

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Tijana M. Rakić

**Hemometrijsko unapređenje razvoja  
metoda tečne hromatografije kroz  
matematičko modelovanje i nove  
funkcije hromatografskog odgovora**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Tijana M. Rakić

**New mathematical modeling techniques  
and chromatographic response  
functions in chemometrical  
advancement of liquid chromatographic  
method development**

Doctorial Dissertation

Belgrade, 2013

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

**Mentor**

---

**Doc. dr Biljana Stojanović, mentor**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet  
Katedra za analitiku lekova

**Članovi komisije**

---

**Prof. dr Darko Ivanović**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet  
Katedra za analitiku lekova

---

**Doc. dr Zorica Stanimirović**  
Univerzitet u Beogradu – Matematički  
fakultet  
Katedra za numeričku matematiku i  
optimizaciju

Datum odbrane

Beograd, \_\_\_\_\_

*Doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Doc. dr Biljani Stojanović, mom mentoru, dugujem neizmernu zahvalnost za stručnu, ali i prijateljsku, pomoć i podršku u svim segmentima izrade ove disertacije. Zahvalna sam na visokim kriterijumima koje je postavila sopstvenim naučnim rezultatima, kao i na velikoj motivaciji da svoje znanje i energiju prenese na mene.*

*Prof. dr Darko Ivanović i prof. dr Mirjana Medenica svojim besprekornim ličnim i profesionalnim primerom uticali su u velikoj meri na mene. Dugujem im zahvalnost na prilici da sa njima sarađujem i da od njih učim.*

*Prof. dr Zorici Stanimirović zahvaljujem za pomoć prilikom izrade dela disertacije koji se odnosi na matematičko modelovanje hromatografskih odgovora.*

*Svim dragim kolegama sa Katedre za analitiku lekova zahvalna sam na pruženoj podršci u zajedničkom radu.*

*Nikoli Rakiću zahvaljujem se za pomoć prilikom tehničkog oblikovanja disertacije.*

*Ovu disertaciju posvećujem mojim roditeljima.*

## **Hemometrijsko unapređenje razvoja metoda tečne hromatografije kroz matematičko modelovanje i nove funkcije hromatografskog odgovora**

### **Rezime**

Primena hemometrijskih tehnika u razvoju metoda tečne hromatografije omogućava da se iz minimalnog broja inicijalnih eksperimenata modeluje ponašanje sistema u funkciji različitih faktora i da se zatim, kreirajući odgovarajuće algoritme, generiše veliki broj simuliranih hromatograma koji će omogućiti automatizovano pretraživanje eksperimentalnog prostora s ciljem pronalaženja optimalnih rešenja. Ovaj proces je u potpunosti zavistan od adekvatnosti definisanog matematičkog modela kao i od odabira funkcije cilja. U ovoj disertaciji predlaže se nova funkcija hromatografskog odgovora kao funkcija cilja u optimizacionim procedurama. Funkcija je dizajnirana tako da procenjuje, istovremeno, kvalitet razdvajanja i ukupnu dužinu trajanja hromatografske analize. Individualni članovi funkcije definisani su tako da omoguće maksimalnu pouzdanost merenja kvaliteta hromatograma, a težinski koeficijenti koji su dodati u dizajn funkcije omogućavaju postavljanje željene ravnoteže između individualnih ciljeva. Funkcija je testirana poređenjem sa šest prethodno razvijenih funkcija hromatografskog odgovora na seriji simuliranih hromatograma i eksperimentalno dobijenih u sistemu reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-LC) i tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (HILIC).

Nakon verifikacije adekvatnosti funkcije cilja da karakteriše hromatogram u celini, novorazvijena funkcija inkorporirana je u metodologiju eksperimentalnog dizajna za optimizaciju metoda za analizu smeše raloksifen hidrohlorida i njegovih nečistoća u RP-LC sistemu, kao i smeše agonista i antagonista beta receptora u HILIC sistemu. Za optimizaciju u oba slučaja primenjen je centralni kompozicioni dizajn. Novorazvijena funkcija hromatografskog odgovora modelovana je i praćena kao jedini odgovor sistema, a optimum je definisan primenom metodologije površine odgovora.

U nastavku istraživanja funkcija je unapređena tako, da osim kvaliteta razdvajanja i dužine trajanja analize, ima sposobnost da proceni oblik dobijenih pikova što može biti

od velikog značaja u farmaceutskoj analizi jer je otežana kvantifikacija pikova neadekvatnog oblika. Unapređena funkcija verifikovana je na seriji eksperimentalno dobijenih hromatograma iz analize smeše antidepresiva u HILIC sistemu, a zatim je primenjena u optimizaciji date metode. Kao eksperimentalni dizajn upotrebljen je  $3^3$  pun faktorski dizajn, a optimum je identifikovan primenom metodologije površine odgovora.

Separacioni mehanizam u HILIC sistemu veoma je složen i nedovoljno proučen što u mnogome otežava modelovanje hromatografskih odgovora konvencionalnim pristupom koji podrazumeva aproksimaciju funkcije polinom drugog stepena primenom višestruke linearne regresije i metode najmanjih kvadrata. Za modelovanje hromatografskog ponašanja smeše antidepresiva u HILIC sistemu predložena je nova tehnika matematičkog modelovanja koja se zasniva na interpolacionom polinomu sa podeljenim razlikama. Tehnika interpolacije omogućava da greška funkcije u interpolacionim čvorovima bude jednaka nuli, a da u svim ostalim bliskim tačkama bude veoma mala. U ovom istraživanju po prvi put primenjena je interpolacija za funkciju od tri promenljive. Predloženo novo matematičko modelovanje primenjeno je za direktno modelovanje retencionih faktora supstanci, dok je funkcija cilja modelovana indirektno. Funkcija cilja kreirana je prilagođavanjem prethodno razvijene funkcije hromatografskog odgovora indirektnom modelovanju. Kao optimizaciona tehnika upotrebljena je metoda pretraživanja čvorova mreže. Identična metodologija koja uključuje modelovanje standardnom kvadratnom formom primenjena je paralelno kako bi se omogućilo poređenje sa novopredloženim matematičkim modelovanjem.

Savremeni trendovi u farmaceutskoj analizi nameću robusnost identifikovanog optimuma kao neminovan cilj kome se mora težiti od samog početka razvoja metode i koji se kasnije u fazi validacije mora potvrditi. Hemometrijske strategije omogućavaju efikasan skrining robusnosti u fazi optimizacije primenom različitih kriterijuma robusnosti, kao i detaljno testiranje robusnosti u fazi validacije primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. U ovoj disertaciji prikazana je primena složenih kriterijuma robusnosti za skrining robusnosti u fazi optimizacije metode za analizu raloksifena i njegovih nečistoća, metode za ispitivanje smeše agonista i antagonista beta receptora i

metode za analizu smeše antidepresiva. Kriterijumi robusnosti zasnovani su na praćenju uticaja faktora na odgovor izračunavanjem vrednosti parcijalnog izvoda funkcije odgovora uzevši u obzir očekivano eksperimentalno variranje faktora.

U završnoj fazi disertacije, predložen je novi pristup kreiranju matematičkih modela iz visoko frakcionisanih dizajna, poput Plaket–Burman dizajna, koji se najčešće koriste za testiranje robusnosti u fazi validacije sledeći hemometrijsku strategiju. Ovi tipovi dizajna imaju kompleksnu strukturu preklapanja glavnih faktora i faktorskih interakcija, a novopredložena metodologija za kreiranje matematičkog modela odgovora omogućava da se iz modela proceni i uticaj faktorskih interakcija. Metodologija je nazvana *Pristup demaskiranja velikih dummy efekata* i zasniva se na otkrivanju efekata interakcija koje su sakrivene iza velikih vrednosti *dummy* efekata. Novi pristup verifikovan je na primeru testiranja robusnosti tri prethodno razvijene metode za analizu raloksifena i njegovih nečistoća, smeše agonista i antagonista beta receptora i smeše antidepresiva.

**Ključne reči:** hemometrija, funkcije hromatografskog odgovora, matematički modeli, eksperimentalni dizajn, tečna hromatografija, optimizacija, robusnost

Naučna oblast: Farmaceutska hemija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

UDK broj:

## **New mathematical modeling techniques and chromatographic response functions in chemometrical advancement of liquid chromatographic method development**

### **Abstract**

The application of chemometrical techniques in liquid chromatographic method development enables modeling of system behavior dependence on several factors after performing minimal number of experiments. Further on, by creating the appropriate algorithms, the large number of simulated chromatograms is constructed providing automatized experimental space search and identification of optimal solutions. This process is completely dependent on the accuracy of defined mathematical model and chosen objective function. This dissertation proposes a new chromatographic response function for optimization strategies. The function is designed to simultaneously estimate the quality of separation and the total analysis duration. Individual function terms are defined to provide maximal reliability in chromatograms quality evaluation and weighting factors are added to enable the proper adjustment of balance between individual goals. The function is compared with six previously developed chromatographic response functions on set of simulated chromatograms and experimentally obtained chromatograms in reversed-phased liquid chromatography (RP-LC) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC).

After the function ability to estimate the chromatograms adequately had been confirmed, it was incorporated in Design of experiments methodology for the optimization of method for the analysis of raloxifene hydrochloride and its impurities in RP-LC system, as well as mixture of agonists and antagonists of beta receptors in HILIC system. The optimization in both cases is performed applying central composite design. The newly developed function was the only output of the system and the optimum is located by response surface methodology.

Further on, the function is improved to estimate the peak shape along with separation quality and analysis duration. This is very important in pharmaceutical analysis since the quantification of peaks of inadequate shape is very difficult. Improved function is verified on a set of experimentally obtained chromatograms acquired in the analysis of



antidepressants in HILIC system and subsequently applied for method optimization. The experiments are performed according to  $3^3$  full factorial design and the optimum is located by response surface methodology.

Separation mechanism in HILIC is very complex which makes the conventional modeling of chromatographic responses by second order polynomial models obtained by multi linear regression and least squares method rather difficult. This dissertation proposes modeling of chromatographic behavior of antidepressants mixture in HILIC by interpolation polynomial with divided differences. By interpolation, the function is approximated so that it strives to pass through the experimental points, but also to minimize the deviation of the remaining experimental region from the function. This dissertation for the first time presents the application of interpolation polynomial with divided differences for a function of three variables. Retention factors of investigated substances are modeled directly by newly proposed mathematical modeling, while the objective function is modeled indirectly. The objective function is created adjusting the previously developed chromatographic response function for indirect modeling. The optimization is performed by grid point search. The performances of the proposed mathematical modeling are simultaneously compared to traditionally applied quadratic function.

Recent trends in pharmaceutical analysis emphasize the importance of identified optimum robustness as an aim which should be incorporated in method development from the very beginning and subsequently confirmed in the validation phase. Chemometrical strategies enable efficient robustness screening in the method optimization phase by application of different robustness criteria, as well as through robustness testing in validation phase applying experimental design methodology. This dissertation presents the application of complex robustness criteria in robustness screening during the optimization of methods for the analysis of raloxifene and its impurities, mixture of agonists and antagonist of beta receptors and mixture of antidepressants. The applied robustness criteria are based on tracking the influence of factors on the response calculating the partial derivatives of the response function taking into consideration the expected experimental variation of the factors.

The final part of dissertation proposes a new approach for creation of mathematical models from highly fractionated designs such as Plackett-Burman design. Plackett-Burman design is the most widely used design in robustness testing by applying chemometrical strategy. This type of designs has a complex structure of main factors and factors interactions. The newly proposed strategy enables creation of mathematical models which can estimate both main factors and factors interactions. The methodology is designated as *Demasking large dummy factor effects* and based on revealing the important factor interactions confounded with large dummy factor effects. The new approach is verified on robustness testing of three previously developed methods for the analysis of raloxifene and its impurities, mixture of agonists and antagonists of beta receptors and mixture of antidepressants.

**Key words:** chemometrics, chromatographic response functions, mathematical models, experimental design, liquid chromatography, optimization, robustness

Research area: Pharmaceutical chemistry

Specific research area: Drug analysis

UDK number:

<b>1. HEMOMETRIJSKI PRISTUP RAZVOJU METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE</b>	<b>1</b>
<b>2. HEMOMETRIJSKI PRISTUP OPTIMIZACIJI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE</b>	<b>4</b>
<b>2.1. DEFINISANJE CILJA OPTIMIZACIJE</b>	<b>4</b>
<b>2.2. ODABIR FAKTORA KOJI ĆE BITI OPTIMIZIRANI</b>	<b>4</b>
<b>2.3. ODABIR FAKTORSKIH NIVOVA</b>	<b>5</b>
<b>2.4. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA</b>	<b>6</b>
<b>2.5. ODABIR ODGOVORA KOJI ĆE BITI PRAĆEN</b>	<b>6</b>
2.5.1. ELEMENTARNI KRITERIJUMI RAZDVAJANJA	7
2.5.2. GLOBALNI KRITERIJUMI RAZDVAJANJA	10
2.5.3. FUNKCIJE HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA	11
<b>2.6. KREIRANJE MATEMATIČKOG MODELA</b>	<b>17</b>
2.6.1. MATEMATIČKO MODELOVANJE HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA TEHNIKOM VIŠESTRUKI LINEARNE REGRESIJE	17
2.6.2. MATEMATIČKO MODELOVANJE HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA METODOM INTERPOLACIJE	23
2.6.3. INDIREKTNO MODELOVANJE KOMPLEKSNIH HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA	26
<b>2.7. IDENTIFIKACIJA OPTIMALNIH USLOVA</b>	<b>29</b>
<b>3. HEMOMETRIJSKI PRISTUP ISPITIVANJU ROBUSNOSTI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE</b>	<b>31</b>
<b>3.1. SKRINING ROBUSNOSTI U TOKU OPTIMIZACIJE</b>	<b>31</b>
<b>3.2. TESTIRANJE ROBUSNOSTI METODOLOGIJOM EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA</b>	<b>36</b>
3.2.1. ODABIR FAKTORA KOJI ĆE BITI ISPITIVANI	36
3.2.2. ODABIR FAKTORSKIH NIVOVA	36
3.2.3. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA	37
3.2.4. ODABIR ODGOVORA KOJI ĆE BITI PRAĆENI	37
3.2.5. KREIRANJE MATEMATIČKOG MODELA IZ PLAKET–BURMAN DIZAJNA	37

3.2.6. PROCENA ZANAČAJNOSTI FAKTORA	44
<b>4. PREGLED LITERATURE</b>	<b>45</b>
4.1. PRIMENA FUNKCIJA HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA I KRITERIJUMA ROBUSNOSTI U OPTIMIZACIJI I ISPITIVANJU ROBUSNOSTI METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE	45
4.2. MATEMATIČKO MODELOVANJE ODGOVORA NAKON PRIMENE VISOKOFRAKCIONISANIH DIZAJNA	52
<b>5. CILJ RADA</b>	<b>56</b>
<b>6. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	<b>58</b>
6.1. APARATI I REAGENSI	58
6.2. STANDARDNE SUPSTANCE	59
6.2.1. HEMIJSKA STRUKTURA ANALIZIRANIH SUPSTANCI	60
6.3. ANALIZA RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA	67
6.3.1. RAZVOJ OSNOVNE METODE	67
6.3.2. <i>BACK UP</i> METODA	70
6.3.3. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE	70
6.4. ANALIZA SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA	73
6.4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE	73
6.4.2. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE	75
6.5. ANALIZA SMEŠE ANTIDEPRESIVA	78
6.5.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE	78
6.5.2. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE	80
<b>7. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>84</b>
7.1. RAZVOJ NOVE FUNKCIJE HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA	84
7.1.1. VERIFIKACIJA FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI SIMULIRANIH HROMATOGRAMA	89
7.1.2. VERIFIKACIJA FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U RP-LC SISTEMU	98

7.1.3. VERIFIKACIJE FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U HILIC SISTEMU	113
<b>7.2. UNAPREĐENJE FUNKCIJE HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA</b>	<b>128</b>
7.2.1. VERIFIKACIJA UNAPREĐENE FUNKCIJE $N_{CRF}^*$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U HILIC SISTEMU	129
<b>7.3. RAZVOJ NOVE TEHNIKE MATEMATIČKOG MODELOVANJA HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA</b>	<b>145</b>
7.3.1. VERIFIKACIJA NOVE TEHNIKE MATEMATIČKOG MODELOVANJA NA PRIMERU ANALIZE SMEŠE ANTIDEPRESIVA U HILIC SISTEMU	146
<b>7.4. SKRINING ROBUSNOSTI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE PRIMENOM KRITERIJUMA ZA PROCENU ROBUSNOSTI</b>	<b>164</b>
7.4.1. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA	165
7.4.2. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA	174
7.4.3. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE SMEŠE ANTIDEPRESIVA	180
<b>7.5. RAZVOJ NOVE METODOLOGIJE KREIRANJA MATEMATIČKIH MODELA IZ PLAKET–BURMAN DIZAJNA U TESTIRANJU ROBUSNOSTI METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE</b>	<b>187</b>
7.5.1. METODOLOGIJA DEMASKIRANJA VELIKIH <i>DUMMY</i> EFEKATA	187
7.5.2. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA	191
7.5.3. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA	206
7.5.4. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU SMEŠE ANTIDEPRESIVA	213
<b>8. ZAKLJUČAK</b>	<b>222</b>
<b>9. LITERATURA</b>	<b>225</b>

## **10. PRILOG**

## **11. BIOGRAFIJA AUTORA**

## **1. HEMOMETRIJSKI PRISTUP RAZVOJU METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE**

Savremene hemometrijske tehnike u razvoju metoda tečne hromatografije omogućavaju detaljnu analizu sistema i rešavanje veoma kompleksnih analitičkih problema koji se jednostavnim eksperimentalnim pristupom tipa pokušaj–pogreška ne mogu rešiti.

Prilikom razvoja hromatografske metode, kao cilj može se postaviti pronalaženje eksperimentalnih uslova koji omogućavaju maksimalan kvalitet separacije svih analiziranih supstanci, minimalnu dužinu trajanja analize, adekvatan oblik dobijenih pikova, maksimalnu robusnost postavljenih uslova, ili u idealnom slučaju, postizanje svih ovih ciljeva istovremeno. U slučaju analize kompleksnih analitičkih smeša koje sadrže više supstanci sa različitim fizičko–hemijskim karakteristikama, za postizanje ovakvog cilja pristupom pokušaj–pogreška potrebno je izvesti veoma veliki broj eksperimenata. Međutim, još bitnija je činjenica da postoji velika opasnost da ovakav pristup identifikuje samo lokalni optimum, ili da uopšte ne identifikuje optimum.

Hemometrijski pristup koristi matematičke i statističke tehnike koje omogućavaju da se na osnovu malog broja dobro isplaniranih eksperimenata detaljno opiše hromatografsko ponašanje sistema. Na taj način, dalji proces optimizacije vrši se teorijskim pretraživanjem eksperimentalnog prostora bez izvođenja novih eksperimenata. Ovakva strategija obuhvata dva ključna koraka: modelovanje sistema i predviđanje ponašanja sistema kompjuterskom simulacijom.

U okviru prvog koraka, inicijalni eksperimenti definisani primenom eksperimentalnog dizajna treba da omoguće konstruisanje jednačina ili treniranje algoritama koji uspostavljaju matematičku vezu između ispitivanih faktora i odabranih odgovora koji se prate. Kreiranim matematičkim modelima mogu se predvideti hromatografski odgovori za bilo koju kombinaciju eksperimentalnih faktora.

U drugom koraku, eksperimentalni prostor detaljno se pretražuje ispitivanjem vrednosti svih odabranih odgovora za veliki broj eksperimentalnih uslova. Na taj način, dobija se

niz simuliranih hromatograma koji odgovaraju određenom setu eksperimentalnih uslova koji se pažljivo menja kroz proces optimizacije, a zatim se procenjuje kvalitet dobijenih hromatograma kako bi se identifikovao globalni optimum. Kako bi se pronašli najbolji eksperimentalni uslovi, informacija sadržana u simuliranim hromatogramima može se prevesti u numeričku vrednost koja će se pratiti u toku optimizacije. Matematički izraz koji omogućava praćenje kvaliteta hromatograma naziva se funkcija cilja ili funkcija hromatografskog odgovora. Osim separacije, funkcije cilja mogu procenjivati i ukupnu dužinu trajanja analize, željeni oblik pikova, robusnost postignutog optimuma, itd. Na taj način, problem optimizacije svodi se na problem pronalaženja najadekvatnije vrednosti funkcije hromatografskog odgovora koja će omogućiti podešavanje eksperimentalnih uslova tako da vode željenom ponašanju sistema [1, 2]. Validnost rezultata optimizacije hemometrijskim pristupom zavisi od tačnosti kojom definisani matematički modeli simuliraju hromatograme i sposobnosti funkcije hromatografskog odgovora da procenjuje hromatograme na onaj način na koji bi to uradio i analitičar.

Konačno, jednom identifikovani optimalni uslovi prihvatljivi su samo ako su eksperimentalno održivi, odnosno ako je potvrđena robusnost optimuma. Robusnost optimuma poželjno je procenjivati hemometrijskim tehnikama već u ranoj fazi razvoja i optimizacije metode kako bi se izbeglo kreiranje očigledno nerobusnih metoda. Po završetku procesa optimizacije, potrebno je sprovesti eksperimentalno testiranje robusnosti koje se takođe može izvesti primenom hemometrijskog pristupa. U ovom slučaju, kao i u fazi optimizacije, potrebno je kreirati matematičke modele koji će opisati variranje sistema u zavisnosti od odabranih eksperimentalnih faktora. Testiranje robusnosti podrazumeva ispitivanje mnogo većeg broja faktora u odnosu na one uključene u fazu optimizacije zbog čega zahteva primenu visokofrakcionisanih tipova eksperimentalnog dizajna.



U uvodnom delu ove disertacije biće izložena hemometrijska strategija za razvoj i optimizaciju metode tečne hromatografije sa posebnim akcentom stavljenim na kreiranje matematičkih modela hromatografskih odgovora i dizajniranje funkcija hromatografskog odgovora. U narednom poglavlju, biće izložena primena složenih kriterijuma robusnosti u ispitivanju robusnosti optimuma, kao i kreiranje unapređenih matematičkih modela hromatografskih odgovora nakon analize visokofrakcionisanim dizajnima u okviru eksperimentalnog testiranja robusnosti.

## **2. HEMOMETRIJSKI PRISTUP OPTIMIZACIJI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE**

Hemometrijski pristup optimizaciji metode uključuje sledeće korake [2, 3]:

- 1) Definisanje cilja optimizacije
- 2) Odabir faktora koji će biti optimizirani
- 3) Odabir faktorskih nivoa
- 4) Odabir eksperimentalnog dizajna
- 5) Odabir odgovora koji će biti praćen
- 6) Kreiranje matematičkog modela
- 7) Identifikacija optimalnih uslova

### **2.1. DEFINISANJE CILJA OPTIMIZACIJE**

Metode tečne hromatografije imaju široku primenu u analizi farmaceutski aktivnih supstanci i njihovih nečistoća. U zavisnosti od namene metode koja se razvija, ciljevi optimizacije mogu biti različiti. U kvantitativnoj analizi poželjno je postizanje potpunog razdvajanja svih analiziranih supstanci, dok je u kvalitativnoj analizi dovoljno i postizanje delimičnog razdvajanja supstanci. Posle separacije, minimizacija dužine trajanja analize jedan je od najznačajnijih ciljeva koji se mogu definisati. U slučaju razvoja metode za kvantifikaciju supstanci, adekvatan oblik pikova i robusnost postavljenih uslova mogu biti značajni ciljevi.

### **2.2. ODABIR FAKTORA KOJI ĆE BITI OPTIMIZIRANI**

Nakon definisanja cilja optimizacije, potrebno je odabrati faktore koji će biti optimizirani. Identifikacija ključnih faktora može se izvršiti primenom skrining dizajna u okviru koga se ispituje veliki broj različitih faktora, kako bi se izolovali oni koji značajno utiču na sistem. U hromatografskim problemima često je i samo iskustvo analitičara i određeni broj preliminarnih eksperimenata dovoljno da se odaberu faktori koji će ući u fazu optimizacije. Veoma je važno da se broj ispitivanih faktora svede na minimum kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata i olakšao postupak kreiranja

matematičkih modela i pretrage eksperimentalnog prostora. Ovakav pristup minimizacije broja faktora potpuno je opravdan, jer se za većinu hromatografskih sistema mogu identifikovati svega tri do četiri ključna faktora čiji uticaj na sistem nije opšte poznat, već ga treba detaljno ispitati.

### **2.3. ODABIR FAKTORSKIH NIVOA**

Odabir faktorskih nivoa veoma je bitan korak u metodologiji eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE metodologija). Ako se definišu previše uski intervali variranja faktora, region eksperimentalnog prostora koji se pretražuje biće sužen. U tom slučaju, nije realno očekivati da će DoE metodologija uspeti da pronađe mnogo bolji optimum od onoga do koga se došlo u toku preliminarnih ispitivanja, jer će sva definisana pomeranja voditi samo malim promenama posmatranih odgovora. Na taj način, primena hemometrijskog pristupa vodiće matematičkoj i statističkoj analizi koje će zahtevati vreme za izvođenje eksperimenata i računске procedure, a neće dovesti do značajnog poboljšanja metode. S druge strane, odabir širokih faktorskih intervala omogućava detaljnu pretragu većeg dela eksperimentalnog prostora što pruža mogućnost pronalazaženja optimuma koji su značajno drugačiji i bolji od pronađenih u fazi preliminarnih ispitivanja. Međutim, što je interval variranja faktora širi, to je kompleksnost funkcionalne zavisnosti odgovora od tog faktora veća. Kako se u standardnim procedurama hemometrijske optimizacije, kao matematički modeli koriste uglavnom jednostavnije funkcije (linearne i kvadratne), postoji veliki rizik da one neće uspeti da opišu adekvatno posmatrani sistem. U tom slučaju, neophodno je podesiti faktorske intervale tako da je moguća aproksimacija jednostavnim funkcijama u tom regionu. U slučaju da je ipak neophodno odabrati široki interval variranja faktora, potrebno je kreirati složenije matematičke modele koji će moći adekvatno da aproksimiraju zavisnost odgovora od ispitivanih faktora.

## 2.4. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA

Vrste eksperimentalnog dizajna koje se koriste u fazi optimizacije metode uključuju pun faktorski dizajn, centralni kompozicioni dizajn, Boks–Benken (eng. *Box–Behenken*) dizajn, Delert (eng. *Doehlert*) dizajn, D–optimalni dizajn, itd. Odabir dizajna koji će se koristiti za odgovarajući problem zavisi od vrste ispitivanih faktora, njihovih intervala variranja, prihvatljivog broja eksperimenata, očekivanja analitičara. Važna karakteristika svakog dizajna je broj nivoa na kojima se ispituju faktori. Dizajni za optimizaciju metode najčešće analiziraju tri nivoa za svaki faktor što omogućava aproksimaciju funkcije cilja polinomom drugog stepena, čije promenljive odgovaraju posmatranim faktorima. Ukoliko se očekuje da će i linearna funkcija moći da opiše zavisnost na odgovarajući način, moguća je i primena punog faktorskog dizajna koji ispituje dva nivoa faktora [4, 5].

## 2.5. ODABIR ODGOVORA KOJI ĆE BITI PRAĆEN

Nakon svake hromatografske analize direktnim očitavanjem sa hromatograma mogu se odrediti jednostavni hromatografski odgovori koji karakterišu individualne pikove kao što su:

- retenciono vreme:  $t_r$
- širina pika na baznoj liniji ili na određenoj visini u odnosu na baznu liniju:  $w$
- redukovano retenciono vreme koje se izračunava prema formuli:

$$t_r' = t_r - t_0 \quad (1)$$

gde je  $t_0$  retenciono vreme pika mobilne faze

- retencioni faktor koji se izračunava prema formuli:

$$k = (t_r - t_0)/t_0 \quad (2)$$

Svi ovi odgovori mogu se modelovati i na taj način može se odrediti njihovo variranje u zavisnosti od variranja odabranih faktora. Međutim, ovakvi odgovori govore samo o karakteristikama hromatografskog ponašanja pojedinačnih supstanci, pa je osim njih potrebno definisati i hromatografske odgovore koji su pokazatelj ukupnog kvaliteta hromatograma. U takve odgovore spadaju kriterijumi koji procenjuju elementarno i globalno razdvajanje, kao i funkcije hromatografskog odgovora.

### 2.5.1. ELEMENTARNI KRITERIJUMI RAZDVAJANJA

Elementarni kriterijumi razdvajanja procenjuju kvalitet razdvajanja za jedan par pikova [1]. Pogodni su u slučaju analize jednostavnih smeša, poput onih koje sadrže samo dve supstance. Najjednostavniji elementarni kriterijum razdvajanja je faktor selektivnosti:

$$\alpha = k_{i+1}/k_i \quad (3)$$

gde je  $k_i$  retencioni faktor analizirane supstance.

Nešto složeniji kriterijum koji uzima u obzir i širinu pikova je faktor rezolucije:

$$Rs = 2(t_{i+1} - t_i)/(w_{i+1} + w_i) \quad (4)$$

gde je  $t_i$  retenciono vreme, a  $w_i$  širina pika analizirane supstance na baznoj liniji.

Takođe, predloženo je i više kriterijuma koji se zasnivaju na *peak to valley* odnosu (odnos visine pika i doline koja spaja dva susedna pika) [6]. Kajzerova (eng. *Kaiser*) definicija ovog odnosa je:

$$\theta = f/g \quad (5)$$

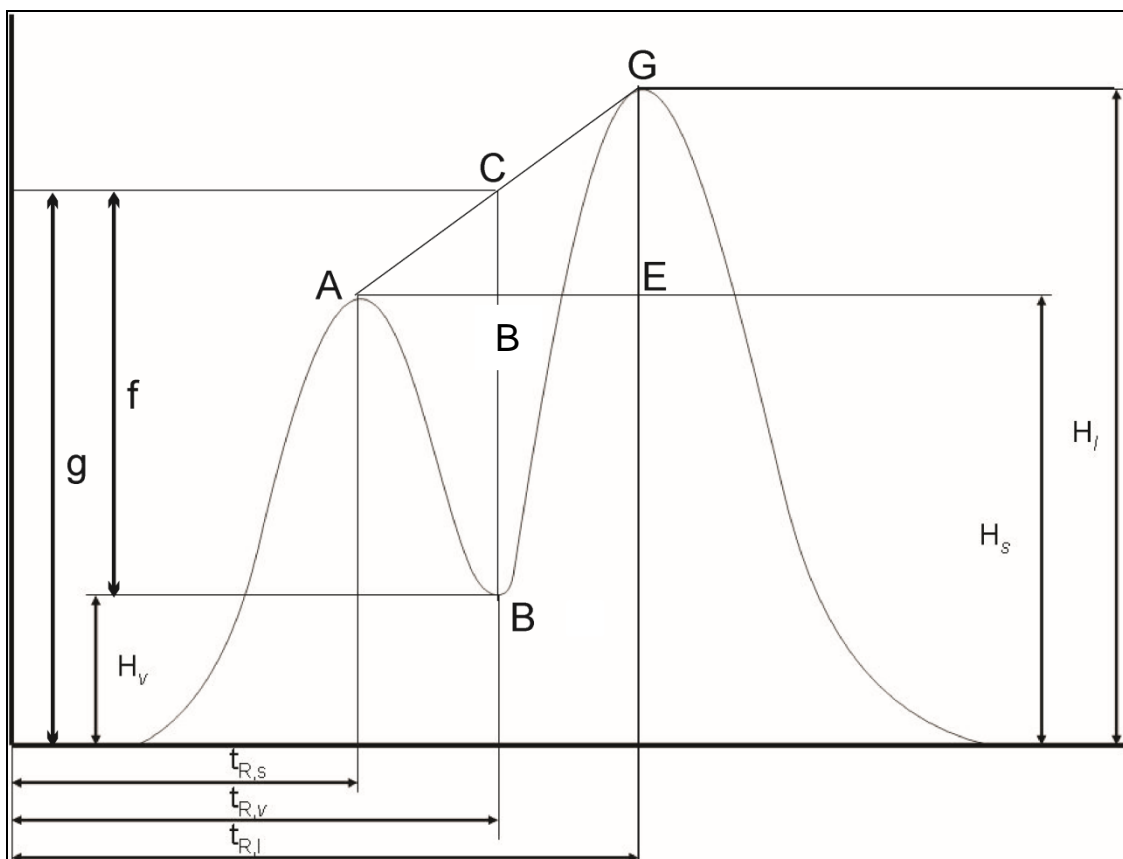
gde  $f$  predstavlja rastojanje između doline koja razdvaja dva pika i linije koja povezuje vrhove pikova, dok  $g$  predstavlja rastojanje od bazne linije do linije koja povezuje vrhove oba pika.

Međutim, procena  $\theta$  kriterijuma razdvajanja na ovaj način postaje problematična kada su susedni pikovi veoma različite površine, odnosno kada su oni disproporcionalni, jer linija koja povezuje vrhove pikova i linija koja seče dolinu postaju gotovo paralelne što otežava tačno lociranje presečne tačke i time onemogućava precizno merenje  $f$  i  $g$ .

Kako bi se prevazišao ovaj nedostatak, Karl (eng. *Carle*) [7, 8] je predložio izračunavanje  $f$  i  $g$  iz parametara koji se mogu preciznije očitati sa hromatograma. Prema Karlu  $f$  i  $g$  se mogu definisati na sledeći način (slika 1):

$$\theta_{s,l} = (\overline{BC} + H_s - H_v) / (\overline{BC} + H_s) = 1 - (H_v / (\overline{BC} + H_s)) \quad (6)$$

gde je  $H_s$  visina prvog pika, a  $H_v$  visina doline.



**Slika 1.** Parametri koji ulaze u izračunavanje  $\theta$  separacionog kriterijuma:

$H_s$  i  $H_l$  – visine susednih pikova,  $H_v$  – visina doline,  $t_{R,s}$  i  $t_{R,l}$  – retenciona vremena pikova i  $t_{R,v}$  – položaj doline

Kako su trouglovi ABC i AEG slični, odgovarajuće stranice su proporcionalne i može se postaviti sledeća ekvivalentnost:

$$\overline{BC} / \overline{AB} = \overline{EG} / \overline{AE} = (H_l - H_s) / (t_{R,l} - t_{R,s}) \quad (7)$$

gde su  $H_s$  i  $H_l$  visine susednih pikova, a  $t_{R,s}$  i  $t_{R,l}$  retenciona vremena pikova.

Kako bi se rešila ova jednačina, AB se mora zameniti razlikom  $(t_{R,v} - t_{R,s})$  što odgovara rastojanju između doline i retencionog vremena prvog pika. Na taj način dobija se sledeća jednačina:

$$\overline{BC} = ((t_{R,v} - t_{R,s}) \times (H_l - H_s)) / (t_{R,l} - t_{R,s}) \quad (8)$$

gde je  $t_{R,v}$  položaj doline.

Zamenom BC u prvu jednačinu može se izvesti:

$$\theta_{s,l} = 1 - (H_v \times (t_{R,l} - t_{R,s})) / ((t_{R,v} - t_{R,s}) \times (H_l - H_s) + H_s \times (t_{R,l} - t_{R,s})) \quad (9)$$

Ova jednačina na adekvatan način opisuje par pikova na datoj slici 1 gde je prvi izlazeći pik manje površine od drugog. Da bi jednačina važila i za obrnut slučaj, potrebno je preći na apsolutne vrednosti razlika retencionih vremena čime se dobija konačan oblik za izračunavanje  $\theta$  kriterijuma:

$$\theta_{s,l} = 1 - \left( \left( H_v \times |t_{R,l} - t_{R,s}| \right) / \left( |t_{R,v} - t_{R,s}| \times (H_l - H_s) + H_s \times |t_{R,l} - t_{R,s}| \right) \right) \quad (10)$$

#### 2.5.2. GLOBALNI KRITERIJUMI RAZDVAJANJA

U slučaju analize smeša koje sadrže više od dve supstance, elementarni kriterijumi razdvajanja nisu dovoljni jer se oni odnose samo na kvalitet razdvajanja jednog para pikova [1, 9]. U tom slučaju, potrebno je izvršiti merenje globalne separacije koja će oslikavati ceo hromatogram. Princip ocene globalne separacije zasniva se na prevođenju elementarnih rezolucija ( $r_i$ ) na jednu numeričku vrednost ( $R$ ) koja opisuje sveobuhvatnu distribuciju pikova. Najjednostavniji način za rešavanje ovog problema je upotreba faktora rezolucije za najlošije razdvojeni par pikova, tj. minimalnog ili kritičnog faktora rezolucije:

$$R = \min\{r_1, \dots, r_n\} \quad (11)$$

Ovakav kriterijum je primenljiv uvek kada se može identifikovati kritičan par pikova. Međutim, on je neosetljiv na razdvajanje ostalih parova pikova. Stoga se može desiti da se kvalitet dva hromatograma sa istim kritičnim faktorom rezolucije i bitno različitim rezolucijama između ostalih parova pikova jednako oceni.



Globalni kriterijumi razdvajanja koji uzimaju u obzir rezoluciju za svaki prisutan par pikova uključuju proizvod faktora rezolucije:

$$R = \prod_{i=1}^n r_i \quad (12)$$

i normalizovan proizvod faktora rezolucije:

$$R = \frac{\prod_{i=1}^n r_i}{[(\sum_{i=1}^n r_i)/n]^n} \quad (13)$$

gde  $n$  predstavlja broj pikova ili parova pikova. Međutim, na vrednosti proizvoda faktora rezolucije dominantno utiču loše razdvojeni pikovi. Stoga optimizacija zasnovana na ovim kriterijumima teži da brzo odbacuje uslove gde su dva ili više pikova nerazdvojeni. Mana ovih kriterijuma ogleda se i u činjenici da se bolje vrednosti kriterijuma dobijaju za hromatograme sa potpuno preklapljenim nego za one sa delimično preklapljenim pikovima [9].

### 2.5.3. FUNKCIJE HROMATOGRFSKOG ODGOVORA

Funkcije hromatografskog odgovora (eng. *Chromatographic Response Function – CRF*) predstavljaju matematičko rešenje za objektivno vrednovanje hromatograma u pogledu više definisanih kriterijuma kvaliteta [10, 11]. Kao primarni cilj hromatografske analize, CRF procenjuju kvalitet postignutog razdvajanja analiziranih supstanci ali ujedno poseduju sposobnost da ocene i brojne druge sekundarne ciljeve poput minimalne dužine trajanja analize, robusnosti optimuma, odgovarajuće simetrije pikova, itd. Matematički su dizajnirane tako da se sastoje iz više članova od kojih svaki procenjuje po jednu karakteristiku kvaliteta hromatograma. Zatim se individualni članovi međusobno kombinuju i kao konačna vrednost funkcije dobija se jedinstvena numerička vrednost. Na taj način, svaki dobijeni hromatogram biće objektivno ocenjen što omogućava istovremeno poređenje i rangiranje velikog broja hromatograma. CRF omogućavaju analitičaru da unapred definiše svoja očekivanja od željnog optimuma, a da u proceduri optimizacije metode celokupan proces vrednovanja hromatograma bude automatizovan. Naime, umesto da analitičar vrši vizuelnu procenu svakog pojedinačnog

hromatograma kako bi ocenio njegovu prihvatljivost, funkcije hromatografskog odgovora inkorporirane u jednostavne kompjuterske programe rešavaju ovaj problem za veoma kratko vreme.

Međutim, da bi se jedna funkcija hromatografskog odgovora koristila kao jedinstvena funkcija cilja optimizacije, ona mora biti dovoljno pouzdana i sposobna da sa dovoljnom tačnošću procenjuje hromatograme. Iako je u literaturi do sada razvijen veliki broj CRF, nijedna od njih nije univerzalno primenljiva upravo zbog činjenice da je nemoguće formulirati funkciju koja će biti „idealna“. Sela (eng. *Cela*) [10, 12] je definisao sledeće fundamentalne zahteve koje bi idealna funkcija trebalo da ispuni:

- 1) funkcija treba da bude efikasna u poređenju i razlikovanju kvaliteta hromatograma i
- 2) funkcija treba da bude efikasna u kvantitativnom rangiranju kvaliteta hromatograma.

Pored ovih suštinskih, postoji niz drugih poželjnih svojstava koje bi ona trebalo da sadrži:

- 3) da odgovara očekivanjima analitičara,
- 4) da zavisi od parametara koje analitičar može kontrolisati, a ne uključuje parametre koje nije moguće kontrolisati,
- 5) da pokazuje razumnu korelaciju sa separacionim parametrima kako bi ukazala analitičaru na koji način može poboljšati sledeći eksperimentalni pokušaj i
- 6) da bude matematički korektna.

Kada je reč o fundamentalnim zahtevima koji se stavljaju pred svaku funkciju, oni se odnose na činjenicu da svaka CRF mora imati adekvatno dizajnirane individualne članove koji opisuju pojedine kvalitete hromatograma. Ti članovi moraju, pre svega, biti sposobni da detektuju, a onda i da na dovoljno precizan način kvantifikuju određeno svojstvo. Većina funkcija hromatografskog odgovora sastoji se iz člana koji procenjuje razdvajanje i člana koji procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize. U članove koji procenjuju razdvajanje mogu ući različiti individualni kriterijumi separacije (faktor selektivnosti, faktor rezolucije,  $\theta$  kriterijum) i globalni kriterijumi separacije (proizvod ili zbir faktora rezolucije). Sve prednosti i mane koje nose individualni ili globalni kriterijumi koji ulaze u sastav funkcije odraziće se i na tačnost vrednovanja separacije

cele CRF. Član koji procenjuje dužinu trajanja analize najčešće je dizajniran tako da bude funkcija položaja poslednje eluirane supstance. Funkcije koje uključuju i mogućnost procene robusnosti odgovora, taj član najčešće predstavljaju kao prvi izvod odgovora po određenom ispitivanom faktoru. Pojedine CRF koje su dizajnirane za analizu višekomponentnih nepoznatih smeša poseduju i član koji meri broj supstanci koje su eluirane u jednoj analizi. Ovaj parametar najčešće se definiše kao broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu.

Kada se jednom definiše način merenja individualnih članova u okviru funkcije, treba ih uravnotežiti tako da njihov međusobni odnos reflektuje cilj optimizacije. U tom smislu, bitno je da funkcija odgovara očekivanjima analitičara i da bude kontrolisana parametrima koje podešava analitičar. Međutim, ove zahteve je u praksi jako teško ispuniti. Upravo zbog toga je razvijen veliki broj CRF jer očekivanja različitih analitičara za različite separacione probleme mogu biti potpuno drugačija. Hromatografski problem može se definisati tako da je cilj optimizacije postizanje razdvajanja sa jako visokim vredostima faktora rezolucije ili nekog drugog separacionog kriterijuma. S druge strane, može se desiti da je poželjnije delimično razdvajanje komponenti u što manjem vremenu trajanja analize od potpunog razdvajanja. Ista funkcija hromatografskog odgovora neće moći jednako dobro da reši oba problema. Najpogodniji način za kreiranje funkcije koja je prilagodljiva različitim problemima je dodavanje težinskih faktora koji prate individualne članove. Iako težinski faktori unose u dizajn funkcije subjektivnu ocenu analitičara u pogledu njihove vrednosti, to je najbolji pristup da analitičar definiše šta su zaista njegova očekivanja od metode. U literaturi je razvijen jako mali broj CRF koje ne sadrže težinske faktore i za njih je realno očekivati da su primenljive samo u pojedinim separacionim problemima. Međutim, dodavanje težinskih faktora ne rešava u svim funkcijama podešavanje uticaja individualnih članova jer funkcije mogu biti tako dizajnirane da je članove nemoguće uravnotežiti.

Jedna od poželjnih karakteristika koja se očekuje od CRF je da pokazuje razumnu korelaciju sa separacionim parametrima kako bi analitičar mogao da planira sledeći eksperimentalni pokušaj. U opštem slučaju, funkcije koje sadrže manji broj

individualnih članova lakše su za interpretaciju i jednostavnije je uspostaviti korelaciju njihove numeričke vrednosti sa stvarnim izgledom hromatograma.

Ukoliko se kao odgovor optimizacije prate funkcije hromatografskog odgovora, kao cilj postavlja se maksimizacija ili minimizacija funkcije, u zavisnosti od toga da li funkcija teži minimumu ili maksimumu kako se približava optimumu. Uticaj individualnih članova funkcije na ukupnu vrednost funkcije podešava se vrednostima težinskih koeficijenata tako da bude u skladu sa definisanim ciljem optimizacije.

U nastavku poglavlja biće predstavljene neke od najčešće korišćenih funkcija hromatografskog odgovora.

1. Beridžova (eng. *Berridge*) funkcija hromatografskog odgovora [13]:

$$B_{CRF} = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 (T_1 - T_0) \quad (14)$$

gde je  $R_i$  faktor rezolucije između  $i$ -tog para pikova;  $L$  broj parova pikova;  $T_A$  maksimalno prihvatljivo retenciono vreme poslednjeg pika,  $T_L$  retenciono vreme poslednjeg pika,  $T_1$  retenciono vreme prvog pika i  $T_0$  minimalno prihvatljivo retenciono vreme prvog pik,  $w_1$ ,  $w_2$  i  $w_3$  su težinski faktori koje bira analitičar.

Beridžova funkcija je prva funkcija hromatografskog odgovora koja je razvijena u literaturi. Sastoji se iz četiri člana: prvi procenjuje kvalitet razdvajanja sabirajući faktore

rezolucije  $\left( \sum_{i=1}^L R_i \right)$ , drugi procenjuje broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu

( $L$ ), treći procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize ( $T_A - T_L$ ) i četvrti procenjuje retenciono vreme prvog pika koji se pojavio na hromatogramu ( $T_1 - T_0$ ).

2. Glajcova (eng. *Glajch*) funkcija hromatografskog cilja [14]:

$$COF = \sum_{i=1}^n A_i \ln(R_i / R_{id}) + B(t_m - t_n) \quad (15)$$

gde je  $R_i$  eksperimentalno dobijeni faktor rezolucije,  $R_{id}$  željeni faktor rezolucije za susedne pikove,  $t_m$  maksimalno prihvatljivo dobijeno retenciono vreme poslednjeg pika i  $t_n$  eksperimentalno dobijeno retenciono vreme poslednjeg pika,  $A_i$  i  $B$  su težinski faktori.

Ova funkcija sastoji se iz člana koji procenjuje razdvajanje  $\left( \sum_{i=1}^n A_i \ln(R_i / R_{id}) \right)$  i člana koji procenjuje ukupnu dužnu trajanja analize  $(B(t_m - t_n))$ .

3. Dozova (eng. *Dose*) funkcija hromatografskog odgovora [15]:

$$DO_{CRF} = \frac{t_{R,n}}{t_{R,cri}} + \sum_{i \neq j} e^{-R_{s,ij}/R_{s,cri}} \quad (16)$$

gde je  $t_{R,n}$  retenciono vreme poslednjeg pika,  $t_{R,cri}$  željeno optimalno vreme trajanja analize,  $R_{s,ij}$  eksperimentalno dobijen faktor rezolucije za susedne pikove,  $R_{s,cri}$  željeni faktor rezolucije koji postavlja analitičar.

Dozova funkcija se takođe sastoji iz člana koji procenjuje vreme  $\left( \frac{t_{R,n}}{t_{R,cri}} \right)$  i člana koji procenjuje razdvajanje komponenti, a koji je predstavljen eksponencijalnom funkcijom  $\left( \sum_{i \neq j} e^{-R_{s,ij}/R_{s,cri}} \right)$ .

4. Šlabahova (eng. *Schlabach*) statistička funkcija hromatografske rezolucije [16]:

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{(R_i - R_{opt})^2}{R_i (R_i - R_{min})^2} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(R_i)^2}{(n-1)R_{av}^2} \right\} * \frac{t_f}{n} \quad (17)$$

gde je  $R_i$  eksperimentalno dobijeni faktor rezolucije,  $R_{opt}$  optimalni faktor rezolucije,  $R_{min}$  minimalan prihvatljiv faktor rezolucije,  $R_{av}$  prosečna vrednost eksperimentalno dobijenih faktora rezolucije,  $t_f$  retenciono vreme poslednjeg pika,  $n$  ukupan broj pikova koji se pojavljuju na hromatogramu.

Šlabahova funkcija procenjuje kvalitet razdvajanja  $\left( \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{(R_i - R_{opt})^2}{R_i (R_i - R_{min})^2} \right] \right)$ , uniformnu distribuciju pikova – odstupanja pojedinačnih faktora rezolucije od prosečne vrednosti

faktora rezolucije  $\left( \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(R_i)^2}{(n-1)R_{av}^2} \right)$ , ukupnu dužinu trajanja analize ( $t_f$ ) i broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu ( $n$ ).

5. Morisova (eng. *Morris*) hromatografska eksponencijalna funkcija [17]:

$$CEF = \left[ \left( \sum_{i=1}^{n-1} \left( 1 - e^{a(R_{opt} - R_i)} \right)^2 \right) + 1 \right] \left( 1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right) \quad (18)$$

gde je  $R_{opt}$  optimalan faktor rezolucije,  $R_i$  eksperimentalno dobijen faktor rezolucije,  $t_{max}$  maksimalno prihvatljivo vreme trajanja analize,  $t_f$  retenciono vreme poslednjeg pika,  $a$  faktor za podešavanje nagiba krive i  $n$  broj očekivanih pikova.

Ova funkcija procenjuje dva parametra kvaliteta – razdvajanje  $\left( \left( \sum_{i=1}^{n-1} \left( 1 - e^{a(R_{opt} - R_i)} \right)^2 \right) + 1 \right)$  i ukupnu dužinu trajanja analize  $\left( 1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right)$ .

6. Duarteova (eng. *Duarte*) funkcija hromatografskog odgovora [8]:

$$D_{CRF} = \sum_{i=1}^{N-1} \theta_{s,i} + N - \left( (t_{R,L} - t_0) / t_{R,L} \right) \quad (19)$$

gde je  $t_{R,L}$  retenciono vreme poslednjeg pika,  $t_0$  retenciono vreme pika mobilne faze,  $N$  ukupan broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu, a  $\theta$  kriterijum separacije. Duarteova funkcija procenjuje kvalitet razdvajanja  $\theta$  separacionim kriterijumom

$\left( \sum_{i=1}^{N-1} \theta_{s,i} \right)$ , ukupan broj pojavljenih pikova na hromatogramu ( $N$ ) i ukupnu dužinu trajanja analize  $\left( (t_{R,L} - t_0) / t_{R,L} \right)$ .

## 2.6. KREIRANJE MATEMATIČKOG MODELA

Kreiranje matematičke zavisnosti između ispitivanih faktora i odabranog hromatografskog odgovora može se izvršiti primenom mehanističkog pristupa koristeći unapred poznate teorijske jednačine, ili empirijskim modelovanjem odgovora u funkciji odabranih faktora nekom od tehnika aproksimacije funkcije [18]. Teorijske jednačine koje opisuju hromatografske odgovore nisu univerzalno primenljive i nisu pogodne kada se ispituje zavisnost odgovora od više posmatranih faktora. U tom slučaju, najbolji pristup predstavlja empirijsko modelovanje hromatografskog ponašanja sistema. Metodologija eksperimentalnog dizajna, kao tehniku aproksimacije, najčešće koristi linearnu regresiju i metodu najmanjih kvadrata [5]. Međutim, kada je funkcionalna zavisnost odgovora složena i interval variranja faktora širok, ovakva tehnika može dati neadekvatne rezultate. U tom slučaju, mogu se primeniti neki drugi vidovi aproksimacije funkcije kao što su metode interpolacije. U ovoj disertaciji, po prvi put, predstaviće se modelovanje hromatografskih odgovora Njutnovim interpolacionim polinomom sa podeljenim razlikama [19].

### 2.6.1. MATEMATIČKO MODELOVANJE HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA TEHNIKOM VIŠESTRUKNE LINEARNE REGRESIJE I METODE NAJMANJIH KVADRATA

Najčešće primenjivani modeli za opis hromatografskih odgovora u funkciji odabranih eksperimentalnih faktora su linearni model i model polinoma drugog stepena. Eksperimentalno dobijeni podaci aproksimiraju se ovim modelima primenom proste i višestruke linearne regresije. Prosta regresija koristi se u slučaju uspostavljanja veze između jednog faktora i odgovora, a višestruka regresija kada se uspostavlja veza između više faktora i odgovora. Upotrebom eksperimentalnih dizajna koji ispituju faktore na dva nivoa poput faktorskog dizajna, frakcionog faktorskog dizajna ili Plakett–Burman dizajna dobijaju se uvek linearni modeli koji opisuju hromatografske odgovore. Pun faktorski dizajn opisuje odgovor linearnim članovima i njihovim interakcijama. Frakcioni dizajni procenjuju glavne faktore i, u zavisnosti od rezolucije dizajna, mogu proceniti neke faktorske interakcije [5]. Eksperimentalni dizajni koji ispituju faktore na tri i više nivoa poput  $3^3$  punog faktorskog dizajna, centralnog

kompozicionog dizajna, Delert dizajna i drugih, omogućavaju uspostavljanje linearne ili kvadratne veze između ispitivanih faktora i odgovora [5].

Linearni model koji opisuje hromatografski odgovor može se predstaviti na sledeći način [5]:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_p X_{ip} \quad (20)$$

pri čemu je  $i = 1$  do  $n$ , gde je  $n$  broj eksperimenata,  $p$  je broj ispitivanih faktora. Matrica dizajna  $X$  može se predstaviti kao vrednosti faktora  $x_p$  u  $n$  eksperimentata na sledeći način:

$$X = \begin{bmatrix} x_1^T \\ \dots \\ x_n^T \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & \dots & x_{1p} \\ 1 & \dots & \dots & \dots \\ 1 & x_{n1} & \dots & x_{np} \end{bmatrix} \quad (21)$$

Vektor dobijenih odgovora  $Y$  u  $n$  eksperimenata može se predstaviti na sledeći način:

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ \dots \\ y_n \end{bmatrix} \quad (22)$$

Slično, vektor  $B$  koeficijenata  $\beta_0$  do  $\beta_p$  može se predstaviti kao:

$$B = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \dots \\ \beta_p \end{bmatrix} \quad (23)$$

Linearni model može se zapisati u matričnom obliku:

$$XB = Y \quad (24)$$

Odakle se dobijaju vrednosti koeficijenata  $\beta$  na sledeći način:

$$B = X^{-1}Y \quad (25)$$



Jasno je da se vrednosti  $p+1$  koeficijenata koji odgovaraju  $p$  faktora i odsečku mogu izračunati samo ako postoji  $p+1$  polaznih jednačina, odnosno  $n = p+1$  eksperimenata u kojima će se dobiti parovi  $(x_i, y_i)$ . Stoga, u slučaju kada postoji tačno  $p+1$  eksperimenata postoji samo jedno rešenje jednačine  $B = X^{-1}Y$ .

Međutim, eksperimenti su najčešće dizajnirani tako da ih ima znatno više nego što ima nepoznatih koeficijenata modela. Ovakav pristup poželjan je prilikom izvođenja eksperimenata kako bi se ostavili određeni stepeni slobode koji će omogućiti procenu eksperimentalne greške. U slučaju kada sistem ima više jednačina nego nepoznatih on je preodređen i postavlja se pitanje koje jednačine, koja rešenja, treba upotrebiti za izračunavanje nepoznatih koeficijenata. U tom slučaju, potrebno je postići najbolje uklapanje (aproksimaciju) podataka u definisani model. Metoda najmanjih kvadrata je standardni pristup za aproksimaciju rešenja preodređenih sistema, tj. sistema jednačina u kojima ima više jednačina nego nepoznatih. „Najmanji kvadrati“ znače da globalno rešenje minimizira sumu kvadrata odstupanja rešenja u odnosu na rezultate svih pojedinačnih jednačina.

Dakle, ako se sa  $R$  označi matrica rezidua, model koji opisuje  $Y$ , korigovaće se tako da se dobija jednačina [5]:

$$XB + R = Y \quad (26)$$

Odnosno, matrica rezidua može se predstaviti kao:

$$R = Y - XB \quad (27)$$

Dalje, suma kvadrata rezidua može se izraziti kao:

$$SSr = R^T R \quad (28)$$

pa sledi da je:

$$SSr = R^T R = (Y - XB)^T (Y - XB) \quad (29)$$

Minimizacija sume kvadrata može se izraziti kao minimiziranje promene sume kvadrata ( $\partial(R'R)$ ) po promeni koeficijenata ( $\partial B$ ), odnosno kao rešavanje jednačine:

$$\frac{\partial(R'R)}{\partial B} = 0 \quad (30)$$

Zamenom u prethodne jednačine važi da je:

$$\frac{\partial(R'R)}{\partial B} = \frac{\partial[(Y-XB)^T(Y-XB)]}{\partial B} = X^T(Y - XB) = X^TY - X^T X B \quad (31)$$

Ako se postavi uslov da je matrica parcijalnih izvoda jednaka nuli, važi sledeća jednačina:

$$0 = X^TY - X^T X \hat{B} \quad (32)$$

gde je  $\hat{B}$  matrica koeficijenata koji daju najmanju sumu kvadrata.

Dalje, važi da je:

$$X^TY = X^T X \hat{B} \quad (33)$$

Množenjem jednačine s leve i s desne strane sa  $(X^T X)^{-1}$  dobija se:

$$(X^T X)^{-1}(X^TY) = (X^T X)^{-1}(X^T X)\hat{B} \quad (34)$$

Odnosno:

$$\hat{B} = (X^T X)^{-1}(X^TY) \quad (35)$$

Jednačina predstavlja rešenje u obliku matrice za set koeficijenata koji daju minimalnu sumu kvadrata rezidua u slučaju kada su svi parametri modela linearni.

Prilikom upotrebe vrsta eksperimentalnog dizajna koji analiziraju faktore na tri nivoa, eksperimentalno dobijeni podaci mogu se aproksimirati i kvadratnim modelom. Kvadratni model može se predstaviti na sledeći način:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_{11} X_{i1}^2 + \beta_2 X_{i2} + \beta_{22} X_{i2}^2 + \beta_{12} X_{i1} X_{i2} + \dots + \beta_p X_{ip} + \beta_{pp} X_{ip}^2 \quad (36)$$

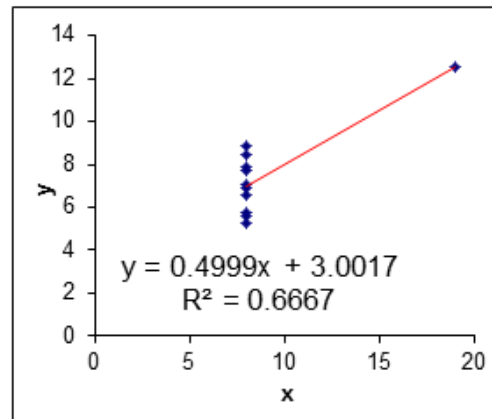
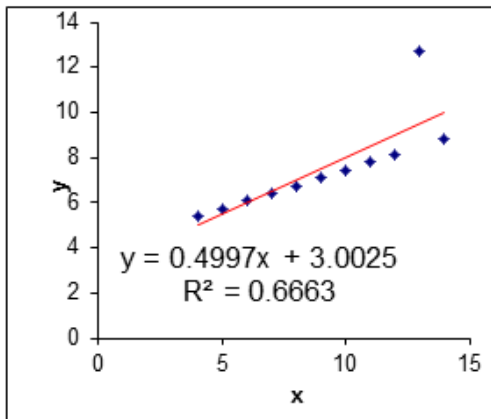
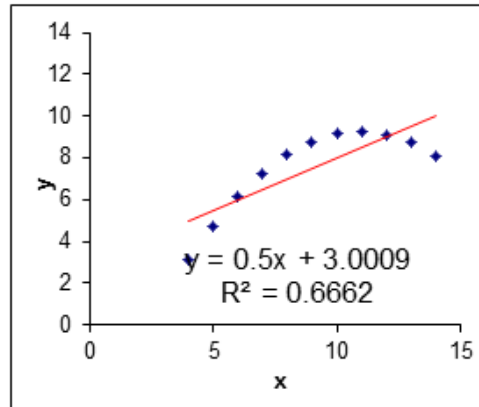
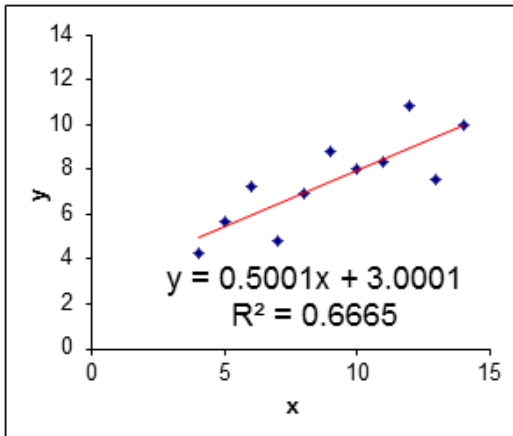
Istovetno prethodnom objašnjenju i ovde se može pokazati da je:

$$\hat{B} = (X^T X)^{-1} (X^T Y) \quad (37)$$

na osnovu čega se mogu izračunati svi koeficijenti polinoma drugog reda.

Iako najčešće primenljivana, u pojedinim slučajevima, metoda aproksimacije linearnom i kvadratnom funkcijom primenom linearne regresije i metode najmanjih kvadrata ne može tačno opisati hromatografske odgovore. Ovo se pre svega dešava kada je zavisnost odgovora od pojedinih faktora suviše složena da bi bila aproksimirana jednostavnim funkcijama sa dovoljnom tačnošću, ali i kada je interval variranja faktora širok.

Slika 2 prikazuje četiri seta eksperimentalnih podataka koja su aproksimirana istom linearnom funkcijom, dok se prave funkcije, koje opisuju ove odgovore značajno razlikuju, iz čega sledi da je u takvim slučajevima potrebna aproksimacija složenijim tehnikama koje će na precizniji način opisati posmatrani sistem.



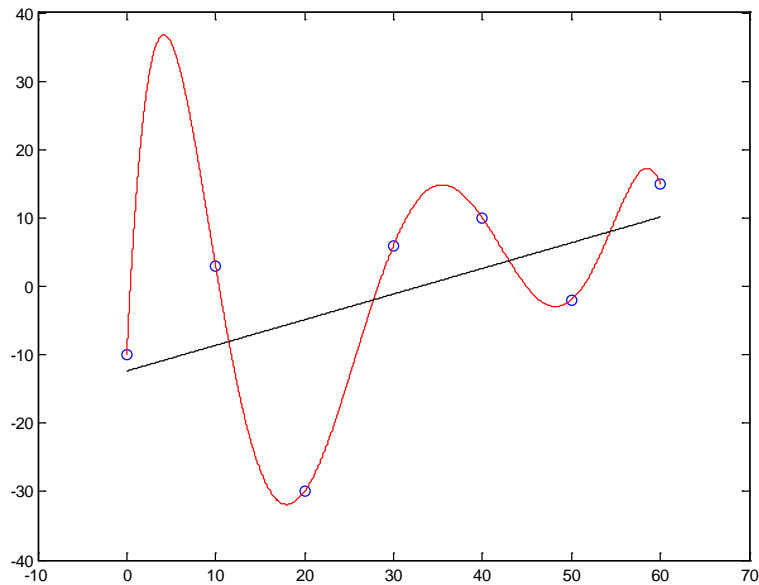
**Slika 2.** Primeri regresionih modela sa sličnim jednačinama i sličnim  $R^2$  vrednostima koji opisuju različite setove podataka

## 2.6.2. MATEMATIČKO MODELOVANJE HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA METODOM INTERPOLACIJE

Metoda interpolacije do sada nije korišćena za modelovanje hromatografskih odgovora. Međutim, interpolacija je veoma pogodan način za uspostavljanje veze između zavisne i nezavisnih promenljivih na ograničenom setu podataka pa će u ovoj disertaciji biti primenjena za kreiranje modela hromatografskih odgovora [20, 21].

Za dati skup tačaka  $(x_i, y_i)$ , gde je  $y_i = f(x_i)$ , metodom interpolacije konstruiše se jednostavnija funkcija  $F(x; a_0, a_1, \dots, a_n)$  gde su  $a_i (i = 0, n)$  neki parametri pomoću kojih se jednostavnije mogu naći vrednosti funkcije  $f(x)$ . Te vrednosti se nalaze približno ali sa potrebnom tačnošću. Funkcija  $F(x; a_0, a_1, \dots, a_n)$  mora se poklapati sa funkcijom  $f(x)$  u tačkama  $x_i$ , koje se nazivaju čvorovi interpolacije [19].

Metoda interpolacije može poslužiti kao značajna alternativa aproksimaciji linearnom regresijom i metodom najmanjih kvadrata i omogućiti sa mnogo većom tačnošću uspostavljanje zavisnosti hromatografskog odgovora od ispitivanih eksperimentalnih faktora, čak i u slučajevima širokih faktorskih intervala i veoma kompleksnih zavisnosti. Razlika između metode interpolacije i metode aproksimacije linearnom regresijom može se ilustrativno predstaviti slikom 3:



**Slika 3.** Razlika između interpolacije (crvena linija, funkcija prolazi kroz sve eksperimentalne tačke) i aproksimacije linearnom regresijom (crna linija, rastojanje svih tačaka od funkcije je najmanje moguće)

Ukoliko funkcija  $F$  pokazuje linearnu zavisnost od neodređenih parametara  $a_0, a_1, \dots, a_n$  reč je o linearnoj interpolacionoj funkciji. Linearne interpolacione funkcije po pravilu se traže u obliku uopštenog polinoma:

$$F(x; a_0, a_1, \dots, a_n) = \sum_{k=0}^n a_k g_k(x) \quad (38)$$

gde su funkcije  $g_k(x)$  zadate i linearno nezavisne, pri tom su funkcije  $g_k(x) = x^k, k = 0, 1, 2, \dots, n$ , a  $a_0, a_1, \dots, a_n$  neodređeni koeficijenti.

Za  $n+1$  tačaka  $(x_i, f(x_i)), i = 0, \dots, n$  postoji jedinstven interpolacioni polinom  $P_n(x)$  stepena  $n$  koji zadovoljava uslove:  $P_n(x_i) = f(x_i), i = 0, 1, 2, \dots, n$ . Taj polinom može da se zapiše na različite načine koji uključuju Lagranžov (eng. *Lagrange*) interpolacioni polinom, Njutnov interpolacioni polinom sa podeljenim razlikama, Njutnov interpolacioni polinom sa konačnim razlikama za interpolaciju unapred i unazad, Gausovi polinomi za interpolaciju unapred i unazad, Stirlingov (eng. *Stirling*) interpolacioni polinom, Baselov (eng. *Basel*) interpolacioni polinom... [19].

Postoji više formi zapisivanja interpolacionog polinoma. Jedna od njih, koja će biti upotrebljena u ovoj disertaciji, jeste Njutnov interpolacioni polinom sa podeljenim razlikama. Opšti oblik ovog polinoma za funkciju jedne promenljive može se napisati na sledeći način:

$$\begin{aligned}
 P_n(x) = & f(x_0) + f[x_0, x_1](x - x_0) + f[x_0, x_1, x_2](x - x_0)(x - x_1) \\
 & + f[x_0, x_1, x_2, x_3](x - x_0)(x - x_1)(x - x_2) + \dots \\
 & + f[x_0, x_1, \dots, x_n](x - x_0)(x - x_1) \dots (x - x_{n-1})
 \end{aligned} \tag{39}$$

Podeljene razlike za funkciju jedne promenljive mogu se dobiti na sledeći način:

Podeljene razlike nultog reda:

$$f[x_0] = f(x_0) \tag{40}$$

Podeljene razlike prvog reda:

$$f[x_0, x_1] = \frac{f(x_1) - f(x_0)}{x_1 - x_0} \tag{41}$$

Podeljene razlike drugog reda:

$$f[x_0, x_1, x_2] = \frac{f[x_1, x_2] - f[x_1, x_0]}{x_2 - x_0} \tag{42}$$

...

Podeljene razlike  $n$ -tog reda:

$$f[x_0, x_1, \dots, x_{n-1}, x_n] = \frac{f[x_1, x_2, \dots, x_n] - f[x_0, x_1, \dots, x_{n-1}]}{x_n - x_0} \tag{43}$$

### 2.6.3. INDIREKTNO MODELOVANJE KOMPLEKSNIH HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA

Kao što je već naglašeno u poglavlju 2.5, jednostavni hromatografski odgovori i kriterijumi razdvajanja nisu dovoljno merilo kvaliteta hromatograma zbog čega je potrebno koristiti neke od kompleksnijih parametara kvaliteta. Međutim, u pojedinim slučajevima matematičko modelovanje kompleksnih hromatografskih odgovora može biti veoma složeno, tako da aproksimacija jednostavnim funkcijama neće omogućiti kreiranje modela dovoljne tačnosti. Čak i kada je reč o elementarnim kriterijumima separacije poput faktora rezolucije, modelovanje u slučaju previše širokih pikova ili pojave inverznih pikova neće biti adekvatno. Jedan od pristupa rešavanju ovog problema jeste indirektno modelovanje kompleksnih odgovora. Ovakav pristup podrazumeva da se modeli kreiraju samo za najjednostavnije hromatografske odgovore, a da se zatim svi složeniji odgovori naknadno (indirektno) računaju [22, 23].

Dev (eng. *Dewe*) [22] je predložio direktno modelovanje retencionih vremena jer ona najbolje opisuju položaj pikova. Retenciona vremena koja treba modelovati za svaki pik su: retenciono vreme vrha pika  $t_A$ , i dva retenciona vremena na X % od visine pika,  $t_{r1}$  i  $t_{rr}$ , pri čemu je  $t_{r1}$  manje od  $t_{rr}$ . Modelovanje tri umesto jednog retencionog vremena ima za cilj da pruži informaciju i o obliku pika, a ne samo o položaju. Iz data tri retenciona vremena mogu se izvesti tri odgovarajuća retenciona faktora:

$$k = (t_r - t_0)/t_0 \quad (44)$$

$$k_1 = (t_{r1} - t_0)/t_0 \quad (45)$$

$$k_r = (t_{rr} - t_0)/t_0 \quad (46)$$

gde je  $t_0$  retenciono vreme pika mobilne faze.

Prema preporukama Evropske farmakopeje visina pika za izračunavanje  $t_{rr}$  i  $t_{r1}$  može biti 50 % [24] ili Američke farmakopeje 13,4 % [25], a neki autori predlažu i retenciona vremena koja odgovaraju početku i kraju pika, odnosno koja uzimaju u obzir širinu pika na baznoj liniji [23].



Tri retenciona faktora definisana na ovaj način modeluju se direktno primenom višestruke linearne regresije ili neke druge tehnike modelovanja. U slučaju primene multilinearne regresije koristiće se jednačine:

$$k = BX + \varepsilon' \quad (47)$$

$$k_1 = B_1X + \varepsilon_1 \quad (48)$$

$$k_r = B_rX + \varepsilon_r \quad (49)$$

Zatim, mogu se izračunati tri odgovarajuća retenciona vremena:

$$t_r = t_0(BX + \varepsilon' + 1) \quad (50)$$

$$t_1 = t_0(B_1X + \varepsilon_1 + 1) \quad (51)$$

$$t_{rr} = t_0(B_rX + \varepsilon_r + 1) \quad (52)$$

Svi ostali hromatografski odgovori mogu se indirektno modelovati izvođenjem iz prethodno definisanih retencionih vremena.

Za širinu pika model će biti oblika:

$$w = t_{rr} - t_{r1} = t_0(B_rX + \varepsilon_r + 1) - t_0(B_1X + \varepsilon_1 + 1) \quad (53)$$

Iz definisanih retencionih vremena i širina pikova mogu se izračunati odgovarajući faktori rezolucije između pikova A i B:

$$RS_{AB} = 2(t_{r,A} - t_{r,B})/(w_A + w_B) \quad (54)$$

ako se  $t_r$  i  $t_l$  odnose na visinu pika na 13,4 % od bazne linije ili

$$RS_{AB} = 1,18(t_{r,A} - t_{r,B})/(w_A + w_B) \quad (55)$$

ako se  $t_r$  i  $t_l$  odnose na visinu pika na 50 % od bazne linije, gde je  $t_{r,A} > t_{r,B}$ .

Slično, mogu se definisati i minimalna rezolucija, ukupna dužina trajanja analize, faktor simetrije i ostali hromatografski odgovori:

Minimalna rezolucija:

$$RS_{min} = \min(RS_{j,k}) \quad (56)$$

gde su  $j$  i  $k$  oznake susednih pikova.

Ukupna dužina trajanja analize:

$$t_{r,min} = \max(t_{r,j}) \quad (57)$$

Faktor simetrije:

$$I_{sym} = (t_{rr} + t_{r1} - 2t_r)/w \quad (58)$$

Maksimalni faktor simetrije

$$I_{sym,max} = \max(I_{sym,j}) \quad (59)$$

Ovakav set jednačina omogućava kreiranje površine odgovora za svaki od odabranih hromatografskih odgovora, a pritom je modelovanje izvršeno samo za odgovarajuća retenciona vremena, tačnije za retencione faktore pridružene odgovarajućim retencionim vremenima.

## 2.7. IDENTIFIKACIJA OPTIMALNIH USLOVA

Finalni korak u optimizaciji je identifikacija eksperimentalnih uslova koji daju najbolji mogući hromatogram, odnosno najbolju moguću vrednost funkcije cilja (funkcije hromatografskog odgovora ili nekog drugog odabranog odgovora) u datom eksperimentalnom prostoru. Nalaženje optimuma može se izvršiti grafički primenom metodologije površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology* – RSM), ili numerički optimizacionim algoritmom [9].

Osnovni i najčešće korišćen način optimizacije je RSM. Funkcija odgovora prikazuje se u funkciji eksperimentalnih faktora i dobijena površina odgovora analizira se s ciljem identifikacije optimalnih regiona [4, 26 – 28]. Ova tehnika daje dobre rezultate, ali je primenjiva samo u slučajevima kada je broj faktora jedan ili dva, jer će tada posmatrani prostor biti prikazan u dve ili tri dimenzije. Četvoro i višedimenzioni prostori ne mogu se proceniti jednostavno i RSM se ne preporučuje u analizi više od dva faktora, osim ako se ne pokaže da su ostali faktori relativno neznačajni i da se mogu zanemariti. Problem ove tehnike je i činjenica da zahteva očitavanje grafika od strane analitičara i ne može se automatizovati usled čega je podložna ljudskoj grešci.

S druge strane, najjednostavnija numerička tehnika optimizacije je prosto pretraživanje čvorova mreže (enumerativna tehnika). Nakon dizajniranja matematičkog modela koji opisuje funkciju hromatografskog odgovora, program izračunava vrednosti funkcije u svim čvorovima, upoređuje ih i pronalazi optimalno rešenje. Suštinski parametar koji se mora definisati za mrežu je rastojanje između čvorova, odnosno gustina mreže. Prevelika gustina vodiće predugom računanju, dok će premala gustina dovesti do gubitka informacija i greške u identifikaciji optimuma.

Numerička optimizacija može se vršiti i simpleks algoritmom. Ova tehnika koristi polihedron (*simpleks*), geometrijsku figuru koja ima  $d+1$  stranica u  $d$  dimenzionalnom prostoru. Algoritam izračunava vrednosti funkcije u temenima figure, rangira dobijene vrednosti od najlošije ka najboljoj, a zatim se kreće kroz eksperimentalni prostor tako da teži što boljim vrednostima. Nedostatak ove tehnike je mogućnost padanja u lokalne optimume. Ovaj problem može se prevazići tako što algoritam počinje pretragu više puta iz različitih tačaka, pa ako se svaki put identifikuje isto rešenje, može se smatrati da je to globalni optimum [9].

### **3. HEMOMETRIJSKI PRISTUP ISPITIVANJU ROBUSNOSTI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE**

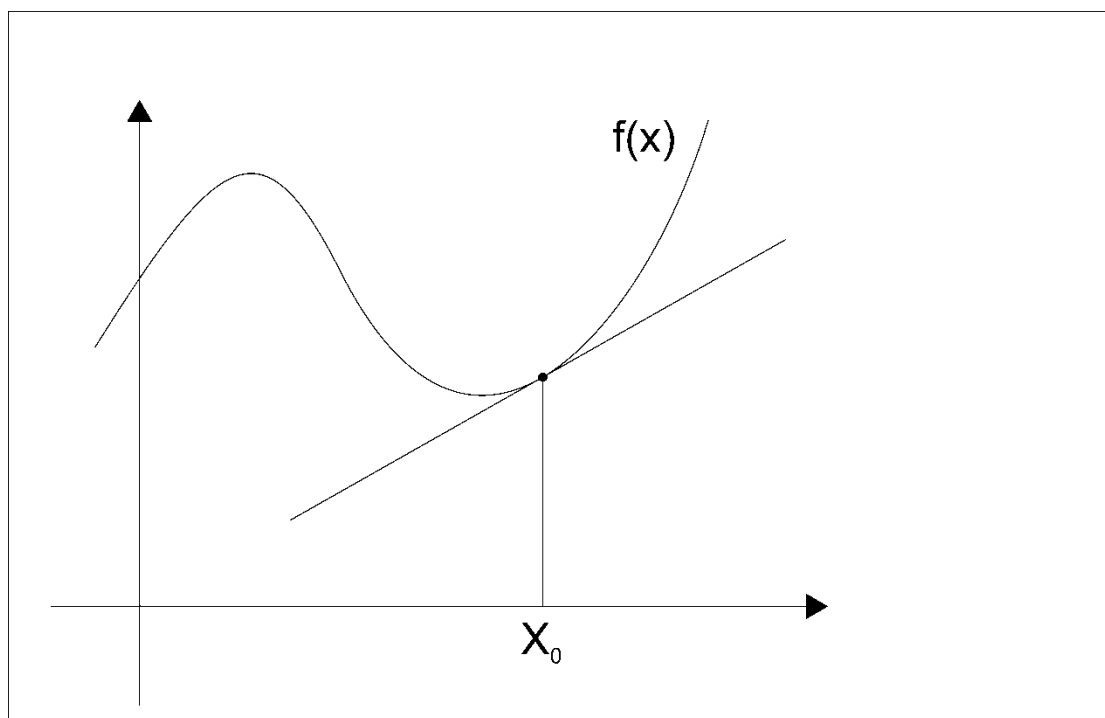
Jednom identifikovani optimalni uslovi biće potuno beskorisni ako se ne mogu reprodukovati pri rutinskom izvođenju eksperimenata. Stoga je robusnost optimuma jedan od veoma važnih parametara koje postavljena metoda mora zadovoljiti. Ispitivanje robusnosti identifikovanog optimuma primenom hemometrijskih strategija može se sagledati kroz dve faze: prva faza podrazumeva skrining robusnosti u okviru optimizacije metode, a druga faza, i to na početku faze validacije, testiranje robusnosti metodologijom eksperimentalnog dizajna.

Hemometrijske tehnike omogućavaju da se u fazi optimizacije metode kompjuterski simulira variranje eksperimentalnih uslova. Procena stabilnosti optimuma na takav način može se izvršiti primenom različitih kriterijuma robusnosti i funkcija hromatografskog odgovora. Neadekvatni rezultati u okviru skrininga robusnosti ukazuju na neophodnost reoptimizacije hromatografske metode. Međutim, zadovoljavajući rezultati nisu dovoljna potvrda robusnosti metode, već se svaka metoda mora podvrgnuti eksperimentalnom testiranju robusnosti na početku faze validacije. U tečnoj hromatografiji metodologija eksperimentalnog dizajna omogućava efikasno izvođenje testiranja robusnosti i u farmaceutskoj analizi najčešće podrazumeva primenu Plaket–Burman (eng. *Plackett–Burman*) i drugih visokofrakcionisanih vrsta dizajna [29, 30]. Ove vrste dizajna omogućavaju kreiranje matematičkih modela hromatografskog odgovora na osnovu kojih se može proceniti značaj ispitivanih faktora. S toga je tačnost tih modela osnovni preduslov za adekvatnu interpretaciju rezultata.

#### **3.1. SKRINING ROBUSNOSTI U TOKU OPTIMIZACIJE**

Različiti kriterijumi robusnosti metode omogućavaju razmatranje pitanja robusnosti već u ranoj fazi razvoja i optimizacije hromatografske metode. Ovaj proces omogućava uvid u potencijalnu nestabilnost optimuma još pre procesa validacije i može sprečiti razvoj, očigledno, nerobusnih metoda [31].

Merenje robusnosti optimuma najčešće se zasniva na izračunavanju parcijalnog izvoda posmatranog odgovora koji u hromatografiji mogu biti faktor selektivnosti, faktor rezolucije, funkcija hromatografskog odgovora. Kada se jednom uspostavi matematička veza između faktora i odgovora, robusnost optimuma može se pratiti kao parcijalni izvod odabranog odgovora ( $y$ ) po parametru optimizacije ( $x$ ). Dobijena  $dy/dx$  vrednost ukazuje na stepen promene odgovora kada se menja vrednost jednog faktora (slika 4).



**Slika 4.** Parcijalni izvod funkcije odgovora

Međutim, jednostavna interpretacija vrednosti parcijalnog izvoda nije dovoljna jer u toku eksperimentalne procedure različiti faktori mogu varirati u okviru različitih intervala. Tako, na primer, očekivano variranje za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi može biti 1 %, dok očekivano variranje pH vrednosti mobilne faze može biti 0,1 ili 0,2 pH jedinice. Stoga će interpretacija numeričke vrednosti parcijalnog izvoda biti pogrešna ako se ne uzme u obzir skala merenja za dati faktor. Može se dogoditi da se na osnovu velike numeričke vrednosti pogrešno zaključi da jedan faktor utiče na odgovor u velikoj meri, dok u standardnoj analitičkoj proceduri zapravo, utiče vrlo malo, jer su mu variranja mala.

Vanbel (eng. *Vanbel*) i saradnici [32] razvili su parcijalni i totalni robusni kriterijum koji u fazi optimizacije pomažu u tumačenju robusnosti. Matematički izraz parcijalnog robusnog kriterijuma je:

$$R_u(f) = \Delta f \cdot \frac{dR}{df} \quad (60)$$

gde  $R_u(f)$  predstavlja robusni kriterijum,  $R$  odabrani odgovor,  $f$  ispitivani hromatografski faktor i  $\Delta f$  dozvoljeno variranje faktora.  $R_u(f)$  može se primeniti za definisanje granice robusnosti (eng. *robustness band*), tj. intervala u kome faktori smeju varirati a da se očuva robusnost metode. Eksperimentator najčešće definiše  $\Delta f$  na osnovu eksperimentalne greške.

Kako bi se izmerila sveobuhvatna robusnost koja uzima u obzir variranja svih ispitivanih faktora, Vanbel predlaže kriterijum ukupne ili totalne robusnosti koji se dobija sabiranjem kriterijuma parcijalne robusnosti. Izraz za izračunavanje totalne robusnosti dat je formulom:

$$R_u = \Delta f_1 \cdot \frac{dR}{df_1} + \Delta f_2 \cdot \frac{dR}{df_2} + \dots + \Delta f_n \cdot \frac{dR}{df_n} \quad (61)$$

gde je  $R_u$  kriterijum totalne robusnosti,  $f_n$  ispitivani hromatografski faktori,  $n$  broj ispitivanih faktora,  $\Delta f_n$  dozvoljeno variranje faktora i  $R$  odabrani hromatografski odgovor.

Kada se jednom definišu optimalni uslovi za hromatografsku analizu određene smeše, robusnost optimuma može se proceniti Vanbelovim parcijalnim i totalnim robusnim kriterijumom prateći sledeće korake:

- 1) Odabir faktora uključenih u optimizaciju čiji će uticaj na robusnost optimuma biti ispitivan
- 2) Definisanje optimalnih vrednosti odabranih faktora
- 3) Odabir odgovora čija će robusnost biti ispitivana
- 4) Kreiranje kvadratnih matematičkih modela koji opisuju odgovore u zavisnosti od ispitivanih faktora

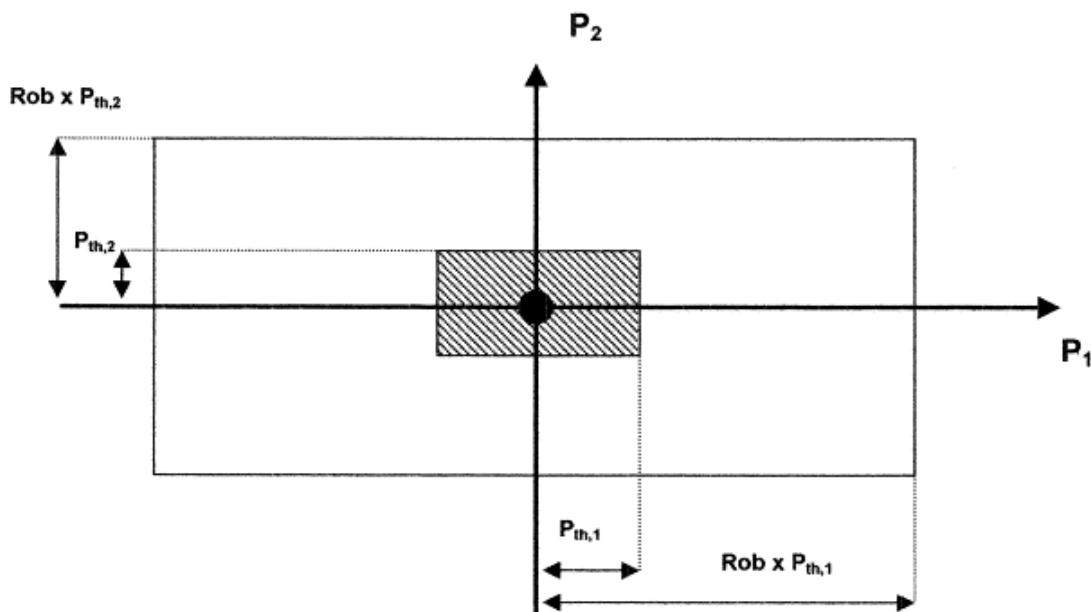
## 5) Izračunavanje robusnog kriterijuma i tumačenje rezultata

Dozvoljene vrednosti za  $R_u$  definiše analitičar i one zavise od vrednosti hromatografskih odgovora pri definisanim optimalnim uslovima. Kada je vrednost dobijenog odgovora na granici prihvatljivosti,  $R_u$  mora biti veoma male vrednosti kako bi se izbeglo dobijanje neadekvatnih rezultata u toku rutinske primene. S druge strane, ako je pri optimalnim uslovima vrednost hromatografskog odgovora više nego zadovoljavajuća, moguće je i prihvatiti veće vrednosti  $R_u$ . Ukoliko jedan odgovor ima zadovoljavajuće  $R_u(f)$  vrednosti za neke faktore, a nezadovoljavajuće za druge, onda se govori o delimičnoj robusnosti odgovora. U tom slučaju, već u fazi skrininga, može se zaključiti koji su to faktori na koje se mora obratiti posebna pažnja u toku eksperimentalnog rada.

Pored Vanbelovog pristupa koji će biti primenjen u ovoj disertaciji, u literaturi se mogu naći i drugi pristupi za procenu robusnosti optimuma.

Goga–Remont (eng. *Goga–Remont*) [33] predložili su za procenu robusnosti hromatografske metode u fazi optimizacije kriterijum Rob koji je definisan na sledeći način: metoda mora zadržati svoje karakteristike u pogledu kvaliteta razdvajanja i retencionih faktora za svako variranje koje je veće ili jednako graničnoj vrednosti  $P_{th,i}$  tačno definisanoj za svaki faktor  $P_i$ . Ove granice definiše analitičar prema svojim očekivanjima od metode. Tako se za svaku tačku eksperimentalnog prostora može definisati prozor sa dimenzijama granične vrednosti  $P_{th,i}$ . Svaka tačka unutar prozora mora zadovoljiti kriterijume za faktore separacije i za vrednosti retencionih faktora. Pored tako definisanog osnovnog prozora, definiše se i veći prozor, prozor robusnosti, koji može postojati sa svim osnovnim jedinicama povećanim za isti faktor Rob. U tom slučaju,  $Rob \times P_{th,i}$  predstavlja meru u kojoj  $P_i$  može da varira bez smanjenja kvaliteta analize. Minimalna zahtevana vrednost za Rob je 1. (slika 5)





**Slika 5.** Parametri koji ulaze u izračunavanje Rob kriterijuma robusnosti

Pored individualnih kriterijuma za procenu robusnosti optimuma, u literaturi je definisano i nekoliko složenih funkcija hromatografskog odgovora koje inkorporiraju u svoju formulaciju i aspekt robusnosti. Masart (eng. *Massart*) i saradnici [34] predložili su 4 funkcije:

$$CR1 = n \left( \frac{(f_J)_s}{\sum_{i=1}^n |(\Delta(f_J)_s) / \Delta x|} \right) \quad (62)$$

$$CR2 = \frac{1}{2} (f_J)_s + \frac{1}{2} \left( 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |(\Delta(f_J)_s) / \Delta x|}{n} \right) \quad (63)$$

$$CR3 = \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n \frac{(f_J)_s}{1 + |(\Delta(f_J)_s) / \Delta x|} \right) \quad (64)$$

$$CR4 = \left( \frac{(f_J)_s}{\prod_{i=1}^n (1 + |(\Delta(f_J)_s) / \Delta x|)} \right) \quad (65)$$

Ovako definisane funkcije hromatografskog odgovora variraju tako da skalirani odgovor za određenu tačku J,  $(f_J)_s$ , i variranje odgovora kada se menja faktor,  $\Delta(f_J)_s / \Delta x$

utiču na njega. U CR1 odgovor se deli sa sumom variranja odgovora pri promeni faktora, u CR3 odgovor se deli sa variranjem odgovora pri promeni faktora, dok se u CR4 odgovor deli sa proizvodom variranja promena faktora [35]. U CR2 vrednosti odgovora i variranja odgovora sabiraju se pri promeni faktora.

Složene funkcije hromatografskog odgovora veoma je teško interpretirati jer je individualne ciljeve (kvalitet separacije i robusnost) teško uravnotežiti. Zbog toga je sigurniji pristup razmatranje robusnosti kroz individualne funkcije  $R_u$  ili Rob.

### **3. 2. TESTIRANJE ROBUSNOSTI METODOLOGIJOM EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA**

Hemometrijski pristup u testiranju robusnosti metode tačne hromatografije uključuje sledeće korake [29, 30]:

- 1) Odabir faktora koji će biti ispitivani
- 2) Odabir faktorskih nivoa
- 3) Odabir eksperimentalnog dizajna
- 4) Odabir odgovora koji će biti praćeni
- 5) Kreiranje matematičkog modela
- 6) Procena zanačajnosti faktora

#### **3.2.1. ODABIR FAKTORA KOJI ĆE BITI ISPITIVANI**

Prilikom testiranja robusnosti hromatografske metode potrebno je razmotriti veliki broj kvalitativnih i kvantitativnih faktora koji potencijalno mogu uticati na metodu. Ti faktori uključuju proizvođača kolone, serijski broj kolone, sastav mobilne faze, temperaturu kolone, protok mobilne faze, talasnu dužinu detekcije, itd [36].

#### **3.2.2. ODABIR FAKTORSKIH NIVOA**

Faktorski nivoi u ispitivanju robusnosti biraju se tako da odgovaraju stvarnom očekivanom eksperimentalnom variranju faktora u toku rutinske primene metode.

### 3.2.3. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA

U ispitivanju robusnosti hromatografske metode potrebno je proceniti uticaj velikog broja hromatografskih faktora na odabrane odgovore hromatografskog sistema. Stoga se za testiranje robusnosti koriste visokofrakcionisani tipovi eksperimentalnog dizajna koji ispituju faktore na dva nivoa, kako ukupan broj eksperimenata ne bi bio preterano veliki. Plaket–Burman dizajn je najčešće primenjivani dizajn u ispitivanju robusnosti hromatografskih metoda. On ispituje  $N-1$  faktora u  $N$  eksperimenata, gde je  $N$  deljivo sa 4 [36]. Kada je broj faktora koji se mogu ispitati Plaket–Burman dizajnom veći od broja faktora koji su od značaja za procenu robusnosti, matrica dizajna se popunjava imaginarnim *dummy* faktorima.

### 3.2.4. ODABIR ODGOVORA KOJI ĆE BITI PRAĆEN

U toku ispitivanja robusnosti poželjno je odabrati različite odgovore koji procenjuju kvalitativna (retencioni faktor, faktor selektivnosti, faktor rezolucije) i kvantitativna (površina pika) svojstva hromatograma [29].

### 3.2.5. KREIRANJE MATEMATIČKOG MODELA IZ PLAKET–BURMAN DIZAJNA

Visokofrakcionisani dizajni omogućavaju kreiranje linearne zavisnosti između odgovora i ispitivanih faktora. U slučaju Plaket–Burman dizajna, linearni model predstavljen je samo glavnim faktorima, dok se uticaj interakcija ne može proceniti zbog kompleksne strukture preklapanja glavnih faktora i interakcija u ovom dizajnu. Dobijeni linearni model može se predstaviti na sledeći način [5]:

$$Y = BX \quad (66)$$

gde je  $Y$  matrica dobijenih odgovora,  $X$  matrica dizajna i  $B$  matrica koeficijenata.

U slučaju da je broj ispitivanih faktora u  $N$  eksperimenata manji od  $N-1$  postoji određeni broj stepeni slobode za procenu statističke pouzdanosti modela, odnosno može se proceniti:

$$\hat{B} = (X^T X)^{-1} (X^T Y) \quad (67)$$

Ako definisani linearni model predstavljen samo glavnim faktorima dobro opisuje sistem važiće [37]:

$$\hat{B} = B \quad (68)$$

U tom slučaju, vrednosti statističkih parametara koji procenjuju adekvatnost modela ( $R^2$  i Adj.  $R^2$ ) biće zadovoljavajuće i tako definisan model moći će da se koristi za procenu značajnosti efekata faktora.

Međutim, ukoliko linearni članovi ne mogu adekvatno opisati posmatrani odgovor, može se desiti da neka od faktorskih interakcija koja nije inicijalno procenjena, značajno doprinosi vrednosti odgovora. U tom slučaju, potrebno je unaprediti matematički model tako da on, pored glavnih faktora, može proceniti i dvofaktorske interakcije. Model se mora korigovati na sledeći način [37, 38]:

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 \quad (69)$$

gde  $B_2$  odgovara matrici koeficijenata interakcija, a  $X_2$  matrici interakcija.

Međutim, koeficijente interakcija u visokofracionisanim dizajnim nije moguće proceniti usled kompleksne strukture preklapanja glavnih faktora i faktorskih interakcija koja dovodi do maskiranja uticaja interakcija glavnim faktorima. To preklapanje može se predstaviti matricom preklapanja  $A$  koja je definisana na sledeći način:

$$A = (X_1^T X_1)^{-1} X_1^T X_2 \quad (70)$$

Matrica preklapanja  $A$  definisana je kao  $p \times p(p-1)/2$  matrica, gde je  $p$  broj faktora. Na taj način glavnim efektima  $(1, 2, \dots, p)$  u redovima matrice  $A$  pridružene su interakcije  $(1, 2), (1, 3), \dots, (k-1, k)$  u kolonama matrice  $A$ . Uobičajeno je da se prikazuje transponovana matrica  $A^T$  i da se naziva tabela preklapanja.

Može se pokazati da u ovom slučaju važi:

$$\hat{B} = B + AB_2 \quad (71)$$

Na taj način, za Plaket–Burman dizajn sa 12 eksperimenata koji ispituje 11 faktora označenih kao A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L matrica  $X_1$ , može se predstaviti:

Matrica  $X_1$

A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

U tom slučaju matrica  $X_2$  će biti:

AB	AC	AD	AE	AF	AG	BC	BD	BE	BF	...	JL	KL
-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	...	1	-1
1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	...	-1	-1
-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	...	1	1
-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	...	-1	1
1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	...	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	...	1	1
-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	...	-1	1
1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	...	1	-1
1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	...	1	-1
-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	...	-1	-1
-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	...	-1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1

Iz prethodne dve matrice može se definisati matrica preklapanja A:

	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AJ	AK	...	JL	KL
A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	...	-0,33	-0,33
B	0,00	-0,33	0,33	0,33	-0,33	-0,33	0,33	-0,33	-0,33	...	-0,33	0,33
C	-0,33	0,00	-0,33	-0,33	0,33	-0,33	0,33	-0,33	-0,33	...	0,33	0,33
D	0,33	-0,33	0,00	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	0,33	...	-0,33	-0,33
E	0,33	-0,33	-0,33	0,00	0,33	0,33	-0,33	-0,33	-0,33	...	0,33	-0,33
F	-0,33	0,33	-0,33	0,33	0,00	-0,33	-0,33	-0,33	0,33	...	-0,33	0,33
G	-0,33	-0,33	-0,33	0,33	-0,33	0,00	-0,33	0,33	-0,33	...	-0,33	-0,33
H	0,33	0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	0,00	0,33	-0,33	...	0,33	-0,33
J	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	0,33	0,33	0,00	0,33	...	0,00	-0,33
K	-0,33	-0,33	0,33	-0,33	0,33	-0,33	-0,33	0,33	0,00	...	-0,33	0,00
L	-0,33	0,33	0,33	-0,33	-0,33	0,33	-0,33	-0,33	-0,33	...	0,00	0,00

Matrica A otkriva kompleksnu strukturu preklapanja glavnih faktora i dvofaktorskih interakcija u Plaket–Burman dizajnu. Može se uočiti da je procena individualnih faktora zapravo nemoguća, jer se u vrednost njihovih efekata uvek uključuju i efekti interakcija. Na primeru faktora B iz matrice preklapanja može se očitati da je njegov efekat jednak:

$$B = B - 1/3AC + 1/3AD + 1/3AE - 1/3AF - 1/3AG + 1/3AH - 1/3AJ - 1/3AK \dots - 1/3JL + 1/3KL \quad (72)$$

Na isti način, može se napisati i za sve ostale faktore. Kako je ukupan broj izvedenih eksperimenata za 11 faktora 12, a broj interakcija (matrica  $X_2$ ) jednak  $10 \cdot 11/2 = 55$ , ukupan broj od 11 faktora i 55 interakcija nikako se ne može istovremeno proceniti. Stoga je potrebno razviti metodologiju koja će omogućiti kreiranje matematičkog modela koji opisuje odgovor u funkciji značajnih faktora i pojedinih interakcija.

Dugo se smatralo da je iz Plaket–Burman dizajna nemoguće proceniti koeficijente modela koji odgovaraju dvofaktorskim interakcijama. Od početka devedesetih godina razvijeno je više pristupa za pokušaj tumačenja efekata interakcija u Plaket–Burman dizajnu koji se uglavnom zasnivaju na analizi matrice preklapanja. Hamada (eng. *Hamada*) i Vu (eng. *Wu*) [39] predložili su strategiju zasnovanu na principu razuđenosti efekata (eng. *effects sparsity*) i principu naslednosti efekata (eng. *effects heredity*). Princip razuđenosti efekata, poznat i kao Pareto princip, zasniva se na pretpostavci da samo mali broj glavnih faktora značajno utiče na odgovor. Princip naslednosti efekata pretpostavlja da, ako je jedna dvofaktorska interakcija značajna, onda je takođe velika verovatnoća da će bar jedan od glavnih faktora koji čini tu interakciju biti značajan. Strategija za kreiranje modela iz Plaket–Burman dizajna zasnovana na ova dva principa sastoji se iz četiri koraka:

*Korak 1.* Razmotriti sve glavne faktore i interakcije koje su ortogonalne glavnim efektima i sprovesti standardne statističke testove poput ANOVE ili grafika verovatnoće normalne i polunormalne raspodele (eng. *normal probability* i *half-normal probability*) kako bi se identifikovali značajni efekti.

*Korak 2.* Sledeći princip naslednosti efekata zadržati 1) efekte identifikovane u prethodnom koraku; 2) dvofaktorske interakcije koje imaju bar jedan faktor koji se pojavljuje u 1); 3) razmotriti i interakcije za koje analitičar misli da bi mogle biti od značaja. Upotrebiti *forward selection* regresiju kako bi se identifikovali značajni efekti u 1) do 3).

*Korak 3.* Upotrebiti *forward selection* regresiju kako bi se identifikovali značajni efekti među efektima identifikovanim u koraku 2 i svim glavnim efektima. Ponavljati korake 2 i 3 sve dok definisani model ne prestane da se menja. Zahvaljujući principu razuđenosti efekata, biće potrebno 2 do 3 iteracije.

*Korak 4.* Proceniti model ispitivanjem ostataka.



Ovakav pristup može rešiti pojedine probleme tumačenja Plaket–Burman dizajna, međutim, njegova mana je upotreba *forward selection* regresije. *Forward selection* regresija kreira model tako da se novi članovi sukcesivno ubacuju i poredi se njihova  $p$  vrednost sa nekom unapred zadatom graničnom  $p$  vrednošću, pa ako je  $p$  vrednost novog člana manja od granične, on će se uključiti u model. Međutim, članovi koji se jednom uključe u model ne mogu biti naknadno isključeni, čak i ako se ispostavi da su u konačnom modelu beznačajni. Opterećivanje modela beznačajnim parametrima dovodi do lažnog poboljšanja modela bez stvarnog efekta na njegovo praktično poboljšanje.

Loson (eng. *Lawson*) [38] je predložio drugu strategiju za analizu interakcija u Plaket–Burman dizajnu. Ovaj pristup zasniva se na analizi matrice preklapanja kako bi se odredio doprinos velikih neprocenjenih interakcija vrednostima glavnih efekata. Naime, posmatrajući grafike verovatnoće polunormalne raspodele za različite rezultate dobijene iz Plaket–Burman dizajna, vrednosti efekata koje se očitavaju mogu biti pogrešne jer dolazi do preklapanja glavnih faktora i interakcija. Činjenica da aktivne, a neprocenjene interakcije utiču na glavne efekte, dovodi do lažnog povećanja njihovih vrednosti. Stoga se analizom preklapanja faktora sa velikim efektima mogu identifikovati potencijalno značajne interakcije. Metodologija je primenjiva u slučajevima kada broj značajnih efekata nije jako veliki, do jedne trećine ukupnog broja, što je najčešće i slučaj u praktičnom radu. Losonova strategija uključuje 8 koraka:

*Korak 1.* Definisati matrice  $X_1$  i  $X_2$ .

*Korak 2.* Metodom najmanjih kvadrata izračunati koeficijente glavnih faktora.

*Korak 3.* Definisati matricu preklapanja.

*Korak 4.* Rangirati faktore po apsolutnim vrednostima efekata i izabrati skup od  $L$  faktora koji se nalaze u prvoj polovini tog niza.

*Korak 5.* Odrediti da li je neki od glavnih faktora značajan, i ako jeste, eliminisati ga iz skupa  $L$ .

*Korak 6.* Sabrati koeficijente u matrici preklapanja za svaki efekat koji se ne može proceniti. Napraviti Pareto dijagram apsolutnih vrednosti ovih efekata.

*Korak 7.* Sprovesti regresiju svih podskupova (eng. *all subsets*) uključujući sve glavne faktore, interkacije identifikovane kao značajne Pareto dijagramom i sve interakcije za koje analitičar misli da bi mogle biti od značaja.

*Korak 8.* Razmotriti najbolje dobijene modele, ali uzeti u obzir princip naslednosti efekata (kriterijum za identifikaciju najboljeg modela može biti koeficijent determinacije –  $R^2$  i prilagođeni koeficijent determinacije – Adj.  $R^2$ ).

### 3.2.6. PROCENA ZNAČAJNOSTI FAKTORA

Značajnost faktora može se proceniti na osnovu apsolutne vrednosti koeficijenata, odnosno efekata faktora primenom statističkih testova poput ANOVE, grafika polunormalne raspodele, Pareto dijagrama itd. [29–31, 40]. Različiti statistički testovi mogu dati različite rezultate usled čega je poželjno sprovesti nekoliko paralelnih statističkih analiza kako bi se došlo do pouzdanih zaključaka. Primena grafičkih testova (grafici polunormalne raspodele i Pareto dijagrami) može biti korisna za dobijanje početnih informacija o najznačajnijim faktorima, ali nije dovoljno objektivna kada je reč o faktorima sa graničnom značajnošću. Statistički testovi daju jasnije rezultate i stoga se njima daje prednost. Statistička analiza zasniva se na poređenju efekata faktora sa standardnom greškom efekata koja se u različitim pristupima može proceniti na različit način: iz vrednosti *dummy* efekata, iz medijane svih efekata, iz vrednosti efekata višefaktorskih interakcija, itd. [30, 40].

## **4. PREGLED LITERATURE**

U ovom poglavlju biće istaknuti najznačajniji rezultati istraživanja u dosadašnjoj literaturi iz oblasti primene funkcija hromatografskog odgovora u optimizaciji i ispitivanju robusnosti metoda tačne hromatografije, kao i matematičkog modelovanja odgovora nakon primene visokofrakcionisanih dizajna.

### **4.1. PRIMENA FUNKCIJA HROMATOGRFSKOG ODGOVORA I KRITERIJUMA ROBUSNOSTI U OPTIMIZACIJI I ISPITIVANJU ROBUSNOSTI METODA TAČNE HROMATOGRFIJE**

Revijalni rad [10] jedan je od prvih preglednih radova koji razmatraju funkcije hromatografskog odgovora koje su do tada bile poznate u literaturi. U radu je istaknuta uloga funkcija cilja u razvoju i optimizaciji hromatografskih metoda. Ispitane su različite karakteristike koje bi idealna funkcija trebalo da sadrži kako bi bila primenljiva u eksperimentalnoj ili simuliranoj hromatografskoj optimizaciji. Autori su dali poseban osvrt na činjenicu da funkcija hromatografskog odgovora mora zadovoljiti zahteve analitičara, što se efikasno može postići dodavanjem težinskih faktora, iako ovakav pristup unosi izvesnu subjektivnost u dizajn funkcije. Dato je detaljno razmatranje o ispravnom uravnotežavanju individualnih članova uključenih u funkciju i istaknuto je da neadekvatna ravnoteža vodi predominaciji pojedinih individualnih članova, čime se upotreba funkcije kao celine obesmišljava. Naglašeno je da funkcije koje sadrže manji broj individualnih članova imaju jednostavniju interpretaciju i pokazuju jasniju korelaciju sa parametrima razdvajanja, što analitičaru pomaže da osmisli dalji tok eksperimenata.

Pregledni rad [9] daje prikaz upotrebe funkcija hromatografskog odgovora i metodologije površine odgovora u optimizaciji metoda tačne hromatografije. U prvom delu rada prikazani su različiti kriterijumi razdvajanja, počevši od jednostavnih kriterijuma koji procenjuju samo razdvajanje kritičnih parova pikova, do složenih funkcija hromatografskog odgovora koje omogućavaju istovremenu procenu više parametara kvaliteta hromatograma. U drugom delu rada prikazana je mogućnost

implementacije hromatografskih funkcija kao jedinstvenog odgovora sistema koji će se modelovati i omogućiti identifikaciju optimuma metodologijom površine odgovora. Konačno, u završnom delu rada dat je osvrt na ostale tehnike optimizacije, poput pretraživanja čvorova mreže i simpleks metode.

Rad [11] predstavlja primenu hemometrijskog pristupa u razvoju hromatografskih metoda i metoda kapilarne elektroforeze. Prikazana je diskusija o elementarnim i globalnim kriterijumima razdvajanja i istaknute su najčešće primenljivane funkcije hromatografskog odgovora. U razmatranje su uključene i funkcije koje, osim kvaliteta razdvajanja procenjuju i robusnost postignutog odgovora. Zaključeno je da ne postoji idealna funkcija hromatografskog odgovora, ali da je njihova upotreba veoma korisna u analizi složenih smeša u kojima se ne mogu identifikovati kritični parovi pikova. U nastavku rada, dat je osvrt na primenu simpleks metode i metode preklapanja mapa rezolucije u optimizaciji hromatografskih metoda. Predstavljena je upotreba punog i frakcionog faktorskog dizajna, Plaket–Burman dizajna i različitih tipova dizajna površine odgovora u hromatografiji, kao i kapilarnoj elektroforezi.

U radu [12] dato je poređenje različitih hemometrijskih pristupa za postizanje istovremene optimizacije više odgovora hromatografskog sistema. Razmotrene su prednosti i mane upotrebe funkcija hromatografskih odgovora i istaknuti su problemi koji se mogu javiti prilikom dizajniranja funkcija hromatografskog odgovora. Dat je detaljan opis tehnike Pareto optimalnosti. Poseban akcenat stavljen je na mogućnost primene genetskih algoritama za automatizovanu optimizaciju hromatografskih metoda. Razvijen je novi pristup započinjanja genetskih algoritama i predstavljen je na primeru optimizacije razdvajanja 11 farmaceutski aktivnih supstanci.

Pregledni rad [1] opisuje hemometrijske pristupe modelovanju i optimizaciji hromatografskih sistema. U prvom delu rada prikazani su neki od retencionih modela koji opisuju ponašanje hromatografskog sistema u zavisnosti od faktora, kao što su udeo organskog rastvarača, pH vrednost mobilne faze i temperatura. U drugom delu rada prikazani su pristupi modelovanju pikova i predviđanju promena u profilu ispitivanih pikova. Nastavak rada nudi pregled elementarnih i globalnih hromatografskih odgovora,

uključujući i funkcije hromatografskog odgovora. Razmotreni su hemometrijski pristupi za istovremeno postizanje razdvajanja i drugih sekundarnih ciljeva, poput minimalne dužine trajanja analize. Poseban akcenat u ranoj fazi razvoja metode stavljen je na procenu robusnosti.

Rad [41] daje osvrt na optimizaciju hromatografskih metoda primenom kompjuterskih simulacija. Istaknuto je da poseban značaj u ovakvom pristupu predstavlja odabir odgovarajućeg optimizacionog kriterijuma. Prikazani su elementarni i globalni kriterijumi razdvajanja i pogodnost pojedinih kriterijuma razdvajanja u postizanju parcijalne optimizacije kada je samo deo ispitivane smeše od značaja za razdvajanje i kvantifikaciju. Objasnjen je multikriterijumski pristup optimizaciji i dati su eksperimentalni primeri tehnike Pareto optimalnosti. Poseban osvrt dat je na funkcije hromatografskog odgovora koje procenjuju robusnost optimuma. Osim u jednodimenzionalnoj, prikazane su i funkcije koje se mogu primenjivati u dvodimenzionalnoj hromatografiji.

Predlog nove funkcije hromatografskog odgovora dat je u radu [17]. Funkcija je dizajnirana tako da procenjuje kvalitet razdvajanja i ukupnu dužinu trajanja analize i testirana na seriji simuliranih hromatograma. U nastavku rada, prikazana je primena funkcije kao jedinstvenog odgovora sistema u okviru hemometrijske strategije za optimizaciju razdvajanja smeše fenola kapilarnom gasnom hromatografijom. Kao optimizacioni dizajn primenjen je centralni kompozicioni dizajn, modelovanje sistema izvršeno je višestrukom linearnom regresijom, a optimum je identifikovan primenom metodologije površine odgovora.

Autori u radu [42] prikazuju optimizaciju razdvajanja R,S oksibutin-hlorida u sistemu reverzno-fazne tečne hromatografije primenom empirijskih modela i multivarijacione analize. Kvalitet razdvajanja meren je novom funkcijom hromatografskog odgovora koja je pogodna za tumačenje hromatograma dobijenih nakon hiralne hromatografije. Funkcija je dizajnirana tako da meri kvalitet razdvajanja i ukupnu dužinu trajanja analize. Zatim je upoređena sposobnost veštačkih neuronskih mreža, višestruke linearne regresije i metode parcijalnih najmanjih kvadrata za modelovanje novorazvijene

funkcije. Pokazano je da su veštačke neuronske mreže imale najbolju sposobnost predviđanja vrednosti novorazvijene funkcije, ali je zaključeno da u datom primeru i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata može biti primenljiva.

U radu [34] predložene su četiri složene funkcije hromatografskog odgovora koje sadrže individualne članove koji procenjuju kvalitet razdvajanja i robusnost identifikovanog optimuma. Pogodnosti razvijenih funkcija prikazane su na primerima reverzno–fazne i normalno–fazne tečne hromatografije. U nastavku rada, funkcije su upotrebljene za lociranje optimuma nakon primene dizajna smeše. Pokazana je sposobnost funkcija da daju ista rešenja koja identifikuju pristupi Pareto optimalnosti i Deringerova funkcija poželjnih odgovora.

Razvoj efikasnih strategija za optimizaciju hromatografskog razdvajanja predstavljen je u radu [43]. Prikazani su različiti hemometrijski pristupi optimizaciji kao i upotreba softvera za automatizovanu optimizaciju. Stavljen je poseban akcenat na pitanje odabira eksperimentalnog dizajna, odabira različitih kriterijuma optimizacije i na razmatranje pitanja robusnosti optimuma u ranoj fazi razvoja metode. Prikazan je pristup optimizaciji metode dve model smeše, od kojih je prva uključila pet kiselih supstanci, a druga devet benzodiazepina. Prva smeša analizirana je primenom  $4 \times 3$  eksperimentalnog dizajna i kreirani su sigmoidalni matematički modeli za opis retencionih faktora analiziranih supstanci i kvadratni modeli za opis asimetrije pikova. U analizi druge model smeše, primenjen je dizajn smeše i retencioni faktori su modelovani kvadratnom eksponencijalnom funkcijom. Kao odgovori sistema praćeni su klasičan faktor rezolucije i efektivna rezolucija u čiji je dizajn uključena i procena ukupne dužine trajanja analize, asimetrije pikova i broja teorijskih platoa kolone.

Autori u radu [44] predstavljaju optimizacioni protokol za razdvajanje kompleksnih smeša u RP–LC sistemu sa mobilnim fazama koje sadrže organski modifikator i vodenu fazu. Predstavljeno je predviđanje položaja i oblika pikova individualnih komponenti smeše. Kao optimizacioni kriterijum upotrebljena je maksimizacija čistoće pika svake analizirane supstance. Koncept procene čistoće pikova omogućava da se separacija za svaku supstancu procenjuje individualno i time na nju ne utiče prisustvo interferirajućih

pikova. Kako iz dobijenih eksperimentalnih podataka nije postignuta identifikacija jedne mobilne faze koja bi omogućila razdvajanje svih ispitivanih supstanci, u nastavku rada prikazana je mogućnost odabira komplementarnih mobilnih faza iz istog seta eksperimentalnih podataka. Pristup je verifikovan na primeru model smeše sastavljene od 13 fenola.

Rad [45] predstavlja metodologiju optimizacije metoda tečne hromatografije kojom je omogućen odabir dve ili više mobilnih faza koje omogućavaju komplementarno razdvajanje. Asimetrični modeli pikova kreirani su za izračinavanje individualne čistoće pikova. Primenjena su dva globalna kriterijuma razdvajanja: proizvod elementranih rezolucija i najlošija elementrana rezolucija. Za konačnu identifikaciju optimalnih uslova primenjeno je sistematično pretraživanje svih mogućih kombinacija sastava mobilne faze, kao i genetski algoritmi. Pristup je prikazan na primeru model smeše 10 diuretika i beta blokatora.

Novi kriterijum separacije i novi algoritam za pretraživanje optimuma predstavljeni su u radu [46]. Kriterijum je razvijen polazeći od računanja recipročne vrednosti faktora rezolucije, a zatim je globalna procena razdvajanja izvršena sumiranjem recipročnih vrednosti faktora rezolucije svih parova pikova. Novi kriterijum separacije upoređen je sa tradicionalno primenjivanim faktorom rezolucije i rezolucijom kritičnog para. Pokazao se superiornim u pogledu tačne procene kvaliteta separacije. Prednost ovakvog kriterijuma separacije je činjenica da dobro razdvojeni pikovi najmanje doprinose ukupnoj vrednosti funkcije, pa nije potrebno svođenje vrednosti njihovih faktora rezolucija na definisanu graničnu vrednost. Takođe, nije potrebno definisanje prihvatljive vrednosti za kvalitet razdvajanja, jer će vrednosti funkcije fino pokazivati ukupan kvalitet separacije. U nastavku rada, prikazan je i novi optimizacioni algoritam i celokupna predložena strategija uspešno je primenjena u eksperimentalnoj analizi model smeše metodom tečne hromatografije.

Rad [47] predstavlja pristup robusnoj optimizaciji gde je kao funkcija odgovora sistema praćena čistoća pikova. Definisana strategija zasniva se na razmatranju nesigurnosti u modelovanju hromatografskih odgovora i doprinosa te nesigurnosti nerobusnosti

funkcija odgovora. Predložena su dva pristupa robusnoj optimizaciji: širenje granica pikova i osciliranje pikova pri ponovljenim eksperimentima koje je procenjeno Monte–Karlo simulacijom. Prvi pristup unosi nesigurnost formiranjem dodatnih proširenih granica oko teorijski dobijenih pikova. Drugi pristup zasniva se na simuliranju ponovljenih teorijskih eksperimenata pri čemu se prati nesigurnost izračunatih koeficijenata matematičkog modela i procenjuje se da li će optimalni uslovi biti istovremeno i robusni.

U radu [48] predložen je novi pristup za kompjutersku optimizaciju metode tečne hromatografije s masenom detekcijom. Prva faza metodologije sastoji se u kreiranju preciznih retencionih modela za svaki od pikova u ispitivanoj smeši u toku izokratske analize, a zatim su retencioni modeli prilagođeni i validirani tako da se mogu primeniti i u gradijntnom eluiranju. U drugoj fazi razvijena je nova funkcija hromatografskog odgovora koja se zasniva na matrici selektivnosti i koja je dalje upotrebljena za procenu kvaliteta serije simuliranih hromatograma. Kreirani retencioni modeli, zajedno sa novorazvijenom funkcijom i evolutivnim algoritmom, omogućili su razvoj i optimizaciju metode za analizu kompleksnih smeša. U okviru optimizacije primenjen je i koncept Pareto optimalnosti.

U radu [49] primenjene su tri različite tehnike modelovanja i više funkcija hromatografskog cilja za optimizaciju razdvajanja smeše sedam neorganskih jona primenom jonske hromatografije s gradijntnim eluiranjem. Retenciono modelovanje izvršeno je primenom dva tipa veštačkih neuronskih mreža i modelovanjem prelaskom sa izokratskog na gradijntno eluiranje. Kvalitet dobijenih simuliranih hromatograma procenjen je funkcijom hromatografskog odgovora, proizvodom separacionog faktora i normalizovanim proizvodom razlike u retencionim vremenima.

Modifikovan faktor rezolucije i globalni faktor separacije upotrebljeni su za optimizaciju razdvajanja kompleksne smeše aminokiselina [50]. Kriterijum razdvajanja dizajniran je tako da omogući procenu hromatograma kod kojih je došlo do potpunog preklapanja pojedinih pikova, što se sumiranjem tradicionalno primenljivanih faktora rezolucije ne može postići. Takođe, u dizajn kriterijuma uključena je i procena dužine



trajanja analize. U fazi skrininga metode primenjen je  $2^{5-1}$  frakcioni faktorski dizajn, a zatim je u fazi optimizacije primenjen centralni kompozicioni dizajn. Kreirani su kvadratni matematički modeli i tehnikom nelinearnog programiranja izvršena je identifikacija optimuma.

U radu [51] izvedena je optimizacija metode tačne hromatografije za razdvajanje devet polifenola primenom funkcije hromatografskog odgovora kao jedinstvene karakteristike sistema. Primenjena funkcija hromatografskog odgovora sastoji se iz tri člana, od kojih prvi procenjuje sumu faktora rezolucije, drugi meri ukupan broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu i treći procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize. Optimizacija metode uključila je super modifikovanu simpleks metodu.

Rad [35] prikazuje optimizaciju složenih analitičkih sistema u jonskoj hromatografiji s gradijentnim eluiranjem. Modelovanje hromatografskog sistema izvršeno je veštačkim neuronskim mrežama. Istovremeno postizanje više ciljeva optimizacije postignuto je primenom funkcija hromatografskog odgovora, proizvoda separacionog faktora i normalizovanog proizvoda razlike u retencionim vremenima. Upoređeni su optimumi koje su tri različita pristupa locirala i zaključeno je da prva dva pristupa imaju prednost, jer normalizovan proizvod razlike u retencionim vremenima daje kompleksne površine odgovora koje se teško interpretiraju. Ispitivanje robusnosti površine odgovora izvršeno je primenom četiri funkcije hromatografskog odgovora koje uključuju u svoj dizajn i procenu robusnosti.

Rad [52] procenjuje funkcije hromatografskog odgovora u optimizaciji hromatografske analize smeše nesteroidnih antiinflamatorna. Novi hromatografski odgovor izveden je polazeći od funkcije hromatografskog odgovora koja procenjuje površinu pika, relativno retenciono vreme pika i širinu pika na polovini visine i predstavljen je kao recipročna vrednost kvadrata retencionog vremena. Novi retencioni modeli dobijeni su modelovanjem ovako modifikovanog odgovora primenom višestruke linearne regresije. Dobijeni modeli predloženi su za studije odnosa strukture i retencionog ponašanja.

Nova funkcija hromatografskog odgovora predstavljena je u radu [8] i primenjena je na razdvajanje smeše kompleksnih organskih molekula. Istovremeno, razvijena funkcija

testirana je na seriji simuliranih hromatograma. Zatim je funkcija primenjena u karakterizaciji složenih organskih smeša [53, 54]. U radu [53] primenjen je centralni kompozicioni dizajn i metodologija površine odgovora za optimizaciju razdvajanja smeše organskih supstanci koristeći funkciju hromatografskog odgovora kao odgovor sistema. U radu [54] funkcija hromatografskog odgovora modifikovana je tako da procenjuje razdvajanje pikova u dvodimenzionalnoj tečnoj hromatografiji i zatim primenjena u analizi kompleksne smeše organskih jedinjenja.

Autori rada [32] predlažu robusne kriterijume za procenu parcijalne i totalne robusnosti koji se zasnivaju na izračunavanju parcijalnih izvoda odgovora po ispitivanim faktorima. Koncept totalne robusnosti uključuje i procenu očekivanog eksperimentalnog variranja faktora. Pored kriterijuma robusnosti, kao optimizacioni kriterijum definisana su dva faktora rezolucije, od kojih prvi procenjuje meru u kojoj je pik razdvojen od narednog pika, a drugi meru u kojoj je pik razdvojen od njemu prethodnog pika. Upoređena je sposobnost tri pristupa multikriterijumske optimizacije (Pareto optimalnost, Deringerova funkcija poželjnih odgovora i pristup višestrukih ograničenja) koji bi omogućili razvoj robusnih hromatografskih metoda.

Novi softver za optimizaciju, koji uključuje novi kriterijum robusnosti, razvijen je i predstavljen u radu [33]. Kriterijum robusnosti zasniva se na definisanju prozora robusnosti u okviru koga variranja ekperimentalnih faktora neće dovesti do neprihvatljivog pogoršanja odgovora. Istaknuta je prednost metoda koje su optimizirane uzimajući u obzir kriterijum robusnosti u odnosu na one koje su optimizirane bez ovog kriterijuma.

#### **4.2. MATEMATIČKO MODELOVANJE ODGOVORA NAKON PRIMENE VISOKOFRAKCIONISANIH DIZAJNA**

U radu [39] predložen je pristup za kreiranje modela koji uključuje dvofaktorske interakcije iz Plaket–Burman dizajna. Strategija je zasnovana na principu razuđenosti i naslednosti efekata i uključuje više ponovljenih ciklusa kojima se postepeno identifikuju glavni faktori i dvofaktorske interakcije koje najviše doprinose modelu. Strategija je

verifikovana na tri serije eksperimentalnih podataka i pokazano je da je primenljiva i na dizajne viših nivoa. Posebna kritika upućena je autorima koji polaze od pretpostavke da se dvofaktorske interakcije mogu uvek zanemariti i da dizajni sa kompleksnom strukturom preklapanja upravo poseduju prednost u pogledu uniformne distribucije doprinosa dvofaktorskih interakcija koji se smatra eksperimentalnom greškom.

Generisanje kompleksne strukture preklapanja za Plaket–Burman dizajn do 100 ispitivanih eksperimenata predstavljeno je u radu [37]. Prikazana je konstrukcija matrica preklapanja za dizajne dobijene cikličnim generisanjem i dizajne dobijene presavijanjem inicijalnih matrica. Objasnjena je procena preklapanja efekata glavnih faktora i faktorskih interakcija iz matrice preklapanja. Naglašen je značaj interpretacije fizičkog smisla rezultata dobijenih regresionom analizom.

Analiza interakcija iz Plaket–Burman dizajna sprovedena je i u istraživanju [55]. Autori otkrivaju skrivenu projekcionu strukturu dizajna i pokazuju da se neke dvofaktorske interakcije mogu proceniti bez izvođenja dodatnih eksperimenata. Izvršena je detaljna analiza dizajna sa 12 i 20 eksperimenata koji ispituju faktore na 2 nivoa i sa 18 eksperimenata koji ispituje faktore na 3 nivoa. Pokazano je kako se iz Plaket–Burman dizajna sa 12 eksperimenata jednostavno mogu izdvojiti bilo koja 4 glavna faktora i u okviru matrice razložiti njihove dvofaktorske interakcije, a zatim i proceniti značajnost faktora i interakcija.

Analiza visokozasićenih dizajna i Plaket–Burman dizajna u pogledu otkrivanja značajnih interakcija, izvršena je u studiji publikovanoj u radu [56]. Predložena strategija naročito je pogodna za analizu Plaket–Burman dizajna sa 12 eksperimenata. Može se generalno primeniti na svaki frakcionisani dizajn, osim onih gde postoji potpuno preklapanje glavnih faktora i interakcija. Autor u ovom radu diskutuje strategije zasnovane na principu naslednosti efekata i ističe primere u kojima one daju nezadovoljavajuće rezultate. Umesto toga, predloženo je da se svaki dizajn sa kompleksnom strukturom preklapanja razloži tako da uključi i sve dvofaktorske interakcije, a da se zatim njegova analiza vrši primenom tehnika procene efekata u visokozasićenim dizajnama.

Identifikacija interakcija u Plaket–Burman dizajnu izvršena je analizom matrice preklapanja [38]. Procenjeni su značajni efekti glavnih faktora, a zatim je izračunat doprinos dvofaktorskih interakcija velikim vrednostima značajnih efekata, sabiranjem odgovarajućih vrednosti dobijenih matricom preklapanja. Konačni modeli kreirani su metodom svih mogućih regresija.

Procedura za generisanje visokozasićenih dizajna koji obuhvataju 8 do 22 eksperimenta prikazana je u radu [57] upotrebom evolutivnih algoritama. Predložen je algoritam koji omogućava konstruisanje najadekvatnije matrice iz veće matrice koja nudi veliki broj potencijalnih rešenja. Zatim se u nastavku istraživanja publikovanom u radu [58] prikazuje pristup za rešavanje visokozasićenih dizajna, takođe upotrebom evolutivnih algoritama. Predložena metoda pokazala je zadovoljavajuću efikasnost i robusnost.

Autori rada [59] predlažu strategiju fiksiranja efekata i dodavanja redova za procenu faktorskih efekata u visokozasićenom dizajnu. Pristup se zasniva na dodavanju redova inicijalnoj matrici u kojima će se jednom proizvoljnom faktoru dodeliti nula kao vrednost efekta. Ovakva strategija upoređena je sa različitim regresionim analizama i pokazala je prednost u odnosu na njih. Isti autori primenili su definisanu metodologiju u okviru validacije metode za određivanje N-monometilarginina [60], a zatim su prikazali i generalizaciju predložene metodologije za visokozasićene dizajne [61].

Modifikovani sekvencijalni pristup definisan je za identifikaciju aktivnih faktora u visokozasićenim dizajnima i primenjen u analizi faktora koji utiču na metodu za ispitivanje sadržaja masnih kiselina u prirodnom uzorku [62]. Pristup se sastoji iz četiri koraka. U prvom koraku regresionom analizom definiše se prvi podskup potencijalno značajnih faktora. U drugom koraku metodom svih mogućih regresija iz prvog podskupa izdvaja se drugi podskup potencijalno značajnih faktora, a zatim se u trećem koraku proverava da li su preostali neki značajni faktori iz prvog podskupa. U četvrtom koraku kreiraju se matematički modeli za identifikovane značajne faktore.

U istraživanju [63] prikazana je primena genetskih algoritama za identifikaciju značajnih dvofaktorskih interakcija u Plaket–Burman dizajnu i verifikovana je na seriji simuliranih i eksperimentalno dobijenih rezultata. Pokazano je da je kvalitet informacija dobijenih primenom genetskih algoritama jednako dobar kao i prilikom primene *Bayesian–Gibbs* metode. Omogućeno je kreiranje koeficijenata matematičkog modela i istaknuta je mogućnost primene ovog dizajna i u fazi modelovanja sistema, pored tradicionalne primene u fazi skrininga.

## 5. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Razvoj nove funkcije hromatografskog odgovora koja na adekvatan način istovremeno procenjuje kvalitet razdvajanja i ukupnu dužinu trajanja hromatografske analize, kao i verifikacija funkcije poređenjem sa šest prethodno razvijenih funkcija na seriji simuliranih hromatograma i eksperimentalno dobijenih hromatograma u RP–LC i HILIC sistemu.
2. Inkorporiranje novorazvijene funkcije kao odgovora sistema u metodologiju eksperimentalnog dizajna za razvoj i optimizaciju metoda za analizu raloksifen-hidrohlorida i njegovih nečistoća u RP–LC sistemu, kao i smeše beta agonista i antagonista u HILIC sistemu.
3. Unapređenje novorazvijene funkcije hromatografskog odgovora kako bi se omogućila procena karakteristika oblika pikova na hromatogramu, a zatim i inkorporiranje takve funkcije u metodologiju eksperimentalnog dizajna za razvoj i optimizaciju metode za analizu smeše antidepresiva u HILIC sistemu.
4. Razvoj nove tehnike matematičkog modelovanja hromatografskih odgovora zasnovane na interpolacionom polinomu sa podeljenim razlikama i primena u direktnom modelovanju jednostavnih hromatografskih odgovora. Razvoj nove funkcije cilja prilagođavanjem prethodno razvijene funkcije hromatografskog odgovora indirektnom modelovanju i primena u preciznom pretraživanju eksperimentalnog prostora na primeru metode za analizu smeše antidepresiva u HILIC sistemu.
5. Primena kriterijuma robusnosti za ispitivanje robusnosti optimuma u fazi razvoja i optimizacije metoda za analizu raloksifen-hidrohlorida i njegovih nečistoća u RP–LC sistemu, smeše beta agonista i antagonista u HILIC sistemu i smeše antidepresiva u HILIC sistemu.

6. Razvoj nove metodologije za kreiranje matematičkih modela hromatografskih odgovora koji uključuju dvofaktorske interakcije nakon analize Plaket–Burman dizajnom i inkorporiranje novopredloženog pristupa u metodologiju eksperimentalnog dizajna za testiranje robusnosti metoda za analizu raloksifen-hidrohlorida i njegovih nečistoća u RP–LC sistemu, smeše beta agonista i antagonista u HILIC sistemu i smeše antidepresiva u HILIC sistemu.

## 6. EKSPERIMENTALNI DEO

### 6.1. APARATI I REAGENSI

Tečni hromatograf 1: *Waters Breeze System*, Waters, Milford, MA, USA

Pumpa: *Waters 1525 Binar HPLC Pump*

Detektor: *Waters 2487 UV/VIS* detektor

Grafička obrada: *Breeze Software, Windows XP*

Mikrolitarski špric: 100  $\mu$ L, SG Australia

Volumen injektovanja: 20  $\mu$ L

Tečni hromatograf 2: *Finnigan Surveyor*, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA

Pumpa: HPLC pumpa

Detektor: *UV/VIS Plus* detektor

Grafička obrada: *ChromQuest, Windows XP*

Injektovanje: *Autosampler Plus*

Volumen injektovanja: 5  $\mu$ L

Filtri: *Nylon membrane filters, 0,45  $\mu$ m Whatman*, Engleska

Elektronska analitička vaga: *121 Sartorius* Nemačka

Ultrazvučno kupatilo: *Fungilab*, Španija

Sistem za dobijanje vode HPLC grade: *Simplicity 185, Millipore*, Nemačka

pH metar, *PHM 210, METERLAB, Radiometer Analytical, Villeurbane Cedex*, Francuska

Acetonitril, *HPLC grade, Lab-Scan*, Irska

Orto-fosforna kiselina: *Carlo Erba*, Italija

Natrijum-dodecilsulfat (eng. SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*): *Sigma-Aldrich Chemie*, Nemačka

Amonijum-acetat: *J. T. Backer*, Holandija

Glacijalna sirćetna kiselina: *Zorka Šabac*, Srbija



### **Hromatografske kolone**

*XBridge*<sup>™</sup>, 100 mm x 3,0 mm, veličina čestica 3,5 μm, Waters, Milford, MA, USA

*Sun Fire C18*, 100 mm x 3 mm, veličina čestica 3,5 μm, Waters, Milford, MA, USA

*Betasil Silica*, 100 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA

### **6.2. STANDARDNE SUPSTANCE**

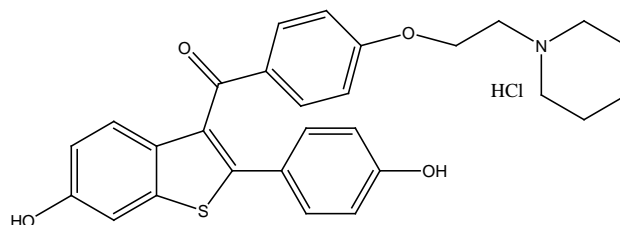
U ovoj disertaciji izvršena je hromatografska analiza tri model smeše:

**Smeša 1:** raloksifen hidrohlorid i njegove nečistoće (slika 6) – nečistoća 1 (2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-6-ol); nečistoća 2 (4-(piperidil-etoksi) benzojeva kiselina); nečistoća 3 ([2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-6-ol]dimezilat); nečistoća 4 ([[6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-3-il]-[4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenil]metanon hidrohlorid] mezilat)

**Smeša 2:** agonisti i antagonisti beta receptora (slika 7) – atenolol, metoprolol-tartarat, fenoterol, salbutamol, propranolol-hidrohlorid

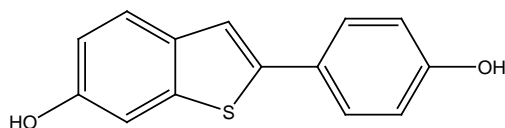
**Smeša 3:** antidepresivi (slika 8) – selegilin-hidrohlorid, mianserin-hidrohlorid, sertralin-hidrohlorid, moklobemid, fluoksetin-hidrohlorid, maprotilin-hidrohlorid

### 6.2.3. HEMIJSKA STRUKTURA ANALIZIRANIH SUPSTANCI [24]



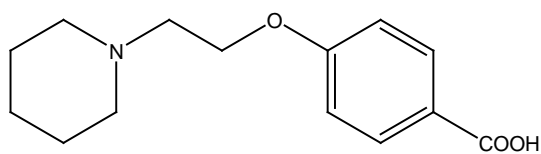
#### **Raloksifen-hidrohlrid**

[6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-3-il]-[4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenil]metanon hidrohlrid



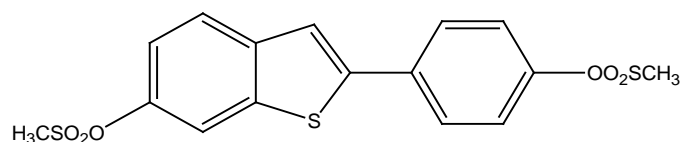
#### **Nečistoća 1**

2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-6-ol



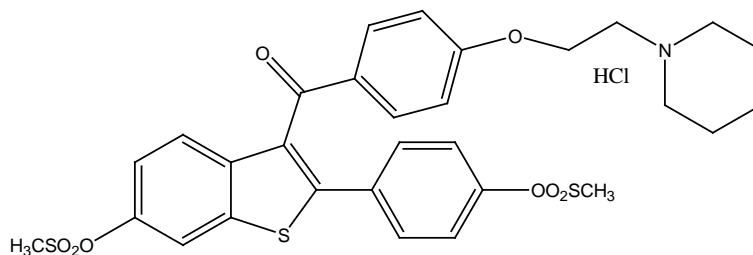
#### **Nečistoća 2**

4-(piperidil-etoksi) benzojeva kiselina



### Nečistoća 3

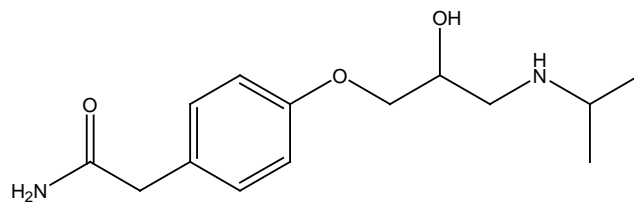
[2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-6-ol]dimezilat



### Nečistoća 4

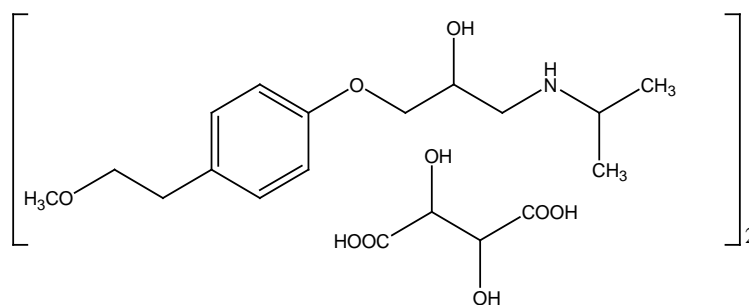
[[6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-1-benzotiofen-3-il]-[4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenil]metanon hidrohlorid] mezilat

**Slika 6.** Smeša 1: raloksifen-hidrohlorid i njegove nečistoće



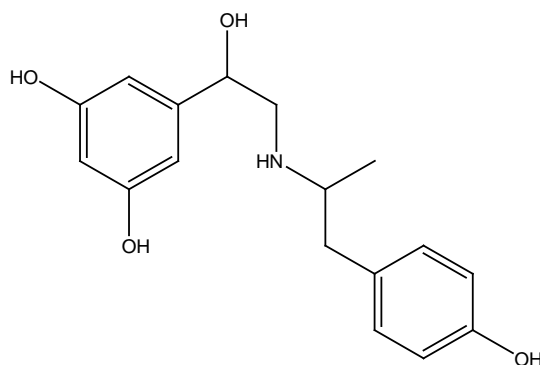
**Atenolol**

2-[4-[(2RS)-2-hidroksi-3-[(1-metiletil)amino]propoksi]-fenil]acetamid



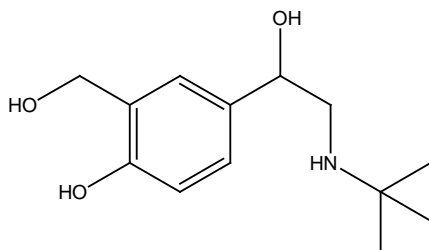
**Metoprolol-tartarat**

Bis[(2RS)-1-[4-(2-metoksietil)fenoksi]-3-[(1-metiletil)amino]propan-2-ol](2R,3R)-2,3-dihidroksibutendioat



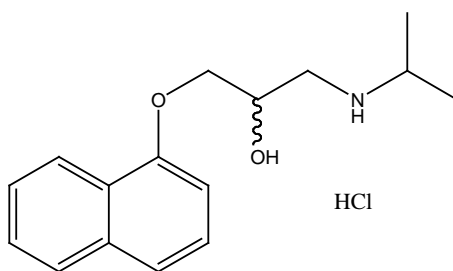
**Fenoterol**

(1RS)-1-(3,5-dihidroksifenil)-2-[[1RS)-2-(4-hidroksifenil)-1-metiletil]amino]etanol



**Salbutamol**

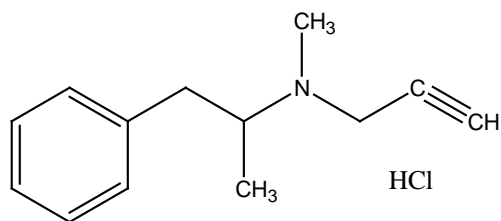
(1RS)-2-[(1,1-dimeteil)amino]-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)fenil]etanol



**Propranolol-hidrohlid**

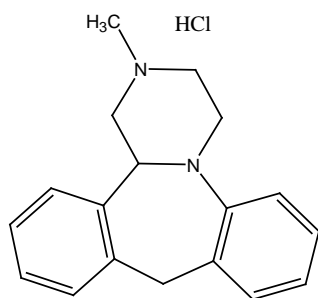
(2RS)-1-[(1,1-meteil)amino]-3-(1-naftalen-1-iloksi)-propan-2-ol hidrohlid

**Slika 7.** Smeša 2: agonisti i antagonisti beta receptora



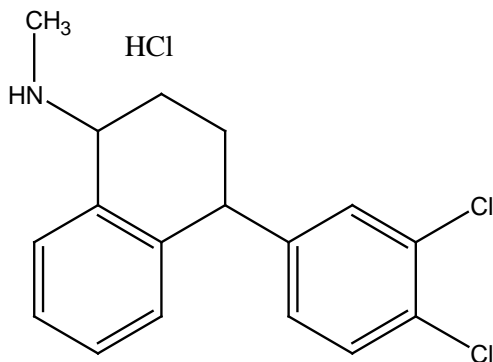
**Selegilin-hidrochlorid**

*N*-metil-*N*-[(1*R*)-1-metil-2-feniletil]prop-2-in-1-amin hidrochlorid



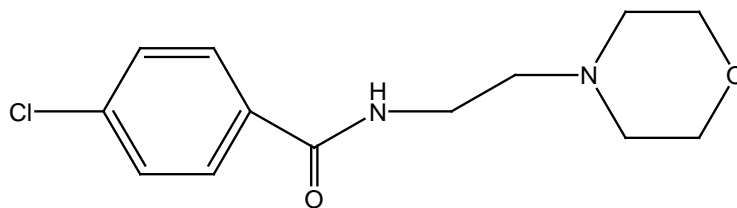
**Mianserin-hidrochlorid**

1,2,3,4,10,14b-heksahidro-2-metildibenzo[*c,f*]pirazino[1,2-*a*]azepin hidrochlorid



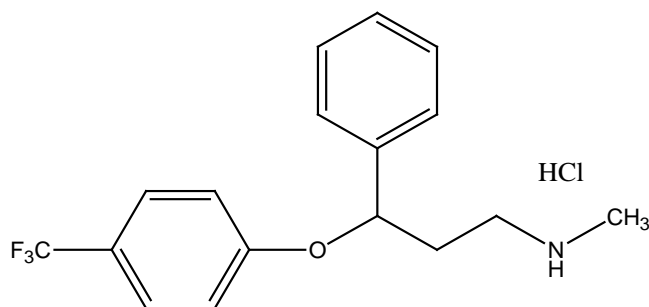
**Sertralin-hidrochlorid**

(1*S*,4*S*)-4-(3,4-dihlorofenil)-*N*-metil-1,2,3,4-tetrahdronaftalen-1-amin hidrochlorid



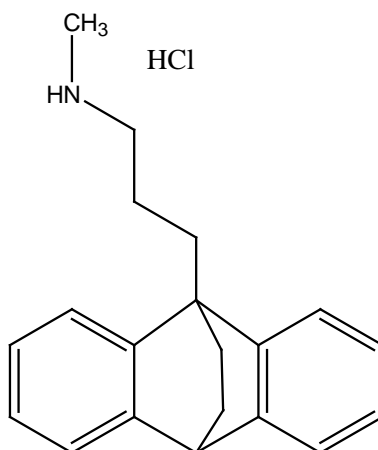
**Moklobemid**

4-hloro-*N*-[2-(4-morfolinil)etil]benzamid



**Fluoksetin-hidrohlorid**

(*3RS*)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoksi]propan-1-amin hidrohlorid



**Maprotilin-hidrohlorid**

3-(9,10-etanoantracen-9(10*H*)-il)-*N*-metilpropan-1-amin hidrohlorid

**Slika 8.** Smeša 3: antidepresivi

## **Kompjuterski programi**

MATLAB 7.10.0 (Mathworks, Natick, MA, USA)

Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

DesignExpert 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

STATISTICA 7 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA)

MINITAB (Minitab Inc. State College, PA, USA)

SPSS Statistics 17.0 (IBM, New York, NY, USA)



### 6.3. ANALIZA RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

#### 6.3.1. RAZVOJ OSNOVNE METODE

##### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda raloksifena i njegove četiri nečistoće pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (5 mM SDS) (45:55 V/V), pH mobilne faze podešen na 2,8 *orto*-fosfornom kiselinom, tako da su postignute koncentracije od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za raloksifen i 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za sve nečistoće. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

##### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom centralnim kompozicionim dizajnom koji je prikazan u tabeli 1.

**Tabela 1.** Eksperimentalni plan prema centralnom kompozicionom dizajnu

<b>Eksp.</b>	<b>ACN</b>	<b>pH</b>	<b>SDS</b>	<b>T</b>
<b>1</b>	43 (-1)	2,5 (-1)	4,0 (-1)	25 (-1)
<b>2</b>	47 (+1)	2,5 (-1)	4,0 (-1)	25 (-1)
<b>3</b>	43 (-1)	3,5 (+1)	4,0 (-1)	25 (-1)
<b>4</b>	47 (+1)	3,5 (+1)	4,0 (-1)	25 (-1)
<b>5</b>	43 (-1)	2,5 (-1)	6,0 (+1)	25 (-1)
<b>6</b>	47 (+1)	2,5 (-1)	6,0 (+1)	25 (-1)
<b>7</b>	43 (-1)	3,5 (+1)	6,0 (+1)	25 (-1)
<b>8</b>	47 (+1)	3,5 (+1)	6,0 (+1)	25 (-1)
<b>9</b>	43 (-1)	2,5 (-1)	4,0 (-1)	35 (+1)
<b>10</b>	47 (+1)	2,5 (-1)	4,0 (-1)	35 (+1)
<b>11</b>	43 (-1)	3,5 (+1)	4,0 (-1)	35 (+1)
<b>12</b>	47 (+1)	3,5 (+1)	4,0 (-1)	35 (+1)
<b>13</b>	43 (-1)	2,5 (-1)	6,0 (+1)	35 (+1)
<b>14</b>	47 (+1)	2,5 (-1)	6,0 (+1)	35 (+1)
<b>15</b>	43 (-1)	3,5 (+1)	6,0 (+1)	35 (+1)
<b>16</b>	47 (+1)	3,5 (+1)	6,0 (+1)	35 (+1)
<b>17</b>	41 (- $\alpha$ )	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>18</b>	49 (+ $\alpha$ )	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>19</b>	45 (0)	2,0 (- $\alpha$ )	5,0 (0)	30 (0)
<b>20</b>	45 (0)	4,0 (+ $\alpha$ )	5,0 (0)	30 (0)
<b>21</b>	45 (0)	3,0 (0)	3,7 (- $\alpha$ )	30 (0)
<b>22</b>	45 (0)	3,0 (0)	7,0 (+ $\alpha$ )	30 (0)
<b>23</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	20 (- $\alpha$ )
<b>24</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	40 (+ $\alpha$ )
<b>25</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>26</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>27</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>28</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>29</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)
<b>30</b>	45 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	30 (0)

ACN – koncentracija acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH – pH vrednost mobilne faze, SDS – koncentracija SDS-a u vodenoj fazi (mM), T – temperatura kolone (°C)

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi

### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *XBridge*<sup>TM</sup>, 100 mm x 3,0 mm, veličina čestica 3,5 μm

Protok mobilne faze: 1 mL min.<sup>-1</sup>

Temperatura: definisana eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 1.

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retencionna vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0.

Računanje vrednosti funkcija: *Microsoft Office Excel*

Grafičke prezentacije funkcija: *MATLAB* 7. 10. 0.

Trodimenzionalne površine odgovora: *STATISTICA* 7.

### 6.3.2. BACK UP METODA

#### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda raloksifena i njegove četiri nečistoće pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (6 mM SDS) (56:44 V/V), pH mobilne faze podešen na 4,5 *orto*-fosfornom kiselinom, tako da su postignute koncentracije od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za raloksifen-hidrohlorid i 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za sve nečistoće. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

#### Mobilna faza

Sastav mobilne faze bio je acetonitril–vodena faza (6 mM SDS) (56:44 V/V), pH mobilne faze podešen na 4,5 *orto*-fosfornom kiselinom.

#### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Sun Fire C18*, 100 mm x 3 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$

Protok mobilne faze: 1 mL min.<sup>-1</sup>

Temperatura: 35 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### 6.3.3. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE

#### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda raloksifena i njegove četiri nečistoće pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (6 mM SDS) (56:44 V/V), pH mobilne faze podešen na 4,5 *orto*-fosfornom kiselinom, tako da su postignute koncentracije od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za raloksifen-hidrohlorid i 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za sve nečistoće. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

#### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom Plaket–Burman dizajnom koji je prikazan u tabeli 2.

**Tabela 2.** Eksperimentalni plan prema Plaket–Burman eksperimentalnom dizajnu

<b>Eksp.</b>	<b>A</b>	<b>d<sub>1</sub></b>	<b>C</b>	<b>d<sub>2</sub></b>	<b>E</b>	<b>d<sub>3</sub></b>	<b>G</b>	<b>d<sub>4</sub></b>	<b>d<sub>5</sub></b>	<b>K</b>	<b>d<sub>6</sub></b>
<b>1</b>	45 (+1)	+1	5,5 (-1)	+1	50 (+1)	+1	4,4 (-1)	-1	-1	1,1 (+1)	-1
<b>2</b>	43 (-1)	+1	6,5 (+1)	-1	50 (+1)	+1	4,7 (+1)	-1	-1	0,9 (-1)	+1
<b>3</b>	45 (+1)	-1	6,5 (+1)	+1	40 (-1)	+1	4,7 (+1)	+1	-1	0,9 (-1)	-1
<b>4</b>	43 (-1)	+1	5,5 (-1)	+1	50 (+1)	-1	4,7 (+1)	+1	+1	0,9 (-1)	-1
<b>5</b>	43 (-1)	-1	6,5 (+1)	-1	50 (+1)	+1	4,4 (-1)	+1	+1	1,1 (+1)	-1
<b>6</b>	43 (-1)	-1	5,5 (-1)	+1	40 (-1)	+1	4,7 (+1)	-1	+1	1,1 (+1)	+1
<b>7</b>	45 (+1)	-1	5,5 (-1)	-1	50 (+1)	-1	4,7 (+1)	+1	-1	1,1 (+1)	+1
<b>8</b>	45 (+1)	+1	5,5 (-1)	-1	40 (-1)	+1	4,4 (-1)	+1	+1	0,9 (-1)	+1
<b>9</b>	45 (+1)	+1	6,5 (+1)	-1	40 (-1)	-1	4,7 (+1)	-1	+1	1,1 (+1)	-1
<b>10</b>	43 (-1)	+1	6,5 (+1)	+1	40 (-1)	-1	4,4 (-1)	+1	-1	1,1 (+1)	+1
<b>11</b>	45 (+1)	-1	6,5 (+1)	+1	50 (+1)	-1	4,4 (-1)	-1	+1	0,9 (-1)	+1
<b>12</b>	43 (-1)	-1	5,5 (-1)	-1	40 (-1)	-1	4,4 (-1)	-1	-1	0,9 (-1)	-1

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – koncentracija SDS-a u vodenoj fazi (mM); d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – temperatura kolone (°C); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – pH vrednost mobilne faze; d<sub>4</sub> – *dummy* 4; d<sub>5</sub> – *dummy* 5; K – protok mobilne faze (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>6</sub> – *dummy* 6

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi

### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Sun Fire C18*, 100 mm x 3 mm, veličina čestica 3,5 µm

Protok mobilne faze: definisan eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 2

Temperatura: definisana eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 2

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retenciona vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0.

Konstruisanje matrica preklapanja: MATLAB 7. 10. 0.

Statistička obrada rezultata: *SPSS Statistics* i MINITAB

## 6.4. ANALIZA SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA

### 6.4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE

#### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše agonista i antagonista beta receptora pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (40 mM amonijum-acetat, pH podešen na 4,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (85:15 V/V) tako da su postignute koncentracije od 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za atenolol, metoprolol, fenoterol i salbutamol i 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za propranolol. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

#### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom centralnim kompozicionim dizajnom koji je prikazan u tabeli 3.

**Tabela 3.** Eksperimentalni plan prema *rotatable* centralnom kompozicionom dizajnu

<b>Eksp.</b>	<b>ACN</b>	<b>pH</b>	<b>AcNH<sub>4</sub></b>
<b>1</b>	80 (-1)	3,5 (-1)	20 (-1)
<b>2</b>	90 (+1)	3,5 (-1)	20 (-1)
<b>3</b>	80 (-1)	5,5 (+1)	20 (-1)
<b>4</b>	90 (+1)	5,5 (+1)	20 (-1)
<b>5</b>	80 (-1)	3,5 (-1)	60 (+1)
<b>6</b>	90 (+1)	3,5 (-1)	60 (+1)
<b>7</b>	80 (-1)	5,5 (+1)	60 (+1)
<b>8</b>	90 (+1)	5,5 (+1)	60 (+1)
<b>9</b>	76,6 (- $\alpha$ )	4,5 (0)	40 (0)
<b>10</b>	93,4 (+ $\alpha$ )	4,5 (0)	40 (0)
<b>11</b>	85 (0)	2,82 (- $\alpha$ )	40 (0)
<b>12</b>	85 (0)	6,18 (+ $\alpha$ )	40 (0)
<b>13</b>	85 (0)	4,5 (0)	6,36 (- $\alpha$ )
<b>14</b>	85 (0)	4,5 (0)	73,64 (+ $\alpha$ )
<b>15</b>	85 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>16</b>	85 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>17</b>	85 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>18</b>	85 (0)	4,5 (0)	40 (0)

ACN – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); pH – pH vrednost vodene faze;

AcNH<sub>4</sub> – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi

#### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*, USA

Kolona: *Betasil Silica*, 100 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5  $\mu$ m

Protok mobilne faze: 1 mL min.<sup>-1</sup>

Temperatura: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm



### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retencionna vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0.

Računanje vrednosti funkcija: *Microsoft Office Excel*

Trodimenzionalne površine odgovora: STATISTICA 7.

## 6.4.2. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE

### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše agonista i antagonista beta receptora pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (40 mM amonijum-acetat, pH podešen na 4,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (85:15 V/V) tako da su postignute koncentracije od 50 µg mL<sup>-1</sup> za atenolol, metoprolol, fenoterol i salbutamol i 20 µg mL<sup>-1</sup> za propranolol. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom Plaket–Burman dizajnom koji je prikazan u tabeli 4.

**Tabela 4.** Eksperimentalni plan prema Plaket–Burman eksperimentalnom dizajnu

Eksp.	A	d <sub>1</sub>	C	d <sub>2</sub>	E	d <sub>3</sub>	G	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub>	K	d <sub>6</sub>
1	86 (+1)	1	4,9 (-1)	1	45 (+1)	1	25 (-1)	-1	0,9 (-1)	1	-1
2	84 (-1)	1	5,3 (+1)	-1	45 (+1)	1	35 (+1)	-1	0,9 (-1)	-1	1
3	86 (+1)	-1	5,3 (+1)	1	35 (-1)	1	35 (+1)	1	0,9 (-1)	-1	-1
4	84 (-1)	1	4,9 (-1)	1	45 (+1)	-1	35 (+1)	1	1,1 (+1)	-1	-1
5	84 (-1)	-1	5,3 (+1)	-1	45 (+1)	1	25 (-1)	1	1,1 (+1)	1	-1
6	84 (-1)	-1	4,9 (-1)	1	35 (-1)	1	35 (+1)	-1	1,1 (+1)	1	1
7	86 (+1)	-1	4,9 (-1)	-1	45 (+1)	-1	35 (+1)	1	0,9 (-1)	1	1
8	86 (+1)	1	4,9 (-1)	-1	35 (-1)	1	25 (-1)	1	1,1 (+1)	-1	1
9	86 (+1)	1	5,3 (+1)	-1	35 (-1)	-1	35 (+1)	-1	1,1 (+1)	1	-1
10	84 (-1)	1	5,3 (+1)	1	35 (-1)	-1	25 (-1)	1	0,9 (-1)	1	1
11	86 (+1)	-1	5,3 (+1)	1	45 (+1)	-1	25 (-1)	-1	1,1 (+1)	-1	1
12	84 (-1)	-1	4,9 (-1)	-1	35 (-1)	-1	25 (-1)	-1	0,9 (-1)	-1	-1

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – pH vrednost vodene faze; d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – temperatura kolone (°C); d<sub>4</sub> – *dummy* 4; J – protok mobilne faze (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>5</sub> – *dummy* 5; d<sub>6</sub> – *dummy* 6

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi

### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*, USA

Kolona: *Betasil Silica*, 100 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm

Protok mobilne faze: definisan eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 4

Temperatura: definisana eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 4

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retencionna vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0.

Konstruisanje matrica preklapanja: MATLAB 7. 10. 0.

Statistička obrada rezultata: *SPSS Statistics* i MINITAB

## 6.5. ANALIZA SMEŠE ANTIDEPRESIVA

### 6.5.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE

#### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše antidepresiva pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (40 mM amonijum-acetat, pH podešen na 4,0 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (90:10 V/V) tako da su postignute koncentracije od 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za fluoksetin i maprotilin, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za mianserin, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za moklobemid, 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za sertralin i 1  $\text{mg mL}^{-1}$  za selegilin. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

#### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom  $3^3$  punim faktorskim dizajnom koji je prikazan u tabeli 5.

**Tabela 5.** Eksperimentalni plan prema 3<sup>3</sup> punom faktorskom dizajnu

<b>Eksp.</b>	<b>ACN</b>	<b>pH</b>	<b>AcNH<sub>4</sub></b>
<b>1</b>	86 (-1)	3,0 (-1)	20 (-1)
<b>2</b>	86 (-1)	3,0 (-1)	40 (0)
<b>3</b>	86 (-1)	3,0 (-1)	60 (+1)
<b>4</b>	86 (-1)	4,5 (0)	20 (-1)
<b>5</b>	86 (-1)	4,5 (0)	40 (0)
<b>6</b>	86 (-1)	4,5 (0)	60 (+1)
<b>7</b>	86 (-1)	6,0 (+1)	20 (-1)
<b>8</b>	86 (-1)	6,0 (+1)	40 (0)
<b>9</b>	86 (-1)	6,0 (+1)	60 (+1)
<b>10</b>	90 (0)	3,0 (-1)	20 (-1)
<b>11</b>	90 (0)	3,0 (-1)	40 (0)
<b>12</b>	90 (0)	3,0 (-1)	60 (+1)
<b>13</b>	90 (0)	4,5 (0)	20 (-1)
<b>14</b>	90 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>15</b>	90 (0)	4,5 (0)	60 (+1)
<b>16</b>	90 (0)	6,0 (+1)	20 (-1)
<b>17</b>	90 (0)	6,0 (+1)	40 (0)
<b>18</b>	90 (0)	6,0 (+1)	60 (+1)
<b>19</b>	94 (+1)	3,0 (-1)	20 (-1)
<b>20</b>	94 (+1)	3,0 (-1)	40 (0)
<b>21</b>	94 (+1)	3,0 (-1)	60 (+1)
<b>22</b>	94 (+1)	4,5 (0)	20 (-1)
<b>23</b>	94 (+1)	4,5 (0)	40 (0)
<b>24</b>	94 (+1)	4,5 (0)	60 (+1)
<b>25</b>	94 (+1)	6,0 (+1)	20 (-1)
<b>26</b>	94 (+1)	6,0 (+1)	40 (0)
<b>27</b>	94 (+1)	6,0 (+1)	60 (+1)
<b>28</b>	90 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>29</b>	90 (0)	4,5 (0)	40 (0)
<b>30</b>	90 (0)	4,5 (0)	40 (0)

ACN – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); pH – pH vrednost vodene faze;  
AcNH<sub>4</sub> – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi

### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Betasil Silica*, 100 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm

Protok mobilne faze: 1 mL min.<sup>-1</sup>

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retenciona vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *STATISTICA 7*

Računanje vrednosti funkcija: *Microsoft Office Excel*

## 6.5.2. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE

### Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše antidepresiva pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (40 mM amonijum-acetat, pH podešen na 4,0 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (90:10 V/V) tako da su postignute koncentracije od  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  za fluoksetin i maprotilin,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  za mianserin,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  za moklobemid,  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  za sertralin i  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  za selegilin. Rastvori su čuvani na temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pre injektovanja temperirani su na sobnu temperaturu.

### Mobilna faza

Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom Plaket–Burman dizajnom koji je prikazan u tabeli 6.

**Tabela 6.** Eksperimentalni plan prema Plaket–Burman dizajnu

Eksp.	A	d <sub>1</sub>	C	d <sub>2</sub>	E	d <sub>3</sub>	G	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub>	K	d <sub>6</sub>
1	87 (+1)	1	5,8 (-1)	1	25 (+1)	1	20 (-1)	-1	-1	1,1 (+1)	-1
2	85 (-1)	1	6,2 (+1)	-1	25 (+1)	1	40 (+1)	-1	-1	0,9 (-1)	1
3	87 (+1)	-1	6,2 (+1)	1	15 (-1)	1	40 (+1)	1	-1	0,9 (-1)	-1
4	85 (-1)	1	5,8 (-1)	1	25 (+1)	-1	40 (+1)	1	1	0,9 (-1)	-1
5	85 (-1)	-1	6,2 (+1)	-1	25 (+1)	1	20 (-1)	1	1	1,1 (+1)	-1
6	85 (-1)	-1	5,8 (-1)	1	15 (-1)	1	40 (+1)	-1	1	1,1 (+1)	1
7	87 (+1)	-1	5,8 (-1)	-1	25 (+1)	-1	40 (+1)	1	-1	1,1 (+1)	1
8	87 (+1)	1	5,8 (-1)	-1	15 (-1)	1	20 (-1)	1	1	0,9 (-1)	1
9	87 (+1)	1	6,2 (+1)	-1	15 (-1)	-1	40 (+1)	-1	1	1,1 (+1)	-1
10	85 (-1)	1	6,2 (+1)	1	15 (-1)	-1	20 (-1)	1	-1	1,1 (+1)	1
11	87 (+1)	-1	6,2 (+1)	1	25 (+1)	-1	20 (-1)	-1	1	0,9 (-1)	1
12	85 (-1)	-1	5,8 (-1)	-1	15 (-1)	-1	20 (-1)	-1	-1	0,9 (-1)	-1
13	86 (0)	0	6 (0)	0	20 (0)	0	30 (0)	0	0	1 (0)	0
14	86 (0)	0	6 (0)	0	20 (0)	0	30 (0)	0	0	1 (0)	0
15	86 (0)	0	6 (0)	0	20 (0)	0	30 (0)	0	0	1 (0)	0

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – pH vrednost vodene faze; d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – temperatura kolone (°C); d<sub>4</sub> – *dummy* 4; d<sub>5</sub> – *dummy* 5; K – protok mobilne faze (mL min<sup>-1</sup>);

d<sub>6</sub> – *dummy* 6

\*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradi



### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Betasil Silica*, 100 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm

Protok mobilne faze: definisan eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 6

Temperatura: definisana eksperimentalnim planom prikazanim u tabeli 6

Talasna dužina detekcije: 254 nm

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smeše analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema zabeleženi su retenciona vremena i širine pikova analiziranih supstanci.

### Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana: *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0.

Konstruisanje matrica preklapanja: MATLAB 7. 10. 0.

Statistička obrada rezultata: *SPSS Statistics* i MINITAB

## 7. REZULTATI I DISKUSIJA

### 7.1. RAZVOJ NOVE FUNKCIJE HROMATOGRFSKOG ODGOVORA

Funkcije hromatografskog odgovora predstavljaju značajnu hemometrijsku pomoć u optimizaciji metoda tačne hromatografije. Međutim, kako je već naznačeno u uvodnom delu disertacije, nijedna od do sada definisanih funkcija hromatografskog odgovora nije univerzalno primenjiva. U ovoj disertaciji daje se predlog nove funkcije hromatografskog odgovora koja bi trebalo da prevaziđe neke od nedostataka koje su imale prethodno definisane funkcije.

Prvi korak u dizajniranju funkcije podrazumevao je definisanje broja i vrste individualnih članova koji će ući u sastav funkcije. Odlučeno je da to budu član koji procenjuje kvalitet separacije i član koji procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize. Kao individualni separacioni kriterijum odabran je  $\theta$  kriterijum [7] kako bi se omogućilo merenje razdvajanja pikova na baznoj liniji. Stoga je definisano da se ukupan kvalitet separacije meri kao zbir svih individualnih  $\theta$  kriterijuma. Za procenu ukupne dužine trajanja analize, kao i u većini do sada razvijenih funkcija hromatografskog odgovora, odabrano je retenciono vreme poslednjeg pika. Međutim, skale kojim se procenjuje kvalitet separacije i ukupna dužina trajanja analize potpuno su drugačije, pa je funkcija morala biti matematički prilagođena tako, da razlike između ove dve skale ne dovedu do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Prva korekcija koja je uvedena podrazumevala je deljenje zbira individualnih kriterijuma separacije sa ukupnim brojem parova pikova i deljenje ukupne dužine trajanja analize sa nekom unapred definisanom optimalnom vrednošću trajanja analize. Na kraju, dodati su težinski faktori i za separacioni član, kao i za član koji procenjuje vreme trajanja analize, kako bi se omogućilo analitičaru da prilagodi funkciju svom individualnom problemu.

Matematički izraz nove funkcije hromatografskog odgovora (označene kao  $N_{CRF}$ ) formulisan je na sledeći način:

$$N_{CRF} = \left( a \left( 1 - \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \theta_{s,l}}{N-1} \right) + 1 \right) \left( 1 + \left( \frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \quad (73)$$

gde je  $\theta_{s,l}$  Karlov kriterijum razdvajanja [7],  $N$  je broj očekivanih pikova,  $t_f$  je retenciono vreme poslednjeg pika,  $t_{opt}$  je odabrano optimalno retenciono vreme poslednjeg pika,  $a$  i  $b$  su koeficijenti koje treba definisati unapred ( $a$  se obično bira u intervalu od 1 do 5, a  $b$  u intervalu od 0 do 5).

$N_{CRF}$  dostiže minimum kako se uslovi razdvajanja približavaju globalnom optimumu, što znači da što je niža izračunata vrednost  $N_{CRF}$ , to su hromatografski uslovi bliži globalnom optimumu.

Razvijena funkcija kreirana je u pokušaju da zadovolji zahteve koje je Sela istakao da bi funkcija hromatografskog odgovora trebalo da poseduje [10, 12]:

### **1) Funkcija hromatografskog odgovora treba da bude efikasna u poređenju i razlikovanju kvaliteta hromatograma**

Funkcija  $N_{CRF}$  dizajnirana je tako da procenjuje kvalitet hromatograma na osnovu kvaliteta postignute separacije i ukupne dužine trajanja analize. Smatra se da su upravo ova dva svojstva hromatograma od najvećeg značaja u postizanju optimalne analize.

### **2) Funkcija hromatografskog odgovora treba da bude efikasna u kvantitativnom skaliranju kvaliteta hromatograma**

Članovi funkcije koji procenjuju separaciju i ukupnu dužinu trajanja analize dizajnirani su u pokušaju da omoguće tačno kvantitativno merenje ova dva svojstva za svaki hromatogram.

### 2.1. Procena kvaliteta razdvajanja – član separacije

Kako  $N_{CRF}$  procenjuje razdvajanje pomoću  $\theta$  kriterijuma, trebalo bi da omogući procenu pikova koji nisu Gausovog oblika i da omogući razmatranje potencijalne pojave asimetrije.  $\theta$  kriterijum ima vrednosti u opsegu od 0 (za potpuno preklapljene pikove) do 1 (za savršeno razdvojene pikove), tako da svaki par pikova koji je dobro razdvojen daje doprinos od 1 sumi  $\theta$  vrednosti i neće biti maskiranja loše razdvojenih pikova visokim vrednostima faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova, što je slučaj sa funkcijama koje koriste faktor rezolucije za procenu kvaliteta razdvajanja.

### 2.2. Procena dužine trajanja analize – član vremena

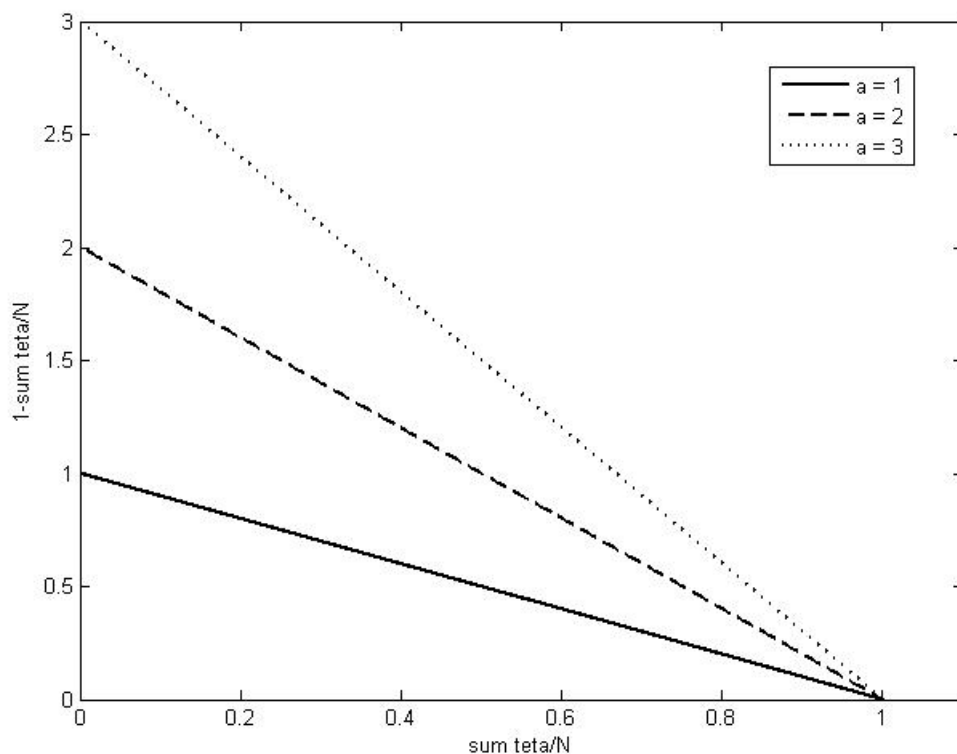
Član koji procenjuje vreme je funkcija odabranog ukupnog vremena trajanja analize.

Pored ovih suštinskih, postoji niz drugih poželjnih svojstava koje bi funkcija trebalo da sadrži:

### **3) Funkcija hromatografskog odgovora treba da odgovara očekivanjima analitičara i 4) da zavisi od parametara koje kontroliše analitičar, a ne uključuje parametre koje nije moguće kontrolisati**

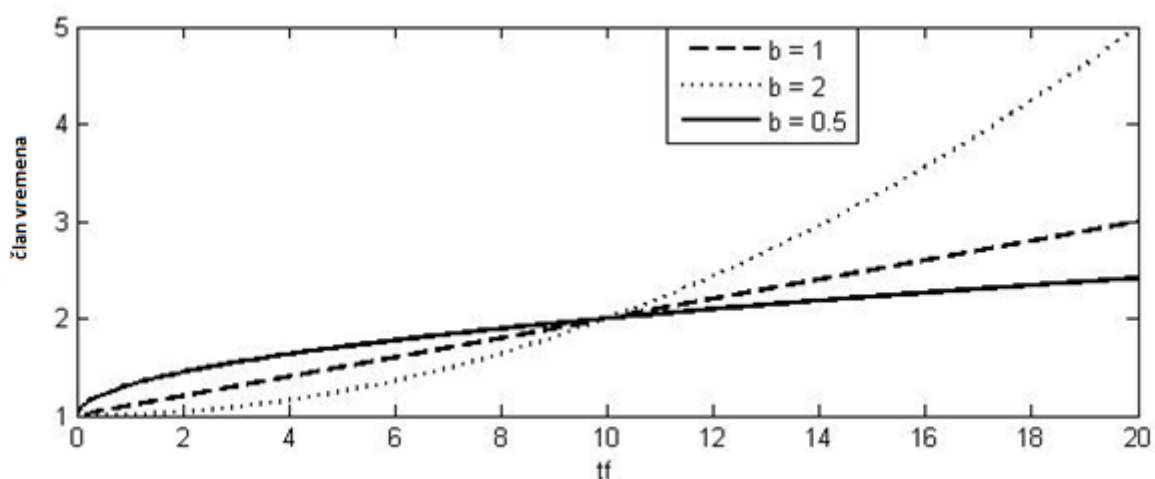
Funkcija  $N_{CRF}$  dizajnirana je tako da analitičar može da podesi željena ravnoteža između dva člana u zavisnosti od njegovih očekivanja od metode. Koeficijenti  $a$  i  $b$  omogućavaju podešavanje težina članova koji procenjuju razdvajanje, kao i trajanje analize. To znači da u slučaju kada je kao osnovni cilj postavljeno savršeno razdvajanje, a dužina trajanja analize nije od presudnog značaja, analitičar će se opredeliti za visoku vrednost  $a$  i malu vrednost  $b$ . S druge strane, ako se akcenat stavlja na odstupanje ukupne dužine trajanja analize od optimalno prihvatljive, potrebno je povećati koeficijent  $b$ .

Koeficijent  $a$  omogućava postavljanje odgovarajućeg akcenta na član rezolucije što se može videti na slici 9. Što je postavljena veća vrednost koeficijenta  $a$ , veći je nagib krive, što znači da će promena kvaliteta razdvajanja snažnije uticati na vrednost funkcije.



**Slika 9.** Uticaj težinskog faktora  $a$  na vrednost funkcije  $N_{CRF}$

Član  $N_{CRF}$  koji procenjuje vreme definisan je, pre svega, određivanjem optimalnog vremena trajanja analize  $t_{opt}$ , a zatim, podešavanjem koeficijenta  $b$  čij je utcaj na vrednost funkcije predstavljen na slici 10. Može se primetiti da povećavanjem  $b$  vrednosti variranje ukupne dužine trajanja analize ima veći uticaj na vrednost funkcije.



**Slika 10.** Uticaj težinskog faktora  $b$  na vrednost funkcije  $N_{CRF}$  ( $t_{opt} = 10$ )

**5) Funkcija hromatografskog odgovora treba da pokazuje logičnu korelaciju sa separacionim parametrima kako bi pokazala analitičaru na koji način može poboljšati sledeći eksperimentalni pokušaj**

Raspon vrednosti kojima funkcija  $N_{CRF}$  karakteriše kvalitet hromatograma je uzak i racionalnim podešavanjima koeficijenata  $a$  i  $b$  relativno se lako mogu povezati dobijene vrednosti funkcije sa stvarnim izgledom hromatograma.

**6) Funkcija hromatografskog odgovora treba da bude matematički korektna**

Funkcija  $N_{CRF}$  kreirana je tako da bude definisana za sve vrednosti  $\theta$ . Kada se postigne zadovoljavajuće razdvajanje svih pikova, suma  $\theta$  vrednosti biće jednaka  $N-1$  i deo funkcije u zagradi koji procenjuje razdvajanje biće jednak nuli. Stoga je u član koji procenjuje separaciju dodata jedinica kako bi funkcija bila definisana vrednošću člana koji procenjuje vreme  $i$  u slučaju idealne separacije.

Novorazvijena funkcija u nastavku istraživanja testirana je na simuliranim hromatogramima, eksperimentalno dobijenim hromatogramima u RP-LC sistemu, kao i eksperimentalno dobijenim hromatogramima u HILIC sistemu. Paralelno sa  $N_{CRF}$ , svi navedeni sistemi procenjivani su sa šest prethodno razvijenih funkcija hromatografskog odgovora kako bi se proverila pogodnost  $N_{CRF}$  i identifikovale potencijalne prednosti i mane u poređenju sa drugim razvijenim funkcijama.

### 7.1.1. VERIFIKACIJA FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI SIMULIRANIH HROMATOGRAMA

Prva faza verifikacije novorazvijene funkcije hromatografskog odgovora podrazumevala je procenu njene sposobnosti da tačno kvalitativno i kvantitativno rangira simulirane hromatograme u poređenju sa šest prethodno razvijenih funkcija: Beridžovom funkcijom hromatografskog odgovora –  $B_{CRF}$  [13]; Glajcovom hromatografskom optimizacionom funkcijom – COF [14]; Šlabahovom statističkom hromatografskom rezolucijom – CRS [16]; Dozovom funkcijom hromatografskog odgovora –  $Do_{CRF}$  [15]; Morisovom hromatografskom eksponencijalnom funkcijom – CEF [17] i Duarteovom funkcijom hromatografskog odgovora –  $D_{CRF}$  [8]. Formule kojima su definisane ove funkcije predstavljene su u uvodnom delu disertacije u poglavlju 2.4.3.

Način na koji će svaka od sedam analiziranih funkcija proceniti isti set hromatograma ne mora da bude identičan. Naprotiv, može se desiti da se jave značajne razlike u proceni hromatograma koje mogu poticati iz razlike u matematičkoj konstrukciji članova funkcija koji procenjuju separaciju i dužinu trajanja analize. Funkcije  $B_{CRF}$ , COF,  $Do_{CRF}$ , CRS i CEF procenjuju razdvajanje pomoću faktora rezolucije. Iako se faktor rezolucije smatra univerzalnim parametrom separacije, kritična vrednost od 1,5 koja se definiše za postizanje separacije na baznoj liniji važi samo za pikove koji imaju Gausov oblik. Za pikove koji su asimetrični, teško je unapred definisati optimalni faktor rezolucije, tako da postoji ozbiljan rizik od dobijanja lažno pozitivnih (ako je odabrana mala vrednost optimalnog faktora rezolucije) ili lažno negativnih rezultata (ako je odabrana velika vrednost optimalnog faktora rezolucije). Takođe, mora se obratiti posebna pažnja na potencijalno maskiranje loše razdvojenih pikova velikim vrednostima faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova. Upravo zbog toga, poželjno je svođenje svih vrednosti faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova na definisanu graničnu vrednost pre računanja funkcija.

Za razliku od prethodnih, funkcije  $D_{CRF}$  i  $N_{CRF}$  procenjuju razdvajanje na osnovu  $\theta$  kriterijuma. Ovaj kriterijum je pogodan za pikove Gausovog oblika, ali i za one koji su asimetrični. Za razliku od faktora rezolucije,  $\theta$  omogućava merenje separacije na baznoj

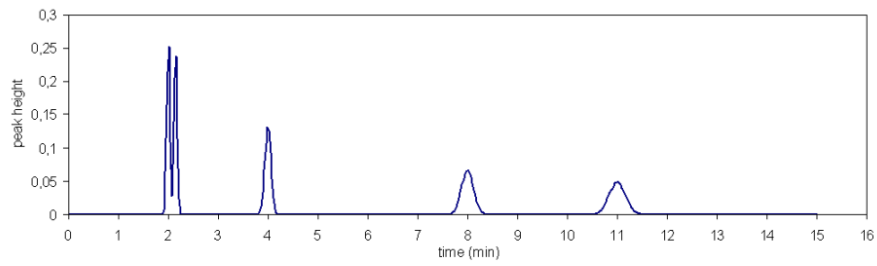
liniji. Doprinos svakog para dobro razdvojenih pikova sumi  $\theta$  vrednosti biće uvek 1, tako da će se izbeći maskiranje loše razdvojenih pikova dobro razdvojenim.

Član koji procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize, u funkcijama  $B_{\text{CRF}}$ ,  $\text{COF}$ ,  $D_{\text{O}_{\text{CRF}}}$ ,  $\text{CEF}$  i  $N_{\text{CRF}}$  konstruisan je tako da meri odstupanje od definisanog optimalnog vremena. U funkciji  $\text{CRS}$  ovaj član predstavljen je samo eksperimentalno dobijenim ukupnim vremenom trajanja analize što može dovesti do prevage člana vremena u odnosu na član separacije unutar funkcije [17]. S druge strane,  $D_{\text{CRF}}$  meri odstupanje ukupnog vremena trajanja analize od vremena izlaska mobilne faze iz kolone. Ovakav pristup stavlja veoma mali akcenat na član koji procenjuje vreme trajanja analize i može voditi izrazitoj dominaciji člana funkcije koji procenjuje razdvajanje.

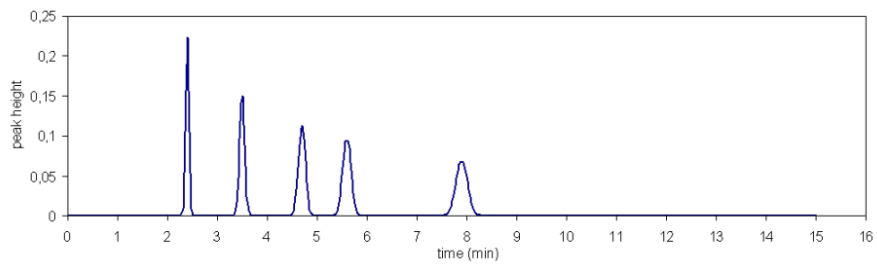
Uprkos navedenim brojnim problemima, najveći izazov prilikom konstrukcije funkcija hromatografskog odgovora predstavlja postizanje adekvatne ravnoteže između različitih individualnih članova funkcije. Naime, većina funkcija uključuje u svoj dizajn težinske faktore kojima se podešava ravnoteža između članova i koje bira analitičar prema datom hromatografskom problemu. Međutim, nisu sve funkcije jednako pogodne za podešavanje ravnoteže. Funkcije koje procenjuju kvalitet razdvajanja eksponencijalnom funkcijom vode ka neizbežnoj prevagi procene razdvajanja u odnosu na procenu dužine trajanja analize.

Kako bi se sagledale prednosti i nedostaci analiziranih funkcija, konstruisano je šest simuliranih hromatograma prikazanih na slici 11.

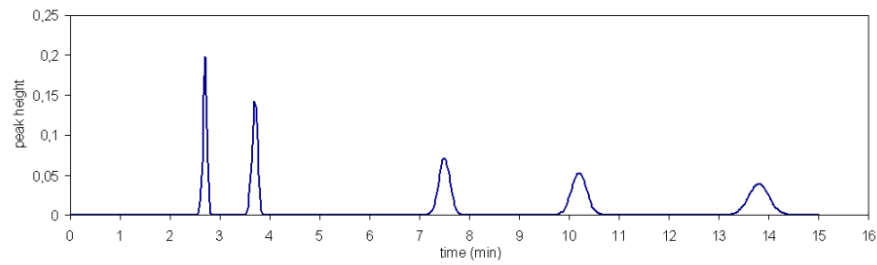




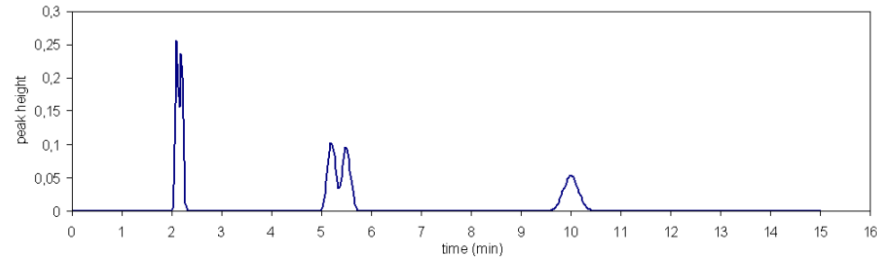
1.



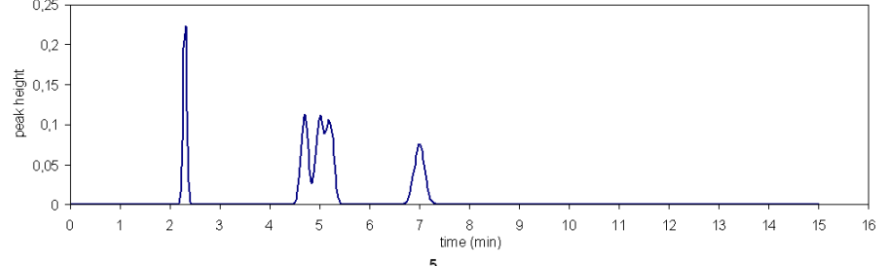
2.



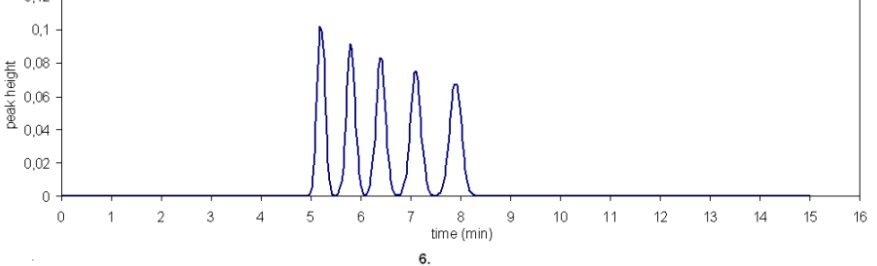
3.



4.



5.



6.

**Slika 11.** Simulirani hromatogrami

Hromatogrami su označeni brojevima od 1 do 6. Odabrani su tako da poseduju različite separacione karakteristike, kao i razlike u ukupnoj dužini trajanja analize. Sa slike 11 može se primetiti da hromatogrami 2, 3 i 6 imaju postignuto razdvajanje svih susednih pikova na baznoj liniji i dužine trajanja analize 7,9 (hromatogram 2), 13,8 (hromatogram 3) i 7,9 (hromatogram 6) minuta. Hromatogram 1 poseduje prvi par pikova delimično preklopljen i ukupnu dužinu trajanja analize 11 minuta, dok hromatogrami 4 i 5 imaju nekoliko preklopljenih pikova i ukupne dužine trajanja analize 10 (hromatogram 4) i 7 minuta (hromatogram 5).

Procenjeni su važni hromatografski parametri za svaki simulirani hromatogram i predstavljeni su u tabeli 7.

**Tabela 7.** Važni hromatografski parametri za simulirane hromatograme i dobijene vrednosti sedam ispitivanih funkcija

Eksp.	$\theta_{1/2}$	$\theta_{2/3}$	$\theta_{3/4}$	$\theta_{4/5}$	$Rs_{1/2}$	$Rs_{2/3}$	$Rs_{3/4}$	$Rs_{4/5}$	$t_1$	$t_f$	$B_{CRF}$	COF	$Do_{CRF}$	CRS	CEF	$D_{CRF}$	$N_{CRF}$
1	0,89	1,00	1,00	1,00	1,26	10,39	11,24	5,28	2,00	11,00	31,18	14,11	1,56	3,68	10,62	7,92	2,40
2	1,00	1,00	1,00	1,00	6,39	4,92	2,94	5,72	2,40	7,90	22,27	16,04	1,00	2,42	8,90	8,05	1,79
3	1,00	1,00	1,00	1,00	5,36	11,5	5,14	5,06	2,70	13,80	27,95	13,47	1,47	4,40	11,90	8,03	2,38
4	0,36	1,00	0,61	1,00	0,79	13,61	0,96	9,83	2,10	10,00	29,29	8,97	2,12	22,56	152,14	6,02	4,56
5	1,00	0,76	0,15	1,00	11,8	1,07	0,67	4,93	2,30	7,00	19,7	9,36	1,86	50,31	218,86	6,97	4,02
6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,86	1,68	1,76	1,78	5,20	7,90	7,79	4,09	2,02	1,75	4,00	8,05	1,79

$\theta_{s,l}$  – kriterijum razdvajanja susednih pikova;  $t_1$  – retenciono vreme prvog pika;  $t_f$  – retenciono vreme poslednjeg pika;  $Rs_{s,l}$  – faktor rezolucije za susedne pikove;  $B_{CRF}$  – Beridžova funkcija hromatografskog odgovora [13]; COF – Glajcova hromatografska optimizaciona funkcija [14]; CRS – Šlabahova statistička hromatografska rezolucija [16];  $Do_{CRF}$  – Dozova funkcija hromatografskog odgovora [15];  $D_{CRF}$  – Duarteova funkcija hromatografskog odgovora [8]; CEF – Morisova hromatografska eksponencijalna funkcija [17];  $N_{CRF}$  – nova funkcija hromatografskog odgovora

Kako bi se izračunale vrednosti funkcija hromatografskog odgovora, težinski parametri postavljani su tako da se stavi veći akcenat na postizanje razdvajanja u odnosu na ukupnu dužinu trajanja analize. Definirane su sledeće konstante:  $B_{CRF}$  ( $T_A = 10$  min,  $T_0 = 3$  min); COF ( $R_{id} = 1,5$ ,  $t_m = 10$  min,  $A = 3$ ,  $B = 1$ ); DoCRF ( $t_{R,cri} = 10$  min,  $R_{s,cri} = 1,5$ ); CRS ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $R_{min} = 0,5$ ); CEF ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $t_{max} = 10$  min,  $a = 3$ ) i  $N_{CRF}$  ( $a = 5$ ,  $b = 1$ ). Funkcije su izračunate za svaki od simuliranih hromatograma i njihove vrednosti predstavljene su u tabeli 7.

Funkcije  $B_{CRF}$ , COF i  $D_{CRF}$  matematički su dizajnirane tako da se povećavaju kako se poboljšava kvalitet hromatograma. S druge strane, funkcije DoCRF, CRS, CEF i  $N_{CRF}$  dostižu minimum kako se približavaju optimalnom hromatogramu. Stoga, analizirajući tabelu 7, može se uočiti sledeći redosled rangiranja hromatograma koji su predložile funkcije:

$B_{CRF}$	1>4>3>2>5>6
COF	2>1>3>5>4>6
$D_{CRF}$	2>3>1>5>6>4
CRS	6>2>1>3>4>5
CEF	6>2>1>3>4>5
$D_{CRF}$	2=6>3>1>5>4
$N_{CRF}$	2=6>3>1>5>4

Analizirajući funkciju  $B_{CRF}$ , može se uočiti da je njen glavni nedostatak činjenica da se procena razdvajanja vrši sabiranjem vrednosti faktora rezolucije. Ovakav pristup vodi maskiranju loše razdvojenih pikova velikim vrednostima faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova. Može se uočiti da je ova funkcija identifikovala hromatograme 1 i 4 kao najbolje, iako oni sadrže više preklapljenih pikova. S druge strane, hromatogram 6 identifikovan je kao najlošiji, iako su svi parovi pikova na njemu dobro razdvojeni i vrednosti faktora rezolucije za susedne pikove veće su od 1,5.

Funkcija COF predstavila je nešto bolje rangiranje hromatograma u odnosu na funkciju  $B_{CRF}$  (hromatogram 2 identifikovan je kao najbolji). Ova funkcija meri kvalitet

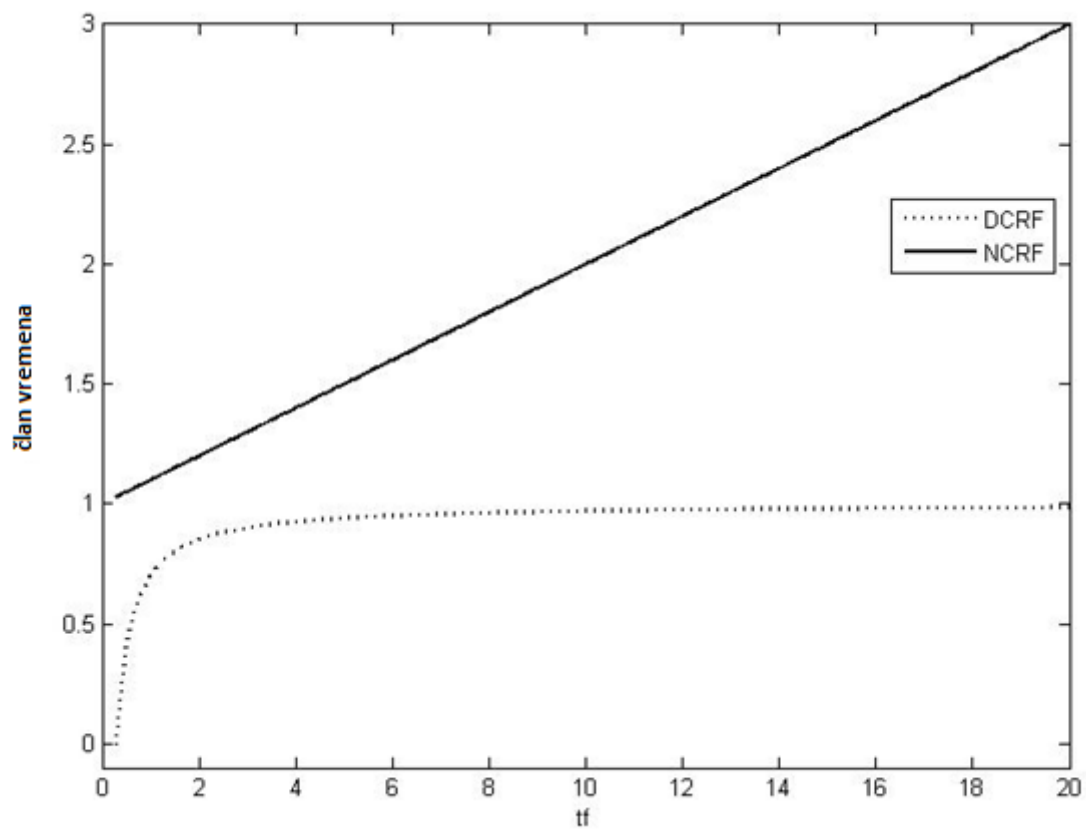
razdvajanja sumirajući logaritme vrednosti dobijenih faktora rezolucije podeljene sa optimalnom vrednošću faktora rezolucije za sve parove pikova. Iako je uticaj dobro razdvojenih pikova manji u odnosu na funkciju  $B_{CRF}$ , ipak je i dalje prisutan. Može se primetiti da je hromatogram 5 (sa tri preklapljenika i ukupnim vremenom trajanja analize od 7 minuta) identifikovan kao bolji od hromatograma 6 (koji poseduje razdvajanje na baznoj liniji za sve pikove i malo duže vreme trajanja analize). Dodatno, COF poseduje nedostatak u matematičkoj ispravnosti: kada je faktor rezolucije jednak nuli, funkcija teži minus beskonačno. Takođe, na funkciju ne utiču pikovi koji se ne pojavljuju na hromatogramu, naprotiv, vrednost funkcije se poboljšava kada se pikovi potpuno preklape [10].

Funkcija  $D_{CRF}$  procenjuje kvalitet razdvajanja eksponencijalnom funkcijom. Stoga, hromatogrami sa loše razdvojenim pikovima više utiču na vrednost ove funkcije u odnosu na prethodne funkcije. Može se primetiti da su hromatogrami 2 i 3 okarakterisani kao najbolji, dok su hromatogrami 1, 4 i 5 dali neadekvatne vrednosti funkcije, što je u skladu sa načinom na koji ova funkcija vrednuje separaciju. Međutim, hromatogram 6 i dalje nije dobro procenjen.

Funkcije CRS i CEF dale su identičnu procenu hromatograma. Zanimljivo je da su obe funkcije identifikovale hromatogram 6 kao najbolji (bolji od hromatograma 2 koji ima isto vreme trajanja analize i takođe postignutu separaciju na baznoj liniji). Ovakva procena je posledica matematičke konstrukcije člana koji procenjuje separaciju, jer je dizajniran tako da ima zadovoljavajuću vrednost samo kada je faktor rezolucije jednak odabranom optimalnom faktoru rezolucije. Usled toga, ne samo hromatogrami sa malom vrednošću faktora rezolucije (hromatogram 5), već i oni sa velikom vrednošću faktora rezolucije (hromatogram 2) pogoršavaju vrednost funkcije. Funkcija CRS može imati i problem sa predominacijom člana koji procenjuje vreme. Osim toga, ova funkcija je nedefinisana kada je dobijena vrednost faktora rezolucije jednaka minimalno prihvatljivoj rezoluciji [17].

Konačno, preostale dve funkcije,  $D_{CRF}$  i  $N_{CRF}$  jednako su ocenile kvalitet hromatograma. Njihova procena tačnija je u odnosu na prethodno ispitivane funkcije

hromatografskog odgovora kada se uzmu u obzir definisani ciljevi optimizacije. Naime, ove dve funkcije jedine su prepoznale da je separacija na baznoj liniji postignuta u slučaju hromatograma 2 i 6 i odabrale su ove hromatograme kao najbolje. Dalje, hromatogram 3 sa zadovoljavajućim razdvajanjem i nešto dužim vremenom trajanja analize dobio je sledeću najbolju vrednost funkcija. Na kraju, hromatogrami 1, 4 i 5 okarakterisani su najlošijim vrednostima funkcije usled lošeg razdvajanja. Međutim, treba primetiti da promene u članu koji procenjuje dužinu trajanja analize malo utiču na funkciju  $D_{CRF}$ . Može se videti da je vrednost  $D_{CRF}$  za hromatogram 2 iznosila 8,05, a za hromatogram 3 vrednost je bila 8,03, iako su razlike u dužini trajanja analize između njih oko 6 minuta. Slika 12 upoređuje uticaj faktora vremena na vrednosti funkcija  $D_{CRF}$  i  $N_{CRF}$ , dok je faktor rezolucije konstantan. Analizirajući sliku 12 može se uočiti da se vrednosti funkcije  $D_{CRF}$  neće značajno promeniti s promenom dužine trajanja analize i može se očekivati da će ova funkcija locirati neke optimume sa ekstremno velikom dužinom trajanja analize. S druge strane, funkcija  $N_{CRF}$  pokazuje osetljivost na promenu člana koji procenjuje vreme i neće voditi lociranju takvih optimuma.



**Slika 12.** Razlike u osjetljivosti člana koji procenjuje vreme u finkcijama  $N_{CRF}$  i  $D_{CRF}$

## 7.1.2. VERIFIKACIJA FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U RP-LC SISTEMU

### RP-LC ANALIZA RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Metoda za analizu raloksifena i njegove četiri nečistoće razvijana je hemometrijskim pristupom prateći metodologiju eksperimentalnog dizajna. Kvalitet eksperimentalno dobijenih hromatograma meren je pomoću šest do sada razvijenih funkcija hromatografskog odgovora, kao i pomoću novorazvijene funkcije  $N_{CRF}$ . Funkcije za koje se dokaže da vrše pravilnu procenu kvaliteta hromatograma mogu poslužiti kao odgovor sistema u toku razvoja i optimizacije metode.

#### **1. Definisanje cilja optimizacije**

Zbog složenosti analizirane smeše koja se sastoji iz pet strukturno sličnih supstanci odlučeno je da se kao primarni cilj optimizacije postavi postizanje razdvajanja između svih susednih pikova. Za optimalno prihvatljivo vreme trajanja analize odabrano je 10 minuta. Stoga je cilj bio pronaći uslove koji omogućavaju dobijanje hromatograma s najboljom mogućom separacijom u okviru 10 minuta.

#### **2. Odabir faktora koji će biti optimizirani**

Uzimajući u obzir hemijsku strukturu raloksifena i njegovih nečistoća (slika 6) izvedeni su preliminarni eksperimenti. Oni su uključili ispitivanje uticaja različitih faktora vezanih za mobilnu fazu i hromatografski sistem na retenciono ponašanje analiziranih supstanci. Najadekvatniji rezultati dobijeni su korišćenjem mobilne faze sastavljene od acetonitrila i rastvora jon-par reagensa u vodenoj fazi, uz podešavanje pH vrednosti *orto*-fosfornom kiselinom. Kao najpodesniji jon-par reagens pokazao se SDS. Odlučeno je da će faktori koji se optimiziraju biti: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, sadržaj SDS-a u vodenoj fazi, pH vrednost mobilne faze i temperatura kolone. Ostali bitni hromatografski parametri imali su poznat i predvidiv uticaj na retenciono ponašanje analizirane smeše, pa su držani na konstantnom nivou: protok mobilne faze podešen je na  $1 \text{ mL min.}^{-1}$ , a talasna dužina detekcije iznosila je 254 nm.



### **3. Odabir faktorskih nivoa**

Kodiranim vrednostima  $-1$  i  $+1$  dodeljene su sledeće stvarne vrednosti faktora: za sadržaj acetonitrila udeo od 43 % i 47 %, za sadržaj SDS-a u vodenoj fazi vrednosti 4 mM i 6 mM, za pH vrednost mobilne faze vrednosti 2,5 i 3,5 pH jedinice i za temperaturu kolone vrednosti 25 °C i 35 °C.

### **4. Odabir eksperimentalnog dizajna**

Odlučeno je da se kao eksperimentalni dizajn upotrebi *rotatable* centralni kompozicioni dizajn (CKD) koji će ispitati svaki od odabranih faktora na pet nivoa. Centralni kompozicioni dizajn sastoji se iz punog faktorskog dizajna i zvezda dizajna. U slučaju *rotatable* centralnog kompozicionog dizajna koji ispituje četiri faktora, nivoi faktora u zvezda dizajnu iznose  $\pm 2$ . Dizajn je dopunjen sa šest replikacija u centralnoj tački kako bi se omogućila odgovarajuća statistička procena rezultata. Plan eksperimenata sa nivoima faktora predstavljen je u tabeli 1.

### **5. Odabir odgovora koji će biti praćen**

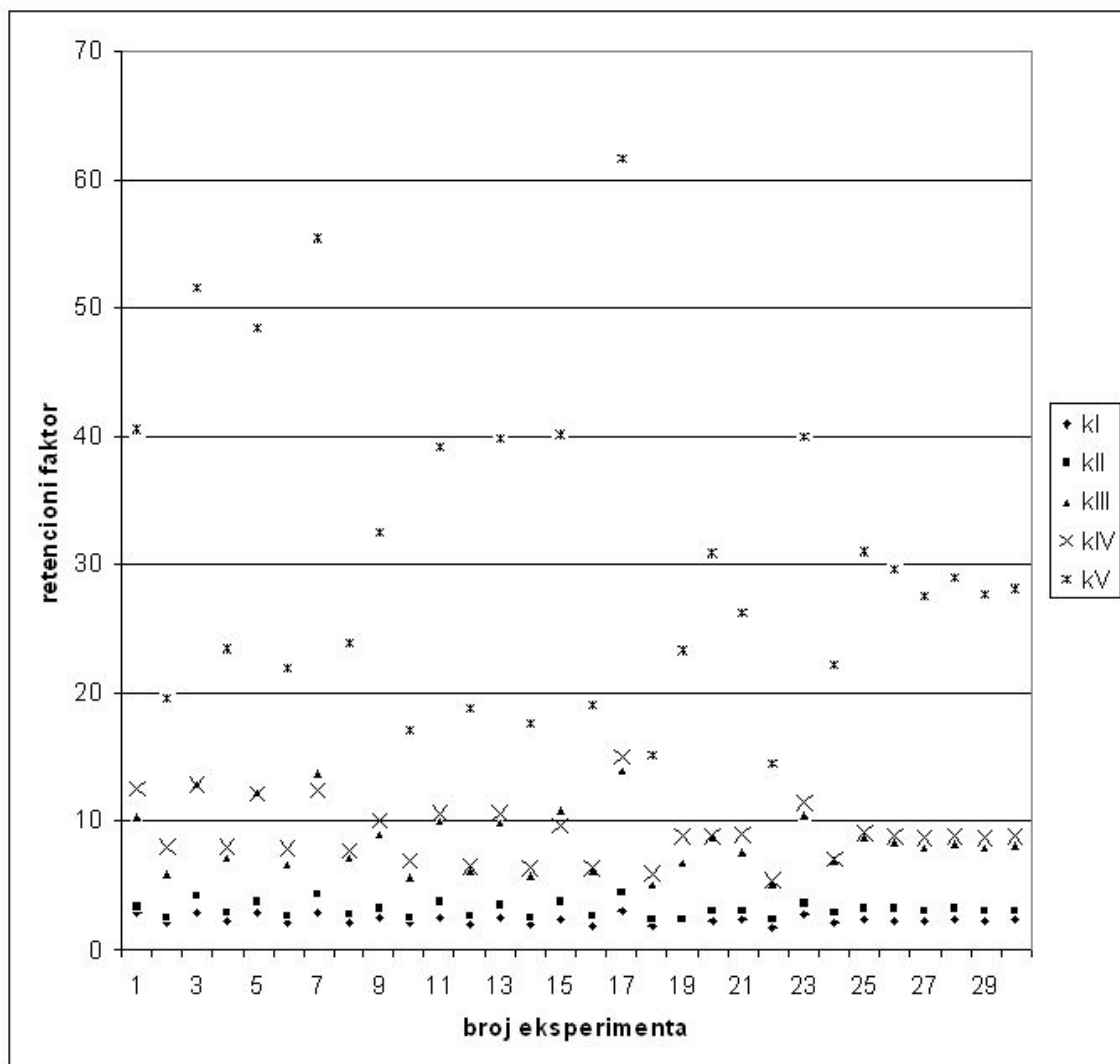
Na svakom dobijenom hromatogramu beleženo je retenciono vreme i širina pikova na baznoj liniji. Iz vrednosti retencionih vremena i retencionog vremena pika mobilne faze izračunati su retencioni faktori. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 8.

**Tabela 8.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

<b>Eksp.</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>2</sub></b>	<b>k<sub>3</sub></b>	<b>k<sub>4</sub></b>	<b>k<sub>5</sub></b>	<b>w<sub>1</sub></b>	<b>w<sub>2</sub></b>	<b>w<sub>3</sub></b>	<b>w<sub>4</sub></b>	<b>w<sub>5</sub></b>
1	2,83	3,33	10,27	12,50	40,47	0,12	0,12	0,28	0,28	0,81
2	2,13	2,43	5,97	8,00	19,63	0,08	0,09	0,13	0,14	0,28
3	2,93	4,13	12,87	12,93	51,53	0,13	0,15	0,36	0,40	1,23
4	2,17	2,90	7,13	8,03	23,37	0,11	0,11	0,21	0,26	0,51
5	2,83	3,77	12,17	12,23	48,30	0,10	0,11	0,26	0,24	0,83
6	2,13	2,63	6,67	7,83	21,97	0,10	0,10	0,17	0,19	0,43
7	2,83	4,23	12,47	13,83	55,40	0,09	0,10	0,19	0,23	0,71
8	2,03	2,80	7,23	7,77	23,80	0,08	0,09	0,15	0,14	0,34
9	2,47	3,13	8,93	10,00	32,53	0,10	0,10	0,20	0,25	0,57
10	2,00	2,50	5,63	6,83	17,10	0,08	0,08	0,12	0,13	0,24
11	2,43	3,73	10,00	10,63	39,20	0,08	0,09	0,15	0,19	0,51
12	1,87	2,67	6,17	6,50	18,73	0,09	0,10	0,17	0,16	0,37
13	2,43	3,50	9,97	10,63	39,77	0,09	0,10	0,18	0,20	0,59
14	1,87	2,43	5,73	6,33	17,60	0,09	0,09	0,14	0,24	0,31
15	2,40	3,70	9,70	10,90	40,13	0,08	0,09	0,15	0,18	0,51
16	1,83	2,63	6,17	6,30	18,96	0,08	0,09	0,13	0,12	0,27
17	3,07	4,37	13,97	15,07	61,63	0,12	0,13	0,33	0,37	1,29
18	1,80	2,37	5,13	5,97	15,10	0,08	0,08	0,12	0,13	0,24
19	2,30	2,40	6,70	8,77	23,33	0,10	0,10	0,18	0,22	0,49
20	2,20	2,97	8,80	8,83	30,81	0,08	0,09	0,16	0,14	0,43
21	2,30	2,97	7,60	9,00	26,20	0,10	0,10	0,19	0,21	0,49
22	1,67	2,33	5,07	5,43	14,53	0,08	0,08	0,11	0,11	0,21
23	2,70	3,53	10,43	11,43	39,93	0,10	0,10	0,22	0,46	0,66
24	2,00	2,83	6,90	7,03	22,23	0,09	0,10	0,17	0,16	0,40
25	2,30	3,20	8,80	9,10	30,97	0,09	0,10	0,19	0,19	0,51
26	2,27	3,17	8,40	8,87	29,67	0,08	0,09	0,16	0,14	0,41
27	2,27	3,03	7,93	8,70	27,53	0,10	0,11	0,21	0,20	0,54
28	2,30	3,13	8,27	8,83	28,97	0,08	0,09	0,16	0,15	0,40
29	2,27	3,03	7,93	8,70	27,63	0,10	0,11	0,21	0,20	0,54
30	2,30	3,03	8,10	8,80	28,13	0,10	0,10	0,20	0,21	0,53

k<sub>1</sub> – k<sub>5</sub> retencioni faktori prve do pete supstance koja se pojavljuje na hromatogramu; w<sub>1</sub> – w<sub>5</sub> odgovarajuće širine pikova analiziranih suspstanci; redosled eluiranja supstanci prikazan je na slici 13.

Mapa vrednosti izračunatih retencionih faktora supstanci u 30 izvedenih eksperimenata prikazana je na slici 13.



**Slika 13.** Mapa vrednosti retencionih faktora: kI – nečistoća 1; kII – nečistoća 2; kIII – raloksifen; kIV – nečistoća 3; kV – nečistoća 4

Kako bi se procenio ukupan kvalitet dobijenih hromatograma, odlučeno je da se kao odgovori prate sedam ispitivanih funkcija hromatografskog odgovora. Međutim, pre nego što se jedna funkcija upotrebi kao odgovor za matematičko modelovanje i izračunavanje optimalnih vrednosti faktora, potrebno je verifikovati njenu sposobnost da tačno ocenjuje kvalitet hromatograma.

### **Verifikacija funkcija hromatografskog odgovora**

Šest literaturno poznatih funkcija  $B_{CRF}$ , COF,  $D_{O_{CRF}}$ , CRS, CEF i  $D_{CRF}$  i novorazvijena funkcija  $N_{CRF}$  testirane su na 30 dobijenih hromatograma u cilju procene njihove sposobnosti da ispravno izmere kvalitet hromatograma.

U prvoj fazi definisani su težinski koeficijenti i konstante koje podešava analitičar:  $B_{CRF}$  ( $T_A = 10$  min,  $T_0 = 3$  min); COF ( $R_{id} = 1,5$ ,  $t_m = 10$  min,  $A = 3$ ,  $B = 1$ );  $D_{O_{CRF}}$  ( $t_{R,cri} = 10$  min,  $R_{s,cri} = 1,5$ ); CRS ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $R_{min} = 0,5$ ); CEF ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $t_{max} = 10$  min,  $a = 3$ ) i  $N_{CRF}$  ( $a = 3$ ,  $b = 0$  za  $t_f \leq t_{opt}$  u suprotnom  $b = 1$ ). Za svaki od 30 eksperimentalno dobijenih hromatograma procenjeni su hromatografski parametri neophodni za računanje funkcija, nakon čega su i vrednosti samih funkcija izračunate i predstavljene u tabeli 9.

**Tabela 9.** Važni hromatografski parametri za eksperimentalno dobijene hromatograme i vrednosti sedam ispitivanih funkcija

<b>Eksp.</b>	<b><math>\theta_{1,2}</math></b>	<b><math>\theta_{2,3}</math></b>	<b><math>\theta_{3,4}</math></b>	<b><math>\theta_{4,5}</math></b>	<b><math>R_{1,2}</math></b>	<b><math>R_{2,3}</math></b>	<b><math>R_{3,4}</math></b>	<b><math>R_{4,5}</math></b>	<b><math>t_f</math></b>	<b><math>B_{CRF}</math></b>	<b>COF</b>	<b><math>D_{oCRF}</math></b>	<b>CRS</b>	<b>CEF</b>	<b><math>D_{CRF}</math></b>	<b><math>N_{CRF}</math></b>
1	0,89	1,00	0,99	1,00	1,25	10,40	2,39	15,39	12,44	18,08	4,88	2,26	39,33	11,47	7,90	2,44
2	0,98	1,00	1,00	1,00	1,06	9,64	4,52	16,62	6,19	17,91	12,54	1,47	99,91	18,78	8,03	2,03
3	0,99	1,00	0,00	1,00	2,57	10,27	0,03	8,38	15,76	13,41	-8,01	2,94	1002,01	10397,21	6,01	4,53
4	0,97	1,00	0,92	1,00	2,00	7,94	1,15	11,95	7,31	13,85	7,65	1,88	49,01	12,27	7,94	2,16
5	0,98	1,00	0,00	1,00	2,67	13,62	0,08	20,22	14,79	19,95	-3,77	2,80	650,95	12091,01	6,00	4,37
6	0,92	1,00	0,98	1,00	1,50	8,96	1,94	13,68	6,89	15,22	9,55	1,74	6,84	5,98	7,94	2,15
7	1,00	1,00	0,99	1,00	4,42	17,03	1,95	26,53	16,92	25,69	6,69	2,33	7,18	12,25	8,02	2,69
8	1,00	1,00	0,85	1,00	2,71	11,08	1,10	20,04	7,44	20,96	10,85	1,75	75,08	16,00	7,89	2,23
9	0,98	1,00	0,93	1,00	2,00	11,60	1,42	16,49	10,06	21,57	7,64	2,04	13,20	7,37	7,93	2,15
10	1,00	1,00	0,99	1,00	1,87	9,40	2,88	16,65	5,43	16,50	13,59	1,37	2,37	6,83	8,04	2,02
11	1,00	1,00	0,97	1,00	4,59	15,67	1,12	24,49	12,06	28,03	9,50	2,02	106,30	19,01	7,99	2,26
12	1,00	1,00	0,00	1,00	2,53	7,78	0,61	13,85	5,92	13,39	8,20	1,80	215,30	301,18	6,05	3,50
13	1,00	1,00	0,95	1,00	3,37	13,86	1,05	22,13	12,23	24,64	7,55	2,15	212,31	26,64	7,97	2,31
14	0,97	1,00	0,88	1,00	1,89	8,61	0,95	12,29	5,58	12,44	8,95	1,76	511,31	33,53	7,90	2,22
15	1,00	1,00	1,00	1,00	4,59	15,00	2,18	25,42	12,34	28,52	11,20	1,83	4,75	10,63	8,04	2,23
16	1,00	1,00	0,00	1,00	2,82	9,64	0,32	19,47	5,99	17,87	8,22	1,83	115,04	1796,93	6,05	3,50
17	1,00	1,00	0,96	1,00	3,12	12,52	0,94	16,83	18,79	14,15	-0,70	2,87	1905,95	65,19	7,98	2,96
18	0,98	1,00	0,96	1,00	2,12	8,30	2,00	14,81	4,83	13,74	12,75	1,41	2,01	6,41	8,01	2,08
19	0,00	1,00	1,00	1,00	0,30	9,21	3,10	12,31	7,30	15,00	5,48	1,95	141,07	2199,23	6,04	3,50
20	1,00	1,00	0,00	1,00	2,70	14,00	0,07	23,13	9,54	26,05	1,46	2,28	491,69	10336,70	6,04	3,50

<b>21</b>	0,96	1,00	1,00	1,00	2,00	9,59	2,10	14,74	8,16	17,92	9,80	1,74	3,37	7,81	8,00	2,06
<b>22</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,50	8,63	1,00	17,06	4,66	14,68	11,87	1,55	163,31	23,49	6,06	3,50
<b>23</b>	1,00	1,00	0,83	1,00	2,50	12,94	0,88	15,27	12,28	19,47	4,75	2,32	10680,90	73,15	7,86	2,50
<b>24</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,63	9,04	0,24	16,29	6,97	16,51	5,46	1,99	143,60	3071,67	6,04	3,50
<b>25</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,84	11,59	0,47	18,74	9,59	22,43	6,25	2,13	213,94	850,06	6,03	3,50
<b>26</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	3,18	12,56	0,93	22,69	9,20	25,40	9,82	1,91	1176,68	46,09	6,03	3,50
<b>27</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,19	9,19	1,12	15,27	8,56	17,92	7,77	1,95	72,57	15,24	6,03	3,50
<b>28</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,94	12,32	1,10	21,96	8,99	24,59	10,13	1,87	96,90	18,05	6,03	3,50
<b>29</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,19	9,19	1,12	15,35	8,56	18,00	7,76	1,95	72,83	15,26	6,03	3,50
<b>30</b>	1,00	1,00	0,00	1,00	2,20	10,13	1,02	15,67	8,74	18,86	7,70	1,98	216,25	25,84	6,03	3,50

$\theta_{s,l}$  – kriterijum razdvajanja;  $t_1$  – retenciono vreme prvog pika;  $t_f$  – retenciono vreme poslednjeg pika;  $R_{s,l}$  – faktor rezolucije;  $B_{CRF}$  – Beridžova funkcija hromatografskog odgovora [13];  $COF$  – Glajcova hromatografska optimizaciona funkcija [14];  $CRS$  – Šlabahova statistička hromatografska rezolucija [16];  $Do_{CRF}$  – Dozova funkcija hromatografskog odgovora [15];  $D_{CRF}$  – Duarteova funkcija hromatografskog odgovora [8];  $CEF$  – Morisova hromatografska eksponencijalna funkcija [17];  $N_{CRF}$  – nova funkcija hromatografskog odgovora

Slično, kao što se moglo uočiti i kod simuliranih hromatograma, redosled kvaliteta 30 eksperimentalno dobijenih hromatograma različito je procenjen od strane sedam različitih funkcija hromatografskog odgovora.

Funkcija  $B_{CEF}$  identifikovala je hromatogram 15 kao najbolji usled jako velike vrednosti faktora rezolucije između poslednja dva pika ( $R_{s_{4,5}} = 25,42$ ), iako je dužina trajanja analize preko 12 minuta. Funkcija COF rangirala je hromatogram 11 kao bolji od hromatograma 8, iako je kod hromatograma 8 razdvajanje pikova na baznoj liniji bolje i ukupna dužina trajanja analize kraća. Ovakvi propusti funkcija  $B_{CRF}$  i COF su u skladu sa nedostatkom funkcija koje razdvajanje procenjuju sumiranjem faktora rezolucije.

Funkcija  $D_{CRF}$  među najbolje rangirane uvrstila je hromatograme kod kojih su dva pika potpuno spojena (12, 16) što ukazuje na neadekvatanu ravnotežu između člana koji procenjuje razdvajanje i člana koji procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize.

Funkcija CRS pokazala je veću osetljivost na produženje trajanja analize u odnosu na pogoršanje separacije što se može primetiti poređenjem hromatograma 10 i 18. Iako hromatogram 10 ima bolji kvalitet separacije, ova funkcija identifikovala je hromatogram 18 kao adekvatniji usled kraće dužine trajanja analize.

$D_{CRF}$  rangira hromatograme 10 i 15 kao jednako dobre ( $D_{CRF}$  je 8,04 u oba slučaja), iako je dužina trajanja analize za hromatogram 10 iznosila 5,43 min, a za hromatogram 15 iznosila 12,34 min. Slično,  $D_{CRF}$  rangira hromatograme 11 i 17 kao gotovo ekvivalentne, iako je razlika u dužini trajanja njihove analize preko 6 minuta. Daljom analizom može se primetiti da se  $D_{CRF}$  naglo smanjuje kada su pojedinačne  $\theta$  vrednosti jednake nuli (hromatogrami 24 i 30), tj. kada izostaje pojava određenih pikova zbog koeluiranja. Ovo se može objasniti činjenicom da je uticaj izostanka pojave pikova na vrednost funkcije dupliran: smanjenjem sume  $\theta$  vrednosti i smanjenjem člana koji broji pikove  $N$ . Suma  $\theta$  sama po sebi već odražava ukupan broj pikova koji se pojavljuju na hromatogramu jer će doprinos svakog nepojavljenog para pikova sumi biti nula ( $\theta = 0$  u slučaju koeluiranja).

Funkcija CEF dala je lažno pozitivne rezultate u slučajevima kada analizirani pikovi nisu bili Gausovog oblika. Ovo se može uočiti na primeru hromatograma 6. Vrednost faktora rezolucije izračunata za prvi i drugi pik je 1,58, dok je za treći i četvrti 1,94, što ukazuje na dobro razdvajanje oba pika. Međutim, ovi pikovi nisu savršeno razdvojeni što se može videti iz izračunatih vrednosti  $\theta$  kriterijuma koja je bila 0,92 za prvi par pikova i 0,98 za drugi par pikova. Dodatno, CEF je dizajnirana tako da ima najbolju (minimalnu) vrednost samo kada je  $R$  jednako  $R_{opt}$  što je u ovom slučaju postavljeno kao 1,5. Posledica ovakvog dizajna funkcije je da loše razdvojeni pikovi, ali i veoma dobro razdvojeni pikovi (pikovi koji imaju  $R$  vrednost veću od 1,5), imaju negativan uticaj na sveobuhvatan kvalitet procene. Stoga, procena hromatograma može biti potpuno pogrešna kao što je to bio slučaj sa hromatogramima 6 i 10. Može se primetiti da hromatogram 10 ima manje ukupno vreme trajanja analize i veće vrednosti za sve faktore rezolucije između susednih pikova, a funkcija CEF ovaj hromatogram karakteriše kao lošiji u odnosu na hromatogram 6.

Konačno, analizirajući rangiranje  $N_{CRF}$  može se primetiti da su najbolje rangirani hromatogrami 10, 2 i 21. Ovi hromatogrami imaju najbolje vrednosti kriterijuma separacije i ukupno vreme trajanja analize u okviru optimalnog vremena. Pogoršavanje  $N_{CRF}$  vrednosti može se primetiti među hromatogramima sa srednje dobrim vrednostima separacije i ukupnom dužinom trajanja analize preko 10 minuta, kao što se može uočiti poređenjem hromatograma 13 i 17. Značajno povećanje vrednosti  $N_{CRF}$  odigralo se u slučajevima lošeg razdvajanja susednih pikova čak i kada je ukupna dužina trajanja analize bila u okvirima optimalne (hromatogrami 12 i 16), što je u skladu sa definisanim planom optimizacije. Najlošije  $N_{CRF}$  vrednosti dodeljene su za hromatograme sa lošom separacijom i veoma dugim vremenom trajanja analize kao što je to bio slučaj sa hromatogramom 3.

## **6. Kreiranje matematičkog modela**

Kako je pokazano da  $N_{CRF}$  daje tačnu i pouzdanu kvantitativnu karakterizaciju hromatograma, odabrana je kao jedini odgovor sistema koji će se pratiti. Uticaj ispitivanih nezavisnih promenljivih odražavao se na povećanje ili smanjenje vrednosti  $N_{CRF}$ . Višestrukom linearnom regresijom i metodom najmanjih kvadrata kreiran je



polinom drugog stepena koji opisuje zavisnost  $N_{CRF}$  od ispitivanih faktora. Izračunati koeficijenti modela za kodirane vrednosti faktora i njihova statistička značajnost prikazani su u tabeli 10.

**Tabela 10.** Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za  $N_{CRF}$  i njihova statistička značajnost

Faktori	Koeficijenti modela	$p$ – vrednosti
	3,50	
$x_1$	-0,14	0,054
$x_1^2$	-0,28	0,000*
$x_2$	-0,01	0,943
$x_2^2$	-0,04	0,517
$x_3$	0,29	0,001*
$x_3^2$	-0,22	0,002*
$x_4$	0,03	0,706
$x_4^2$	-0,31	0,001*
$x_1x_2$	0,38	0,001*
$x_1x_3$	-0,21	0,030*
$x_1x_4$	0,26	0,009*
$x_2x_3$	-0,16	0,072
$x_2x_4$	0,24	0,015*
$x_3x_4$	-0,10	0,264
$R^2$		0,920
Adj. $R^2$		0,826

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost mobilne faze;  
 $x_3$  – koncentracija SDS-a u vodenoj fazi (mM);  $x_4$  – temperatura kolone (°C)

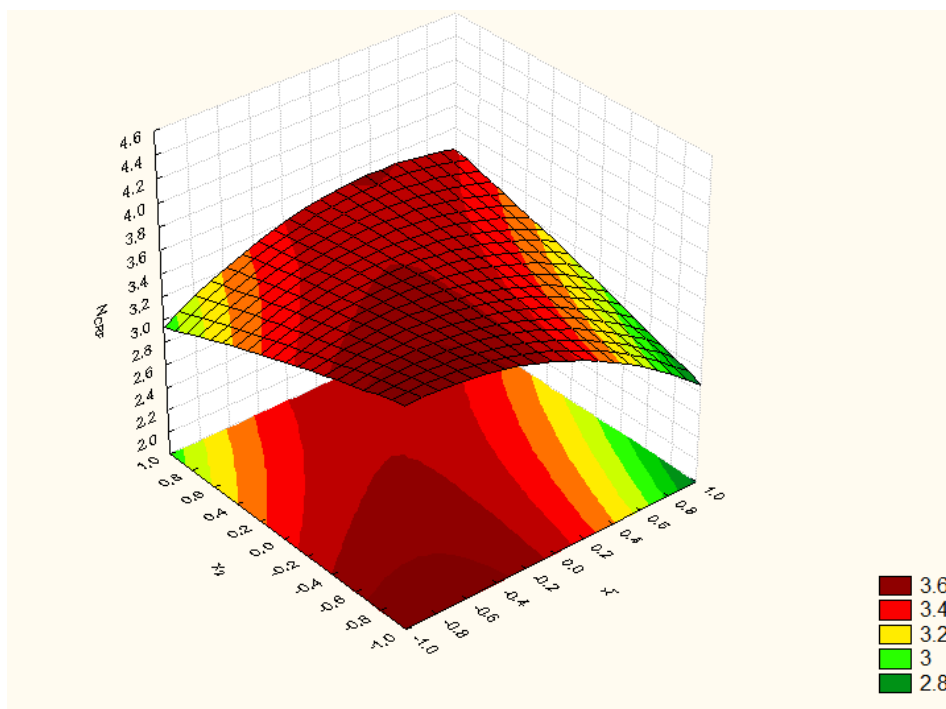
\*statistički značajni koeficijenti za nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$

\*\*Statističkom analizom rezultata eksperimenti 3, 13 i 24 identifikovani su kao *outlier*-i (njihove vrednosti značajno su odstupale od predložene matematičke zavisnosti) i nisu uključeni u kreiranje modela

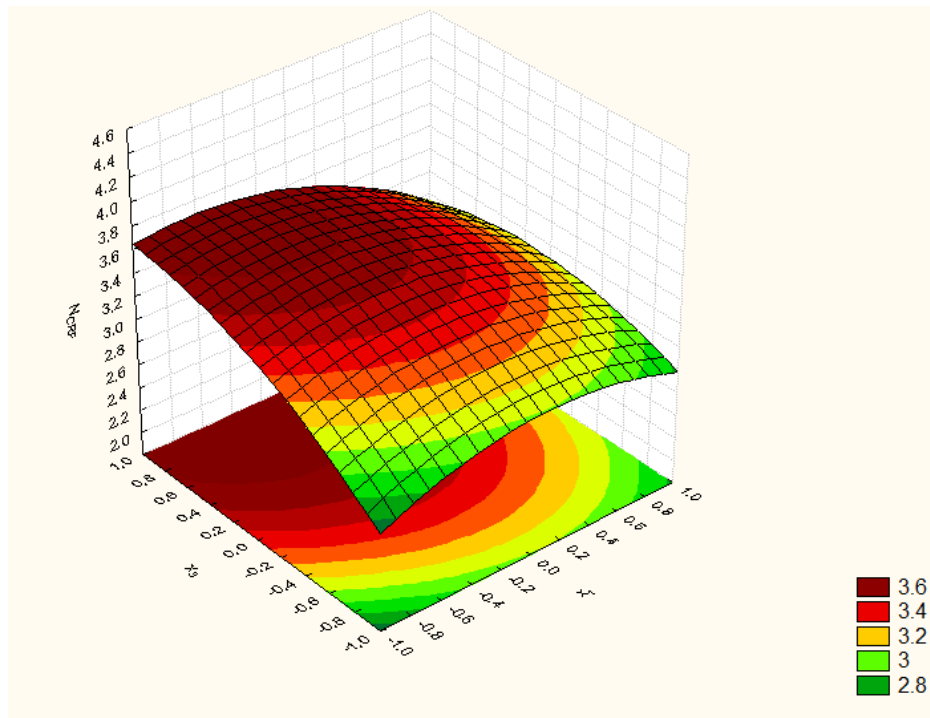
Analizom dobijenih rezultata u tabeli 10 može se zaključiti da je hromatografsko ponašanje analizirane smeše bilo pod izuzetno velikim uticajem sadržaja acetonitrila, koncentracije SDS-a u vodenoj fazi i temperature kolone.  $N_{CRF}$  je pokazala snažnu kvadratnu zavisnost od sva tri faktora pojedinačno (dobijene  $p$  vrednosti bile su 0,000 za kvadratni koeficijent acetonitrila, 0,002 za kvadratni koeficijent koncentracije SDS-a i 0,001 za kvadratni koeficijent temperature kolone). Takođe, može se uočiti i značajan uticaj interakcije acetonitrila sa svim ostalim ispitivanim faktorima ( $p$  vrednost za koeficijent uz  $x_1x_2$  je iznosila 0,001, za koeficijent uz  $x_1x_3$  0,03, a za koeficijent uz  $x_1x_4$  0,009), kao i uticaj interakcije pH vrednosti mobilne faze i temperature kolone za koju je  $p$  vrednost iznosila 0,015.

## 7. Identifikacija optimalnih uslova

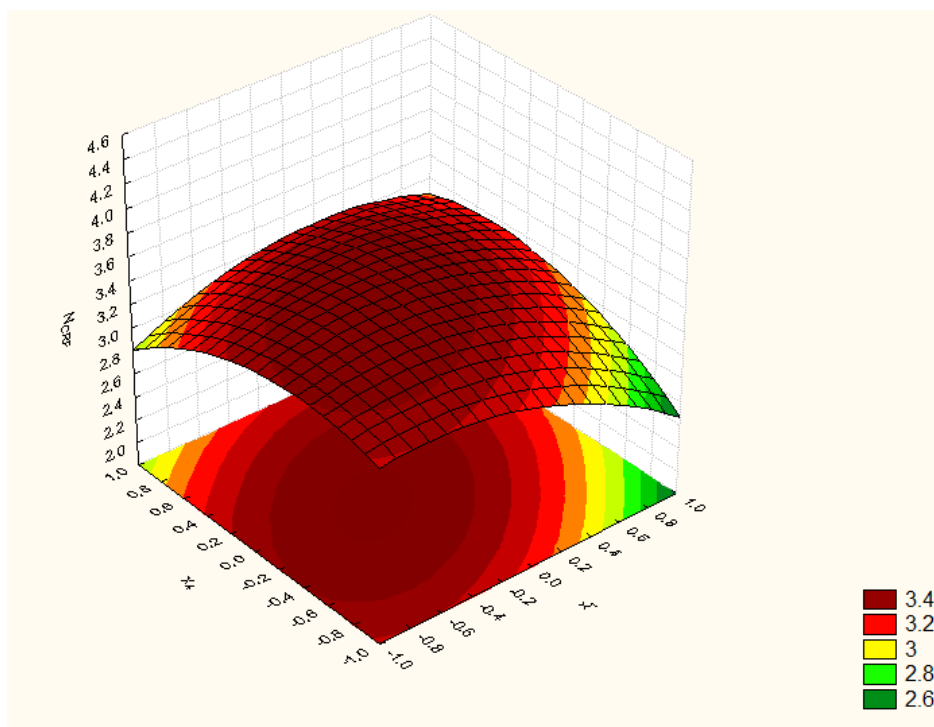
Identifikacija globalnih optimalnih uslova izvršena je metodologijom površine odgovora koristeći  $N_{CRF}$  kao output. Konstruisane su trodimenzionalne površine odgovora prikazane na slici 14.



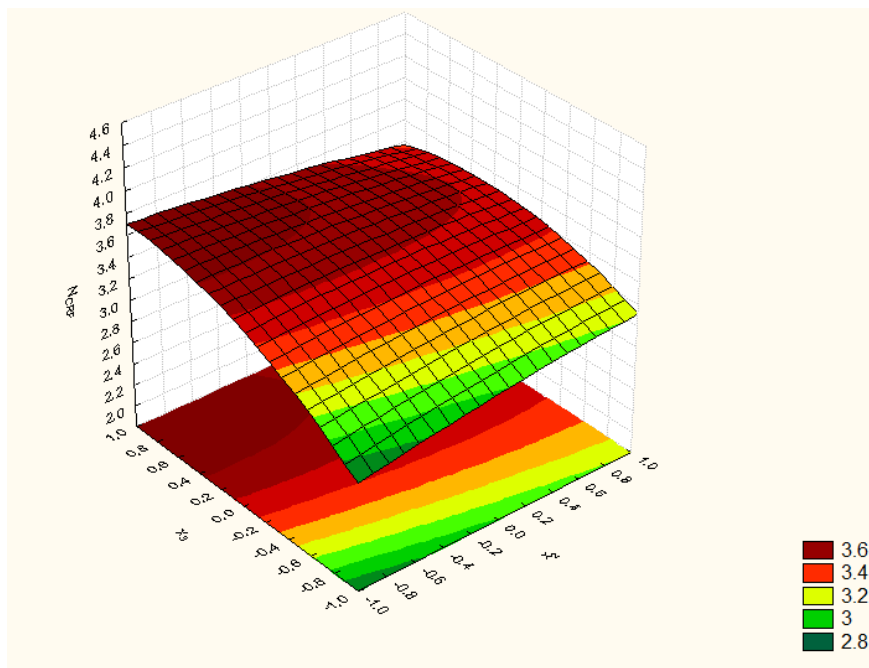
A)



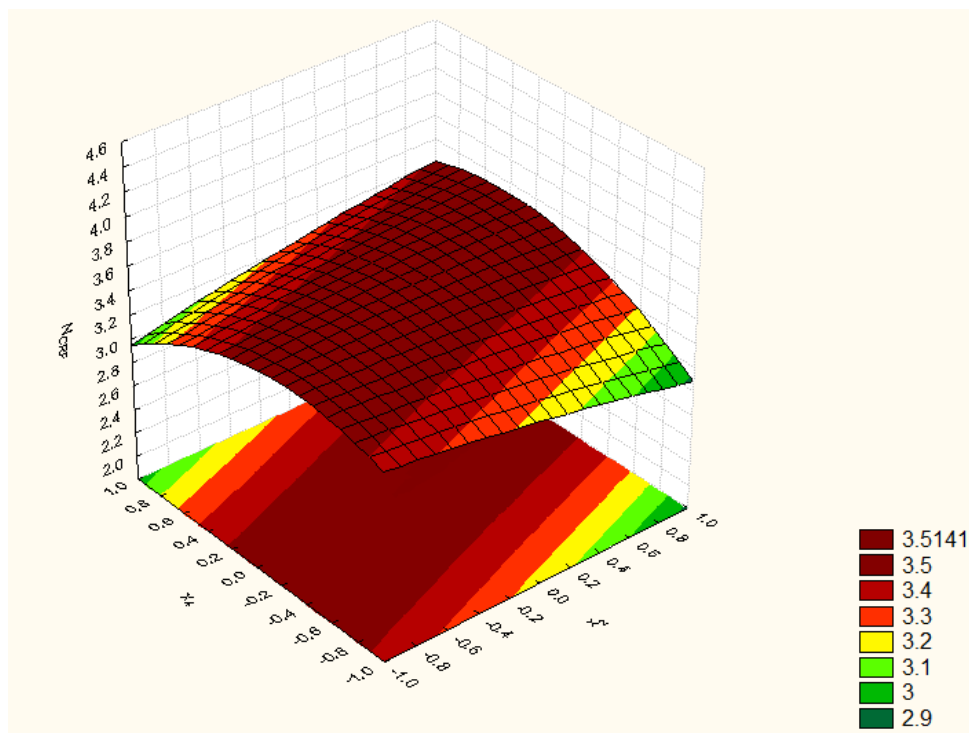
B)



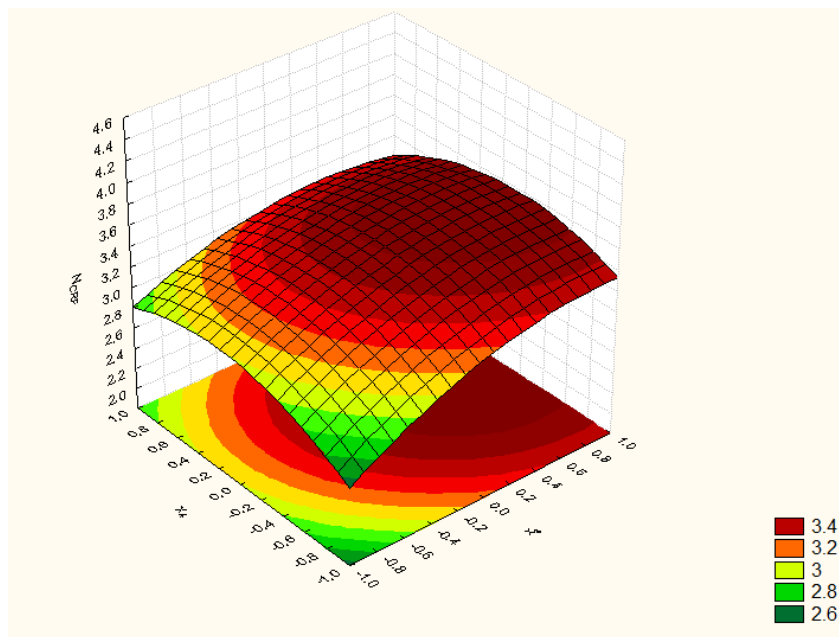
C)



D)



E)

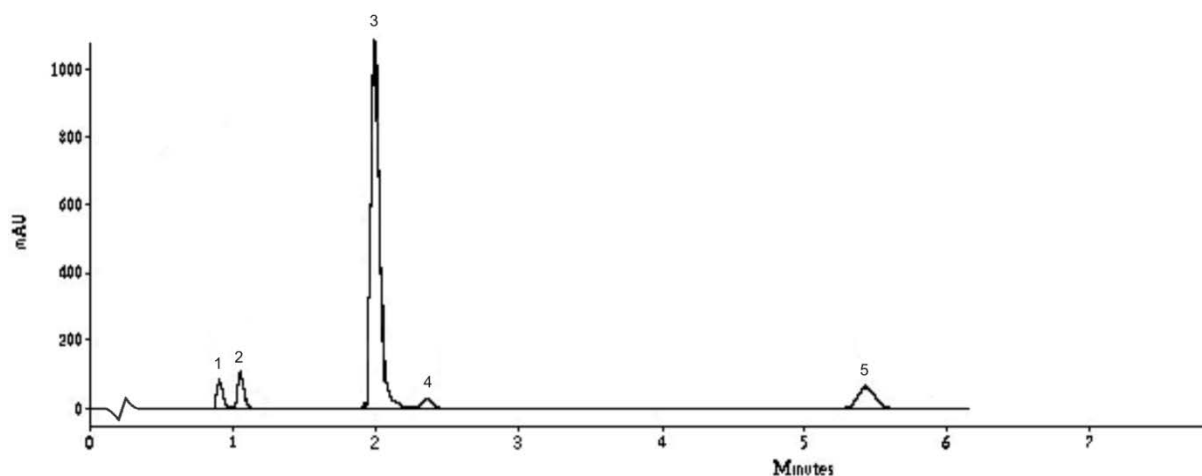


F)

**Slika 14.** Trodimenzionalne površine odgovora: A)  $N_{CRF} = f(x_1, x_2)$ ; B)  $N_{CRF} = f(x_1, x_3)$ ; C)  $N_{CRF} = f(x_1, x_4)$ ; D)  $N_{CRF} = f(x_2, x_3)$ ; E)  $N_{CRF} = f(x_2, x_4)$ ; F)  $N_{CRF} = f(x_3, x_4)$ ;  $x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost mobilne faze;  $x_3$  – koncentracija SDS-a u vodenoj fazi (mM);  $x_4$  – temperatura kolone ( $^{\circ}\text{C}$ )

Slika 14 predstavlja grafički prikaz zavisnosti funkcije hromatografskog odgovora od ispitivanih faktora. Njenom analizom može se jednostavnije uočiti značajnost pojedinih linearnih, kvadratnih članova i interakcija koja je identifikovana u tabeli 10. Na slikama 14 B) i 14 F) jasno se može primetiti kvadratna zavisnost funkcije cilja od faktora  $x_1$  i  $x_4$ , jer su vrednosti funkcije minimalne pri malim i velikim vrednostima ovih faktora, dok se u središnjem regionu naglo povećavaju. Na slikama 14 C) i E) može se primetiti da postoji značajna interakcija između faktora  $x_1$  i  $x_4$ , kao i faktora  $x_2$  i  $x_4$ , jer se uočava da se odgovor poboljšava istovremenim smanjenjem prvog i povećanjem drugog faktora, ili povećanjem prvog uz smanjenje drugog faktora. Sa slika 14 A), B) i C) može se uočiti da se najadekvatnije vrednosti odgovora (označene kao zeleni regioni na trodimenzionalnim površinama odgovora) dobijaju pri maksimalnim vrednostima sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, minimalnoj pH vrednosti, minimalnoj koncentraciji SDS-a u vodenoj fazi i maksimalnoj temperaturi kolone. Istovremenom analizom svih prikazanih površina odgovora, definisani su globalni optimalni uslovi razdvajanja: acetonitril–4 mM SDS (47:53 V/V), pH mobilne faze podešen na 2,5,

temperatura kolone 35 °C sa  $N_{CRF}$  vrednošću od 2,02. Hromatogram analizirane smeše pod optimalnim uslovima predstavljen je na slici 15.



**Slika 15.** Hromatografsko razdvajanje raloksifena i njegovih nečistoća dobijeno pri definisanim optimalnim uslovima: acetonitril–4 mM SDS (47:53 V/V), pH mobilne faze podešen na 2,5 *orto*-fosfornom kiselinom, temperatura kolone 35 °C, talasna dužina detekcije 254 nm i protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>. Redosled eluiranja supstanci na prikazanom hromatogramu je: 1) nečistoća 1, 2) nečistoća 2, 3) raloksifen, 4) nečistoća 3 i 5) nečistoća 4

### 7.1.3. VERIFIKACIJE FUNKCIJE $N_{CRF}$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U HILIC SISTEMU

#### HILIC SISTEM

Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija (eng. *Hidrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) predstavlja alternativni tip tečne hromatografije pod visokim pritiskom u kojoj se primenjuju polarne stacionarne faze i mobilne faze sa visokim procentom organskog rastvarača i malim udelom polarnog rastvarača. Naziv HILIC prvi je uveo Alpert [64] i primetio da u ovakvom sistemu naelektrisane bazne grupe izrazite hidrofilnosti imaju produženo retenciono zadržavanje. On je smatrao da retencioni mehanizam u HILIC-u podrazumeva uglavnom raspodelu između sloja mobilne faze koji je bogat vodom i koji je delimično adsorbovana na površini stacionarne faze i ostatka mobilne faze [64]. Stoga se smatra da je jedan od mehanizama razdvajanja u HILIC-u raspodela između mobilne faze i sloja vodene faze koji prekriva površinu stacionarne faze. Kako bi se omogućila adekvatna zasićenost stacionarne faze, potrebno je da mobilna faza sadrži minimum 3 % vodene faze. Redosled eluiranja supstanci usko je povezan sa debljinom vodenog sloja na površini silike. S povećanjem udela acetonitrila u mobilnoj fazi, smanjuje se debljina vodenog sloja na površini silike i produžava se retenciono zadržavanje polarnih supstanci. S druge strane, povećanjem udela vode u mobilnoj fazi, povećava se debljina vodenog sloja i smanjuje razlika u polarnosti mobilne faze i vodenog sloja, pa se polarne supstance brže eluiraju dok je redosled eluiranja nepolarnih supstanci obrnut. Međutim, novija istraživanja pokazuju da mehanizam razdvajanja u HILIC-u nije samo raspodela, već predstavlja kombinaciju raspodele i adsorpcije [65, 66]. Dodatno, pokazalo se da je za razdvajanja bitna i interakcija tipa jona sa negativno naelektrisanim silanolnim grupama na površini silike, a koja zavisi od prirode stacionarne faze, analita i sastava mobilne faze.

Zapravo, HILIC sadrži određene karakteristike reverzno-fazne, normalno-fazne i jonoizmenjivačke hromatografije i stoga predstavlja značajnu alternativu pri izboru separacione tehnike, pre svega u slučajevima kada navedena tri tipa hromatografije imaju neka ograničenja u primeni. HILIC se smatra tehnikom izbora za analizu

nenaelektrisanih visoko polarnih hidrofilnih i amfifilnih supstanci [67], a pokazao se uspešnim i u analizi različitih malih molekula organskih kiselina, baznih lekova, ugljenih hidrata, peptida i brojnih drugih neutralnih i naelektrisanih supstanci. HILIC omogućava zadovoljavajući oblik pikova baznih supstanci i dobro zadržavanje polarnih supstanci u koloni. On pruža dobru alternativu reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji u pogledu selektivnosti jer je redosled eluiranja supstanci obrnut. Pored toga, mobilne faze koje se koriste u HILIC-u kompatibilne su s masenim detektorom, a uz to visok procenat organskog rastvarača i mobilnoj fazi omogućava visoku efikasnost jonizacije. Međutim, za razliku od reverzno-fazne tečne hromatografije, HILIC nije univerzalno primenljiv jer neutralne i nepolarne supstance, kao i jonizovane kisele supstance pokazuju veoma slabo retenciono zadržavanje. Dodatno, separacioni mehanizam u HILIC-u je nedovoljno proučen što znatno otežava razvoj metoda u poređenju sa reverzno-faznom tečnom hromatografijom [68].

Većina farmaceutski aktivnih supstanci su nenaelektrisane bazne supstance, pa se u njihovoj analizi sve češće primenjuje HILIC. Stoga je novorazvijena funkcija hromatografskog odgovora testirana i na primeru analize model smeše u HILIC sistemu.



## RAZVOJ METODE ZA ANALIZU SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA U HILIC SISTEMU

Razvoj HILIC metode za analizu smeše agonista (salbutamol i fenoterol) i antagonista (atenolol, metoprolol i propranolol) beta receptora izveden je primenom DoE metodologije. Kvalitet eksperimentalno dobijenih hromatograma meren je pomoću šest literaturno poznatih funkcija hromatografskog odgovora, kao i pomoću novorazvijene funkcije  $N_{CRF}$ .

### 1. Definisanje cilja optimizacije

Kao cilj optimizacije postavljeno je postizanje kompromisa između prihvatljive separacije i minimalnog vremena trajanja analize. Vreme od 10 minuta odabrano je kao optimalno vreme trajanja analize.

### 2. Odabir faktora koji će biti optimizirani

Analiza ispitivane smeše u HILIC sistemu započeta je odabirom stacionarne faze. Odlučeno je da se primeni kolona od čiste silike jer je pokazano da je to jedna od najadekvatnijih kolona za analize u HILIC sistemu [66]. Mobilna faza pripremljena je kao smeša acetonitrila i male količine vodene faze koja je modifikovana dodatkom amonijum-acetata uz podešavanje pH vrednosti glacijalnom sirćetnom kiselinom. Kroz preliminarna ispitivanja uočeno je da je sastav mobilne faze (sadržaj acetonitrila, koncentracija amonijum-acetata i pH vrednost mobilne faze) pokazao najveći uticaj na retenciono ponašanje ispitivanih supstanci zbog čega je on dalje optimiziran. Nivoi ostalih relevantnih faktora postavljeni su na konstantne vrednosti: temperatura kolone bila je 30 °C, protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, a talasna dužina detekcije 254 nm.

### 3. Odabir faktorskih nivoa

Kodiranim vrednostima -1 i +1 za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi dodeljene su stvarne vrednosti od 80 % i 90 %. Nizak udeo acetonitrila vodio je neretencionom ponašanju i koeluiranju svih analiziranih supstanci, dok je gornji limit postavljen tako da se obezbedi određena količina vodene faze neophodna za postojanje HILIC sistema (minimum 3 %). Kodiranim vrednostima -1 i +1 za pH vrednosti vodene faze dodeljene

su stvarne vrednosti od 3,5 i 5,5 pH jedinica. Veoma male pH vrednosti (<2,5 pH jedinica) vodile su koeluiranju supstanci, dok je gornji limit postavljen u skladu sa maksimalnom pH vrednošću koja je prihvatljiva za datu kolonu. U analizi baznih supstanci u koloni od čiste silike poželjno je dodavanje određene količine pufera (u ovom slučaju amonijum-acetata) kako bi se deo površine stacionarne faze zasitio amonijum jonima i time onemogućilo preterano jako vezivanje analiziranih supstanci što bi dovelo do produžavanja dužine trajanja analize, kao i širenja pikova. S druge strane, visoke koncentracije pufera mogle bi značajno da smanje zadržavanje supstanci u koloni i da dovedu do brzog koeluiranja ispitivanih jedinjenja. Stoga je opseg koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi izabran tako da bude pogodan za analizu baznih supstanci (od 20 mM do 40 mM).

#### **4. Odabir eksperimentalnog dizajna**

Eksperimentalni plan definisan je pomoću centralnog kompozicionog dizajna. Vrednost alfa za zvezda dizajn odabrana je tako da sve eksperimentalne tačke leže na površini sfere, odnosno da dizajn u celini bude *rotatable*. Četiri replikacije u centralnoj tački dodate su zbog statističke verifikacije modela. Plan eksperimenata prikazan je u tabeli 3.

#### **5. Odabir odgovora koji će biti praćen**

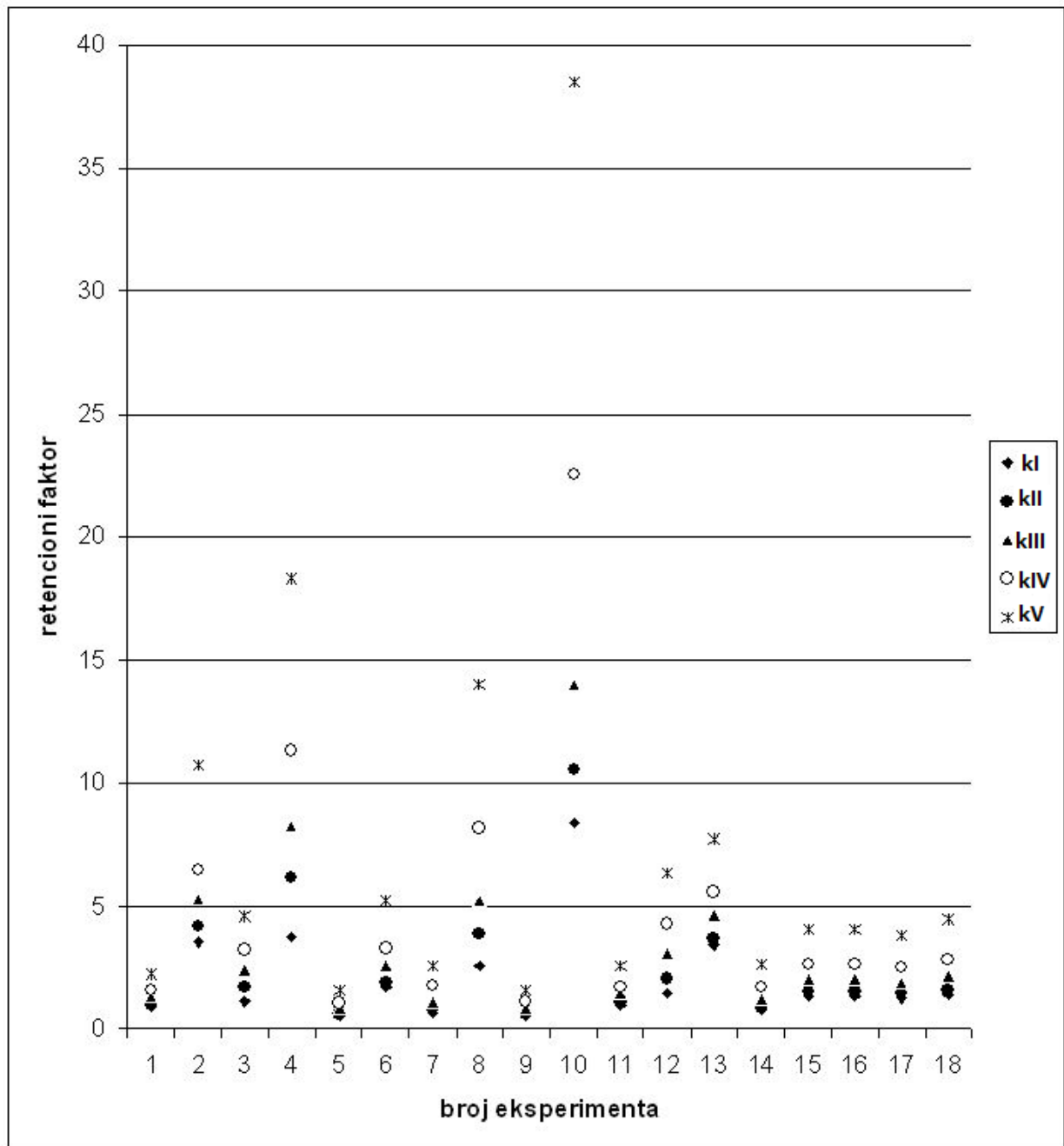
Na svakom dobijenom hromatogramu beleženo je retenciono vreme pikova, kao i širine pikova na baznoj liniji, a zatim su izračunati odgovarajući retencioni faktori. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

**Tabela 11.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

<b>Eksp.</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>2</sub></b>	<b>k<sub>3</sub></b>	<b>k<sub>4</sub></b>	<b>k<sub>5</sub></b>	<b>w<sub>1</sub></b>	<b>w<sub>2</sub></b>	<b>w<sub>3</sub></b>	<b>w<sub>4</sub></b>	<b>w<sub>5</sub></b>
<b>1</b>	0,95	0,99	1,30	1,57	2,25	0,45	0,35	0,38	0,42	0,58
<b>2</b>	3,56	4,16	5,28	6,48	10,74	0,82	0,88	0,97	1,22	2,40
<b>3</b>	1,13	1,73	2,44	3,18	4,58	1,00	0,86	0,58	0,82	1,10
<b>4</b>	3,71	6,16	8,24	11,29	18,28	0,97	1,15	1,33	2,15	2,87
<b>5</b>	0,54	0,59	0,82	1,05	1,57	0,43	0,40	0,32	0,40	0,65
<b>6</b>	1,69	1,92	2,52	3,24	5,23	0,64	0,60	0,63	0,78	1,25
<b>7</b>	0,63	0,76	1,11	1,74	2,53	0,43	0,53	0,47	0,70	0,68
<b>8</b>	2,52	3,83	5,25	8,16	13,97	0,80	0,88	0,97	1,77	2,33
<b>9</b>	0,54	0,59	0,85	1,09	1,58	0,43	0,37	0,38	0,40	0,52
<b>10</b>	8,35	10,52	14,00	22,54	38,47	1,55	2,22	2,72	8,02	7,08
<b>11</b>	1,01	1,12	1,44	1,72	2,57	0,48	0,50	0,38	0,45	0,72
<b>12</b>	1,45	2,05	3,06	4,24	6,36	0,52	0,55	0,92	0,97	1,28
<b>13</b>	3,40	3,65	4,62	5,54	7,71	0,85	1,13	1,00	1,20	1,45
<b>14</b>	0,78	0,87	1,24	1,70	2,61	0,42	0,57	0,43	0,63	0,85
<b>15</b>	1,28	1,49	2,01	2,62	4,06	0,57	0,48	0,50	0,57	1,07
<b>16</b>	1,28	1,48	2,00	2,60	4,03	0,52	0,54	0,52	0,77	1,08
<b>17</b>	1,22	1,41	1,91	2,48	3,81	0,43	0,54	0,62	0,62	1,23
<b>18</b>	1,34	1,59	2,14	2,82	4,44	0,67	0,50	1,03	0,80	1,15

k<sub>1</sub> – k<sub>5</sub> retencioni faktori prve do pete supstance koja se pojavljuje na hromatogramu;  
w<sub>1</sub> – w<sub>5</sub> širine pikova analiziranih supstanci; redosled eluiranja supstanci prikazan je na slici 16

Analizirana smeša pokazala je složeno retenciono ponašanje u okviru 18 izvedenih eksperimenata koje se može predstaviti šematski (slika 16).



**Slika 16.** Redosled eluiranja supstanci u 18 izvedenih eksperimenata: kI – fenoterol; kII – propranolol; kIII – salbutamol; kIV – metoprolol; kV – atenolol

Analizirajući sliku 16 može se uočiti da je najbolje razdvajanje supstanci dobijeno u eksperimentima u kojima je hromatografska analiza trajala jako dugo. Optimizacija razdvajanja i ukupne dužine trajanja analize može se postići istovremeno primenom funkcija hromatografskog odgovora koje u svoj dizajn uključuju članove koji omogućavaju procenu ova dva cilja optimizacije. Dobijeni set od 18 hromatograma

upotrebljen je za verifikaciju sedam funkcija hromatografskog odgovora kako bi se odabrala ona koja najbolje opisuje posmatrani sistem.

### **Verifikacija funkcija hromatografskog odgovora**

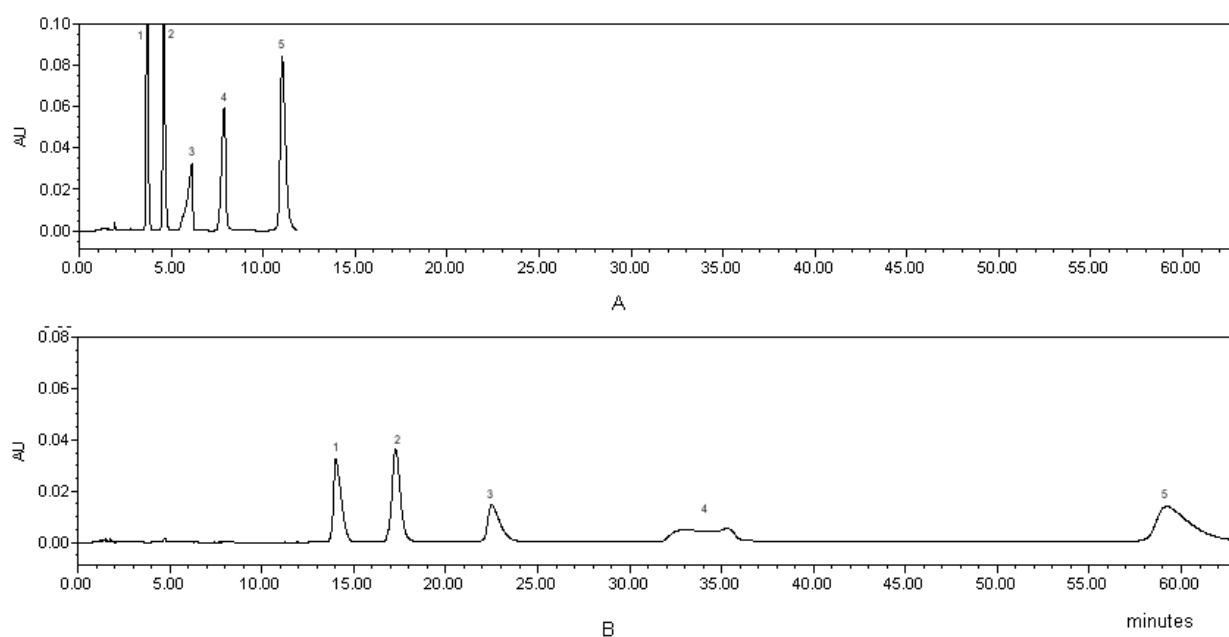
Za svaki od 18 eksperimentalno dobijenih hromatograma procenjeni su hromatografski parametri neophodni za računanje funkcija, nakon čega su i vrednosti samih funkcija izračunate i predstavljene u tabeli 12. Parametri koje podešava analitičar za svaku funkciju postavljeni su tako da se stavi veći akcenat na razdvajanje u odnosu na ukupnu dužinu trajnja analize. Definisane su sledeće konstante:  $B_{CRF}$  ( $T_A = 10$  min,  $T_0 = 3$  min); COF ( $R_{id} = 1,5$ ,  $t_m = 10$  min,  $A = 3$ ,  $B = 1$ ); DoCRF ( $t_{R,cri} = 10$  min,  $R_{s,cri} = 1,5$ ); CRS ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $R_{min} = 0,5$ ); CEF ( $R_{opt} = 1,5$ ,  $t_{max} = 10$  min,  $a = 3$ ) i  $N_{CRF}$  ( $a = 5$ ,  $b = 1$ ).

**Tabela 12.** Važni hromatografski parametri za eksperimentalno dobijene hromatograme i izračunate vrednosti sedam ispitivanih funkcija

Run	$\theta_{1/2}$	$\theta_{2/3}$	$\theta_{3/4}$	$\theta_{4/5}$	$Rs_{1/2}$	$Rs_{2/3}$	$Rs_{3/4}$	$Rs_{4/5}$	$t_1$	$t_f$	$B_{CRF}$	COF	$Do_{CRF}$	CRS	CEF	$D_{CRF}$	$N_{CRF}$	$N_{CRF2}$
1	0,00	1,00	1,00	1,00	0,17	1,24	1,02	2,03	2,92	4,87	3,25	-2,16	2,60	24,73	4141,06	6,31	3,35	3,50
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05	1,82	1,65	3,54	6,84	17,61	1,60	-5,24	2,98	4,96	28,82	8,08	2,76	2,76
3	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	1,46	1,59	2,18	3,19	8,36	9,40	1,59	2,31	8,34	29,50	8,18	1,84	2,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	3,47	2,51	2,62	4,18	7,07	28,91	-5,20	-10,10	3,41	6,71	18,81	8,05	3,89	3,89
5	0,09	1,00	1,00	1,00	0,17	0,98	0,97	1,47	2,31	3,85	0,75	-2,92	2,69	19,72	3816,19	6,48	2,96	3,37
6	1,00	1,00	1,00	1,00	0,57	1,45	1,51	2,94	4,03	9,35	9,81	-0,28	2,50	139,69	450,94	8,16	1,93	2,00
7	0,94	1,00	1,00	1,00	0,42	1,03	1,63	1,71	2,44	5,29	4,53	0,38	2,45	112,22	947,88	8,22	1,65	2,09
8	1,00	1,00	1,00	1,00	2,32	2,31	3,19	4,25	5,28	22,45	2,34	-4,45	2,85	5,28	15,11	8,07	3,25	3,24
9	0,18	1,00	1,00	1,00	0,17	1,04	0,91	1,60	2,31	3,87	1,91	-2,70	2,66	19,92	3826,35	7,56	2,81	3,23
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,72	2,12	2,38	3,17	14,03	59,21	-45,84	-44,11	6,80	13,34	26,33	8,02	6,92	6,92
11	0,78	1,00	1,00	1,00	0,34	1,08	1,02	2,18	3,01	5,35	4,96	-0,84	2,56	42,33	1572,19	8,06	1,95	2,33
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,69	2,08	1,87	2,82	3,67	11,03	11,76	2,86	2,12	2,43	6,91	8,13	2,1	2,10
13	0,90	1,00	1,00	1,00	0,38	1,37	1,25	2,45	6,60	13,06	3,80	-6,52	3,11	153,63	1785,93	8,01	2,59	2,59
14	0,64	1,00	1,00	1,00	0,26	1,09	1,29	1,84	2,67	5,41	4,58	-1,39	2,58	29,62	2446,13	7,92	2,23	2,54
15	1,00	1,00	1,00	1,00	0,60	1,61	1,71	2,64	3,41	7,59	8,74	1,99	2,26	46,68	330,53	8,20	1,76	2,00
16	1,00	1,00	1,00	1,00	0,59	1,47	1,42	2,30	3,41	7,54	7,90	0,70	2,41	70,43	368,02	8,20	1,75	2,00
17	1,00	1,00	1,00	1,00	0,59	1,29	1,38	2,15	3,33	7,21	7,29	0,39	2,45	60,69	353,07	8,21	1,72	2,00
18	0,98	1,00	1,00	1,00	0,63	1,08	1,11	2,49	3,51	8,16	7,95	-1,13	2,63	31,09	311,09	8,17	1,85	2,02

$\theta_{s,l}$  – kriterijum razdvajanja;  $t_1$  – retenciono vreme prvog pika;  $t_f$  – retenciono vreme poslednjeg pika;  $Rs_{s,l}$  – faktor rezolucije;  $B_{CRF}$  – Beridžova funkcija hromatografskog odgovora [13]; COF – Glajcova hromatografska optimizaciona funkcija [14]; CRS – Šlabahova statistička hromatografska rezolucija [16];  $Do_{CRF}$  – Dozova funkcija hromatografskog odgovora [15];  $D_{CRF}$  – Duarteova funkcija hromatografskog odgovora [8]; CEF – Morisova hromatografska eksponencijalna funkcija [17];  $N_{CRF}$  – nova funkcija hromatografskog odgovora

Analizirajući eksperimentalno dobijene hromatograme, može se uočiti da se oni međusobno razlikuju, kako po kvalitetu razdvajanja prisutnih pikova, tako i po ukupnoj dužini trajanja analize. Može se primetiti da su sve funkcije identifikovale iste najbolje i iste najlošije hromatograme. Međutim, redosled hromatograma između ova dva ekstremna slučaja značajno je različit kada ga definišu različite funkcije. To znači da je većina funkcija bila primenljiva u proceni očigledno dobrih hromatograma (u kojima je postignuta odlična separacija u malom vremenskom periodu, slika 17A, eksperiment 12) ili očigledno loših hromatograma (loša separacija za većinu pikova ili veoma produženo vreme trajanja analize, slika 17B, eksperiment 10).



**Slika 17.** A) najbolji eksperimentalno dobijeni hromatogram (sadržaj acetonitrila 85 %, pH vrednost vodene faze 6,18, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 40 mM); B) najlošiji eksperimentalno dobijeni hromatogram (sadržaj acetonitrila 93,4 %, pH vrednost vodene faze 4,5, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 40 mM); redosled eluiranja supstanci na prikazanom hromatogramu je: 1) fenoterol, 2) propranolol, 3) salbutamol, 4) metoprolol i 5) atenolol

Međutim, kada se funkcija hromatografskog odgovora primenjuje kao odgovor koji će se modelovati u toku optimizacije, veoma je bitno da ona tačno može proceniti svaki hromatogram u skladu sa definisanim ciljem optimizacije. Ako funkcija ne može adekvatno da oceni hromatograme, površina odgovora biće netačna i vodiće lažnom optimumu.

Prednosti i nedostaci sedam ispitivanih funkcija uočeni na primeru ove smeše slažu se sa prethodno uočenim u okviru analize funkcija na simuliranim hromatogramima. U nastavku će biti istaknuti samo neki karakteristični primeri.

Funkcija  $B_{CRF}$  neadekvatno je rangirala hromatograme zbog sabiranja vrednosti faktora rezolucije. Na primeru hromatograma 6 i 12 može se uočiti da, iako je separacija na baznoj liniji postignuta u oba slučaja, a dužina trajanja analize na hromatogramu 6 kraća za 2 minuta, ova funkcija identifikuje hromatogram 12 kao bolji ( $B_{CRF}$  za hromatogram 12 je 11,76, a za hromatogram 6 je 9,81). Ova funkcija definisala je hromatogram 11 kao bolji od hromatograma 7, iako hromatogram 7 ima i bolje separacione karakteristike i kraću ukupnu dužinu trajanja analize. Faktor rezolucije na sličan način utiče na COF kao i na  $B_{CRF}$ . S druge strane, COF je omogućila bolju procenu hromatograma izbegavajući maskiranje loše razdvojenih pikova dobro razdvojenim (COF za hromatogram 11 je 0,84, a za hromatogram 7 je 0,38).

Funkcija  $D_{O_{CRF}}$  pokazala je nešto slabiju osetljivost na razlike u kvalitetu separacije što se može uočiti ako se uporede hromatogram 1 ( $D_{O_{CRF}} = 2,60$  i  $\theta_{1/2} = 0$ ) i hromatogram 18 ( $D_{O_{CRF}} = 2,63$  i  $\theta_{1/2} = 0,98$ ). Razlog za ovakvu pojavu može se tražiti u lošoj uravnoteženosti članova funkcije koji procenjuju razdvajanje i dužinu trajanja analize.

Obe funkcije CRS i CEF pokazale su problem sa rangiranjem hromatograma jer je kvalitet separacije adekvatno vrednovan samo u slučajevima kada je bio jednak zadatoj optimalnoj vrednosti. Stoga, može se primetiti da su obe funkcije identifikovale hromatogram 4 (postignuto razdvajanje na baznoj liniji i ukupna dužina trajanja analize 28,91 minuta) kao bolji od hromatograma 3 (postignuto razdvajanje na baznoj liniji, takođe, i ukupna dužina trajanja analize 8,36 minuta).

Funkcije  $D_{CRF}$  i  $N_{CRF}$  jedine su adekvatno izmerile separaciju na baznoj liniji zahvaljujući  $\theta$  kriterijumu. Ove funkcije dale su najbolje rangiranje hromatograma u skladu sa definisanim ciljem optimizacije. Dodatno, kako  $N_{CRF}$  omogućava podešavanje težinskih faktora (za razliku od  $D_{CRF}$ ), još jedna varijacija procene kvaliteta hromatograma putem ove funkcije predstavljena je u tabeli 12 ( $N_{CRF2}$ ) gde je težinski



faktor  $b$  definisan na sledeći način: za  $t_f < 10$ ,  $b = 0$ , u suprotnom  $b = 1$ . Ovakva varijacija težinskog faktora stavlja jači akcenat na član razdvajanja sve dok ukupna dužina trajanja analize ne pređe 10 minuta. Time se izbegava mogućnost da hromatografske analize sa ekstremno kratkom dužinom trajanja maskiraju loše razdvajanje nekih pikova.

## **6. Kreiranje matematičkog modela**

Kako je potvrđeno da funkcije  $N_{CRF}$  i  $D_{CRF}$  tačno procenjuju kvalitet eksperimentalno dobijenih hromatograma, one mogu biti upotrebljene kao jedinstveni odgovori sistema za optimizaciju. Primenom višestruke linearne regresije i metode najmanjih kvadrata definisani su polinomi drugog stepena koji opisuju  $N_{CRF}$  i  $D_{CRF}$  i koeficijenti modela za kodirane vrednosti faktora predstavljeni su u tabeli 13.

**Tabela 13.** Koeficijenti kvadratnih modela definisanih za  $N_{CRF}$  i  $D_{CRF}$  i njihova statistička značajnost

Faktori	$N_{CRF}$		$D_{CRF}$	
	Koeficijenti	$p$ – vrednosti	Koeficijenti	$p$ – vrednosti
$x_1$	0,27	0,001*	0,33	0,034*
$x_1^2$	0,55	0,000*	-0,15	0,285
$x_2$	-0,01	0,806	0,26	0,034*
$x_2^2$	0,10	0,039*	-0,10	0,382
$x_3$	-0,19	0,001*	0,01	0,911
$x_3^2$	0,24	0,001*	-0,15	0,215
$x_1x_2$	0,66	0,000*	-0,47	0,009*
$x_1x_3$	-0,12	0,047*	-0,01	0,919
$x_2x_3$	0,05	0,355	-0,02	0,861
$R^2$		0,983		0,823
Adj. $R^2$		0,960		0,595

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost vodene faze;  $x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

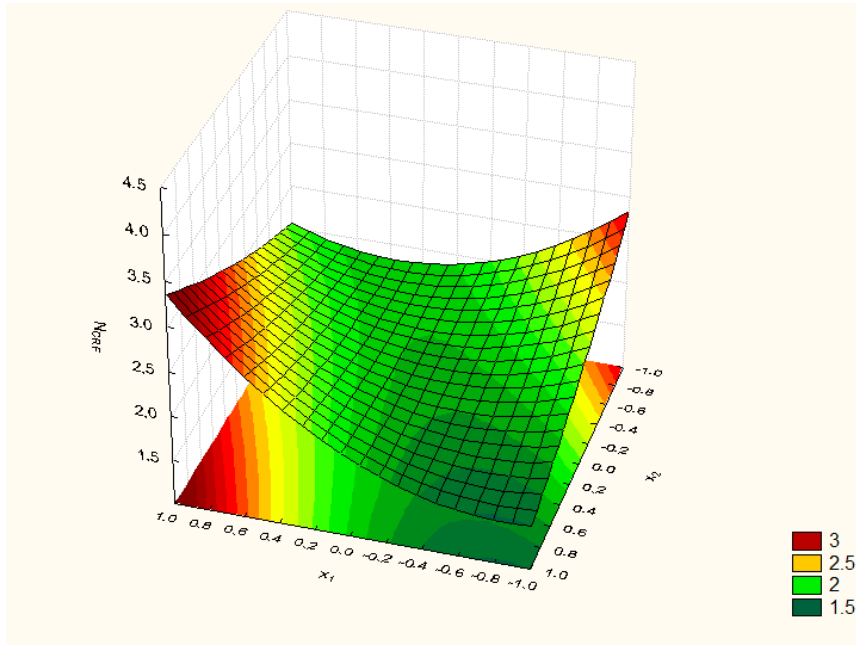
\*statistički značajni koeficijenti za nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$

\*\*statističkom analizom eksperiment 10 identifikovan je kao *outlier* i nije uključen u kreiranje modela

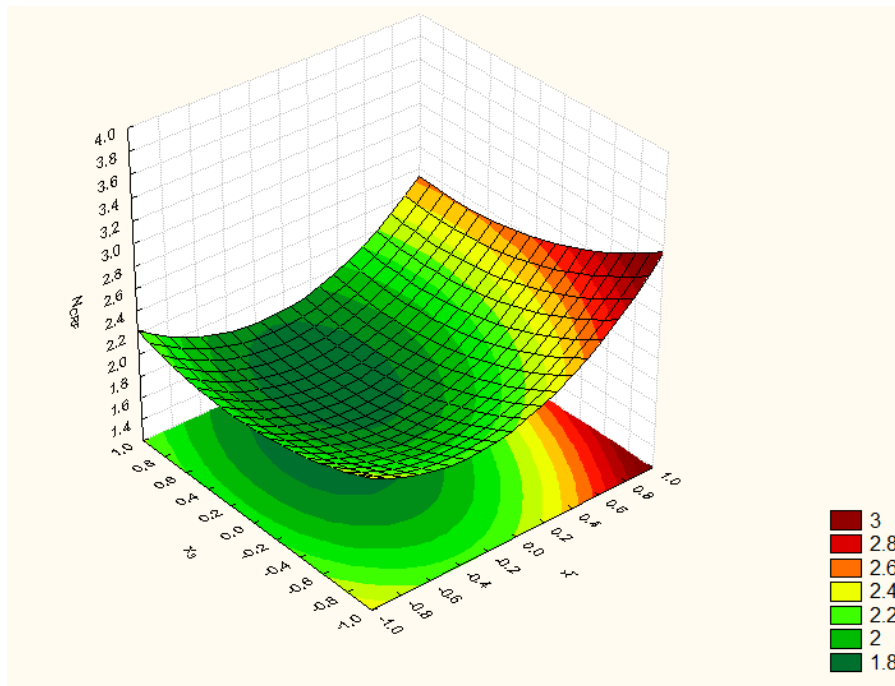
Analizom tabele 13 može se primetiti da je model dobijeni za  $N_{CRF}$  značajno bolji u odnosu na onaj dobijen za  $D_{CRF}$  i to naročito kada se uporede vrednosti Adj.  $R^2$ . To znači da je ponašanje datog sistema na adekvatan i pouzdan način opisano funkcijom  $N_{CRF}$  i da se ona može iskoristiti za identifikaciju optimalnih uslova razdvajanja.

## 7. Identifikacija optimalnih uslova

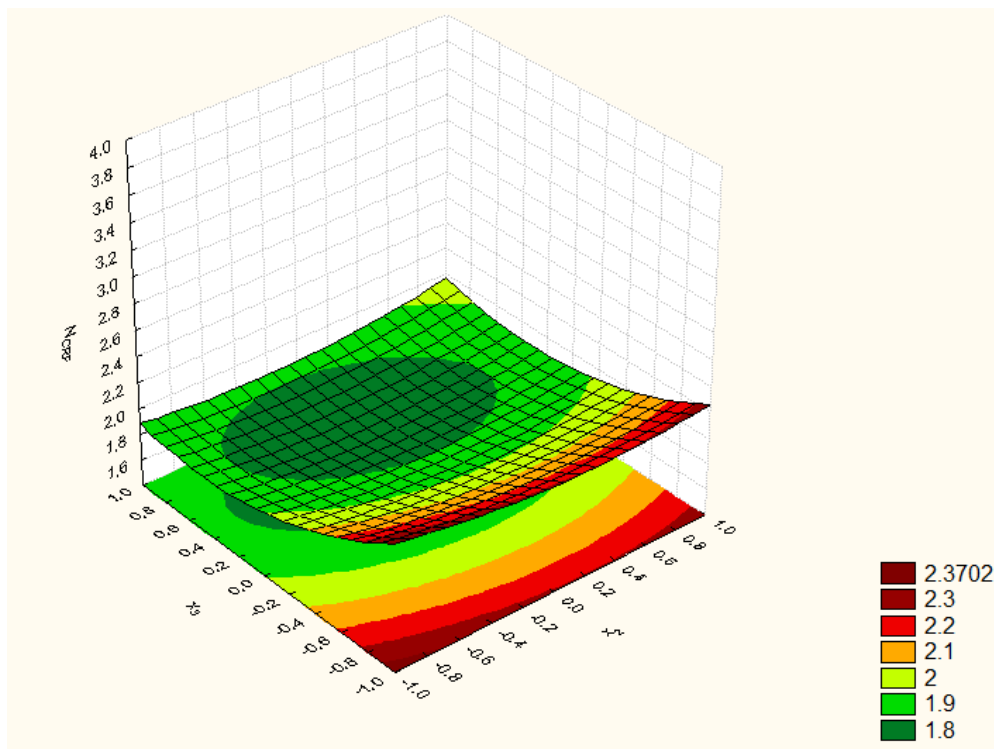
Identifikacija globalnih optimalnih uslova izvršena je metodologijom površine odgovora koristeći  $N_{CRF}$  kao odgovor sistema. Konstruisane su trodimenzionalne površine odgovora i prikazane na slici 18.



A)



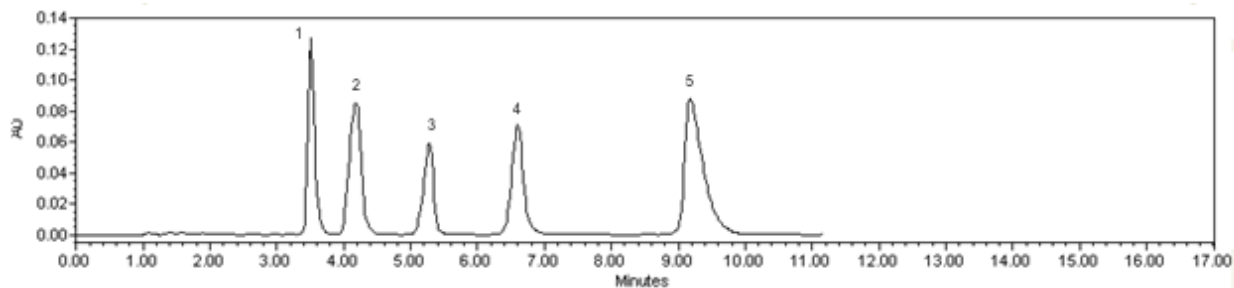
B)



C)

**Slika 18.** Trodimenzionalne površine odgovora: A)  $N_{CRF} = f(x_1, x_2)$ ; B)  $N_{CRF} = f(x_1, x_3)$ ; C)  $N_{CRF} = f(x_2, x_3)$ ;  $x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost mobilne faze;  $x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

Analiza dobijenih površina odgovora na slici 18 olakšava vizuelizaciju rezultata dobijenih u tabeli 13. Na slici 18 A) primećuje se snažan uticaj interakcije  $x_1x_2$  na vrednost funkcije hromatografskog odgovora i može se identifikovati optimalan region u delu eksperimentalnog prostora gde je sadržaj acetonitrila najmanji, a pH vrednost vodene faze najveća. S druge strane, slika 18 C) ukazuje na to da se u regionu eksperimentalnog prostora sa najvećom pH vrednošću ne locira željeni optimum, već je potrebno blago pomeranje ka nešto manjoj pH vrednosti. Istovremenom procenom sve tri površine odgovora zaključeno je da bi optimum mogao da se identifikuje za vrednosti ispitivanih faktora: 85 % acetonitrila, pH vrednost vodene faze 5,1 i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi od 40 mM. Dobijeni hromatogram pod optimalnim uslovima prikazan je na slici 19.



**Slika 19.** Eksperimentalno dobijeni hromatogram pod optimalnim uslovima: acetonitril–vodena faza (40 mM amonijum-acetat, pH vrednost podešena na 5,1 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (85:15 V/V), temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 254 nm i protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>; redosled eluiranja supstanci na prikazanom hromatogramu je: 1) fenoterol, 2) propranolol, 3) salbutamol, 4) metoprolol i 5) atenolol

## 7.2. UNAPREĐENJE FUNKCIJE HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA

Najveći broj funkcija hromatografskog odgovora dizajniran je tako da procenjuje kvalitet razdvajanja pikova, kao i ukupnu dužinu trajanja analize. Međutim, važan aspekt procene kvaliteta hromatograma je i oblik dobijenih pikova, jer pikovi koji ne slede Gausov oblik i oni koji su ekstremno široki mogu otežati adekvatnu kvantifikaciju. Kada se razvijaju hromatografske metode za analizu farmaceutski aktivnih supstanci, regulatorni zahtevi su jako strogi i postavljene metode moraju garantovati pouzdanu kvantifikaciju. Stoga je u ovoj disertaciji razvijena unapređena funkcija hromatografskog odgovora inkorporiranjem člana koji procenjuje širinu pika u dizajn prethodno razvijene  $N_{CRF}$ . Tako unapređena funkcija označena je kao  $N_{CRF}^*$  i predstavljena je sledećom formulom:

$$N_{CRF}^* = \left( a \left( 1 - \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \theta_{s,l}}{N-1} \right) + 1 \right) \left( 1 + \left( \frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \left( 1 + \frac{\sum w_i}{N} \right)^c \quad (74)$$

gde je  $\theta_{s,l}$  kriterijum separacije,  $N$  je broj očekivanih pikova,  $t_f$  je retenciono vreme poslednjeg pika,  $t_{opt}$  je odabrano optimalno retenciono vreme poslednjeg pika,  $w_i$  širina pika na baznoj liniji  $a$ ,  $b$  i  $c$  su koeficijenti koje treba unapred definisati.

Sa povećanjem broja članova koji su uključeni u funkciju otežava se postavljanje adekvatne ravnoteže između njih i zato je za svaki set hromatograma potrebno pažljivo odabrati vrednosti  $a$ ,  $b$  i  $c$ .

Unapređena funkcija hromatografskog odgovora  $N_{CRF}^*$  omogućava odabir hromatograma u kojima je postignuto najbolje razdvajanje prisutnih pikova, minimalna dužina trajanja analize, ali i adekvatan oblik pikova.

## 7.2.1. VERIFIKACIJA UNAPREĐENE FUNKCIJE $N_{CRF}^*$ NA SERIJI EKSPERIMENTALNO DOBIJENIH HROMATOGRAMA U HILIC SISTEMU

### HILIC ANALIZA SMEŠE ANTIDEPRESIVA

Razvoj HILIC metode za analizu smeše antidepresiva (selegilin, mianserin, sertralin, moklobemid, fluoksetin, maprotilin) izveden je primenom DoE metodologije. Kvalitet eksperimentalno dobijenih hromatograma meren je unapređenom funkcijom hromatografskog odgovora  $N_{CRF}^*$ .

#### **1. Definisane cilja optimizacije**

Cilj optimizacije bio je identifikacija eksperimentalnih uslova koji će omogućiti razdvajanje svih analiziranih supstanci u toku minimalnog vremena trajanja analize pri čemu će se težiti postizanju pikova blizu Gausovog oblika. Unapređena funkcija hromatografskog odgovora  $N_{CRF}^*$  biće primenjena za postizanje ovako definisanog cilja.

#### **2. Odabir faktora koji će biti optimizirani**

Analiza ispitivane smeše u HILIC sistemu započela je preliminarnim ispitivanjima. Kao stacionarna faza odabrana je kolona od čiste silike. Mobilna faza sastojala se od velikog udela acetonitrila i male količine vodene faze, kojoj je dodat amonijum-acetat. pH vrednost vodene faze podešena je glacijalnom sirćetnom kiselinom. Primećeno je da je retenciono ponašanje analizirane smeše pod snažnim uticajem sastava mobilne faze i odlučeno je da se izvrši optimizacija tri faktora vezana za sastav mobilne faze: sadržaja acetonitrila, pH vrednosti vodene faze i koncentracije pufera u vodenoj fazi. Stoga, kao cilj je postavljena identifikacija kombinacije ova tri faktora koja će omogućiti najbolje hromatografsko ponašanje analizirane smeše, tj. koja će dati najbolju vrednost funkcije  $N_{CRF}^*$ . Nivoi ostalih relevantnih faktora postavljeni su na konstantne vrednosti: temperatura kolone bila je 30 °C, protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, a talasna dužina detekcije 254 nm.

### **3. Odabir faktorskih nivoa**

Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi ispitivan je u opsegu od 86 % do 94 %. Manje koncentracije acetonitrila od 86 % dovodile su do brzog koeluiranja ispitivanih supstanci, dok su koncentracije veće od 94 % vodile izuzetnom produžavanju trajanja analize. Odabrani pH opseg iznosio je od 3,0 do 6,0 pH jedinica. Vrednosti pH ispod 3,0 pH jedinice vodile su brzom eluiranju i preklapanju ispitivanih supstanci, dok su pH vrednosti iznad 6,0 pH jedinica bile neprihvatljive za odabranu hromatografsku kolonu. Opseg za koncentraciju pufera bio je od 20 mM do 40 mM kako bi se obezbedilo adekvatno retenciono zadržavanje baznih supstanci, kao što je prethodno objašnjeno u poglavlju 7.1.3.

### **4. Odabir eksperimentalnog dizajna**

Eksperimentalni plan kreiran je na osnovu matrice  $3^3$  punog faktorskog dizajna. Tako definisani eksperimentlani plan sa tri dodate replikacije u centralnoj tački predstavljen je u tabeli 5.

### **5. Odabir odgovora koji će biti praćen**

Na svakom dobijenom hromatogramu beleženo je retenciono vreme pikova i širine pikova na baznoj liniji. Zatim, izračunati su odgovarajući retencioni faktori. Rezultati su prikazani u tabeli 14.

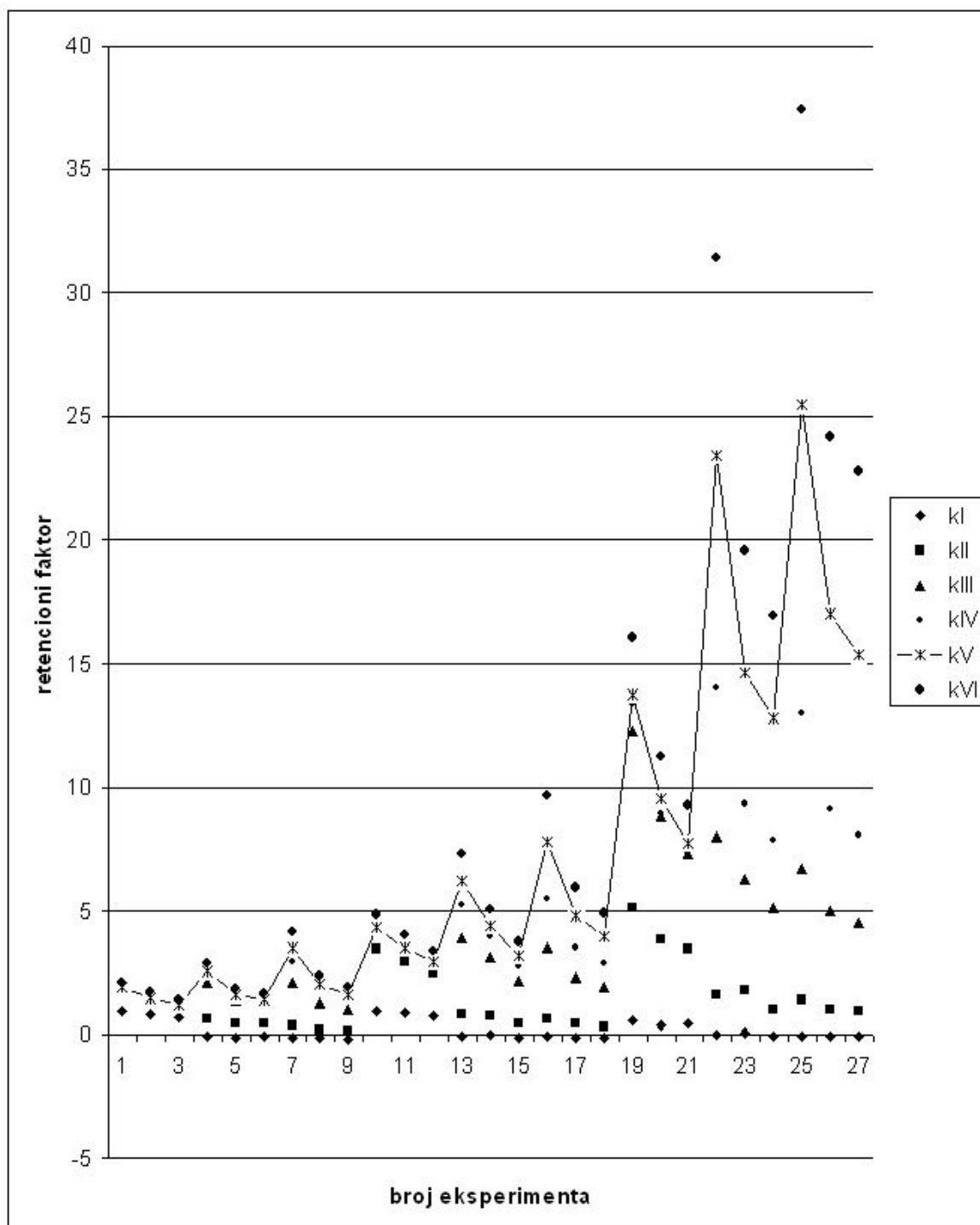


**Tabela 14.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

Eksp.	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$	$w_1$	$w_2$	$w_3$	$w_4$	$w_5$	$w_6$
1	0,94	1,89	2,01	2,03	2,09	2,12	0,40	1,16	0,65	0,55	1,11	0,79
2	0,84	1,49	1,59	1,61	1,66	1,69	0,78	0,88	0,49	0,42	0,38	0,41
3	0,71	1,24	1,28	1,36	1,37	1,41	0,40	0,74	0,64	1,25	0,39	0,80
4	-0,09	0,62	2,13	2,54	2,54	2,86	0,21	0,40	0,50	0,84	0,70	0,64
5	-0,11	0,46	1,41	1,62	1,64	1,86	0,19	0,35	0,33	0,44	0,42	0,37
6	-0,08	0,44	1,28	1,42	1,46	1,65	0,18	0,31	0,38	0,36	0,38	0,34
7	-0,14	0,36	2,09	2,94	3,51	4,13	0,26	0,37	0,54	0,63	0,74	0,70
8	-0,16	0,21	1,29	1,79	2,02	2,34	0,18	0,26	0,36	0,38	0,45	0,69
9	-0,19	0,14	1,01	1,39	1,59	1,90	0,23	0,36	0,46	0,38	0,40	0,55
10	0,98	3,44	4,36	4,41	4,64	4,88	0,38	0,67	0,68	0,69	0,75	1,02
11	0,92	2,95	3,54	3,62	3,76	4,03	0,34	0,53	0,53	0,88	0,63	0,81
12	0,79	2,51	2,93	3,02	3,09	3,36	0,36	0,53	0,66	0,70	1,02	0,70
13	-0,08	0,82	3,88	5,25	6,19	7,31	0,18	0,40	0,66	0,81	0,87	0,94
14	-0,03	0,78	3,15	3,97	4,41	5,04	0,22	0,51	0,78	0,63	0,68	0,75
15	-0,13	0,47	2,20	2,74	3,17	3,78	0,18	0,37	0,48	0,55	0,66	0,64
16	-0,10	0,64	3,53	5,51	7,81	9,69	0,25	0,44	0,68	0,90	1,13	1,36
17	-0,13	0,43	2,30	3,52	4,80	5,93	0,17	0,30	0,49	0,64	0,72	0,86
18	-0,15	0,33	1,90	2,87	3,96	4,94	0,19	0,37	0,49	0,59	0,63	0,81
19	0,60	5,09	12,31	13,34	13,74	16,07	0,32	0,81	1,29	1,50	1,51	1,75
20	0,40	3,86	8,81	8,95	9,54	11,28	0,31	0,70	1,44	1,13	1,09	1,27
21	0,41	3,48	7,26	7,29	7,78	9,27	0,48	0,67	1,23	1,54	1,03	1,27
22	-0,01	1,59	7,97	13,99	23,44	31,42	0,33	0,57	1,17	2,13	2,91	3,98
23	0,06	1,80	6,27	9,32	14,63	19,57	0,22	0,53	1,28	1,23	1,64	2,58
24	-0,07	0,99	5,14	7,87	12,78	16,94	0,19	0,46	0,85	1,14	1,56	2,11
25	-0,04	1,37	6,71	12,99	25,44	37,43	0,19	0,55	1,04	1,71	2,75	4,02
26	-0,06	1,04	4,99	9,11	17,04	24,21	0,18	0,43	0,77	1,72	2,42	3,18
27	-0,08	0,95	4,54	8,09	15,36	22,83	0,21	0,45	0,79	1,19	2,65	2,88
28	-0,11	0,60	2,74	3,56	4,10	4,84	0,18	0,39	0,51	0,62	0,65	0,72
29	0,07	1,34	3,39	3,88	4,14	4,81	0,19	0,37	0,50	0,62	0,65	0,71
30	-0,03	0,78	3,15	3,97	4,41	5,04	0,22	0,41	0,55	0,63	0,68	0,75

$k_1 - k_6$  retencioni faktori prve do pete supstance koja se pojavljuje na hromatogramu;  $w_1 - w_6$  širine pikova na baznoj liniji analiziraih supstanci

Slika 20 pokazuje mapu retencionih faktora analiziranih supstanci dobijenu za svaki izvedeni eksperiment.



**Slika 20.** Šematski prikaz redosleda eluiranja supstanci u izvedenim eksperimentima:  
 kI – selegilin; kII – mianserin; kIII – sertralin; kIV – moklobemid;  
 kV – fluoksetin; kVI – maprotilin

Na slici 20 može se uočiti kompleksnost hromatografskog ponašanja analizirane smeše. Pod određenim eksperimentalnim uslovima dolazilo je do preklapanja čak pet od šest ispitivanih supstanci (eksperimenti 1, 2 i 3), pa nije bilo moguće identifikovati jedan kritičan par. Promena eksperimentalnih faktora uticala je na retenciono ponašanje svake ispitivane supstance na različite načine. Supstanca I eluirala je uvek prva, a supstanca VI poslednja. Međutim, položaj supstance V menjao se od drugog do petog mesta, kao što se i može primetiti na slici 20. Hromatografski uslovi na kojima je postignuto nesumnjivo razdvajanje svih pikova vodili su izuzetno dugom trajanju analize, kao i neadekvatnom obliku pikova. Stoga je identifikacija eksperimentalnih uslova u kojima će se postići istovremeno razdvajanje, minimalno vreme trajanja analize, kao i adekvatan oblik pikova bila veliki izazov. Unapređena funkcija hromatografskog odgovora  $N_{CRF}^*$  trebalo bi da omogući rešavanje ovakvog problema.

### **Verifikacija funkcija hromatografskog odgovora**

U prvoj fazi primene funkcije  $N_{CRF}^*$  definisani su težinski koeficijenti:  $a = 5$ ,  $b = 1$ ,  $c = 0,2$ . Njihove vrednosti podešene su tako da se najveći akcenat stavi na postizanje razdvajanja analiziranih supstanci, dok su ukupna dužina trajanja analize, kao i širina pikova bili sekundarni ciljevi. Vrednost ukupnog optimalnog vremena trajanja analize postavljena je na 10 minuta jer je odlučeno da je to prihvatljiva dužina trajanja analize šest supstanci. Kvalitet razdvajanja susednih pikova meren je pomoću  $\theta$  kriterijuma i tradicionalno primenljivog faktora rezolucije. Izračunate su vrednosti  $N_{CRF}^*$  za trideset eksperimentalno dobijenih hromatograma i rezultati su predstavljeni u tabeli 15.

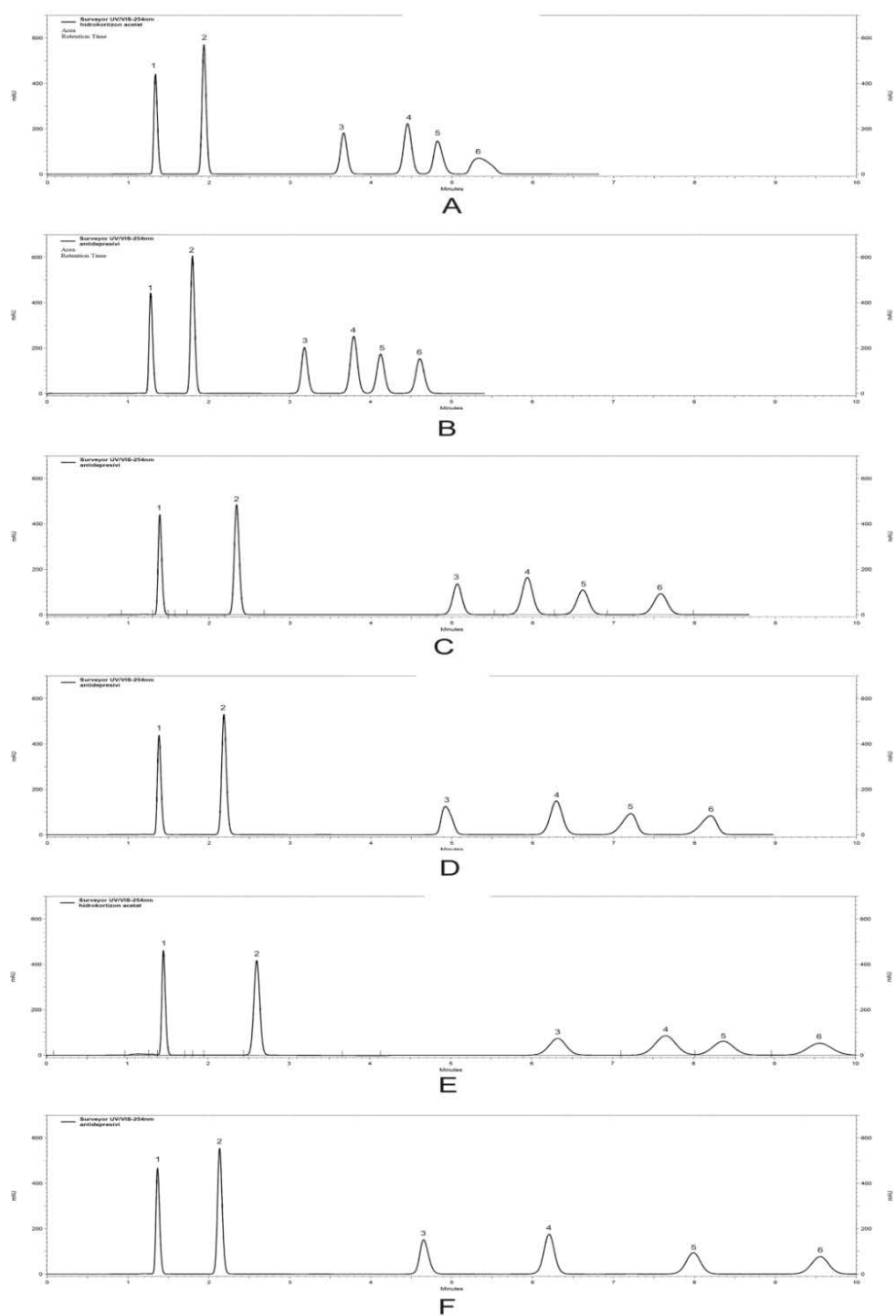
**Tabela 15.** Važni hromatografski parametri za eksperimentalno dobijene hromatograme i izračunate vrednosti sedam ispitivanih funkcija

Eksp.	$\theta_{1/2}$	$\theta_{2/3}$	$\theta_{3/4}$	$\theta_{4/5}$	$\theta_{5/6}$	Sum $\theta/N$	$Rs_{1/2}$	$Rs_{2/3}$	$Rs_{3/4}$	$Rs_{4/5}$	$Rs_{5/6}$	Sum $Rs/N$	Sum $w/N$	$t_f$	$N_{CRF}^*$
1	1,00	0,77	0,00	0,75	0,00	0,50	1,95	0,21	0,05	0,13	0,04	0,47	0,78	4,99	5,86
2	1,00	0,82	0,17	0,28	0,14	0,48	1,25	0,25	0,06	0,20	0,13	0,38	0,56	4,31	5,60
3	1,00	0,59	0,47	0,04	0,23	0,46	1,47	0,10	0,13	0,02	0,10	0,36	0,70	3,85	5,65
4	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,80	3,70	5,38	0,97	0,01	0,76	2,16	0,55	6,18	3,53
5	1,00	1,00	0,99	0,00	0,97	0,79	3,37	4,50	0,86	0,07	0,89	1,94	0,35	4,57	3,15
6	1,00	1,00	0,95	0,33	0,98	0,85	3,18	3,65	0,57	0,16	0,80	1,67	0,32	3,98	2,57
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,57	6,09	2,32	1,33	1,37	2,74	0,54	8,21	1,98
8	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	2,73	5,58	2,13	0,89	0,89	2,44	0,39	5,34	1,65
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,76	3,39	1,45	0,85	1,03	1,70	0,39	4,64	1,56
10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,84	0,74	7,52	2,16	0,13	0,50	0,44	2,15	0,70	9,41	4,91
11	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	0,78	6,99	1,68	0,17	0,28	0,56	1,93	0,62	7,54	4,05
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	5,80	1,06	0,20	0,12	0,48	1,53	0,66	6,54	4,08
13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,93	9,23	2,99	1,78	1,99	4,18	0,64	13,30	2,57
14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,31	5,52	1,74	1,01	1,31	2,58	0,59	9,06	2,09
15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,49	6,52	1,67	1,14	1,49	2,86	0,48	7,64	1,91
16	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,42	8,25	4,02	3,62	2,42	4,35	0,79	17,11	3,05
17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,79	7,59	3,45	3,01	2,28	4,02	0,53	11,08	2,29
18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,75	5,84	2,87	2,87	2,17	3,30	0,51	9,50	2,12
19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	12,71	11,00	1,18	0,42	2,29	5,52	1,19	27,31	4,37

<b>20</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	11,67	7,85	0,19	0,89	2,51	4,62	0,99	20,87	6,54
<b>21</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	8,54	6,37	0,04	0,61	2,08	3,52	1,04	16,43	6,09
<b>22</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5,67	11,73	5,84	6,00	3,70	6,59	1,84	51,87	7,63
<b>23</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	7,44	7,90	3,89	5,92	3,74	5,78	1,25	32,91	5,04
<b>24</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5,23	10,14	4,38	5,82	3,62	5,84	1,05	28,70	4,47
<b>25</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	6,08	10,74	7,31	8,94	5,66	7,75	1,71	61,48	8,72
<b>26</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5,77	10,53	5,28	6,13	4,09	6,36	1,45	40,33	6,02
<b>27</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,97	9,26	5,75	6,06	4,32	6,07	1,36	38,12	5,71
<b>28</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,96	7,62	2,32	1,35	1,74	3,40	0,51	9,35	2,10
<b>29</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	7,21	7,56	2,20	1,01	1,57	3,91	0,44	9,30	2,07
<b>30</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,31	5,52	1,74	1,01	1,31	2,58	0,59	9,06	2,09

$\theta_{s,l}$  – kriterijum separacije za susedne pikove;  $Rs_{s,l}$  – faktor rezolucije za susedne pikove;  $w_i$  – širina pika;  $t_f$  – retenciono vreme poslednjeg pika;  $N$  – ukupan broj pikova koji se pojavljuju na hromatogramu;  $N_{CRF}^*$  – unapređena funkcija hromatografskog odgovora

$N_{CRF}^*$  dostiže minimum kako se uslovi približavaju globalnom optimumu. Stoga su najmanje vrednosti funkcije dobijene za hromatograme sa dobrim razdvajanjem, relativno kratkim vremenom trajanja analize i adekvatnom širinom pikova, kao što je bio slučaj sa hromatogramima 9 ( $N_{CRF}^* = 1,56$ ), 8 ( $N_{CRF}^* = 1,65$ ), 15 ( $N_{CRF}^* = 1,91$ ), 7 ( $N_{CRF}^* = 1,98$ ), 14 ( $N_{CRF}^* = 2,09$ ) i 18 ( $N_{CRF}^* = 2,12$ ). Ovi hromatogrami predstavljeni su na slici 21. Hromatogrami 28, 29 i 30 koji su replikacije hromatograma 14, takođe imaju zadovoljavajuće  $N_{CRF}^*$  vrednosti.



**Slika 21.** Eksperimentalno dobijeni hromatogrami: A) Eksperiment 9; B) Eksperiment 8; C) Eksperiment 15; D) Eksperiment 7; E) Eksperiment 14; F) Eksperiment 18; hromatografski uslovi za svaki hromatogram prikazani su u tabeli 5; redosled eluiranja supstanci je: 1) selegilin, 2) mianserin, 3) sertralin, 4) moklobemid, 5) fluoksetin i 6) maprotilin

Redosled rangiranja hromatograma predstavljenih na slici 21 u skladu je sa ukupnom dužinom trajanja njihovih analiza, kao i sa oblikom dobijenih pikova jer je zadovoljavajuća separacija postignuta u svakom od datih slučajeva. Hromatogram 18 ima nešto bolji član separacije od hromatograma 7 i 14, ali njegova  $N_{CRF}^*$  vrednost je veća zbog ukupne dužine trajanja analize.

Kako je razdvajanje odabrano kao cilj sa najvećim prioritetom, hromatogrami sa nekoliko preklapljenih pikova „kažnjeni“ su pogoršanjem vrednosti  $N_{CRF}^*$ . Iz tog razloga hromatogrami 1 ( $N_{CRF}^* = 5,86$ ), 2 ( $N_{CRF}^* = 5,60$ ) i 3 ( $N_{CRF}^* = 5,65$ ) imaju nezadovoljavajuće vrednosti funkcije  $N_{CRF}^*$ , iako je ukupna dužina trajanja analize manja od 5 minuta. Slično, poredeći hromatograme 20 ( $N_{CRF}^* = 6,54$ ) i 26 ( $N_{CRF}^* = 6,09$ ) može se uočiti da je ukupna dužina trajanja analize prvog (40,33) duplo duža od ukupne dužine trajanja analize drugog hromatograma (20,87). Ipak, hromatogram 20 okarakterisan je kao lošiji usled lošeg razdvajanja (dva od šest  $\theta$  kriterijuma su neodgovarajuća i iznose 0,19 i 0,83).

Ekstremno produženje trajanja analize i deformacija pikova, odnosno značajno povećanje širine pikova, takođe su uticali na funkciju. Najlošije vrednosti funkcije dobijene su za hromatograme 25 ( $N_{CRF}^* = 8,72$ ) i 22 ( $N_{CRF}^* = 7,63$ ) gde je ukupno vreme trajanja analize jako dugo: 61,48 minuta za hromatogram 25 i 51,87 minuta za hromatogram 22. Takođe, ova dva hromatograma imala su i najveći zbir širina pikova.

Prednost procene razdvajanja  $\theta$  kriterijumom umesto faktorom rezolucije može se primetiti na primerima hromatograma od broja 22 do broja 27. Suma  $\theta$  kriterijuma za sve ove hromatograme je 1, jer je separacija na baznoj liniji za sve parove pikova postignuta na svakom hromatogramu. Stoga uticaj člana rezolucije neće maskirati ostale članove funkcije. Redosled koji je predložila funkcija  $N_{CRF}^*$  ( $24 < 23 < 27 < 26 < 22 < 25$ ) prati redosled ukupne dužine trajanja analize na ovim hromatogramima omogućavajući da se hromatogrami sa najkraćim vremenom trajanja analize procene kao najbolji. Nasuprot tome, vrednost faktora rezolucije povećava se kako se povećava razlika između retencionih vremena susednih pikova. Stoga se suma vrednosti faktora rezolucije podeljena sa brojem parova pikova povećava kako se povećava ukupna dužina trajanja analize, dovodeći do precenjivanja člana razdvajanja. U tom slučaju,



uticaj prolongirane dužine trajanja analize ili ekstremnih širina pikova bio bi maskiran i hromatogram 25 bio bi okarakterisan kao najbolji, dok ga  $N_{CRF}^*$  karakteriše kao najlošijeg.  $N_{CRF}^*$  je ocenila hromatograme tako da je izbegnuto maskiranje loše razdvojenih pikova velikim vrednostima faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova. Analizirajući hromatogram 20, može se primetiti da je zbir faktora rezolucije podeljen sa ukupnim brojem parova pikova 4,62, dok je za hromatogram 9 taj zbir 1,70. Međutim, u slučaju hromatograma 9 svi parovi pikova dobro su razdvojeni dok su kod hromatograma 20 treći i četvrti pik preklopljeni. Stoga, procena razdvajanja faktorom rezolucije može dati lažno pozitivne rezultate jer su neki faktori rezolucije numerički dovoljno veliki da maskiraju loše vrednosti drugih faktora rezolucije. S druge strane, suma  $\theta$  kriterijuma proceniće tačno razdvajanje otkrivajući sve pikove koji su preklopljeni.

## **6. Kreiranje matematičkog modela**

$N_{CRF}^*$  je omogućila efikasnu i tačnu procenu kvaliteta dobijenih hromatograma. Stoga su primenom višestruke linearne regresije i metode najmanjih kvadrata kreirani matematički modeli koji opisuju zavisnost  $N_{CRF}^*$  od ispitivanih faktora. Rezultati su prikazani u tabeli 16.

**Tabela 16.** Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za  $N_{CRF}^*$  i njihova statistička značajnost

	<b>Koeficijenti</b>	<b><i>p</i> – vrednosti</b>
<b>Odsečak</b>	2,23	
$x_1$	1,28	0,000*
$x_1^2$	1,82	0,000*
$x_2$	-0,78	0,000*
$x_2^2$	0,84	0,004*
$x_3$	-0,47	0,009*
$x_3^2$	0,26	0,325
$x_1x_2$	1,28	0,000*
$x_1x_3$	-0,24	0,242
$x_2x_3$	-0,42	0,046*
<b><math>R^2</math></b>		0,915
<b>Adj<math>R^2</math></b>		0,877

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost vodene faze;

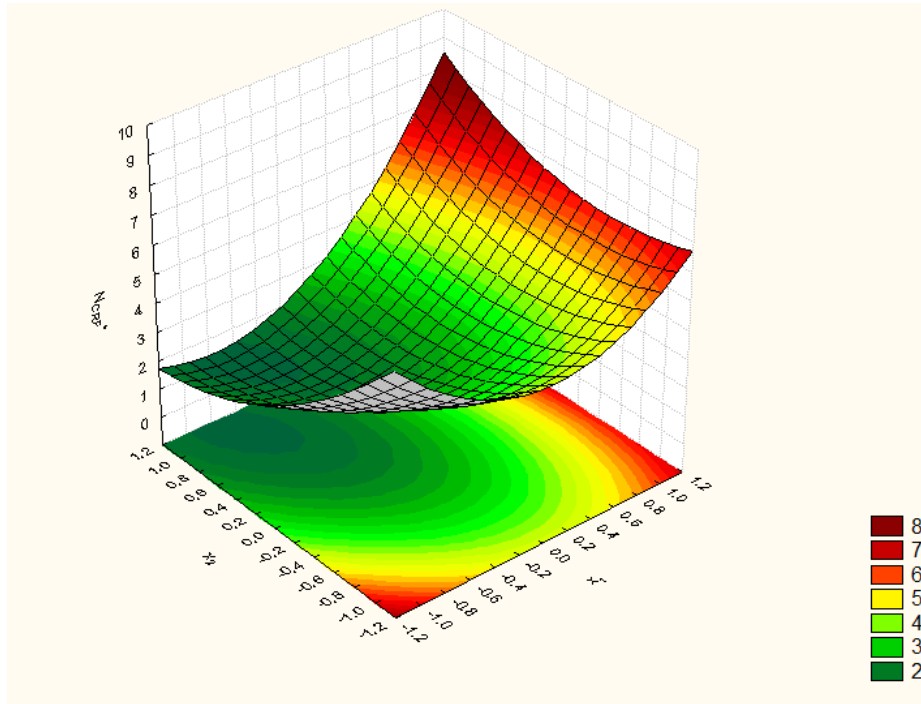
$x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM);

\*statistički značajni koeficijenti za nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$

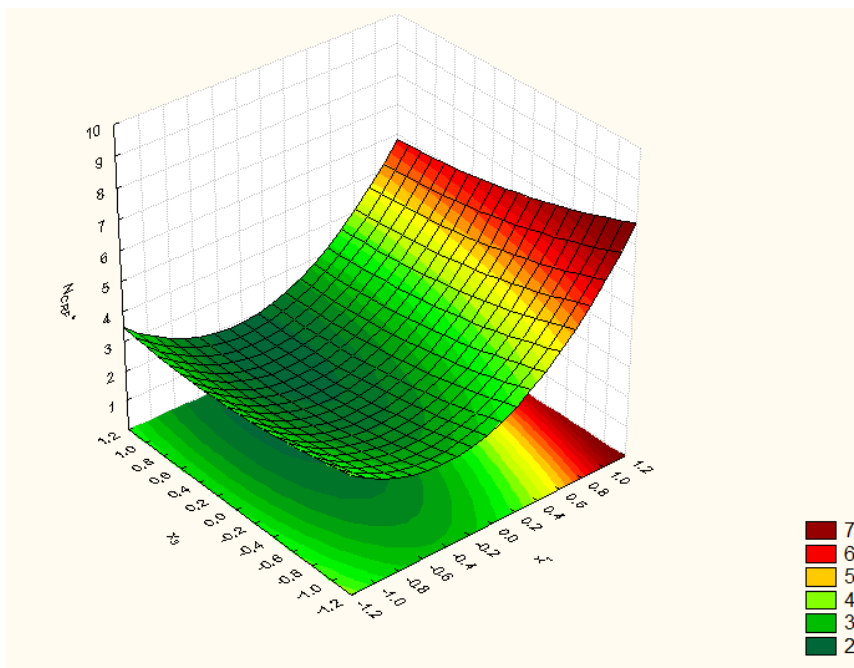
Može se uočiti da je statistička analiza identifikovala sva tri ispitivana faktora kao i interakcije faktora  $x_1$  i  $x_2$  i faktora  $x_1$  i  $x_3$  kao značajne za nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 7. Identifikacija optimalnih uslova

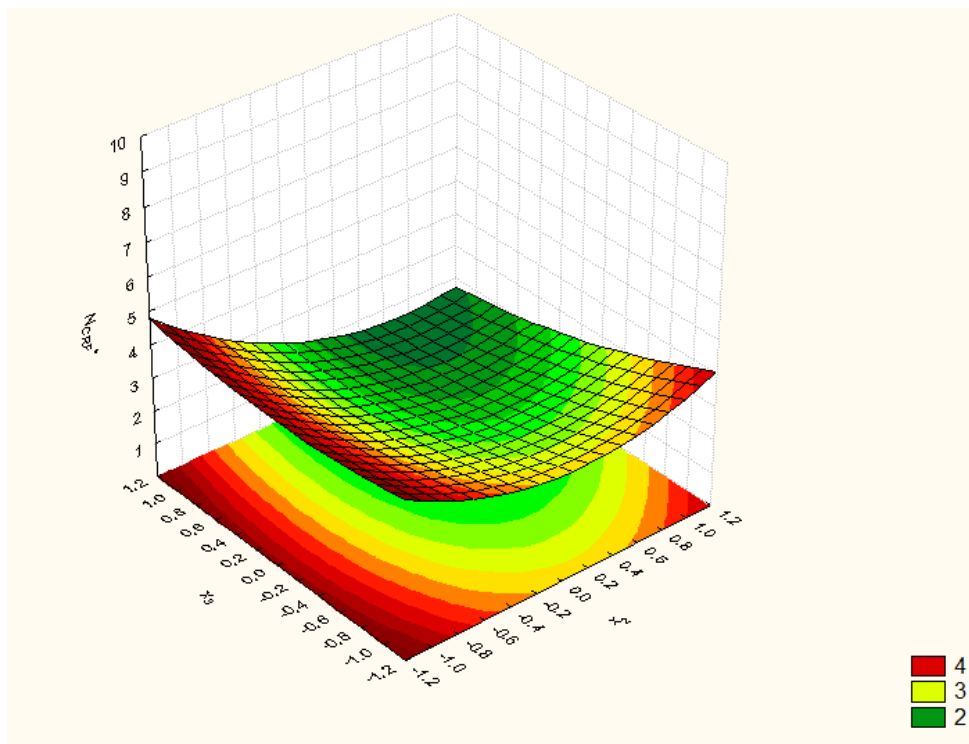
Identifikacija optimalnih vrednosti eksperimentalnih faktora izvršena je metodologijom površine odgovora. Odgovarajuće trodimenzionalne površine odgovora prikazane su na slici 22.



A)



B)



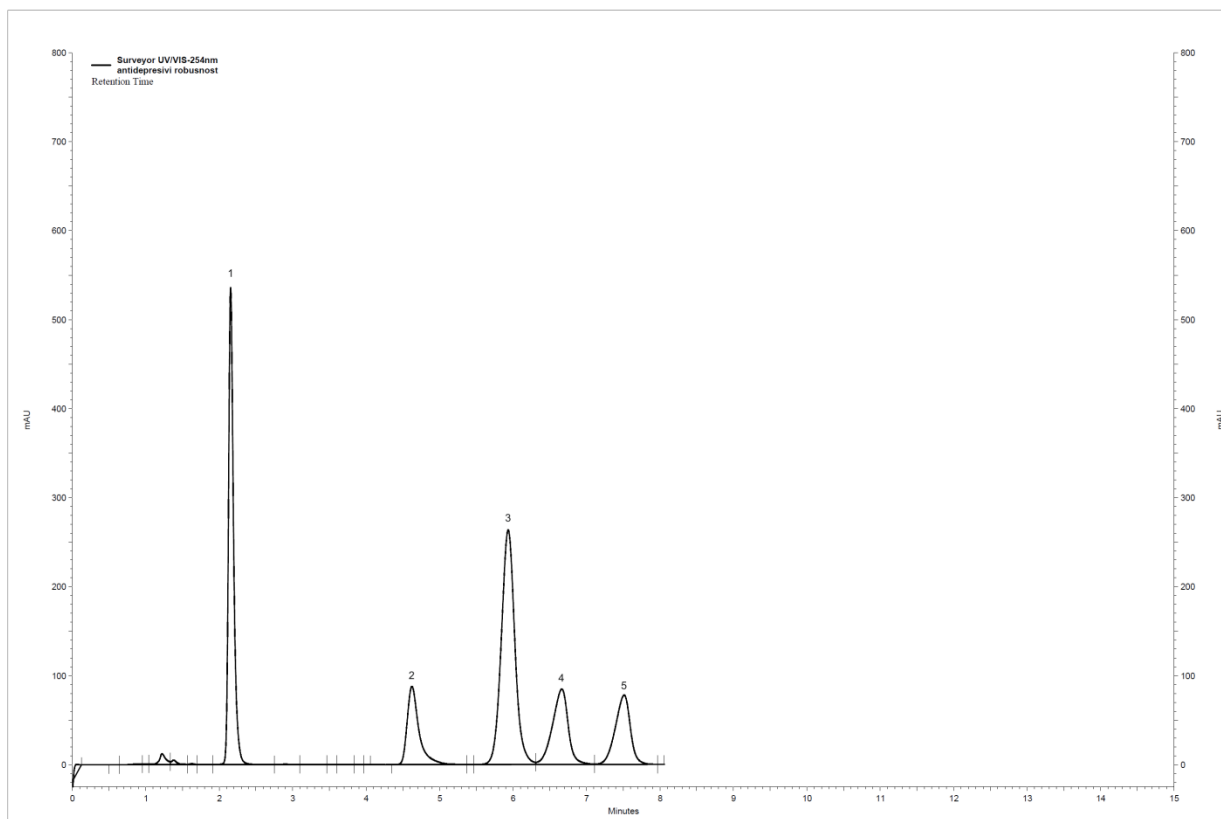
C)

**Slika 22.** Trodimenzionalne površine odgovora: A)  $N_{CRF}^* = f(x_1, x_2)$ ; B)  $N_{CRF}^* = f(x_1, x_3)$ ; C)  $N_{CRF}^* = f(x_2, x_3)$ ;  $x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost mobilne faze;  $x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

Analiza 3D površina odgovora pokazuje da sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH mobilne faze snažno utiču na hromatografsko ponašanje analizirane smeše, dok je uticaj koncentracije pufera bio manje značajan. Sa slike 22 može se primetiti da je interakcija sadržaja acetonitrila i pH vrednosti vodene faze posebno značajna. Smanjenje sadržaja acetonitrila skraćuje retenciono vreme analiziranih supstanci i samim tim ukupnu dužinu trajanja analize u HILIC sistemu. Međutim, ovo nosi rizik od pogoršanja razdvajanja supstanci. S druge strane, povećanje pH vrednosti mobilne faze poboljšava razdvajanje analiziranih supstanci. Stoga su najniže  $N_{CRF}^*$  vrednosti dobijene u regionima sa manjim sadržajem acetonitrila (regioni koji se približavaju vrednosti 1 u kodiranim ili 86 % u stvarnim vrednostima faktora) i većom pH vrednošću (do 1 u kodiranim, odnosno do 6,0 pH jedinica u stvarnim vrednostima faktora). Slika 22 prikazuje interakciju pH i koncentracije pufera. Najniža  $N_{CRF}^*$  vrednost dobijena je u regionima gde su oba faktora na najvišem nivou. Povećanje pH vrednosti omogućilo je

poboljšanje člana razdvajanja u funkciji, dok je povećanje koncentracije pufera omogućilo skraćivanje dužine trajanja analize i poboljšanje oblika pikova.

Uprkos kompleksnosti uticaja ispitivanih faktora,  $N_{CRF}^*$  je uspela da opiše retenciono ponašanje smeše u celini. Posledično, omogućila je identifikaciju regiona eksperimentalnog prostora u kojima odgovarajuća kombinacija ispitivanih faktora omogućava dobro razdvajanje, minimalnu dužinu trajanja analize i adekvatnu širinu pikova za sve analizirane supstance. Kao optimalni uslovi razdvajanja definisani su: acetonitril 86 %, pH 6,0 i molaritet amonijum-acetata 20 mM.



**Slika 23.** Eksperimentalno dobijeni hromatogram pod optimalnim uslovima: acetonitril–vodena faza (20 mM amonijum-acetat, pH vrednost podešena na 6,0 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (86:14 V/V), temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 254 nm i protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>; redosled eluiranja supstanci na prikazanom hromatogramu je: 1) selegilin, 2) mianserin, 3) sertralin, 4) moklobemid, 5) fluoksetin i 6) maprotilin

### 7.3. RAZVOJ NOVE TEHNIKE MATEMATIČKOG MODELOVANJA HROMATOGRAFSKIH ODGOVORA

Jedan od ključnih koraka razvoja metode hemometrijskim pristupom predstavlja uspostavljanje matematičke veze između faktora i odabranih odgovora. Ceo proces optimizacije zavisi od tačnosti ove veze jer će neadekvatni modeli voditi ka lociranju lažnih optimuma. Najčešće primenjivani tip matematičkog modelovanja hromatografskih odgovora podrazumeva kreiranje polinoma drugog stepena primenom višestruke linearne regresije i metode najmanjih kvadrata. Eksperimentalni dizajni koji ispituju faktore na tri nivoa omogućavaju da se primenom višestruke linearne regresije na set dobijenih podataka uspostavi ovakav tip zavisnosti [5]. Tako dobijeni model pretpostavlja da se veza faktora i hromatografskih odgovora može predstaviti kvadratnom formom ako je uzak interval variranja faktora. Međutim, širenjem eksperimentalnog prostora ova pretpostavka ne mora da bude održiva. Pored toga, u zavisnosti od odabranih faktora i odgovora, polinom drugog stepena ne mora tačno da opiše zavisnost. Ovakav problem naročito se može uočiti u analizi kompleksnih smeša u slučaju kada se vrši indirektno modelovanje hromatografskih odgovora. Ako se individualni odgovori modeluju kvadratnom formom i svaki model nosi određenu grešku, greška funkcije hromatografskog odgovora će se sabirati i samim tim povećavati. Stoga će i pretraživanje eksperimentalnog prostora biti neprecizno i javiće se rizik od lociranja lažnih optimuma.

U ovoj disertaciji predlaže se novi pristup modelovanju hromatografskih odgovora interpolacionim polinomom sa podeljenim razlikama. Interpolacioni polinom konstruisan je tako da je minimalna ukupna greška aproksimacija svih individualnih hromatografskih odgovora. Ovakvo modelovanje trebalo bi da opiše hromatografski sistem tačnije i pouzdanije u odnosu na tradicionalne pristupe modelovanju i na taj način izbegne akumulaciju grešaka individualnih modela.

Nova tehnika matematičkog modelovanja implementirana je u DoE metodologiju. Ova tehnika kombinovana sa pristupom indirektnog modelovanja kompleksnih hromatografskih odgovora trebalo bi da omogući pouzdanu optimizaciju razdvajanja

kompleksnih smeša u slučajevima u kojima tradicionalne tehnike modelovanja ne mogu dati zadovoljavajuće rezultate.

### 7.3.1. VERIFIKACIJA NOVE TEHNIKE MATEMATIČKOG MODELOVANJA NA PRIMERU ANALIZE SMEŠE ANTIDEPRESIVA U HILIC SISTEMU

Nova tehnika modelovanja verifikovana je na primeru razdvajanja šest antidepresiva u HILIC sistemu. Retenciono ponašanje supstanci u HILIC-u je složeno i očekuje se da će novo modelovanje omogućiti adekvatno opisivanje retencionog ponašanja supstanci, a zatim kombinovano sa indirektnim modelovanjem kompleksnih hromatografskih odgovora, tačno lociranje optimuma. Prednosti nove tehnike modelovanja biće istovremeno upoređene sa tradicionalno primenjenim kvadratnim modelovanjem.

Prve četiri faze razvoja metode za analizu smeše antidepresiva (**1. Definisanje cilja optimizacije; 2. Odabir faktora koji će se pratiti; 3. Odabir faktorskih nivoa i 4. Odabir eksperimentalnog dizajna**) opisane su u poglavlju 7.2.

#### **5. Odabir odgovora koji će se pratiti**

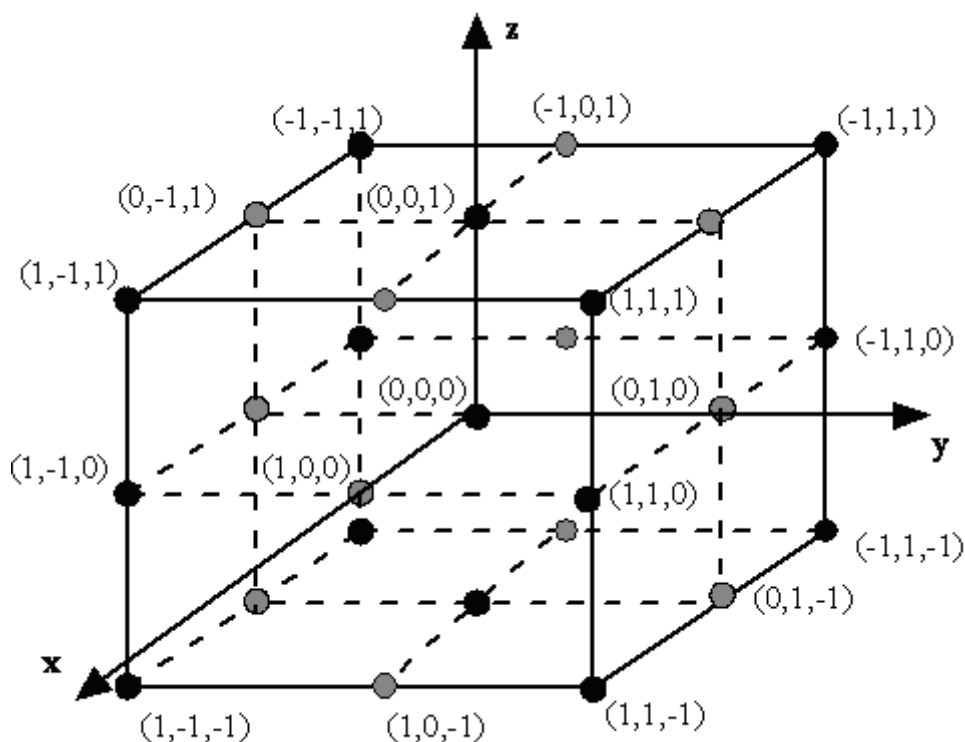
Najpreciznije modelovanje hromatografskih odgovora postiže se kada se direktno modeluju samo jednostavni odgovori, poput retencionog vremena ili retencionog faktora [22, 23]. Iz vrednosti ovih odgovora mogu se naknadno izračunati svi ostali važni hromatografski odgovori, odnosno može se izvršiti indirektno modelovanje kompleksnih hromatografskih odgovora. Kako bi se kreirali matematički modeli maksimalne tačnosti i pouzdanosti, retencioni faktori analiziranih supstanci upotrebljeni su kao jedini odgovori za modelovanje. Za svaki od  $K$  hromatograma i svaku od  $M$  analiziranih supstanci beleženo je retenciono vreme na početku ( $t_B$ ), na vrhu ( $t_A$ ) i na kraju pika ( $t_E$ ). Zatim su izračunati retencioni faktori i širine pikova koji su prikazani u tabeli 14. Svi ostali hromatografski odgovori indirektno su izračunati iz ovih vrednosti.

#### **6. Kreiranje novog matematičkog modela**

Matematičko modelovanje izvršeno je primenom interpolacionog polinoma sa podeljenim razlikama za funkciju tri promenljive. Do sada je u literaturi predstavljena



primena interpolacionog polinoma za funkciju od dve promenljive [69, 70], kao i teorijsko razmatranje generalizacije podeljenih razlika za funkciju više promenljivih [71–74]. Varirajući tri nezavisno promenljive  $x$ ,  $y$  i  $z$  prema eksperimentalnoj matrici  $3^3$  punog faktorskog dizajna dobijeno je 27 tačaka koje se mogu označiti kao  $(x_i, y_j, z_k)$ ,  $i, j, k=0, 1, 2$ , gde je  $x_0 = y_0 = z_0 = -1, x_1 = y_1 = z_1 = 0$  i  $x_2 = y_2 = z_2 = 1$ . Raspored tačaka prikazan je na slici 24.



**Slika 24.** Šematski prikaz izvedenih eksperimenata

Polazeći od polinoma sa podeljenim razlikama za funkciju jedne promenljive, koji je opisan u uvodnom delu disertacije, konstruisan je trodimenzionalni polinom sa podeljenim razlikama.

Konstrukcija modela uključila je sledeće korake:

**Korak 1:** definisanje oblika 3–D interpolacionog polinoma;

**Korak 2:** definisanje podeljenih razlika za funkciju tri promenljive, označene kao 3DD razlike (eng. *3 Divided Differences – 3DD*);

**Korak 3:** definisanje veze između koeficijenata polinoma i 3DD razlika i

**Korak 4:** izračunavanje koeficijenata polinoma

Polazeći od definisane mreže od 27 tačaka i vrednosti funkcije u tim tačkama, potrebno je izvršiti aproksimaciju funkcije  $f = f(x,y,z)$ . U okviru koraka 1 konstruisan je 3–D interpolacioni polinom sledećeg oblika:

$$L_3(x, y, z) = \sum_{\substack{i,j,k \\ i,j,k \in \{0,1,2\} \\ 0 \leq i+j+k \leq 6}} a_{ijk} \prod_{i_1=0}^{i-1} (x - x_{i_1}) \prod_{j_1=0}^{j-1} (y - y_{j_1}) \prod_{k_1=0}^{k-1} (z - z_{k_1}) = \sum_{\substack{i,j,k \\ i,j,k \in \{0,1,2\} \\ 0 \leq i+j+k \leq 6}} a_{ijk} (x - x_0) \dots (x - x_{i-1})(y - y_0) \dots (y - y_{j-1})(z - z_0) \dots (z - z_{k-1}) \quad (75)$$

Veza između koeficijenata  $a_{ijk}$  polinoma (75) izvedena je iz uslova da se vrednost polinoma  $L_3(x, y, z)$  poklapa sa vrednostima funkcije  $f(x, y, z)$  u tačkama datim u trodimenzionalnoj mreži, tj.

$$L_3(x_i, y_j, z_k) = f(x_i, y_j, z_k), \text{ za svako } i, j, k = 0, 1, 2 \quad (76)$$

Iz (75) i (76) dobijena je sledeća zavisnost:

$$a_{ijk} = f[x_0, \dots, x_i; y_0, \dots, y_j; z_0, \dots, z_k], \text{ } i, j, k = 0, 1, 2 \quad (77)$$

Preciznije:

$$a_{000} = f[x_0; y_0; z_0] \quad (78)$$

$$a_{100} = f[x_0, x_1; y_0; z_0] \quad (79)$$

$$a_{010} = f[x_0; y_0, y_1; z_0] \quad (80)$$

$$a_{001} = f[x_0; y_0; z_0, z_1] \quad (81)$$

$$a_{110} = f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0] \quad (82)$$

$$a_{011} = f[x_0; y_0, y_1; z_0, z_1] \quad (83)$$

$$a_{101} = f[x_0, x_1; y_0; z_0, z_1] \quad (84)$$

$$a_{111} = f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0, z_1] \quad (85)$$

$$a_{200} = f[x_0, x_1, x_2; y_0; z_0] \quad (86)$$

$$a_{020} = f[x_0; y_0, y_1, y_2; z_0] \quad (87)$$

$$a_{002} = f[x_0; y_0; z_0, z_1, z_2] \quad (88)$$

$$a_{210} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1; z_0] \quad (89)$$

$$a_{201} = f[x_0, x_1, x_2; y_0; z_0, z_1] \quad (90)$$

$$a_{102} = f[x_0, x_1; y_0; z_0, z_1, z_2] \quad (91)$$

$$a_{012} = f[x_0; y_0, y_1; z_0, z_1, z_2] \quad (92)$$

$$a_{120} = f[x_0, x_1; y_0, y_1, y_2; z_0] \quad (93)$$

$$a_{021} = f[x_0; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1] \quad (94)$$

$$a_{211} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1; z_0, z_1] \quad (95)$$

$$a_{121} = f[x_0, x_1; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1] \quad (96)$$

$$a_{112} = f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0, z_1, z_2] \quad (97)$$

$$a_{220} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1, y_2; z_0] \quad (98)$$

$$a_{022} = f[x_0; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1, z_2] \quad (99)$$

$$a_{202} = f[x_0, x_1, x_2; y_0; z_0, z_1, z_2] \quad (100)$$

$$a_{221} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1] \quad (101)$$

$$a_{212} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1; z_0, z_1, z_2] \quad (102)$$

$$a_{122} = f[x_0, x_1; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1, z_2] \quad (103)$$

$$a_{222} = f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1, y_2; z_0, z_1, z_2] \quad (104)$$

Za konstruisanje 3–D interpolacionog polinoma maksimalnog stepena (75) upotrebljeno je svih 27 jednačina (76) koje daju 27 koeficijenata  $i, j, k$ , koji su izraženi preko podeljenih razlika (77).

Podeljene razlike za funkciju tri promenljive dobijene su generalizacijom jednodimenzionalnog slučaja. Oznake „ $p+q+r$ “ upotrebljene su da označe red 3DD podeljenih razlika po promenljivim  $x, y, z$ , redom, što znači da su upotrebljene tačke mreže koje uključuju različite  $p+1$  vrednosti koordinate  $x$ ,  $q+1$  vrednosti koordinate  $y$  i  $r+1$  vrednosti koordinate  $z$ .

Kao i u jednodimenzionalnom slučaju, 3DD razlike višeg reda definisane su korišćenjem 3DD razlika nižeg reda.

1) 3DD razlike reda 0+0+0 definisane su kao vrednost funkcije u tački:

$$f[x_i; y_j; z_k] = f(x_i, y_j, z_k) \quad (105)$$

2) 3DD razlike reda  $0 \leq p + q + r \leq 3$ , gde je  $0 \leq p, q, r \leq 1$  definisane su kao:

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}] = \frac{1}{x_{i+1}-x_i} \frac{1}{y_{j+1}-y_j} \frac{1}{z_{k+1}-z_k} \sum_{i_1=i}^{i+1} \sum_{j_1=j}^{j+1} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{i_1+1} (-1)^{j_1+1} (-1)^{k_1+1} f(x_{i_1}, y_{j_1}, z_{k_1}) \quad (106)$$

U slučaju da je  $x_i = x_{i+1}$  ( $p=0$ ) ili  $y_j = y_{j+1}$  ( $q=0$ ) ili  $z_k = z_{k+1}$  ( $r=0$ ), odgovarajući razlomak i suma se isključuju iz (2), odnosno:

- za  $p=0$ , razlomak  $\frac{1}{x_{i+1}-x_i} = 1$  i suma  $\sum_{i_1} \dots$  je isključena iz ukupne sume,
- za  $q=0$ , razlomak  $\frac{1}{y_{j+1}-y_j} = 1$  i suma  $\sum_{j_1} \dots$  je isključena iz ukupne sume,
- za  $r=0$ , razlomak  $\frac{1}{z_{k+1}-z_k} = 1$  i suma  $\sum_{k_1} \dots$  je isključena iz ukupne sume.

Na taj način,

$$f[x_1, x_2; y_0; z_0, z_1] = \frac{1}{x_2-x_1} \frac{1}{z_1-z_0} \sum_{i_1=1}^2 \sum_{k_1=0}^1 (-1)^{i_1+1} (-1)^{k_1+1} f(x_{i_1}, y_{j_1}, z_{k_1})$$

3) 3DD razlike reda  $p + q + r = 2$ , gde su  $p, q, r \geq 0$  i  $p = 2 \vee q = 2 \vee r = 2$  definisane su koristeći (106) na sledeći način:

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j; z_k] = \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j; z_k] \quad (107)$$

(za  $p=2, q=0, r=0$ )

$$f[x_i; y_j, y_{j+1}; y_{j+2}; z_k] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k] \quad (108)$$

(za  $p=0, q=2, r=0$ )

$$f[x_i; y_j, y_{j+1}; y_{j+2}; z_k] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k] \quad (109)$$

(za  $p=0, q=0, r=2$ )

Očigledno, 3DD razlike na desnoj strani (107), (108) i (109) izračunavaju se koristeći (106)

Na taj način,

$$\begin{aligned} f[x_0, x_1, x_2; y_1; z_2] &= \\ \frac{1}{x_2-x_0} \sum_{i_1=0}^1 (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_1; z_2] &= \\ \frac{1}{x_2-x_0} (-f[x_0, x_1; y_1; z_2] + f[x_1, x_2; y_1; z_2]) & \end{aligned} \quad (110)$$

4) 3DD razlike reda  $p + q + r = 3$ , gde  $0 \leq p, q, r \leq 2$  i  $p = 0 \vee q = 0 \vee r = 0$  definisane su koristeći (106) na sledeći način:

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}; z_k] = \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j, y_{j+1}; z_k] \quad (111)$$

(za  $p=2, q=1, r=0$ )

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j; z_k, z_{k+1}] = \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j; z_k, z_{k+1}] \quad (112)$$

(za  $p=2, q=0, r=1$ )

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i, x_{i+1}; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k] \quad (113)$$

(za  $p=1, q=2, r=0$ )

$$f[x_i; y_j, y_{j+1}; y_{j+2}; z_k, z_{k+1}] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k, z_{k+1}] \quad (114)$$

(za  $p=0, q=2, r=1$ )

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{z_{k+2}-z_k} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{k_1+1} f[x_i, x_{i+1}; y_j; z_{k_1}, z_{k_1+1}] \quad (115)$$

(za  $p=1, q=0, r=2$ )

$$f[x_i; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{z_{k+2}-z_k} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{k_1+1} f[x_i; y_j, y_{j+1}; z_{k_1}, z_{k_1+1}] \quad (116)$$

(za  $p=0, q=1, r=2$ )

3DD razlike na desnoj strani (111 – 116) izračunate su koristeći (106)

5) 3DD razlike reda  $p + q + r = 4$ , gde  $1 \leq p, q, r \leq 2$  definisane su koristeći (106) na sledeći način:

$$\begin{aligned} f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}] &= \\ \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}] & \end{aligned} \quad (117)$$

(za  $p=2, q=1, r=1$ )

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k, z_{k+1}] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i, x_{i+1}; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k, z_{k+1}] \quad (118)$$

(za  $p=1, q=2, r=1$ )

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{z_{k+2}-z_k} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{k_1+1} f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}; z_{k_1}, z_{k_1+1}] \quad (119)$$

(za  $p=1, q=1, r=2$ )

3DD razlike na desnoj strani (117 – 119) takođe se računaju koristeći (106)

6) 3DD razlike reda  $p + q + r = 4$ , gde  $0 \leq p, q, r \leq 2$  i  $p = 0 \vee q = 0 \vee r = 0$  definisane su koristeći (111) – (116) na sledeći način:

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k] = \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k] \quad (120)$$

(za  $p=2, q=2, r=0$ )

$$f[x_i; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] \quad (121)$$

(za  $p=0, q=2, r=2$ )

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{z_{k+2}-z_k} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{k_1+1} f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j; z_{k_1}, z_{k_1+1}] \quad (122)$$

(za  $p=2, q=0, r=2$ )

3DD razlike na desnoj strani (120 – 122) dobijene su koristeći redom (113), (116) i (112).

7) 3DD razlike reda  $p + q + r = 5$ , gde  $1 \leq p, q, r \leq 2$  i  $p = 1 \vee q = 1 \vee r = 1$  definisane su koristeći (106) na sledeći način:

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k, z_{k+1}] = \frac{1}{x_{i+2}-x_i} \sum_{i_1=i}^{i+1} (-1)^{i_1+1} f[x_{i_1}, x_{i_1+1}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k, z_{k+1}] \quad (123)$$

(za  $p=2, q=2, r=1$ )

$$f[x_i, x_{i+1}; y_j, y_{j+1}, y_{j+2}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{y_{j+2}-y_j} \sum_{j_1=j}^{j+1} (-1)^{j_1+1} f[x_i, x_{i+1}; y_{j_1}, y_{j_1+1}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] \quad (124)$$

(za  $p=1, q=2, r=2$ )

$$f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}; z_k, z_{k+1}, z_{k+2}] = \frac{1}{z_{k+2}-z_k} \sum_{k_1=k}^{k+1} (-1)^{k_1+1} f[x_i, x_{i+1}, x_{i+2}; y_j, y_{j+1}; z_{k_1}, z_{k_1+1}] \quad (125)$$

(za  $p=2, q=1, r=2$ )

3DD razlike na desnoj strani (123 – 125) dobijene su koristeći (118), (119) i (117).

3DD podeljene razlike višeg reda (111 – 125) mogu se dobiti redukcijom na podeljene razlike nižeg reda, ali na drugi način. Ovo je moguće zahvaljujući osobini simetričnosti podeljenih razlika. Konačan rezultat biće isti u slučaju da se različitim redosledom snižavaju podeljene razlike.

Na taj način definisane su 3DD razlike reda:

$$0+0+0: f[x_0; y_0; z_0] = f(x_0, y_0, z_0) \quad (126)$$

$$1+0+0: f[x_0, x_1; y_0; z_0] = \frac{f(x_1, y_0, z_0) - f(x_0, y_0, z_0)}{x_1 - x_0} \quad (127)$$

$$0+1+0: f[x_0; y_0, y_1; z_0] = \frac{f(x_0, y_1, z_0) - f(x_0, y_0, z_0)}{y_1 - y_0} \quad (128)$$

$$0+0+1: f[x_0; y_0; z_0, z_1] = \frac{f(x_0, y_0, z_1) - f(x_0, y_0, z_0)}{z_1 - z_0} \quad (129)$$

$$1+1+0: f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0] = \frac{f[x_1; y_0, y_1; z_0] - f[x_0; y_0, y_1; z_0]}{x_1 - x_0} = \frac{f[x_0, x_1; y_1; z_0, z_1] - f[x_0, x_1; y_0; z_0, z_1]}{y_1 - y_0} \quad (130)$$

$$\begin{aligned} 1+1+1: f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0, z_1] &= \frac{f[x_1; y_0, y_1; z_0, z_1] - f[x_0; y_0, y_1; z_0, z_1]}{x_1 - x_0} = \frac{f[x_0, x_1; y_1; z_0, z_1] - f[x_0, x_1; y_0; z_0, z_1]}{y_1 - y_0} \\ &= \frac{f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_1] - f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0]}{z_1 - z_0} \end{aligned} \quad (131)$$

$$2+0+0: f[x_0, x_1, x_2; y_0; z_0] = \frac{f[x_1, x_2; y_0; z_0] - f[x_0, x_1; y_0; z_0]}{x_2 - x_1} \quad (132)$$

$$\begin{aligned}
2+1+0: f[x_0, x_1, x_2; y_0, y_1; z_0] &= \frac{f[x_0, x_1, x_2; y_1; z_0] - f[x_0, x_1, x_2; y_0; z_0]}{y_2 - y_1} \\
&= \frac{f[x_1, x_2; y_0, y_1; z_0] - f[x_0, x_1; y_0, y_1; z_0]}{x_2 - x_0} \dots
\end{aligned}
\tag{133}$$

Za svaki od odabranih odgovora  $k_1 - k_6$  kreiran je interpolacioni polinom funkcije tri promenljive pomoću 3DD razlika. Kako je selegilin pokazao neretenciono ponašanje isključen je iz dalje studije. Dobijeni modeli za retenciono ponašanje ostalih supstanci prikazani su u tabeli 17.



**Tabela 17.** Koeficijenti polinoma definisanog za posmatrane odgovore

	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$
$a_{000}$	2,02	2,00	2,09	1,89	2,11
$a_{100}$	1,42	2,41	2,54	2,46	2,77
$a_{010}$	-1,40	0,13	0,45	0,65	0,75
$a_{001}$	-0,41	-0,41	-0,43	-0,40	-0,42
$a_{110}$	-1,22	-0,67	0,17	1,19	1,68
$a_{011}$	0,25	-0,31	-0,48	-0,52	-0,58
$a_{101}$	-0,08	-0,38	-0,44	-0,41	-0,43
$a_{111}$	0,20	0,38	0,07	-0,45	-0,84
$a_{200}$	0,12	2,75	3,09	3,47	4,21
$a_{020}$	0,57	-0,09	-0,03	0,16	0,26
$a_{002}$	0,08	0,05	0,07	0,08	0,07
$a_{210}$	0,17	-1,57	-0,07	3,34	5,62
$a_{201}$	-0,33	-1,17	-1,54	-1,50	-1,76
$a_{120}$	0,65	0,18	-0,16	-0,27	-0,29
$a_{021}$	-0,12	0,12	0,12	-0,03	-0,11
$a_{102}$	-0,06	0,05	0,03	0,03	0,02
$a_{012}$	-0,01	0,25	0,30	0,29	0,33
$a_{211}$	0,40	0,68	0,03	-1,59	-2,40
$a_{121}$	-0,20	-0,40	-0,27	-0,11	0,07
$a_{112}$	-0,15	-0,46	-0,38	-0,12	0,09
$a_{221}$	-0,24	-0,11	0,48	1,37	1,41
$a_{212}$	-0,31	-0,01	0,35	1,10	1,36
$a_{122}$	0,19	0,51	0,51	0,38	0,27
$a_{222}$	0,21	-0,18	-0,54	-0,95	-0,73
$a_{220}$	-0,12	0,63	-0,25	-1,74	-2,18
$a_{022}$	-0,01	-0,14	-0,15	-0,06	-0,02
$a_{202}$	0,23	0,42	0,62	0,55	0,64
<b>r</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>RMSE</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

$k_2 - k_6$  retencioni faktori analiziranih supstanci

r – koeficijent korelacije između izračunatih i eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora; RMSE – srednja kvadratna greška

Analizom rezultata tabele 17 može se uočiti da su koeficijenti korelacije između eksperimentalno dobijenih retencionih faktora i teorijskih vrednosti koje predlaže novo matematičko modelovanje jednaki 1,00 za sve ispitivane supstance. To znači da ovakvi modeli opisuju sistem u ispitivanim tačkama sa greškom 0,00 i da će stoga jedina greška u teorijskom predviđanju hromatografskog ponašanja analizirane smeše poticati od eksperimentalne greške. U okviru eksperimentalnog prostora između ispitivanih tačaka, greška će takođe biti minimizirana.

### Funkcija cilja

Funkcija cilja definisana je polazeći od nove funkcije hromatografskog odgovora  $N_{CRF}$ , pri čemu je separacioni kriterijum  $\theta$  zamenjen sa  $k_{i+1}/k_i$  jer je direktno modelovanje vršeno upravo za retencione faktore. Funkcija je označena sa  $N_{CRF(k)}$  i predstavljena je sledećom formulom:

$$N_{CRF(k)} = \left( a^* \left( \alpha_{opt} - \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \frac{k_{i+1}}{k_i}}{N-1} \right) + 1 \right) \left( \frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \quad (134)$$

za  $k_{i+1}/k_i > \alpha_{opt}$ ,  $k_{i+1}/k_i = \alpha_{opt}$  i za  $t_f > t_{opt}$ ,  $t_f = t_{opt}$

gde je  $\alpha_{opt}$  optimalan  $k_{i+1}/k_i$  odnos (tj. optimalan faktor selektivnosti). Funkcija je definisana tako da poboljšanje kvaliteta hromatograma karakteriše smanjenje vrednosti funkcija, a najbolja moguća vrednost je 1.

Za svaki od K eksperimenata  $N_{CRF(k)}$  je izračunata prateći sledeći algoritam:

Izračunati  $k_2$  do  $k_6$  prema dobijenim matematičkim modelima  $k_i = f(x, y, z)$ ;

Rangirati  $k_2$  do  $k_6$ ;

Za  $k_{i+1}/k_i > 1,2$ ,  $k_{i+1}/k_i = 1,2$ ;

$t_f = k_6 * t_0 + t_0$ ;

Za  $t_f < 8$ ,  $t_f = 8$ ;

Izračunati  $N_{CRF(k)}$ .

Niveliranje svih  $k_{i+1}/k_i > 1,2$  na 1,2 izbegava maskiranje loše razdvojenih pikova visokim vrednostima faktora selektivnosti dobro razdvojenih pikova. Optimalno vreme trajanja analize postavljeno je na 8 minuta.

### 7. Identifikacija optimalnih uslova

Identifikacija globalnih optimalnih uslova razdvajanja izvršena je metodologijom pretraživanja čvorova mreže. Gustina mreže je definisana tako da inkrementi za faktore x i z budu 0,25, a za y 0,2 (u kodiranim vrednostima). Stoga, pomak za koncentraciju acetonitrila bio je 1 %, za pH 0,3 pH jedinice, a za molaritet amonijum-acetata 5 mM. Ukupan broj ispitanih eksperimentalnih tačaka bio je:

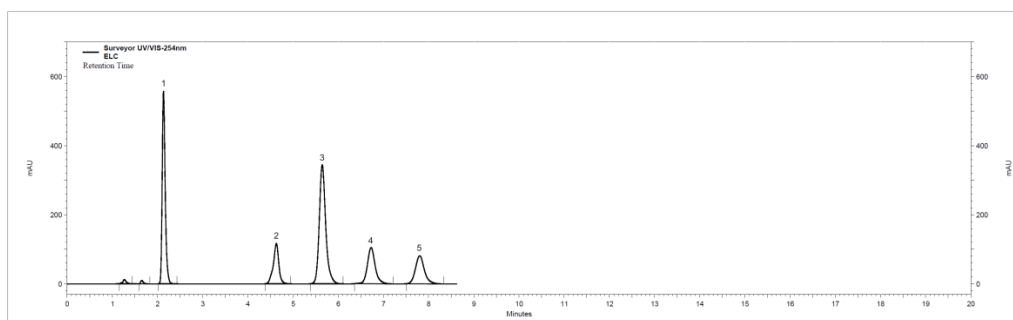
9 nivoa za sadržaj acetonitrila x 11 nivoa za pH vrednost vodene faze x 9 nivoa za koncentraciju amonijum-acetata = 891 tačka.

Za svaku definisanu tačku izračunata je vrednost funkcije cilja. Pronađene su dve optimalne tačke okarakterisane najboljom vrednošću  $N_{CRF(k)}$  ( $N_{CRF(k)} = 1,00$ ) i predstavljene su u tabeli 18.

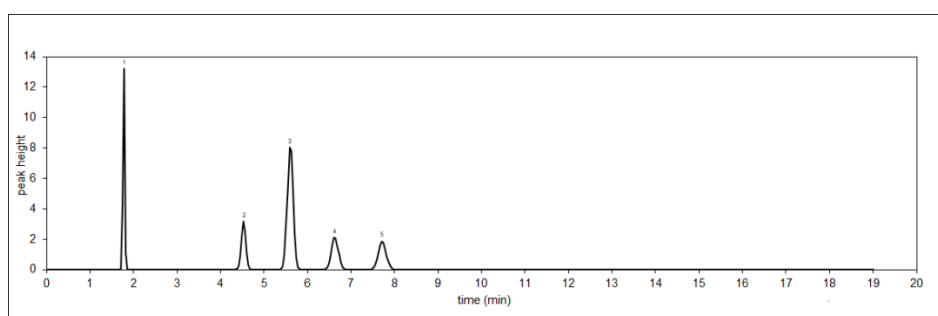
**Tabela 18.** Optimumi identifikovani koristeći novu tehniku matematičkog modelovanja

	$N_{CRF(k)}$	x (ACN)		y (pH)		z (AcNH <sub>4</sub> )	
		Kodirane vrednosti	Stvarne vrednosti	Kodirane vrednosti	Stvarne vrednosti	Kodirane vrednosti	Stvarne vrednosti
<b>Optimalna tačka 1</b>	1	0	90 %	0,4	5,1	1	60 mM
<b>Optimalna tačka 2</b>	1	0	90 %	0,2	4,8	1	60 mM

Dobijene optimalne tačke verifikovane su poređenjem teorijskih i eksperimentalno dobijenih hromatograma (slika 25)

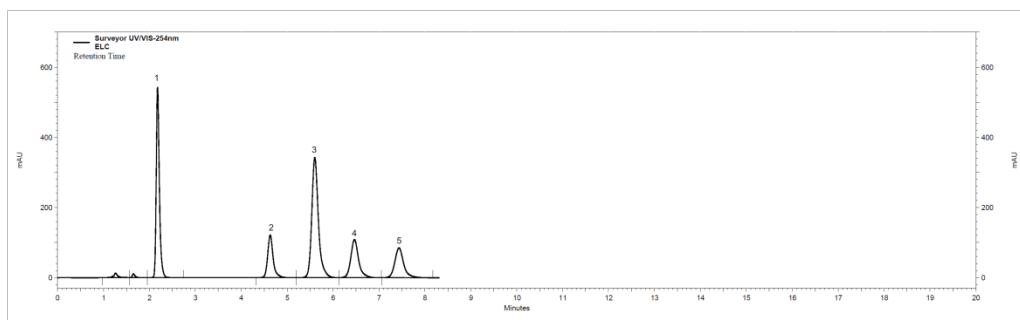


A)

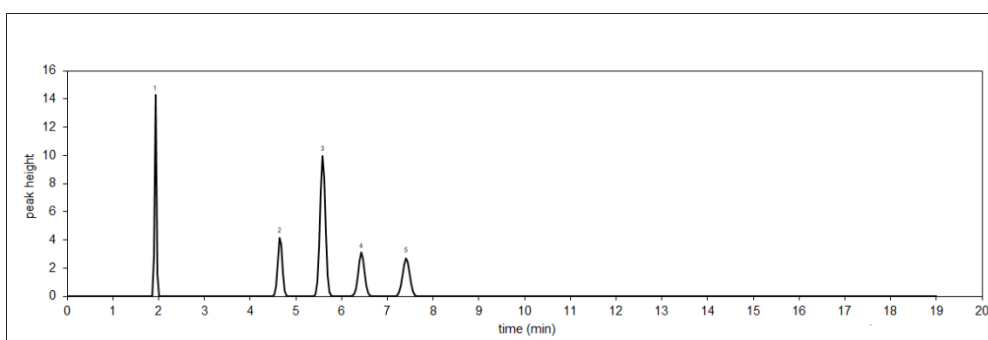


B)

**Slika 25.** A) Eksperimentalno dobijeni hromatogram za definisane optimalne uslove 1 primenom nove tehnike matematičkog modelovanja i B) teorijski hromatogram; redosled eluiranja supstanci na prikazanim hromatogramima je: 1) mianserin, 2) sertralin, 3) moklobemid, 4) fluoksetin i 5) maprotilin



A)



B)

**Slika 26.** A) Eksperimentalno dobijeni hromatogram za definisane optimalne uslove 2 primenom nove tehnike matematičkog modelovanja i B) teorijski hromatogram; redosled eluiranja supstanci na prikazanim hromatogramima je: 1) mianserin, 2) sertralin, 3) moklobemid, 4) fluoksetin i 5) maprotilin

Veliko slaganje između teorijskih i eksperimentalno dobijenih hromatograma potvrđuje da je predloženi matematički model uspeo adekvatno da opiše sistem. Sve prisutne supstance dobro su razdvojene u okviru minimalnog vremena trajanja analize.

*Poređenje nove tehnike matematičkog modelovanja sa modelovanjem pomoću kvadratne funkcije*

Kako bi se istakle prednosti nove tehnike matematičkog modelovanja, identična metodologija eksperimentalnog dizajna primenjena je koristeći modelovanje retencionih faktora pomoću kvadratne forme dobijene višestrukom linearnom regresijom i metodom najmanjih kvadrata. Dobijeni koeficijenti kvadratnog modela za odgovore  $k_2 - k_6$  prikazani su u tabeli 19.

**Tabela 19.** Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za posmatrane odgovore

	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$
<b>Odsečak</b>	0,83	2,86	3,69	4,24	4,85
<b>x</b>	0,72	2,77	4,12	6,80	9,39
<b>x<sup>2</sup></b>	0,12	1,15	2,03	4,16	6,16
<b>y</b>	-1,16	-0,89	0,11	1,95	3,29
<b>y<sup>2</sup></b>	0,86	0,25	-0,21	-0,68	-0,76
<b>z</b>	-0,29	-0,97	-1,51	-2,15	-2,77
<b>z<sup>2</sup></b>	-0,01	0,24	0,63	1,17	1,66
<b>xy</b>	-0,40	-0,97	-0,03	2,03	3,72
<b>xz</b>	-0,13	-0,62	-1,14	-1,92	-2,65
<b>yz</b>	0,19	0,19	-0,07	-0,65	-1,05
<b>r</b>	0,986	0,987	0,994	0,986	0,983
<b>RMSE</b>	0,209	0,433	0,417	1,112	1,798

x – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); y – pH vrednost mobilne faze;

z – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM)

r – koeficijent korelacije između izračunatih i eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora

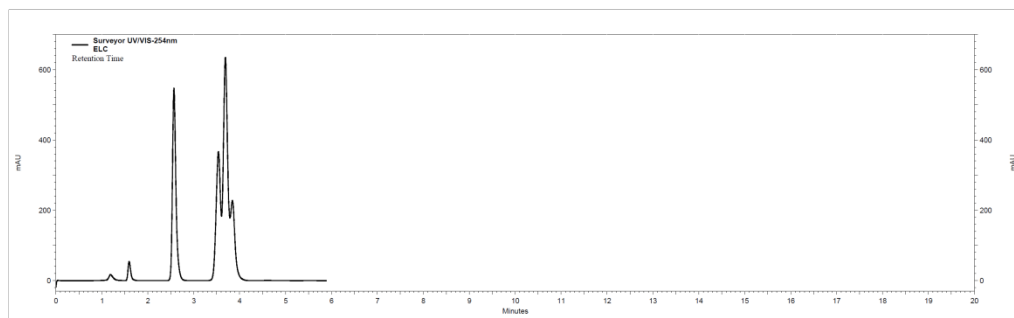
RMSE – srednja kvadratna greška

Izračunate su vrednosti funkcije cilja. Identifikacija optimalnih uslova razdvajanja izvršena je pretragom čvorova mreže pri čemu je gustina mreže podešena na identičan način kao u prethodnom poglavlju. Identifikovane optimalne tačke sa vrednošću  $N_{CRF(k)}$  od 1,00 prikazane su u tabeli 20.

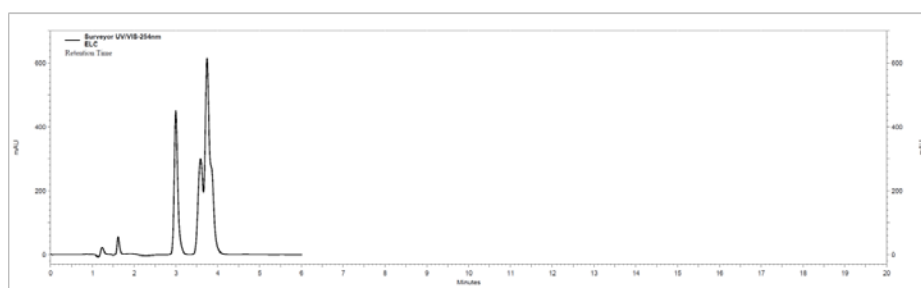
**Tabela 20.** Optimumi identifikovani koristeći standardno modelovanje kvadratnom funkcijom

	$N_{CRF(k)}$	<b>x (ACN)</b>		<b>y (pH)</b>		<b>z (AcNH<sub>4</sub>)</b>	
		<b>Kodirane vrednosti</b>	<b>Stvarne vrednosti</b>	<b>Kodirane vrednosti</b>	<b>Kodirane vrednosti</b>	<b>Stvarne vrednosti</b>	<b>Kodirane vrednosti</b>
<b>Optimalna tačka 1</b>	1	- 1	86 %	- 0,2	4,2	0,75	55 mM
<b>Optimalna tačka 2</b>	1	- 1	86 %	- 0,4	3,9	0,75	55 mM

Odgovarajući hromatogrami pod optimalnim uslovima prikazani su na slici 27.



A)



B)

**Slika 27.** Eksperimentalno dobijeni hromatogram za definisane A) optimalne uslove 1 i B) optimalne uslove 2 primenom standardnog modelovanja kvadratnom funkcijom

Analizirajući slike 27 A i 27 B može se primetiti da je pronađeno ekstremno suboptimalno rešenje. Dobijeni hromatogrami sadrže više preklopljenih pikova i identifikovani optimalni uslovi potpuno su neprihvatljivi. Posmatrajući dobijene vrednosti koeficijenta korelacije  $r$  za pojedinačne  $k_2 - k_6$  modele i RMSE vrednosti (tabela 19) može se uočiti da je kombinacijom  $k_2 - k_6$  vrednosti u okviru funkcije cilja došlo do akumulacije greške. Ukupna greška koja nastaje bila je dovoljno velika da onemogući adekvatnu pretragu eksperimentalnog prostora i stoga su identifikovani „lažni“ optimumi.



S druge strane, novi pristup matematičkom modelovanju pomoću interpolacionog polinoma sa podeljenim razlikama uspeo je da omogući tačan opis složenog hromatografskog sistema (koeficijent korelacije bio je 1,000 za svaki modelovan odgovor) i u kombinaciji sa indirektnim modelovanjem hromatografskih odgovora i novom funkcijom cilja vodio je lociranju pravih optimuma.

#### **7.4. SKRINING ROBUSNOSTI METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE PRIMENOM KRITERIJUMA ZA PROCENU ROBUSNOSTI**

Različite funkcije i složeni kriterijumi omogućavaju procenu robusnosti metode u ranoj fazi razvoja i optimizacije. Na taj način, skriningom robusnosti može se ukazati na postojanje očigledno nerobusnih eksperimentalnih uslova koje je neophodno modifikovati, jer će u suprotnom, cela eksperimentalna procedura u okviru validacije biti bespotrebna. U ovoj disertaciji procena robusnosti identifikovanih optimuma za tri analizirane smeše (smeša raloksifena i njegovih nečistoća, smeša agonista i antagonista beta receptora i smeša antidepresiva) vršena je Vanbelovim kriterijumima za procenu parcijalne i totalne robusnosti [32]. Metodologija eksperimentalnog dizajna koja je primenjena za razvoj ovih metoda (opisana u poglavljima 7.1.2., 7.1.3. i 7.2.) omogućila je uspostavljanje funkcionalne zavisnosti predstavljene polinomom drugog stepena između faktora posmatranih u toku optimizacije i dobijenih odgovora. Za svaki analizirani faktor, čiji uticaj na robusnost optimuma želi da se ispita, moguće je definisati parcijalni izvod funkcije odgovora po tom faktoru. Nakon toga, uzimajući u obzir očekivano eksperimentalno variranje faktora, može se izračunati kriterijum parcijalne robusnosti koji govori o uticaju individualne promene jednog faktora na odgovor. Na kraju, sumiranjem parcijalnih robusnih kriterijuma izračunava se totalni robusni kriterijum koji pokazuje sveobuhvatnu otpornost identifikovanog optimuma na variranja eksperimentalnih faktora koja se mogu očekivati u toku rutinske primene metode.

#### 7.4.1. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE RALOKSIFENA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Skrining robusnosti RP–LC metode za određivanje raloksifena i njegovih nečistoća izvršen primenom Vanbelovih robusnih kriterijuma sledeći strategiju definisanu u poglavlju 3.1. ove disertacije.

##### **1. Odabir faktora uključenih u optimizaciju čiji se uticaj na robusnost optimuma ispituje**

U okviru optimizacije metode za analizu raloksifena i njegovih nečistoća ispitivan je uticaj četiri faktora na hromatografsko razdvajanje smeše. Robusnost identifikovanog optimuma ispitivana je u pogledu osetljivosti na variranje sledeća četiri faktora:

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi

$x_2$  – pH vrednost mobilne faze

$x_3$  – molaritet SDS–a u vodenoj fazi

$x_4$  – temperatura kolone

##### **2. Definisane optimalne vrednosti odabranih faktora**

Optimalne vrednosti faktora definisane u fazi optimizacije bile su:

$x_1 = 47 \%$

$x_2 = 2,5$  pH jedinica

$x_3 = 4$  mM

$x_4 = 35$  °C

##### **3. Odabir odgovora čija se robusnost ispituje**

Kao odgovori koji se prate odabrani su retencioni faktori raloksifena i njegovih nečistoća ( $k_1 - k_5$ ) koji su prikazani u tabeli 8 (poglavlje 7.1.2), a izračunati faktori selektivnosti za susedne pikove ( $\alpha_{1,2} - \alpha_{4,5}$ ) prikazani su u tabeli 21.

**Tabela 21.** Dobijeni rezultati za faktore selektivnosti

<b>Eksp.</b>	<b><math>\alpha_{1,2}</math></b>	<b><math>\alpha_{2,3}</math></b>	<b><math>\alpha_{3,4}</math></b>	<b><math>\alpha_{4,5}</math></b>
<b>1</b>	1,18	3,08	1,22	3,24
<b>2</b>	1,14	2,45	1,34	2,45
<b>3</b>	1,41	3,11	1,01	3,98
<b>4</b>	1,34	2,46	1,13	2,91
<b>5</b>	1,33	3,23	1,01	3,95
<b>6</b>	1,23	2,53	1,18	2,80
<b>7</b>	1,49	2,94	1,11	4,00
<b>8</b>	1,38	2,58	1,07	3,06
<b>9</b>	1,27	2,85	1,12	3,25
<b>10</b>	1,25	2,25	1,21	2,50
<b>11</b>	1,53	2,68	1,06	3,69
<b>12</b>	1,43	2,31	1,05	2,88
<b>13</b>	1,44	2,85	1,07	3,74
<b>14</b>	1,30	2,36	1,10	2,78
<b>15</b>	1,54	2,62	1,12	3,68
<b>16</b>	1,44	2,34	1,02	3,01
<b>17</b>	1,42	3,20	1,08	4,09
<b>18</b>	1,31	2,17	1,16	2,53
<b>19</b>	1,04	2,79	1,31	2,66
<b>20</b>	1,35	2,97	1,00	3,49
<b>21</b>	1,29	2,56	1,18	2,91
<b>22</b>	1,40	2,17	1,07	2,67
<b>23</b>	1,31	2,95	1,10	3,49
<b>24</b>	1,42	2,44	1,02	3,16
<b>25</b>	1,39	2,75	1,03	3,40
<b>26</b>	1,40	2,65	1,06	3,35
<b>27</b>	1,34	2,62	1,10	3,16
<b>28</b>	1,36	2,64	1,07	3,28
<b>29</b>	1,34	2,62	1,10	3,18
<b>30</b>	1,32	2,67	1,09	3,20

$\alpha_{1,2}$  – faktor selektivnosti za nečistoću 1 i nečistoću 2;  $\alpha_{2,3}$  – faktor selektivnosti za nečistoću 2 i raloksifen;  $\alpha_{3,4}$  – faktor selektivnosti za raloksifen i nečistoću 3;  $\alpha_{4,5}$  – faktor selektivnosti za nečistoću 3 i nečistoću 4

#### 4. Kreiranje kvadratnih matematičkih modela koji opisuju odgovore u zavisnosti od ispitivanih faktora

Primenom višestruke regresije i metode najmanjih kvadrata definisani su kvadratni matematički modeli koji predstavljaju zavisnost odabranih odgovora od ispitivanih faktora. Koeficijenti kvadratnih modela za stvarne vrednosti faktora predstavljeni su u tabeli 22.

**Tabela 22.** Matematički modeli za odabrane odgovore

	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{4,5}$
<b>Odsečak</b>	38,18	49,45	278,15	306,80	1633,60	1,23	27,35	1,19	26,95
$x_1$	-1,35	-2,29	-11,03	-12,17	-68,64	-0,16	-0,64	-0,06	-1,06
$x_2$	0,92	6,28	9,52	8,22	69,16	1,55	-3,14	0,15	1,93
$x_3$	0,80	2,54	7,91	6,28	46,65	0,49	0,30	-0,10	2,17
$x_4$	-0,31	-0,32	-1,96	-1,57	-9,59	0,02	-0,20	0,08	-0,25
$x_1x_2$	-0,02	-0,07	-0,06	-0,21	-1,04	-0,01	0,05	-0,03	0,01
$x_1x_3$	0,00	-0,03	-0,04	-0,08	-0,51	-0,01	0,01	-0,01	-0,01
$x_1x_4$	0,01	0,01	0,04	0,02	0,17	0,00	0,00	0,00	0,01
$x_2x_3$	-0,02	-0,13	-0,54	0,13	-1,56	-0,04	-0,05	0,08	-0,19
$x_2x_4$	-0,01	-0,02	-0,07	-0,04	-0,34	0,00	0,00	0,01	-0,01
$x_3x_4$	0,00	-0,01	-0,02	0,00	-0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
$x_1^2$	0,01	0,02	0,10	0,13	0,70	0,00	0,00	0,00	0,01
$x_2^2$	0,01	-0,29	-0,16	0,31	-0,04	-0,14	0,23	0,08	-0,11
$x_3^2$	-0,06	-0,08	-0,39	-0,32	-1,69	0,00	-0,07	0,01	-0,10
$x_4^2$	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost mobilne faze;

$x_3$  – koncentracija SDS-a u vodenoj fazi (Mm);  $x_4$  – temperatura kolone (°C);

$k_1$  – retencioni faktor nečistoće 1;  $k_2$  – retencioni faktor nečistoće 2;  $k_3$  – retencioni

faktor raloksifena;  $k_4$  – retencioni faktor nečistoće 3;  $k_5$  – retencioni faktor nečistoće 4;

$\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove kao što je navedeno u tabeli 21

## **5. Izračunavanje robusnog kriterijuma i tumačenje rezultata**

Sledeći Vanbelovu strategiju izračunati su parcijalni izvodi funkcija odgovora po analiziranim faktorima. Parcijalna robusnost odgovora merena je parcijalnim robusnim kriterijumom uzimajući u obzir očekivana eksperimentalna variranja faktora. Zatim je izračunata totalna robusnost.

Odgovor  $k_1$

$$dk_1/dx_1 = -1,232 + 0,025x_1$$

$$dk_1/dx_2 = -0,167 - 0,028x_2$$

$$dk_1/dx_3 = 0,560 - 1,126x_3$$

$$dk_1/dx_4 = -0,088 + 0,002x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,073, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = -0,097, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,054, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = -0,009, \Delta f = 1$$

$$Ru = -0,047$$

Odgovor  $k_2$

$$dk_2/dx_1 = -2,377 + 0,049x_1$$

$$dk_2/dx_2 = 2,000 - 0,583x_2$$

$$dk_2/dx_3 = 0,779 - 0,163x_3$$

$$dk_2/dx_4 = -0,128 + 0,004x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,076, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = 0,542, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,129, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = 0,018, \Delta f = 1$$

$$Ru = 0,180$$

Odgovor  $k_3$

$$dk_3/dx_1 = -10,07 + 0,205x_1$$

$$dk_3/dx_2 = 1,908 - 0,322x_2$$

$$dk_3/dx_3 = 3,960 - 0,789x_3$$

$$dk_3/dx_4 = -0,489 + 0,015x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,445, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = 1,103, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,804, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = 0,004, \Delta f = 1$$

$$Ru = 0,620$$

Odgovor  $k_4$

$$dk_4/dx_1 = -12,22 + 0,253x_1$$

$$dk_4/dx_2 = -2,353 + 0,617x_2$$

$$dk_4/dx_3 = 2,678 - 0,638x_3$$

$$dk_4/dx_4 = -0,579 + 0,015x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,322, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = -0,811, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,128, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = -0,060, \Delta f = 1$$

$$Ru = -0,417$$

Odgovor  $k_5$

$$dk_5/dx_1 = 67,23 + 1,407x_1$$

$$dk_5/dx_2 = 2,056 - 0,079x_2$$

$$dk_5/dx_3 = 16,267 - 3,372x_3$$

$$dk_5/dx_4 = 2,595 + 0,079x_4$$

$$Ru(x_1) = -1,106, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = 1,860, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 2,779, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = 0,186, \Delta f = 1$$

$$Ru = 2,230$$

Odgovor  $\alpha_{1,2}$

$$d\alpha_{1,2}/dx_1 = -0,219 + 0,005x_1$$

$$d\alpha_{1,2}/dx_2 = 1,006 - 0,272x_2$$

$$d\alpha_{1,2}/dx_3 = 0,001 + 0,006x_3$$

$$d\alpha_{1,2}/dx_4 = -0,009 + 0,001x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,001, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = 0,325, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,027, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = 0,013, \Delta f = 1$$

$$Ru = 0,104$$

Odgovor  $\alpha_{2,3}$

$$d\alpha_{2,3}/dx_1 = -0,334 + 0,004x_1$$

$$d\alpha_{2,3}/dx_2 = -1,265 + 0,458x_2$$

$$d\alpha_{2,3}/dx_3 = 0,731 - 0,142x_3$$

$$d\alpha_{2,3}/dx_4 = -0,042 + 0,001x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,137, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = -0,121, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,164, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = -0,011, \Delta f = 1$$

$$Ru = -0,008$$

Odgovor  $\alpha_{3,4}$

$$d\alpha_{3,4}/dx_1 = -0,238 + 0,006x_1$$

$$d\alpha_{3,4}/dx_2 = -0,708 + 0,164x_2$$

$$d\alpha_{3,4}/dx_3 = -0,206 + 0,027x_3$$

$$d\alpha_{3,4}/dx_4 = -0,003 + 0,000x_4$$

$$Ru(x_1) = 0,034, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = -0,299, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = -0,098, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = -0,015, \Delta f = 1$$

$$Ru = -0,138$$



Odgovor  $\alpha_{4,5}$

$$d\alpha_{4,5}/dx_1 = -0,911 + 0,016x_1$$

$$d\alpha_{4,5}/dx_2 = 1,147 - 0,215x_2$$

$$d\alpha_{4,5}/dx_3 = 1,103 - 0,195x_3$$

$$d\alpha_{4,5}/dx_4 = -0,080 + 0,003x_4$$

$$Ru(x_1) = -0,156, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_2) = 0,609, \Delta f = 0,2$$

$$Ru(x_3) = 0,325, \Delta f = 1$$

$$Ru(x_4) = 0,021, \Delta f = 1$$

$$Ru = 0,311$$

Vrednosti odabranih hromatografskih odgovora pri optimalnim uslovima iznosile su:  
 $k_1 = 2,000$ ;  $k_2 = 2,500$ ;  $k_3 = 5,633$ ;  $k_4 = 6,833$ ;  $k_5 = 17,100$ ;  $\alpha_{1,2} = 1,250$ ;  $\alpha_{2,3} = 2,253$ ;  
 $\alpha_{3,4} = 1,213$ ;  $\alpha_{4,5} = 2,502$

Analizom dobijenih rezultata za parcijalne robusne kriterijume može se zaključiti u kojoj meri na vrednosti odabranih odgovora utiče variranje ispitivanih faktora. Uočava se da temperatura kolone, kao pojedinačni faktor, najmanje utiče na nestabilnost odgovora jer su brožane vrednosti odgovarajućih parcijalnih robusnih kriterijuma za ovaj faktor najmanje.

S druge strane, vrednosti totalnog robusnog kriterijuma pokazuju koliko su odgovori osetljivi na istovremenu promenu svih ispitivanih faktora. U okviru ispitivanih odgovora u ovom primeru, retencioni faktori  $k_3$  ( $R_u = 0,620$ ) i  $k_5$  ( $R_u = 2,230$ ) najosetljiviji na promene eksperimentalnih faktora, odnosno, najmanje su robusni. Retencioni faktori  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_4$  okarakterisani su manjim vrednostima totalnog robusnog kriterijuma. Međutim, retencioni faktori sami po sebi govore samo o položaju pikova, a ne o kvalitetu hromatografskog razdvajanja. Stoga, procena robusnosti faktora selektivnosti je od većeg značaja. Dobijeni totalni robusni kriterijumi za date vrednosti faktora selektivnosti pod optimalnim uslovima pokazuju da će, u najgorem slučaju, variranja eksperimentalnih faktora promene faktora selektivnosti dovesti do sledećih korigovanih vrednosti:

$$\alpha_{1,2} \text{ korigovano} = 1,250 + 0,104 = 1,354$$

$$\alpha_{2,3} \text{ korigovano} = 2,253 - 0,008 = 2,245$$

$$\alpha_{3,4} \text{ korigovano} = 1,213 - 0,138 = 1,075$$

$$\alpha_{4,5} \text{ korigovano} = 2,502 + 0,311 = 2,813$$

Dobijene korigovane vrednosti faktora selektivnosti za  $\alpha_{1,2}$ ,  $\alpha_{2,3}$ ,  $\alpha_{4,5}$  su zadovoljavajuće i može se zaključiti da će razdvajanje odgovarajućih pikova biti zadovoljavajuće i pri ekstremnom variranju eksperimentalnih uslova. S druge strane, može se uočiti da dobijena korigovana vrednost za  $\alpha_{3,4}$  iznosi svega 1,075 što ukazuje da je potrebno obratiti posebnu pažnju na održanje ovog odgovora u prihvatljivim granicama. Analizom vrednosti parcijalnih robusnosti ovog odgovora primećuje se da faktori  $x_2$  i  $x_3$  najviše utiču na njegovu nestabilnost. Stoga se može zaključiti da je potrebno posvetiti posebnu pažnju podešavanju pH vrednosti i molariteta SDS-a kako bi se ovaj odgovor očuvao na zadovoljavajućem nivou.

#### 7.4.2. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA

Skrining robusnosti HILIC metode za određivanje smeše agonista i antagonista beta receptora izvršen je koristeći podatke dobijene u fazi optimizacije primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Vanbelovi robusni kriterijumi izračunati su sledeći strategiju definisanu u poglavlju 3.1. ove disertacije.

##### **1. Odabir faktora uključenih u optimizaciju čiji se uticaj na robusnost optimuma ispituje**

Skrining robusnosti postavljene HILIC metode za određivanje smeše beta agonista i antagonista izvršen je analizirajući sledeća tri faktora koja su razmatrana u toku optimizacije:

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi

$x_2$  – pH vrednost vodene faze

$x_3$  – molaritet amonijum-acetata u vodenoj fazi

##### **2. Definisavanje optimalnih vrednosti odabranih faktora**

Optimalne vrednosti odabranih faktora koje su identifikovane iznosile su:

$x_1 = 85 \%$

$x_2 = 5,1$  pH jedinica

$x_3 = 40$  mM

##### **3. Odabir odgovora čija se robusnost ispituje**

Retencioni faktori analiziranih supstanci ( $k_1 - k_5$ ) i faktori selektivnosti za susedne pikove ( $\alpha_{1,2} - \alpha_{4,5}$ ) odabrani su kao odgovori sistema i predstavljeni su u tabelama 11 (poglavlje 7.1.3) i 23.

**Tabela 23.** Dobijeni rezultati za faktore selektivnosti

<b>Eksp.</b>	<b><math>\alpha_{1,2}</math></b>	<b><math>\alpha_{2,3}</math></b>	<b><math>\alpha_{3,4}</math></b>	<b><math>\alpha_{4,5}</math></b>
<b>1</b>	1,05	1,31	1,21	1,43
<b>2</b>	1,17	1,27	1,22	1,66
<b>3</b>	1,54	1,41	3,18	1,44
<b>4</b>	1,66	1,34	1,37	1,62
<b>5</b>	1,09	1,40	1,28	1,49
<b>6</b>	1,14	1,31	1,28	1,62
<b>7</b>	1,21	1,45	1,57	1,45
<b>8</b>	1,52	1,37	1,55	1,71
<b>9</b>	1,09	1,44	1,28	1,45
<b>10</b>	1,26	1,33	1,61	1,71
<b>11</b>	1,11	1,29	1,20	1,49
<b>12</b>	1,42	1,50	1,38	1,50
<b>13</b>	1,07	1,27	1,20	1,39
<b>14</b>	1,11	1,42	1,37	1,54
<b>15</b>	1,17	1,35	1,30	1,55
<b>16</b>	1,16	1,35	1,30	1,54
<b>17</b>	1,16	1,35	1,30	1,54
<b>18</b>	1,18	1,35	1,32	1,58

$\alpha_{1,2}$  – faktor selektivnosti za fenoterol i propranolol;  $\alpha_{2,3}$  – faktor selektivnosti za propranolol i salbutamol;  $\alpha_{3,4}$  – faktor selektivnosti za salbutamol i metoprolol;  $\alpha_{4,5}$  – faktor selektivnosti za metoprolol i atenolol

#### 4. Kreiranje kvadratnih matematičkih modela koji opisuju odgovore u zavisnosti od ispitivanih faktora

Primenom višestruke linearne regresije u fazi optimizacije definisani su polinomi drugog stepena koji opisuju matematičku zavisnost odabranih odgovora od ispitivanih faktora. Koeficijenti modela za stvarne vrednosti faktora prikazani su u tabeli 24.

**Tabela 24.** Matematički modeli za odabrane odgovore

	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{4,5}$
<b>Odsečak</b>	242,02	347,64	466,88	801,74	1409,17	11,08	3,84	20,78	5,93
$x_1$	-6,06	-8,47	-11,32	-19,25	-33,79	-0,21	-0,06	-0,59	-0,12
$x_2$	0,25	-4,61	-6,93	-12,09	-21,30	-0,81	0,01	4,10	-0,11
$x_3$	0,16	0,30	0,38	0,45	0,73	0,00	0,01	-0,16	0,01
$x_1x_2$	0,02	0,08	0,11	0,19	0,32	0,01	0,00	-0,05	0,00
$x_1x_3$	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
$x_2x_3$	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00
$x_1^2$	0,04	0,05	0,07	0,12	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
$x_2^2$	-0,20	-0,12	-0,13	-0,26	-0,48	0,06	0,01	0,05	-0,01
$x_3^2$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost vodene faze;  $x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (Mm);  $k_1$  – retencioni faktor fenoterola;  $k_2$  – retencioni faktor propranolola;  $k_3$  – retencioni faktor salbutamola;  $k_4$  – retencioni faktor metoprolola;  $k_5$  – retencioni faktor atenolola;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove

#### 5. Izračunavanje robusnog kriterijuma i tumačenje rezultata

Za svaki od odabranih odgovora određeno je dozvoljeno eksperimentalno variranje faktora, a zatim su izračunate vrednosti parcijalnog i totalnog robusnog kriterijuma.

Odgovor  $k_1$

$$dk_1/dx_1 = -6,076 + 0,075x_1 \quad dk_1/dx_2 = 1,922 - 0,395x_2 \quad dk_1/dx_3 = -0,050 + 0,001x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,324, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,090, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,050, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,056$$

Odgovor  $k_2$

$$dk_2/dx_1 = -8,245 + 0,102x_1 \quad dk_2/dx_2 = 1,573 - 0,246x_2 \quad dk_2/dx_3 = -0,065 + 0,001x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,465, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,321, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,065, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,056$$

Odgovor  $k_3$

$$dk_3/dx_1 = -10,97 + 0,136x_1 \quad dk_3/dx_2 = 1,858 - 0,252x_2 \quad dk_3/dx_3 = -0,075 + 0,001x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,617, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,570, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,075, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,206$$

Odgovor  $k_4$

$$dk_4/dx_1 = -18,53 + 0,229x_1 \quad dk_4/dx_2 = 3,509 - 0,515x_2 \quad dk_4/dx_3 = -0,051 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,957, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,882, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,051, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,879$$

Odgovor  $k_5$

$$dk_5/dx_1 = -32,49 + 0,402x_1 \quad dk_5/dx_2 = 6,237 - 0,964x_2 \quad dk_5/dx_3 = -0,031 + 0,001x_3$$

$$Ru(x_1) = 1,650, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 1,320, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,031, \Delta f = 5$$

$$Ru = 1,760$$

Odgovor  $\alpha_{1,2}$

$$d\alpha_{1,2}/dx_1 = -0,173 + 0,002x_1 \quad d\alpha_{1,2}/dx_2 = -0,390 + 0,119x_2 \quad d\alpha_{1,2}/dx_3 = -0,003 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,017, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,218, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,003, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,044$$

Odgovor  $\alpha_{2,3}$

$$d\alpha_{2,3}/dx_1 = -0,066 + 0,001x_1 \quad d\alpha_{2,3}/dx_2 = -0,045 + 0,020x_2 \quad d\alpha_{2,3}/dx_3 = 0,003 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = -0,007, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,058, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = 0,003, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,019$$

Odgovor  $\alpha_{3,4}$

$$d\alpha_{3,4}/dx_1 = -0,738 + 0,008x_1 \quad d\alpha_{3,4}/dx_2 = -0,207 + 0,095x_2 \quad d\alpha_{3,4}/dx_3 = -0,019 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = -0,046, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,276, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,019, \Delta f = 5$$

$$Ru = -0,084$$

Odgovor  $\alpha_{4,5}$

$$d\alpha_{4,5}/dx_1 = -0,109 + 0,002x_1 \quad d\alpha_{4,5}/dx_2 = 0,094 - 0,020x_2 \quad d\alpha_{4,5}/dx_3 = 0,006 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,019, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,010, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = 0,006, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,047$$



Vrednosti odabranih hromatografskih odgovora pri optimalnim uslovima iznosile su:  
 $k_1 = 1,358$ ;  $k_2 = 1,788$ ;  $k_3 = 2,484$ ;  $k_4 = 3,399$ ;  $k_5 = 5,292$ ;  $\alpha_{1,2} = 1,317$ ;  $\alpha_{2,3} = 1,389$ ;  
 $\alpha_{3,4} = 1,369$ ;  $\alpha_{4,5} = 1,557$

Analizom dobijenih rezultata može se primetiti da promena koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi veoma slabo utiče na većinu odgovora. Koncentracija acetonitrila i pH vrednost vodene faze imali su snažniji uticaj, međutim ni oni uglavnom nisu doveli do značajnijih promena odgovora, osim kada je reč o retencionim faktorima  $k_4$  i  $k_5$ .

Ru vrednosti dobijene za ova dva odgovora (0,879 za  $k_4$  i 1,760 za  $k_5$ ) ukazuju na potencijalno značajna variranja njihovih vrednosti u toku rutinske primene metode. Međutim, ova variranja dovode do pomeranja retencionog vremena obe supstance u istom smeru usled čega se neće narušiti kvalitet separacije, što se može uočiti i iz vrednosti totalnog robusnog kriterijuma za faktor selektivnosti između ove dve supstance (Ru za  $\alpha_{4,5}$  iznosi 0,047). Retencioni faktori  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  okarakterisani su nižim vrednostima totalnog robusnog kriterijuma.

Za procenu kvaliteta separacije pri ekstremnom variranju eksperimentalnih faktora izračunate su vrednosti faktora selektivnosti korigovane za dobijene vrednosti ukupnog robusnog kriterijuma:

$$\alpha_{1,2} \text{ korigovano} = 1,317 + 0,044 = 1,361$$

$$\alpha_{2,3} \text{ korigovano} = 1,389 - 0,019 = 1,408$$

$$\alpha_{3,4} \text{ korigovano} = 1,369 - 0,084 = 1,285$$

$$\alpha_{4,5} \text{ korigovano} = 1,557 + 0,047 = 1,604$$

Dobijene korigovane vrednosti za sve faktore selektivnosti su zadovoljavajuće i može se zaključiti da će razdvajanje supstanci verovatno ostati očuvano i pri ekstremnom variranju eksperimentalnih uslova.

#### 7.4.3. SKRINING ROBUSNOSTI METODE ZA ODREĐIVANJE SMEŠE ANTIDEPRESIVA

Skrining robusnosti HILIC metode za određivanje smeše antidepresiva izvršen je koristeći podatke dobijene u fazi optimizacije primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Vanbelovi robusni kriterijumi izračunati su sledeći strategiju definisanu u poglavlju 3.1. ove disertacije.

##### **1. Odabir faktora uključenih u optimizaciju čiji se uticaj na robusnost optimuma ispituje**

Kao i u prethodnim ispitivanjima, u ispitivanju robusnosti smeše antidepresiva svi faktori analizirani u fazi optimizacije uključeni su u skrining robusnosti:

$x_1$  – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi

$x_2$  – pH vrednost vodene faze

$x_3$  – molaritet amonijum-acetata u vodenoj fazi

##### **2. Definisane optimalne vrednosti odabranih faktora**

Optimalne vrednosti faktora identifikovane metodologijom eksperimentalnog dizajna iznosile su:

$x_1 = 86 \%$

$x_2 = 6,0$  pH jedinica

$x_3 = 20$  mM

##### **3. Odabir odgovora čija se robusnost ispituje**

Odabrani odgovori sistema bili su retencioni faktori analiziranih supstanci ( $k_2 - k_6$ ) i faktori selektivnosti za susedne pikove ( $\alpha_{2,3} - \alpha_{5,6}$ ) i predstavljeni su u tabelama 14 (poglavlje 7.2.1) i 25.

**Tabela 25.** Dobijeni rezultati za faktore selektivnosti

<b>Eksp.</b>	<b><math>\alpha_{2,3}</math></b>	<b><math>\alpha_{3,4}</math></b>	<b><math>\alpha_{4,5}</math></b>	<b><math>\alpha_{5,6}</math></b>
<b>1</b>	0,99	1,05	0,90	1,12
<b>2</b>	0,99	1,04	0,90	1,13
<b>3</b>	0,94	1,07	0,91	1,14
<b>4</b>	3,44	1,19	1,00	1,13
<b>5</b>	3,07	1,16	0,99	1,15
<b>6</b>	2,91	1,14	0,97	1,16
<b>7</b>	5,81	1,41	1,19	1,18
<b>8</b>	6,14	1,39	1,13	1,16
<b>9</b>	7,21	1,38	1,14	1,19
<b>10</b>	1,28	1,05	0,94	1,12
<b>11</b>	1,23	1,04	0,94	1,14
<b>12</b>	1,20	1,02	0,95	1,15
<b>13</b>	4,72	1,36	1,18	1,18
<b>14</b>	4,04	1,26	1,11	1,14
<b>15</b>	4,68	1,25	1,16	1,19
<b>16</b>	5,50	1,57	1,42	1,24
<b>17</b>	5,48	1,53	1,36	1,23
<b>18</b>	5,76	1,51	1,38	1,25
<b>19</b>	2,42	1,08	1,03	1,17
<b>20</b>	2,28	1,02	1,06	1,18
<b>21</b>	2,09	1,00	1,07	1,19
<b>22</b>	5,01	1,76	1,68	1,34
<b>23</b>	3,48	1,49	1,57	1,34
<b>24</b>	5,19	1,53	1,63	1,32
<b>25</b>	4,90	1,94	1,96	1,47
<b>26</b>	4,80	1,83	1,87	1,42
<b>27</b>	4,78	1,78	1,90	1,48
<b>28</b>	4,57	1,30	1,15	1,18
<b>29</b>	2,53	1,14	1,07	1,16
<b>30</b>	4,04	1,26	1,11	1,14

$\alpha_{2,3}$  – faktor selektivnosti za mianserin i sertralin;  $\alpha_{3,4}$  – faktor selektivnosti za sertralin i moklobemid;  $\alpha_{4,5}$  – faktor selektivnosti za moklobemid i fluoksetin;  $\alpha_{5,6}$  – faktor selektivnosti za fluoksetin i maprotilin

#### 4. Kreiranje kvadratnih matematičkih modela koji opisuju odgovore u zavisnosti od ispitivanih faktora

Matematički modeli oblika polinom drugog stepena dobijeni u fazi optimizacije za posmatrane odgovore predstavljeni su u tabeli 26. Koeficijenti dobijenih modela prikazani su za stvarne vrednosti faktora.

**Tabela 26.** Matematički modeli za odabrane odgovore

	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{4,5}$	$\alpha_{5,6}$
<b>Odsečak</b>	26,93	438,44	885,73	2000,17	3030,54	-80,95	38,96	66,21	31,67
$x_1$	-0,84	-11,21	-21,16	-45,65	-68,36	1,07	-0,82	-1,42	-0,66
$x_2$	1,53	12,75	1,48	-25,49	-49,19	13,77	-1,51	-1,98	-0,83
$x_3$	0,11	0,57	1,10	1,91	2,67	0,01	0,03	-0,01	0,00
$x_1x_2$	-0,07	-0,16	-0,01	0,34	0,62	-0,12	0,02	0,03	0,01
$x_1x_3$	0,00	-0,01	-0,01	-0,02	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
$x_2x_3$	0,01	0,01	0,00	-0,02	-0,04	0,01	0,00	0,00	0,00
$x_1^2$	0,01	0,07	0,13	0,26	0,39	0,00	0,00	0,01	0,00
$x_2^2$	0,38	0,11	-0,09	-0,30	-0,34	-0,21	-0,01	-0,01	0,00
$x_3^2$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

$x_1$  – sadržaj acetonnitrila u mobilnoj fazi (%);  $x_2$  – pH vrednost vodene faze;  $x_3$  – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM);  $k_2$  – retencioni faktor mianserina;  $k_3$  – retencioni faktor sertralina;  $k_4$  – retencioni faktor moklobemida;  $k_5$  – retencioni faktor fluoksetina;  $k_6$  – retencioni faktor maprotilina;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove

#### 5. Izračunavanje robusnog kriterijuma i tumačenje rezultata

Nakon definisanja očekivanog eksperimentalnog variranja ispitivanih faktora, izračunati su parcijalni izvodi funkcija odgovora, a zatim i vrednosti paricijalnog i totalnog robusnog kriterijuma.

Odgovor  $k_2$

$$dk_2/dx_1 = -1,270 + 0,015x_1 \quad dk_2/dx_2 = -4,051 + 0,760x_2 \quad dk_2/dx_3 = 0,002 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,052, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,507, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = 0,002, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,165$$

Odgovor  $k_3$

$$dk_3/dx_1 = -12,34 + 0,144x_1 \quad dk_3/dx_2 = -21,052 + 0,218x_2 \quad dk_3/dx_3 = -0,057 + 0,001x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,029, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,257, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,057, \Delta f = 5$$

$$Ru = -0,202$$

Odgovor  $k_4$

$$dk_4/dx_1 = -21,48 + 0,253x_1 \quad dk_4/dx_2 = 0,985 - 0,188x_2 \quad dk_4/dx_3 = -0,147 + 0,003x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,294, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,142, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,147, \Delta f = 5$$

$$Ru = -0,470$$

Odgovor  $k_5$

$$dk_5/dx_1 = -44,10 + 0,520x_1 \quad dk_5/dx_2 = 3,106 - 0,605x_2 \quad dk_5/dx_3 = -0,279 + 0,006x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,606, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,526, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,279, \Delta f = 5$$

$$Ru = -0,891$$

Odgovor  $k_6$

$$dk_6/dx_1 = -65,30 + 0,769x_1 \quad dk_6/dx_2 = 3,441 - 0,673x_2 \quad dk_6/dx_3 = -0,389 + 0,008x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,862, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = -0,597, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,389, \Delta f = 5$$

$$Ru = -1,204$$

Odgovor  $\alpha_{2,3}$

$$d\alpha_{2,3}/dx_1 = 0,337 - 0,005x_1 \quad d\alpha_{2,3}/dx_2 = 3,659 - 0,428x_2 \quad d\alpha_{2,3}/dx_3 = -0,057 + 0,002x_3$$

$$Ru(x_1) = -0,088, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 1,091, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,057, \Delta f = 5$$

$$Ru = -1,153$$

Odgovor  $\alpha_{3,4}$

$$d\alpha_{3,4}/dx_1 = -0,709 + 0,009x_1 \quad d\alpha_{3,4}/dx_2 = 0,195 - 0,018x_2 \quad d\alpha_{3,4}/dx_3 = -0,009 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,040, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,085, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,009, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,010$$

Odgovor  $\alpha_{4,5}$

$$d\alpha_{4,5}/dx_1 = -1,266 + 0,015x_1 \quad d\alpha_{4,5}/dx_2 = 0,162 - 0,017x_2 \quad d\alpha_{4,5}/dx_3 = -0,009 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,041, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,057, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,009, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,007$$

Odgovor  $\alpha_{5,6}$

$$d\alpha_{5,6}/dx_1 = -0,606 + 0,007x_1 \quad d\alpha_{5,6}/dx_2 = -0,011 - 0,005x_2 \quad d\alpha_{5,6}/dx_3 = -0,002 + 0,000x_3$$

$$Ru(x_1) = 0,009, \Delta f = 1 \quad Ru(x_2) = 0,018, \Delta f = 0,2 \quad Ru(x_3) = -0,002, \Delta f = 5$$

$$Ru = 0,000$$

Vrednosti odabranih hromatografskih odgovora pri optimalnim uslovima iznosile su:  
 $k_2 = 0,360$ ;  $k_3 = 2,090$ ;  $k_4 = 2,940$ ;  $k_5 = 3,510$ ;  $k_6 = 4,130$ ;  $\alpha_{2,3} = 5,806$ ;  $\alpha_{3,4} = 1,407$ ;  
 $\alpha_{4,5} = 1,194$ ;  $\alpha_{4,6} = 1,177$

Analizom dobijenih rezultata za parcijalne robusne kriterijume može se uočiti da je na retencione faktore ispitivanih supstanci najmanji uticaj imao faktor  $x_3$ , dok su faktori  $x_1$  i  $x_2$  imali veći uticaj.

S druge strane, vrednosti totalnog robusnog kriterijuma pokazuju koliko su odgovori osetljivi na istovremenu promenu svih ispitivanih faktora. Stoga se može zaključiti da retencioni faktori  $k_5$  ( $R_u = -0,891$ ) i  $k_6$  ( $R_u = -1,204$ ) pokazuju relativno značajne vrednosti robusnih kriterijuma. Međutim, uticaj promena faktora na oba odgovora ima isti znak, usled čega će pomeranje obe supstance u okviru hromatografske analize biti u istom smeru i neće se narušiti separacija. Retencioni faktori  $k_2$ ,  $k_3$  i  $k_4$  okarakterisani su nižim vrednostima totalnog robusnog kriterijuma.

Dobijeni totalni robusni kriterijumi za vrednosti faktora selektivnosti pod optimalnim uslovima pokazuju da će, u najgorem slučaju, variranja eksperimentalnih faktora promene faktora selektivnosti dovesti do sledećih korigovanih vrednosti:

$$\alpha_{2,3} \text{ korigovano} = 5,806 - 1,153 = 4,653$$

$$\alpha_{3,4} \text{ korigovano} = 1,407 + 0,010 = 1,417$$

$$\alpha_{4,5} \text{ korigovano} = 1,194 + 0,007 = 1,201$$

$$\alpha_{5,6} \text{ korigovano} = 1,177 + 0,000 = 1,177$$

Dobijeni totalni robusni kriterijumi za  $\alpha_{3,4}$ ,  $\alpha_{4,5}$  i  $\alpha_{5,6}$  imaju veoma male numeričke vrednosti i može se smatrati da su ovi odgovori stabilni na variranje ispitivanih faktora. S druge strane, vrednost totalnog robusnog kriterijuma za  $\alpha_{2,3}$  ima vrednost od  $-1,153$  što je numerički značajna vrednost, ali u poređenju sa dobijenom vrednošću za ovaj odgovor pod optimalnim uslovima ( $\alpha_{2,3} = 5,81$ ) može se smatrati prihvatljivom. Izračunate korigovane vrednosti za faktore selektivnosti potvrđuju da će metoda verovatno zadržati zadovoljavajući kvalitet separacije i u fazi testiranja robusnosti u okviru postupka validacije metode.



## **7.5. RAZVOJ NOVE METODOLOGIJE KREIRANJA MATEMATIČKIH MODELA IZ PLAKET–BURMAN DIZAJNA U TESTIRANJU ROBUSNOSTI METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE**

### 7.5.1. METODOLOGIJA DEMASKIRANJA VELIKIH *DUMMY* EFEKATA

Plaket–Burman dizajn najčešće je primenjivani eksperimentalni dizajn za testiranje robusnosti metoda tečne hromatografije. Ovaj dizajn omogućava uspostavljanje linearne veze između posmatranih faktora koji mogu uticati na robusnost i odabranog odgovora sistema. Takva linearna zavisnost opisana je samo glavnim faktorima dok se tradicionalnim načinima interpretacije rezultata ne može proceniti uticaj interakcija. Detaljan opis pristupa analizi Plaket–Burman dizajna dat je u poglavlju 3.2. U ovoj disertaciji po prvi put predlaže se unapređena statistička analiza rezultata iz Plaket–Burman dizajna koja omogućava kreiranje matematičkog modela koji uključuje i dvofaktorske interakcije.

Kreiranje novog pristupa analizi Plaket–Burman dizajna polazi od definisanja glavnih koraka koji su važni za rešavanje ovog problema:

- 1) Ako je potrebno identifikovati  $(N-1)$  glavnih faktora i  $(N-1)(N-2)/2$  dvofaktorskih interakcija, ukupan broj promenljivih biće  $(N-1) + (N-1)(N-2)/2$ . S druge strane, ukupan broj izvedenih eksperimenata omogućava procenu koeficijenata za svega  $N-1$  faktora i odsečak. Stoga je neophodno izvršiti selekciju promenljivih koje će ući u kreiranje modela.
- 2) Preselekcija je ključni korak jer zahteva izostavljanje relativno velikog broja promenljivih što može biti izuzetno rizično. Stoga se mora uvesti dobro definisani kriterijum na osnovu koga će se identifikovati potencijalno značajne promenljive.
- 3) Ukupno vreme potrebno za računanje treba svesti na minimum. Stoga, poželjno je koristiti jednostavne statističke analize koje se mogu sprovesti pomoću komercijalno dostupnih softvera.

Kako bi se rešili navedeni problemi, predložena je nova strategija nazvana Metodologija demaskiranja velikih *dummy* efekata (eng. *Demasking Large Dummy Effects* – DDE). Osnovna ideja predstavlja uvođenje novog kriterijuma za identifikaciju značajnih interakcija u Losonovu strategiju [38], objašnjenu u poglavlju 3.2.5, polazeći od pretpostavke da se značajne interakcije najjednostavnije mogu uočiti u velikim vrednostima značajnih *dummy* efekata. Naime, *dummy* faktori su imaginarni faktori i efekti koji su izračunati za njih predstavljaju eksperimentalni šum. Međutim, ako se dogodi da neki od *dummy* efekata bude zaista značajan, uzrok tome može biti preklapanje sa nekom od interakcija koja doprinosi visokoj vrednosti efekta. Stoga, demaskiranje velikih *dummy* efekata može otkriti nekoliko značajnih interakcija koje će doprineti poboljšanju modela.

Glavna prednost DDE pristupa je njegov veliki praktični značaj. Kada se identifikuju modeli za praktičnu/farmaceutsku namenu, krajnji cilj nije postizanje savršenog matematičkog ili statističkog rešenja, već najboljeg rešenja koje se može interpretirati u stvarnim sistemima. To znači da jedan model može imati  $R^2$  od 0,9999 što će ga činiti statistički najboljim, ali ako sadrži previše faktora i faktorskih interakcija, odnosno ako je preterano uklopljen (eng. *overfitted*), biće komplikovan za interpretaciju i njegov praktičan značaj biće mali. S druge strane, DDE pristup ne bira kandidate za modelovanje nasumično, već prema njihovom doprinosu velikim *dummy* efektima što će omogućiti da samo interakcije koje su praktično značajne uđu u model. Druga važna prednost DDE pristupa je mali broj kandidata interakcija što značajno smanjuje vreme računanja i ne zahteva složene kompjuterske programe.

Novopredložena metodologija demaskiranja velikih *dummy* efekata za kreiranje modela za analizu podataka iz Plaket–Burman dizajna sastoji se iz četiri faze:

### Faza 1. Preselekcija glavnih faktora

Neka  $S_0$  bude polazni skup za analizu koji se sastoji od svih stvarnih i *dummy* faktora  $F$ . Faktorski efekti ( $E_F$ ) procenjuju se sledećom jednačinom [31]:

$$E_F = \frac{\sum Y(+) - \sum Y(-)}{N/2}$$

gde je  $E_F$  efekat faktora  $F$ ,  $\sum Y(+)$  i  $\sum Y(-)$  sume odgovora gde je faktor  $F_i$  na (+) ili (-) nivou. Nakon toga, faktorski efekti u  $S_0$  rangiraju se od 1 do  $N-1$  gde 1 predstavlja najveći efekat. Sledeći skup  $S_1$  dobija se na sledeći način:

$$S_1 = \left\{ F \mid \text{rank}(E_F) \leq \frac{N}{2} \right\}$$

### Faza 2. Preselekcija interakcija

Konstruisati matricu preklapanja  $A = (X^T_1 X_1)^{-1} (X^T_1 X_2)$  iz modela  $y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon$  ( $y$  je  $N \times 1$  vektor odgovora,  $X_1$  je  $N \times N$  matrica odsečka i glavnih efekata,  $\beta_1$  je  $N \times 1$  vektor koeficijenata dobijenim višestrukom linearnom regresijom,  $X_2$  je  $N \times U$  matrica dvofaktorskih interakcija koje se ne mogu proceniti,  $\beta_2$  je odgovarajući  $U \times 1$  vektor regresionih koeficijenata i  $\varepsilon$  je  $N \times 1$  vektor greške).

Matrica preklapanja može otkriti kompleksnu strukturu preklapanja Plaket–Burman dizajna. Stoga se iz nje može pročitati interferencija svake interakcije  $I$  sa glavnim faktorima. Sumirajući koeficijente interferencije koji odgovaraju faktorima uključenim u  $S_1$  može se izračunati potencijalni doprinos svake interakcije modelu označen sa  $C_I$  [40]:

U narednoj fazi može se definisati sledeći skup:

$$S_2 = \{I | C_I \gg 0\}$$

Zatim, interakcije uključene u  $S_2$  rangiraju se prema novopredloženom kriterijumu – relativnom doprinosu velikim vrednostima *dummy* efekata  $Cd_I$ .  $Cd_I$  se dobija sabiranjem koeficijenata preklapanja koji odgovaraju *dummy* faktorima i dobija se skup  $S_3$ :

$$S_3 = \{I | I \in S_2 \wedge Cd_I \gg 0\}$$

### Faza 3. Korekcija modela

Primarno definisani model koji sadrži samo glavne faktore koriguje se dodavanjem interakcija uključenih u skup  $S_3$ . Na taj način, dobija se novi skup  $S_4$ . U ovoj fazi već se očekuje značajno poboljšanje koeficijenta determinacije i prilagođenog koeficijenta determinacije.

### Faza 4. Finalno podešavanje modela

Finalno podešavanje modela sastoji se u analizi promenljivih uključenih u  $S_4$  primenom metode svih mogućih regresija (eng. *all subsets regressions*). Iako je logično očekivati da će model koji uključuje sve promenljive imati najveće koeficijente determinacije, ova faza je bitna jer omogućava odabir modela koji ima najveću praktičnu vrednost bez obzira na vrednost koeficijenta determinacije. Ovaj korak omogućava, takođe, da se uzmu u obzir princip razuđenosti efekata i princip naslednosti efekata kako bi se donela konačna odluka o željenom modelu.

Novopredložena DDE metodologija verifikovana je na primeru testiranja robusnosti metoda tačne hromatografije za analizu raloksifena i njegovih nečistoće, smeše agonista i antagonista beta receptora i smeše antidepresiva.

## 7.5.2. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU RALOKSIFENA I NJегоVIH NEČISTOĆA

Paralelno sa metodom za ispitivanje raloksifena i njegovih nečistoća opisanom u poglavlju 7.1.2. razvijena je i *back up* metoda (metoda podrške). *Back up* metoda predstavlja alternativnu metodu koja omogućava analizu ispitivane smeše i na taj način obezbeđuje dodatnu sigurnost u slučaju da je izvođenje primarno definisane metode nemoguće u određenoj analitičkoj laboratoriji. Definisani eksperimentalni uslovi za *back up* metodu opisani su u poglavlju 6.3.2. Zatim je testirana robusnost tako definisanih optimalnih uslova metodologijom eksperimentalnog dizajna prema koracima opisanim u poglavlju 3.2.

### 1. Odabir faktora koji će biti ispitivani

Faktori čiji je uticaj na robusnost razvijene metode ispitivan bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, sadržaj SDS-a u vodenoj fazi, temperatura kolone, pH vrednost mobilne faze i protok mobilne faze.

### 2. Odabir faktorskih nivoa

Variranja za odabrane faktore definisana su tako da odgovaraju stvarnim očekivanim promenama vrednosti ovih faktora u toku eksperimentalnog rada.

Nivoi faktora prikazani su u tabeli 2 u poglavlju 6.3.3.

### 3. Odabir eksperimentalnog dizajna

Testiranje robusnosti izvršeno je primenom Plaket–Burman eksperimentalnog dizajna.

Plan eksperimenata prikazan je u tabeli 2 u poglavlju 6.3.3.

### 4. Odabir odgovora koji će biti praćen

Odabrano je 9 hromatografskih odgovora koji će biti praćeni: pet retencionih faktora ( $k_1$  –  $k_5$ ) i četiri faktora selektivnosti ( $\alpha_1$  –  $\alpha_4$ ). Dobijeni rezultati u 12 definisanih eksperimenata predstavljeni su u tabeli 27.

**Tabela 27.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

Eksp.	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{4,5}$
1	0,89	1,44	4,39	6,14	14,7	1,63	3,04	1,39	2,39
2	1,52	2,28	8,37	9,47	29,44	1,50	3,67	1,13	3,11
3	1,39	2,2	7,27	9,23	25,5	1,58	3,30	1,27	2,76
4	0,64	2,31	8,12	9,45	28,57	3,61	3,52	1,16	3,02
5	1,37	1,62	6,71	10,02	24,05	1,18	4,14	1,49	2,40
6	0,99	2,07	8,18	9,72	31,59	2,09	3,96	1,19	3,25
7	0,34	1,43	4,59	6,12	15,47	4,14	3,21	1,33	2,53
8	1,71	2,32	6,97	9,62	24,29	1,34	3,01	1,38	2,50
9	1,03	1,69	5,95	7,56	21,16	1,64	3,51	1,27	2,80
10	1,49	2,07	8,42	9,67	32,17	1,38	4,07	1,15	3,32
11	1,57	1,96	6,01	7,53	19,51	1,25	3,07	1,25	2,59
12	2,18	2,75	9,88	12,15	37,07	1,26	3,58	1,23	3,05

$k_1$  – retencioni faktor nečistoće 1;  $k_2$  – retencioni faktor nečistoće 2,  $k_3$  – retencioni faktor raloksifena;  $k_4$  – retencioni faktor nečistoće 3;  $k_5$  – retencioni faktor nečistoće 4;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove

### 5. Kreiranje matematičkog modela i procena značajnosti faktora

Tradicionalni način interpretacije rezultata iz visoko frakcionisanih dizajna sastoji se u konstruisanju modela koji je opisan samo glavnim faktorima, dok su faktorske interakcije zanemarene. Za kreiranje modela koristi se višestruka linearna regresija i aproksimacija metodom najmanjih kvadrata. Dobijeni modeli i odgovarajući koeficijenti determinacije za date odgovore bili su:

$k_1 = 1,26 - 0,11A + 0,13C - 0,21E - 0,28G - 0,24K$	$R^2 = 0,884$
$k_2 = 2,01 - 0,17A - 0,04C - 0,17E - 0,02G - 0,29K$	$R^2 = 0,991$
$k_3 = 7,07 - 1,12A + 0,05C - 0,71E + 0,08G - 0,7K$	$R^2 = 0,992$
$k_4 = 8,89 + 1,19A + 0,02C - 0,77E - 0,3G - 0,69K$	$R^2 = 0,923$
$k_5 = 25,29 - 5,19A + 0,01C - 3,34E - 0,01G - 2,1K$	$R^2 = 0,985$
$\alpha_{1,2} = 1,88 + 0,05A - 0,46C + 0,34E + 0,54G + 0,13K$	$R^2 = 0,743$
$\alpha_{2,3} = 3,51 - 0,32A + 0,12C - 0,06E + 0,02G + 0,15K$	$R^2 = 0,974$
$\alpha_{3,4} = 1,27 + 0,05A - 0,01C + 0,02E - 0,05G + 0,03K$	$R^2 = 0,517$
$\alpha_{4,5} = 2,81 - 0,22A + 0,02C - 0,14E + 0,1G - 0,03K$	$R^2 = 0,755$

Analizirajući dobijene  $R^2$  vrednosti može se uočiti da su odgovori  $\alpha_{2,3}$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_5$  dobro opisani glavnim faktorima. S druge strane, prilično loše vrednosti koeficijenta determinacije dobijene su za odgovore  $\alpha_{1,2}$ ,  $\alpha_{3,4}$ ,  $\alpha_{4,5}$  i  $k_1$ , što ukazuje na to da su ovi modeli manje prihvatljivi. Nezadovoljavajući koeficijenti determinacije mogu se podeliti u tri grupe: modeli sa ekstremno lošim  $R^2$  (kao što je 0,517 dobijeno za  $\alpha_{3,4}$ ), umereno lošim  $R^2$  (kao što je 0,743 za  $\alpha_{1,2}$  i 0,755 za  $\alpha_{4,5}$ ) i neznatno lošim  $R^2$  (kao što je 0,884 dobijeno za  $k_1$ ). Stoga je neophodno uraditi detaljnu analizu potencijalnog uticaja faktorskih interakcija na ove odgovore. Kako bi se identifikovale značajne interakcije DDE pristupom izračunate su vrednosti efekata glavnih faktora (tabela 28) i matrica preklapanja za dati Plaket–Burman dizajn (tabela 29).

**Tabela 28.** Faktorski efekti za ispitivane odgovore

<b>Faktori</b>	<b><math>\alpha_{1,2}</math></b>	<b><math>\alpha_{3,4}</math></b>	<b><math>\alpha_{4,5}</math></b>	<b><math>k_1</math></b>
<b>A</b>	0,09	0,09	-0,43	-0,21
<b>d<sub>1</sub></b>	-0,07	-0,05	0,09	-0,09
<b>C</b>	-0,92	-0,02	0,04	0,27
<b>d<sub>2</sub></b>	0,08	-0,07	0,16	-0,20
<b>E</b>	0,67	0,04	-0,27	-0,41
<b>d<sub>3</sub></b>	-0,66	0,08	-0,15	0,10
<b>G</b>	1,09	-0,09	0,20	-0,55
<b>d<sub>4</sub></b>	0,64	0,05	-0,11	-0,21
<b>d<sub>5</sub></b>	-0,06	0,04	-0,10	-0,08
<b>K</b>	0,25	0,07	-0,06	-0,48
<b>d<sub>6</sub></b>	0,13	-0,06	0,15	0,02

A – sadržaj acetonitrila (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – sadržaj SDS-a u vodenoj fazi (mM); d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – temperatura kolone (°C); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – pH vrednost mobilne faze; d<sub>4</sub> – *dummy* 4; d<sub>5</sub> – *dummy* 5; K – protok (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>6</sub> – *dummy* 6;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti;  $k_1$  – retencioni faktor

\* sivo označena polja prikazuju faktore uključene u podskup S<sub>1</sub>



**Tabela 29.** Matrica preklapanja

	<b>AC</b>	<b>AE</b>	<b>AG</b>	<b>AK</b>	<b>CE</b>	<b>CG</b>	<b>CK</b>	<b>EG</b>	<b>EK</b>	<b>GK</b>
<b>A</b>	0	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
<b>C</b>	0	-1/3	1/3	-1/3	0	0	0	-1/3	-1/3	-1/3
<b>E</b>	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
<b>G</b>	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>K</b>	-1/3	1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	0
<b>d<sub>1</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>2</sub></b>	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>3</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>4</sub></b>	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>5</sub></b>	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3
<b>d<sub>6</sub></b>	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3

A – sadržaj acetonitrila (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – sadržaj natrijum-dodecilsulfata (SDS) u vodenoj fazi (mM); d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – temperatura kolone (°C); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – pH vrednost mobilne faze; d<sub>4</sub> – *dummy* 4; d<sub>5</sub> – *dummy* 5; K – protok (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>6</sub> – *dummy* 6

### **DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{3,4}$**

Odgovor  $\alpha_{3,4}$  pripada grupi odgovora sa ekstremno malim vrednostima koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0,517$ ). To znači da glavni faktori nikako ne mogu da opišu ovaj odgovor na adekvatan način. Stoga je primenjen DDE pristup u cilju identifikacije potencijalno značajnih interakcija koje doprinose odgovoru  $\alpha_{3,4}$  i koje će omogućiti kreiranje pouzdanijeg modela.

#### ***Faza 1***

Početni skup  $S_0$  definisan je na sledeći način:

$$S_0 = \{A, C, E, G, K, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

gde je značenje promenljivih prikazano u tabeli 28. Izračunati su faktorski efekti i prikazani su u tabeli 28. Dobijeni efekti su rangirani i promenljive koje ulaze u podskup  $S_1$  definisane su na sledeći način:

$$S_1 = \{A, G, K, d_2, d_3, d_6\}$$

Tri od šest najvećih efekata na model čine efekti *dummy* faktora. Kao što se može videti u tabeli 28, efekti *dummy* faktora skoro su ekvivalentni efektima glavnih faktora, što ukazuje na moguće snažno preklapanje sa dvofaktorskim interakcijama.

#### ***Faza 2***

Matrica preklapanja (tabela 29) otkriva kompleksnu strukturu dizajna. Potencijalni doprinos svake interakcije vrednostima velikih efekata izračunat je sabiranjem odgovarajućih vrednosti iz matrice uzimajući u obzir znak faktorskih efekata. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 30.

**Tabela 30.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
<b>A +*</b>	0	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
<b>G -</b>	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>K +</b>	-1/3	1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	0
<b>d<sub>2</sub> -</b>	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>3</sub> +</b>	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>6</sub> -</b>	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3
<b>C<sub>I</sub></b>	-3/3**	-1/3	2/3	0	0	3/3	1/3	-3/3	5/3	0
<b>Cd<sub>I</sub></b>	-1/3	-3/3				3/3	1/3	-1/3	3/3	

\* znak faktorskog efekta

\*\*sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije bile su:

$$S_2 = \{AC, AE, AG, CG, CK, EG, EK\}$$

Sledeći korak je primena novog kriterijuma za identifikaciju značajnih interakcija. Iz podskupa  $S_2$  izolovane su interakcije koje najviše doprinose velikim *dummy* efektima (tabela 30):

$$S_3 = \{AE, CG, EK\}$$

### Faza 3

Korigovan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, AE, CG, EK\}$$

Dobijeni koeficijent determinacije konačnog modela bio je 0,926, što predstavlja značajno povećanje u poređenju sa inicijalno dobijenom vrednošću od 0,517 što je potvrdilo sposobnost DDE pristupa da poboljša model koji opisuje odgovor  $\alpha_{3,4}$ .

#### **Faza 4**

Konačno, izvršen je jedan „prolaz“ metode svih mogućih regresija koji uključuje odabrane promenljive. Neki od karakterističnih modela koji su dobijeni predstavljeni su u tabeli 31.

**Tabela 31.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	EK	CG	AE	R <sup>2</sup>	Adj. R <sup>2</sup>
1						X*			0,554	0,509
5	X			X	X	X		X	0,862	0,747
6	X		X	X	X	X		X	0,904	0,790
7	X		X	X	X	X	X	X	0,922	0,784
8	X	X	X	X	X	X	X	X	0,926	0,728

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model

Tabela 31 pokazuje da model određen samo interakcijom EK ima veći R<sup>2</sup> (0,554) nego model definisan svim glavnim faktorima što još jednom ističe značaj procene interakcija u Plaket–Burman dizajnu.

### DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{1,2}$

Odgovor  $\alpha_{1,2}$  pripada grupi odgovora sa umereno lošim koeficijentom determinacije ( $R^2 = 0,743$ ). DDE pristup je primenjen u pokušaju da identifikuje potencijalne interakcije koje će poboljšati model.

#### Faza 1

Polazeći od skupa  $S_0$ :

$$S_0 = \{A, C, E, G, K, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

na osnovu vrednosti faktorskih efekata prikazanih u tabeli 28, definisan je podskup  $S_1$ :

$$S_1 = \{C, E, G, d_3, d_4\}$$

#### Faza 2

Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata izračunat je iz matrice preklapanja (tabela 29) i predstavljen je u tabeli 32.

**Tabela 32.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
<b>C</b> -*	0	-1/3	1/3	-1/3	0	0	0	-1/3	-1/3	-1/3
<b>E</b> +	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
<b>G</b> +	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>d<sub>3</sub></b> -	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>4</sub></b> +	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>C<sub>I</sub></b>	0	0	0	3/3	-3/3	-3/3	0	3/3	0	0
<b>Cd<sub>I</sub></b>				0	-2/3**	-2/3		2/3		

\* znak faktorskog efekta

\*\*sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije bile su:

$$S_2 = \{AK, CE, CG, EG\}$$

Iz podskupa  $S_2$  izolovane su interakcije koje najviše doprinose velikim *dummy* efektima (tabela 32):

$$S_3 = \{CE, CG, EG\}$$

### Faza 3

Korigovan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, CE, CG, EG\}$$

Dobijeni koeficijent determinacije ovako definisanog modela bio je **0,979** za razliku od prethodno definisanog modela sa  $R^2 = 0,743$ .

### Faza 4

Izvršen je jedan „prolaz“ metode svih mogućih regresija koji uključuje odabrane promenljive. Dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 33. Kao što se može videti iz tabele 33, izostavljanje faktora A i K dovelo je do neznatnog pogoršanja modela ističući značaj uključenih interakcija.

**Tabela 33.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	CE	EG	CG	R <sup>2</sup>	Adj. R <sup>2</sup>
4		X*		X		X		X	0,862	0,784
5		X	X	X		X		X	0,917	0,848
6		X	X	X		X	X	X	0,954	0,899
7	X	X	X	X		X	X	X	0,979	0,941
8	X	X	X	X	X	X	X	X	0,979	0,922

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model

### DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{4,5}$

Odgovor  $\alpha_{4,5}$  pripada grupi odgovora sa umereno lošim koeficijentom determinacije ( $R^2 = 0,755$ ). DDE pristup primenjen je u pokušaju da identifikuje potencijalne interakcije koje će poboljšati model.

#### Faza 1

Skup  $S_0$  i podskup  $S_1$  definisani su na sledeći način:

$$S_0 = \{A, C, E, G, K, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

$$S_1 = \{A, E, G, d_2, d_3, d_6\}$$

#### Faza 2

Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata izračunat je iz matrice preklapanja (tabela 29), a dobijene vrednosti predstavljene su u tabeli 34.

**Tabela 34.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
A –*	0	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
E –	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
G +	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
$d_2$ +	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
$d_3$ –	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3
$d_6$ +	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3
$C_I$	3/3**	2/3	0	-1/3	-1/3	-3/3	0	2/3	-5/3	1/3
$Cd_I$	1/3	3/3				-3/3		1/3	-3/3	

\* znak faktorskog efekta

\*\* sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije bile su:

$$S_2 = \{AC, AE, CG, EG, EK\}$$

Iz podskupa  $S_2$  izolovane su interakcije koje najviše doprinose velikim *dummy* efektima (tabela 34):

$$S_3 = \{AE, CG, EK\}$$

### Faza 3

Korigovan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, AE, CG, EK\}$$

U poređenju sa prvo izračunatim  $R^2$  koji je bio **0,755**, novodobijena vrednost od **0,959** predstavlja značajno poboljšanje.

### Faza 4

Tabela 35 omogućava fino podešavanje modela. Može se primetiti da model bez interakcije CG opisuje sistem jednako dobro. Modelovanje pomoću promenljivih A, E, G, K, EK i AE ima  $R^2 = 0,948$  i najvišu Adj.  $R^2$  vrednost.

**Tabela 35.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	CG	EK	AE	$R^2$	Adj. $R^2$
5	X*		X	X			X	X	0,916	0,845
6	X		X	X		X	X	X	0,936	0,859
6	X		X	X	X		X	X	0,948	0,885
7	X		X	X	X	X	X	X	0,956	0,879
8	X	X	X	X	X	X	X	X	0,959	0,850

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model



### **DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $k_1$**

Odgovor  $k_1$  razlikuje se od ostalih analiziranih odgovora, jer efekti njegovih *dummy* faktora ne prelaze vrednosti efekata glavnih faktora (tabela 28). Posledično, model za  $k_1$  opisan samo glavnim faktorima ima bolji koeficijent determinacije u odnosu na modele za ostale odgovore ( $\alpha_{1,2}$ ,  $\alpha_{3,4}$ ,  $\alpha_{4,5}$ ), ali i dalje ne prelazi vrednost 0,9. Uprkos činjenici da DDE prestup otkriva značajne interakcije iz velikih *dummy* efekata, a ovaj odgovor nema velike *dummy* efekte, DDE je primenjen za pokušaj poboljšanja modela. Odabrana su dva najveća *dummy* efekta i uključena su u podskup  $S_2$  zajedno sa svim glavnim faktorima.

#### ***Faza 1***

Skup  $S_0$  i podskup  $S_1$  definisani su na sledeći način

$$S_0 = \{A, C, E, G, K, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

$$S_1 = \{A, C, E, G, K, d_2, d_4\}$$

#### ***Faza 2***

Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata izračunat je iz matrice preklapanja (tabela 29), a dobijene vrednosti predstavljene su u tabeli 36.

**Tabela 36.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
<b>A</b> –*	0	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
<b>C</b> +	0	-1/3	1/3	-1/3	0	0	0	-1/3	-1/3	-1/3
<b>E</b> –	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
<b>G</b> –	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>K</b> –	-1/3	1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	0
<b>d<sub>2</sub></b> –	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>4</sub></b> –	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>C<sub>I</sub></b>	1/3	-1/3	1/3	-1/3	5/3**	3/3	3/3	1/3	-1/3	1/3

\* znak faktorskog efekta

\*\* sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije bile su:

$$S_2 = \{CE, CG, CK\}$$

$$S_3 = \{CE, CG\}$$

### Faza 3

Korigovan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, CE, CG\}$$

Konačno, dobijeni model imao je  $R^2 = 0,976$ , što ukazuje na to da je DDE pristup uspeo da popravi i ovaj model.

### Faza 4

Tabela 37 predlaže neke alternativne modele, poput modela bez glavnog faktora A koji ima  $R^2 = 0,944$  i Adj.  $R^2 = 0,876$ .

**Tabela 37.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	CE	CG	R <sup>2</sup>	Adj. R <sup>2</sup>
4			X*	X	X	X		0,843	0,754
5		X	X	X	X	X		0,922	0,857
6		X	X	X	X	X	X	0,944	0,876
7	X	X	X	X	X	X	X	0,976	0,934

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model

Za sve ispitivane odgovore DDE pristup identifikovao je značajne faktorske interakcije i uspeo je da pronađe modele koji opisuju sistem bolje nego inicijalni modeli definisani samo glavnim faktorima. Analiza odgovora koji su inicijalno imali ekstremno male vrednosti ( $\alpha_{3,4}$ ) ili umereno male vrednosti R<sup>2</sup> ( $\alpha_{1,2}$ ,  $\alpha_{4,5}$ ) primarno je pokazala postojanje nekoliko značajnih *dummy* efekata, ali DDE pristup je otkrio da velike vrednosti ovih efekata potiču od značajnih efekata interakcija sa kojima se preklapaju. Dodatno, na primeru odgovora  $k_1$  (neznatno mala vrednost R<sup>2</sup>) gde nijedan od efekata *dummy* faktora nije bio veći od efekata glavnih faktora, može se uočiti da je DDE pristup mogao da izoluje informaciju o značajnim interakcijama i da omogući poboljšanje modela čak i u ovakvoj situaciji.

### 7.5.3. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU SMEŠE AGONISTA I ANTAGONISTA BETA RECEPTORA

Metodologijom eksperimentalnog dizajna testirana je robusnost metode za analizu smeše agonista i antagonista beta receptora opisane u poglavlju 7.1.3. Kao i u prethodnom primeru, nakon definisanja eksperimentalnog plana i kreiranja inicijalnih modela okarakterisanih glavnim faktorima, DDE pristup je primenjen za poboljšanje modela koji nisu bili zadovoljavajući.

#### **1. Odabir faktora koji će biti ispitivani**

Faktori čiji je uticaj na robusnost razvijene metode ispitivan bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi, temperatura kolone i protok mobilne faze.

#### **2. Odabir faktorskih nivoa**

Variranja za odabrane faktore definisana su tako da odgovaraju stvarno očekivanim promenama vrednosti ovih faktora u toku eksperimentalnog rada. Nivoi faktora prikazani su u tabeli 4 u poglavlju 6.4.2.

#### **3. Odabir eksperimentalnog dizajna**

Testiranje robusnosti izvršeno je primenom Plaket–Burman eksperimentalnog dizajna. Plan eksperimenata prikazan je u tabeli 4 u poglavlju 6.4.2.

#### **4. Odabir odgovora koji će biti praćen**

Odabrano je 9 hromatografskih odgovora koji će biti praćeni: 5 retencionih faktora ( $k_1 - k_5$ ) i 4 faktora selektivnosti ( $\alpha_{1,2} - \alpha_{4,5}$ ). Dobijeni rezultati u 12 definisanih eksperimenata predstavljeni su u tabeli 38.

**Tabela 38.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

<b>Eksp.</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>2</sub></b>	<b>k<sub>3</sub></b>	<b>k<sub>4</sub></b>	<b>k<sub>5</sub></b>	<b><math>\alpha_{1,2}</math></b>	<b><math>\alpha_{2,3}</math></b>	<b><math>\alpha_{3,4}</math></b>	<b><math>\alpha_{4,5}</math></b>
<b>1</b>	1,73	2,29	3,09	4,21	6,44	1,32	1,35	1,36	1,53
<b>2</b>	1,42	1,87	2,66	3,62	5,28	1,32	1,42	1,36	1,46
<b>3</b>	1,90	2,76	3,72	5,00	7,38	1,45	1,35	1,35	1,48
<b>4</b>	0,98	1,34	1,85	2,54	3,84	1,37	1,38	1,37	1,52
<b>5</b>	0,98	1,32	1,96	2,77	4,23	1,35	1,49	1,42	1,53
<b>6</b>	1,08	1,46	2,00	2,65	4,01	1,36	1,37	1,33	1,52
<b>7</b>	1,76	2,40	3,19	4,35	6,50	1,36	1,33	1,36	1,49
<b>8</b>	1,36	1,90	2,60	3,47	5,36	1,40	1,37	1,34	1,54
<b>9</b>	1,37	2,07	2,84	3,89	5,84	1,51	1,38	1,37	1,50
<b>10</b>	1,53	1,94	2,85	3,80	5,66	1,27	1,47	1,33	1,49
<b>11</b>	1,26	1,75	2,57	3,61	5,49	1,40	1,47	1,40	1,53
<b>12</b>	1,54	1,97	2,67	3,47	5,22	1,28	1,36	1,30	1,51

k<sub>1</sub> – retencioni faktor fenoterola; k<sub>2</sub> – retencioni faktor propranolola; k<sub>3</sub> – retencioni faktor salbutamola; k<sub>4</sub> – retencioni faktor metoprolola; k<sub>5</sub> – retencioni faktor atenolola;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove

### **5. Kreiranje matematičkog modela i procena značajnosti faktora**

Metodom linearne regresije dobijeni su inicijalni modeli koji opisuju odgovore u funkciji glavnih faktora:

$$\begin{aligned}
k_1 &= 1,41 + 0,15A + 0,00C - 0,05E - 0,01G - 0,24J & R^2 &= 0,995 \\
k_2 &= 1,92 + 0,27A + 0,29C - 0,09E + 0,06G - 0,29J & R^2 &= 0,986 \\
k_3 &= 2,67 + 0,33A + 0,1C - 0,11E + 0,04G - 0,36J & R^2 &= 0,991 \\
k_4 &= 3,61 + 0,47A + 0,17C - 0,10E + 0,06G - 0,46J & R^2 &= 0,990 \\
k_5 &= 5,43 + 0,73A + 0,21C - 0,14E + 0,04G - 0,64J & R^2 &= 0,988 \\
\alpha_{1,2} &= 1,21 + 0,03A + 0,01C - 0,01E + 0,02G + 0,00J & R^2 &= 0,944 \\
\alpha_{2,3} &= 1,25 - 0,00A + 0,02C - 0,00E - 0,01G + 0,00J & R^2 &= 0,856 \\
\alpha_{3,4} &= 1,27 + 0,01A + 0,01C + 0,01E - 0,00G - 0,00J & R^2 &= 0,988 \\
\alpha_{4,5} &= 1,39 - 0,01A - 0,00C - 0,00E - 0,01G - 0,00J & R^2 &= 0,962
\end{aligned}$$

Analizirajući dobijene  $R^2$  vrednosti može se uočiti da su svi odgovori, osim  $\alpha_{2,3}$ , dobro opisani modelima predstavljenim samo sa glavnim faktorima. Stoga je model za  $\alpha_{2,3}$  kreiran DDE metodologijom.

### **DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{2,3}$**

#### ***Faza 1***

Početni skup  $S_0$  definisan je na sledeći način:

$$S_0 = \{A, C, E, G, J, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

gde je značenje promenljivih prikazano u tabeli 39. Izračunati faktorski efekti prikazani su u tabeli 39.

**Tabela 39.** Faktorski efekti za ispitivane odgovore

<b>Faktori</b>	<b><math>\alpha_{2,3}</math></b>
<b>A</b>	0,00
<b>d<sub>1</sub></b>	0,00
<b>C</b>	0,05
<b>d<sub>2</sub></b>	0,01
<b>E</b>	0,01
<b>d<sub>3</sub></b>	-0,01
<b>G</b>	-0,03
<b>d<sub>4</sub></b>	0,00
<b>J</b>	-0,01
<b>d<sub>5</sub></b>	0,00
<b>d<sub>6</sub></b>	0,02

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – pH vrednost vodene faze; d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – temperatura kolone (°C); d<sub>4</sub> – *dummy* 4; J – protok mobilne faze (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>5</sub> – *dummy* 5; d<sub>6</sub> – *dummy* 6;  $\alpha_{2,3}$  – faktor selektivnosti između propranolola i salbutamola;

\* sivo označena polja prikazuju faktore uključene u podskup S<sub>1</sub>

Dobijeni efekti su rangirani i definisane su promenljive koje ulaze u podskup S<sub>1</sub>:

$$S_1 = \{C, G, d_6\}$$

### **Faza 2**

Konstruisana je matrica preklapanja i predstavljena u tabeli 40.

**Tabela 40.** Matrica preklapanja

	<b>AC</b>	<b>AE</b>	<b>AG</b>	<b>AJ</b>	<b>CE</b>	<b>CG</b>	<b>CJ</b>	<b>EG</b>	<b>EJ</b>	<b>GJ</b>
<b>A</b>	0	0	0	0	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>C</b>	0	-1/3	1/3	1/3	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3
<b>E</b>	-1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	1/3	0	0	-1/3
<b>G</b>	1/3	-1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>J</b>	1/3	-1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	0
<b>d<sub>1</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3
<b>d<sub>2</sub></b>	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
<b>d<sub>3</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>4</sub></b>	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>5</sub></b>	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3
<b>d<sub>6</sub></b>	-1/3	1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3

Potencijalni doprinos svake interakcije vrednostima velikih efekata izračunat je sabiranjem odgovarajućih numeričkih vrednosti iz matrice uzimajući u obzir znak faktorskih efekata (tabela 41).



**Tabela 41.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AJ	CE	CG	CJ	EG	EJ	GJ
$C(+)^*$	0	-1/3	1/3	1/3	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3
$G(-)$	1/3	-1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
$d_6(+)$	-1/3	1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3
$C_I$	-2/3**	1/3	0	3/3	2/3	-1/3	0	0	1/3	-2/3

\* znak faktorskog efekta

\*\*sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije uključene su u skup  $S_2$ :

$$S_2 = \{AC, AJ, CE, GJ\}$$

Kako je samo jedan *dummy* faktor definisan kao potencijalno značajan, u skup  $S_3$  uključene su iste interakcije, kao i u skup  $S_2$

### Faza 3

Korigovan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, J, AC, AJ, CE, GJ\}$$

Za ovaj model izračunat je koeficijent determinacije koji je iznosio 0,958 dok je koeficijent determinacije primarno definisanog modela bio  $R^2 = 0,856$ .

### Faza 4

Metoda svih mogućih regresija koja uključuje promenljive uključene u  $S_4$  omogućava definisanje alternativnih modela koji su prikazani u tabeli 42. Može se primetiti da poslednja tri modela prikazana u tabeli 42 imaju isti koeficijent determinacije, a da se prilagođeni koeficijent determinacije smanjuje kako se broj članova modela povećava. To znači da dolazi do veštačkog poboljšanja modela, pa se kao najadekvatniji model

može izabrati onaj koji se sastoji iz glavnih faktora C, E, G i J i dvofaktorskih interakcija AC, AJ i GJ.

**Tabela 42.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	J	AC	AJ	CE	GJ	R <sup>2</sup>	Adj. R <sup>2</sup>
1			X*							0,627	0,590
2			X			X				0,696	0,629
3			X			X	X			0,758	0,668
4			X	X		X	X			0,850	0,764
5		X	X	X		X	X			0,925	0,862
6		X	X	X	X	X	X			0,938	0,863
7		X	X	X	X	X	X		X	0,958	0,883
8	X	X	X	X	X	X	X		X	0,958	0,846
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,958	0,771

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model

#### 7.5.4. VERIFIKACIJA DDE PRISTUPA NA PRIMERU TESTIRANJA ROBUSNOSTI METODE ZA ANALIZU SMEŠE ANTIDEPRESIVA

Kao i u testiranju robusnosti metoda prethodne dve ispitivane smeše, metodologija eksperimentalnog dizajna primenjena je i u testiranju robusnosti metode razvijene za analizu smeše antidepresiva koja je opisana u poglavlju 7.2.

##### **1. Odabir faktora koji će biti ispitivani**

Faktori čiji je uticaj na robusnost razvijene metode ispitivan bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi, temperatura kolone i protok mobilne faze.

##### **2. Odabir faktorskih nivoa**

Variranja za odabrane faktore definisana su tako da odgovaraju stvarno očekivanim promenama vrednosti ovih faktora u toku eksperimentalnog rada. Nivoi faktora prikazani su u tabeli 6 u poglavlju 6.5.2.

##### **3. Odabir eksperimentalnog dizajna**

Testiranje robusnosti izvršeno je primenom Plaket–Burman eksperimentalnog dizajna. Plan eksperimenata prikazan je u tabeli 6 u poglavlju 6.5.2.

##### **4. Odabir odgovora koji će biti praćeni**

Ispitivanjem je praćeno 9 hromatografskih odgovora: 5 retencionih faktora ( $k_1 - k_5$ ) i 4 faktora selektivnosti ( $\alpha_{2,3} - \alpha_{5,6}$ ). Dobijeni rezultati u 12 definisanih eksperimenata predstavljena su u tabeli 43.

**Tabela 43.** Eksperimentalno dobijeni rezultati

Eksp.	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{4,5}$	$\alpha_{5,6}$
1	0,37	1,99	2,60	2,81	3,21	5,32	1,31	1,08	1,14
2	0,46	1,92	2,72	3,26	3,85	4,19	1,42	1,20	1,18
3	0,65	3,17	4,65	6,14	7,43	4,91	1,46	1,32	1,21
4	0,47	1,99	2,78	3,32	3,92	4,27	1,40	1,19	1,18
5	0,27	1,48	1,91	1,96	2,23	5,44	1,29	1,03	1,14
6	0,31	2,13	3,02	3,79	4,52	6,93	1,42	1,25	1,19
7	0,26	1,78	2,66	3,43	4,17	6,85	1,49	1,29	1,22
8	0,84	3,39	4,78	5,48	6,28	4,04	1,41	1,15	1,15
9	0,37	2,48	3,72	5,00	6,10	6,76	1,50	1,34	1,22
10	0,39	1,99	3,07	2,78	3,58	5,06	1,54	0,91	1,28
11	0,63	2,52	3,25	3,46	3,94	4,02	1,29	1,06	1,14
12	0,72	2,68	3,67	3,99	4,60	3,70	1,37	1,09	1,15
13	0,43	2,08	2,96	3,45	4,01	4,81	1,42	1,17	1,16
14	0,44	2,08	2,96	3,44	4,01	4,78	1,42	1,16	1,16
15	0,44	2,09	2,96	3,45	4,02	4,78	1,42	1,17	1,16

$k_2$  – retencioni faktor selegilina;  $k_3$  – retencioni faktor mianserina;  $k_4$  – retencioni faktor sertralina;  $k_5$  – retencioni faktor moklobemida;  $k_6$  – retencioni faktor maprotilina;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti za susedne pikove

### 5. Kreiranje matematičkog modela

Dobijeni linearni modeli i odgovarajući koeficijenti determinacije koji ih karakterišu bili su:

$$k_2 = 0,48 + 0,04A - 0,02C - 0,07E - 0,06G - 0,15K \quad R^2 = 0,996$$

$$k_3 = 2,29 + 0,26A - 0,03C - 0,35E - 0,05G - 0,32K \quad R^2 = 0,986$$

$$k_4 = 3,23 + 0,37A - 0,02C - 0,58E + 0,02G - 0,41K \quad R^2 = 0,985$$

$$k_5 = 3,78 + 0,60A - 0,02C - 0,74E + 0,37G - 0,49K \quad R^2 = 0,975$$

$$k_6 = 4,48 + 0,70A + 0,03C - 0,93E + 0,51G - 0,52K \quad R^2 = 0,981$$

$$\alpha_{2,3} = 5,12 + 0,19A - 0,06C - 0,11E + 0,53G + 0,94K \quad R^2 = 0,957$$

$$\alpha_{3,4} = 1,41 + 0,00A + 0,01C - 0,04E + 0,04G + 0,02K \quad R^2 = 0,605$$

$$\alpha_{4,5} = 1,16 + 0,05A - 0,02C - 0,02E + 0,11G - 0,01K \quad R^2 = 0,913$$

$$\alpha_{5,6} = 1,18 - 0,00A + 0,01C - 0,02E + 0,02G - 0,01K \quad R^2 = 0,544$$

Dobijene  $R^2$  vrednosti ukazuju da je većina odgovora adekvatno opisana ovakvim modelima. Izuzetak predstavljaju odgovori  $\alpha_{3,4}$  i  $\alpha_{5,6}$  pa su njihovi modeli kreirani DDE metodologijom.

Izračunati efekti za glavne faktore predstavljeni su u tabeli 44, a matrica preklapanja u tabeli 45.

**Tabela 44.** Faktorski efekti za ispitivane odgovore

Faktori	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{5,6}$
A	0,00	-0,01
d <sub>1</sub>	0,04	0,02
C	0,02	0,02
d <sub>2</sub>	-0,01	0,02
E	-0,09	-0,03
d <sub>3</sub>	-0,05	-0,03
G	0,08	0,03
d <sub>4</sub>	0,05	0,02
d <sub>5</sub>	-0,05	-0,03
K	0,03	0,03
d <sub>6</sub>	0,04	0,02

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); d<sub>1</sub> – *dummy* 1; C – pH vrednost vodene faze; d<sub>2</sub> – *dummy* 2; E – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mM); d<sub>3</sub> – *dummy* 3; G – temperatura kolone (°C); d<sub>4</sub> – *dummy* 4; d<sub>5</sub> – *dummy* 5; K – protok mobilne faze (mL min<sup>-1</sup>); d<sub>6</sub> – *dummy* 6;  $\alpha_{i,j}$  – faktori selektivnosti

\* sivo označena polja prikazuju faktore uključene u podskup S<sub>1</sub>

**Tabela 45.** Matrica preklapanja

	<b>AC</b>	<b>AE</b>	<b>AG</b>	<b>AK</b>	<b>CE</b>	<b>CG</b>	<b>CK</b>	<b>EG</b>	<b>EK</b>	<b>GK</b>
<b>A</b>	0	0	0	0	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3
<b>C</b>	0	-1/3	1/3	-1/3	0	0	0	-1/3	-1/3	-1/3
<b>E</b>	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
<b>G</b>	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>K</b>	-1/3	1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	-1/3	0	0
<b>d<sub>1</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>2</sub></b>	1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3
<b>d<sub>3</sub></b>	-1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>4</sub></b>	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>5</sub></b>	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3
<b>d<sub>6</sub></b>	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3

## DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{3,4}$

### Faza 1

Početni skup  $S_0$  definisan je na sledeći način:

$$S_0 = \{A, C, E, G, K, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

Na osnovu vrednosti faktorskih efekata (tabela 44) definisan je prvi podskup:

$$S_1 = \{E, G, d_3, d_4, d_5\}$$

### Faza 2

Na osnovu matrice preklapanja (tabela 45) izračunat je potencijalni doprinos svake interakcije vrednostima velikih efekata i predstavljen je u tabeli 46.

**Tabela 46.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirani odgovor

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
<b>E</b> -*	-1/3	0	-1/3	1/3	0	-1/3	-1/3	0	0	-1/3
<b>G</b> +	1/3	-1/3	0	1/3	-1/3	0	-1/3	0	-1/3	0
<b>d<sub>3</sub></b> -	1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	-1/3	1/3
<b>d<sub>4</sub></b> +	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	1/3	1/3	-1/3
<b>d<sub>5</sub></b> -	1/3	-1/3	-1/3	-1/3	1/3	-1/3	1/3	-1/3	-1/3	1/3
<b>C<sub>I</sub></b>	3/3**	0	4/3	1/3	-4/3	0	1/3	3/3	0	0
<b>Cd<sub>I</sub></b>	-1/3		3/3		-3/3			3/3		

\* znak faktorskog efekta

\*\*sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije bile su:

$$S_2 = \{AC, AG, CE, EG\}$$

Iz podskupa  $S_2$  izolovane su interakcije koje najviše doprinose velikim *dummy* efektima (tabela 46):

$$S_3 = \{AG, CE, EG\}$$

### Faza 3

Model koji uključuje glavne faktore i odabrane interakcije predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, AG, CE, EG\}$$

Koeficijent determinacije ovakvog modela iznosi 0,982 što predstavlja značajno poboljšanje u odnosu na koeficijent determinacije početnog modela koji je iznosio 0,605.

### Faza 4

Konačno, izvršen je jedan „prolaz“ metode svih mogućih regresija koja je ispitala sve faktore i interakcije uključene u  $S_4$ . Neki od karakterističnih modela predstavljeni su u tabeli 47.

**Tabela 47.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	AG	CE	EG	R <sup>2</sup>	Adj. R <sup>2</sup>
4			X*	X			X	X	0,823	0,752
5		X	X	X	X			X	0,894	0,835
6	X	X	X	X	X			X	0,956	0,923
7	X	X	X	X	X		X	X	0,976	0,959
8	X	X	X	X	X	X	X	X	0,982	0,957

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model



## DDE pristup u kreiranju modela koji opisuje odgovor $\alpha_{5,6}$

### Faza 1

Početni skupovi  $S_0$  i  $S_1$  definisani su na sledeći način:

$$S_0 = \{A, C, E, G, J, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6\}$$

$$S_1 = \{E, G, K, d_3, d_5\}$$

### Faza 2

Na osnovu dobijene strukture preklapanja glavnih faktora i interakcija prikazane u tabeli 45, izračunati su relativni doprinosi interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata i predstavljeni su u tabeli 48.

**Tabela 48.** Relativni doprinos interakcija velikim vrednostima procenljivih efekata ( $C_I$ ) i velikim vrednostima *dummy* efekata ( $Cd_I$ ) za analizirane odgovore

	AC	AE	AG	AK	CE	CG	CK	EG	EK	GK
<b>E</b> –*	–1/3	0	–1/3	1/3	0	–1/3	–1/3	0	0	–1/3
<b>G</b> +	1/3	–1/3	0	1/3	–1/3	0	–1/3	0	–1/3	0
<b>K</b> +	–1/3	1/3	1/3	0	–1/3	–1/3	0	–1/3	0	0
<b>d<sub>3</sub></b> –	–1/3	–1/3	–1/3	–1/3	1/3	1/3	–1/3	–1/3	1/3	–1/3
<b>d<sub>5</sub></b> –	1/3	–1/3	–1/3	–1/3	1/3	–1/3	1/3	–1/3	–1/3	1/3
<b>C<sub>I</sub></b>	–1/3	2/3	4/3**	2/3	–4/3	0	0	1/3	–1/3	1/3
<b>Cd<sub>I</sub></b>	0	2/3	2/3	2/3	2/3	0	0	2/3	0	0

\* znak faktorskog efekta

\*\*sivo označena polja  $C_I$  redova predstavljaju promenljive koje ulaze u podskup  $S_2$ , a siva polja u  $Cd_I$  redovima promenljive koje ulaze u podskup  $S_3$

Identifikovane značajne interakcije uključene su u podskup  $S_2$ :

$$S_2 = \{AE, AG, AK, CE\}$$

Sve interakcije uključene u  $S_2$  doprinose vrednosti *dummy* efekata, pa su one uključene i u skup  $S_3$ . Takođe, skupu  $S_3$  dodata je i interakcija EG jer je primećeno da ona ima isti udeo u *dummy* efektima kao i ostale interakcije (tabela 48):

$$S_3 = \{AE, AG, AK, CE, EG\}$$

### Faza 3

Konačan model predstavljen je u okviru podskupa  $S_4$ :

$$S_4 = \{A, C, E, G, K, AE, AG, AK, CE\}$$

Koeficijent determinacije ovog modela iznosi 1,000 dok je koeficijent determinacije primarno definisanog modela bio  $R^2 = 0,544$ .

### Faza 4

Konačno, izvršen je jedan „prolaz“ metodologije svih mogućih regresija i neki od dobijenih modela predstavljeni su u tabeli 49. U skladu sa principima naslednosti i razuđenosti efekata model sačinjen od faktora C, E, G, K, AE, CE, EG sa vrednostima 0,958 za  $R^2$  i 0,883 za Adj.  $R^2$ , može se smatrati najadekvatnijim.

**Tabela 49.** Pojedini modeli dobijeni metodom svih mogućih regresija

No**	A	C	E	G	K	AE	AG	AK	CE	EG	$R^2$	Adj. $R^2$
5		X*	X		X				X	X	0,834	0,695
6		X	X	X	X				X	X	0,897	0,772
7		X	X	X	X	X			X	X	0,958	0,883
8		X	X	X	X	X		X	X	X	0,988	0,956
9	X	X	X	X	X	X		X	X	X	0,995	0,970
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1,000	0,997

\* znak X predstavlja promenljive koje ulaze u model

\*\* No – broj promenljivih koji je uključen u model

Glavno ograničenje DDE pristupa je činjenica da je on zasnovan na *dummy* efektima, pa dizajni bez *dummy* efekata ili sa malim brojem ovakvih efekata ne mogu da se analiziraju. Međutim, dizajni koji se koriste za testiranje robusnosti u farmaceutskoj analizi obično poseduju svega pet ili šest glavnih faktora, tako da je primena DDE pristupa za analizu Plaket–Burman dizajna sa 12 eksperimenata uvek moguća.

## 8. Zaključak

1. Razvijena je nova funkcija hromatografskog odgovora ( $N_{\text{CRF}}$ ) koja se sastoji od dva individualna člana od kojih jedan procenjuje kvalitet separacije, a drugi ukupnu dužinu trajanja analize. Funkcija je upoređena sa šest prethodno razvijenih funkcija na primeru simuliranih hromatograma i eksperimentalno dobijenih hromatograma u RP–LC i HILIC sistemu. Pokazano je da separacioni član uključen u  $N_{\text{CRF}}$  ima sposobnost da adekvatno meri razdvajanje pikova na baznoj liniji hromatograma čak i u slučajevima asimetričnih pikova i velikih razlika u koncentracijama susednih pikova. Takođe, izbegnuto je maskiranje loše razdvojenih pikova velikim vrednostima faktora rezolucije dobro razdvojenih pikova. Član funkcije koji procenjuje dužinu trajanja analize pokazao je zadovoljavajuću osetljivost na ovaj parametar kvaliteta. Potvrđeno je da težinski koeficijenti uključeni u dizajn funkcije pružaju analitičaru mogućnost da je prilagodi odgovarajućem separacionom problemu u RP–LC i HILIC sistemu.
2. Novorazvijena funkcija uključena je u metodologiju eksperimentalnog dizajna za razvoj i optimizaciju metoda za analizu raloksifena i njegovih nečistoća u RP–LC sistemu. Uspostavljena je kvadratna funkcionalna zavisnost između vrednosti funkcije i ispitivanih eksperimentalnih faktora. Metodologijom površine odgovora identifikovane su sledeće optimalne vrednosti ispitivanih faktora za analizu raloksifena i njegovih nečistoća: acetonitril–4 mM SDS (47:53 V/V), pH mobilne faze podešen na 2,5, temperatura kolone 35 °C. Na isti način,  $N_{\text{CRF}}$  je primenjena za hemometrijski pristup optimizaciji metode za analizu smeše beta agonista i antagonista u HILIC sistemu. Pokazano je da dobijeni matematički modeli na odgovarajući način opisuju ispitivani sistem, pa su metodologijom površine odgovora identifikovani sledeći optimalni uslovi razdvajanja: acetonitril–40 mM rastvor amonijum-acetata u vodi (85 : 15 V/V), pri čemu je pH vodene faze podešen na 5,1.
3. Nova funkcija hromatografskog odgovora unapređena je tako da ima sposobnost da proceni oblik pikova na hromatogramu i označena je sa  $N_{\text{CRF}}^*$ . Procena

oblika pikova od naročito je značaja za adekvatnu kvantifikaciju analiziranih supstanci. Pogodnost funkcije potvrđena je na seriji eksperimentalno dobijenih hromatograma iz analize smeše antidepresiva u HILIC sistemu. Zatim je  $N_{CRF}^*$  upotrebljena kao jedinstveni odgovor sistema za optimizaciju date metode primenom metodologije eksperimentalnog dizajna i metodologije površine odgovora. Dobijene optimalne vrednosti faktora bile su: acetonitril–20 mM rastvor amonijum-acetata u vodi (86 : 14 V/V), pri čemu je pH vodene faze podešen na 6,0.

4. Definisana je nova tehnika matematičkog modelovanja hromatografskih odgovora zasnovana na interpolacionom polinomu sa podeljenim razlikama. Retencioni faktori supstanci iz analize smeše antidepresiva u HILIC sistemu direktno su modelovani u funkciji tri promenljive. Modelovanje u interpolacionim čvorovima izvršeno je sa greškom koja je jednaka nuli. Dobijeni rezultati omogućili su precizno pretraživanje eksperimentalnog prostora i indirektno modelovanje funkcije hromatografskog odgovora koja je modifikovana tako da separacioni član bude funkcija retencionog faktora. Optimizacija je izvršena metodologijom pretraživanja čvorova mreže i identifikovana su dva optimuma: optimum 1 (acetonitril–60 mM rastvor amonijum-acetata u vodi (90 : 10 V/V), pri čemu je pH vodene faze podešen na 5,1) i optimum 2 (acetonitril–60 mM rastvor amonijum-acetata u vodi (90 : 10 V/V), pri čemu je pH vodene faze podešen na 4,8). Oba optimuma eksperimentalno su verifikovana i dobijeno je visoko slaganje sa teorijskim hromatogramima.
5. Kriterijumi za procenu parcijalne i totalne robusnosti primenjeni su za skrining robusnosti optimuma u fazi optimizacije metoda za analizu raloksifen-hidrohlorida i njegovih nečistoća, smeše agonista i antagonista beta receptora i smeše antidepresiva. U slučaju sve tri ispitivane smeše pokazano je da su odabrani optimumi stabilni na male promene eksperimentalnih uslova. Identifikovani su najuticajni faktori koji su kod prve smeše bili sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH vrednost mobilne faze i molaritet

natrijum-dodecilsulfata u vodenoj fazi, a kod druge i treće smeše sadržaj organskog rastvarača i pH vrednost vodene faze.

6. Razvijena je nova metodologija za kreiranje matematičkih modela hromatografskih odgovora koji uključuju dvofaktorske interakcije nakon analize Plaket–Burman dizajnom. Metodologija je verifikovana na primeru testiranja robusnosti metoda za analizu raloksifena i njegovih nečistoća, smeše beta agonista i antagonista beta receptora i smeše antidepresiva. Potvrđeno je da novopredloženi pristup omogućava adekvatno poboljšanje matematičkih modela i identifikaciju dvofaktorskih interakcija koje utiču na stabilnost sistema iz dizajna sa kompleksnom strukturom preklapanja. Modeli predstavljeni samo glavnim faktorima koji su imali veoma male vrednosti koeficijenta determinacije, reda veličine 0,7; 0,6 i 0,5, dopunjeni su sa svega nekoliko interakcija identifikovanih novim pristupom, a vrednosti njihovih koeficijenata determinacije značajno su poboljšane i dostigle su vrednosti preko 0,9.

## 9. LITERATURA

1. Garcia–Alvarez–Coque, M. C., Torres–Lapasio, J. R., Baeza–Baeza, J. J.: Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed–phase liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 2006; 579: 125–145.
2. Cela, R., Ordonez, E. Y., Quintana, J. B., Rodil, R.: Chemometric–assisted method development in reversed–phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1287: 2–22.
3. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation and analytical applications. *J Pharmaceut Biomed* 2011; 56: 141–158.
4. Jančić, B.: *Hemometrijska analiza indinavira, fosinopril-natrijuma, imatinab-mezilata i njihovih nečistoća u farmaceutskim preparatima primenom reversno–fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom*, Magistarska teza, Beograd, 2004.
5. Deming S. N., Morgan S. L.: *Experimental design: a chemometric approach*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 1993.
6. López–Grio, S. J., Vivó–Truyols, G., Torres–Lapasio, J. R., Garcia–Alvarez–Coque, M. C.: Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 2001; 433: 187–198.
7. Carle, G. C.: Determination of chromatographic resolution for peaks of vast concentration differences. *Anal Chem* 1972; 44: 1905–1906.

8. Duarte, R. M. B. O., Duarte, A. C.: A new chromatographic response function for use in size–exclusion chromatography optimization strategies: Application to complex organic mixtures. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 7556–7563.
9. Rivera, K.: A review of criterial functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr R T* 2000; 23: 2097–2121.
10. Cela, R., Barroso, C. G., Pérez–Bustamante, J. A.: Objective functions in experimental and simulated chromatographic optimization: Comparative study and alternative proposal. *J Chromatogr A* 1989; 485: 477–500.
11. Siouffi, A. M., Phan–Tan–Luu, R.: Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2000; 892: 75–106.
12. Cela, R., Martinez, J. A., Gonzalez–Barreiro, C., Lores, M.: Multi–objective optimisation using evolutionary algorithms: its application to HPLC separations. *Chemometr Intell Lab* 2003; 69: 137–156.
13. Berridge, J. C.: Unattended optimization of reversed–phase high–performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm. *J Chromatogr* 1982; 244: 1–14.
14. Glajch, J. L., Kirkland, J. J., Squire, K. M., Minor, J. M.: Optimization of solvent strength and selectivity for reversed–phase liquid chromatography using an interactive mixture–design statistical technique. *J Chromatogr* 1980; 199: 57–79.
15. Dose, E. N.: Off–line optimization of gas chromatographic temperature programs. *Anal Chem* 1987; 59: 2420–2423.



16. Schlabach, T. D., Excoffier, J. L.: Multi-variate ranking function for optimizing separations. *J Chromatogr* 1988; 439: 173–184.
17. Morris, V. M., Hughes, J. G., Marriott, Ph. J.: Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J Chromatogr A* 1996; 755: 235–243.
18. Rozet, E., Lebrun, P., Debrus, B., Boulanger, B., Hubert, P.: Design spaces for analytical methods. *TrAC Trend Anal. Chem* 2013; 42: 157–167.
19. Zolić, A.: *Numerička matematika I*, Matematički fakultet Beograd, Srbija, 2008.
20. Rao, G. S.: *Numerical Analysis* (3rd edn), New Age International (P) Ltd. Publishers, New Delhi, India, 2006.
21. Ryaben’kii, V. S., Tsynkov, S. V.: *A Theoretical Introduction to Numerical Analysis*, Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, LLC, Oxford, United Kingdom 2007.
22. Dewe, W., Marini, R. B., Chiap, P., Hubert, Ph., Crommen, J., Boulanger, B.: Development of response models for optimising HPLC methods. *Chem Intell Lab* 2004; 74: 263–268.
23. Lebrun, P., Govaerts, B., Debrus, B., Ceccato, A., Caliaro, G., Hubert, Ph, Boulanger, B.: Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chem Intell Lab* 2008; 91: 4–16.
24. European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe 7th ed, 2011.

25. The United States Pharmacopoeia 36, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Md., 2013.
26. Mason, R. L., Gunst, R. F., Hess, J. L.: *Statistical Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey 2003.
27. Medenica, M., Jancic, B., Ivanovic, D., Malenovic, A.: Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity. *J Chromatogr A* 2004; 1031: 243–248.
28. Ivanovic, D., Medenica, M., Jancic, B., Malenovic, A., Markovic, S.: Chemometrical approach in fosinopril–sodium and its degradation product fosinoprilat analysis. *Chromatographia* 2004; 60: 87–92.
29. Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., Massart, D. L.: Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *J Pharmaceut Biomed* 2001; 24: 723–753.
30. Mašković, M., Jančić–Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of liquid chromatographic method robustness by use of Plackett–Burman design. *Acta Chromatogr* 2010; 22: 281–296.
31. Rakic, T., Vemic, S., Jancic–Stojanovic, B., Medenica, M.: Multi-level robustness evaluation approach: from robustness criterion to adapted algorithm of Dong. *Chromatographia* 2013; 76: 267–277.
32. Vanbel, P. F., Tilquin, B. L., Schoenmakers, P. J.: Criteria for developing rugged high-performance liquid chromatographic methods. *J Chromatogr A* 1995; 697: 3–16.

33. Goga-Remont, S., Heinisch, S., Rocca, J. L.: Use of optimization software to determine rugged analysis conditions in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; 868: 13–29.
34. de Aguiar, P.F., Vander Heyden, Y., Massart, D. L.: Study of different criteria for the selection of a rugged optimum in high performance liquid chromatography optimisation. *Anal Chim Acta* 1997; 348: 223–235.
35. Bolanča, T., Cerjan-Stefanović, S., Luša, M., Ukić, S., Rogošić, M.: Application of different artificial neural networks retention models for multi-criteria decision-making optimization in gradient ion chromatography. *Separ Sci Technol* 2010; 45: 236–243.
36. Jančić Stojanović, B.: Factorial-Based Designs in Liquid Chromatography. *Chromatographia* 2013; 76: 227–240.
37. Lin, D. K. J., Draper, N. R.: Generating alias relationships for two-level Plackett and Burman designs. *Comput Stat Data An* 1993; 15: 147–157.
38. Lawson, J.: Regression analysis of experiments with complex confounding patterns guided by the alias matrix. *Comput Stat Data An* 2002; 39: 227–241.
39. Hamada, M., Wu, C. F. J.: Analysis of designed experiments with complex aliasing. *J Qual Technol* 1991; 24: 130–137.
40. Rakic, T., Malenovic, A., Jancic-Stojanovic, B., Ivanovic, D., Medenica, M.: Avoiding the false negative results in LC method robustness testing by modifications of the algorithm of Dong and dummy factor effects approach. *Chromatographia* 2012; 75: 397–401.

41. Vanbel, P. F., Schoenmakers, P. J.: Selection of adequate optimization criteria in chromatographic separations. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 1283–1289.
42. Bylund, D., Bergens, A., Jacobsson, S. P.: Optimisation of chromatographic separations by use of a chromatographic response function, empirical modelling and multivariate analysis. *Chromatographia* 1997; 44: 74–80.
43. Vanbel, P. F.: Development of flexible and efficient strategies for optimizing chromatographic separations. *J Pharmaceut Biomed* 1999; 21: 603–610.
44. Torres–Lapasio, J. R., Rose, M., Bosch, E., Garca–Alvarez–Coque, M. C.: Interpretive optimization strategy applied to the isocratic separation of phenols by reversed–phase liquid chromatography with acetonitrile–water and methanol–water mobile phases. *J Chromatogr A* 2000; 886: 31–46.
45. Vivo–Truyols, G., Torres–Lapasio, J. R., Garcia–Alvarez–Coque, M. C.: Complementary mobile–phase optimization for resolution enhancement in high–performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; 876: 17–35.
46. Dharmadi, Y., Gonzalez, R.: A better global resolution function and a novel iterative stochastic search method for optimization of high–performance liquid chromatographic separation. *J Chromatogr A* 2005; 1070: 89–101.
47. Vivo–Truyols, G., Concha–Herrera, V., Torres–Lapasio, J. R., Garcia–Alvarez–Coque, M. C.: Robust interpretive optimisation in high–performance liquid chromatography considering uncertainties in peak position. *J Chromatogr A* 2005; 1096: 123–132.

48. García–Lavandeira, J., Losada, B., Martínez–Pontevedra, J. A., Lores, M., Cela, R.: Computer–assisted method development in liquid chromatography–mass spectrometry: New proposals. *J Chromatogr A* 2008; 1208: 116–125.
49. Bolanča, T., Cerjan–Stefanović, S., Luša, M., Ukić, S., Rogošić, M.: Evaluation of separation in gradient elution ion chromatography by combining several retention models and objective functions. *J Sep Sci* 2008; 31: 705–713.
50. Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo–Young, M., Douglas, P. L.: Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse–phase HPLC. *Anal Biochem* 2008; 383: 93–102.
51. Bostyn, S., Cagnon, B., Fauduet, H.: Optimization by the simplex method of the separation of phenolic acids by high–performance liquid chromatography in wastewater olive and sugar beet vinasse. *Talanta* 2009; 80: 1–7.
52. Iuliani, P., Carlucci, G., Marrone, A.: Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters. *J Pharmaceut Biomed* 2010; 51: 46–55.
53. Duarte, R. M. B. O., Duarte, A. C.: Optimizing size–exclusion chromatographic conditions using a composite objective function and chemometric tools: Application to natural organic matter profiling. *Anal Chim Acta* 2011; 688: 90–98.
54. Duarte, R. M. B. O., Matos, J. T. V., Duarte, A. C.: A new chromatographic response function for assessing the separation quality in comprehensive two–dimensional liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2012; 1225: 121–131.

55. Wang, J. C., Wu, C. F.: A hidden projection property of Plackett–Burman and related designs. *Stat Sinica* 1995; 5: 235–250.
56. Lin, D. K. J.: Spotlight interaction effects in main–effect plans: a supersaturated design approach. *Qual Engineering* 1998; 1: 133–139.
57. Cela, R., Martinez, E., Carro, A. M.: Supersaturated experimental designs. New approaches to building and using it – Part I. Building optimal supersaturated designs by means of evolutionary algorithms. *Chemometr Intell Lab* 2000; 52: 167–182.
58. Cela, R., Martinez, E., Carro, A. M.: Supersaturated experimental designs. New approaches to building and using it – Part II. Solving supersaturated designs by genetic algorithms. *Chemometr Intell Lab* 2001; 57: 75–92.
59. Dejaegher, B., Capron, X., Vander Heyden, Y.: Fixing Effects and Adding Rows (FEAR) method to estimate factor effects in supersaturated designs constructed from Plackett–Burman designs. *Chemometr Intell Lab* 2007; 85: 220–231.
60. Dejaegher, B., Dumarey, M., Caprona, X., Bloomfield, M. S., Vander Heyden, Y.: Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim Acta* 2007; 595: 59–71.
61. Dejaegher, B., Capron, X., Vander Heyden, Y.: Generalized FEAR method to estimate factor effects in two–level supersaturated designs. *J Chemometr* 2007; 21: 303–323.
62. Rais, F., Kamoun, A., Chaabouni, M., Claeys–Bruno, M., Phan–Tan–Luu, R., Sergent, M.: Supersaturated design for screening factors influencing the preparation of sulfated amides of olive pomace oil fatty acids. *Chemometr Intell Lab* 2009; 99: 71–78.

63. Magallanes, J. F., Olivieri, A. C.: The effect of factor interactions in Plackett–Burman experimental designs: Comparison of Bayesian–Gibbs analysis and genetic algorithms. *Chemometr Intell Lab* 2010; 102: 8–14.
64. Alpert, A. J.: Hydrophilic–interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr A* 1990; 499:177–196.
65. McCalley, D. V.: Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 3408–3417.
66. Hemström, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784–1821.
67. Bogusław, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 231–247.
68. McCalley, D. V.: 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.
69. Salzer, H. E.: Divided differences for functions of two variables for irregularly spaced Arguments. *Numer Math* 1964; 6: 68–77.
70. Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., Flannery, B. P.: *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing* (3rd edn), Cambridge Press, Cambridge, United Kingdom, 2007.
71. Neamtu, M.: Multivariate divided difference. I. Basic properties. *SIAM J Numer Anal* 1992; 29: 1435–1445.

72. de Boor, C.: *A multivariate divided difference in Approximation theory VIII*, vol.1. World Sci. Publishing, River Edge, NJ, USA, 1995.

73. Kunkle, T.: Multivariate differences, polynomials, and splines. *J Approx Theory* 1996; 84: 290–314.

74. Rabut, C.: Multivariate divided differences with simple knots. *SIAM J Numer Anal* 2000; 38: 1294–1311.



## 10. PRILOG

### NAUČNE PUBLIKACIJE OBJAVLJENE IZ DOKTORSKE DISERTACIJE U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

1. Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Kostić, N., Vemić, A., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: application to LC separation of raloxifene and its impurities. *Talanta* 2011; 85: 1453–1460. **M21**
2. **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Demasking large dummy effects approach in revealing important interactions in Plackett–Burman experimental design. *J Chemometr* 2012; 26: 518–525. **M21**
3. **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Improved chromatographic response function in HILIC analysis: application to mixture of antidepressants. *Talanta* 2012; 98: 54–61. **M21**
4. **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Jovanovic, M., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Evaluation of seven chromatographic response functions on simulated and experimentally obtained chromatograms in hydrophilic interaction liquid chromatography system. *Anl Lett* 2013; 46: 1198–1212. **M23**

### NAUČNE PUBLIKACIJE OBJAVLJENE IZ DOKTORSKE DISERTACIJE U KNJIGAMA

5. Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Malenović A. *Robustness of Liquid Chromatography Method: How to Achieve it and How to Confirm it?* In: *Liquid Chromatography: Principles, Technology and Applications*, Ed. Ramos, F. NOVA Science Publishers, In press **M13**

## OSTALE NAUČNE PUBLIKACIJE

6. Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., **Rakić, T.**, Medenica, M.: Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1263–1296. **M21**
7. **Rakić, T.**, Malenović, A., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Avoiding the false negative results in LC method robustness testing by modifications of the algorithm of Dong and dummy factor effects approach. *Chromatographia* 2012; 75: 397–401. **M23**
8. Jovanović, M., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Malenović A., Ivanović D., Medenica, M.: Assessment of  $\beta$ -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography utilizing Box–Behnken design. *J Sep Sci* 2012; 35: 1424–1431. **M22**
9. Jančić Stojanović, B., Vemić, A., **Rakić, T.**, Kostić, N., Malenović, A.: Razvoj metode titracije po Karl–Fišeru primenom tzv. *Quality by design* koncepta. *Hemijska industrija* 2012; 66: 659–665. **M23**
10. Malenović, A., Kostić, N., Vemić, A., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B.: Multi-criteria decision making approach for the optimization of atorvastatin and its impurities separation by micellar liquid chromatography. *Arhiv za farmaciju* 2012; 62: 191–207. **M53**
11. Kasagić Vujanović, I., Jovanović, M., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Ivanović, D: Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna. *Arhiv za farmaciju* 2012; 62: 475–488. **M53**
12. Vemić, A., Malenović, A., **Rakić, T.**, Kostić, N., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Physicochemical factors governing the partition of

- pramipexole and its five impurities in microemulsion liquid chromatographic systems. *J Braz Chem Soc* 2012; 23: 2084–2092. **M22**
13. **Rakić, T.**, Vemić, S., Jančić Stojanović, B., Medenica, M.: Multilevel robustness evaluation approach: from robustness criterion to adapted algorithm of Dong. *Chromatographia* 2013; 76: 267–277. **M23**
14. Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Slavković, B., Kostić, N., Vemić, A., Malenović, A.: Systematical approach in evaluation of LC method for determination of raloxifene hydrochloride and its impurities employing experimental design. *J Pharmaceut Biomed* 2013; 3: 45–52.
15. **Rakić, T.**, Jovanović, M., Dumić, A., Pekić, M., Ribić, S., Jančić Stojanović, B.: Robust optimization of psychotropic drug mixture separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Acta Chim Slov* 2013, Accepted paper **M22**
16. Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162 **M23**
17. Vemić, A., Malenović, A., Rakić, T., Kostić, N., Jančić Stojanović, B.: Chemometrical tools in the study of azole antifungals retention behavior. *J Chromatogr Sci* 2013, Accepted paper **M23**
18. Kasagić Vujanović, I., Malenović, A., Jovanović, M., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Ivanović, D.: Chemometrically assisted optimization and validation of LC method for the analysis of Itraconazole and its impurities. *Acta pharmaceut* 2013; 63: 159 – 153. **M23**
19. Kostić, N., Dotsikas, Y., Malenović, A., Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Ivanović, D., Medenica, M.: Stepwise optimization approach for improving LC–

**USMENA IZLAGANJA NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG I NACIONALNOG ZNAČAJA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B.: Advancement in optimization achieved by newly developed chromatographic response function. *EUROanalysis 16, European Conference on Analytical Chemistry, Challenges in Modern Analytical Chemistry*, Belgrade, Serbia, 2011.
2. **Rakić, T.**, Đenić, A., Marić, M., Stanimirović, Z., Jančić Stojanović, B.: Razvoj novih modela predviđanja retencionog ponašanja u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija. *Treći simpozijum Matematika i primene*, Beograd, Srbija, 2012.

**RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG I NACIONALNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU IZ DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Slavković, B., Kostić, N.: Identification of the significant effects in experiments where the main factors are partially confounded by interactions. *7<sup>th</sup> International Conference on Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications*, Chania Crete, Greece, 2011.
2. **Rakić, T.**, Stanimirović, Z., Đenić, A., Marić, M., Jovanović, M., Jančić Stojanović, B.: Modeling of chromatographic responses by interpolation polynomial with divided differences. *VIII Colloquium Chemometricum Mediterraneum*, Bevagna, Italy, 2013.

**OSTALI RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG I NACIONALNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU**

3. **Rakić, T.**, Malenović, A., Jančić Stojanović B.: Evaluacija metode tečne hromatografije za analizu ropinirola i njegove nečistoće nastale oksidacijom. *V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, 2010.
4. Jovović, M., Kostić, N., **Rakić, T.**, Vemić, A, Jančić Stojanović, B., Malenović, A.: Ispitivanje stabilnosti tropikamida i benzalkonijum-hlorida primenom tečne hromatografije. *I Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem*, Bečići, 2011.
5. Jovović, M., Kostić, N., **Rakić, T.**, Vemić, A, Jančić Stojanović, B., Malenović, A.: Značaj ispitivanja nečistoća u farmaceutskim supstancama i gotovim proizvodima. *I Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem*, Bečići, 2011.
6. Malenović, A., Vemić, A, **Rakić, T.**, Kostić, N., Jančić Stojanović, B.: Partition behavior of pramipexole and its five impurities in microemulsion liquid chromatography. *36<sup>th</sup> International Symposium on High-performance liquid chromatography and related techniques*, Budapest, Hungary, 2011.
7. Jančić Stojanović, B., **Rakić, T.**, Vemić, S., Kostić, N., Vemić, A, Malenović, A.: Robustness criterion vs. experimental design in robustness testing of RP-HPLC method for ramipril and its impurities determination. *36<sup>th</sup> International Symposium on high-performance liquid chromatography and related techniques*, Budapest, Hungary, 2011.
8. Vemić, A., Malenović, A., **Rakić, T.**, Kostić, N., Jančić Stojanović, B.: Cluster analysis of factors governing the retention in microemulsion liquid chromatographic systems. *EUROanalysis 16, European Conference on*

*Analytical Chemistry, Challenges in Modern Analytical Chemistry*, Belgrade, Serbia, 2011.

9. Malenović, A., Vemić, A., Kostić, N., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B.: Optimization of MELC analysis of pramipexole and its impurities. *Fifth Congress of Pharmacy of Macedonia with International Participation*, Ohrid, R. Macedonia, 2011.
10. Jančić Stojanović, B., Marković, B., Malenović, A., **Rakić, T.**, Vemić, A., Kostić, N.: Central composition design in separation of ramipril and hydrochlorothiazide. *Fifth Congress of Pharmacy of Macedonia with International Participation*, Ohrid, R. Macedonia, 2011.
11. Stojanović, B., **Rakić, T.**, Šober, M., Kasagić Vujanović, I., Ivanović, D.: QbD principles in validation of LC method for raloxifene and its impurities determination. *II Kongres farmaceuta BiH sa međunarodnim učesćem*, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 2011.
12. Jovanović, M., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Malenović, A.: Assessment of  $\beta$ -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying Box – Behnken design. *The XXXV Symposium chromatographic methods of investigating the organic compounds*, Szczyrk, Poland, 2012.
13. Pekić, M., Ribić, S., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B.: Funkcije hromatografskog odgovora u rešavanju optimizacionih problema u tečnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija. *Treći simpozijum Matematika i primene*, Beograd, 2012.
14. **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Jovanović, M.: D-optimal design for simultaneous method development on silica, cyano and diol column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *VIII Colloquium Chemometricum Mediterraneum*, Bevagna, Italy, 2013.

15. Jovanović, M., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B.: The investigation of the retention mechanisms and retention behavior of basic drugs on five polar columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *9<sup>th</sup> Balaton Symposium on high-performance separation methods*, Siofok, Hungary, 2013.
16. Maksić, J., Jovanović, M., Popović, I., **Rakić, T.**, Jančić Stojanović, B., Ivanović, D.: Olopatidine and its geometric isomer determination in hydrophilic interaction liquid chromatography. *9<sup>th</sup> Balaton Symposium on high-performance separation methods*, Siofok, Hungary, 2013.

## 11. BIOGRAFIJA AUTORA

Tijana Rakić rođena je u Aranđelovcu 1985. godine. Osnovnu školu „Vojislav Voka Savić“ i gimnaziju završila je u Lazarevcu. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je 2004. godine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,94. Dobitnik je Nagrade Univerziteta u Beogradu za Studenta generacije Farmaceutskog fakulteta i Nagrade Kruna uspeha za najboljeg studenta Univerziteta u Beogradu. U toku studija bila je dobitnik Stipendije Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, Stipendije grada Beograda talentovanim studentima, Stipendije fonda Mihajlo Pupin, Stipendije fonda za mlade talente Republike Srbije i Eurobank EFG stipendije za najbolje studente Srbije. Bila je jedan od osnivača i predsednik Centra za naučno–istraživački rad studenata Farmaceutskog fakulteta, Koordinator tima za nauku i međunarodnu saradnju Studentskog parlamenta Farmaceutskog fakulteta i član Komisije za nauku Studentskog parlamenta Univerziteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije upisala je školske 2010/11. godine. Od januara 2011. godine zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu kao istraživač saradnik na Projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije broj 172052. Kao doktorand učestvovala je u realizaciji praktične nastave na Farmaceutskom fakultetu u okviru predmeta Instrumentalne metode, Farmaceutska regulativa u kontroli lekova, Eksperimentalni dizajn u farmaceutskoj analizi i Farmaceutska analiza. Bila je komentor pet studentskih istraživačkih radova. Pohađala je školu eksperimentalnog dizajna (eng. *School of Experimental Design*) u klasi profesora Rikarda Leardija, septembra 2012. godine u Đenovi (Italija).

Do sada je objavila 16 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja, jedno poglavlje u monografiji od međunarodnog značaja i 2 rada u časopisima nacionalnog značaja. Održala je 2 usmena izlaganja na skupovima od međunarodnog i nacionalnog značaja i učestvovala sa 16 naučnih radova saopštenih na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampanih u izvodu.

Tečno govori engleski i italijanski jezik i služi se francuskim i španskim jezikom.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а      Тијана Ракић

број уписа

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хеометријско унапређење развоја метода течне хроматографије кроз математичко моделовање и нове функције хроматографског одговора

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.5.2013. године

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора    Тијана Ракић

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада            Хемометријско унапређење развоја метода течне  
хроматографије кроз математичко моделовање и нове  
функције хроматографског одговора

Ментор    доц. др Биљана Стојановић

Потписани    Тијана Ракић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 20.5.2013. године



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Хемометријско унапређење развоја метода течне хроматографије кроз математичко моделовање и нове функције хроматографског одговора

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.5.2013. године



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а      Тијана Ракић

број уписа

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хеометријско унапређење развоја метода течне хроматографије кроз математичко моделовање и нове функције хроматографског одговора

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.5.2013. године

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора    Тијана Ракић

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада            Хемометријско унапређење развоја метода течне  
хроматографије кроз математичко моделовање и нове  
функције хроматографског одговора

Ментор    доц. др Биљана Стојановић

Потписани    Тијана Ракић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 20.5.2013. године

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Хемометријско унапређење развоја метода течне хроматографије кроз математичко моделовање и нове функције хроматографског одговора

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.5.2013. године

