

QSRR modeliranje u ionskoj kromatografiji

Janda, Rea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:566220>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Rea Janda

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Rea Janda

QSRR MODELIRANJE U IONSKOJ KROMATOGRAFIJI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Šime Ukić
2. prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
3. dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2015.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svom mentoru docentu dr. sc. Šimi Ukiću na pomoći i strpljenu prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima što su bili neiscrpna podrška tijekom cijelog mog dosadašnjeg školovanja te uvijek puni razumijevanja.

SAŽETAK

Razvoj novih metoda za određivanje pojedinih analita ionskom kromatografijom dugotrajan je proces koji se najčešće temelji na metodi pokušaja i pogreške. Osim što pronalazak optimalnih uvjeta poput koncentracije eluensa, temperature sustava ili vremena trajanja analize oduzima puno vremena, nepovoljan je i s ekonomskog aspekta jer se troši velika količina raznoraznih reagensa. Kako bi se smanjili troškovi i vrijeme potrebno za razvoj novih metoda koriste se modeli vremena zadržavanja.

Svrha ovog rada je izraditi gradijentni model vremena zadržavanja ugljikohidrata u ionskoj kromatografiji, a na temelju eksperimentalno određenih vrijednosti vremena zadržavanja pojedinih komponenata pri četirima jakostima eluensa. Na temelju spomenutih eksperimentalnih vrijednosti izrađeni su QSRR modeli, po jedan za svaku jakost eluensa. Kao alat za modeliranje primijenjene su umjetne neuronske mreže. Na temelju QSRR-om predviđenih vrijednosti vremena zadržavanja izrađeni su izokratni modeli vremena zadržavanja. Potom je, primjenom pristupa numeričkog integriranja (tzv. *iso-to-grad* pristup), informacija prenašana u gradijentno okruženje.

Budući da QSRR modeliranje uključuje samo strukturne značajke analita i ne vodi računa o njihovim međusobnim interakcijama, u razmatranja predviđenih vrijednosti vremena zadržavanja uključena su empirijska kromatografska znanja kojima su eliminirana nesuvisla predviđanja.

Pokazalo se da primjena dodatnih empirijskih informacija može poboljšati izvedbene karakteristike modela vremena zadržavanja, što u konačnici može rezultirati dodatnom znanstvenom i ekonomskom vrijednošću razvijenih modela.

Ključne riječi: ionska kromatografija, analiza ugljikohidrata, QSRR modeliranje, *iso-to-grad* pristup

SUMMARY

Development of new ion chromatographic methods is generally a long-term process usually based on trial and error approach. Searching for optimal conditions (like eluent concentration, system temperature or analysis time) is economically unfavorable since it is time-consuming and requires significant amount of diverse reagents. In order to reduce the costs and required time for method development, diverse retention models are applied.

The aim of this work is to develop gradient retention model for IC analysis of carbohydrates, based on experimentally determined retentions on 4 isocratic levels. These experimentally determined retentions were used for creation of 4 QSRR models: one per each isocratic level. The modeling tool was artificial neural networks. Based on QSRR prediction, isocratic retention model for each analyte was developed. Afterwards, the information was transferred from isocratic to gradient environment by applying numerical integration (so called *iso-to-grad* approach).

Since QSRR modeling includes only structural characteristics of analytes, it does not consider their mutual interactions. Therefore, all predicted values were filtered by considering common empirical chromatographic observations; thus the insubstantial predictions were eliminated.

It was shown that application of additional empirical information can improve the prediction characteristics of developed retention models, which results with additional scientific and economic worthiness of developed models.

Keywords: ion chromatography, carbohydrate analysis, QSRR modeling, *iso-to-grad* approach

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Ionska kromatografija	2
2.1.1	Osnove kromatografije	2
2.1.2	Razvoj ionske kromatografije	2
2.1.3	Ionski kromatografski sustav	3
2.1.4	Razdvajanje u ionskoj kromatografiji	8
2.1.5	Karakteristične kromatografske veličine	8
2.2	Analiza ugljikohidrata	14
2.3	Modeliranje vremena zadržavanja	15
2.3.1	Izokratno modeliranje	16
2.3.2	Gradijentno modeliranje	18
2.3.3	<i>Iso-to-grad</i> model	20
2.3.4	QSRR modeliranje	22
2.4	Umjetna inteligencija	24
2.4.1	Umjetne neuronske mreže	24
2.4.2	Genetički algoritam	28
3	EKSPERIMENTALNI DIO	30
3.1	Reagensi i otopine	30
3.2	Aparatura	32
3.2.1	Ionski kromatografski sustav	32
3.2.2	Računalo i softverski paketi	32
3.3	Dizajn eksperimenta	33
3.4	Odabir deskriptora	34

4	MODELIRANJE	35
4.1	Optimalan broj ponovljenih treniranja mreže.....	35
4.2	Kriteriji eliminacije nesuvislih QSRR rješenja	35
5	REZULTATI I RASPRAVA	36
5.1	Određivanje optimalnog broja ponovljenih ANN treniranja	36
5.2	Izrada primarnog QSRR modela	38
5.3	Odbacivanje očitih pogrešaka predviđanja.....	40
5.4	Gradijentni modeli vremena zadržavanja	55
6	ZAKLJUČAK	59
7	LITERATURA.....	60

1 UVOD

Prema IUPAC-u kromatografija je fizikalno kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga se kreće u određenom smjeru (pokretna faza) [1,2]. Osim odabira pokretne i nepokretne faze, za kromatografsku analizu potrebno je odabrati i brzinu protoka te temperaturu na koju će se kolona termostatirati. Kao rezultat kromatografske analize dobiva se kromatogram iz kojeg je moguće iščitati vremena zadržavanja analita iz uzorka, odnosno vremena koja su im potrebna da prođu kroz kolonu od injektora do detektora [3]. Prema tome, ukupno vrijeme trajanja analize, za koje je poželjno da bude što kraće, ovisi o vremenu zadržavanja najzadržanijeg sastojka. Podešavanje parametara kromatografske analize u svrhu smanjenja vremena trajanja analize zasniva se na metodi pogodaka i pogreške što znatno produljuje vrijeme potrebno za razvoj novih metoda. Kako taj proces ne bi bio toliko dugotrajan, tijekom godina su razvijani modeli za predviđanje vremena zadržavanja [4–10]. Nedostatak tih modela je što su se isključivo koristili za komponente za koje su izrađeni. Stoga bi bilo poželjno izraditi modele koji bi bili univerzalni za sve komponente iz određene grupe spojeva, temeljene na njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama. U tu svrhu koriste se QSRR matematički modeli (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship*) koji omogućavaju predviđanje vremena zadržavanja s obzirom na kemijsku strukturu analita i fizikalno-kemijska svojstva pokretne i nepokretne faze.

QSRR modeli primjenjuju se od kraja 70-ih godina i predstavljaju statistički dobivene odnose između kromatografskih parametara i veličina (deskriptora) koje karakteriziraju molekulsku strukturu analita. Neki od autora koji su predviđali parametre vremena zadržavanja su: Kaliszan [11,12], Carr [13,14], Forgács i Cserháti [15], Valko [3] i Park [16], a njihova predviđanja provedena su pri izokratnoj eluciji, odnosno pri konstantnoj temperaturi, protoku i koncentraciji eluensa.

S obzirom da se u praksi gradijentnom elucijom dobivaju bolji rezultati kromatografske analize, u ovom radu primijenjen je *iso-to-grad* QSRR model za predviđanje vremena zadržavanja ugljikohidrata čiji je princip predviđanje vremena zadržavanja ugljikohidrata pri izokratnim elucijama i njegovo implementiranje u gradijentni model vremena zadržavanja baziran na izokratnim podacima [17–19]. Na taj način moguće je predvidjeti vremena zadržavanja komponenata pri gradijentnim analizama koje do tada nisu provedene na ionskom kromatografskom sustavu.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Ionska kromatografija

2.1.1 Osnove kromatografije

Kako je već prije rečeno, kromatografija je fizikalno kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između pokretne i nepokretne faze [1,2]. Nepokretna faza može biti čvrsta ili tekuća, a ako je tekuća može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju.

Glavne metode kromatografije su: frontalna kromatografija, kromatografija istisnućem i kromatografija ispiranjem. Kod frontalne kromatografije se ne koristi dodatna pokretna faza jer se uzorak u tekućem ili plinovitom obliku kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu, dok se kod kromatografije istisnućem i kromatografije ispiranjem uzorak mora unositi u sustav u ograničenim količinama. Kromatografija istisnućem javlja se kad pokretna faza sadrži spoj koji se na nepokretnoj fazi zadržava jače od ispitivanog uzorka, a u kromatografiji ispiranjem pokretna faza, eluens, neprekidno prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze. Eluens sadržava tvari koje se ravnomjerno natječu s ispitivanim uzorkom za aktivna mjesta u kromatografskoj podlozi (kompeticijske tvari).

Kromatografija se dijeli na nekoliko načina: prema obliku kromatografske podloge (kolonska i plošna), prema fizikalnom stanju pokretne i nepokretne faze (plinsko-tekućinska, plinsko-čvrsta, tekućinsko-tekućinska i tekućinsko-čvrsta), prema fizikalnom stanju pokretne faze (plinska, tekućinska i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima) i prema mehanizmu separacije (adsorpcijska, razdjelna, ionska izmjenjivačka, kromatografija isključenjem i afinitetna kromatografija) [20].

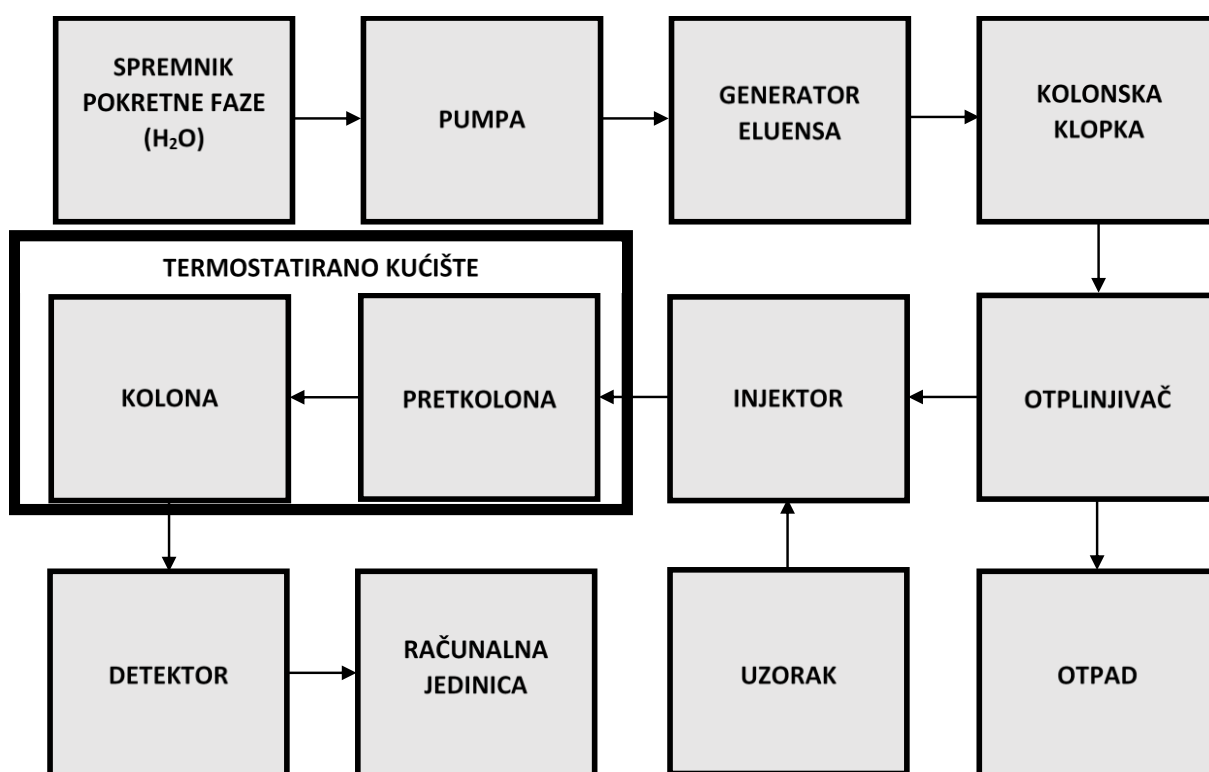
2.1.2 Razvoj ionske kromatografije

Ionsku kromatografiju kao analitičku metodu uveli su Small, Stevens i Bauman [21]. Vrlo kratko nakon toga korištena je kao moderna tehnika za određivanje niza ionskih vrsta, a krajem sedamdesetih godina prvi je put upotrijebljena za analizu organskih iona. Zahtjevi za kromatografskom tehnikom koja bi omogućila razdvajanje i analizu organskih kiselina doveli su do razvoja metode temeljene na mehanizmu ionskog isključivanja koju su prvi opisali Wheaton i Bauman [22]. Širina primjene ionske kromatografije se uvelike povećala

uvođenjem elektrokemijskih i spektrometrijskih detektora, a danas je ionska kromatografija moderna analitička tehnika i sastavni dio moderne organske i anorganske analize [20].

2.1.3 Ionski kromatografski sustav

Slika 1 prikazuje blok shemu ionskog kromatografskog sustava s amperometrijskim detektorom. Pokretna faza, ultračista deionizirana voda, crpi se iz spremnika pomoću pumpe i potiskuje kroz sustav. U računalno kontroliranoj jedinici, generatoru eluensa, pripravlja se eluens željene koncentracije i uvodi u kolonsku klopku i otplinjivač kako bi se iz eluensa uklonile smetajuće ionske vrste i potencijalno prisutni plinovi. Eluens zatim nastavlja do injektorske jedinice u kojoj se uzorak uvodi u tok eluensa te nošen pokretnom fazom prolazi kroz pretkolonu i kolonu gdje se sastojci izdvajaju iz uzorka. Pretkolona i kolona nalaze se u termostatiranom kućištu kako bi se analiza provodila u kontroliranim uvjetima. Nakon izlaska iz kolone analiti dolaze do amperometrijskog detektora. Računalna jedinica služi za sakupljanje i obradu signala sa detektora.

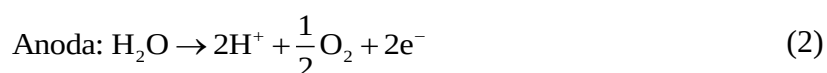


Slika 1. Blok shema ionskog kromatografskog sustava.

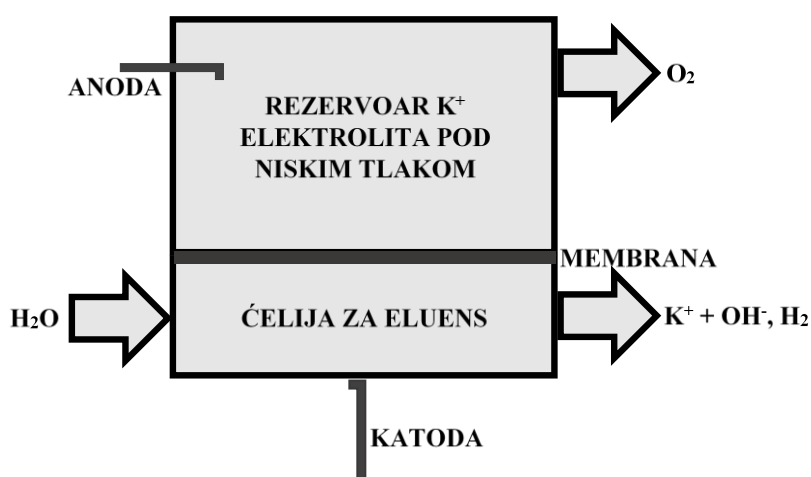
Iako ionski kromatografski sustav ne koristi izrazito visoke tlakove, materijali od kojih je izrađen moraju biti dovoljno čvrsti. Zato se za njihovu izradu koriste polieterketoni i druge vrste plastike, safiri, rubini i keramika [20].

2.1.3.1 On-line stvaranje KOH eluensa

Moderni ionski kromatografski sustavi najčešće su opremljeni jedinicom za *on-line* stvaranje eluensa, a kod anionske kromatografije je to najčešće KOH eluens. Sustav za generaciju KOH eluensa sastoji se od visokotlačne ćelije za pripravu eluensa i rezervoara K^+ elektrolita pod niskim tlakom, a prikazan je na slici 2. Između ćelije i rezervoara nalazi se polupropusna membrana koja propušta samo kalijeve ione u ćeliju za generaciju eluensa. Ona sadrži platinsku katodu, a rezervoar platinsku anodu, dok se kao pokretna faza koristi ultračista deionizirana voda. Za pripravu eluensa potrebno je uspostaviti odgovarajući napon između katode i anode što dovodi do elektrolize vode prikazane jednačbama (1) i (2):



Nastali vodikovi ioni tjeraju kalijeve ione kroz polupropusnu membranu u ćeliju za generaciju eluensa u kojoj se nalaze hidroksidni ioni nastali elektrolizom. Količina kalijevih iona proporcionalna je količini nastalih vodikovih, odnosno hidroksidnih iona. Kisik koji nastaje na anodi odvodi se kroz otvor za plinove, a nastali vodik potrebno je ukloniti otplinjivačem.



Slika 2. Shema *on-line* generacije KOH eluensa.

Koncentracija KOH eluensa proporcionalna je jakosti struje i obrnuto proporcionalna protoku pokretne faze. Kontroliranjem jakosti struje elektrolize, uz određeni protok pokretne faze i narinuti potrebni potencijal, kontrolira se koncentracija KOH u eluensu [20].

2.1.3.2 Amperometrijska detekcija

Amperometrijska detekcija koristi se za analizu otopina koje slabo disociraju i imaju pK vrijednosti iznad 7 pa se zbog toga teško detektiraju drugim metodama.

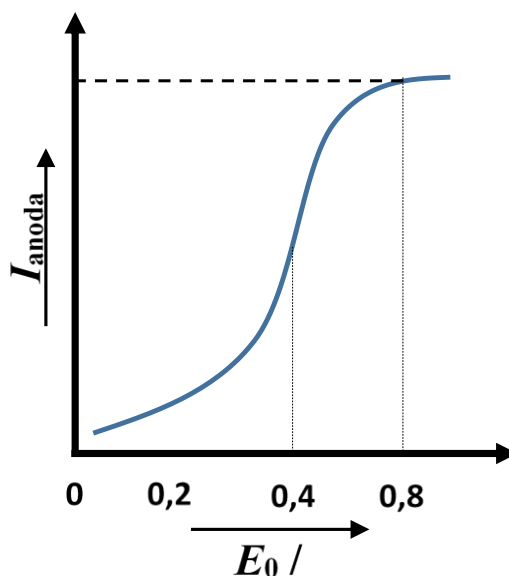
Amperometrijski detektor je troelektrodni sustav koji sadrži radnu, referentnu Ag/AgCl elektrodu i protuelektrodu. Na radnoj elektrodi može se odvijati oksidacija ili redukcija ovisno o narinutom potencijalu. Referentna Ag/AgCl elektroda ima točno poznat i stalan elektrodni potencijal, E_{ref} , koji je neovisan o koncentraciji analita i drugih iona u otopini. Protuelektroda služi održavanju potencijala i inhibiranju strujnog toka na referentnoj elektrodi kako se ne bi uništila. Kako elektroaktivna komponenta prolazi kroz detektor, ona se djelomično reducira ili oksidira, a kao rezultat elektrokemijske reakcije dobiva se katodna ili anodna struja koja je proporcionalna koncentraciji analizirane komponente i prikazuje se kromatografskim signalom. Amperometrijski detektori mogu se koristiti za analiziranje velike količine organskih i anorganskih iona već u koncentracijama od nekoliko $\mu\text{g/L}$ [23,24].

Kako bi se odredio prikladan radni potencijal za amperometrijsku detekciju potrebno je provesti voltametrijske eksperimente. Voltometrija je elektroanalitička tehnika mjerenja u kojoj se kao signal pobude koristi linearno promjenjivi potencijal, a signal odziva je jakost struje koja je funkcija narinutog potencijala. Osnova voltametrijskih eksperimenata je linearna promjena potencijala radne elektrode s vremenom od početnog potencijala, $E_{\text{poč}}$, do konačnog potencijala, E_{kon} , i natrag [25].

Obzirom da je prijenos naboja puno brži od difuzije, na površini elektrode se u svakom trenutku uspostavlja ravnoteža opisana Nernstovom jednadžbom:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,059 \text{ V}}{n} \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} \quad (3)$$

u kojoj E predstavlja elektrodni potencijal redoks sustava (V), E° standardni elektrodni potencijal redoks sustava (V), n broj izmijenjenih elektrona u reakciji (4), a $[\text{A}]$ i $[\text{B}]$ koncentracije reducirane (A) i oksidirane vrste (B). Standardni elektrodni potencijal (E°) (standardni redukcijski potencijal) je relativni elektrodni potencijal redoks sustava određen prema standardnoj vodikovoj elektrodi ($E^{\circ} = 0,00 \text{ V}$) pri standardnim uvjetima, odnosno temperaturi 25°C , tlaku 101325 Pa i vrijednosti aktiviteta vodikovih iona 1.



Slika 3. Voltamogram oksidacije komponente A.

Tijekom amperometrijske detekcije na radnoj elektrodi odvija se reakcija oksidacije:



Dok elektrolit struji uz površinu elektrode, brzina strujanja elektrolita je manja od brzine strujanja u otopini zato što se među slojevima tekućine javlja sila trenja, odnosno tekućine su viskoznog karaktera. Brzina strujanja se mijenja od nule na samoj površini elektrode do konstantne brzine u masi otopine, a gradijent brzine javlja se u hidrodinamičkom graničnom sloju čija debljina ovisi o brzini strujanja tekućine. Difuzijski sloj je tanji od hidrodinamičkog graničnog sloja, ali i njegova debljina ovisi o hidrodinamici sustava. Za različite brzine strujanja dobivaju se različiti odnosi debljine ova dva sloja.

S obzirom da se uz određene hidrodinamičke uvjete uspostavlja određena debljina difuzijskog sloja koja se ne mijenja s vremenom za sustav se može reći da je postignuo stacionarno stanje kod kojeg se unutar difuzijskog sloja prijenos tvari odvija difuzijom. Ovisnost jakosti struje elektrokemijske reakcije o debljini difuzijskog sloja i koncentraciji na površini elektrode prikazuje se jednadžbom:

$$I = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot D \cdot c}{\delta} \quad (5)$$

u kojoj I predstavlja jakost granične difuzijske struje, tj. zbroj jakosti katodne i anodne struje (A), n broj izmijenjenih elektrona, F Faradayevu konstantu ($96487 \text{ C/mol} = 96487 \text{ As/mol}$),

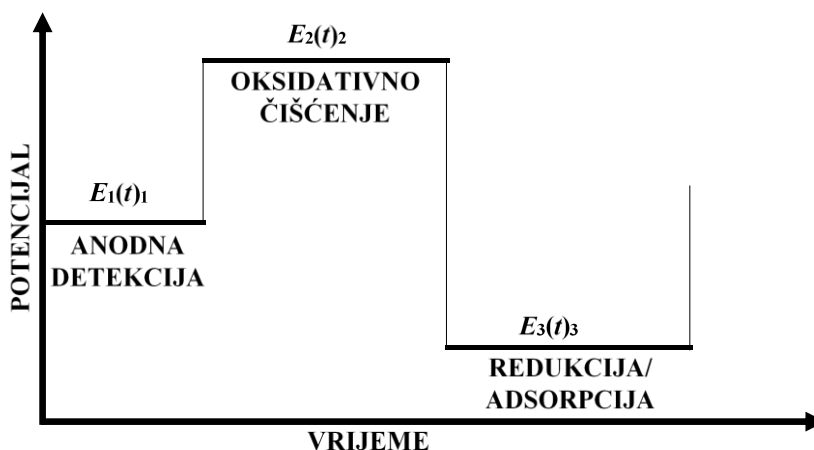
A površinu elektrode (m^2), D difuzijski koeficijent (m^2/s), c koncentraciju tvari na površini elektrode (mol/m^3), a δ debljinu difuzijskog sloja (m).

2.1.3.3 Pulsna amperometrija

Kod pulsne amperometrije sustav je u nestacionarnom stanju, a jakost struje mjeri se u kratkim vremenskim intervalima. Uz elektrodu postoji koncentracijski gradijent jer se molekule u njezinoj blizini oksidiraju, a ostale moraju prvo difundirati do elektrode da bi se mogle oksidirati. S vremenom se koncentracijski gradijent smanjuje zbog čega opada jakost difuzijske struje. Kad se elektroda polarizira, odnosno kada se koncentracija na elektrodi izjednači s nulom, jednadžba (5) poprima oblik:

$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot c \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t}} \quad (6)$$

i poznata je pod nazivom Cottrelova jednadžba u kojoj $I(t)$ predstavlja promjenu jakosti struje u vremenu t (A), n broj izmijenjenih elektrona, F Faradayevu konstantu ($96487 \text{ C/mol} = 96487 \text{ As/mol}$), A površinu elektrode (m^2), c koncentraciju na površini elektrode (mol/m^3), D difuzijski koeficijent (m^2/s), a t vrijeme (s). Iz izraza (6) je vidljivo da je jakost struje proporcionalna koncentraciji tvari [23,26].



Slika 4. Oblik pulsa potencijala u amperometrijskoj detekciji.

Kod pulsne amperometrije koristi se brzo ponavljajuća sekvenca na tri različita radna potencijala (E_1 , E_2 i E_3) primijenjena za tri različita vremena (t_1 , t_2 i t_3) na zlatnoj radnoj elektrodi. Primjenom dodatnih potencijala (više pozitivnih ili negativnih) oksidirane i

reducirane vrste uklanjaju se s elektrode. Iako je uklanjanje gornjeg sloja elektrode preduvjet za čistu, katalitički aktivnu površinu elektrode, ono se mora smanjiti izbjegavanjem previsokog pozitivnog potencijala. Razlog je u tome što se uklanjanjem gornjeg sloja elektrode povećava volumen ćelije što utječe na smanjenje odziva ispitivane komponente određene koncentracije [23].

2.1.4 Razdvajanje u ionskoj kromatografiji

U ionskoj kromatografiji postoje dvije faze, pokretna i nepokretna. Nepokretna faza, koja može biti u krutom ili gel obliku [27] je ionski izmjenjivač sastavljen od nosača, funkcionalne skupine i protuiona. Nosač je netopljiva matrica koja može biti organskog ili anorganskog porijekla, funkcionalna skupina je ionizirana skupina vezana na matricu (aktivna mjesta na nepokretnoj fazi), dok su protuioni ekvivalentna količina suprotno nabijenih iona na aktivnim mjestima u svrhu očuvanja elektroneutralnosti sustava.

Razdvajanje u ionskoj kromatografiji temelji se na svojstvu protuiona da izmjene mjesta s ionima istog predznaka koji se nalaze u otopini u kontaktu s izmjenjivačem, odnosno u pokretnoj fazi. Nakon što ion iz otopine zamijeni protuion na aktivnom mjestu, zadržava se na ionskom izmjenjivaču pod utjecajem elektrostatskih sila određeno vrijeme, ovisno o njegovom afinitetu prema izmjeni na nepokretnoj fazi. Ako se u otopini uzorka nalazi više različitih iona oni će se na nepokretnoj fazi zadržati različit vremenski period i na taj se način izdvajaju analiti iz uzorka upotrebom ionske kromatografije [20].

2.1.5 Karakteristične kromatografske veličine

2.1.5.1 Omjeri raspodjele u kromatografiji

Kako je već prije objašnjeno, kromatografska razdvajanja temelje se na različitim afinitetima komponenata uzorka prema pokretnoj i nepokretnoj fazi.

$$A_{MF} \rightleftharpoons A_{SF} \quad (7)$$

Ako se pretpostavi da je između pokretne i nepokretne faze uspostavljeno ravnotežno stanje procesa ionske izmjene, raspodjela komponenti između dviju faza može se prikazati izrazom za konstantu razdjeljenja:

$$K_{c,i} = \frac{c_{S,i}}{c_{M,i}} \quad (8)$$

gdje $K_{c,i}$ predstavlja konstantu razdjeljenja komponente i između dvije faze, $c_{S,i}$ koncentraciju komponentne i u nepokretnoj fazi (mol/dm^3), a $c_{M,i}$ koncentraciju komponente i u pokretnoj fazi (mol/dm^3). Ako komponenta ima veći afinitet prema nepokretnoj fazi, konstanta razdjeljenja poprimat će veće vrijednosti, a ako ima veći afinitet prema pokretnoj fazi vrijednosti konstante razdjeljenja bit će bliže nuli. Zato su razlike u vrijednostima konstanti razdjeljenja različitih komponenata preduvjet za njihovo uspješno kromatografsko razdvajanje. S obzirom da ta pretpostavka vrijedi samo u idealnim slučajevima kada se uspostavi ravnotežno stanje, u dinamičnom ionskom kromatografskom sustavu bolje je promatrati vrijeme koje pojedina komponenta provede u nepokretnoj fazi [23,28,29].

2.1.5.2 Vrijeme zadržavanja

Vrijeme zadržavanja je vrijeme koje uzorak provede u koloni, odnosno vrijeme koje mu je potrebno da prođe kroz kolonu od injektora do detektora [3]. Komponente prolaze kroz kromatografsku kolonu čiji se ukupni volumen sastoji od volumena pokretne (V_M) i volumena nepokretne faze (V_S). Sve komponente koje se razdvajaju u jednoj koloni prolaze kroz isti volumen koji je jednak:

$$V_M = t_{R,i} v_i = t_0 v_0 \quad (9)$$

gdje V_M predstavlja volumen pokretne faze (dm^3), $t_{R,i}$ vrijeme zadržavanja komponente i (s), a v_i brzinu protoka komponente i kroz kolonu (dm^3/s). Brzina v_0 i vrijeme protoka t_0 odnose se na nezadržanu komponentu, odnosno pokretnu fazu.

Brzina protoka komponente i manja je od brzine protoka nezadržane komponente i ovisi o vremenu koje komponenta i provede u nepokretnoj fazi. Važan parametar kojim se opisuje brzina gibanja komponenata u koloni je faktor zadržavanja, k_i :

$$k_i = K_c \frac{V_S}{V_M} = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (10)$$

gdje K_c predstavlja konstantu razdjeljenja (8), V_S i V_M volumene nepokretne i pokretne faze (dm^3), c_S i c_M koncentracije komponente i u nepokretnoj i pokretnoj fazi (mol/dm^3), $t_{R,i}$ vrijeme zadržavanja komponente i (s), a t_0 vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka (s). Kako faktor zadržavanja predstavlja omjer vremena koje uzorak provede u nepokretnoj i pokretnoj fazi i ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, prikladniji je izraz

za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Poznavanje faktora zadržavanja dobar je pokazatelj kvalitete razdjeljivanja tvari određenom kromatografskom metodom. Ako faktor zadržavanja ima vrijednost puno manju od 1 znači da dolazi do prebrze elucije, a ako mu je vrijednost veća od 20 znači da je elucija prespora. Idealna vrijednost faktora zadržavanja je između 1 i 5 [23,28,29].

2.1.5.3 Selektivnost

Selektivnost, α , je mjera sposobnosti razdvajanja komponenata, a definira se kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenata:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}; k_2 \geq k_1 \quad (11)$$

gdje k_1 predstavlja faktor zadržavanja komponente koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena. Selektivnost ovisi o faktoru zadržavanja zbog čega ovisi o sastavu pokretne i nepokretne faze, ali i o temperaturi sustava. Ako selektivnost ima vrijednost 1, to znači da nema razlike između dvije analizirane komponente i njihovo razdvajanje nije moguće [29].

2.1.5.4 Djelotvornost kromatografske kolone

Djelotvornost kromatografske kolone definira širenje eluirane zone tijekom prolaska komponenti kroz kolonu. Zona širenja proporcionalna je vremenu zadržavanja pojedine komponente u koloni, a obrnuto proporcionalna brzini pokretne faze. Djelotvornost kolone može se izraziti brojem teorijskih odsječaka, N (eng. *number of theoretical plates*), ili visinom ekvivalentnom teorijskom odsječku, $HETP$ (eng. *height equivalent to a theoretical plate*), a kolona je djelotvorna kada su vrijednosti visine ekvivalentne teorijskom odsječku niske, a vrijednosti broja teorijskih odsječaka visoke [30]. Visina ekvivalentna teorijskom odsječku, $HETP$, računa se prema izrazu:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (12)$$

gdje L predstavlja duljinu kromatografske kolone, a N broj teorijskih odsječaka [4,28].

Teorija odsječaka zamišlja veliki broj odijeljenih slojeva duž kromatografske kolone i da se u svakom od njih uspostavlja ravnoteža između pokretne i nepokretne faze. Ako je elucija idealna, to znači da se unutar kromatografskih zona komponente raspodjeljuju prema

Gaussovoj normalnoj raspodjeli što kao odzive analize daje simetrične Gaussove funkcije. U tom slučaju izraz za broj teorijskih odsječaka poprima oblik:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (13)$$

gdje N predstavlja broj teorijskih odsječaka, t_R vrijeme zadržavanja, a σ standardnu devijaciju njene raspodjele oko centra zone.

Umjesto standardne devijacije može se upotrijebiti vrijednost širine pika, w_b :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (14)$$

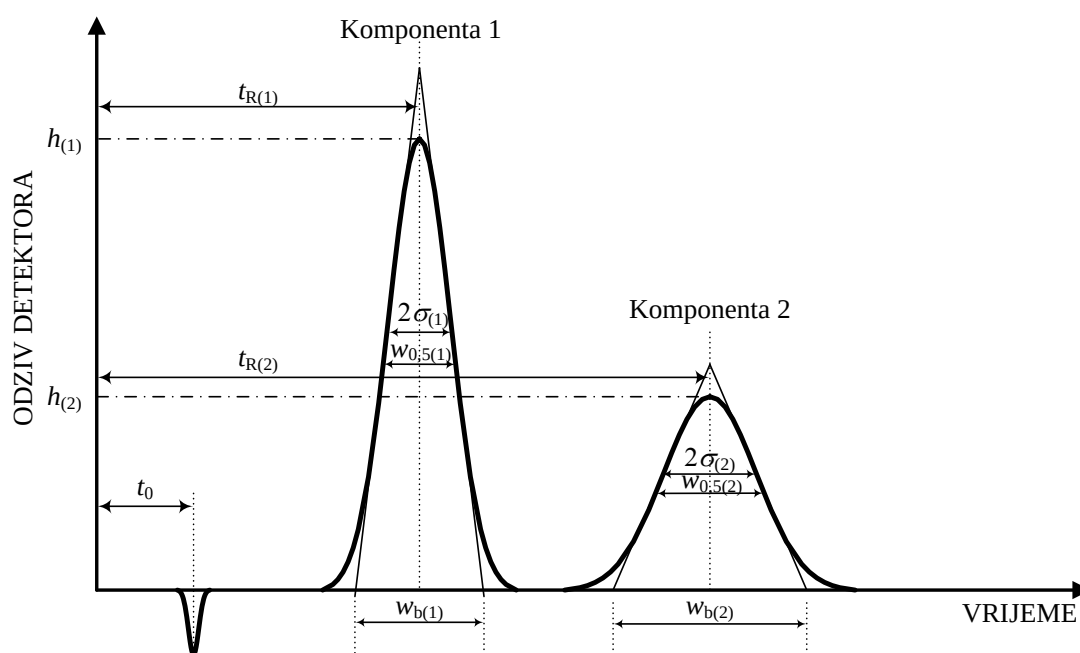
To je duljina osnovice trokuta kojeg čine tangente u točkama infleksije s obje strane pika produljene do osnovice kromatograma. Parametar $w_{0,5}$ je širina polovice maksimalne visine pika.

Broj teorijskih odsječaka može se izračunati i prema izrazu:

$$N = 2\pi \left(t_R \frac{h}{A} \right)^2 \quad (15)$$

gdje je h visina kromatografske krivulje, a A površina ispod nje.

2.1.5.5 Razlučivanje komponenti



Slika 5. Shema odziva kromatografske analize s naznačenim karakterističnim veličinama.

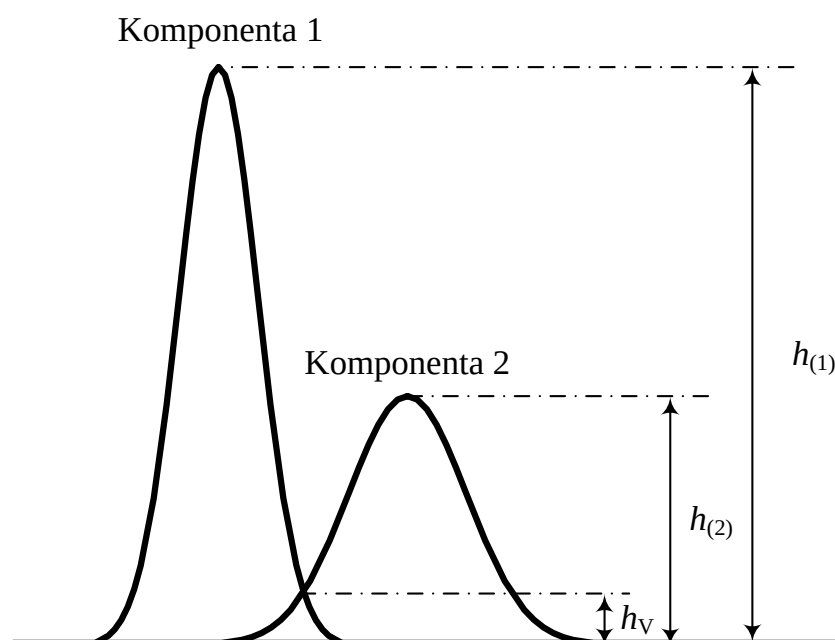
Razlučivanje komponenti, R_s , je kvantitativna mjera za izražavanje sposobnosti odjeljivanja analiziranih komponenti pri određenoj eluciji, a izražava se kao:

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (16)$$

gdje $t_{R,1}$ i $t_{R,2}$ predstavljaju vremena zadržavanja dviju susjednih komponenti, a σ_1 i σ_2 standardne devijacije krivulja odziva [31].

Vrijednost razlučivanja komponenti može se procijeniti i iz vrijednosti visina kromatografskih krivulja, h , i visine njihovog eventualnog preklopa, h_v [28]:

$$R_s \approx 0,1 \left(\frac{\bar{h}}{h_v} \right); \quad \bar{h} = \frac{h_1 + h_2}{2} \quad (17)$$



Slika 6. Procjena razlučivanja na temelju visina susjednih krivulja i njihove preklopljenosti.

Većina kromatografičara smatra da je za kvalitativnu analizu uzoraka potrebno postići vrijednosti razlučivanja veće od 1,5, dok neki za krivulje koje znatnije odstupaju od Gaussove funkcije razdiobe predlažu da minimalna potrebna vrijednost razlučivanja bude 2 [29].

2.1.5.6 Faktor asimetrije

U idealnom slučaju koncentracijski profili kromatograma odgovaraju normalnoj Gaussovoj razdiobi, ali svako odstupanje od idealnosti dovodi do deformacije kromatografske krivulje, njenog pružanja ili povlačenja.

U svrhu opisivanja odstupanja od idealnosti, koristi se faktor asimetrije, A_s . To je bezdimenzijska veličina koja ima dvojaku definiciju, ovisno o upotrijebljenom standardu. Prema američkoj i europskoj farmakopeji, asimetrija se računa prema izrazu:

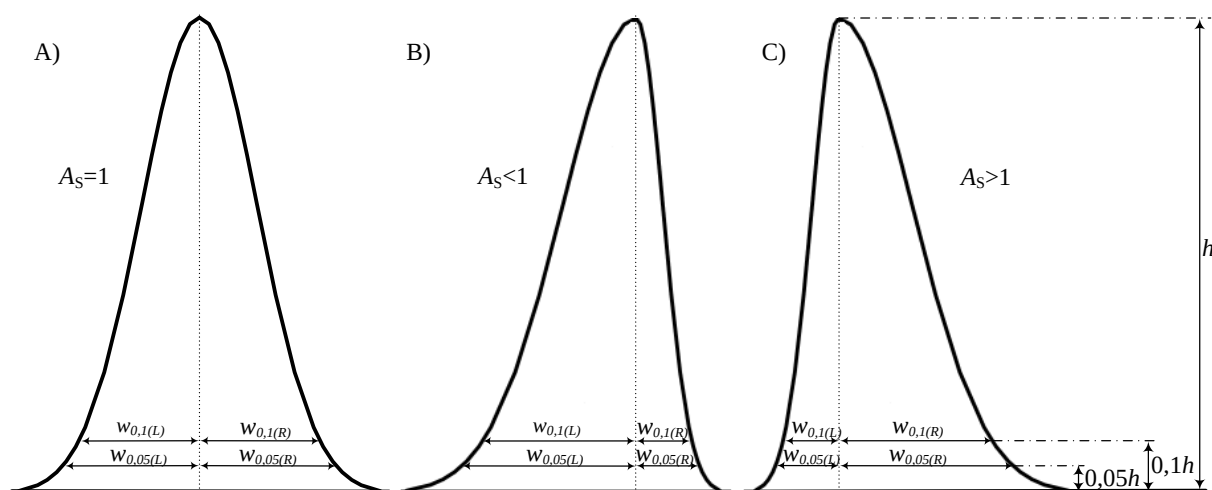
$$A_s = \frac{w_{0,05(D)} + w_{0,05(L)}}{2w_{0,05(L)}} \quad (18)$$

gdje $w_{0,05(D)}$ predstavlja desnu širinu kromatografske krivulje na 5 % njezine visine, a $w_{0,05(L)}$ njezinu lijevu širinu na istoj visini.

Ipak, većina kromatografičara današnjice ravna se prema ALSSA (engl. *Analytical and Life Science System Association*) standardu, te faktor asimetrije računa prema izrazu:

$$A_s = \frac{w_{0,1(D)}}{w_{0,1(L)}} \quad (19)$$

gdje $w_{0,1(D)}$ predstavlja desnu širinu kromatografske krivulje na 10 % njezine visine, a $w_{0,1(L)}$ njezinu lijevu širinu na istoj visini.



Slika 7. Faktor asimetrije kromatografske krivulje pri tri različita elucijska profila:

- A) simetrična kromatografska krivulja, B) kromatografska krivulja s početnim razvlačenjem i
C) kromatografska krivulja sa završnim razvlačenjem.

Ako faktor asimetrije poprima vrijednosti u intervalu 0,9–1,2, kromatografska kolona smatra se kvalitetnom [29].

2.2 Analiza ugljikohidrata

U posljednjih pola stoljeća došlo je do značajnog razvoja metoda analize ugljikohidrata, a uslijed ubrzanog napretka analitičkih tehnika.

70-ih godina XX. stoljeća Hobbs i Lawrence istraživali su razdvajanje i kvantifikaciju ugljikohidrata pomoću kationskih izmjenjivačkih kolona s organskim protuionima [32]. Opisali su utjecaj organskih protuiona i njihovog stupnja supstitucije na razdvajanje ugljikohidrata na jako kiselim kationskim izmjenjivačkim smolama kada se kao pokretna faza koristi smjesa etanola i vode. Pokazalo se da trimetilamonijev oblik smole daje najbolje rezultate separacije pri opisanim uvjetima optimizacije. Nachtmann i Budna [33] opisali su određivanje nekih monosaharida, disaharida i trisaharida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Relativno nepolarni derivati omogućuju brza izokratna razdvajanja na polarnim adsorbensima, kao što su silika gel i glinica. Ugljikohidratne derivate moguće je detektirati s visokom osjetljivošću u granicama detekcije nanogramskih veličina za sve ispitivane šećere. Kompletna analiza traje 70–75 min, od čega je 10–15 min potrebno za kromatografsko razdvajanje. McGinnis i Fang [34] koristili su HPLC za razdvajanje različitih djelomično i potpuno supstituiranih ugljikohidrata pomoću kolone s mikročesticama silikagela pri čemu su mijenjali otapala ovisno o relativnoj polarnosti ugljikohidrata. Ispitivani su nesupstituirani glikozidi, izopropiliden i benziliden derivati, djelomično metilirani ugljikohidrati i niz potpuno acetiliranih ugljikohidrata, a rezultati su pokazali da se HPLC može koristiti za kvalitativne i kvantitativne analize raznih supstituiranih ugljikohidrata.

Do početka 80-ih godina ugljikohidrati su se razdvajali pomoću kromatografije na papiru, kromatografije s ionskom izmjenom, tankoslojnom kromatografijom i kromatografijom s gel filtracijom. Iako su tradicionalne metode postizale dobru rezoluciju, za njih se trošilo relativno puno vremena. Yang i suradnici [35] usporedili su HPLC metodu s plinsko-tekućinskom kromatografskom (engl. *gasliquid chromatography*, GLC) metodom za razdvajanje smjesa uobičajeno prisutnih monosaharida. Naime, HPLC ne može u potpunosti razdvojiti smjese D-manoze i D-glukoze, D-glukoze i D-galaktoze, te D-ksiloze i L-arabinoze. Za razliku od HPLC, GLC postiže puno bolje razdvajanje, ali samo kada se uzorci prevedu u hlapive komponente. Na kraju su došli do zaključka da se HPLC metodom može postići ista rezolucija kao i GLC metodom ukoliko se koriste kolone izrađene od poroznih mikročestica.

Baust i sur. [36] usporedili su kolone izrađene od silika gela sa ionsko izmjenjivačkim kolonama za razdvajanje ugljikohidrata i poliola. Iako su ionsko izmjenjivačke kolone dale bolje rezultate, kolone sa silika gelom daju rezultate visoke rezolucije, a jeftinije su i dugotrajnije od ionsko izmjenjivačkih kolona.

Sredinom 80-ih godina XX. stoljeća, Bonn i sur. [37,38] došli su do zaključka da je prilikom analize ugljikohidrata HPLC metodom temperatura kolone jedan od ključnih parametara te su opisali utjecaj različitih funkcionalnih grupa na eluciju, kao i neaditivnost broja teorijskih odsječaka, N , visine ekvivalentne teorijskom odsječku, $HETP$ i razlučivanja, R_s . Rajakylä [39] je također ispitivao utjecaj temperature kolone. Dokazao je da se snižavanjem temperature kolone povećavaju vremena zadržavanja komponenata i dobiva bolje razlučivanje.

90-ih godina XX. stoljeća Ueda i sur. [40] napravili su preliminarne testove analize ugljikohidrata anionsko izmjenjivačkom kromatografijom s različitim metalnim elektrodama kao detektorima. Pri vrijednosti 3 omjera signala i šuma, granica detekcije glukoze iznosila je 110 fmol. Malo kasnije analize ugljikohidrata HPLC metodama bazirale su se na hidrofilnim interakcijama između pokretne i nepokretne faze. Tako je npr. Schurms [41] uz polarnu nepokretnu fazu koristila manje polaran eluens. Krajem 90-ih godina povezane su HPLC metoda i metoda infracrvene spektrometrije s Fourierovim transformacijama (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) za određivanje ugljikohidrata, alkohola i organskih kiselina u vinu [42].

Hanko i Rohrer [43] upotrijebili su pulsnu amperometrijsku detekciju za određivanje ugljikohidrata, alkoholnih šećera i glikola proizvedenih od strane mikroorganizama. Pokazalo se da pulsna amperometrijska detekcija omogućava direktno određivanje ugljikohidrata, alkoholnih šećera i glikola te da je otporna na utjecaj interferencija iz matrice uzorka.

2.3 Modeliranje vremena zadržavanja

Predviđanja vremena zadržavanja komponenata mogu se koristiti za razvoj novih kromatografskih metoda ili za predviđanje kromatografskog razdvajanja smjesa. Modeli za predviđanje vremena zadržavanja dijele se na teorijske, temeljene na teorijskim objašnjenjima fizikalno-kemijskih procesa unutar kromatografskog sustava za čiju primjenu su potrebne informacije o analitu, nepokretnoj fazi i eluensu, te empirijske, temeljene na eksperimentalnim podacima koji pokušavaju pronaći ovisnost između vremena zadržavanja i

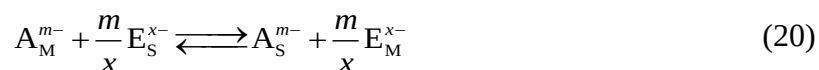
sastava eluensa. Empirijski modeli ispituju kako promjena sastava eluensa djeluje na kromatografski sustav, a njihove prednosti su velika točnost, brzina proračuna i mogućnost uključivanja više parametara u model, bez gubitka točnosti i znatnijeg vremena utrošenog za razvoj algoritma [44].

2.3.1 Izokratno modeliranje

Razvijeno je puno modela za predviđanje vremena zadržavanja komponenata pri izokratnoj eluciji. Neki od poznatijih su: model linearne jakosti otapala, Hooverov model, model dvokompeticijskog eluensa, model multikompeticijskog eluensa, polinomni model...

2.3.1.1 Model linearne jakosti otapala

Model linearne jakosti otapala (engl. *linear solvent strength model*, LSS model) je prvi i najjednostavniji teorijski model za predviđanje vremena zadržavanja, a izveden je za monokompeticijske eluense, na temelju ravnoteže procesa ionske izmjene:



gdje je A^{m-} ispitivani sastojak, a E^{x-} kompeticijski ion iz eluensa. Taj izraz može se pojednostaviti pa poprima oblik:

$$\log k_A = C - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x-}) \quad (21)$$

u kojem C predstavlja sumarnu konstantu svih konstanti koje se odnose na određeni kromatografski sustav (volumen nepokretne faze, volumen eluensa u koloni, konstanta ionske ravnoteže, kapacitet proboja kolone). Iz izraza (21) vidljivo je da je ovisnost logaritma faktora zadržavanja i logaritma koncentracije kompeticijskog iona u eluensu linearna, pri čemu je nagib pravca jednak omjeru nabojnog broja analita i kompeticijskog iona iz eluensa [5].

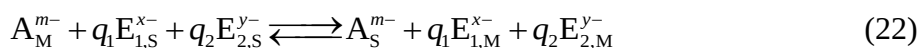
2.3.1.2 Hooverov model

Hooverov model može se primijeniti za višekomponentne eluense, a uzima u obzir utjecaj svih sastojaka eluensa na vrijeme zadržavanja analita. Za svaki sastojak eluensa

potrebno je eksperimentalno utvrditi koeficijent selektivnosti odgovarajućeg procesa ionske izmjene [6].

2.3.1.3 Model dvokompetijskog eluensa

Model dvokompetijskog eluensa (engl. *dual eluents species model*, DES) pojednostavljuje Hooverov model za dvokompetijski eluens, a za njegovu primjenu potrebno je eksperimentalno odrediti dva parametra: konstantu selektivnosti iona analita A^{m-} prema kompetijskom ionu iz eluensa E_1^{x-} ($K_{A/E1}$) te konstantu selektivnosti drugog kompetijskog iona iz eluensa E_2^{y-} prema ionu E_1^{x-} ($K_{E1/E2}$). Konstante se definiraju prema jednadžbi:



gdje su m , x i y nabojni brojevi iona, a q_1 i q_2 stehiometrijski koeficijenti [45,46].

2.3.1.4 Model multikompetijskog eluensa

Model multikompetijskog eluensa (engl. *multiple species eluent / analyte model*, MSEA) uzima u obzir da prilikom kromatografskih ispitivanja razdvajanja analita u širokom području pH-vrijednosti dolazi do protonizacije iona iz uzorka. Stoga se razmatraju interakcije svih tvari koje se nalaze u eluensu sa svim ionskim oblicima analita, zbog čega je ovo do danas najkompleksniji teorijski model [47].

2.3.1.5 Polinomni model

Kao što je već rečeno u poglavlju 2.3.1.1, LSS je najjednostavniji model za predviđanje vremena zadržavanja pri izokratnoj eluciji u ionskoj kromatografiji. S obzirom da uzima u obzir samo elektrostatičke efekte koji uzrokuju ionsku izmjenu, prisutnost mehanizama koji uzrokuju zadržavanje utječe na sposobnost predviđanja, a može se identificirati kao odstupanje od linearnosti. Primijećeno je i da nagib pravca u LSS modelu značajno odstupa od teorijskog u slučaju kada je analiziran velik broj analita. Odstupanje od teorijskog modela ovisi o promjeru hidratiziranog iona, a može se objasniti velikim promjerom iona koji sprječava njegovu penetraciju u ionski izmjenjivač zbog čega ne dolazi

do izmjene ekvivalentnog broja funkcionalnih grupa [48]. Kvaliteta predviđanja u situacijama kada se javlja odstupanje od linearnosti može se poboljšati uključivanjem dodatnog faktora u LSS model čime se dobiva polinomna ovisnost:

$$\log k_A = a_0 \log^2 c(E^{x-}) + a_1 \log c(E^{x-}) + a_2 \quad (23)$$

Parametri polinomnog modela, a_0 , a_1 i a_2 , određuju se eksperimentalno, a za to je potrebno provesti minimalno tri elucije pri izokratnim uvjetima.

Nedostaci ovog modela su nemogućnost primjene za višekomponentne pokretne faze [20]. Empirijska saznanja istovjetna ovom modelu koriste se i u drugim kromatografskim tehnikama [49,50]. Polinomni model već je korišten za predviđanje vremena zadržavanja u ionskoj kromatografiji [19], a primjenjuje se i u komercijalno dostupnom programskom paketu DryLab (Molnár-Institute for applied chromatography, Berlin, Njemačka) [51].

2.3.2 Gradijentno modeliranje

Kod gradijentne elucije sastav eluensa tijekom analize nije konstantan, što se najčešće postiže dodatkom sastojka eluensa koji povećava njegovu jakost, tj. koncentraciju, a naziva se modifikatorom. Promjena sastava eluensa naziva se gradijentnim profilom, a opisuje se funkcijom:

$$c_{\text{mod}}(t) = c_{\text{mod,poč}} + (c_{\text{mod,kraj}} - c_{\text{mod,poč}}) \cdot \left(\frac{t - t_{\text{g,poč}}}{t_g} \right)^S; \quad t_{\text{g,poč}} \leq t \leq t_{\text{g,kraj}} \quad (24)$$

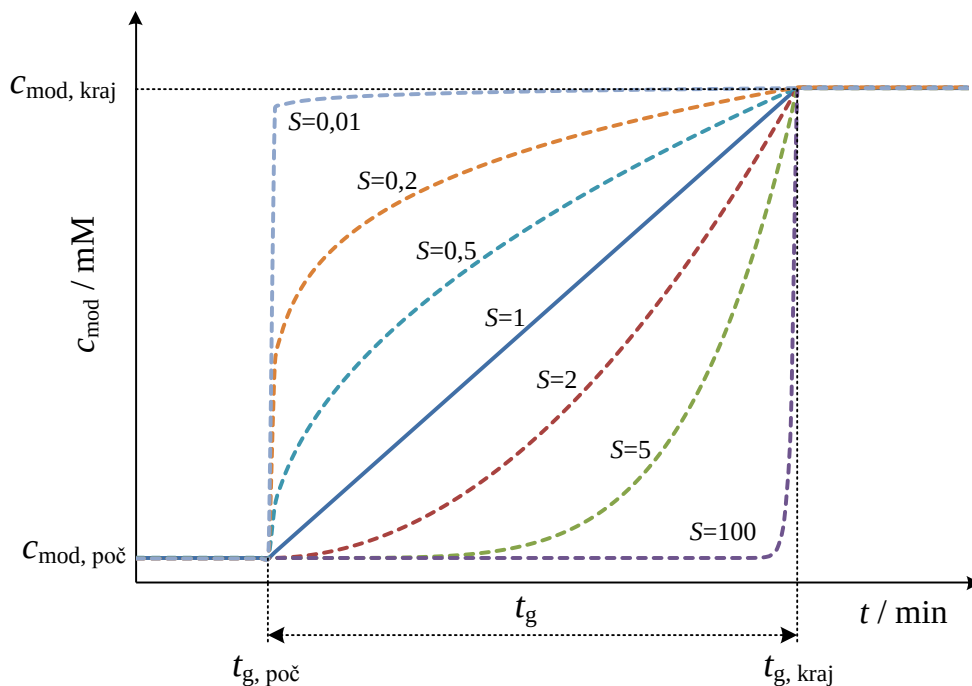
u kojoj $c_{\text{mod,poč}}$ predstavlja početnu koncentraciju modifikatora, $c_{\text{mod,kraj}}$ njegovu konačnu koncentraciju, $t_{\text{g,poč}}$ vrijeme početka gradijenta, $t_{\text{g,kraj}}$ vrijeme njegova završetka, t_g vrijeme trajanja gradijenta ($t_{\text{g,kraj}} - t_{\text{g,poč}}$), a S je parametar oblika gradijentnog profila koji određuje vrstu funkcije prema kojoj se mijenja koncentracija modifikatora između $t_{\text{g,poč}}$ i $t_{\text{g,kraj}}$ i prikazan je na slici 8.

Često se umjesto vremena trajanja gradijenta koristi nagib gradijenta, G :

$$G = \frac{c_{\text{mod,kraj}} - c_{\text{mod,poč}}}{t_g} \quad (25)$$

pa funkcija (24) poprima oblik:

$$c_{\text{mod}}(t) = c_{\text{mod,poč}} + (c_{\text{mod,kraj}} - c_{\text{mod,poč}})^{1-S} \cdot (t - t_{\text{g,poč}})^S G^S \quad (26)$$



Slika 8. Definiranje gradijentnog profila i učinak parametra oblika na njegov izgled.

Predviđanje vremena zadržavanja pri gradijentnoj eluciji je složenije i manje istraženo od predviđanja pri izokratnoj eluciji. Rocklin i suradnici [52] predložili su uvođenje tzv. efektivnog faktora zadržavanja, k_{ef} , koji se postepeno mijenja s promjenom koncentracije eluensa tijekom gradijentne elucije, a izražava se kao:

$$k_{ef} = C_g R^{-m/(m+x)} \quad (27)$$

gdje je C_g konstanta, R nagib gradijentnog profila koji se računa kao omjer promjene koncentracije eluensa s vremenom i volumnog protoka, a m i x nabojni brojevi iona analita, odnosno kompeticijskog iona iz eluensa kako je prikazano jednadžbom (20).

Na temelju gornjeg izraza Souza i suradnici [53] predviđali su faktor zadržavanja u ovisnosti o nagibu gradijentnog profila. Za primjenu takvog modela potreban je samo jedan eksperiment pri gradijentnoj eluciji kako bi se odredila konstanta C_g , ali obzirom da model ne uzima u obzir vrijeme početka gradijenta, nije pogodan za složenije gradijentne profile.

Za predviđanje vremena zadržavanja pri gradijentnoj eluciji moguće je upotrijebiti i umjetne neuronske mreže, ANN, čije su prednosti lako uklapanje u algoritme za optimizaciju i visoka točnost predviđanja. S druge strane, za njihovu izradu potreban je velik broj eksperimentalnih podataka o zadržavanju pri gradijentnoj eluciji, koji se sve više povećava s povećanjem broja parametara koji opisuju gradijent.

Zato se prilikom predviđanja vremena zadržavanja pri gradijentnoj eluciji koriste eksperimentalni podaci dobiveni izokratnom elucijom. Prijenos informacija iz izokratnog u

gradijentni model provodi se integriranjem, pri čemu se faktor zadržavanja dobiven izokratnom elucijom integrira od trenutka injektiranja uzorka do trenutka eluiranja. Taj princip temelj je *iso-to-grad* modela, odnosno integralnog gradijentnog modela [54].

2.3.3 *Iso-to-grad* model

Integralni gradijentni model temelji se na pretpostavci da je vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka u određenoj koloni uz stalan protok konstantno. Taj model proizlazi iz jednadžbe (10) kojom se definira koeficijent zadržavanja, k_i , a prema kojoj se vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka može izraziti kao:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} (t_R - t_0) \quad (28)$$

pri čemu $k_i [c]$ označava faktor zadržavanja uzimajući u obzir njegovu ovisnost o koncentraciji kompeticijskih iona iz eluensa, c . Ta jednadžba (28) može se zapisati i kao:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} \{ (t_R - t_0) - (t_0 - t_0) \} \quad (29)$$

Član u vitičastoj zagradi može se prikazati pomoću integrala:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} \int_{(t_0 - t_0)}^{(t_R - t_0)} d(t - t_0) = \frac{1}{k_i [c]} \int_0^{(t_R - t_0)} dt \quad (30)$$

S obzirom da pri izokratnom eluciju faktor zadržavanja ne ovisi o vremenu može se pisati:

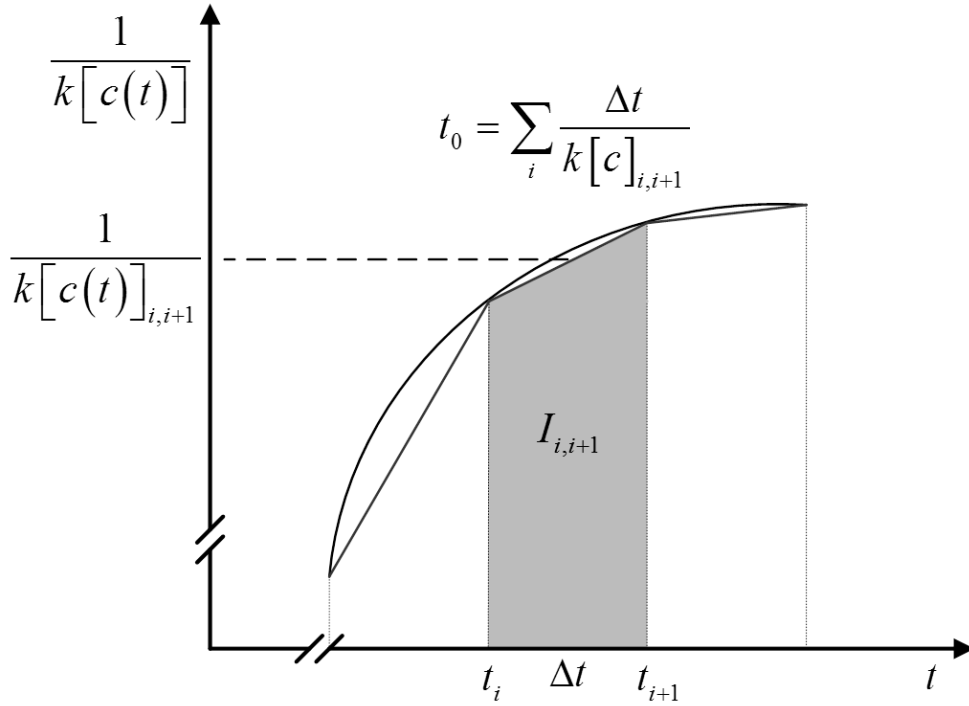
$$t_0 = \int_0^{(t_R - t_0)} \frac{dt}{k_i [c]} \quad (31)$$

Za razliku od izokratnog elucija, pri gradijentnom eluciju koncentracija kompeticijskih iona mijenja se tijekom vremena pa zbog toga i faktor zadržavanja postaje ovisan o vremenu:

$$t_0 = \int_0^{(t_R - t_0)} \frac{dt}{k_i [c(t)]} \quad (32)$$

Dobivena integralna jednadžba rješava se numerički, pri čemu se integral dijeli na velik broj malih integracijskih koraka. Za svaki integracijski korak može se pretpostaviti izokratno elucije:

$$t_0 = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k_i [c(t)]} \quad (33)$$



Slika 9. Prikaz numeričke integracije trapeznom metodom.

Unutar tako sitnih integracijskih koraka, faktor zadržavanja može se smatrati konstantnim, a ovisi samo o koncentraciji kompeticijskih iona iz eluensa. Njegova vrijednost može se aproksimirati srednjom vrijednošću pri koncentracijama eluensa u granicama integrala prikazanog na slici 9:

$$k[c]_{i,i+1} = \frac{k[c(t_i)] + k[c(t_{i+1})]}{2} \quad (34)$$

Uvažavajući sve navedeno, integrali iz izraza (33) mogu se aproksimirati:

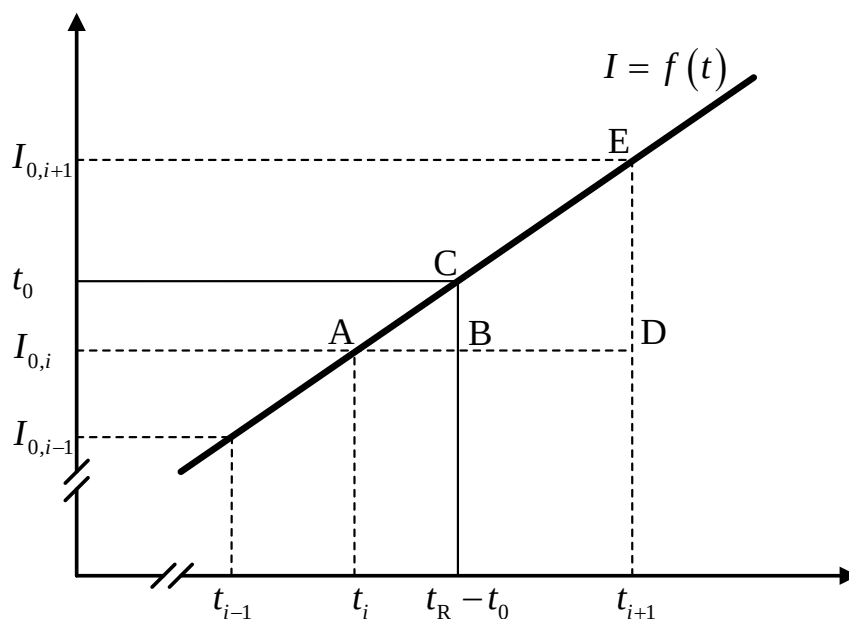
$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} = I_{0,i} + I_{i,i+1} = I_{0,i+1} \quad (35)$$

gdje je I aproksimativna vrijednost integrala u naznačenim granicama. Vrijednost kumulativnog integrala $I_{0,i+1}$ računa se stupnjevito, dodajući doprinose pojedinih integracijskih koraka. Iteracijski postupak završava u trenutku kada je vrijednost kumulativnog integrala veća od vrijednosti t_0 . Tada iz sličnosti trokuta ABC i ADE prikazanih na slici 10 slijedi:

$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_R - t_0) - t_i} = \frac{I_{0,i+1} - I_{0,i}}{t_{i+1} - t_i} \quad (36)$$

Iz jednadžbi (35) i (36) izračuna se vrijeme zadržavanja analita prema izrazu:

$$t_R = t_0 + t_i + (t_0 - I_{0,i})k[c]_{i,i+1} \quad (37)$$



Slika 10. Grafički prikaz završetka integracijskog postupka i računanja vremena zadržavanja pri gradijentnom eluciju.

Dakle, za integralni gradijentni model potrebno je eksperimentalno odrediti vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka. Nadalje, potrebno je zadati gradijentni profil, tj. ovisnost koncentracije kompeticijskih iona iz eluensa o vremenu. Tada se gradijentni profil može podijeliti na sitne intervale u kojima će se provesti numerička integracija i za koje će se moći pretpostaviti izokratna elucija [29,54].

2.3.4 QSRR modeliranje

Za razvoj QSRR modela potrebna su dva skupa podataka, parametri kromatografskog zadržavanja za dovoljno velik broj strukturno sličnih spojeva i brojčane veličine koje karakteriziraju molekulske strukture tih spojeva, odnosno deskriptori. Deskriptori mogu biti teorijske ili pak eksperimentalne vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava molekula (npr. dipolni moment, polarizabilnost i dr.). Teorijski deskriptori izvedu se na temelju simboličkog prikaza molekule, generiranog u nekom od programskih paketa za molekulske modeliranje, poput ChemOffice, Hyperchem, Avogadro, AMBER i sl., ili preuzetog iz neke od baza kao što je PubChem. Zbog toga su teorijski deskriptori lako dostupni te ne uključuju znatan trošak vremena ni novca, što im daje veliku prednost u odnosu na eksperimentalne deskriptore [55]. Poželjno je da virtualni prikaz molekulske strukture što više odgovara stvarnom prikazu

molekule zbog čega se izračunava optimalna struktura, odnosno nekom metodom molekuskog modeliranja traži se konformer s najnižom energijom.

Molekulsko modeliranje temelji se na primjeni računalnih metoda, koje se dijele na metode polja sila i kvantno-mehaničke metode, u svrhu proučavanja strukture i svojstava molekula. Razlika između ovih dviju metoda je što se metoda polja sila temelji na zakonima klasične fizike, a kvantno-mehanička metoda na zakonima kvantne fizike.

QSRR modeliranje započinje provođenjem eksperimenata kako bi se dobio skup podataka o vremenu zadržavanja velikog broja komponenata te pribavljanjem deskriptora za sve komponente. Zatim se iz skupa deskriptora odabiru oni koji imaju najveći utjecaj na promatrani kromatografski sustav. Raznovrsne kemometrijske metode (linearna regresija, metoda najmanjih kvadrata, genetički algoritam, metoda umjetne inteligencije itd.) daju kao rezultat ovisnost parametara zadržavanja i molekulske strukture ispitivanih komponenata.

Nakon izrade modela potrebno ga je validirati, ili na vanjskom skupu podataka ili unakrsnom validacijom. Kod validacije na vanjskom skupu podataka provodi se predviđanje vremena zadržavanja komponenata koje nisu korištene za izradu modela. Podaci predviđeni modelom uspoređuju se sa eksperimentalno dobivenim podacima i računa se srednja kvadratna pogreška predviđanja (engl. *root mean squared error of prediction*, RMSEP) [56]:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (38)$$

gdje je y_i eksperimentalna vrijednost kromatografskog parametra, $\hat{y}_i$ vrijednost predviđena modelom, a n broj spojeva u vanjskom skupu.

Unakrsna validacija (engl. *cross-validation*) koristi se kada nije dostupan vanjski skup za validaciju modela. Cijeli skup podataka za izradu modela podijeli se u dva skupa od kojih se jedan koristi za izradu modela, a drugi za validaciju. Zatim se cijeli skup podataka ponovno podijeli na drugi način te se postupak ponavlja. Najčešće se provodi unakrsna validacija uz izostavljanje po jednog člana skupa (engl. *leave-one-out cross-validation*, LOO). Tijekom tog postupka, iz skupa n komponenata odbaci se jedna komponenta čime se dobije skup za izradu QSRR modela. Izrađenim modelom predviđa se vrijeme zadržavanja komponente koja je odbačena. Postupak se ponavlja n puta, odnosno dok se na ovaj način ne predvide vremena zadržavanja za sve komponente iz skupa. Na kraju se računa srednja kvadratna pogreška unakrsne validacije (engl. *root mean squared error of cross-validation*, RMSECV) također prema izrazu (38). Unakrsna validacija najčešće se provodi već prilikom izrade modela, a

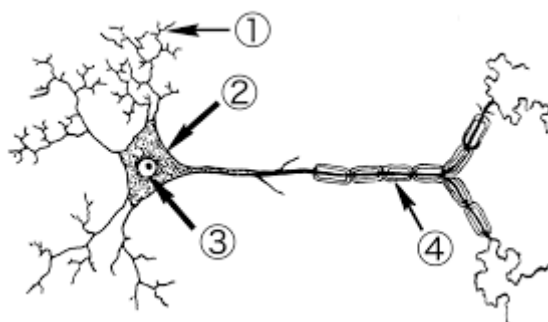
validacija na vanjskom skupu daje pouzdaniju informaciju o sposobnosti predviđanja QSRR modela [56,57].

2.4 Umjetna inteligencija

Umjetnom inteligencijom naziva se matematičko oponašanje inteligentnog ponašanja [58], što najčešće obuhvaća računalne pristupe i metode sposobne za rješavanje kompleksnih problema koje tradicionalni pristupi, poput statističkih metoda, ne mogu uspješno riješiti. Metode umjetne inteligencije mogu se podijeliti u skupine, a glavne su: ekspertni sustavi, umjetne neuronske mreže, neizrazita logika, evolucijski algoritmi (najpoznatiji je genetički algoritam) i razni hibridni sustavi koji su kombinacije navedenih metoda [59].

2.4.1 Umjetne neuronske mreže

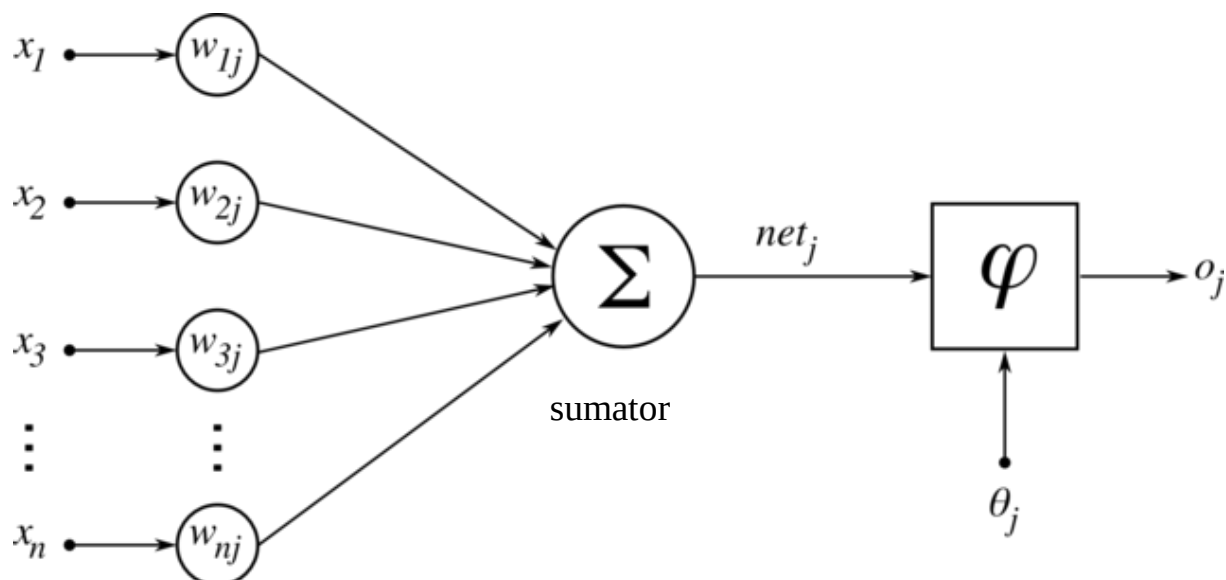
Umjetne neuronske mreže (engl. *artificial neural network*, ANN) su skupovi procesnih elemenata međusobno povezanih i organiziranih u svrhu obrade signala. Polazišna točka za osmišljavanje strukture, procesa i metoda učenja umjetnih neuronskih mreža je ljudski mozak s nevjerojatno velikom sposobnošću rješavanja složenih problema. S obzirom da procesni elementi matematičkim jedinicama oponašaju biološke neurone za njihovo razumijevanje potrebno je poznavanje strukture i funkcioniranja bioloških neurona, a nazivaju se umjetnim neuronima.



Slika 11. Biološki neuron [60].

Kako je prikazano na slici 11, biološki neuron sastoji se od tijela (2) u kojem se nalazi stanična jezgra (3), aksona (4) i dendrita (1) koji služe za slanje signala iz mnoštva drugih

dendrita u tijelo neurona. U tijelu se određuje prosječna vrijednost svih signala, a ukoliko je ona u kratkom vremenskom periodu veća od kritične, praga osjetljivosti neurona, neuron generira impuls. Impuls zatim putuje preko aksona i dolazi do sinapsi, malih razmaka između aksona jednog i dendrita drugog neurona. Ovisno o efikasnosti ostvarene sinaptičke veze, signali različitog intenziteta šalju se kroz dendrite prema tijelu drugih neurona.



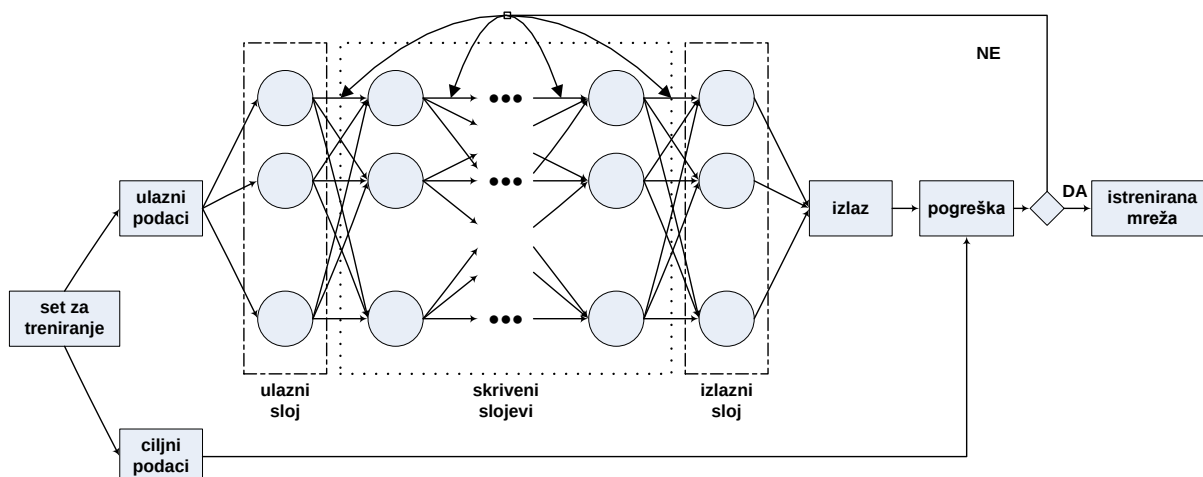
Slika 12. Umjetni neuron.

Iz slike 12 vidljivo je da se umjetni neuron može usporediti s biološkim neuronom. Sinaptička veza predstavlja se množenjem svakog ulaznog signala, x_n , sa težinskim koeficijentima, w_{nj} , koji mogu biti pozitivni ili negativni brojevi, a mogu biti i varijabilni faktori, funkcije. Tako otežani ulazni signali dovode se u sumator, koji je ekvivalent tijelu biološkog neurona, gdje se zbrajaju te se njihov zbroj uspoređuje s pragom osjetljivosti neurona. Ako je zbroj otežanih signala veći od praga osjetljivosti neurona, aktivacijska funkcija, φ , generira izlazni signal, o_j , kao što biološki neuron generira impuls [61].

Kao aktivacijske funkcije kojima se dobiva izlaz iz neurona koriste se: funkcije praga osjetljivosti, funkcije linearne po odsječcima te sigmoidne funkcije (npr. tangens hiperbolna funkcija) [62]. Budući da je kod većine algoritama učenja za podešavanje težina potrebno izračunati derivacije aktivacijskih funkcija, učenje mreže je otežano ukoliko se koriste diskontinuirane funkcije. Upravo se zbog toga kao aktivacijske funkcije najčešće koriste sigmoidne funkcije.

2.4.1.1 Struktura umjetne neuronske mreže

Iako su strukture bioloških neurona jednostavne, ljudski mozak ima sposobnost brzog rješavanja vrlo kompleksnih zadataka što je moguće zahvaljujući paralelnom radu mnoštva neurona. Zato se u umjetnoj neuronskoj mreži neuroni organiziraju na način da se što bolje postigne sličnost s biološkim sustavom.



Slika 13. Shema umjetne neuronske mreže.

U umjetnoj neuronskoj mreži neuroni su organizirani u slojeve koji su međusobno povezani. Tipična umjetna neuronska mreža sastoji se od ulaznog i izlaznog sloja te jednog ili više slojeva između njih (tzv. skriveni slojevi, slika 13). S obzirom na broj skrivenih slojeva, mreže mogu biti jednoslojne ili višeslojne.

2.4.1.2 Vrste umjetnih neuronskih mreža

Ako se slojevi neurona povežu tako da signali putuju samo u jednom smjeru, od ulaza mreže prema izlazu, tada se dobivaju unaprijedne neuronske mreže (engl. *feed-forward neural networks*, FF). Ukoliko se u unaprijednim neuronskim mrežama neuroni ne povezuju samo s neuronima iz prethodnog sloja, već i s neuronima iz drugih prethodnih slojeva, takve mreže nazivaju se kaskadnim unaprijednim mrežama (engl. *cascade-forward neural networks*, CF) [63]. Mreže mogu biti izrađene i tako da signal putuje u oba smjera, a nazivaju se povratnima (engl. *feedback ili recurrent neural networks*).

Ovisno o algoritmu za rasprostiranje mreže razlikuju se umjetne neuronske mreže s povratnim rasprostiranjem pogreške (eng. *feed-forward error back-propagation network*),

umjetne neuronske mreže sa suprotnim rasprostiranjem pogreške i statističke neuronske mreže.

2.4.1.3 Učenje neuronskih mreža

Osnovno obilježje umjetnih neuronskih mreža je učenje iterativnim postupkom tijekom kojeg se podešavaju težine i pragovi osjetljivosti, a dva osnovna načina učenja su nadgledano (eng. *supervised learning*) i nenadgledano učenje (eng. *unsupervised learning*).

Za nadgledano učenje potreban je skup poznatih vrijednosti ulaznih i izlaznih varijabli. Na početku se usvaja struktura umjetne neuronske mreže sastavljena od broja ulaza u neuronsku mrežu, broja izlaza iz neuronske mreže, broja skrivenih slojeva te broja neurona u skrivenim slojevima. Potrebno je odrediti i inicijalne težine koje svakoj od ulaznih varijabli daju određenu vrijednost, a najčešće se usvoje generiranjem slučajnih brojeva. Nakon toga se neuronskom mrežom računaju vrijednosti izlaznih varijabli na temelju vrijednosti ulaznih varijabli, a njihova razlika predstavlja pogrešku predviđanja umjetne neuronske mreže. Potrebno je izračunati pogrešku predviđanja kako bi se na temelju usvojenog algoritma odredile nove težine. Na taj način težine se prilagođavaju da bi se procijenio odnos ulaznih i izlaznih varijabli, te se postupak iteracijski ponavlja sve dok pogreška mreže ne postane manja od zadane vrijednosti. Na kraju je potrebno validirati već istreniranu mrežu dovodenjem novih ulaznih varijabli čije izlazne vrijednosti mreža treba predvidjeti, uz konstantne parametre. Ponovno se računa pogreška predviđanja koja ukazuje na kvalitetu predviđanja umjetne neuronske mreže.

U slučaju kada se koristi nenadgledano učenje nisu poznate izlazne vrijednosti, a mreže se nazivaju samoorganizirajućima. Na ulaz neuronske mreže dovodi se skup ulaznih varijabli te se mreža sama organizira podešavanjem parametara prema definiranom algoritmu. Prema tome, mreža sama otkriva korelacije, uzorke ili kategorije u ulaznim podacima. Budući da za vrijeme učenja nisu poznate izlazne vrijednosti, takve mreže ne mogu se koristiti za predviđanje već se koriste za klasifikaciju ulaza, tj. prepoznavanje uzoraka [64,65].

2.4.1.4 Primjena umjetnih neuronskih mreža u ionskoj kromatografiji i QSRR modeliranju

U trenutno prisutnoj literaturi objašnjena je primjena umjetnih neuronskih mreža u ionskoj kromatografiji za predviđanje kromatografskog zadržavanja anorganskih aniona pri

gradijentnoj eluciji na temelju poznavanja vremena zadržavanja pri nekim drugim gradijentnim elucijama [66]. Model je razvijen pri strogo definiranim elucijskim uvjetima (mogućnost predviđanja samo pri elucijama s različitim nagibima gradijentnog pravca).

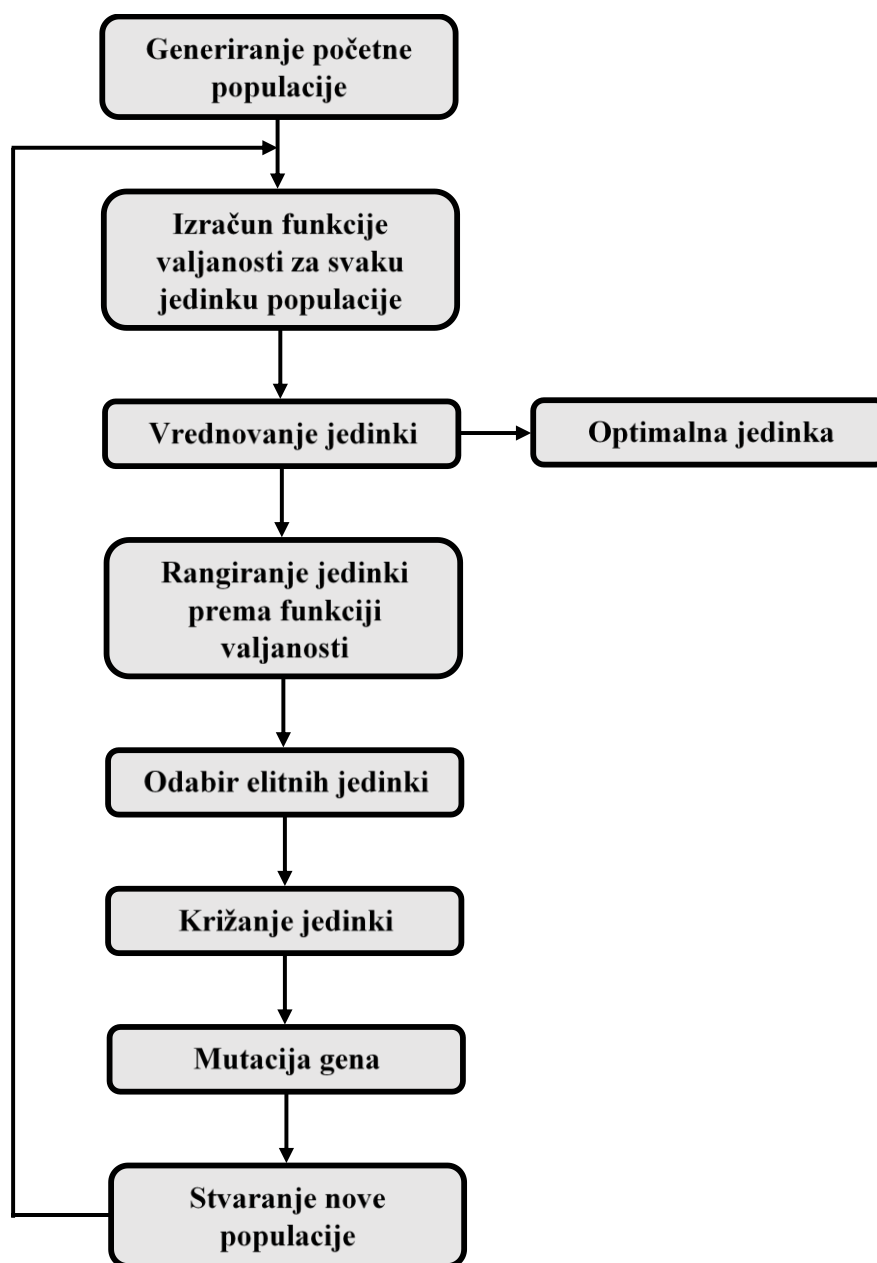
S obzirom na njihove dobre mogućnosti predviđanja, osobito u slučaju nelinearne ovisnosti, umjetne mreže korištene su za QSRR modeliranje, uglavnom u tekućinskoj kromatografiji [67,68] i nešto rjeđe u plinskoj kromatografiji [69]. Dosad nema objavljenih radova o upotrebi umjetnih neuronskih mreža za izradu QSRR mdela u ionskoj kromatografiji.

2.4.2 Genetički algoritam

Genetički algoritmi rade na principu oponašanja biološke evolucije za optimizaciju složenih problema, a najvažnija im je karakteristika korištenje skupa potencijalnih rješenja. I za genetički algoritam, kao i za evolucijski proces, vrijedi:

- postoji populacija jedinki
- neke jedinke su bolje (bolje se prilagođuju okolini)
- bolje jedinke imaju veću vjerojatnost preživljavanja i reprodukcije
- svojstva jedinki zapisana su u kromosomima pomoću genetičkog koda
- djeca nasljeđuju svojstva roditelja i
- može doći do mutacija jedinki.

U genetičkom algoritmu (slika 14) kromosom je apstraktan prikaz rješenja, a sastoji se od niza znakova (gena). Početna populacija obično se stvara slučajnim uzorkovanjem prostora pretraživanja sa što više kromosoma. Potom se procjenjuje valjanost pojedinih kromosoma upotrebom funkcije cilja, odnosno funkcije čiji maksimum ili minimum se traži. Nakon toga slijedi križanje, izmjena gena tijekom reprodukcije u genetičkim algoritmima, što uzrokuje stvaranje potomaka koji su kombinacija svojih roditelja, dok se mali dio kromosoma mijenja mutiranjem. Selekcija je proces izdvajanja najsposobnijih jedinki unutar svake generacije, a njme se određuju kromosomi na kojima će se primijeniti genetički operatori križanja i mutiranja kako bi nastali njihovi potomci. Stvoreni potomci se zatim natječu sa starim kromosomima na temelju svojih vrijednosti funkcija cilja i stvara se nova generacija. Proces se ponavlja dok se ne dostigne kriterij zaustavljanja [70]. Izvođenje genetičkog algoritma može se poboljšati korištenjem elitizma, pri čemu se u novu populaciju prvo kopira najbolji kromosom (ili nekoliko njih) čime se sprječava gubitak najboljih rješenja [71].



Slika 14. Shema genetičkog algoritma.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Reagensi i otopine

Za potrebe izvedbe eksperimenata korišteno je 29 ugljikohidrata navedenih u tablici 1.

Tablica 1. 24 ugljikohidrata korištena za potrebe izrade modela.

Broj	Naziv spoja	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
1	2-deoksi-D-glukoza	$C_6H_{12}O_5$	$\geq 98\%$ (GC)	SAF, SAD
2	L-arabinoza	$C_5H_{10}O_5$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
3	D-arabitol	$C_5H_{12}O_5$	99,50 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka
4	D-celobioza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	98 %	SAF, SAD
5	mezo-eritritol	$C_4H_{10}O_4$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
6	D-fruktoza	$C_6H_{12}O_6$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
7	L-fukoza	$C_6H_{12}O_5$	97 %	Acros Organics, SAD
8	galaktitol	$C_6H_{14}O_6$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
9	D-galaktoza	$C_6H_{12}O_6$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
10	β -gentiobioza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$\geq 85\%$ (ostatak α anomer)	SAF, SAD
11	D-glukoza	$C_6H_{12}O_6$	<i>pure, p.a.</i>	POCH, Poljska
12	glicerol	$C_3H_8O_3$	<i>extra pure</i>	Merck
13	D-laktoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	<i>ACS reagent</i>	SAF, SAD
14	laktuloza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	98,0 % (HPLC), <i>purum</i>	SAF, SAD
15	D-liksoza	$C_5H_{10}O_5$	99 %	SAF, SAD
16	maltitol	$C_{12}H_{21}O_{11}$	$\geq 98\%$	SAF, SAD
17	D-manozamin	$C_6H_{13}NO_5$	$\geq 98\%$	SAF, SAD
18	D-manoza	$C_6H_{12}O_6$	99,50 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka
19	melibioza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$\geq 98\%$ (HPLC)	SAF, SAD
20	N-acetil-D-glukozamin	$C_8H_{15}NO_6$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
21	D-rafinoza	$C_{18}H_{32}O_{16}$	99,00 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka
22	L-ramnoza	$C_6H_{14}O_5$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
23	ribitol	$C_5H_{12}O_5$	99 %	SAF, SAD
24	D-riboza	$C_5H_{10}O_5$	$\geq 99\%$	SAF, SAD
25	D-sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	$\geq 98\%$	SAF, SAD
26	L-sorboza	$C_6H_{12}O_6$	99,50 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka
27	sukroza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$> 99,50\%$ (GC)	SAF, SAD
28	D-trehaloza	$C_5H_{10}O_5$	99,50 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka
29	D-ksiloza	$C_5H_{10}O_5$	99,50 %	Dr. Ehrenstorfer, Njemačka

Iz krutih uzoraka pripremljene su temeljne standardne otopine, TSO, odvagom odgovarajućih masa ugljikohidrata na analitičkoj vagi, kvantitativnim prenošenjem u odmjerne tikvice i otapanjem u deioniziranoj vodi (18 M Ω , Millipore, Billerica, SAD) nakon

čega su odmjerne tikvice nadopunjene do oznake. Temeljne standardne otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C.

Iz temeljnih standardnih otopina su razrjeđenjem pripremljene radne standardne otopine, RSO, (tablica 2) koje su analizirane na ionskom kromatografskom sustavu i korištene za određivanje parametara modela vremena zadržavanja.

Tablica 2. Koncentracije temeljnih i radnih standardnih otopina ugljikohidrata korištenih za izradu modela.

Broj	Naziv spoja	Odvaga	V / mL	c(TSO) / ppm	c(RSO) / ppm
1	2-deoksi-D-glukoza	0,0030	10,00	300,00	3,00
2	L-arabinoza	0,0030	10,00	300,00	3,00
3	D-arabitol	0,0038	25,00	152,00	1,52
4	D-celobioza	0,0060	10,00	600,00	24,00
5	mezo-eritritol	0,0038	25,00	152,00	1,52
6	D-fruktoza	0,0100	10,00	1000,00	10,00
7	L-fukoza	0,0025	25,00	100,00	1,00
8	galaktitol	0,0015	10,00	150,00	1,50
9	D-galaktoza	0,0030	10,00	300,00	3,00
10	β-gentiobioza	0,0200	10,00	2000,00	20,00
11	D-glukoza	0,1500	50,00	3000,00	30,00
12	glicerol	0,0502	25,00	2008,00	20,08
13	D-laktoza	0,0394	25,00	1497,21	14,97
14	laktuloza	0,0751	25,00	3004,00	30,04
15	D-liksoza	0,0051	25,00	204,00	4,08
16	maltitol	0,0050	25,00	200,00	2,00
17	D-manozamin	0,0020	10,00	166,18	1,66
18	D-manoza	0,0075	25,00	300,00	3,00
19	melibioza	0,0060	10,00	600,00	6,00
20	N-acetil-D-glukozamin	0,0050	10,00	500,00	5,00
21	D-rafinoza	0,0295	25,00	1001,22	20,02
22	L-ramnoza	0,0055	10,00	495,61	4,96
23	ribitol	0,0020	10,00	200,00	2,00
24	D-riboza	0,0060	10,00	600,00	6,00
25	D-sorbitol	0,0015	10,00	150,00	1,50
26	L-sorboza	0,0100	10,00	1000,00	10,00
27	sukroza	0,0081	10,00	810,00	16,20
28	D-trehaloza	0,0055	25,00	199,05	1,99
29	D-ksiloza	0,0076	25,00	304,00	3,04

3.2 Aparatura

3.2.1 Ionski kromatografski sustav

Analize ispitivanih ugljikohidrata provedene su na ionskom kromatografskom sustavu Dionex ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific, slika 15) kojim je upravljano pomoću programskog paketa Chromeleon 7.0. Kao pokretna faza korištena je otopina kalijevog hidroksida, pripremljena pomoću ugrađenog generatora eluensa. Tijekom analize održavan je konstantan protok 0,5 mL/min korištenjem pumpnog modula DP-5, a volumen injektorske petlje iznosio je na 10 μ L.

Za analizu uzoraka, kao nepokretna faza korištene su kolona CarboPac20 (3x150 mm) i odgovarajuća pretkolona CarboPac20 (3x30 mm), termostatisane na 30 °C. Za detekciju analita iz uzoraka upotrijebljen je elektrokemijski detektor s radnom Au i referentnom Ag/AgCl elektrodom.



Slika 15. Ionski kromatografski sustav Dionex ICS-5000.

3.2.2 Računalo i softverski paketi

Za potrebe modeliranja korišteno je prijenosnom računalu Lenovo (procesor AMD A6-6310 APU s AMD Radeon R4 grafičkom karticom 1,80 GHz, unutarnja memorija (RAM) 4,00 GB i 64-bitni operacijski sustav Windows 10 Pro)

Jednostavne obrade podataka provedene su pomoću programskog paketa MS Office Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, SAD), a sama izrada modela vremena zadržavanja u programskom okruženju Matlab R2013a (The MathWorks Inc., Natick, MA, SAD).

3.3 Dizajn eksperimenta

Iz početnog skupa 29 ugljikohidrata, 24 ugljikohidrata nasumično su odabrana za izradu modela (1–3, 5–18, 20–24, 26, 28), a preostalih 5 (vanjski skup) uzeto je za validaciju (4, 19, 25, 27, 29).

Prilikom treniranja umjetnih neuronskih mreža, sustav radi samoprovjeru na određenom broju ispitivanih komponenti (u našem slučaju ugljikohidrata) ne bi li se na taj način osigurao od mogućeg pretreniranja. Za potrebe samoprovjere, iz skupa 24 ugljikohidrata za treniranje, odabrana su sljedeća 4: galaktitol, liksoza, arabinoza i laktuloza.

Za potrebe izrade modela provedene su izokratne elucije smjese 24 šećera pri: 2, 26, 50 i 98 mM KOH, a za potrebe validacije modela iste izokratne elucije ali s 5 komponenta iz vanjskog skupa. Kod elucija kod kojih su uočena preklapanja signala komponenti, provedene su analize otopina čistih komponenti. Za potrebe vrednovanja razvijenog gradijentnog modela na vanjskom skupu provedeno je još i 27 gradijentnih elucija (tablica 3).

Tablica 3. Gradijentni uvjeti mjerenja šećera pri kojima je testiran IG model.

$\Delta c/\Delta t$ (mM min ⁻¹)	$c_{\text{poč.}}$ (mM)	$t_{\text{poč.}}$ (min)	$\Delta c/\Delta t$ (mM min ⁻¹)	$c_{\text{poč.}}$ (mM)	$t_{\text{poč.}}$ (min)	$\Delta c/\Delta t$ (mM min ⁻¹)	$c_{\text{poč.}}$ (mM)	$t_{\text{poč.}}$ (min)
0,466	5	0	1,192	5	0	3,732	5	0
0,466	5	5	1,192	5	5	3,732	5	5
0,466	5	10	1,192	5	10	3,732	5	10
0,466	10	0	1,192	10	0	3,732	10	0
0,466	10	5	1,192	10	5	3,732	10	5
0,466	10	10	1,192	10	10	3,732	10	10
0,466	15	0	1,192	15	0	3,732	15	0
0,466	15	5	1,192	15	5	3,732	15	5
0,466	15	10	1,192	15	10	3,732	15	10

Svi gradijenti bili su linearni, a na kraju svih je koncentracija eluensa iznosila 98 mM KOH.

3.4 Odabir deskriptora

Matrica najznačajnijih deskriptora za analizirane ugljikohidrate preuzeta je iz istraživanja P. Žuvele [72]. P. Žuvela proveo je molekulsku optimizaciju struktura ugljikohidrata (programski paket ChemBio3D 2008, CambridgeSoft, PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, SAD) te na temelju njih pomoću programskih paketa Dragon 5,5 (Talete, Milano, Italy) i PaDeL (National University of Singapore, Singapore) izračunao 1313 molekulskih deskriptora. Izvornu matricu postupno je reducirao kroz četiri redukcijaska koraka do konačne matrice deskriptora 53 deskriptora. Detaljni opis redukcije matrice deskriptora i konačna matrica mogu se pronaći u njegovom diplomskom radu [72].

Zbog toga što je kao alat za izradu modela vremena zadržavanja korištena ANN, te uzimajući u obzir činjenicu da se modeliralo na relativno malom uzorku od svega 24 ugljikohidrata, rad sa sva 53 deskriptora nije bio realan. Stoga je iz matrice 53 deskriptora A. Vlahović odabrala njih 6 s najvećim sadržajem korisne informacije. U svrhu odabira korišten je genetički algoritam, izveden u okružju programskog paketa Matlab 2010b (The MathWorks Inc., Natick, MA, SAD), a sam proces optimizacije detaljno je opisan u diplomskom radu A. Vlahović [28] iz kojeg su i preuzete optimalne jedinice (tablica 4).

Tablica 4. Optimalne kombinacije deskriptora (optimalne jedinice) pri različitim koncentracijama eluensa [63].

<i>c</i> / mM	Optimalne jedinice					
2	Lop	JGI3	DISPv	Mor11m	G1p	G1v
26	Lop	JGI2	DISPv	Mor31p	G1p	HATS2m
50	JGI1	SPH	Mor31u	G2u	G1v	G1v
98	JGI1	DISPp	E1m	Mor20e	R3m	R6e+

4 MODELIRANJE

4.1 Optimalan broj ponovljenih treniranja mreže

Budući da nijedno treniranje umjetnih neuronskih mreža nije identično (primjerice početne težine veza uzimaju se proizvoljno), moguće je da samo jednom provedeno treniranje rezultira mrežom koja slučajno daje veću pogrešku. Kada bi se broj treniranja povećao, za očekivati je da bi se utjecaj slučajnosti smanjio. Za potrebe ispitivanja utjecaja ovog efekta provedena su ponovljena treniranja (do 4000). Promatrane su srednje vrijednost izlaza mreža za svaki od 4 ugljikohidrata iz skupa za samoprovjeru te relativno odstupanja (pogreška) predviđenih od eksperimentalno dobivenih vrijednosti.

4.2 Kriteriji eliminacije nesuvislih QSRR rješenja

Današnji QSRR modeli u svojoj naravi su robusni i vrlo često daju relativno velike pogreške predviđanja. Stoga svaka implementacija empirije (iskustva) u konačni rezultat je dobrodošla i može znatno poboljšati kvalitetu predviđanja modela. U ovom radu primijenjeno je nekoliko takvih empirijskih spoznaja:

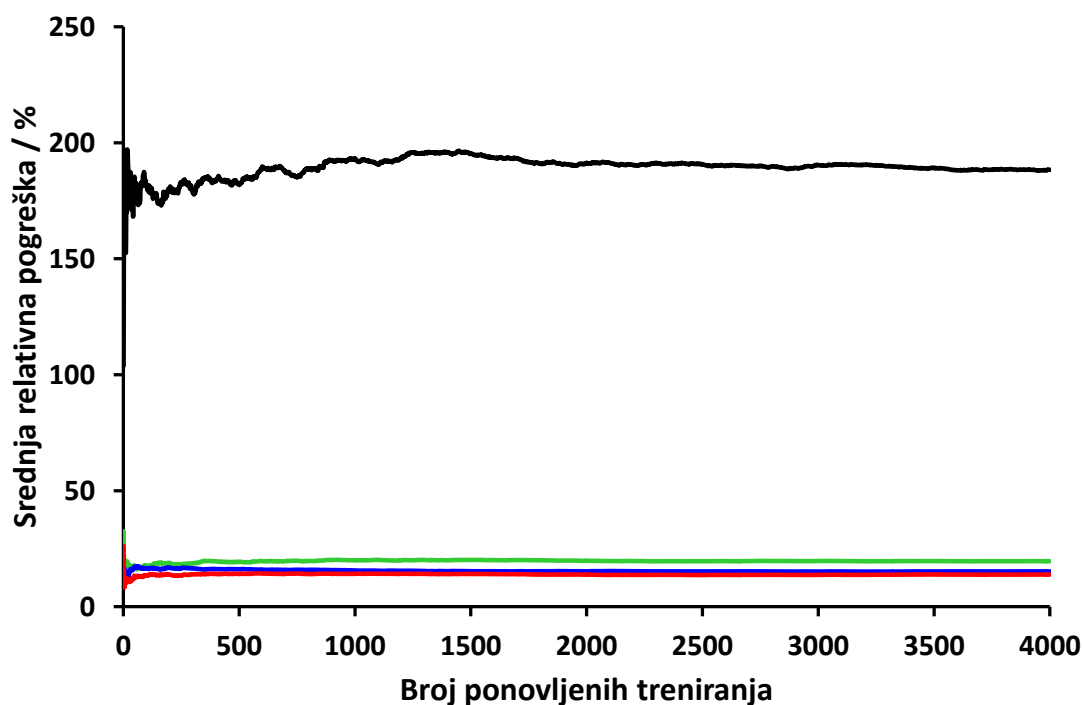
1. Povećanjem jakosti eluensa nužno dolazi do smanjenja vremena zadržavanja analita.
2. Iz eksperimentalnih dobivenih rezultata vremena zadržavanja ugljikohidrata uzetih za treniranje modela moguće je izraditi izokratne modele vremena zadržavanja i na temelju njih odrediti okvirno područje unutar kojeg se trebaju nalaziti parametri modela.
3. Modeli s manjim brojem stupnjeva slobode (robusniji modeli) prikladniji su kada se opis vladanja kromatografskog sustava temelji na podacima generiranim robusnim modelima, poput QSRR modela, a koji su u stanju producirati relativno veliko odstupanje predviđenih od stvarnih vrijednosti.

5 REZULTATI I RASPRAVA

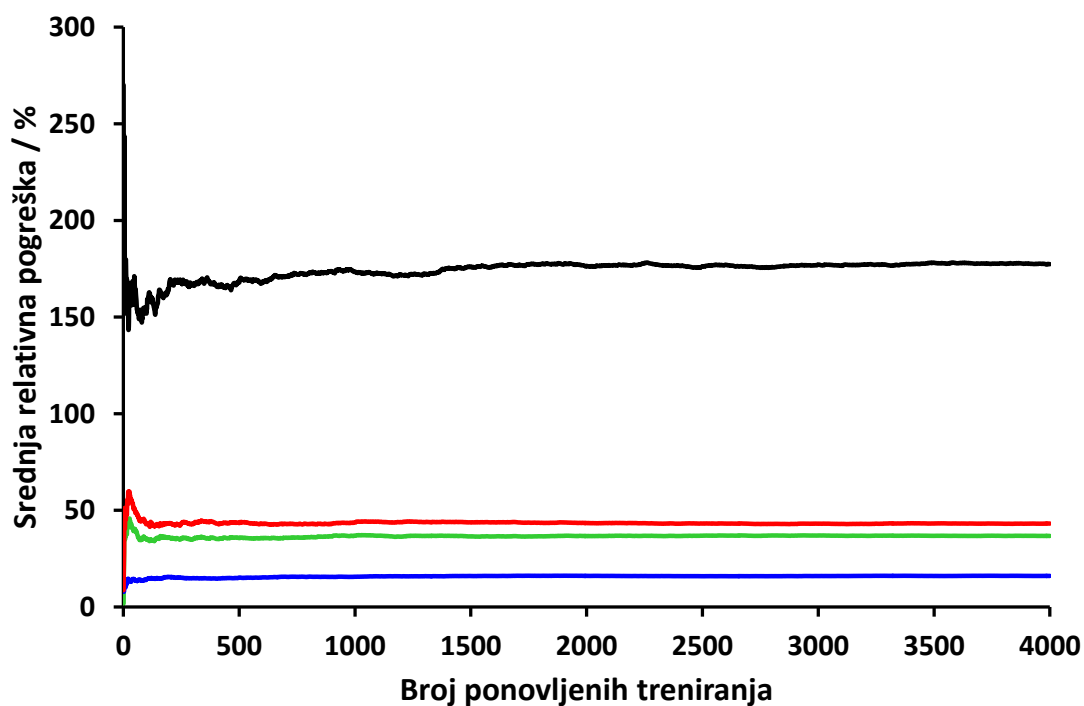
5.1 Određivanje optimalnog broja ponovljenih ANN treniranja

Rezultati utjecaja broja ponavljanja treninga na relativnu pogrešku predviđanja ANN modela prikazani su na slikama 16–19.

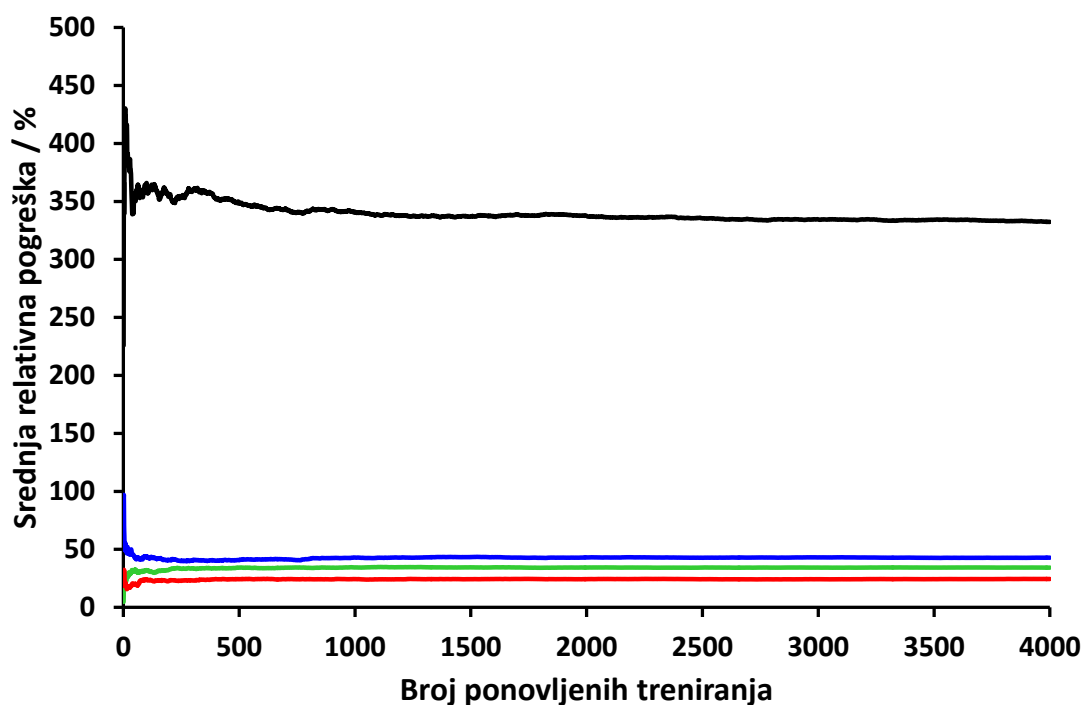
Nakon provedenih 4000 ANN treniranja na svakoj od 4 ispitivane koncentracije eluensa jasno je vidljivo da fluktuacije iznosa relativne pogreške predviđanja vremena zadržavanja prestaju nakon otprilike 1000 ponovljenih treniranja. Stoga je u daljem istraživanju uvijek korišteno 1000 treniranja te na temelju njih računata srednja vrijednost izlaza mreže za pojedini ugljikohidrat koja je uzeta kao relevantno rješenje.



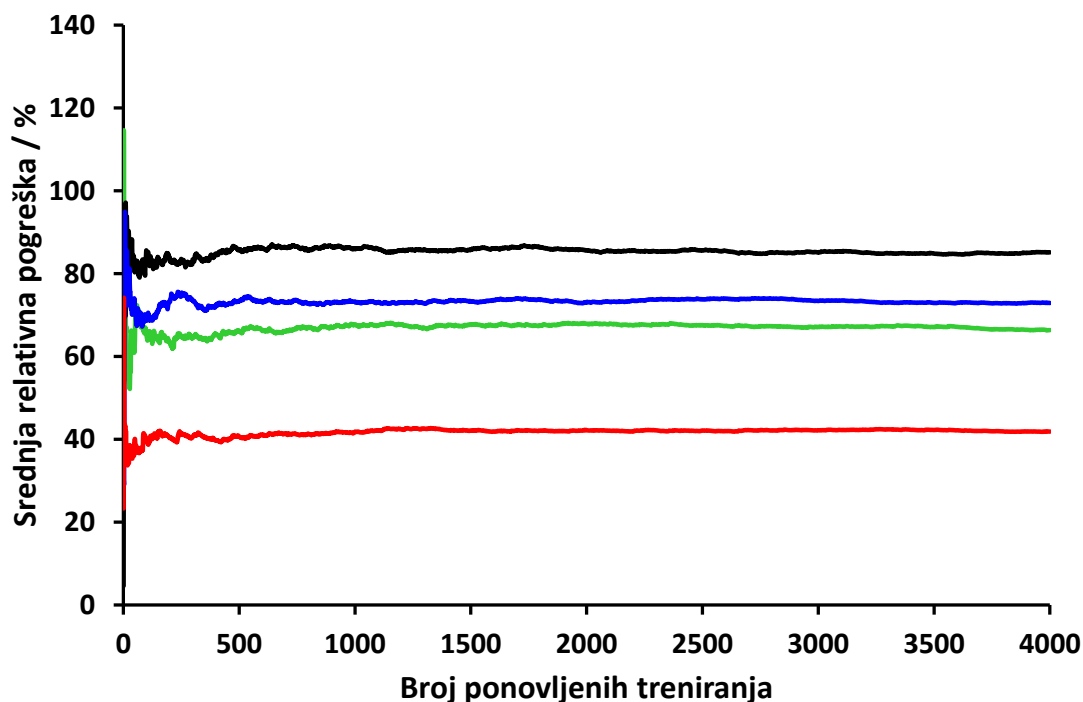
Slika 16. Određivanje optimalnog broja ponovljenih treniranja neuronske mreže pri 2 mM KOH provedeno za četiri ugljikohidrata: galaktitol (■), D-liksozu (■), L-arabinozu (■) i laktulozu (■).



Slika 17. Određivanje optimalnog broja ponovljenih treniranja neuronske mreže pri 26 mM KOH provedeno za četiri ugljikohidrata: galaktitol (■), D-liksozu (■), L-arabinozu (■) i laktulozu (■).



Slika 18. Određivanje optimalnog broja ponovljenih treniranja neuronske mreže pri 50 mM KOH provedeno za četiri ugljikohidrata: galaktitol (■), D-liksozu (■), L-arabinozu (■) i laktulozu (■).



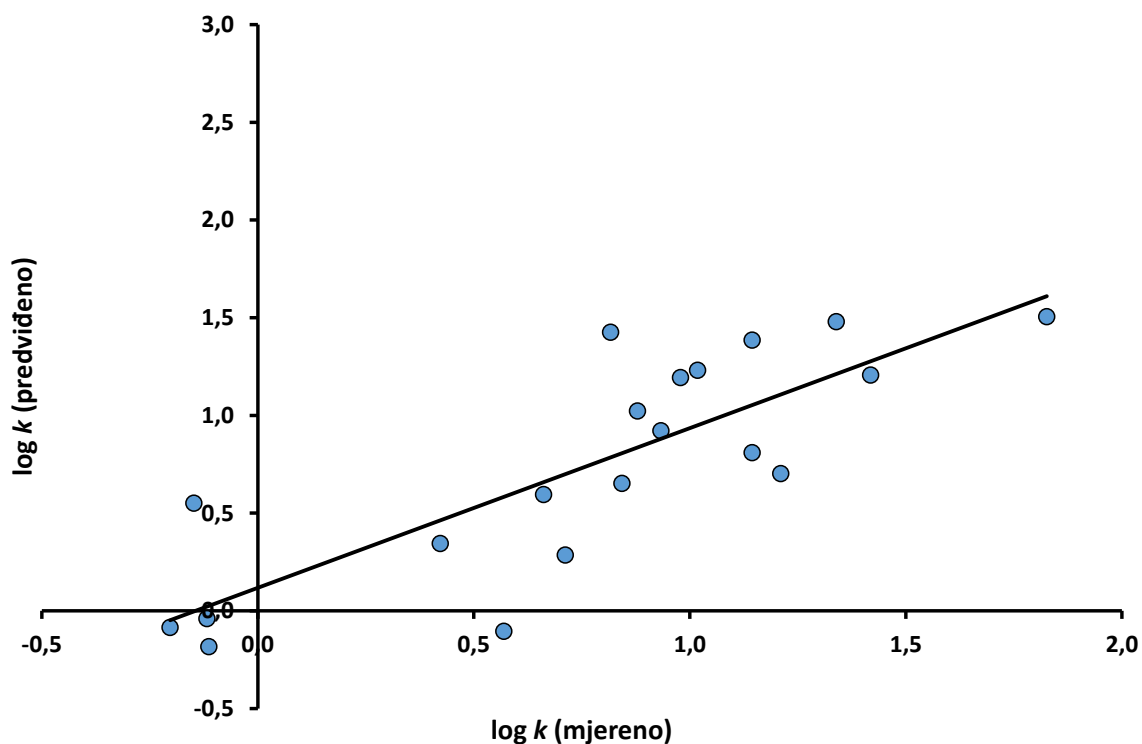
Slika 19. Određivanje optimalnog broja ponovljenih treniranja neuronske mreže pri 98 mM KOH provedeno za četiri ugljikohidrata: galaktitol (■), D-liksozu (■), L-arabinozu (■) i laktulozu (■).

5.2 Izrada primarnog QSRR modela

Koristeći eksperimentalno dobivene podatke vremena zadržavanja 24 ugljikohidrata (tablica 5) pri izokratnim analizama izrađeni su primarni QSRR modeli (na 4 izokratne razine). Točnost modela prikazana je na slici 20. Analiza točnosti modela (tablica 6) govori o izostanku sustavnih pogrešaka, kako konstantne (interval 95%-tne pouzdanosti uključuje vrijednost 0) tako i proporcionalne (interval 95%-tne pouzdanosti uključuje vrijednost 1). Najveća zamjerka ovog modela trenutno leži u njegovoj nepreciznosti jer koeficijent determinacije iznosi svega 0,6605.

Tablica 5. Eksperimentalno dobivene vrijednosti vremena i faktora zadržavanja za 24 komponente pri četiri izokratne koncentracije eluensa.

Broj	Komponenta	t_R				$\log k$			
		2 mM	26 mM	50 mM	98 mM	2 mM	26 mM	50 mM	98 mM
1	2-deoksi-D-glukoza	6,467	4,534	3,567	2,717	5,360	3,690	2,689	1,763
2	L-arabinoza	8,667	5,284	3,917	2,800	0,868	0,641	0,475	0,266
3	D-arabitol	1,533	1,517	1,484	1,450	-0,192	-0,266	-0,272	-0,324
5	<i>mezo</i> -eritritol	1,267	1,250	1,250	1,233	-0,390	-0,567	-0,533	-0,595
6	D-fruktoza	18,867	8,584	5,767	3,767	1,244	0,888	0,696	0,452
7	L-fukoza	3,850	2,917	2,433	1,967	0,426	0,294	0,169	0,000
8	galaktitol	1,734	1,700	1,650	1,600	-0,152	-0,138	-0,151	-0,203
9	D-galaktoza	11,084	6,667	4,933	3,433	0,988	0,771	0,613	0,396
10	β -gentiobioza	52,134	24,250	15,417	8,917	1,701	1,374	1,175	0,907
11	D-glukoza	13,083	7,150	5,050	3,450	1,074	0,797	0,626	0,410
12	glicerol	1,167	1,150	1,150	1,150	-0,889	-0,771	-0,722	-0,771
13	D-laktoza	34,417	15,884	10,250	6,167	1,517	1,188	0,982	0,722
14	laktuloza	40,117	16,234	10,150	5,984	1,578	1,191	0,978	0,706
15	D-liksoza	14,567	6,967	4,783	3,200	1,110	0,784	0,587	0,353
16	maltitol	5,283	4,567	4,017	3,300	0,614	0,562	0,499	0,372
17	D-manozamin	9,067	4,850	3,500	2,517	0,899	0,595	0,418	0,193
18	D-manoza	16,550	7,467	5,034	3,317	1,177	0,819	0,624	0,375
20	N-acetil-D-glukozamin	15,833	6,417	4,300	2,884	1,164	0,742	0,528	0,286
21	D-rafinoza	27,917	20,284	15,384	10,350	1,415	1,293	1,174	0,979
22	L-ramnoza	8,483	4,450	3,217	2,333	0,858	0,547	0,367	0,138
23	ribitol	1,767	1,717	1,667	1,600	-0,049	-0,127	-0,158	-0,203
24	D-riboza	20,367	9,433	6,367	4,100	1,272	0,942	0,747	0,501
26	L-sorboza	19,934	8,967	6,000	3,884	1,309	0,909	0,708	0,470
28	D-trehaloza	2,284	2,167	2,083	1,933	0,083	0,094	0,063	-0,015



Slika 20. Točnost predviđanja primarnih QSRR modela.

Tablica 6. Analiza točnosti QSRR modela.

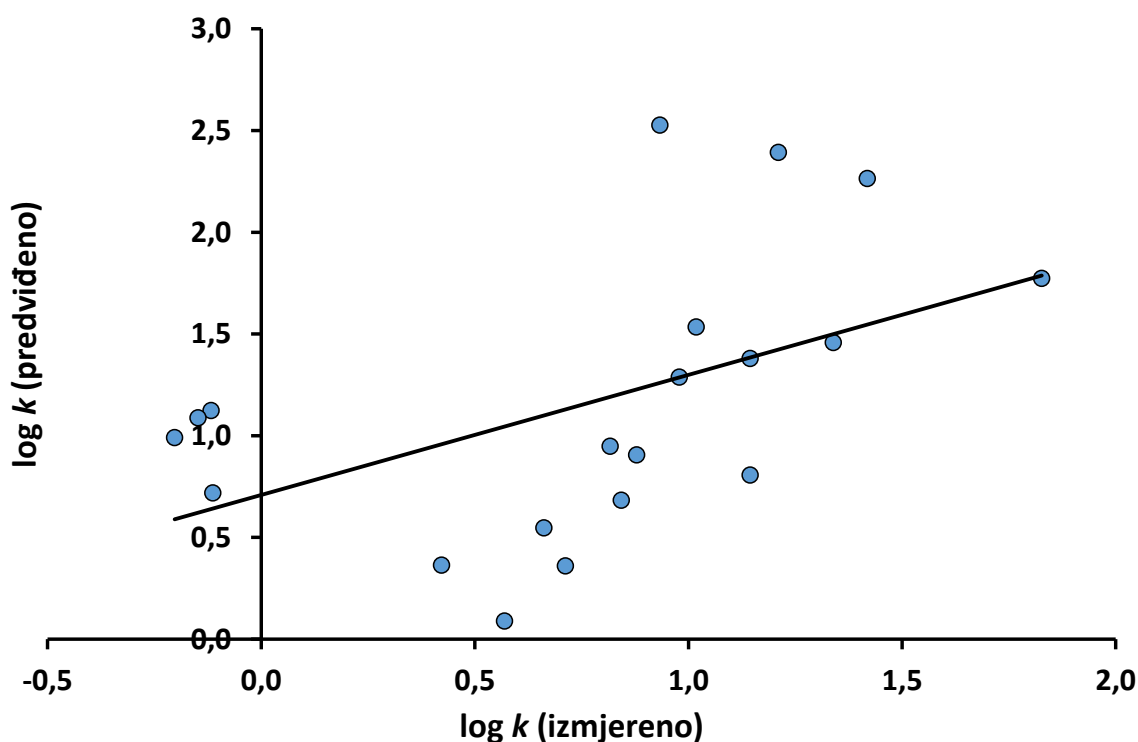
	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,1178	-0,1557	0,3913
Nagib	0,8171	0,5271	1,1072
R^2	0,6605		
$RMSEP$	0,3374		

5.3 Odbacivanje očitih pogrešaka predviđanja

Na temelju dobivenih QSRR predviđanja za četiri jakosti eluensa izrađeni su izokratni modeli vremena zadržavanja za svaku od pet komponenti iz vanjskog skupa (tablica 7). Na identičan način kao i kod QSRR modela provedeno je vrednovanje razvijenih modela.

Tablica 7. Parametri polinomnih modela vremena zadržavanja (jednadžba (23)) za 5 šećera iz vanjskog skupa određeni na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije pojedinih predviđenih vrijednosti.

Broj	Šećer	a_0	a_1	a_2	R^2
4	D-celobioza	0,0080	-0,4275	1,6432	0,7553
19	melibioza	-1,5241	2,6837	0,7881	0,7879
25	D-sorbitol	-0,3511	0,9657	0,4600	0,3027
27	sukroza	-0,9040	1,4691	1,0192	0,9606
29	D-ksiloza	-0,2610	0,3363	0,7291	0,9679



Slika 21. Točnost izokratnih polinomnih modela razvijenih na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

Tablica 8. Analiza točnosti izokratnih polinomnih modela razvijenih na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,7092	0,2179	1,2004
Nagib	0,5904	0,0694	1,1115
R^2	0,2395		
RMSEP	0,7347		

Uočeno je da transferom QSRR podataka u polinomne izokratne modele vremena zadržavanja dolazi do unosa konstantne sustavne pogreške. Naime, 0 se ne nalazi unutar 95%-tnog intervala pouzdanosti za odsječak. Ujedno, rasipanje točaka oko regresijskog pravca prikazanog slikom 21 znatno je veće nego u slučaju usporedbe mjerenih vrijednosti s primarno predviđenim QSRR vrijednostima (slika 20); R^2 vrijednost iznimno je mala pa možemo dovesti u pitanje korelaciju uspoređivanih podataka. Opadanje kvalitete predviđanja uočava se i u znatnom povećanju *RMSEP* vrijednosti: 0,7347 (tablica 8) naspram 0,3374 (tablica 6).

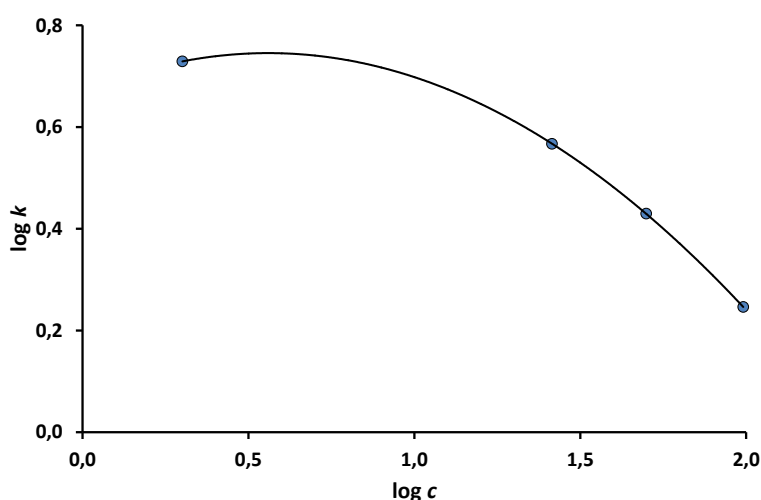
Tablica 9. Eksperimentalno određeni parametri polinomnog modela vremena zadržavanja (jednadžba (23)) za 24 šećera korištena pri izradi modela.

Broj	Šećer	a_0	a_1	a_2	R^2
1	2-deoksi-D-glukoza	-0,2435	0,2724	0,6692	1,0000
2	L-arabinoza	-0,2620	0,2438	0,8189	1,0000
3	D-arabitol	-0,0285	-0,0091	-0,1874	0,9686
5	mezo-eritritol	0,0449	-0,2153	-0,3306	0,9274
6	D-fruktoza	-0,2591	0,1252	1,2301	1,0000
7	L-fukoza	-0,2311	0,2779	0,3632	1,0000
8	galaktitol	-0,0791	0,1533	-0,1910	0,9589
9	D-galaktoza	-0,2706	0,2711	0,9307	0,9999
10	β -gentiobioza	-0,3079	0,2365	1,6579	0,9999
11	D-glukoza	-0,2503	0,1802	1,0429	1,0000
12	glicerol	-0,0791	0,2584	-0,9607	0,9178
13	D-laktoza	-0,3041	0,2266	1,4759	1,0000
14	laktuloza	-0,2922	0,1545	1,5576	1,0000
15	D-liksoza	-0,2671	0,1635	1,0849	0,9999
16	maltitol	-0,1731	0,2566	0,5520	0,9943
17	D-manozamin	-0,2511	0,1583	0,8736	1,0000
18	D-manoza	-0,2662	0,1365	1,1595	1,0000
20	N-acetil-D-glukozamin	-0,2410	0,0315	1,1762	0,9999
21	D-rafinoza	-0,2626	0,3462	1,3344	0,9988
22	L-ramnoza	-0,2556	0,1598	0,8329	1,0000
23	ribitol	-0,0374	-0,0046	-0,0445	0,9993
24	D-riboza	-0,2779	0,1806	1,2428	1,0000
26	L-sorboza	-0,2376	0,0474	1,3160	1,0000
28	D-trehaloza	-0,1228	0,2256	0,0256	0,9864
	najmanja vrijednost	-0,3079	-0,2153	-0,9607	0,9178
	najveća vrijednost	0,0449	0,3462	1,6579	1,0000

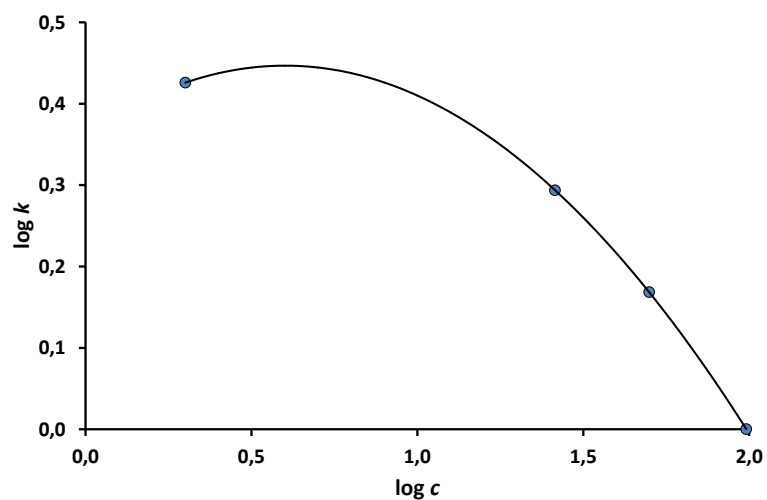
Kvaliteta predviđanja izvedenih izokratnih modela neupitno ovisi o kvaliteti QSRR modela. Budući da je karakteristika QSRR pristupa da nerijetko generira znatnija odstupanja od stvarnih vrijednosti, željelo se provjeriti postoje li takva odstupanja. Stoga su za 24 šećera iz skupa za treniranje, a na temelju eksperimentalno poznatih vrijednosti koeficijenta zadržavanja, izrađeni također izokratni modeli (tablica 9) te su se pokušale uočiti pravilnosti među njima.

Iz tablice 9 vidljivo je relativno visoko podudaranje pretpostavljenog polinomnog modela ovisnosti $\log k$ o $\log c$ (vrijednosti koeficijenta determinacije, R^2 , veće od 0,9178). Pa ipak, uočena su određena neslaganja s iskustvenim spoznajama. Naime, ionska kromatografija se u svojoj biti zasniva na različitim afinitetima ionskih vrsta prema nepokretnoj fazi. Pri tome veliku ulogu u eluciji komponenti iz kolone imaju kompeticijski ioni iz eluensa koji se također vezuju za nepokretnu fazu. Povećanje koncentracije kompeticijskih iona u eluensu (jakost eluensa) nužno uzrokuje bržu eluciju analita. Polinomni model primijenjen na eksperimentalnim podacima, usprkos visokim vrijednostima koeficijenta determinacije u nekim slučajevima odstupa od spomenutih iskustvenih spoznaja (slike 22–28) i u područjima niskih koncentracija eluensa pokazuje stagnaciju ili čak povećanje zadržavanja analita s povećanjem jakosti eluensa. Ova anomalija ponašanja vjerojatno je posljedica slučajnih eksperimentalnih pogrešaka koje su se mogle izbjeći višekratnim ponavljanjem eksperimenata, no taj pristup tijekom ovog istraživanja nije korišten zbog intenzivnog trošenja radne elektrode detektora.

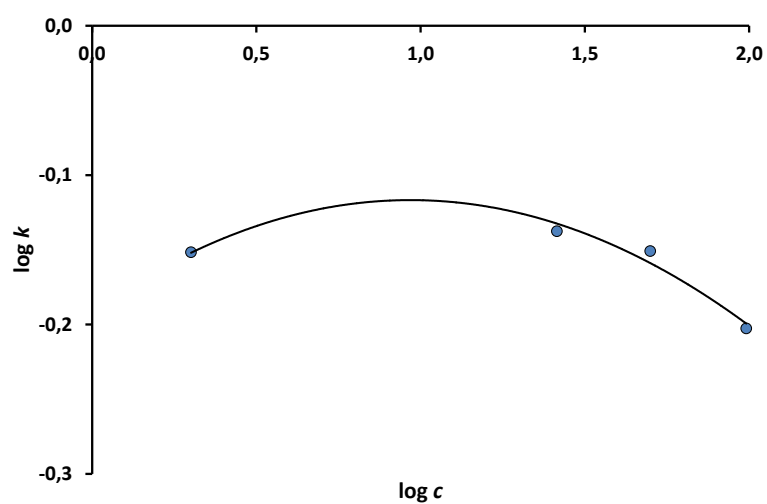
Kako modeli s uočenom anomalijom očito u sebi sadrže pogrešku, njihovo korištenje u daljnjem proračunu moglo bi imati znatnog utjecaja na kvalitetu predviđanja iz njih izvedenih modela (*iso-to-grad* model).



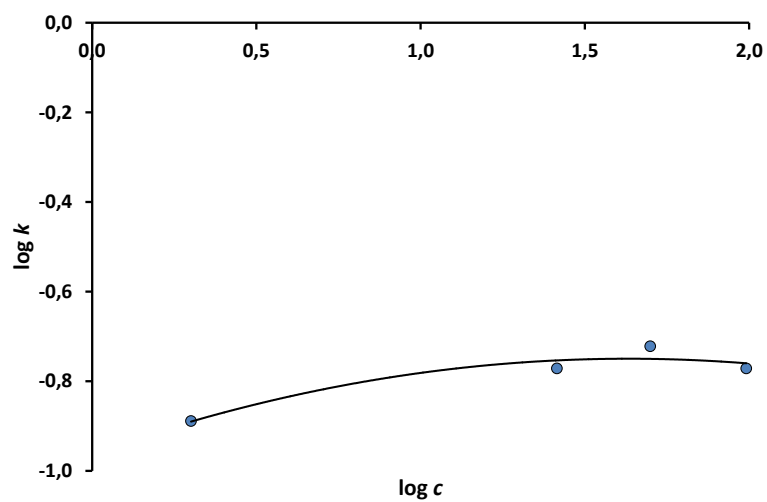
Slika 22. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja 2-deoksi-D-glukoze.



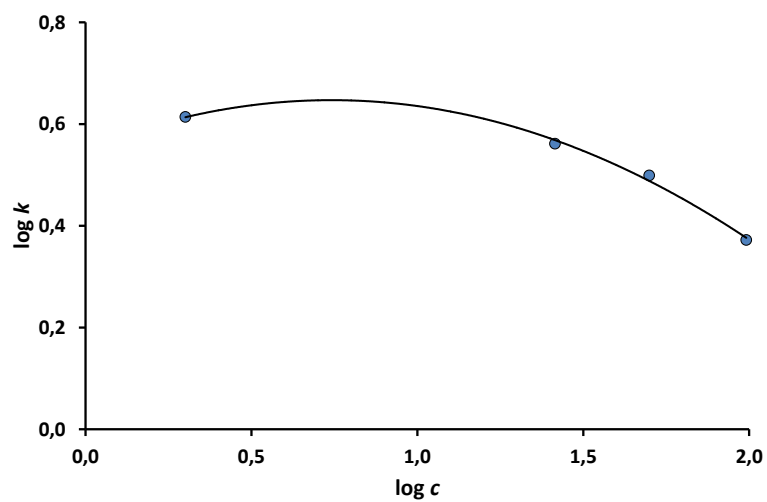
Slika 23. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja L-fukoze.



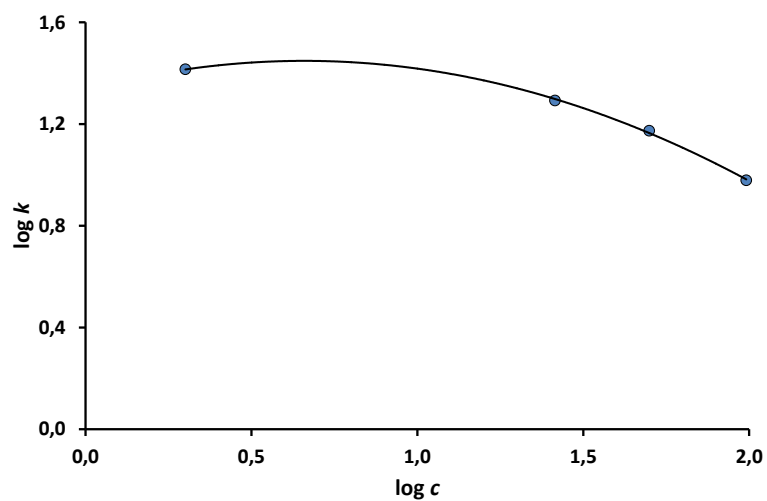
Slika 24. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja galaktitola.



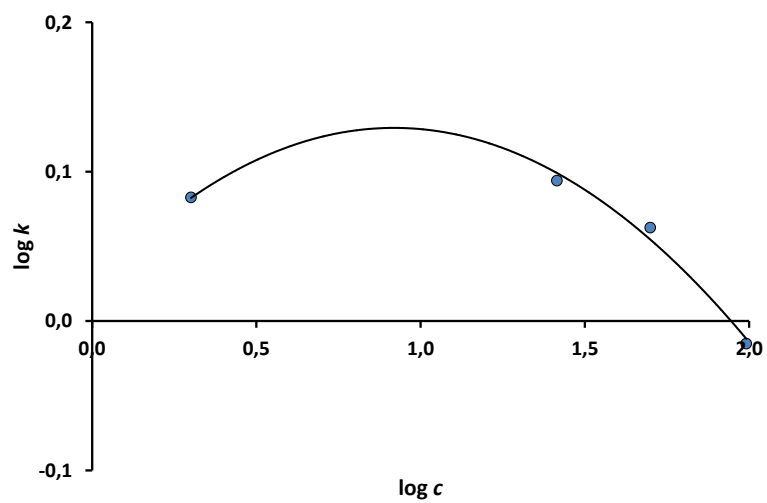
Slika 25. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja glicerola.



Slika 26. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja maltitola.



Slika 27. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja D-rafinoze.



Slika 28. Eksperimentalni polinomni model vremena zadržavanja D-trehaloze.

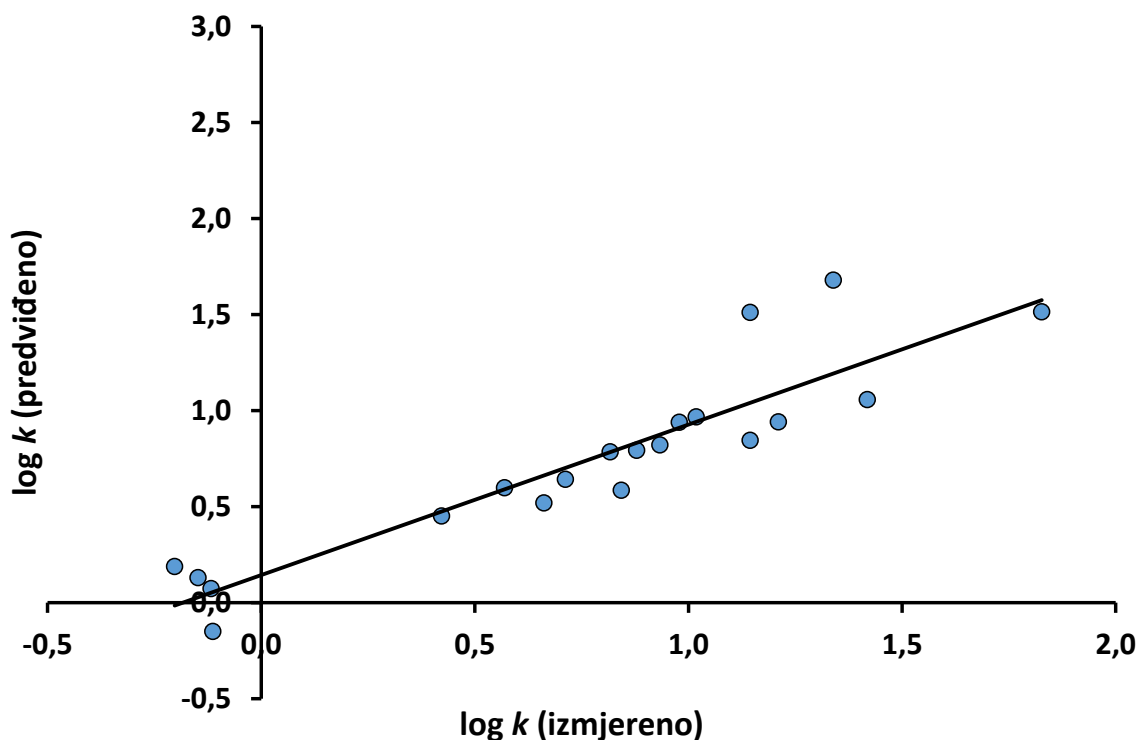
Robusniji modeli, poput primjerice Snyderova LSS modela (model pravca; poglavlje 2.3.1.1), koji je preteča svih modela vremena zadržavanja u ionskoj kromatografiji, trebali bi biti „otporniji“ na spomenutu anomaliju ponašanja te stoga prikladniji od polinomnog. Primjena robusnijeg modela još je prihvatljivija ako se prisjetimo da je ishodišna ideja ovog rada izraditi univerzalni model vremena zadržavanja na temelju podataka dobivenih QSRR modelima, za koje se zna da generiraju relativno velike pogreške. Stoga je odlučeno smanjiti broj stupnjeva slobode izokratnog modela vremena zadržavanja i umjesto polinomnog modela primijeniti model pravca:

$$\log k = a_1 \log c(\text{KOH}) + a_2 \quad (39)$$

Parametri izokratnih modela pravaca za 5 ugljikohidrata iz vanjskog skupa prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Parametri modela pravaca (jednadžba (39)) za 5 šećera iz vanjskog skupa određeni na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom prije provedene empirijske eliminacije pojedinih predviđenih vrijednosti.

Broj	Šećer	a_1	a_2	R^2
4	D-celobioza	-0,4101	1,6376	0,7552
19	melibioza	-0,6400	1,8722	0,3981
25	D-sorbitol	0,2000	-0,2102	0,1976
27	sukroza	-0,5140	1,6660	0,6236
29	D-ksiloza	-0,2328	0,9147	0,7953



Slika 29. Točnost izokratnih modela pravaca razvijenih na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

Tablica 11. Analiza točnosti izokratnih modela pravaca razvijenih na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,1435	-0,0197	0,3066
Nagib	0,7836	0,6106	0,9567
R^2	0,8341		
$RMSEP$	0,2266		

Promatranjem odnosa eksperimentalno izmjerenih i modelom pravca predviđenih $\log k$ vrijednosti (slika 29) uočava se bolja korelacija podataka nego kada je kao izokratni model korišten polinom drugog reda (slika 21). To je potkrijepljeno i provedenom analizom točnosti (tablica 11) gdje je uočljiva znatno veća vrijednost koeficijenta korelacije, R^2 , kao i bitno smanjena vrijednost $RMSEP$ pogreške. Štoviše, $RMSEP$ pogreška je manja nego kod primarno predviđenih QSRR vrijednosti, što znači da smo modelom pravca uspjeli umanjiti nedostatke QSRR modeliranja. Konstantna sustavna pogreška, koja je zamijećena u slučaju primjene polinomnog izokratnog modela, u ovom slučaju je izostala. Nažalost, s 95%

sigurnosti možemo tvrditi da je modelom pravca u sustav unijeta proporcionalna pogreška jer vrijednost 1 ne upada u odgovarajući interval pouzdanosti za nagib.

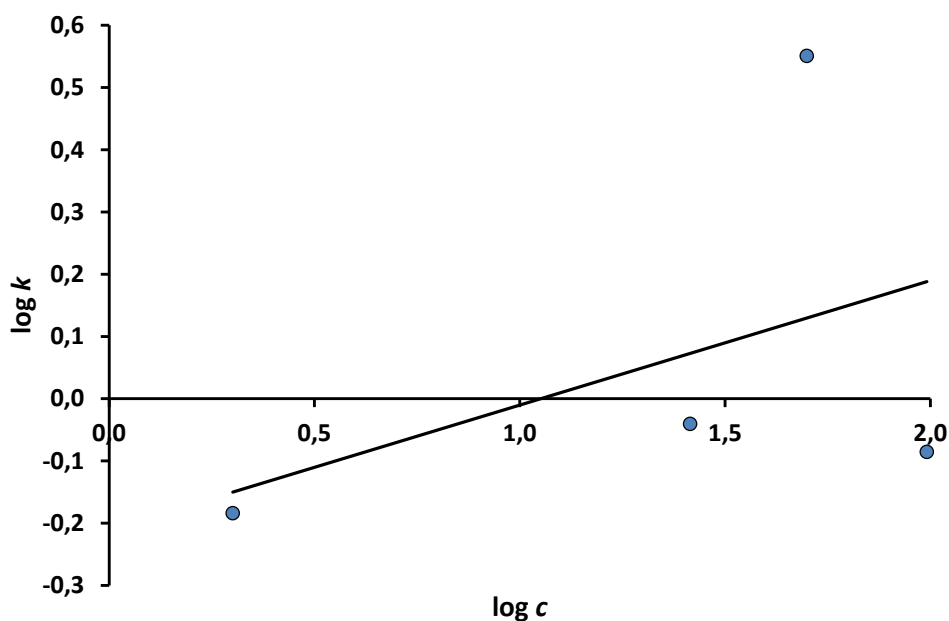
Tablica 12. Eksperimentalno određeni parametri modela pravca (jednadžba (39)) za 24 šećera korištena pri izradi modela.

Broj	Šećer	a_1	a_2	R^2
1	2-deoksi-D-glukoza	-0,2585	0,8424	0,8672
2	L-arabinoza	-0,3275	1,0053	0,9005
3	D-arabitol	-0,0711	-0,1672	0,9426
5	mezo-eritritol	-0,1175	-0,3625	0,9046
6	D-fruktoza	-0,4397	1,4144	0,9435
7	L-fukoza	-0,2261	0,5276	0,8472
8	galaktitol	-0,0192	-0,1347	0,2443
9	D-galaktoza	-0,3190	1,1231	0,8894
10	β -gentiobioza	-0,4348	1,8768	0,9203
11	D-glukoza	-0,3656	1,2209	0,9251
12	glicerol	0,0858	-0,9044	0,8003
13	D-laktoza	-0,4365	1,6922	0,9227
14	laktuloza	-0,4827	1,7654	0,9405
15	D-liksoza	-0,4191	1,2749	0,9343
16	maltitol	-0,1209	0,6751	0,7345
17	D-manozamin	-0,3893	1,0522	0,9330
18	D-manoza	-0,4441	1,3489	0,9416
20	N-acetil-D-glukozamin	-0,4939	1,3476	0,9604
21	D-rafinoza	-0,2265	1,5212	0,8106
22	L-ramnoza	-0,3976	1,0148	0,9334
23	ribitol	-0,0861	-0,0180	0,9678
24	D-riboza	-0,4253	1,4405	0,9314
26	L-sorboza	-0,4707	1,4850	0,9578
28	D-trehaloza	-0,0421	0,1130	0,3996

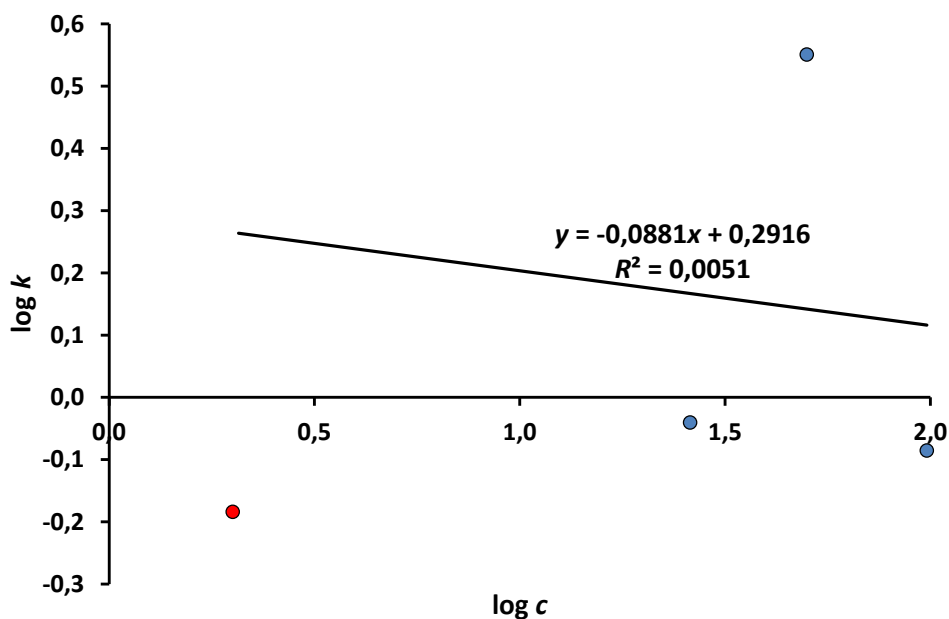
I u slučaju primjene modela pravca želja je bila kvalitetu dobivenih modela poboljšati dodatnim empirijskim spoznajama. Stoga su, kao i u slučaju polinomnog modela, izrađeni na temelju eksperimentalnih vrijednosti modeli pravaca za 24 šećera iz skupa za treniranje (tablica 12). Iz tablice 12 lako je uočljivo da glavnina komponenti ima negativnu vrijednost koeficijenta smjera što je u skladu s činjenicom da povećanje jakosti eluensa utječe na brže eluiranje analita iz kolone. Iznimka je glicerol kod kojeg je, vjerojatno uslijed iznimno kratkog zadržavanja u koloni, u model unesena pogreška. Također, vrijednosti koeficijenata determinacije općenito su lošije nego kod polinomnih modela, pa tako kod galaktitola i trehaloze iznose svega 0,2443, odnosno 0,3996. Stoga modeli spomenutih triju ugljikohidrata

nisu dalje razmatrani u pokušaju pronalaženja pravilnosti između početna 24 modela. Promatrajući preostale modele može se uočiti da bi koeficijent smjera pravca trebao biti unutar intervala od $-0,4939$ do $-0,0711$.

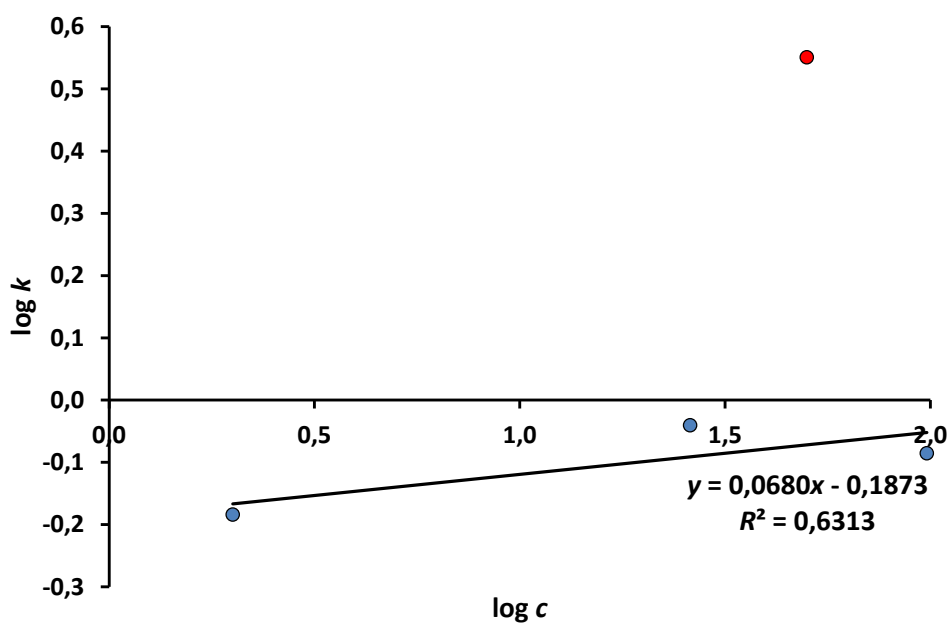
Uspoređujući uočeno s vrijednostima parametara modela pravaca dobivenih za 5 šećera iz vanjskog skupa (tablica 10) jasno je vidljiv pozitivan nagib kod D-sorbitola, popraćen s iznimno niskom vrijednosti koeficijenta determinacije. Očito je da barem jedna od $\log k$ vrijednosti procijenjenih QSRR modelom znatno odstupa od stvarne. Promatrajući grafički prikaz, vidljivo je da su sumnjive točka 1 i točka 3 (slika 30). Odbacivanjem prve točke (slika 31) dobije pravac nagiba $-0,0881$ što ulazi u željeni interval, međutim korelacija preostalih triju točaka je gotovo nikakva ($R^2=0,0051$). Ukoliko se odbaci 3. točka dobiva se znatno bolja korelacija podataka (slika 32), međutim nagib pravca postaje blago pozitivan ($0,0680$). Očito, nijedna od ove dvije eliminacije nije ispunila očekivanja. Ipak, uzimajući u obzir da od 6 alkoholnih šećera korištenih u trenažnom postupku čak 5 eluira u cijelom području koncentracije eluensa za manje od minute nakon nezadržanog sastojka (maksimalni $\log k$ iznosi $-0,0492$) uz iznimku maltitola s $0,6140$ pri 2 mM , odnosno $0,4991$ pri 50 mM KOH, odlučeno je kako je vjerojatniji *outlier* onaj pri 50 mM KOH, te je ta vrijednost odbačena iz modela. Uslijed iznimno kratkih vremena zadržavanja alkoholnih šećera, blago pozitivan nagib tako dobiveno modela ne bi trebao imati znatnijeg utjecaja na kvalitetu predviđanja konačnog gradijentnog modela.



Slika 30. Model pravca kod sorbitola dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, prije odbacivanja očitih pogrešaka.



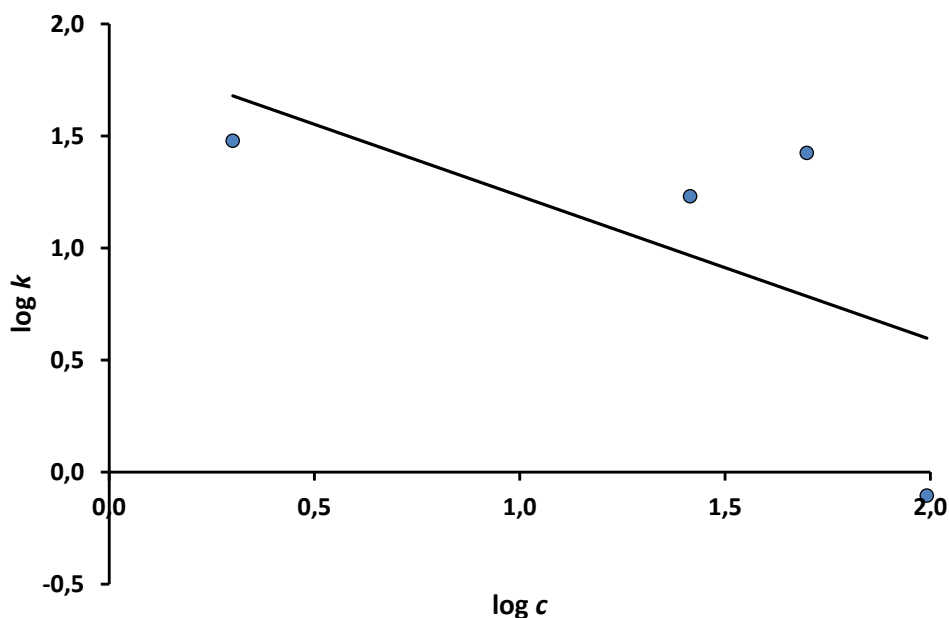
Slika 31. Model pravca kod sorbitola dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 2 mM KOH (crvena točka).



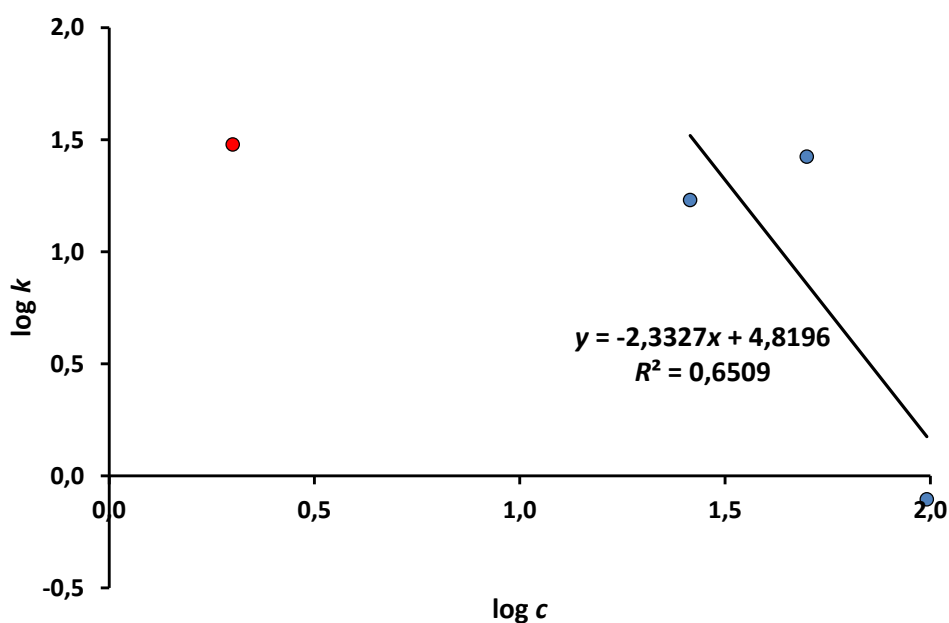
Slika 32. Model pravca kod sorbitola dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 50 mM KOH (crvena točka).

Promatrajući preostala četiri šećera iz vanjskog skupa lako je za uočiti da nagibi modela vremena zadržavanja kod melibioze i sukroze izlaze iz očekivanog intervala (tablica 10), što ukazuje na postojanje pogreške.

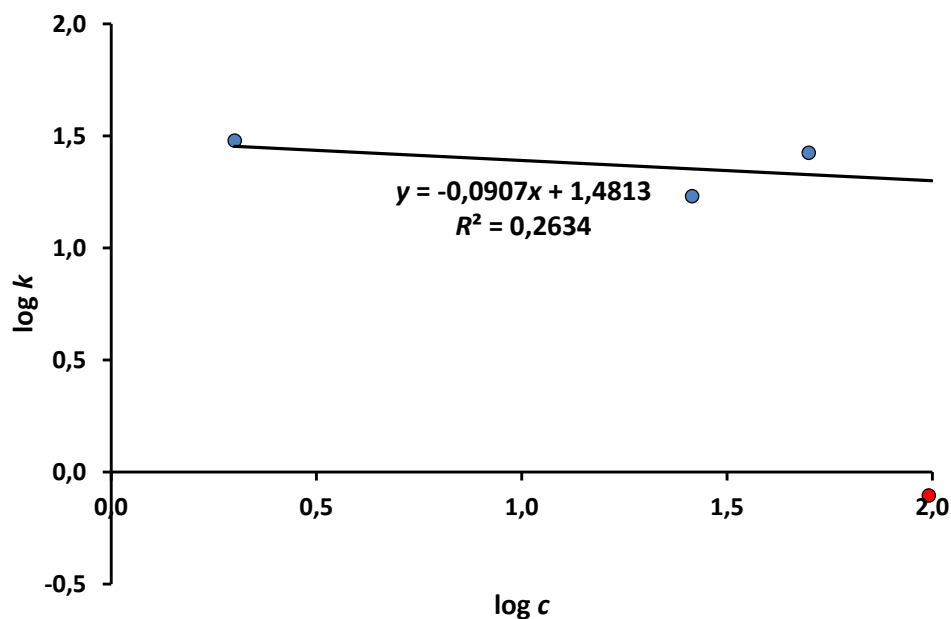
Uspoređujući model pravca u slučaju melibioze s predviđenim $\log k$ vrijednostima na temelju kojih je model generiran (slika 33), posve je očito da na nagib pravca najviše utjecaja mogu imati prva i četvrta točka. Odbacivanjem prve točke (2 mM KOH) odstupanje nagiba pravca se izrazito intenzivira (slika 34), dok odbacivanje četvrte točke (98 mM KOH) dovodi model pravca u željeni interval (slika 35) pa je stoga upravo četvrta točka uzeta kao *outlier*.



Slika 33. Model pravca kod melibioze dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, prije odbacivanja očitih pogrešaka.

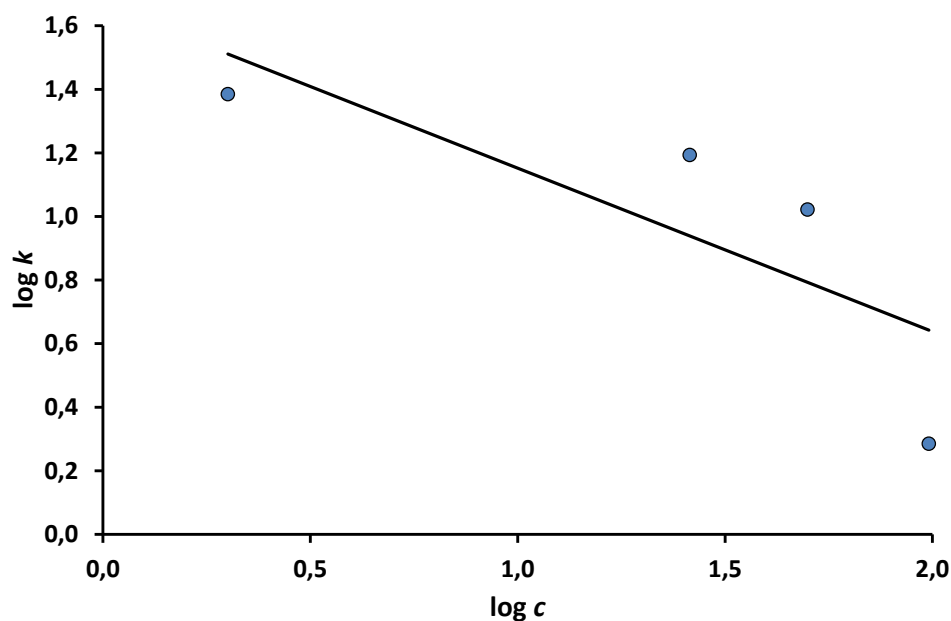


Slika 34. Model pravca kod melibioze dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 2 mM KOH (crvena točka).

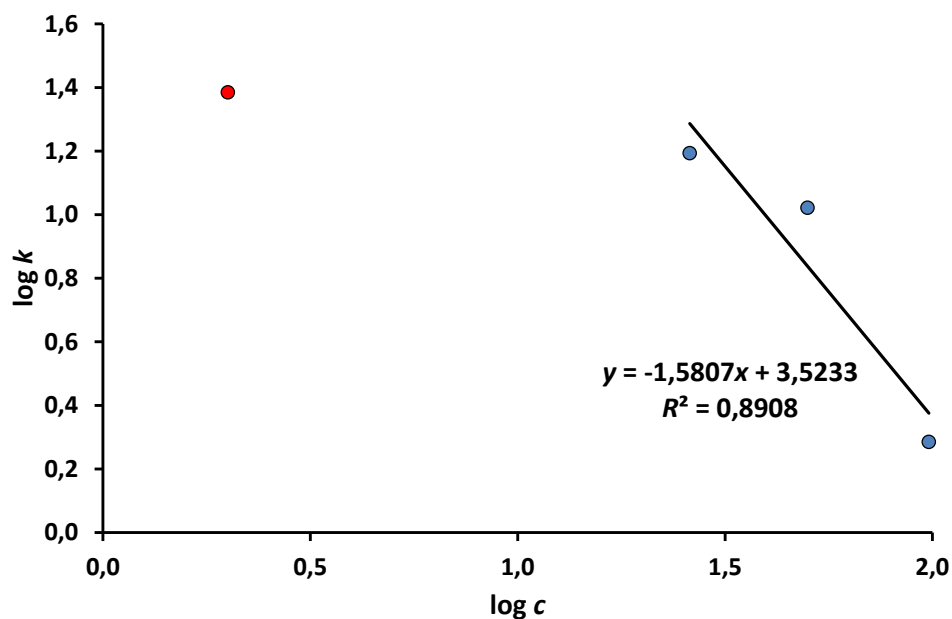


Slika 35. Model pravca kod melibioze dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 98 mM KOH (crvena točka).

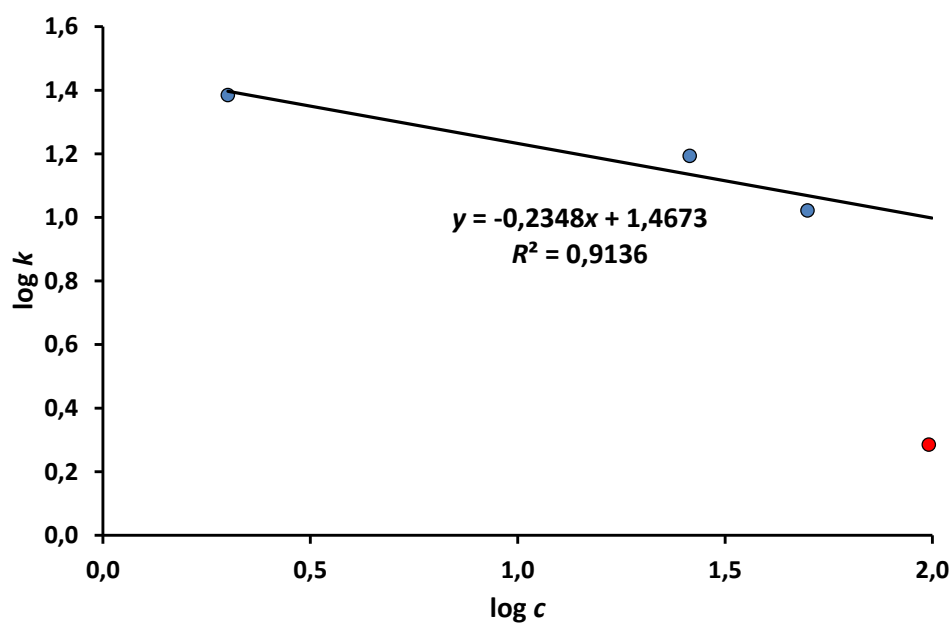
Potpuno identično razmatranje možemo primijeniti i kod sukroze (slika 36). I u ovom slučaju sumnjive su prva i četvrta točka. Odbacivanjem prve točke dolazi do još većeg odstupanja nagiba (slika 37), dok odbacivanje četvrte dovodi model u željeno područje (slika 38).



Slika 36. Model pravca kod sukroze dobiven na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, prije odbacivanja očitih pogrešaka.



Slika 37. Model pravca kod sukroze dobiven na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 2 mM KOH (crvena točka).

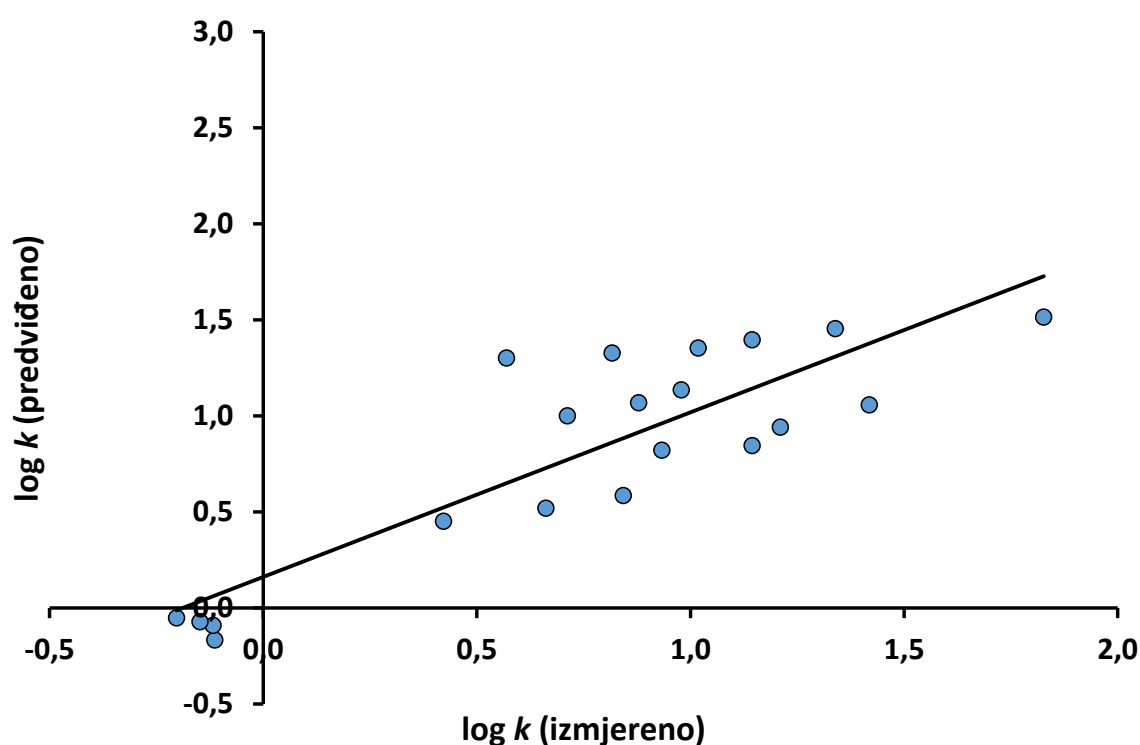


Slika 38. Model pravca kod sukroze dobiven na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, s izuzetom vrijednosti pri 98 mM KOH (crvena točka).

Konačni oblici izokratnih modela pravaca, nakon odbacivanja očitih pogrešaka, sumirani su u tablici 13.

Tablica 13. Parametri modela pravca (jednadžba (39)) za 5 šećera iz vanjskog skupa određeni na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom i nakon provedene empirijske eliminacije pojedinih predviđenih vrijednosti.

BROJ	ŠEĆER	a_1	a_2	R^2
4	D-celobioza	-0,4101	1,6376	0,7552
19	melibioza	-0,0907	1,4813	0,2634
25	D-sorbitol	0,0680	-0,1873	0,6313
27	sukroza	-0,2348	1,4673	0,9136
29	D-ksiloza	-0,2328	0,9147	0,7953



Slika 39. Točnost izokratnih modela pravaca razvijenih na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a nakon provedene empirijske eliminacije.

Tablica 14. Analiza točnosti izokratnih modela pravaca razvijenih na temelju log k vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a nakon provedene empirijske eliminacije.

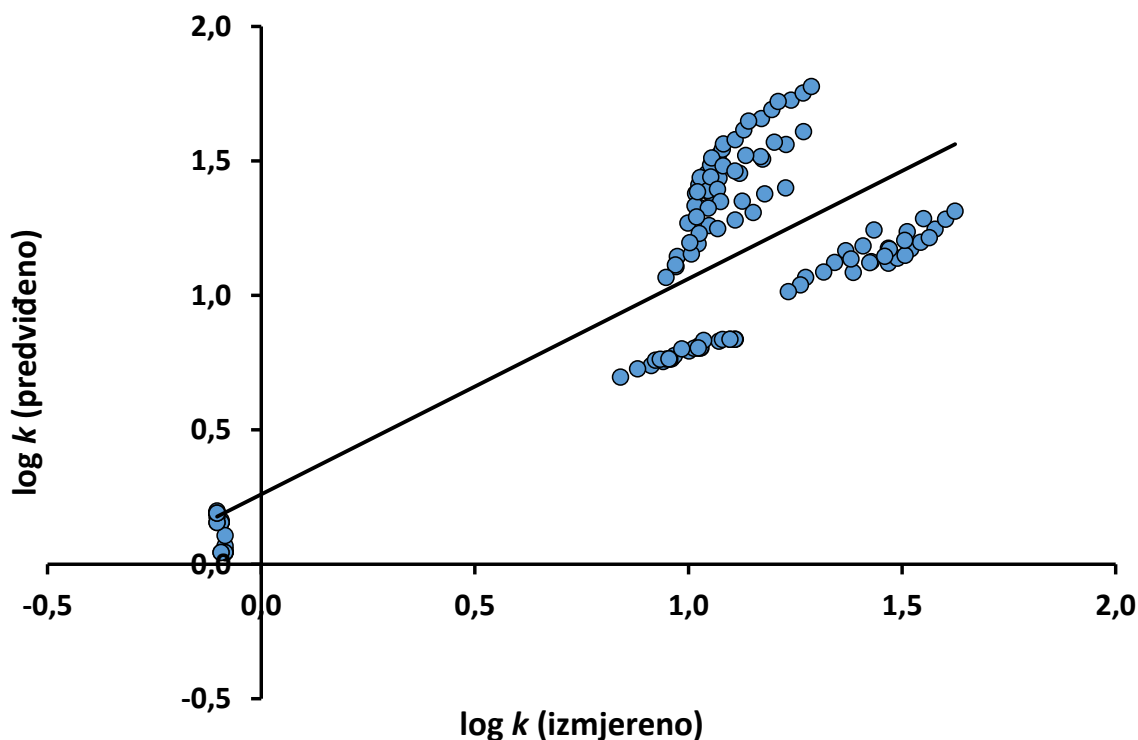
	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,1620	-0,0689	0,3929
Nagib	0,8572	0,6122	1,1021
R^2	0,7502		
RMSEP	0,2872		

Eliminacijom očitih pogrešaka na temelju empirijskih spoznaja dobiveni su izokratni modeli prihvatljive, ali naočigled donekle lošije kvalitete predviđanja (nešto niža R^2 i viša $RMSEP$ vrijednost). Međutim, važno je za uočiti da je eliminirana i proporcionalna sustavna pogreška koja je bila veliki nedostatak nekorrigiranih modela pravaca (tablica 10). Stoga su ovi modeli uzeti kao prihvatljiva baza za gradijentni model vremena zadržavanja.

5.4 Gradijentni modeli vremena zadržavanja

Kao što je prethodno rečeno, gradijentni model temelji se na izokratnom modelu vremena zadržavanja, pa je samim time za očekivati da njegova kvaliteta predviđanja djelom ovisi o kvaliteti predviđanja izokratnog modela. Za vrednovanje kvalitete predviđanja gradijentnih modela provedeno je 27 eksperimenata u gradijentnom elucijskom modu (vidi poglavlje 3.3). Na slikama 40–42 prikazana je kvaliteta predviđanja triju gradijentnih modela; modeli se razlikuju ovisno o tome je li kao izokratni model vremena zadržavanja korišten polinom (slika 40) ili pravac (slike 41 i 42), odnosno jesu li pri izradi izokratnog modela korištena nepročišćena (slika 41) ili pročišćena (slika 42) QSRR predviđanja. Za sva tri modela provedena je i regresijska analiza točnosti (tablice 15–17). U pravilu, sva tri modela ponudila su bolje rezultate točnosti nego što je to bio slučaj kod izokratnih modela (veći koeficijenti korelacije i manje $RMSEP$ vrijednosti). Naravno da ovo ne može biti posljedica superiornih karakteristika gradijentnog modela, već prije rezultat znatno većeg broja eksperimenata provedenih u ovom slučaju (135 gradijentnih podataka naspram 20 izokratnih) što bi trebalo dati realniju sliku stvari. Također, bitno je za uočiti kako je odabir eksperimenata prilikom vrednovanja izokratnih modela bio takav da je rezultirao ravnomjerno raspoređenim vremenima zadržavanja (pokrivena cijela domena). Suprotno tome, u slučaju gradijentnih elucija, odabrana mjerenja rezultirala su uglavnom višim vrijednostima vremena zadržavanja ($\log k > 1$) većine komponenti, a u području niskih vremena ostao je samo sorbitol (izmjereni $\log k < 0$). Upravo stoga, svaka pogreška predviđanja $\log k$ vrijednosti sorbitola imala bi znatan utjecaj na analizu točnosti.

Slično kao što je izokratni model pravca dominirao kvalitetom nad polinomnim (tablice 8 i 11), tako je i gradijentni model koji koristi pravac pokazao bolje karakteristike (tablice 15 i 16). Međutim oba ova gradijentna modela sadrže i proporcionalnu i konstantnu sustavnu pogrešku.

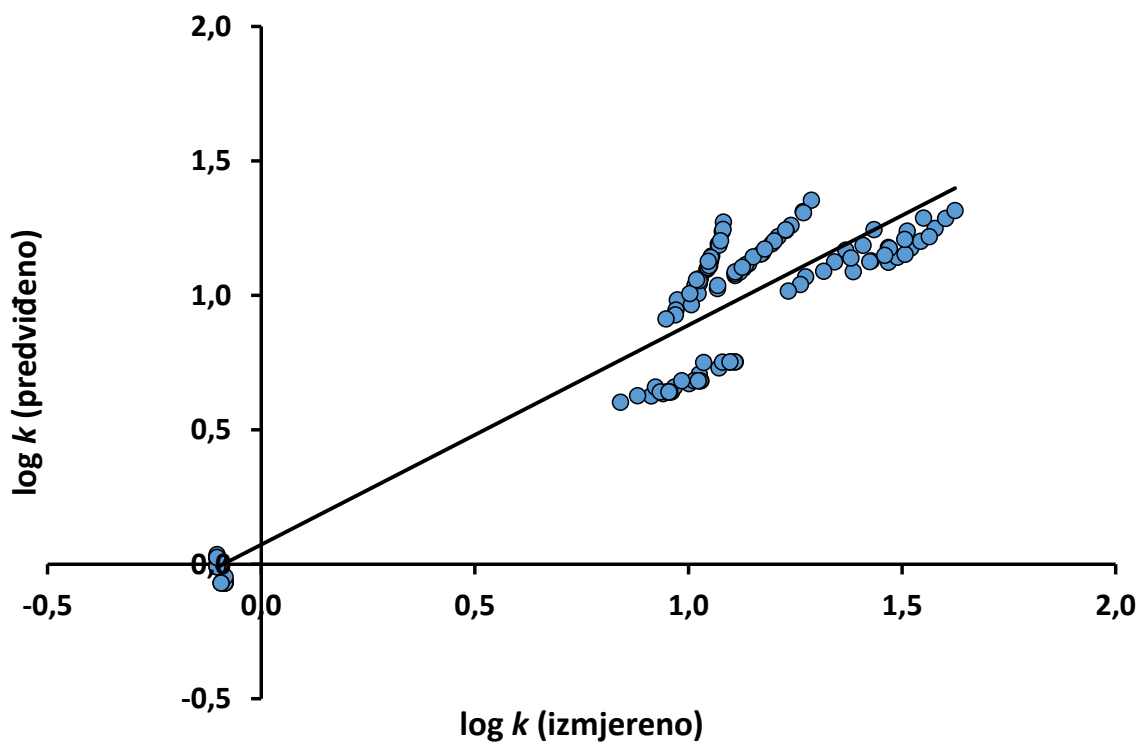


Slika 40. Točnost gradijentnog modela. Kao izokratni model korišten je polinom izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

Tablica 15. Analiza točnosti gradijentnog modela. Kao izokratni model korišten je polinom izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,2598	0,1705	0,3492
Nagib	0,8019	0,7169	0,8869
R^2	0,7235		
RMSEP	0,2941		

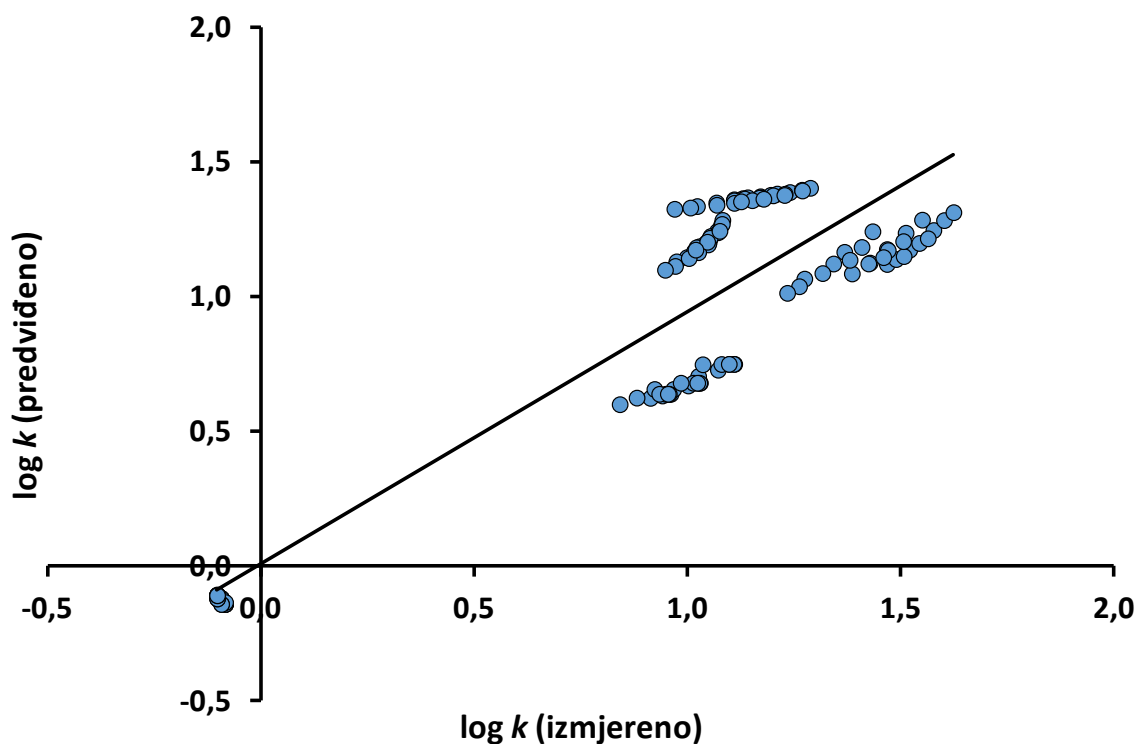
Uspoređujući gradijentne modele koji koriste pravac izrađen na nepročišćenim i pročišćenim QSRR predviđanjima, možemo također primijetiti sličnost s analizom izokratnih modela pravaca. Naime, gradijentni model temeljen na pravcu proizašlom iz pročišćenih QSRR vrijednosti ima donekle lošiju kvalitetu predviđanja ($RMSEP=0,2284$ naspram 0,1996, tablice 16 i 17). Međutim sustavne pogreške prisutne kod gradijentnog modela proizašlog iz “nepročišćenog” modela pravca u ovom slučaju su izostale. Stoga, uvažavajući činjenicu da su RMSEP vrijednosti manje od 0,30 uglavnom prihvatljive u QSRR modeliranju, možemo ovaj model smatrati najboljim odabirom.



Slika 41. Točnost gradijentnih modela. Kao izokratni model korišten je pravac izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

Tablica 16. Analiza točnosti gradijentnog modela. Kao izokratni model korišten je pravac izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a prije provedene empirijske eliminacije.

	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,0728	0,0229	0,1228
Nagib	0,8165	0,7689	0,8640
R^2	0,8966		
RMSEP	0,1996		



Slika 42. Točnost gradijentnih modela. Kao izokratni model korišten je pravac izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a nakon provedene empirijske eliminacije.

Tablica 17. Analiza točnosti gradijentnog modela. Kao izokratni model korišten je pravac izrađen na temelju $\log k$ vrijednosti predviđenih QSRR modelom, a nakon provedene empirijske eliminacije.

	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95%	Gornja granica intervala pouzdanosti 95%
Odsječak	0,0101	-0,0648	0,0850
Nagib	0,9346	0,8633	1,0058
R^2	0,8349		
$RMSEP$	0,2284		

6 ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je analiza QSRR pristupa u ionskoj kromatografskoj analizi šećera. QSRR pristup kombiniran je s metodologijom prijenosa informacije iz izokratnog u gradijentno područje predviđanja ponašanja kromatografskih sustava (IG metodologija, poglavlje 2.3.3). Ova metodologija primijenjena je i okarakterizirana u više radova [28,29,54,72], međutim nijedan od njih nije uvažavao osnovne kromatografske empirijske spoznaje. To je urađeno u ovom radu.

Umjesto uobičajenog polinomnog modela drugog reda ($\log k$ vs. $\log c$) upotrijebljen je model pravca koji se zbog, smanjenog broja stupnjeva slobode, pokazao prikladniji (robusniji) u situacijama kada modeliramo na podacima prizašlim iz relativno nepreciznih modela poput QSRR-a. Kao rezultat dobiveni su gradijentni modeli vremena zadržavanja zadovoljavajuće kvalitete predviđanja.

Uvažavanje empirijskih spoznaja dovelo je do dodatnih poboljšanja karakteristika gradijentnog modela. Naime, kvaliteta predviđanja finalnog gradijentnog modela nije bitno umanjena ($RMSEP=0,2284$), a došlo je do eliminacije prisutnih sustavnih pogrešaka.

Jasno je da QSRR modeli koji uvažavaju samo molekulske informacije produciraju rezultate koji nužno ne uključuju međudjelovanja uočena u realnim sustavima (empirijske spoznaje). Uvažavanjem ovih spoznaja moguće je postići pouzdanije i vjerodostojnije modele vremena zadržavanja.

7 LITERATURA

1. L.S. Ettre, *Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993.)*, Pure & Appl. Chem. **65** (1993) 819–872
2. Š. Cerjan Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, *Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI*, Zagreb, 1999.
3. K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, *Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/log D*, Anal. Chem. **69** (1997) 2022–2029
4. J.E. Madden, P.R. Haddad, *Critical comparison of retention models for optimisation of the separation of anions in ion chromatography: I. Non-suppressed anion chromatography using phthalate eluents and three different stationary phases*, J. Chrom. A **829** (1998) 65–80
5. L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems*, J. Chrom. A **165** (1979) 3–30
6. T.B. Hoover, *Multiple eluent and pH effects on ion chromatography of phosphate and arsenate*, Sep. Sci. Tech. **17** (1982) 295–305
7. D.R. Jenke, *Modeling of analyte behavior in indirect photometric chromatography*, Anal. Chem. **56** (1984) 2674–2681
8. M. Novič, J. Zupan, M. Novič, *Computer simulation of ion chromatography separation: an algorithm enabling continuous monitoring of anion distribution on an ion-exchange chromatography column*, J. Chrom. A **922** (2001) 1–11
9. T. Bolanča, Š. Cerjan Stefanović, M. Regelja, H. Regelja, S. Lončarić, *Development of an inorganic cations retention model in ion chromatography by means of artificial neural networks with different two-phase training algorithms*, J. Chrom. A **1085** (2005) 74–85
10. T. Bolanča, Š. Cerjan Stefanović, Š. Ukić, M. Rogošić, M. Luša, *Application of different training methodologies for the development of a back propagation artificial neural network retention model in ion chromatography*, J. Chemom. **22** (2008) 106–113
11. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.

12. R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach*, Harwood Academic, Amsterdam, 1997.
13. P.T. Jackson, M.R. Schure, T.P. Weber, P.W. Carr, *Intermolecular Interactions Involved in Solute Retention on Carbon Media in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*, *Anal. Chem.* **69** (1997) 416–425
14. J. Li, P.W. Carr, *Characterization of polybutadiene-coated zirconia and comparison to conventional bonded phases by use of linear solvation energy relationships*, *Anal. Chim. Acta* **334** (1996) 239–250
15. E. Forgács, T. Cserhádi, *Molecular Basis of Chromatographic Separations*, CRC Press, Boca Raton, 1997.
16. J. H. Park, M.D. Jang, D. S. Kim, P.W. Carr, *Solvatochromic hydrogen bond donor acidity of aqueous binary solvent mixtures for reversed-phase liquid*, *J. Chrom. A* **513** (1990) 107–116
17. Š. Ukić, T. Bolanča, M. Rogošić, *Novel criteria for fast searching for optimal method in gradient ion chromatography: An integrated approach*, *J. Sep. Sci.* **34** (2011) 780–788
18. T. Bolanča, Š. Cerjan Stefanović, Š. Ukić, M. Luša, M. Rogošić, *From Isocratic Data to a Gradient Elution Retention Model in IC: An Artificial Neural Network Approach*, *Chromatographia* **70** (2009) 15–20
19. T. Bolanča, Š. Cerjan Stefanović, M. Luša, M. Rogošić, Š. Ukić, *Development of an ion chromatographic gradient retention model from isocratic elution experiments*, *J. Chrom. A* **1121** (2006) 228–235
20. T. Bolanča, Š. Ukić: *Ionska kromatografija*, FKIT, Zagreb, 2013.
(http://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/T_Bolanca_S_Ukic_Ionska_kromatografija.pdf)
21. H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman, *Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection*, *Anal. Chem.* **47** (1975) 1801–1809
22. R.M. Wheaton, W.C. Bauman, *Ion Exclusion – A Unit Operation Utilizing Ion Exchange Materials*, *Ind. Eng. Chem.* **45** (1953) 228–233
23. J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, WILEY-VCH, Winheim, 2004.
24. http://www.periodni.com/enig/potenciometrijski_senzori.html
25. M. Kraljić Roković, *Ciklička voltametrija*, priručnik za vježbe, FKIT, Zagreb
26. Z. Mandić, M. Kraljić Roković, *Elektrodni procesi*, predavanja, FKIT, Zagreb
27. H. Small: *Ion Chromatography*, Plenum Press, New York, 1989.

28. A. Vlahović, *Razvoj QSRR modela u ionskoj kromatografiji primjenom umjetne inteligencije*, diplomski rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2013.
29. Š. Ukić, *Matematički model za simuliranje odziva ionske kromatografske analize*, doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2009.
30. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 6. izd., Thompson Brooks/Cole, US, 2008.
31. <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm>
32. J.S. Hobbs, J.G. Lawrence, *The separation and quantitation of carbohydrates on cation-exchange resin columns having organic counterions*, J. Chrom. A **72** (1972) 311–318
33. F. Nachtmann, K.W. Budna, *Sensitive determination of derivatized carbohydrates by high-performance liquid chromatography*, J. Chrom. A **136** (1977) 279–287
34. G.D. McGinnis, P. Fang, *Separation of substituted carbohydrates by high-performance liquid chromatography II*, J. Chrom. A **153** (1978) 107–114
35. M.T. Yang, L.P. Milligan, G.W. Mathison, *Improved sugar separation by high-performance liquid chromatography using porous microparticle carbohydrate columns*, J. Chrom. A **209** (1981) 316–322
36. J.G. Baust, R.E. Lee Jr., R.R. Rojas, D.L. Hendrix, D. Friday, H. James, *Comparative separation of low-molecular-weight carbohydrates and polyols by high-performance liquid chromatography: Radially compressed amine modified silica versus ion exchange*, J. Chrom. A **261** (1983) 65–75
37. R. Pecina, G. Bonn, E. Burtscher, O. Bobleter, *High-performance liquid chromatographic elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase*, J. Chrom. A **287** (1984) 245–258
38. G. Bonn, *High-performance liquid chromatographic elution behaviour of oligosaccharides, monosaccharides and sugar degradation products on series-connected ion-exchange resin columns using water as the mobile phase*, J. Chrom. A **322** (1985) 411–424
39. E. Rajakylä, *Use of reversed-phase chromatography in carbohydrate analysis*, J. Chrom. A **353** (1986) 1–12
40. T. Ueda, R. Mitchell, F. Kitamura, A. Nakamoto, *Constant-potential amperometric detection of carbohydrates at metal electrodes in high-performance anion-exchange chromatography*, J. Chrom. A **592** (1992) 229–237
41. S.C. Churms, *Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction*, J. Chrom. A **720** (1996) 75–91

42. R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, *High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines*, J. Chrom. A **824** (1998) 159–167
43. V.P. Hanko, J.S. Rohrer, *Determination of Carbohydrates, Sugar Alcohols, and Glycols in Cell Cultures and Fermentation Broths Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*, Analytical Biochemistry **283** (2000) 192–199
44. L.R. Snyder, M.A. Stadalius, M.A. Quarry, *Gradient elution in reversed-phase HPLC separation of macromolecules*, Anal. Chem. **55** (1983) 1412A–1430A
45. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf, *Optimization of anion separation by nonsuppressed ion chromatography*, Anal. Chem. **56** (1984) 85–88
46. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf, *Models for prediction of retention in nonsuppressed ion chromatography*, Anal. Chem. **56** (1984) 88–91
47. P. Hajós, O. Horváth, V. Denke, *Prediction of retention for halide anions and oxoanions in suppressed ion chromatography using multiple species eluent*, Anal. Chem. **67** (1995) 434–441
48. D.T. Gjerd, *Eluent selection for the determination of cations in ion chromatography*, J. Chrom. A **439** (1988) 49–61
49. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tussen, L. De Galan, *Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chrom. A **149** (1978) 519–537
50. J. Torres-Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M. García-Alvarez-Coque, *Interpretive optimisation strategy applied to the isocratic separation of phenols by reversed-phase liquid chromatography with acetonitrile–water and methanol–water mobile phases*, J. Chrom. A **886** (2000) 31–46
51. L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *Drylab® computer simulation for highperformance liquid chromatographic method development: I. Isocratic elution*, J. Chrom. A **485** (1989) 65–89
52. R.D. Rocklin, C.A. Pohl, J.A. Schibler, *Gradient elution in ion chromatography*, J. Chrom. A **411** (1987) 107–119
53. S.R. Souza, M.F. Tavares, L.R. de Carvalho, *Systematic approach to the separation of mono- and hydroxycarboxylic acids in environmental samples by ion chromatography and capillary electrophoresis*, J. Chrom. A **796** (1998) 335–346

54. M. Novak Stankov, *Molekularno modeliranje i umjetna inteligencija u razvoju ionskih kromatografskih metoda*, doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
55. R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of molecular descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
56. D.L. Massart, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Data handling in science and technology, Elsevier, Amsterdam, 1997.
57. P. Gramatica, *Principles of QSAR models validation: Internal and external*, QSAR Comb. Sci., **26** (2007), 694–701
58. B.K. Bose, *Expert system, fuzzy logic, and neural network applications in power electronics and motion control*, Proc. IEEE **82** (1994) 1303–1323
59. A. Mellit, S.A. Kalogirou, L. Hontoria, S. Shaari, *Artificial intelligence techniques for sizing photovoltaic systems: A review*, Renew. Sustain. Energy Rev. **13** (2009) 406–419
60. L. Marasović, *Optimizacija neuronske mreže uz pomoć genetskog algoritma*, završni rad, FER, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2012.
61. D.R. Baughman, Y.A. Liu, *Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering*, Academic Press, Boston, 1995.
62. S. Haykin, *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, Prentice Hall: Upper Saddle River, N.J., 1994.
63. Š. Ukić, M. Novak, A. Vlahović, N. Avdalović, Y. Liu, B. Buszewski, T. Bolanča, *Development of Gradient Retention Model in Ion Chromatography. Part II: Artificial Intelligence QSRR Approach*, Chromatographia, **77** (2014) 997–1007
64. D. Klobučar, R. Pernar, *Umjetne neuronske mreže u procjeni sastojinskih obrasta s cikličkih snimaka*, Šumar. List **133** (2009) 145–155
65. T. Kohonen, *An introduction to neural computing*, Neural Netw. **1** (1988) 3–16
66. J.E. Madden, N. Avdalovic, P.R. Haddad, J. Havel, *Prediction of retention times for anions in linear gradient elution ion chromatography with hydroxide eluents using artificial neural networks*, J. Chrom. A **910** (2001) 173–179
67. M.H. Fatemi, M.H. Abraham, C.F. Poole, *Combination of artificial neural network technique and linear free energy relationship parameters in the prediction of gradient retention times in liquid chromatography*, J. Chrom. A **1190** (2008) 241–252
68. F. Ruggieri, A.A. D'Archivio, G. Carlucci, P. Mazzeo, *Application of artificial neural networks for prediction of retention factors of triazine herbicides in reversedphase liquid chromatography*, J. Chrom. A **1076** (2005) 163–169

69. V.K. Gupta, H. Khani, B. Ahmadi-Roudi, S. Mirakhorli, E. Fereyduni, S. Agarwal, *Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks*, *Talanta* **83** (2011) 1014–1022
70. W. Banzhaf, P. Nordin, R.E. Keller, F.D. Francone, *Genetic Programming - An Introduction: On the Automatic Evolution of Computer Programs and Its Applications*, Morgan Kaufmann Publishers Inc., San Francisco, 1998.
71. D. Whitley, *An overview of evolutionary algorithms: practical issues and common pitfalls*, *Inf. Softw. Technol.* **43** (2001) 817–831
72. P. Žuvela, *Modeliranje ionskog kromatografskog zadržavanja upotrebom QSPR relacija*, diplomski rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2013.

ŽIVOTOPIS

Rea Janda rođena je 10. siječnja 1991. u Zagrebu. Nakon završene osnovnoškolske naobrazbe, 2005. godine, upisuje „Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga“ gdje stiče zvanje kemijskog tehničara. 2009. godine upisuje preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu gdje 2013. stiče zvanje prvostupnice primijenjene kemije. U rujnu iste godine, na matičnom fakultetu upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Kemija okoliša.

Tijekom svog dosadašnjeg školovanja; Rea Janda je prisustvovala brojnim natjecanjima, međunarodnim školama (14th i 15th International Chromatography School, 6th The European Summer School on Electrochemical Engineering) i znanstvenim kongresima (24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera).