

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Marko M. Jovanović

**Teorijska i hemometrijska analiza
retencionih mehanizama odabranih
lekova u tečnoj hromatografiji
hidrofilnih interakcija**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Marko M. Jovanović

**Theoretical and chemometrical analysis
of the retention mechanisms of selected
drugs in hydrophilic interaction liquid
chromatography**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Mentor

Dr Biljana Stojanović, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
Katedra za analitiku lekova

Članovi komisije

Dr Mirjana Medenica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode

Dr Miroslav Šober, redovni profesor
Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet
Katedra za farmaceutsku analitiku

Datum odbrane

Beograd, _____

Doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i predstavlja deo istraživanja u okviru naučnoistraživačkog Projekta broj 172052 (rukovodilac: prof. dr Mirjana Medenica – Farmaceutski fakultet u Beogradu) koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru doc. dr Biljani Jančić Stojanović na profesionalnoj podršci, kao i na bezgraničnom poverenju i pružanju slobode prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojim dragim profesorima, prof. dr Mirjani Medenici i prof. dr Darku Ivanoviću, koji su sa mnom nesebično delili svoje radno i životno iskustvo, čime su značajno doprineli mom, kako profesionalnom, tako i ličnom razvoju.

Svojoj kolegici i prijateljici Tijani Rakić Kostić neizmerno se zahvaljujem na безусловnoj kolegijalnosti i pomoći koju mi je pružila prilikom rešavanja naizgled nerešivih istraživačkih problema.

Želeo bih da se zahvalim i ostalim kolegicama sa naučnoistraživačkog Projekta broj 172052 koje su svojom posvećenošću i rezultatima učinili da se osećam kao deo kolektiva koji postiže visoke ciljeve.

Prijatnu radnu atmosferu u kojoj je nastajala ova disertacija dugujem i svim ostalim kolegicama i kolegama sa Katedre za analitiku lekova.

I za kraj, iz sveg srca se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima koji su s radošću proslavljali moje uspehe i uvek strpljivo ostajali pored mene kao podrška u teškim trenucima.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima.

Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija

Rezime

Retenciono ponašanje i retencioni mehanizmi lekova različitih kiselo–baznih osobina na polarnim i umereno polarnim stacionarnim fazama detaljno su ispitani pomoću teorijskih i eksperimentalnih modela u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC*). Teorijskim modelima prevashodno je omogućeno razjašnjavanje retencionih mehanizama u ispitivanim HILIC sistemima, dok su eksperimentalni modeli bili od značaja u analizi retencionog ponašanja u zavisnosti od većeg broja ispitivanih faktora i kvantifikaciji faktorskih uticaja, kao i njihovih interakcija.

Literaturni podaci pokazali su da je do sada najveći broj analiza u HILIC sistemima izveden u silika kolonama, pri čemu su najčešće bile razdvajane bazne supstance zbog svog velikog afiniteta prema ovom tipu stacionarnih faza. U ovom delu disertacije, primenom hemometrijskog pristupa, ispitano je retenciono ponašanje kiselih i amfoternih farmaceutski aktivnih supstanci na primeru model smeše β -laktamskih antibiotika u silika koloni. Kvantifikacija faktorskih uticaja omogućena je građenjem eksperimentalnih modela u formi polinoma drugog reda, a faktorske interakcije grafički su prikazane u vidu trodimenzionih površina odgovora. Verifikacija dobijenih modela urađena je poređenjem simuliranih i eksperimentalno dobijenih hromatograma u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora.

Separacioni mehanizam u HILIC sistemima izuzetno je složen i do sada nedovoljno proučen. Smatra se da mogu biti uključeni procesi raspodele, adsorpcije i/ili jonske izmene, a da relativan udeo svakog od njih zavisi od tri grupe faktora: strukturnih karakteristika analita, sastava mobilne faze i vrste kolone. Zato su u nastavku istraživanja ispitani retencioni mehanizmi i retenciono ponašanje baznih analita na primeru model smeše odabranih farmaceutski aktivnih supstanci u dve silika, dve cijano i jednoj diolnoj stacionarnoj fazi korišćenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih

modela. Fitovanjem retencionih podataka u katjonsko–izmenjivačke retencione modele kvantifikovan je doprinos procesa katjonske izmene u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu ovih analita, dok je udeo procesa raspodele i adsorpcije ispitan na osnovu kreiranih particionih i adsorpcionih retencionih modela. Pošto su cijano i diolne kolone umereno polarnog karaktera može se, pored HILIC retencionog mehanizma pri određenim sastavima mobilne faze, očekivati i prisustvo RP retencionog mehanizma. Iz tog razloga istražen je širok opseg odnosa vodenog i organskog udela u mobilnoj fazi, a korišćenjem prikupljenih retencionih podataka uspostavljeni su odgovarajući dvojni HILIC/RP modeli, koji su omogućili određivanje tačke prelaza između dva retencionia mehanizma za svaki od analita. Analiza retencionog ponašanja ispitivane smeše analita u *Betasil Silica* koloni, kao i kvantifikacija faktorskih uticaja omogućena je građenjem eksperimentalnih modela primenom Boks–Benken dizajna. Statistički značajne faktorske interakcije predstavljene su grafički u vidu trodimenzionih površina odgovora.

U nastavku istraživanja ispitani su retencioni mehanizmi i retenciono ponašanje kiselih i neutralnih analita na primeru model smeše farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom u amino koloni, korišćenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih modela. Uzevši u obzir prirodu kiselih analita i karakteristike površine amino kolone očekivalo se prisustvo procesa anjonske izmene u njihovom retencionom mehanizmu. U ovoj disertaciji prvi put je predložen matematički opis procesa anjonske izmene u nekom HILIC sistemu, a na osnovu kreiranih modela procenjen je doprinos ovog procesa retencionom mehanizmu. Zbog umereno polarnih karakteristika amino kolone uspostavljeni su i dvojni HILIC/RP modeli na osnovu kojih su određeni sastavi mobilne faze pri kojima dolazi do prelaza između dva retencionia mehanizma. Nakon toga, svaki od regiona modelovan je zasebno particionim i adsorpcionim retencionim modelima koji su poslužili za procenu udela procesa raspodele i adsorpcije. Konačno, u cilju procene uticaja većeg broja faktora mobilne faze kreirani su eksperimentalni modeli primenom Boks–Benken dizajna. Kompletan uvid u retenciono ponašanje ispitivanih analita u amino koloni ilustrovan je trodimenzionim površinama odgovora.

U završnoj fazi disertacije detaljno su ispitani retencioni mehanizmi i retenciono ponašanje neutralnih analita na primeru model smeše joheksola i njegovih srodnih supstanci u dve silika i dve diolne stacionarne faze. Kako na tri od četiri odabrane kolone linearni particioni i adsorpcioni teorijski modeli nisu obezbedili zadovoljavajuću aproksimaciju retencionih podataka, pristupilo se modelovanju nelinearnim (kvadratnim) particionim i mešovitim adsorpciono-particionim modelima. Na osnovu njih izvedeni su zaključci o doprinosu procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu ovih analita. Jedan od ciljeva ovog dela istraživanja bio je i građenje eksperimentalnih modela koji omogućavaju istovremenu procenu uticaja tri kvantitativna faktora mobilne faze i jednog kvalitativnog faktora (tip kolone) na retenciono ponašanje analita. Kao dizajn koji omogućava istovremenu procenu kvantitativnih i kvalitativnih faktora primenjen je D-optimalni dizajn. Na osnovu dobijenih matematičkih modela urađena je optimizacija razdvajanja komponenti smeše. Kao parametar separacije odabran je faktor selektivnosti kritičnog para smeše, a njegovim direktnim modelovanjem dobijeni su neadekvatni modeli. Zato se pristupilo indirektnom modelovanju ovog odgovora, a konačni optimalni uslovi identifikovani su tzv. pristupom pretrage čvorova mreže. Na kraju je predložena HILIC metoda validirana za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci u rastvorima za intravensku primenu.

Holistički pristup analizi hromatografskog sistema, opisan u ovoj disertaciji, omogućio je proširivanje izvedenih zaključaka i na HILIC sisteme koji još nisu ispitani. Na taj način, ne samo da je dat značajan naučni doprinos teorijskim razmatranjima HILIC sistema, nego je izgrađena i osnova koja će omogućiti da se pojednostavi planiranje budućih istraživanja u HILIC hromatografiji.

Ključne reči: tečna hromatografija, hidrofilnih interakcija, retenciono ponašanje, retencioni mehanizmi, teorijski modeli, eksperimentalni modeli, hemometrija, eksperimentalni dizajn, optimizacija

Naučna oblast: Farmaceutska hemija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

UDK 615.074:543.544:001.891.54(043.3)

Theoretical and chemometrical analysis of the retention mechanisms of selected drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography

Abstract

The assessment of the retention behavior and retention mechanisms of drugs with different acido–basic properties on various polar and moderately polar stationary phases was carried out with the aid of theoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). Theoretical models primarily enabled the elucidation of the retention mechanisms in the examined HILIC systems, whereas empirical models were useful in the analysis of the retention behavior as a function of several examined factors and in the quantification of factor influences, as well as their interactions.

Literature survey has shown that the greatest number of separations in HILIC mode was performed on bare silica columns. Since basic analytes have high affinity towards this type of stationary phases, they were most commonly analyzed on bare silica columns. In this part of dissertation the retention behavior of acidic and amphoteric analytes on the example of a model mixture of β -lactam antibiotics on bare silica column utilizing chemometric approach was investigated. Quantification of factor influences was enabled through the creation of empirical models in the form of second–order polynomial and factor interactions were graphically represented as 3D response surface plots. Verification of the created models was conducted by comparing simulated and experimentally obtained chromatograms at random points of experimental space.

Separation mechanism in HILIC systems is complex and insufficiently investigated so far. It is believed that it involves partition, adsorption and/or ion–exchange processes, and that the dominance of each process depends on three groups of factors: structural characteristics of the analytes, mobile phase composition and column type. Thus, further on, the retention mechanisms and retention behavior of basic analytes on the example of a model mixture of selected basic drugs on two bare silica, two cyano and one diol stationary phase using theoretical and empirical retention models were assessed. By

fitting the retention data in cation–exchange models the involvement of cation–exchange process in the overall HILIC retention mechanism was quantified. On the other hand, the contribution of partition and adsorption process was estimated on the basis of partition and adsorption retention models. Due to the fact that cyano and diol columns are moderately polar, apart from HILIC retention mechanism, the presence of RP retention mechanism on these types of columns can be expected. Consequently, broad range of the ratios between water and organic solvent in the mobile phase was examined and the acquired retention data was utilized for the establishment of dual HILIC/RP models. These models enabled the determination of the transition point between the two mechanisms for each analyte. The analysis of the retention behavior of the investigated drug mixture on *Betasil Silica* column, as well as the quantification of factor influences were facilitated through the creation of empirical models applying Box–Behnken design. Statistically significant factor interactions were graphically shown as 3D response surface plots.

Further on, the retention mechanisms and retention behavior of acidic and neutral analytes on the example of a model mixture of drugs containing amidic and sulfonamidic functional group on amino column utilizing theoretical and empirical models were examined. Taking into account the nature of the acidic analytes and the properties of the surface of amino column, the presence of anion–exchange process was expected in their retention mechanism. In this dissertation the mathematical description of anion–exchange process in HILIC system was proposed for the first time. Due to moderately polar properties of amino column, dual HILIC/RP models were built as well. On their basis the transition points between the two mechanisms were calculated. Next, each region was modeled separately and the contributions of the partition and adsorption processes were determined. Finally, in order to estimate the impact of several mobile phase factors, the empirical models employing Box–Behnken design were established. Complete insight into retention behavior of the examined analytes was illustrated with 3D response surface plots.

In the final part of the dissertation the retention mechanisms and retention behavior of neutral analytes on the example of a model mixture of iohexol and its related substances

on two bare silica and two diol columns were thoroughly analyzed. Since on three out of four columns linear partition and adsorption theoretical models did not provide satisfactory approximation of the retention data, the modeling with nonlinear (quadratic) partition and mixed adsorption–partition models was attempted. On the basis of the obtained models the conclusions regarding the partition and adsorption contribution to the overall HILIC retention mechanism were drawn. One of the goals of this part of the research was also the creation of the empirical models that will enable the estimation of the effects of three quantitative mobile phase factors and one qualitative factor (column type) simultaneously on analytes' retention behavior. For that purpose D–optimal design was applied. On the basis of the obtained mathematical models the optimization of the separation of the components of the mixture was carried out. As the separation criterion selectivity factor of a critical peak pair was selected. However, direct modeling of this response yielded inadequate models. Therefore, indirect modeling of selectivity factor was performed. Final optimal conditions were identified using grid point search approach. In the end, the suggested HILIC method was subjected to validation for the analysis of iohexol and its related substances in the solutions for intravenous administration.

Holistic approach to the analysis of a chromatographic system described in this dissertation enabled the expanding of the conclusions to HILIC systems that were not investigated yet. Therefore, not only do these investigations render the significant scientific contribution to HILIC chromatography, but they also help setting up the basis that will simplify the planning of a research in this type of chromatography in the future.

Key words: hydrophilic interaction liquid chromatography, retention behavior, retention mechanisms, theoretical models, empirical models, chemometrics, experimental design, optimization

Research area: Pharmaceutical chemistry

Specific research area: Drug analysis

UDK 615.074:543.544:001.891.54(043.3)

1. TEČNA HROMATOGRAFIJA HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	1
1.1. PROBLEMI U ANALIZI VEOMA POLARNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI.....	2
1.2. PREDNOSTI TEČNE HROMATOGRAFIJE HIDROFILNIH INTERAKCIJA U ANALIZI VEOMA POLARNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	4
1.3. RETENCIONI MEHANIZMI U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	6
1.4. FAKTORI KOJI UTIČU NA RETENCIONO PONAŠANJE ANALITA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	7
1.4.1. STACIONARNE FAZE U HILIC SISTEMIMA.....	7
1.4.2. MOBILNE FAZE U HILIC SISTEMIMA.....	12
1.4.3. STRUKTURNE OSOBINE ANALITA U HILIC SISTEMIMA.....	16
1.5. PRIMENA TEČNE HROMATOGRAFIJE HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	16
2. TEORIJSKI MODELI U HROMATOGRAFIJI I I NJIHOVA PRIMENA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	18
2.1. PARTICIONI RETENCIONI MODEL.....	18
2.2. ADSORPCIONI (KOMPETITIVNI) RETENCIONI MODEL.....	21
2.3. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODEL.....	24
2.4. MEŠOVITI ADSORPCIONO–PARTICIONI RETENCIONI MODEL.....	25
2.5. JONOIZMENJIVAČKI RETENCIONI MODEL.....	26
3. HEMOMETRIJSKI PRISTUP TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA.....	31
3.1. ODABIR ISPITIVANIH FAKTORA I NJIHOVIH NIVOVA.....	32
3.2. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA I IZVOĐENJE EKSPERIMENATA.....	34
3.2.1. BOKS–BENKEN DIZAJN.....	35
3.2.2. D–OPTIMALNI DIZAJN.....	38
3.2.3. IZVOĐENJE EKSPERIMENATA.....	39

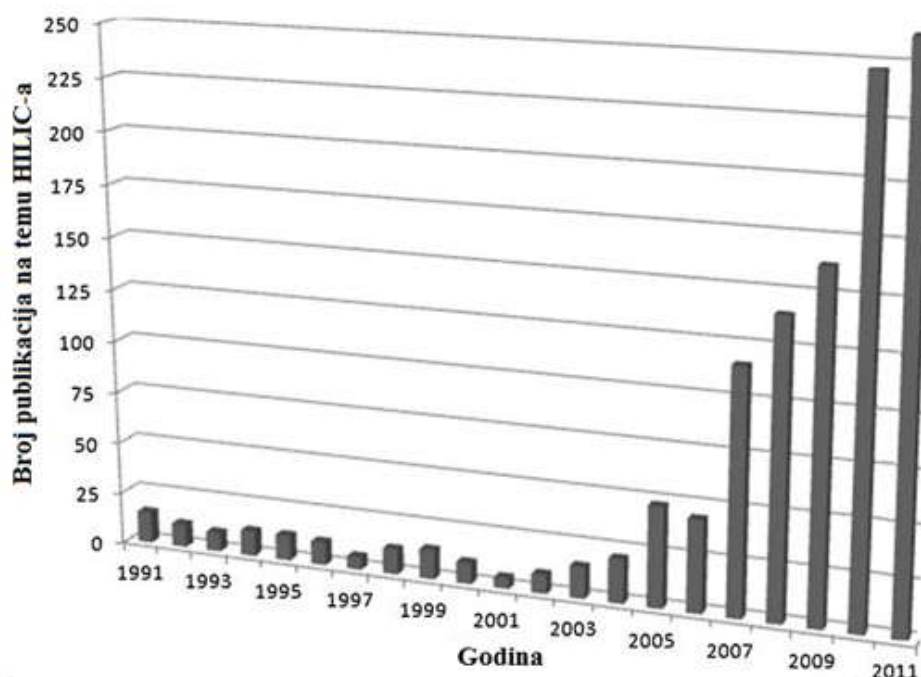
3.3. ODABIR HROMATOGRAFSKOG ODGOVORA.....	39
3.4. KREIRANJE EKSPERIMENTALNOG MODELA.....	40
3.5. OPTIMIZACIJA HROMATOGRAFSKE METODE.....	42
4. PREGLED LITERATURE.....	44
4.1. TEORIJSKI MODELI U HILIC SISTEMIMA.....	44
4.2. EKSPERIMENTALNI MODELI U HILIC SISTEMIMA.....	50
5. CILJ RADA.....	54
6. EKSPERIMENTALNI DEO.....	56
6.1. APARATI I REAGENCI.....	56
6.2. STANDARDNE SUPSTANCE.....	58
6.2.1. HEMIJSKA STRUKTURA ANALIZIRANIH SUPSTANCI.....	59
6.3. KOMPJUTERSKI PROGRAMI.....	70
6.4. ANALIZA β-LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA.....	71
6.5. ANALIZA ODABRANIH BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	74
6.5.1. TEORIJSKI MODELI.....	74
6.5.2. EKSPERIMENTALNI MODELI.....	75
6.6. ANALIZA FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI SA AMIDSKOM I SULFONAMIDSKOM FUNKCIONALNOM GRUPOM.....	78
6.6.1. TEORIJSKI MODELI.....	78
6.6.2. EKSPERIMENTALNI MODELI.....	80
6.7. ANALIZA JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI.....	83
6.7.1. TEORIJSKI MODELI.....	83
6.7.2. EKSPERIMENTALNI MODELI I OPTIMIZACIJA METODE.....	84
6.7.3. VALIDACIJA METODE.....	87

7. REZULTATI I DISKUSIJA.....	91
7.1. ANALIZA RETENCIONOG PONAŠANJA β-LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA U SILIKA KOLONI PRIMENOM BOKS-BENKEN DIZAJNA.....	91
7.1.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA.....	92
7.1.2. GRAĐENJE EKSPERIMENTALNIH MODELA I NJIHOVA STATISTIČKA PROCENA.....	94
7.1.3. VERIFIKACIJA KROZ EKSPERIMENTE KREIRANIH RETENCIONI MODELAMA.....	98
7.1.4. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA.....	101
7.1.5. UTICAJ STRUKTURNIH OSOBINA β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA NA NJIHOVO RETENCIONO PONAŠANJE I RETENCIONE MEHANIZME.....	108
7.2. TEORIJSKI I EKSPERIMENTALNI MODELI U ANALIZI RETENCIONOG PONAŠANJA I RETENCIONI MEHANIZAMA ODABRANIH BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	111
7.2.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA.....	112
7.2.2. KATJONSKO-IZMENJIVAČKI RETENCIONI MODELI.....	113
7.2.3. PARTICIONI I ADSORPCIONI RETENCIONI MODELI.....	117
7.2.4. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODELI.....	125
7.2.5. UTICAJ VRSTE KOLONE NA RETENCIONO PONAŠANJE BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	128
7.2.6. EKSPERIMENTALNI MODELI KREIRANI UZ POMOĆ HEMOMETRIJSKOG PRISTUPA.....	135
7.2.7. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	139
7.3. TEORIJSKI I EKSPERIMENTALNI MODELI U ANALIZI RETENCIONOG PONAŠANJA I RETENCIONI MEHANIZAMA KISELIH I NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U AMINO KOLONI.....	146
7.3.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA.....	147
7.3.2. ANJONSKO-IZMENJIVAČKI RETENCIONI MODELI.....	151
7.3.3. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODELI.....	158

7.3.4. MODELOVANJE HILIC I RP REGIONA PARTICIONIM I ADSORPCIONIM RETENCIONIM MODELIMA.....	161
7.3.5. EKSPERIMENTALNI MODELI KREIRANI UZ POMOĆ HEMOMETRIJSKOG PRISTUPA.....	164
7.3.6. VERIFIKACIJA KROZ EKSPERIMENTE KREIRANIH EKSPERIMENTALNIH MODELA.....	168
7.3.7. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE KISELIH I NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	171
7.3.8. UTICAJ STRUKTURNIH OSOBINA KISELIH I NEUTRALNIH ANALITA NA NJIHOVO RETENCIONO PONAŠANJE.....	178
7.4. ISPITIVANJE RETENCIONIH MEHANIZAMA I RAZVOJ HILIC METODE ZA ANALIZU JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI.....	180
7.4.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA.....	181
7.4.2. LINEARNI I NELINEARNI TEORIJSKI MODELI.....	182
7.4.3. UTICAJ VRSTE KOLONE NA RETENCIONO PONAŠANJE JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI.....	191
7.4.4. EKSPERIMENTALNI MODELI.....	197
7.4.5. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI.....	203
7.4.6. OPTIMIZACIJA HROMATOGRFSKOG RAZDVAJANJA ANALIZIRANE SMEŠE.....	205
7.4.7. VALIDACIJA HILIC METODE.....	209
8. ZAKLJUČAK.....	213
9. LITERATURA.....	216
10. PRILOZI.....	225
11. BIOGRAFIJA AUTORA.....	227

1. TEČNA HROMATOGRAFIJA HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) je alternativni tip hromatografije, u prošlosti poznat pod nazivom „Vodena normalno–fazna tečna hromatografija“. Tada se ovaj tip hromatografije najčešće koristio za analizu polarnih makromolekula, poput peptida, proteina i polisaharida [1]. Alpert i saradnici prvi put su upotrebili naziv tečna hromatografija hidrofilnih interakcija i od tog momenta ovaj pojam, a posebno akronim HILIC, prihvaćen je u upotrebi [2]. Danas, HILIC prolazi kroz novi period renesanse. Naime, od 2003. godine broj naučnih publikacija na ovu temu u značajnom je porastu (slika 1). Do ovoga je delimično došlo kao posledica novih primena HILIC metode, a posebno u analizi različitih tipova složenih uzoraka, kao i usled tendencije unapređenja teorijske osnove ovog tipa hromatografije [3].



Buszewski, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 231–247.

Slika 1. Broj publikacija na godišnjem nivou vezanih za HILIC u poslednjih 20 godina

1.1. PROBLEMI U ANALIZI VEOMA POLARNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI

Kada se kaže da je HILIC alternativni tip hromatografije, misli se na to da predstavlja veoma korisnu alternativu reversno–faznoj tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (eng. *Reversed–Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP–HPLC), danas najšire primenjivanoj metodi u farmaceutskoj analizi. Ako se uzme u obzir činjenica da je najveći procenat farmaceutski aktivnih supstanci nepolarnog karaktera, onda je sasvim logično da će takvi analiti ispoljiti zadovoljavajući afinitet prema nepolarnim stacionarnim fazama, kakve se koriste u reversno–faznim sistemima.

Znatno manji, ali nikako zanemarljivi, procenat farmaceutski aktivnih supstanci je polarnog karaktera. Takvi analiti pokazuju izuzetno slab afinitet prema stacionarnim fazama reversno–faznih sistema, stoga se eluiraju u tzv. „mrtvoj“ zapremini kolone. Drugim rečima, njihovo razdvajanje i analiza nisu izvodljivi. S druge strane, u normalno–faznoj tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (eng. *Normal–Phase High Performance Liquid Chromatography* – NP–HPLC), u kojoj se koriste polarne stacionarne faze, analiza polarnih farmaceutski aktivnih supstanci takođe je otežana. Naime, polarne supstance imaju veliki afinitet prema polarnim stacionarnim fazama normalno–faznih sistema, te se za njih snažno vezuju. Mobilne faze, koje predstavljaju smeše organskih rastvarača, su nepolarne i nemaju dovoljnu moć da eluiraju takve supstance sa površine stacionarne faze. Dodatno, polarne supstance slabo su rastvorljive u nepolarnim rastvaračima, poput heksana koji se veoma često koristi u NP–HPLC. Organski rastvarači koji se koriste u ovom tipu hromatografije su toksični i veoma nepovoljno utiču na životnu sredinu. Takođe, NP–HPLC metoda ne može biti kombinovana sa masenom spektrometrijom (eng. *Mass Spectrometry* – MS), jer heksan onemogućava proces jonizacije potreban u masenim detektorima sa elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* – ESI–MS) [1].

Problem slabog zadržavanja veoma polarnih molekula u RP–HPLC sistemima nastaje usled ostvarivanja polarnih interakcija (vodoničnih veza, dipol–dipol interakcija, i dr) između analita i polarne mobilne faze, koja predstavlja smešu vode i polarnog

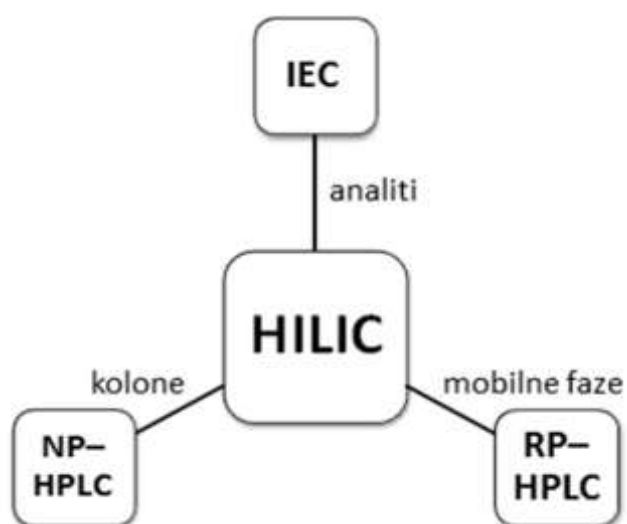
organskog rastvarača (najčešće acetonitrila ili metanola). Nasuprot tome, zbog odsustva polarnih grupa na površini stacionarne faze, polarne supstance bivaju eluirane sa kolone odmah nakon njihovog kontakta s mobilnom fazom. Velika polarnost ovih analita može poticati od funkcionalnih grupa koje pod odgovarajućim uslovima mogu da jonizuju i/ili od polarnih grupa koje mogu da grade dipol–dipol interakcije, vodonične veze i druge tipove polarnih interakcija [4].

U situaciji kada su naelektrisane grupe razlog slabog zadržavanja supstanci u RP–HPLC sistemima, često se pribegava sledećim načinima za otklanjanje ovakvog problema: jonoizmenjivačka hromatografija (eng. *Ion–Exchange Chromatography* – IEC) ili dodatak jon–par reagenasa u mobilnu fazu (npr. trifluorosirćetne kiseline ili natrijum–heptansulfonata). Iako se IEC može koristiti u analizi gotovo svih tipova naelektrisanih analita, jon–par reagensi su ipak u nešto široj upotrebi, jer su znatno jeftiniji i omogućavaju bolju efikasnost hromatografskog razdvajanja [1]. Njihovi osnovni nedostaci su: smanjenje intenziteta ESI–MS signala, značajno skraćanje „životnog veka“ kolone i dugačko vreme kondicioniranja kolone [5].

Možda i najproblematičniji tip analita u farmaceutskoj analizi su veoma polarne supstance koje ne sadrže funkcionalne grupe koje mogu jonizovati. Tradicionalni pristup rešavanju ovog problema je upotreba agenasa za derivatizaciju u cilju prevođenja datih analita u nepolarne molekule [6]. Međutim, u pojedinim slučajevima ovakva strategija može imati brojne nedostatke: hemijska reakcija derivatizacije analita s velikim brojem polarnih grupa pored željenog proizvoda, daje i sporedne proizvode; reakcija nije kvantitativna; u slučaju analita slične strukture, razdvajanje derivata može biti neadekvatno; proces derivatizacije neretko je vrlo zametan; itd. [1].

1.2. PREDNOSTI TEČNE HROMATOGRAFIJE HIDROFILNIH INTERAKCIJA U ANALIZI VEOMA POLARNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

Primenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija prevazilaze se brojni problemi prilikom hromatografske analize molekula polarnih karakteristika. Jedan od najznačajnijih razloga jeste činjenica da ova metoda nosi karakteristike tri postojeća tipa hromatografije [3]: NP–HPLC, RP–HPLC i IEC (slika 2). Razdvajanja u HILIC sistemima odvijaju se na polarnim i umereno polarnim stacionarnim fazama, što je takođe slučaj i sa NP–HPLC sistemima. Mobilne faze u HILIC sistemima sastoje se od smeše vode (ili vodenog rastvora pufera) i organskog rastvarača (najčešće acetonitril i metanol). Tip organskog rastvarača, vodeno–organski karakter mobilne faze, tip i raspon koncentracija pufera dodatog u vodenoj fazi su osobine po kojima su mobilne faze, koje se koriste u HILIC sistemima, slične onima u RP–HPLC sistemima. Jedina razlika je u odnosu između vodenog i organskog udela mobilne faze. U HILIC sistemima sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi gotovo da je uvek veći od 60 %, dok je u reversno–faznim sistemima ovaj sadržaj uglavnom znatno manji. U HILIC sistemima moguće je razdvajati i naelektrisane analite, tj. one koji se nalaze u jonizovanom obliku, što je inače osnovna karakteristika IEC [3].



Slika 2. Sličnost HILIC sistema i drugih tipova hromatografije

Uz osvrt na probleme u analizi veoma polarnih analita u hromatografskim sistemima pomenutih u prethodnom poglavlju, HILIC je našao veoma značajnu primenu u analizi kako naelektrisanih, tako i nenaelektrisanih polarnih analita bez potrebe za korišćenjem jon-par reagenasa ili derivatizacije. Oprema koja je neophodna za izvođenje HILIC separacija ne uključuje ništa drugo osim stacionarnih faza, rastvarača i reagenasa koji se inače koriste u normalno-faznim i reversno-faznim hromatografskim sistemima [1].

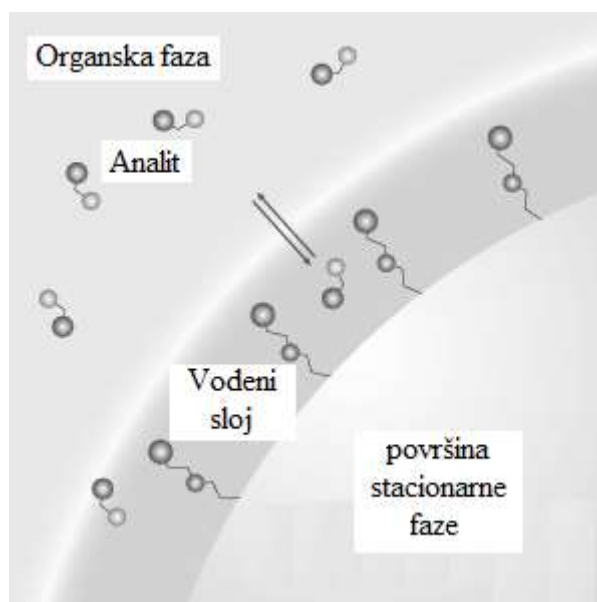
Zbog većeg procenta organskog rastvarača u mobilnoj fazi i posledično njenog manjeg viskoziteta u poređenju sa RP-HPLC, HILIC metoda pokazuje bolju moć razdvajanja, kao i mogućnost izvođenja separacija pod nižim pritiscima. Redosled eluiranja komponenti u HILIC sistemima je prema rastućoj polarnosti, što je obrnuto od redosleda eluiranja u reversno-faznim sistemima [7]. Ova ortogonalnost između HILIC i RP-HPLC sistema predstavlja osnovu za izvođenje spregnutih separacija. Primer za ovo predstavlja priprema uzorka polarnih analita metodom čvrsto tečne ekstrakcije (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE) na nepolarnim sorbensima, nakon čega se dobijeni eluat direktno može analizirati u HILIC sistemu. Ovakav pristup omogućava uštedu vremena i sprečava gubitke uzorka [1]. Takođe, moguće je izvršiti i spregu dva hromatografska sistema. Naime, česte su kombinacije HILIC i RP-HPLC sistema u cilju izvođenja 2D (dvodimenzionih) separacija. Na ovaj način omogućava se razdvajanje najrazličitijih analita u širokom rasponu polarnosti [3].

Još jedan od razloga za porast primenljivost ove metode je i njena kompatibilnost s masenim detektorom. Naime, usled velikog sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi, u procesu elektrosprej jonizacije dolazi do brzog i lakog isparavanja uzorka. Na ovaj način postiže se čak i desetostruko povećanje osetljivosti signala, u poređenju sa RP-HPLC [3].

1.3. RETENCIONI MEHANIZMI U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

U poslednjih nekoliko godina uloženo je mnogo napora u teorijsko razjašnjavanje retencionih mehanizama razdvajanja u HILIC sistemima. Zahvaljujući tome, u literaturi se može naći značajan broj radova na tu temu. Ipak, najveće istraživačke grupe u ovoj oblasti još uvek se nisu usaglasile niti oko dominantnog procesa u retencionom mehanizmu, niti oko teorijske osnove koja bi mogla da opiše i predvidi ove procese [8, 9].

Retencioni mehanizam u HILIC sistemima prvobitno je predložio Alpert [2]. Ovaj mehanizam podrazumevao je prvobitnu adsorpciju vodenog dela mobilne faze na površinu polarne stacionarne faze i stvaranja tankog nepokretnog vodenog sloja na njenoj površini, nakon čega se analit raspodeljuje između tog vodenog sloja i ostatka mobilne faze. Mehanizam raspodele ilustrovan je na slici 3.



Slika 3. Alpertov predloženi mehanizam raspodele u HILIC sistemu [2]

Međutim, danas se u literaturi može naći i veliki broj dokaza koji sa velikom sigurnošću ukazuju i na prisustvo procesa direktne adsorpcije analita na površinu stacionarne faze, kao i procesa jonske izmene naelektrisanih analita sa površinski naelektrisanim grupama stacionarne faze u HILIC retencionom mehanizmu. Na taj način došlo se do zaključka da brojne interakcije mogu igrati važnu ulogu prilikom hromatografskog razdvajanja u ovom tipu hromatografije: vodonične veze, elektrostatičke interakcije, dipol–dipol interakcije, a ponekad čak i hidrofobne interakcije [3].

1.4. FAKTORI KOJI UTIČU NA RETENCIONO PONAŠANJE ANALITA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Zbog izuzetno složenog retencionog mehanizma, veliki broj faktora utiče na relativan udeo zastupljenosti procesa raspodele, adsorpcije i/ili jonske izmene, a samim tim i na retenciono ponašanje različitih tipova analita u HILIC sistemima [7]. Ovi faktori mogu biti grubo podeljeni u tri grupe: tip stacionarne faze, sastav mobilne faze i karakteristike analita. Temperatura kolone takođe utiče na retenciono ponašanje analita u HILIC sistemima [10], ali je stepen tog uticaja u poređenju sa prethodno navedenim grupama faktora izuzetno mali. Iz tog razloga nije detaljnije obrađivan u daljem tekstu.

1.4.1. STACIONARNE FAZE U HILIC SISTEMIMA

Prvobitne separacije u HILIC sistemima prvenstveno su se sprovodile na silikagel kolonama i aminopropil modifikacijama silikagel kolona. Broj različitih tipova polarnih grupa kojima su modifikovane površine silikagel kolona vremenom je rastao i tako su u upotrebu ušle, pored pomenutih, i amidne, cijano, diolne, polietilenglikolne, polisukcinimidne, ciklodekstrinske, polipeptidne, cviterjonske i druge kolone. Ova veza se najčešće uspostavlja preko kratkih alkil lanaca. Na ovaj način dobijene su umereno polarne stacionarne faze i prvobitno su bile namenjene za hromatografiju reversnih faza uz korišćenje mobilnih faza s velikim sadržajem vode. Međutim, za mnoge od njih ustanovljeno je da se s podjednakom efikasnošću ove kolone mogu koristiti i u HILIC sistemima uz korišćenje mobilnih faza s velikim procentom organskog rastvarača. Vremenom se otišlo i dalje, u smislu prilagođavanja karakteristika ovih kolona za

primenu samo u HILIC sistemima, ali i u smislu modifikacije površine silikagel kolona novim grupama. Vezane grupe na površini silike često mogu obrazovati polimernu mrežu različite debljine u koju se može inkorporirati vodeni sloj, čime se favorizuje proces raspodele. Hemijski modifikovane stacionarne faze ne mogu se smatrati elektroneutralnim, pa čak ni u situacijama kada se derivatizuju neutralnim grupama. Naime, one na svojim površinama uvek sadrže rezidualne silanolne podložne jonizaciji [7].

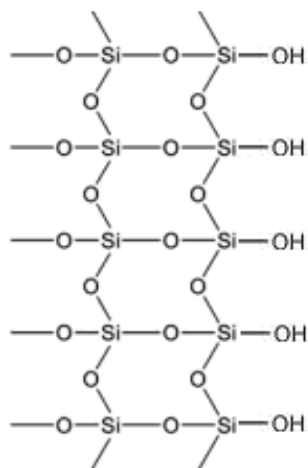
U poslednjih nekoliko godina veliki broj kiselih, baznih, neutralnih i amfoternih analita razdvajan je na nekim od ovih stacionarnih faza u HILIC sistemima. Kako se na različitim tipovima kolona postiže različito retenciono ponašanje, kao i selektivnost različitih polarnih analita, tako je odabirom adekvatne kolone moguće znatno skratiti postavljanje odgovarajuće HILIC metode.

Silikagel kolone

Na površini silikagel kolona (u daljem tekstu silika) prisutne su slobodne silanolne grupe. Njihova struktura prikazana je na slici 4. S obzirom da je vodeni deo mobilne faze u bliskom kontaktu s površinom silike, pri pH vrednostima mobilne faze višim od 4,0 ili 5,0 dolazi do disocijacije silanolnih grupa ($pK_a \approx 4,0$) [11] i formiranja negativnog naelektrisanja na njenoj površini. Time dolazi i do favorizovanja procesa jonske izmene. U skladu s tim, pozitivno naelektrisana polarna jedinjenja, usled elektrostatičkog privlačenja, pokazuju povećano zadržavanje. Negativno naelektrisana polarna jedinjenja, usled elektrostatičkog odbijanja, pokazuju smanjeno zadržavanje u koloni. Iz ovoga sledi da silika kolone imaju veći afinitet za bazna jedinjenja, nego za kisela [3].

Naravno, treba napomenuti i da kolone istog tipa, a od različitih proizvođača pokazuju značajne razlike u zadržavanju analita, efikasnosti razdvajanja i obliku pikova, a što je posledica kvaliteta silike i tehnološkog procesa proizvodnje. Zbog velike reaktivnosti, glavni nedostatak silika kolona jeste pojava nesimetričnih pikova, pa čak i ireverzibilne adsorpcije analita na površini stacionarne faze. Površinski porozne silika kolone,

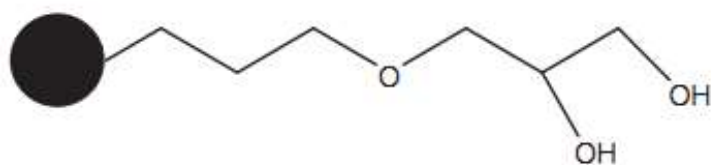
dobijene korišćenjem tehnologije fuzionisanih jezgara (eng. *Fused-Core Technology*), dizajnirane su tako da obezbede izvođenje brzih separacija i prevazilaženje problema ireverzibilne adsorpcije analita [7].



Slika 4. Silikagel stacionarna faza

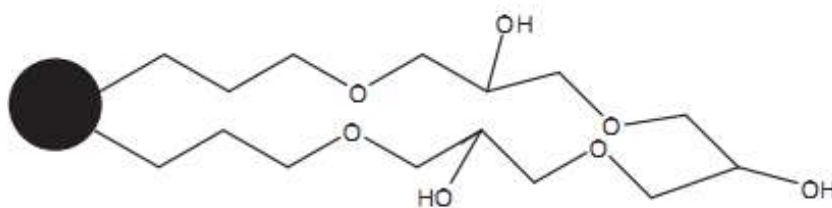
Diolne modifikacije silikagel kolona

Diolne modifikacije silike sadrže neutralne hidrofilne 2,3-dihidroksipropil ligande na svojoj površini (slika 5). Diolne stacionarne faze našle su značajnu primenu u HILIC sistemima zbog prisustva polarnih dihidroksilnih grupa na svojoj površini, koje su odgovorne za građenje vodoničnih veza. U tom smislu, ovaj tip kolona sličan je nederivatizovanim silikagel kolonama. Međutim, za razliku od silanolnih grupa na površini nederivatizovanih silika stacionarnih faza, hidroksilne grupe na površini diolnih stacionarnih faza ne mogu da jonizuju, tako da je kod ovih kolona prevaziđen problem ireverzibilne adsorpcije analita. Zbog svoje dvojne prirode, usled prisustva nepolarnog propil lanca i polarne diolne grupe, u ovom tipu kolona moguće je razdvajati analite mešovitim HILIC/RP retencionim mehanizmom. U kiseljoj sredini dolazi do postepenog „otkidanja“ grupa sa diolnih stacionarnih faza i gubitka njihovih karakteristika [7].



Slika 5. Diolna modifikacija silikagel stacionarne faze

Unakrsno povezane diolne stacionarne faze (slika 6) dobijene su unakrsnim povezivanjem diolnih grupa preko etarskih mostova, pri čemu je formiran polimerni sloj na površini silike. U poređenju sa konvencionalnim diolnim silikama, ovakve stacionarne faze izrazito su stabilne na reakcije hidrolize, favorizuju hidrofobne interakcije, daju bolju simetriju pikova, kao i veće vrednosti faktora rezolucije [12].



Slika 6. Unakrsno povezana diolna modifikacija silikagel stacionarne faze

Cijanopropil modifikacije silikagel kolona

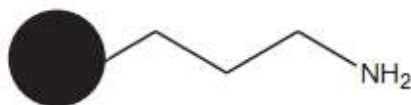
Za razliku od NP hromatografije, gde je upotreba cijanopropil kolona široko rasprostranjena, njihova primena u HILIC separacijama je do sada prilično ograničena [10]. Struktura cijanopropil stacionarnih faza (slika 7) podrazumeva prisustvo cijano grupa vezanih preko propil lanaca za površinu silike. Cijano grupe nemaju sposobnost građenja vodoničnih veza, što ih čini slabo polarnim. Kao posledica toga, javlja se slabo zadržavanje polarnih analita na ovakvom tipu stacionarnih faza, pa je uspešnost izvođenja separacija na cijanopropil kolonama zabeležena samo u nekim slučajevima [7].



Slika 7. Cijanopropil modifikacija silikagel stacionarne faze

Aminopropil modifikacije silikagel kolona

Hemijski modifikovane silika kolone koje na svojoj površini imaju primarne amino grupe (slika 8) su najstariji tip amino stacionarnih faza koje se i dalje koriste za razdvajanje npr. šećera, aminokiselina, peptida, karboksilnih kiselina i nukleotida u HILIC sistemima. Aminopropil silike pokazuju afinitet i prema polarnim farmaceutski aktivnim supstancama s kiselim osobinama zbog svoje pozitivno naelektrisane površine u rasponu pH mobilnih faza koje se koriste u HILIC separacijama. Smatra se da proces jonske izmene značajno doprinosi ukupnom retencionom mehanizmu kiselih analita [7].



Slika 8. Aminopropil modifikacija silikagel stacionarne faze

Problemi do kojih dolazi prilikom razdvajanja u ovim kolonama su neophodno dugačko vreme kondicioniranja kolona, asimetrični pikovi, ireverzibilna adsorpcija analita i "otkidanje" grupa s površine kolona. Takođe, primarne amino grupe su reaktivne (npr. formiranje Šifovih baza sa aldehidima), što može dovesti do poteškoća prilikom razdvajanja šećera [7].

Ostali tipovi hemijski modifikovanih silikagel kolona

Amidne modifikacije silika kolona dobijaju se vezivanjem karbamoil ili amidne funkcionalne grupe za površinu silikagela preko kratkog alkil lanca. Za razliku od nederivatizovanih silika kolona, kod amidnih kolona se izuzetno retko javlja problem ireverzibilne adsorpcije analita, zbog čega su one stabilne u toku dugog vremenskog

perioda. Ovaj tip stacionarnih faza najšire je upotrebljavan prilikom razdvajanja peptida u HILIC sistemima [7].

Ciklodekstrinske silika kolone najčešće se dobijaju imobilizacijom odgovarajućeg ciklodekstrina na površini silike. Vreme zadržavanja komponenata u ovakvim sistemima povećava se s povećanjem broja monosaharidnih jedinica u strukturi ciklodekstrina, što se pre dovodi u vezu sa interakcijom s vodenim slojem adsorbovanim na površini stacionarne faze, nego sa penetracijom analita u šupljinu zarubljene kupe molekula ciklodekstrina. Ovaj tip kolona našao je primenu u analizi monosaharida i oligosaharida do 8 monosaharidnih jedinica u HILIC sistemima [7].

Cviterjonske stacionarne faze nedavno su počele da se primenjuju u HILIC sistemima. Prva sintetisana stacionarna faza ovog tipa je sulfoalkilbetainska stacionarna faza čiji se aktivni sloj sastoji od jako kisele sulfonske kiseline i jako bazne kvaternerne amonijum grupe koje su razdvojene kratkim alkil lancem. Pošto se dve suprotno naelektrisane grupe nalaze u molskom odnosu 1:1, na površini sulfoalkilbetainske kolone nalazi se veoma slabo ukupno negativno naelektrisanje. To je posledica veće udaljenosti sulfonske grupe od površine silikagela u odnosu na kvaternernu amonijum grupu. Smatra se da površinske grupe snažno adsorbuju vodu na površinu kolone, što doprinosi dominaciji procesa raspodele u retencionom mehanizmu [7].

Do sada su sintetisani i brojni drugi tipovi hemijski modifikovanih slika kolona, s ciljem da se omogući izvođenje HILIC separacija odabranih analita. Naime, prema strukturnim osobinama tih analita podešavane su i karakteristike površine stacionarne faze. Kao rezultat toga, optimalno razdvajanje smeše postizano je za najkraće vreme [7, 12].

1.4.2. MOBILNE FAZE U HILIC SISTEMIMA

Mobilne faze u HILIC sistemima predstavljaju smeše vode i organskog rastvarača. U vodeni deo mobilne faze često se dodaje neka so u određenoj koncentraciji, nakon čega se pH vrednost vodene faze podešava odgovarajućom kiselinom. Može se identifikovati veliki broj faktora mobilne faze koji bi potencijalno mogao da utiče na retenciono

ponašanje i razdvajanje analita: tip i sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi, tip i koncentracija soli u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze.

Uticaj organskog rastvarača

Kao što je već ranije rečeno, mobilne faze u HILIC sistemima sadrže preko 60 % organskog rastvarača i manje od 40 % vode, odnosno vodenog rastvora pufera. Međutim, adekvatno razdvajanje analita najčešće se postiže tek pri sadržajima organskog rastvarača većim od 80 %. Kako su vodonične veze u velikoj meri uključene u HILIC retencioni mehanizam, tako je odabir odgovarajućeg organskog rastvarača jedan od ključnih koraka za postizanje adekvatnog razdvajanja komponenti. Organski rastvarači koji mogu ući u sastav mobilnih faza dele se na polarne protične (npr. metanol, etanol, izopropanol) i aprotične (npr. acetonitril, tetrahidrofuran). Polarni protični rastvarači mogu biti i donori i akceptori vodoničnih veza, dok aprotični rastvarači mogu biti samo akceptori vodoničnih veza. Usled velikog potencijala da grade vodonične veze, polarni protični rastvarači takmiče se s molekulima vode za površinu stacionarne faze. Na taj način narušava se integritet vodenog sloja čineći površinu stacionarne faze znatno hidrofobnijom, što dovodi do brzog eluiranja analita. Ovo nije slučaj sa aprotičnim rastvaračima [10]. Dakle, kako raste polarnost organskog rastvarača, a time i sposobnost učestvovanja u proton–donorskim i proton–akceptorskim interakcijama, tako raste i njegova eluaciona moć (acetonitril < tetrahidrofuran < 2-propanol < etanol < metanol) [7]. Kada je u pitanju uticaj sadržaja organskog rastvarača, opšte pravilo u HILIC sistemima jeste da se, s povećanjem sadržaja organskog rastvarača, a time i smanjenjem polarnosti mobilne faze, produžava zadržavanje polarnih analita [11].

Od navedenih rastvarača acetonitril je najpogodni i najčešće korišćen rastvarač u HILIC postupcima razdvajanja jer, u poređenju sa ostalima, jedini omogućava postizanje odgovarajućeg zadržavanja analita u koloni i simetričnog oblika pikova. Najslabije osobine pokazuje metanol koji je najpolarniji od pomenutih rastvarača i u tom smislu je nasličniji vodi. Pošto acetonitril gotovo da uopšte ne stupa u interakcije s površinom stacionarne faze, smatra se idealnim organskim rastvaračem za HILIC, tako da su se

dosadašnji brojni napori da se on zameni manje toksičnim rastvaračem završili neuspješno [7].

Uticaj soli

Dodatak soli u mobilne faze namenjene HILIC separacijama gotovo da je neizbežan. Kada se naelektrisani analiti razdvajaju na površinski naelektrisanim stacionarnim fazama (silika, amino, ali i na ostalim elektroneutralnim stacionarnim fazama zbog rezidualnih silanolnih grupa), soli se dodaju u cilju kontrole elektrostatičkih interakcija [11]. Najčešće do sada korišćene soli bile su amonijum-acetat i amonijum-formijat, mada se u literaturi mogu sresti i amonijum-citrat i amonijum-bikarbonat. Uticaj koncentracije soli na retenciono ponašanje analita može biti različit, a prevashodno zavisi od naelektrisanja površine stacionarne faze i naelektrisanja analita. Mogu se izdvojiti tri izolovana slučaja:

- 1) elektrostatičko privlačenje,
- 2) elektrostatičko odbijanje,
- 3) odsustvo elektrostatičke interakcije.

U slučajevima kada su površina stacionarne faze i analit suprotno naelektrisani (npr. bazni analiti na silika koloni, kiseli analiti na amino koloni, itd), u retencioni mehanizam uključeno je elektrostatičko privlačenje ili proces jonske izmene [3, 7]. Naelektrisani joni dodatog pufera takmiče se sa analitom za vezivanje za suprotno naelektrisanu površinu stacionarne faze. Na taj način, povećanje koncentracije dodate soli u mobilnu fazu skraćuje zadržavanje analita u ovakvom tipu HILIC sistema.

U obrnutom slučaju, kada površina stacionarne faze i analit nose isto naelektrisanje (npr. bazni analiti na amino koloni, kiseli analiti na silika koloni, itd), na površini kolone zastupljen je proces elektrostatičkog odbijanja (eng. *Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography* – ERLIC) [13]. Naelektrisani joni dodatog pufera neutrališu naelektrisanje na površini stacionarne faze i time smanjuju

elektrostatičko odbijanje s molekulima analita. Zbog toga, povećanje koncentracije soli u mobilnoj fazi produžava njihovo zadržavanje.

Prilikom razdvajanja neutralnih analita u HILIC sistemima, elektrostatička interakcija nije uključena u retencioni mehanizam. Međutim, dodatak soli u ovakvim slučajevima ipak utiče na produženo zadržavanje neutralnih analita. Postoje dve teorije koje objašnjavaju ovaj fenomen. Prva se zasniva na efektu isoljavanja (eng. *Salting-out effect*) [7] koji podrazumeva da povećana koncentracija soli u mobilnoj fazi pospešuje građenje vodoničnih veza između analita i površinskih grupa stacionarne faze. Prema drugoj teoriji, promena koncentracije dodate soli utiče na debljinu vodenog sloja adsorbovanog na površinu stacionarne faze, što posebno dolazi do izražaja u mobilnim fazama s velikim sadržajem organskog rastvarača [3, 11, 12]. Naime, povećanje koncentracije soli u mobilnoj fazi dovodi do povećanja debljine tog sloja i obratno.

Najčešće korišćene koncentracije soli u HILIC sistemima su u rasponu od 5 mmol L⁻¹ do 100 mmol L⁻¹, izraženo na ukupnu mobilnu fazu. U cilju dobijanja bolje reproduktivnosti rezultata i oblika pikova, preporučuje se da koncentracija pufera u HILIC sistemima nikad ne bude manja od 5 mmol L⁻¹. Kada je elektrostatička interakcija uključena u retencioni mehanizam, koncentracija pufera mora biti znatno veća [11].

Uticaj pH

Primarni efekat promene pH vrednosti mobilne faze odražava se na oblik u kojem će analit s prisutnim jonizacionim centrom u strukturi biti zastupljen. Najčešće se pH podešava na taj način da analiti budu prisutni u jonizovanom obliku, jer im se na taj način povećava hidrofilnost, a samim tim i produžava zadržavanje u HILIC sistemima [11]. Međutim, ono što je još bitnije je da pH bude takav da analiti postoje samo u jednom obliku (jonizovanom ili nejonizovanom) da bi se izbegla pojava širenja, nepravilnog oblika ili cepanja pikova [3].

Najveći broj HILIC separacija izvodi se u pH opsegu 3,0 – 8,0 a najčešće kiseline kojima se podešava pH su mravlja i sirćetna kiselina usled njihove kompatibilnosti sa MS detektorom [11]. Veliki broj kolona s površinskim naelektrisanjem otporan je na varijacije pH u opsegu 3,0–8,0 (npr. amino, cviterjonske i dr). Međutim, izuzetak su nederivatizovane silika kolone. Naime, pri pH vrednostima većim od 4,0–5,0 silanolne grupe podležu jonizaciji, formirajući negativno naelektrisanje na svojoj površini. Slična pojava dešava se i sa hemijski modifikovanim silika kolonama, mada u manjem stepenu, usled prisustva rezidualnih silanolnih grupa. Kao posledica toga, povećanje pH vrednosti mobilne faze dovodi do drastičnog povećanja zadržavanja baznih komponenti u slika kolonama [3, 12].

1.4.3. STRUKTURNE OSOBINE ANALITA U HILIC SISTEMIMA

U HILIC sistemima važi opšte pravilo da se zadržavanje supstanci u koloni povećava s povećanjem polarnosti analita [7]. Iako ne postoji univerzalna definicija polarnosti, sasvim je očigledno da različite interakcije doprinose ukupnom polarnom karakteru analita: dipol–dipol, proton–donor, proton–akceptor, π – π elektronske i elektrostatičke interakcije. Strategija odnosa kvantitativne strukture i retencionog ponašanja (eng. *Quantitative Structure–Retention Relationships – QSRR*), uspešno su iskorišćeni da kvantitativno opišu strukturne doprinose zadržavanju analita, prvobitno u RP [14], a kasnije i u HILIC sistemima [15]. Najšire primenjivani tip QSRR modela su odnosi linearne solvatacione energije (eng. *Linear Solvation Energy Relationships – LSER*) [16]. Ovaj pristup pretpostavlja postojanje linearne zavisnosti između retencionog faktora i strukturnih molekulskih deskriptora koji opisuju različite karakteristike koje utiču na zadržavanje analita u koloni. Na taj način, obezbeđuje se kompletan uvid u procese uključene u reticioni mehanizam odgovarajućeg HILIC sistema.

1.5. PRIMENA TEČNE HROMATOGRAFIJE HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Još u prošlosti primećen je potencijal HILIC metode u analizi polarnih molekula velike molekulske mase, poput peptida, polisaharida i proteina, stoga je njena primena u glikomici i proteomici poznata već dvadesetak godina [1]. Primarna prednost HILIC

metode danas, u odnosu na ostale, jeste mogućnost analize polarnih molekula male molekulske mase, kakvi su neke farmaceutski aktivne supstance. Zbog toga je njen praktični značaj u farmaceutskoj analizi sve veći. U prilog tome govori i činjenica da je u poslednjih 10 godina broj razvijenih HILIC metoda, namenjen za analizu brojnih farmaceutski aktivnih supstanci, u značajnom porastu [17].

Pored farmaceutski aktivnih supstanci, brojni drugi tipovi polarnih molekula mogu biti analizirani u HILIC sistemima. Do sada, to je bio slučaj sa nukleozidima, nukleotidima, aminokiselinama, peptidima, proteinima, monosaharidima, oligosaharidima, polisaharidima, alkaloidima, glukozinolatima, saponinima, fosforilisanim ugljenim hidratima, metabolitima, nekim neorganskim jonima, itd. Dakle, pored farmaceutske analize, HILIC metoda pokazuje izuzetan potencijal i u sledećim oblastima: medicini, poljoprivredi, hemiji hrane, toksikologiji, bioanalitici, farmakokinetici, istraživanju i razvoju novog leka, proteomici, glikomici, metabolomici, itd [18, 19].

Značajno je imati u vidu i činjenicu da je najveći broj metabolita polarnog karaktera. S druge strane, mogućnost sprege HILIC sistema sa masenim detektorom obezbeđuje veliku osetljivost ove metode uz mogućnost određivanja veoma malih koncentracija analita. Stoga se HILIC sve više koristi za praćenje metabolita, ali i samih polarnih farmaceutski aktivnih supstanci u biološkom materijalu. Dodatni motiv za ovakvu vrstu primene jeste i jednostavna priprema uzorka biološkog materijala [17].

Mogućnost sprege HILIC sistema sa različitim tipovima detektora, poput ultravioletnog (UV), *diode array* (DAD), fluorescentnog, refraktometrijskog, masenog i dr, dodatno proširuje spektar primene ove metode.

2. TEORIJSKI MODELI U HROMATOGRAFIJI I I NJIHOVA PRIMENA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Teorijski modeli u hromatografiji zasnovani su na termodinamičkim konceptima. Njihov cilj je da precizno opišu separacioni proces definišući mehanizme. Međutim, usled nedostatka teorijskog znanja o molekulskim parametrima inkorporiranim u modele, nisu se pokazali korisnim u praktičnom smislu, tj. prilikom razvoja hromatografskih metoda [20]. Usled složenog retencionog mehanizma, ni fundamentalna osnova HILIC hromatografije, kao ni retencioni mehanizmi, još uvek nisu sasvim rasvetljeni. Stoga se brojni pokušaji da se ovo postigne, uz korišćenje prethodno ustanovljenih teorijskih modela karakterističnih za druge tipove hromatografije, mogu pronaći u literaturi. U opštem slučaju, teorijski modeli mogu biti od koristi u:

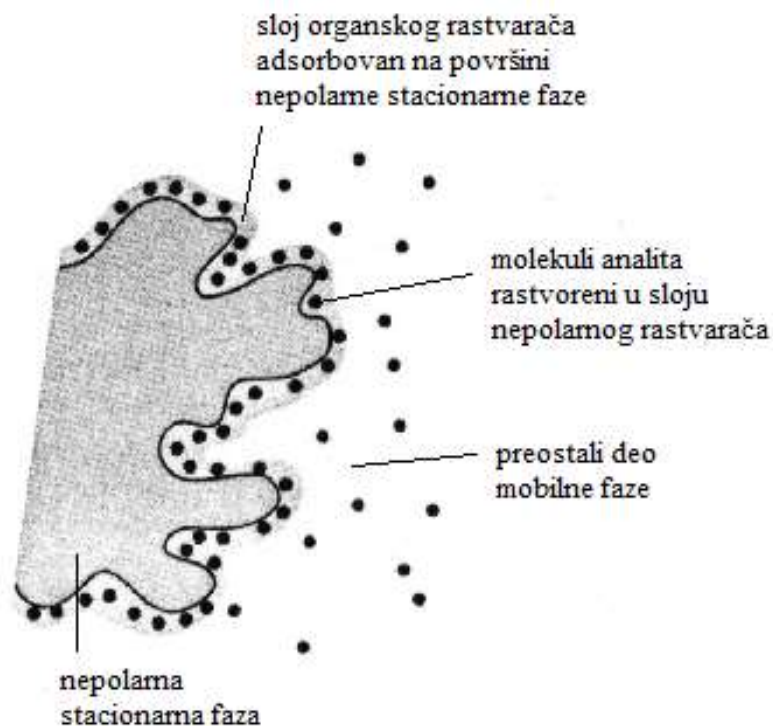
- 1) produblivanju znanja o retencionim mehanizmima,
- 2) predviđanju retencionog ponašanja,
- 3) kvantifikaciji uticaja pojedinačnih faktora mobilne faze na retenciono ponašanje i stepena separacije analita.

U ovom poglavlju biće predstavljeni teorijski modeli koji opisuju normalno–faznu, reversno–faznu i jonoizmenjivačku hromatografiju, uključujući i njihovu fundamentalnu osnovu. Takođe, biće opisani i načini na koje su dati modeli izmenjeni u cilju njihovog prilagođavanja HILIC sistemima.

2.1. PARTICIONI RETENCIONI MODEL

Postoje brojni teorijski modeli koji opisuju retencioni mehanizam u RP–HPLC sistemima. Jedan od opšte prihvaćenih modela jeste particioni model, odnosno model koji podrazumeva raspodelu molekula analita između mobilne i stacionarne faze usled različitih tipova molekulskih interakcija koje nastaju između njih. Proces raspodele prikazan je na slici 9 i odvija se u tri stupnja [20]:

- 1) formiranje „šupljina“ u stacionarnoj fazi,
- 2) transfer molekula analita iz mobilne faze u „šupljine“,
- 3) zatvaranje šupljina unutar mobilne faze koje su nastale usled transfera molekula analita.



Slika 9. Ilustrovani prikaz procesa raspodele u RP–HPLC sistemima

Mobilnu fazu u RP–HPLC sistemimu čini smeša vode i nekog organskog rastvarača i ona je kao takva polarnija od nepolarne stacionarne faze (najčešće C_8 i C_{18}). Kao posledica velike kohezione energije vode, kao i njene sposobnosti da gradi vodonične veze, polarniji analiti se brže eluiraju od manje polarnih. S druge strane, s povećanjem sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi, usled smanjivanja njene polarnosti, povećava se njena eluaciona moć. Particioni model predlaže kvadratnu zavisnost između logaritma retencionog faktora i sastava mobilne faze u širokom opsegu odnosa organskog i vodenog dela mobilne faze [21, 22]:

$$\log k = \log k_0 + a \varphi + b \varphi^2 \quad (1)$$

gde je k retencioni faktor analita, k_0 ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini samo voda, φ zapreminska frakcija organskog rastvarača u mobilnoj fazi, dok su a i b regresioni koeficijenti dobijeni fitovanjem eksperimentalnih podataka u polinom drugog reda.

U dovoljno uskom opsegu odnosa organskog i vodenog dela mobilne faze, kvadratna zavisnost može se aproksimirati linearnom funkcijom i to na sledeći način:

$$\log k = \log k_0 - m \varphi \quad (2)$$

gde je m nagib prave dobijen fitovanjem eksperimentalnih podataka u linearni model.

Nagib m linearnog modela često je u literaturi označavan kao S -vrednost i upotrebljavan kao mera eluacione moći organskog rastvarača. Naime, ranije se pretpostavljalo da promene u sastavu mobilne faze ne utiču na samu stacionarnu fazu, što bi dovelo do toga da je dobijena S -vrednost linearnog modela proporcionalna promeni slobodne energije transfera analita iz vodene u organsku fazu i ne zavisi od osobina stacionarne faze. Međutim, dokazano je da su S -vrednosti slične samo za analite male molekulske mase, a u svim ostalim slučajevima ove vrednosti variraju u zavisnosti od strukture analita. Naime, S -vrednosti imaju tendenciju da se povećavaju pri povećanju molekulske mase i smanjenju polarnosti analita. Kao posledica toga, S -vrednost može se smatrati samo semikvantitativnim deskriptorom eluacione moći rastvarača [20].

Ako se uzme u obzir činjenica da je zadržavanje analita u HILIC sistemima proporcionalno njihovoj polarnosti, a obrnuto proporcionalno polarnosti mobilne faze (suprotno RP sistemima), kao i da mobilnu fazu takođe čini smeša organskog rastvarača i vode (odnosno vodenog rastvora pufera), prethodno izvedeni kvadratni i linearni model mogu se primeniti u identičnom obliku i u HILIC hromatografiji. Jedino, u tom slučaju φ predstavlja zapreminsku frakciju vode (ili vodenog rastvora pufera) u mobilnoj fazi, dok k_0 predstavlja ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj

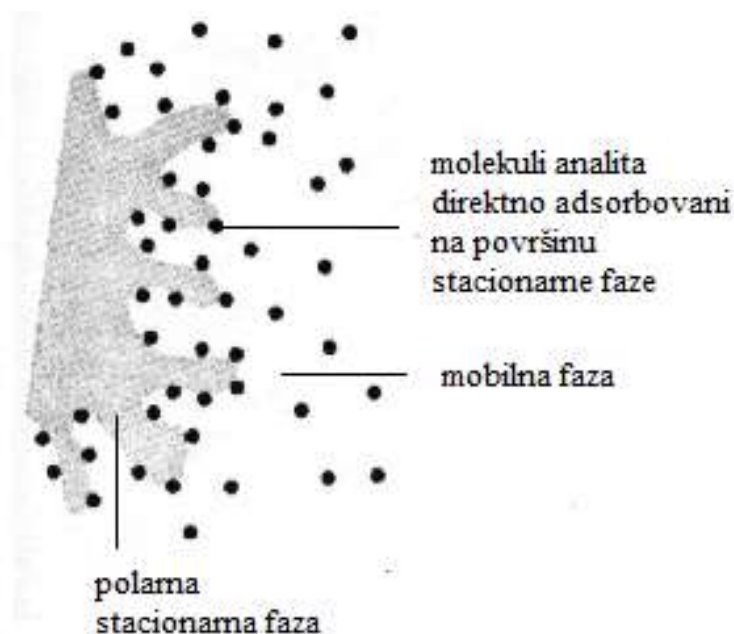
mobilnoj fazi koju čini čist organski rastvarač. U slučaju dobrog fitovanja retencionih podataka u jednačinu (2) dobijaju se linearni $\log k/\varphi$ grafici [23].

2.2. ADSORPCIONI (KOMPETITIVNI) RETENCIONI MODEL

Adsorpcioni (kompetitivni) model, u literaturi još poznat i pod nazivom Snajder–Sočevinski (eng. *Snyder – Soczewinski*) model, utemeljen je na principima tečno–čvrste hromatografije (eng. *Liquid – Solid Chromatography*). Ovaj model uspešno je primenjen na NP–HPLC sisteme, u kojima se smatra da je u retencionom mehanizmu dominantan proces lokalizovane adsorpcije [7, 20]. Adsorpcioni model pretpostavlja da je čitava površina stacionarne faze prekrivena monoslojem kojeg sačinjavaju molekuli analita i mobilne faze. Tokom procesa hromatografskog razdvajanja, koncentracija analita je veoma mala, dok se u adsorbovanom monosloju uglavnom nalaze molekuli mobilne faze. Da bi se određena zapremina analita zadržala na površini stacionarne faze, mora s nje biti uklonjena ekvivalentna zapremina mobilne faze. Eluiranje analita s kolone odvija se suprotnim redosledom. Prema tome, ovaj proces je povratan i može biti predstavljen na sledeći način:



gde X predstavlja molekule analita, S molekule rastvarača, s i m u indeksu označavaju molekule na površini stacionarne, odnosno u mobilnoj fazi, dok n predstavlja broj molekula rastvarača koje zamenjuje jedan molekul analita [20]. Proces adsorpcije prikazan je na slici 10.



Slika 10. Ilustrovani prikaz procesa adsorpcije u NP–HPLC sistemima

Mobilnu fazu u NP–HPLC sistemu čini smeša nepolarnog i polarnog organskog rastvarača i manje je polarna od polarnih i umereno polarnih stacionarnih faza (silika, diolne, amino, cijano i dr) na kojima se najčešće izvodi proces razdvajanja. Uzevši u obzir pretpostavke da je površina stacionarne faze energetski homogena i da se interakcije između molekula analita i mobilne faze potpuno poništavaju novonastalim interakcijama između molekula analita i stacionarne faze, linearna zavisnost između logaritma retencionog faktora i logaritma sastava mobilne faze može biti uspostavljena, i to na sledeći način [24, 25]:

$$\log k = \log k_0 - (As/n) \log N \quad (4)$$

ili u jednostavnijem obliku:

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \quad (5)$$

gde je k retencioni faktor analita, k_0 ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini čist polarni organski rastvarač, As poprečni presek

molekula analita, n poprečni presek molekula polarnog organskog rastvarača, N molska frakcija polarnog organskog rastvarača, m regresioni koeficijent koji karakteriše broj molekula rastvarača koji zamenjuju jedan molekul adsorbovanog analita na površini stacionarne faze, a φ zapreminska frakcija polarnog organskog rastvarača.

Jedina razlika između NP–HPLC sistema i HILIC sistema jeste što je polarni organski rastvarač u mobilnoj fazi zamenjen vodom. Samim tim, ako se primeni prethodno izvedeni linearni model u HILIC hromatografiji, φ postaje zapreminska frakcija vode (ili vodenog rastvora pufera), dok k_0 postaje ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini samo voda (ili vodeni rastvor pufera). U slučaju dobrog fitovanja retencionih podataka u jednačinu (5) dobijaju se linearni $\log k/\log \varphi$ grafici [7].

Proces adsorpcije analita u HILIC hromatografiji može biti uzrokovan [3]:

1. elektrostatičkim interakcijama,
2. hemijskim (vodonične veze) i fizičkim (dipol–dipol, jon–dipol i dr) interakcijama.

U slučaju da su obe grupe interakcija zastupljene u HILIC retencionom mehanizmu, nije moguće jednačinama (4) i (5) razgraničiti koji je pravi uzrok adsorpcije. S obzirom da će u nastavku biti razmatrani jonoizmenjivački retencioni modeli, koji kvantifikuju doprinos procesa jonske izmene u celokupnom HILIC retencionom mehanizmu, da ne bi došlo do pogrešnih tumačenja mehanizama, pojam adsorpcija biće raščlanjen na dva pojma:

- 1) adsorpcija u širem smislu (obuhvata sve tipove interakcija),
- 2) adsorpcija u užem smislu (obuhvata hemijske i fizičke interakcije uz odsustvo jonske komponente).

2.3. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODEL

Na hemijski modifikovanim polarnim slikagel stacionarnim fazama, na kojima su preko kratkih alkil lanaca vezane polarne grupe, često je zastupljen dvojni HILIC/RP retencioni mehanizam. Naime, analiti učestvuju istovremeno u solvofobnim interakcijama s kratkim alkil nizovima i u polarnim interakcijama s polarnim hemijski vezanim grupama, kao i rezidualnim silanolnim grupama na površini ovih tipova stacionarnih faza [7]. Ako se uzme u obzir činjenica da osnovnu razliku između NP i RP hromatografije čini relativan odnos polarosti između stacionarne i mobilne faze, ispitivanjem širokog opsega odnosa vodenog i organskog dela u mobilnoj fazi moguće je odrediti doprinos RP i HILIC retencionih mehanizama ukupnom zadržavanju analita u hromatografskoj koloni [26]. U prisustvu dvojnog HILIC/RP retencionog mehanizma zavisnost između logaritma retencionog faktora i zapreminske frakcije vodenog dela mobilne faze je u obliku latiničnog slova „U“, pri čemu sastav mobilne faze koji odgovara minimumu date funkcije predstavlja prelaz između RP i HILIC mehanizma. To konkretno znači da u mobilnim fazama u kojima je veliki sadržaj vode, RP retencioni mehanizam preovlađuje usled dominacije solvofobnih interakcija u odnosu na polarne interakcije. Kako se sadržaj organskog rastvarača povećava, tako se zadržavanje analita skraćuje, dok se ne dostigne minimum, kada se ostvaruje prelaz iz RP u HILIC retencioni mehanizam. Nakon toga, daljim povećavanjem sadržaja organskog rastvarača, polarne interakcije postepeno nadvladavaju solvofobne, odnosno HILIC retencioni mehanizam postaje sve dominantniji. Kao posledica toga, zadržavanje analita se sve više produžava. Veliki broj analita pokazuje izuzetno slabo zadržavanje na prelazu između dva retencionna mehanizma [23, 27].

Uz pretpostavku da HILIC i RP retencioni mehanizmi aditivno doprinose energiji retencije na polarnim hemijski modifikovanim polarnim slikagel stacionarnim fazama, dvojni HILIC/RP retencioni mehanizam može biti predstavljen na sledeći način [28, 29]:

$$\log k = \psi_1 \log k_1 + \psi_2 \log k_2 \quad (6)$$

gde su: ψ_1 i ψ_2 relativni udeli doprinosa RP, odnosno HILIC mehanizma ukupnoj energiji retencije, i zavise od sastava mobilne faze, polarnosti analita i tipa stacionarne faze; k ukupni retencioni faktor analita; k_1 i k_2 retencioni faktori analita koji potiču od RP, odnosno HILIC retencionog mehanizma.

Kombinovanjem ove jednačine s jednačinama (2) i (5) u cilju dobijanja kvantitativne zavisnosti između retencionog faktora i sastava mobilne faze u širokom opsegu odnosa organskog i vodenog dela mobilne faze dobija se sledeći izraz [30]:

$$\log k = a + m_1 \varphi - m_2 \log \varphi \quad (7)$$

gde je: φ zapreminska frakcija vode (ili vodenog rastvora pufera) u mobilnoj fazi; m_1 regresioni koeficijent koji karakteriše uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na doprinos RP retencionog mehanizma celokupnom procesu razdvajanja; m_2 regresioni koeficijent koji karakteriše uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na doprinos HILIC retencionog mehanizma celokupnom procesu razdvajanja; a empirijska konstanta.

Jednačina (7) omogućava ne samo predviđanje retencionog ponašanja analita u širokom opsegu sastava mobilne faze, nego i izračunavanje φ_{\min} , odnosno sastava mobilne faze pri kojoj dolazi do prelaza iz RP u HILIC retencioni mehanizam. Naime, koristeći regresione koeficijente m_1 i m_2 eksperimentalno dobijenog dvojnog HILIC/RP retencionog modela odgovarajućeg analita na određenoj koloni, moguće je izračunati minimum date funkcije, i to na sledeći način [30]:

$$\varphi_{\min} = m_2 / (2,301 m_1) \quad (8)$$

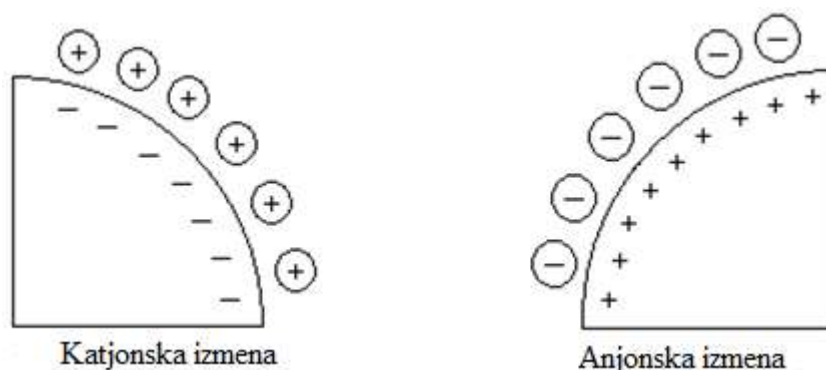
2.4. MEŠOVITI ADSORPCIONO–PARTICIONI RETENCIONI MODEL

Veoma je čest slučaj da se ispitivanjem uticaja različitih odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze na retencione faktore različitih analita na različitim kolonama dobijaju nelinearne $\log k/\varphi$ i $\log k/\log \varphi$ zavisnosti. Dakle, u takvim slučajevima ni jednačina (2) ni jednačina (5) ne mogu adekvatno opisati dati sistem. Za rešavanje ovog

problema Liang (eng. *Liang*) i saradnici predložili su jednačinu (7), odnosno onu koja je kreirana u cilju opisivanja dvojnog HILIC/RP retencionog modela [31]. Naime, kako ova jednačina sadrži i linearan i logaritamski član, smatra se da ona predstavlja sintezu adsorpcionog i particionog retencionog modela. Ideja za korišćenje ovakvog modela proistekla je iz pretpostavke da se debljina vodenog sloja na površini polarnih stacionarnih faza u HILIC sistemima menja u zavisnosti od odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze, pa se u skladu s tim menja i doprinos procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu.

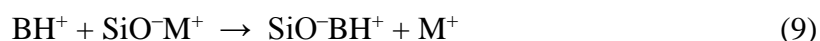
2.5. JONOIZMENJIVAČKI RETENCIONI MODEL

Jonoizmenjivački retencioni modeli opisuju retenciono ponašanje analita u jonizovanom obliku na površinski naelektrisanim stacionarnim fazama. Ovakav tip hromatografije naziva se jonoizmenjivačka hromatografija. Glavni retencioni mehanizam u ovom tipu hromatografije jeste ostvarivanje elektrostatičke interakcije između odgovarajućeg analita i naelektrisanih grupa na površini stacionarne faze. Elektrostatička interakcija može biti privlačna ili odbojna, u zavisnosti od naelektrisanja analita i površine stacionarne faze. Kako se kiseli, bazni i amfoterni analiti mogu analizirati na velikom broju polarnih stacionarnih faza s površinskim naelektrisanjem, procesi katjonske ili anjonske izmene često su deo ukupnog HILIC retencionog mehanizma [1, 32]. Ovi procesi grafički su prikazani na slici 11.



Slika 11. Ilustrovani prikaz katjonske i anjonske izmene u jonoizmenjivačkoj hromatografiji

Temelji retencionog mehanizma katjonske izmene baznih analita na silikagel kolonama pod tzv. „pseudoreversno–faznim uslovima“ postavljeni su još pre četvrt veka [33]. Prema njima, pod analiziranim uslovima, bazni analiti nalaze se u svojoj katjonskoj formi, dok su površinske silanolne grupe silika kolone u svojoj anjonskoj formi. U mobilnu fazu dodaje se i odgovarajuća so, koja u rastvoru daje suprotno naelektrisan jon u odnosu na površinu stacionarne faze. Sa ovim jonima, molekuli analita učestvuju u procesu katjonske izmene. Ovaj proces može biti prikazan na sledeći način:

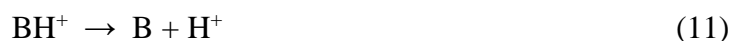


gde SiO^- predstavlja naelektrisane silanolne grupe na površini stacionarne faze, BH^+ jonizovani oblik baznog analita, dok je M^+ suprotno naelektrisani jon.

Konstanta ravnoteže procesa katjonske izmene, K_{ix} , dobija se na sledeći način:

$$K_{ix} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+][\text{M}^+]}{[\text{BH}^+][\text{SiO}^- \text{M}^+]} \quad (10)$$

Koncentracija jonizovanog oblika analita BH^+ zavisi od pH vrednosti mobilne faze.



Stoga, jednačina za izračunavanje konstante disocijacije, K_a , glasi:

$$K_a = \frac{[\text{B}][\text{H}^+]}{[\text{BH}^+]} \quad (12)$$

Ako se uzme u obzir činjenica da samo jonizovani oblik analita BH^+ stupa u interakciju s površinom negativno naelektrisane stacionarne faze, koeficijent distribucije između stacionarne i mobilne faze, D_{ix} , može se izvesti na sledeći način:

$$D_{ix} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{[\text{BH}^+] + [\text{B}]} \quad (13)$$

Preuređivanjem jednačine (12) dobija se:

$$[\text{B}] = \frac{K_a [\text{BH}^+]}{[\text{H}^+]} \quad (14)$$

Preuređivanjem jednačine (10) dobija se:

$$[\text{BH}^+] = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+][\text{M}^+]}{K_{ix} [\text{SiO}^- \text{M}^+]} \quad (15)$$

Zamenom člana [B] iz jednačine (14) s jednačinu (13) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{[\text{BH}^+] + \frac{K_a [\text{BH}^+]}{[\text{H}^+]}} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{[\text{BH}^+](1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]})} \quad (16)$$

Zamenom člana [BH⁺] iz jednačine (15) u jednačinu (16) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{\frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+][\text{M}^+]}{K_{ix} [\text{SiO}^- \text{M}^+]}} \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}\right) \quad (17)$$

Sređivanjem jednačine (17) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{K_{ix} [\text{SiO}^- \text{M}^+]}{[\text{M}^+]} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}\right)} \quad (18)$$

Pošto je koeficijent distribucije D_{ix} direktno proporcionalan retencionom faktoru odgovarajućeg analita, jednačinom (18) kompletno je opisan proces katjonske izmene, odnosno dolazi se do zaključka da je retencioni faktor analita obrnuto proporcionalan koncentraciji dodatog suprotno naelektrisanog jona [33]. Ova zavisnost predstavljena je jednačinom (19):

$$k = m (1/[C]) + a \quad (19)$$

gde je k retencioni faktor ispitivanog analita, $[C]$ koncentracija dodate soli, m nagib prave dobijen fitovanjem eksperimentalnih podataka u linearni model, a a odsečak. U slučaju da je u retencionom mehanizmu isključivo prisutan proces katjonske izmene, zavisnost retencionog faktora od inverzne vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona (odnosno dodate soli) biće prava linija, pri čemu će njen odsečak prolaziti kroz koordinatni početak, a njen nagib biće proporcionalan konstanti ravnoteže jonske izmene i broju dostupnih jonizovanih mesta na površini stacionarne faze (što zavisi od pH vrednosti mobilne faze i pK_a vrednosti funkcionalnih grupa na površini stacionarne faze). Kao što je već pomenuto u poglavlju 2.2, proces jonske izmene može se podvesti pod mehanizam adsorpcije, pošto podrazumeva direktnu interakciju analita i površine stacionarne faze. Prisustvo nekog dodatnog procesa u retencionom mehanizmu (npr. raspodele ili adsorpcije u užem smislu) uslovljavaće odsečak na ordinati, odnosno vrednost k prikazane jednačinom (19).

Jednačina (19) takođe može biti prikazana kao klasična zavisnost logaritma retencionog faktora analita od logaritma koncentracije dodate soli karakteristične za jonoizmenjivačku hromatografiju [34]:

$$\log k = -s \log [C] + a \quad (20)$$

gde je k retencioni faktor ispitivanog analita, $[C]$ koncentracija dodate soli, a odsečak, dok je s koeficijent koji zavisi od naelektrisanja analita i suprotno naelektrisanog jona. Ovaj koeficijent predstavlja odnos naelektrisanja analita i suprotno naelektrisanog jona prisutnog u mobilnoj fazi. Stoga, povećanje naelektrisanja suprotno naelektrisanog jona

u mobilnoj fazi dovodi do smanjenog zadržavanja analita, dok smanjenje koncentracije ovog jona dovodi do suprotnog efekta [20]. U slučaju da analit i suprotno naelektrisani jon imaju jedinično naelektrisanje, nagib zavisnosti logaritma retencionog faktora datog analita i logaritma koncentracije suprotno naelektrisanog jona trebalo bi da bude -1 . U suprotonom, u retencioni mehanizam uključeni su dodatni procesi.

Jednačine (19) i (20) mogu biti primenjene analogno i na proces anjonske izmene, s obzirom da su, i u tom slučaju, površina stacionarne faze i analiti suprotno naelektrisani. Međutim, u dosadašnjoj literaturi proces anjonske izmene u HILIC sistemima nije matematički formulisan.

3. HEMOMETRIJSKI PRISTUP TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Hemometrijski pristup tečnoj hromatografiji omogućava građenje empirijskih (eksperimentalnih) modela. Njihova značajna prednost u odnosu na teorijske modele je što uzimaju u obzir istovremeni uticaj većeg broja faktora na ispitivani odgovor sistema. U osnovi hemometrijskog pristupa nalazi se metodologija eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE). Ona podrazumeva izvođenje minimalnog broja eksperimenata na sistematičan i pažljivo isplaniran način, što omogućava dobijanje maksimalnog broja korisnih informacija vezanih za ispitivani sistem, kao i značajnu uštedu reagenasa i vremena neophodnog za izvođenje eksperimenata [35].

Iako do sada u literaturi nema velikog broja radova u kojima je hemometrijski pristup primenjen u HILIC sistemima, nesumnjivo je da bi on mogao značajno da doprinese unapređenju ove hromatografske tehnike [8]. Ako se pođe od činjenice da HILIC sisteme karakteriše složen retencioni mehanizam, onda bi potencijalno veliki broj faktora mogao uticati na retenciono ponašanje i stepen separacije odgovarajućih analita. Upravo se eksperimentalni modeli, kreirani uz pomoć metodologije eksperimentalnog dizajna, nameću kao potencijalno rešenje za kompletan opis ovako složenih sistema. Značaj eksperimentalnih modela ogleda se u tome što oni omogućavaju [36]:

- 1) ispitivanje uticaja većeg broja faktora i njihovih interakcija na ispitivani odgovor sistema,
- 2) predviđanje retencionog ponašanja analita u okviru ispitanog eksperimentalnog prostora,
- 3) konstruisanje površine odgovora sistema što olakšava vizuelni prikaz retencionog ponašanja,
- 4) optimizaciju hromatografskog razdvajanja smeša i razvoj odgovarajuće hromatografske metode,
- 5) dobijanje kvalitativnih podataka koji mogu posredno dovesti do dodatnih zaključaka vezanih za retencione mehanizme, ali u tom smislu nisu pouzdani kao teorijski modeli.

3.1. ODABIR ISPITIVANIH FAKTORA I NJIHOVIH NIVOA

Prvi korak u građenju eksperimentalnih modela u hromatografskim sistemima je odabir ispitivanih faktora. Faktori mogu biti podeljeni u tri grupe: instrumentalni (protok mobilne faze, talasna dužina detekcije, tip kolone, dimenzije kolone), fizički (pritisak, temperatura kolone) i hemijski (tip i koncentracija pufera, tip i sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH vrednost mobilne faze) [37]. Navedeni hemijski faktori, tip kolone, a u pojedinim slučajevima i temperatura kolone nemaju predvidiv uticaj na retenciono ponašanje i razdvajanje analiziranih komponenti u HILIC sistemima. Neki od ovih faktora mogu se ispostaviti kao značajni za konkretan hromatografski sistem, pa primena hemometrijskog pristupa može biti od izuzetne koristi u kvantifikaciji tih uticaja, kao i prilikom razvoja odgovarajuće HILIC metode. Kada su u pitanju faktori, poput brzine protoka mobilne faze, pritiska i talasne dužine detekcije, oni uglavnom imaju predvidiv uticaj na prethodno pomenute odgovore, stoga se oni retko kada ispituju.

Mada, koliko god da se primenom hemometrijskog pristupa značajno smanjuje broj neophodnih eksperimenata, broj potencijalno značajnih faktora za odgovarajući hromatografski sistem i dalje je veliki. Kako bi se broj eksperimenata sveo na najrazumniji mogući, potrebno je da se izvrši adekvatna selekcija ispitivanih faktora. Ovo podrazumeva izvođenje preliminarnih ispitivanja u kojima se nakon određenog broja izvedenih eksperimenata identifikuju potencijalno značajni faktori. Takođe, ovo je moguće postići i primenom skrining dizajna, poput punog faktorskog, frakcionog faktorskog ili Plaket–Burmanovog (eng. *Plackett–Burman*) dizajna. Na ovaj način se, uz izvođenje malog broja eksperimenata, mogu identifikovati statistički značajni faktori [8].

Kada je u pitanju izbor nivoa prethodno odabranih faktora, od velikog je značaja iskustvo analitičara. Poželjno je da odabrani opseg vrednosti odgovarajućeg faktora bude adekvatne širine. Preuski intervali bi mogli dovesti do situacije da promena datog faktora ne dovodi do značajnije promene odgovora sistema koji se prati. Samim tim sprovođenje celokupnog procesa neće omogućiti izvođenje značajnijih zaključaka, a

reagensi i vreme biće neracionalno utrošeni. Kako se najveći broj zavisnosti u hromatografiji aproksimira jednostavnijim funkcijama (linearnim i kvadratnim), preširoki intervali faktora mogli bi dovesti do složenijih tipova zavisnosti ispitivanih odgovora od odabranih faktora. U takvim situacijama, s linearnom i kvadratnom funkcijom ne bi se postigla neophodna aproksimacija, što bi se ustanovilo kroz statističku analizu dobijenih eksperimentalnih modela. Odabir odgovarajuće širine opsega ispitivanih faktora je jedan od kritičnih koraka u metodologiji eksperimentalnog dizajna, stoga, bilo da su odabrani preuski ili preširoki opsezi ispitivanih faktora, neophodno je ponoviti celokupnu eksperimentalnu proceduru nakon što je izvršena njihova korekcija [38].

Pošto je u HILIC sistemima sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi obično faktor koji ispoljava najveći uticaj na retenciono ponašanje analita, posebno se mora voditi računa o definisanju raspona ispitivanih vrednosti ovog faktora. Naime, čak naizgled i uski intervali ovog faktora mogu se ispostaviti na kraju kao preširoki. Zbog toga je neophodno pažljivo i detaljno izvesti preliminarna ispitivanja i na taj način obezbediti dovoljno eksperimentalnih podataka na osnovu kojih će biti moguće pravilno definisati opseg sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi.

U HILIC sistemima treba posebno voditi računa i o izboru opsega pH vrednosti mobilne faze u slučaju razdvajanja analita sa jonizacionim centrima na naelektrisanim tipovima kolona (silika, amino, i dr). U zavisnosti od pH vrednosti mobilne faze, ovakvi tipovi analita mogu se naći u različitim oblicima. Broj i zastupljenost tih oblika na odgovarajućoj pH vrednosti mobilne faze zavisi od broja jonizacionih centara u strukturi molekula analita i njihove pK_a vrednosti. Zbog toga, prilikom definisanja intervala pH vrednosti mobilne faze poželjno bi bilo da on ne uključuje pK_a vrednost nijednog jonizacionog centra, jer se na pH vrednostima oko pK_a vrednosti odgovarajuće grupe ona može naći u dva oblika (jonizovanom i nejonizovanom). Usled značajne razlike u polarnosti između jonizovanih i nejonizovanih oblika analita, oni mogu imati različito hromatografsko ponašanje, što se na hromatogramu može uočiti kao loša simetrija ili cepanje pika ili pojava većeg broja pikova [12].

3.2. ODABIR EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA I IZVOĐENJE EKSPERIMENATA

Kao što je već prethodno rečeno, najveći broj zavisnosti u hromatografskim sistemima može se aproksimirati linearnom i kvadratnom funkcijom. Za kreiranje linearnih modela neophodno je izvesti eksperimente na dva različita nivoa za svaki faktor koji se ispituje. S druge strane, za dobijanje kvadratnih modela faktore je potrebno ispitati na tri različita nivoa. Kako je kvadratna funkcija složenija u poređenju sa linearnom, uvek se polazi od pretpostavke da je zavisnost ispitivanog odgovora od ispitivanih faktora kvadratnog tipa. Pošto hemometrijski pristup u svojoj osnovi podrazumeva istovremenu promenu većeg broja faktora, onda i broj neophodnih eksperimenata značajno raste i jednak je broju mogućih kombinacija faktorskih nivoa svih ispitivanih faktora. Drugim rečima, ako se broj ispitivanih faktora označi sa n , onda bi broj potrebnih eksperimenata bio 3^n . Predstavljanjem svih kombinacija faktorskih nivoa za 2, 3, 4, ... faktora dobila bi se matrica od 9, 27, 81, ... eksperimenata. Ovaj tip dizajna naziva se pun faktorski dizajn na tri nivoa i spada u tzv. optimizacione dizajne ili dizajne površine odgovora [39].

Dizajni površine odgovora omogućavaju građenje eksperimentalnih modela kojima se ispitivani sistem u potpunosti može opisati. Drugim rečima, odgovor sistema može se predvideti i u tačkama eksperimentalnog prostora u kojima eksperimenti nisu bili prethodno izvedeni. Ovaj pristup takođe omogućava grafičko predstavljanje zavisnosti praćenog odgovora sistema od jednog ili više ispitivanih faktora, pa je u skladu s tim i celokupna metodologija dobila naziv metodologija površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology* – RSM). Na ovaj način moguće je identifikovati uslove sa optimalnim odgovorima sistema. Stoga je ovaj pristup od izuzetno velike važnosti u optimizaciji hromatografskih metoda u procesu njihovog razvoja [40].

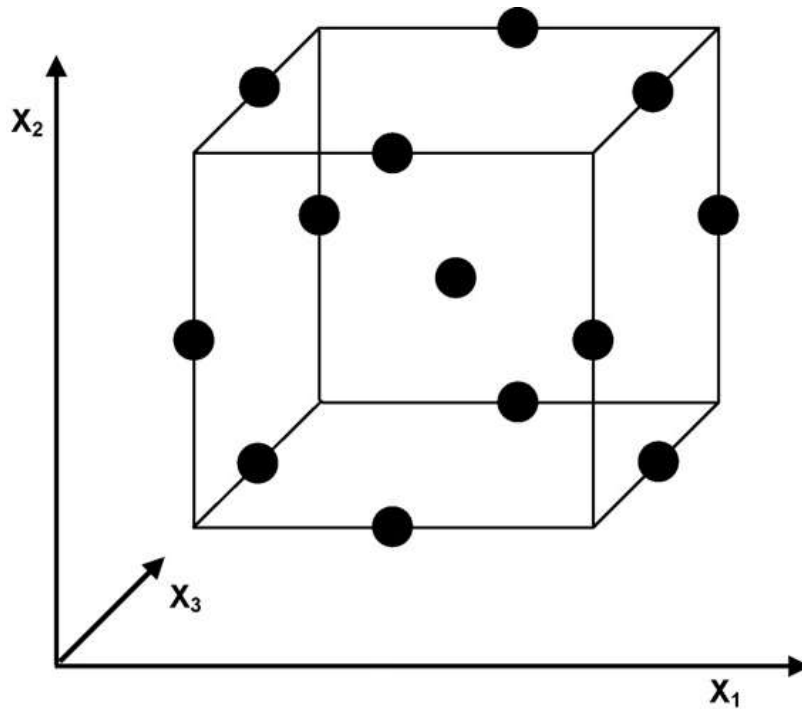
U dizajne površine odgovora spadaju i: centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central Composite Design* – CCD), Boks–Benken dizajn (eng. *Box–Behnken Design* – BBD), Delert dizajn (eng. *Doehlert*), D–optimalni dizajn, itd. Svaki od navedenih dizajna, u poređenju sa punim faktorskim dizajnom na tri nivoa, zahteva izvođenje manjeg broja eksperimenata. Izbor tipa optimizacionog dizajna prevashodno zavisi od: vrste i broja

ispitivanih faktora, ograničenja vezana za intervale variranja faktora, broja neophodnih eksperimenata, itd. [41].

U nastavku će detaljnije biti opisani Boks–Benken i D–optimalni dizajn jer su oni primenjeni u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.2.1. BOKS–BENKEN DIZAJN

Boks–Benken dizajn spada u klasu faktorskih optimizacionih dizajna. U ovaj tip dizajna uključene su neke od tačaka iz eksperimentalnog prostora 3^n punog faktorskog dizajna raspoređene na karakterističan način. Eksperimentalni prostor za tri ispitivana faktora može biti predstavljen u vidu kocke, pri čemu svaka dimenzija predstavlja odgovarajući faktor. Temena takve kocke odgovaraju kodiranim vrednostima odgovarajućeg faktora na donjem (-1) i gornjem ($+1$) nivou, dok sredine tih stranica odgovaraju nultom (0) nivou. Prema tome Boks–Benken dizajn za tri faktora obuhvata faktorske kombinacije koje odgovaraju svim stranicama kocke i replikacije u centralnoj tački (slika 12) [42].



Slika 12. Faktorske kombinacije Boks–Benken dizajna za 3 faktora

Broj potrebnih eksperimenata (N) prema matrici BBD dobija se pomoću sledeće jednačine:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (21)$$

gde je k broj ispitivanih faktora, a C_0 broj eksperimenata u centralnoj tački. Matrica BBD za tri ispitivana faktora prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Matrica BBD za tri faktora predstavljena u kodiranim vrednostima

Broj Eksperimenta	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Efikasnost eksperimentalnog dizajna predstavlja količnik između broja koeficijenata koje je potrebno proceniti u predloženom modelu i broja eksperimenata. U poređenju sa drugim tipovima dizajna, BBD se može smatrati jednim od najefikasnijih, jer zahteva izvođenje manjeg broja eksperimenata u odnosu na CCD i pun faktorski dizajn, a obezbeđuje jednako pouzdane rezultate.

Prednost BBD, u odnosu na druge tipove dizajna, ogleda se i u tome da ne sadrži faktorske kombinacije koje podrazumevaju sve ispitivane faktore istovremeno na svojim gornjim i donjim nivoima. Stoga je BBD izuzetno koristan u situacijama kada postoji mogućnost dobijanja neprihvatljivih rezultata pri ekstremnim vrednostima ispitivanih faktora. S druge strane, nije preporučljivo da se ovaj dizajn upotrebljava kada je podatak o odgovoru sistema u ekstremnim vrednostima ispitivanih faktora od istraživačkog značaja [42].

3.2.2. D-OPTIMALNI DIZAJN

Kako je prethodno navedeno, najšire korišćeni dizajni površine odgovora su simetrični i tu spadaju: pun faktorski dizajn, CCD, BBD i Delertov dizajn. U ovakvim tipovima dizajna tačke u okviru eksperimentalnog prostora simetrično su raspoređene. Samim tim, oni ispunjavaju kriterijum D-optimalnosti. To znači da modeli izgrađeni na osnovu matrice eksperimenata simetričnog dizajna, sa podjednako dobrom tačnošću, mogu predviđati vrednost praćenog odgovora sistema u bilo kojoj tački eksperimentalnog prostora. To se odnosi i na tačke u kojima eksperimenti nisu bili prethodno izvedeni. Međutim, simetrični dizajni nisu uvek pogodni za korišćenje, pa je koncept D-optimalnosti primenjen u cilju procene mogućnosti predviđanja vrednosti ispitivanog odgovora nesimetričnih tipova dizajna. Nesimetrični tip dizajna, koji ispunjava navedeni kriterijum, jeste tzv. D-optimalni dizajn [43].

Primena D-optimalnog dizajna izuzetno je korisna kada eksperimentalni prostor nije pravilnog oblika, kada je broj eksperimenata pretpostavljen matricom klasičnog simetričnog dizajna neprihvatljivo veliki i kada postoji osnovana pretpostavka da zavisnost praćenog odgovora od jednog ili više ispitivanih faktora ne može biti aproksimirana linearnom ili kvadratnom funkcijom. Pored toga, od posebnog je značaja upotreba D-optimalnog dizajna u slučaju kada je neophodno ispitati i uticaje kvalitativnih faktora na ispitivani odgovor. Možda i najznačajnija prednost ovog tipa dizajna ogleda se u činjenici da on omogućava istraživaču da pre izvođenja eksperimenata definiše matematički model. Na ovaj način istraživač može da unapred isključi koeficijente modela koji se odnose na odgovarajuće interakcije i/ili kvadratne članove, a za koje je, na osnovu prethodnog teorijskog znanja ili iskustva, ustanovio da nisu značajni. Na ovaj način, direktno se smanjuje broj neophodnih eksperimenata koje je potrebno izvesti, a samim tim smanjuju se i troškovi istraživanja. Dodatno, sloboda kreiranja modela omogućava istraživaču da doda novi član u odgovarajući model ako postoji verovatnoća da je pretpostavljena zavisnost trećeg ili višeg reda [43].

3.2.3. IZVOĐENJE EKSPERIMENATA

Nakon definisanja eksperimentalnog plana pristupa se randomiziranom izvođenju eksperimenata. Prilikom hromatografskog razdvajanja složenih smeša neophodno je voditi računa o tome da se pravilno identifikuju pikovi na hromatogramu. Ako se u ovu svrhu koriste maseni detektori, kompletan proces može se odvijati automatski. Naime, identifikacija pikova može se vršiti nakon svih izvedenih eksperimenata. Međutim, kod aparata opremljenih UV/VIS detektorom preklapanje pikova može značajno usporiti dinamiku izvođenja eksperimenata, jer je u takvim situacijama neophodno pojedinačno injektovanje analita pod datim hromatografskim uslovima kako bi se definitivno odredile pozicije interferirajućih pikova na hromatogramu.

3.3. ODABIR HROMATOGRFSKOG ODGOVORA

Nakon izvedenih eksperimenata predviđenih matricom odgovarajućeg eksperimenatalnog dizajna pristupa se analizi dobijenih hromatograma. Pozicija individualnog pika na hromatogramu može se pratiti odgovarajućim hromatografskim odgovorima [44]:

- 1) retenciono vreme: t_r
- 2) redukovano retenciono vreme: t_r'
- 3) retencioni faktor: k

Pored ovih parametara takođe je značajno pratiti i razdvajanje susednih pikova. Najjednostavniji parametar za praćenje razdvajanja je faktor selektivnosti koji se izračunava na sledeći način [44]:

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (22)$$

gde su k_1 i k_2 retencioni faktori susednih pikova analiziranih supstanci.

Nešto složeniji parametar razdvajanja susednih pikova, koji u obzir uzima i širinu pikova, jeste faktor rezolucije, a izračunava se pomoću sledećeg izraza [44]:

$$Rs = 2(t_2 - t_1) / (w_2 - w_1) \quad (23)$$

gde su t_1 i t_2 retenciona vremena, a w_1 i w_2 širine odgovarajućih pikova analiziranih supstanci na baznoj liniji.

U skladu s ciljem s kojim se eksperimentalni modeli grade, kao odgovori sistema biraju se neki od navedenih parametara. Kada postoji cilj da se opiše retenciono ponašanje analita u nekom hromatografskom sistemu i kvantifikuju faktorski uticaji, kao odgovor najčešće se prate retenciono vreme ili retencioni faktor. Međutim, u slučaju da je postavljeni cilj optimizacija hromatografskog razdvajanja neke složene smeše neophodno je, pored retencionih faktora komponenti smeše, pratiti i neki od parametara razdvajanja (faktor selektivnosti ili faktor rezolucije).

3.4. KREIRANJE EKSPERIMENTALNOG MODELA

Kao što je već u prethodnim poglavljima pomenuto, najveći broj zavisnosti u hromatografskim sistemima može biti aproksimiran linearnom ili kvadratnom funkcijom. Najčešći pristup građenju eksperimentalnih modela podrazumeva primenu tehnike višestruke linearne regresije (eng. *Multiple Linear Regression* – MLR) i metode najmanjih kvadrata (eng. *Least Squares Method*). Linearni model, koji opisuje uticaj većeg broja faktora na posmatrani hromatografski odgovor, y_i , može se predstaviti sledećom jednačinom [39, 40]:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip} \quad (24)$$

pri čemu je $i = 1 \dots n$, gde je n broj eksperimenata, p broj ispitivanih faktora, β_0 odsečak, β_1 , β_2 i β_3 regresioni koeficijenti linearnih članova.

Kako se optimizacionim dizajnima ispitivani faktori ispituju na tri nivoa, njihov uticaj na posmatrani hromatografski odgovor, y_i , može se aproksimirati i kvadratnom funkcijom sledećeg oblika [39, 40]:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_{11} x_{i1}^2 + \beta_2 x_{i2} + \beta_{22} x_{i2}^2 + \beta_{12} x_{i1} x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip} + \beta_{pp} x_{ip}^2 \quad (25)$$

pri čemu je $i = 1 \dots n$, gde je n broj eksperimenata, p broj ispitivanih faktora, β_0 odsečak, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ regresioni koeficijenti linearnih članova, $\beta_{12}, \dots, \beta_{ip}$ regresioni koeficijenti članova faktorskih interakcija, $\beta_{11}, \beta_{22}, \dots, \beta_{pp}$ regresioni koeficijenti kvadratnih članova.

Da bi bilo moguće kreiranje eksperimentalnih matematičkih modela, odnosno da bi se sprovela statistička analiza koja potvrđuje njihovu pouzdanost, neophodno je da broj eksperimenata bude nešto veći od broja koeficijenata koje je neophodno proceniti. Na taj način ostavlja se dovoljan broj stepeni slobode kako bi bilo moguće proceniti eksperimentalnu grešku. Optimizacioni tipovi dizajna ne samo da ispunjavaju ovaj uslov, nego je i raspored tačaka u eksperimentalnom prostoru takav, da ukoliko statistička analiza potvrdi adekvatnost dobijenih modela, oni u potpunosti opisuju analizirani hromatografski sistem. Tehnika višestruke linearne regresije podrazumeva fitovanje retencionih podataka prikupljenih izvođenjem eksperimenata prema DoE metodologiji u odgovarajuće modele, dok metoda najmanjih kvadrata podrazumeva da se suma kvadrata odstupanja rešenja predviđenih dobijenim modelom u odnosu na vrednosti prikupljenih retencionih podataka svede na minimum [39, 40].

U koeficijentima kreiranih eksperimentalnih modela sadržana je informacija o faktorskim uticajima na ispitivani odgovor. Kada su u pitanju koeficijenti linearnih članova, apsolutna vrednost koeficijenta ukazuje na stepen uticaja faktora, dok predznak koeficijenta ukazuje na smer u kojem se odgovor menja s promenom odgovarajućeg faktora. Kvadratni članovi modela ukazuju na postojanje nelinearne zavisnosti posmatranog odgovora u funkciji jednog ili više faktora. Konačno, koeficijentima članova faktorskih interakcija procenjuje se istovremeni uticaj dva faktora na posmatrani hromatografski odgovor. Ako se retencioni faktor prati kao odgovor sistema,

analizom uticaja faktora i njihovih interakcija na osnovu koeficijenata dobijenih eksperimentalnih modela moguće je izvršiti kompletan opis retencionog ponašanja.

U slučaju višekomponentnih smeša, neretko se dešava da pikovi pod različitim hromatografskim uslovima menjaju mesta na hromatogramu ili da se menja njihova širina. Ovakve situacije često mogu dovesti do toga da se parametri separacije pikova (faktor selektivnosti i faktor rezolucije) ne mogu aproksimirati prethodno pomenutim jednostavnim funkcijama. Jedan od pristupa za prevazilaženje ovog problema jeste direktno modelovanje jednostavnih hromatografskih odgovora (poput retencionog vremena i retencionog faktora) fitovanjem eksperimentalnih podataka u linearne ili kvadratne modele, nakon čega sledi indirektno modelovanje složenijih odgovora (npr. parametara separacije) na osnovu modela jednostavnih hromatografskih odgovora [45, 46].

3.5. OPTIMIZACIJA HROMATOGRFSKE METODE

Jedan od najznačajnijih ciljeva DoE metodologije i kreiranja eksperimentalnih matematičkih modela je optimizacija hromatografske metode. Ovakav pristup omogućava da novorazvijena metoda zadovolji unapred definisane ciljeve, na primer da bude pogodna za predviđenu namenu, odnosno da pikovi koji odgovaraju komponentama smeše budu adekvatno razdvojeni, da simetrija dobijenih pikova bude zadovoljavajuća, da hromatografska analiza traje što kraće, itd. [35, 41].

Prvi korak u optimizaciji metode podrazumeva postavljanje ciljeva optimizacije. U skladu s njima biraju se hromatografski odgovori koji će biti praćeni, a potom se primenom hemometrijskog pristupa kreiraju eksperimentalni matematički modeli koji definišu funkcionalnu zavisnost odabranog odgovora od ispitivanih faktora. Konačni optimalni hromatografski uslovi, pod kojima se dobijaju najbolje vrednosti odabranih odgovora sistema, mogu se identifikovati na dva načina: grafički ili numerički [47].

Grafički pristup identifikacije optimalnih hromatografskih uslova zasniva se na RSM. Naime, on podrazumeva predstavljanje kreiranih eksperimentalnih modela u vidu

dvodimenzionih i trodimenzionih površina odgovora na kojima se posmatrani odgovor nalazi u funkciji jednog, odnosno dva ispitivana faktora. Prednost ovog načina identifikovanja optimalnih uslova jeste što se ovo može izvesti na veoma jednostavan način, pošto komercijalno dostupni softveri omogućavaju konstrukciju ovakvih grafika. Glavni nedostatak ovog pristupa jeste nemogućnost njegove primene u slučajevima kada eksperimentalni modeli uključuju više od dva faktora, što se vrlo često dešava. Kako bi to zahtevalo konstruisanje površine odgovora u četvoro ili višedimenzionom prostoru, vrednosti pojedinih faktora bilo bi neophodno fiksirati na konstantnu vrednost, što bi dovelo do gubitka informacija. Još jedan od problema ove tehnike jeste činjenica da odabir optimalnih uslova zavisi prevashodno od subjektivne procene analitičara [39–41].

S druge strane, najjednostavniji numerički pristup optimizaciji zasniva se na pretraživanju čvorova mreže. On podrazumeva da se na početku definiše gustina mreže unutar raspona vrednosti ispitivanih faktora, nakon čega se na osnovu prethodno kreiranog eksperimentalnog modela izračunava vrednost posmatranog odgovora u svakom od čvorova mreže. Broj tačaka direktno će se povećavati s gustinom mreže. Na kraju, pretragom mreže u skladu s ciljevima optimizacije identifikuju se hromatografski uslovi pod kojima se postižu optimalne vrednosti odgovora [46].

4. PREGLED LITERATURE

U ovom poglavlju biće istaknuti najvažniji rezultati istraživanja dostupni u dosadašnjoj literaturi iz oblasti primene teorijskih modela u proširivanju znanja o retencionim mehanizmima i unapređenju teorijskih aspekata različitih HILIC sistema, kao i primene hemometrijskog pristupa građenju eksperimentalnih modela u cilju analize retencionog ponašanja, faktorskih uticaja i optimizacije razdvajanja složenih smeša u ovom tipu hromatografije.

4.1. TEORIJSKI MODELI U HILIC SISTEMIMA

Prvobitno predloženi retencioni mehanizam u HILIC hromatografiji dao je Alpert [2]. Na osnovu dotadašnjih znanja zaključio je da je to proces raspodele. Ovaj proces se odvija tako što se vodeni sloj odgovarajuće debljine adsorbuje na površinu polarne stacionarne faze nakon čega dolazi do raspodele polarnog analita između tog vodenog sloja i ostatka mobilne faze. Međutim, sumnjao je da je to jedini proces u retencionom mehanizmu, pa je pretpostavio da su u njega uključene i neke direktne interakcije između analita i funkcionalnih grupa na površini stacionarne faze, poput dipol–dipol interakcija. Naučnik Alpert prvi je i upotrebio naziv tečna hromatografija hidrofilnih interakcija.

Pregledni rad [1] jedan je od prvih ovakvih radova koji razmatraju značaj teorijskih modela u HILIC sistemima. U ovom radu objedinjena su sva znanja o upotrebi particionih i adsorpcionih retencionih modela u određivanju doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu koja su do tada bila poznata u literaturi. Takođe, istaknut je i značaj doprinosa procesa jonske izmene u retencionom mehanizmu kiselih, baznih i amfoternih analita na površinski naelektrisanim stacionarnim fazama, mada ovaj doprinos nije bio kvantitativno opisan i utemeljen na odgovarajućim jonoizmenjivačkim retencionim modelima. U ovom radu predstavljene su i karakteristike do tada korišćenih tipova stacionarnih faza u HILIC sistemima, kao i potencijalni retencioni mehanizmi separacije različitih analita u njima.

U drugoj polovini rada predstavljeni su tipovi polarnih i umereno polarnih analita male i velike molekulske mase za čiju analizu je pogodna HILIC hromatografija.

U preglednom radu [12] dat je prikaz tipova stacionarnih faza od značaja za HILIC sisteme s posebnim akcentom na funkcionalne grupame odgovorne za zadržavanje analita na njihovoj površini. Uz osvrt na činjenicu da particioni i adsorpcioni modeli u analiziranim HILIC sistemima, u literaturi generalno, nisu dali jasan zaključak o doprinosu procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu, dat je pregled radova o primeni mešovito adsorpciono-particionog retencionog modela koji predviđa istovremeno prisustvo i procesa raspodele i procesa adsorpcije. Konačno, izvršena je i klasifikacija HILIC stacionarnih faza po zastupljenosti odgovarajućeg procesa u retencionom mehanizmu u zavisnosti od vrste analiziranih komponenti.

Pregledni rad [4] navodi primenu particionih, adsorpcionih i mešovutih adsorpciono-particionih retencionih modela u HILIC hromatografiji. Data je i diskusija o aproksimacijama u izvođenju predloženih jednačina, kao i zaključci do kojih one mogu dovesti u smislu tumačenja retencionih mehanizama. Takođe, prikazan je i pregled radova u kojima je korišćen dvojni HILIC/RP retencioni model u analizi složenog retencionog mehanizma prilikom razdvajanja polarnih analita na umereno polarnim hemijski modifikovanim silikagel stacionarnim fazama.

U preglednom radu [3] dat je prikaz tipova interakcija od značaja koje učestvuju u HILIC retencionom mehanizmu. U njemu su prikazana i istraživanja koja su bila usmerena na proučavanje debljine vodenog sloja koji se adsorbuje na površinu stacionarne faze u zavisnosti od sastava mobilne faze. Takođe, predstavljen je i značaj adsorpcionog, particionog i mešovito adsorpciono-particionog retencionog modela u retencionom predviđanju analita na različitim tipovima stacionarnih faza.

Autori rada [48] su, na osnovu dobrog fitovanja retencionih podataka 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiola (TRIS) i 2-amino-2-etil-1,3-propandiola (AEPD) u particioni retencioni model u amino koloni u rasponu udela vodenog dela u mobilnoj fazi od 10 % do 35 %, došli do zaključka da je proces raspodele primarno zastupljen u

retencionom mehanizmu ovog HILIC sistema. Hemstrom i Irgum [1] u svom revijalnom radu iskoristili su iste retencione podatke i fitovali ih i u adsorpcioni i u particioni retencioni model nakon čega su ustanovili da nijedan od njih ne aproksimira rezultate na adekvatan način. Oni su, takođe, upozorili na činjenicu da mobilna faza nije sadržala pufer, stoga je verodostojnost prvobitno izvedenih zaključaka dovedena u pitanje, jer je zanemaren proces snažnog elektrostatičkog odbijanja između baznih analita i pozitivno naelektrisane površine amino kolone.

U radu [49] retencioni podaci citozina dobijeni sa četiri različite kolone (amino, amidna, silika i cviterjonska) u rasponu sadržaja vodenog dela u mobilnoj fazi od 65 % do 95 % fitovani su u odgovarajuće particione i adsorpcione retencione modele. Ustanovljeno je da su adsorpcioni modeli izvršili bolju aproksimaciju podataka ukazujući na prisustvo direktne interakcije između molekula analita i površinskih grupa stacionarnih faza, te je zaključeno da je dominantan proces u retencionom mehanizmu bio proces adsorpcije.

Efikasnost adsorpcionog modela u fitovanju retencionih podataka peptida u amidnoj koloni potvrđena je u radu [50]. Naime, dobijene su linearne zavisnosti između retencionih faktora deset različitih peptida i udela vode u mobilnoj fazi. Zaključak ovog istraživanja bio je da je retencioni mehanizam separacije analiziranih peptida nalik onom u normalno-faznim sistemima, odnosno procesu adsorpcije. Autor ovog rada zastupa teoriju da je glavni tip interakcija u retencionom procesu u analiziranom HILIC sistemu zasnovan na građenju vodoničnih veza.

U radu [51] ispitana je zavisnost retencionih faktora benzokaina i cetilpiridinium-bromida u nederivatizovanoj silikagel koloni. Kako je ustanovljena linearna zavisnost u rasponu sadržaja vodenog dela u mobilnoj fazi od 10 % do 23 %, tako je zaključeno da je u retencionom mehanizmu dominantan proces adsorpcije. Činjenice da su analizirane supstance bile baznog karaktera i da je površina silika kolone pri datoj pH vrednosti mobilne faze bila negativno naelektrisana (usled prisustva silanolnih grupa) ukazuju na prisustvo katjonske izmene u retencionom mehanizmu. Na osnovu dobijenih rezultata autori ovog rada došli su do zaključka da postoji direktna interakcija između analita i

površine stacionarne faze, tj. da do adsorpcije analita dolazi usled procesa katjonske izmene.

U radu [52] ispitana je zavisnost retencionog ponašanja različitih polarnih analita od odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze u silikagel stacionarnim fazama modifikovanim 2-merkaptetanol (MEO) i 1-tioglicerol (TGO) funkcionalnim grupama. Ispitan je raspon sadržaja vode u mobilnoj fazi od 5 % do 40 % i dobijene su linearne zavisnosti između logaritma retencionog faktora manje polarnih analita i zapreminske frakcije vodenog dela u mobilnoj fazi. S druge strane, kod analita veće polarnosti primećena je linearna zavisnost njihovih retencionih faktora od zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi. Na taj način demonstrirano je da je raspodela dominantan proces u retencionom mehanizmu manje polarnih analita, dok polarniji analiti podležu procesu adsorpcije ili usled elektrostatičke interakcije sa rezidualnim silanolnim grupama ili usled direktnih interakcija s polarnim funkcionalnim grupama ostvarivanjem vodoničnih veza i dipol–dipol interakcija.

Liang i saradnici [31] su u svom radu predložili nelinearni mešoviti adsorpciono–particioni retencioni model u cilju opisivanja zavisnosti retencionih faktora analita od sadržaja vode u mobilnoj fazi u situacijama kada ni adsorpcioni ni particioni retencioni model nisu u stanju da fituju retencione podatke. Kako particioni model u širokom rasponu udela vode u mobilnoj fazi ima nelinearni (kvadratni) oblik, izveden je pokušaj fitovanja retencionih podataka i u ovaj model. Korišćene su vrednosti retencionih faktora nukleozida dobijenih sa šest različitih HILIC kolona (tri silika, dve diolne i jedna β -ciklodekstrinska). Mešoviti adsorpciono–particioni retencioni model izvršio je najbolju aproksimaciju rezultata, stoga je okarakterisan kao najefikasniji u retencionom predviđanju.

Slični zaključci izvedeni su i u radu [53], u kojem je retenciono ponašanje hidrosolubilnih vitamina u diolnoj koloni ispitano u rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi od 50 % do 90 %. Fitovanjem retencionih podataka u particioni model ustanovljena je linearnost pri manjim sadržajima vode u mobilnoj fazi, dok je pri većim sadržajima primećen gubitak linearnosti. S druge strane, adsorpcioni model adekvatno je fitovao

retencione podatke pri većim sadržajima vode u mobilnoj fazi, dok je nelinearnost ustanovljena pri manjim sadržajima. Autori ovog rada istakli su da bi ovakvo retenciono ponašanje moglo biti posledica dominantnosti procesa raspodele pri velikim sadržajima vode u mobilnoj fazi, dok smanjivanjem sadržaja vode adsorpcioni proces, kao posledica formiranja vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija, postaje sve dominantniji. Kao posledica toga, mešoviti adsorpciono-particioni retencioni model obezbedio je najbolju aproksimaciju retencionih podataka hidrosolubilnih vitamina u diolnoj koloni u širokom opsegu odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi.

Rezultati prikazani u radu [54] ukazuju na činjenicu da je debljina adsorbovanog vodenog sloja u HILIC sistemima relativno mala pri mobilnim fazama koje sadrže veliki sadržaj acetonitrila, a da se ona znatno povećava s povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi. Autori ovog rada smatrali su da ovakvi podaci predstavljaju indirektan dokaz da do direktne interakcije između molekula analita i površine stacionarne faze jedino može doći kada je adsorbovani vodeni sloj dovoljno tanak. S povećavanjem debljine ovog vodenog sloja verovatnoća da će se proces adsorpcije odvijati biće sve manja, stoga proces raspodele postaje dominantan u retencionom mehanizmu.

Autori rada [33] matematički su definisali doprinos procesa katjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu baznih supstanci u nederivatizovanim silikagel stacionarnim fazama. Naime, oni su uspostavili linearnu zavisnost distribucionog koeficijenta, koji je proporcionalan retencionom faktoru analita, i inverzne vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi. U konkretnom slučaju to je bio amonijum jon koji je nastao u procesu disocijacije amonijum-acetata dodatog u mobilnu fazu. U slučaju da je samo proces katjonske izmene prisutan u retencionom mehanizmu baznih analita, zavisnost retencionog faktora od inverzne vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona bila bi prava linija čiji bi odsečak prolazio kroz koordinatni početak, a njen nagib bio bi proporcionalan konstanti ravnoteže jonske izmene i broju jonizovanih silanolnih grupa na površini silika stacionarne faze. Međutim, prisustvo nekog dodatnog procesa u retencionom mehanizmu uslovljavaće postojanje odsečka na ordinati pomenute zavisnosti.

U radu [55] odgovarajućim retencionim modelima okarakterisan je mehanizam katjonske izmene derivata hidrazina u cviterjonskoj stacionarnoj fazi. Model katjonske izmene, opisan u prethodnom radu, transformisan je u linearnu zavisnost između logaritma retencionog faktora i logaritma koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi. Retencioni podaci analita, prikupljeni u rasponu koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi od 5 mmol L⁻¹ do 30 mmol L⁻¹, fitovani su u odgovarajuće katjonsko–izmenjivačke retencione modele. Analizom nagiba konstruisanih linearnih zavisnosti ustanovljeno je prisustvo nekog dodatnog procesa u retencionom mehanizmu pored procesa katjonske izmene (raspodela, adsorpcija).

U radu [32] ispitan je doprinos elektrostatičke interakcije četiri bazna, jednog neutralnog i jednog kiselog analita u pet različitih kolona (amidna, silika, diolna i cviterjonska) ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Prikupljane su vrednosti retencionih faktora ispitivanih analita u rasponu rastućih koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi od 2 mmol L⁻¹ do 10 mmol L⁻¹. Usled prisustva negativno naelektrisanih silanolnih grupa na silika koloni i rezidualnih silanolnih grupa na ostalim kolonama, retencioni faktori baznih analita smanjivali su se s povećanjem koncentracije soli. Efekat koncentracije soli na retenciono ponašanje kiselog analita bio je suprotan, dok je ovaj efekat bio neznatan u slučaju neutralnog analita. Fitovanjem retencionih podataka baznih analita u katjonsko–izmenjivački model opisan u prethodnom radu, i praćenjem odsečka na ordinati na konstruisanim graficima, izračunat je doprinos procesa katjonske izmene na svakoj od kolona. S obzirom da je postojao odsečak u svim slučajevima, zaključeno je da su procesi raspodele i/ili adsorpcije bili deo retencionog mehanizma. Očekivano, usled najveće koncentracije silanolnih grupa na svojoj površini, proces katjonske izmene bio je najzastupljeniji u silika koloni.

U radu [26] istaknuto je da su u hromatografsko razdvajanje polarnih i umereno polarnih analita u hemijski modifikovanim stacionarnim fazama uključeni i RP i HILIC retencioni mehanizam. Kao komponente smeše korišćeni su neutralni analiti (uracil, tiourea, fenol), a njihovo razdvajanje izvođeno je u polimetakrilatnim stacionarnim fazama u HILIC sistemu. Retencioni podaci, dobijeni variranjem sadržaja vode u mobilnoj fazi u širokom rasponu vrednosti od 2 % do 90 %, fitovani su metodom

nelinearne regresije u novorazvijeni dvojni HILIC/RP retencioni model. Ovi modeli ne samo da su omogućili uspešnu aproksimaciju retencionih podataka, nego je izračunavanjem njihovih minimuma postignuto i određivanje sastava mobilne faze pri kojoj dolazi do prelaza iz HILIC mehanizma u RP mehanizam i obratno.

Dvojni HILIC/RP retencioni model takođe se pokazao korisnim i u aproksimaciji retencionih podataka fenolnih i flavonskih antioksidanasa u četiri diolne i dve polietilenglikolne stacionarne faze [30]. Ispitani opseg sadržaja vode u mobilnoj fazi bio je od 1 % do 98 %, a retencioni faktori ispitivanih analita pokazali su tipičnu nelinearnu zavisnost u ovom opsegu vrednosti sastava mobilne faze. Kako su se minimumi odgovarajućih funkcija za identične analite razlikovali na kolonama koje su po tipu površinskih grupa bile slične, tako je zaključeno da na prelaz između retencionih mehanizama može značajno uticati gustina, način pakovanja kolona, kao i druge varijacije koje postoje između kolona različitih proizvođača.

Retenciono ponašanje u širokom opsegu sastava mobilnih faza fenolnih kiselina ispitano je i u dve nemodifikovane silikagel kolone i dve silika kolone hemijski modifikovane nepolarnim grupama [56]. Sadržaj vode u mobilnoj fazi variran je u rasponu od 1 % do 98 %, a retencioni faktori analiziranih fenolnih kiselina fitovani su u dvojne HILIC/RP retencione modele. Zbog velike polarnosti nemodifikovanih silika kolona u RP regionu sastava mobilnih faza analiti su se izuzetno slabo zadržavali u kolonama, dok je u HILIC regionima sastava mobilnih faza primećeno tipično HILIC retenciono ponašanje. S druge strane, na modifikacijama silikagel stacionarnih faza, zbog njihove slabije polarnosti, zadržavanje analita bilo je znatno duže u RP regionima sastava mobilnih faza, dok je njihovo retenciono ponašanje u HILIC regionima bilo uporedivo sa onim na nemodifikovanim silikagel stacionarnim fazama.

4.2. EKSPERIMENTALNI MODELI U HILIC SISTEMIMA

U preglednom radu [17] dat je pregled postavljenih HILIC metoda. U njemu je istaknuto da je do tada najčešći pristup optimizacije HILIC metoda bio jednofaktorski, odnosno da se ispitivani odgovor pratio kao funkcija samo jednog faktora. Prvi deo

preglednog rada obuhvata tipove analita, ispitivane faktore i praćene odgovore prilikom optimizacije, definisanje optimalnih uslova, kao i podatke vezane za validaciju postavljenih HILIC metoda. Takođe, dato je poređenje nekih razvijenih HILIC metoda s drugim analitičkim separacionim tehnikama. U drugom delu preglednog rada opisan je potencijal multifaktorskog pristupa upotrebom metodologije eksperimentalnog dizajna u optimizaciji HILIC metoda. Do tada u literaturi nije pronađena nijedna HILIC metoda razvijena na ovakav način, pa su u ovom delu predstavljeni i koraci koje je neophodno sprovesti kako bi se potencijalna HILIC metoda optimizovala hemometrijskim pristupom.

U radu [57] predstavljena je primena 3×5 dizajna sa centralnim tačkama u cilju građenja eksperimentalnih modela kojima je dat kompletan opis retencionog ponašanja nekih organskih kiselina u pet kolona (dve amidne, silikagel, diolna, cviterjonska). Kreirani su kvadratni modeli pomoću kojih je kvantitativno opisan uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi i temperature kolone na retencione faktore odgovarajućih organskih kiselina. Odgovarajuće zavisnosti prikazane su u vidu trodimenzionih površina odgovora.

Centralni kompozicioni dizajn primenjen je u radu [58] kako bi se omogućila analiza retencionog ponašanja mokraćne kiseline i njenih derivata u diolnoj stacionarnoj fazi. Dobijeni su odgovarajući kvadratni modeli zavisnosti retencionih faktora analita od tri faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-formijata u vodenoj fazi, temperatura kolone). Konstruisanjem trodimenzionih površina odgovora omogućeno je grafičko predstavljanje uticaja ispitivanih hromatografskih faktora na retenciono ponašanje analita. Na osnovu njih data je i odgovarajuća analiza faktorskih efekata.

U radu [59] prikazana je optimizacija hromatografskog razdvajanja salicilne, acetilsalicilne i askorbinske kiseline u silikagel koloni hemometrijskim pristupom. Varirana su četiri hromatografska faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija pufera u vodenoj fazi, pH vrednost vodene faze i temperatura kolone), a kao odgovori sistema praćena su retencionna vremena analita i faktori rezolucije.

Eksperimenti su izvedeni prema matrici Boks–Benken dizajna, nakon čega su kreirani odgovarajući kvadratni modeli. Primenom Deringerove funkcije poželjnih odgovora, a u skladu s postavljenim ciljevima optimizacije, identifikovani su optimalni hromatografski uslovi. Nakon toga, izvršena je i validacija optimizovne HILIC metode za određivanje sadržaja ispitivanih komponenti u tabletama. Analizom konstruisanih trodimenzionih površina odgovora procenjena je i robusnost razvijene HILIC metode.

Optimizacija hromatografskog razdvajanja aminoglikozidnih antibiotika u cviterjonskoj stacionarnoj fazi primenom metodologije površine odgovora predstavljena je u radu [60]. Ispitivan je uticaj tri hromatografska faktora (koncentracija pufera u vodenoj fazi, pH vrednost mobilne faze i temperatura kolone), dok su kao odgovori sistema praćena retencionna vremena pikova odgovarajućih aminoglikozida, kao i njihove površine. Eksperimentalni plan postavljen je prema matrici centralnog kompozicionog dizajna. Kreirani kvadratni modeli prikazani su grafički, što je omogućilo detaljnu analizu uticaja faktora i identifikaciju optimalnih hromatografskih uslova. Nakon toga, optimizovana HILIC metoda je validirana za određivanje rezidua aminoglikozidnih antibiotika u uzorcima meda.

Primena hemometrijskog pristupa na model smešu koja se sastojala iz glicerola, gliceril-karbonata i uree opisana je u radu [61]. Kako su mobilnu fazu sačinjavala tri rastvarača, za identifikaciju njihovog optimalnog odnosa odabran je trokomponentni mešoviti tip dizajna. Na ovaj način obezbeđeno je da sadržaji vode, metanola i acetonitrila u mobilnoj fazi variraju na sistematičan način. Pošto je kompletna procedura izvođena u tri različite kolone (silikagel, diolna, cviterjonska), omogućeno je i poređenje faktorskih uticaja između njih. Na taj način izvedeni su i značajni zaključci o retencionim mehanizmima. Korišćenjem Deringerove funkcije poželjnih odgovora, identifikovani su optimalni uslovi separacije u diolnoj koloni. Konačno, razvijena HILIC metoda primenjena je za istovremeno određivanje ovih analita iz uzoraka dobijenih prilikom procesa sinteze gliceril-karbonata.

U radu [62] prikazana je optimizacija hromatografskog razdvajanja smeše antidepresiva u silikagel stacionarnoj fazi primenom punog faktorskog dizajna za tri faktora. Odabrani

hromatografski faktori bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze, dok je kao hromatografski odgovor praćen globalni kriterijum razdvajanja okarakterisan unapređenom funkcijom hromatografskog odgovora. Ova funkcija uspešno je opisala retenciono ponašanje komponenti smeše u celini, a takođe je i omogućila identifikaciju regiona eksperimentalnog prostora u kojima odgovarajuća kombinacija vrednosti ispitivanih faktora omogućava dobro razdvajanje, minimalnu dužinu trajanja analize i adekvatnu širinu pikova za sve ispitivane analite.

5. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Ispitivanje faktorskih uticaja i retencionog ponašanja kiselih i amfoternih analita na primeru model smeše penicilina i cefalosporina u silika koloni primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, kao i verifikacija dobijenih modela poređenjem simuliranih i eksperimentalno dobijenih hromatograma u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora.
2. Analiza retencionih mehanizama baznih analita na primeru model smeše antipsihotika, antihistaminika i antiepileptika u dve silika, dve diolne i jednoj cijano koloni fitovanjem retencionih podataka u particioni, adsorpcioni, katjonsko–izmenjivački i dvojni HILIC/RP retencioni model. Ispitivanje retencionog ponašanja, kao i faktorskih uticaja ovih analita u *Betasil Silica* koloni na osnovu eksperimentalnih modela dobijenih hemometrijskim pristupom.
3. Analiza retencionih mehanizama kiselih i neutralnih analita na primeru model smeše analita sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom u amino koloni fitovanjem retencionih podataka u particioni, adsorpcioni, anjonsko–izmenjivački i dvojni HILIC/RP retencioni model. Upotpunjavanje znanja o uticaju faktora mobilne faze na retenciono ponašanje ispitivanih analita u amino koloni primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, kao i procena kvaliteta retencionog predviđanja dobijenih modela verifikacijom kroz eksperimente.
4. Ispitivanje doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu neutralnih analita u zavisnosti od sastava mobilne faze na primeru model smeše joheksola i njegove tri srodne supstance u dve silika i dve diolne kolone primenom mešovitog adsorpciono–particionog retencionog modela.

5. Građenje eksperimentalnih modela zavisnosti retencionih faktora joheksola i njegove tri srodne supstance od faktora mobilne faze i tipa kolone primenom D-optimalnog dizajna, kao i optimizacija hromatografskog razdvajanja ispitivanih analita primenom indirektnog modelovanja faktora selektivnosti kritičnog para smeše i pretraživanjem čvorova mreže u okviru istraženog eksperimentalnog prostora. Validacija postavljene HILIC metode za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci u rastvorima za intravensku primenu.

6. EKSPERIMENTALNI DEO

6.1. APARATI I REAGENSI

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

Pumpa: *Waters 1525 Binar HPLC Pump*

Detektor: *Waters 2487 UV/VIS detektor*

Grafička obrada: *Breeze Software, Windows XP*

Mikrolitarski špric: 100 µL, SG Australija

Volumen injektovanja: 20 µL

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

Pumpa: HPLC pumpa

Detektor: *UV/VIS Plus detektor*

Grafička obrada: *ChromQuest, Windows XP*

Injektovanje: *Autosampler Plus*

Volumen injektovanja: 5 µL

Filtri: *Nylon membrane filters, 0,45 µm Whatman, Engleska*

Elektronska analitička vaga: *121 Sartorius, Nemačka*

Ultrazvučno kupatilo: *Fungilab, Španija*

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

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

Acetonitril, HPLC grade, *Sigma–Aldrich, Nemačka*

Amonijum-acetat: *Riedel-de Haen, Nemačka*

Amonijum-formijat: *Fluka, Indija*

Natrijum-dihidrogenfosfat: *Alkaloid, Makedonija*

Natrijum-citrat: *Sigma–Aldrich, Nemačka*

Mravlja kiselina: *Sigma–Aldrich, Nemačka*

Glacijalna sirćetna kiselina: *Zorka Šabac, Srbija*

Orto-fosforna kiselina: *Carlo Erba, Italija*

Limunska kiselina: *Sigma–Aldrich*, Nemačka

Omnipaque™ rastvor za intravensku primenu, *GE Healthcare*, Nemačka

Hromatografske kolone

Alltech Silica, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Alltech Associates*, Deerfield, IL, SAD

Alltima Amino, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Alltech Associates*, Deerfield, IL, SAD

Betasil Silica, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, MA, SAD

Betasil Diol, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, MA, SAD

Betasil CN, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, MA, SAD

Bakerbond Silica Gel, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *J. T. Baker*, Phillipsburg, NJ, SAD

Bakerbond Cyanopropyl, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *J. T. Baker*, Phillipsburg, NJ, SAD

Luna HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Phenomenex*, Torrance, CA, SAD

Kinetex HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 2,6 µm veličine čestica, *Phenomenex*, Torrance, CA, SAD

6.2. STANDARDNE SUPSTANCE

U ovoj disertaciji izvršena je hromatografska analiza četiri model smeše:

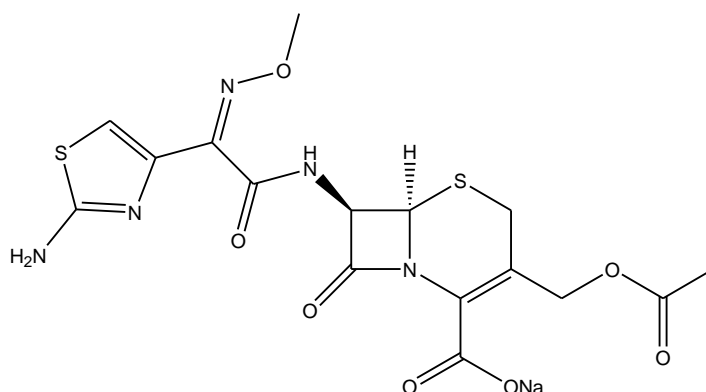
Smeša 1: β -laktamski antibiotici (slika 13) – cefotaksim-natrijum, cefaleksin-monohidrat, cefaklor, cefuroksim-natrijum, cefuroksim-aksetil, ampicilin-trihidrat, amoksicilin-trihidrat (radni standardi)

Smeša 2: smeša odabranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci (slika 14) – tioridazin, klozapin, sulpirid, feniramin-maleat, hlorfeniramin-maleat, lamotrigin (radni standardi)

Smeša 3: farmaceutski aktivne supstance sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom (slika 15) – tropikamid, nikotinamid, levetiracetam, piracetam, sulfanilamid, sulfacetamid-natrijum, sulfametoksazol, sulfafurazol, furosemid, bumetanid (radni standardi)

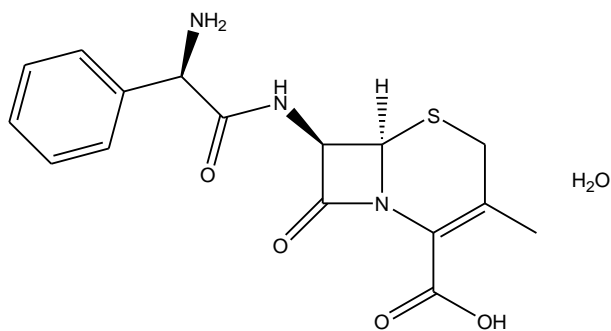
Smeša 4: joheksol i njegove srodne supstance (slika 16): srodna supstanca A (5-(acetilamino)- N,N' -bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid), srodna supstanca B (5-amino- N,N' -bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid), srodna supstanca C (5-nitro- N,N' -bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid) (radni standardi)

6.2.1. HEMIJSKA STRUKTURA ANALIZIRANIH SUPSTANCI



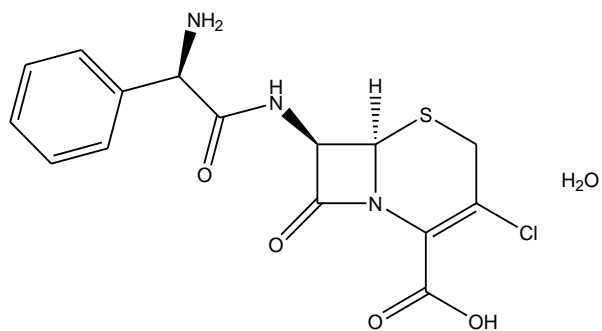
Cefotaksim-natrijum

Natrijum (6*R*,7*R*)-3-[(acetiloksi)metil]-7-[[*(2Z)*-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metiloksiimino)acetil]amino]-8-okso-5-tia-1-azabiciklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilat



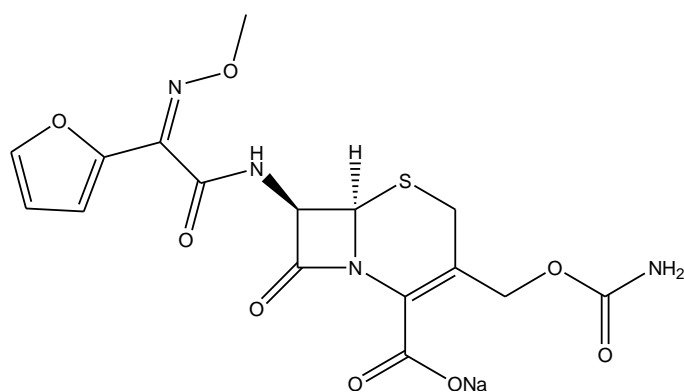
Cefaleksin-monohidrat

(6*R*,7*R*)-7-[[*(2R)*-2-amino-2-fenilacetil]amino]-3-metil-8-okso-5-tia-1-azabiciklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilna kiselina



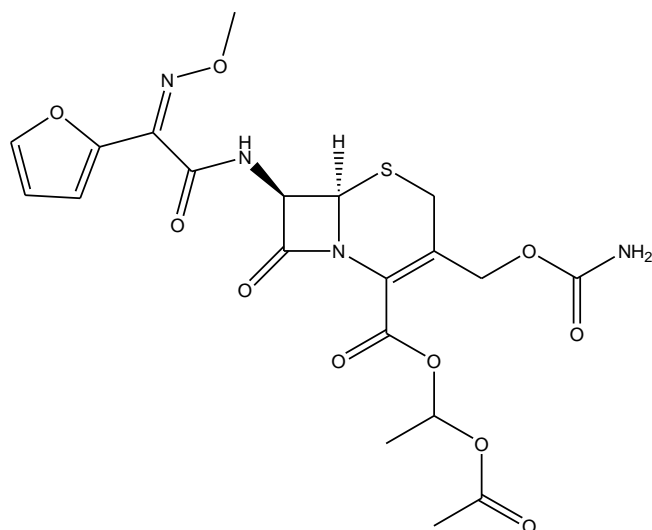
Cefaklor

(6*R*,7*R*)-7-[[*(2R)*-2-amino-2-fenilacetil]amino]-3-hloro-8-okso-5-tia-1-azabiciklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilna kiselina



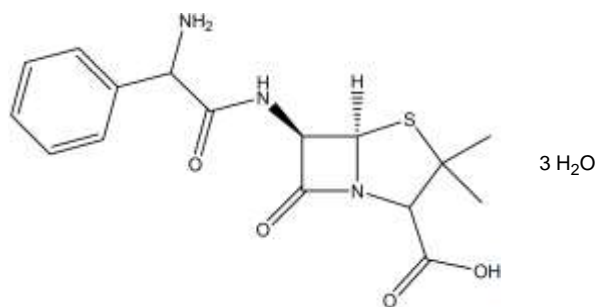
Cefuroksim-natrijum

Natrijum (6*R*,7*R*)-3-[(karbamoiloksi)metil]-7-[[*(Z)*-(furan-2-il)(metoksiimino)acetil]amino]-8-okso-5-tia-1-azabiciklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilat



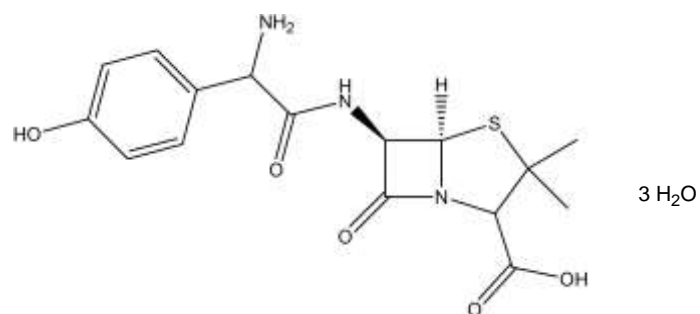
Cefuroksim-aksetil

(1*RS*)-1-(acetiloksi)etil-(6*R*,7*R*)-3-[(karbamoiloksi]metil]-7-[[*Z*]-2-(furan-2-il)-2-(metoksiimino)acetil]amino]-8-okso-5-tia-1-azabiciklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilat



Ampicilin-trihidrat

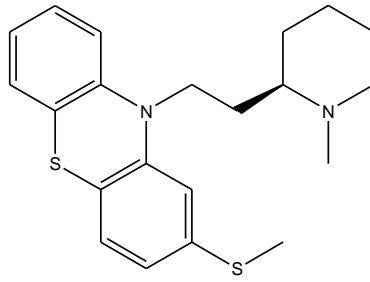
(2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[[*(2R)*-2-amino-2-fenilacetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tia-1-azabiciklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kiselina



Amoksicilin-trihidrat

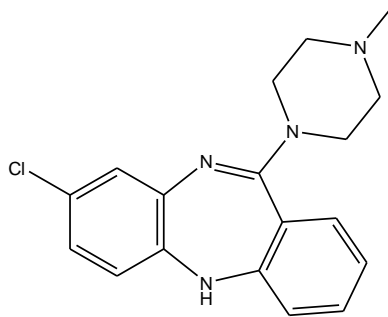
(2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[[*(2R)*-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tia-1-azabiciklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kiselina

Slika 13. Smeša 1: β -laktamski antibiotici [63]



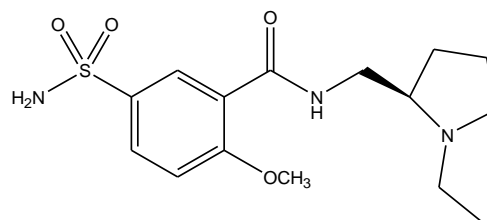
Tioridazin

10-[2-[(2*RS*)-1-metilpiperidin-2-il]etil]-2-(metilsulfanil)-10*H*-fenotiazin



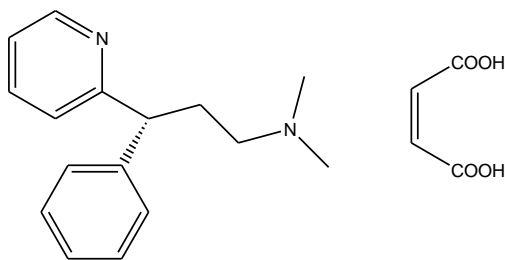
Klozapin

8-hloro-11-(4-metilpiperazin-1-il)-5*H*-dibenzo[*b,e*][1,4]diazepin



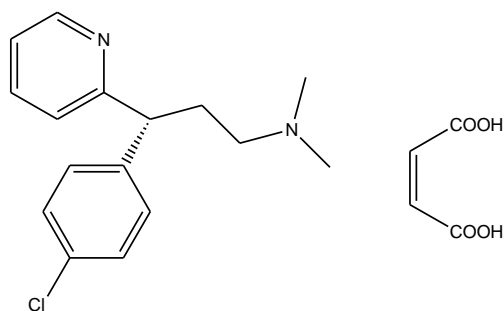
Sulpirid

(*RS*)-*N*-[(1-etilpirolidin-2-il)metil]-2-metoksi-5-sulfamoilbenzamid



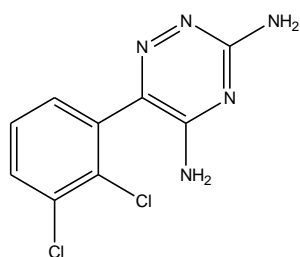
Feniramin-maleat

(3RS)-N,N-dimetil-3-fenil-3-(piridin-2-il)propan-1-amin hidrogen (Z)-butendioat



Hlorfeniramin-maleat

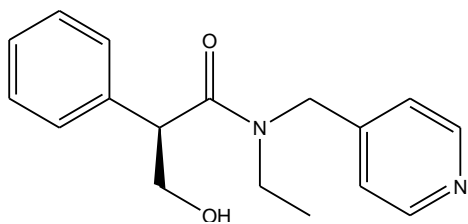
(3RS)-3-(4-hlorfenil)-N,N-dimetil-3-(piridin-2-il)propan-1-amin hidrogen (Z)-butendioat



Lamotrigin

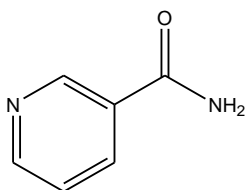
6-(2,3-dihlorfenil)-1,2,4-triazin-3,5-diamin

Slika 14. Smeša 2: odabrana bazna jedinjenja [63]



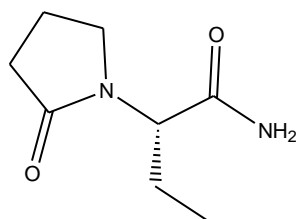
Tropikamid

(2*RS*)-*N*-etil-3-hidroksi-2-fenil-*N*-(piridin-4-ilmetil)propanamid



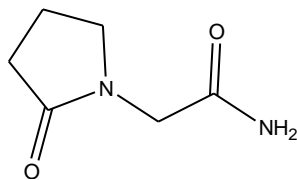
Nikotinamid

Piridin-3-karboksamid



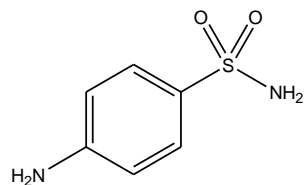
Levetiracetam

(2*S*)-2-(2-oksopirolidin-1-il)butanamid



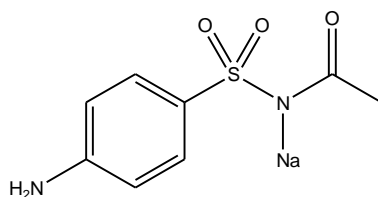
Piracetam

2-(2-oksopirolidin-1-il)acetamid



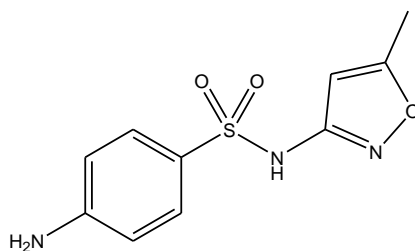
Sulfanilamid

4-aminobenzensulfonamid



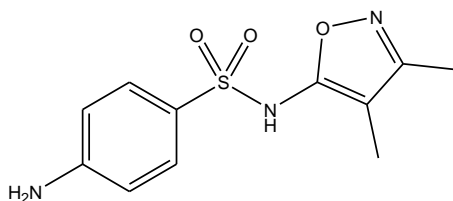
Sulfacetamid-natrijum

Natrijum acetil[(4-aminofenil)sulfonil]azaniid



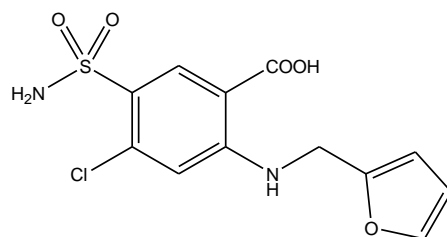
Sulfametoksazol

4-amino-*N*-(5-metilizoksazol-3-il)benzensulfonamid



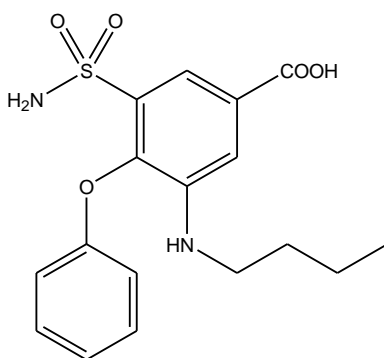
Sulfafurazol

4-amino-*N*-(3,4-dimetilizoksazol-5-il)benzensulfonamid



Furosemid

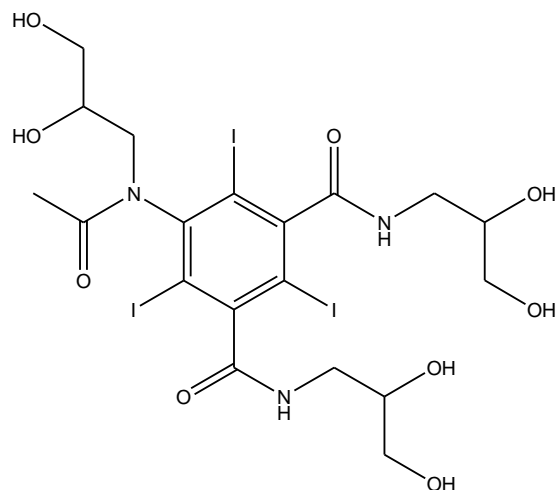
4-hloro-2-[(furan-2-ilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzoeva kiselina



Bumetanid

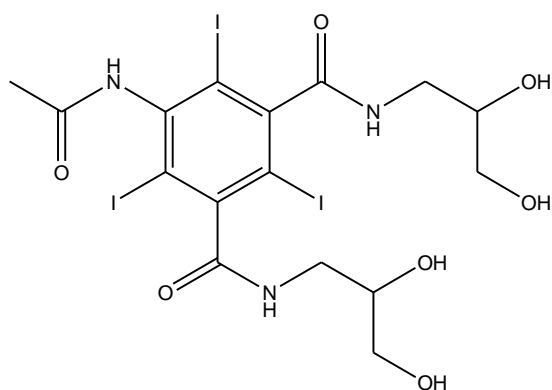
3-(butilamino)-4-fenoksi-5-sulfamoilbenzoeva kiselina

Slika 15. Smeša 3: jedinjenja sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom
[63]



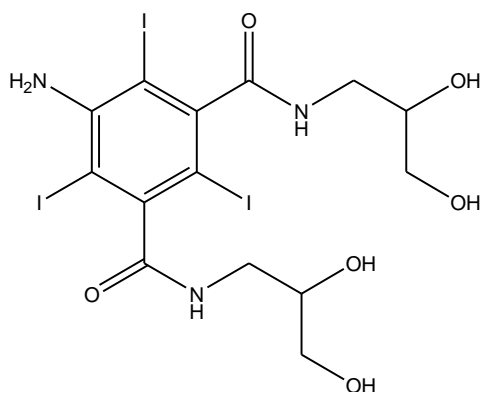
Joheksol

5-[acetil(2,3-dihidroksiipropil)amino]-*N,N'*-bis(2,3-dihidroksiipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid



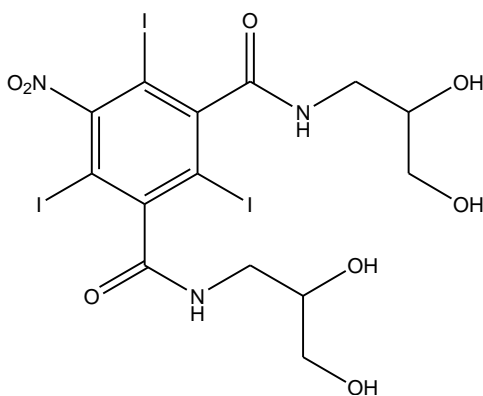
Srodna supstanca A

5-(acetilamino)-*N,N'*-bis(2,3-dihidroksiipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid



Srodna supstanca B

5-amino-*N,N'*-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid



Srodna supstanca C

5-nitro-*N,N'*-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid

Slika 16. Smeša 4: joheksol i njegove srodne supstance [64]

6.3. KOMPJUTERSKI PROGRAMI

Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Natick, MA, SAD)

Design-Expert 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, SAD)

SPSS Statistics 17.0. (IBM, New York, NY, SAD)

MATLAB 7.10.0. (MathWorks, Natick, MA, SAD)

MarvinSketch 6.1.0. (ChemAxon Kft., Mađarska)

6.4. ANALIZA β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*

Kolona: *Alltech Silica*, 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m veličine čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora standarda

Osnovni rastvori standarda cefotaksim-natrijuma, cefaleksin-natrijuma, cefuroksim-natrijuma i cefuroksim-aksetila pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (90:10 V/V), dok su osnovni rastvori standarda cefaklora, ampicilin-trihidrata i amoksicilin-trihidrata pripremljeni rastvaranjem u čistoj vodi. Radni rastvori standarda dobijeni su razblaživanjem osnovnih rastvora smešom acetonitril–vodena faza (90:10 V/V), tako da su postignute koncentracije od 100 μ g mL⁻¹ za sve analite. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Mobilne faze dobijane su mešanjem acetonitrila i vodene faze. Vodene faze činili su vodeni rastvori amonijum-acetata čiji je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanim matricom Boks–Benken dizajna koji je prikazan u tabeli 2.

Tabela 2. Plan eksperimenata prema matrici Boks–Benken dizajna

Eksperiment	ACN	pH	AcNH₄
1	80 (-1)*	4,5 (-1)*	100 (0)*
2	90 (+1)	4,5 (-1)	100 (0)
3	80 (-1)	6,5 (+1)	100 (0)
4	90 (+1)	6,5 (+1)	100 (0)
5	80 (-1)	5,5 (0)	70 (-1)
6	90 (+1)	5,5 (0)	70 (-1)
7	80 (-1)	5,5 (0)	130 (+1)
8	90 (+1)	5,5 (0)	130 (+1)
9	85 (0)	4,5 (-1)	70 (-1)
10	85 (0)	6,5 (+1)	70 (-1)
11	85 (0)	4,5 (-1)	130 (+1)
12	85 (0)	6,5 (+1)	130 (+1)
13	85 (0)	5,5 (0)	100 (0)
14	85 (0)	5,5 (0)	100 (0)
15	85 (0)	5,5 (0)	100 (0)

ACN – koncentracija acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH – pH vrednost vodene faze, AcNH₄ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradama

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. J Sep Sci 2012; 35: 1424–1431

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Kreiranje plana eksperimenata, fitovanje retencionih podataka metodom višestruke linearne regresije, statistička obrada rezultata i konstruisanje trodimenzionih površina odgovora: *Design-Expert* 7.0.0.

Kreiranje simuliranih hromatograma: *Microsoft Office Excel* 2010.

Predviđanje pK_a i $\log P$ vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

6.5. ANALIZA ODABRANIH BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

6.5.1. TEORIJSKI MODELI

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*

Kolone: *Betasil Silica*, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Betasil Diol, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Betasil CN, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Bakerbond Silica Gel, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Bakerbond Cyanopropyl, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše odabranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (85:15 V/V), tako da su postignute koncentracije od 100 µg mL⁻¹ za sve analite. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Za građenje jonoizmenjivačkih retencionih modela pripremljena je serija vodenih faza koje su činili vodeni rastvori amonijum-acetata čije su koncentracije varirale u rasponu od 5 mmol L⁻¹ do 55 mmol L⁻¹ i kojima je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 5,0. Konačne mobilne faze činile su smeše acetonitril–vodena faza (85:15 V/V).

Za građenje particionih i adsorpcionih retencionih modela mobilne faze pripremane su tako što je prvobitno napravljen 20 mmol L⁻¹ vodeni rastvor amonijum-acetata kojem je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 3,5, a potom je odnos između acetonitrila i dobijenog vodenog rastvora amonijum-acetata variran u rasponu od (70:30 V/V) do (90:10 V/V).

Za građenje dvojnih HILIC/RP retencionih modela pripremljena je vodena faza na identičan način, samo je odnos između acetonitrila i vodenog rastvora amonijum-acetata variran u rasponu od (5:95 V/V) do (95:5 V/V).

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Fitovanje podataka metodom proste linearne regresije: *Microsoft Office Excel* 2010.

Fitovanje podataka metodom nelinearne regresije: *SPSS Statistics* 17.0.

Predviđanje *pKa* i log *P* vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

6.5.2. EKSPERIMENTALNI MODELI

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*

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

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše odabranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (85:15 V/V), tako da su postignute koncentracije od 100 µg mL⁻¹ za sve analite. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Mobilne faze dobijane su mešanjem acetonitrila i vodene faze. Vodene faze činili su vodeni rastvori amonijum-acetata čiji je pH podešen glacijskom sirćetnom kiselinom. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanim matricom Boks–Benken dizajna koji je prikazan u tabeli 3.

Tabela 3. Plan eksperimenata prema matrici Boks–Benken dizajna

Eksperiment	ACN	pH	AcNH₄
1	80 (–1)*	2,5 (–1)*	20 (0)*
2	90 (+1)	2,5 (–1)	20 (0)
3	80 (–1)	4,5 (+1)	20 (0)
4	90 (+1)	4,5 (+1)	20 (0)
5	80 (–1)	3,5 (0)	5 (–1)
6	90 (+1)	3,5 (0)	5 (–1)
7	80 (–1)	3,5 (0)	35 (+1)
8	90 (+1)	3,5 (0)	35 (+1)
9	85 (0)	2,5 (–1)	5 (–1)
10	85 (0)	4,5 (+1)	5 (–1)
11	85 (0)	2,5 (–1)	35 (+1)
12	85 (0)	4,5 (+1)	35 (+1)
13	85 (0)	3,5 (0)	20 (0)
14	85 (0)	3,5 (0)	20 (0)
15	85 (0)	3,5 (0)	20 (0)
16	85 (0)	3,5 (0)	20 (0)

ACN – koncentracija acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH – pH vrednost vodene faze, AcNH₄ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradama

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana, fitovanje retencionih podataka metodom višestruke linearne regresije, statistička obrada rezultata i konstruisanje trodimenzionih površina odgovora: *Design-Expert 7.0.0*.

6.6. ANALIZA FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI SA AMIDSKOM I SULFONAMIDSKOM FUNKCIONALNOM GRUPOM

6.6.1. TEORIJSKI MODELI

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*

Kolona: *Alltima Amino*, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 230 nm

Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše jedinjenja sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (80:20 V/V), tako da su postignute koncentracije od 600 μg mL⁻¹ za piracetam, 300 μg mL⁻¹ za tiracetam, 150 μg mL⁻¹ za tropikamid, 100 μg mL⁻¹ za sulfanilamid, sulfacetamid-natrijum i sulfametoksazol, 75 μg mL⁻¹ za nikotinamid, 50 μg mL⁻¹ za sulfafurazol i bumetanid i 30 μg mL⁻¹ za furosemid. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Prilikom ispitivanja uticaja vrste pufera na ispitivani sistem pripremljena je serija mobilnih faza sa sledećim puferima: amonijum-formijat/mravlja kiselina, amonijum-acetat/sirćetna kiselina, natrijum-hidrogenfosfat/fosforna kiselina i natrijum-citrat/limunska kiselina. Mobilne faze činile su smeše acetonitril–vodena faza (30 mmol L⁻¹ soli, pH podešen odgovarajućom kiselinom na 6,0) (80:20 V/V).

Za građenje jonoizmenjivačkih retencionih modela pripremljena je serija vodenih faza koje su činili vodeni rastvori amonijum-acetata čije su koncentracije varirale u rasponu od 10 mmol L⁻¹ do 40 mmol L⁻¹ i kojima je pH podešen glacijalnom sirćetnom

kiselinom na 6,0. Konačne mobilne faze činile su smeše acetonitril–vodena faza (80:20 V/V).

Za građenje particionih i adsorpcionih retencionih modela u HILIC regionu sastava mobilnih faza, mobilne faze pripremane su tako što je prvobitno napravljen vodeni rastvor 20 mmol L⁻¹ amonijum-acetata kojem je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 6,0, a potom je odnos između acetonitrila i dobijenog vodenog rastvora amonijum-acetata variran u rasponu od (75:25 V/V) do (95:5 V/V). Za građenje particionih i adsorpcionih retencionih modela u RP regionu sastava mobilnih faza ovaj odnos variran je u rasponu od (5:95 V/V) do (40:60 V/V).

Za građenje dvojnih HILIC/RP retencionih modela vodena faza pripremljena je na identičan način, samo je odnos između acetonitrila i vodenog rastvora amonijum-acetata variran u rasponu od (5:95 V/V) do (95:5 V/V).

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Fitovanje podataka metodom proste linearne regresije: *Microsoft Office Excel* 2010.

Fitovanje podataka metodom nelinearne regresije: *SPSS Statistics* 17.0.

Predviđanje *pKa* i log *P* vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

6.6.2. EKSPERIMENTALNI MODELI

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze System*

Kolona: *Alltima Amino*, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 230 nm

Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda smeše jedinjenja sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–vodena faza (80:20 V/V), tako da su postignute koncentracije od 600 µg mL⁻¹ za piracetam, 300 µg mL⁻¹ za tiracetam, 150 µg mL⁻¹ za tropikamid, 100 µg mL⁻¹ za sulfanilamid, sulfacetamid-natrijum i sulfametoksazol, 75 µg mL⁻¹ za nikotinamid, 50 µg mL⁻¹ za sulfafurazol i bumetanid i 30 µg mL⁻¹ za furosemid. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Mobilne faze dobijane su mešanjem acetonitrila i vodene faze. Vodene faze činili su vodeni rastvori amonijum-acetata čiji je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanim matricom Boks–Benken dizajna koji je prikazan u tabeli 4.

Tabela 4. Plan eksperimenata prema matrici Boks–Benken dizajna

Eksperiment	ACN	pH	AcNH₄
1	70 (-1)*	3,0 (-1)*	25 (0)*
2	90 (+1)	3,0 (-1)	25 (0)
3	70 (-1)	6,0 (+1)	25 (0)
4	90 (+1)	6,0 (+1)	25 (0)
5	70 (-1)	4,5 (0)	10 (-1)
6	90 (+1)	4,5 (0)	10 (-1)
7	70 (-1)	4,5 (0)	40 (+1)
8	90 (+1)	4,5 (0)	40 (+1)
9	80 (0)	3,0 (-1)	10 (-1)
10	80 (0)	6,0 (+1)	10 (-1)
11	80 (0)	3,0 (-1)	40 (+1)
12	80 (0)	6,0 (+1)	40 (+1)
13	80 (0)	4,5 (0)	25 (0)
14	80 (0)	4,5 (0)	25 (0)
15	80 (0)	4,5 (0)	25 (0)

ACN – koncentracija acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH – pH vrednost vodene faze, AcNH₄ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradama

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana, fitovanje retencionih podataka metodom višestruke linearne regresije, statistička obrada rezultata i konstruisanje trodimenzionih površina odgovora: *Design-Expert 7.0.0*.

Kreiranje simuliranih hromatograma: *Microsoft Office Excel 2010*.

6.7. ANALIZA JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI

6.7.1. TEORIJSKI MODELI

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolone: *Betasil Silica*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Betasil Diol, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Luna HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Kinetex HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 2,6 μm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora standarda

Osnovni rastvori joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C pripremljeni su rastvaranjem u čistoj vodi. Radni rastvori standarda dobijeni su razblaživanjem osnovnih rastvora smešom acetonitril–vodena faza (20 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen na 4,0 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (80:20 V/V) tako da su postignute koncentracije od 100 μg mL⁻¹ za joheksol i 10 μg mL⁻¹ za srodne supstance A, B i C. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Za građenje particionih, adsorpcionih i mešovutih adsorpciono–particionih retencionih modela mobilne faze pripremane su tako što je prvobitno napravljen 20 mmol L⁻¹ vodeni rastvor amonijum-acetata kojem je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,5, a potom je odnos između acetonitrila i dobijenog vodenog rastvora amonijum-acetata variran u rasponu od (70:30 V/V) do (97:3 V/V).

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Fitovanje podataka metodom proste linearne regresije: *Microsoft Office Excel* 2010.

Fitovanje podataka metodom nelinearne regresije: *SOLVER* u okviru *Microsoft Office Excel* 2010 paketa.

Predviđanje log *P* vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

6.7.2. EKSPERIMENTALNI MODELI I OPTIMIZACIJA METODE

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolone: *Betasil Silica*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Betasil Diol, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Luna HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Kinetex HILIC, 100 mm × 4,6 mm, 2,6 μm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora standarda

Osnovni rastvori joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C pripremljeni su rastvaranjem u čistoj vodi. Radni rastvori standarda dobijeni su razblaživanjem osnovnih rastvora smešom acetonitril–vodena faza (25 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,5) (90:10 V/V) tako da su postignute koncentracije od 100 μg mL⁻¹ za joheksol i 10 μg mL⁻¹ za srodne supstance A, B i C. Rastvori su čuvani na temperaturi od 4 °C. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

Mobilna faza

Mobilne faze dobijane su mešanjem acetonitrila i vodene faze. Vodene faze činili su vodeni rastvori amonijum-acetata čiji je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanim matricom D-optimalnog dizajna koji je prikazan u tabeli 5.

Tabela 5. Plan eksperimenata prema matrici D–optimalnog dizajna

Eksperiment	ACN	pH	AcNH₄	Kolona
1	85,00 (-1,000)*	5,50 (+1,000)*	40,00 (+1,000)*	1
2	85,00 (-1,000)	5,50 (+1,000)	40,00 (+1,000)	2
3	85,00 (-1,000)	5,50 (+1,000)	10,00 (-1,000)	3
4	85,00 (-1,000)	5,50 (+1,000)	40,00 (+1,000)	4
5	85,00 (-1,000)	3,50 (-1,000)	40,00 (+1,000)	1
6	85,00 (-1,000)	3,50 (-1,000)	10,00 (-1,000)	2
7	85,00 (-1,000)	3,93 (-0,566)	40,00 (+1,000)	3
8	93,36 (+0,672)	3,50 (-1,000)	40,00 (+1,000)	4
9	95,00 (+1,000)	5,50 (+1,000)	10,00 (-1,000)	1
10	95,00 (+1,000)	3,50 (-1,000)	29,50 (+0,300)	2
11	94,24 (+0,848)	5,50 (+1,000)	40,00 (+1,000)	3
12	95,00 (+1,000)	5,50 (+1,000)	28,37 (+0,224)	4
13	85,00 (-1,000)	5,50 (+1,000)	10,00 (-1,000)	1
14	95,00 (+1,000)	4,75 (+0,255)	40,00 (+1,000)	2
15	88,52 (-0,296)	3,50 (-1,000)	10,00 (-1,000)	3
16	90,73 (+0,146)	5,50 (+1,000)	10,00 (-1,000)	4
17	95,00 (+1,000)	3,50 (-1,000)	10,00 (-1,000)	1
18	95,00 (+1,000)	5,50 (+1,000)	10,00 (-1,000)	2
19	95,00 (+1,000)	4,35 (-0,148)	10,00 (-1,000)	3
20	85,00 (-1,000)	3,50 (-1,000)	14,64 (-0,691)	4
21	95,00 (+1,000)	3,50 (-1,000)	40,00 (+1,000)	1
22	89,32 (-0,137)	4,66 (+0,163)	22,88 (-0,141)	2
23	90,00 (0,000)	3,66 (-0,844)	25,00 (0,000)	3
24	89,57 (-0,085)	4,00 (-0,500)	40,00 (+1,000)	4
25	85,78 (-0,844)	5,05 (+0,547)	28,75 (+0,250)	1
26	85,00 (-1,000)	5,50 (+1,000)	40,00 (+1,000)	2
27	94,24 (+0,848)	5,50 (+1,000)	40,00 (+1,000)	3
28	93,36 (+0,672)	3,50 (-1,000)	40,00 (+1,000)	4

ACN – koncentracija acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH – pH vrednost vodene faze, AcNH₄ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹), Kolona – vrsta kolone (1 – *Betasil Silica*; 2 – *Luna HILIC*; 3 – *Kinetex HILIC*; 4 – *Betasil Diol*)

*kodirane vrednosti faktora prikazane su u zagradama

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

Hromatografski postupak

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

Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana, fitovanje retencionih podataka metodom višestruke linearne regresije i statistička obrada rezultata: *Design-Expert* 7.0.0.

Indirektno modelovanje i pretraga čvorova mreže: *MATLAB* 7.10.0.

6.7.3. VALIDACIJA METODE

Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Betasil Diol*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 30 °C

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Priprema rastvora

Procena selektivnosti

Placebo smeša pripremljena je u mobilnoj fazi u koncentraciji koja odgovara farmaceutskom obliku (rastvoru za intravensku primenu). Smeša rastvora standarda koji sadrži joheksol u koncentraciji 500 μg mL⁻¹ i srodne supstance A, B i C u koncentraciji 0,5 μg mL⁻¹ pripremljena je u mobilnoj fazi.

Procena linearnosti

Za konstruisanje kalibracionih krivih pripremljene su rastuće koncentracije joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C.

Osnovni rastvor standarda joheksola pripremljen je tako što je odmereno 50 mg radnog standarda joheksola i preneto u odmerni sud od 10 mL, koji je potom dopunjen vodom do oznake. Koncentracija dobijenog rastvora bila je 5 mg mL^{-1} . Nakon toga, otpipetirano je redom 0,5 mL, 0,7 mL, 0,9 mL, 1,0 mL, 1,1 mL, 1,3 mL i 1,5 mL osnovnog rastvora standarda joheksola u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Na taj način pripremljena je serija rastućih koncentracija joheksola: $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $350 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $450 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $550 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $650 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $750 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Osnovni rastvori standarda srodnih supstanci A, B i C pripremljeni su tako što je odmereno po 5 mg radnih standarda odgovarajućih srodnih supstanci u odmerne sudove od 100 mL, koji su potom vodom dopunjeni do oznake. Koncentracije dobijenih rastvora bile su $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon toga je po 1 mL od sva tri osnovna rastvora srodnih supstanci otpipetirano u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom vodom dopunjeni do oznake. Koncentracije dobijenih rastvora bile su $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Konačno, otpipetirano je redom 0,5 mL, 0,7 mL, 0,9 mL, 1,0 mL, 1,1 mL, 1,3 mL i 1,5 mL rastvora standarda srodnih supstanci u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Na taj način pripremljena je serija rastućih koncentracija srodnih supstanci A, B i C: $0,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,35 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,55 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,65 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,75 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Procena tačnosti

Osnovni rastvor laboratorijske smeše koji sadrži komponente *placeba* i joheksol pripremljen je tako što je odmereno 50 mg radnog standarda joheksola i odgovarajuća masa *placebo* smeše i preneto u odmerni sud od 10 mL, koji je potom vodom dopunjen do oznake. Koncentracija joheksola u dobijenom osnovnom rastvoru laboratorijske smeše bila je 5 mg mL^{-1} . Nakon toga, od dobijenog rastvora pravljene su tri serije razblaženja koje sadrže joheksol u koncentracijama koje odgovaraju 80 %, 100 % i 120 % u odnosu na ciljanu koncentraciju, pri čemu je pravljeno po tri rastvora za svaku koncentraciju. Tako je od osnovnog rastvora laboratorijske smeše redom otpipetirano tri puta po 0,8 mL, 1,0 mL i 1,2 mL u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom dopunjeni mobilnom fazom do oznake. Koncentracije konačnih rastvora joheksola za ispitivanje tačnosti bile su $400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $600 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Osnovni rastvor laboratorijske smeše koji sadrži komponente *placeba* i srodne supstance A, B i C pripremljen je tako što je odmereno po 5 mg radnih standarda odgovarajućih srodnih supstanci i odgovarajuća masa *placebo* smeše i preneto u odmerni sud od 100 mL, koji je potom vodom dopunjen do oznake. Koncentracije odgovarajućih srodnih supstanci u dobijenom osnovnom rastvoru laboratorijske smeše bile su po $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon toga je 1 mL dobijenog rastvora otpipetiran u odmerni sud od 10 mL, koji je potom vodom dopunjen do oznake. Koncentracije odgovarajućih srodnih supstanci u dobijenom rastvoru bile su po $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Konačno, od dobijenog rastvora pravljene su tri serije razblaženja koje sadrže srodne supstance u koncentracijama koje odgovaraju 80 %, 100 % i 120 % u odnosu na ciljanu koncentraciju, pri čemu je pravljeno po tri rastvora za svaku koncentraciju. Tako je od dobijenog rastvora laboratorijske smeše redom otpipetirano tri puta po 0,8 mL, 1,0 mL i 1,2 mL u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom dopunjeni mobilnom fazom do oznake. Koncentracije konačnih rastvora srodnih supstanci A, B i C za ispitivanje tačnosti bile su $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Procena preciznosti

Procena preciznosti izvedena je korišćenjem komercijalno dostupnog *Omnipaque*TM rastvora za intravensku primenu koji sadrži 350 mg joda po mL (što odgovara 755 mg joheksola po mL). Kako su koncentracije srodnih supstanci u ovom rastvoru bile manje od limita detekcije, uzorak rastvora joheksola za intravensku primenu bio je „opterećen” rastvorom koji je sadržao odgovarajuće srodne supstance u koncentracijama koje su odgovarale maksimalnim dozvoljenim koncentracijama za dati farmaceutski oblik, odnosno po 0,1 % u odnosu na sadržaj joheksola. Osnovni rastvor srodnih supstanci A, B i C pripremljen je tako što je odmereno po 10 mg radnih standarda svake od srodnih supstanci i preneto u odmerni sud od 10 mL, koji je potom vodom dopunjen do oznake. Koncentracije odgovarajućih srodnih supstanci u dobijenom osnovnom rastvoru bile su po 1 mg mL^{-1} . Potom je 1,32 mL rastvora joheksola za intravensku primenu i 1 mL prethodno pripremljenog rastvora srodnih supstanci otpipetirano u odmerni sud od 100 mL, koji je potom vodom dopunjen do oznake. Koncentracija joheksola u dobijenom rastvoru bila je 10 mg mL^{-1} , dok su koncentracije srodnih supstanci A, B i C bile po $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Konačno, 2,5 mL dobijenog rastvora otpipetirano je u odmerni sud od 50 mL,

koji je potom mobilnom fazom dopunjen do oznake. Na taj način, dobijen je rastvor za procenu preciznosti u kojem je koncentracija joheksola bila $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, a srodnih supstanci A, B i C po $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ova procedura ponovljena je šest puta.

Mobilna faza

Mobilna faza predstavljala je smešu acetonitril–vodena faza (35 mmol L^{-1} amonijum-acetata, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 3,9) (91:9 V/V).

Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su odgovarajući rastvori analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema praćena su retenciona vremena i površine pikova analiziranih supstanci.

Kompjuterski programi

Statistićka obrada podataka: *Microsoft Office Excel 2010*.

7. REZULTATI I DISKUSIJA

7.1. ANALIZA RETENCIONOG PONAŠANJA β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA U SILIKA KOLONI PRIMENOM BOKS–BENKEN DIZAJNA

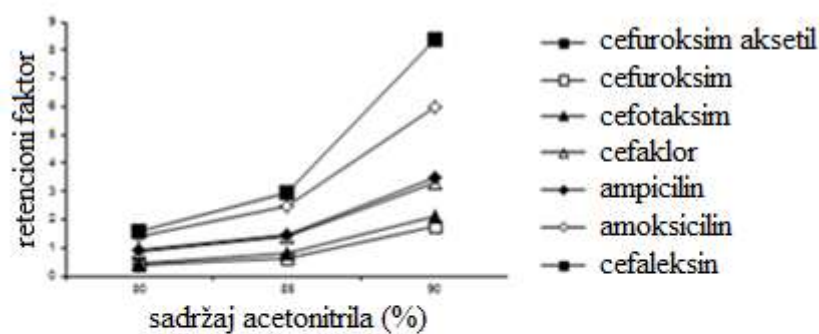
Dosadašnji literaturni podaci pokazali su da je najveći broj analiza u HILIC sistemima izveden u silika kolonama. Kako je površina ovakvih stacionarnih faza pretežno negativno naelektrisana, a posebno pri višim pH vrednostima mobilne faze, bazni analiti pokazuju značajan afinitet prema njima. Naime, privlačna elektrostatička interakcija odgovorna je za produženo zadržavanje ovakvih analita u silika kolonama. Kao posledica toga, retenciono ponašanje različitih tipova polarnih i umereno polarnih baznih analita na silika stacionarnim fazama do sada je prilično dobro opisano u literaturi [32]. S druge strane, znatno manji broj analiza izveden je s kiselim i amfoternim analitima [57–59]. Negativno naelektrisanje u strukturi ovakvih analita, pri odgovarajućim vrednostima pH, uslovljava elektrostatičko odbijanje s površinom negativno naelektrisane silika kolone. Na taj način, u ovakvim tipovima HILIC sistema, elektrostatička interakcija otežava zadržavanje analita.

U ovoj disertaciji izvršena je detaljna analiza retencionog ponašanja kiselih i amfoternih β -laktamskih antibiotika (cefotaksim-natrijuma, cefaleksin-monohidrata, cefaklora, cefuroksim-natrijuma, cefuroksim-aksetila, ampicilin-trihidrata i amoksicilin-trihidrata) u *Alltech Silica* koloni primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Karakteristike *Alltech Silica* kolone navedene su u Eksperimentalnom delu disertacije u poglavlju 6.4. Ovaj pristup omogućio je građenje eksperimentalnih modela zavisnosti retencionih faktora ispitivanih β -laktamskih antibiotika od faktora mobilne faze, kao i predviđanje retencionog ponašanja u okviru ispitanog eksperimentalnog prostora. Takođe, dovođenje u vezu retencionog ponašanja analita s njihovom polarnošću i jonizacionom sposobnošću omogućilo je kvalitativnu analizu potencijalnih retencionih mehanizama karakterističnih za ispitivani HILIC sistem.

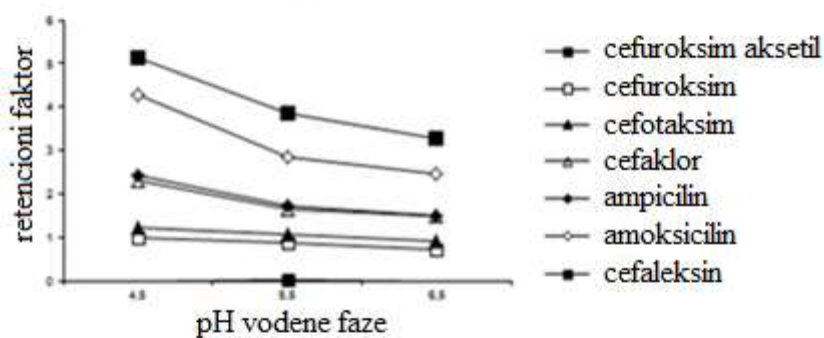
7.1.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA

U preliminarnoj fazi istraživanja izvršena je gruba procena uticaja različitih faktora, vezanih za mobilnu fazu i hromatografski sistem uopšte, na retenciono ponašanje analita u odabranoj *Alltech Silica* koloni. U tu svrhu ispitani su temperatura kolone, brzina protoka mobilne faze, sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze. Kako se pokazalo da temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze imaju predvidiv uticaj na hromatografske sisteme, tako nije postojala potreba da se priroda te zavisnosti detaljnije ispituje. Stoga su u daljim fazama oba ova faktora bila fiksirana na konstantnim, prethodno odabranim vrednostima (temperatura kolone na 30° C, a protok mobilne faze na 1 mL min⁻¹). S druge strane, u preliminarnoj fazi zaključeno je da preostali faktori koji se odnose na sastav mobilne faze (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze) značajno utiču na hromatografsko ponašanje analita u datom HILIC sistemu, pa je njihov uticaj dalje ispitivan. Prvo su ispitani široki opsezi vrednosti faktora mobilne faze, a potom su oni u cilju dobijanja prihvatljivog trajanja hromatografske analize suženi. Prema tome, definisani opsezi za faktore mobilne faze bili su sledeći: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi vrednosti od 80 % do 90 %, pH vrednosti vodene faze od 4,5 do 6,5 i sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi od 70 mmol L⁻¹ do 130 mmol L⁻¹.

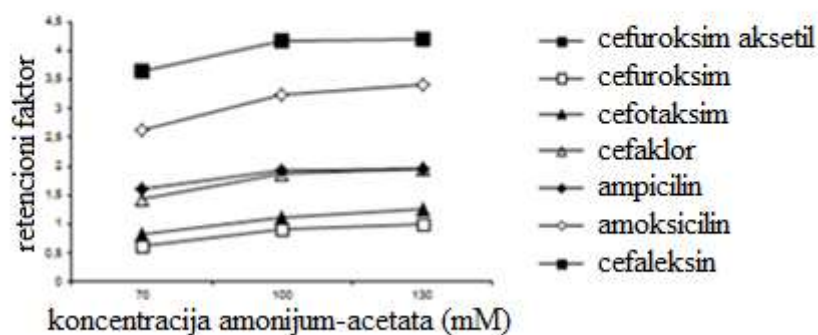
U cilju analize faktorskih uticaja na retenciono ponašanje analita u ovoj fazi najpre je primenjen jednostavan *one-factor-at-a-time* pristup prema kojem se ispituje uticaj jednog faktora na odabrani odgovor sistema tako što se svi ostali faktori drže na konstantnom nivou. U konkretnom slučaju, svaki od tri ispitivana faktora mobilne faze (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze) variran je pojedinačno u tri tačke (na gornjem, centralnom i donjem nivou), pri čemu su preostala dva faktora održavana na konstantnom (centralnom) nivou. Na osnovu toga, konstruisani su grafici zavisnosti retencionih faktora analita od pojedinačnih faktora mobilne faze (slika 17).



A)



B)



C)

Slika 17. Zavisnost retencioni faktora analiziranih β -laktamskih antibiotika od pojedinačnih faktora mobilne faze: A) sadržaj acetonitrila (pH vrednost vodene faze 5,5 i koncentracija amonijum-acetata 100 mmol L⁻¹); B) pH vrednost vodene faze (sadržaj acetonitrila 85 % i koncentracija amonijum-acetata 100 mmol L⁻¹); C) koncentracija amonijum-acetata (sadržaj acetonitrila 85 % i pH vrednost vodene faze 5,5).

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. J Sep Sci 2012; 35: 1424–1431

Eksperimentalno dobijeni podaci, grafički prikazani na slici 17, ukazuju na činjenicu da se s povećanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, odnosno sa smanjenjem pH vrednosti vodene faze produžava zadržavanje analiziranih supstanci u datom HILIC sistemu. Međutim, jedan od nedostataka *one-factor-at-a-time* pristupa je nemogućnost identifikacije faktorskih interakcija. Zato je u nastavku istraživanja ispitan uticaj sva tri faktora mobilne faze na retenciono ponašanje analiziranih supstanci na sistematičan način uz primenu hemometrijskog pristupa, pri čemu su za definisanje eksperimentalnog prostora zadržani opsezi ispitivanih faktora koji su postavljeni u preliminarnoj fazi istraživanja. Na taj način, kodiranim vrednostima -1 i +1 dodeljene su sledeće stvarne vrednosti faktora: za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi vrednosti 80 % i 90 %, za pH vrednost vodene faze vrednosti 4,5 i 6,5, a za sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi vrednosti 70 mmol L⁻¹ i 130 mmol L⁻¹.

7.1.2. GRAĐENJE EKSPERIMENTALNIH MODELA I NJIHOVA STATISTIČKA PROCENA

Kako je cilj ovog dela istraživanja bio analiza retencionog ponašanja β -laktamskih antibiotika, primenjen je optimizacioni tip dizajna koji omogućava građenje matematičke zavisnosti između ispitivanih faktora i retencionih faktora odgovarajućih analita. U konkretnom slučaju, zbog najmanjeg broja eksperimenata koje je neophodno izvesti, odlučeno je da se kao eksperimentalni dizajn upotrebi Box-Benken dizajn kojim će svaki od odabranih faktora mobilne faze biti ispitan na tri nivoa. Ovaj tip dizajna sastoji se od tri 2² puna faktorska dizajna, pri čemu su u svakom od njih dva faktora raspoređena prema matrici 2² punog faktorskog dizajna, a nivo trećeg faktora podešen je na kodiranu vrednost 0. Dizajn je dopunjen s tri replikacije u centralnoj tački kako bi se omogućila odgovarajuća statistička procena rezultata. Plan eksperimenata s nivoima faktora, kao i njihovim kodiranim vrednostima, predstavljen je u tabeli 2, koja je prikazana u Eksperimentalnom delu disertacije u poglavlju 6.4. Nakon izvedenih eksperimenata s dobijenih hromatograma očitavana su retencionna vremena. Iz vrednosti retencionih vremena i retencionog vremena pika mobilne faze izračunati su retencioni faktori. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Eksperimentalno dobijeni rezultati retencionih faktora β -laktamskih antibiotika

Eksp.	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7
1	0,001	0,413	0,523	1,320	1,435	2,296	2,446
2	0,000	2,181	2,510	4,219	4,480	8,023	10,515
3	-0,010	0,364	0,464	0,718	0,718	1,088	1,270
4	-0,018	1,498	1,779	2,858	2,858	4,780	6,800
5	0,001	0,255	0,309	0,636	0,669	1,020	1,218
6	0,008	1,376	1,665	2,599	3,084	4,805	7,572
7	0,002	0,431	0,541	0,841	0,841	1,279	1,484
8	0,000	2,052	2,484	3,527	3,527	6,261	8,608
9	-0,012	0,541	0,767	1,539	1,652	3,001	3,507
10	-0,026	0,336	0,519	1,013	1,013	1,676	2,243
11	-0,003	0,838	1,037	2,062	2,062	3,859	4,009
12	0,001	0,611	0,927	1,379	1,379	2,261	2,710
13	0,002	0,665	0,804	1,299	1,299	2,117	2,689
14	0,007	0,579	0,902	1,385	1,385	2,257	2,825
15	0,000	0,649	0,806	1,295	1,295	2,059	2,580

k_1 – retencioni faktor cefuroksim-aksetila; k_2 – retencioni faktor cefuroksima; k_3 – retencioni faktor cefotaksima; k_4 – retencioni faktor cefaklora; k_5 – retencioni faktor ampicilina; k_6 – retencioni faktor amoksicilina; k_7 – retencioni faktor cefaleksina

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. J Sep Sci 2012; 35: 1424–1431

Metodom višestruke linearne regresije retencioni podaci fitovani su u polinom drugog reda. Adekvatnost dobijenih eksperimentalnih modela procenjena je ANOVA testom, a kao relevantni statistički parametri korišćeni su R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 . Regresioni koeficijenti dobijenih kvadratnih modela, njihova statistička značajnost, kao i ostali relevantni statistički parametri prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za posmatrane odgovore i njihova statistička analiza

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

	<i>k</i> ₁		<i>k</i> ₂		<i>k</i> ₃		<i>k</i> ₄	
	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
b₁	-0,001	0,8587	0,71	<0,0001*	0,83	<0,0001*	1,21	<0,0001*
b₂	-0,005	0,1632	-0,15	0,0028*	-0,14	0,0086*	-0,40	0,0005*
b₃	0,004	0,2650	0,18	0,0012*	0,22	0,0015*	0,25	0,0041*
b₁₂	-0,002	0,6388	-0,16	0,0086*	-0,17	0,0179*	-0,19	0,0457*
b₁₃	-0,021	0,6205	0,12	0,0214*	0,15	0,0293*	0,18	0,0531
b₂₃	0,005	0,3088	-0,01	0,8937	0,03	0,5086	-0,39	0,6091
b₁₁	0,001	0,7571	0,46	<0,0001*	0,46	0,0003*	0,68	0,0003*
b₂₂	-0,011	0,0468*	0,02	0,6664	0,02	0,6754	0,27	0,0142*
b₃₃	-0,002	0,6586	-0,07	0,1466	-0,05	0,3940	-0,10	0,2251
R²	0,7276		0,9947		0,9933		0,9935	
Adjusted R²	0,2373		0,9853		0,9813		0,9819	
Predicted R²	-3,037		0,9265		0,9055		0,9009	

*k*₁ – retencioni faktor cefuroksim-aksetila; *k*₂ – retencioni faktor cefuroksima; *k*₃ – retencioni faktor cefotaksima; *k*₄ – retencioni faktor cefaklora; R² – koeficijent determinacije

*x*₁ – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); *x*₂ – pH vrednost vodene faze; *x*₃ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

* koeficijenti modela značajni za *p* < 0,05

	<i>k₅</i>		<i>k₆</i>		<i>k₇</i>	
	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
b₁	1,29	<0,0001*	2,27	<0,0001*	3,38	<0,0001*
b₂	-0,46	0,0006*	-0,92	0,0002*	-0,93	0,0010*
b₃	0,17	0,0317*	0,39	0,0096*	0,28	0,0884
b₁₂	-0,23	0,0418*	-0,51	0,0138*	-0,63	0,0206*
b₁₃	0,07	0,4521	0,30	0,0806	0,19	0,3580
b₂₃	-0,01	0,9020	-0,07	0,6390	-0,01	0,9656
b₁₁	0,78	0,0003*	1,27	0,0003*	2,08	0,0001*
b₂₂	0,27	0,0259*	0,63	0,0069*	0,48	0,0605
b₃₃	-0,07	0,4483	-0,08	0,6206	-0,06	0,7775
R²	0,9923		0,9936		0,9939	
Adjusted R²	0,9784		0,9820		0,9829	
Predicted R²	0,8807		0,9020		0,9057	

k₅ – retencioni faktor ampicilina; *k₆* – retencioni faktor amoksicilina; *k₇* – retencioni faktor cefaleksina; R² – koeficijent determinacije

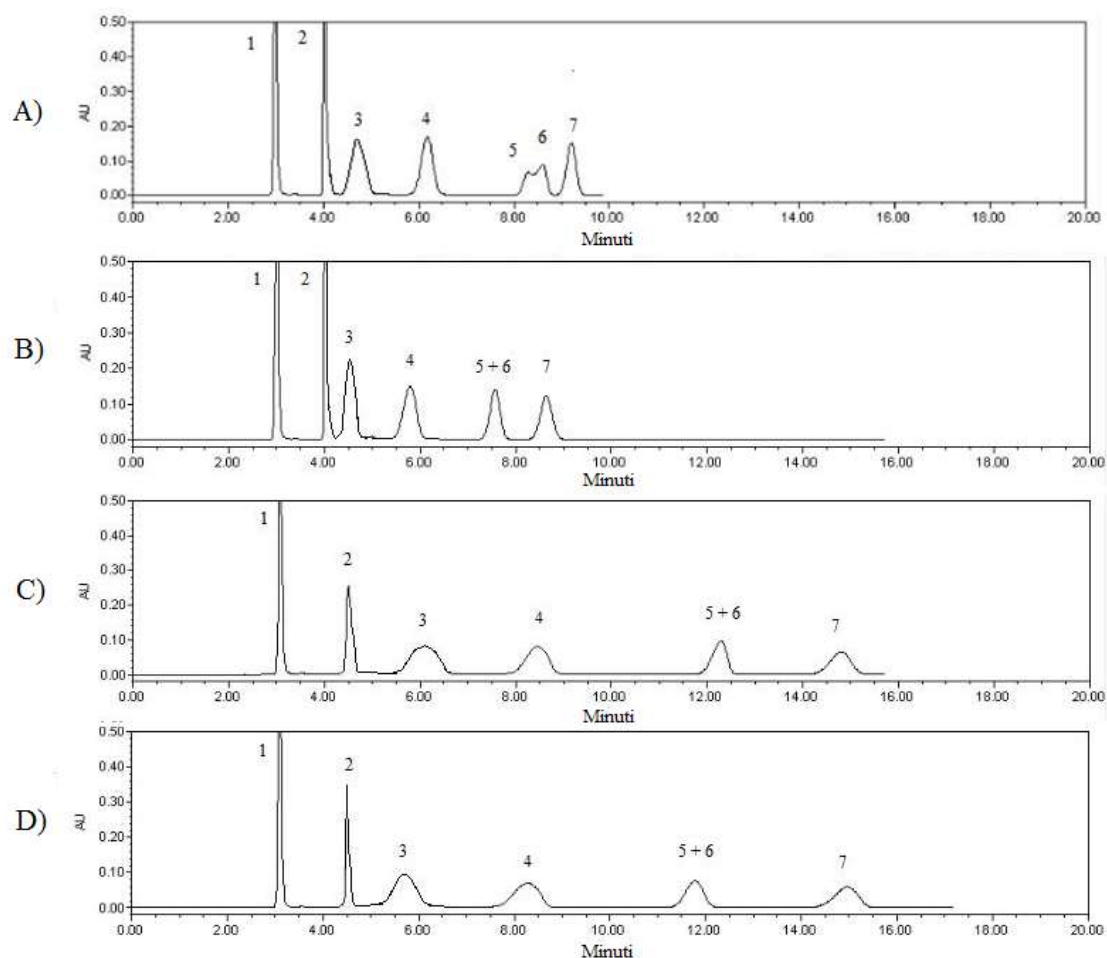
* koeficijenti modela značajni za $p < 0,05$

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. J Sep Sci 2012; 35: 1424–1431

Na osnovu statističkih parametara iz tabele 7 može se zaključiti da je jedino model cefuroksim-aksetila neadekvatan. Ovaj podatak nije iznenađujuć, pošto se cefuroksim-aksetil eluirao zajedno s pikom mobilne faze pod svim primenjenim hromatografskim uslovima, tj. ponašao se neretenciono. Ovakvo retenciono ponašanje cefuroksim-aksetila sasvim je očekivano s obzirom da je on jedino jedinjenje iz analizirane smeše koje ne poseduje jonizacioni centar u svojoj strukturi, što ga čini najmanje polarnim. Što se tiče ostalih modela, vrednosti R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 bliske 1,0 potvrđuju njihovu adekvatnost i dobru sposobnost predviđanja. Drugim rečima, dobijeni modeli izvršili su zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalno dobijenih retencionih podataka. Koeficijenti polinoma drugog reda koji su bili statistički značajni ($p < 0,05$) ušli su u konačne retencione modele analiziranih supstanci.

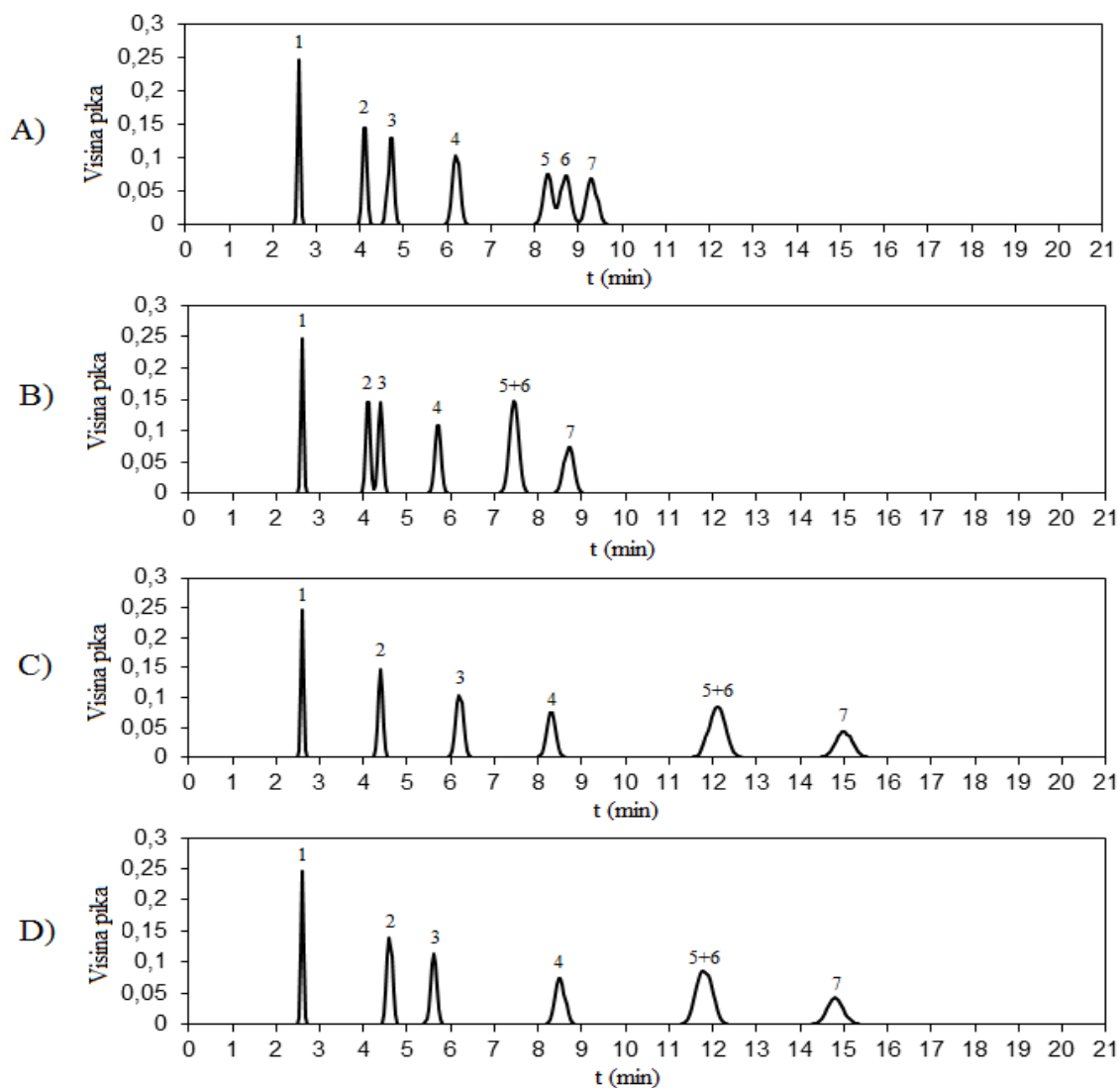
7.1.3. VERIFIKACIJA KROZ EKSPERIMENTE KREIRANIH RETENCIONIH MODELA

Nakon statističke potvrde pouzdanosti uspostavljenih retencionih modela β -laktamskih antibiotika sprovedena je i njihova eksterna verifikacija izvođenjem četiri dodatna eksperimenta u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora. Dobijeni hromatogrami predstavljeni su na slici 18. Nakon toga su eksperimentalno dobijena retenciona vremena analiziranih supstanci upoređena sa teorijskim vrednostima retencionih vremena, a koja su izračunata rešavanjem kreiranih kvadratnih jednačina za odabrane kombinacije vrednosti ispitivanih faktora. Rešenja datih jednačina predstavljena su na simuliranim hromatogramima na slici 19. Izračunati su koeficijenti korelacije (r) između eksperimentalno dobijenih i simuliranih vrednosti retencionih faktora za svaku od analiziranih supstanci. Odgovarajuće r vrednosti bile su u rasponu 0,9594–0,9938, čime je dokazano da kreirani matematički modeli omogućavaju zadovoljavajuće retenciono predviđanje analiziranih β -laktamskih antibiotika u ispitanom eksperimentalnom prostoru faktora mobilne faze.



Slika 18. Eksperimentalno dobijeni hromatogrami za verifikaciju pri sledećim sastavima mobilne faze A) acetonitril–vodena faza (100 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 5,0) (83:17 V/V); B) acetonitril–vodena faza (100 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 6,0) (83:17 V/V); C) acetonitril–vodena faza (100 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 5,0) (87:13 V/V); D) acetonitril–vodena faza (100 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 6,0) (87:13 V/V). Pikovi analita označeni su brojevima: 1) cefuroksim-aksetil; 2) cefuroksim; 3) cefotaksim; 4) cefaklor; 5) ampicilin; 6) amoksicilin; 7) cefaleksin.

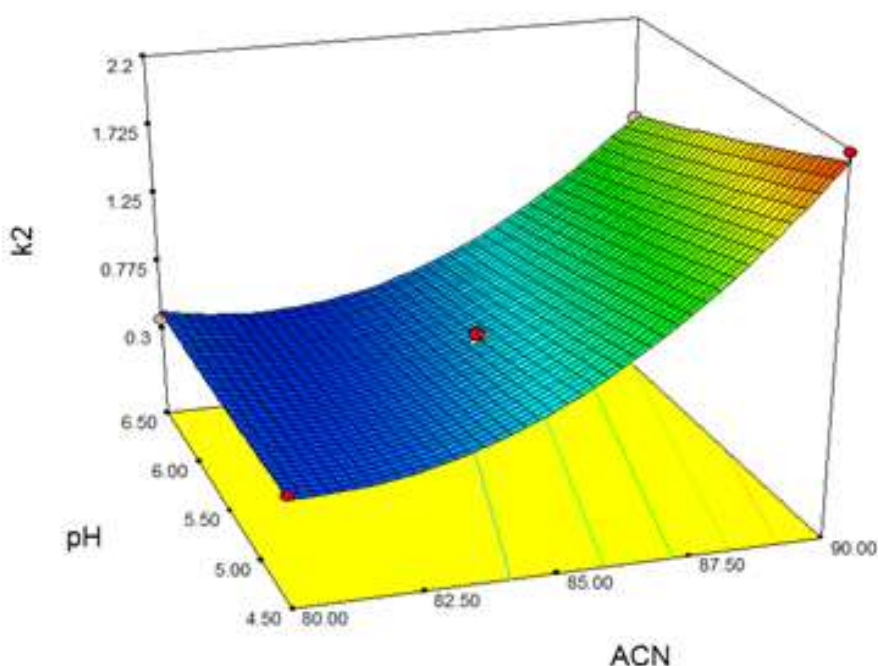
Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. *J Sep Sci* 2012; 35: 1424–1431



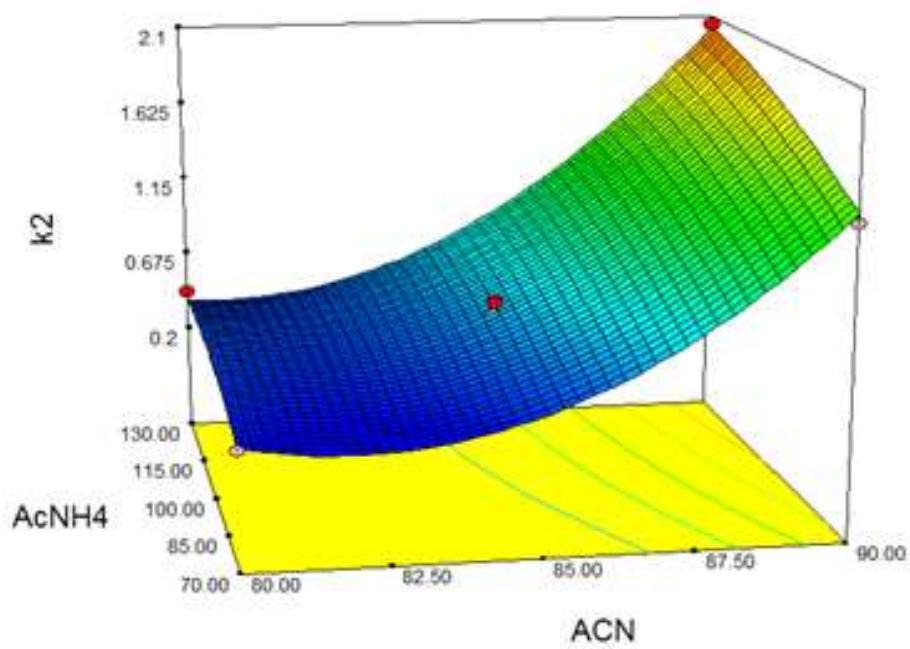
Slika 19. Simulirani hromatogrami za sledeće kombinacije vrednosti ispitivanih faktora mobilne faze: A) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 83 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 100 mmol L⁻¹, pH 5,0; B) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 83 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 100 mmol L⁻¹, pH 6,0; C) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 87 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 100 mmol L⁻¹, pH 5,0; D) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 87 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 100 mmol L⁻¹, pH 6,0. Brojevi kojima su označeni pikovi odgovarajućih analita isti su kao i na hromatogramima prikazanim na slici 18.

7.1.4. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA

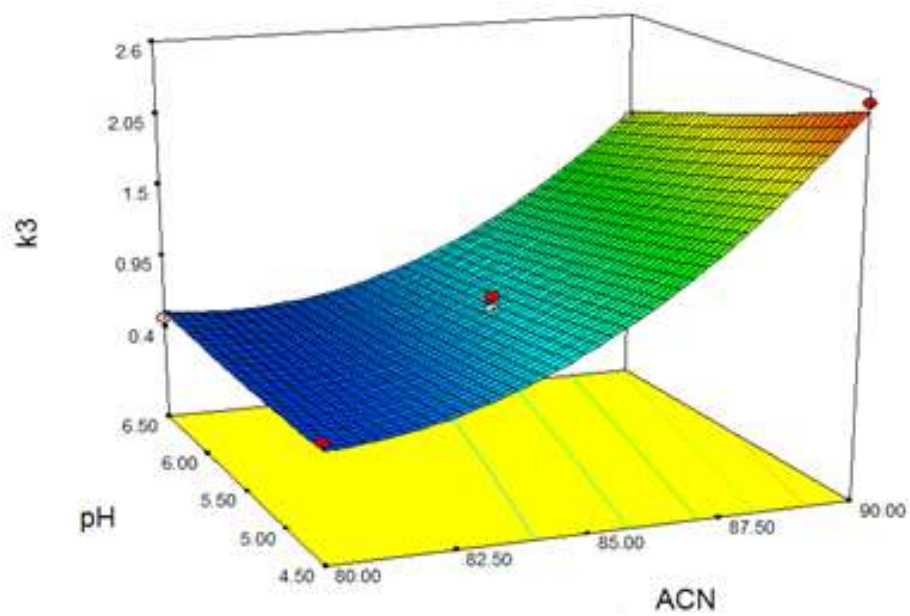
Osnovna prednost metodologije eksperimentalnog dizajna jeste što omogućava ne samo ispitivanje uticaja pojedinačnih faktora na odabrane odgovore sistema, nego i njihovih interakcija. Najjednostavniji način da se one prikažu jeste konstruisanje trodimenzionih površina odgovora, odnosno zavisnosti odabranog odgovora sistema od dva ispitivana faktora. U slučaju retencionih modela β -laktamskih antibiotika statističkom analizom identifikovani su statistički značajni regresioni koeficijenti (tabela 7). Potom su u obliku trodimenzionih površina odgovora grafički prikazane statistički značajne interakcije. Zbog neadekvatnosti izostavljen je retencioni model cefuroksim-aksetila. U retencionim modelima cefuroksima i cefotaksima statistički su značajne dve faktorske interakcije: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednost vodene faze, kao i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi. One su ilustrovane na odgovarajućim trodimenzionim površinama odgovora (slika 20 A–D). S druge strane, u retencione modele preostalih analita (cefaklora, ampicilina, amoksicilina i cefaleksina) uključena je samo jedna faktorska interakcija i to ona između sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi. U skladu s tim, konstruisane su i odgovarajuće trodimenzione površine odgovora (slika 20 E–H).



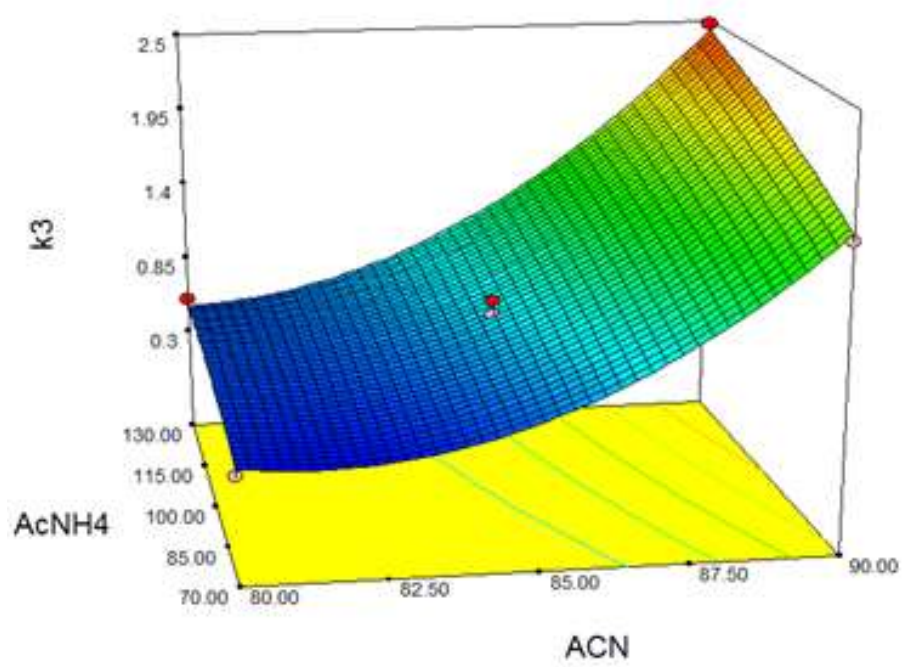
A)



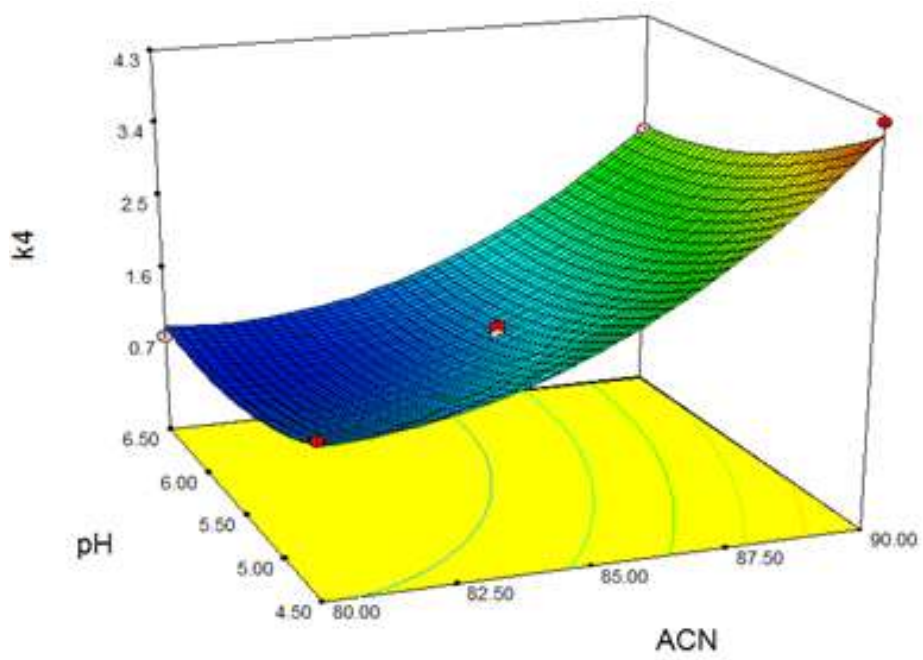
B)



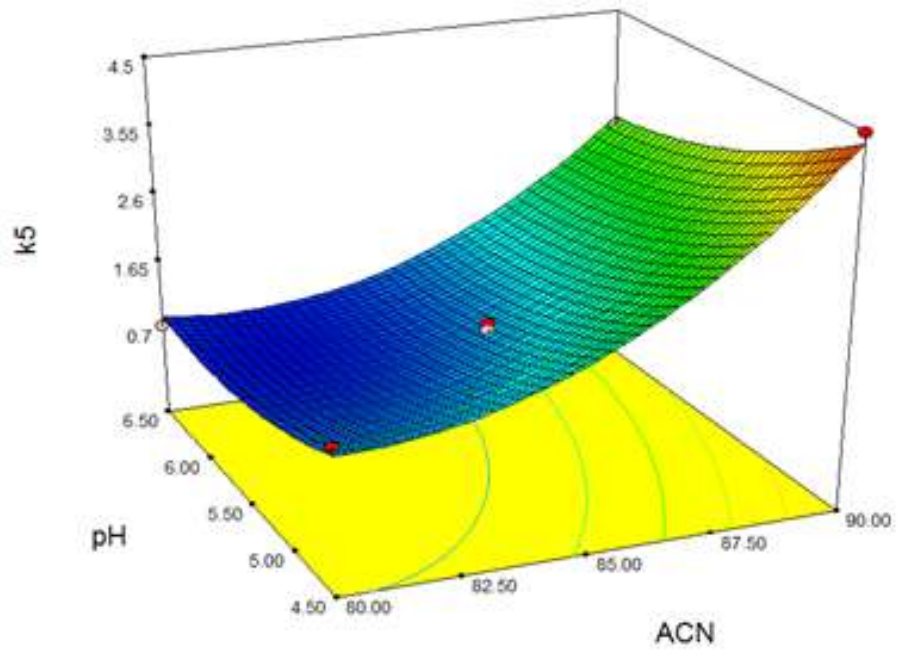
C)



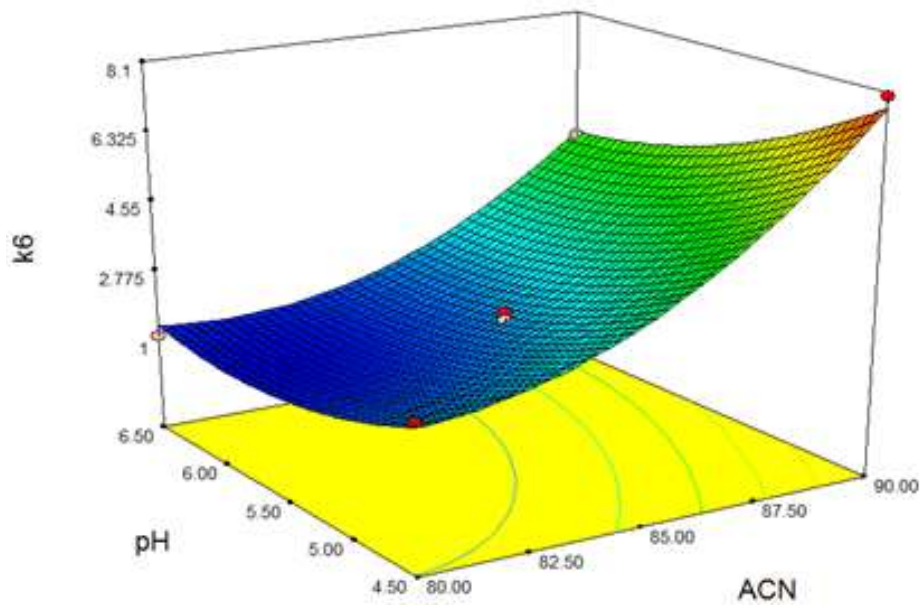
D)



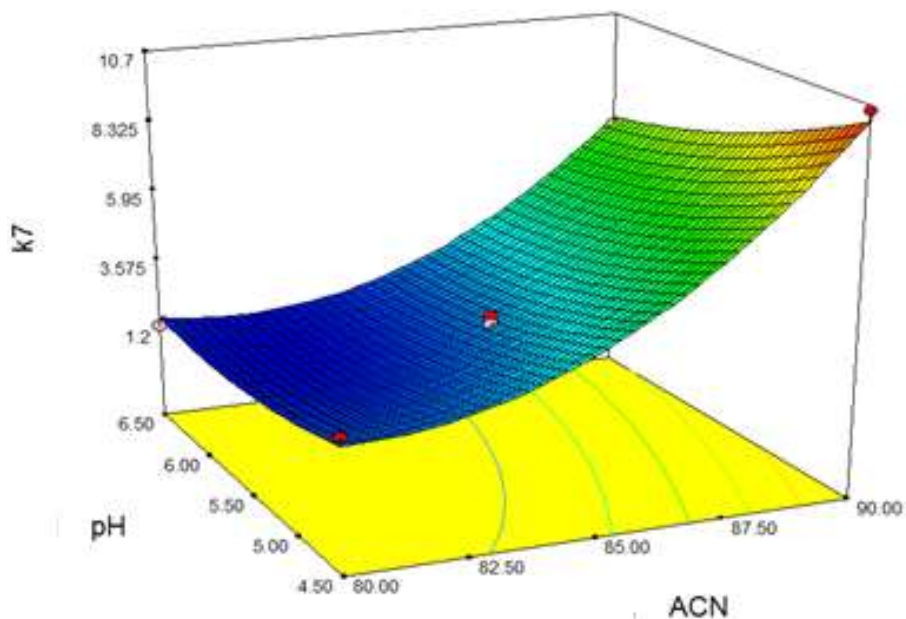
E)



F)



G)



H)

Slika 20. Trodimenzione površine odgovora: A) $k_2 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); B) $k_2 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi); C) $k_3 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); D) $k_3 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi); E) $k_4 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); F) $k_5 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); G) $k_6 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); H) $k_7 = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze). Retencioni faktori odgovaraju sledećim analitima: k_2 – cefuroksim; k_3 – cefotaksim; k_4 – cefaklor; k_5 – ampicilin; k_6 – amoksisicilin; k_7 – cefaleksin.

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. J Sep Sci 2012; 35: 1424–1431

Još jedna značajna prednost hemometrijskog pristupa jeste i kvantifikacija faktorskih uticaja čime je u konkretnom slučaju postignut kompletan opis retencionog ponašanja analiziranih β -laktamskih antibiotika na silika koloni. Uticaji faktora i njihovih interakcija procenjeni su na osnovu koeficijenata kreiranih matematičkih modela (tabela 7), a vizuelnu potvrdu izvedenih zaključaka obezbedile su konstruisane trodimenzione površine odgovora (slika 20).

Cefuroksim-aksetil ponašao se neretenciono u konkretnom HILIC sistemu, odnosno u ispitanom eksperimentalnom prostoru nije došlo do zadovoljavajućeg razdvajanja njegovog pika od pika mobilne faze. Na osnovu koeficijenata b_1 , b_2 i b_3 retencionih modela za preostalih šest analita procenjivani su uticaji pojedinačnih faktora mobilne faze, odnosno sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi na njihovo retenciono ponašanje. Naime, svi koeficijenti linearnih članova modela bili su statistički značajni, stoga je stepen uticaja faktora procenjivan poređenjem apsolutnih vrednosti koeficijenata, a smer uticaja na osnovu njihovih predznaka. Kako su b_1 koeficijenti svih modela po apsolutnoj vrednosti bili najveći, tako je zaključeno da je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi ispoljio najveći uticaj na retencione faktore analiziranih β -laktamskih antibiotika. Pozitivni predznaci ovih koeficijenata ukazuju na činjenicu da su se s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi vrednosti retencionih faktora analita povećavali. Međutim, statistička značajnost kvadratnih članova modela b_{11} ukazuje na kvadratnu prirodu ove zavisnosti, odnosno da s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dolazi do nelinearnog porasta retencionih faktora analiziranih supstanci. Ovakav tip zavisnosti karakterističan je za HILIC sisteme, jer se s povećanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi smanjuje polarnost mobilne faze, čime se smanjuje njena eluaciona moć, odnosno sposobnost da eluira polarne analite s polarne stacionarne faze; u ovom slučaju, silika kolone. S druge strane, koeficijenti b_2 i b_3 po apsolutnoj vrednosti manji su od koeficijenata b_1 u kreiranim modelima, što ukazuje na činjenicu da pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata imaju slabiji uticaj na retencione faktore analita. Međutim, ovi koeficijenti međusobno se razlikuju po predznaku. Naime, negativan predznak b_2 koeficijenata pretpostavlja opadanje retencionih faktora s porastom pH vrednosti vodene faze. Kada je reč o baznim analitima, pronađeni su brojni dokazi u

literaturi koji ukazuju na porast njihovih retencionih faktora s porastom pH vrednosti vodene faze usled postojanja privlačne elektrostatičke interakcije [65]. Zato je donekle i bilo očekivano da ovaj faktor ispolji suprotan efekat na retenciono ponašanje kiselih analita usled postojanja odbojne elektrostatičke interakcije. Naime, s povećanjem pH vrednosti vodene faze došlo bi do pospešivanja jonizacije silanolnih grupa sa površine silika kolone, čime bi elektrostatičko odbijanje postajalo sve snažnije, a time bi i zadržavanje analita u sistemu bilo sve slabije. Međutim, analizirana smeša je pored kiselih analita (cefuroksim i cefotaksim), koji su pod primenjenim hromatografskim uslovima bili u anjonskom obliku, sadržala i amfoterne analite (cefaklor, ampicilin, amoksicilin i cefaleksin), koji su pod istim tim uslovima bili u cviterjonskom obliku. Negativni predznak b_2 koeficijenata u svim modelima ukazuje na dominaciju odbojnih elektrostatičkih interakcija u retencionom mehanizmu i kiselih i amfoternih analita. U slučaju retencionih modela cefaklora, ampicilina i amoksicilina statistički značajan bio je i kvadratni član b_{22} , ukazujući na kvadratnu prirodu zavisnosti retencionih faktora ovih analita od pH vrednosti vodene faze. Koeficijenti b_3 , kojima je opisan uticaj koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi na retencione faktore analita, imali su pozitivan predznak, što znači da je s povećanjem koncentracije ove soli dolazilo do produženog zadržavanja analita na površini stacionarne faze. U konkretnom HILIC sistemu NH_4^+ jon iz acetatnog pufera blokira negativno naelektrisanje na površini silika stacionarne faze, čime se smanjuje elektrostatičko odbijanje između negativno naelektrisanih silanolnih grupa i molekula analita. Povećanjem koncentracije amonijum-acetata, sve više silanolnih grupa biva blokirano NH_4^+ jonima, čime se zadržavanje analita u hromatografskom sistemu znatno produžava.

Statistička značajnost pojedinih koeficijenata članova interakcija uspostavljenih retencionih modela ukazuje na činjenicu da pojedinačni faktori nisu nezavisno uticali na retenciono ponašanje β -laktamskih antibiotika. Naime, koeficijenti b_{12} u slučaju svih modela bili su statistički značajni, što potvrđuje postojanje interakcije između sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodene faze. Na trodimenzionim površinama odgovora (slika 20 A, C, E–H) može se uočiti da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora analita pri manjim pH vrednostima vodene faze, nego pri većim. Razlog za ovakvo retenciono ponašanje može

biti činjenica da je na nižim pH vrednostima mobilne faze i većem sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi manji doprinos elektrostatičke interakcije, a veći doprinos procesa raspodele ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. U slučaju retencionih modela cefuroksima i cefotaksima koeficijenti b_{13} , koji karakterišu interakciju između sadržaja acetonitrila i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, bili su takođe statistički značajni. Posmatranjem trodimenzionih površina odgovora (slika 20 B, D) uočava se da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora analita pri većim vrednostima koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, nego pri manjim. Ovo se može objasniti na sličan način kao i prethodno pomenuta interakcija, jer pri većim koncentracijama pufera dolazi do smanjenja udela elektrostatičke interakcije u ukupnom retencionom mehanizmu, usled čega proces raspodele postaje dominantan.

7.1.5. UTICAJ STRUKTURNIH OSOBINA β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA NA NJHOVO RETENCIONO PONAŠANJE I RETENCIONE MEHANIZME

S obzirom da su u ovom delu disertacije u istom HILIC sistemu analizirani derivati iz iste hemijske grupe, njihove strukturne razlike nisu bile velike. Uprkos tome, razlike u njihovom retencionom ponašanju, pod odgovarajućim hromatografskim uslovima, bile su čak i drastično različite. Na osnovu toga, opravdano se može zaključiti da je u ispitivanom HILIC sistemu zastupljen izuzetno složen retencioni mehanizam. Redosled eluiranja analiziranih β -laktamskih antibiotika bio je uvek isti u ispitivanom eksperimentalnom prostoru faktora mobilne faze, što se može videti na hromatogramima prikazanim na slici 18. Na kraju ovog dela istraživanja biće ukratko razmotreni prethodno izvedeni zaključci o retencionom ponašanju β -laktamskih antibiotika na silika koloni sa aspekta njihovih strukturnih karakteristika.

Kako procesi raspodele, adsorpcije i elektrostatičke interakcije mogu biti uključeni u ukupni HILIC retencioni mehanizam, strukturne osobine analita u značajnoj meri određuju njihovo retenciono ponašanje u datom HILIC sistemu. U konkretnom istraživanju, kao strukturne karakteristike ispitivanih β -laktamskih antibiotika, odabrane su i praćene polarnost i jonizacija (numerički izražene preko $\log P$ i pK_a vrednosti). Te

vrednosti su sledeće za: cefuroksim-aksetil ($\log P = 0,89$), cefuroksim ($\log P = 0,05$; $pK_a = 2,50$), cefotaksim ($\log P = -0,16$; $pK_a = 3,75$), cefaklor ($\log P = 0,40$; $pK_{a1} = 1,50$; $pK_{a2} = 7,20$), ampicilin ($\log P = 1,35$; $pK_{a1} = 2,50$; $pK_{a2} = 7,30$), amoksicilin ($\log P = 0,87$; $pK_{a1} = 2,40$; $pK_{a2} = 7,40$), cefaleksin ($\log P = 0,65$; $pK_{a1} = 2,50$; $pK_{a2} = 7,50$).

Kao što je već prethodno napomenuto, cefuroksim-aksetil ponašao se neretenciono bez obzira na primenjene hromatografske uslove, što nije bio slučaj s cefuroksimom. Ovakvo ponašanje sasvim je očekivano pošto nagrađeni estar značajno povećava lipofilnost molekula ($\log P = 0,89$), pa je i njegovo zadržavanje na površini stacionarne faze skraćeno. Kako je u molekulu cefuroksim-aksetila jonizacioni centar (karboksilna grupa) blokiran estarskom funkcionalnom grupom, promena pH vrednosti mobilne faze i koncentracije amonijum-acetata u mobilnoj fazi, takođe, nisu uticale na njegovo retenciono ponašanje. S druge strane, molekul cefuroksima znatno je hidrofilniji jer je karboksilna grupa slobodna, pa se on eluirao nakon pika cefuroksim-aksetila. Ako se u obzir uzme činjenica da se karboksilna kiselina nalazila u anjonskom obliku u ispitanom pH opsegu mobilne faze, onda je bilo sasvim očekivano da promene jonske jačine i pH vrednosti mobilne faze utiču na retenciono ponašanje cefuroksima, što je kroz prethodne faze istraživanja i potvrđeno. Cefotaksim je strukturno izuzetno sličan cefuroksimu, ali se on ipak zbog nešto veće hidrofilnosti eluirao nakon cefuroksima. Treba takođe napomenuti da su se cefuroksim i cefotaksim kao kiseli molekuli u svom anjonskom obliku eluirali pre amfoternih molekula (cefaklor, ampicilin, amoksicilin i cefaleksin), odnosno onih koji su imali dva jonizaciona centra i koji su se nalazili u cviterjonskom obliku. Naime pozitivno naelektrisanje, koje potiče od sekundarne amino grupe u strukturi ovih molekula, verovatno je učestvovalo u privlačnim elektrostatičkim interakcijama s negativno naelektrisanim silanolnim grupama na površini silika stacionarne faze, što je donekle umanjilo efekat negativnog naelektrisanja elektrostatičkog odbijanja koje potiče od karboksilne grupe. Međutim, s obzirom da je s povećanjem pH vrednosti vodene faze dolazilo do bržeg eluiranja ovih analita, ukupni efekat ovih suprotstavljenih uticaja bio je ipak elektrostatičko odbijanje, koje je evidentno bilo slabije u poređenju s kiselim analitima. Prema tome, nakon cefotaksima eluirao se cefaklor, koji je, uzevši u obzir njegovu $\log P$ vrednost, najhidrofilniji od

preostala četiri molekula. Nakon njega, iz sistema su se redom eluirali pikovi ampicilina, amoksisilina i cefaleksina, odnosno prema redosledu rastuće polarnosti, što je i bilo u skladu s predviđanjem. Jedino se sa aspekta polarnosti i jonizacije molekula ne može objasniti položaj cefaklora na hromatogramu, za koji je očekivano da se eluira poslednji. Jedino objašnjenje za ovakvo retenciono ponašanje može biti postojanje direktnih polarnih interakcija nejonskog karaktera (poput vodoničnih veza i dipol–dipol interakcija) između polarnih grupa molekula cefaklora i površine silikagel stacionarne faze.

Naučnoistraživački doprinos ovog dela disertacije ogleda se u tome da je hemometrijski pristup prvi put primenjen u cilju opisivanja retencionog ponašanja kiselih i amfoternih analita u nekom HILIC sistemu.

7.2. TEORIJSKI I EKSPERIMENTALNI MODELI U ANALIZI RETENCIONOG PONAŠANJA I RETENCIONI MEHANIZAMA ODABRANIH BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

Različiti tipovi polarnih analita mogu se razdvajati na brojnim polarnim i umereno polarnim stacionarnim fazama. Od vrste funkcionalne grupe koja je vezana za površinu odabrane stacionarne faze zavisi koji će tip interakcija biti u najvećoj meri odgovoran za zadržavanje analita, kao i način na koji će sastav mobilne faze uticati na njihovo retenciono ponašanje. Kao posledica toga, svaki HILIC sistem izuzetno je složen, stoga je za njihovo detaljno opisivanje neophodno primeniti sistematičan pristup koji će omogućiti dobijanje maksimalnog broja podataka iz izvedenih eksperimenata.

Analiza retencionog ponašanja i retencionih mehanizama različitih tipova analita na pojedinim HILIC stacionarnim fazama može se naći u literaturi. Međutim, kombinovanje teorijskih i eksperimentalnih modela, u cilju kompletnog opisa nekog HILIC sistema, do sada nije primenjeno. Stoga je cilj ovog dela disertacije bio da se ispituju retenciono ponašanje i retencioni mehanizmi baznih farmaceutski aktivnih supstanci (tioridazina, klozapina, sulpirida, feniramin-maleata, hlorfeniramin-maleata i lamotrigina) u pet kolona (dve silika, dve cijano i jedna diolna) građenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih modela.

U prvoj fazi ovog dela istraživanja kreirani su odgovarajući teorijski retencioni modeli koji će omogućiti analizu retencionih mehanizama odgovornih za razdvajanje ispitivanih analita u datom HILIC sistemu. Usled prisustva silanolnih grupa na površini silika stacionarnih faza, očekivano je prisustvo procesa katjonske izmene pozitivno naelektrisanih baznih analita. Da bi se ispitaio doprinos ovog procesa ukupnom retencionom mehanizmu u silika kolonama, kreirani su odgovarajući katjonsko–izmenjivački teorijski retencioni modeli fitovanjem retencionih podataka prikupljenih variranjem koncentracije soli u mobilnoj fazi. U svrhu opisa uticaja organskog rastvarača na retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci, kao i na razmatranje udela procesa raspodele i adsorpcije u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu u svih pet kolona, građeni su particioni i adsorpcioni teorijski retencioni modeli. Kako su diolna i preostale dve cijano kolone zapravo hemijske

modifikacije silika kolona, odnosno za vezivanje ovih funkcionalnih grupa korišćeni su propil lanci, ovi tipovi stacionarnih faza mogu se smatrati umereno polarnim. Kao posledica toga, očekivalo se da se odgovarajući bazni analiti mogu u datim kolonama razdvajati i HILIC i RP mehanizmom u zavisnosti od relativnog odnosa polarosti između stacionarne i mobilne faze. Građenje dvojnih HILIC/RP retencionih modela variranjem odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze u širokom rasponu vrednosti omogućilo je određivanje doprinosa HILIC i RP mehanizma retencionom procesu u zavisnosti od sastava mobilne faze, ali i određivanje odnosa vodenog i organskog udela mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza između jednog mehanizma u drugi.

U drugoj fazi ovog dela istraživanja građeni su eksperimentalni retencioni modeli uz pomoć hemometrijskog pristupa. Ovi modeli omogućili su detaljnu analizu faktorskih uticaja i retencionog ponašanja ispitivanih analita na *Betasil Silica* koloni. U svrhu prikupljanja eksperimentalnih podataka primenjen je Boks–Benken dizajn. Kreirani eksperimentalni retencioni modeli omogućili su istovremenu procenu uticaja sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi i drugih faktora mobilne faze (pH vrednost vodene faze i koncentracije pufera u vodenoj fazi) na retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci.

7.2.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA

U preliminarnoj fazi ovog dela istraživanja izvedeno je po nekoliko eksperimenata s različitim polarnim kolonama sa unapred definisanim sastavom mobilne faze s ciljem da se odaberu kolone s kojima će se izvoditi analize u daljim fazama. Zadovoljavajući izgled pikova, kao i prihvatljivo trajanje hromatografskih analiza postignuti su s dve silika, dve cijano i jednoj diolnoj stacionarnoj fazi, čije su karakteristike navedene u Eksperimentalnom delu disertacije, u poglavlju 6.5. Preliminarni eksperimenti bili su od značaja u identifikaciji potencijalnih hromatografskih faktora sa značajnim uticajem na retenciono ponašanje analita u datim kolonama, kao i za definisanje opsega vrednosti tih faktora koji će u nastavku istraživanja biti ispitani i na osnovu kojih će biti građeni odgovarajući teorijski i eksperimentalni retencioni modeli. Od parametara mobilne faze najveći uticaj na retenciono ponašanje analita imao je sadržaj acetonitrila u mobilnoj

fazi. Značajan uticaj, a posebno u slučaju silika kolona, imali su pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi. Osnovni kriterijumi prilikom definisanja raspona vrednosti parametara mobilne faze bili su da se analiti ponašaju retenciono i da hromatografske analize imaju prihvatljivo vreme trajanja. Na ovaj način postignuto je brzo i ekonomično prikupljanje podataka koji karakterišu retenciono ponašanje ispitivanih analita u narednim fazama istraživanja.

7.2.2. KATJONSKO–IZMENJIVAČKI RETENCIONI MODELI

Površina silika kolona prekrivena je silanolnim grupama, stoga se pri pH vrednostima mobilne faze iznad 4,0 ili 5,0 (pK_a silanolnih grupa oko 4,0) može očekivati da je pretežno negativno naelektrisana i da će se na njenoj površini odvijati proces katjonske izmene baznih analita. Preliminarna ispitivanja pokazala su da se retencioni faktori analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u ovim kolonama značajno menjaju s promenom pH vrednosti mobilne faze, tj. kada se menja udeo jonizovanih silanolnih grupa na površini stacionarne faze. Takođe, i promenom jonske jačine, odnosno koncentracije amonijum-acetata u mobilnoj fazi, tj. kada NH_4^+ joni u različitom stepenu kompetitivno stupaju u interakcije sa silanolnim grupama. Uticaj ovih faktora u preostale tri hemijski modifikovane silika kolone znatno je bio slabiji, jer diolne i cijano grupe nemaju sposobnost jonizacije. Pored toga, koncentracija rezidualnih silanolnih grupa na površini ovih kolona znatno je manja nego što je to slučaj s nemodifikovanim silikagel kolonama. Kao posledica toga, na njima je doprinos procesa katjonske izmene izuzetno mali.

Zato je odlučeno da u ovom delu disertacije bude ispitan udeo procesa katjonske izmene u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u dve silika kolone. U ovu svrhu uspostavljeni su odgovarajući katjonsko–izmenjivački retencioni modeli koji podrazumevaju linearnu zavisnost retencionih faktora analita od inverzne vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi (u konkretnom slučaju NH_4^+ jona), odnosno linearnu zavisnost logaritamske vrednosti retencionih faktora od logaritamske vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi. Kako je koncentracija NH_4^+ jona bila

proporcionalna koncentraciji soli amonijum-acetata u vodenoj fazi, ove vrednosti korišćene su prilikom građenja katjonsko–izmenjivačkih retencionih modela. Eksperimentalni podaci dobijeni su tako što su retencioni podaci ispitivanih analita prikupljani pri variranju koncentracije amonijum-acetata u rasponu od 5 mmol L⁻¹ do 55 mmol L⁻¹, pri čemu su ostali faktori mobilne faze održavani na konstantnim vrednostima (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi bio je 85 %, dok je pH vrednost vodene faze bila podešena na 5,0). Dobijene vrednosti retencionih faktora fitovane su u odgovarajuće katjonsko–izmenjivačke retencione modele okarakterisane jednačinama (19) i (20) koje su detaljno objašnjene u poglavlju 2.5. U tabeli 8 prikazani su koeficijenti tih modela sa *Betasil Silica* i *Bakerbond Silica* kolonama.

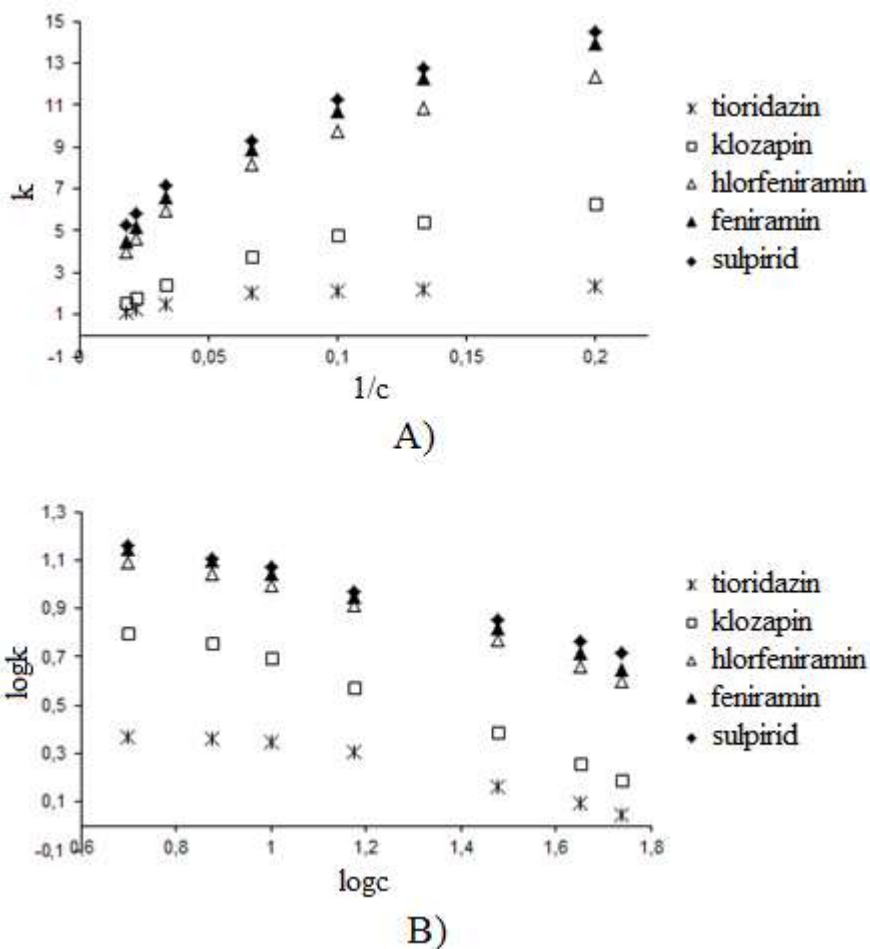
Tabela 8. Koeficijenti katjonsko–izmenjivačkih modela baznih analita sa dve silika kolone

Analiti Kolona	Modeli			
	$k = m (1/[C]) + a$		$\log k = m \log [C] + a$	
	a	m	a	m
<i>Betasil Silica</i> kolona				
Lamotrigin	0,24	0*	-0,58	0*
Tioridazin	1,24	6,67	0,64	-0,33
Klozapin	1,53	26,86	1,27	-0,61
Hlorfeniramin	4,17	45,99	1,46	-0,48
Feniramin	4,59	52,25	1,51	-0,48
Sulpirid	5,19	51,57	1,48	-0,43
<i>Bakerbond Silica</i> kolona				
Lamotrigin	0,18	0*	-0,70	0*
Tioridazin	0,67	8,39	0,66	-0,46
Klozapin	0,78	25,41	1,30	-0,75
Hlorfeniramin	2,32	43,35	1,51	-0,66
Feniramin	2,70	47,01	1,52	-0,61
Sulpirid	3,07	47,56	1,50	-0,57

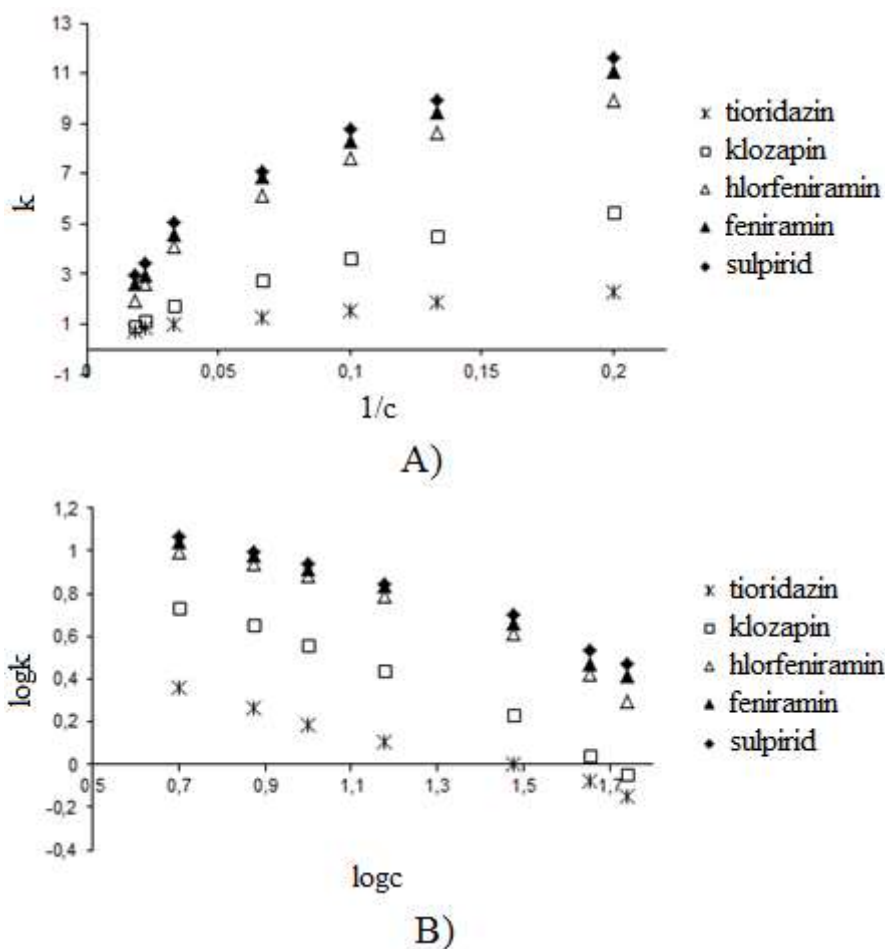
k – retencioni faktor analita; $[C]$ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi;
 a – odsečak linearnog modela; m – nagib linearnog modela

* nagib nije statistički značajan ($p > 0,05$)

Grafički prikazi uspostavljenih katjonsko–izmenjivačkih retencionih modela sa *Betasil Silica* i *Bakerbond Silica* kolonama predstavljeni su na slikama 21 i 22. Sa ovih grafika izostavljeni su retencioni podaci lamotrigina koji je pokazao neretenciono ponašanje u datom HILIC sistemu, pa ni promena koncentracije amonijum-acetata nije uticala na pomeranje pika lamotrigina na hromatogramu.



Slika 21. Katjonsko–izmenjivački retencioni modeli baznih analita sa *Betasil Silica* kolonom dobijeni variranjem koncentracije amonijum-acetata u rasponu od 5 mmol L⁻¹ do 55 mmol L⁻¹ (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 85 % i pH vrednost vodene faze 5,0) predstavljeni kao: A) zavisnost retencionih faktora od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi i B) zavisnost logaritma retencionih faktora od logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi.



Slika 22. Katjonsko–izmenjivački retencioni modeli baznih analita sa *Bakerbond Silica* kolonom dobijeni variranjem koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi u rasponu od 5 mmol L⁻¹ do 55 mmol L⁻¹ (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 85 % i pH vrednost vodene faze 5,0) predstavljeni kao: A) zavisnost retencionih faktora od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi i B) zavisnost logaritma retencionih faktora i logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi.

Analizom uspostavljenih modela procenjen je doprinos procesa katjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Odsustvo uticaja promene koncentracije amonijum-acetata na reticioni faktor lamotrigina ukazuje na odsustvo doprinosa procesa katjonske izmene u retencionom mehanizmu ovog analita. Ovo je sasvim očekivano ako se uzme u obzir činjenica da je lamotrigin slaba baza (pK_a konjugovane kiseline lamotrigina iznosi 3,4), pa se samim tim, pod primenjenim hromatografskim uslovima, nalazio u nejonizovanom obliku. Takav oblik nema mogućnost građenja elektrostatičke interakcije sa silanolnim grupama. Na ovo ukazuje i statistička neznačajnost nagiba kreiranih katjnsko–izmenjivačkih modela, prikazanih u tabeli 8. Kod ostalih analita primećen je doprinos procesa katjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Naime, njihove pK_a vrednosti su sledeće: tioridazin ($pK_a = 9,5$), klozapin ($pK_a = 7,6$), hlorfeniramin ($pK_a = 9,1$), feniramin ($pK_a = 9,3$) i sulpirid ($pK_a = 10,2$). Samim tim, svi ovi molekuli nalazili su se u katjnskom obliku pri pH vrednosti vodene faze 5,0, pa je proces katjonske izmene pod ovakvim uslovima bio moguć. Na osnovu odsečaka linearnih modela zavisnosti retencionih faktora ovih analita od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi koji su različiti od nule (tabela 8) može se izvesti zaključak da su u ukupni reticioni mehanizam preostalih analita, pored procesa katjonske izmene, uključeni i neki drugi procesi (npr. raspodela i/ili adsorpcija) [33]. Do istog zaključka može se doći i na osnovu nagiba linearnih modela zavisnosti logaritma retencionih faktora analita od logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi čije se vrednosti nalaze između -1 i 0 (tabela 8).

7.2.3. PARTICIONI I ADSORPCIONI RETENCIONI MODELI

U prethodnoj fazi istraživanja ustanovljeno je da je u ukupni reticioni mehanizam tioridazina, klozapina, hlorfeniramina, feniramina i sulpirida u silika kolonama, pored procesa katjonske izmene, uključen još neki proces, dok je u ostalim hemijski modifikovanim silika kolonama (diolna i dve cijano kolone) u preliminarnoj fazi istraživanja već ustanovljen veoma slab doprinos procesa katjonske izmene. Zato je cilj ove faze istrživanja bio da se, kroz kreirane particione i adsorpcione retencione modele, ispita uticaj odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze na retenciono ponašanje

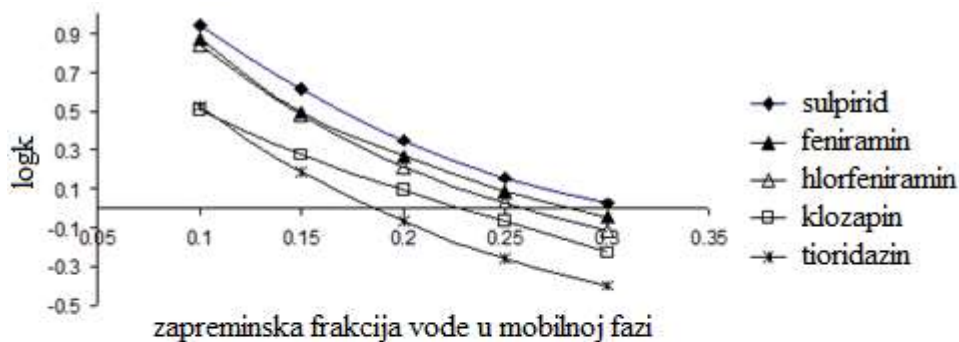
ispitivanih baznih farmaceutski aktivnih supstanci, kao i doprinos procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. U ovu svrhu variran je sadržaj vode u mobilnoj fazi u rasponu od 10 % do 30 %, koji pripada HILIC regionu sastava mobilnih faza, pri čemu su vrednosti ostalih faktora mobilne faze održavani na konstantnom nivou (koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi bila je 20 mmol L^{-1} , dok je pH vrednost vodene faze bila podešena na 3,5). Nakon toga, prikupljeni retencioni podaci fitovani su u odgovarajuće teorijske retencione modele. Particioni i adsorpcioni retencioni modeli okarakterisani su jednačinama (4) i (5), a detaljno su opisani u poglavljima 2.1, odnosno 2.2. U tabeli 9 prikazani su regresioni koeficijenti partitionih i adsorpcionih retencionih modela i odgovarajući koeficijenti determinacije.

Tabela 9. Koeficijenti particionih i adsorpcionih modela baznih analita sa pet kolona

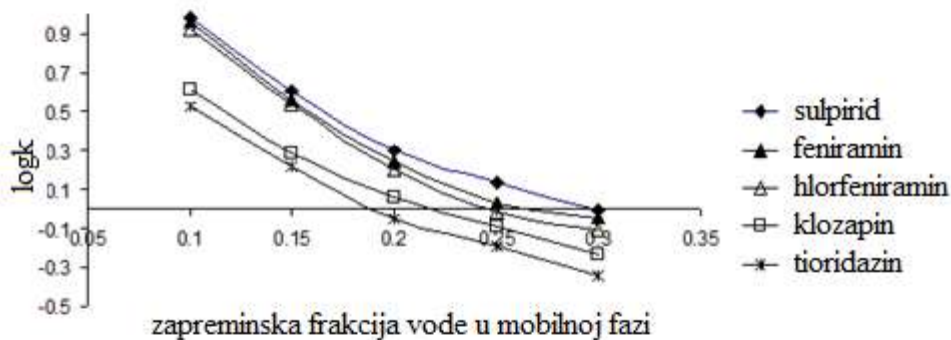
Analit Kolona	Modeli					
	Particioni model $\log k = \log k_0 - m \varphi$			Adsorpcioni model $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2	$\log k_0$	m	R^2
<i>Betasil Silica kolona</i>						
Sulpirid	1,34	-4,58	0,9722	-1,00	-1,95	0,9990
Feniramin	1,24	-4,50	0,9587	-1,07	-1,93	0,9979
Hlorfeniramin	1,24	-4,73	0,9677	-1,18	-2,02	0,9992
Klozapin	0,84	-3,62	0,9825	-0,99	-1,55	0,9938
Tioridazin	0,96	-4,73	0,9707	-1,45	-2,00	0,9940
<i>Bakerbond Silica kolona</i>						
Sulpirid	1,38	-4,83	0,9555	-1,09	-2,07	0,9937
Feniramin	1,37	-5,10	0,9412	-1,25	-2,20	0,9907
Hlorfeniramin	1,36	-5,24	0,9492	-1,33	-2,25	0,9917
Klozapin	0,96	-4,16	0,9673	-1,17	-1,78	0,9992
Tioridazin	0,90	-4,32	0,9684	-1,31	-1,84	0,9978
<i>Betasil CN kolona</i>						
Sulpirid	0,76	-4,62	0,9725	-1,60	-1,96	0,9988
Feniramin	0,74	-3,99	0,9612	-1,31	-1,71	0,9975
Hlorfeniramin	0,69	-3,66	0,9422	-1,18	-1,57	0,9907
Klozapin	0,19	-1,68	0,9567	-0,65	-0,70	0,9720
Tioridazin	0,65	-2,70	0,9010	-0,75	-1,18	0,9708
<i>Bakerbond Cyanopropyl kolona</i>						
Sulpirid	0,58	-2,26	0,9070	-0,59	-0,98	0,9717
Feniramin	0,56	-1,72	0,8524	-0,34	-0,76	0,9441
Hlorfeniramin	0,54	-1,55	0,8145	-0,28	-0,69	0,9174
Klozapin	0,11	-0,05	0,9248	0,08	-0,02	0,9840
Tioridazin	0,50	-0,80	0,5597	0,08	-0,36	0,6891
<i>Betasil Diol kolona</i>						
Sulpirid	1,29	-5,49	0,9658	-1,52	-2,34	0,9977
Feniramin	1,26	-5,79	0,9533	-1,70	-2,47	0,9873
Hlorfeniramin	1,26	-5,96	0,9682	-1,78	-2,53	0,9936
Klozapin	0,93	-4,91	0,9870	-1,56	-2,07	0,9940
Tioridazin	0,98	-6,04	0,9884	-2,08	-2,54	0,9905

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; $\log k_0$ – odsečak linearnog modela; m – nagib linearnog modela; R^2 – koeficijent determinacije

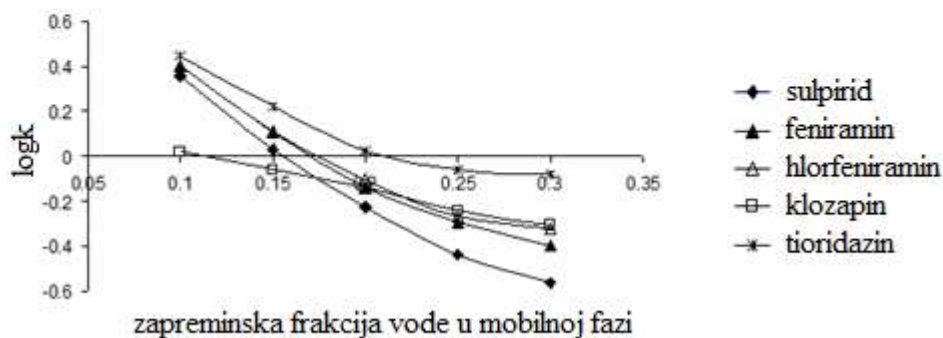
Grafički prikaz fitovanja retencionih podataka analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci u particione, odnosno u adsorpcione retencione modele na svih pet kolona predstavljen je na slikama 23 i 24. Zbog neretencionog ponašanja, retencioni podaci lamotrigina nisu grafički prikazani, niti su uzeti u dalje razmatranje.



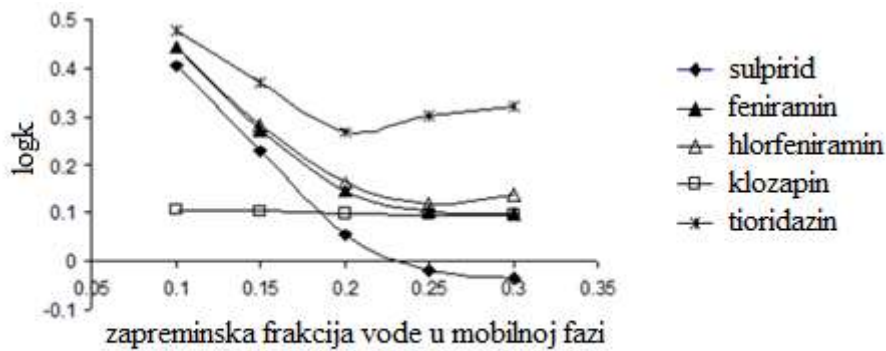
A)



B)



C)



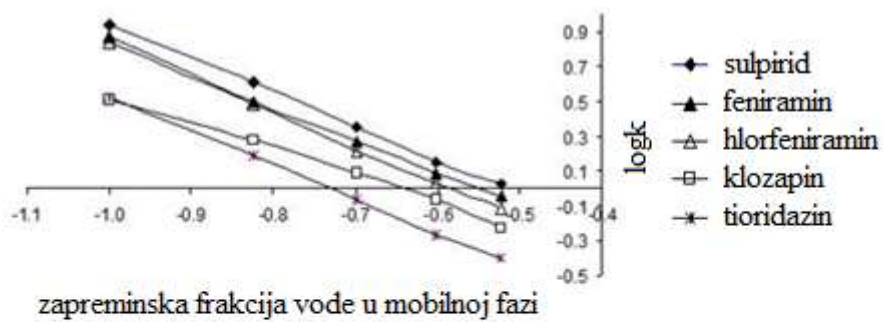
D)



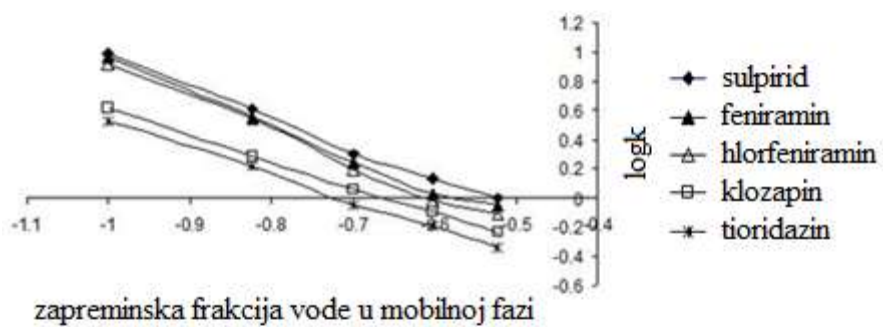
E)

Slika 23. Particioni retencioni modeli baznih analita dobijeni variranjem zapremnske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 10 % do 30 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L^{-1} i pH vrednost vodene faze 3,5) sa kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Bakerbond Silica*, C) *Betasil CN*, D) *Bakerbond Cyanopropyl* i E) *Betasil Diol*.

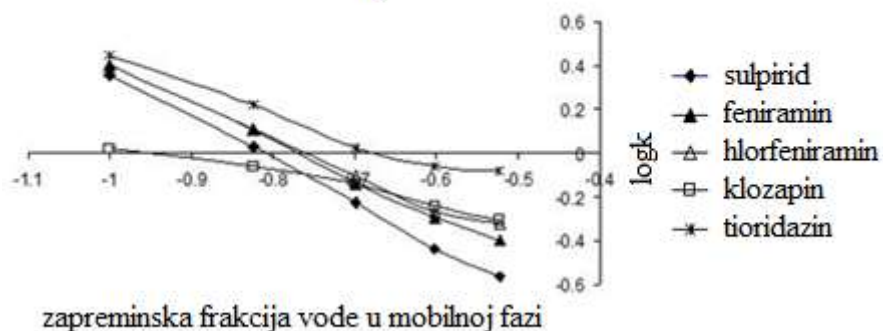
Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.



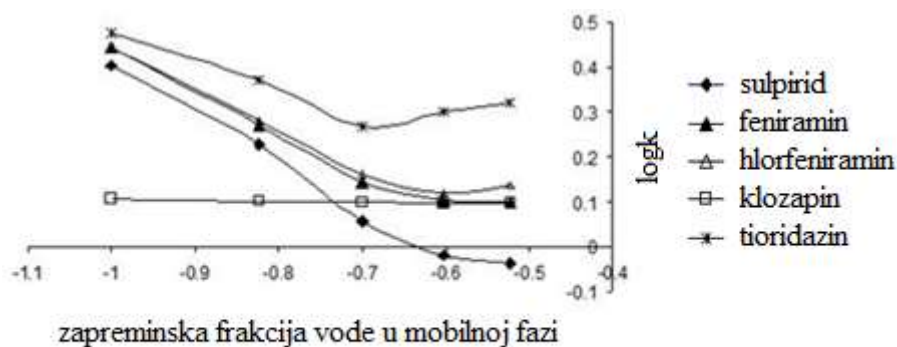
A)



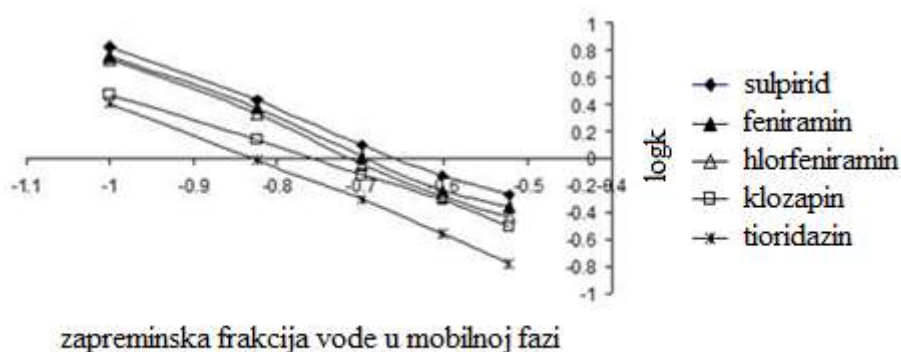
B)



C)



D)



E)

Slika 24. Adsorpcioni retencioni modeli baznih analita dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 10 % do 30 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹ i pH vrednost vodene faze 3,5) sa kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Bakerbond Silica*, C) *Betasil CN*, D) *Bakerbond Cyanopropyl* i E) *Betasil Diol*.

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.

Poređenjem koeficijenata determinacije, prikazanih u tabeli 9, procenjeno je fitovanje retencionih podataka u particione i adsorpcione retencione modele. Veće vrednosti koeficijenata determinacije imali su adsorpcioni modeli, pa je na osnovu toga zaključeno da su oni bili uspešniji u aproksimaciji prikupljenih retencionih podataka u ispitanom opsegu vrednosti zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi. Samim tim je i

retenciono predviđanje koje adsorpcioni modeli omogućavaju u ispitivanom opsegu sastava mobilne faze bolje u poređenju s particionim retencionim modelima. Mada, treba napomenuti, da modeli dobijeni na cijano kolonama, a pogotovo na *Bakerbond Cyanopropyl* koloni, za sve analite generalno nisu imale dovoljno visoke vrednosti koeficijenta determinacije, pa se može smatrati da ni particioni, ni adsorpcioni modeli nisu obezbedili adekvatnu aproksimaciju retencionih podataka.

Određivanje doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu na osnovu kreiranih modela u ovim kolonama nije tako jednostavno. Naime, u procesu prikupljanja retencionih podataka variran je udeo vode u mobilnoj fazi, pri čemu su ostali faktori mobilne faze održavani na konstantnim vrednostima. S druge strane, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi bila je konstantna, ali pošto su vodena faza i acetonitril pri kreiranju modela bili u različitim odnosima, koncentracija amonijum-acetata u ukupnoj mobilnoj fazi zapravo nije bila konstantna. Kao posledica toga, udeo katjonske izmene u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu, pri različitim sastavima mobilne faze, nije bio konstantan, pa se na osnovu kreiranih retencionih modela može govoriti samo o doprinosu procesa raspodele i adsorpcije u širem smislu (adsorpcije usled nejonskih hidrofilnih interakcija i jonske komponente) ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Doprinos procesa adsorpcije, koji potiče samo od nejonskih hidrofilnih interakcija (dipol–dipol, vodonične veze, itd), na ovaj način nije moguće proceniti. Kako su adsorpcioni modeli bolje opisivali retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u dve silika kolone i u diolnoj kolini, može se zaključiti da je proces adsorpcije bio dominantan u retencionom mehanizmu, ali je ostalo nepoznato u kojoj meri je on posledica nejonske, a u kojoj meri jonske komponente. S druge strane, ni adsorpcioni ni particioni modeli nisu na zadovoljavajući način fitovali retencione podatke baznih farmaceutski aktivnih supstanci u cijano kolonama, pa se na osnovu toga može zaključiti da su i proces raspodele i proces adsorpcije uključeni u njihov retencioni mehanizam.

7.2.4. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODELI

Ispitivanjem širokog opsega vrednosti odnosa vodene faze i acetonitrila u mobilnoj fazi na hemijski modifikovanim silika stacionarnim fazama, u slučaju pojedinih analita, zapaženo je da se s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi prvo smanjuju vrednosti retencionih faktora, do postizanja minimalne vrednosti. Nakon toga, dalji porast sadržaja acetonitrila dovodi do ponovnog rasta vrednosti retencionih faktora, što je ukazivalo na postojanje dvojnog HILIC/RP retencionog mehanizma. To je bio slučaj s hlorfeniraminom, klozapinom i tioridazinom u *Betasil CN koloni*, s feniraminom, hlorfeniraminom, klozapinom i tioridazinom u *Bakerbond Cyanopropyl koloni* i sa sulpiridom, feniraminom, hlorfeniraminom, klozapinom i tioridazinom u *Betasil Diol koloni*. U cilju građenja odgovarajućih dvojnih HILIC/RP retencionih modela, koji su okarakterisani jednačinom (7), a detaljno objašnjeni u poglavlju 2.3, odabran je opseg variranja vrednosti sadržaja vode u mobilnoj fazi od 5 % do 95 %, pri čemu su vrednosti ostalih faktora mobilne faze održavani na konstantnom nivou (koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi bila je 20 mmol L⁻¹, dok je pH vrednost vodene faze bila 3,5). Prikupljeni eksperimentalni podaci fitovani su u odgovarajuće modele metodom nelinearne regresije. Nakon toga, iz dobijenih regresionih koeficijenata izračunati su minimumi funkcija (ϕ_{\min}) koji odgovaraju sastavu mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza iz RP retencionog mehanizma u HILIC retencioni mehanizam i obratno. U tabeli 10 prikazani su koeficijenti kreiranih modela s koeficijentima determinacije, kao i odgovarajući minimumi funkcija.

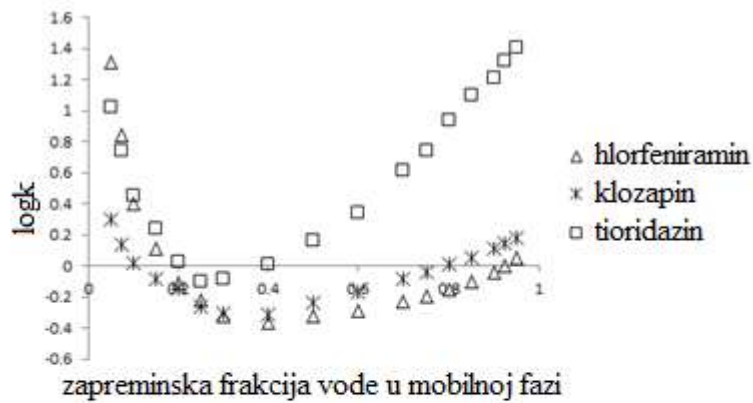
Tabela 10. Koeficijenti dvojnih HILIC/RP retencionih modela baznih analita sa hemijskim modifikacijama silika kolone i minimalne vrednosti funkcija

Analit Kolona	Model				
	$\log k = a + m_1 \varphi - m_2 \log \varphi$				
	a	m_1	m_2	R^2	φ_{\min}
Sulpirid					
<i>Betasil diol</i> kolona	-2,56	2,66	2,47	0,9996	0,402
Feniramin					
<i>Betasil diol</i> kolona	-3,09	3,62	3,45	0,9994	0,413
<i>Bakerbond Cyanopropyl</i> kolona	-1,36	2,02	1,60	0,9956	0,344
Hlorfeniramin					
<i>Betasil diol</i> kolona	-3,29	3,86	3,60	0,9993	0,406
<i>Betasil CN</i> kolona	-2,53	2,79	2,65	0,9997	0,412
<i>Bakerbond Cyanopropyl</i> kolona	-1,47	2,40	1,67	0,9941	0,302
Klozapin					
<i>Betasil diol</i> kolona	-2,32	2,10	1,93	0,9967	0,399
<i>Betasil CN</i> kolona	-1,17	1,15	1,08	0,9468	0,407
<i>Bakerbond Cyanopropyl</i> kolona	-0,63	1,42	0,600	0,9692	0,183
Tioridazin					
<i>Betasil diol</i> kolona	-3,41	3,61	3,41	0,9958	0,410
<i>Betasil CN</i> kolona	-2,88	4,35	2,90	0,9991	0,290
<i>Bakerbond Cyanopropyl</i> kolona	-1,78	3,70	1,89	0,9991	0,221

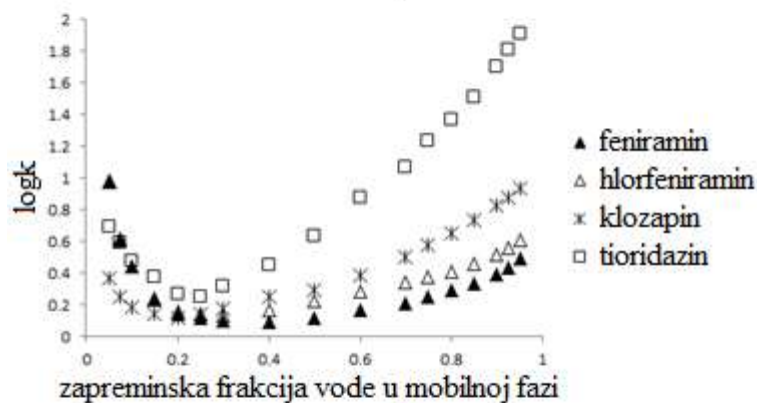
k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; a – odsečak HILIC/RP modela; m_1 i m_2 – regresioni koeficijenti RP/HILIC modela; φ_{\min} – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi pri kojoj dolazi do prelaza između RP i HILIC mehanizama; R^2 – koeficijent determinacije

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. Cent Eur J Chem 2013; 11: 1150–1162.

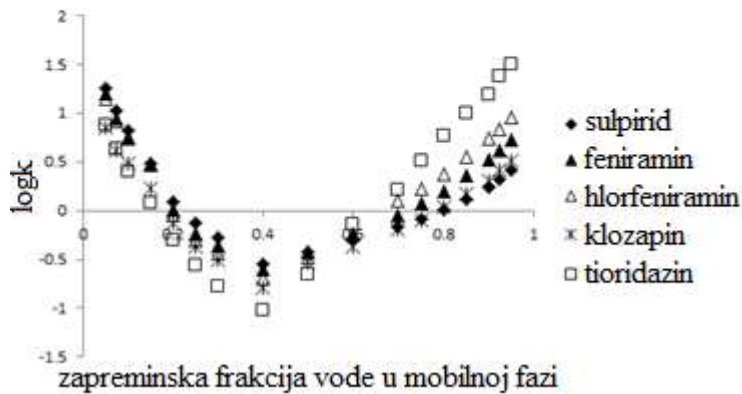
Na slici 25 grafički su prikazani kreirani HILIC/RP retencioni modeli.



A)



B)



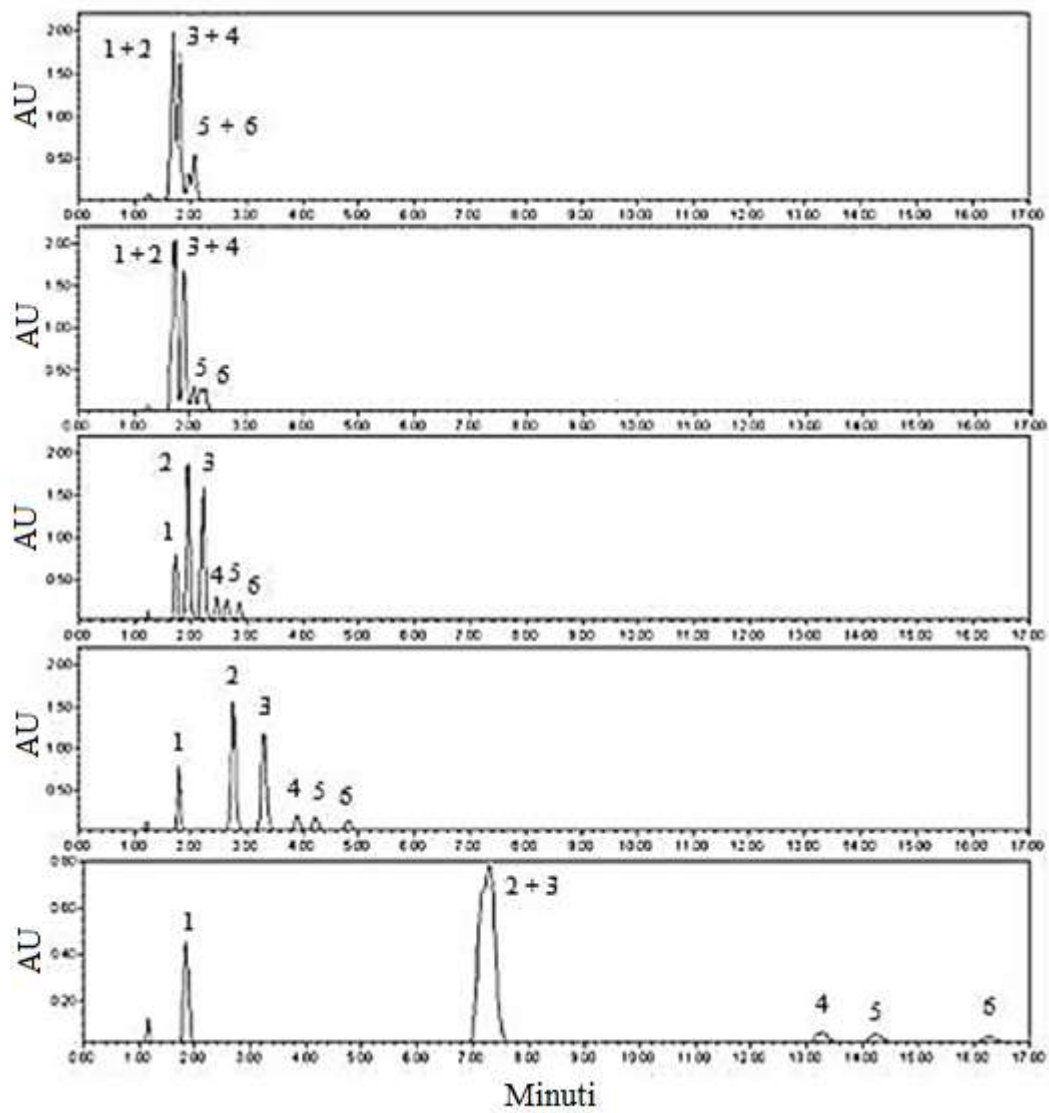
C)

Slika 25. Dvojni HILIC/RP retencioni modeli baznih analita dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 5 % do 95 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹ i pH vrednost vodene faze 3,5) sa kolonama: A) *Betasil CN*; B) *Bakerbond Cyanopropyl* i C) *Betasil Diol*.

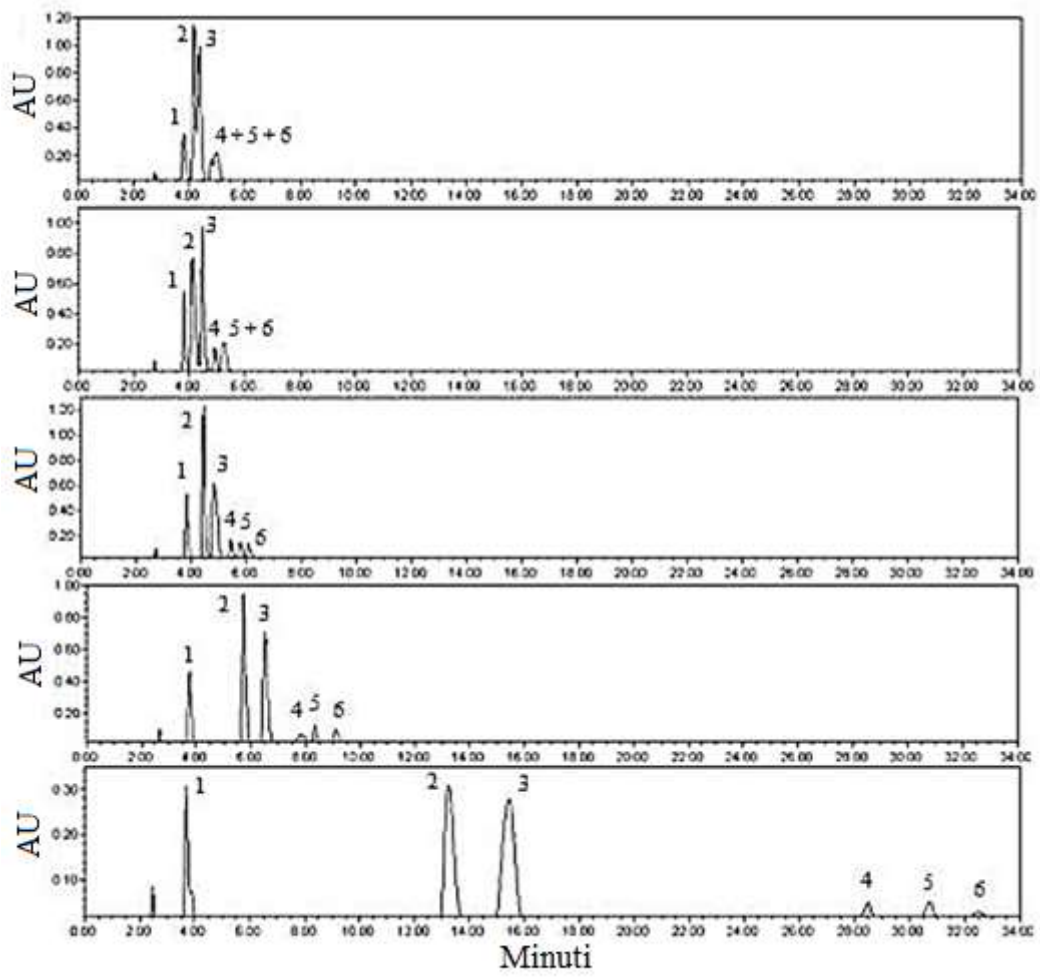
Na minimalnim vrednostima retencionih faktora ispitivanih analita (tabela 10) upoređivane su vrednosti sastava mobilne faze. Tačke prelaza između retencionih mehanizama bile su različite za različite analite (na *Betasil Diol* koloni na oko 40 %, na *Betasil CN* u rasponu od 29 % do 41 %, na *Bakerbond Cyanopropyl* u rasponu od 18 % do 34 % vode u mobilnoj fazi). Na osnovu ovog podatka potvrđeno je i da priroda analita, pored sastava mobilne faze i vrste stacionarne faze, ima značajan uticaj na složenost retencionog mehanizma u analiziranim HILIC sistemima.

7.2.5. UTICAJ VRSTE KOLONE NA RETENCIONO PONAŠANJE BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

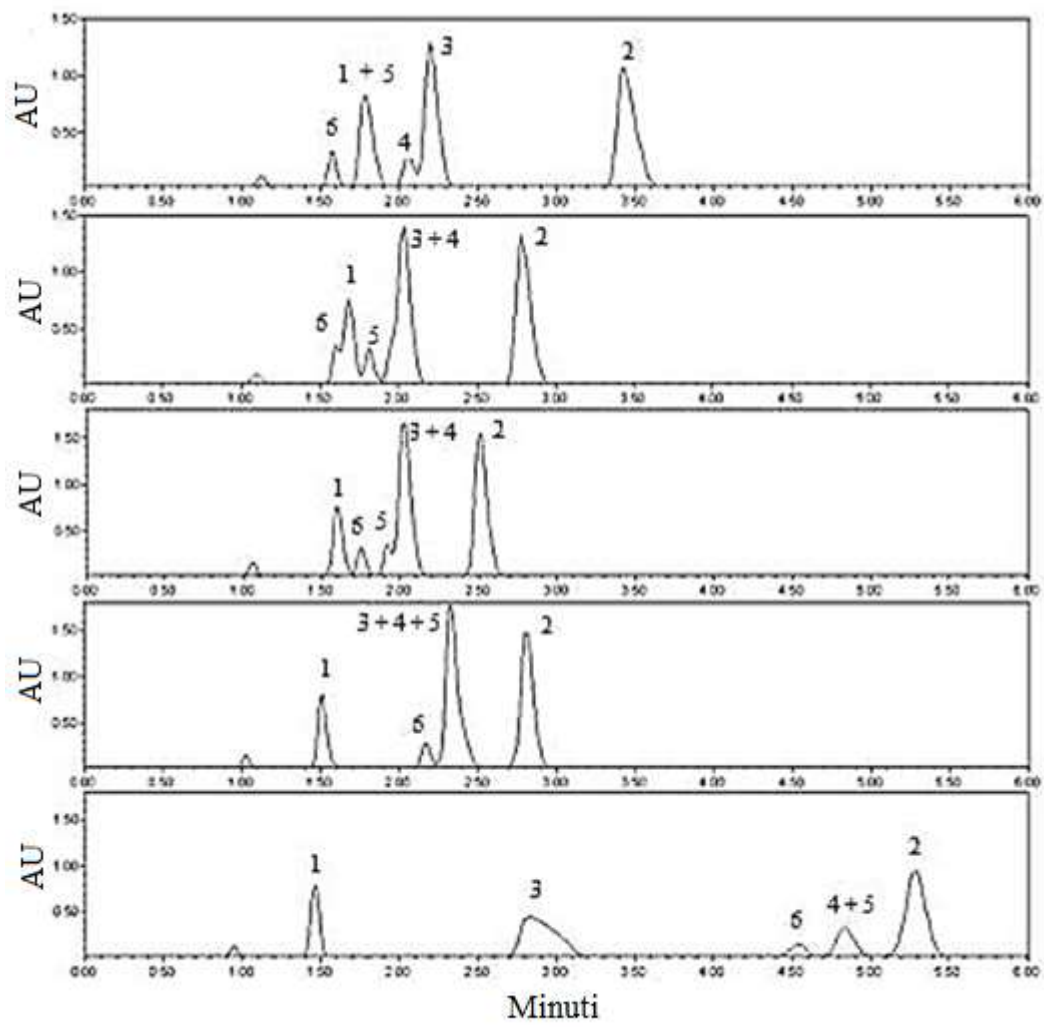
U prethodnim fazama ovog dela istraživanja, prilikom građenja retencionih modela, prikupljen je veliki broj podataka koji karakterišu retenciono ponašanje ispitivanih analita. Ovo je omogućilo da se upoređi retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci pri istim hromatografskim uslovima u različitim kolonama, odnosno da se proceni uticaj stacionarne faze na retenciono ponašanje analita. Na slici 26 prikazani su hromatogrami smeše analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u svih pet kolona pri porastu sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi sledećom dinamikom: 50 %, 60 %, 70 %, 80 % i 90 % (koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi održavana je na konstantnoj vrednosti od 20 mmol L⁻¹, što je bio slučaj i sa pH vrednošću mobilne faze koji je bio 3,5). Na taj način ilustrovane su sličnosti i razlike u retencionom ponašanju baznih analita u različitim kolonama.



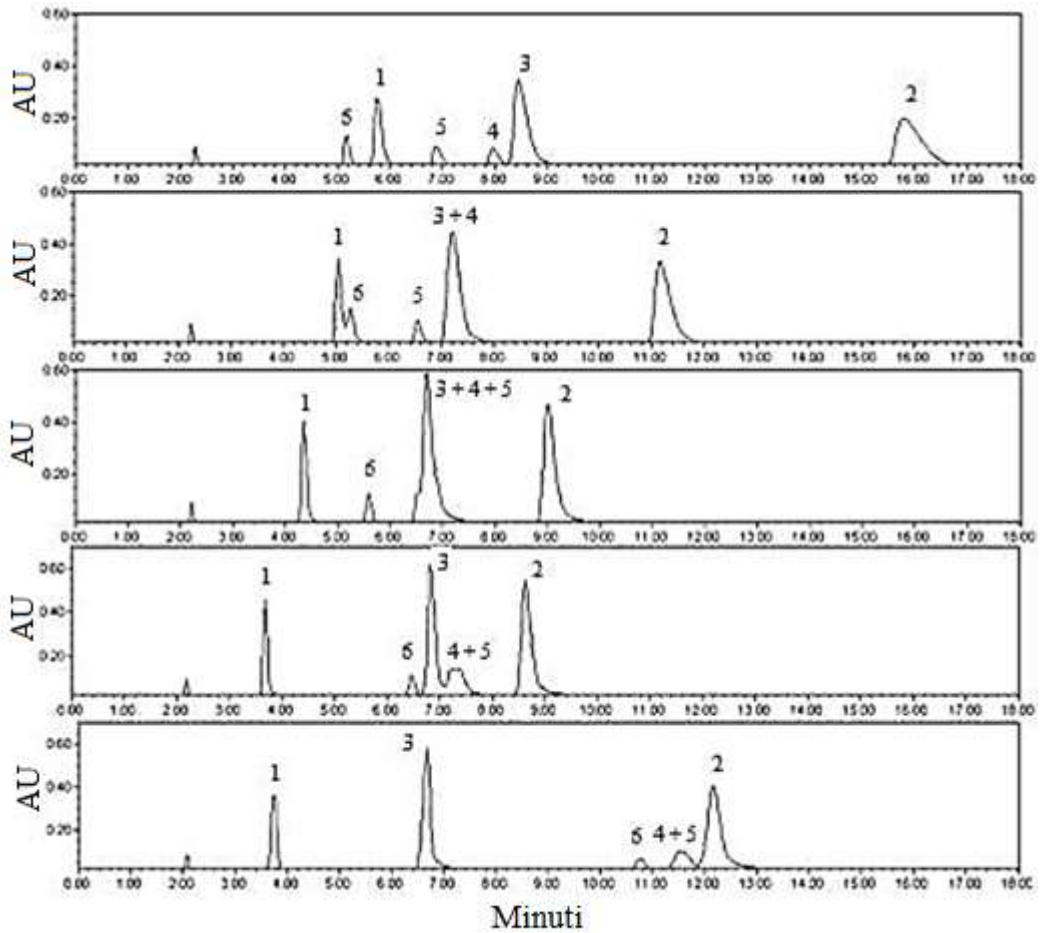
Minuti
A)



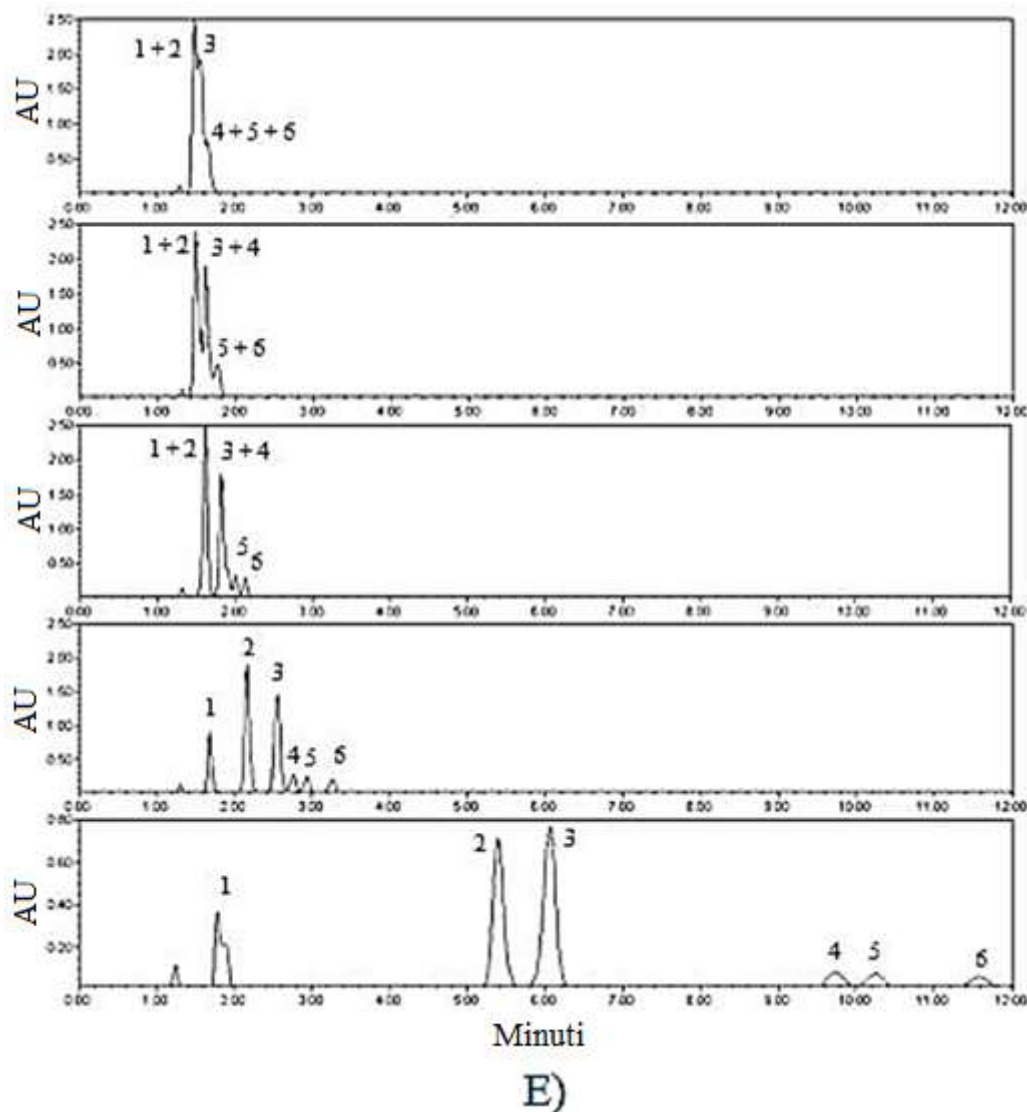
B)



C)



Minuti
D)



Slika 26. Hromatogrami analizirane smeše baznih analita dobijeni pri sledećim sastavima mobilne faze: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi bio je 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, pri konstantnim vrednostima koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi (20 mmol L^{-1}) i pH vrednosti vodene faze (3,5) u kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Bakerbond Silica*, C) *Betasil CN*, D) *Bakerbond Cyanopropyl* i E) *Betasil Diol*. Pikovi analita označeni su brojevima: 1 – lamotrigin, 2 – tioridazin, 3 – klozapin, 4 – hlorfeniramin, 5 – feniramin, 6 – sulpirid.

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.

U silika kolonama i diolnoj koloni redosled eluiranja analiziranih komponenti zavisio je od njihove lipofilnosti i jonizacije. Već je napomenuto u ranijim poglavljima da se, pri analiziranoj pH vrednosti mobilne faze, jedino lamotrigin nalazio u nejonizovanom, dok su se ostali ispitivani analiti nalazili u jonizovanom, odnosno protonovanom obliku. Lipofilnost analita izražava se kao $\log P$, pa su odgovarajuće $\log P$ vrednosti, izračunate pomoću *MarvinSketch* 6.1.0. softvera, iznosile: za lamotrigin 2,5; za tioridazin 5,9; za klozapin 3,7; za hlorfeniramin 3,4; za feniramin 3,2; a za sulpirid 0,6. Prema tome, lamotrigin je najlipofilniji, dok je tioridazin najhidrofilniji analit analizirane smeše.

Sa *Betasil Silica* kolone prvi se eluirao lamotrigin, koji se inače ponašao neretenciono (slika 26 A). Iako lamotrigin nije najlipofilniji analit u analiziranoj smeši, odsustvo elektrostatičke interakcije očigledno je uticalo na njegovo brzo eluiranje sa ove kolone. Ostali analiti eluirali su se redosledom opadajuće lipofilnosti, što je i osnovna karakteristika svih HILIC sistema. Slično retenciono ponašanje ovih analita primećeno je i u *Bakerbond Silica* koloni (slika 26 B). Jedino su se analiti duže zadržavali u sistemu zbog veće dužine ove kolone u odnosu na *Betasil Silica* kolonu. Redosled eluiranja analita u *Betasil Diol* koloni bio je isti kao i u silika kolonama (slika 26 E), ali u poređenju sa *Betasil Silica* kolonom (od istog proizvođača i istih dimenzija) analiti su se nešto kraće zadržavali. Ovo je verovatno posledica znatno manjeg broja slobodnih silanolnih grupa na površini diolne stacionarne faze u poređenju sa silika kolonom, pa samim tim i manjeg udela elektrostatičke interakcije u retencionom mehanizmu analiziranih komponenti. U slučaju *Betasil CN* kolone, redosled eluiranja bio je potpuno drugačiji i nije zavisio od lipofilnosti analita (slika 26 C), što ukazuje na postojanje različitih tipova direktnih interakcija između analita i stacionarne faze. Ovo je u skladu sa zaključkom iz prethodnog poglavlja o postojanju mešovitog retencionog mehanizma u ovom tipu kolone. Slično retenciono ponašanje analita, primećeno je i u *Bakerbond Cyanopropyl* koloni (slika 26 D), mada su se u njoj supstance nešto duže zadržavale što je posledica njene veće dužine. Takođe je s njom pod odgovarajućim uslovima postignuto bolje razdvajanje pikova.

7.2.6. EKSPERIMENTALNI MODELI KREIRANI UZ POMOĆ HEMOMETRIJSKOG PRISTUPA

Još u preliminarnoj fazi zaključeno je da veći broj faktora vezanih za sastav mobilne faze (sadržaj acetonitrila, jonska jačina, pH vrednost mobilne faze i dr) značajno utiče na retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u silika kolonama, a u kasnijim fazama istraživanja ovo zapažanje objašnjeno je postojanjem procesa katjonske izmene molekula analita na njihovoj površini. Na diolnoj i cijano kolonama ovaj proces znatno je slabije izražen, stoga se sa njima pokazalo da je samo sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi faktor koji značajnije utiče na retenciono ponašanje ispitivanih analita. Zato je u ovom delu istraživanja odabrana *Betasil Silica* kolona da se sa njom kroz sistematičan pristup istovremeno ispita uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi.

Odgovarajući eksperimentalni modeli razvijeni su primenom eksperimentalnog dizajna i metodologije površine odgovora. U konkretnom slučaju odabran je Boks–Benken dizajn koji zahteva ispitivanje uticaja svakog faktora na tri nivoa. Dizajn je dopunjen s četiri replikacije u centralnoj tački kako bi se omogućila odgovarajuća statistička procena rezultata. Na osnovu podataka prikupljenih u preliminarnoj fazi definisani su opsezi ispitivanih faktora, pa su kodiranim vrednostima -1 i $+1$ dodeljene sledeće stvarne vrednosti faktora: za sadržaj acetonitrila vrednosti 80 % i 90 %, za pH vrednost vodene faze 2,5 i 4,5, a za sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi vrednosti 5 mmol L⁻¹ i 35 mmol L⁻¹. Plan eksperimenata s nivoima faktora predstavljen je u tabeli 3, koja je prikazana u Eksperimentalnom delu disertacije, u poglavlju 6.5. Nakon izvedenih eksperimenata s dobijenih hromatograma očitavana su retencionna vremena. Iz vrednosti retencionih vremena i retencionog vremena pika mobilne faze izračunati su retencioni faktori. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Eksperimentalno dobijeni rezultati retencionih faktora baznih analita

Eksp.	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6
1	0,659	0,987	1,431	1,754	1,955	2,240
2	0,925	4,493	6,339	8,559	9,148	10,193
3	0,048	1,079	1,079	2,346	2,663	3,078
4	0,047	1,742	3,577	8,386	9,211	9,711
5	0,274	1,474	1,884	2,469	2,748	3,136
6	0,001	4,797	7,066	13,641	14,746	15,454
7	0,160	0,732	1,100	1,519	1,732	2,168
8	0,092	2,887	3,160	6,971	7,528	9,181
9	1,175	2,376	3,154	3,819	4,163	4,638
10	0,046	2,286	4,550	9,010	10,012	10,347
11	0,673	1,519	2,293	2,969	3,239	3,738
12	-0,045	1,121	1,456	3,543	3,956	4,689
13	0,115	1,830	2,295	3,571	3,934	4,724
14	0,144	1,598	2,052	3,097	3,431	4,111
15	0,146	1,579	2,032	3,083	3,414	4,106
16	0,156	1,783	2,255	3,477	3,833	4,600

k_1 – retencioni faktor lamotrigina; k_2 – retencioni faktor tioridazina; k_3 – retencioni faktor klozapina; k_4 – retencioni faktor hlorfeniramina; k_5 – retencioni faktor feniramina; k_6 – retencioni faktor sulpirida

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. Cent Eur J Chem 2013; 11: 1150–1162.

Metodom višestruke linearne regresije retencioni podaci fitovani su u polinom drugog reda. Adekvatnost dobijenih modela ispitana je ANOVA testom, a kao relevantni statistički parametri korišćeni su R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 . Koeficijenti dobijenih kvadratnih modela, njihova statistička značajnost, kao i ostali relevantni statistički parametri prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za posmatrane odgovore i njihova statistička analiza

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

	<i>k</i> ₁		<i>k</i> ₂		<i>k</i> ₃	
	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
b₁	-0,010	0,8519	1,21	0,0001*	1,83	0,0001*
b₂	-0,420	0,0001*	0,39	0,0314*	0,32	0,1688
b₃	-0,077	0,1668	-0,58	0,0060*	-1,08	0,0018*
b₁₂	-0,067	0,3708	-0,71	0,0118*	-0,60	0,0819
b₁₃	0,051	0,4855	-0,29	0,1926	-0,78	0,0354*
b₂₃	0,100	0,1877	-0,08	0,7121	-0,56	0,1013
b₁₁	-0,040	0,5848	0,53	0,0372*	0,74	0,0430*
b₂₂	0,290	0,0057*	-0,12	0,5794	0,30	0,3357
b₃₃	0,002	0,9721	0,28	0,2079	0,50	0,1370
R²	0,9416		0,9535		0,9580	
Adjusted R²	0,8540		0,8837		0,8951	
Predicted R²	0,7547		0,7837		0,8007	

*k*₁ – retencioni faktor lamotrigina; *k*₂ – retencioni faktor tiordazina; *k*₃ – retencioni faktor klozapina; R² – koeficijent determinacije

*x*₁ – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); *x*₂ – pH vrednost vodene faze; *x*₃ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

* koeficijenti modela značajni za *p* < 0,05

	<i>k₄</i>		<i>k₅</i>		<i>k₆</i>	
	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
b₁	3,68	<0,0001*	3,94	<0,0001*	4,18	0,0001*
b₂	0,77	0,0746	0,92	0,0553	0,81	0,1295
b₃	-1,74	0,0028*	-1,90	0,0027*	-1,72	0,0099*
b₁₂	-0,19	0,7190	-0,16	0,7777	-0,45	0,5139
b₁₃	-1,43	0,0304*	-1,55	0,0297*	-1,33	0,0496*
b₂₃	-1,15	0,0632	-1,28	0,0573	-1,19	0,1197
b₁₁	1,70	0,0155*	1,57	0,0285*	1,54	0,0578
b₂₂	0,38	0,4797	0,22	0,6981	-0,10	0,8880
b₃₃	1,27	0,0462*	1,17	0,0767	1,21	0,1151
R²	0,9649		0,9639		0,9503	
Adjusted R²	0,9122		0,9099		0,8758	
Predicted R²	0,8874		0,8750		0,7764	

k₄ – retencioni faktor hlorfeniramina; *k₅* – retencioni faktor feniramina; *k₆* – retencioni faktor sulpirida; R² – koeficijent determinacije

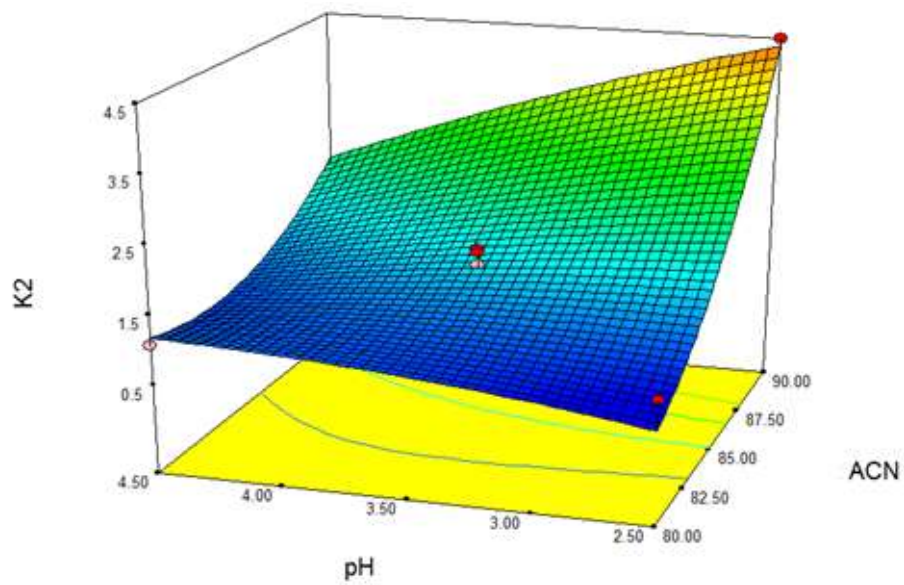
* koeficijenti modela značajni za $p < 0,05$

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. Cent Eur J Chem 2013; 11: 1150–1162.

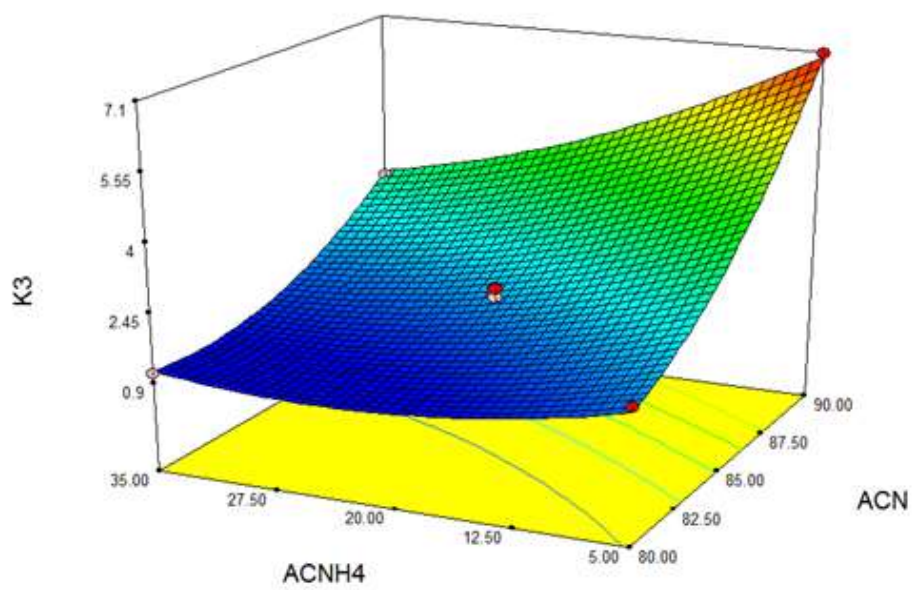
Na osnovu vrednosti R^2 , *Adjusted R²* i *Predicted R²* bliskih 1,0, koje su prikazane u tabeli 12, potvrđena je adekvatnost kreiranih matematičkih modela i njihova dobra sposobnost predviđanja. Drugim rečima, dobijeni modeli izvršili su zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalno dobijenih retencionih podataka. Regresioni koeficijenti polinoma drugog reda, koji su bili statistički značajni ($p < 0,05$), ušli su u konačne retencione modele analiziranih supstanci. U toku izvođenja eksperimenata zapaženo je da se retencioni faktor lamotrigina nije značajnije menjao s promenom ispitivanih faktora mobilne faze, odnosno ponašao se neretenciono. S druge strane, razmatranjem dobijenog modela za lamotrigin može se primetiti da je jedino pH vrednost vodene faze faktor koji je pokazao statistički značajan uticaj, pa su, shodno tome, linearni i kvadratni član ovog faktora ušli u kreirani model. Kako uticaj ovog faktora ipak nije imao fizički značaj u ispitivanom HILIC sistemu, dobijeni model nije razmatran u daljem tekstu.

7.2.7. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE BAZNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

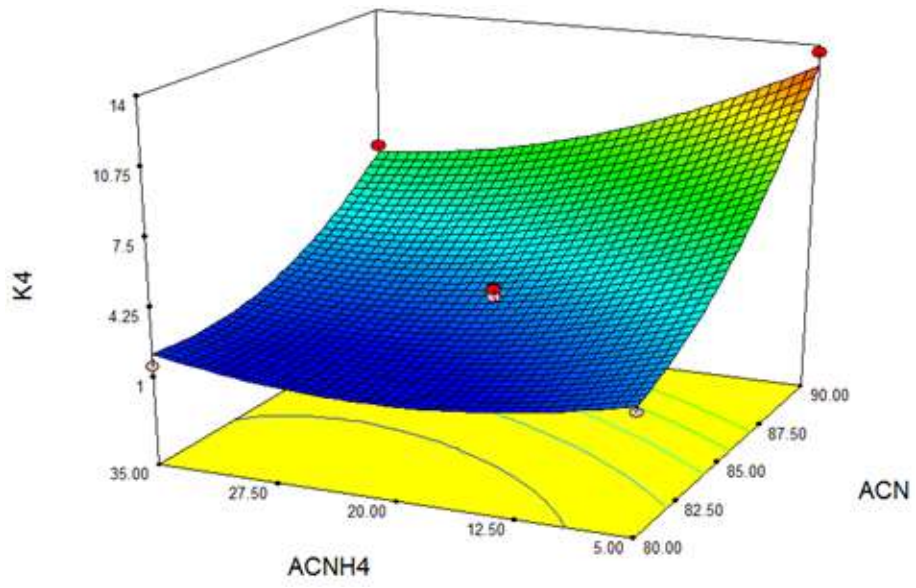
U tabeli 12 prikazani su statistički značajni regresioni koeficijenti uspostavljenih retencionih modela. Na osnovu njih identifikovan je uticaj pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih baznih analita. Na slici 27 u obliku trodimenzinih površina odgovora grafički su prikazane statistički značajne interakcije. U retencionom modelu tioridazina statistički je bila značajna interakcija sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodene faze, pa je ona u skladu s tim ilustrovana odgovarajućom trodimenzionom površinom odgovora (slika 27 A). S druge strane, u retencione modele preostalih analita (klozapina, hlorfeniramina, feniramina i sulpirida) uključena je samo jedna faktorska interakcija i to ona između sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi. Odgovarajuće trodimenzione površine odgovora grafički su predstavljene (slika 27 B–E).



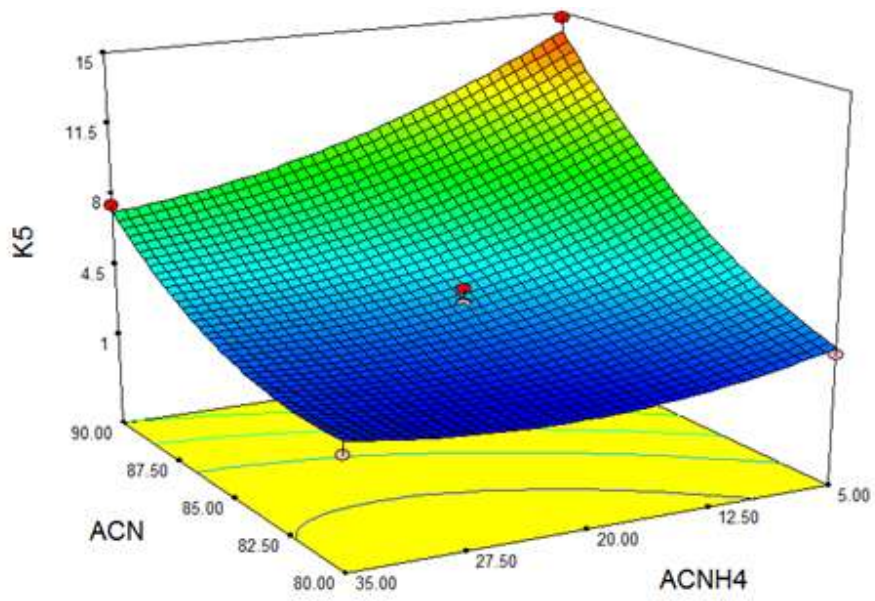
A)



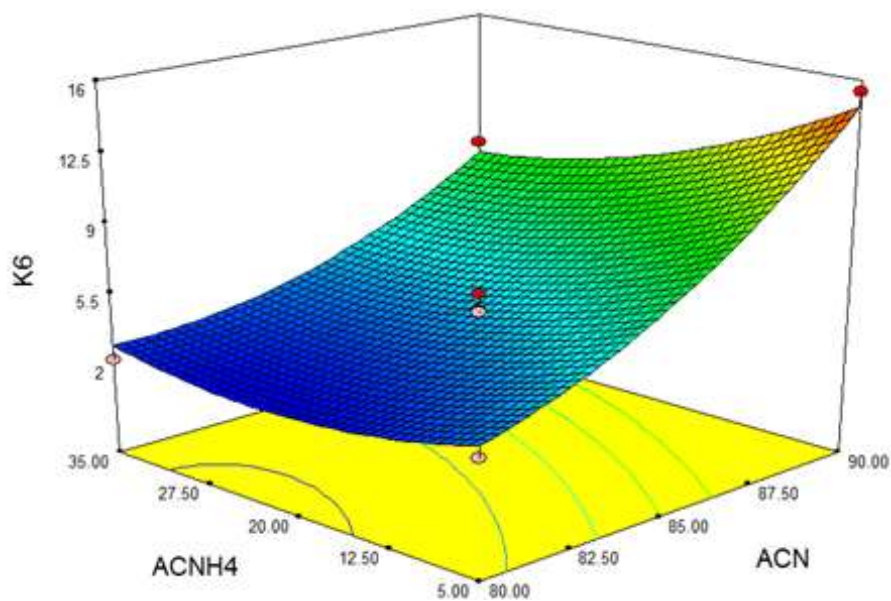
B)



C)



D)



E)

Slika 27. Trodimenzionalna površina odgovora: A) $k = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze); B – E) $k = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi). Retencioni faktori odgovaraju sledećim analitima: k_2 – tioridazin; k_3 – klozapin; k_4 – hlorfeniramin; k_5 – feniramin; k_6 – sulpirid.

Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. Cent Eur J Chem 2013; 11: 1150–1162.

Hemometrijski pristup u datom slučaju omogućio je da se ispitivani faktorski uticaji kvantifikuju, čime je postignut kompletan opis retencionog ponašanja analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci u *Betasil Silica* koloni. Uticaji faktora i njihovih interakcija procenjeni su na osnovu koeficijenata kreiranih matematičkih modela (tabela 12), a vizuelnu potvrdu izvedenih zaključaka obezbedile su konstruisane trodimenzione površine odgovora (slika 27).

Na osnovu koeficijenata b_1 , b_2 i b_3 kreiranih retencionih modela procenjivani su uticaji pojedinačnih faktora mobilne faze, odnosno sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi na retenciono ponašanje analita (tabela 12). Naime, koeficijenti linearnih članova modela b_1 i b_3 bili su statistički značajni u slučaju svih analita, dok je koeficijent b_2 jedino bio statistički značajan u slučaju modela tioridazina, mada je ovaj koeficijent bio takođe na granici statističke značajnosti i u slučaju modela hlorfeniramina i feniramina. Poređenjem apsolutnih vrednosti linearnih regresionih koeficijenata modela zaključeno je da je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi imao najveći uticaj na retencione faktore analita. Nakon njega, usledio je uticaj amonijum-acetata u vodenoj fazi. Konačno, uticaj pH vrednosti vodene faze na retencione faktore analita bio je najmanji. Pozitivni predznaci b_1 koeficijenata modela ukazuju na činjenicu da su se s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi vrednosti retencionih faktora analita povećavale. Međutim, statistička značajnost kvadratnih članova modela b_{11} kod skoro svih modela ukazuje na kvadratnu prirodu ove zavisnosti, odnosno da s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dolazi do nelinearnog porasta retencionih faktora analiziranih supstanci, što je karakteristično za sve HILIC sisteme. Pozitivni predznak b_2 koeficijenata pretpostavlja povećanje retencionih faktora s porastom pH vrednosti vodene faze. Naime, kada je reč o baznim analitima, već je i ranije napomenuto da su oni u ispitivanom rasponu pH vrednosti mobilne faze bili prisutni u svojim katjonskim oblicima. Kao posledica toga, sasvim je očekivano da će s povećanjem pH vrednosti mobilne faze jonizacija silanolnih grupa biti sve izraženija, usled čega će elektrostatičko privlačenje između površine silika stacionarne faze i molekula analita biti sve veće, a samim tim i njihovo zadržavanje u hromatografskom sistemu. Dokazi za ovakvo ponašanje baznih analita pronađeni su i u literaturi [65]. Koeficijenti b_3 , koji karakterišu uticaj koncentracije

amonijum-acetata u vodenoj fazi na retencione faktore analita, imali su negativan predznak, što znači da je s povećanjem koncentracije ove soli dolazilo do smanjenja retencionih faktora analita u datom HILIC sistemu. Naime, NH_4^+ jon iz acetatnog pufera takmiči se s molekulima analita za ostvarivanje elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim silanolnim grupama na površini stacionarne faze. Povećanjem koncentracije amonijum-acetata, sve više silanolnih grupa biva zauzeto NH_4^+ jonima, pa privlačna elektrostatička interakcija sve manje doprinosi zadržavanju molekula analita [30]. Ovo je detaljno objašnjeno prilikom razmatranja doprinosa procesa katjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu u poglavlju 7.2.2.

Podaci iz tabele 12 takođe ukazuju i na činjenicu da pojedinačni faktori nisu nezavisno uticali na retenciono ponašanje analiziranih baznih farmaceutski aktivnih supstanci. Naime, koeficijent b_{12} u slučaju modela tioridazina bio je statistički značajan, što potvrđuje postojanje interakcije između sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodene faze. Na odgovarajućoj trodimenzionoj površini odgovora (slika 27 A) može se uočiti da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionog faktora tioridazina pri manjim pH vrednostima vodene faze, nego pri većim. Ovakvo retenciono ponašanje može biti posledica toga da pri manjim pH vrednostima mobilne faze i većem sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi dolazi do smanjenja debljine vodenog sloja adsorbovanog na površinu silika stacionarne faze. Na taj način doprinos adsorpcije, uzrokovan direktnim nejonskim interakcijama ukupnom HILIC retencionom mehanizmu, postaje izraženiji. Statistička neznačajnost ove interakcije u modelima ostalih baznih analita verovatno je posledica neznačajnosti linearnih b_2 koeficijenata. U slučaju retencionih modela klozapina, hlorfeniramina, feniramina i sulpirida koeficijenti b_{13} , koji karakterišu interakciju između sadržaja acetonitrila i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, bili su takođe statistički značajni. Posmatranjem odgovarajućih trodimenzionih površina odgovora (slika 27 B – E) primećuje se da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora analita pri manjim vrednostima koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, nego pri većim. Naime, pod takvim hromatografskim uslovima debljina adsorbovanog vodenog sloja na površini silika stacionarne faze je manja, a negativno naelektrisane silanolne grupe postaju dostupnije analitu. S druge strane,

manja koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi uslovljava manju koncentraciju NH_4^+ jona, koji imaju tendenciju da se vežu za te silanolne grupe. Na taj način, postiže se maksimalan doprinos privlačne elektrostatičke interakcije retencionom mehanizmu analita, a time i njihovo duže zadržavanje u hromatografskom sistemu.

U ovom delu disertacije prvi put je primenjena kombinacija teorijskih i eksperimentalnih modela u cilju detaljne analize retencionih mehanizama i retencionog ponašanja baznih analita u nekom HILIC sistemu.

7.3. TEORIJSKI I EKSPERIMENTALNI MODELI U ANALIZI RETENCIONOG PONAŠANJA I RETENCIONI MEHANIZAMA KISELIH I NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U AMINO KOLONI

Podaci o detaljnim ispitivanjima retencionih mehanizama u amino koloni u HILIC hromatografiji u dosadašnjoj literaturi nisu bili pronađeni. Zato je i u ovom delu disertacije primenjena slična strategija kao i u prethodnom. Ako se uzme u obzir da su na površini amino stacionarne faze prisutne amino grupe koje su u širokom opsegu pH vrednosti zastupljene u svom jonizovanom obliku, sasvim je očekivano da će njena površina biti pozitivno naelektrisana, odnosno da će kiseli analiti pokazivati afinitet prema njoj [4]. Prilikom razdvajanja kiselih analita u amino koloni očekivan je doprinos procesa anjonske izmene retencionom mehanizmu. S druge strane, očekivano je da zadržavanje neutralnih analita (zastupljenih u nejonizovanom obliku) u ovakvom sistemu ne bi trebalo da bude uzrokovano jonskom komponentom u retencionom mehanizmu.

Stoga, cilj ovog dela disertacije bio je da se ispituju retenciono ponašanje i retencioni mehanizmi neutralnih i kiselih analita na primeru model smeše farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom (tropikamid, nikotinamid, levetiracetam, piracetam, sulfanilamid, sulfacetamid-natrijum, sulfametoksazol, sulfafurazol, furosemid i bumetanid) u amino koloni građenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih modela.

U prvoj fazi ovog dela istraživanja kreirani su odgovarajući teorijski retencioni modeli koji su omogućili analizu retencionih mehanizama odgovornih za razdvajanje ispitivanih analita u datom HILIC sistemu. Kako bi se ispitaio doprinos procesa anjonske izmene retencionom mehanizmu u ispitivanom HILIC sistemu, prvo je odabran tip pufera, nakon čega su kreirani odgovarajući anjonsko–izmenjivački teorijski retencioni modeli fitovanjem retencionih podataka dobijenih variranjem koncentracije pufera u mobilnoj fazi. Matematičke jednačine kojima je pretpostavljen anjonski proces predložene su u ovom delu disertacije i prvi put su upotrebljene za opisivanje procesa anjonske izmene u HILIC hromatografiji. Kako je amino kolona hemijska modifikacija silika kolone, odnosno za vezivanje amino grupa korišćeni su propil ostaci, ovaj tip

stacionarne faze može se smatrati umereno polarnim. Samim tim, očekivano je da će analizirane farmaceutski aktivne supstance biti pod uticajem i HILIC i RP retencionog mehanizma. Prema tome, variranjem odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze u širokom rasponu vrednosti omogućeno je građenje dvojnih HILIC/RP retencionih modela, nakon čega je za svaki analit izračunat odnos vodenog i organskog udela u mobilnoj fazi pri kojem dolazi do prelaza između jednog mehanizma u drugi. Nakon toga su i HILIC i RP region sastava mobilnih faza zasebno modelovani pomoću adsorpcionih i particionih retencionih modela. Dobijeni modeli iskorišćeni su u svrhu opisa uticaja organskog rastvarača na retenciono ponašanje analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci, kao i na razmatranje udela procesa raspodele i adsorpcije u retencionom mehanizmu u amino koloni u svakom od ispitivanih regiona sastava mobilne faze.

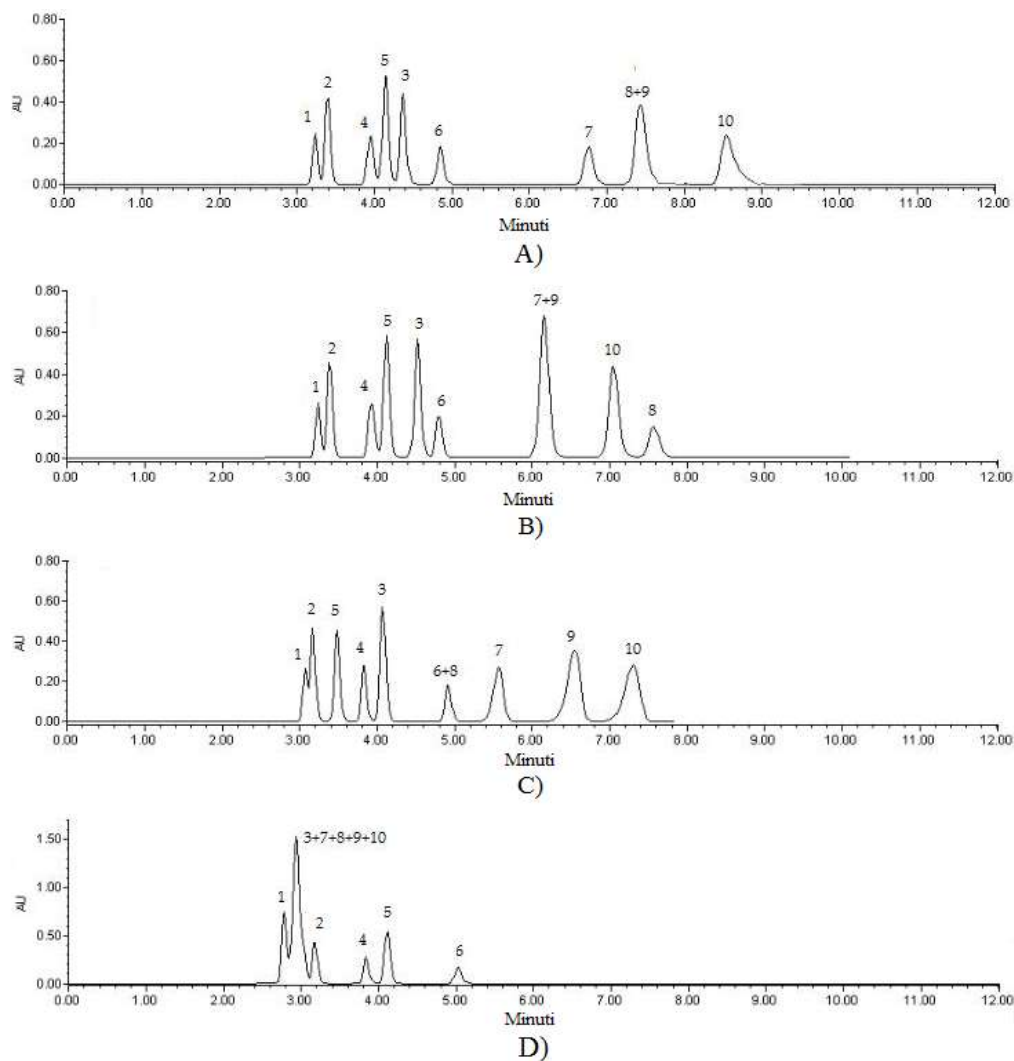
U drugoj fazi ovog dela istraživanja primenjen je Boks–Benken dizajn u cilju prikupljanja eksperimentalnih podataka koji su potom iskorišćeni za građenje eksperimentalnih retencionih modela. Na ovaj način omogućena je istovremena procena uticaja sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi i drugih faktora mobilne faze (pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi) na retenciono ponašanje analiziranih kiselih i neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci.

7.3.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA

Na početku je kao stacionarna faza za hromatografsku analizu odabrana *Alltima Amino* kolona, a njene karakteristike prikazane su u Eksperimentalnom delu, u poglavlju 6.6. Pošto je prisustvo elektrostatičke interakcije u retencionom mehanizmu kiselih analita u amino koloni bilo očekivano, bilo je neophodno da se u mobilnu fazu doda pufer u odgovarajućoj koncentraciji, kako bi se izbegla ireverzibilna adsorpcija analita na stacionarnu fazu i postigao zadovoljavajući oblik pikova. Zato se u početnoj fazi ovog dela istraživanja pristupilo odabiru odgovarajućeg pufera. U ovu svrhu ispitane su četiri vrste pufera: amonijum-formijat/mravlja kiselina, amonijum-acetat/glacijalna sirćetna kiselina, natrijum-hidrogenfosfat/*o*-fosforna kiselina, natrijum-citrat/limunska kiselina. Ostali hromatografski uslovi održavani su na konstantnim vrednostima i podešavani su

tako da se obezbedi prihvatljivo trajanje analize i postigne što bolje razdvajanje pikova u cilju smanjenja broja ponovljenih injektovanja usled preklapanja pikova. Takođe, pH vrednost vodene faze podešena je na 6,0, pa je na taj način omogućeno da analizirane kisele farmaceutski aktivne supstance budu u svom jonizovanom obliku u hromatografskom sistemu. Svi analizirani sulfonamidi poseduju slabo baznu arilamino grupu (pK_a odgovarajuće konjugovane baze je oko 1,9), međutim ona se pod primenjenim hromatografskim uslovima uvek nalazila u molekulskom obliku. U njihovoj strukturi takođe postoji i sulfonamidska funkcionalna grupa čija pK_a vrednost znatno varira, i ona iznosi za sulfanilamid 10,6, sulfametoksazol 5,6, sulfacetamid 5,4, sulfafurazol 5,0, furosemid 9,8, a za bumetanid 9,6. Ove vrednosti su izračunate pomoću *MarvinSketch* 6.1.0. softvera. U strukturama furosemida i bumetanida dodatno postoji i karboksilna funkcionalna grupa čije pK_a vrednosti iznose 4,2, odnosno 3,7. Kada je reč o jedinjenjima sa amidskom funkcionalnom grupom, tropikamid i nikotinamid u svojim strukturama poseduju piridinski prsten koji ima slabo bazni karakter (pK_a odgovarajuće konjugovane baze tropikamida je 5,3, a nikotinamida 3,4) i pod primenjenim hromatografskim uslovima su u molekulskom obliku, dok piracetam i tiracetam uopšte ne poseduju jonizacione centre. Dakle, pri pH vrednosti vodene faze 6,0 može se zaključiti da su sulfanilamid, tropikamid, nikotinamid, piracetam i tiracetam u analiziranom HILIC sistemu bili zastupljeni u molekulskom obliku, dok su sulfametoksazol, sulfacetamid, sulfafurazol, furosemid i bumetanid bili u monoanjonskom obliku.

U toku ispitivanja uticaja pufera na retenciono ponašanje analita sastav mobilne faze bio je sledeći: acetonitril–vodena faza (30 mmol L⁻¹ soli, pH podešen odgovarajućom kiselinom na 6,0) (80:20 V/V). Dobijeni hromatogrami pod navedenim uslovima, pri korišćenju različitih vrsta pufera, prikazani su na slici 28.



Slika 28. Hromatogrami dobijeni razdvajanjem analizirane smeše lekova pri sastavu mobilne faze: acetonitril–vodena faza (30 mmol L⁻¹ soli, pH podešen odgovarajućom kiselinom na 6,0) (80:20 V/V) korišćenjem pufera: A) amonijum-formijat/mravljja kiselina; B) amonijum-acetat/glacijalna sirćetna kiselina; C) natrijum-hidrogenfosfat/*o*-fosforna kiselina; D) natrijum-citrat/limunska kiselina. Pikovi analita označeni su brojevima: 1 – sulfanilamid, 2 – tropikamid, 3 – sulfametoksazol, 4 – tiracetam, 5 – nikotinamid, 6 – piracetam, 7 – sulfacetamid, 8 – sulfafurazol, 9 – furosemid, 10 – bumetanid.

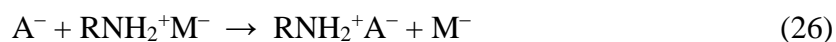
Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Analizom hromatograma na slici 28 ustanovljeno je da se, pri korišćenju različitih pufera, retenciono ponašanje analita u molekulskom obliku nije značajno menjalo. Simetrija odgovarajućih pikova u svim slučajevima bila je zadovoljavajuća. S druge strane, analiti koji su bili u jonizovanom obliku pokazali su značajno različito retenciono ponašanje i stepen separacije u prisustvu različitih pufera u datom hromatografskom sistemu. Do ovoga je najverovatnije došlo kao posledica različite koncentracije dostupnih suprotno naelektrisanih jona koji nastaju disocijacijom komponenti pufera i koji sa analitom kompetitivno učestvuju u procesu anjonske izmene. Naime, pri mešanju vodene faze odgovarajuće pH vrednosti i organske faze dobija se ukupna vodeno-organska mobilna faza različite pH vrednosti u odnosu na vodenu fazu. Stepene promene zavisi od dva faktora: pK_a vrednosti kisele komponente pufera i konstante autoprotolize organskog rastvarača [13, 66]. Ova promena pH vrednosti u ukupnoj mobilnoj fazi može značajno uticati na stepen jonizacije analita, broj jonizovanih rezidualnih silanolnih grupa na površini stacionarne faze, kao i na koncentraciju katjona i anjona dostupnih u mobilnoj fazi za reakcije katjonske i anjonske izmene, što može dovesti do drastičnih promena vezanih za stepen separacije analita [66]. Što se tiče simetrije pikova jonizovanih analita, narušena simetrija jedino je primećena pri mobilnoj fazi koja je sadržala fosfatni pufer, dok su u preostala tri slučaja dobijeni Gausovi pikovi. Ipak, najoštriji pikovi dobijeni su pri korišćenju acetatnog pufera. Zbog prihvatljive simetrije i oštine pikova, zadovoljavajućeg razdvajanja komponenti smeše, ali i zbog prihvatljivog trajanja hromatografske analize, acetatni pufer je odabran da se koristi u daljim fazama istraživanja.

U preliminarnoj fazi istraživanja takođe su identifikovani i rasponi vrednosti faktora mobilne faze (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi, pH vrednost vodene faze), odnosno definisan je eksperimentalni prostor koji će biti detaljno ispitan u narednim fazama.

7.3.2. ANJONSKO–IZMENJIVAČKI RETENCIONI MODELI

U ovom delu disertacije predložen je matematički opis procesa anjonske izmene kiselih analita u amino koloni. Odgovarajuće jednačine izvedene su na isti način kao i kod opisa katjonske izmene baznih analita u silika kolonama pod tzv. „pseudoreversno–faznim uslovima“ [33]. Preduslove za postojanje procesa anjonske izmene činili su pozitivno naelektrisana površina amino kolone i negativno naelektrisani kisel analiti. Isto kao i kod procesa katjonske izmene, u mobilnu fazu dodavana je i odgovarajuća so koja će dati jon suprotno naelektrisan u rastvoru u odnosu na površinu stacionarne faze. Sa ovim jonima, molekuli analita učestvovali su u procesu anjonske izmene. Ovaj proces može biti prikazan na sledeći način:



gde RNH_2^+ predstavlja naelektrisane amino grupe na površini stacionarne faze, A^- jonizovani oblik kiselog analita, dok je M^- suprotno naelektrisani jon.

Konstanta ravnoteže procesa anjonske izmene, K_{ix} , dobija se na sledeći način:

$$K_{ix} = \frac{[RNH_2^+A^-][M^-]}{[A^-][RNH_2^+M^-]} \quad (27)$$

Koncentracija jonizovanog oblika analita A^- zavisi od pH vrednosti mobilne faze.



Stoga, jednačina za izračunavanje konstante disocijacije, K_a , glasi:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (29)$$

Ako se uzme u obzir činjenica da samo jonizovani oblik analita A^- stupa u interakciju s površinom pozitivno naelektrisane stacionarne faze, koeficijent distribucije između stacionarne i mobilne faze, D_{ix} , može se izvesti na sledeći način:

$$D_{ix} = \frac{[RNH_2^+ A^-]}{[A^-] + [HA]} \quad (30)$$

Preuređivanjem jednačine (29) dobija se:

$$[HA] = \frac{[A^-][H^+]}{K_a} \quad (31)$$

Preuređivanjem jednačine (27) dobija se:

$$[A^-] = \frac{[RNH_2^+ A^-][M^-]}{K_{ix}[RNH_2^+ M^-]} \quad (32)$$

Zamenom člana $[HA]$ definisanog jednačinom (31) u jednačinu (30) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{[RNH_2^+ A^-]}{[A^-] + \frac{[A^-][H^+]}{K_a}} = \frac{[RNH_2^+ A^-]}{[A^-](1 + \frac{[H^+]}{K_a})} \quad (33)$$

Zamenom člana $[A^-]$ definisanog jednačinom (32) u jednačinu (33) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{[RNH_2^+ A^-]}{\frac{[RNH_2^+ A^-][M^-]}{K_{ix}[RNH_2^+ M^-]}(1 + \frac{[H^+]}{K_a})} \quad (34)$$

Sređivanjem jednačine (34) dobija se:

$$D_{ix} = \frac{K_{ix} [\text{RNH}_2^+ \text{M}^-]}{[\text{M}^-]} \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \quad (35)$$

Kako je koeficijent distribucije D_{ix} direktno proporcionalan retencionom faktoru odgovarajućeg analita, jednačinom (35) kompletno je opisan proces anjonske izmene, odnosno dolazi se do zaključka da je retencioni faktor analita obrnuto proporcionalan koncentraciji dodatog suprotno naelektrisanog jona. Ova zavisnost predstavljena je jednačinom (36):

$$k = m (1/[C]) + a \quad (36)$$

gde je, k retencioni faktor ispitivanog analita, $[C]$ koncentracija dodate soli, m nagib prave dobijen fitovanjem eksperimentalnih podataka u linearni model, a a odsečak. Tumačenje ove zavisnosti analogno je tumačenju jednačine (19) kojom je matematički definisan proces katjonske izmene.

Jednačina (36) takođe može biti prikazana kao klasična zavisnost logaritma retencionog faktora analita od logaritma koncentracije dodate soli:

$$\log k = -s \log [C] + a \quad (37)$$

gde je k retencioni faktor ispitivanog analita, $[C]$ koncentracija dodate soli, a odsečak, dok je s koeficijent koji zavisi od naelektrisanja analita i suprotno naelektrisanog jona. Ova jednačina je po svom obliku identična jednačini (20) katjnsko–izmenjivačkog procesa, stoga se i dobijeni rezultati mogu na isti način interpretirati.

Predloženi anjonsko–izmenjivački retencioni modeli iskorišćeni su u cilju određivanja doprinosa procesa anjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu analizirane smeše kiselih i neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci u amino koloni.

Oni podrazumevaju linearnu zavisnost retencionih faktora analita od inverzne vrednosti koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi (u konkretnom slučaju CH_3COO^- jona), odnosno linearnu zavisnost logaritma retencionih faktora od logaritma koncentracije suprotno naelektrisanog jona u mobilnoj fazi. Kako je koncentracija CH_3COO^- jona bila proporcionalna koncentraciji soli amonijum-acetata u vodenoj fazi, ove vrednosti korišćene su prilikom građenja anjonsko–izmenjivačkih retencionih modela. Eksperimentalni podaci dobijeni su tako što su retencioni podaci ispitivanih analita prikupljeni pri variranju koncentracije amonijum-acetata u rasponu od 10 mmol L^{-1} do 40 mmol L^{-1} , pri čemu su ostali faktori mobilne faze održavani na konstantnim vrednostima (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi bio je 80 %, dok je pH vrednost vodene faze bila podešena na 6,0). Dobijene vrednosti retencionih faktora fitovane su u odgovarajuće anjonsko–izmenjivačke retencione modele. U tabeli 13 prikazani su parametri kreiranih anjonsko–izmenjivačkih modela.

Tabela 13. Koeficijenti anjonsko–izmenjivačkih modela kiselih i neutralnih analita sa amino kolonom

Analiti	Modeli			
	$k = m (1/[C]) + a$		$\log k = m \log [C] + a$	
	a	m	a	m
<i>Neutralni analiti</i>				
Tropikamid	0,21	0*	-0,71	0*
Nikotinamid	0,48	0*	-0,35	0,02
Tiracetam	0,40	0*	-0,39	0*
Piracetam	0,74	0*	-0,120	0,04
Sulfanilamid	0,16	0*	-0,83	0,02
<i>Kiseli analiti</i>				
Sulfametoksazol	0**	14,22	1,21	-1,00
Sulfacetamid	0,72	28,51	1,23	-0,68
Sulfafurazol	0,35	25,58	1,23	-0,77
Furosemid	0,37	26,74	1,25	-0,77
Bumetanid	0,59	30,07	1,30	-0,74

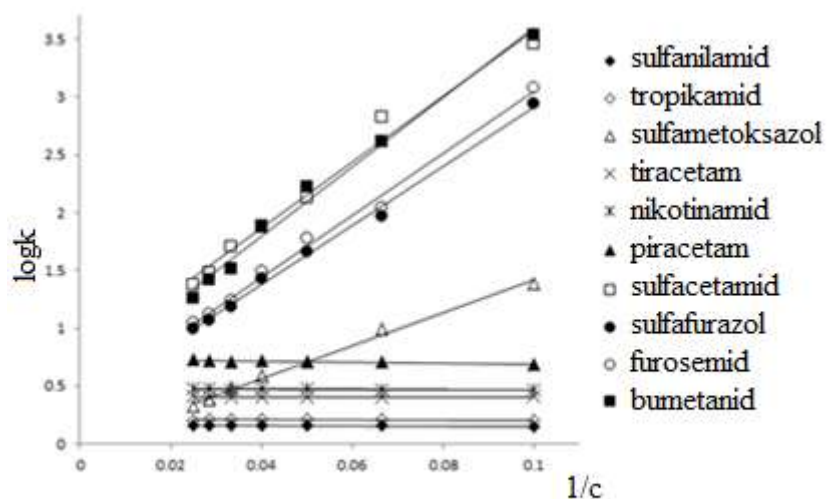
k – retencioni faktor analita; $[C]$ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi; a – odsečak linearnog modela; m – nagib linearnog modela

* nagib nije statistički značajan ($p > 0,05$)

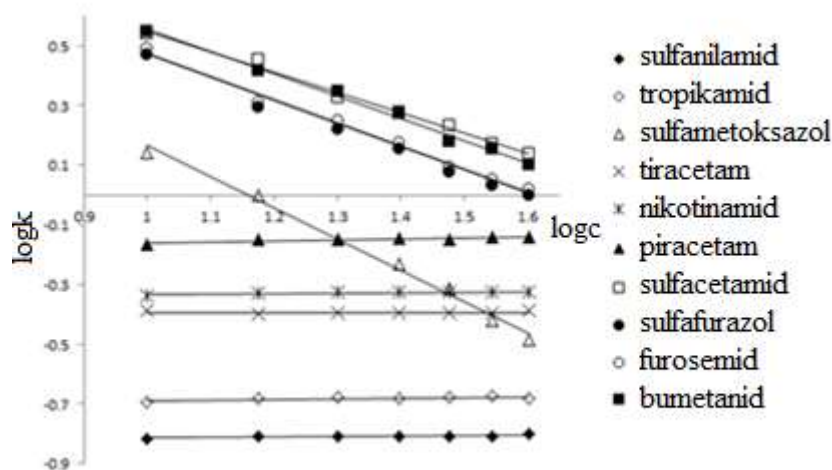
** odsečak nije statistički značajan ($p > 0,05$)

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr A 2013; 1301: 27–37.

Na osnovu podataka iz tabele 13, uspostavljeni anjonsko–izmenjivački retencioni modeli, prikazani su i grafički na slici 29.



A)



B)

Slika 29. Anjonsko–izmenjivački retencioni modeli kiselih i neutralnih analita sa amino kolonom dobijeni variranjem koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi u rasponu od 10 mmol L^{-1} do 40 mmol L^{-1} (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 80 % i pH vrednost vodene faze 6,0) predstavljeni kao: A) zavisnost retencionih faktora od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi i B) zavisnost logaritma retencionih faktora od logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi.

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Analizom uspostavljenih linearnih modela procenjen je doprinos procesa anjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. U slučaju neutralnih analita nagibi dobijenih modela nisu bili statistički značajni (tabela 13), što karakteriše odsustvo uticaja promene koncentracije amonijum-acetata na njihove retencione faktore, odnosno odsustvo doprinosa procesa anjonske izmene njihovom retencionom mehanizmu. Pri podešenoj pH vrednosti mobilne faze ovi analiti nisu u svojoj strukturi posedovali naelektrisane grupe, zbog čega nisu stupali u elektrostatičke interakcije sa silanolnim grupama. Stoga je ovakvo ponašanje i bilo očekivano. S druge strane, kod kiselih analita primećen je doprinos procesa anjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Pošto je pH vrednost mobilne faze bila veća od pK_a vrednosti kiselih grupa u strukturi ovih analita, oni su u hromatografskom sistemu bili prisutni u anjonskom obliku, koji može učestvovati u procesima anjonske izmene. Na osnovu odsečka linearnog modela zavisnosti retencionog faktora sulfametoksazola od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, koji nije bio statistički značajan, može se izvesti zaključak da je proces anjonske izmene bio jedini proces u retencionom mehanizmu ove farmaceutski aktivne supstance. Do istog zaključka može se doći i na osnovu nagiba linearnog modela zavisnosti logaritma retencionog faktora sulfametoksazola od logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi čija je vrednost iznosila -1 . Analizom koeficijenata modela ostalih analita iz tabele 13 može se uočiti da su odsecci linearnih modela zavisnosti retencionih faktora analita od inverzne vrednosti koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi bili različiti od nule, što ukazuje na činjenicu da su u njihov ukupni retencioni mehanizam pored procesa anjonske izmene uključeni i neki drugi procesi (npr. raspodela i/ili adsorpcija). Na isti zaključak navode i vrednosti nagiba linearnih modela zavisnosti logaritma retencionih faktora analita od logaritma koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi koje se nalaze između -1 i 0 .

7.3.3. DVOJNI HILIC/RP RETENCIONI MODELI

Ako se uzme u obzir da su amino grupe u amino koloni preko propil lanaca vezane za njenu površinu, sasvim je opravdano očekivati da će se razdvajanje analita u njima, u širokom rasponu sastava mobilne faze, odvijati pod uticajem dvojnog HILIC/RP mehanizma. Zato je u ovoj fazi istraživanja ispitan raspon udela vode u mobilnoj fazi od 5 % do 95 %, dok su ostali faktori mobilne faze održavani na konstantnim vrednostima (koncentracija amonijum-acetata na 20 mmol L⁻¹, pH vrednost vodene faze na 6,0). Prikupljeni retencioni podaci fitovani su metodom nelinearne regresije u odgovarajuće dvojne HILIC/RP retencione modele, koji su okarakterisani jednačinom (7), a detaljno objašnjeni u poglavlju 2.3. Izračunati regresioni koeficijenti kreiranih modela, odgovarajući koeficijenti determinacije, kojima je procenjen kvalitet fitovanja retencionih podataka, kao i minimumi funkcija, koji karakterišu sastav mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza između dva mehanizma, prikazani su u tabeli 14. Grafičkim predstavljanjem zavisnosti logaritma retencionih faktora od zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u ispitanom rasponu sastava mobilne faze dobijene su krive oblika latiničnog slova „U“ koje su karakteristične za dvojni HILIC/RP retencioni mehanizam (slika 30). Tačke prelaza između retencionih mehanizama, koje odgovaraju vrednostima φ_{\min} u tabeli 14, na ovim graficima uočavaju se pri minimalnim vrednostima retencionog faktora. Pri sadržajima vode u mobilnoj fazi pre ove tačke preovlađuje HILIC retencioni mehanizam, dok pri sadržajima vode u mobilnoj fazi nakon nje preovlađuje RP retencioni mehanizam.

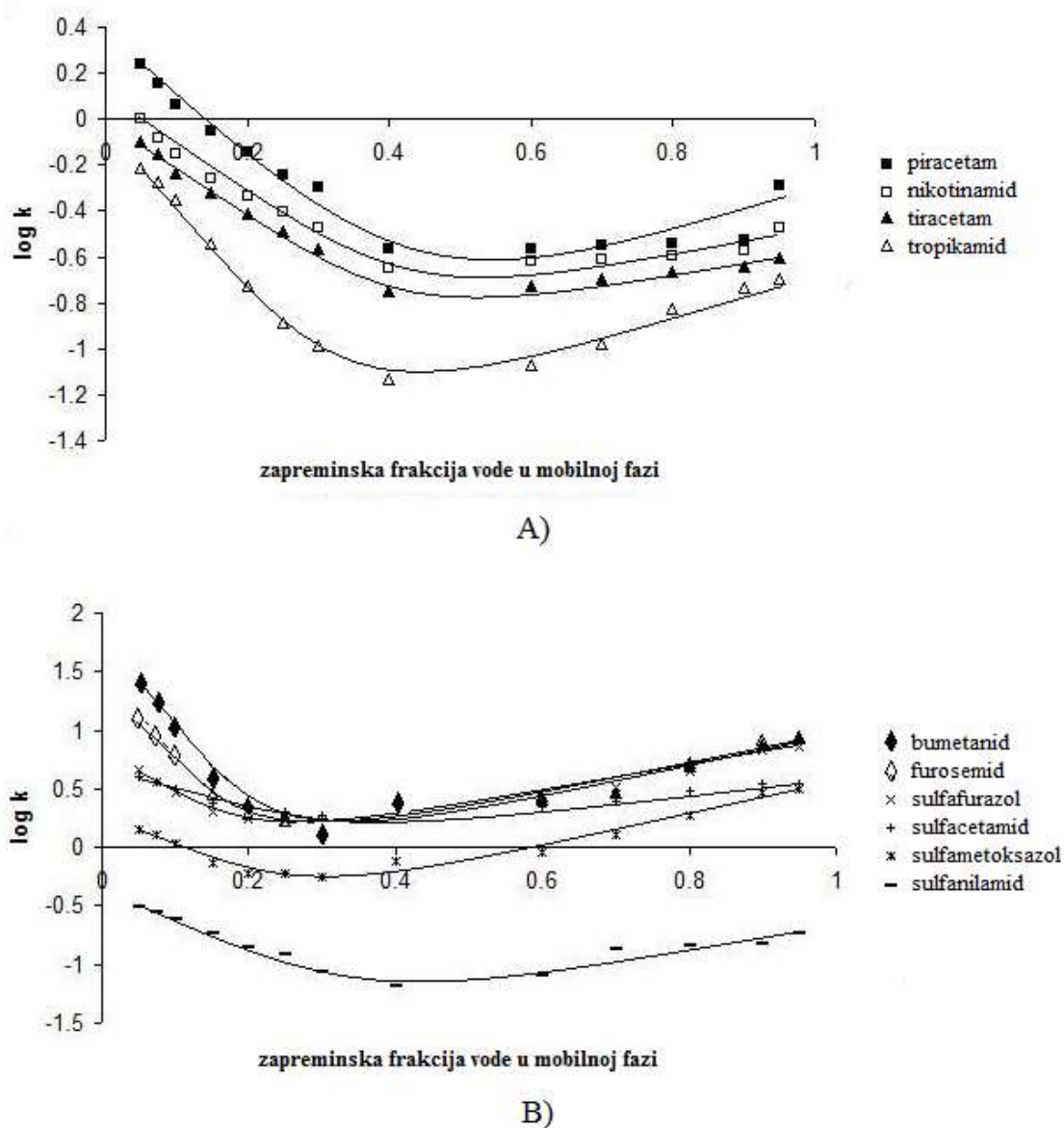
Tabela 14. Koeficijenti dvojnih HILIC/RP retencionih modela kiselih i neutralnih analita sa amino kolonom i minimalne vrednosti funkcija

Analiti	Model				
	$\log k = a + m_1 \varphi - m_2 \log \varphi$				
	<i>a</i>	<i>m</i> ₁	<i>m</i> ₂	R ²	φ_{\min}
<i>Neutralni analiti</i>					
Tropikamid	-1,62	1,00	0,94	0,9530	0,411
Nikotinamid	-1,34	0*	1,05	0,9632	–
Tiracetam	-1,59	0*	0,96	0,9723	–
Piracetam	-1,28	0*	1,12	0,9698	–
Sulfanilamid	-1,69	0,93	0,91	0,9489	0,423
<i>Kiseli analiti</i>					
Sulfametoksazol	-1,48	2,07	1,22	0,9731	0,256
Sulfacetamid	-0,33	0,91	0,70	0,9445	0,332
Sulfafurazol	-0,90	1,83	1,15	0,9771	0,272
Furosemid	-1,36	2,39	1,86	0,9594	0,336
Bumetanid	-1,14	2,08	1,92	0,9478	0,401

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; *a* – odsečak HILIC/RP modela; *m*₁ i *m*₂ – regresioni koeficijenti HILIC/RP modela; φ_{\min} – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi pri prelazu između RP i HILIC mehanizma; R² – koeficijent determinacije

* koeficijent nije statistički značajan (*p* > 0,05)

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr A 2013; 1301: 27–37.



Slika 30. Dvojni HILIC/RP retencioni modeli farmaceutski aktivnih supstanci sa A) amidskom i B) sulfonamidskom funkcionalnom grupom, dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 5 % do 95 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹ i pH vrednost vodene faze 6,0) sa amino kolonom.

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 14 može se uočiti da regresioni koeficijenti m_1 modela nikotinamida, piracetama i tiracetama nisu bili statistički značajni, što ukazuje na činjenicu da su ovi analiti pokazali slabo zadržavanje u sistemu u RP regionu mobilnih faza. Drugim rečima, ovi analiti razdvajali su se samo pod uticajem HILIC mehanizma. Kao posledica toga, minimumi ovih funkcija nisu postojali, pa ni odgovarajuće vrednosti φ_{\min} nisu izračunavane. Regresioni koeficijenti nelinearnih modela ostalih analita bili su statistički značajni, pa je i određivanje tačaka prelaza u njihovom retencionom mehanizmu bilo izvodivo. Adekvatnost uspostavljenih modela potvrđena je zadovoljavajućim vrednostima koeficijenata determinacije, čije su vrednosti bile u rasponu od 0,95 do 0,98. Tačke prelaza između retencionih mehanizama znatno su se razlikovale za različite analite (od 26 % do 42 % vode u mobilnoj fazi), što ukazuje na to da su strukturne osobine analita, takođe, značajno uticale na reticioni mehanizam koji je definisao njihovo razdvajanje u ispitivanom hromatografskom sistemu.

7.3.4. MODELOVANJE HILIC I RP REGIONA PARTICIONIM I ADSORPCIONIM RETENCIONIM MODELIMA

Nakon opisa sistema u širokom opsegu odnosa vode i acetonitrila u mobilnoj fazi pristupilo se zasebnom modelovanju HILIC i RP regiona sastava mobilne faze. Naime, reticioni podaci iz svakog od regiona fitovani su u odgovarajuće linearne particione i adsorpcione reticione modele, koji su okarakterisani jednačinama (4) i (5), a detaljno opisani u poglavljima 2.1, odnosno 2.2. Ostali faktori mobilne faze održavani su na konstantnim vrednostima (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹ i pH vrednost vodene faze 6,0). Na ovaj način omogućeno je predviđanje reticionog ponašanja ispitivanih analita i određivanje doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom retencionom mehanizmu u HILIC, odnosno RP regionu. HILIC region je bio ispitan tako što su reticioni podaci prikupljeni u rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi od 5 % do 25 % fitovani u odgovarajuće modele. Regresioni koeficijenti kreiranih modela i njihovi koeficijenti determinacije prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Koeficijenti particionih i adsorpcionih modela kiselih i neutralnih analita sa amino kolonom u HILIC rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi od 5 % do 25 %

Analiti	Modeli					
	Particioni model $\log k = \log k_0 - m \varphi$			Adsorpcioni model $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2	$\log k_0$	m	R^2
<i>Neutralni analiti</i>						
Tropikamid	0*	3,47	0,9974	-1,40	0,98	0,9398
Nikotinamid	0,07	1,99	0,9754	-0,74	0,58	0,9959
Tiracetam	0*	1,92	0,9876	-0,80	0,56	0,9816
Piracetam	0,33	2,36	0,9842	-0,63	0,69	0,9907
Sulfanilamid	-0,41	2,11	0,9922	-1,25	0,60	0,9665
<i>Kiseli analiti</i>						
Sulfametoksazol	0,24	2,11	0,9363	-1,25	0,60	0,9665
Sulfacetamid	0,66	1,60	0,9388	-0,63	0,62	0,9697
Sulfafurazol	0,71	2,19	0,8910	0*	0,47	0,9716
Furosemid	1,31	4,82	0,9371	-0,21	0,67	0,9758
Bumetanid	1,70	6,22	0,9583	-0,67	1,43	0,9826

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; $\log k_0$ – odsečak linearnog modela; m – nagib linearnog modela; R^2 – koeficijent determinacije

* odsečak nije statistički značajan ($p > 0,05$)

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr A 2013; 1301: 27–37.

Upoređivanjem vrednosti koeficijenata determinacije odgovarajućih particionih i adsorpcionih modela u HILIC regionu sastava mobilnih faza (tabela 15) ustanovljeno je da su adsorpcioni modeli obezbedili nešto bolju aproksimaciju retencionih podataka. Pod datim hromatografskim uslovima kiseli analiti bili su prisutni u sistemu u svom jonizovanom obliku, a koncentracija pufera je u ukupnoj mobilnoj fazi rasla s povećanjem udela vode u mobilnoj fazi. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je u retencionom mehanizmu u HILIC regionu proces adsorpcije u širem

smislu bio dominantniji od procesa raspodele. Međutim, ostalo je nepoznato u kojoj meri je do adsorpcije dolazilo usled nejonske, a u kojoj meri usled jonske komponente.

Raspon sadržaja vode u mobilnoj fazi za građenje retencionih modela u RP regionu bio je od 60 % do 95 %. Fitovanjem dobijenih retencionih podataka kreirani su odgovarajući particioni i adsorpcioni modeli. Njihovi regresioni koeficijenti i koeficijenti determinacije prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Koeficijenti particionih i adsorpcionih modela kiselih i neutralnih analita sa amino kolonom u RP rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi od 60 % do 95 %

Analiti	Modeli					
	Particioni model $\log k = \log k_0 - m \varphi$			Adsorpcioni model $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2	$\log k_0$	m	R^2
<i>Neutralni analiti</i>						
Tropikamid	-1,53	-0,34	0,7420	-0,63	-1,66	0,7899
Nikotinamid	-0,84	0**	0,6615	-0,51	0**	0,6152
Tiracetam	-0,93	0**	0,9780	-0,60	-0,59	0,9616
Piracetam	-0,95	0**	0,5087	-0,39	0**	0,4660
Sulfanilamid	-1,55	-0,86	0,8532	-0,71	-1,53	0,8803
<i>Kiseli analiti</i>						
Sulfametoksazol	-1,02	-1,62	0,9913	0,57	-2,85	0,9872
Sulfacetamid	0*	-0,60	0,9817	0,58	-1,06	0,9852
Sulfafurazol	-0,40	-1,33	0,9879	0,90	-2,34	0,9768
Furosemid	-0,59	-1,63	0,9511	1,01	-2,84	0,9317
Bumetanid	-0,59	-1,60	0,9745	0,98	-2,78	0,9575

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; $\log k_0$ – odsečak linearnog modela; m – nagib linearnog modela; R^2 – koeficijent determinacije

* odsečak nije statistički značajan ($p > 0,05$)

** nagib nije statistički značajan ($p > 0,05$)

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr A 2013; 1301: 27–37.

Upoređivanjem vrednosti koeficijenata determinacije odgovarajućih particionih i adsorpcionih modela u RP regionu sastava mobilnih faza (tabela 16) ustanovljeno je da su particioni modeli obezbedili nešto bolju aproksimaciju retencionih podataka. Na osnovu toga izveden je zaključak da je u retencionom mehanizmu u RP regionu proces raspodele bio dominantniji od procesa adsorpcije.

7.3.5. EKSPERIMENTALNI MODELI KREIRANI UZ POMOĆ HEMOMETRIJSKOG PRISTUPA

Kako je u prethodnim fazama ovog dela istraživanja na osnovu kreiranih teorijskih modela bilo moguće proceniti samo uticaj pojedinačnih faktora mobilne faze na retenciono ponašanje kiselih i neutralnih analita na amino koloni, u cilju procene istovremenog uticaja većeg broja faktora primenjen je sistematičan pristup. Na taj način omogućena je kvantifikacija uticaja ne samo pojedinačnih faktorskih uticaja, nego i njihovih interakcija na retencione faktore analita. Kao ispitivani faktori odabrani su: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi.

Odgovarajući eksperimentalni modeli razvijeni su primenom eksperimentalnog dizajna i metodologije površine odgovora. Boks–Benken dizajn, koji zahteva ispitivanje uticaja svakog faktora na tri nivoa, odabran je u konkretnom slučaju. Dizajn je dopunjen s tri replikacije u centralnoj tački kako bi se omogućila odgovarajuća statistička procena rezultata. Na osnovu podataka prikupljenih u preliminarnoj fazi definisani su opsezi ispitivanih faktora. Na taj način su kodiranim vrednostima -1 i $+1$ dodeljene sledeće stvarne vrednosti faktora: za sadržaj acetonitrila vrednosti 80 % i 90 %, za pH vrednost vodene faze 3,0 i 6,0, a za sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi vrednosti 10 mmol L⁻¹ i 40 mmol L⁻¹. Plan eksperimenata s nivoima faktora predstavljen je u tabeli 4, koja je prikazana u Eksperimentalnom delu disertacije u poglavlju 6.6. Nakon izvedenih eksperimenata sa odgovarajućih hromatograma očitavana su retencionna vremena. Iz vrednosti retencionih vremena i retencionog vremena pika mobilne faze izračunati su retencioni faktori. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Eksperimentalno dobijeni rezultati retencioni faktora kiselih i neutralnih analita

Eksp	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9	k_{10}
1	0,07	0,04	0,01	0,23	0,28	0,44	0,07	0,02	0,49	0,24
2	0,22	0,40	0,17	0,58	0,64	1,08	0,30	0,30	3,29	2,85
3	0,05	0,04	0,60	0,23	0,29	0,45	1,96	1,32	1,09	1,09
4	0,20	0,35	0,83	0,60	0,66	1,19	2,96	2,63	4,97	9,10
5	0,04	0,02	0,14	0,23	0,29	0,46	0,91	1,28	2,54	2,84
6	0,22	0,38	0,82	0,60	0,64	1,20	2,82	3,45	10,63	10,79
7	0,06	0,04	0,03	0,24	0,30	0,46	0,34	0,40	0,90	0,82
8	0,22	0,38	0,40	0,60	0,66	1,15	1,19	1,26	3,44	5,94
9	0,11	0,14	0,04	0,36	0,430	0,67	0,17	0,16	1,86	1,10
10	0,11	0,13	1,07	0,35	0,42	0,68	3,46	2,94	3,08	3,53
11	0,13	0,16	0,05	0,35	0,42	0,65	0,14	0,09	0,71	0,44
12	0,10	0,12	0,48	0,35	0,42	0,69	1,73	1,14	1,04	1,26
13	0,08	0,11	0,14	0,34	0,42	0,69	0,70	0,79	1,58	1,68
14	0,10	0,12	0,14	0,35	0,42	0,70	0,70	0,79	1,62	1,79
15	0,10	0,12	0,14	0,34	0,41	0,67	0,71	0,84	1,70	1,85

k_1 – retencioni faktor sulfanilamida; k_2 – retencioni faktor tropikamida; k_3 – retencioni faktor sulfametoksazola; k_4 – retencioni faktor tiracetama; k_5 – retencioni faktor nikotinamida; k_6 – retencioni faktor piracetama; k_7 – retencioni faktor sulfacetamida; k_8 – retencioni faktor sulfafurazola; k_9 – retencioni faktor furosemida; k_{10} – retencioni faktor bumetanida

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Metodom višestruke linearne regresije retencioni podaci fitovani su u polinom drugog reda. Adekvatnost modela ispitana je ANOVA testom, a kao relevantni statistički parametri korišćeni su R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 . Koeficijenti dobijenih kvadratnih modela, njihova statistička značajnost, kao i ostali relevantni statistički parametri prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18. Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za posmatrane odgovore i njihova statistička analiza

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

	<i>k</i> ₁		<i>k</i> ₂		<i>k</i> ₃		<i>k</i> ₄		<i>k</i> ₅	
	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>
b₁	0,0630	<0,0001*	0,140	<0,0001*	0,15	0,0068*	0,170	<0,0001*	0,150	<0,0001*
b₂	0,0019	0,4942	0,002	0,4477	0,31	0,0002*	0,013	0,3453	0,016	0,0004*
b₃	0,0001	0,9584	0,002	0,5435	-0,13	0,0135*	-0,021	0,1516	-0,003	0,2222
b₁₂	0,0001	0,9818	-0,001	0,6551	0,01	0,8833	0,003	0,8764	-0,001	0,6379
b₁₃	0,0024	0,5396	-0,004	0,3071	-0,06	0,2356	-0,035	0,1007	-0,003	0,3011
b₂₃	-0,0140	0,0140*	-0,015	0,0068*	-0,14	0,0296*	-0,007	0,6918	-0,006	0,0603
b₁₁	0,0200	0,0032*	0,061	<0,0001*	0,07	0,0307*	0,065	0,0167*	0,033	<0,0001*
b₂₂	0,0064	0,1549	0,048	0,2299	0,14	0,0600	-0,025	0,2389	-0,009	0,0173*
b₃₃	0,0160	0,0681	0,019	0,0932	0,11	0,0837	0,033	0,1357	0,004	0,0236*
R²	0,9922		0,9987		0,9662		0,9760		0,9992	
Adj. R²	0,9781		0,9963		0,9055		0,9329		0,9979	
Pred. R²	0,8930		0,9825		0,7419		0,7809		0,9924	

*k*₁ – retencioni faktor sulfanilamida; *k*₂ – retencioni faktor tropikamida; *k*₃ – retencioni faktor sulfametoksazola; *k*₄ – retencioni faktor tiracetama; *k*₅ – retencioni faktor nikotinamida; R² – koeficijent determinacije

*x*₁ – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); *x*₂ – pH vrednost vodene faze; *x*₃ – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

* koeficijenti modela značajni za *p* < 0,05

	<i>k</i> ₆		<i>k</i> ₇		<i>k</i> ₈		<i>k</i> ₉		<i>k</i> ₁₀	
	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>	<i>koef.</i>	<i>p-vred.</i>
b₁	0,29	<0,0001*	0,42	0,0035*	0,49	0,0031*	1,87	0,0028*	3,34	0,0064*
b₂	-0,0033	0,0023*	1,06	<0,0001*	0,84	0,0003*	0,95	0,0461*	1,87	0,0382*
b₃	-0,01	0,1049	-0,45	0,0027*	-0,55	0,0017*	-1,33	0,0113*	-1,88	0,0485*
b₁₂	0,02	0,0546	0,16	0,2211	0,22	0,1508	0,24	0,6393	1,18	0,3103
b₁₃	-0,01	0,5595	-0,22	0,1066	-0,28	0,0442*	-1,20	0,0450*	-2,17	0,0434*
b₂₃	-0,01	0,5071	-0,40	0,0178*	-0,40	0,0262*	-0,22	0,6653	-0,38	0,7322
b₁₁	0,09	0,0001*	0,23	0,0470*	0,32	0,0400*	1,53	0,0286*	2,97	0,0417*
b₂₂	-0,02	0,0524	0,30	0,0540	-0,12	0,4214	-0,84	0,1561	-1,67	0,1878
b₃₃	0,02	0,0902	0,31	0,0485*	0,37	0,0392*	0,89	0,1357	1,51	0,2264
R²	0,9981		0,9813		0,9733		0,9328		0,9038	
Adj. R²	0,9948		0,9475		0,9251		0,8118		0,7307	
Pred. R²	0,9776		0,8043		0,7123		0,5132		0,4721	

*k*₆ – retencioni faktor piracetama; *k*₇ – retencioni faktor sulfacetamida; *k*₈ – retencioni faktor sulfafurazola; *k*₉ – retencioni faktor furosemida; *k*₁₀ – retencioni faktor bumetanida; R² – koeficijent determinacije

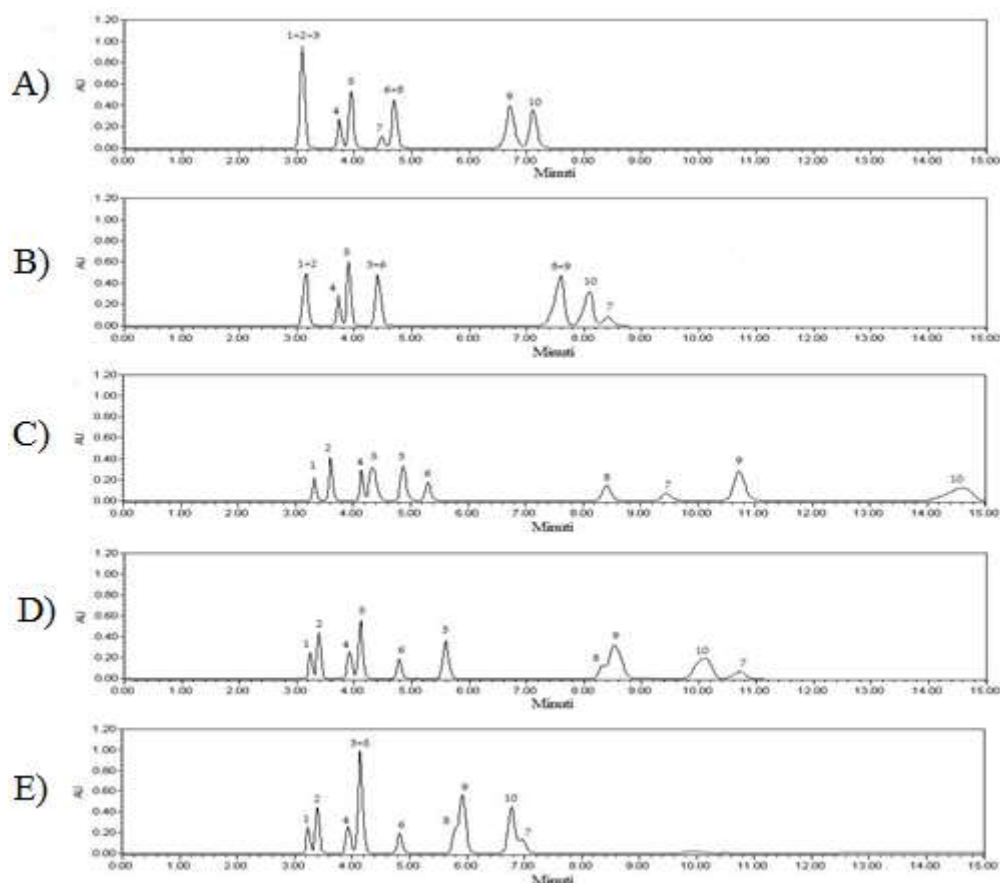
* koeficijenti modela značajni za $p < 0,05$

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr A 2013; 1301: 27–37.

Na osnovu statističkih parametara iz tabele 18 procenjena je adekvatnost dobijenih modela. Dobijene vrednosti R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 bliske 1,0 ukazuju na njihovu dobru sposobnost aproksimacije eksperimentalno dobijenih retencionih podataka. Koeficijenti polinoma drugog reda, koji su bili statistički značajni ($p < 0,05$), ušli su u konačne retencione modele analiziranih supstanci.

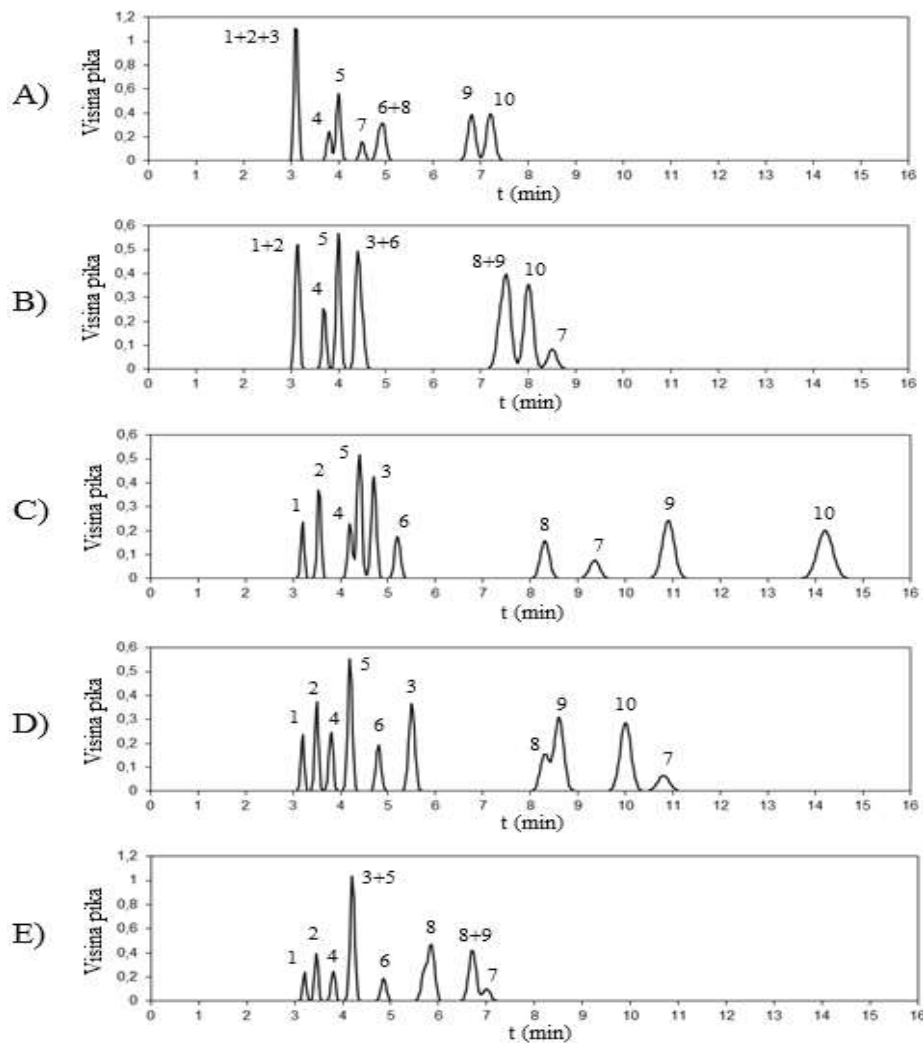
7.3.6. VERIFIKACIJA KROZ EKSPERIMENTE KREIRANIH EKSPERIMENTALNIH MODELA

Nakon statističke potvrde pouzdanosti uspostavljenih retencionih modela kiselih i neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci sprovedena je i njihova eksterna verifikacija, izvođenjem pet dodatnih eksperimenata u nasumično odabranim tačkama eksperimentalnog prostora. Dobijeni hromatogrami predstavljeni su na slici 31. Nakon toga su, za odabrane kombinacije vrednosti ispitivanih faktora, upoređena eksperimentalno dobijena retencionna vremena analiziranih supstanci sa teorijskim vrednostima retencionih vremena izračunatih rešavanjem kreiranih kvadratnih jednačina. Rešenja datih jednačina predstavljena su na simuliranim hromatogramima na slici 32. Poređenjem eksperimentalno dobijenih i simuliranih hromatograma potvrđeno je dobro slaganje rezultata, čime je dokazano da dobijeni matematički modeli omogućavaju adekvatno predviđanje retencionog ponašanja analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci u ispitanom eksperimentalnom prostoru.



Slika 31. Eksperimentalno dobijeni hromatogrami za verifikaciju pri sledećim sastavima mobilne faze: A) acetonitril–vodena faza (30 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,5) (80:20 V/V); B) acetonitril–vodena faza (20 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 5,5) (75:25 V/V); C) acetonitril–vodena faza (20 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 5,5) (85:15 V/V); D) acetonitril–vodena faza (15 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 6,0) (80:20 V/V); E) acetonitril–vodena faza (35 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 6,0) (80:20 V/V). Pikovi analita označeni su brojevima: 1) sulfanilamid; 2) tropikamid; 3) sulfametoksazol; 4) tiracetam; 5) nikotinamid; 6) piracetam; 7) sulfacetamid; 8) sulfafurazol; 9) furosemid; 10) bumetanid.

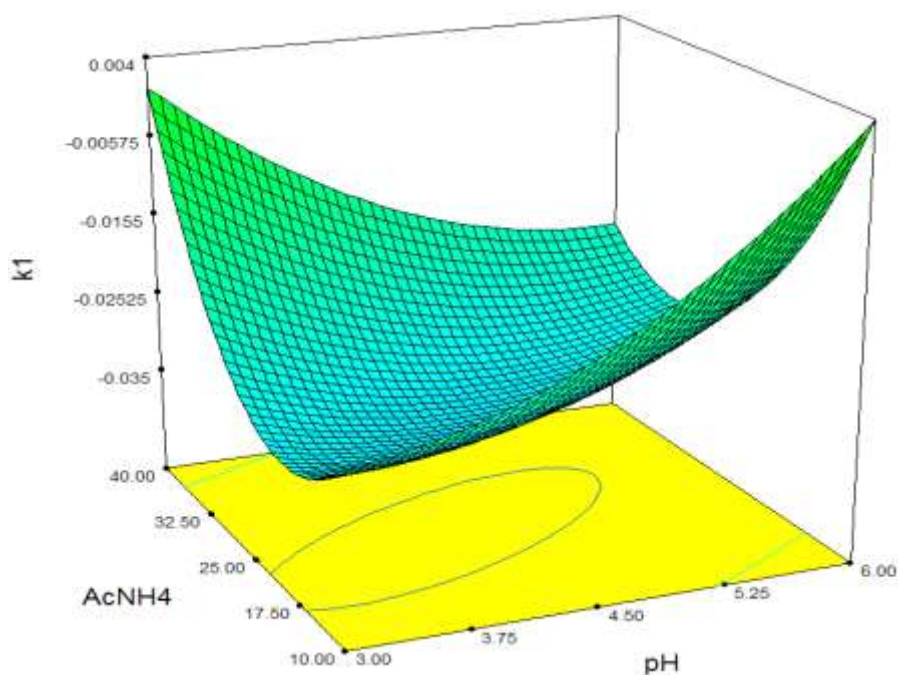
Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.



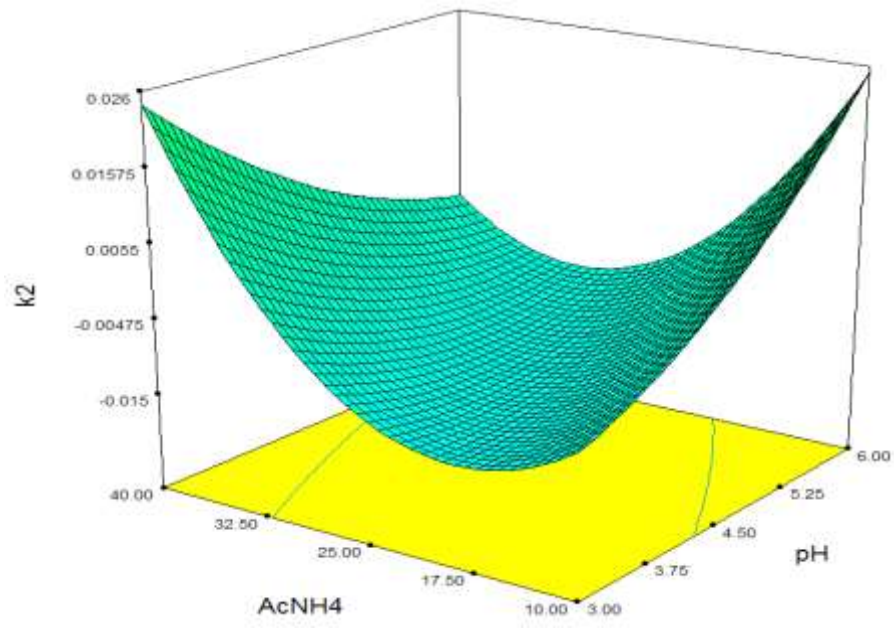
Slika 32. Simulirani hromatogrami za sledeće kombinacije vrednosti ispitivanih faktora mobilne faze: A) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 80 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 30 mmol L⁻¹, pH 4,5; B) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 75 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹, pH 5,5; C) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 85 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹, pH 5,5; D) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 80 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 15 mmol L⁻¹, pH 6,0; E) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 80 %, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi 35 mmol L⁻¹, pH 6,0. Brojevi kojima su označeni pikovi odgovarajućih analita isti su kao i na hromatogramima prikazanim na slici 31.

7.3.7. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE KISELIH I NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

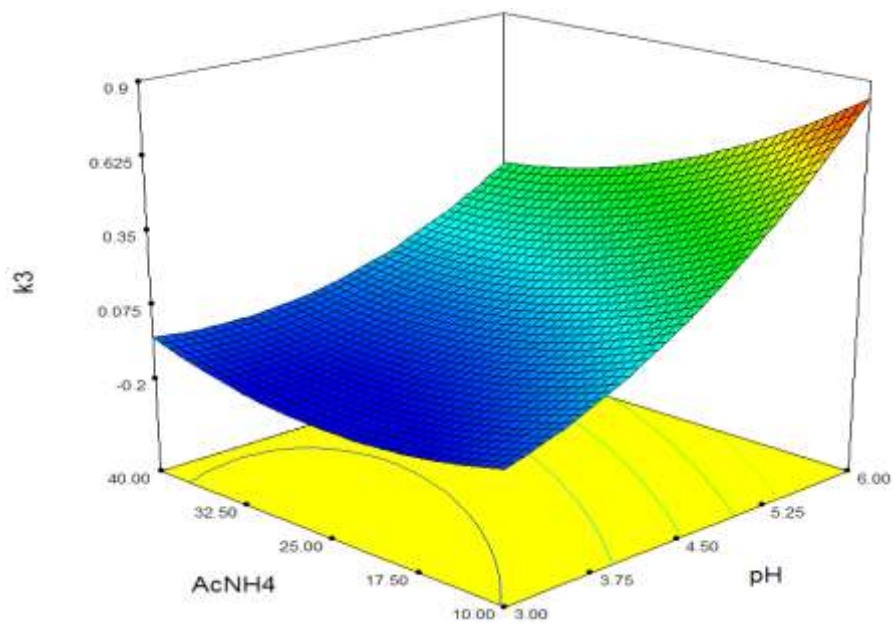
U tabeli 18 prikazani su statistički značajni regresioni koeficijenti kreiranih eksperimentalnih retencionih modela. Na osnovu njih izvršena je procena uticaja pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih kiselih i neutralnih analita. Statistički značajne interakcije ilustrovane su trodimenzionim površinama odgovora koje su prikazane na slici 33. U retencionim modelima sulfanilamida, tropikamida, sulfametoksazola, sulfacetamida i sulfafurazola statistički je bila značajna faktorska interakcija pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, a njena ilustracija prikazana je trodimenzionim površinama odgovora (slika 33 A–E). S druge strane, u modelima sulfafurazola, furosemida i bumetanida postojala je statistički značajna interakcija sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, a odgovarajuće trodimenzione površine odgovora grafički su prikazane (slika F–H).



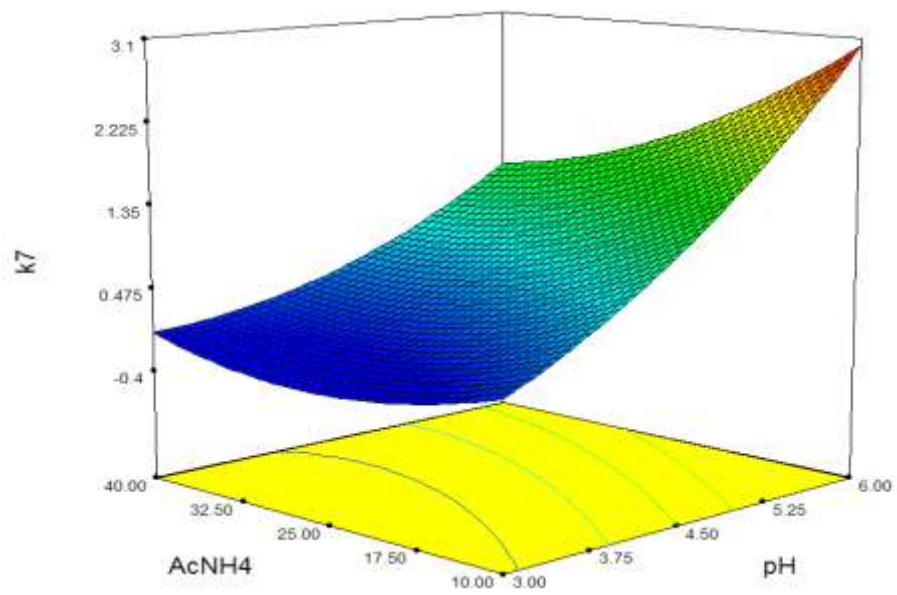
A)



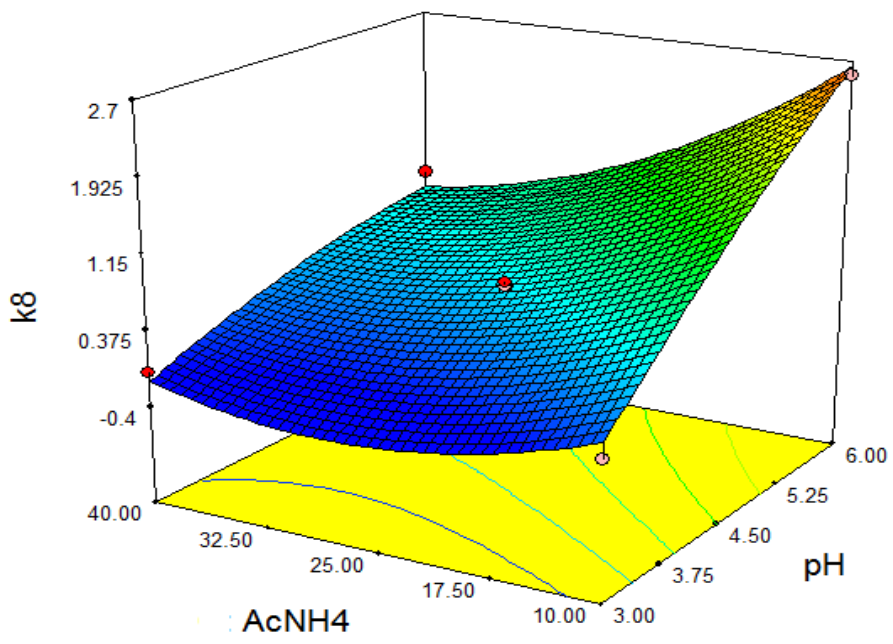
B)



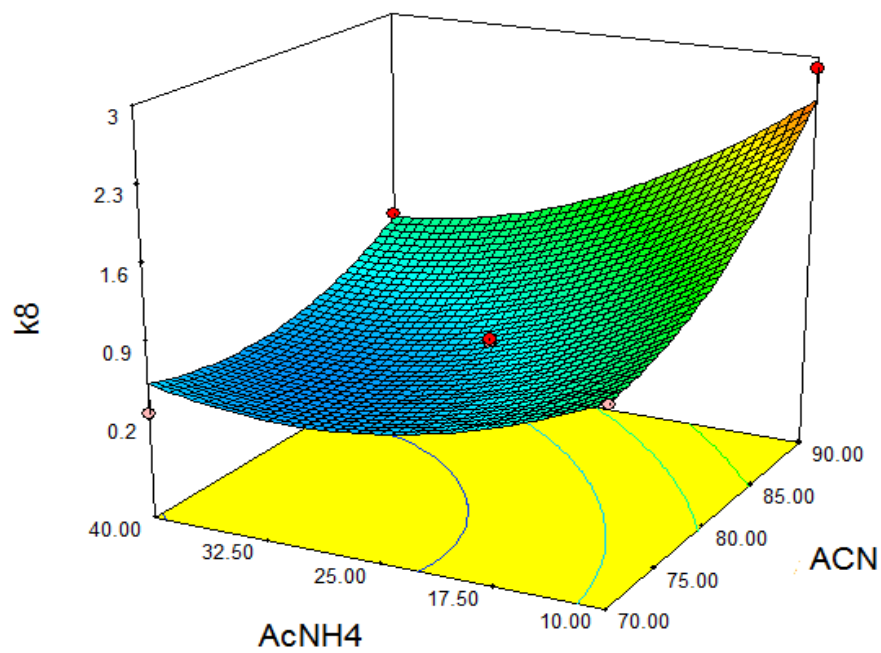
C)



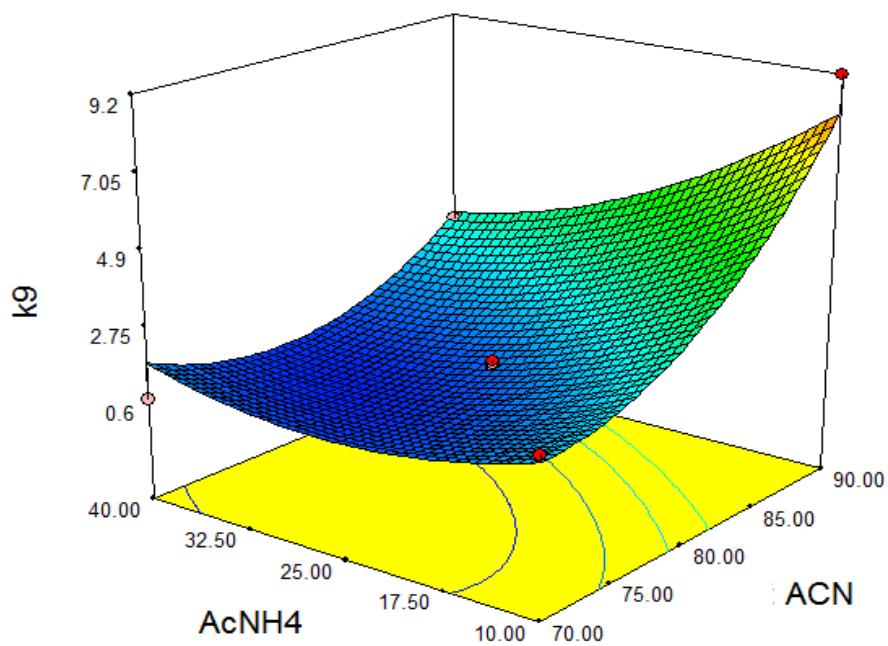
D)



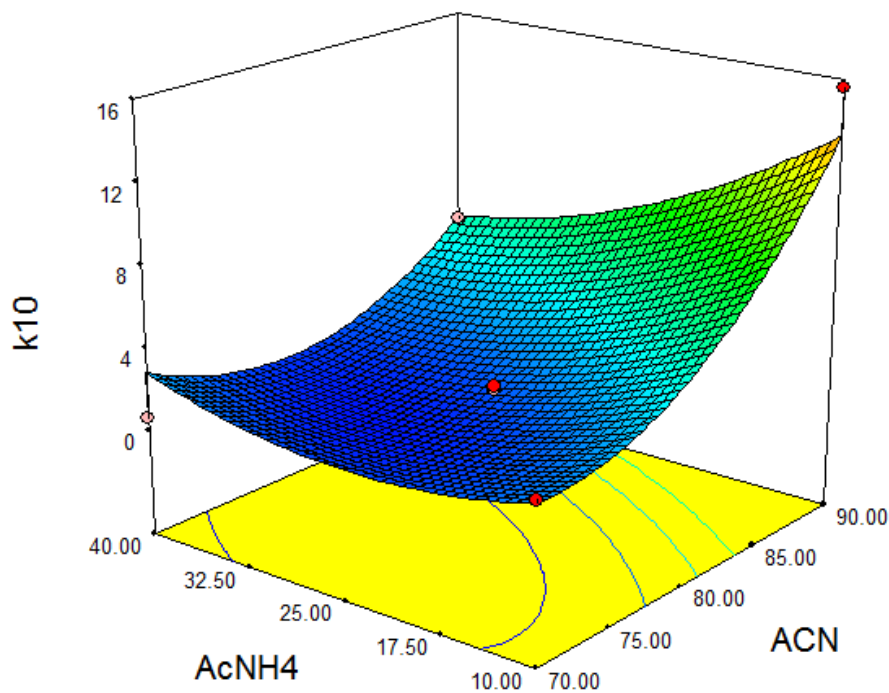
E)



F)



G)



H)

Slika 33. Trodimenzione površine odgovora: A – E) $k = f$ (pH vrednost vodene faze, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi); F – H) $k = f$ (% acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi). Retencioni faktori odgovaraju sledećim analitima: k_1 – retencioni faktor sulfanilamida; k_2 – retencioni faktor tropikamida; k_3 – retencioni faktor sulfametoksazola; k_7 – retencioni faktor sulfacetamida; k_8 – retencioni faktor sulfafurazola; k_9 – retencioni faktor furosemida; k_{10} – retencioni faktor bumetanida. ACN – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, AcNH4 – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi, pH – pH vrednost vodene faze.

Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

Metodologija eksperimentalnog dizajna u konkretnom slučaju omogućila je da se ispitivani uticaji faktora kvantifikuju, čime je postignut kompletan opis retencionog ponašanja analiziranih analita sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom u amino koloni. Uticaji faktora i njihovih interakcija procenjeni su na osnovu koeficijenata kreiranih matematičkih modela (tabela 18), a vizuelnu potvrdu izvedenih zaključaka omogućile su konstruisane trodimenzione površine odgovora (slika 33).

Na osnovu koeficijenata b_1 , b_2 i b_3 kreiranih retencionih modela procenjivani su uticaji pojedinačnih faktora mobilne faze, odnosno sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi na retenciono ponašanje analita (tabela 18). Očekivano, koeficijenti b_1 u svim modelima bili su statistički značajni, a njihov pozitivan predznak ukazuje na porast zadržavanja analiziranih komponenti s porastom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi u datom HILIC sistemu. Priroda ove zavisnosti bila je nelinearnog karaktera, što su potvrdili statistički značajni kvadratni koeficijenti b_{11} u kreiranim modelima. Koeficijenti b_2 bili su statistički značajni u modelima sulfametoksazola, nikotinamida, piracetama, sulfacetamida, sulfafurazola, furosemida i bumetanida. Mada su u modelima nikotinamida i piracetama apsolutne vrednosti ovih koeficijenata bile izuzetno male. Zbog toga, uprkos njihovoj statističkoj značajnosti, okarakterisani uticaj pH vrednosti vodene faze na retencione faktore ovih analita nije imao fizički smisao. Uzevši još dodatno u obzir i izostanak uticaja pH vrednosti vodene faze na retenciono ponašanje sulfanilamida, tropikamida i tiracetama, može se izvesti zaključak da je ovaj faktor ispoljio uticaj na kisele, ali ne i na neutralne komponente analizirane smeše. Kako neutralni analiti nisu mogli da podlegnu procesu jonizacije u ispitanom opsegu pH vrednosti vodene faze, ovakav zaključak svakako ima smisla. S druge strane, apsolutne vrednosti b_2 koeficijenata kiselih analita imali su pozitivan predznak, što ukazuje na produženje zadržavanja odgovarajućih analita s povećanjem pH vrednosti vodene faze. Ako se uzme u obzir da su sve amino grupe na površini amino kolone u ispitanom opsegu pH vrednosti mobilne faze (3,0 – 6,0) bile u jonizovanom obliku, i da su pK_a vrednosti kiselih grupa u strukturi ispitivanih kiselih analita bile unutar ovog opsega, može se pretpostaviti da je porast zadržavanja ovih analita s povećanjem pH vrednosti vodene faze posledica njihovog prelaska iz molekuskog u jonizovani oblik. Tada

proces anjonske izmene postaje dominantna komponenta retencionog mehanizma. Slično, b_3 koeficijenti statistički su bili značajni samo u modelima kiselih analita. Njihov negativan predznak ukazuje na to da je povećanje koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi dovelo do kraćeg zadržavanja ovih analita u datom HILIC sistemu. Do ovoga dolazi tako što se CH_3COO^- jon iz acetatnog pufera „takmiči“ s molekulima negativno naelektrisanih analita za građenje elektrostatičke interakcije s pozitivno naelektrisanim amino grupama na površini stacionarne faze. Povećanjem koncentracije amonijum-acetata, sve veći broj amino grupa biva zauzeto CH_3COO^- jonima, pa privlačna elektrostatička interakcija sve manje doprinosi zadržavanju molekula analita. U ovaj tip interakcija nisu stupali neutralni analiti, stoga je uticaj koncentracije amonijum-acetata na njih izostao. Ovakvo ponašanje detaljno je objašnjeno prilikom razmatranja doprinosa procesa anjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu u poglavlju 7.3.2.

Podaci iz tabele 18 takođe ukazuju na činjenicu da pojedinačni faktori mobilne faze nisu nezavisno uticali na retenciono ponašanje analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci. Naime, koeficijenti b_{23} u slučaju modela sulfanilamida, tropikamida, sulfametoksazola, sulfacetamida i sulfafurazola bili su statistički značajni, što potvrđuje postojanje interakcije pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi. Na odgovarajućim trodimenzionim površinama odgovora (slika 33 A – E) može se uočiti da porast pH vrednosti vodene faze dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora analita pri manjim koncentracijama amonijum-acetata u vodenoj fazi, nego pri većim. U slučaju sulfanilamida i tropikamida koeficijenti b_{23} imali su veoma malu apsolutnu vrednost, stoga ova interakcija nije imala fizički smisao. Interakcija ovih faktora u modelima preostala tri analita može biti objašnjena time da je uticaj elektrostatičkog privlačenja na molekule analita pri njihovom prelasku iz molekulskog u jonizovani oblik, pri povećanju pH vrednosti mobilne faze, izraženiji kada je koncentracija suprotno naelektrisanog CH_3COO^- jona, odnosno koncentracija amonijum-acetata, manja. Na taj način, manji broj CH_3COO^- jona „konkuriše” za vezivna mesta na površini stacionarne faze, time olakšavajući prilaz molekulima analita. U slučaju retencionih modela sulfafurazola, furosemida i bumetanida koeficijenti b_{13} , koji karakterišu interakciju sadržaja acetonitrila i koncentracije amonijum-acetata u

vodenoj fazi, bili su takođe statistički značajni. Posmatranjem trodimenzionih površina odgovora (slika 33 F – H) primećuje se da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora ovih analita pri manjim koncentracijama amonijum-acetata u vodenoj fazi, nego pri većim. Naime, pri većim sadržajima acetonitrila u mobilnoj fazi debljina adsorbovanog vodenog sloja na površini amino stacionarne faze je manja, a pozitivno naelektrisane amino grupe postaju dostupnije analitu. S druge strane, manja koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi uslovljava manju koncentraciju CH_3COO^- jona koji imaju tendenciju da se vežu za te amino grupe. Na taj način, privlačne elektrostatičke interakcije maksimalno doprinose retencionom mehanizmu analita, čime se postiže njihovo duže zadržavanje u hromatografskom sistemu.

7.3.8. UTICAJ STRUKTURNIH OSOBINA KISELIH I NEUTRALNIH ANALITA NA NJIHOVO RETENCIONO PONAŠANJE

U prethodnim poglavljima razmotreni su uticaji sastava mobilne faze i karakteristika amino kolone na retenciono ponašanje i retencione mehanizme analita kiselih i neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci. Na kraju ovog dela istraživanja ukratko će biti razmotreno retenciono ponašanje ovih farmaceutski aktivnih supstanci kroz prizmu njihovih fizičko-hemijskih osobina. Tumačenje redosleda eluiranja neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci sprovedeno je bez poteškoća zbog znatno jednostavnijeg retencionog mehanizma ovih analita u odnosu na kisele farmaceutski aktivne supstance. Nakon izvođenja eksperimenata pod različitim hromatografskim uslovima, u prethodnim fazama istraživanja, zapaženo je da su se neutralni analiti eluirali redosledom rastuće polarnosti i to na sledeći način: sulfanilamid ($\log P = 1,5$), tropikamid ($\log P = 1,3$), tiracetam ($\log P = -0,3$), nikotinamid ($\log P = -0,4$), piracetam ($\log P = -1,5$). Na osnovu ovoga moglo se zaključiti da je polarnost ovih analita bitno uticala na njihovo retenciono ponašanje. S druge strane, redosled eluiranja kiselih analita nije samo zavisio od njihove polarnosti, nego i od oblika u kojima su oni bili zastupljeni u hromatografskom sistemu (molekulski ili jonski). Zato se njihov redosled eluiranja menjao u zavisnosti od sastava mobilne faze, a posebno kao posledica promene pH vrednosti mobilne faze, koja je direktno uticala na to u kom obliku će se

analizirani molekul naći u sistemu. Generalno, jonizovani oblici molekula duže su se zadržavali u hromatografskom sistemu nego molekulski, što je posledica postojanja privlačne elektrostatičke interakcije u njihovom retencionom mehanizmu.

U ovom delu disertacije prvi put je predložen matematički opis procesa anjonske izmene u nekom HILIC sistemu. Dobijeni teorijski modeli omogućili su kvantifikaciju udela procesa anjonske izmene u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu kiselih analita na površini amino stacionarne faze.

7.4. ISPITIVANJE RETENCIONIH MEHANIZAMA I RAZVOJ HILIC METODE ZA ANALIZU JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI

U ovoj disertaciji je na nekoliko mesta ukazano na nedostatak adsorpcionih teorijskih retencionih modela u proceni do koje mere je adsorpcija jonizovanih analita na površinu naelektrisanih polarnih stacionarnih faza posledica jonske, a do koje mere nejonske komponente adsorpcije. Samim tim, otežano je i određivanje relativnog doprinosa procesa adsorpcije i raspodele ukupnom HILIC retencionom mehanizmu ovih tipova analita. Međutim, u slučaju neutralnih analita, kod kojih se očekuje odsustvo procesa jonske izmene u retencionom mehanizmu, može se smatrati da se teorijskim modelima može znatno tačnije protumačiti doprinos procesa adsorpcije i raspodele.

Prema tome, cilj ovog dela disertacije bio je da se izvrši procena udela procesa adsorpcije i raspodele u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci u četiri različite kolone (dve silika i dve diolne), kao i da se izvrši optimizacija hromatografskog razdvajanja ispitivanih analita građenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih modela. Kao model smeša za ovaj deo istraživanja odabrana je smeša joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C.

Eksperimentalno dobijeni podaci, koji karakterišu retenciono ponašanje prikupljeni variranjem odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi u određenom rasponu, korišćeni su za građenje odgovarajućih teorijskih modela. Kako linearni teorijski modeli (adsorpcioni i particioni) nisu obezbedili zadovoljavajuću aproksimaciju podataka, u tu svrhu kreirani su nelinearni teorijski modeli (kvadratni particioni i mešoviti adsorpciono-particioni). Na osnovu njih su potom izvedeni zaključci o retencionim mehanizmima analiziranih neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci u datim kolonama.

Kako se komponente odabrane model smeše mogu naći u odgovarajućim farmaceutskim oblicima, još jedan od ciljeva ovog dela disertacije bio je i razvoj HILIC metode za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci u rastvorima za intravensku primenu. Optimizacija hromatografskog razdvajanja date smeše izvedena je korišćenjem

metodologije eksperimentalnog dizajna. S obzirom da je u ovom delu istraživanja planirano da se istovremeno variraju tri kvantitativna (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze) i jedan kvalitativni faktor (tip kolone) primenjen je D–optimalni dizajn. Na osnovu kreiranih eksperimentalnih retencionih modela omogućena je kvantitativna procena faktorskih uticaja i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih komponenti smeše. Kako direktno modelovanje faktora selektivnosti kritičnog para smeše nije dalo zadovoljavajući model, pristupilo se indirektnom modelovanju ovog odgovora sistema. Identifikacija optimalnih uslova razdvajanja postignuta je tehnikom pretraživanja čvorova mreže. U cilju potvrđivanja pouzdanosti postavljene HILIC metode, izvršena je i njena validacija.

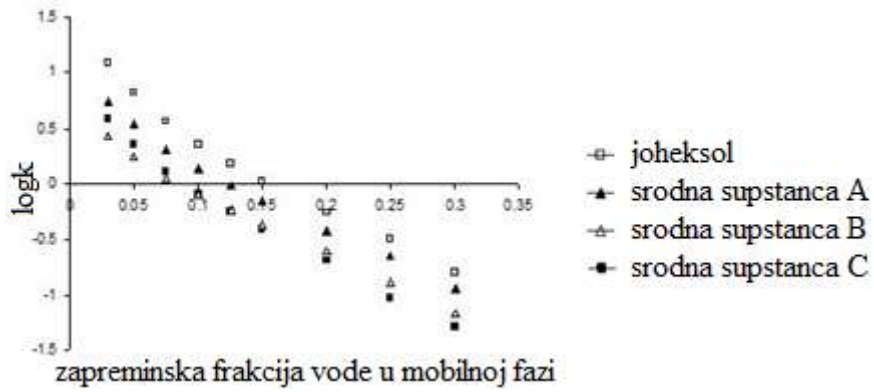
7.4.1. PRELIMINARNA FAZA ISTRAŽIVANJA

U preliminarnoj fazi istraživanja odabrana model smeša analizirana je u većem broju polarnih kolona. Komponente smeše pokazale su zadovoljavajući afinitet prema silika i diolnim kolonama, stoga su u nastavku istraživanja eksperimenti izvođeni u dve silika i dve diolne kolone, čije su karakteristike prikazane u Eksperimentalnom delu, u poglavlju 6.7. *Betasil Silica* i *Betasil Diol* kolone spadaju u klasični tip HILIC stacionarnih faza. *Kinetex HILIC* je tip porozne silika kolone dobijen specifičnom tehnologijom fuzionisanih jezgara, čime je smanjena mogućnost pojave ireverzibilne adsorpcije analita. *Luna HILIC* svrstava se u tip unakrsno povezanih diolnih stacionarnih faza dobijenih tehnologijom unakrsnog povezivanja diolnih grupa preko etarskih mostova, pri čemu je formiran polimerni sloj na površini silike. Takođe je grubo ispitan i uticaj hromatografskih faktora na retenciono ponašanje analita, a posebno onih koji se odnose na sastav mobilne faze. Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi pokazao je najveći uticaj. Iako bi se očekivalo da jonska jačina i pH vrednost mobilne faze ne utiču na retenciono ponašanje neutralnih analita u HILIC sistemima zbog odsustva naelektrisanja u njihovoj strukturi, prilikom izvođenja preliminarnih eksperimenata primećeno je da koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze ipak pokazuju uticaj na retenciono ponašanje joheksola i njegovih srodnih supstanci. Naravno, stepen tog uticaja bio je znatno slabiji u odnosu na sadržaj

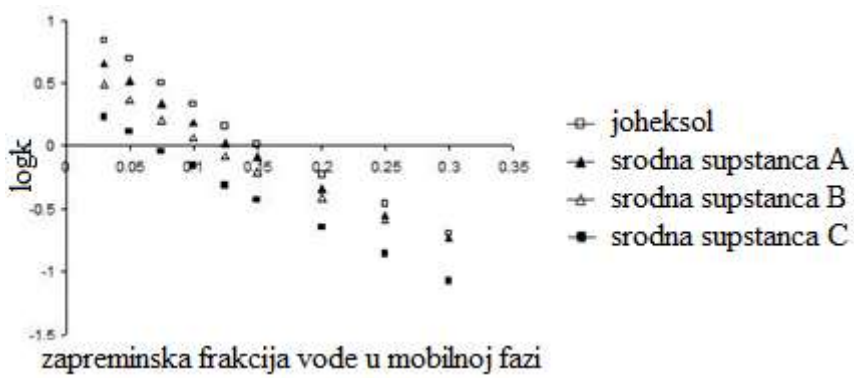
acetonitrila u mobilnoj fazi. U literaturi je pronađeno objašnjenje za ovakvo ponašanje neutralnih analita u HILIC sistemima. Smatra se da povećana koncentracija soli, poput amonijum-acetata, u mobilnoj fazi dovodi do povećanja debljine adsorbovanog vodenog sloja na površini polarne stacionarne faze, a time i do produžavanja zadržavanja analita u HILIC sistemu [3]. Pronađeno je takođe i objašnjenje za produženo zadržavanje ovih analita u silikagel i hemijski modifikovanim silika kolonama pri povećanju pH vrednosti mobilne faze. Naime, pretpostavlja se da tada usled povećanja jonizacije slobodnih silanolnih grupa, a time i povećanja naelektrisanja na površini stacionarne faze, takođe dolazi do povećanja debljine vodenog sloja na njenoj površini [67]. Prikupljeni podaci tokom preliminarne faze korišćeni su i prilikom definisanja raspona vrednosti faktora značajnih za naredne faze istraživanja.

7.4.2. LINEARNI I NELINEARNI TEORIJSKI MODELI

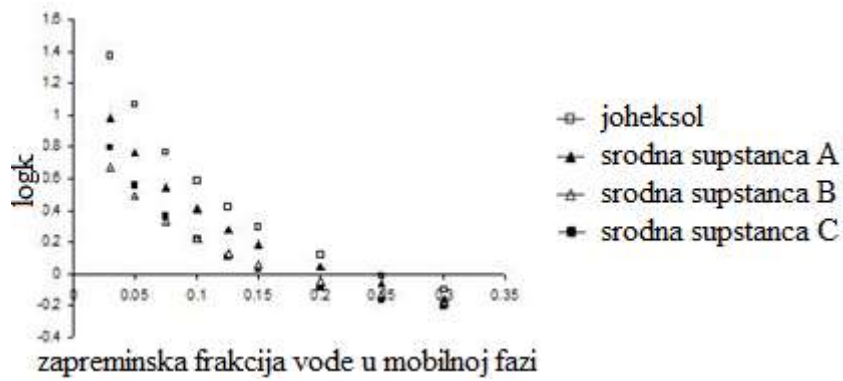
Kako bi se omogućila procena doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu analiziranih neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci u četiri prethodno odabrane kolone, kreirani su teorijski modeli koji opisuju zavisnost retencionih faktora analita od odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi izraženog kao zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi. Retencionni podaci prikupljeni su u rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi od 3 % do 30 %, dok su ostali faktori mobilne faze održavani na konstantnim vrednostima (koncentracija amonijum-acetata na 20 mmol L^{-1} , pH vrednost vodene faze na 4,5), nakon čega je izvršena njihova aproksimacija pomoću linearnih particionih odnosno adsorpcionih teorijskih modela. Grafički prikazi fitovanja retencionih podataka analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci u linearne particione, odnosno u adsorpcione retencione modele sa sve četiri kolone predstavljeni su na slikama 34 i 35.



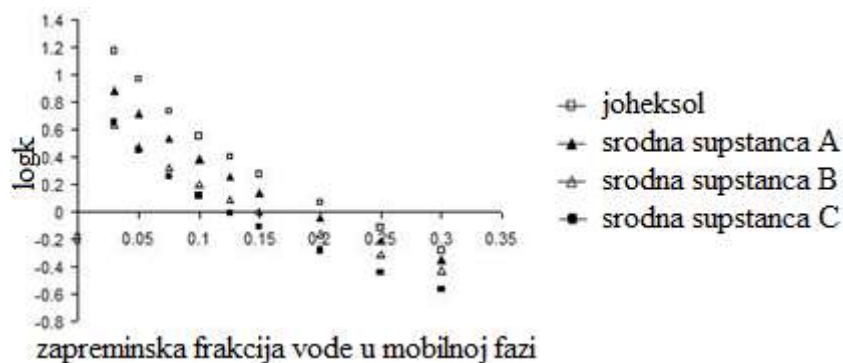
A)



B)



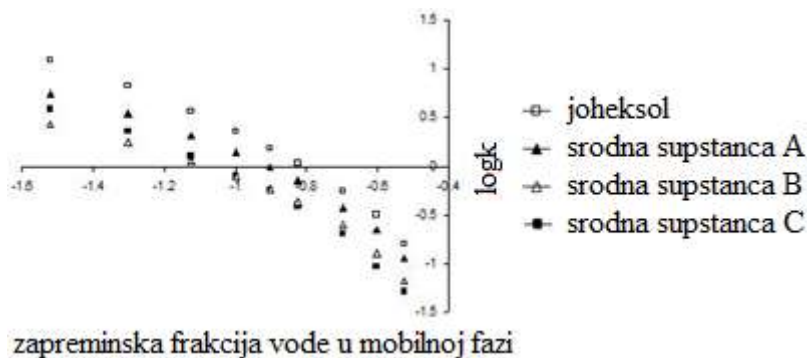
C)



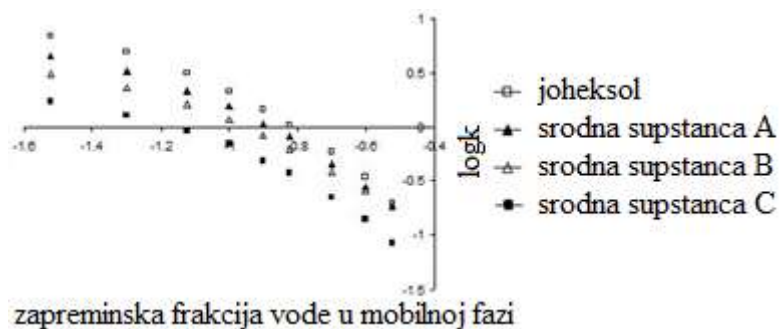
D)

Slika 34. Linearni particioni retencioni modeli neutralnih analita dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi od 3 % do 30 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L⁻¹ i pH vrednost vodene faze 4,5) sa kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Luna HILIC*, C) *Kinetex HILIC*, D) *Betasil Diol*.

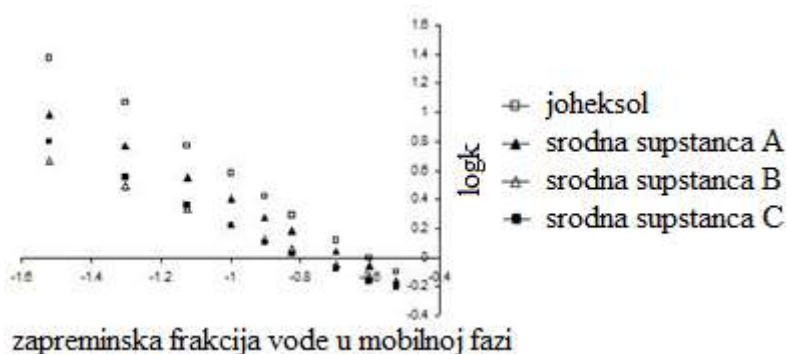
Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.



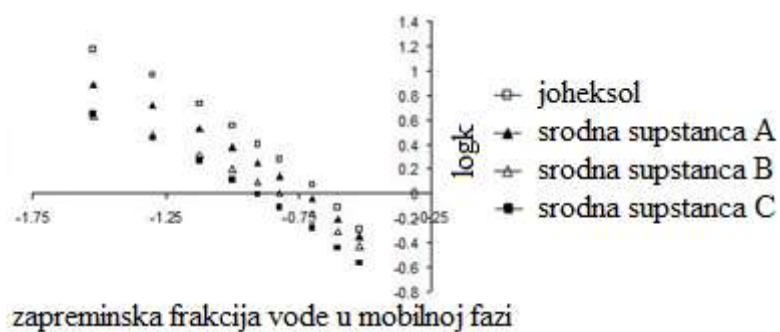
A)



B)



C)



D)

Slika 35. Linearni adsorpcijski retencijski modeli neutralnih analita dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi od 3 % do 30 % (sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi 20 mmol L^{-1} i pH vrednost vodene faze 4,5) sa kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Luna HILIC*, C) *Kinetex HILIC*, D) *Betasil Diol*.

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

Nelinearan karakter zavisnosti prikazanih na slikama 34 i 35 ukazuje na činjenicu da nijedan od predloženih linearnih modela ne može da adekvatno fituje prikupljene retencione podatke neutralnih analita sa *Betasil Silica*, *Luna HILIC* i *Betasil Diol* kolona. Ovaj zaključak potvrđen je i na osnovu izračunatih R^2 vrednosti i standardnih grešaka kreiranih modela. Naime, R^2 vrednosti linearnih particionih modela za različite analite kretale su se sa *Betasil Silica* kolonom u rasponu 0,9755 – 0,9882, sa *Luna HILIC* kolonom u rasponu 0,9805 – 0,9889, a sa *Betasil Diol* kolonom u rasponu 0,9510 – 0,9651, dok su vrednosti standardne greške sa *Betasil Silica* kolonom bile u rasponu 0,046 – 0,103, sa *Luna HILIC* kolonom u rasponu 0,032 – 0,063, a sa *Betasil Diol* kolonom u rasponu 0,071 – 0,108. S druge strane, R^2 vrednosti linearnih adsorpcionih modela za različite analite kretala se sa *Betasil Silica* kolonom u rasponu 0,9400 – 0,9728, sa *Luna HILIC* kolonom u rasponu 0,9360 – 0,9613, a sa *Betasil Diol* kolonom u rasponu 0,9816 – 0,9904, dok su vrednosti standardne greške sa *Betasil Silica* kolonom bile u rasponu 0,109 – 0,141, sa *Luna HILIC* kolonom u rasponu 0,089 – 0,122, a sa *Betasil Diol* kolonom u rasponu 0,042 – 0,060. Jedino je sa *Kinetex HILIC* kolonom linearni adsorpcioni model izvršio zadovoljavajuću aproksimaciju retencionih podataka (R^2 vrednosti u rasponu 0,9947 – 0,9991, vrednosti standardne greške u rasponu 0,011 – 0,026). Ovo je takođe ilustrovano i na slici 35 C. Prema tome, uspostavljeni adsorpcioni modeli mogu se koristiti za predviđanje retencionog ponašanja ispitivanih analita na *Kinetex HILIC* koloni u definisanom rasponu sastava mobilne faze. Takođe, dobro fitovanje retencionih podataka u ove modele ukazuje na to da je na ovoj koloni adsorpcija dominantan proces u retencionom mehanizmu. Kako zbog prirode analita jonska komponenta ne učestvuje u retencionom mehanizmu, može se izvesti zaključak da je proces adsorpcije posledica interakcija isključivo nejonskog karaktera. Pošto je u strukturama analiziranih supstanci prisutan veliki broj hidroksilnih i amidnih grupa, opravdano se može pretpostaviti da su upravo vodonične veze, koje nastaju između ovih grupa i silanolnih grupa na površini *Kinetex HILIC* stacionarne faze, glavni tip interakcija u retencionom mehanizmu.

Sa preostale tri kolone linearni teorijski modeli nisu bili efikasni u aproksimaciji retencionih podataka. Na osnovu toga može se pretpostaviti da su se u ispitanom opsegu sastava mobilnih faza analizirane farmaceutski aktivne supstance u njima razdvajale

mešovitim retencionim mehanizmom. Jedno od mogućih rešenja za matematičko opisivanje ovakvih sistema je fitovanje retencionih podataka metodom nelinearne regresije. U tabeli 19 prikazani su koeficijenti dobijenih nelinearnih modela sa *Betasil Silica*, *Luna HILIC* i *Betasil Diol* kolonama sa odgovarajućim R^2 vrednostima. U istoj tabeli prikazani su i koeficijenti linearnih adsorpcionih modela dobijeni sa *Kinetex HILIC* koloni, kao i odgovarajuće R^2 vrednosti.

Tabela 19. Regresioni koeficijenti kvadratnih particionih, mešovutih adsorpciono–particionih i linearnih adsorpcionih modela joheksola i njegovih srodnih supstanci sa četiri kolone

Kolone	Analiti	Modeli										
		$\log k = \log k_0 + m_1 \varphi - m_2 \log \varphi$				$\log k = \log k_0 + a \varphi + b \varphi^2$				$\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
		$\log k_0$	m_1	m_2	R^2	$\log k_0$	a	b	R^2	$\log k_0$	m	R^2
<i>Betasil Silica</i>	Joheksol	-0,090	-0,829	-3,844	0,9995	1,156	-7,834	0,087	0,9848	-	-	-
	A	-0,180	-0,700	-3,703	0,9990	0,856	-6,944	0,087	0,9905	-	-	-
	B	-0,205	-0,490	-3,790	0,9986	0,578	-6,645	1,095	0,9831	-	-	-
	C	-0,109	-0,494	-4,661	0,9988	0,640	-7,343	2,095	0,9951	-	-	-
<i>Luna HILIC</i>	Joheksol	-0,192	-0,800	-2,978	0,9914	0,920	-6,339	1,999	0,9865	-	-	-
	A	-0,269	-0,710	-2,785	0,9850	0,721	-5,829	2,000	0,9793	-	-	-
	B	-0,336	-0,641	-2,591	0,9836	0,560	-5,503	3,000	0,9726	-	-	-
	C	-0,195	-0,392	-3,754	0,9907	0,344	-5,266	0,294	0,9888	-	-	-
<i>Betasil Diol</i>	Joheksol	-0,491	-1,154	-1,183	0,9998	0,989	-5,003	2,499	0,9953	-	-	-
	A	-0,424	-0,919	-1,212	0,9995	0,812	-5,022	4,497	0,9947	-	-	-
	B	-0,518	-0,813	-0,990	0,9996	0,607	-4,513	3,164	0,9960	-	-	-
	C	-0,832	-1,042	-0,938	0,9999	0,560	-4,811	2,098	0,9836	-	-	-
<i>Kinetex HILIC</i>	Joheksol	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,917	-1,501	0,9983
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,755	-1,153	0,9991
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,642	-0,864	0,9989
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,787	-1,024	0,9947

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; $\log k_0$ – odsečak odgovarajućeg modela; a , b , m , m_1 i m_2 – regresioni koeficijenti odgovarajućih modela, A – srodna supstanca A; B – srodna supstanca B; C – srodna supstanca C; R^2 – koeficijent determinacije

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

Poređenjem R^2 vrednosti odgovarajućih kvadratnih particionih i mešovutih adsorpciono-particionih modela može se ustanoviti da su mešoviti adsorpciono-particioni modeli bolje fitovali retencione podatke. Da bi se ispitala mogućnost predviđanja uspostavljenih nelinearnih modela, a time i konačno potvrdila njihova adekvatnost, pristupilo se njihovoj internoj validaciji. Naime, u nekoliko tačaka ispitanog eksperimentalnog prostora izračunate su relativne greške između eksperimentalno dobijenih i modelima predviđenih vrednosti retencionih faktora analita. Vrednosti izračunatih relativnih grešaka prikazane su u tabeli 20.

Tabela 20. Poređenje između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora ispitivanih analita sa tri kolone u odgovarajućim tačkama eksperimentalnog prostora

Analit	ϕ^1	Model	Betasil Silica			Luna HILIC			Betasil Diol		
			Exp ²	Pre ³	Err ⁴	Exp	Pre	Err	Exp	Pre	Err
I	0,05	1	6,68	6,27	6,14	4,87	5,01	2,87	9,19	8,93	2,83
		2		5,82	12,87		4,05	16,84		5,56	39,50
	0,10	1	2,24	2,26	0,89	2,13	2,04	4,23	3,56	3,50	1,68
		2		2,37	5,80		2,02	5,16		3,26	8,43
	0,15	1	1,06	1,04	1,89	1,04	1,05	0,96	1,89	1,91	1,06
		2		0,96	9,43		1,03	0,96		1,97	4,23
	0,25	1	0,32	0,28	12,50	0,35	0,35	0,00	0,76	0,78	2,63
		2		0,16	50,00		0,29	17,14		0,81	6,58
A	0,05	1	3,46	3,51	1,45	3,28	3,27	0,30	5,24	5,14	1,91
		2		3,23	6,65		2,72	17,07		3,74	28,63
	0,10	1	1,39	1,41	1,44	1,53	1,45	5,23	2,42	2,37	2,07
		2		1,45	4,32		1,44	5,88		2,26	6,61
	0,15	1	0,71	0,69	2,82	0,82	0,79	3,66	1,39	1,42	2,16
		2		0,65	8,45		0,78	4,88		1,45	4,32
	0,25	1	0,22	0,21	4,55	0,28	0,29	3,57	0,62	0,67	8,06
		2		0,13	40,91		0,24	14,29		0,69	11,29
B	0,05	1	1,78	1,75	1,69	2,31	2,34	1,30	3,00	3,09	3,00
		2		1,67	6,18		1,96	15,15		2,45	18,33
	0,10	1	0,79	0,81	2,53	1,17	1,11	5,13	1,59	1,57	1,26
		2		0,84	6,33		1,10	5,98		1,54	3,14
	0,15	1	0,43	0,43	0,00	0,63	0,64	1,59	1,00	1,01	1,00
		2		0,40	6,98		0,64	1,59		1,01	1,00
	0,25	1	0,13	0,14	7,69	0,26	0,25	3,85	0,50	0,53	6,00
		2		0,10	23,08		0,24	7,69		0,47	6,00
C	0,05	1	2,25	2,00	11,11	1,29	1,34	3,88	2,83	3,00	6,01
		2		1,89	16,00		1,21	6,20		2,11	25,44
	0,10	1	0,82	0,83	1,22	0,69	0,66	4,35	1,30	1,31	0,77
		2		0,84	2,44		0,66	4,35		1,26	3,08
	0,15	1	0,39	0,40	2,56	0,37	0,37	0,00	0,77	0,77	0,00
		2		0,38	2,56		0,36	2,70		0,77	0,00
	0,25	1	0,09	0,10	11,11	0,14	0,13	7,14	0,36	0,36	0,00
		2		0,08	11,11		0,11	21,43		0,31	13,89

I – joheksol; A – srodna supstanca A; B – srodna supstanca B; C – srodna supstanca C

¹ zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi

² Exp – eksperimentalno dobijene vrednosti retencionih faktora

³ Pre – predviđene vrednosti retencionih faktora mešovitim adsorpciono-particionim modelom (1) i kvadratnim particionim modelom (2)

⁴ Err – relativna greška (%)

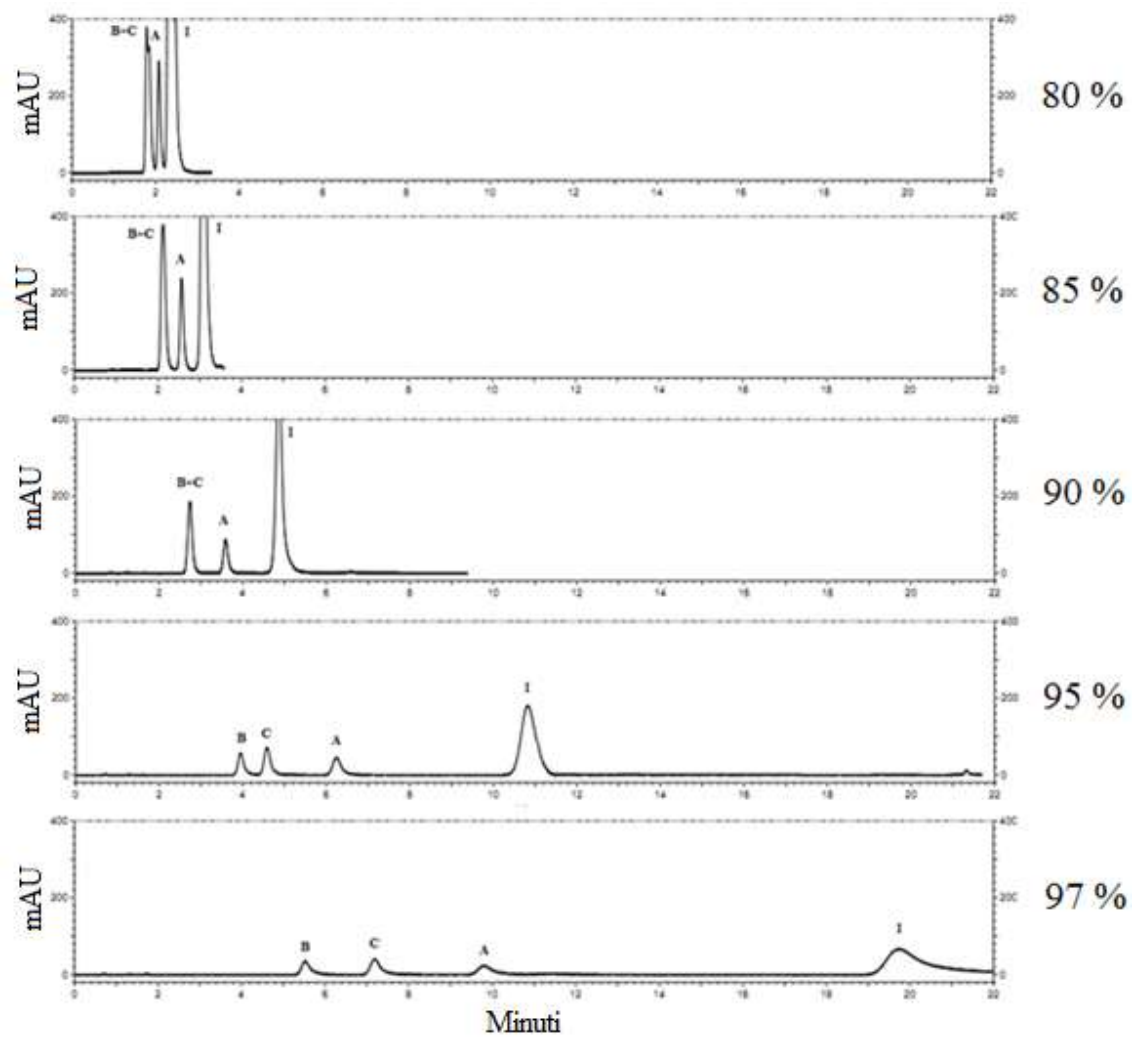
Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 2014; 17: 4217–4232.

Analizom rezultata, prikazanih u tabeli 20, može se uočiti da su vrednosti relativnih grešaka predviđanja retencionih faktora generalno manje u slučaju adsorpciono-particionih, nego u slučaju kvadratnih particionih modela. Kod kvadratnog particionog modela je čak 38 % grešaka veće od 10 % i čak 71 % grešaka veće od 5 %, dok je kod mešovitog adsorpciono-particionog modela samo 6 % grešaka veće od 10 % i samo 23 % grešaka veće od 5 %. Dakle, na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je mešoviti adsorpciono-particioni model obezbedio bolji opis retencionog ponašanja analita. Kao rezultat toga, omogućeno je pouzdano i precizno predviđanje njihovih retencionih faktora u ispitanom opsegu sastava mobilnih faza u *Betasil Silica*, *Luna HILIC* i *Betasil Diol* kolonama.

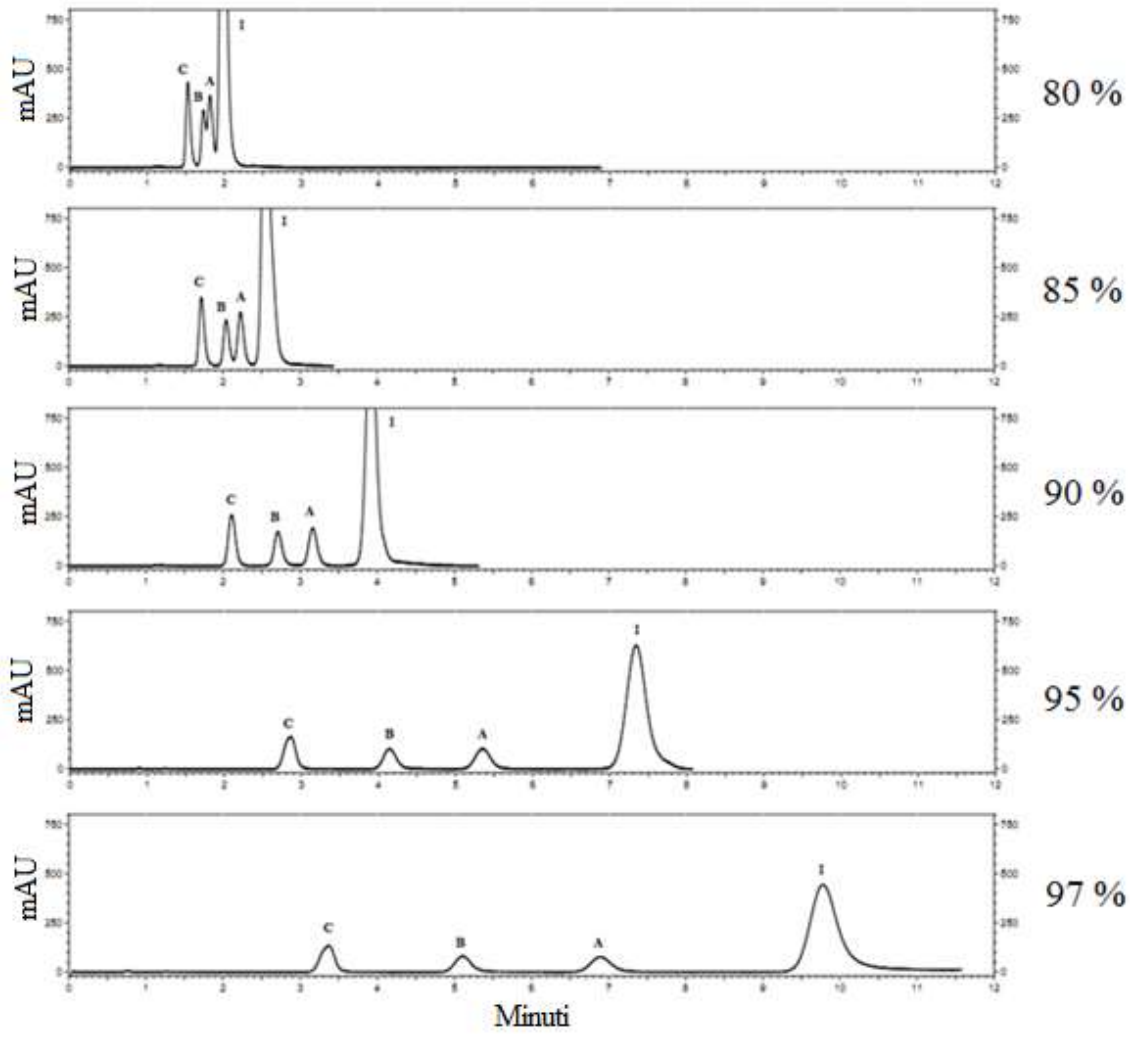
U literaturi su pronađeni dokazi da je u prisustvu mešovitog retencionog mehanizma proces adsorpcije dominantniji pri većim sadržajima acetonitrila usled smanjenja debljine vodenog sloja koji je adsorbovan na površini stacionarne faze. U toj eksperimentalnoj oblasti adsorpcioni model dobro aproksimira retencione podatke. Nasuprot tome, pri manjim sadržajima acetonitrila debljina ovog vodenog sloja se povećava, pa je tada proces raspodele dominantniji. Samim tim, bolju aproksimaciju retencionih podataka u ovom delu eksperimentalnog prostora obezbeđuje particioni model [68]. Na sličan način ponašali su se i ispitivani analiti u datim hromatografskim sistemima. Stoga nije iznenađujuće da je nelinearni adsorpciono-particioni model izvršio najbolje fitovanje prikupljenih retencionih podataka.

7.4.3. UTICAJ VRSTE KOLONE NA RETENCIONO PONAŠANJE JOHEKSOLA I NJEGOVIH SRODNIH SUPSTANCI

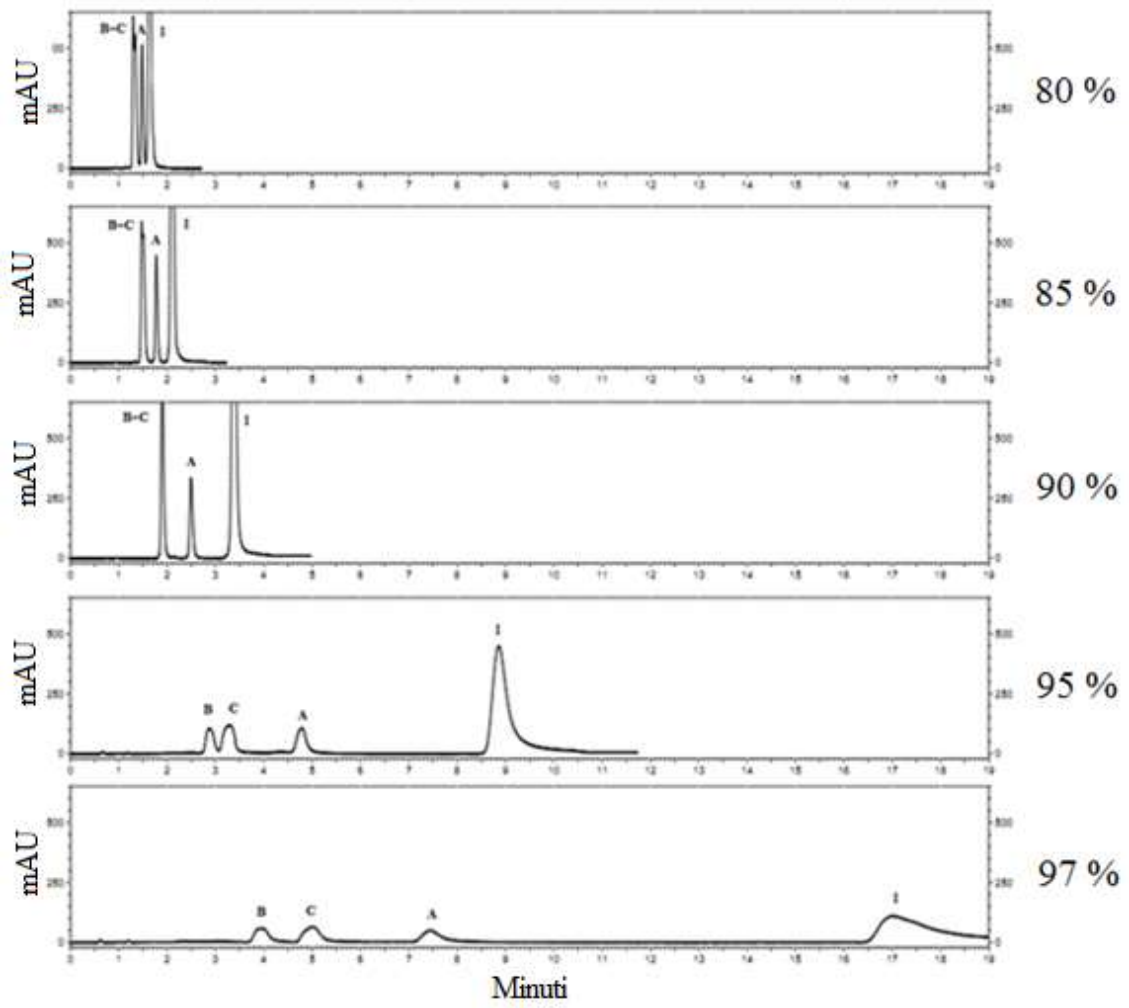
Selektivnost ispitivanih kolona prema analiziranim supstancama bila je generalno različita. Jedina sličnost postojala je između dve silika kolone. Razlike u selektivnosti između kolona ilustrovane su na slici 36 na kojoj su prikazani hromatogrami pri rastućim sadržajima acetonitrila u mobilnoj fazi sa svake od kolona.



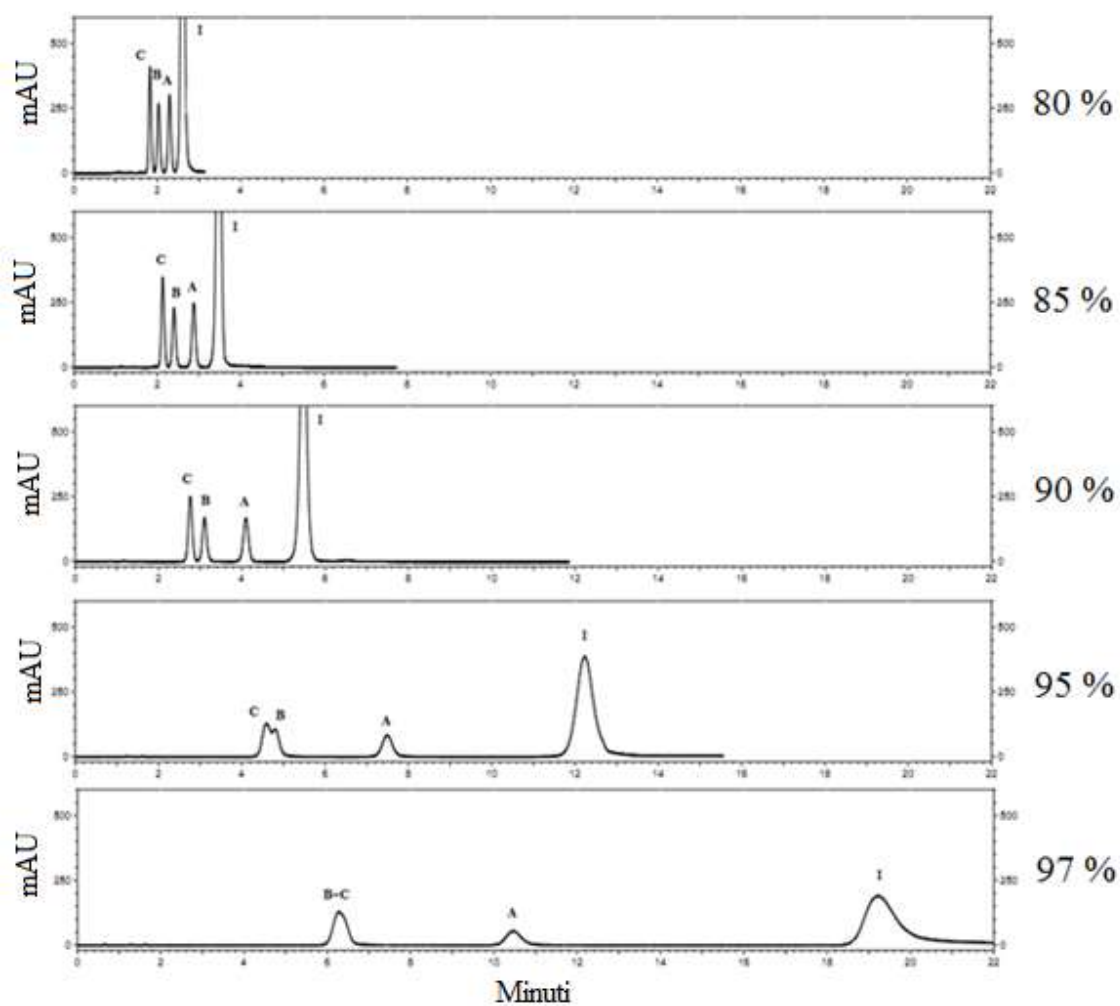
A)



B)



C)



D)

Slika 36. Hromatogrami analizirane smeše neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci dobijeni pri sledećim sastavima mobilne faze: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, pri konstantnim vrednostima koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi (20 mmol L^{-1}) i pH vrednost vodene faze (4,5) u kolonama: A) *Betasil Silica*, B) *Luna HILIC*, C) *Kinetex HILIC*, D) *Betasil Diol*. Pikovi analita označeni su slovima: I – joheksol, A – srodna supstanca A, B – srodna supstanca B, C – srodna supstanca C.

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

S povećanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi produžavalo se i zadržavanje analita u svim kolonama, ali je stepen tog uticaja varirao u zavisnosti od kolone. Kako redosled eluiranja komponenti smeše u HILIC sistemima u velikoj meri zavisi od polarnosti analita, analizirane su log P vrednosti odgovarajućih komponenti smeše dobijene pomoću *MarvinSketch* 6.1.0. softvera: joheksol ($\log P = -2,59$), srodna supstanca A ($\log P = -1,46$), srodna supstanca B ($\log P = -1,35$), srodna supstanca C ($\log P = -0,64$). Dakle, može se zaključiti da su srodne supstance A i B bile slične po polarnosti, da je joheksol najpolarnija, a da je srodna supstanca C najmanje polarna komponenta analizirane smeše. Neki autori smatraju da je upravo direktna zavisnost između polarnosti analita i njihovog redosleda eluiranja dokaz za postojanje procesa raspodele u HILIC retencionom mehanizmu [69]. U svim kolonama joheksol i srodna supstanca A eluirale su se istim redosledom. Naime, joheksol se kao najpolarnija komponenta smeše eluirao poslednji, dok se komponenta sledeća po polarnosti (srodna supstanca A) eluirala preposlednja. S druge strane, redosled pikova srodnih supstanci B i C varirao je u različitim kolonama. Na dve diolne kolone pik srodne supstance C pojavio se prvi na hromatogramu, a nakon njega usledio je pik srodne supstance B. Eluiranje analita prema redosledu rastuće polarnosti ($C < B < A < \text{joheksol}$) u dvema diolnim kolonama može se smatrati još jednim dokazom za postojanje procesa raspodele u retencionom mehanizmu. Ipak, analiti su se nešto duže zadržavali u *Betasil Diol*, nego u *Luna HILIC* koloni. Po svojim karakteristikama *Luna HILIC* kolona nešto je manje polarna od *Betasil Diol* kolone, stoga duže zadržavanje komponenti u *Betasil Diol* koloni može biti posledica formiranja nešto debljeg vodenog sloja na površini njene stacionarne faze, nego što je to slučaj sa *Luna HILIC* kolonom. Dodatno, selektivnost ovih kolona prema analiziranim farmaceutski aktivnim supstancama, pri različitim sastavima mobilne faze, takođe je bila različita. Pri manjim sadržajima acetonitrila u mobilnoj fazi srodne supstance A i B u *Luna HILIC* koloni nisu bile dobro razdvojene, dok je pri većim sadržajima acetonitrila u mobilnoj fazi to bio slučaj sa srodnim supstancama B i C u *Betasil Diol* koloni. Ovo može biti posledica različitog udela adsorpcionog procesa u retencionom mehanizmu u ovim kolonama. Kada je reč o hromatografskom ponašanju analita u silika kolonama, nisu zapažene gotovo nikakve vidljive razlike. Selektivnost obe silika kolone prema analiziranim supstancama u celokupnom rasponu sastava mobilne faze bila je ista. Međutim, redosled eluiranja komponenti smeše nije bio prema

redosledu rastuće polarnosti ($B < C < A < \text{joheksol}$). Naime, srodne supstance B i C nisu bile dobro razdvojene pri manjim sadržajima acetonitrila u mobilnoj fazi, dok je povećanje njegovog sadržaja omogućilo uspešno razdvajanje ove dve komponente smeše, ali nasuprot njihovoj polarnosti. Zato je sasvim opravdano pretpostaviti da je ovakvo hromatografsko ponašanje u silika kolonama posledica značajnog doprinosa procesa adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu. Dobra simetrija pikova dobijena je u svim kolonima osim sa *Kinetex HILIC* kolonom, gde je pik joheksola odstupao od Gausove simetrije.

7.4.4. EKSPERIMENTALNI MODELI

U cilju detaljnijeg ispitivanja uticaja većeg broja faktora mobilne faze, kao i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci istovremeno u sve četiri kolone primenjen je hemometrijski pristup. Ovom strategijom kreirani su odgovarajući eksperimentalni modeli koji ne samo da su omogućili kvantifikaciju faktorskih uticaja i upotpunjavanje slike o retencionim mehanizmima, nego su u kasnijoj fazi iskorišćeni i kao osnova za optimizaciju hromatografskog razdvajanja ispitivane smeše. Kako je postojala namera da se ispita uticaj tri kvantitativna faktora mobilne faze (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednost vodene faze), kao i jednog kvalitativnog faktora (tip kolone), plan eksperimenata kreiran je prema matrici D–optimalnog dizajna. Ovaj tip dizajna omogućava da se matematički model, u koji će eksperimentalni podaci biti fitovani, definiše na osnovu prethodnog iskustva analitičara o odgovarajućem hromatografskom sistemu, pa je odlučeno da u konkretnom slučaju to bude kvadratni model za četiri ispitivana faktora u koji su bile uključene samo dvofaktorske interakcije. Višefaktorske interakcije, kao ni kvadratni uticaj kvalitativnog faktora, nisu bili očekivani, stoga nisu ni uključeni u model. Prema tome, konačni opšti oblik modela predstavljen je jednačinom (38):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (38)$$

Na osnovu rezultata prikupljenih u preliminarnoj fazi ovog dela istraživanja definisani su opsezi ispitivanih faktora. Na taj način su kodiranim vrednostima -1 i $+1$ dodeljene sledeće stvarne vrednosti faktora: za sadržaj acetonitrila vrednosti 85 % i 95 %, za pH vrednost vodene faze 3,5 i 5,5, a za sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi vrednosti 10 mmol L^{-1} i 40 mmol L^{-1} . Plan eksperimenata sa nivoima faktora predstavljen je u tabeli 5, koja je prikazana u Eksperimentalnom delu disertacije, u poglavlju 6.7. Nakon izvedenih eksperimenata sa odgovarajućih hromatograma očitavana su retencionna vremena. Iz vrednosti retencionih vremena i retencionog vremena pika mobilne faze izračunati su retencioni faktori. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Eksperimentalno dobijeni rezultati retencionih faktora joheksola i njegovih srodnih supstanci

Eksp.	k_A	k_B	k_C	k_I
1	0,79	0,53	0,46	1,17
2	0,91	0,72	0,43	1,22
3	1,60	1,20	1,13	2,10
4	0,90	0,54	0,35	1,34
5	0,81	0,49	0,45	1,19
6	0,87	0,70	0,42	1,17
7	1,69	1,25	1,15	2,17
8	3,47	1,88	1,56	5,78
9	3,64	1,86	2,43	7,25
10	4,34	2,96	1,63	6,71
11	6,62	3,47	3,97	12,44
12	4,10	2,17	2,04	7,39
13	0,73	0,45	0,41	1,09
14	4,21	2,88	1,58	6,41
15	2,03	1,41	1,37	2,83
16	1,70	0,99	0,78	2,74
17	3,31	1,72	2,15	6,47
18	3,88	2,68	1,47	5,88
19	5,66	3,13	3,70	11,16
20	0,74	0,45	0,28	1,10
21	4,30	2,15	2,60	8,69
22	1,57	1,19	0,70	2,20
23	1,53	0,87	0,88	2,44
24	1,71	1,27	0,75	2,42
25	1,84	1,34	1,23	2,44
26	0,92	0,55	0,36	1,37
27	6,50	3,45	3,93	12,18
28	3,60	1,96	1,63	6,01

k_A – retencioni faktor srodne supstance A; k_B – retencioni faktor srodne supstance B; k_C – retencioni faktor srodne supstance C; k_I – retencioni faktor joheksola

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 2014; 17: 4217–4232.

Metodom višestruke linearne regresije retencioni podaci fitovani su u prethodno predloženi polinom drugog reda. Adekvatnost modela ispitana je ANOVA testom, a kao relevantni statistički parametri korišćeni su R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 . Koeficijenti dobijenih sumarnih kvadratnih modela sa sve četiri kolone, njihova statistička značajnost, kao i ostali relevantni statistički parametri prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Koeficijenti kvadratnog modela definisanog za posmatrane odgovore i njihova statistička analiza

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{4[1]}X_4 + b_{4[2]}X_4 + b_{4[3]}X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14[1]}X_1X_4 + b_{14[2]}X_1X_4 + b_{14[3]}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24[1]}X_2X_4 + b_{24[2]}X_2X_4 + b_{24[3]}X_2X_4 + b_{34[1]}X_3X_4 + b_{34[2]}X_3X_4 + b_{34[3]}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

	k_A		k_B		k_C		k_I	
	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
b_0	2,00	<0,0001*	1,24	<0,0001*	1,16	<0,0001*	3,28	<0,0001*
b_1	1,79	<0,0001*	0,94	<0,0001*	0,95	<0,0001*	3,47	<0,0001*
b_2	0,064	0,0026*	0,016	0,1389	0,058	0,0307*	0,17	0,0108*
b_3	0,29	<0,0001*	0,13	<0,0001*	0,12	0,0011*	0,51	<0,0001*
$b_{4[1]}$	-0,54	<0,0001*	-0,46	<0,0001*	-0,12	<0,0001*	-0,59	<0,0001*
$b_{4[2]}$	-0,26		0,11		-0,48		-0,98	
$b_{4[3]}$	1,23		0,69		0,99		2,31	
b_{12}	-0,06	0,7840	-0,015	0,3929	0,013	0,6507	-0,034	0,6240
b_{13}	0,15	0,0002*	0,06	0,0107*	0,042	0,1770	0,28	0,0055*
$b_{14[1]}$	-0,19	<0,0001*	-0,18	0,0001*	0,10	<0,0001*	-0,036	<0,0001*
$b_{14[2]}$	-0,22		0,11		-0,45		-1,14	
$b_{14[3]}$	0,66		0,19		0,51		1,86	
b_{23}	-0,09	0,0047*	-0,029	0,1553	-0,065	0,0685	-0,27	0,0091*

$b_{24[1]}$	0,018	0,0537	0,019	0,2954	0,033	0,2397	0,063	0,3034
$b_{24[2]}$	-0,06		-0,029		-0,081		-0,18	
$b_{24[3]}$	0,11		0,043		0,081		0,19	
$b_{34[1]}$	-0,022	0,0047*	-0,004	0,0995	0,01	0,5220	0,079	0,0988
$b_{34[2]}$	-0,13		-0,058		-0,051		-0,24	
$b_{34[3]}$	0,14		0,06		0,051		0,24	
b_{11}	0,71	<0,0001*	0,37	<0,0001*	0,39	0,0002*	1,63	<0,0001*
b_{22}	0,11	0,0535	0,10	0,0591	0,004	0,9526	0,18	0,3066
b_{33}	-0,10	0,0565	-0,047	0,2104	-0,041	0,4888	-0,23	0,1475
R²	0,9998		0,9994		0,9987		0,9993	
Adjusted R²	0,9989		0,9973		0,9940		0,9967	
Predicted R²	0,9932		0,9101		0,8387		0,9262	

k_A – retencioni faktor srodne supstance A; k_B – retencioni faktor srodne supstance B; k_C – retencioni faktor srodne supstance C; k_1 – retencioni faktor joheksola; R^2 – koeficijent determinacije

* koeficijenti modela značajni za $p < 0,05$

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 2014; 17: 4217–4232.

U okviru kreiranih sumarnih modela, prikazanih u tabeli 22, regresioni koeficijenti koji odgovaraju tipu kolone (b_4) i faktorskim interakcijama tipa kolone i drugih faktora mobilne faze (b_{14} , b_{24} i b_{34}) dodatno su označeni brojevima u zagradi. U cilju dobijanja pojedinačnih retencionih modela za svaku od kolona uzeti su u obzir samo oni regresioni koeficijenti koji imaju isti broj u zagradi, dok su ostali bili zanemareni. Drugim rečima, ako se posmatra samo model dobijen sa *Betasil Diol* kolonom regresioni koeficijent vezan za tip kolone, kao i oni regresioni koeficijenti vezani za faktorske interakcije u koje je uključen tip kolone bili su izostavljeni. U slučaju modela sa ostalim kolonama ovi regresioni koeficijenti bili su uključivani na sledeći način: model za *Betasil Silica* kolonu uzimao je u obzir regresione koeficijente $b_{4[1]}$, $b_{14[1]}$, $b_{24[1]}$ i $b_{34[1]}$, model za *Luna HILIC* kolonu koeficijente $b_{4[2]}$, $b_{14[2]}$, $b_{24[2]}$ i $b_{34[2]}$, a model za *Kinetex HILIC* kolonu koeficijente $b_{4[3]}$, $b_{14[3]}$, $b_{24[3]}$ i $b_{34[3]}$. Koeficijenti polinoma drugog reda koji su bili statistički značajni ($p < 0,05$) ušli su u konačne retencione modele analiziranih supstanci. Na osnovu statističkih parametara iz tabele 22 procenjena je adekvatnost dobijenih modela. Vrednosti R^2 , *Adjusted* R^2 i *Predicted* R^2 bliske 1,0 ukazuju na njihovu dobru sposobnost aproksimacije eksperimentalno dobijenih retencionih podataka, a samim tim i predviđanja retencionog ponašanja analiziranih farmaceutski aktivnih supstanci u okviru ispitanog eksperimentalnog prostora.

7.4.5. FAKTORSKI UTICAJI I RETENCIONO PONAŠANJE NEUTRALNIH FARMACEUTSKI AKTIVNIH SUPSTANCI

U tabeli 22 može se uočiti da svi pojedinačni faktori pokazuju statistički značajan efekat na retenciono ponašanje ispitivanih analita. Apsolutne vrednosti ovih koeficijenata smanjivale su se sledećim redosledom $b_1 > b_4 > b_3 > b_2$. Na osnovu toga može se zaključiti da je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi najviše uticao na retenciono ponašanje analita, potom su usledili uticaji tipa kolone i pH vrednosti vodene faze, a najslabiji uticaj pokazala je koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi. Svi koeficijenti faktora mobilne faze imali su pozitivan predznak, što potvrđuje da su se s njihovim povećanjem analiti sve duže zadržavali u ispitivanim HILIC sistemima. Kada je u pitanju sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, priroda ove zavisnosti bila je

nelinearnog karaktera, što su potvrdili statistički značajni kvadratni koeficijenti b_{11} u kreiranim modelima. O uticaju acetonitrila na retenciono ponašanje ispitivanih analita bilo je dosta reči u prethodnim poglavljima, pa će u ovom poglavlju biti dodata samo diskusija vezana za interakciju ovog faktora s tipom kolone, a koja je okarakterisana koeficijentima b_{14} . Poređenjem vrednosti ovih koeficijenata, dobijenih sa različitim kolonama, može se zaključiti da je sledećim redosledom opadao uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi na retencione faktore analita *Kinetex HILIC* > *Betasil Diol* > *Betasil Silica* > *Luna HILIC*. Apsolutne vrednosti koeficijenata b_1 bile su u korelaciji s log P vrednostima ispitivanih analita, što je u skladu sa zaključcima izvedenim u poglavlju 7.4.3. Uticaj koncentracije amonijum-acetata na retenciono ponašanje analita procenjen je na osnovu b_3 koeficijenata. Pozitivan predznak ovih koeficijenata ukazuje na duže zadržavanje analita u hromatografskom sistemu s povećanjem vrednosti ovog faktora. Do ovoga najverovatnije dolazi kao posledica povećanja debljine adsorbovanog vodenog sloja na površini stacionarne faze u retencionom mehanizmu. Prema nekim autorima ovo predstavlja indirektan dokaz za postojanje procesa raspodele u retencionom mehanizmu [70]. Koeficijenti b_{34} u modelu za srodnu supstancu A statistički su značajni i razlikuju se sa različitim kolonama. U poređenju sa *Betasil diol* kolonom, uticaj koncentracije amonijum-acetata na ovaj analit veći je sa *Kinetex HILIC* koloni, dok je taj uticaj manje izražen sa *Betasil Silica* i *Luna HILIC* kolonama. Kako su koeficijenti b_{34} u slučaju modela ostalih analita bili statistički neznačajni, uticaj koncentracije amonijum-acetata na njihovo retenciono ponašanje može se smatrati univerzalnim na svakoj od stacionarnih faza. Na osnovu koeficijenata b_2 uspostavljenih modela procenjen je uticaj pH vrednosti vodene faze na retenciono ponašanje analita. Pozitivan predznak ovih koeficijenata ukazuje na to da, s povećanjem vrednosti ovog faktora, dolazi do produžavanja zadržavanja analita. Kao što je već prethodno pomenuto u preliminarnoj fazi istraživanja, do ovoga najverovatnije dolazi usled povećanja debljine vodenog sloja na površini stacionarne faze kao posledica povećanja koncentracije naelektrisanja koje potiče od silanolnih, odnosno rezidualnih silanolnih grupa. Regresioni koeficijent b_{24} , koji opisuje interakciju tipa kolone i pH vrednosti vodene faze nije bio statistički značajan. Prema tome, može se zaključiti da je pH vrednost vodene faze imala univerzalan efekat na retenciono ponašanje svih analita u sve četiri kolone.

Uticaj interakcija faktora vezanih za sastav mobilne faze procenjen je na osnovu regresionih koeficijenata b_{12} , b_{13} , b_{23} . Statistička značajnost potvrđena je samo za koeficijente b_{13} joheksola i srodnih supstanci A i B i za koeficijente b_{23} joheksola i srodne supstance A. Pozitivan predznak koeficijenata b_{13} ukazuje na to da porast sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do značajnijeg povećanja retencionih faktora joheksola i srodnih supstanci A i B pri većim koncentracijama amonijum-acetata u vodenoj fazi, nego pri manjim. S druge strane, negativan predznak koeficijenata b_{23} ukazuje na činjenicu da pri manjim pH vrednostima vodene faze i većim koncentracijama amonijum-acetata u mobilnoj fazi dolazi do dužeg zadržavanja srodne supstance A i joheksola u odgovarajućim hromatografskim sistemima.

7.4.6. OPTIMIZACIJA HROMATOGRFSKOG RAZDVAJANJA ANALIZIRANE SMEŠE

Kako Američka Farmakopeja [64] predlaže RP/HPLC metodu s gradijentnim eluiranjem za određivanje sadržaja komponenti ove smeše, a u literaturi nije pronađena nijedna metoda sa izokraskim eluiranjem, cilj sledeće faze ovog dela disertacije bio je postavljanje HILIC metode sa izokraskim eluiranjem za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci iz odgovarajućeg farmaceutskog oblika doziranja (rastvora za intravensku primenu). Jedan od osnovnih uslova koji mora biti ispunjen da bi metoda bila adekvatna je obezbeđivanje razdvajanja svih komponenti smeše. Međutim, često neke komponente smeše imaju tendenciju da se pri variranju vrednosti faktora u okviru eksperimentalnog prostora koeluiraju. Stoga je prvo neophodno identifikovati kritični par/parove pikova koji pokazuju takvo ponašanje. Prilikom razdvajanja smeše neutralnih analita to je bio slučaj sa srodnim supstancama B i C, stoga su one i identifikovane kao jedini kritični par ispitivane smeše. Na osnovu svih prethodnih rezultata i izvedenih zaključaka procenjene su poželjne karakteristike HILIC metode za analizu smeše joheksola i njegovih srodnih supstanci. U skladu s tim postavljeni su sledeći ciljevi optimizacije:

- 1) faktor selektivnosti kritičnog para smeše veći od 1,15 ($\alpha_{BC} > 1,15$),
- 2) retencioni faktor prvog pika smeše veći od 1 (k_B ili $k_C > 1$),
- 3) trajanje analize (okarakterisano retencionim faktorom joheksola koji se eluira poslednji) minimalno (k_I).

Jednostavni hromatografski odgovori, poput retencionog vremena i retencionog faktora, najčešće mogu biti adekvatno aproksimirani linearnom, odnosno kvadratnom funkcijom. Nasuprot njima, modelovanje složenih hromatografskih odgovora ovim tipovima zavisnosti često dovodi do dobijanja nedovoljno pouzdanih i preciznih modela. Do ovakve situacije može doći čak i u slučaju jednostavnih hromatografskih odgovora, poput faktora selektivnosti i faktora rezolucije, kada je širina pikova prevelika ili kada se redosled pikova na hromatogramu menja. Jedna od strategija za rešavanje ovakvog problema je indirektno modelovanje složenih hromatografskih odgovora [45]. Ovaj pristup sastoji se iz dve faze:

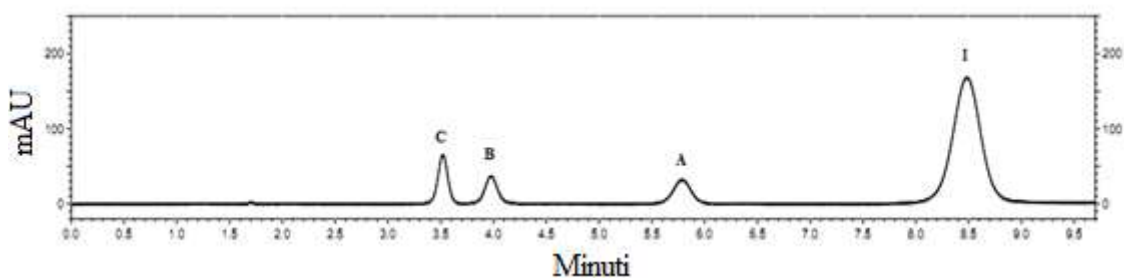
- 1) građenje modela jednostavnih hromatografskih odgovora i
- 2) indirektno modelovanje složenih hromatografskih odgovora na osnovu modela jednostavnih hromatografskih odgovora.

U konkretnom istraživanju, prva faza ovog pristupa opisana je još u prethodnom poglavlju i podrazumevala je fitovanje retencionih podataka, prikupljenih izvođenjem eksperimenata prema matrici D–optimalnog dizajna, metodom višestruke linearne regresije u odgovarajuće kvadratne retencione modele. Pouzdanost dobijenih modela potvrđena je izvođenjem statističke analize. Međutim, pokušaj da se direktno modeluje faktor selektivnosti kritičnog para (α_{BC}) završio se neuspehom, jer dobijeni model nije prošao tzv. *Lack of fit* test, odnosno pokazalo se da linearna ili kvadratna funkcija ne mogu na zadovoljavajući način da aproksimiraju ovaj odgovor sistema.

Stoga se pristupilo sledećoj fazi koja je podrazumevala indirektno modelovanje faktora selektivnosti kritičnog para. Kako bi se izvršila identifikacija optimalnih uslova razdvajanja u skladu s postavljenim ciljevima optimizacije primenjena je tehnika pretrage čvorova mreže [46]. Gustina mreže definisana je za svaki od ispitivanih faktora u okviru eksperimentalnog prostora definisanog D–optimalnim dizajnom na sledeći način: 1 % za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, 0,2 pH jedinice za pH vrednost vodene faze i 5 mmol L⁻¹ za koncentraciju amonijum-acetata u vodenoj fazi. Nakon toga, korišćenjem retencionih modela, izračunate su vrednosti retencionih faktora u svakoj tački mreže, a potom je mreža koju su činili faktori selektivnosti kritičnog para

smeše kreirana na indirektan način, tj. deljenjem odgovarajućih retencionih faktora prema jednačini (22). Pošto su se srodne supstance B i C eluirale različitim redosledom u različitim kolonama, deljenje odgovarajućih retencionih faktora vršeno je uvek tako da faktor selektivnosti ima vrednost veću od 1.

Konačno, analizom dobijenih vrednosti praćenih odgovora u svim čvorovima mreže svi prethodno definisani ciljevi optimizacije postignuti su sa *Betasil Diol* kolonom pri sledećem sastavu mobilne faze: smeša acetonitril–vodena faza (35 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 3,9) (91:9 V/V). Pod datim hromatografskim uslovima predviđene vrednosti odgovora, koje su postavljene kao kriterijumi optimizacije, bile su sledeće: $\alpha_{BC} = 1,15$, $k_C = 1,03$, $k_I = 4,00$. Kako bi se izvršila eksterna validacija optimizovane HILIC metode, izvedena je hromatografska analiza pod optimalnim uslovima. Dobijeni hromatogram prikazan je na slici 37.



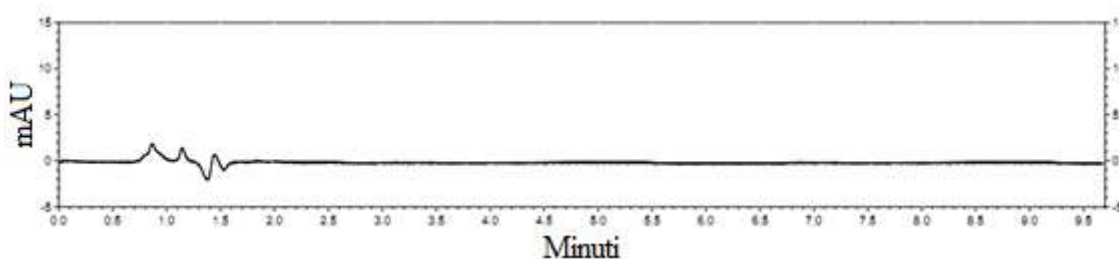
Slika 37. Hromatogram dobijen sa *Betasil Diol* kolonom pod optimalnim uslovima razdvajanja pri sledećem sastavu mobilne faze: smeša acetonitril–vodena faza (35 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 3,9) (91:9 V/V). Pikovi na hromatogramu: srodna supstanca C (3,52 minuta), srodna supstanca B (3,98 minuta), srodna supstanca A (5,79 minuta), joheksol (8,48 minuta).

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

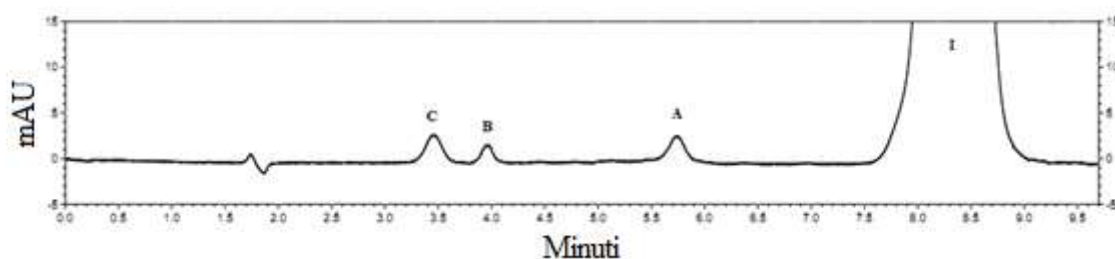
Retenciona vremena ispitivanih komponenti smeše, koja mogu biti očitana sa hromatograma prikazanog na slici 37, upotrebljena su za izračunavanje eksperimentalno dobijene vrednosti odgovora sistema ($t_0 = 1,7$ minuta): $\alpha_{BC} = 1,13$, $k_C = 1,07$, $k_I = 3,95$. Poređenjem predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti odgovora sistema pod optimalnim hromatografskim uslovima konačno je i potvrđena adekvatnost primenjene optimizacione strategije. Komponente smeše bile su dobro razdvojene u HILIC sistemu sa *Betasil Diol* kolonom za manje od 10 minuta.

7.4.7. VALIDACIJA HILIC METODE

Da bi se potvrdila pouzdanost optimizovane HILIC metode i dokazao njen potencijal u analizi smeše joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C u rastvorima za intravensku primenu, izvedena je njena validacija. Prvi parametar validacije koji je testiran bila je selektivnost metode. Poređeni su hromatogrami dobijeni analiziranjem *placebo* rastvora i rastvora smeše standarda (slika 38). Selektivnost HILIC metode potvrđena je s obzirom da nisu uočeni interferirajući pikovi na hromatogramu *placebo* rastvora na retencionim vremenima ispitivanih analita.



A)



B)

Slika 38. Hromatogrami A) *placebo* smeše i B) laboratorijske smeše joheksola i njegovih srodnih supstanci A, B i C.

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

Linearnost predložene HILIC metode potvrđena je uspostavljanjem linearne zavisnosti između površine pikova joheksola i njegovih srodnih supstanci i njihovih koncentracija. Izračunati regresioni parametri bili su u opsegu prihvatljivosti rezultata za linearnost metode.

Ispitivanje osetljivosti metode od značaja je u kvantitativnoj analizi nečistoća i srodnih supstanci, koje su u uzorku prisutne u veoma malim koncentracijama, i obuhvata određivanje limita detekcije (eng. *Limit of Detection* – LOD) i limita kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification* – LOQ). Ove vrednosti eksperimentalno su određene za srodne supstance A, B i C izračunavanjem odnosa signala i šuma (eng. *Signal to Noise* – S/N). Smatra se da je S/N odnos 3:1 prihvatljiv za izračunavanje LOD vrednosti, a da je S/N odnos 10:1 prihvatljiv za izračunavanje LOQ vrednosti [71].

Tačnost metode ispitana je na osnovu izračunatih *Recovery* vrednosti dobijenih analizom laboratorijske smeše. Sve *Recovery* vrednosti bile su u opsegu prihvatljivosti rezultata za tačnost metode.

Preciznost metode testirana je na osnovu izračunate relativne standardne devijacije (eng. *Relative Standard Deviation* – RSD) na osnovu podataka dobijenih analiziranjem šest replikacija odgovarajućeg razblaženja *Omnipaque*TM rastvora joheksola za intravensku primenu. Sve RSD vrednosti bile su u opsegu prihvatljivosti rezultata za preciznost metode.

Vrednosti prethodno nabrojanih parametara validacije sumarno su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. Parametri validacije predložene HILIC metode

Parametri	Analiti			
	Joheksol	A	B	C
LOD				
$\mu\text{g mL}^{-1}$	–	0,08	0,08	0,08
LOQ				
$\mu\text{g mL}^{-1}$	–	0,25	0,25	0,25
Linearnost				
Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	250–750	0,25–0,75	0,25–0,75	0,25–0,75
<i>a</i>	32,269	40,186	31,474	51,469
<i>b</i>	96,747	0,927	–1,071	–0,831
<i>p</i> -vrednost odsečka	0,7144	0,8852	0,1543	0,4238
<i>r</i>	0,9995	0,9939	0,9988	0,9969
Tačnost				
Koncentracija 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	400	0,25	0,25	0,25
<i>Recovery</i> 1 (%) [*]	99,17	114,83	111,68	109,17
Koncentracija 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	500	0,5	0,5	0,5
<i>Recovery</i> 2 (%)	100,90	95,65	99,94	103,21
Koncentracija 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	600	0,6	0,6	0,6
<i>Recovery</i> 3 (%)	99,57	99,94	97,95	103,29
Preciznost				
Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	500	0,5	0,5	0,5
RSD (%) ^{**}	0,91	4,75	4,56	4,79

A – srodna supstanca A; B – srodna supstanca B; C – srodna supstanca C

a – nagib; *b* – odsečak; *r* – koeficijent korelacije (> 0,99 za aktivne supstance, >0,98 za srodne supstance [72])

* *Recovery*: 98 % – 102 % za aktivne supstance, 70 % – 130 % za srodne supstance [72]

** Relativna standardna devijacija: prihvatljiva 2 % za aktivne supstance, 15 % za srodne supstance [72]

Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

Naučnoistraživački doprinos ovog dela disertacije podrazumeva kvantifikaciju doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu neutralnih tipova analita u četiri različita HILIC sistema primenom nelinearnog teorijskog adsorpciono-particionog retencionog modela. Takođe je u ovom delu disertacije prvi put primenjen D-optimalni dizajn u cilju kreiranja odgovarajućih eksperimentalnih modela, koji su omogućili istovremeno definisanje uticaja tri kvalitativna i jednog kvantitativnog faktora na retenciono ponašanje joheksola i njegovih srodnih supstanci.

8. ZAKLJUČAK

1. Retenciono ponašanje kiselih i amfoternih farmaceutski aktivnih supstanci na primeru model smeše β -laktamskih antibiotika u silika koloni ispitano je primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Na osnovu rezultata kreirani su eksperimentalni modeli u formi polinoma drugog reda, nakon čega je statističkom analizom potvrđena njihova pouzdanost. Neadaekvatan model dobijen je jedino u slučaju cefuroksim-aksetila što je objašnjeno njegovim neretncionim ponašanjem. Ovaj pristup omogućio je efikasnu analizu faktorskih uticaja i retencionog ponašanja ispitivanih analita i obezbedio procenu ne samo uticaja pojedinačnih faktora mobilne faze, nego i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih analita. Zadovoljavajuća sposobnost retencionog predviđanja kreiranih retencionih modela potvrđena je verifikacijom kroz eksperimente, poređenjem simuliranih i eksperimentalno dobijenih hromatograma u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora. Pošto su analizirane komponente smeše iz iste hemijske grupe farmaceutski aktivnih supstanci, odnosno iz grupe β -laktamskih antibiotika, zbog čega imaju i slične strukture, razmotren je i uticaj njihovih strukturnih osobina na njihovo retenciono ponašanje.
2. Teorijski modeli kreirani na osnovu retencionih podataka baznih analita na primeru model smeše antipsihotika, antihistaminika i antiepileptika u dve silika, dve diolne i jednoj cijano koloni omogućili su određivanje doprinosa procesa raspodele, adsorpcije i katjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu ovih analita. Fitovanjem retencionih podataka u katjonsko–izmenjivačke modele za sve analite, osim lamotrigina, ustanovljeno je da je proces katjonske izmene odgovoran za retencioni mehanizam, ali da to nije i jedini proces. Stoga se u nastavku pristupilo građenju particionih i adsorpcionih retencionih modela na osnovu kojih je zaključeno da je u silika kolonama i u diolnoj koloni bio dominantan proces adsorpcije. Sa cijano kolonama nije mogao da se izvede takav zaključak pošto ni particioni ni adsorpcioni modeli nisu aproksimirali podatke na adekvatan način. Pošto

cijano kolone i diolna kolona imaju umereno polarni karakter, dodatno su kreirani i dvojni HILIC/RP retencioni modeli pomoću kojih je određen sastav mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza između HILIC i RP retencionog mehanizma za svaki od analita. Nakon toga, hemometrijski pristup omogućio je građenje eksperimentalnih retencionih modela za *Betasil Silica* kolonu. Statističkom analizom dobijenih modela potvrđena je adekvatnost svih modela, osim modela za lamotrigin, usled neretencionog ponašanja ovog analita u ispitivanom hromatografskom sistemu. Faktorski uticaji i retenciono ponašanje vizuelno su prikazani na trodimenzionim površinama odgovora.

3. Teorijski modeli kreirani na osnovu retencionih podataka kiselih i neutralnih analita na primeru model smeše farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom u amino koloni omogućili su određivanje doprinosa procesa raspodele, adsorpcije i anjonske izmene ukupnom HILIC retencionom mehanizmu ovih analita. Fitovanjem retencionih podataka u anjonsko–izmenjivačke modele za sve kisele analite ustanovljeno je da je proces anjonske izmene odgovoran za retencioni mehanizam. Takođe je zaključeno da je u mehanizmu sulfametoksazola to ujedno bio i jedini proces, a u slučaju ostalih analita bili su uključeni još neki procesi. Pošto amino kolona ima umereno polarni karakter, dodatno su kreirani i dvojni HILIC/RP retencioni modeli pomoću kojih je određen sastav mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza između HILIC i RP retencionog mehanizma za svaki od analita. Nakon toga, zasebno je modelovan svaki od regiona particionim i adsorpcionim retencionim modelima. Na osnovu dobijenih modela zaključeno je da je u RP regionu mobilnih faza bio dominantniji proces raspodele, a u HILIC regionu proces adsorpcije. Konačno, hemometrijski pristup omogućio je kreiranje eksperimentalnih retencionih modela, a odgovarajućom statističkom analizom potvrđena je njihova adekvatnost. Faktorski uticaji i retenciono ponašanje vizuelno su prikazani na trodimenzionim površinama odgovora, a dobra moć predviđanja uspostavljenih eksperimentalnih modela potvrđena je verifikacijom kroz eksperimente.

4. U cilju ispitivanja doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu neutralnih analita na primeru model smeše joheksola i njegove tri srodne supstance u dve silika i dve diolne kolone kreirani su linearni particioni i adsorpcioni teorijski modeli. Na osnovu njih zaključeno je da je adsorpcioni proces bio dominantan u retencionom mehanizmu ovih analita samo u *Kinetex HILIC* koloni. Kako ni particioni ni adsorpcioni modeli nisu adekvatno fitovali retencione podatke za ostale kolone, izgrađeni su nelinearni teorijski modeli: kvadratni particioni i mešoviti adsorpciono-particioni retencioni modeli. Kako su mešoviti adsorpciono-particioni modeli obezbedili bolje retenciono predviđanje, zaključeno je da su i proces raspodele i proces adsorpcije ravnopravno bili zastupljeni u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu u tri ispitivane kolone.

5. U cilju definisanja uticaja tri kvantitativna faktora mobilne faze (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vodene faze) i jednog kvalitativnog faktora (tip kolone) na retenciono ponašanje joheksola i njegovih srodnih supstanci primenom D-optimalnog dizajna kreirani su eksperimentalni modeli. Statističkom analizom potvrđena je adekvatnost dobijenih matematičkih modela. Dobijeni modeli poslužili su kao osnova za detaljnu analizu retencionog ponašanja u različitim tipovima kolona, ali i za optimizaciju hromatografskog razdvajanja komponenti smeše. Usled nemogućnosti direktnog modelovanja faktora selektivnosti kritičnog para smeše primenjena je strategija indirektnog modelovanja ovog odgovora. Nakon toga, izvršena je identifikacija optimalnih uslova razdvajanja pretraživanjem čvorova mreže u okviru definisanog eksperimentalnog prostora. Konačno, predložena HILIC metoda je validirana, čime je potvrđena njena podobnost za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci u rastvorima za intravensku primenu.

9. LITERATURA

- [1] Hemstrom, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784–1821.
- [2] Alpert, A.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 449: 177–196.
- [3] Buszewski, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 231–247.
- [4] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692: 1–25.
- [5] Gustavsson, S.A., Samskog, J., Markides, K.E., Långstrom, B.: Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J Chromatogr A* 2001; 937: 41–47.
- [6] Lunn, G., Hellwig, L.C.: *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley-Interscience, New York, USA 1998.
- [7] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692: 1–25.
- [8] Vailaya, A., Horváth, C.: Retention in reversed-phase chromatography: Partition or adsorption? *J Chromatogr A* 1998; 829: 1–27.
- [9] Gritti, F., Guiochon, G.: Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1099: 1–42.

- [10] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N.: Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2008; 31: 1449–1464.
- [11] Greco, G., Letzel, T.: Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *J Chromatogr Sci* 2013; 51: 684–693.
- [12] Guo, Y., Gaiki, S.: Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 5920–5938.
- [13] Alpert, A.J.: Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal Chem* 2008; 80: 62–76.
- [14] Kaliszan, R.: QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chem Rev* 2007; 107: 3212–3246.
- [15] Jinno, K., Quiming, N.S., Denola, N.L., Saito, Y.: Modeling of retention of adrenoreceptor agonists and antagonists on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 137–153.
- [16] Park, J.H., Carr, P.W., Abraham, M.H., Taft, R.W., Doherty, R.M., Kamlet, M.J.: Some observations regarding different retention properties of HPLC stationary phases. *Chromatographia* 1988; 25: 373–381.
- [17] Dejaegher, B., Mangelings, D., Vander Heyden, Y.: Method development for HILIC assays. *J Sep Sci* 2008; 31: 1438–1448.
- [18] Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci* 2010; 33: 698–715.
- [19] Gama, M.R., da Costa Silva, R.G., Collins, C.H., Bottoli, C.B.G.: Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC – Trends Anal Chem* 2012; 37: 48–60.

[20] Poole, C.F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands 2003.

[21] Snyder, L.R., Dolan, J.W., Gant, J.R.: Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *J Chromatogr A* 1979; 165: 3–30.

[22] Jandera, P., Churáček, J., Svoboda, L.: Gradient elution in liquid chromatography. X. Retention characteristics in reversed-phase gradient elution chromatography. *J Chromatogr A* 1979; 174: 35–50.

[23] Jandera, P.: Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J Sep Sci* 2008; 31; 1421–1437.

[24] Snyder, L.R.: Role of the solvent in liquid-solid chromatography – a review. *Anal Chem* 1974; 46: 1384–1393.

[25] Jandera, P., Churáček, J.: Gradient elution in liquid chromatography. I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution - theoretical considerations. *J Chromatogr A* 1974; 91: 207–221.

[26] Urban, J., Škeříková, V., Jandera, P., Kubíčková, R., Pospíšilová, M.: Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds. *J Sep Sci* 2009; 32: 2530–2543.

[27] Jandera, P., Hájek, T., Škeříková, V., Soukup, J.: Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *J Sep Sci* 2010; 33: 841–852.

- [28] Nahum, A., Horváth, C.: Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *J Chromatogr A* 1981; 203: 53–63.
- [29] Bij, K.E., Horváth, C., Melander, W.R., Nahum, A.: Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking. *J Chromatogr A* 1981; 203: 65–84.
- [30] Jandera, P., Hájek, T.: Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J Sep Sci* 2009; 32: 3603–3619.
- [31] Jin, G., Guo, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Y., Liang, X.: Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta* 2008; 76: 522–527.
- [32] McCalley, D.V.: Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 3408–3417.
- [33] Cox, G.B., Stout, R.W.: Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under "pseudo-reversed-phase" conditions. *J Chromatogr A* 1987; 384: 315–336.
- [34] Liu, M., Ostovic, J., Chen, E.X., Cauchon, N.: Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 2362–2370.
- [35] Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. M., Michotte, Y., Kaufman, L.: *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2003.
- [36] Otto, M.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Verlag GmbH and co. KGaA 2007.

- [37] Cela, R., Ordoñez, E.Y., Quintana, J.B., Rodil, R.: Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1287: 2–22.
- [38] Rakić, T.: *Hemometrijsko unapređenje razvoja metoda tečne hromatografije kroz matematičko modelovanje i nove funkcije hromatografskog odgovora*, Doktorska disertacija, Beograd, 2013.
- [39] Deming, S.N., Morgan, S.L.: *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 1993.
- [40] Mason, R.L., Gunst, R.F., Hess, J.L.: *Statistical Design and Analysis of Experiments with Application to Engineering and Science*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA 2003.
- [41] Jančić, B.: Hemometrijska analiza indinavira, fosinopril-natrijuma, imatinib-mezilata i njihovih nečistoća u farmaceutskim preparatima primernom reversno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom, Magistarska teza, Beograd, 2004.
- [42] Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L.: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta* 2007; 597: 179–186.
- [43] De Aguiar, P.F., Bourguignon, B., Khots, M.S., Massart, D.L., Phan-Thau-Luu, R.: D-Optimal designs. *Chem Intell Lab* 1995; 30: 199–210.
- [44] Snyder, L. R., Kirkland, J. J.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA 1979.
- [45] Dewe, W., Marini, R.B., Chiap, P., Hubert, P., Crommen, J., Boulanger, B.: Development of response models for optimising HPLC methods. *Chem Intell Lab* 2004; 74: 263–268.

- [46] Lebrun, P., Govaerts, B., Debrus, B., Ceccato, A., Caliaro, G., Hubert, P. Boulanger, B.: Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chem Intell Lab* 2008; 91: 4–16.
- [47] Rivera, K.: A review of criterial functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2000; 23: 2097–2121.
- [48] Guo, Y., Huang, A.: A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31: 1191–1201.
- [49] Guo, Y., Gaiki, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1074: 71–80.
- [50] Yoshida, T.: Prediction of peptide retention time in normal-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 811: 61–67.
- [51] Nakov, N., Acevska, J., Brezovska, K., Petkovska, R., Dimitrovska, A.: Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for simultaneous determination of cetylpyridinium chloride and benzocaine in lozenges. *Maced J Chem Chem En* 2012; 31: 47–54.
- [52] Wu, J.Y., Bicker, W., Lindner, W.: Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *J Sep Sci* 2008; 31: 1492–1503.
- [53] Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D.: Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column. *Chromatographia* 2010; 71: 751–759.

- [54] McCalley, D.V., Neue, U.D.: Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1192: 225–229.
- [55] Greco, G.; Grosse, S.; Letzel, T.: Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J Chromatogr A* 2012; 1235: 60–67.
- [56] Soukup, J., Jandera, P.: Hydrosilated silica-based columns: The effects of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids. *J Chromatogr A* 2012; 1228: 125–134.
- [57] Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S.: Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia* 2007; 66: 223–229.
- [58] Quiming, N.S., Denola, N.L., Saito, Y., Catabay, A.P., Jinno, K.: Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC. *Chromatographia* 2008; 67: 507–515.
- [59] Hatambeygi, N., Abedi, G., Talebi, M.: Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 5995–6003.
- [60] Kumar, P., Rubies, A., Companyó, R., Centrich, F.: Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J Sep Sci* 2011; 35: 498–504.
- [61] Fourdinier, M., Bostyn S., Delépée, R., Fauduet, H.: Interest of a chemometric approach in understanding the retention behaviour of three columns in hydrophilic interaction liquid chromatography: Application to the separation of glycerol carbonate, glycerol and urea. *Talanta* 2010; 81: 1281–1287.

[62] Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Improved chromatographic response function in HILIC analysis: application to mixture of antidepressants. *Talanta* 2012; 98: 54–61.

[63] *European Pharmacopoeia*, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe, 7th ed., 2011.

[64] *U.S. Pharmacopoeia 35 (USP 35)*, The United States Pharmacopoeial Convention, 2012.

[65] Guo, Z., Jin, Y., Liang, T., Liu, Y., Xu, Q., Liang, X., Lei, A.: Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click β -cyclodextrin" stationary phase. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 257–263.

[66] Espinosa, S., Bosch, E., Rosés, M.: Retention of ionizable compounds on HPLC. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile-water mobile phases that influence HPLC retention. *Anal Chem* 2002; 74: 3809–3818.

[67] Kumar, A., Heaton, J.C., McCalley, D.V.: Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1276: 33–46.

[68] Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D.: A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 2871–2879.

[69] Dinh, N.P., Jonsson, T., Irgum, K.: Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 5880–5891.

[70] Olsen, B.A.: Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J Chromatogr A* 2001; 913: 113–122.

[71] Kazakevich, Y., Lobrutto, R.: *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA 2007.

[72] Crowther, J.B. In: Ahuja, S., Scypinski, S. (eds): *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, 2nd ed., Academic Press, New York, USA 2001.

10. PRILOZI

NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

1. **Jovanović, M.**, Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. *J Sep Sci* 2012; 35: 1424–1431. **M22**
2. **Jovanović, M.**, Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162. **M23**
3. **Jovanović, M.**, Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37. **M21**
4. **Jovanović, M.**, Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232. **M21**
5. **Jovanović, M.**, Rakić, T., Jančić-Stojanović, B.: Theoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Inst Sci Technol* 2014; 42: 230–266. **M23**

**RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA
MEĐUNARODNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU**

1. **Jovanović, M.**, Rakić, T., Jančić–Stojanović, B., Malenović, A.: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying Box–Behnken design. *The XXXV Symposium chromatographic methods of investigating the organic compounds*, Szczyrk, Poland, 2012.
2. **Jovanović, M.**, Rakić, T., Stojanović, B. The investigation of the retention mechanisms and retention behavior of basic drugs on five polar columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *IX Balaton Symposium on High–Performance Separation Methods*, Siofok, Hungary, 2013.
3. **Jovanović, M.**, Maksić, J., Rakić, T., Jančić Stojanović, B. The analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *XXX International Symposium on Chromatography*, Salzburg, Austria, 2014.

11. BIOGRAFIJA AUTORA

Marko Jovanović rođen je u Beogradu 1987. godine. Osnovnu školu „Josif Pančić“ i XIII beogradsku gimnaziju završio je u Beogradu. Studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisao je školske 2006/07. godine i diplomirao 2011. godine s prosečnom ocenom 9,82. U toku studija bio je dobitnik Stipendije grada Beograda talentovanim studentima (2009. i 2010. godine), kao i „Dositeje“ – Stipendije fonda za mlade talente Republike Srbije (2011. godine). Bio je član hora Farmaceutskog fakulteta. Tokom studija bio je autor jednog studentskog istraživačkog rada urađenog na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska hemija, upisao je školske 2011/2012. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od januara 2012. godine zaposlen je na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, najpre kao istraživač pripravnik, a zatim i kao istraživač saradnik, na Projektu 172052 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Kao doktorand, u toku školske 2012/13. godine, učestvovao je u realizaciji praktične nastave predmeta Farmaceutska analiza, Eksperimentalni dizajn u farmaceutskoj analizi, Farmaceutska regulativa u kontroli lekova i Sportska farmacija na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. Pohađao je dva seminarra: *Latest LC/MS/MS Developments for Small Molecules Applications* u organizaciji AB Sciex i Cluster d.o.o i *MM-QSR; Regulatory & Quality Inquiries* u organizaciji Merck Millipore, kao i obuku za rad na UPLC/MS/MS sistemu (Waters). Bio je komentor tri studentska istraživačka rada na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu.

Do sada je objavio 12 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja i 2 rada u časopisima nacionalnog značaja. Učestvovao je sa 8 naučnih radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja, a takođe je imao i jedno usmeno izlaganje na skupu međunarodnog značaja.

Tečno govori engleski i nemački jezik i služi se francuskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марко Јовановић

број уписа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Теоријска и хеометријска анализа ретенционих механизма одабраних лекова у течной хроматографији хидрофилних интеракција

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

Потпис докторанда

У Београду, 4.4.2014. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Јовановић

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада Теоријска и хеометријска анализа ретенционих
механизама одабраних лекова у течној хроматографији
хидрофилних интеракција

Ментор доц. др Биљана Стојановић

Потписани Марко Јовановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 4.4.2014. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Теоријска и хеометријска анализа ретенционих механизма одабраних лекова у течној хроматографији хидрофилних интеракција

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 4.4.2014. године

