



ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени подобности студента, теме и ментора за израду докторске дисертације

1. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Орган који је именовео комисију: Научно-наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци

Датум именовања комисије: 11.06.2024. године

Број одлуке: 18/3.456/24

Чланови комисије:

1. Анђелка Рачић	доцент	Фармацеутска технологија и козметологија
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци		предсједник
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
2. Мирза Дедић	ванредни професор	Аналитика лијекова
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Фармацеутски факултет Универзитета у Сарајеву		члан
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
3. Ервина Бечић	ванредни професор	Аналитика лијекова
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Фармацеутски факултет Универзитета у Сарајеву		члан
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији

2. ПОДАЦИ О СТУДЕНТУ

Име, име једног родитеља, презиме: Дарија (Милисав) Кнежевић Ратковић

Датум рођења: 21.12.1991. године

Мјесто и држава рођења: Сански Мост, Босна и Херцеговина					
2.1. Студије првог циклуса или основне студије или интегрисане студије					
Година уписа:	2010	Година завршетка:	2015	Просјечна оцјена током студија:	9,58
Универзитет: Универзитет у Бањој Луци					
Факултет/и: Медицински факултет					
Студијски програм: Фармација					
Стечено звање: магистар фармације					
2.2. Студије другог циклуса или мастер студије					
Година уписа:	/	Година завршетка:	/	Просјечна оцјена током студија:	/
Универзитет: /					
Факултет/и: -/					
Студијски програм: /					
Назив завршног рада другог циклуса или мастер тезе, датум одбране: /					
Ужа научна област завршног рада другог циклуса или мастер тезе: /					
Стечено звање: /					
2.3. Студије трећег циклуса					
Година уписа:	2018	Број ECTS остварених до сада:	120	Просјечна оцјена током студија:	9,35
Факултет/и: Медицински факултет					
Студијски програм: Биомедицинске науке					
2.4. Приказ научних и стручних радова студента					
РБ	Подаци о референци				Категорија ¹
1.	Knežević Ratković D , Kukobat R, Kasagić-Vujanović I. Retention mechanisms of amitriptyline and its impurities on amide, amino, diol, and silica columns in hydrophylic interaction liquid chromatography. <i>Journal of Separation Science</i> . 2024; 47:2300949. https://doi.org/10.1002/jssc.202300949				
<i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i> Овај рад свеобухватно истражује ретенционе механизме амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G на амидној, аминок, диолној и силика стационарној					

¹ Категорија се односи на оне часописе и научне скупове који су категорисани у складу са Правилником о публикавању научних публикација („Службени гласник РС”, бр. 77/17) и Правилником о мјерилима за остваривање и финансирање Програма одржавања научних скупова („Службени гласник РС”, бр. 102/14) односно припадност рада часописима индексираним у свјетским цитатним базама.

фази. Двојни HILIC/РP-HPLC механизам развијен је на амидној, диолној и силика колони и израчунате су тачке прелаза између HILIC и РP-HPLC региона. Допринос механизма адсорпције и партиције укупном ретенционом механизму процијењен је коришћењем Python софтвера у HILIC и РP-HPLC регионима. Утврђено је да катјонско-измјењивачки ретенциони механизам доминира у укупном ретенционом механизму јонизованих испитиваних једињења у силика колони, те да се задржавање ових једињења повећава са повећањем рН вриједности мобилне фазе. Утицаји садржаја ацетонитрила, јонске јачине пуфера и рН вриједности, заједно са њиховим интеракцијама на задржавање јонизованих испитиваних једињења у силика колони, процијењени су употребом хеометријског приступа. Садржај ацетонитрила је показао најзначајнији утицај на ретенционе механизме испитиваних једињења.

РБ	Подаци о референци	Категорија
2.	Knežević Ratković D, Kasagić-Vujanović I. Chemometric approach in the analysis of retention mechanisms of amitriptyline and its impurities in hydrophilic interaction liquid chromatography. V Kongres magistara farmacije Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, 2023: 39-40	

Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):

Прелиминарна испитивања показала су да повећање садржаја ацетонитрила у мобилној фази, смањење јонске јачине пуфера и пораст рН вриједности мобилне фазе доприносе дужем задржавању испитиваних једињења у силика HILIC стационарној фази. Примјеном хеометријског приступа процијењен је утицај свих испитиваних фактора и њихових међуфакторских интеракција на задржавање испитиваних једињења. Статистичка анализа добијених резултата открила је да ретенциони механизми базних једињења на силика стационарној фази највише зависе од: садржаја ацетонитрила у мобилној фази и јонске јачине пуфера (ретенционо вријеме се продужава са порастом садржаја ацетонитрила и смањењем јонске јачине пуфера). Од двофакторских интеракција значајне су: садржај ацетонитрила у мобилној фази – јонска јачина пуфера и јонска јачина пуфера – рН вриједност мобилне фазе.

РБ	Подаци о референци	Категорија
3.	Knežević Ratković D, Kasagić-Vujanović I. Retention mechanisms of amitriptyline and its impurities in hydrophilic interaction liquid chromatography. XVI Međunarodni naučni skup Contemporary Materials, Banja Luka 2023: 82	

Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):

Течна хроматографија хидрофилних интеракција (енг. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) постала је метода избора за анализу малих поларних молекула. Ретенциони механизми у HILIC систему су комплексни и укључују распоdjелу испитиваних једињења између мобилне и стационарне фазе, адсорпцију испитиваних једињења на површину стационарне фазе, јонску измјену и хидрофобне интеракције. Циљ овог рада је испитивање ретенционих механизма амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G на амидној, аминок, диолној и силика стационарној фази. У HILIC региону, механизам распоdjеле био је доминантан само на аминок стационарној фази, док је механизам адсорпције доминирао на преосталим стационарним фазама. Објашњење за овакве резултате лежи у чињеници да механизам адсорпције не може доминирати на стационарним фазама које носе истоимено наелектрисање као и

испитивана једињења због чега је у том случају доминантан процес расподеле.		
РБ	Подаци о референци	Категорија
4.	Kasagić-Vujanović I, Knežević D. Design of experiments in optimization and validation of hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and its impurities, <i>Acta Chromatographica</i> 2021; 1:1-12.	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>Употребом <i>Design of Experiments</i> (DoE) развијена је HILIC метода за анализу амлодипин-бесилата и његових специфичних нечистоћа (D, E и F). У току развоја методе за процес оптимизације кориштен је Vox-Behnken дизајн и Derringer функција пожељних одговора. Њиховом употребом и анализом, а на основу добијених математичких модела и графичких процедура (3 D графикони), идентификовани су оптимални хроматографски услови раздвајања испитиваних једињења. Испитани су и остали параметри валидације методе. Овом методологијом развијена је брза, економична, специфична, тачна, прецизна и осјетљива метода за контролу квалитета готових производа који садрже амлодипин-бесилат.</p>		
РБ	Подаци о референци	Категорија
5.	Kasagić-Vujanović I, Gagić Ž, Okuka N, Knežević D. Quality control of distilled water used for reconstitution of powders for oral suspension in pharmacies on the territory of Bosnia and Herzegovina. <i>Contemporary Materials</i> 2019; 10(1):47-55	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>У овом раду су приказани резултати контроле квалитета дестиловане воде која се користи за реконституцију прашкова за израду оралних суспензија, обично намијењених педијатријској популацији. Не постоји јасно дефинисан рок трајања и упутство за складиштење ове врсте воде. Проведене анализе су потврдиле да поједине апотеке на територији БиХ користе техничку дестиловану воду, али и дестиловану воду која не испуњава услове квалитета прописане Европском фармакопејом. Испитани узорци воде нису имали адекватно обиљежену амбалажу (датум производње и рок трајања). Резултати су показали да су од укупно 10 узорака 2 узорка имала проводљивост већу од дозвољене, код 3 узорка био је прекорачен лимит за тешке метале, а 2 узорка су показала присуство оксидабилних супстанци. Од свих испитаних узорака, само један узорак је испуњавао микробиолошке критеријуме за пречишћену воду. На основу ових резултата претпоставља се да се у многим апотекама широм земље користи неадекватна дестилована вода која може угрозити стабилност фармацеутских препарата и безбједност пацијената.</p>		
РБ	Подаци о референци	Категорија
6.	Kasagić-Vujanović I, Knežević D. Development and validation of a HILIC method for analysis of amlodipine besylate and its impurities. IV Kongres farmaceuta BiH sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, 2019; 326-327	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>У овом раду је приказана примјена експерименталног дизајна за развој брзе HILIC методе која се може врло поуздано примјењивати у контроли квалитета готових производа са амлодипин-бесилатом. У оквиру процеса оптимизације, детаљно је приказана анализа Derringer функције пожељних одговора (начин статистичке и графичке анализе) са</p>		

одабиром оптималних услова анализе. Детаљно су приказни и сљедећи кораци: испитивање робусности, специфичности, линеарности, тачности, прецизности и осјетљивости методе.

РБ	Подаци о референци	Категорија
7.	Kasagić-Vujanović I, Jančić-Stojanović B, Knežević D , Ivanović D. Investigation of the retention mechanisms of amlodipine besylate, bisoprolol fumarate and their impurities on three different HILIC columns. Arhiv za farmaciju 2018; 68(3):401-402	

Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):

Циљ овог рада био је да се одреде механизми раздвајања испитиваних једињења коришћењем партиционих и адсорпционих модела. Раздвајање је извршено на три HILIC колоне: силика, аминок и диолна, с мобилном фазом састава ацетонитрил–50 mmol/L водени раствор пуфера (pH 4,0 подешена са концентрованом сирћетном киселином), у односу који је варирао од 84:16 до 96:4 (V/V). UV детекција вршена је на 230 nm, запремина ињектовања била је 20 µL, брзина протока мобилне фазе 1 mL/min и температура колоне 30°C. Веће вриједности R² имали су партициони модели за сва испитивана једињења на аминок колони – било је неопходно обезбједити већу концентрацију соли пуфера, те на тај начин сузбити електростатичко одбијање испитиваних једињења. Веће вриједности R² имали су адсорпциони модели за сва испитивана једињења на силика и диолној колони. На све три колоне закључено је да са повећавањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази продужава ретенционо вријеме свих испитиваних једињења.

РБ	Подаци о референци	Категорија
8.	Kasagić-Vujanović I, Knežević D , Forsdahl G, Jančić-Stojanović B. QbD oriented development and validation of the HILIC method for the analysis of amitriptyline hydrochloride and its impurities. Arhiv za farmaciju 2018; 68(3):403-404	

Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):

Циљ овог рада био је да се примјеном QbD концепта развије HILIC метода за контролу квалитета таблета са амитриптилином. Програм MODDE[®] коришћен је за креирање плана експеримента, статистичку обраду резултата, те за креирање простора знања и простора дизајна. Као колони кориштена је ZORBAX-NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm величина честица), мобилна фаза: ацетонитрил–60 mM раствор амонијум ацетата (pH 4,5 подешена концентрованом сирћетном киселином) у односу 92,5:7,5 (V/V). Температура колоне била је 30°C, проток мобилне фазе 1 mL/min, таласна дужина одређивања 254 nm. За процес оптимизације методе коришћен је Vox-Behnken дизајн, а као критични параметри коришћени су: садржај ацетонитрила у мобилној фази, pH вриједност воденог раствора пуфера и концентрација амонијум-ацетата. Пројекција робусности методе извршена је употребом фракционог факторског дизајна (FFD 2⁴⁻¹) а затим су испитани и остали параметри валидације: селективност, линеарност, тачност, прецизност и осјетљивост - одређени су лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ).

РБ	Подаци о референци	Категорија
9.	Kasagić-Vujanović I, Gagić Ž, Okuka N, Knežević D . Testing of the quality of distilled water used for syrup reconstitution in pharmacies on the territory of Bosnia and Herzegovina. XI International scientific conference	

	contemporary materials, Banja Luka 2018.	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>У овом раду су приказани резултати испитивања квалитета воде која се користи у апотекама. Прегледом законске регулативе утврђено је да не постоји јасно дефинисан временски период и начин складиштења ове врсте воде. Анализе су спроведене узорковањем дестиловане воде у апотекама на територији Босне и Херцеговине. Испитани узорци воде нису имали адекватан физичко-хемијски састав какав је захтјеван прописима Европске фармакопеје. Од свих испитаних узорака, 20% је имало проводљивост већу од дозвољене, 30% прекорачену границу за тешке метале, а 20% узорака је показало присуство оксидирајућих супстанци. На основу резултата ових анализа може се претпоставити да се у многим апотекама користи неадекватна дестилована вода која би могла да угрози стабилност фармацеутског препарата и безбједност пацијента.</p>		
РБ	Подаци о референци	Категорија
10.	Kasagić-Vujanović I, Knežević D , Vukičević N. Stress degradation of lisinopril dehydrate in different aqueous media. Contemporary Materials. 2017; 8(2):164-171	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>У складу са савременим трендовима фармацеутске анализе, у овом раду је испитивана хемијска стабилност лизиноприла под утицајем различитих <i>stress</i> агенаса, као што су: дестилована вода, 0,1М НСl, 0,1М и 0,01М NaOH и 3% раствор водоник пероксида. Такође, да би се јасно дефинисао утицај повишене температуре на стабилност лизиноприла, анализе су, са свим испитиваним агенсима, урађене на 25°C и 50°C. Метода кориштена за испитивање стабилности била је течна хроматографија високих перформанси (HPLC). Добијени резултати указују да је лизиноприл најосетљивији на базну хидролизу, гдје се на 25°C, у првом минуту, разграђује ~100%. У разградњи лизиноприла у неутралном и киселом медијуму, нечистоћа D је идентификована као главни производ разградње. У овом раду су утврђени и кинетички параметри (константна брзине деградације, полувријеме деградације, енергија активације и други), што је омогућило јасно дефинисање његове стабилности и идентификацију продукта разградње под утицајем различитих <i>stress</i> агенаса.</p>		
РБ	Подаци о референци	Категорија
11.	Knežević D , Kasagić-Vujanović I. Testing of the influence of media's pH value on the solubility and partition coefficient of the acetylsalicylic acid. IFMBE Proceedings 2017; 62:368-371	
<p><i>Кратак опис садржаја (до 150 ријечи):</i></p> <p>Циљ овог рада био је да се испита утицај pH вриједности медијума на степен растворљивости ацетилсалицилне киселине (АСК) те да се одреди партициони коефицијент испитиване супстанце. Медијуми су бирано тако да симулирају гастроинтестиналне сокове на мјестима апсорпције АСК након оралне примјене. Растворљивост АСК у 3 медијума pH вриједности 1,2; 5,5 и 7,4 одређивана је кориштењем UV спектрофотометријске методе. Подаци о партиционом коефицијенту добијени су кориштењем <i>shake-flask</i> методе, при чему су као поларне фазе кориштени наведени медијуми док се као органска фаза користио хлороформ. Студија је показала да и на растворљивост и на партициони коефицијент значајно утиче pH вриједност: растворљивост расте са порастом pH вриједности до вриједности која је нижа од pKa</p>		

вриједности АСК.		
Оцјена релевантности научне и стручне активности кандидата за предложену тему дисертације:		
Да ли студент испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ

3. ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме: Ирена Касагић-Вујановић
Академско звање: ванредни професор
Научно поље и ужа научна област: фармација, аналитика лијекова
Матична институција стицања избора у звање: Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци
<p>Биографија (до 300 ријечи):</p> <p>Ирена Касагић-Вујановић рођена је 08.07.1978. године у Бањој Луци, гдје је завршила основну и средњу школу. Дипломирала је 2005. године на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци – студијски програм фармација, са просјечном оцјеном 9,23. Магистарску тезу под називом „Експериментални дизајн у фармацеутској анализи итраконазола и његових нечистоћа“ одбранила је 2013. године на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци под менторством проф. др Дарка Ивановића. Докторску дисертацију под називом „Хеометријска анализа хроматографског понашања амлодипин-бесилата и бисопролол-фумарата у течној хроматографији хидрофилних интеракција“ одбранила је 2016. године на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци под менторством проф. др Дарка Ивановића, уз коменторство проф. др Биљане Јанчић-Стојановић. Специјалистички рад из Испитивања и контроле лекова одбранила је 2018. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, под менторством проф. др Биљане Јанчић-Стојановић. Похађала је бројне едукације из области стручног и научноистраживачког рада. Године 2010. изабрана је у звање асистента на Катедри за аналитику лијекова на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци. У звање вишег асистента изабрана је 2014. године, доцента 2017. године, те ванредног професора 2022. године. Од 2018. године члан је Комисије за фармакопеју Агенције за лијекове и медицинска средства Босне и Херцеговине. Била је координатор и учесник више националних научноистраживачких пројеката, а учествовала је и у реализацији међународног Еразмус⁺ пројекта. У току каријере више пута је награђивана за резултате постигнуте на пољу научноистраживачког и образовног рада. Била је предавач по позиву и организатор бројних међународних симпозијума и стручних скупова те предсједник Комисије за развој новог плана и програма студија фармације на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци. Рецензент је у неколико међународних часописа, као што су: <i>Analytical Letters (Taylor & Francis)</i>, <i>Chromatographia (Springer)</i>, <i>Acta Chromatographica (AK Journals)</i>, <i>Current Analytical Chemistry</i>. Почасни је члан Фармацеутског друштва Републике Српске од 2021. године и коаутор Фармакопеје Босне и Херцеговине –</p>

Национални додатак Европској фармакопеји (прво издање).		
Радови из области којој припада приједлог теме докторске дисертације:		
РБ	Навести појединачно радове, књиге, поглавља. Додати потребан број редова. Користити исти стил за навођење свих референци.	Категорија
1.	Kasagić I , Malenović A, Jovanović M, Rakić T, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Chemometrically assisted optimization and validation of RP–HPLC method for the analysis of itraconazole and its impurities. Acta Pharm. 2013; 63(2):159–173.	
2.	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. Arh. Farm. 2012; 62:475–488.	
3.	Tubić B, Kasagić Vujanović I , Mihajlica N, Gagić Ž, Bubić Pajić N. Ispitivanje sadržaja aktivne supstance i degradacionih proizvoda/nečistoća u tabletama nimesulida primjenom reverzno–fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom. Arh. Farm. 2013; 63:1–19.	
4.	Rakić T, Kasagić Vujanović I , Jovanović M, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Comparison of full factorial design, central composite desing and Box Behenken desing in chromatographic method development for the analysis of fluconazole and its impurities. Anal Lett. 2014; 47(8):1334–1347.	
5.	Kasagić Vujanović I , Jančić Stojanović B, Rakić T, Ivanović D. Desing of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2015; 38(8):919–928.	
6.	Kasagić-Vujanović I , Jančić Stojanović B, Ivanović D. Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. Arh. Farm. 2014; 64:230–246.	
7.	Kasagić Vujanović I , Jelić D, Antunović V, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Stability study of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate in aqueous solutions. Contemp Mater. 2014; 5(2):212-221.	
8.	Kasagić-Vujanović I , Knežević D, Vukičević N. Stress degradation of lisinopril dihydrate in different aqueous media. Contemp Mater. 2017; 8(2):164-171.	
9.	10. Kasagić-Vujanović I , Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Investigation of the retention mechanisms of amlodipine besylate, bisoprolol fumarate and their impurities on three different HILIC columns. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2018; 41(9): 523-531.	

11.	Kasagić-Vujanović I , Gagić Ž, Okuka N, Knežević D. Quality control of distilled water used for reconstitution of powders for oral suspension in pharmacies on the territory of Bosnia and Herzegovina. Contemp Mater. 2019; X(1):47-55.	
12.	Kasagić Vujanović I , Knežević D. Design of experiments in optimization and validation of hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and its impurities. AChrom. 2021; 1:1-12	
13.	Mandić-Kovačević N, Kasagić-Vujanović I , Popović Bijelić A. Analysis of fixed-dose combination of three antihypertensive drugs by a green and Quality by Design approach. J. Chromatogr. Sci. 2023; 61(3):256-268	
14.	Dokmanović J, Kasagić-Vujanović , Gagić Ž, Nikolić K, Čarapić M, Agbaba D. Design of experiments and Derringer's desirability function in optimisation and validation of RP-HPLC method for the analysis of enrofloxacin and its impurities. AChrom. 2023; 1:1-11.	
15.	Kasagić-Vujanović I. Farmakopejske metode u kontroli kvaliteta lijekova. Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci; Banja Luka, 2021.	
Да ли ментор испуњава прописане услове?		<u>ДА</u> НЕ

4. ПОДАЦИ О П МЕНТОРУ		
Име и презиме: /		
Академско звање: /		
Научно поље и ужа научна област: /		
Матична институција стицања избора у звање: /		
Биографија другог ментора (до 1000 карактера): /		
Радови из области којој припада приједлог теме докторске дисертације: /		
РБ	Навести појединачно радове, књиге, поглавља. Додати потребан број редова. Користити исти стил за навођење свих референци.	Категорија
1.	/	
2.	/	

3.	/	
4.	/	
5.	/	
Да ли други ментор испуњава прописане услове?		ДА НЕ

5. ОЦЈЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ

5.1. Формулација назива дисертације (наслова)

МУЛТИКРИТЕРИЈУМСКИ ПРИСТУП У ГРАЂЕЊУ МОДЕЛА ЗА ПРЕДВИЂАЊЕ
РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА ОДАБРАНИХ ЛИЈЕКОВА У ТЕЧНОЈ
ХРОМАТОГРАФИЈИ ХИДРОФИЛНИХ ИНТЕРАКЦИЈА

Да ли је наслов тезе подобан?	ДА	НЕ
-------------------------------	----	----

5.2. Научно поље и ужа научна област

Фармација, аналитика лијекова

Да ли су научно поље и ужа научна област исти као код првог ментора/другог ментора?	ДА	НЕ
---	----	----

5.3. Предмет истраживања

Течна хроматографија хидрофилних интеракција (енг. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) је хроматографска метода која се примјењује у изазовним и врло комплексним анализама у пољу фармацеутских и биомедицинских наука. Кориштењем поларних стационарних фаза, сличних онима које се примјењују у нормално-фазној течној хроматографији високих перформанси (енг. *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography* – NP-HPLC) и мобилне фазе сличне оној која се користи у реверзно-фазној течној хроматографији високих перформанси (енг. *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC) омогућена је анализа како поларних и неполарних, тако и наелектрисаних једињења у HILIC систему. На тај начин превазиђени су главни недостаци NP-HPLC и RP-HPLC метода који су се огледали у слабој растворљивости поларних једињења у неполарној мобилној фази (код NP-HPLC) или елуирања поларних једињења заједно са мобилном фазом (код RP-HPLC).

Због постојања различитих врста интеракција (расподјела, адсорпција, јонска измјена, хидрофобне интеракције) између испитиваног једињења и стационарне фазе, а у зависности од састава мобилне фазе, ретенциони механизми у HILIC систему изузетно су сложени. Заступљеност и доминација наведених интеракција зависи како од врсте стационарне фазе и састава мобилне фазе, тако и од особина испитиваног једињења. Због тога се механизам раздвајања сваког појединачног једињења разликује за сваку нову комбинацију стационарне и мобилне фазе. Да би се што боље разумјела природа присутних али и доминантних ретенционих механизма, потребно је описати ефекат садржаја заступљенијег елуента у мобилној фази, а у ту сврху развијени су различити ретенциони модели.

У довољно уском интервалу односа воденог и органског дијела мобилне фазе, *партициони ретенциони модел* дефинисан је слједећом једначином:

$$\log k = \log k_0 - m \varphi \quad [1]$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, k_0 екстраполисани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини само вода (или водени раствор пуфера), m нагиб праве добијене фитовањем експерименталних резултата у линеарни модел, а φ запреминска фракција воде или воденог раствора пуфера.

Адсорпциони ретенциони модел може се приказати слjedeћом једначином:

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \quad [2]$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, k_0 екстраполисани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини само вода (или водени раствор пуфера), m нагиб праве добијене фитовањем експерименталних резултата у линеарни модел, а φ запреминска фракција воде или воденог раствора пуфера.

Осим линеарним, ретенциони механизми могу се прецизније изразити полиномијалним једначинама. Један од модела тог реда је *квадратни модел* који се може представити слjedeћом једначином:

$$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2 \quad [3]$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w екстраполисани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини само вода (или водени раствор пуфера), S_1 и S_2 регресиони коефицијенти, а φ запреминска фракција воде или воденог раствора пуфера.

Минимум функције описане једначином [3] може се израчунати према слjedeћој формули:

$$\varphi_{\min} = - S_1 / 2 \cdot S_2 \quad [4]$$

У широком опсегу односа воденог и органског дијела мобилне фазе, присутан је *двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизам* окарактерисан слjedeћом једначином:

$$\log k = a + m_{RP} \cdot \varphi - m_{HILIC} \cdot \log(1 + b \cdot \varphi) \quad [5]$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, m_{RP} параметер који карактерише ефекат повећања удјела воде у мобилној фази на задржавање усљед RP-HPLC механизма у мобилним фазама богатим водом, m_{HILIC} мјера утицаја садржаја воде на смањење задржавања у HILIC региону, b објашњава коначно задржавање при веома ниским концентрацијама воде, и a емпиријска константа.

Када се развије двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизам, криве добијене фитовањем података у модел описан једначином [5] имају облик параболе. Вриједности параметара m_{RP} , m_{HILIC} , a и b одређују се нелинеарном регресионом анализом. На основу добијених вриједности, а према слjedeћој формули, може се израчунати минимум добијене функције:

$$\varphi_{\min} = (0.434 m_{HILIC})/m_{RP} - 1/b \quad [6]$$

Добијена вриједност представља удео водене фазе у мобилној фази при којем се јавља прелаз између RP-HPLC и HILIC механизма.

Када се испитивана једињења налазе у јонизованом облику, а површина стационарне фазе

је наелектрисана присутан је и *јоноизмјењивачки ретенциони механизам* који се, у свом најједноставнијем облику, може представити сљедећом једначином:

$$k = m (1/[C]) + a \quad [7]$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, $[C]$ концентрација тј. јонска јачина пуфера, m нагиб праве добијене фитовањем експерименталних резултата у линеарни модел, а a одсјечак.

Ова зависност може се представити и логаритамском функцијом:

$$\log k = -s \log [C] + \text{konstanta} \quad [8]$$

гдје је s коефицијент који зависи од наелектрисуња испитиваног једињења и супротно наелектрисаног јона. Наиме, он представља однос наелектрисуња јона узорка и контрајона из мобилне фазе.

Сваки од претходно описаних модела прати промјену једног фактора на ретенционо понашање испитиваних једињења. Међутим, имајући у виду сложеност ретенционих механизма у HPLC систему те могућности које, у погледу истовременог испитивања већег броја фактора и њихових међусобних интеракција, нуди експериментални дизајн (енг. *Design of Experiments* – DoE), он се намеће као потенцијално рјешење за детаљан опис овако сложених хроматографских система. Експериментални модели омогућавају и предвиђање ретенционих механизма испитиваних једињења у оквирима датог експерименталног простора дајући одговарајуће статистичке и графичке анализе. За испитивање међуфакторских интеракција потребно је креирати одговарајуће математичке моделе, нпр. квадратне моделе. У ту сврху, сваки од испитиваних фактора потребно је испитати на три нивоа. Вох-Бехнкеп дизајн један је од факторских оптимизационих дизајна који омогућава креирање квадратних модела, који се могу представити сљедећом једначином:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 \quad [9]$$

гдје су: A , B и C – испитивани фактори, b_0 – одсјечак модела, b_1 , b_2 и b_3 – чланови који мјере утицај испитиваних фактора, b_{12} , b_{13} и b_{23} – чланови који мјере утицај интеракције између испитиваних фактора, b_{11} , b_{22} и b_{33} – чланови који мјере квадратни утицај испитиваних фактора.

Позитиван предзнак испред чланова који описују утицај појединачних фактора на испитивани параметар значи да испитивани параметар расте са порастом испитиваног фактора, док негативан предзнак значи да се испитивани параметар смањује са порастом испитиваног фактора. Статистички значајне двофакторске интеракције могу се представити у виду 3D-графика површине одговора, што значајно олакшава интерпретацију резултата.

Развој нове HPLC методе за раздвајање испитиваних једињења је врло захтјеван и комплексан процес. Нова метода мора да буде репродуктивна, специфична, тачна, прецизна и одговарајућег нивоа осјетљивости, што је чини погодном за предвиђену намјену. Од посебне важности је да се развије метода која је робусна што се дефинише као мјера поузданости методе да услед малих варијација у параметрима методе (брзина протока мобилне фазе, запремина инјектованог узорка, таласна дужина одређивања, температура испитивања, итд.) остане непромијењена и осигура добијање тачних и поузданих резултата. То значи да ће метода успјети да се одупре малим промјенама свих

критичних фактора, који могу да утичу на квантитативност резултата. Управо због тога, процјена робусности је један од кључних корака у току развоја методе. Та особина методе може бити угрожена уколико се развој методе ради традиционалним *one-factor-at-a-time* (OFAT) приступом, који подразумијева испитивање утицаја само једног фактора у датом тренутку на испитиване одговоре система. Овај приступ захтјева употребу већег броја експеримената које је потребно извести с циљем дефинисања кључних фактора, али и начина на који они утичу на испитиване одговоре система. Осим тога, OFAT приступ не омогућава евалуацију утицаја међуфакторских интеракција на испитиване одговоре система што у коначници често доводи до развоја методе са недовољно јасним ефектима мултипараметарских интеракција због чега постављена метода обично не испуњава захтјеве за робусност. Због тога је уведен концепт аналитичког квалитета кроз дизајн (енг. *Analytical Quality-by-Design* – AQbD) који је представљен у нацрту корака 2 смјернице Међународне конференције о хармонизацији (енг. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* – ICH) под ознаком ICH Q14 о развоју аналитичке процедуре.

Први корак код AQbD-концепта подразумијева дефинисање захтјева које метода треба да испуни (енг. *Analytical Target Profile* – ATP). Други корак је избор критичних параметара аналитичке процедуре (енг. *Critical Analytical Procedure Attributes* – CAPA). Они представљају одговоре који се мјере како би се контролисале перформансе методе. Наредни корак у развоју нове методе подразумијева процјену ризика и може се спроводити употребом различитих алата. Један од најчешће кориштених алата је *Ishikawa* дијаграм (дијаграм рибље кости) који идентификује ризичне и потенцијално ризичне факторе. Фактори за које се процијени да носе највећи ризик означавају се критичним параметрима аналитичке процедуре (енг. *Critical Analytical Procedure Parameters* – CAPP). Они треба да буду контролисани и/или праћени како би се потврдило да аналитичка процедура испуњава жељене захтјеве. У завршној фази процјене ризика, чини се да многи параметри утичу на процес раздвајања испитиваних једињења што не значи да сви они заправо јесу нужно значајни за постизање жељених особина методе. Због тога се, у наредном кораку, употребом DoE врши одабир параметара који имају најзначајнији утицај на хроматографске перформансе примјеном *screening* дизајна. Након завршеног скрининга, употребом више категорије DoE тзв. методологије површине одговора (енг. *Response Surface Methodology* – RSM) приступа се оптимизацији значајних фактора која укључује и међуфакторске интеракције како би се постигле оптималне радне перформансе методе. На основу резултата добијених спровођењем експеримената по матрици неког RSM дизајна, креира се робусни регион (енг. *Design Space* – DS). Он представља простор унутар граница експерименталног домена формиран мултиваријантним распоном вриједности фактора у коме су испуњени сви предефинисани критеријуми CAPA и метода је дефинисана као робусна. DS који посебно представља радну перформансу аналитичке методе назива се оперативни робусни регион (енг. *Method Operable Design Region* – MODR). Дакле, аналитичка метода постављена на вриједностима унутар граница свог DS, тј. MODR-а, са сигурношћу ће моћи да пружи поуздане, репродуктивне и тачне резултате анализе са одговарајућом вјероватноћом. То значи да метода није операбилна само на једној поставци параметара, већ може да се користи било гдје у MODR-у, гдје се сви извори варијабилности контролишу кориштењем одговарајуће стратегије контроле методе, нпр. тестом погодности система (енг. *System Suitability Test* – SST). Дакле, MODR нуди већу флексибилност методе при њеном рутинском кориштењу и истовремено представља њену област робусности. Додатно, када се креира DS, потребно је потврдити могуће варијације које произилазе или из мјерења одговора или из несигурности модела како би вјероватноћа да CAPP достигну предефинисане критеријуме била висока. Метода која се најчешће примјењује за процјену несигурности модела је *Monte-Carlo* симулација.

За додатну потврду робусности изабране радне тачке може се примијенити DoE методологија.

По завршетку оптимизације методе и потврде њене робусности врши се испитивање преосталих параметара валидације, а то су:

1. Селективност или специфичност;
2. Линеарност и опсег;
3. Осјетљивост (лимит детекције и лимит квантификације);
4. Тачност;
5. Прецизност.

Селективност или специфичност методе представља одсуство интерференције, а односи се на могућност методе да једнозначно (селективно) одреди испитивано једињење у присуству других једињења која се очекивано могу налазити у испитиваном узорку.

Линеарност методе је могућност да се у датој области концентрација добију резултати пропорционални концентрацији испитиваног једињења, док опсег представља интервал између највише и најниже концентрације испитиваног једињења, укључујући и те вриједности, унутар кога се може вршити одређивање испитиваног једињења са задовољавајућом линеарношћу, тачношћу и прецизношћу.

Осјетљивост методе изражава се кроз лимит детекције (енг. *Limit of Detection* – LOD) и лимит квантификације (енг. *Limit of Quantification* – LOQ). Лимит детекције је најнижа концентрација испитиваног једињења у узорку која може бити детектована, али не мора нужно моћи да се квантитативно одреди као тачна вриједност под одговарајућим експерименталним условима. Лимит квантификације је најнижа концентрација испитиваног једињења у узорку која може бити квантитативно одређена са одговарајућом тачношћу и прецизношћу, под датим експерименталним условима.

Тачност аналитичке методе изражава близину сагласности између вриједности која се прихвата као конвенционална тачна вриједност или као прихваћена референтна вриједност и измјерене вриједности или скупа измјерених вриједности.

Прецизност методе изражава близину сагласности (степен распрострања) између серије мјерења добијених из вишеструких анализа на истом хомогеном узорку под прописаним условима.

Смјерницом ICH Q2(R2) прецизно су дефинисани начини на које се могу урадити сви тестови који се спроводе у току валидације методе или аналитичке процедуре, а дат је и приједлог како треба да се изражавају добијени резултати.

Да ли је предмет истраживања релевантан и у складу са предложеним насловом?

ДА

НЕ

5.4. Релевантност и савременост коришћених референци и литературе са списком литературе

1. J. Alpert, "Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds," *J. Chromatogr. A*, vol. 499, pp. 177–196, 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3.
2. Y. Guo, N. Bhalodia, B. Fattal, and I. Serris, "Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC)," *Separations*, vol. 6, no. 2, p. 19, 2019, doi: 10.3390/separations6020019.
3. Q. Zhang, F. Yang, L. Ge, Y. Hu, and Z. Xia, "Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 49–80, 2017, doi: 10.1002/jssc.201600843.
4. I. Kohler and M. Giera, "Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 93–108, 2017, doi: 10.1002/jssc.201600981.

5. G. Greco and T. Letzel, "Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 51, no. 7, pp. 684–693, 2013, doi: 10.1093/chromsci/bmt015.
6. Y. Guo, "A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 36, no. 4, 2022, doi: 10.1002/bmc.5332.
7. L. Redón, X. Subirats, and M. Rosés, "Evaluation of hold-up volume determination methods and markers in hydrophilic interaction liquid chromatography," *Molecules*, vol. 28, no. 3, 2023, doi: 10.3390/molecules28031372.
8. S. Zhang, F. Zhang, B. Yang, and X. Liang, "A reversed phase/hydrophilic interaction/ion exchange mixed-mode stationary phase for liquid chromatography," *Chin Chem Lett.*, vol. 30, no. 2, pp. 470–472, 2019, doi: 10.1016/j.ccllet.2018.04.013.
9. H. Geng, Z. Wang, F. Zhang, Z. Li, and B. Yang, "A hyperbranched polyglycerol-functionalized polymer polar stationary phase," *J. Chromatogr. A*, vol. 1670, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462946.
10. P. Jandera and P. Janás, "Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. a review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 967, pp. 12–32, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.01.060.
11. M. Navarro-Reig, E. Ortiz-Villanueva, R. Tauler, and J. Jaumot, "Modelling of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phases Using Chemometric Approaches," *Metabolites*, vol. 7, no. 4, 2017, doi: 10.3390/metabo7040054.
12. P. Jandera and T. Hájek, "Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review," *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no. 1, pp. 145–162, 2018, doi: 10.1002/jssc.201701010.
13. T. Alvarez-Segura, X. Subirats, and M. Rosés, "Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1050, pp. 176–184, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2018.11.021.
14. P. Kozlik, J. Vaclova, and K. Kalikova, "Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography – separation potential in peptide analysis," *Microchem. J.*, vol. 165, 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106158.
15. Q. Sheng, M. Liu, M. Lan, and G. Qing, "Hydrophilic interaction liquid chromatography promotes the development of bio-separation and bio-analytical chemistry," *TrAC, Trends Anal. Chem.*, vol. 165, 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117148.
16. David V. McCalley, "Hydrophilic interaction liquid chromatography: an update," *LC GC Eur*, vol. 32, no. 3, pp. 114–125, 2019.
17. T. Hanai, "Definition of HILIC system and quantitative analysis of retention mechanisms," *CCHG*, vol. 5, no. 1, pp. 43–52, 2018, doi: 10.2174/2213240605666180207093716.
18. P. Jandera, P. Janás, V. Škeříková, and J. Urban, "Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 7, pp. 1434–1448, 2017, doi: 10.1002/jssc.201601044.
19. B. A. Al-Aphalahy, A. W. Qassim, and R. R. Karabat, "Knowledge of the HILIC retention behaviors of two quinolone antibiotics on sulfobetaine-type zwitterionic stationary phases," *Int. J. Drug Deliv. Technol.*, vol. 13, no. 01, pp. 372–375, 2023, doi: 10.25258/ijddt.13.1.60.
20. X. Subirats, L. Casanovas, L. Redón, and M. Rosés, "Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC," *Adv. Sample Prep.*, vol. 6, p. 100063, 2023, doi: 10.1016/j.sampre.2023.100063.
21. G. Marrubini, E. Tumminelli, C. Corman, P. Appelblad, C. Melzi, and S. Collina, "A

- design of experiments robustness study on gradient elution conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography,” *SSRN*, preprint, 2023. doi: 10.2139/ssrn.4524981.
22. L. Redón, X. Subirats, and M. Rosés, “HILIC characterization: estimation of phase volumes and composition for a zwitterionic column,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1130, pp. 39–48, 2020, doi: 10.1016/j.aca.2020.06.035.
 23. Y. Guo and D. Baran, “Hydrophilic partitioning or surface adsorption? A quantitative assessment of retention mechanisms for hydrophilic interaction chromatography (HILIC),” *Molecules*, vol. 28, no. 18, 2023, doi: 10.3390/molecules28186459.
 24. A. Tumpa, S. Mišković, Z. Stanimirović, B. Jančić-Stojanović, and M. Medenica, “Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique,” *J. Chemom.*, vol. 31, no. 9, 2017, doi: 10.1002/cem.2910.
 25. D. Obradović, Ł. Komsta, and D. Agbaba, “Novel computational approaches to retention modeling in dual hydrophilic interactions/reversed phase chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1619, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.460951.
 26. P. Jandera and T. Hájek, “Dual-mode hydrophilic interaction normal phase and reversed phase liquid chromatography of polar compounds on a single column,” *J. Sep. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 70–86, 2020, doi: 10.1002/jssc.201900920.
 27. F. Wang, F. Yang, J. Liu, and Q. Bai, “Studies on the retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography using stoichiometric displacement theory II. HILIC/RPLC dual-retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography over the entire range of water concentration in mobile phase,” *Talanta*, vol. 265, 2023, doi: 10.1016/j.talanta.2023.124858.
 28. P. Ziobrowski, L. Zapała, and W. Zapała, “Studies on the retention behavior of quercetin, phenol, and caffeine as test substances on selected neutral and charged hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases,” *Sep. Sci. plus*, vol. 5, no. 7, pp. 267–274, 2022, doi: 10.1002/sscp.202200027.
 29. O. Kalisz, M. Dembek, S. Studzińska, and S. Bocian, “Beta-blocker separation on phosphodiester stationary phases—the application of intelligent peak deconvolution analysis,” *Molecules*, vol. 28, no. 7, 2023, doi: 10.3390/molecules28073249.
 30. Y. Guo and B. Fattal, “Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1184, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.339025.
 31. W. Gao, X. Liu, Y. Wang, C. Liang, H. Lian, and J. Qiao, “Insight into the hydrophilic interaction liquid chromatographic retention behaviors of hydrophilic compounds on different stationary phases,” *Talanta*, vol. 219, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121363.
 32. L. S. Roca, S. E. Schoemaker, B. W. J. Pirok, A. F. G. Gargano, and P. J. Schoenmakers, “Accurate modelling of the retention behaviour of peptides in gradient-elution hydrophilic interaction liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1614, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460650.
 33. T. Tome, N. Žigart, Z. Časar, and A. Obreza, “Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances,” *Org. Process Res. Dev.*, vol. 23, no. 9, pp. 1784–1802, 2019, doi: 10.1021/acs.oprd.9b00238.
 34. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q2(R2) Validation of Analytical Procedures, Step 5 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
 35. M. K. Parr and A. H. Schmidt, “Life cycle management of analytical methods,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 506–517, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.020.

36. G. Park, M. K. Kim, S. H. Go, M. Choi, and Y. P. Jang, "Analytical Quality by Design (AQbD) Approach to the Development of Analytical Procedures for Medicinal Plants," *Plants*, vol. 11, no. 21, 2022, doi: 10.3390/plants11212960.
37. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q14 Analytical Procedure Development, Step 2 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q14-analytical-procedure-development-scientific-guideline>
38. I. Kasagić-Vujanović and B. Jančić-Stojanović, "Quality by design oriented development of hydrophilic interaction liquid chromatography method for the analysis of amitriptyline and its impurities," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 173, pp. 86–95, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.026.
39. Salwa and L. Kumar, "Quality-by-design driven analytical method (AQbD) development and validation of HPLC–UV technique to quantify rivastigmine hydrogen tartrate in lipidic nanocarriers: Forced degradation, and assessment of drug content and in vitro release studies," *Microchem. J.*, vol. 193, 2023, doi: 10.1016/j.microc.2023.108944.
40. P. Prajapati, A. Gandhi, and S. Shah, "Method Greenness Profile Assessment to AQbD-Driven Stability Indicating HPTLC Method for Estimation of Aripiprazole Using Screening Design and Response Surface Modeling," *J. AOAC Int.*, vol. 106, no. 2, pp. 501–513, 2023, doi: 10.1093/jaoacint/qsac107.
41. V. Mishra, S. Thakur, A. Patil, and A. Shukla, "Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up," *Expert Opin. Drug Del.*, vol. 15, no. 8, pp. 737–758, 2018, doi: 10.1080/17425247.2018.1504768.
42. R. Tiwari et al., "Analytical quality-by-design (AQbD) guided development of a robust HPLC method for the quantification of plumbagin from *Plumbago* species," *J. Liq. Chromatogr. Relat.*, vol. 44, no. 11–12, pp. 529–537, 2021, doi: 10.1080/10826076.2021.1973027.
43. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Step 4 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
44. L. Redón, X. Subirats, and M. Rosés, "Volume and composition of semi-adsorbed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of water adsorption in common stationary phases and eluents," *J. Chromatogr. A*, vol. 1656, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462543.

Да ли су коришћена литература и референце релевантне у погледу обима, садржаја и савремености.

ДА

НЕ

5.5. Циљеви истраживања

1. Испитати ретенционе механизме базних и неутралних једињења на примјеру модел смјеше амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G у аминок, амидној, диолној и силика колони фитовањем експериментално добијених података у партициони, адсорпциони, катјонско-измјењивачки, квадратни и двојни HILIC/RP-HPLC модел;
2. Испитати утицај појединачних фактора и двофакторских интеракција на ретенционо понашање амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G примјеном методологије експерименталног дизајна у силика колони;

3. Испитати ретенционе механизме киселих и неутралних једињења на примјеру модел смјеше диклофенака, ибупрофена, парацетамола и кофеина у аминок, амидној и диолној колони фитовањем експериментално добијених података у партициони, адсорпциони, анјонско-измјењивачки, квадратни и двојни HILIC/RP-HPLC модел;
4. Испитати факторске утицаје на ретенционо понашање диклофенака, ибупрофена, парацетамола и кофеина на основу експерименталних модела добијених хемометријским приступом у аминок колони;
5. Развити софтвер за анализу ретенционих механизма који ће омогућити аутоматизовану обраду експериментално добијених података у циљу извођења релевантних закључака о присутним и доминантним ретенционим механизмима;
6. Развити и валидирати HILIC методу за истовремену анализу парацетамола и кофеина употребом AQbD приступа;
7. Развити и валидирати HILIC методу за истовремену анализу ибупрофена и кофеина употребом AQbD приступа.

Да ли су циљеви истраживања јасно дефинисани и усклађени са предметом истраживања?	<u>ДА</u>	НЕ
--	-----------	----

5.6. Хипотеза истраживања: главна и помоћне хипотезе

1. Ретенциони механизми испитиваних једињења зависе од састава мобилне фазе (садржаја органског растварача, концентрације пуфера и/или рН вриједности воденог дијела мобилне фазе) и одабраног типа стационарне фазе;
2. Појединачни фактори и двофакторске интеракције значајно утичу на ретенционо понашање испитиваних једињења;
3. Развијени софтвер пружа прецизну и аутоматизовану анализу ретенционих механизма испитиваних једињења;
4. Двије новоразвијене HILIC методе постављене примјеном хемометријског и AQbD приступа омогућавају брзу и поуздану истовремену анализу парацетамола и кофеина односно ибупрофена и кофеина у таблетама и другим готовим производима, те обје методе, као такве могу да се користе у контроли квалитета ових лијекова.

Да ли је хипотеза истраживања јасно дефинисана?	<u>ДА</u>	НЕ
---	-----------	----

5.7. Очекивани резултати

Теоријски дио научног доприноса овог истраживања огледа се у разјашњавању сложених и, још увијек, недовољно испитаних ретенционих механизма у овом типу хроматографије. На овај начин омогућава се ширење знања како о присутним, тако и о доминантним процесима који утичу на ретенционе механизме у HILIC систему. Такође, резултати добијени током овог истраживања додатно ће разјаснити феномене који дефинишу ретенционе механизме у HILIC систему. Софтвер који ће бити развијен током ових истраживања омогућиће брзо и лако извођење релевантних закључака који се тичу

доприноса појединих процеса на ретенционе механизме одабраних једињења. Развијени софтвер биће слободно доступан за кориштење и другим истраживачима који се буду бавили истраживањем ретенционих механизма што ће умногоме допринијети развоју ове области.

Практични допринос очекиваних резултата огледа се у развоју нових хроматографских метода за анализу ових лијекова или њихових комбинација у дозираним фармацеутским облицима. Разумијевање принципа који доводе до раздвајања у HPLC систему је кључни фактор за предвиђање елуирања испитиваних једињења. Стога, развој нових метода биће економски, временски и еколошки прихватљив када се разјасне фактори који дефинишу хроматографско понашање. Додатно, разумијевање ових механизма може допринијети развоју нових типова хроматографије, као и производњи нових врста стационарних фаза усмјерених ка побољшању резолуције између хроматографских пикова, дужине трајања анализе и других критичних фактора. Коначно, фармацеутска индустрија моћи ће да користи постављене HPLC методе за анализу готових фармацеутских облика који садрже комбинације парацетамола и кофеина, односно ибупрофена и кофеина.

Да ли је образложен научни значај и/или потенцијална примјена очекиваних резултата?	ДА	НЕ
---	----	----

5.8. План рада и временска динамика

Прва фаза (у трајању до шест мјесеци)

Прва фаза истраживања обухватаће прелиминарна испитивања која ће се спроводити у циљу дефинисања параметара који ће се пратити да би се испитали и адекватно окарактерисали ретенциони механизми одабраних лијекова и њихових нечистоћа.

Употребом *Marvin Sketch 15.4.13*. софтвера биће одабрани физичко-хемијски параметри који ће се користити за предвиђање хроматографског понашања испитиваних једињења.

Такође, у овој фази испитаће се утицај врсте пуферског система на ретенционо понашање испитиваних једињења. Примјена пуфера треба да омогући репродуктивност резултата као и да обезбједи задовољавајуће раздвајање испитиваних једињења те изглед/симетрију хроматографских пикова. У ту сврху припремиће се 0,02 М водени раствори амонијум-ацетата, амонијум-формијата, натријум-цитрата те монобазног и дибазног калијум-фосфата чије рН вриједности ће бити подешене концентрованој сирћетној киселином, концентрованој мрављом киселином, 1М лимунском киселином те ортофосфорном киселином. У наставку истраживања користиће се пуферски систем који буде дао најбоље резултате.

Друга фаза (у трајању до годину дана)

Први дио друге фазе истраживања обухватаће испитивање ретенционих механизма киселих, базних и неутралних једињења на начин који је детаљно описан у дијелу „Материјал и методологија рада“.

Након завршене експерименталне анализе, услиједиће статистичка обрада добијених података употребом софтвера и метода које су, такође, детаљно описане у дијелу „Материјал и методологија рада“.

Трећа фаза (у трајању до шест мјесеци)

Трећа фаза истраживања биће посвећена развоју, оптимизацији и валидацији метода на начин који је детаљно представљен кроз методологију рада.

Четврта фаза (у трајању до три мјесеца)

Четврта фаза истраживања биће посвећена развоју новог софтвера који ће омогућити аутоматизацију у анализи ретенционих механизма, као и комплетну статистичку анализу добијених резултата.

По завршетку статистичке обраде података, планирано је публикавање добијених резултата у међународно-признатим часописима из наведених научних области.

Да ли су предложени одговарајући план рада и временска динамика израде дисертације?

ДА

НЕ

5.9. Материјал и методологија рада

Хроматографски услови:

Хроматографски систем *Agilent 1200 series* састојаће се од кватернарне пумпе *G1311A*, аутосамплера *ALS G1329A*, термостата *TCC G1316A*, детектора *DAD G1315D* и система за прикупљање података *Agilent ChemStation*.

Анализе ће се обављати у HILIC и RP-HPLC режиму на сљедећим стационарним фазама:

Zorbax NH₂ (250 x 4,6 mm; величина честица 5 µm),
Inertsil Amide (250 x 4,6 mm, величина честица 5 µm),
Inertsil SIL-100 A (250 x 4,6 mm, величина честица 5 µm) и
Inertsil Diol (250 x 4,6 mm, величина честица 5 µm).

Стандардне супстанце и реагенси:

Референтни стандарди амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G, те диклофенака, ибупрофена, парацетамола и кофеина биће кориштени за припремање модел смјеша за испитивање ретенционих механизма, као и за развој метода.

Ацетонитрил, амонијум-ацетат, амонијум-формијат, натријум-цитрат, монобазни и дибазни калијум-фосфат, концентрована сирћетна киселина, концентрована мравља киселина, 1M лимунска киселина, концентрована ортофосфорна киселина, амонијум-хидроксид, високо пречишћена вода (вода HPLC чистоће) биће кориштени за припрему мобилних фаза и свих испитиваних узорака.

Двије врсте филм таблета *Thomapyrin TENSION DUO*[®] (комбинација ибупрофена и кофеина у односу 400/100, mg/mg) и *Panadol Extra*[®] (комбинација парацетамола и крофеина, у односу 500/65, mg/mg) биће кориштене за проверу селективности и прецизности развијених HILIC метода.

Остала опрема и прибор:

Систем за добијање воде HPLC чистоће: *Barnstead LabTower EDI, Thermo Fisher Scientific*, Сједињене Америчке Државе.

Систем за филтрирање: *Whatman 47 mm Glass/mesh* мембрански носач, *Whatman*, Енглеска.

Филтри: *Nylon membrane filters, 0,45 µm, Agilent Technologies*, Њемачка.

Електронска аналитичка вага: *Kern ABJ*, Њемачка.

Ултразвучно купатило: *Sonorex digitec (DT 102 H), Bandelin*, Њемачка.

pH-метар: *Ciberscan pH 11, Eutech*, Малезија.

Магнетна мјешалица: *Falc*, Италија.

Софтвер:

Design Expert 13.0.0. (Stat-Ease Inc., Mineappolis, USA) биће кориштен за креирање плана експеримената према FFD, CKD и Вох-Behnken дизајну. *Marvin Sketch 15.4.13. (ChemAxon Kft, Hungary)* користиће се за физичко-хемијску карактеризацију испитиваних једињења (добијање података о вриједностима за: pKa, log P и log D). *Origin Pro 9.9 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA)* биће кориштен за статистичку анализу и графичку презентацију резултата. Програмски језик *Python (The Python Software Foundation, Delaware, USA)* биће кориштен за развој софтвера за анализу ретенционих механизма, а потом и за статистичку обраду података партиционог, адсорпционог, квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог механизма. *MODDE Pro 13 (Sartorius AG, Göttingen, Germany)* биће кориштен за дефинисање DS и предвиђање оптималних и робусних услова.

Грађење квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела:

Мобилне фазе за грађење квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела припремаће се прављењем 0,02 М раствора амонијум-ацетата чија рН вриједност ће бити подешена глацијалном сирћетном киселином на 4,50 за испитивање амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа, те на рН 7,00 употребом амонијум-хидроксида за анализу диклофенака, ибупрофена, парацетамола и кофеина. Затим ће се однос између ацетонитрила и добијеног воденог раствора амонијум-ацетата варирати у широком распону од 4 v/v до 96 v/v, с циљем да се испита допринос квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог механизма.

Испитивање партиционих и адсорпционих ретенционих механизма:

Моделовањем почетних 7 експерименталних тачака (HILIC регион) и крајњих 7 експерименталних тачака (RP-HPLC регион) добијених грађењем квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела испитаће се допринос процеса расподеле и адсорпције укупном ретенционом механизму испитиваних једињења фитовањем добијених података у одговарајуће партиционе и адсорпционе ретенционе моделе.

Грађење катјонско-измјењивачког/анјонско-измјењивачког ретенционог модела:

Испитивање доприноса процеса катјонске измјене укупном ретенционом механизму амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа биће спроведено у силика колони. Јонска јачина водених раствора амонијум-ацетата биће од 0.005 М до 0.065 М, а њихова рН вриједност биће подешена на 4,50 глацијалном сирћетном киселином. Садржај ацетонитрила биће одржаван на константном нивоу од 80 v/v.

За испитивање доприноса анјонске измјене укупном ретенционом механизму диклофенака и ибупрофена користиће се амино колона. Јонска јачина водених раствора амонијум-ацетата биће од 0.01 М до 0.05 М, а њихова рН вриједност биће подешена на 7,00 раствором амонијум-хидроксида. Садржај ацетонитрила биће одржаван на константном нивоу од 80 v/v.

Испитивање утицаја појединачних фактора и двофакторских интеракција на хроматографско понашање испитиваних једињења:

Примјеном хеометријског приступа испитаће се утицај појединачних фактора и двофакторских интеракција садржаја ацетонитрила у мобилној фази, јонске јачине пуфера и рН вриједности пуфера на хроматографско понашање испитиваних једињења. За модел смјешу амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа користиће се силика колона, док ће се за модел смјешу диклофенака, ибупрофена, парацетамола и кофеина користити амино колона. Мобилне фазе биће припремљене према плану експеримената који ће се креирати употребом Vox-Behnken експерименталног дизајна. Статистички значајне двофакторске интеракције представиће се 3D-графиконима површине одговора који ће омогућити процјену истовременог утицаја више фактора на ретенционо понашање испитиваних једињења чиме ће њихови ретенциони механизми бити у потпуности дефинисани.

Развој, оптимизација и валидација HILIC методе:

За развој и оптимизацију метода користиће се савремени AQbD приступ. Овакав приступ омогућава уградњу квалитета у методу током њеног развоја, што осигурава добијање

робусне методе, а тиме и репродуктивних, тачних и поузданих резултата. Овако постављене методе користиће се за идентификацију и одређивање садржаја испитиваних једињења. Основни циљ који такве методе треба да испуне је постизање задовољавајућег раздвајања хроматографских пикова испитиваних једињења. Додатни циљеви би били пронаћи и обезбиједити слједеће: оптимално вријеме трајања анализе, задовољавајућа симетрија свих испитиваних хроматографских пикова и задовољавајућа резолуција критичних хроматографских пикова.

Резултати добијени у току испитивања ретенционих механизма служиће као детаљни прелиминарни подаци на основу којих ће се приступити развоју, а потом оптимизацији и валидацији методе. На основу прелиминарних резултата закључиће се која колона ће бити кориштена за развој методе, шта ће се одабрати као састав мобилне фазе, која ће бити оптимална брзина протока мобилне фазе, затим волумен ињектовања и таласна дужина детекције, те која је пожељна рН вриједност воденог дијела мобилне фазе.

Након што се дефинишу претходно наведени фактори, приступиће се креирању математичког модела који има способност да адекватно опише посматрани систем у циљу проналажења хроматографских услова под којима се добијају задовољавајући резултати. Овај дио заправо представља оптимизацију методе и биће изведен употребом хеометријског приступа – математичких модела и алгоритама који су уграђени у софтвер *MODDE Pro 13*, а који ће послужити за креирање плана експериманата према СКД. На основу резултата добијених након извођења свих експеримената према плану СКД, употребом добијеног математичког модела креираће се DS. У оквиру тог региона, кориштењем *Monte-Carlo* симулације помоћу претраге површине одговора, ићи ће се у претрагу за добијање најробусније тачке – дефинисаће се најидеалније вриједности свих анализираних параметара (критичних фактора и одговора система). Ти услови представљаће оптималне хроматографске услове, а њихова робусност биће потврђена кроз низ експеримената који ће се спровести према плану за FFD, а који ће бити креиран употребом нових математичких модела и *Design Expert 13.0.0* софтвера. Добијени резултати омогућиће и дефинисање параметара за SST-лимите.

Након потврђене робусности, приступиће се провјери осталих параметара валидације методе, као што су: селективност или специфичност, линеарност и опсег, осјетљивост, тачност и прецизност.

Основни раствори парацетамола, кофеина и ибупрофена биће припремљени одмјеравањем 10 mg стандардне супстанце која ће се пренијети у одмјерни суд од 10 mL и растварати додатком 5 mL ацетонитрила на ултразвучном купатилу у току 5 минута. Након хлађења, раствори ће бити допуњени до ознаке ацетонитрилом.

Селективност: У циљу процјене селективности постављене HPLC методе, припремиће се смјеша која садржи компоненте плацеба у односу који одговара њиховом садржају у анализираним филм таблетама. Одговарајућа маса биће пренијета у одмјерни суд и растворена у мобилној фази на ултразвучном купатилу. Раствор ће се профилтрирати кроз мембрански филтер (0,45 μm).

Од основног раствора парацетамола и кофеина, односно ибупрофена и кофеина пипетираће се одговарајућа запремина, пренијети у одмјерни суд и допунити до ознаке мобилном фазом. Добијени раствор ињектоваће се под оптималним условима, као и раствор плацеба.

Линеарност: Од основног раствора сваке супстанце пипетираће се у одмјерни суд од 10 mL растуће запремине (нпр. 0,5 mL, 0,8 mL, 1,1 mL, 1,4 mL, 1,7 mL) и допуњавати

одговарајућом мобилном фазом до ознаке. Овако добијени раствори инјектоваће се у хроматографски систем под оптималним условима и пратиће се површине добијених хроматографских пикова. Конструисаће се графикони зависности површине пика од концентрације раствора. Овако добијене калибрационе криве треба да имају коефицијент корелације $\geq 0,9990$.

Лимит квантификације: Од основног раствора парацетамола и кофеина односно ибупрофена и кофеина припремаће се појединачни радни раствори опадајућих концентрација (нпр. 1,00 $\mu\text{g/mL}$, 0,50 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,10 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$...) до одређивања лимита квантификације за свако испитивано једињење.

Лимит детекције: Од основног раствора парацетамола и кофеина односно ибупрофена и кофеина припремаће се појединачни радни раствори опадајућих концентрација (нпр. 1,00 $\mu\text{g/mL}$, 0,50 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,10 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$...) до одређивања лимита детекције за свако испитивано једињење.

Тачност: Припремиће се основни раствор смјеше плацеба (ексципијенси) и испитиваних једињења вагањем масе плацеба и испитиваних једињења тако да њихов однос одговара односу у таблети. Те масе биће пренесене у одмјерни суд и растворене у ацетонитрилу на ултразвучном купатилу. Раствор ће се профилирати кроз мембрански филтер (0,45 μm). Од овако добијеног раствора биће припремљени радни раствори чије су концентрације 80%, 100% и 120% у односу на декларисани садржај. На основу добијених резултата биће израчуната *Recovery* вриједност и коефицијент варијације.

Прецизност: Измјериће се маса 20 *Thomapyrin TENSION DUO*[®] односно *Panadol Extra*[®] таблета и израчунати просјечна маса једне таблете. Употребом тарионика и пистила, хомогенизоваће се таблете и вагаће се одговарајућа маса таблетне смјеше. Затим ће се припремити 6 раствора исте концентрације, растварањем таблетне масе у мобилној фази у одмјерном суду употребом ултразвучног купатила и филтрирањем кроз мембрански филтер (0,45 μm). Из добијених резултата рачунаће се *Recovery* вриједност за свако мјерење, средња вриједност измјерених концентрација и на основу ње коефицијент варијације.

Развој софтвера:

За развој софтвера за анализу ретенционих механизма биће кориштен програмски језик *Python* са библиотекама *NumPy*, *Matplotlib*, *Pandas* и *SciPy*. Такође, користиће се и уграђени модули *sys*, *math* и *csv*.

NumPy је библиотека која садржи моћне алате за извођење различитих математичких операција и обезбјеђује рад са различитим типовима података представљених низовима. Она имплементира бројне алгоритме и операције које су оптимизоване за брзо израчунавање због чега је идеална за обраду великих низова података у реалном времену. Ова библиотека пружа подршку за матричне операције, због чега је посебно корисна за научно рачунање, анализу података, машинско учење и обраду сигнала. Она подржава извршавање операција које могу бити примијењене на сваки елемент низа појединачно. Осим тога, *NumPy* се лако интегрише са другим *Python* библиотекама које ће бити кориштене за развој овог софтвера.

Matplotlib је једна од најпопуларнијих библиотека за визуализацију података. Она омогућава креирање различитих врста графикона и дијаграма, а подржава више излазних формата укључујући слике у бројним форматима (PNG, JPEG и слично) и интерактивне

графичке приказе за интеграцију у различите апликације.

Pandas је библиотека која садржи алате за манипулацију подацима и анализу података, а намијењена је посебно раду са табеларним подацима, временским серијама и векторизованим подацима. Ова библиотека омогућава читање, писање и манипулацију из различитих извора укључујући CSV (*Comma-separated Values*) датотеке, Excel датотеке и многе друге чиме се олакшава рад са различитим форматима. *Pandas* уводи *DataFrame* табличну структуру што омогућава организовање података у редове и колоне чиме се олакшава рад са комплексним скуповима података. Она омогућава индексирање и селекцију података на основу редова, колона или вриједности што олакшава приступ подацима и пружа бројне функције за прочишћавање и трансформацију података нпр. уклањање недостајућих вриједности, филтрирање података, груписање и слично.

Scipy је библиотека која пружа широк спектар напредних математичких функција и алгоритама за научно рачунање што је чини есенцијалним алатом за ову сврху у *Python*-у. Често се користи у научним истраживањима, анализи података, статистици, линеарној алгебри и другим областима. Базира се на интеграцији са *NumPy* библиотеком и користи њене низове као основну структуру за напредне математичке операције, као што су: диференцијалне једначине, рјешавање линеарних и нелинеарних једначина, различите врсте трансформација и слично. *Scipy* садржи дефиниције многих научних константи и јединица, а пружа и функције за интерполацију података и апроксимацију графичких кривих те различите методе за интеграцију и оптимизацију функција. Библиотека садржи функције за статистичку анализу података и нуди могућност израчунавања бројних статистичких параметара.

Интегрисани модул *sys* пружа функционалности за интеракцију са системским параметрима и омогућава приступ аргументима командне линије. Модул *math* омогућава извођење математичких функција, док модул *csv* омогућава читање и писање CSV датотека те омогућава једноставан и ефикасан начин рада са подацима у овом формату.

Софтвер ће се дизајнирати тако да може примати податке кроз аргументе командне линије и кроз CSV датотеку по имену *input.csv*, при чему ће улаз путем CSV датотеке имати већи приоритет. Читање улазне CSV датотеке вршиће се употребом *pd.read* функције из *Pandas* библиотеке. За улаз су потребна два низа података који ће бити означени као *xInput* и *yInput*, а који морају бити исте дужине. Прије самог почетка анализе, софтвер ће прво провјеравати да ли су подаци добро уписани те ако пронађе грешку, исписиваће одговарајућу поруку. Након што добије адекватне податке, започеће са анализом. Сви излазни подаци биће заокружени на четири децимале, а уколико то буде потребно мијењати биће довољно само модификовати вриједност варијабле „*decimal*“. Добијени резултати као и одговарајући статистички параметри биће исписивани такође у CSV датотеке чији називи ће одговарати сваком од модела нпр. *OutputDualModel*, *OutputQuadraticModel* и слично. Графички приказ резултата биће омогућен примјеном претходно описане *Matplotlib* библиотеке за све испитиване моделе.

Први корак биће фитовање цијелог низа података у двојни HPLC/RP-HPLC модел према једначини [5]. За тај прорачун користиће се *curve_fit* функција из *Scipy.optimize* дијела *Scipy* библиотеке. *Scipy.optimize* пружа опције оптимизације циљних функција уз поштовање постављених ограничења. То укључује рјешавање нелинеарних проблема (са подршком за локалне и глобалне алгоритме оптимизације) и прилагођавање графичких кривих. Предност оваквог начина анализе огледа се не само у аутоматизацији обраде података, него и у могућности подешавања броја понављања анализе и извршавању функције на начин да са што мањим вриједностима коефицијената модела (чија максимална вриједност ће се моћи мијењати према потребама што ће бити назначено у коду) обезбиди највеће могуће вриједности коефицијената детерминације (R^2). Наиме,

Excel и *OriginPro* немају могућност ограничавања вриједности коефицијената што доводи до добијања изузетно високих вриједности, а што отежава њихово разјашњавање у физичком смислу. Додатно, у *Excel*-у вриједност добијених коефицијената умногоме зависи од способности аналитичара да сам прилагоди експерименталне податке моделу. Тек када се крива која описује моделоване податке „ручним“ подешавањем коефицијената модела приближи експерименталним вриједностима може се покренути екстензија „*solver*“ која врши даље прилагођавање. Такође, у појединим случајевима се може десити да након једне серије прилагођавања, поновно покретање „*solver*“ екстензије може довести до промјене вриједности коефицијената модела што представља додатни проблем у смислу поузданости добијених података. Овакви проблеми могу се превазићи развојем предложеног софтвера, гдје се манипулација података дешава искључиво софтверски, без учешћа аналитичара.

Након добијања података о коефицијентима модела (a , m_{HILIC} , m_{RP} , b) исписују се вриједности коефицијента детерминације (R^2), прилагођеног коефицијента детерминације ($adjusted R^2$) те предвиђеног коефицијента детерминације ($predicted R^2$). Такође, на основу добијених вриједности за коефицијенте модела софтвер према једначини [6] рачуна минимум добијене функције који одговара удјелу воденог раствора пуфера у мобилној фази за који се дешава прелазак из HILIC у RP-HPLC регион.

Други корак биће фитовање истог низа података у квадратни модел описан једначином [3]. За овај прорачун користиће се *np.polyfit* функција из *NumPy* библиотеке која омогућава рачунање коефицијената полинома другог реда. Након добијања података о коефицијентима модела ($\ln k_w$, S_1 , S_2) исписују се вриједности R^2 , $adjusted R^2$ те $predicted R^2$. Такође, на основу добијених вриједности за коефицијенте модела софтвер према једначини [4] рачуна минимум добијене функције који одговара удјелу воденог раствора пуфера у мобилној фази за који се дешава прелазак из HILIC у RP-HPLC регион.

Трећи корак биће фитовање дијела података у моделе описане једначинама [1] (партициони модел) и [2] (адсорпциони модел), посебно за HILIC, а посебно за RP-HPLC регион. За ове прорачуне користиће се *np.polyfit* функција из *NumPy* библиотеке, која омогућава рачунање коефицијената линеарног модела. Софтвер ће анализирати низове података који се формирају кориштењем почетних и крајњих тачака двојног HILIC/RP-HPLC односно квадратног модела. Ови низови података ће имати дужину између 5 и 7 тачака. Овакав приступ је могућ јер је при високим садржајима ацетонитрила у мобилној фази (почетне тачке двојног HILIC/RP-HPLC односно квадратног модела) присутан чисти HILIC механизам, док је при високим садржајима воденог раствора пуфера у мобилној фази (крајње тачке двојног HILIC/RP-HPLC односно квадратног модела) присутан чисти RP-HPLC механизам. Након одабира низа са најбољом вриједношћу R^2 , софтвер ће поредити да ли виши R^2 даје партициони или адсорпциони модел у оба испитивана региона засебно, предлажући „побједнички“ модел. На тај начин, доћи ће се до података који од механизма представљених датим једначинама има већи допринос у укупном ретенционом механизму испитиваних једињења. Овакав приступ анализи ретенционих механизма омогућиће испитивање доприноса процеса адсорпције и расподјеле на више сетова података што обично није случај уколико се ова анализа спроводи „ручно“ употребом нпр. *Excel*-а. Осим тога, овакав приступ обезбиједиће аутоматизовану обраду података што ће значајно смањити утрошак времена и свести на минимум могућу грешку која се може десити посредством људског фактора.

Статистичка анализа:

Процјена адекватности двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела вршиће се примјеном нелинеарне регресионе анализе употребом *Origin Pro 9.9* и *Excel* софтвера.

Ниво корелације између експерименталних и моделованих резултата биће изражен коефицијентом детерминације (R^2).

За процјену доприноса процеса расподјеле и адсорпције биће кориштен *Origin Pro 9.9* софтвер. Исти софтвер употребиће се и за процјену адекватности квадратног модела. Ниво корелације између експерименталних и моделованих резултата биће изражен коефицијентом детерминације (R^2).

Претходно описана статистичка анализа извршиће се и употребом развијеног *Python* софтвера. Ниво корелације између експерименталних и моделованих података биће изражен коефицијентом детерминације (R^2) и прилагођеним коефицијентом детерминације (*adjusted R²*), док ће способност сваког од модела да предвиђа ретенционо понашање бити изражена кроз предвиђени коефицијент детерминације (*predicted R²*).

Испитивање доприноса процеса јонске измјене укупном ретенционом механизму испитиваних једињења вршиће се примјеном линеарне регресионе анализе употребом *Origin Pro 9.9* софтвера. Ниво корелације између експерименталних и моделованих резултата биће изражен коефицијентом детерминације (R^2). Статистичка значајност нагиба и одсјечка линеарног модела процјениће се на основу *p*-вриједности.

За испитивање утицаја појединачних фактора и двофакторских интеракција на хроматографско понашање испитиваних једињења користиће се *Design Expert 13.0.0.* софтвер. Адекватност добијених модела софтвер ће процијенити ANOVA тестом. Способност модела да предвиђа ретенционо понашање испитиваних једињења биће изражена кроз *predicted R²* вриједност. Коефицијенти појединачних фактора и двофакторских интеракција биће представљени са интервалом статистичке сигурности од 95%, а њихова статистичка значајност биће изражена кроз *p*-вриједност.

За опимизацију метода користиће се *Design Expert 13.0.0.* и *MODDE Pro 13* софтвери. Адекватност добијених модела софтвери ће процијенити ANOVA тестом. Коефицијенти појединачних фактора и двофакторских интеракција биће представљени са интервалом статистичке сигурности од 95%, а њихова статистичка значајност биће изражена кроз *p*-вриједност. Ниво корелације између моделованих и експериментално добијених резултата биће изражен коефицијентом детерминације (R^2). Робусни регион (DS-регион) биће креиран употребом добијених математичких модела и *Monte-Carlo* симулацијом.

За процјену робусности методе користиће се *Design Expert 13.0.0.* софтвер, а као статистичка подршка *Dong*-ов алгоритам.

Да ли су предвиђени материјал и методологија рада одговарајући?	<u>ДА</u>	НЕ
---	-----------	----

5.10. Мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад

Лабораторија Одсјека за фармацију Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци са припадајућом опремом и реагенсима

Да ли су предвиђени одговарајуће мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад?	<u>ДА</u>	НЕ
--	-----------	----

Да ли је планирана сарадња са другим институцијама у земљи и иностранству?	<u>ДА</u>	НЕ
--	-----------	----

Да ли је тема подобна?	<u>ДА</u>	НЕ
------------------------	-----------	----

6. ЗАКЉУЧАК

Да ли студент испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ
--	-----------	----

Да ли је тема подобна?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли први ментор испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли други ментор испуњава прописане услове?	ДА	НЕ

Образложење (до 300 ријечи):

На основу података о кандидату и разматрања образложења теме, Комисија сматра да је кандидат Дарија Кнежевић Ратковић својим досадашњим радом и постигнутим резултатима показала да је подобна за израду докторске дисертације.

Предложена тема докторске дисертације „Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течной хроматографији хидрофилних интеракција“ је научно заснована, актуелна и, уз примјену савремених истраживачких метода, представља оригинално научно истраживање у пољу фармацеутских наука. У оквиру ове дисертације први пут ће бити развијен посебан софтвер за анализу ретенционих механизма, што ће допринијети бржој, лакшој и поузданијој интерпретацији експерименталних података који се тичу ретенционих механизма. На тај начин, допринијеће се ширењу знања и расвјетљавању улоге појединих процеса у ретенционом понашању испитиваних једињења у HILIC систему и уопште у хроматографији што је од изузетног значаја имајући у виду сложеност ових процеса. Значај испитивања ретенционих механизма у погледу развоја нових типова стационарних фаза и потенцијалног развоја нових типова хроматографије је велики, а ова истраживања веома су актуелна и у погледу анализе биолошких узорака и испитивања интеракција на нивоу лијек-рецепторско мјесто. Поред тога, научни допринос овог истраживања огледа се и у томе што ће први пут бити развијене HILIC методе за анализу парацетамола и кофеина, односно ибупрофена и кофеина, што је основа контроле квалитета наведених супстанци у дозираним фармацеутским облицима.

Ментор, др Ирена Касагић-Вујановић, ванредни професор, запослена на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, својим радом и постигнутим резултатима задовољава услове за менторство кандидата на III циклусу студија.

На основу изнијетих чињеница, Комисија са посебним задовољством, **даје позитивну оцјену о подобности теме, кандидата и ментора** за израду докторске дисертације под називом „Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течној хроматографији хидрофилних интеракција“.

Мјесто и датум:

Бања Лука, 1.7.2024.

Име и презиме, титула и звање

Доц. др Анђелка Рачић, с.р. доцент, ужа научна област фармацеутска технологија и козметологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци; предсједник комисије

Име и презиме, титула и звање

Проф. др Мирза Дедић, с.р. ванредни професор, ужа научна област аналитика лијекова, Фармацеутски факултет Универзитета у Сарајеву; члан

Име и презиме, титула и звање

Проф. др Ервина Бечић, с.р. ванредни професор, ужа научна област аналитика лијекова, Фармацеутски факултет Универзитета у Сарајеву; члан

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије дужан је да у извјештај унесе образложење, односно разлоге због којих не жели да потпише извјештај. `зтзух

У прилогу Извјештаја доставити:

1. Одлуку о прихватању пријаве теме докторске дисертације;
2. Одлуку о именовању Комисије за оцјену подобности студента, теме и ментора за израду докторске дисертације;
3. Доказе о подобности чланова комисије (радови и пратећи докази из члана 12. Правила студирања на III циклусу студија за студије започете закључно са академском годином 2021/2022, односно докази из члана 31. Правила студирања на трећем циклусу студија за студије започете од академске 2022/2023. године); и
4. Доказе о подобности првог ментора/другог ментора (радови и пратећи докази из члана 11. Правила студирања на III циклусу студија за студије започете закључно са академском годином 2021/2022, односно докази из члана 30. Правила студирања на трећем циклусу студија за студије започете од академске 2022/2023. године).