

Универзитет у Београду

Фармацеутски факултет

Јелена Р. Чоловић

МОДЕЛОВАЊЕ УТИЦАЈА МОЛЕКУЛСКЕ  
СТРУКТУРЕ И ПАРАМЕТАРА  
ХРОМАТОГРАФСКОГ СИСТЕМА НА  
ПОНАШАЊЕ АНАЛИТА У ХАОТРОПНОЈ  
ХРОМАТОГРАФИЈИ

Докторска дисертација

Београд, 2018

University of Belgrade

Faculty of pharmacy

Jelena R. Čolović

MODELING THE INFLUENCE OF  
MOLECULAR STRUCTURE AND  
CHROMATOGRAPHIC SYSTEM  
PARAMETERS ON ANALYTES'  
BEHAVIOUR IN CHAOTROPIC  
CHROMATOGRAPHY

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Универзитет у Београду  
Фармацеутски факултет

**Ментор**

---

Др Анђелија Маленовић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет,  
Катедра за аналитику лекова

**Чланови комисије**

---

Проф. др Славица Ерић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет,  
Катедра за фармацеутску хемију

---

Др Марко Калинић, научни сарадник  
Тотиент д.о.о.

---

Др Ана Калинић, научни сарадник  
Славиамед д.о.о.

---

Dr Yannis Dotsikas, доцент  
Универзитет у Атини – Фармацеутски факултет,  
Катедра за фармацеутску анализу

Датум одбране

Београд, \_\_\_\_\_

*Родитељима и сестри*

*Докторска дисертација је урађена на Катедри за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду.*

*Првенствено желим да се захвалим ментору ванр. проф. Анђелији Маленовић, за несебично залагање, потпуну посвећеност, професионалност, корисне савете, сугестије, помоћ и разумевање током свих фаза израде ове докторске дисертације.*

*Велику захвалност на сарадњи, смерницама, саветима и учешћу у научно истраживачком раду и обликовању докторске дисертације дугујем др сци. Ани Калинић.*

*Др сци. Марку Калинићу се посебно захваљујем за залагање, сугестије и помоћ у делу научног истраживања везаног за QSRR моделовање.*

*Проф. др Славици Ерић се захваљујем на учешћу у комисији и сарадњи у делу заједничког истраживања које се односи на QSRR анализу.*

*I am expressing special gratitude to dr Yannis Dotsikas, ass. prof for membership in the Committee for the assessment and defense of the completed doctoral dissertation.*

*Колегама са Катедре за аналитику лекова се захваљујем за позитивну и креативну радну атмосферу.*

*Највећу захвалност за безрезервну љубав и подршку дугујем својим родитељима, сестри и Ивану.*

# МОДЕЛОВАЊЕ УТИЦАЈА МОЛЕКУЛСКЕ СТРУКТУРЕ И ПАРАМЕТАРА ХРОМАТОГРАФСКОГ СИСТЕМА НА ПОНАШАЊЕ АНАЛИТА У ХАОТРОПНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ

## Резиме

Најчешћи проблеми који се јављају при анализи супстанци са базним функционалним групама у *RP-HPLC* системима су кратко задржавање анализата на стационарној фази и неодговарајући облик хроматографског пика. Наведени проблеми се успешно могу превазићи додатком јон-интеракционих агенаса у мобилну фазу, а овај тип хроматографије назван је јон-интеракциона хроматографија и представља прелаз између реверзно-фазне и јоноизмењивачке хроматографије. Хаотропни агенси су врста јон-интеракционих агенаса који остварују реверзибилне интеракције са стационарном фазом и имају утицај само на хроматографско понашање базних анализата. Овај тип јон-интеракционе хроматографије назван је хаотропна хроматографија. Механизам ретенције анализата у овим системима је веома сложен, а хроматографски процеси се могу представити серијом равнотежа и њихових стехиометријских константи. Циљ истраживања ове докторске дисертације био је проучавање утицаја молекулске структуре и параметара хроматографског система на ретенционо понашање одабраних анализата у системима хаотропне хроматографије, као и описивање хроматографског понашања анализата са базним функционалним групама (амлодипина и рисперидона) и њихових нечистоћа у овим системима применом емпиријских математичких модела.

У првом делу истраживања систематично је проучаван утицај рН вредности мобилне фазе, концентрације натријум хексафлуорофосфата (со са најизраженијим хаотропним ефектом према Хофмајстеровом низу) и садржаја ацетонитрила у мобилној фази на ретенционо понашање структурно разноврсног сета анализата кога су чиниле 34 активне супстанце. Показано је да раст рН вредности мобилне фазе од 2,00 до 4,00 доводи до дужег задржавања анализата на стационарној фази иако се у том опсегу рН вредности њихово јонизационо стање није мењало. Добијени резултати

указују да рН вредност мобилне фазе утиче на термодинамичке равнотеже у системима хаотропне хроматографије. У циљу објашњења ефекта рН вредности мобилне фазе на ретенцију анализата, методом фронталне анализе проучавана је адсорпција натријум хексафлуорофосфата на површину стационарне фазе, а методом најмање пертурбације базне линије адсорпционо понашање ацетонитрила. Показано је да при вишим рН вредностима долази до израженије адсорпције ацетонитрила, која доводи до боље адсорпције хаотропног агенса и последично до виших вредности електростатског потенцијала на површини стационарне фазе што условљава дужа ретенциона времена анализата. Након тога, приступом мешовитог моделовања и *support vector machine* алгоритма, развијен је регресиони модел са циљем идентификовања структурних карактеристика анализата које доприносе механизму ретенције. Анализом молекулских дескриптора може се закључити да комплементарност између распореда наелектрисања унутар молекуле и електричног двослоја на површини стационарне фазе представља кључни фактор који условљава ретенцију у системима хаотропне хроматографије. Структурна разноврсност испитиваног сета анализата и добре предиктивне карактеристике модела чине га корисним за предвиђање ретенционог понашања у проучаваном хроматографском систему.

У наставку истраживања изведена је студија са циљем разграничавања утицаја рН вредности и јонске јачине мобилне фазе на ретенционо понашање 13 потпуно протонваних анализата у системима хаотропне хроматографије. Изведена су два сета експеримената: у једном је јонска јачина варирана са додатком хаотропног агенса натријум хексафлуорофосфата и адитива за подешавање рН вредности мобилне фазе, а у другом сету је додавана и одговарајућа количина натријум хлорида са циљем да се јонска јачина одржи на константном нивоу. Примећено је да пораст рН вредности мобилне фазе од 2,00 до 4,00 условљава дужа ретенциона времена анализата, али је у сету са константном јонском јачином ова разлика мања. Разматрањем адсорпционих изотерми хаотропног агенса уочава се мање изражена адсорпција хексафлуорофосфатног анјона на стационарној фази у сету са константном јонском

јачином. Проширеним термодинамичким приступом показано је да јонско спаривање на стационарној фази значајно утиче на ретенцију у системима са варијабилном јонском јачином, док у системима са константном јонском јачином ове интеракције нису значајне због конкуренције јона натријума и протонованог анализата за везивање са адсорбованим хаотропним јоном. Методом вишеструке линеарне регресије развијен је емпиријски модел који укључује и молекулске дескрипторе и параметре система, а чији коефицијенти имају јасно физичко значење. Поређењем коефицијената овог модела у испитиваним експерименталним сетовима потврђено је да рН зависне промене у ретенционом понашању потичу од разлика у интеракцијама са развијеним електричним двослојем.

У другом делу истраживања проучавана је способност полиномски-модификованог Гаусовог модела да опише и предвиди ретенцију и облик пика анализата у системима хаотропне хроматографије. Предложена је тростепена процедура за израчунавање коефицијената овог модела која се заснива на индиректном моделовању. Као модел супстанце одабрани су амлодипин и његова нечистоћа А, а експериментални план је дефинисан централним композиционим дизајном. Испитивани фактори били су садржај ацетонитрила у мобилној фази, концентрација перхлорне киселине као хаотропног агенса у воденој фази и температура колоне. Експериментални услови за симулацију хроматограма одабрани су методом претраге чворова мреже на основу дефинисаних критеријума за ефикасност ( $N$ ) и *tailing* фактор ( $Tf$ ). Веома добро слагање између експериментално добијеног хроматограма и хроматограма симулираног предложеном тростепеном процедуром потврђује погодност полиномски-модификованог Гаусовог модела и тростепене процедуре за успешно описивање и предвиђање хроматографског понашања анализата у системима хаотропне хроматографије.

Након тога, развијена је процедура за процену перформанси модификованих стационарних фаза која се заснива на комбинацији методологије експерименталног дизајна, индиректног моделовања и полиномски-модификованог Гаусовог модела. Као модел супстанце одабрани су рисперидон и његове три нечистоће, испитиване



стационарне фазе биле су *Zorbax Eclipse XDB* и *Zorbax Extend*, а D-оптимални експериментални дизајн је одабран за дефинисање експерименталног плана због могућности истовремене процене и квалитативних и квантитативних фактора. Метода претраге чворова мреже примењена је за одабир експерименталних услова који обезбеђују најбоље перформансе стационарних фаза. Добро слагање експерименталног и симулираног хроматограма потврдило је адекватност ове процедуре за успешно описивање ретенционог понашања, чак и у системима када анализи мењају редослед елуирања. Вредности узлазног и силазног дела пика израчунате индиректним моделовањем, примењене су за конструисање графика полуширине пикова. Резултати добијени приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика и предложеном процедуром указују на већу ефикасност и боље сепарационе перформансе стационарне фазе код које су слободне силанолне групе блокиране малим триметилсилил групама у поређењу са стационарном фазом код које су слободне силанолне групе стерно заштићене бидентатним силанолним мостовима.

**Кључне речи:** Хаотропна хроматографија; рН-зависно ретенционо понашање; Емпиријски ретенциони модел; Ефекат јонске јачине; Адсорпција ацетонитрила; Адсорпција натријум хексафлуорофосфата; Полиномски-модификован Гаусов модел; Предвиђање хроматографског понашања; Приступ праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика.

**Научна област:** Фармација

**Ужа научна област:** Аналитика лекова

**УДК број:** 615.07:543.544(043.3)

# MODELING THE INFLUENCE OF MOLECULAR STRUCTURE AND CHROMATOGRAPHIC SYSTEM PARAMETERS ON ANALYTES' BEHAVIOUR IN CHAOTROPIC CHROMATOGRAPHY

## **Abstract**

During the analysis of basic substances in RP HPLC chromatographic systems, the most common issues are unacceptable short retention and unsatisfactory shape of chromatographic peaks. These problems can be successfully overcome with the addition of ion-interaction agents in the mobile phase, and this type of chromatography, referred as ion-interaction chromatography, represents transition between reverse-phased and ion-exchange chromatography. Chaotropic agents are type of ion-interaction agents which perform reversible interactions with the stationary phase and have influence only on chromatographic behaviour of basic analytes. This type of ion-interaction chromatography has been named chaotropic chromatography. The retention mechanisms in these systems are very complex and chromatographic processes can be represented with series of equilibriums and their stoichiometric constants. The aim of this doctoral dissertation was investigation of molecular structure and chromatographic system parameters on analytes' behaviour in chaotropic chromatography systems, as well as description of chromatographic behaviour of analytes with basic functional groups in their structure (amlodipine and risperidone) and their impurities in these systems by the empirical mathematical models.

In the first part of investigation, influence of pH value of the aqueous phase, concentration of sodium hexafluorophosphate (the salt with the most prominent chaotropic effect according to Hofmeister series) and content of acetonitrile in the mobile phase on the retention behaviour of structurally diverse set of 34 active substances was systematically studied. It was demonstrated that increase of pH value from 2.00 to 4.00 led to longer retention times, even for analytes which remained completely protonated. Obtained results indicated that mobile phase pH affects the thermodynamic equilibriums in chaotropic

chromatography systems. With the aim to explain pH effect on retention behaviour, method of frontal analysis was performed to determinate adsorption isotherms of sodium hexafluorophosphate, while minor disturbance method was used for investigation of adsorption behaviour of acetonitrile. The larger surface excess of acetonitrile was found at higher mobile phase pH value, which potentiate adsorption of chaotropic agents and consequentially the development of surface potential of higher magnitude. After that, regression model was developed by mixture modeling approach and support vector machine algorithm with the aim to identify analytes' structural properties which affect their retention. The analysis of molecular descriptors revealed that complementarity of analytes' structure with the electric double layer on the surface of stationary phase can be recognize as a key factor influencing retention behavior in chaotropic chromatography systems. Structural diversity of studied analytes and good predictive capabilities make the established model a useful tool in predicting retention behavior in the studied chromatographic system.

Furthermore, the study with the aim to distinguish influence of mobile phase pH value and ionic strength on the retention behaviour of 13 fully protonated analytes in chaotropic chromatography systems was performed. Experiments were divided in two sets: in the first set, the ionic strength was varied with the concentration of sodium hexafluorophosphate and additives that adjusted the mobile phase pH, while in the second set, the appropriate amount of sodium chloride was added to keep constant ionic strength. Increase of mobile phase pH from 2.00 to 4.00 led to longer retention times, but in set with constant ionic strength this difference is smaller. The adsorption isotherms of the chaotropic agents revealed lower adsorption of hexafluorophosphate anion on the stationary phase was noticed in the set with constant ionic strength. Applying extended thermodynamic approach, the contribution of ion-pair formation on the stationary phase to the retention of the solutes was demonstrated in systems with variable ionic strength, while in the set with constant ionic strength these interactions were not significant due to competition of sodium ion and protonated analyte for ion-pairing with adsorbed chaotropic ion. Multiple linear regression was used to develop empirical model which included both

molecular descriptor and parameters of chromatographic systems and whose coefficients had clear physical meaning. Comparing the coefficients of models in studied experimental sets confirmed that pH dependent changes in retention behaviour is originated from different interactions with electric double layer.

In the second part of investigation, the capability of polynomial-modified Gaussian model to describe and predict retention and peak shape in chaotropic chromatography systems was tested. Three-step procedure for calculating coefficients of the model based on indirect modeling was proposed. Amlodipine and its impurity A were selected as model substances, while experimental plan was defined by central composition design. Investigated factors were acetonitrile content in the mobile phase, concentration of perchlorate acid in the aqueous phase and column temperature. Experimental conditions for chromatogram simulation was selected by grid point search method and according to predefined criteria for efficiency ( $N$ ) and tailing factor ( $Tf$ ). The perfect agreement between experimentally obtained chromatogram and chromatogram predicted by proposed procedure confirmed the ability of polynomial-modified Gaussian model and three-step procedure to successfully describe and predict chromatographic behaviour in chaotropic chromatography systems.

Thereafter, the procedure for the characterization of bonded stationary phase performance based on combination of experimental design methodology, indirect modeling and polynomial-modified Gaussian model was established. Risperidone and its three impurities were selected as model substances, *Zorbax Eclipse XDB* and *Zorbax Extend* represented the studied stationary phases, while D-optimal experimental design was used to define experimental plan due to its ability to simultaneously estimate both qualitative and quantitative chromatographic factors. Grid point search method was applied for selection of experimental conditions with the best performances of stationary phases were achieved. Good agreement between experimentally obtained and simulated chromatograms confirmed the applicability of proposed procedure for successfully description of retention behaviour even when analytes changed the elution order. The values of left and right peak half-widths obtained from indirect modeling were used to generate the half-width plots. The results

from half-width plot approach as well as from the proposed procedure indicated higher efficiency and better separation performance of the stationary phase where free silanol groups blocked with trimethylsilyl group than the stationary phase where free silanol groups sterically protected by bidentate silane bonding.

**Key words:** Chaotropic chromatography; pH-dependent retention behaviour; Empirical retention models; Ionic strength effect; Acetonitrile adsorption; Sodium hexafluorophosphate adsorption; Polynomial-modified Gaussian model; Simulation of chromatographic behaviour; Half-width plots approach.

**Scientific field:** Pharmacy

**Special topic:** Drug analysis

**UDK number:** 615.07:543.544(043.3)

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Јон-интеракциона хроматографија у аналитици једињења са базним функционалним групама.....	1
1.2. Ретенциони механизми у јон-интеракционој хроматографији.....	3
1.3. Утицај параметара система на хроматографско понашање анализата у хаотропној хроматографији.....	5
1.3.1. Утицај природе и концентрације хаотропног агенса.....	5
1.3.2. Квалитативни и квантитативни утицај органског модификатора мобилне фазе.....	7
1.3.3. Утицај рН вредности мобилне фазе.....	10
1.3.4. Утицај јонске јачине мобилне фазе.....	10
1.3.5. Утицај хидрофобности стационарне фазе.....	10
1.3.6. Утицај молекулске структуре анализата на ретенционо понашање у системима хаотропне хроматографије.....	11
1.4. Моделовање ретенционог понашања у системима јон-интеракционе хроматографије.....	12
1.4.1. Теоријско моделовање.....	12
1.4.2. Емпиријско моделовање.....	19
1.4.2.1. Модели добијени хеометријским приступом.....	19
1.4.2.2. Моделовање квантитативног односа структуре и ретенционог понашања молекула.....	25
1.5. Моделовање облика пика.....	28
1.5.1. Полиномски-модификован Гаусов модел.....	29
1.5.2. Приступ праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика.....	31
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	34
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	36
3.1. Уређаји, реагенси и софтверски системи.....	36

3.2. Испитивање утицаја најзначајнијих хроматографских параметара и молекулске структуре анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији.....	38
3.2.1. Стандардне супстанце.....	38
3.2.2. Испитивање ретенционог понашања анализата, одређивање укупне површине стационарне фазе и одређивање адсорпционих изотерми ацетонитрила .....	50
3.2.2.1. Припрема радних раствора испитиваних супстанци за испитивање ретенционог понашања .....	50
3.2.2.2. Припрема мобилних фаза за испитивање ретенционог понашања ....	50
3.2.2.3. Одређивање површине стационарне фазе .....	51
3.2.2.4. Одређивање адсорпционих изотерми ацетонитрила .....	53
3.2.3. Одређивање адсорпционих изотерми $\text{NaPF}_6$ .....	53
3.2.4. Израчунавање молекулских дескриптора, развој и валидација QSRR модела .....	54
3.2.4.1. Израчунавања дескриптора.....	54
3.2.4.2. Развој и валидација модела .....	58
3.3. Разграничавање утицаја јонске јачине, рН вредности мобилне фазе и структурних карактеристика анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији.....	59
3.3.1. Стандардне супстанце.....	59
3.3.2. Хроматографски услови за испитивање ретенционог понашања анализата .....	61
3.3.3. Хроматографски услови за одређивање адсорпционих изотерми $\text{NaPF}_6$ .....	64
3.3.4. Израчунавање молекулских дескриптора, развој и валидација QSRR модела .....	65
3.4. Тестирање способности полиномски-модификованог Гаусовог модела за описивање и симулацију хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће А у јон-интерекционој хроматографији.....	67

3.4.1.	Стандардне супстанце.....	67
3.4.2.	Хроматографски услови за испитивање ретенционог понашања анализата у циљу добијања неопходних параметара за тестирање модела и симулацију хроматографских пикова.....	68
3.4.3.	Софтвери за обраду података.....	70
3.5.	Процена перформанси модификованих стационарних фаза праћењем утицаја квалитативних и квантитативних хроматографских параметара у хаотропној хроматографији на примеру респеридона и његових нечистоћа.....	71
3.5.1.	Стандардне супстанце.....	71
3.5.2.	Хроматографски услови.....	73
3.5.3.	Софтвери за обраду података.....	75
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	76
4.1.	Испитивање утицаја најзначајнијих хроматографских параметара и молекулске структуре анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији.....	76
4.1.1.	Испитивање ефекта компоненти мобилне фазе на ретенционо понашање испитиваних супстанци.....	77
4.1.2.	Утицај рН вредности мобилне фазе на адсорпцију $\text{NaPF}_6$ на стационарну фазу.....	80
4.1.3.	Утицај промене рН вредности мобилне фазе на адсорпцију ацетонитрила на површину стационарне фазе.....	81
4.1.4.	Развој QSRR модела за успостављање корелације параметара мобилне фазе и структурних дескриптора са ретенционим подацима.....	84
4.1.5.	Перформансе модела и анализа структурних карактеристика које утичу на ретенционо понашање анализата.....	87
4.2.	Разграничавање утицаја јонске јачине, рН вредности мобилне фазе и структурних карактеристика анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији.....	92
4.2.1.	Утицај јонске јачине на рН зависне промене ретенционог понашања у хаотропној хроматографији.....	92



4.2.2.	Утицај јонске јачине на рН зависне промене у адсорпцији $\text{NaPF}_6$ и развој електростатског потенцијала у системима хаотропне хроматографије.....	97
4.2.3.	Разјашњавање ретенционог понашања.....	99
4.2.3.1.	Разјашњавање ретенционог понашања применом проширеног термодинамичког модела.....	99
4.2.3.2.	Развој емпиријског ретенционог модела који укључује параметре хроматографског система и молекулске структуре анализата.....	104
4.3.	Тестирање способности полиномски-модификованог Гаусовог модела за описивање и симулацију хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће А у јон-интеракционој хроматографији.....	113
4.3.1.	Тростепена процедура за израчунавање коефицијената полиномски-модификованог Гаусовог модела .....	114
4.3.2.	Примена предложене тростепене процедуре за описивање хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће А у системима хаотропне хроматографије .....	115
4.4.	Процена перформанси модификованих стационарних фаза праћењем утицаја квалитативних и квантитативних хроматографских параметара у хаотропној хроматографији на примеру респеридона и његових нечистоћа.....	123
4.4.1.	Прелиминарна испитивања .....	123
4.4.2.	Примена тростепене процедуре за израчунавање коефицијената полиномски-модификованог Гаусовог модела за симулацију хроматограма респеридона и његових нечистоћа .....	125
4.4.3.	Процена перформанси стационарних фаза приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика .....	137
5.	ЗАКЉУЧАК.....	143
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	146
7.	ПРИЛОГ .....	158
8.	БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	160

## 1. УВОД

### 1.1. Јон-интеракциона хроматографија у анализи једињења са базним функционалним групама

Реверзно фазна течна хроматографија под високим притиском (енг. *reverse phase high pressure liquid chromatography* – *RP-HPLC*) данас је најчешће примењивана аналитичка метода у свим фазама истраживања, развоја и производње лекова. Приликом анализе супстанци које у својој структури садрже базне функционалне групе у овим хроматографским системима наилази се на следеће проблеме са њиховим хроматографским понашањем:

- Анализа молекулског облика базних супстанци захтева подешавање рН вредности мобилне фазе најмање две рН јединице изнад  $pK_a$  вредности анализата. Већина активних супстанци садржи базне функционалне групе чије су  $pK_a$  вредности изнад 6, а најчешће око 9 [1], па је за анализу њиховог молекулског облика неопходно подешавање рН вредности мобилне фазе од 8,00 до 11,00. Овако високе рН вредности мобилне фазе су изван препорученог опсега испитивања за већину *RP-HPLC* стационарних фаза и могу довести до њиховог оштећења.
- Анализа јонизованог облика базних супстанци резултује недовољним задржавањем анализата на стационарној фази и појавом хроматографских пикова неприхватљивог облика и симетрије.

Описани проблеми се успешно могу превазићи додатком јон-интеракционог агенса у мобилну фазу. Јон-интеракциона хроматографија представља прелаз између реверзно фазне и јоноизмењивачке хроматографије. Додатак јон-интеракционог агенса у мобилну фазу доводи до дуже ретенције супротно наелектрисаних анализата због њиховог спаривања у мобилној фази или на стационарној фази. Првобитно коришћени јон-интеракциони агенси били су јон-пар реагенси, који представљају амфифилне јоне са релативно дугим алкил ланцем на једном крају и наелектрисаном групом на другом крају. Ови јони ступају у

интеракције са стационарном фазом својим хидрофобним делом, алкил ланцем, док наелектрисани део остаје оријентисан ка мобилној фази и слободан за интеракције са супротно наелектрисаним анализом. Јон-пар реагенси се користе у анализи и киселих и базних анализата, али њихов недостатак је иреверзибилно везивање за стационарну фазу и скраћивање трајања колоне [2]. Овај тип јон-интеракционе хроматографије назван је *јон-пар хроматографија* [3].

Другу врсту јон-интеракционих агенаса представљају хаотропни агенси и данас све више расте интересовање за њихову примену у аналитици једињења са базним функционалним групама. Хаотропни агенси или лиофилни јони су мали неоргански јони који остварују реверзибилне интеракције са стационарном фазом, што представља њихову главну предност у односу на јон-пар реагенси. Они имају утицај само на хроматографско понашање базних анализата, а овај тип јон-интеракционе хроматографије назван је *хаотропна хроматографија* [4].

Хаотропни агенси су добили назив према својој способности нарушавања солватационог омотача око јонизованог анализата и увођења „хаоса“ у структуру јона у раствору. Франц Хофмајстер (*Franz Hofmeister*) је први рангирао соли тако што је формирао низ њихових анјона и катјона у циљу објашњења ефекта исољавања [5]. На основу својства нарушавања солватационог омотача анјони су поређени у Хофмајстеров низ на следећи начин:

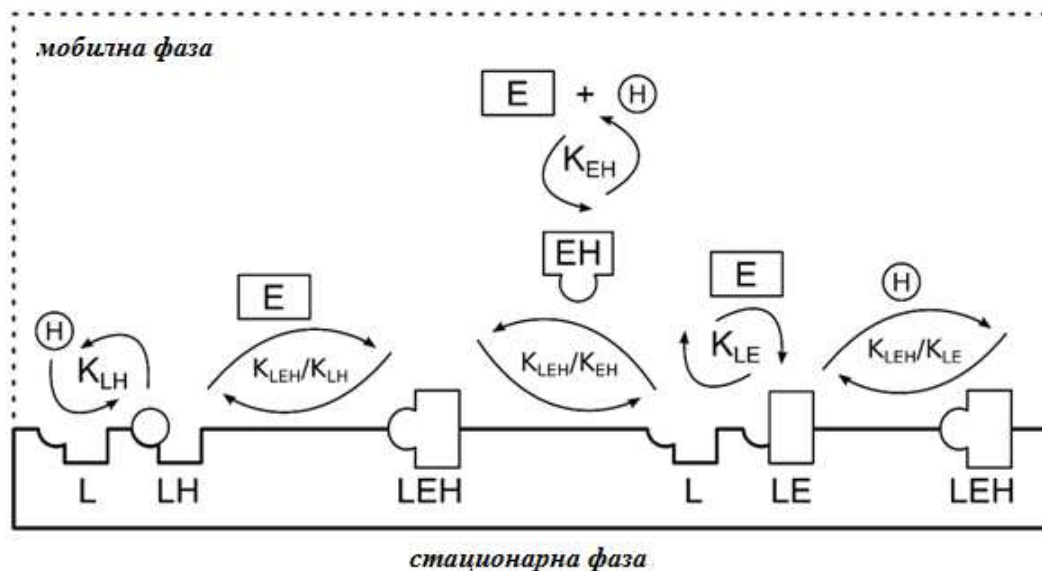


Хаотропни ефекат расте са леве на десну страну низа и повезан је са физичко-хемијским особинама јона као што су повећање симетрије јона, хидрофобности, густине електрона и могућности делокализације наелектрисуња. Такође, ефекат хаотропних агенаса на ретенцију анализата прати Хофмајстеров низ па јони са израженијим хаотропним ефектом доводе до дужег задржавања анализата на стационарној фази [6].

## 1.2. Ретенциони механизми у јон-интеракционој хроматографији

Механизам ретенције анализата у системима јон-интеракционе хроматографије је веома сложен, тако да хроматографски процеси који се одигравају у овим системима могу бити представљени серијом равнотежа и њихових стехиометријских константи приказаних на слици 1. Сматра се да највећи утицај на ретенцију анализата имају процеси који су последица следећих равнотежа [7–9]:

- Адсорпција јон-интеракционог агенса (H) на место лиганда (L) хидрофобне стационарне фазе и формирање наелектрисања на њеној површини (LH).
- Адсорпција анализата (E) на површину стационарне фазе (LE).
- Јонско спаривање на стационарној фази (LEH).
- Јонско спаривање у мобилној фази (EH).
- Компетиција између јон-интеракционог агенса (H) и анализата (E).



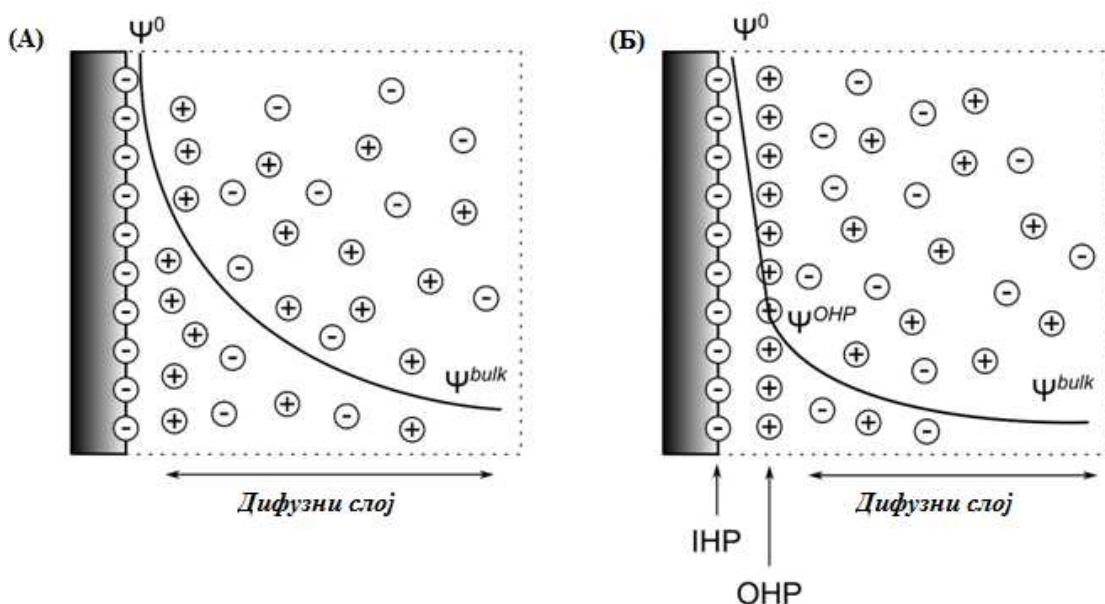
Слика 1. Шематски приказ равнотежа укључених у ретенциони механизам у системима јон-интеракционе хроматографије (прилагођено из референце [4]).

Приликом разматрања ретенционих процеса у хаотропној хроматографији треба узети у обзир и својство хаотропних агенаса да се адсорбују на површину стационарне фазе, при чему се формира електрични двослој [10,11]. Претпоставља се да су хаотропни јони (анјони) много адсорбофилнији од њихових контрајона (катјона) и да се приликом њихове адсорпције на стационарну фазу формира негативно наелектрисана површина. Након тога, наелектрисана стационарна фаза привлачи контрајоне и формира се електрични двослој. Аналити имају могућност остваривања интеракција са двослојом на површини стационарне фазе или јонском изменом и/или адсорпцијом на површину услед разлике у електростатском потенцијалу [12].

Вредност електростатског потенцијала на површини стационарне фазе може бити одређена разматрањем Гуи-Чапманове теорије о електричном двослоју или Штернове верзије ове теорије [7,8]. Према Гуи-Чапмановој теорији разликујемо примарни слој који се састоји од адсорбованих хаотропних јона и дифузни слој који се састоји од контрајона. Вредност електростатског потенцијала експоненцијално опада са променом растојања од површине стационарне фазе (слика 2А). На основу Штернове верзије претходне теорије разликујемо:

- унутрашњу Хелмхолцову раван (енг. *inner Helmholtz plane* – INP) која је дефинисана адсорбованим хаотропним јонима на стационарној фази,
- спољашњу Хелмхолцову раван (енг. *outer Helmholtz plane* – ОНР) која се састоји од контрајона и налази на најмањој могућој удаљености на којој могу да се налазе контрајони и
- дифузни слој.

Вредност електростатског потенцијала опада линеарно између унутрашње и спољашње Хелмхолцове равни, а након тога наставља експоненцијално да пада у дифузном слоју са променом растојања од површине стационарне фазе (слика 2Б). Обе ове теорије су разматране приликом моделовања ретенционог понашања у хаотропној хроматографији које ће касније бити описано у овој дисертацији.



**Слика 2.** Шематски приказ структуре електричног двослоја према (А) Гуи-Чапмановој теорији; (Б) Штерн-Гуи-Чапмановој теорији. ИНР (енг. *inner Helmholtz plane*) – унутрашња Хелмхолцова раван; ОНР (енг. *outer Helmholtz plane*) – спољашња Хелмхолцова раван;  $\Psi$  – електростатски потенцијал (прилагођено из референце [4]).

### 1.3. Утицај параметара система на хроматографско понашање анализата у хаотропној хроматографији

#### 1.3.1. Утицај природе и концентрације хаотропног агенса

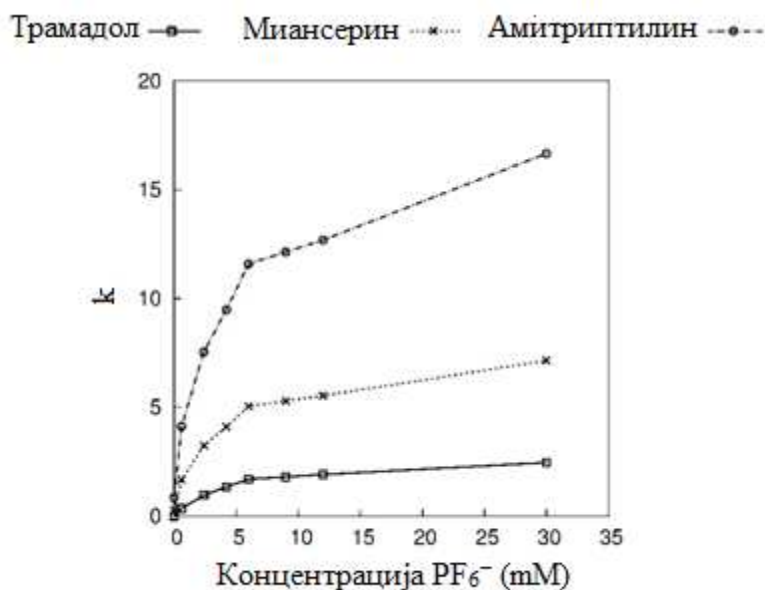
Утицај природе хаотропног агенса и његове концентрације у мобилној фази на хроматографско понашање анализата са базним функционалним групама предмет је бројних истраживања којима је потврђена значајност ових фактора приликом развоја метода у хаотропној хроматографији [6,13–19].

Показано је да хаотропни агенси, који према Хофмајстеровом низу имају израженији хаотропни ефекат, доводе до дужег задржавања анализата на стационарној

фази, као и до значајнијег побољшања облика и симетрије пика. За експериментално добијене резултате предложена су следећа објашњења:

- Са порастом такозване хаотропности јона (израженији хаотропни ефекат према Хофмајстеровом низу), долази до ефикасније десолватације анализата и лакшег јонског спаривања у мобилној фази, а последично и до дужег задржавања неутралног јон-пара на стационарној фази [13,14].
- Пораст хаотропности јона доводи до интензивније адсорпције хаотропног агенса на стационарну фазу, стварања већег електростатског потенцијала на њеној површини и дуже ретенције супротно наелектрисаног анализата [6,15].

Поред природе хаотропног агенса, показано је и да његова концентрација представља битан фактор у овим системима. Уочено је да са порастом концентрације хаотропног агенса долази до дужег задржавања анализата на стационарној фази до одређене концентрације, а након тога даље повећање концентрације хаотропног агенса нема утицаја на ретенцију, тако да се на графику зависности ретенционог фактора од концентрације хаотропног агенса уочава појава платоа (слика 3).



**Слика 3.** Репрезентативни график зависности ретенционог фактора од концентрације хаотропног агенса у мобилној фази. Подаци су добијени на колони *Luna C18* 150×4,6mm, 5μm величине честица (*Phenomenex, CA, САД*); мобилна фаза: атонитрил-водени раствор NaPF<sub>6</sub> (40:60% V/V); рН вредност мобилне фазе 3,00; брзина протока мобилне фазе 1 mL/min; λ = 254 nm (прилагођено из референце [4]).

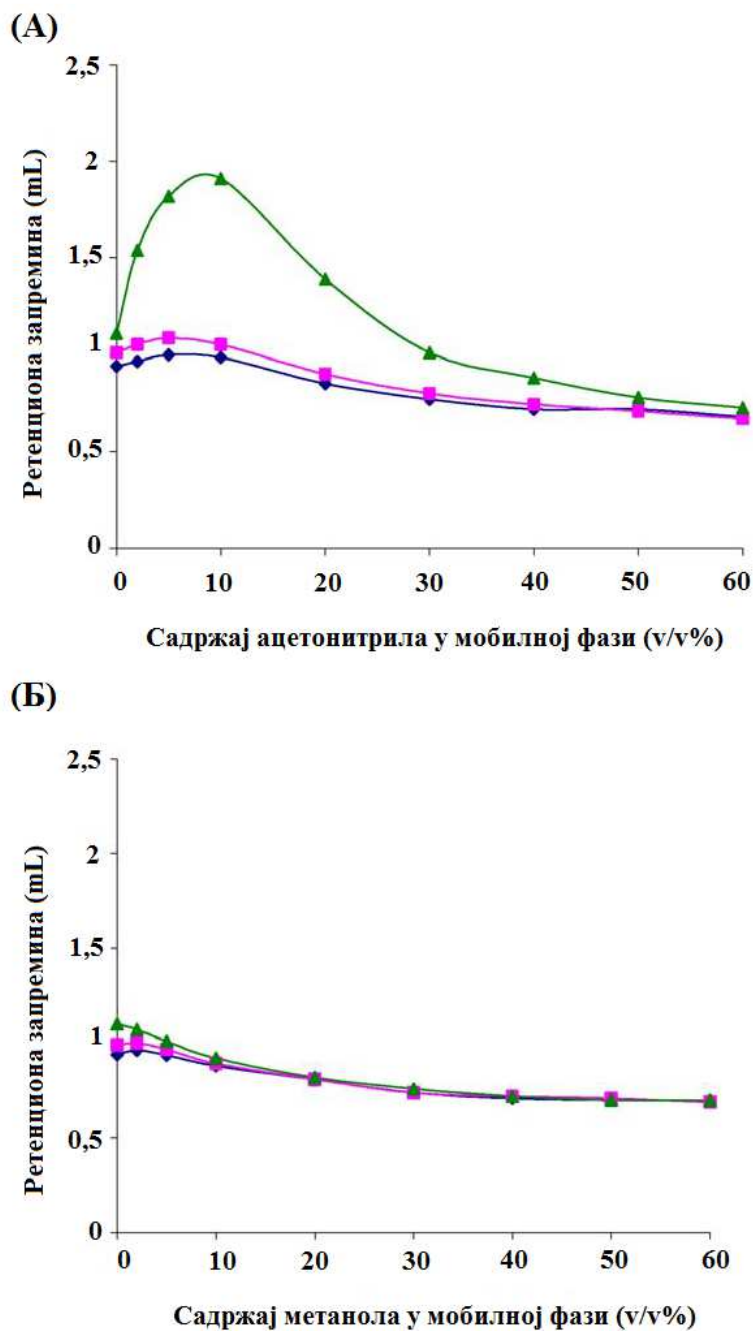
### 1.3.2. Квалитативни и квантитативни утицај органског модификатора мобилне фазе

Ретенција анализата у *RP-HPLC* системима у великој мери зависи од избора органског модификатора и његовог удела у мобилној фази зато што ови фактори доприносе елуационој моћи мобилне фазе [6]. У системима хаотропне хроматографије ова два фактора додатно утичу на хроматографско понашање анализата услед ефекта на адсорпцију хаотропног агенса на површину стационарне фазе. Најчешће коришћени органски модификатори у овим хроматографским системима су ацетонитрил, метанол и тетрахидрофуран. Показано је да метанол формира монослој, а ацетонитрил и тетрахидрофуран више слојева на површини стационарне фазе тако да укупна дебљина слоја ацетонитрила може да буде већа и од



10Å. Адсорпциони слој ацетонитрила представља погодан медијум за адсорпцију лиофилних јона на стационарну фазу услед могућности остваривања  $\pi$ - $\pi$  интеракција, па се ретенционом механизму протонваних базних анализата додају и електростатичке интеракције [6]. Са друге стране метанол нема могућност остваривања интеракција овог типа, па монослој метанола спречава формирање псеудо јоноизмењивачке површине стационарне фазе за адсорпцију хаотропних јона и све интеракције између анализата и хаотропних јона се дешавају у мобилној фази [14].

Са повећањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази долази до продужене ретенције хаотропних јона и максимум њихове ретенције се постиже при уделу ацетонитрила у мобилној фази од 10-15% (слика 4А). Даље повећање садржаја ацетонитрила у мобилној фази доводи до постепеног скраћивања ретенције услед повећања елуационе моћи мобилне фазе која надјачава електростатске интеракције. Са друге стране, на слици 4Б се запажа да повећање садржаја метанола у мобилној фази доводи до краће ретенције хаотропних јона услед повећања елуационе моћи мобилне фазе и немогућности метанола да оствари  $\pi$ - $\pi$  интеракција са лиофилним јонима [20].



**Слика 4.** Ретенциона зависност хаотропних јона:  $\text{PF}_6^-$  (троуглови),  $\text{ClO}_4^-$  (квадрати),  $\text{BF}_4^-$  (ромбоиди) од садржаја органског модификатора у мобилној фази: (А) ацетонитрил-вода и (Б) метанол-вода на колони *Zorbax Eclipse XDB C8* (прилагођено из референце [6]).

### **1.3.3. Утицај рН вредности мобилне фазе**

Ефекат рН вредности мобилне фазе на ретенцију базних анализата у системима хаотропне хроматографије до сада је проучаван само кроз утицај на промену јонизационог стања анализата са променом рН вредности [16]. Показано је да снижавање рН вредности мобилне фазе и додатак хаотропног агенса у мобилну фазу доводи до продужавања ретенције протонованих базних анализата. Претпоставља се да до дуже ретенције анализата долази услед разарања солватационог омотача анализата од стране хаотропног агенса и пораста хидрофобности анализата. У већини експеримената се рН вредност мобилне фазе подешава на вредност која омогућава потпуно протоновање базног анализата и одржава се константном током испитивања. Ефекат рН вредности на ретенцију потпуно протонованог анализата у хаотропној хроматографији није до сада описан у литератури.

### **1.3.4. Утицај јонске јачине мобилне фазе**

Јонска јачина мобилне фазе, као фактор који утиче на хроматографско понашање анализата, није пуно изучавана у системима хаотропне хроматографије и у већини истраживања је одржавана константном. Казакевич и сарадници (*Kazakevich et al.*) [6] су испитивали утицај јонске јачине на адсорпцију натријум хексафлуорофосфата и показали да долази до продужавања његове ретенције са повећањем јонске јачине до 10 mM након чега даље повећање јонске јачине не утиче на задржавање овог јона на стационарној фази.

### **1.3.5. Утицај хидрофобности стационарне фазе**

Избор стационарне фазе у системима хаотропне хроматографије представља важан фактор не само за ретенцију анализата већ и за адсорпцију хаотропних агенаса на стационарну фазу. У литератури је описано продужавање ретенције анализата у *RP-HPLC* системима са порастом хидрофобности стационарне фазе према следећем низу: алкил>фенил>флуорофенил колоне [21–23]. У системима хаотропне

хроматографије показано је да са порастом хидрофобности стационарне фазе расте и адсорпција хаотропног агенса, посебно када се разматрају јони са јако израженим хаотропним ефектом, као што је натријум хексафлуорофосфат. Количина адсорбованог натријум хексафлуорофосфата на стационарној фази расте од перфлуорофенил до алкилфенил и *n*-алкил колоне, а највећа количина јона се адсорбује на графитној колони [20].

Интезивнија адсорпција хаотропног агенса са порастом хидрофобности стационарне фазе одражава се и на ретенцију протонисаних базних анализа. Вемић и сарадници [15] су изучавали утицај хидрофобности колоне на ретенцију прамипексола и његових нечистоћа и показали да долази до дужег задржавања испитиваних супстанци на хидрофобнијим колонама услед стварања већег електростатског потенцијала на површини колоне и последично израженијег јонског спаривања анализа и хаотропног јона на стационарној фази.

### ***1.3.6. Утицај молекулске структуре анализа на ретенционо понашање у системима хаотропне хроматографије***

У литератури постоји свега неколико студија о односу молекулске структуре анализа и њихове ретенције у хроматографским системима са хаотропним реагенсима [15, 24]. Закључци ових студија углавном указују на пораст сензитивности анализа према хаотропним агенсима са порастом хидрофобности анализа, али мало је познато о структурним карактеристикама молекула које доприносе ретенцији анализа у хаотропној хроматографији. Вемић и сарадници [15] су дошли до закључка да на ретенцију анализа у овим системима утиче и распоред наелектрисања унутар молекула анализа и његова комплементарност са електричним двослојем формираним на стационарној фази. Међутим, иако је ово важан закључак који први пут указује на конкретну структурну карактеристику анализа која условљава његово задржавање у системима хаотропне хроматографије, ово истраживање је рађено на шест модел супстанци па то онемогућава његову генерализацију, али свакако представља добру основу за даља истраживања.

#### **1.4. Моделовање ретенционог понашања у системима јон-интеракционе хроматографије**

У циљу бољег разумевања комплексних механизма на којима се заснива ретенција анализата у јон-интеракционој хроматографији развијени су теоријски и емпиријски модели. Теоријски модели се заснивају на примени познатих физичко-хемијских принципа у циљу објашњавања експериментално добијених података и добијања увида у процесе и факторе који утичу на ретенцију анализата. За јон-интеракционе хроматографске системе развијено је неколико теоријских модела који су детаљније описани у поглављу 1.4.1. Емпиријски модели се заснивају на експериментално добијеним подацима и не захтевају шире теоријско утемељење за описивање ретенционих процеса. Емпиријски модели развијени за описивање ретенционог понашања у системима са јон-интеракционим агенсима су модели добијени хеометријским приступом и модели квантитативног односа структуре и ретенционог понашања молекула.

##### ***1.4.1. Теоријско моделовање***

Првобитно предложени теоријски модели за описивање ретенционих механизма у јон-пар хроматографији били су стехиометријски модели. У основи идеје ових модела је разматрање формирања неутралног комплекса између наелектрисаног анализата и супротно наелектрисаног јон-пар реагенса, а међусобно се модели разликују по томе да ли заступају теорију формирања неутралног комплекса у мобилној фази тзв. јон-пар модели [25–27] или теорију формирања комплекса на стационарној фази тзв. динамички јоноизмењивачки модели [28–30]. Међутим, ова два приступа су идентична са термодинамичког аспекта зато што им је почетно и крајње стање исто, а разликују се само у претпостављеном путу којим се прелази из почетног у крајње стање [31].

Први теоријски модели у хаотропној хроматографији такође су били стехиометријски и велики број аутора се залагао за јон-пар моделе тј. формирање

неутралног комплекса у мобилној фази. Аутори су пошли од чињенице да хаотропни агенси нису изразито хидрофобна једињења па њихова адсорпција на стационарну фазу није изражена, а са друге стране, хаотропни агенси лако нарушавају солватациони омотач анализата чиме је њихово спаривање у мобилној фази олакшано [13, 16, 32–35]. Ови модели имају и своје експериментално упориште јер је показано да са смањењем хидрофобности анализата долази до смањеног утицаја концентрације хаотропног агенса на ретенцију тог анализата [13, 32].

Ло Бруто и сарадници (*LoBrutto et al.*) [16] су развили теорију према којој додаток хаотропног агенса у мобилну фазу доводи до нарушавања солватационог омотача анализата, стварања неутралног јонског пара са хаотропним анјоном, адсорпције неутралног комплекса на стационарну фазу и последично дужег задржавања анализата на стационарној фази. Приликом успостављања ове теорије, аутори су пошли од претпоставке да је укупна концентрација анализата у систему једнака збиру солватисаног и десолватисаног анализата, а да десолватисани аналит постоји само у форми комплекса са хаотропним агенсом. Према томе, укупан ретенциони фактор анализата,  $k$  може се приказати једначином 1:

$$k = k_s \theta + k_{us}(1 - \theta) \quad (1)$$

где је  $k_s$  ретенциони фактор солватисаног анализата,  $\theta$  солватисана фракција,  $k_{us}$  ретенциони фактор десолватисаног анализата и  $1-\theta$  десолватисана фракција.

Главни недостатак стехиометријских модела у јон-интеракционој хроматографији је занемаривање чињенице да се додатком јон-интеракционог агенса у мобилну фазу формира електрични двослој на површини стационарне фазе, као и претпоставка да не долази до промена константи равнотежа (слика 1) након увођења јон-интеракционог агенса у систем.

Термодинамички модели разматрају утицај разлике потенцијала између стационарне фазе и елуента која настаје као последица различите адсорбофилности

јон-интеракционог јона и његовог контра јона. Бидлингмајер и сарадници (*Bidlingmeyer et al.*) [10, 11] су први указали на значај формирања електричног двослоја на стационарној фази након адсорпције јон-пар агенса на њу. Према овим ауторима, приликом задржавање анализата на стационарној фази долази до проласка анализата кроз електрични двослој, па су у ретенциони механизам укључене и електростатске интеракције и Ван дер Валсове силе. Поред модела ових аутора, предложена су још два нестехиометријска модела [12, 36] која разматрају само утицај електростатских интеракција на ретенцију анализата, а занемарују јонско спаривање у мобилној фази. Главни недостатак термодинамичког приступа моделовању ретенционог понашања у јон-интеракционој хроматографији је занемаривање формирања комплекса између јон-интеракционог реагенса и наелектрисаног анализата иако за то постоје јасни експериментални докази [37–43].

Проширени термодинамички модел сагледава ретенцију анализата и са стехиометријског и са термодинамичког аспекта. Овај приступ узима у обзир и термодинамичке константе формирања јонских парова и значај развоја електричног двослоја на стационарној фази. Модел је првобитно развијен у хроматографским системима са јон-пар агенсима, али је његова примена потврђена и у системима хаотропне хроматографије [7–9].

Разјашњавање основних принципа и равнотежа на којима се заснива проширени термодинамички модел у хаотропној хроматографији треба почети од адсорпције хаотропног агенса на стационарну фазу. Једначином Фројндлихове адсорпционе изотерме може се описати веза између количине хаотропног агенса адсорбованог на стационарну фазу,  $[LH]$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) и његове концентрације у мобилној фази,  $[H]$ :

$$[LH] = a[H]^b \quad (2)$$

где  $a$  и  $b$  представљају константе које се експериментално одређују.

Фројндлихова изотерма омогућава израчунавање разлике електростатског потенцијала  $\Psi^0$  који се развија између површине стационарне фазе и мобилне фазе. Гуи-Чапманов израз за израчунавање електростатског потенцијала има следећи облик:

$$\Psi^0 = \frac{2RT}{F} \ln \left\{ \frac{[LH] \cdot |z_H| F}{(8\varepsilon_0 \varepsilon_r RT \sum_i c_{oi})^{0.5}} + \left[ \frac{([LH] \cdot z_H F)^2}{8\varepsilon_0 \varepsilon_r RT \sum_i c_{oi}} + 1 \right]^{0.5} \right\} \quad (3)$$

где је  $\varepsilon_0$  диелектрична пермитивност вакуума,  $\varepsilon_r$  диелектрична константа мобилне фазе,  $T$  апсолутна температура,  $R$  универзална гасна константа,  $F$  Фарадејева константа, а  $\sum c_{oi}$  је концентрација једноструко наелектрисаног јона електролита у мобилној фази (mM). Вредности  $\Psi^0$  имају позитиван или негативан предзнак у зависности од наелектривања најадсорбофилнијег јона хаотропног агенса.

Према теоријским чињеницама на којима се темељи проширени термодинамички модел, најважније хемијске равнотеже у системима хаотропне хроматографије и њихове термодинамичке константе равнотеже су следеће [7–9]:

- 1) адсорпција анализата,  $E$  на место лиганда,  $L$  на стационарној фази:



$$K_{LE} = \frac{a_{LE}}{a_L a_E} \exp(z_E F \Psi^0 / RT) \quad (5)$$

- 2) адсорпција хаотропног агенса,  $H$  на место лиганда,  $L$  на стационарној фази:



$$K_{LH} = \frac{a_{LH}}{a_L a_H} \exp(z_H F \Psi^0 / RT) \quad (7)$$

- 3) јонско спаривање у мобилној фази, ЕН:





$$K_{EH} = \frac{a_{EH}}{a_E a_H} \quad (9)$$

- 4) формирање комплекса између анализита и хаотропног агенса на стационарној фази, ELH:



$$K_{EHL} = \frac{a_{EHL}}{a_E a_H a_L} \quad (13)$$

У једначинама 4–13,  $a$  представља активитет јона,  $R$  је универзална гасна константа,  $F$  Фарадејева константа,  $T$  је апсолутна температура,  $z_E$  је наелектрисање анализита, а  $z_H$  наелектрисање хаотропног агенса.

Узимајући у обзир константанте јонског спаривања, ретенциони фактор анализита,  $k$  се може израчунати према следећој једначини:

$$k = \Phi \frac{[LE] + [EHL]}{[E] + [EH]} \quad (14)$$

где је  $[LE]$  површинска концентрација анализита,  $[EHL]$  површинска концентрација комплекса анализита и хаотропног агенса,  $[EH]$  концентрација комплекса анализита и хаотропног агенса у мобилној фази,  $[E]$  концентрација анализита у мобилној фази, а  $\Phi$  представља однос стационарне и мобилне фазе.

Ако вредност активитета у једначинама 4–13 сматрамо константном, онда једначину 14 лако можемо трансформисати у следећу једначину:

$$k = \Phi[L](K_{EL} \exp\left(\frac{-z_E F \Psi^0}{RT}\right) \theta + \frac{K_{EHL}}{K_{EH}} (1 - \theta)) \quad (15)$$

где  $\theta$  представља солватисану фракцију анализата, а  $[L]$  површинску концентрацију места лиганда (места доступних за везивање хаотропног агенса) на стационарној фази ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ). Ова једначина је унапређење стехиометријског модела (једначина 1) који су предложили Казакевич и сарадници (*Kazakevich et al.*) пошто има могућност предвиђања скраћења ретенције у случају да се у систем уведе хаотропни агенс истог наелектрисања као анализат, као и могућност предвиђања максимума ретенције.

Зависност ретенције анализата од концентрације хаотропног агенса може се приказати следећом једначином, која је алгебарски еквивалентна једначини 15:

$$k = \Phi[L]_T \frac{K_{LE}(\gamma_L \gamma_E / \gamma_{LE}) \exp\left(\frac{-z_E F \Psi^0}{RT}\right) + K_{EHL}(\gamma_E \gamma_{HYL} / \gamma_{EHL})[H]}{(1 + K_{EH}(\gamma_E \gamma_H / \gamma_{EH})[H])(1 + K_{LH}(\gamma_L \gamma_H / \gamma_{LH}) \exp\left(\frac{-z_E F \Psi^0}{RT}\right)[H])} \quad (16)$$

где је  $\gamma$  коефицијент активитета сваке врсте, а  $[L]_T$  укупна концентрација места лиганда на стационарној фази.

Када се Гуи-Чапманов израз за потенцијал и Фројндлихова једначина адсорпционе изотерме замене у једначини 16 добија се коначни израз проширеног термодинамичког модела:

$$k = \frac{c_1 \left\{ (a[H]^b f + [(a[H]^b f)^2 + 1]^{0.5})^{\pm 2|z_E|} + c_2[H] \right\}}{(1 + c_3[H]) \left\{ 1 + c_4[H] \left\{ a[H]^b f + [(a[H]^b f)^2 + 1]^{0.5} \right\}^{(-2|z_H|)} \right\}} \quad (17)$$

где  $a$  и  $b$  представљају константе Фројндлихове изотерме,  $[H]$  је концентрација хаотропног агенса у мобилној фази,  $z_E$  наелектрисање анализата,  $z_H$  наелектрисање хаотропног агенса, а  $c_1$ – $c_4$  представљају параметре са јасним физичким значењем [7–9]. Константа  $f$  се одређује из експерименталних услова према следећем изразу:

$$f = \frac{|z_H|F}{(8\varepsilon_0\varepsilon_rRT \sum_i c_{0i})^{0.5}} \quad (18)$$

Параметри  $c_1$ – $c_4$  се могу израчунати према следећим једначинама:

$$c_1 = \Phi[L]_T K_{LE} \frac{\gamma_{LYE}}{\gamma_{LE}} \quad (19)$$

$$c_2 = \Phi[L]_T K_{EHL} \frac{\gamma_{EYHYL}}{\gamma_{EHL}} \quad (20)$$

$$c_3 = K_{EH} \frac{\gamma_{EYH}}{\gamma_{EH}} \quad (21)$$

$$c_4 = K_{LH} \frac{\gamma_{LYH}}{\gamma_{LH}} \quad (22)$$

Параметар  $c_1$  представља ретенцију анализата без додатка хаотропног агенса и може се одредити експериментално. Параметар  $c_2$  представља термодинамичку константу равнотеже формирања јонског пара на стационарној фази, а параметар  $c_3$  термодинамичку константу равнотеже за формирање јонског пара у мобилној фази. Параметар  $c_4$  представља константу равнотеже за адсорпцију хаотропног агенса на стационарну фазу и може се сматрати незначајним и искључити из даљег моделовања када се ради о слабо адсорбофилним јон-интеракционим агенсима као што су хаотропни агенси.

### 1.4.2. Емпиријско моделовање

#### 1.4.2.1. Модели добијени хеометријским приступом

Хеометрија се дефинише као хемијска дисциплина која користи математичке, статистичке и логичке методе у циљу: дизајнирања или избора оптималних експерименталних услова, добијања максималног броја релевантних информација анализом хемијских података и разумевања хемијских система [44]. Методологија експерименталног дизајна је најчешће примењивани хеометријски приступ у аналитици лекова. Експериментални дизајн представља поступак планирања експеримената у циљу истовремене процене утицаја већег броја фактора и факторских интеракција извођењем релативно малог броја експеримената на основу чијих резултата се може доћи до релевантних закључака. Хеометријски приступ је успешно примењиван у системима хаотропне хроматографије у циљу планирања експеримента и објашњавања веза између значајних хроматографских параметара (одговори система) и параметара система [14, 16, 17].

Фактори чији се утицај најчешће разматра у хроматографским системима су: састав мобилне фазе (врста и садржај органског модификатора у мобилној фази), рН вредност мобилне фазе, састав водене фазе (врста и концентрација пуфера или других адитива), врста стационарне фазе, температура колоне и брзина протока мобилне фазе. Као одговори система углавном се посматрају ретенционо време ( $t_r$ ) или ретенциони фактор ( $k$ ) анализата, дужина трајања анализе, фактор селективности ( $\alpha$ ), фактор резолуције ( $R_s$ ), фактор сепарације ( $S$ ), а при анализи анализата базних особина и фактор асиметрије пика ( $A_s$ ). Методологија експерименталног дизајна омогућава успостављање математичке зависности између испитиваних фактора,  $X$  и одговора система,  $Y$  а општи облик те зависности може бити представљен следећом једначином:

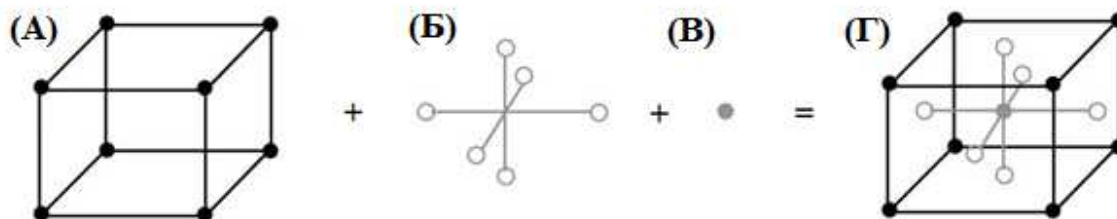
$$Y = f(X) \quad (23)$$

Функција  $f(X)$  је апроксимирана полиномском функцијом која добро описује везу између фактора и одговора система унутар испитиваног експерименталног простора [45]. Ова функција може бити линеарна, квадратна, кубна или вишег степена, али квадратна зависност у највећем броју случајева најбоље описује везу између посматраних фактора и одговора приликом развоја и оптимизације хроматографских метода. У циљу добијања релевантних закључака, вредности фактора се преводе у кодиране вредности и на тај начин доводе у исту скалу. Кодирање фактора се врши тако да све више вредности имају кодирану вредност +1, а све ниже вредности кодирану вредност -1.

Експериментални дизајни се могу поделити у две групе:

- (1) Скрининг дизајни (пун факторски дизајн на два нивоа, фракциони факторски дизајн, Плакет-Бурманов дизајн) се користе за идентификацију фактора са највећим утицајем на одговоре система. Овај тип дизајна омогућава проучавање утицаја великог броја фактора на одговоре система помоћу релативно малог броја експеримената. Код скрининг дизајна, фактори се обично разматрају на два нивоа.
- (2) Дизајни површине одговора (пун факторски дизајн на три нивоа, централни композициони дизајн (енг. *central composite design-CCD*), Бокс-Бенкенов дизајн, D-оптимални дизајн, Делертова матрица, комбиновани дизајни) се користе за одређивање оптималних вредности фактора са највећим утицајем на одговоре система. Код овог типа дизајна, фактори се разматрају на најмање три нивоа. Дизајни површине одговора омогућавају успостављање квадратне функционалне зависности између фактора и одговора система, па се оптималне вредности фактора добијају на основу површине одговора. У наставку ће детаљније бити описани дизајни коришћени приликом израде ове докторске дисертације, а то су CCD и D-оптимални дизајн.

Централни композициони дизајн (CCD) спада у дизајне површине одговора и често се користи уместо пуног факторског дизајна на три нивоа зато што је потребан мањи број експеримената у циљу процене утицаја истог броја фактора. Овај дизајн се састоји од пуног факторског или фракционог факторског дизајна, „звезда“ дизајна и репликација у централној тачки (слика 5).



**Слика 5.** Приказ просторног распореда експеримената централног композиционог дизајна (D) – (A) тачке које припадају пуном факторском дизајну; (B) тачке које припадају „звезда“ дизајну; (C) репликације у централној тачки (прилагођено из референце [46]).

Тачке које одговарају пуном факторском дизајну представљају експерименте са кодираним вредностима фактора  $+1$  или  $-1$ ; експерименти који одговарају репликацијама у централној тачки имају кодиране вредности свих фактора  $0$ ; тачке које одговарају „звезда“ дизајну представљају експерименте где фактори имају кодирану вредност  $+\alpha$  или  $-\alpha$  [47]. У зависности од вредности  $\alpha$  постоје две врсте CCD:

- ка центру страна коцке оријентисани CCD (енг. *face-centred central composite design*) где  $\alpha$  има вредности  $+1$  или  $-1$  и сви фактори се испитују на три нивоа;
- ротабилни CCD (енг. *rotatable central composite design*) где  $\alpha$  има такву вредност да су све тачке подједнако удаљене од центра и израчунава се помоћу израза  $\alpha = k^{1/2}$  (за два фактора  $\alpha = 1,41$ ; за три фактора  $\alpha = 1,68$ , итд).

Број експеримената предвиђених експерименталним планом CCD одређен је бројем експеримената неопходних за сваки од три саставна дела овог дизајна, а може се представити једначином:

$$N = 2^k + 2k + \text{број понављања у централној тачки} \quad (24)$$

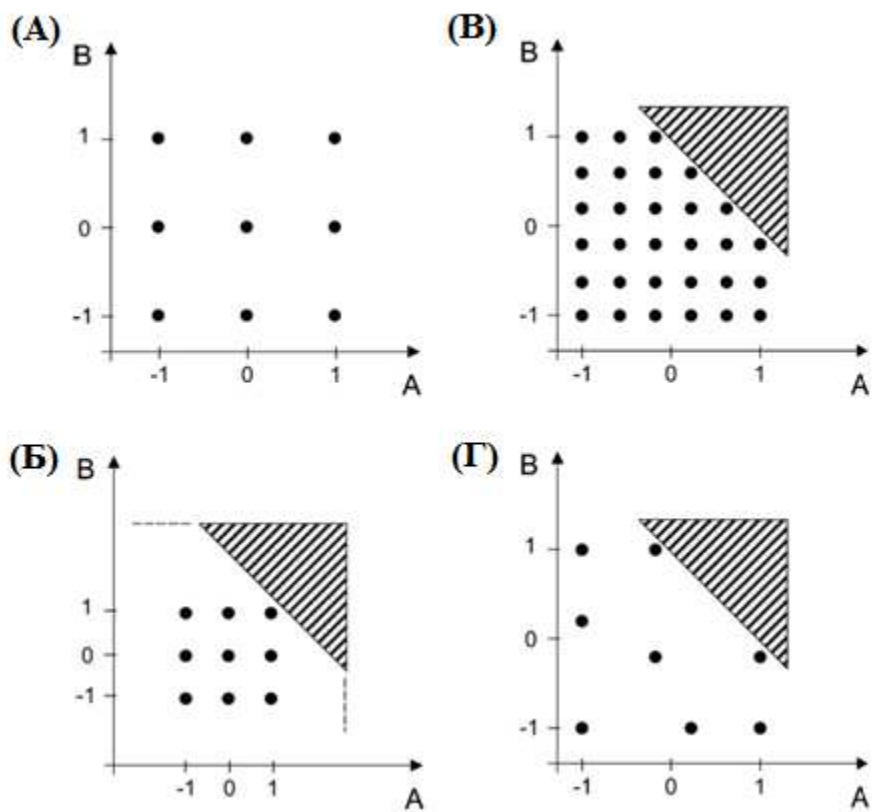
где је  $N$  укупан број експеримената, а  $k$  број фактора који се разматра. Члан  $2^k$  представља број експеримената код пуног факторског дизајна, а  $2k$  број експеримената „звезда“ дизајна. Репликације у централној тачки се изводе у циљу процене експерименталне грешке, а број понављања у централној тачки је најчешће 4 или 5 експеримената. Матрица експеримената за испитивање три фактора ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) CCD-ом представљена је у табели 1.

**Табела 1.** Матрица експеримената CCD за три фактора ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ).

<i>№</i>	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	$+\alpha$	0	0
10	$-\alpha$	0	0
11	0	$+\alpha$	0
12	0	$-\alpha$	0
13	0	0	$+\alpha$
14	0	0	$-\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

D-оптимални дизајн се може сврстати и у скрининг дизајне и у дизајне површине одговора. Примењује се у случајевима када је експериментални домен асиметричан, када треба истовремено проценити утицај и квалитативних и квантитативних фактора, када се испитују квалитативни фактори на више од два нивоа, када треба укључити експерименте који су већ изведени, када број експеримената треба да буде редукован или када специјални регресиони модел треба да буде примењен за описивање зависности [48]. Алгоритам за конструисање D-оптималног дизајна подразумева дефинисање функције која описује везу између фактора,  $X$  и одговора система,  $Y$  у првом кораку. Након тога се генерише сет потенцијалних тачака кандидата на основу овог модела и на крају се из тог сета кандидата издвоји подсет који максимизује детерминанту  $X'X$  матрице (слика 6) [49].





**Слика 6.** (А)  $3^2$  пун факторски дизајн у симетричном експерименталном домену, (Б) трансформација  $3^2$  пун факторски дизајн у асиметрични експериментални домен, (В) потенцијалне тачке кандидати у асиметричном домену, (Г) одабране тачке за постављање 8 експримената према D-оптималном дизајну (●) (прилагођено из референце [49]).

#### 1.4.2.2. Моделовање квантитативног односа структуре и ретенционог понашања молекула

Моделовање квантитативног односа структуре и ретенционог понашања молекула (енг. *quantitative structure-retention relationships* – *QSRR*) је широко заступљено у хроматографским студијама. У основи овог моделовања је претпоставка да одређене структурне карактеристике молекула условљавају његово ретенционо понашање у хроматографским системима.

Први корак у конструисању *QSRR* модела је избор независно променљивих тј. молекулских дескриптора. Параметри који квантификују структурне карактеристике молекула означавају се као молекулски дескриптори и могу квантитативно представљати карактеристику дводимензионалне (2D) или тродимензионалне (3D) структуре молекула. Када се ради о 3D дескрипторима јавља се проблем постојања више конформера истог молекула у систему, као и проблем избора одговарајућег конформера. Ови проблеми се могу превазићи применом приступа развијеног од стране Оливеире и сарадника (*Oliveira et al.*) [50] који подразумева генерисање ансамбла конформера, израчунавање појединачних вредности дескриптора сваког конформера и множење са фактором који представља вероватноћу проналажења тог конформера у ансамблу, а израчунава се према следећој једначини:

$$p_i = \frac{e^{\frac{-\Delta E_i}{RT}}}{\sum_{i=1}^t e^{\frac{-\Delta E_i}{RT}}} \quad (25)$$

где је  $p$  вероватноћа проналажења једињења у конформацији  $i$  унутар сета свих конформера тог једињења  $t$ , на датој апсолутној температури  $T$ , а на основу разлике у енергији конформера  $i$  од глобалног минимума енергије  $\Delta E$ ;  $R$  је универзална гасна константа.

На крају се јединствена вредност дескриптора за молекулу добија сабирањем свих вредности дескриптора конформера помножених са одговарајућим фактором његове вероватноће налажења у ансамблу конформера.

Након израчунавања вредности молекулских дескриптора потребно је одабрати најзначајније дескрипторе. Од укупног броја молекулских дескриптора израчунатих помоћу одговарајућег софтвера, најпре се из даљег разматрања искључују дескриптори чије су све вредности нула или им недостају вредности за неке анализе, дескриптори који имају мали коефицијент варијације и статистички незначајни дескриптори. Након те селекције, разматрају се међусобно високо корелисани дескриптори и из те групе се бира дескриптор који има највећу корелацију са посматраним одговором система. Применом ових метода селекције, најчешће се добија одговарајући број дескриптора који могу ући у даље разматрање приликом развоја модела.

Избор методе за успостављање математичке зависности између параметара ретенционог понашања и одабраних дескриптора је следећи корак у развоју модела. У литератури је предложен велики број метода за *QSRR* моделовања у хроматографским системима, као што су метода линеарне регресије и вишеструке линеарне регресије, метода најмањих квадрата, вештачке неуронске мреже, генетски алгоритми, *support vector machine* алгоритми, али ниједна од њих се не може издвојити као универзална и оптимална метода, већ се избор мора направити у зависности од испитиваног система. Метода вишеструке линеарне регресије је једноставна за примену и добијају се модели који су погодни за интерпретацију, па ову методу треба примењивати кад год је могуће описати зависност у посматраном систему на статистички адекватан начин. Међутим, ова метода се може користити само када је број анализа већи од броја одабраних дескриптора и када дескриптори нису међусобно високо корелисани. У системима који не испуњавају ове захтеве неопходно је применити компликованије методе као што су методе машинског учења [51]. *Support vector machine* алгоритми су једна од метода машинског учења и примењују се за добијање прецизних и робусних модела који успешно описују зависности у сложеним системима чак и када независне променљиве нису монотоне и не могу се раздвојити линеарном функцијом [52].

Последњи корак у развоју *QSRR* модела је валидација модела. Иницијални сет података се на почетку креирања модела подели на тренинг ( $\approx 75\%$ ) и тест ( $\approx 25\%$ ) сет. Модел се развија помоћу података из тренинг сета, а у последњем кораку се изврши валидација модела применом података из тест сета у циљу процене предиктивних способности модела и могућности генерализације.

Велики број хроматографских студија осмишљен је тако да се аналити тестирају под различитим експерименталним условима, а услед тога хроматографски параметри се не добијају под идентичним експерименталним условима. Како је за добијање поузданог *QSRR* модела важно да подаци за генерисање модела буду добијени под истим експерименталним условима, развијен је нови приступ моделовања који као независно променљиве разматра и параметре хроматографског система и молекулске дескрипторе. Овај приступ је назван *мешовито моделовање* и успешно је демонстрирана његова примена у бројним студијама [53–56].

Први *QSRR* модели развијени у системима хаотропне хроматографије разматрали су дескриптор који представља укупно наелектрисање молекула као меру способности анализата да учествује у јонском спаривању [57–59]. Ови модели се могу користити за предвиђање разлике у ретенцији између јонизованих и нејонизованих анализата, али како само један члан описује све процесе јонских интеракција у овим системима, поставља се питање да ли је ове моделе могуће објаснити са физичког становишта. Даље су развијени *QSRR* модели за успостављање везе између ретенционих фактора различитих  $\beta$ -блокатора [24] и фенотиазина [60] са неколико дескриптора који описују хидрофобност молекула. Релативно добра корелација је успостављена за сет конгенеричких анализата чиме су потврђени експериментално добијени закључци да долази до пораста осетљивости анализата на хаотропне агенсе са порастом њихове хидрофобности. Разматрање хидрофобности анализата, као јединог дескриптора, често је довољно за предвиђање редоследа елуирања, али са циљем добијања бољег увида у специфичније структурне карактеристике молекула које доприносе ретенцији анализата развијен је нови *QSRR* модел. Модел супстанце за развијање модела биле су прамипексол и његових пет нечистоће, а овим моделом је

показано да поред хидрофобности анализата и распоред наелектрисања унутар молекула значајно доприноси ретенцији анализата у системима хаотропне хроматографије [15].

### 1.5. Моделовање облика пика

Примена математичких модела за описивање облика хроматографских пикова омогућава прикупљање информација које доприносе квалитету развоја хроматографских метода. Најчешћа примена математичких функција за описивање облика пика је раздвајање делимично коелуираних пикова [61]. Поред тога, ове математичке функције се примењују и за израчунавање хроматографских параметара као што су површина и ширина пика, нагиб, број теоријских платоа, али и за успостављање везе између промене хроматографских пикова са променама експерименталних услова [61–65]. Независно од примене математичког модела, предложена математичка функција мора на поуздан и тачан начин да предвиђа облик хроматографских пикова.

Симулација хроматограма са симетричним и не коелуираним пиковима може се поуздано извести применом Гаусовог модела полинома узимајући у обзир ретенционо време и висину максимума пика. Ипак, у реалним хроматографским системима, пикови су често асиметрични и међусобно преклопљени, па су развијени модели који представљају полиномске модификације Гаусовог модела и узимају у разматрање промену стандардне девијације са променом растојања од максимума пика [61–63, 65–68]. Торес-Лапасио и сарадници (*Torres-Lapasio et al.*) [66] су развили једноставан и прецизан полиномски модификован Гаусов модел за предвиђање профила асиметричних пикова у мицеларној течној хроматографији на основу експериментално добијених вредности за ефикасност и фактор асиметрије.

Поред ових модела, приступ праћење промене ширине узлазног и силазног дела пика на базној линији представља једноставан и веома погодан начин за предвиђање облика пика. Како ширина и асиметрија хроматографског пика

представљају параметре чија вредност директно зависи од ширине леве и десне половине пика, овим приступом се поред облика пика могу предвидети и карактеристике стационарних фаза и процењивати кинетика процеса који се на њима одигравају [65,69].

### 1.5.1. Полиномски-модификован Гаусов модел

Једначина којом се описује облик хроматографског пика применом полиномски-модификованог Гаусовог модела (енг. *polynomial-modified Gaussian model*- ПМГ) има следећи облик:

$$h(t) = H_0 e^{\left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t-t_r}{s_0+s_1(t-t_r)+s_2(t-t_r)^2+\dots} \right)^2 \right]} \quad (26)$$

где  $H_0$  представља висину врха пика,  $t_r$  је ретенционо време врха пика,  $s_0$  је коефицијент који одговара стандардној девијацији симетричног Гаусовог пика и описује централни регион пика, а коефицијенти  $s_1$  и  $s_2$  су чланови који квантификују дисторзију пика [66]. Коефицијент  $s_1$  зависи само од фактора асиметрије и велика вредност овог коефицијента указује на изражену асиметрију пика, док се негативне вредности овог коефицијента добијају код асиметричних пикова са великим нагибом узлазног дела пика. Коефицијент  $s_2$  и коефицијенти који стоје уз чланове већег степена коригују могуће девијације у циљу добијања бољег предвиђања облика пика. У једначини 26 стандардна девијација може бити представљена полиномском функцијом већег степена, али у највећем броју случајева линеарна функција стандардне девијације пружа задовољавајуће описивање облика хроматографског пика. Наведени разлози довели су до развоја једноставне и прецизне методе са линеарном функцијом стандардне девијације за симулацију хроматограма која омогућава поуздано предвиђање не само ретенционог понашања анализата већ и облика пика [66].

Овај приступ, предложен од стране Торес-Лапасиа и сарадника (*Torres-Lapasio et al.*), успешно је примењен за описивање асиметричних пикова у

мицеларној хроматографији и према овом приступу неопходни кораци за израчунавање параметара  $s_0$  и  $s_1$  у једначини 26 су следећи [66]:

- (1) Ретенциона времена пикова под одређеним хроматографским условима се предвиђају из одговарајућих ретенционих модела.
- (2) Ефикасност ( $N$ ) и фактор асиметрије ( $B/A$ ) се процењују интерполацијом на основу параметара добијених из експерименталних података за мобилне фазе које су по саставу најсличније мобилној фази за коју желимо да извршимо симулацију хроматограма.
- (3) Висина врха пика,  $H_0$  и ретенционо време врха пика,  $t_r$  читавају се са хроматограма, а вредности ширине пикова на 10% висине ( $W_{0,1}$ ), ширине узлазног дела пика ( $A$ ) и ширине силазног дела пика ( $B$ ) се израчунавају према једначинама 27–29:

$$W_{0,1} = A + B = \sqrt{\frac{41,7t_r^2}{N(1,25+B/A)}} \quad (27)$$

$$A = \frac{W_{0,1}}{1+B/A} \quad (28)$$

$$B = \frac{W_{0,1}}{1+\frac{1}{B/A}} \quad (29)$$

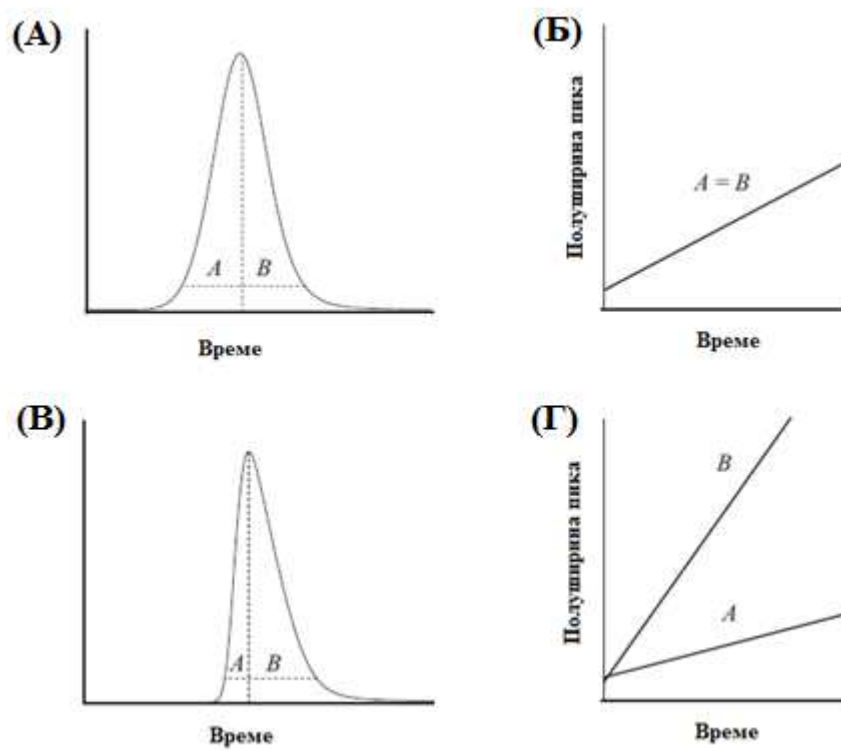
- (4) Коефицијенти  $s_0$  и  $s_1$  се израчунавају на основу једначина 30 и 31:

$$s_1 = 0,466 \frac{B/A-1}{B/A+1} \quad (30)$$

$$s_0 = 0,466B(1 - 2,146s_1) \quad (31)$$

### 1.5.2. Приступ праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика

Ширине узлазног и силазног дела пика представљају параметре помоћу којих се могу предвидети облик хроматографског пика и карактеристике стационарне фазе. График зависности узлазног и силазног дела пика од ретенционог времена назива се график полуширине пикова (енг. *half-width plot*) [65, 69].



**Слика 7.** Хроматографски сигнал код симетричних (А) и асиметричних (В) пикова и одговарајући графици полуширина за симетричне (Б) и асиметричне (Г) пикове. *A* представља ширину узлазног дела пика, а *B* ширину силазног дела пика (прилагођено из референце [65]).

Графичка зависност ширине пика, као и ширина његовог узлазног и силазног дела од ретенционог времена има облик параболе и за њено описивање би било најпогодније применити експоненцијалну функцију. Међутим, у широком опсегу ретенционих времена ова зависност се може апроксимирати правом линијом и



описати линеарном функцијом. Експериментално је показано да се добијају задовољавајући коефицијенти корелације ( $R > 0,99$ ) и вредности стандардне девијације ( $< 5\%$ ) за овакве линеарне моделе, као и одлично слагање између експерименталних и моделом предвиђених параметара [70]. Једначине линеарних модела за ширину узлазног и силазног дела пика имају следећи облик:

$$A = a_0 + a_1 t_r \quad (32)$$

$$B = b_0 + b_1 t_r \quad (33)$$

где је  $A$  ширина узлазног дела пика,  $B$  ширина силазног дела пика,  $t_r$  ретенционо време, а  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $b_0$  и  $b_1$  представљају константе које се израчунавају. Вредности  $A$  и  $B$  се одређују на 10% висине максимума пика зато што је на тим тачкама асиметрија пика јасно изражена, а сигнал није угрожен шумом базне линије [64]. Сабирањем једначина 32 и 33, добија се израз за ширину пика,  $w$ :

$$w = A + B = (a_0 + b_0) + (a_1 + b_1)t_r = (a_0 + b_0) + \frac{r_{PB}}{100} t_r \quad (34)$$

где  $r_{PB} = (a_1 + b_1) \cdot 100$  представља део ширења пика (у процентима, %) који је проузрокован факторима који потичу од стационарне фазе. Код пикова са задовољавајућом ретенцијом, члан  $(a_0 + b_0)$  у једначини 34 је занемарљив, па се може сматрати да укупно ширење ових пикова настаје као последица процеса на самој стационарној фази. Претпоставља се да су ужи пикови уједно и симетричнији, али се прецизно израчунавање фактора асиметрије пика,  $f_{asym}$  може добити применом следеће једначине:

$$f_{asym} = \frac{A}{B} = \frac{b_0 + b_1 t_r}{a_0 + a_1 t_r} \quad (35)$$

Параметри  $r_{PB}$  и  $f_{asym}$  у комбинацији са графицима полуширине пикова успешно се примењује за карактеризацију и поређење стационарних фаза на основу облика пика [65].

Предвиђање облика пика приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика такође се заснива на полиномски-модификованом Гаусовом моделу чији је општи облик представљен једначином 26. Два облика овог модела која се примењују код приступа праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика разматрају стандардну девијацију (једначина 36) или варијансу (једначина 37), али обе ове величине се мењају са променом растојања од максимума пика ( $t-t_r$ ):

$$h(t) = H_0 e^{\left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t-t_r}{s_0+s_1(t-t_r)} \right)^2 \right]} \quad (36)$$

$$h(t) = H_0 e^{\left[ -\frac{1}{2s_0^2 + a(t-t_r) + b(t-t_r)^2} \right]} \quad (37)$$

Вредности  $s_0$  и  $s_1$  у једначини 36 израчунавају се према следећим једначинама:

$$s_0 = 0,932 \frac{AB}{A+B} \quad (38)$$

$$s_1 = 0,466 \frac{B-A}{A+B} \quad (39)$$

Вредности  $a$  и  $b$  у једначини 37 израчунавају се према следећим једначинама:

$$a = \frac{B-A}{BA} S_0^2 \quad (40)$$

$$b = 0,217 - \frac{S_0^2}{BA} \quad (41)$$

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су:

1. Систематично испитивање утицаја концентрације хаотропног агенса натријум хексафлуорофосфата, садржаја ацетонитрила у мобилној фази и рН вредности мобилне фазе на ретенционо понашање структурно разноврсног сета анализата са базним функционалним групама у системима хаотропне хроматографије. Разматрање утицаја рН вредности мобилне фазе на адсорпцију хаотропног агенса и ацетонитрила на стационарну фазу. Развој квантитативног модела који узима у обзир структурне карактеристике анализата и параметре хроматографског система применом приступа мешовитог моделовања и *support vector machine* алгоритма. Идентификација структурних карактеристика анализата које условљавају ретенционо понашање анализата у системима хаотропне хроматографије.

2. Разграничавање утицаја јонске јачине и рН вредности мобилне фазе на ретенционо понашање анализата са базним функционалним групама у хроматографским системима са хаотропним агенсом. Разматрање утицаја јонске јачине на рН зависне промене у адсорпцији натријум хексафлуорофосфата и развоју потенцијала на површини стационарне фазе у системима хаотропне хроматографије. Проширеним термодинамичким моделом квантификовати утицај јонске јачине и рН вредности мобилне фазе на ретенционе процесе у испитиваним системима. Методом вишеструке линеарне регресије развити емпиријски модел са коефицијентима који имају јасно физичко значење и указују на процесе који условљавају хроматографско понашање у испитиваним системима.

3. Тестирање могућности полиномски-модификованог Гаусовог модела да опише и предвиди хроматографско понашање анализата у системима хаотропне хроматографије. Развој нове процедуре за израчунавање коефицијената модела која се заснива на комбинацији експерименталног дизајна, индиректног моделовања и полиномски-модификованог Гаусовог модела. Верификација предложене процедуре, на примеру модел смеше амлодипина и његове нечистоће А, поређењем

експериментално добијеног и симулираног хроматограма под експерименталним условима који су одабрани методом претраге чворова мреже.

4. Развој поступка за процену перформанси модификованих стационарних фаза у системима хаотропне хроматографије када се истовремено варирају и квалитативни и квантитативни фактори применом D-оптималног дизајна, индиректог моделовања и полиномски-модификованог Гаусовог модела. Испитивање погодности предложене процедуре, на модел смеси респеридона и његове три нечистоће, за предвиђање хроматографског понашања анализата када промена експерименталних услова доводи до измене у редоследу елуирања анализата. Применом графика полуширине пикова извршити додатну процену карактеристика модификованих стационарних фаза у присуству натријум перхлората и натријум трифлуороацетата као хаотропних агенаса.

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. Уређаји, реагенси и софтверски системи

##### Уређаји

- **Течни хроматограф:** *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*  
**Кватернерна пумпа:** *Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo Electron Corporation*  
**Аутосамплер:** *Finnigan Surveyor Autosampler Plus, Thermo Electron Corporation*  
**Детектор:** *Finnigan Surveyor UV/VIS Plus Detector, Thermo Scientific*  
**Софтвер за обраду података:** *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- **Течни хроматограф:** *Accela, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*  
**Кватернерна пумпа:** *Accela Pump, Thermo Electron Corporation*  
**Аутосамплер:** *Accela Autosampler, Thermo Electron Corporation*  
**Детектор:** *Accela PDA Detector, Thermo Scientific*  
**Софтвер за обраду података:** *Chrom Quest 5.0, Thermo Scientific*
- **Систем за филтрирање:** *Whatman 47 mm Glass/mesh мембрански носач и мембрански филтри 0,45  $\mu\text{m}$ , Whatman International Ltd., Енглеска*
- **Систем за добијање воде HPLC квалитета:** *Simplicity 185, Millipore, Немачка*
- **Аналитичка вага:** *Sartorius, Sartorius Werke GmbH, Немачка*
- **Ултразвучно купатило:** *Fungilab, Шпанија*
- **pH-метар са комбинованом електродом:** *Dolmen, Немачка*
- **Микропипета:** *LLG Labware 0,5 $\mu\text{L}$ –10 $\mu\text{L}$ , Meckenheim, Немачка*

Реагенси

- Ацетонитрил (ACN), *Fluka, Sigma – Aldrich, Steinheim*, Немачка
- Вода HPLC квалитета
- Калијум дихидрогенфосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), *Merck, Darmstadt*, Немачка
- Концентрирана хлороводонична киселина (*conc. HCl*), *Zorka Pharma*, Шабац, Србија
- Натријум хидроксид (NaOH), *Zorka Pharma*, Шабац, Србија
- Натријум хексафлуорофосфат ( $\text{NaPF}_6$ ), *Aldrich, St. Louis, MO*, САД
- Натријум хлорид (NaCl), *Zorka Pharma*, Шабац, Србија
- Натријум перхлорат ( $\text{NaClO}_4$ ), *Fluka, Steinheim*, Немачка
- Натријум трифлуороацетат ( $\text{CF}_3\text{COONa}$ ), *Aldrich, St. Louis, MO*, САД
- *Ormho*-фосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), *J. T. Baker, Deventer*, Холандија
- Перхлорна киселина ( $\text{HClO}_4$ ), *Riedel-de Haën AG, Seelze*, Немачка
- *Para*-толуенсулфонска киселина ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ ), *Acros Organics, Geel*, Белгија
- Трифлуоросирћетна киселина ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), *Riedel-de Haën AG, Seelze*, Немачка

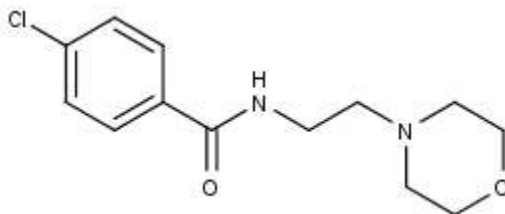
Софтверски системи

- MATLAB<sup>®</sup> 7.10.0, *Math Works*, САД
- Design-Expert<sup>®</sup> 7.0.0., *Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN*, САД
- STATISTICA, *StatSoft Inc, Tulsa, OK*, САД
- Microsoft Excel, *Microsoft*, САД
- RDKit: Open-source Chemoinformatics (2015.03.1, <http://www.rdkit.org/>)
- MOPAC 2012, *Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO*, САД
- PaDEL-Descriptor (<http://padel.nus.edu.sg/>)
- Marvin 15.1.19 (<http://www.chemaxon.com>)
- Python 2.7.9 (<https://www.python.org>)
- Scipy 0.15 (<https://www.scipy.org>)
- Scikit-learn 0.15 (<http://scikit-learn.org>)

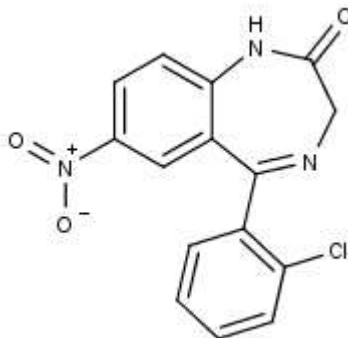
### 3.2. Испитивање утицаја најзначајнијих хроматографских параметара и молекулске структуре анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији

#### 3.2.1. Стандардне супстанце

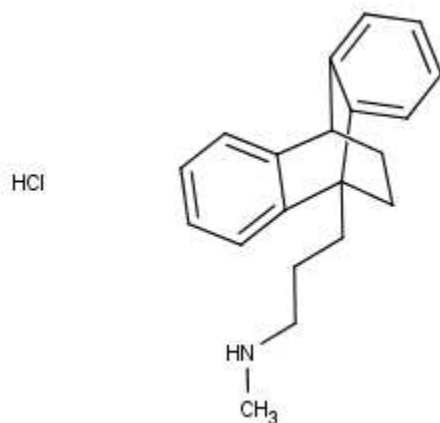
Ово испитивање је спроведено на радним стандардима следећих активних супстанци: моклобемид, клоназепам, мапротилин хидрохлорид, сулпирид, тиоридазин хидрохлорид, перазин дималонат, фенирамин малеат, хлорфенирамин малеат, дулоксетин хидрохлорид, амитриптилин хидрохлорид, флувоксамин малеат, кломипрамин хидрохлорид, деслоратадин, лоратадин, сертралин хидрохлорид, суматриптан сукцинат, елетриптан хидробромид, ризатриптан бензоат, лоразепам, карбамазепин, празепам, бромазепам, флуоксетин хидрохлорид, венлафаксин хидрохлорид, селегилин хидрохлорид, ламотригин, рисперидон, оланзапин, цинаризин, цетиризин, клозапин, трамадол и миансерин хидрохлорид. Структурне формуле испитиваних супстанци приказане су на слици 8.



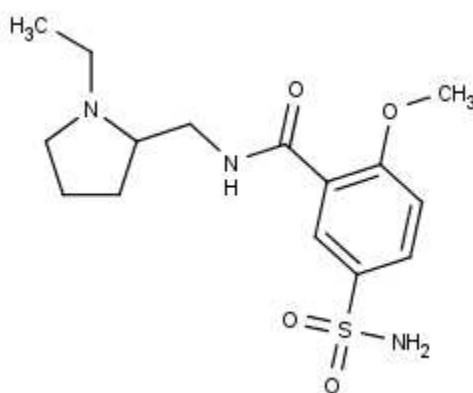
**Моклобемид** (4-хлоро-N-[2-морфолин-4-ил]етил]бензамид)



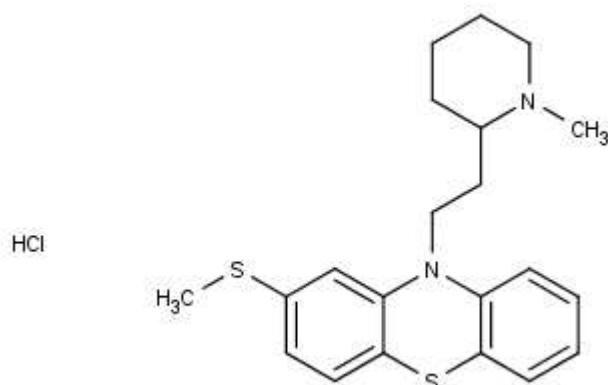
**Клоназепам** (5-(2-хлорофенил)-7-нитро-2,3-дихидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он)



**Мапротилин хидрохлорид** (метил(3-{тетрацикло[6.6.2.0<sup>2,7</sup>.0<sup>9,14</sup>]хексадека-2,4,6,9,11,13-хексен-1-ил}пропил)амин-хидрохлорид)

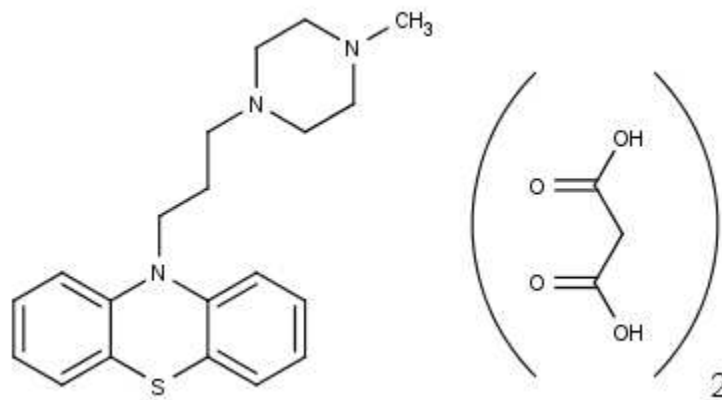


**Сулпирид** (N-[(1-етилпиролидин-2-ил)метил]-2-метокси-5-сулфамоилбензамид)

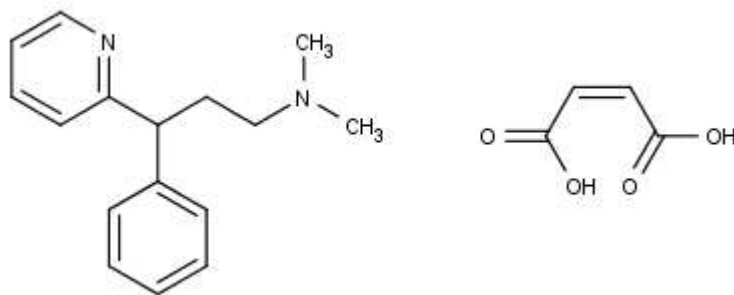


**Тиоридазин хидрохлорид** (10-[2-(1-метилпиперидин-2-ил)етил]-2-(метилсулфанил)-10Н-фенотиазин-хидрихлорид)

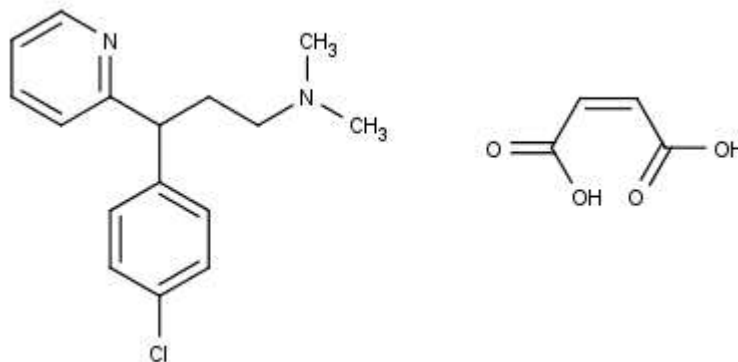




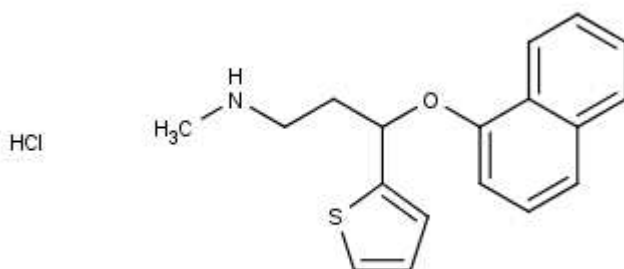
**Перазин дималонат** (10-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропил]-10Н-фенотиазин-дималонат)



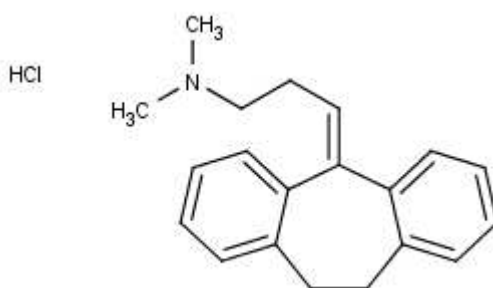
**Фенирамин малеат** (диметил[3-фенил-3-(пиридин-2-ил)пропил]амин-малеат) и енантиомер



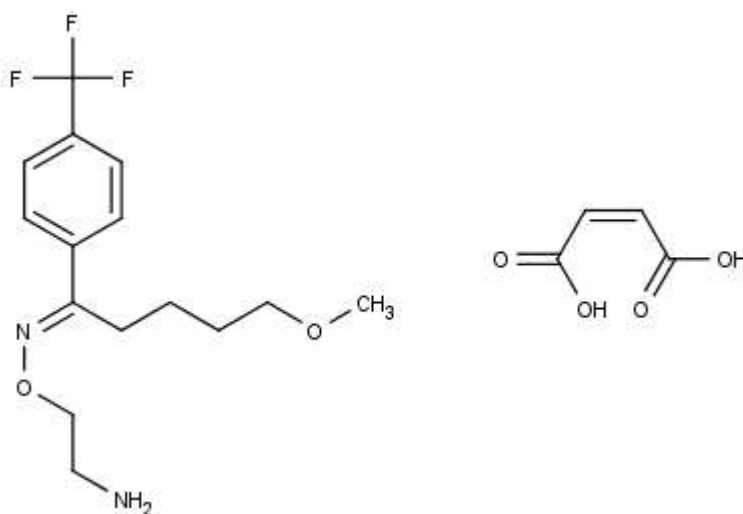
**Хлорфенирамнин малеат** ([3-(4-хлорфенил)-3-(пиридин-2-ил)пропил]диметиламин; (2Z)-бут-2-ендиоат) и енантиомер



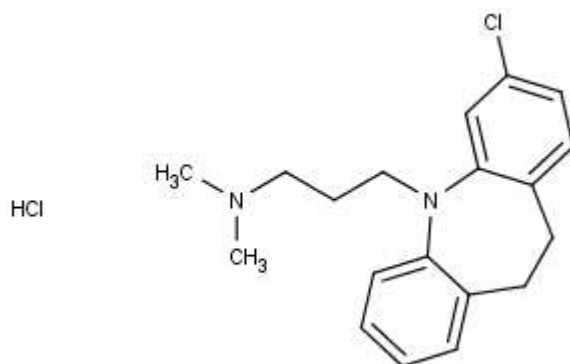
**Дулоксетин хидрохлорид** (метил[3-(нафтаген-1-илокси)-3-(тиофен-2-ил)пропил]амин-хидрохлорид) и енантиомер



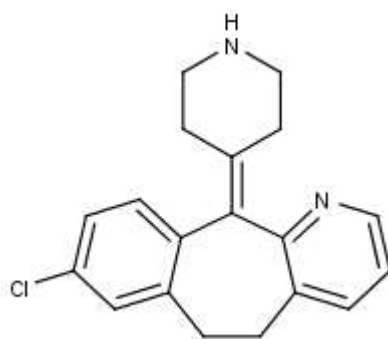
**Амитриптилин хидрохлорид** (диметил({3-[(2Z)-трицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,11,13-хексен-2-илидиен]пропил})амин-хидрохлорид)



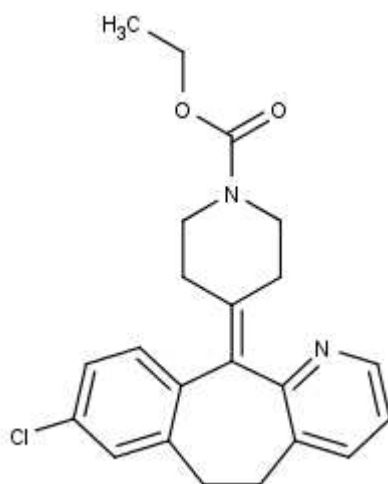
**Флувоксамин малеат** ((E)-(2-аминоетокси)({5-метокси-1-[4-(трифлуорометил)фенил]пентилдиен})амин-малеат)



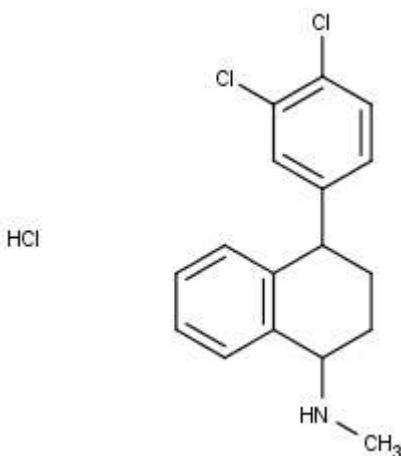
**Кломипрамин хидрохлорид** (3-{5-хлоро-2-азатрицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,11,13-хексен-2-ил}пропил)диметиламин-хидрохлорид)



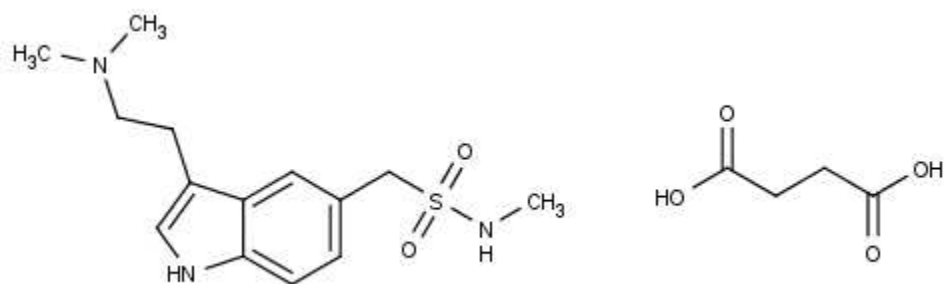
**Деслоратадин** (13-хлоро-2-(пиперидин-4-илдиене)-4-азатрицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,11,13-хексен)



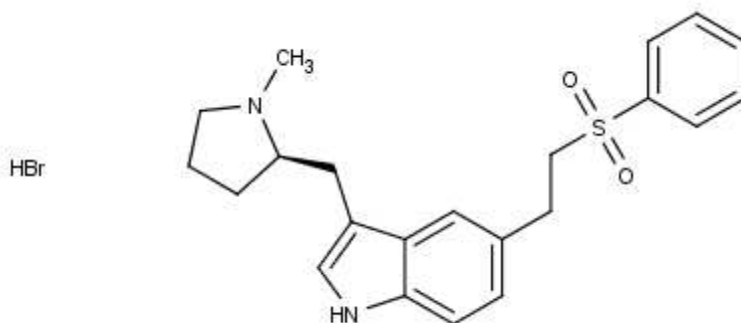
**Лоратадин** (етил 4-{13-хлоро-4-азатрицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,11,13-хексен-2-илдиен}пиперидин-1-карбоксилат)



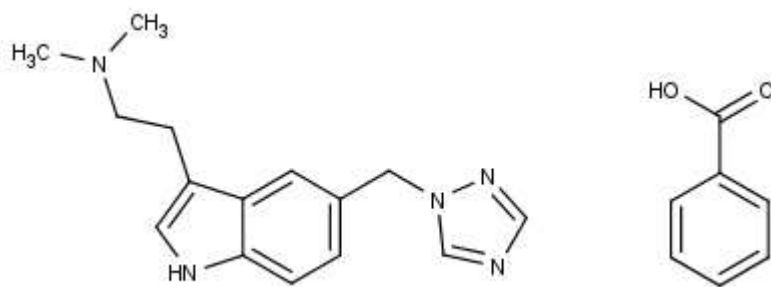
**Сертралин хидрохлорид** (4-(3,4-дихлорофенил)-N-метил-1,2,3,4-тетрахидронафтаген-1-амин-хидрохлорид)



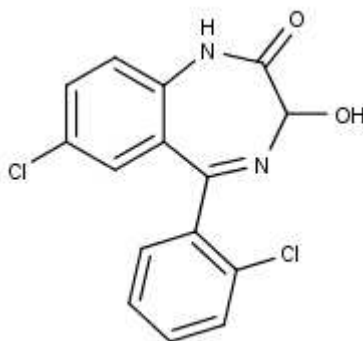
**Суматриптан сукцинат** (1-[3-[2-(диметиламино)етил]-1H-индол-5-ил]-N-метилметансулфонамид-сукцинат)



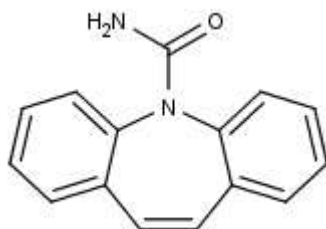
**Елетриптан хидробромид** (5-[2-(бензенсулфонил)етил]-3-[[2R]-1-метилпиролидин-2-ил]метил]-1H-индол-хидробромид)



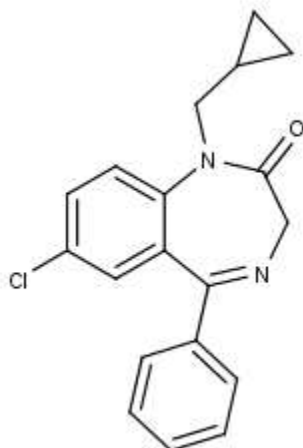
**Ризатрипан бензоат** (диметил(2-{5-[(1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил]-1H-индол-3-ил}етил)амин-бензоат)



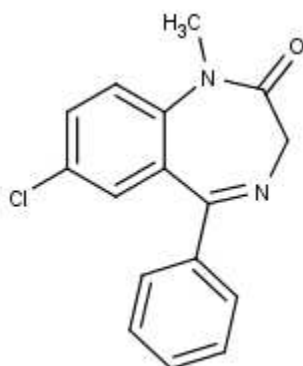
**Лоразепам** (7-хлоро-5-(2-хлорофенил)-3-хидрокси-2,3-дихидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он) и енантиомер



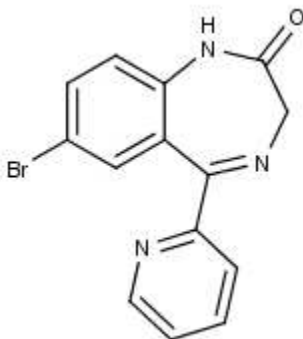
**Карбамазепин** (2-азатрицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,9,11,13-хептен-2-карбоксамид)



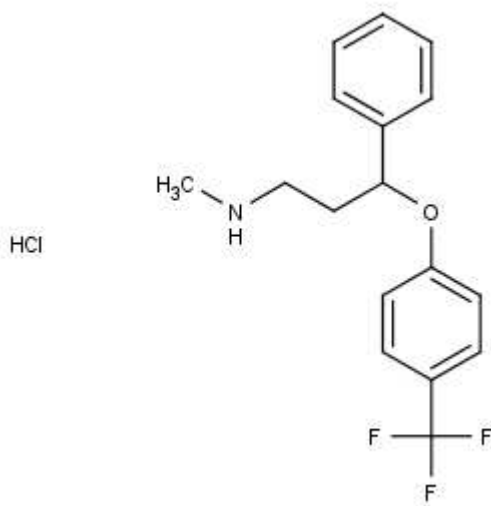
**Празепам** (7-хлоро-1-(циклопропилметил)-5-фенил-2,3-дихидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он)



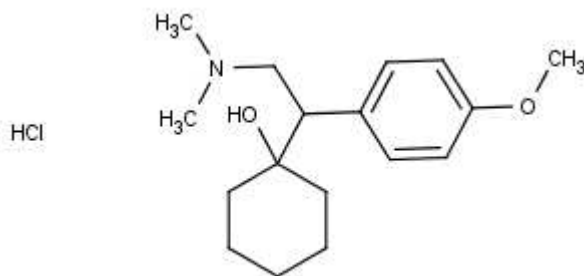
**Диазепам** (7-хлоро-1-метил-5-фенил-2,3-дихидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он)



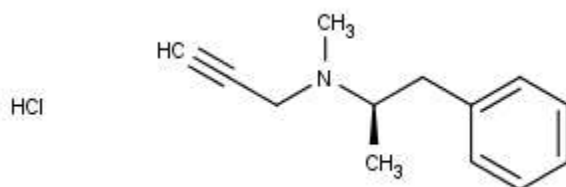
**Бромазепам** (7-бромо-5-(пиридин-2-ил)-2,3-дихидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он)



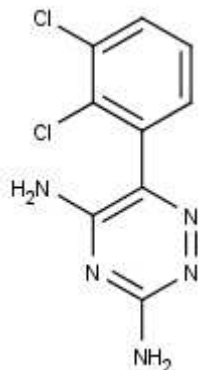
**Флуоксетин хидрохлорид** (метил({3-фенил-3-[4-(трифлуорометил)фенокси]пропил})амин-хидрохлорид и енантиомер



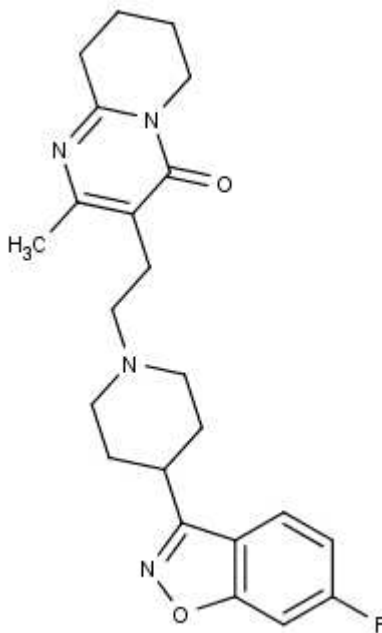
**Венлафаксин хидрохлорид** (1-[2-(диметиламино)-1-(4-метоксифрил)етил]циклохексан-1-ол хидрохлорид) и енантиомер



**Селегилин хидрохлорид** (метил[(2R)-1-фенилпропан-2-ил](проп-2-ин-1-ил)амин-хидрохлорид)

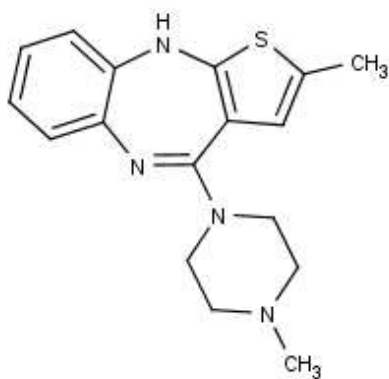


**Ламоотригин** (6-(2,3-дихлорофенил)-1,2,4-триазин-3,5-диамин)

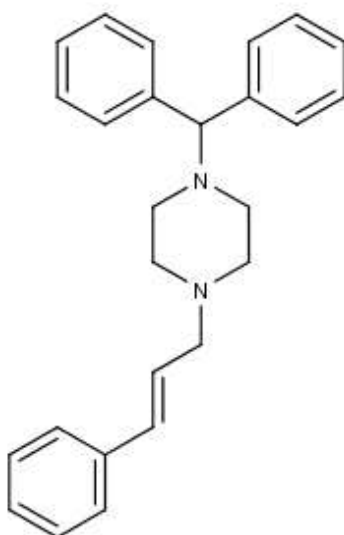


**Рисперидон** (3-{2-[4-(6-флуоро-1,2-бензоксазол-3-ил)пиперидин-1-ил]етил}-2-метил-4Н,6Н,7Н,8Н,9Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он)

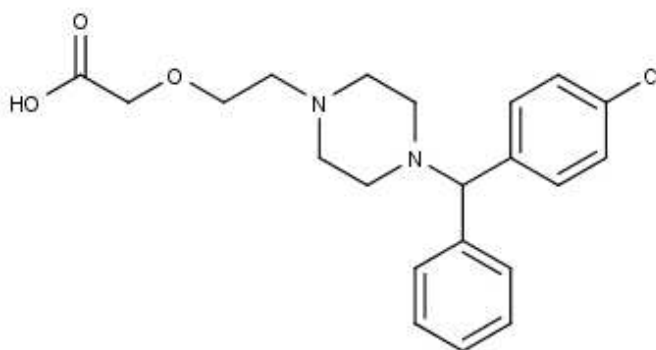




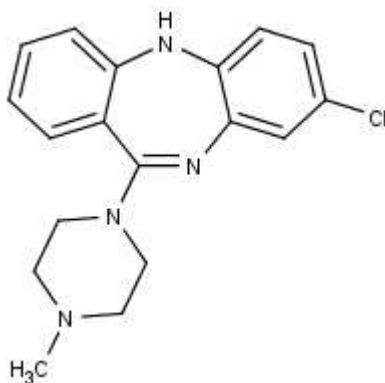
**Оланзапин** (5-метил-8-(4-метилпиперазин-1-ил)-4-тиа-2,9-  
 диазатрицикло[8.4.0.0<sup>3,7</sup>]тетрадека-1(14),3(7),5,8,10,12-хексен)



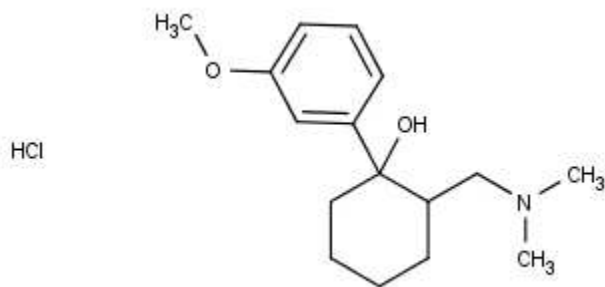
**Цинаризин** (1-(дифенилметил)-4-[(2Е)-3-фенилпроп-2-ен-1-ил]пиперазин)



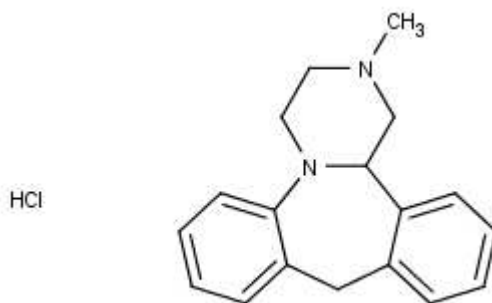
**Цетиризин** (2-(2-{4-[(4-хлорофенил)(фенил)метил]пиперазин-1-ил}етокси)ацетатна  
 киселина)



**Клозапин** (6-хлоро-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-2,9-  
дизатрицикло[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]пентадека-1(15),3,5,7,9,11,13-хептен)



**Трамадол хидрохлорид** (2-[(диметиламило)метил]-1-(3-  
метоксифенил)циклоохексан-1-ол хидрохлорид) и енантиомер



**Миансерин хидрохлорид** (5-метил-2,5-дизатетрацикло[13.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>8,13</sup>]нонадека-  
1(19),8,10,12,15,17-хексен хидрохлорид)

**Слика 8.** Структурне формуле испитиваних супстанци [71].

### ***3.2.2. Испитивање ретенционог понашања анализата, одређивање укупне површине стационарне фазе и одређивање адсорпционих изотерми ацетонитрила***

Сви експерименти изведени су под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутосамплером и UV/VIS детектором: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*
- Софтвер за обраду података: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- Колона: *Luna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) -Phenomenex, CA, САД*
- Температура колоне: 30°C
- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Волумен инјектовања: 5 μL

#### *3.2.2.1. Припрема радних раствора испитиваних супстанци за испитивање ретенционог понашања*

Припремљени су радни раствори испитиваних супстанци у концентрацији 1 mg/mL растварањем одговарајућих количина радних стандарда у смеси ацетонитрил-вода (50:50, V/V). Радни раствор цинаризина у концентрацији 1 mg/mL припремљен је растварањем одговарајуће количине стандардне супстанце у чистом ацетонитрилу. Тако припремљени раствори су даље разблажени истом смешом ацетонитрил-вода до концентрације 100 μg/mL.

#### *3.2.2.2. Припрема мобилних фаза за испитивање ретенционог понашања*

Припремљено је 36 мобилних фаза које су се састојале од различитог односа ацетонитрила и водене фазе (35:65; 37,5:62,5; 40:60, V/V) у циљу испитивања ретенционог понашања анализата наведених у поглављу 3.2.1. Водена фаза је припремана растварањем различитих количина NaPF<sub>6</sub> у води тако да су добијани раствори различитих концентрација – 1 mM, 4 mM, 7 mM и 10 mM, а потом је

подешавана рН вредност водене фазе на 2,00; 3,00 или 4,00 додатком *conc.* HCl или 10 M NaOH.

Сви експерименти изведени су изократским елуирањем, а одговори система су снимани на таласној дужини детекције од 220 nm.

### 3.2.2.3. Одређивање површине стационарне фазе

Укупна површина стационарне фазе одређена је поступком фронталне анализе са две пумпе према програму градијента приказаном у табели 2. Састав мобилне фазе А био је метанол–1 mM *para*-толуенсулфонат у фосфатном пуферу (5:95, V/V), а мобилне фазе Б метанол–фосфатни пуфер (5:95, V/V). рН вредност мобилних фаза подешена је на 3,00 помоћу *ortho*-фосфорне киселине, а јонска јачина мобилних фаза била је 100 mM.

**Табела 2.** Програм градијента за одређивање површине стационарне фазе и адсорпционих изотерми NaPF<sub>6</sub> поступком фронталне анализе.

<i>Време (min)</i>	<i>Мобилна фаза А (%)</i>	<i>Мобилна фаза Б (%)</i>
0,01–20,00	0	100
20,01–40,00	5	95
40,01–60,00	10	90
60,01–80,00	20	80
80,01–100,00	40	60
100,01–120,00	60	40
120,01–140,00	80	20
140,01–160,00	100	0

Адсорбована количина *para*-толуенсулфоната, *LH* ( $\mu\text{mol}$ ) одређена је помоћу ретенционог времена пробојних криви. Ретенциона времена пробојних кривих коригована су за време кашњења система које је последица мртве запремине система и добија се читавањем ретенционог времена пробојне криве када се колона замени тзв. беззапреминском јединицом. За израчунавање *LH* примењује се једначина 42:

$$LH = v \cdot (t_r - t_0) \cdot [H] \quad (42)$$

где је  $t_r$  ретенционо време пробојне криве кориговано за време кашњења система,  $t_0$  ретенционо време пика мобилне фазе,  $[H]$  концентрација *para*-толуенсулфоната у елуенту (mM), а  $v$  брзина протока мобилне фазе (mL/min).

Цеки (*Cecchi*) је предложила једначину за израчунавање површине стационарне фазе [72]:

$$[H] = \frac{LH}{K_{LH}(L_T - LH)} \left( \frac{LH \cdot f}{A} + \left( \left( \frac{LH \cdot f}{A} \right)^2 + 1 \right)^{0.5} \right)^{2|z_H|} \quad (43)$$

где је  $A$  површина стационарне фазе доступна за хроматографске интеракције (m<sup>2</sup>),  $L$  укупан број слободних места лиганда (капацитет монослоја колоне,  $\mu\text{mol}$ ), а  $K_{LH}$  је константа термодинамичке равнотеже адсорпције  $H$  на слободно место лиганда на стационарној фази. Константа  $f$  (m<sup>2</sup>/mol) се израчунава према једначини 44 на основу експерименталних услова [72]:

$$f = \frac{|z_H|F}{(8\epsilon_0\epsilon_rRT\sum_i c_{0i})^{0.5}} \quad (44)$$

где је  $R$  универзална гасна константа,  $F$  је Фарадејева константа,  $T$  је апсолутна температура,  $\epsilon_0$  је електрична пермитивност вакуума,  $\epsilon_r$  је диелектрична константа мобилне фазе а  $\sum_i c_{0i}$  је концентрација моноелектрисаних јона у мобилној фази (mM).

Фитовања за одређивање површине колоне су урађена помоћу софтвера *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0.

### 3.2.2.4. Одређивање адсорпционих изотерми ацетонитрила

Метода најмање пертурбације базне линије (енг. *minor disturbance method*) примењена је за одређивање адсорпције ацетонитрила из воде чија је рН вредност подешена додатком *conc.* HCl на 2,00; 3,00 или 4,00. Хроматограми су снимани на две таласне дужине 195 nm и 205 nm. Колона је еквилибрисана са по 30 mL мобилне фазе чији се удео (%) ацетонитрила повећавао на сваких 30 минута и то на следећи начин: 5, 10, 20, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 V/V. Пертурбација базне линије је процењивана инјектовањем чистог ацетонитрила у трипликату. Додатно адсорбована количина ацетонитрила у свакој тачки изотерме,  $\Gamma$  (mol/m<sup>2</sup>) израчуната је према једначини 45 [73]:

$$\Gamma(C) = \frac{1}{S} \int_0^C (V_R(C) - V_M) dC \quad (45)$$

где је  $V_R$  ретенциона запремина појаве пика пертурбације базне линије,  $V_M$  је термодинамички мртва запремина колоне,  $S$  је укупна површина стационарне фазе.  $V_M$  се израчунава према једначини 46 [74]:

$$V_M = \frac{1}{C_{max}} \int_{c=0}^{c_{max}} V_R(c) dc \quad (46)$$

где је  $C$  концентрација ацетонитрила (mol/L).

### 3.2.3. Одређивање адсорпционих изотерми NaPF<sub>6</sub>

Експерименти за одређивање адсорпционих изотерми NaPF<sub>6</sub> изведени су под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутосамплером и PDA детектором: Accela, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД
- Софтвер за обраду података: Chrom Quest 5.0, Thermo Scientific
- Колона: Luna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Phenomenex, CA, САД
- Температура колоне: 30°C

- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Таласна дужина детекције: 215 nm
- Волумен инјектовања: 5  $\mu$ L

У циљу одређивања 9 адсорпционих изотерми NaPF<sub>6</sub> примењен је поступак фронталне анализе према градијентном програму приказаном у табели 2. Мобилна фаза А састојала се од ацетонитрила и 100 mM воденог раствора NaPF<sub>6</sub> (35:65; 37,5:62,5 или 40:60, V/V). Мобилна фаза Б састојала се од ацетонитрила и воде (35:65; 37,5:62,5 или 40:60, V/V). рН вредност водених фаза обе мобилне фазе подешавана је на 2,00; 3,00 или 4,00 додатком *conc.* HCl или 10 M NaOH.

Количина хаотропне соли адсорбоване на стационарну фазу  $LH$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) израчуната је из једначине 47:

$$[LH] = v(t_r - t_0)[H]/A \quad (47)$$

где је  $t_r$  ретенционо време пробојне криве кориговано за време кашњења система,  $t_0$  ретенционо време пика мобилне фазе,  $[H]$  концентрација NaPF<sub>6</sub> у елуенту (mM),  $v$  брзина протока мобилне фазе (mL/min), а  $A$  претходно израчуната површина стационарне фазе.

#### **3.2.4. Израчунавање молекулских дескриптора, развој и валидација QSRR модела**

##### **3.2.4.1. Израчунавања дескриптора**

На основу  $pK_a$  вредности израчунатих коришћењем *Calculator Plugin* додатка за софтвер *Marvin 15.1.19* [71] утврђено је доминантно јонизационо стање анализата при испитиваној рН вредности. При свим испитиваним рН вредностима моклобемид, мапротилин хидрохлорид, сулпирид, тиоридазин хидрохлорид, дулоксетин хидрохлорид, амитриптилин хидрохлорид, кломипрамин хидрохлорид, лоратадин, сертралин хидрохлорид, суматриптан сукцинат, елетриптан хидробромид,

флуоксетин хидрохлорид, венлафаксин хидрохлорид, селегилин хидрохлорид, ламотригин, рисперидон, трамадол и миансерин хидрохлорид су присутни у форми 100% монокајона. Насупрот њима су лоразепам и карбамазепин који у опсегу рН вредности од 2,00 до 4,00 нису били јонизовани. Код молекула чије се доминантно јонизационо стање разликује при испитиваним рН вредностима (табела 3), одговарајуће форме анализата су моделоване појединачно.



**Табела 3.** Процентуална заступљеност јонизационих стања анализата чије се јонизационо стање мења при испитиваним рН вредностима [71].

<i>Назив анализата</i>	<i>Јонизационо стање анализата</i>		
	<i>рН 2,00*</i>	<i>рН 3,00*</i>	<i>рН 4,00*</i>
<i>Клоназепам</i>	50% монокатјон; 50% молекулски облик	7% монокатјон; 93% молекулски облик	100% монокатјон
<i>Перазин дималонат</i>	87% дикатјон; 13% монокатјон	39,3% дикатјон; 60,7% монокатјон	6% дикатјон; 94% монокатјон
<i>Фенирамин Малеат</i>	100% дикатјон	79% дикатјон; 21% монокатјон	27% дикатјон; 73% монокатјон
<i>Хлорфенирамин малеат</i>	100% дикатјон	78,4% дикатјон; 21,6% монокатјон	27% дикатјон; 73% монокатјон
<i>Флувоксамин малеат</i>	25% дикатјон; 75% монокатјон	3% дикатјон; 97% монокатјон	100% монокатјон
<i>Деслоратадин</i>	100% дикатјон	100% дикатјон	68% дикатјон; 32% монокатјон
<i>Ризатриптан бензоат</i>	64% дикатјон; 36% монокатјон	15% дикатјон; 85% монокатјон	1,7% дикатјон; 98,3% монокатјон
<i>Празепам</i>	92% монокатјон; 8% молекулски облик	54% монокатјон; 46% молекулски облик	10% монокатјон; 90% молекулски облик
<i>Диазепам</i>	90% монокатјон; 10% молекулски облик	46% монокатјон; 54% молекулски облик	8% монокатјон; 92% молекулски облик
<i>Бромазепам</i>	77,6% монокатјон; 22,4% молекулски облик	30% монокатјон; 70% молекулски облик	5% монокатјон; 95% молекулски облик
<i>Оланзапин</i>	100% дикатјон	91% дикатјон; 9% монокатјон	50% дикатјон; 50% монокатјон
<i>Цинаризин</i>	75% дикатјон; 25% монокатјон	26% дикатјон; 74% монокатјон	3% дикатјон; 97% монокатјон
<i>Цетиризин</i>	73% дикатјон; 26% монокатјон	30,2% монокатјон; 19,8% цвистерјон; 50% молекулски облик	25% монокатјон; 75% цвистерјон
<i>Клозапин</i>	100% дикатјон	90% дикатјон; 10% монокатјон	54% дикатјон; 46% монокатјон

\*рН вредност воденог дела мобилне фазе

Ансамбл конформера за сваки молекул генерисан је помоћу *RDKit* библиотеке [75] према поступку претходно описаном у литератури [76], а поступак минимизације енергије је спроведен у *MMFF94s* пољу сила, имплементираном у одговарајућем *RDKit* модулу [77]. Сваки првобитно добијен ансамбал конформера је редукован до сета репрезентативних конформера коришћењем *NMR-Clust* алгоритма [78] за који је показано да ефикасно редукује величину ансамбла конформера задржавајући при томе добру покривеност простора конформера [79]. Геометрија конформера је коначно оптимизована помоћу AM1 Хамијтонијан и *COSMO* модела имплицитног растварача у *MOPAC2012* [80]. Израчунавања неопходна за добијање *COSMO* модела извршена су на по 60 сегмената сваког атома и вредности диелектричних константи које одговарају вредностима у смеси ацетонитрила и воде. Диелектричне константе смеса ацетонитрил-вода (35:65; 37,5:62,5 односно 40:60, V/V) израчунате су из података датих у референци [81] и експериментално одређеног индекса рефракције за испитиване смеше ацетонитрил-вода. Добијене су следеће вредности диелектричних константи: 64,28 за 35:65, V/V; 63,14 за 37,5:62,5, V/V и 61,99 за 40:60, V/V.

Оптимизоване геометрије молекула коришћене су за рачунање молекулских дескриптора у *PaDEL-Descriptor* софтверском пакету [82]. Израчунавање 2D дескриптора је извршено за сваки молекул, док су 3D дескриптори израчунати за сваки конформер. У циљу добијања појединачних вредности 3D дескриптора за сваки молекул, примењен је поступак описан у референци [50]. Овај приступ подразумева множење појединачних вредности дескриптора сваког конформера са фактором који представља вероватноћу проналажења конформера у ансамблу. Фактор се израчунава помоћу Болцманове једначине и AM1 енергије конформера. На крају је јединствена вредност дескриптора за молекул добијена сабирањем свих вредности дескриптора конформера помножених са одговарајућим фактором.

### 3.2.4.2. Развој и валидација модела

Иницијално добијен број дескриптора је редукован искључивањем из даљег разматрања оних који испуњавају неки од следећих критеријума:

- дескриптори којима недостаје вредност или су све вредности нула;
- дескриптори са малим коефицијентом варијације (<5%);
- дескриптори који нису статистички значајни ( $R < 0,25$ ).

Након ове селекције, искључивани су из даљег разматрања дескриптори који су високо корелисани ( $R > 0,85$ ). Из сваке групе високо корелисаних дескриптора, задржан је само по један дескриптор који је показао највећу корелацију са зависно променљивом. Након извршене редукције, преостале вредности дескриптора су преведене у одговарајуће нормализоване вредности од 0 до 1.

Цео сет података је подељен у тренинг ( $\approx 75\%$ ,  $n = 938$ ) и тест ( $\approx 25\%$ ,  $n = 286$ ) сет коришћењем кластеризације методом  $k$ -средњих вредности која је имплементирана у *SciPy Python* библиотеци. Број кластера је подешен тако да одговара величини сета података. Након извршене кластеризације, тачка која је била најближа центру кластера смештана је у тест сет, док су остале тачке кластера смештане у тренинг сет.

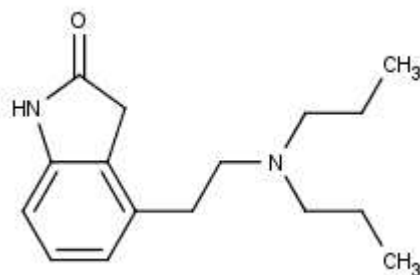
Модел за предвиђање вредности ретенционог фактора у систему хаотропне хроматографије развијен је укључивањем вредности молекулских дескриптора и три параметра хроматографског система: рН вредности воденог дела мобилне фазе, концентрације хаотропног агенса у мобилној фази и садржаја ацетонитрила у мобилној фази (све вредности су нормализоване и добиле су вредности од 0 до 1). Избор најбољих молекулских дескриптора за укључивање у предиктивни модел направљен је помоћу свеобухватног приступа испитивања свих могућих комбинација од 1 до 4 дескриптора са 3 параметра система. За сваку комбинацију параметара добијен је регресиони модел помоћу *support vector machine (SVR)* алгорита на основу података из тренинг сета. За успостављење модела коришћена је  $v$ -SVR

метода имплементирана у *libsvm* библиотеци, кроз одговарајуће функције *scikit-learn Python* пакета. У првим корацима, код свих *SVR* модела је коришћена функција радијалне основе (енг. *radial basis function – RBF*) кернела и фиксирани вредности хиперпараметара; *RBF* кернел коефицијент  $\gamma$  подешен је на 0,1; параметар  $C$  на 1,0 и  $\nu$  вредност на 0,5. Најбоља комбинација одабрана је унакрсном валидацијом (енг. *cross-validation*) на основу вредности корена квадрата средње вредности грешке (енг. *root mean squared error – RMSE*). У циљу оптимизације перформанси одабраног модела, спроведена је метода претраге мреже како би се пронашли оптимални  $\nu$ -*SVR* параметри:  $C$  вредности су вариране у логаритамској скали од  $10^{-2}$  до  $10^4$ , а *RBF*  $\gamma$  вредност је изабрана из сета  $\{10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}, 10^{-0.5}, 1\}$ . Оптималан избор хиперпараметара је заснован на вредности *RMSE* у унакрсној валидацији и укључене су вредности  $C = 10^3$ ,  $\gamma = 0,5$  и  $\nu = 0,5$ . Коначан модел је валидиран коришћењем података из тест сета.

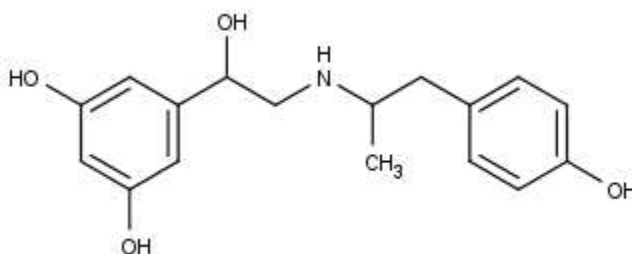
### **3.3. Разграничавање утицаја јонске јачине, рН вредности мобилне фазе и структурних карактеристика анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији**

#### **3.3.1. Стандардне супстанце**

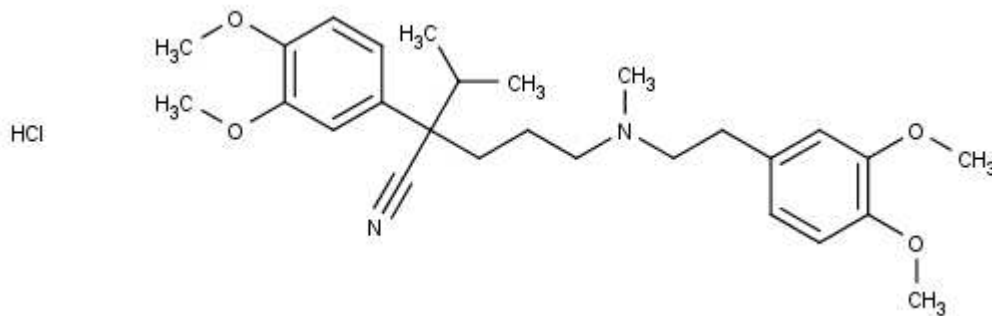
Испитивање је спроведено на радним стандардима следећих активних супстанци: мапротилин хидрохлорид, тиоридазин хидрохлорид, дулоксетин хидрохлорид, амитриптилин хидрохлорид, кломипрамин хидрохлорид, флуоксетин хидрохлорид, венлафаксин хидрохлорид, селегилин хидрохлорид, трамадол, миансерин хидрохлорид, ропинирол, фенотерол и верапамил хидрохлорид. Структурне формуле испитиваних супстанци приказане су на сликама 8 и 9.



**Ропиринол** (4-[2-(дипропиламино)етил]-2,3-дихидро-1Н-индол-2-он)



**Фенотерол** (5-(1-хидрокси-2-{[1-(4-хидроксифенил)пропан-2-ил]амино}етил)бензен-1,3-диол) и енантиомер



**Верапамил хидрохлорид** (2-(3,4-диметоксифенил)-5-{{2-(3,4-диметоксифенил)етил}(метил)амино}-2-(пропан-2-ил)пентан-нитрил хидрохлорид) и енантиомер

**Слика 9.** Структурне формуле испитиваних супстанци [71].

### 3.3.2. Хроматографски услови за испитивање ретенционог понашања анализата

Експерименти су изведени под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутосамплером и UV/VIS детектором: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*
- Софтвер за обраду података: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- Колона: *Luna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Phenomenex, CA, САД*
- Температура колоне: 30°C
- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Волумен инјектовања: 5 μL
- Таласна дужина детекције: 220 nm

Припремљени су радни раствори испитиваних супстанци у концентрацији 1 mg/mL растварањем одговарајућих количина радних стандарда у смеси ацетонитрил-вода (50:50, V/V). Тако припремљени раствори су даље разблажени истом смешом ацетонитрила и воде до концентрације 100 μg/mL.

За потребе овог испитивања спроведена су два сета експеримената:

- У првом сету експеримената припремљена је 21 мобилна фаза (табела 4) састава ацетонитрил-водена фаза (40:60, V/V). Водена фаза је представљала водени раствор NaPF<sub>6</sub> концентрације 1 mM, 4 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM и 50 mM. pH вредност мобилне фазе подешавана је на 2,00; 3,00 или 4,00 додатком *conc.* HCl или 10 M NaOH узимајући у обзир параметар конверзије,  $\delta$  [83]. Параметар конверзије,  $\delta$  омогућава израчунавање pH вредности смеше ацетонитрила и воде која би била измерена електродом калибрисаном у истој таквој смеси ( $^s$ pH скала) на основу pH вредности смеше ацетонитрила и воде измерене електродом која је калибрисана у воденим растворима пуфера ( $^w$ pH скала). С

обзиром да је коришћен рН-метар чија је електрода напуњена 3 М КСI и калибрисана воденим растворима пуфера, било је неопходно уврстити параметар  $\delta$  у циљу добијања тачних рН вредности мобилних фаза. Вредност параметра  $\delta$  за испитиване експерименталне услове (40% ацетонитрила и амбијентална температура 25°C) износи -0,175 [83].

- У другом сету експеримената припремљена је такође 21 мобилна фаза (табела 4). Начин припреме мобилних фаза био је исти као и у првом сету експеримената, само је након подешавања рН вредности мобилне фазе накнадно подешавана и јонска јачина додатком NaCl. Укупна јонска јачина свих мобилних фаза била је 110 mM и представљала је збир јонских јачина које потичу од хаотропне соли, од количине додатог агенса за подешавање рН вредности и количине додатог NaCl. У циљу одређивања тачне количине додатог агенса за подешавање рН вредности, *conс.* HCl или 10 М NaOH су додаване *LLG Labware* микропипетом чији је најмањи инкремент 0,5  $\mu$ L.

Табела 4. Припрема мобилних фаза за оба сета експеримената.

$[H]_{\text{водена фаза}}$ (mM)	$[H]_{\text{мобилна фаза}}$ (mM)	$pH_{\text{почетно}}$	$V$ сопс. HCl/10M NaOH	$pH_{\text{коначно}}^*$	NaCl (g)**
1	0,6	5,97	290 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,4901
			20,5 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,5852
			5 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,5901
4	2,4	4,46	300 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,4428
			22 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,5412
			2,5 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,5477
7	4,2	4,27	300 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,3989
			26 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,4956
			3 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,5038
10	6	4,19	360 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,334
			27 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,4515
			2 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,4603
15	9	4,11	380 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,2538
			31 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,377
			1,5 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,3874
20	12	3,99	380 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	1,1808
			30,5 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	1,3041
			1 $\mu\text{L}$ HCl	3,83	1,3145
50	30	3,73	380 $\mu\text{L}$ HCl	1,83	0,7424
			35 $\mu\text{L}$ HCl	2,83	0,8642
			1 $\mu\text{L}$ NaOH	3,83	0,8763

$[H]$  концентрација хаотропне соли

\* рН вредност мерена у смеси ацетонитрил-вода електродом калибрисаном у воденом раствору пуфера ( $^w_p\text{H}$  скала); параметар конверзије на температури од 25°C и при садржају ацетонирила 40% V/V износи  $\delta = -0,175$  (табела 4 у референци [83]).

\*\* количина додавана само у другом сету експеримената у циљу подешавања јонске јачине мобилне фазе на 110 mM.



### 3.3.3. Хроматографски услови за одређивање адсорпционих изотерми $\text{NaPF}_6$

Експерименти за одређивање адсорпционих изотерми  $\text{NaPF}_6$  изведени су под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутоамплером и UV/VIS детектором: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*
- Софтвер за обраду података: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- Колона: *Luna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Phenomenex, CA, САД*
- Температура колоне: 30°C
- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Волумен инјектовања: 5 μL
- Таласна дужина детекције: 215 nm

У циљу одређивања адсорпционих изотерми  $\text{NaPF}_6$  примењен је поступак фронталне анализе према градијентном програму приказаном у табели 2. Мобилне фазе су припремане на следећи начин:

- За одређивање три адсорпционе изотерме које одговарају првом сету експеримената мобилне фазе А и Б су се састојале од смеше ацетонитрил-водена фаза (40:60, V/V). Водена фаза мобилне фазе А је била водени раствор 100 mM  $\text{NaPF}_6$ , а водена фаза мобилне фазе Б је била вода. рН вредност обе мобилне фазе подешавана је на 2,00; 3,00 или 4,00 додатком *conc.* HCl или 10M NaOH узимајући у обзир параметар конверзије  $\delta = -0,175$ .
- За одређивање адсорпционих изотерми које одговарају другом сету експеримената, мобилне фазе А и Б су припремане на идентичан начин као и за први сет експеримената, само је на крају подешавана јонска јачина обе мобилне фазе на 110 mM додатком одговарајуће количине NaCl.

Детаљи припреме мобилних фаза за оба сета експеримената приказани су у табели 5.

**Табела 5.** Припрема мобилних фаза А и Б за оба сета експеримената.

Мобилна фаза	$[H]_{\text{водена фаза}}$ (mM)	$[H]_{\text{мобилна фаза}}$ (mM)	$pH_{\text{почетно}}$	V conc. HCl/10M NaOH	$pH_{\text{коначно}}^*$	NaCl (g)**
А	100	60	3,6	74 $\mu$ L HCl	1,83	0,0323
				7 $\mu$ L HCl	2,83	0,056
				10 $\mu$ L NaOH	3,83	0,0555
В	0	0	6,04	448 $\mu$ L HCl	1,83	2,2788
				36 $\mu$ L HCl	2,83	2,6679
				4 $\mu$ L HCl	3,83	2,6792

$[H]$  – концентрација хаотропне соли

\* pH вредност мерена у смеси ацетонитрил-вода електродом калибрисаном у воденом раствору пуфера ( $^w_p$ pH скала); параметар конверзије на температури од 25°C и при садржају ацетонирила 40% V/V износи  $\delta = -0.175$  (табела 4 у референци [83]).

\*\* количина додавана само у другом сету експеримената у циљу подешавања јонске јачине мобилне фазе на 110 mM.

Концентрација хаотропне соли адсорбоване на стационарну фазу израчунава се на основу једначине 47 поступком описаним у поглављу 3.2.3.

### 3.3.4. Израчунавање молекулских дескриптора, развој и валидација QSRR модела

Најзаступљеније јонизационо стање анализата при испитиваној pH вредности одређено је помоћу *Calculator Plugin* додатка за софтвер *Marvin* 15.10.26 и сви анализи су 100% заступљени у облику монокатјона при испитиваним pH вредностима [84]. Ансамбл конформера за сваки молекул генерисан је помоћу *RDKit* библиотеке [75] према поступку претходно описаном у поглављу 3.2.4.1. Геометрија конформера је оптимизована помоћу AM1 семиемпиријске методе у *MOPAC2012* [80]. Коначно, конформери са највећим диполним моментом, израчунатим AM1

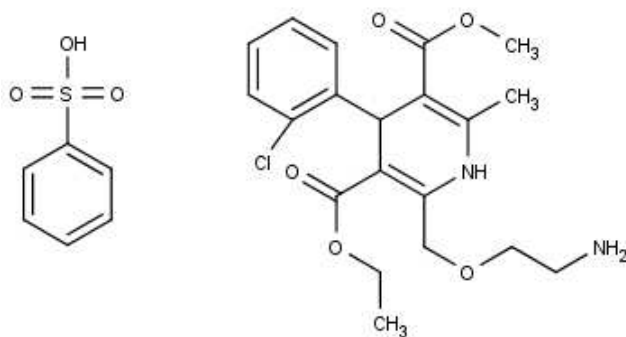
методом, одабрани су као репрезентативни и на основу њих су израчунати молекулски дескриптори у *PaDEL-Descriptor* софтверском пакету [82].

Оба сета података била су састављена од по 273 ретенциона фактора добијена за 13 анализа у 21 хроматографском систему. Сваки сет је подељен у тренинг ( $\approx 75\%$ ,  $n = 207$ ) и тест ( $\approx 25\%$ ,  $n = 66$ ) сет коришћењем кластеризације методом  $k$ -средњих вредности која је имплементирана у софтверу *STATISTICA*. Број кластера је подешен тако да одговара величини сета података. Након извршене кластеризације, тачке које су биле најближе центру кластера смештане су у тест сет, док су остале тачке кластера смештане у тренинг сет. Корелациона анализа, фитовање модела као и његово тестирање извршено је помоћу статистичких операција у софтверском пакету *STATISTICA*.

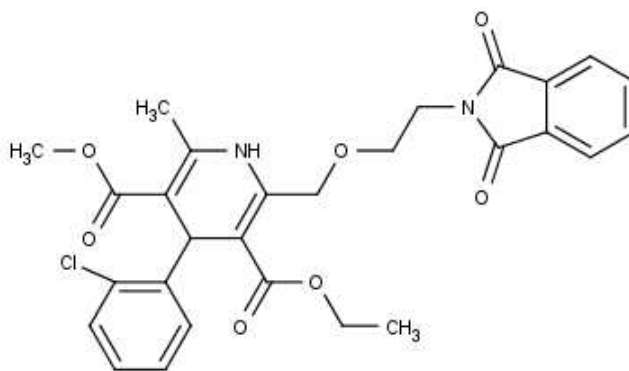
### 3.4. Тестирање способности полиномски-модификованог Гаусовог модела за описивање и симулацију хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће А у јон-интерекционој хроматографији

#### 3.4.1. Стандардне супстанце

Ово испитивање спроведено је на смеси радних стандарда амлодипин бесилата и његове нечистоће А. Структурне формуле испитиваних анализата приказане су на слици 10.



**Амлодипин бесилат** (3-етил 5-метил 2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорофенил)-6-метил-1,4-дихидропиридин-3,5-дикарбоксилат бесилат)



**Нечистоћа А** (3-етил 5-метил 4-(2-хлорофенил)-2-{[2-(1,3-диоксо-2,3-дихисро-1Н-изоиндол-2-ил)етокси]метил}-6-метил-1,4-дихидропиридин-3,5-дикарбоксилат)

**Слика 10.** Структурне формуле амлодипин бесилата и његове нечистоће А [71].

**3.4.2. Хроматографски услови за испитивање ретенционог понашања  
аналита у циљу добијања неопходних параметара за тестирање модела и  
симулацију хроматографских пикова**

Експерименти су изведени под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутосамплером и UV/VIS детектором: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*
- Софтвер за обраду података: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- Колона: *Zorbax Extend C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Agilent, CA, САД*
- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Волумен инјектовања: 5 μL
- Таласна дужина детекције: 280 nm
- Хаотропни агенс: перхлорна киселина (HClO<sub>4</sub>) – *Riedel-de Haën AG, Seelze, Немачка*
- pH вредност мобилне фазе: 2,20 подешено са 10 M NaOH

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената дефинисаном централним композиционим дизајном. План експеримената приказан је у табели 6.

**Табела 6.** План експеримената дефинисан централним композиционим експерименталним дизајном.

<i>№</i>	<i>Ацетонитрил (%)</i>	<i>Концентрација HClO<sub>4</sub> (mM)</i>	<i>Температура колоне (°C)</i>
1	32	25	20
2	42	25	20
3	32	75	20
4	42	75	20
5	32	25	40
6	42	25	40
7	32	75	40
8	42	75	40
9	32	50	30
10	42	50	30
11	37	25	30
12	37	75	30
13	37	50	20
14	37	50	40
15	37	50	30
16	37	50	30
17	37	50	30
18	37	50	30

Припремљени су радни раствори испитиваних супстанци растварањем одговарајућих количина радних стандарда у смеси ацетонитрил-вода (50:50, V/V) у циљу добијања концентрације раствора амлодипина 500 µg/mL, а раствора нечистоће А 100 µg/mL. Припремљени раствори су даље разблажени истом смешом ацетонитрила и воде тако да су добијени радни раствори концентрација 10 µg/mL амлодипина и 1 µg/mL нечистоће А.

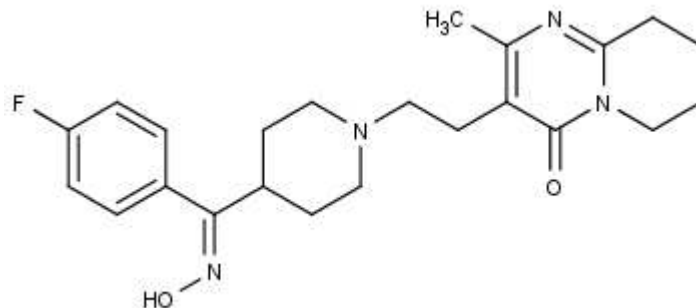
### 3.4.3. Софтвери за обраду података

За дефинисање експерименталног плана и одговарајућу анализу података коришћен је *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0. Метода претраге чворова мреже, индиректно моделовање, израчунавање  $W_{0,1}$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $B/A$ ,  $N$  и  $Tf$  параметара изведено је помоћу *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0 софтверског пакета.

### 3.5. Процена перформанси модификованих стационарних фаза праћењем утицаја квалитативних и квантитативних хроматографских параметара у хаотропној хроматографији на примеру рисперидона и његових нечистоћа

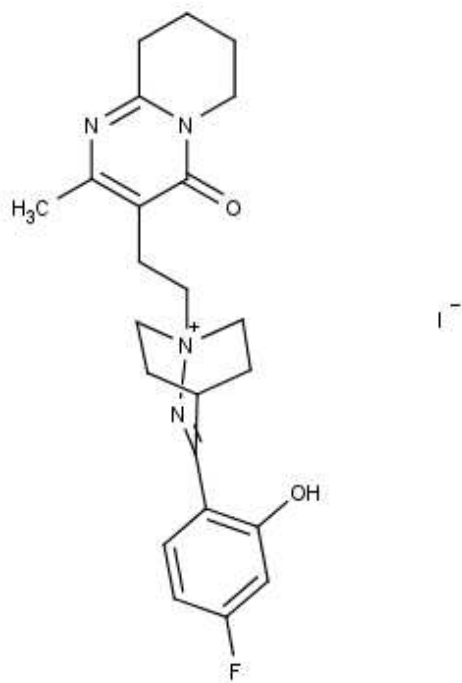
#### 3.5.1. Стандардне супстанце

Испитивање је спроведено на смеси радних стандарда риперидона и његових нечистоћа 1, 2 и 3. Структурна формула рисперидона је приказана на слици 8, а структурне формуле испитиваних нечистоћа су приказане на слици 11.

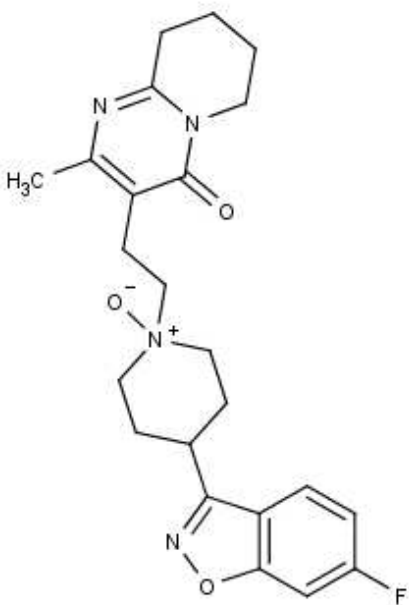


**Нечистоћа 1** (3-(2-{4-[(1Z)-(4-флуорофенил)(хидроксиимино)метил]пиперидин-1-ил}етил)-2-метил-4Н,6Н,7Н,8Н,9Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он)





**Нечистоћа 2** (3-(4-флуоро-2-хидроксифенил)-1-(2-{2-метил-4-оксо-4Н,6Н,7Н,8Н,9Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-ил}етил)-1,2-дизабицикло[2.2.2]окт-2-ен јодид)



**Нечистоћа 3** (4-(6-флуоро-1,2-бензоксазол-3-ил)-1-(2-{2-метил-4-оксо-4Н,6Н,7Н,8Н,9Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-ил}етил)пиперидин-1-ијум-1-олат)

**Слика 11.** Структурне формуле нечистоћа риперидона [71].

### 3.5.2. Хроматографски услови

Експерименти за испитивање хроматографског понашања респеридона и његове три нечистоће у циљу добијања неопходних параметара за тестирање модела и симулацију хроматографских пикова изведени су под следећим хроматографским условима:

- Течни хроматограф са кватернерном пумпом, аутосамплером и UV/VIS детектором: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, САД*
- Софтвер за обраду података: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- Колона: *Zorbax Extend C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Agilent, CA, САД*  
*Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) – Agilent, CA, САД*
- Хаотропни агенс: натријум перхлорат ( $\text{HClO}_4$ ) – *Fluka, Steinheim, Немачка*  
натријум трифлуороацетат ( $\text{CF}_3\text{COONa}$ ) – *Aldrich, St. Louis, MO, САД*
- Брзина протока мобилне фазе: 1 mL/min
- Волумен инјектовања: 5 μL
- Таласна дужина детекције: 254 nm

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената дефинисаном D-оптималним дизајном. План експеримената приказан је у табели 7.

Припремљени су радни раствори испитиваних супстанци растварањем одговарајућих количина радних стандарда у смеси ацетонитрил-вода (50:50, V/V) у циљу добијања концентрације раствора респеридона 1 mg/mL, а концентрација раствора сваке од нечистоћа била је 100 μg/mL. Припремљени раствори су даље разблажени истом смешом ацетонитрила и воде тако да су добијени радни раствори концентрација 100 μg/mL респеридона и 10 μg/mL нечистоћа.

**Табела 7.** План експеримената дефинисан D-оптималним експерименталним дизајном.

<i>№</i>	<i>Ацетонитрил (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Концентрација хаотронне соли (mM)</i>	<i>Тип хаотронне соли</i>	<i>Врста колоне</i>
1	30	5	100	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
2	30	3	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
3	30	3	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
4	30	5	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
5	20	5	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
6	30	5	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
7	20	3	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
8	20	3	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
9	20	3	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
10	20	5	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
11	20	5	100	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
12	30	3	100	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
13	30	3	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
14	20	3	100	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
15	30	5	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
16	20	5	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
17	30	4	55	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
18	25	3	55	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
19	25	4	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
20	22,5	4	55	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
21	20	4	55	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend
22	30	4	55	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
23	25	3	55	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
24	25	5	55	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
25	30	5	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
26	20	5	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Extend
27	20	5	10	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Eclipse XBD
28	20	3	10	NaClO <sub>4</sub>	Zorbax Eclipse XBD
29	20	5	100	CF <sub>3</sub> COONa	Zorbax Extend

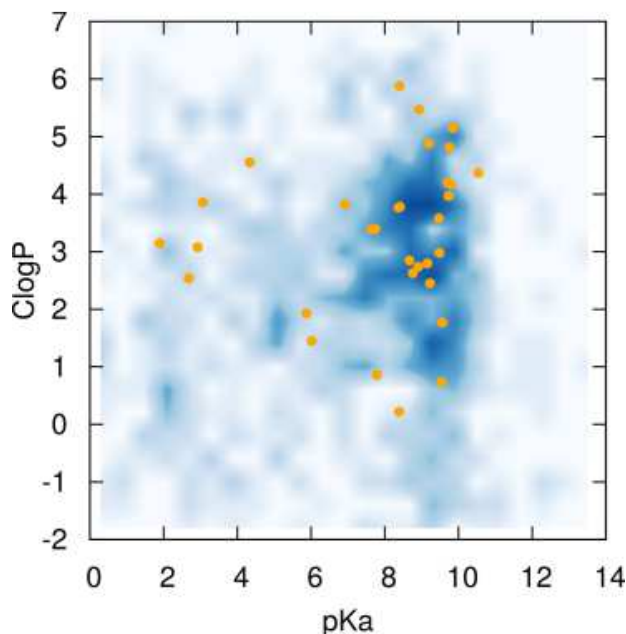
### 3.5.3. Софтвери за обраду података

*Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0 софтверски пакет коришћен је за дефинисање експерименталног плана и добијање математичких модела за испитиване одговоре система. *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0 софтверски пакет коришћен је за претрагу чворова мреже, индиректно моделовање, израчунавање  $W_{0,1}$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $B/A$ ,  $N$  и  $Tf$  као и неопходна израчунавања и конструисање графика за приступ праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика на базној линији.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1. Испитивање утицаја најзначајнијих хроматографских параметара и молекулске структуре анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији

Ретенционо понашање анализата са базним функционалним групама, у хроматографским системима модификованим додатком хаотропног агенса, може се описати на адекватан начин једино истовременим разматрањем утицаја већег броја фактора. У овој студији, испитивано је ретенционо понашање 34 структурно разноврсне модел супстанце у 36 хроматографских система који су дефинисани концентрацијом  $\text{NaPF}_6$  у мобилној фази, рН вредношћу водене фазе и садржајем ацетонитрила у мобилној фази. Све анализи су активне супстанце од којих 32 имају базне функционалне групе које могу да јонизују, док су преостале 2 супстанце (карбамазепин и лоразепам) неутралне природе. Структурне формуле испитиваних супстанци приказане су на слици 8. Анализи су одабрани тако да се максимално повећа структурна разноврсност испитиваног сета, а на слици 12 је илустрована добра покривеност хемијског простора дефинисаног референтним базним супстанцама одобреним од стране FDA (енг. *U.S. Food and Drug Administration*) и регистрованих у бази података *Drug Bank 4.0*. [85].



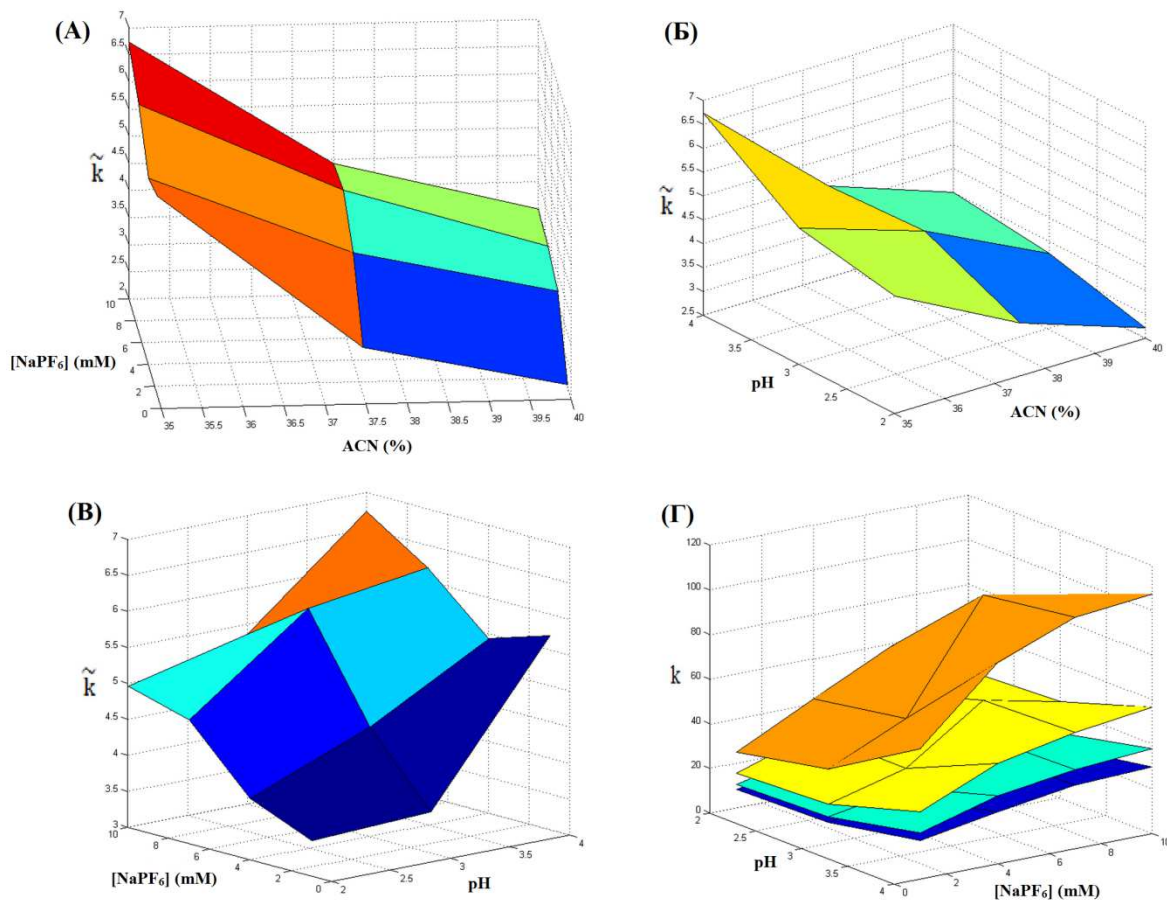
**Слика 12.** Дистрибуција анализата према њиховим партиционим коефицијентима вода-октанол ( $ClogP$ ) и предвиђеним  $pKa$  вредностима за најбазније функционалне групе (жуте тачке). Интезитет плаве боје одговара релативној фреквенцији налажења референтних базних супстанци одобрених од стране FDA.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

#### ***4.1.1. Испитивање ефекта компоненти мобилне фазе на ретенционо понашање испитиваних супстанци***

Утицај садржаја ацетонитрила у мобилној фази, рН вредности водене фазе и концентрације  $NaPF_6$  у воденој фази на ретенционо понашање анализираних супстанци процењен је кроз 1244 експеримента применом приступа *one-factor-at-a-time*. Код овог приступа мења се само један од испитиваних фактора, док су сви остали на константном, претходно утврђеном, нивоу. У циљу илустрације тренда ретенционог понашања на основу експериментално прикупљених податка за вредности ретенционих фактора анализата, израчуната је медијана ретенционих фактора,  $\tilde{k}$  свих анализата у сваком од 36 хроматографских система појединачно. Након тога су конструисани 3D графици за сваки пар испитиваних фактора, док је трећи

фактор одржан на тачно дефинисаном нивоу на коме преостала два фактора имају најизраженији утицај на ретенцију анализата (слика 13).



**Слика 13.** 3D графици (А)  $\tilde{k} = f(\%$  ацетонитрила, [NaPF<sub>6</sub>]) на рН 4,00; (Б)  $\tilde{k} = f(\%$  ацетонитрила, рН) са 10 mM NaPF<sub>6</sub>; (В)  $\tilde{k} = f(\text{pH}$ , [NaPF<sub>6</sub>]) на 35% ацетонитрила, (Г)  $k = f(\text{pH}$ , [NaPF<sub>6</sub>]) на 35% ацетонитрила за 4 анализата са најизраженијим променама у ретенционом понашању (тиоридазин–жута, кломипрамин–тиркизна, сертралин–плава, цинаризин–наранџаста).

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

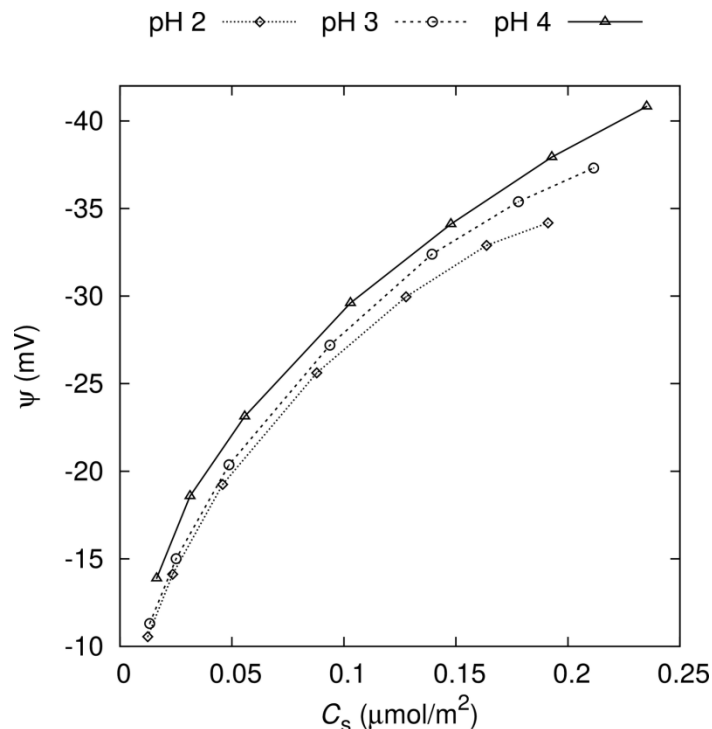
На слици 13А илустровано је смањење вредности ретенционог фактора свих анализата са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази, док је са порастом

концентрације хаотропног агенса ефекат супротан и ретенција се повећава. У испитиваном опсегу смањење садржаја ацетонитрила у мобилној фази доводи до израженијег ефекта хаотропног агенса на ретенцију, иако је у овој студији уочена само мала промена у интензитету хаотропног ефекта са променом садржаја ацетонитрила. Тренд ретенционог понашања приказаног на слици 13А је очекиван и већ описан у литератури [6], али ефекат рН вредности мобилне фазе на ретенцију анализата који је уочљив на сликама 13Б и 13В било је тешко објаснити на основу литературно доступних података. Како већина испитиваних супстанци има  $pK_a \approx 9$ , могло се очекивати да се при рН вредности водене фазе од 2,00 до 4,00 све супстанце налазе у потпуно јонизованом облику и да промена рН вредности у овом опсегу не утиче на заступљеност протоноване форме анализата. Сем тога, анализирани супстанце у структури имају базне центре па би се на основу те чињенице могло претпоставити да смањење рН вредности помера равнотежу ка протонованом облику анализата. У хроматографским системима са хаотропним агенсом долази до повећања ретенције анализата са повећањем заступљености његове протоноване форме. Међутим, као што је приказано на сликама 13Б и 13В, у овој студији је уочено да смањење рН вредности мобилне фазе условљава краћа ретенциона времена анализата. Овај тренд је најочљивији на слици 13Г где је приказан утицај рН вредности на хаотропну осетљивост 4 анализата код којих су уочене највеће промене ретенционог фактора. Уколико се упореди промена вредности медијане ретенционих фактора након додатка 10 mM NaPF<sub>6</sub> у систем без хаотропног агенса, добија се 1,8 пута већи пораст у системима где је рН вредност 4,00 него у системима где је рН вредност 2,00.



#### **4.1.2. Утицај рН вредности мобилне фазе на адсорпцију $\text{NaPF}_6$ на стационарну фазу**

У литератури је већ описана карактеристика хаотропних јона да показују тенденцију акумулирања на површини стационарне фазе и да при томе формирају електрични двослој између стационарне фазе и раствора елуента што даље утиче на ретенцију протонваних анализата [9]. На основу тог својства хаотропних јона, у овој студији је постављена хипотеза да рН вредност мобилне фазе утиче на количину  $\text{PF}_6^-$  јона адсорбованих на површину стационарне фазе, а последично и на вредност развијеног електростатског потенцијала. Постављена хипотеза тестирана је одређивањем количине  $\text{PF}_6^-$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) јона адсорбоване на површину стационарне фазе применом методе фронталне анализе (поступак одређивања адсорпционих изотерми  $\text{NaPF}_6$  описан је у поглављу 3.2.3.). На основу једначине 47 израчуната је количина  $\text{PF}_6^-$  јона адсорбованих на стационарној фази при садржају ацетонитрила 35%, 37,5% и 40% и при различитим рН вредностима мобилне фазе. Одговарајуће вредности потенцијала су израчунате на основу Гуи-Чапмановог израза (једначина 3). На слици 14 приказан је тренд промене потенцијала са променом рН вредности мобилне фазе и уочава се да долази до пораста и количине адсорбованог хаотропног агенса и вредности електростатског потенцијала са порастом рН вредности мобилне фазе.



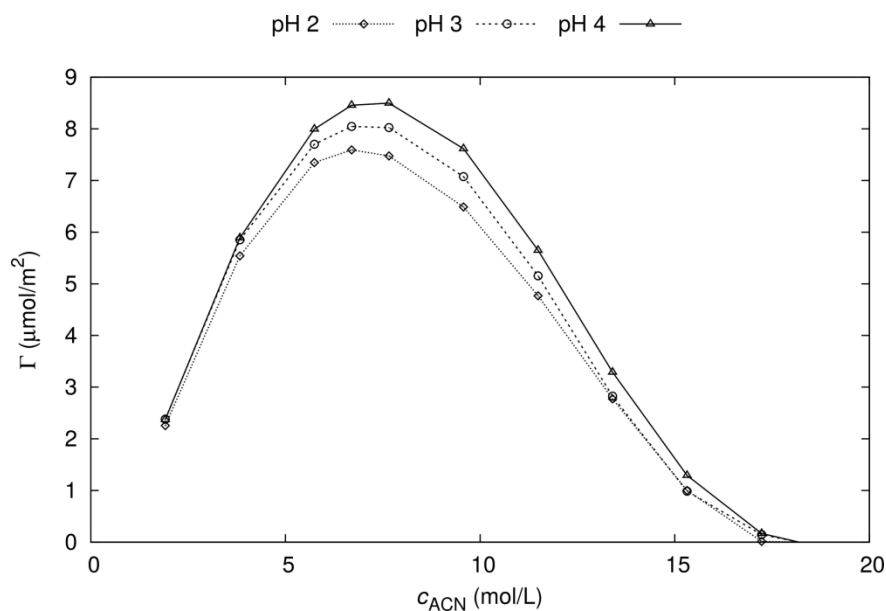
**Слика 14.** Тренд померања кривих које описују промену адсорбоване количине  $\text{PF}_6^-$  јона и развијеног електростатског потенцијала на површини стационарне фазе са променом рН вредности мобилне фазе при 35% V/V ацетонитрила у мобилној фази. (Прилагођено из: J. Čolović, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

#### ***4.1.3. Утицај промене рН вредности мобилне фазе на адсорпцију ацетонитрила на површину стационарне фазе***

Промене у електростатском потенцијалу са променом рН вредности мобилне фазе приказане на слици 14 не могу се објаснити различитом адсорбофилношћу  $\text{PF}_6^-$  анјона на испитиваним рН вредностима. Из тог разлога разматрана је могућност да промене у електростатском потенцијалу настају као последица промена у дифузној слоју који се формира на површини стационарне фазе од молекула ацетонитрила. Утицај садржаја ацетонитрила на адсорпцију  $\text{PF}_6^-$  јона описан је у литератури и Казакевич и сарадници (*Kazakevich et al.*) су указали на повезаност између количине

ацетонитрила адсорбованог на стационарној фази и количине адсорбоване хаотропне соли [20].

Подаци о утицају рН вредности мобилне фазе на адсорпцију ацетонитрила нису пронађени у литератури, па су у циљу тестирања хипотезе о постојању корелације између рН вредности мобилне фазе и адсорпције ацетонитрила одређене адсорпционе изотерме ацетонитрила. Метода најмање пертурбације базне линије примењена је за одређивање адсорпције ацетонитрила са променом рН вредности водене фазе (описано у поглављу 3.2.2.4.). На слици 13 приказане су адсорпционе изотерме ацетонитрила при рН вредностима водене фазе 2,00; 3,00 и 4,00.



**Слика 15.** Адсорпционе изотерме ацетонитрила: промена адсорбоване количине ацетонитрила при рН вредности водене фазе 2,00; 3,00 и 4,00.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

На слици 15 уочава се значајна разлика у количини адсорбованог ацетонитрила при различитим рН вредностима водене фазе када је садржај ацетонитрила у мобилној фази у опсегу од 30% до 40%. У овом опсегу долази до веће

адсорпције ацетонитрила при вишим рН вредностима водене фазе. Стога се може закључити да већа количина адсорбованог ацетонитрила условљава већу адсорпцију хаотропног агенса што на крају доводи до дужег задржавања анализата на стационарној фази. Међутим, када је садржај ацетонитрила мањи од 20% не уочава се разлика у количини адсорбованог ацетонитрила при различитим рН вредностима што указује да при садржају ацетонитрила до 20% промене рН вредности мобилне фазе не утичу на ретенцију комплетно протонисаних базних анализата. Са друге стране треба напоменути да већа количина адсорбованог ацетонитрила која се добија при већем уделу ацетонитрила не мора довести до веће адсорпције хаотропног агенса, зато што би већи удео ацетонитрила утицао и на поларност мобилне фазе што такође утиче на адсорпцију хаотропних јона на стационарну фазу. Дакле, треба истаћи да претходно описано запажање о повећању ретенције базних анализата са порастом адсорпције ацетонитрила и хаотропног агенса услед повећања рН вредности мобилне фазе важи само за промене у количини адсорбованог хаотропног агенса при фиксираним вредностима удела ацетонитрила, а са променом рН вредности мобилне фазе.

Дефинитивно објашњење за описане експерименталне податаке није могуће пружити на основу до сада доступних података. У литератури је описано да ацетонитрил формира дифузни слој на површини стационарне фазе и може достићи дебљину од чак четири монослоја [86]. Слој ацетонитрила ове дебљине на површини стационарне фазе настаје као резултат хидрофобних интеракција молекула ацетонитрила и угљоводоничних ланаца којим је модификована силика. Постављена је хипотеза да при вишим рН вредностима резидуалне силанолне групе делимично јонизују, па наелектрисане силанолне групе доводе до пертурбације у структури колабираних угљоводоничних ланаца који иначе формирају места са високим афинитетом за везивање ацетонитрила [73, 86]. Било би очекивано да јонизација силанолних група смањује афинитет за везивање хаотропних јона истог наелектрисања, а да повећава ретенцију супротно наелектрисаних анализата. Међутим, изучавањем ретенционог понашања анализата у одсуству хаотропног агенса показало се да је ефекат интеракција са јонизованим силанолним групама изражен у знатно

мањој мери него ефекат интеракције анализата са дифузним слојем ацетонитрила на стационарној фази.

Посматрањем ретенционог понашања анализата у системима без хаотропног агенса, могуће је издвојити три групе анализата на основу промене њихове ретенције са променом рН вредности водене фазе. Прву групу чине анализати у форми монокатјона чије се јонизационо стање не мења са променом рН вредности од 2,00 до 4,00 и ретенција ових анализата се смањује са порастом рН вредности. Овај тренд је у складу са описаним адсорпционо-партиционим моделом пошто се са порастом количине адсорбованог ацетонитрила смањује афинитет наелектрисаних анализата за дифузни слој ацетонитрила. Са друге стране, анализати чије се наелектрисање мења у испитиваном опсегу рН вредности и укупно позитивно наелектрисање расте са опадањем рН вредности, показују дужу ретенцију на рН 4,00 него на рН 2,00 и њихово ретенционо понашање у системима без хаотропног агенса је у складу са конвенционалним *RP-HPLC* механизмима. Неутрални анализати не показују промене у ретенционом понашању са променом рН вредности у испитиваном опсегу. Поред ове три групе анализата, постоји и четврта група од 8 супстанци које се понашају неретенционо у системима без хаотропног агенса, па се о њиховом ретенционом понашању не може дискутовати. Анализирање ретенционог понашања анализата у системима без хаотропног агенса додатно потврђује хипотезу да промена у количини адсорбованог ацетонитрила посредује у рН условљеним променама у ретенционом понашању анализата и да ефекат рН вредности треба разматрати одвојено од ефекта на јонизацију анализата.

#### ***4.1.4. Развој QSRR модела за успостављање корелације параметара мобилне фазе и структурних дескриптора са ретенционим подацима***

Према конвенционалним правилима *QSRR* моделовања, подаци о параметру који квантификује ретенционо понашање и са којим се корелишу молекулске карактеристике морају бити сакупљени под идентичним експерименталним условима. Овај услов не само да редукује количину података који се могу укључити у

развој модела, већ и значајно смањује практичну применљивост таквог модела пошто је он применљив само за тачно дефинисану комбинацију експерименталних услова. Како бисмо превазишли ограничења која условљава овај захтев моделовања, у овој студији је коришћен приступ мешовитог моделовања који као независно променљиве посматра и параметре мобилне фазе и структурне дескрипторе [87]. Овај приступ моделовања је већ успешно примењиван за описивање ретенционог понашања у *RP-HPLC* системима са различитим саставима мобилне фазе [53, 88].

Приликом примене приступа мешовитог моделовања у овој студији, јавио се проблем померања јонизационе равнотеже анализата при различитим рН вредностима мобилне фазе. Нејонизована и јонизована форма истог молекула показују различито ретенционо понашање и имају различите вредности молекулских дескриптора. У циљу решавања овог проблема, моделовали смо појединачно структуру сваког анализата тако да она представља доминантно јонизационо стање на датој рН вредности мобилне фазе (табела 3). Компјутерско предвиђање *pKa* вредности се не може сматрати поузданим у потпуности, међутим подаци добијени за тренирање овог модела су добијени из водених раствора са довољно ниским садржајем органског модификатора који не би требало да значајније утиче на доминантну форму једињења у односу на предвиђања за водени раствор, па се може сматрати да су доминантна јонизациона стања одређена са задовољавајућим нивоом поузданости.

На основу података из студије која се бавила моделовањем односа између хемијске структуре и ретенционог понашања у хаотропној хроматографији, закључено је да већу статистичку значајност имају дескриптори добијени на основу тродимензионалне структуре [15]. Међутим, у овој студији постојала је релативна конформерна ригидност анализата па се поједначни конформер изабран на основу најмање енергије сматрао одговарајућим избором за израчунавање 3D молекулских дескриптора. Велика структурна разноврсност анализата у овој студији захтевала је примену другачијег приступа. Претходно је показано да избор правог приступа приликом одабира конформера анализата и оптимизације геометрије молекула представља критичан моменат који условљава добијање поузданих *QSRR* модела

[89]. Свако појединачно јонизационо стање молекула представљено је конформерним ансамблом и индивидуалне геометрије конформера су оптимизоване AM1 методом, а одговарајуће енергије се даље могу користити за рачунање Болцманове расподеле вероватноће конформера. Применљивост оваквог приступа у *QSRR* моделовању описана је од стране Оливеире и сарадника (*Oliveira et al.*) [50], а детаљан опис поступка израчунавања вредности молекулског дескриптора за молекула који постоји у више конформационих облика дат је у делу 1.4.2.2. У овој докторској дисертацији, примена приступа предложеног од стране Оливеире и сарадника (*Oliveira et al.*) илустрована је на примеру израчунавања вредности дескриптора *TDB9p* за молекула амитриптилина при рН вредности водене фазе 2,00 (табела 8). Молекула амитриптилина има 12 конформера при рН вредности водене фазе 2,00 и за сваки од њих израчуната је вредност дескриптора *TDB9p* и *p* вредност на основу једначине 25. Јединствена вредност *TDB9p* дескриптора за молекула амитриптилина добија се као сума производа *TDB9p* дескриптора и одговарајућих *p* вредности за свих 12 конформера овог молекула.

**Табела 8.** Израчунавање вредности дескриптора *TDB9p* за молекула амитриптилина при рН вредности водене фазе 2,00.

<i>Конформер</i>	<i>TDB9p</i>	<i>p</i> вредност	<i>TDB9p</i> × <i>p</i> вредност
амитриптилин_A_1	6,88602	0,083110734	0,57230214
амитриптилин_A_2	7,478436	0,083527375	0,62465416
амитриптилин_A_3	7,071582	0,083455883	0,590165089
амитриптилин_A_4	7,864814	0,083579783	0,657339471
амитриптилин_A_5	6,297074	0,083141107	0,523545713
амитриптилин_A_6	7,84711	0,083466617	0,654971743
амитриптилин_A_7	6,381372	0,083276600	0,531418945
амитриптилин_A_8	6,05141	0,083121778	0,503003916
амитриптилин_A_9	7,463432	0,083507569	0,623253056
амитриптилин_A_10	7,461507	0,083471969	0,622826662
амитриптилин_A_11	5,863628	0,082966826	0,486486622
амитриптилин_A_12	6,848555	0,08337376	0,570989787
<b>УКУПНО</b>		1	<b>6,960957305</b>

#### 4.1.5. Перформансе модела и анализа структурних карактеристика које утичу на ретенционо понашање анализата

Регресиони модел је развијен помоћу *support vector machine (SVR)* алгоритма, а детаљан опис развоја модела је дат у поглављу 3.2.4.2. Молекулски дескриптори који су укључени у коначни *SVR* модел приказани су у табели 9, а хиперпараметри модела и карактеристике тренинг и тест сета дати су збирно у табели 10.

**Табела 9.** Преглед параметара укључених у развој *SVR* модела.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

Молекулски дескриптори	<p><b>ETA_EtaP_B_RC</b> – Индекс разгранатости молекула EtaB (коригован за постојање прстена у молекулу) израчунат релативно у односу на величину молекула (енг. <i>branching index EtaB (with ring correction) relative to molecular size</i>)</p> <p><b>XlogP</b> – израчунати октанол-вода партициони коефицијент (енг. <i>calculated octanol-water partition coefficient</i>)</p> <p><b>TDB9p</b> – 3D тополошки дескриптор аутокорелисаности, интервал 9, пондерисан поларизабилношћу (енг. <i>3D topological distance based autocorrelation - lag 9 / weighted by polarizabilities</i>)</p> <p><b>RDF45p</b> – радијална функција расподеле - 045/пондерисана релативном поларизабилношћу (енг. <i>radial distribution function - 045/weighted by relative polarizabilities</i>)</p>
Параметри мобилне фазе	<p><b>%ACN</b> – садржај ацетонитрила у мобилној фази</p> <p><b>[NaPF<sub>6</sub>]</b> – концентрација (mM) NaPF<sub>6</sub></p> <p><b>pH</b> – pH вредност воденог дела мобилне фазе</p>

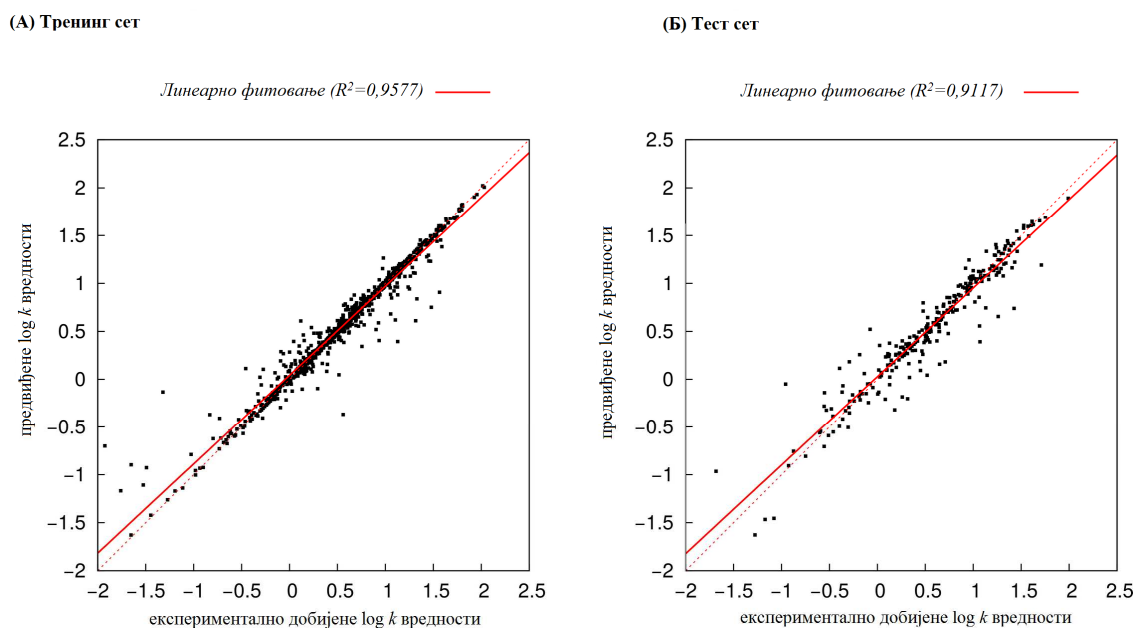


**Табела 10.** Преглед хиперпараметара *SVR* модела и карактеристика тренинг и тест сета.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

<i>NuSVR</i> параметри	$C = 10^3$ RBF кернел $\gamma = 0,5$ $\nu = 0,5$
<i>Перформансе модела</i>	<i>Тренинг сет</i> ( $n = 938$ ) $R^2_{\text{тренинг}} = 0,9577$ $RMSE_{\text{тренинг}} = 0,1238$
	<i>Тест сет</i> ( $n = 286$ ) $R^2_{\text{тест}} = 0,9117$ $RMSE_{\text{тест}} = 0,1806$

Као што се види из табела 9 и 10, комбинацијом 4 молекулска дескриптора и 3 параметра мобилне фазе развијен је *SVR* модел добрих предиктивних карактеристика, што је потврђено ниском *RMSE* вредношћу и тачношћу у предвиђању података тест сета. График односа предвиђених и експериментално добијених  $\log k$  вредности за тренинг и тест сет приказан је на слици 16.



**Слика 16.** График односа предвиђених и експериментално добијених  $\log k$  вредности за (А) тренинг и (Б) тест сет.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1425 (2015) 150-157.)

Изабрани сет молекулских дескриптора је потребно интерпретирати у контексту утицаја структурних карактеристика анализата на ретенцију у хаотропној хроматографији како да би се потврдила релевантност предложеног модела и стекао бољи увид у структурне карактеристике анализата које утичу на његову ретенцију. *ETA\_EtaP\_B\_RC* дескриптор је проширени тополошки дескриптор [90] који се добија поређењем индекса разгранатости референтног алкана са алканом који има нормалан алкански низ и исти број атома. Како референти алкан представља само молекулски скелет и не садржи информације о врсти атома и типу веза у молекулу, на вредности овог дескриптора утиче само степен разгранатости молекулске топологије коригован за број прстенова. У суштини, разгранатијој структури молекула одговарају веће вредности овог дескриптора и краћа ретенциона времена. Овај тренд је већ описан у литератури [54] и објашњава се стерним ефектима који ометају интеракције између молекула анализата и стационарне фазе. *XlogP* је параметар који описује хидрофобност молекула и његов утицај на ретенцију у *RP-HPLC* системима је добро познат.

За дескрипторе *ETA\_EtaP\_B\_RC* и *XlogP* се може рећи да описују структурне карактеристике анализата које утичу на ретенционо понашање у *RP-HPLC* системима, док *TDB9p* и *RDF45p* описују карактеристике молекула које су важне за ретенцију анализата у хаотропној хроматографији. *TDB9p* је 3D тополошки дескриптор чија вредност одговара збиру производа поларизабилности атома пондерисану њиховом геометријском дистанцом, с тим што се узимају у обзир парови атома раздвојени са 9 веза. Слично њему, *RDF45p* квантификује вероватноћу налажења два атома на удаљености од 4,5 Å пондерисану њиховом релативном поларизабилношћу. Оба дескриптора описују специфични просторни распоред поларизабилних атома унутар молекула. На основу добре корелације са параметрима проширеног термодинамичког модела, у студији Вемић и сарадника [15] специфична дистрибуција наелектрисања унутар молекула анализата идентификована је као фактор који доприноси ретенцији анализата у системима хаотропне хроматографије. Ово је објашњено комплементарношћу између дипола молекула и електричног двослоја који се формира на површини стационарне фазе услед адсорпције хаотропног јона. Статистички значајан утицај *TDB9p* и *RDF45p* који је идентификован у овој студији даље потврђује хипотезу да се молекулски дескриптори, који описују просторни распоред високо поларизабилних атома, могу лако довести у везу са задржавањем анализата на површини стационарне фазе где се налази развијен електрични двослој.

У складу са претходно описаном интерпретацијом је и чињеница да предиктивна вредност дескриптора *TDB9p* и *RDF45p* (описана вредношћу коефицијента корелације,  $R$  између дескриптора и  $\log k$ ) расте са порастом рН вредности мобилне фазе, односно концентрације хаотропног агенса (табела 11). Како је показано да са порастом рН вредности мобилне фазе расте и вредност електростатског потенцијала, ова запажања потврђују интерпретацију *TDB9p* и *RDF45p* дескриптора пошто они најбоље описују структурне карактеристике молекула одговорних за интеракције са електричним двослојем на површини стационарне фазе.

**Табела 11.** Вредности коефицијента корелације,  $R$  између дескриптора и  $\log k$  израчунатих на основу података прикупљених на испитиваним рН вредностима и концентрацијама  $\text{NaPF}_6$ .

<i>Подсет података</i>	<i>R</i>	
	<i>TDB9p</i>	<i>RDF45p</i>
pH 2,00	0,21	0,32
pH 3,00	0,29	0,33
pH 4,00	0,36	0,35
$[\text{NaPF}_6] = 1 \text{ mM}$	0,21	0,23
$[\text{NaPF}_6] = 4 \text{ mM}$	0,29	0,33
$[\text{NaPF}_6] = 7 \text{ mM}$	0,32	0,39
$[\text{NaPF}_6] = 10 \text{ mM}$	0,34	0,42

На основу резултата ове студије могло би се претпоставити да растојања у молекулима, описана *TDB9p* и *RDF45p* дескрипторима, имају директне везе са природом двослоја који се формира на површини стационарне фазе. Међутим, много је вероватније да ове дистанце одражавају доминантну дистрибуцију атома у хемијском простору који је дефинисан проучаваним анализитима. У сваком случају, структурна разноврсност испитиваног сета је репрезентативна и у великој мери обухвата молекулске структуре које се најчешће испитују у хаотропној хроматографији, што нас доводи до закључка да се добијени модел и запажања у овој студији могу сматрати генерално применљивим за разумевање утицаја структурних карактеристика молекуле на ретенционе процесе у системима хаотропне хроматографије.

## **4.2. Разграничавање утицаја јонске јачине, рН вредности мобилне фазе и структурних карактеристика анализата са базним функционалним групама на ретенционо понашање у хаотропној хроматографији**

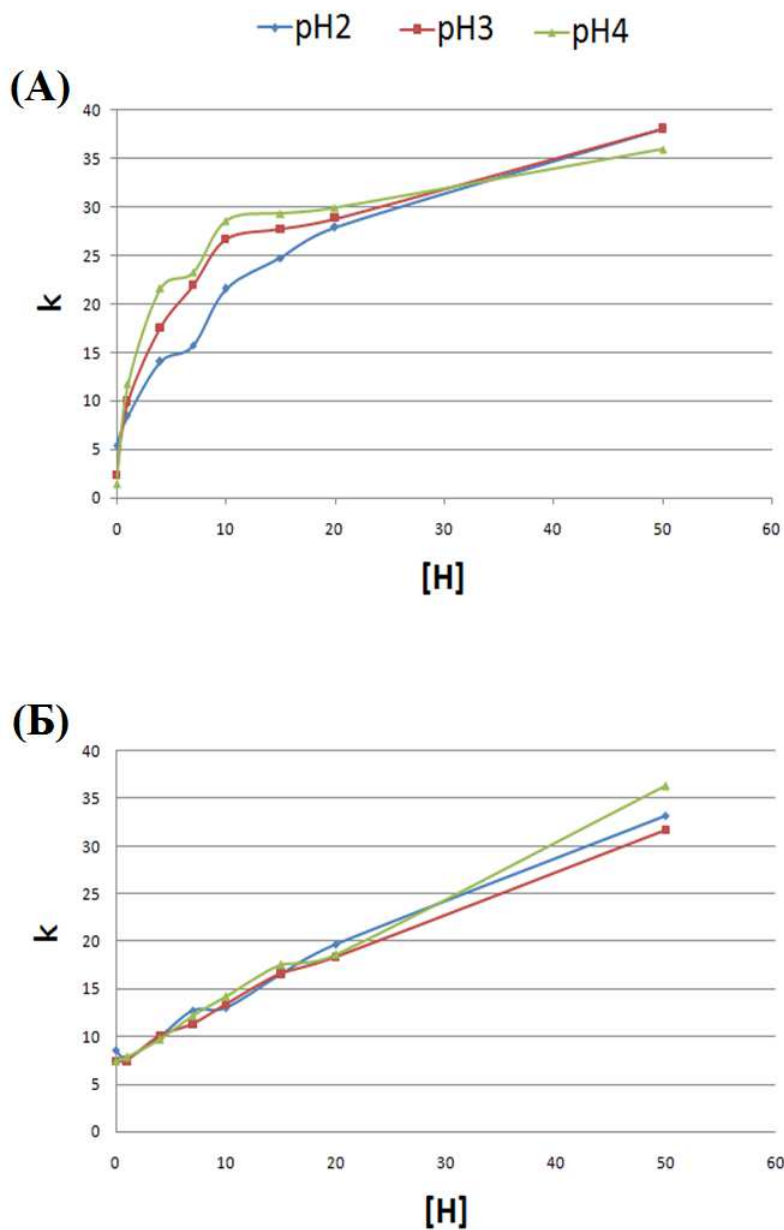
### **4.2.1. Утицај јонске јачине на рН зависне промене ретенционог понашања у хаотропној хроматографији**

Механизми задржавања анализата на површини стационарне фазе су веома сложени у системима хаотропне хроматографије и састоје се из више различитих процеса. У истраживању описаном у поглављу 4.1. показано је да пораст рН вредности мобилне фазе од 2,00 до 4,00 у хаотропним хроматографским системима доводи до промена у ретенционом понашању анализата, а да при томе не долази и до промене јонизационог стања анализата. Израженија адсорпција ацетонитрила и хаотропног агенса на стационарну фазу и последични раст електростатског потенцијала са повећањем рН вредности водене фазе идентификовани су као разлог настанка ових промена у ретенционом понашању. Како јонска јачина мобилне фазе није контролисана у овом истраживању, а додаток јона за подешавање јонске јачине може утицати на вредност електростатског потенцијала [9], било је потребно спровести истраживање са циљем разграничавања појединачних утицаја рН вредности мобилне фазе и јонске јачине на уочене промене у овим системима.

Са циљем утврђивања ефекта јонске јачине на рН зависне промене у хаотропним хроматографским системима, изведена су два сета експеримената. У првом сету експеримената, допуштено је да јонска јачина варира са променом концентрације  $\text{NaPF}_6$  и додатком јона за подешавање рН вредности мобилне фазе, док је у другом сету јонска јачина одржавана константном на 110 mM додатком одговарајуће количине  $\text{NaCl}$ . Ова со је изабрана као модификатор јонске јачине зато што се  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  јони могу сматрати неутралним према Хофмајстеровом низу и као такви не угрожавају поуздану интерпретацију резултата. Према солватобној теорији, присуство јона  $\text{NaCl}$  продужава ретенцију протонисаних базних анализата, али се ово може сматрати занемарљивим у поређењу са ефектом  $\text{NaPF}_6$  чији анјон

показује најизраженији хаотропни ефекат на ретенцију протонованих базних анализата према Хофмајстеровом низу. Једињења проучавана у овој студији су активне супстанце са базним функционалним групама: 10 анализата је изабрано из сета од 34 једињења који је проучаван у студији описаној у делу 4.1. на основу хаотропне сензитивности супстанци, а поред њих су укључена још 3 анализата (ропинирол, верапамил и фенотерол) са циљем повећања структурног диверзитета испитиваног сета супстанци. Структурне формуле испитиваних супстанци су приказане на сликама 8 и 9.

На слици 17 илустровано је ретенционо понашање тиоридазина као репрезентативног анализата у испитиваним хроматографским системима.



**Слика 17.** Ретенционо понашање тиоридазина у испитиваним хроматографским системима. Вредности ретенционог фактора  $k$  добијене су из (А) сета где се јонска јачина мењала са променом концентрације хаотропног агенса  $[H]$  и додатком адитива за подешавање рН вредности мобилне фазе; (Б) сета где је јонска јачина одржавана константном додатком одговарајуће количине NaCl у водену фазу која је већ садржала јоне хаотропног агенса и адитива за подешавање рН вредности.

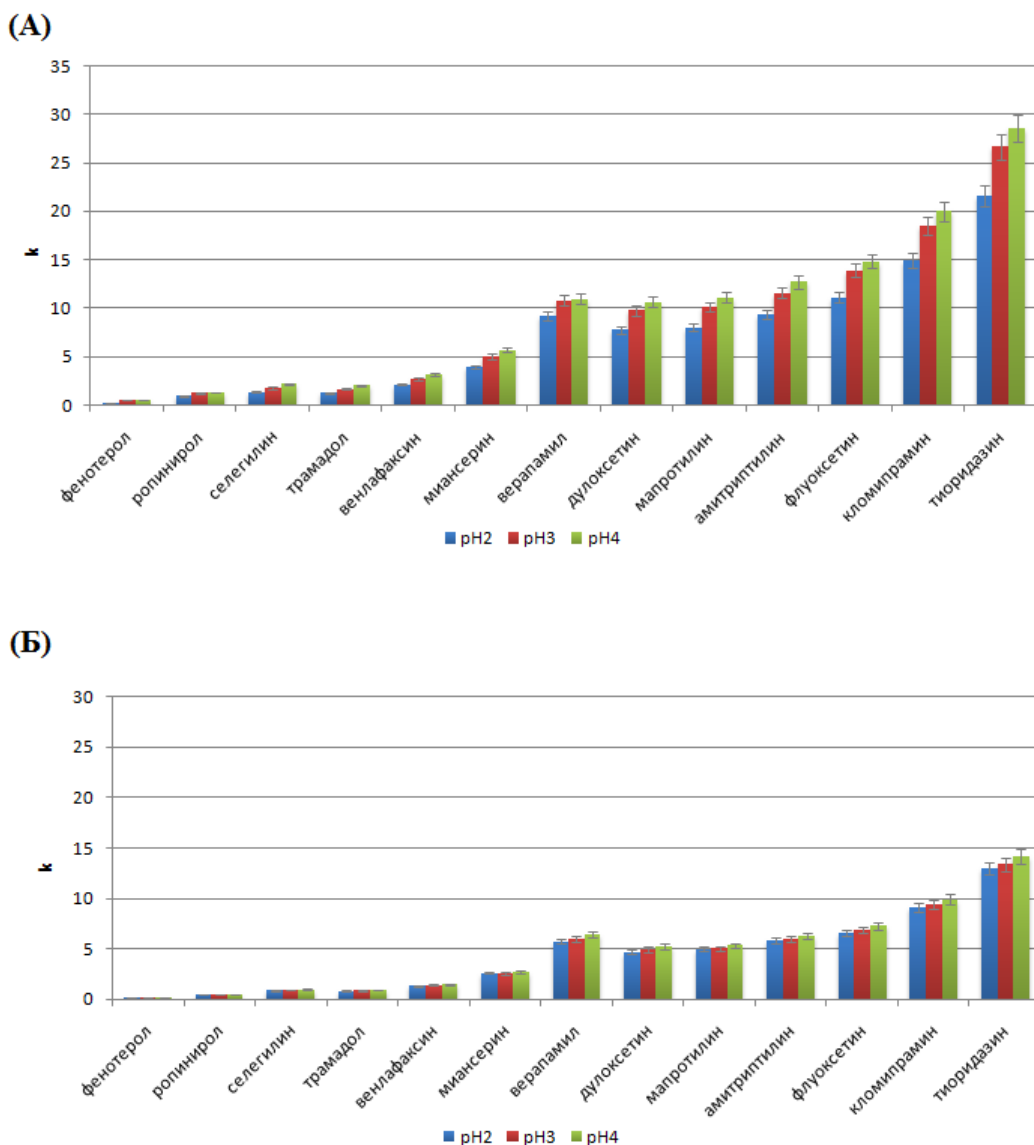
(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017)

68-76.)

Тиоридазин представља супстанцу са најдужом ретенцијом међу испитиваним супстанцама и најизраженијим променама у ретенционом понашању тако да његово ретенционо понашање најјасније осликава генерални тренд у ретенционом понашању свих анализа у испитиваном сету. На слици 17А уочава се изражено повећање вредности ретенционих фактора са порастом концентрације хаотропног агенса све до 40 mM NaPF<sub>6</sub> након чега се достиже плато и даље повећање концентрације хаотропног агенса не доводи до даљег продужења ретенције. На слици 17Б је показано да додаток јона за подешавање јонске јачине доводи до смањења ефекта хаотропног агенса на ретенцију, као и да не долази до достизања платоа, па се у овим системима зависност  $k$  од концентрације хаотропног агенса може описати готово линеарном функцијом.

На слици 18 приказано је рН-зависно ретенционо понашање анализа у оба експериментална сета. Како је у сету експериментална са варијабилном јонском јачином плато достигнут већ при концентрацији од 20 mM NaPF<sub>6</sub>, разматрали смо рН зависне промене у ретенционом понашању анализа при концентрацији од 10 mM NaPF<sub>6</sub> у мобилној фази. Сви анализи показују исти тренд продужења ретенције са порастом рН вредности мобилне фазе у оба испитивана сета (слика 18А и 18Б). Међутим, додаток јона NaCl за подешавање јонске јачине доводи до скраћења ретенције, а то последично доводи и до мање изражених промена у ретенцији са променом рН вредности мобилне фазе.





**Слика 18.** Вредности ретенционог фактора  $k$  при концентрацији  $\text{NaPF}_6$  од 10 mM добијене из (А) сета где се јонска јачина мењала са променом концентрације хаотропног агенса,  $[H]$  и додатком адитива за подешавање рН вредности мобилне фазе; (Б) сета где је јонска јачина одржавана константном додатком одговарајуће количине  $\text{NaCl}$  у водену фазу која је већ садржала јоне хаотропног агенса и адитива за подешавање рН вредности.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017) 68-76.)

#### **4.2.2. Утицај јонске јачине на рН зависне промене у адсорпцији $\text{NaPF}_6$ и развој електростатског потенцијала у системима хаотропне хроматографије**

Ефекат константне и варијабилне јонске јачине на ретенцију анализата са базним функционалним групама у системима хаотропне хроматографије није до сада био описан у литератури. Међутим, испитиван је утицај јонске јачине на ретенцију базних анализата у хроматографским системима модификованим додатком анјонског јон-пар реагенса. Показано је да додаток јона за подешавање јонске јачине доводи до краћег задржавања базних анализата на стационарној фази у системима са јон-пар реагенсима у поређењу са системима без подешавање јонске јачине. Као адитив за подешавање јонске јачине коришћен је  $\text{NaBr}$  који је према Хофмајеровом низу неутрална со. Катјон јон-пар реагенса и адитива за подешавање јонске јачине био је јон  $\text{Na}^+$ , а повећање његове концентрације у раствору доводи до смањења ретенције базних анализата услед конкуренције за јонско спаривање са адсорбованим анјоном јон-пар реагенса [91]. На основу тога се може претпоставити да се ретенционе промене приказане на сликама 17 и 18 могу објаснити разматрањем тенденције хаотропних јона да се акумулирају на површини стационарне фазе [9].

Са циљем тестирања ове хипотезе, одређивали смо количину  $\text{PF}_6^-$  јона адсорбованог на стационарну фазу, а потом и вредност развијеног електростатског потенцијала у свим испитиваним системима. Метода фронталне анализе примењена је за одређивање површинске концентрације  $\text{PF}_6^-$  при рН вредностима мобилне фазе које су дефинисане у овој студији (поступак одређивања адсорпционих изотерми  $\text{NaPF}_6$  описан је у поглављу 3.3.3.). Површинска концентрација  $\text{NaPF}_6$  израчуната је према једначини 47, а вредности електростатског потенцијала израчунате су према Гуи-Чапмановом изразу за потенцијал (једначина 3). За сет експеримената са варијабилном јонском јачином, члан  $\sum c_{oi}$  у једначини 3 је представљао збир концентрација хаотропног јона у мобилној фази и концентрације јона адитива коришћеног за подешавање рН вредности мобилне фазе, док је за сет експеримената са константном јонском јачином члан  $\sum c_{oi}$  имао вредност од 110 mM. Вредности  $\Psi^0$

имају негативан предзнак на основу наелектрисуња најадсорбофилнијег јона хаотропног агенса ( $\text{PF}_6^-$ ). У табели 12 приказане су вредности константи  $a$  и  $b$ , параметри њихове статистичке процене, као и вредности електростатског потенцијала у свим испитиваним хроматографским системима.

**Табела 12.** Константе Фројндлихових изотерми ( $a$ ,  $b$ ) са стандардним грешкама ( $SE$ ), коефицијентима корелације ( $R$ ) и вредностима електростатског потенцијала ( $\Psi^o$ ) у испитиваним хроматографским системима.

(Прилагођено из: **Ј. Čolović**, М. Kalinić, А. Vemić, S. Erić, А. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017) 68-76.)

<i>Варијабилна јонска јачина</i>						
<i>pH</i>	<i>a [mM<sup>b</sup>]</i>	<i>SEa</i>	<i>B</i>	<i>SEb</i>	<i>R</i>	<i>Ψ<sup>o</sup> [mV]*</i>
<b>2</b>	7,51e-03	1,43e-03	5,91e-01	5,15e-02	0,9904	-14,231
<b>3</b>	8,45e-03	1,04e-03	6,46e-01	3,30e-02	0,9900	-21,056
<b>4</b>	8,96e-03	6,94e-04	7,50e-01	2,05e-02	0,9991	-31,122
<i>Константна јонска јачина</i>						
<i>pH</i>	<i>a [mM<sup>b</sup>]</i>	<i>SEa</i>	<i>B</i>	<i>SEb</i>	<i>R</i>	<i>Ψ<sup>o</sup> [mV]*</i>
<b>2</b>	9,05e-03	4,55e-04	6,87e-01	1,33e-02	0,9995	-13,933
<b>3</b>	1,14e-02	1,89e-03	6,36e-01	4,43e-02	0,9941	-14,764
<b>4</b>	1,06e-02	1,31e-03	6,80e-01	3,28e-02	0,9972	-15,938

\*вредности  $\Psi^o$  рачунате су за  $[\text{NaPF}_6] = 50 \text{ mM}$  у воденој фази

У сету експеримената са варијабилном јонском јачином, веће вредности електростатског потенцијала добијене су у системима са вишим pH вредностима мобилних фаза, док се у сету експеримената са константном јонском јачином може уочити само благ раст електростатског потенцијала са повећањем pH вредности мобилне фазе. У хроматографским системима са варијабилном јонском јачином, јонизација силанолних група доводи до боље адсорпције ацетонитрила при вишим pH вредностима мобилне фазе (експериментално показано у студији описаној у поглављу 4.1.). Услед тога јављају се значајне разлике у количини адсорбованог  $\text{PF}_6^-$  јона на површини стационарне фазе, као и вредностима развијеног електростатског потенцијала (при концентрацији  $[\text{NaPF}_6] = 50 \text{ mM}$  разлика у електростатском потенцијалу на pH 4,00 и pH 2,00 износи  $\Delta\Psi^o_{\text{pH } 4 - \text{pH } 2} \approx -17 \text{ mV}$ ). Насупрот израженој разлици у вредностима електростатског потенцијала у системима са варијабилном

јонском јачином, у системима са константном јонском јачином ове разлике су веома мале (при концентрацији  $[\text{NaPF}_6] = 50 \text{ mM}$  разлика у електростатском потенцијалу на  $\text{pH } 4,00$  и  $\text{pH } 2,00$  износи  $\Delta\Psi_{\text{pH } 4 - \text{pH } 2}^{\circ} \approx -2 \text{ mV}$ ). Додатак  $\text{NaCl}$  у мобилну фазу са циљем одржавања константе јонске јачине не доводи само до константне концентрације јона  $\text{Na}^+$  у овим системима већ и значајно веће концентрације овог јона у поређењу са системима са варијабилном јонском јачином. На основу тога постављена је хипотеза да већа концентрација јона  $\text{Na}^+$  блокира силанолне групе јонизоване при  $\text{pH } 3,00$  и  $4,00$ , супримира ефекат  $\text{pH}$  вредности мобилне фазе на адсорпцију  $\text{PF}_6^-$  јона и доводи до готово константних вредности електростатског потенцијала при свим испитиваним  $\text{pH}$  вредностима мобилне фазе. Постављену хипотезу потврђује и добро слагање са вредностима потенцијала добијеним у системима са варијабилном јонском јачином при  $\text{pH}$  вредности  $2,00$  (када слободне силанолне групе нису јонизоване) и вредности потенцијала на свим  $\text{pH}$  вредностима у системима са константом јонском јачином. На основу свега наведеног може се закључити да експериментални подаци из ове студије дефинитивно потврђују ефекат  $\text{pH}$  вредности на адсорпцију хаотропних јона на површину стационарне фазе и вредности последично развијеног електростатског потенцијала.

#### ***4.2.3. Разјашњавање ретенционог понашања***

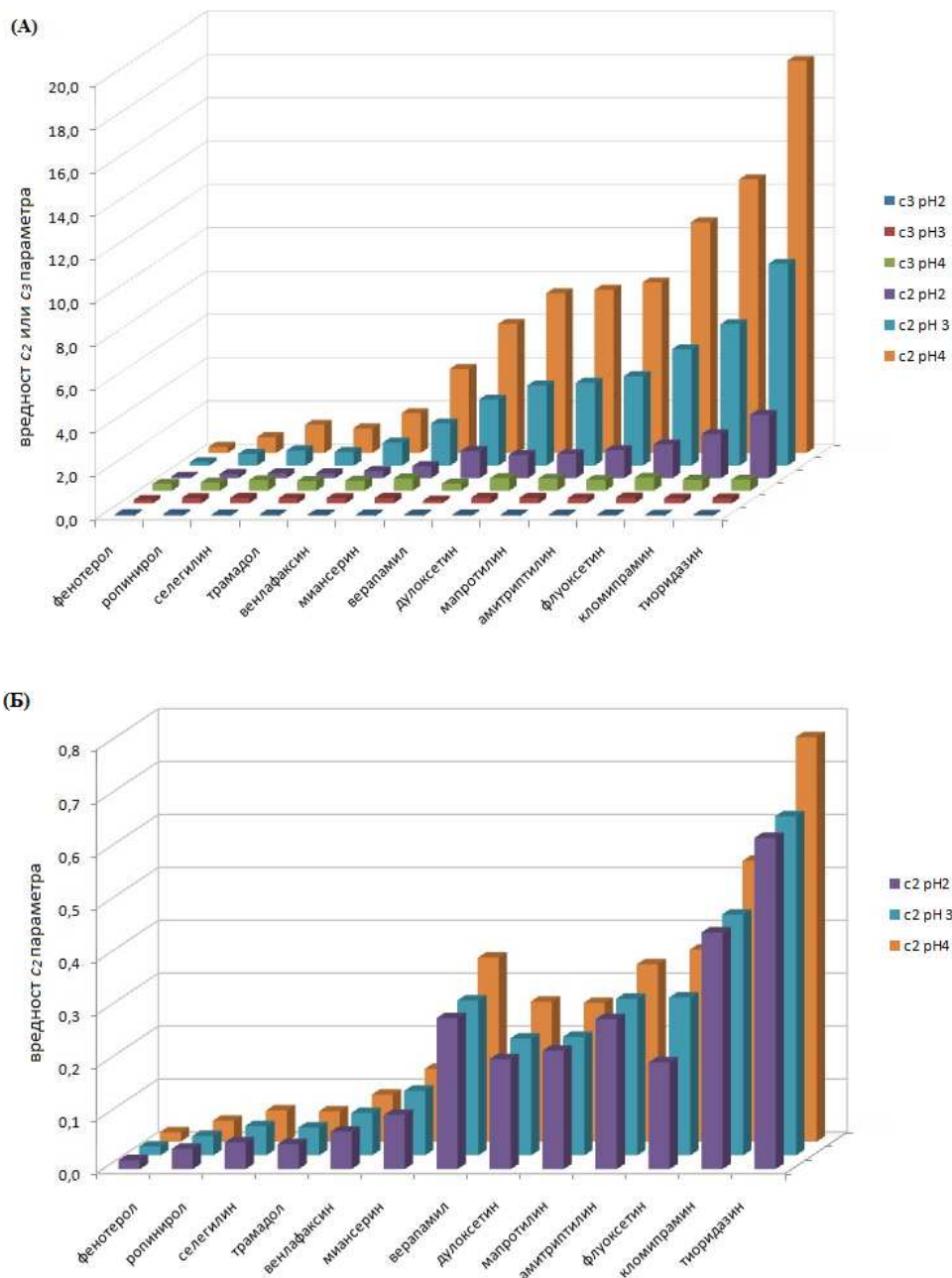
##### *4.2.3.1. Разјашњавање ретенционог понашања применом проширеног термодинамичког модела*

Како би се облик криве зависности  $k$  vs.  $[H]$ , приказане на слици 17 ефикасно и недвосмислено објаснио примењен је проширени термодинамички приступ [9]. Овај модел је најсвеобухватнији теоријски модел погодан за описивање ретенције у системима јон-интеракционе хроматографије, па је зато изабран за разумевање процеса који се дешавају како на стационарној фази тако и у мобилној фази, као и њиховог утицаја на задржавање анализата на стационарној фази. Експериментално добијене вредности ретенционих фактора моделоване су проширеним

термодинамичким моделом (једначина 17), а вредност константе  $f$  израчуната је на основу једначине 18.

Параметар  $c_1$  представља вредност ретенционог фактора анализата у системима без додатка хаотропног агенса у мобилну фазу и у овој студији је одређиван експериментално. Како хаотропни јони не представљају јоне које карактерише висока адсорбофилност, параметар  $c_4$  је искључен из моделовања [7, 8]. Параметри  $c_2$  и  $c_3$  процењени су на основу података прикупљених за седам различитих концентрација  $\text{NaPF}_6$  на свакој рН вредности. Процена свих вредности параметара има задовољавајуће вредности коефицијената корелације ( $R \geq 0,96$ ).

На слици 19 приказане су вредности параметара  $c_2$  и  $c_3$  при испитиваним рН вредностима у хроматографским системима са варијабилном јонском јачином, као и вредности параметара  $c_2$  при испитиваним рН вредностима у хроматографским системима са константном јонском јачином.



**Слика 19.** (А) Сет експеримената са варијабилном јонском јачином: вредност  $c_2$  или  $c_3$  параметра vs. pH вредност мобилне фазе; (Б) Сет експеримената са константном јонском јачином: вредност  $c_2$  параметра vs. pH вредност мобилне фазе.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017)

68-76.)

На слици 19А уочава се раст вредности параметара  $c_2$  и  $c_3$  са порастом рН вредности мобилне фазе у системима где се јонска јачина мењала са променом концентрације хаотропног агенса и количином адитива додатог за подешавање рН вредности мобилне фазе. Како параметар  $c_2$  описује јонско спаривање на стационарној фази, пораст вредности овог параметара је очекиван на основу претходно експериментално показане и описане интензивније адсорпције  $\text{PF}_6^-$  јона при вишим рН вредностима мобилне фазе. Веће вредности  $c_2$  параметра указују на израженије спаривање јона хаотропног агенса и позитивно наелектрисаног анализита на површини стационарне фазе што за последицу има дужу ретенцију анализита при вишим рН вредностима мобилне фазе. Параметар  $c_3$  се мења у истом смеру као и параметар  $c_2$  са порастом рН вредности мобилне фазе. На основу висине стубића на слици 19А уочава се да су вредности параметра  $c_3$  драстично ниже од вредности параметра  $c_2$  под истим експерименталним условима код мапротилина, тиоридазина, дулоксетина, амитриптилина, кломипрамина, флуоксетина, миансерина, верапамила и венлафаксина. Са друге стране, вредности параметара  $c_3$  и  $c_2$  су готово исте код селегилина, трамадола, ропинирола и фенотерола, чиме се могу објаснити кратка ретенциона временима ових анализита у испитиваним хроматографским системима. Важно је напоменути да се вредности  $c_2$  параметра доста разликују између испитиваних једињења, док су вредности параметра  $c_3$  готово идентичне код свих анализита. Различите вредности параметра  $c_2$  међу анализитима указују на значај утицаја молекулске структуре на процесе јонског спаривања на стационарној фази и упућују на важност укључивања параметра молекулске структуре приликом моделовања ретенционог понашања у системима хаотропне хроматографије.

Моделовањем ретенционих фактора анализита у сету експеримента где је јонска јачина одржавана константном додатком одговарајуће количине NaCl у водену фазу, процењено је да параметар  $c_3$  није статистички значајан, па су само вредности параметра  $c_2$  коришћене за даље моделовање. Показано је да вредности параметра  $c_2$  благо расту са променом рН вредности мобилне фазе од 2,00 до 4,00 (слика 19Б).

Чеки и сарадници (*Cecchi et al.*) [92] проучавали су утицај јонске јачине на ретенцију анализата у системима модификованим анјонским јон-пар агенсом применом проширеног термодинамичког приступа. Постојање максимума ретенције позитивно наелектрисаних анализата у системима са варијабилном јонском јачином објашњено је ефикаснијим јонским спаривањем у мобилној фази када се не додаје NaBr као адитив за подешавање јонске јачине. Потврђено је да је Na<sup>+</sup> јон компетитиван са позитивно наелектрисаним анализатом у процесу јонског спаривања у мобилној фази, па су процењене веће вредности параметра  $c_3$  у системима са варијабилном јонском јачином него у системима са константном концентрацијом Na<sup>+</sup> јона. У нашој студији, параметар  $c_3$  се показао као статистички незначајан у системима са константном јонском јачином, што објашњава недостатак ретенционог максимума тиоридазина приказаног на слици 17Б. Ниже вредности параметара ретенције анализата у системима са додатим NaCl у мобилну фазу објашњене су као последица смањења електростатског потенцијала на површини стационарне фазе (табела 12), а вредности параметра  $c_2$  потврђују ову претпоставку. На основу свих изнетих чињеница може се закључити да мала разлика у електростатском потенцијалу при различитим рН вредностима мобилне фазе у системима са константном јонском јачином, као и покривање површине стационарне фазе контра јонима (Na<sup>+</sup> јона), смањују привлачни електростатски потенцијал између јона анализата и адсорбованог хаотропног јона на стационарној фази чиме се умањује ефекат рН вредности мобилне фазе на ретенцију анализата.

У хаотропној хроматографији, разлика у потенцијалу између површине стационарне фазе и електронеутралног раствора елуента настаје као последица различите адсорбофилности анјона и катјона хаотропног агенса. Резултати ове студије нас наводе на претпоставку да природа катјона хаотропног агенса представља важан фактор у ретенционим механизмима зато што његова адсорбофилност редукује укупно наелектрисување површине стационарне фазе, а то се даље одражава и на електростатски потенцијал и на адсорпцију јона. Дакле, неопходно је спровести даља истраживања у циљу процене утицаја природе катјона који потиче и од



хаотропног јона и од модификатора јонске јачине на ретенционо понашање анализата у системима хаотропне хроматографије.

#### 4.2.3.2. *Развој емпиријског ретенционог модела који укључује параметре хроматографског система и молекулске структуре анализата*

Проширени термодинамички приступ моделовању омогућава сагледавање ретенционих механизма који се налазе у основи хроматографског понашања анализата, а коефицијенти модела имају јасно физичко значење. Поред тога што овакав приступ прецизно и поуздано моделује утицај експерименталних услова на хроматографско понашање анализата, он нема могућност предвиђања утицаја хемијске структуре анализата на њихову ретенцију. Приликом развоја новог емпиријског модела који истовремено укључује параметре хроматографског система и молекулске структуре са циљем описивања ретенционог понашања анализата, у разматрање су узете и информације сакупљене приликом моделовања ових система проширеним термодинамичким моделом.

Пошли смо од претпоставке да се ретенциони фактор,  $k$  протонованог анализата у присуству супротно наелектрисаног јона хаотропног агенса може израчунати помоћу следеће једначине:

$$k = k_0 + e * E + s * S - m * M \quad (48)$$

где  $k_0$  представља ретенциони фактор анализата у одсуству хаотропног агенса,  $E$  квантификује допринос интеракција анализата са електричним двослојем,  $S$  представља јонско спаривање на стационарној фази,  $M$  јонско спаривање у мобилној фази, а  $e$ ,  $s$  и  $m$  представљају коефицијенте модела који се одређују моделовањем.

У циљу одређивања одговарајућег емпиријског израза за члан  $E$  разматрали смо до сада описане врсте интеракција анализата са електричним двослојем на површини стационарне фазе. За цвистерјонска једињења, Цеки и сарадници (*Cecchi et al.*) [93] су претпоставили да трансфер молекула анализата из мобилне фазе на

стационарну фазу укључује процес при коме молекули заузимају конформацију са највећим диполним моментом, односно конформацију у којој је растојање између центара супротног наелектрисања унутар молекула највеће. Након тога, молекул се оријентише тако да вектор његовог диполног момента буде паралелан са линијама поља формираног од стране електричног двослоја пошто се на тај начин омогућава највећи контакт молекула са стационарном фазом. Такође је показано и да се афинитет молекула за стационарну фазу може сматрати пропорционалним величини његовог диполног момента. Модел који предлаже наша група генерализује претходно изнете чињенице и омогућава примену и на супстанце код којих укупно наелектрисање није једнако нули пошто и они представљају молекуле са перманентним диполним моментом. Поред тога и електростатски и проширени термодинамички модели указују на пропорционалност ретенције са развијеним електростатским потенцијалом, па параметар  $E$  можемо представити следећим изразом:

$$E = \mu * \Psi * LaI \quad (49)$$

где  $\mu$  представља вредност диполног момента анализата,  $\Psi$  електростатски потенцијал, а  $LaI$  индекс липоафинитета [94]. Разлог за укључивање  $LaI$  у израз за израчунавање параметра  $E$  је чињеница да постоји добра корелација између хидрофобности анализата и његове сензитивности према хаотропним агенсима, а  $LaI$  представља параметар који квантификује хидрофобност анализата. Анализит се инкорпорира у електрични двослој остваривањем електростатичких интеракција, затим бива потиснут ка површини стационарне фазе, а даље задржавање на стационарној фази варира у зависности од његове хидрофобности. Иако је  $n$ -октанол-вода партициони коефицијент ( $ClogP$ ) често коришћен молекулски дескриптор за квантификовање хидрофобности молекула, овај дескриптор није укључен у предложени модел због могућности појаве негативних вредности овог дескриптора које би промениле предзнак параметра  $E$ , већ је као најадекватнија алтернатива укључен  $LaI$ . Треба нагласити и да избор почетне тачке вектора диполног момента код супстанци чије укупно наелектрисање није једнако нули утиче на вредност диполног момента, али то

неће утицати на вредност параметра  $E$  уколико се примењује конзистентан приступ у избору почетне тачке вектора код свих анализа (нпр. центар масе молекуле или центар наелектрисања).

Како би се утврдило које структурне карактеристике анализа доприносе јонском спаривању протонованог анализа и хаотропног јона на површини стационарне фазе, спроведена је корелациона анализа између израчунатих молекулских дескриптора и процењених вредности параметра  $c_2$  из проширеног термодинамичког модела. Овакав тип анализе је претходно коришћен при објашњавању ретенционог понашања конгенеричких анализа у системима хаотропне хроматографије [15]. Сви молекулски дескриптори израчунати су из појединачно оптимизованих 3D структура које су представљале конформер са највећим диполним моментом у репрезентативном ансамблу конформера, а разлог за овакав избор је највећа вероватноћа да молекула заузме такву конформацију приликом интеракција са стационарном фазом. Најбоља корелација је успостављена са *WHIM* дескрипторима који дају информације о 3D структури анализа узимајући у обзир величину, облик, симетрију и дистрибуцију атома [95]. Дескриптор који је показао највећу корелацију са параметром  $c_2$  био је  $L2p$  – 3D дескриптор који истовремено узима у обзир облик и величину молекула, као и просторни распоред атома пондерисан поларизабилношћу атома. Како је  $L2p$  изабран као погодан дескриптор за квантификацију молекулских карактеристика које доприносе процесима јонског спаривања на стационарној фази, параметар  $S$  можемо представити следећим изразом:

$$S = L2p * [H] \quad (50)$$

где  $[H]$  представља концентрацију хаотропне соли у мобилној фази.

Разматрана је могућност извођења сличне корелационе анализе са параметром  $c_3$  у циљу идентификације молекулских дескриптора који могу описати допринос молекулске структуре процесима јонског спаривања у мобилној фази. Међутим, варирање вредности параметра  $c_3$  између анализа је веома мало (слика 19А), што

доводи у питање оправданост укључивања молекулског дескриптора у израз за израчунавање  $M$ . Ниједан од покушаја овакве анализе није дао резултате који доприносе побољшавању перформанси модела. Дакле, може се сматрати да процеси јонског спаривања у мобилној фази константно доприносе смањењу ретенције анализата у хаотропним хроматографским системима и да зависе једино од концентрације хаотропног агенса у мобилној фази.

Узимајући у обзир све претходно наведено, првобитно предложени облик емпиријског модела приказаног једначином 48 може се трансформисати у следећу једначину:

$$k = k_0 + e * \mu * |\psi| * |L| + s * L2p * [H] - m * [H] \quad (51)$$

Даљим анализама модела, показано је да се боље описивање података из тренинг сета може постићи увођењем квадратне зависности члана  $S$  од  $L2p$  дескриптора у прелиминарни израз за овај члан. Слично томе, зависност ретенционог фактора од концентрације хаотропног агенса у мобилној фази, представљене помоћу вредности развијеног електростатског потенцијала на површини стационарне фазе, најбоље се може описати логаритамском функцијом. Укључивањем ових модификација у једначину 51, добија се коначни облик емпиријског модела:

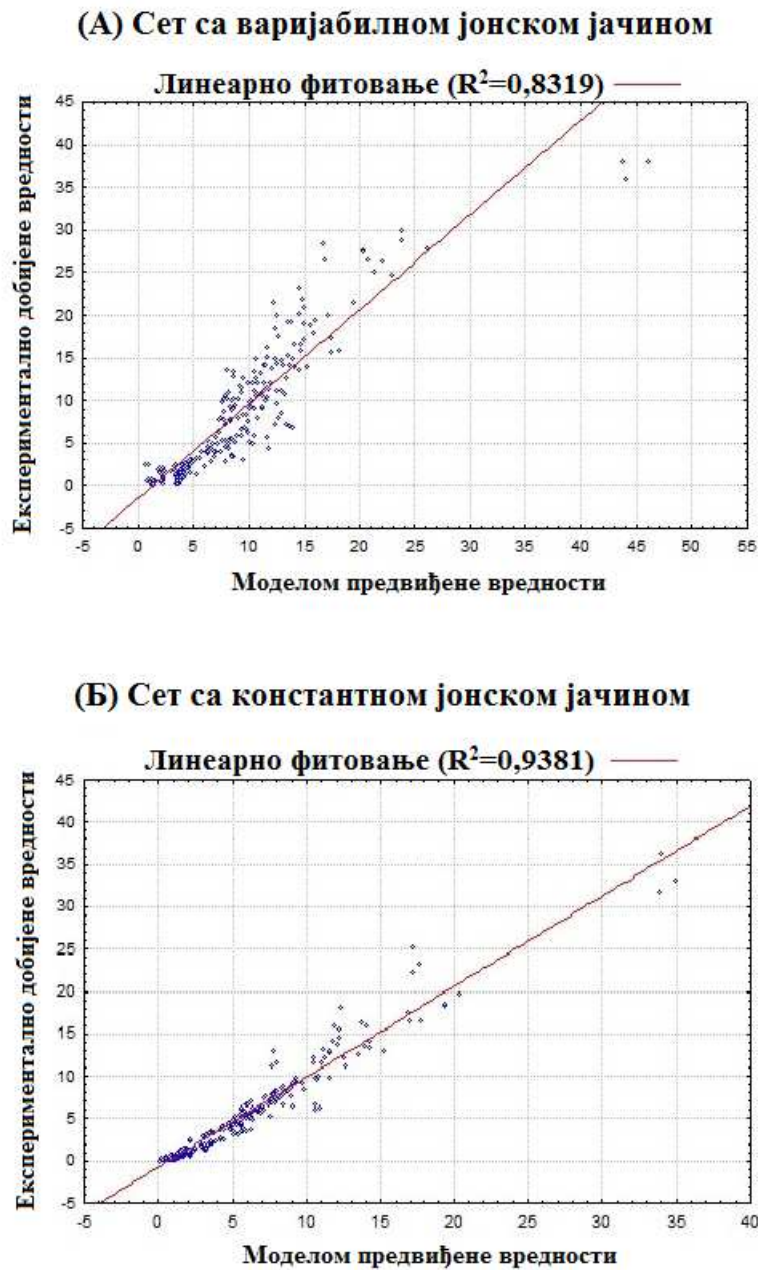
$$k = k_0 + e * \mu * \ln|\psi| * |L| + s * L2p^2 * [H] - m * [H] \quad (52)$$

Применом модела приказаног једначином 52 на податке из тренинг сета добијене су добре предиктивне перформансе модела, а затим потврђене применом овог модела на податке из тест сета. Перформансе модела приказане су у табели 13 и илустроване на слици 20.

**Табела 13.** Перформансе модела.

(Прилагођено из: **Ј. Čolović**, М. Kalinić, А. Vemić, S. Erić, А. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017) 68-76.)

	<i>Константе модела</i>	<i>Тренинг сет n = 207</i>	<i>Тест сет n = 66</i>
<i>Системи са варијабилном јонском јачином</i>	$e = 0,012889$ $s = 0,023285$ $m = 0,180474$	$R = 0,9105$ $R^2 = 0,8290$	$R = 0,9215$ $R^2 = 0,8491$
<i>Системи са константном јонском јачином</i>	$e = 0,006151$ $s = 0,014892$ $m = 0,054284$	$R = 0,9669$ $R^2 = 0,9348$	$R = 0,9505$ $R^2 = 0,9035$



**Слика 20.** Зависност моделом предвиђених vs. експериментално добијених вредности ретенционих фактора ( $k$ ) у експерименталном сету са (А) варијабилном јонском јачином; (Б) константном јонском јачином.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017) 68-76.)

Емпријски модел развијен у овој студији имао је за циљ описивање ретенције протонованих аналита у присуству супротно наелектрисаних хаотропних јона, али овај модел се може модификовати и прилагодити тако да на адекватан начин описује и ретенционо понашање неутралних и цвтерјонских једињења, што може представљати предмет истраживања неке наредне студије.

На крају, треба нагласити да домен применљивости предложеног емпиријског ретенционог модела није ограничен само на хемијски простор дефинисан структурама испитиваних аналита, већ и избором комбинације састава мобилне фазе и стационарне фазе. Ово се не може сматрати ограничењем модела, пошто његова предност лежи у чињеници да су коефицијенти линеарног модела специфични за систем и имају јасно физичко значење. Из тих разлога се овај модел може користити у компаративним студијама за процену доприноса различитих карактеристика хроматографских система специфичним ретенционим процесима који су у основи хаотропне хроматографије.

Ова могућност предложеног модела искоришћена је за поређење система испитиваних у овој студији и дефинисање процеса који највише доприносе ретенцији испитиваних аналита. У циљу спровођења такве анализе, израчунате су вредности константи модела за сваку испитивану рН вредност мобилне фазе у оба сета експеримената. Добро је позната чињеница да се коефицијенти линеарног модела могу упоређивати само након кодирања вредности фактора тако да вредности свих коефицијената буду исказане у истој скали [96]. Метода *min-max* нормализације изабрана је као одговарајућа за кодирање испитиваних фактора због своје једноставности [97]. Вредности коефицијената линеарног модела израчунате за нормализоване вредности фактора и њихова статистичка процена приказане су у табели 14.

**Табела 14.** Вредности коефицијената модела израчунате за вредности фактора нормализоване применом *min-max* методе и њихова статистичка процена.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, J. Chromatogr. A 1511 (2017) 68-76.)

<b>Варијабилна јонска јачина</b>			
	<b>Коефицијенти модела</b>	<b><i>p</i> - вредност</b>	<b><i>R</i></b>
<b><i>pH</i> 2</b>	$e = 31,56795^{***}$	0,000000	0,9449
	$s = 29,10427^{***}$	0,000000	
	$m = 0,88902$	0,307600	
<b><i>pH</i> 3</b>	$e = 37,84440^{***}$	0,000000	0,9156
	$s = 28,74658^{***}$	0,000000	
	$m = 1,94857$	0,093413	
<b><i>pH</i> 4</b>	$e = 40,34209^{***}$	0,000000	0,8770
	$s = 26,81185^{***}$	0,000000	
	$m = 2,85374$	0,040091	
<b>Константна јонска јачина</b>			
	<b>Коефицијенти модела</b>	<b><i>p</i> - вредност</b>	<b><i>R</i></b>
<b><i>pH</i> 2</b>	$e = 21,11165^{***}$	0,000000	0,9509
	$s = 24,63545^{***}$	0,000000	
	$m = -0,59811$	0,353856	
<b><i>pH</i> 3</b>	$e = 20,58016^{***}$	0,000000	0,9500
	$s = 23,31700^{***}$	0,000000	
	$m = -0,58590$	0,348567	
<b><i>pH</i> 4</b>	$e = 21,25250^{***}$	0,000000	0,9534
	$s = 26,68301^{***}$	0,000000	
	$m = -1,11105$	0,099183	

\*\*\*Статистички значајни коефицијенти ( $p < 0,01$ )

У свим моделима, процењене вредности коефицијента  $m$  нису статистички значајне што указује да процеси јонског спаривања у мобилној фази нису статистички значајни у испитиваним системима. У хроматографским системима са константном јонском јачином, параметри  $e$  и  $s$  су статистички значајни, али су њихове вредности веома сличне за мобилне фазе различитих  $pH$  вредности. Са друге стране, у хроматографским системима са варијабилном јонском јачином, параметри  $e$  и  $s$  су такође статистички значајни, вредности параметра  $s$  су готово константне за

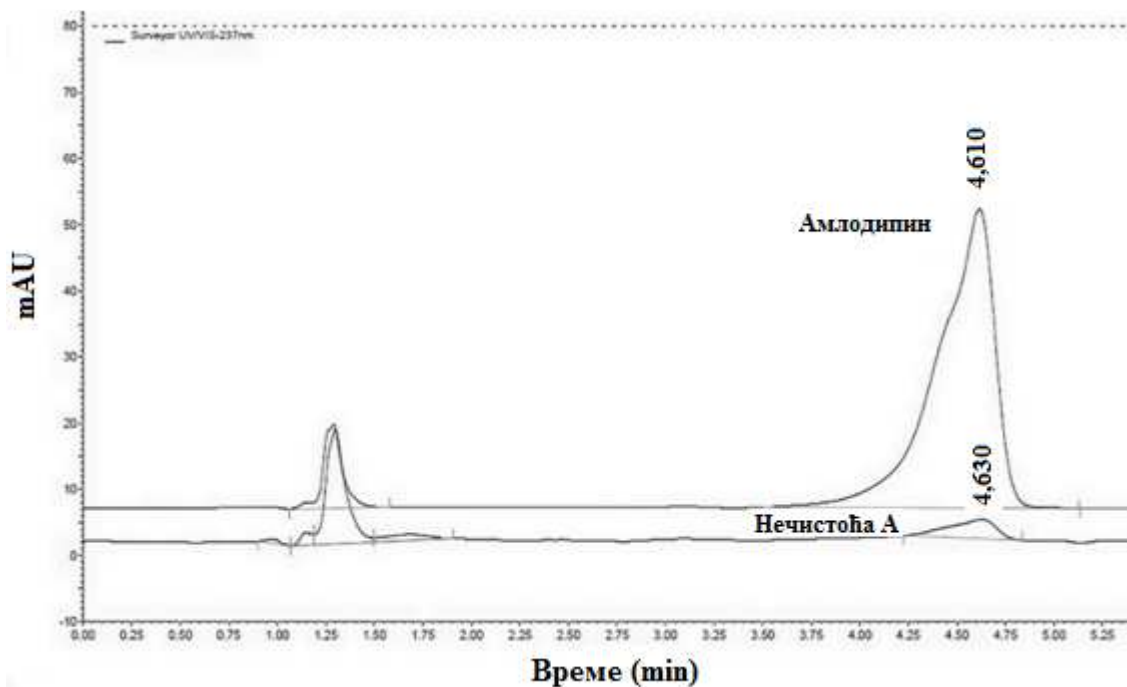


све испитиване рН вредности мобилне фазе, а вредности параметра  $e$  расту са порастом рН вредности. Разматрањем нормализованих вредности коефицијената модела при различитим рН вредностима још једном је потврђена важност интеракција анализата са електричним двослојем на стационарној фази у системима хаотропне хроматографије.

#### 4.3. Тестирање способности полиномски-модификованог Гаусовог модела за описивање и симулацију хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће А у јон-интеракционој хроматографији

Математички модели се успешно примењују за описивање промена у облику хроматографских пикова које настају као последица промена у хроматографским условима [62, 63]. У овој студији предложена је нова тростепена процедура израчунавања константи полиномски-модификованог Гаусовог модела (ПМГ) и тестирана је способност модела да опише промене у облику пика амлодипина и његове нечистоће А (слика 10) у системима хаотропне хроматографије.

Амлодипин је једињење са израженим базним особинама:  $pK_a$  вредност износи 9,45, а  $\log D$  вредности су: -1,40 (pH 1,50), -1,38 (pH 5,00), -1,05 (pH 6,0) и - 0,37 (pH 7,40) [71]. Нечистоћа А је неутрална, па су вредности  $\log D$  и  $\log P$  исте и износе 3,18 [71]. Међутим, у структури нечистоће А постоји енаминска структура која се услед имино-енаминске таутомерије може трансформисати до имиона који представља слабо базно једињење ( $pK_a \sim 3,16$ ), па се зато може очекивати да се њено ретенционо понашање мења у присуству хаотропних агенаса. У циљу праћења и процене побољшања ретенције, облика пика и ефикасности услед додатка перхлорне киселине као хаотропног агенса, на слици 21 приказан је хроматограм испитиваних супстанци када хаотропни агенси нису додати у мобилну фазу.



**Слика 21.** Хроматограм амлодипина и његове нечистоће А: мобилна фаза ацетонитрил-вода (рН вредност водене фазе подешенана 2,20 са *conc.* HCl) (33:67%, V/V).

(Прилагођено из: **J. Čolović**, A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica *J. Sep. Sci* 37 (2014) 1797-1804.)

#### **4.3.1. Тростепенa процедура за израчунавање коефицијената полиномски-модификованог Гаусовог модела**

Најсликовитији начин за описивање утицаја хаотропних агенаса на промене у облику хроматографских пикова и сепарацију супстанци је симулација облика пика. У овој студији је примећен ПМГ модел [66] за предвиђање промена у облику хроматографских пикова које настају као последица промена у експерименталним условима. Предложена је нова процедура за израчунавање коефицијената ПМГ модела која комбинује методологију експерименталног дизајна и индиректно моделовање, а састоји се од следећих корака:

1) директно моделовање ретенционих фактора ( $k$ ) и висине пика ( $H$ ) под хроматографским условима датим у експерименталном плану који је дефинисан применом експерименталног дизајна;

2) индиректно моделовање вредности ширине пикова на 10% висине ( $W_{0,1}$ ) према једначини 27; вредности ширине узлазног дела пика ( $A$ ) према једначини 28, ширине силазног дела пика ( $B$ ) према једначини 29; ефикасности ( $N$ ), фактора асиметрије ( $B/A$ ) и *tailing* фактор ( $Tf$ ) према следећим једначинама:

$$N = \frac{41,7(k_A+1)^2}{(k_E-k_B)^2 \left( \frac{k_E-k_A}{k_A-k_B} + 1,25 \right)} \quad (53)$$

$$B/A = \frac{k_E-k_A}{k_A-k_B} \quad (54)$$

$$Tf = \frac{k_E-k_B}{2(k_A-k_B)} \quad (55)$$

3) израчунавање коефицијената  $s_0$  и  $s_1$  према једначинама 30 и 31.

#### **4.3.2. Примена предложене тростепене процедуре за описивање хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће $A$ у системима хаотропне хроматографије**

У овој студији експерименти су изведени према експерименталном плану који је дефинисан централним композиционим дизајном. Прикупљени су експериментални подаци неопходни за дефинисање математичких модела. Одабран је ка центру страна коцке оријентисан централни композициони дизајн, а како су разматрана 3 фактора и урађене 4 репликације у централној тачки, укупан број изведених експеримената био је  $2^3+2*3+4 = 18$  експеримената. Испитивани фактори и њихови нивои били су: фактор  $X_1$ —садржај ацетонитрила у мобилној фази (32%–42%), фактор  $X_2$ —концентрација перхлорне киселине као хаотропног агенса у воденој

фази (25mM–75mM) и фактор X3–температура колоне (20°C–40°C). Као одговори система одабрани су ретенциони фактори који одговарају почетку пика на 10% висине пика ( $k_B$ ), врху пика ( $k_A$ ), крају пика на 10% висине пика ( $k_E$ ), као и висина пика ( $H_0$ ) за свако једињење. Према Шенмакерсу (*Schoenmakers*) [98] вредности ретенционих фактора се морају трансформисати логаритамском функцијом пре било каквог моделовања. Експериментално добијене вредности одговора система приказане су у табели 15.

За све  $\ln k$  вредности експериментални подаци су апроксимирани квадратним моделом, а за вредности  $H_0$  линеарним моделом. Општи облик квадратног модела за три фактора приказан је једначином 56, а линеарног једначином 57:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (56)$$

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (57)$$

где је  $Y$  одговор система,  $x_1$ – $x_3$  испитивани фактори, а  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$  и  $b_{33}$  су коефицијенти модела.

Погодност добијених модела потврђена је тестовима анализе варијансе, *lack-of-fit* тестовима и вредностима коефицијента детерминације. Дефинисани модели са коефицијентима добијеним за реалне вредности фактора, као и одговарајуће вредности  $R^2$ , *adjusted R<sup>2</sup>* (*adj. R<sup>2</sup>*) и *predicted R<sup>2</sup>* (*pred. R<sup>2</sup>*) дати су у табели 16. Добијени математички модели показују добре предиктивне карактеристике у дефинисаном експерименталном домену.

Експериментални простор је подељен на на 605 експерименталних тачака (11 нивоа за садржај ацетонитрила  $\times$  11 нивоа за концентрацију перхлорне киселине  $\times$  5 нивоа за температуру колоне) за које ће бити предвиђено понашање испитиваних анализата. У свакој тачки експерименталног простора израчунате су вредности  $k_B$ ,  $k_A$  и  $k_E$  према следећој једначини:

$$k_{A,B,E} = e^{\hat{Y}_k} \quad (58)$$

где  $\hat{Y}_k$  представља вредности  $\ln k_{A,B,E}$  израчунате из одговарајућих математичких модела датих у табели 16. Вредности  $H_{0imp}$  и  $H_{0amlo}$  такође су израчунате из одговарајућих математичких модела.

Други корак тростепене процедуре подразумева индиректно моделовање  $W_{0,1}$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $B/A$ ,  $N$  и  $Tf$  у свакој тачки експерименталног простора на основу израчунатих вредности ретенционих фактора уз помоћ софтвера *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0 и применом једначина 26–28 и 53–55. Методом претраге чворова мреже који представљају тачке у којима је предвиђано ретенционо понашање, закључено је да се најбољи резултати за ефикасност и *tailing* фактор амлодипина и његове нечистоће А добијају при температури колоне од 40°C. Из тог разлога, помоћу софтвера *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0, конструисани су 3D графици на 40°C:  $N_{imp} = f(\%ACN, \text{mM HClO}_4)$ ,  $Tf_{imp} = f(\%ACN, \text{mM HClO}_4)$ ,  $N_{amlo} = f(\%ACN, \text{mM HClO}_4)$  и  $Tf_{amlo} = f(\%ACN, \text{mM HClO}_4)$  (слика 22) као уобичајени начин за дефинисање одговарајућег експерименталног простора за симулацију ретенционог понашања.

**Табела 15.** Одговори система добијени из експеримената дефинисаних применом ка центру страна коцке оријентисаним централним композиционим дизајном.

(Прилагођено из: **Ј. Čolović**, A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica J. Sep. Sci 37 (2014) 1797-1804.)

№	Фактори			Одговори							
	Ацетонитрил (%)	Концентрација $\text{HClO}_4$ (mM)	Температура колоне ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\ln k_{B\text{imp}}$	$\ln k_{A\text{imp}}$	$\ln k_{E\text{imp}}$	$\ln k_{B\text{amlo}}$	$\ln k_{A\text{amlo}}$	$\ln k_{E\text{amlo}}$	$H_{0\text{imp}}$ (mAU)	$H_{0\text{amlo}}$ (mAU)
1.	32	25	20	2,074	2,096	2,123	2,854	2,874	2,899	15,5	79,1
2.	42	25	20	0,632	0,668	0,712	1,171	1,201	1,239	42,8	314,1
3.	32	75	20	2,325	2,348	2,373	3,114	3,134	3,157	11,6	58,6
4.	42	75	20	0,884	0,92	0,961	1,44	1,467	1,5	39,2	265
5.	32	25	40	1,7	1,723	1,751	2,417	2,436	2,462	20,5	110,1
6.	42	25	40	0,376	0,41	0,462	0,896	0,927	0,965	41,1	313,2
7.	32	75	40	1,956	1,977	2,002	2,675	2,695	2,718	15,3	81,9
8.	42	75	40	0,608	0,647	0,689	1,141	1,168	1,203	38,3	282,2
9.	32	50	30	2,045	2,067	2,092	2,798	2,818	2,841	15,5	81,3
10.	42	50	30	0,656	0,691	0,746	1,2	1,224	1,26	46,0	335,7
11.	37	25	30	1,128	1,157	1,192	1,765	1,789	1,818	25,3	163,3
12.	37	75	30	1,371	1,397	1,428	2,011	2,034	2,06	24,0	148,7
13.	37	50	20	1,433	1,461	1,493	2,084	2,107	2,135	27,2	165,0
14.	37	50	40	1,134	1,161	1,193	1,745	1,768	1,796	32,3	210,5
15.	37	50	30	1,301	1,329	1,36	1,937	1,96	1,988	26,9	167,1
16.	37	50	30	1,282	1,31	1,34	1,918	1,941	1,969	27,9	175,2
17.	37	50	30	1,284	1,312	1,344	1,921	1,944	1,972	30,6	191,3
18.	37	50	30	1,296	1,322	1,353	1,93	1,953	1,981	32,4	202,4

$k_{B\text{imp}}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика нечистоће А;  $k_{A\text{imp}}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика нечистоће А;  $k_{E\text{imp}}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика нечистоће А;  $k_{B\text{amlo}}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика амлодипина;  $k_{A\text{amlo}}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика амлодипина;  $k_{E\text{amlo}}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика амлодипина;  $H_{0\text{imp}}$  – висина пика нечистоће А;  $H_{0\text{amlo}}$  – висина пика амлодипина

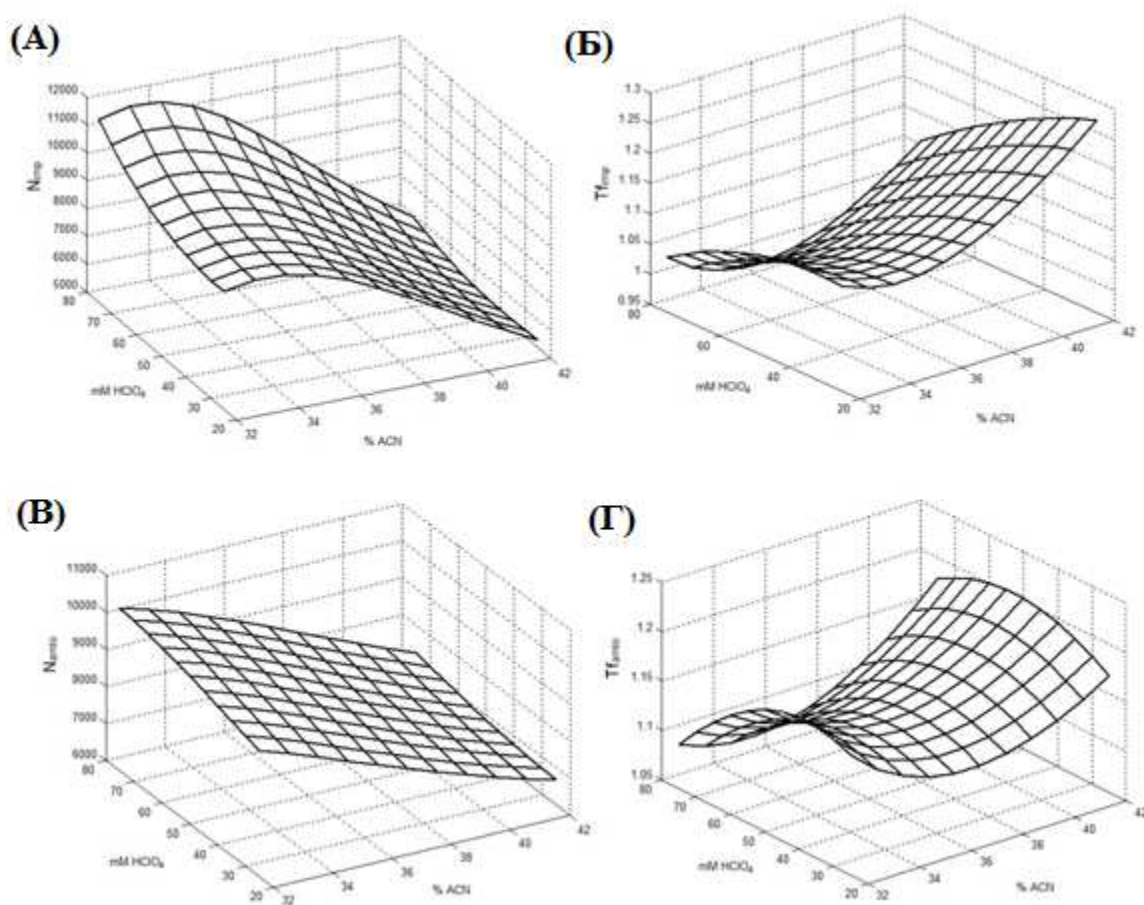
**Табела 16.** Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ , *adjusted R<sup>2</sup> (adj. R<sup>2</sup>)* и *predicted R<sup>2</sup> (pred. R<sup>2</sup>)*.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica J. Sep. Sci 37 (2014) 1797-1804.)

Аналит	Математички модели	$R^2$	<i>adj. R<sup>2</sup></i>	<i>pred. R<sup>2</sup></i>
<b>Нечистоћа А</b>	$\ln k_{A_{\text{imp}}} = 10,742 - 0,353x_1 + 0,0113x_2 - 0,035x_3 - 0,000017 x_1x_2 + 0,00053x_1x_3 - 0,0000065x_2x_3 + 0,0027x_1^2 - 0,000055x_2^2 - 0,0000035x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9994
	$\ln k_{B_{\text{imp}}} = 10,673 - 0,350x_1 + 0,0116x_2 - 0,0345x_3 - 0,000023x_1x_2 + 0,00053x_1x_3 - 0,0000075x_2x_3 + 0,0027x_1^2 - 0,000056x_2^2 - 0,0000063x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9992
	$\ln k_{E_{\text{imp}}} = 11,016 - 0,369x_1 + 0,0117x_2 - 0,034x_3 - 0,000025x_1x_2 + 0,00055x_1x_3 - 0,0000105x_2x_3 + 0,0029x_1^2 - 0,000056x_2^2 - 0,0000228x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9993
	$H_{0_{\text{imp}}} = -66,989 + 2,580x_1 - 0,067x_2 + 0,112x_3$	0,9413	0,9287	0,9083
<b>Амлодипин</b>	$\ln k_{A_{\text{amlo}}} = 13,016 - 0,412x_1 + 0,011x_2 - 0,0420x_3 - 0,000012x_1x_2 + 0,00076x_1x_3 - 0,000013x_2x_3 + 0,00312x_1^2 - 0,0000505x_2^2 - 0,000056x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9993
	$\ln k_{B_{\text{amlo}}} = 13,039 - 0,414x_1 + 0,011x_2 - 0,0414x_3 - 0,000004x_1x_2 + 0,00076x_1x_3 - 0,000013x_2x_3 + 0,00312x_1^2 - 0,0000525x_2^2 - 0,000063x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9994
	$\ln k_{E_{\text{amlo}}} = 13,109 - 0,417x_1 + 0,011x_2 - 0,0423x_3 - 0,000015x_1x_2 + 0,00076x_1x_3 - 0,000013x_2x_3 + 0,00319x_1^2 - 0,0000507x_2^2 - 0,000052x_3^2$	0,9999	0,9998	0,9994
	$H_{0_{\text{amlo}}} = -633,741 + 21,984x_1 - 0,573x_2 + 0,161x_3$	0,959	0,9512	0,9400

$k_{B_{\text{imp}}}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика нечистоће А,  $k_{A_{\text{imp}}}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика нечистоће А,  $k_{E_{\text{imp}}}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика нечистоће А,  $H_{0_{\text{imp}}}$  – висина пика нечистоће А,  $k_{B_{\text{amlo}}}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика амлодипина,  $k_{A_{\text{amlo}}}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика амлодипина,  $k_{E_{\text{amlo}}}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика амлодипина,  $H_{0_{\text{amlo}}}$  – висина пика амлодипина





**Слика 22.** 3D графици: (А)  $N_{imp} = f(\% \text{ACN}, \text{mM HClO}_4)$ , (Б)  $Tf_{imp} = f(\% \text{ACN}, \text{mM HClO}_4)$ , (В)  $N_{amlo} = f(\% \text{ACN}, \text{mM HClO}_4)$ , (Г)  $Tf_{amlo} = f(\% \text{ACN}, \text{mM HClO}_4)$ .  
(Прилагођено из: **J. Čolović**, A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica *J. Sep. Sci* 37 (2014) 1797-1804.)

На основу графичке презентације на слици 22 може се уочити да најробуснији регион за  $N_{amlo}$  и  $N_{imp}$  представља део експерименталног простора у којем је садржај ацетонитрила у мобилној фази од 32%–35%, а концентрација перхлорне киселине у воденој фази 50mM–75mM. У овом експерименталном простору број теоријских платоа за оба анализита је преко 9000. За  $Tf_{amlo}$  и  $Tf_{imp}$  дефинисан је критеријум за избор одговарајућег експерименталног простора тако да  $Tf$  вредности оба анализита буду између 0,9 и 1,1. Регион који испуњава дефинисани критеријум за  $Tf$  одговара садржају ацетонитрила од 32%–38%, као и концентрацији перхлорне киселине у

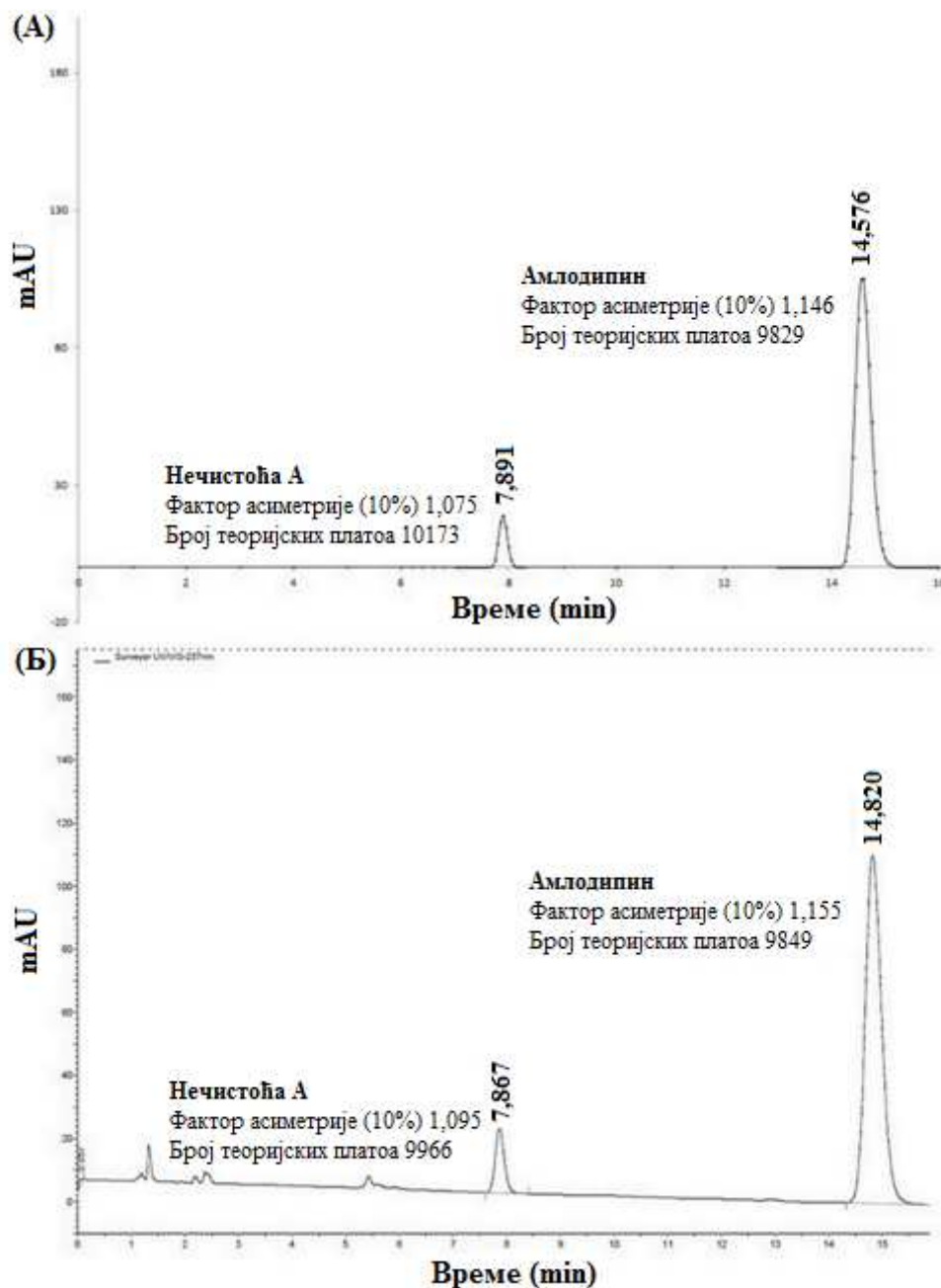
воденој фази 25mM–75mM. На основу предвиђених резултата и унапред дефинисаних критеријума, одабрани су следећи експериментални услови за симулацију ретенционог понашања амлодипина и његове нечистоће А: 33% ацетонитрила у мобилној фази, 55 mM перхлорне киселине у воденој фази и 40°C температура колоне.

Последњи корак тростепене процедуре подразумева израчунавање коефицијената  $s_0$  и  $s_1$  према једначинама 30 и 31. Израчунате вредности  $s_0$  и  $s_1$  су инкорпориране у једначину 26 и добијене су једначине ПМГ модела за амлодипин (59) и нечистоћу А (60):

$$h_{imp} = 18,928 e^{\left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t-7,891}{0,0756+0,0327(t-7,891)} \right)^2 \right]} \quad (59)$$

$$h_{amlo} = 106,623 e^{\left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t-14,576}{0,1365+0,0595(t-14,576)} \right)^2 \right]} \quad (60)$$

Одговарајући хроматограм са предвиђеним вредностима ретенционих времена, фактора асиметрије и броја теоријских платоа приказан је на слици 23А. Са циљем да се верификује способност ПМГ модела да опише облик хроматографског пика, као и погодност предложене тростепене процедуре за симулацију хроматограма, амлодипин и његова нечистоћа А су анализирани под одабраним експерименталним условима (слика 23Б). Поређењем предвиђених и експериментално добијених вредности, као и визуелном проценом предвиђеног и експериментално добијеног хроматограма потврђено је одлично слагање хроматографског понашања амлодипина и његове нечистоће А које је добијено симулацијом и експерименталним путем. Потврђена је погодност ПМГ модела и новопредложене тростепене процедуре за предвиђање хроматографског понашања у системима хаотропне хроматографије.



**Слика 23.** (А) Хроматограм симулиран применом ПМГ модела и тростепене процедуре: мобилна фаза: ацетонитрил-55 mM перхлорне киселине (pH водене фазе подешен на 2,20 *сop.* HCl) (33:67, V/V), 40°C температура колоне; (Б) Хроматограм добијен експериментално под хроматографским условима наведеним код хроматограма 23А.

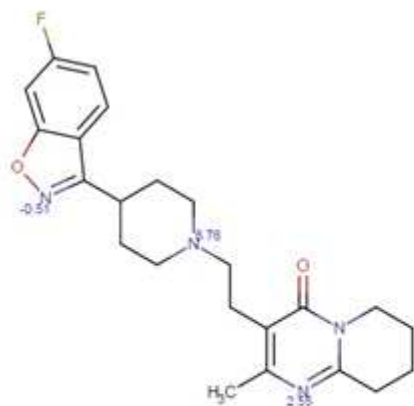
(Прилагођено из: **J. Čolović**, A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica *J. Sep. Sci* 37 (2014) 1797-1804.)

#### **4.4. Процена перформанси модификованих стационарних фаза праћењем утицаја квалитативних и квантитативних хроматографских параметара у хаотропној хроматографији на примеру респеридона и његових нечистоћа**

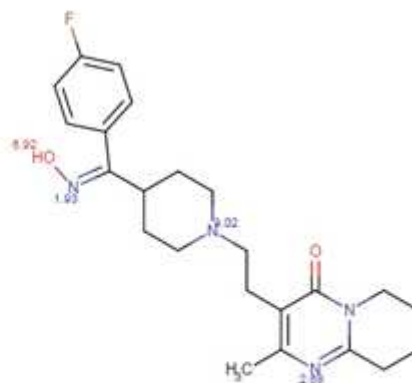
Развој аналитичких метода за одређивање сродних супстанци представља један од највећих изазова за аналитичаре зато што долази до преклапања хроматографских пикова услед структурне сличности анализата. Коришћење математичких функција за предвиђање хроматографског понашања у зависности од експерименталних услова у великој мери доприноси ефикаснијем развоју ових аналитичких метода. Сходно томе, циљ ове студије био је развој и тестирање процедуре за карактеризацију модификованих стационарних фаза при симултаном варирању квалитативних и квантитативних хроматографских фактора у системима хаотропне хроматографије. Као модел супстанце одабрани су респеридон и његове три нечистоће, док је комбинација методологије експерименталног дизајна, индиректног моделовања и ПМГ модела примењена за симулацију хроматограма. Поред тога, приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика процењене су сепарационе карактеристике две различито модификоване стационарне фазе у присуству  $\text{NaClO}_4$  и  $\text{CF}_3\text{COONa}$  као хаотропних агенаса.

##### **4.4.1. Прелиминарна испитивања**

Процедура за симулацију хроматографског понашања је развијена у системима хаотропне хроматографије пошто су они репрезентативни пример сложених хроматографских система где ретенција анализата зависи од неколико термодинамичких равнотежа (слика 1). Као модел супстанце одабрани су респеридон и његове три нечистоће на основу структурне сличности и карактеристичних физичко-хемијских особина. На слици 24 приказане су структурне формуле испитиваних једињења са одговарајућим  $pK_a$  вредностима [71].



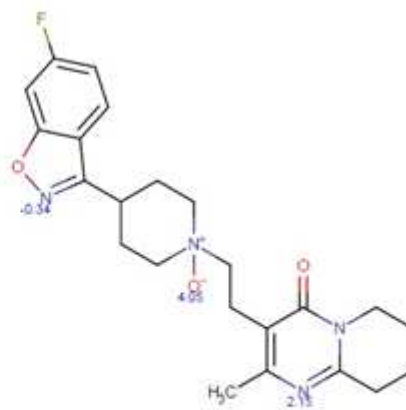
(А) рисперидон



(Б) нечистоћа 1 (серија R082355)



(В) нечистоћа 2 (серија R076960)



(Г) нечистоћа 3 (серија R071611)

**Слика 24.** Хемијске структуре испитиваних супстанци са одговарајућим *pKa* вредностима.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, Anal Bioanal Chem 410 (2018) 4855–4866.)

Сви анализи имају базне функционалне групе у својој структури, али се под испитиваним експерименталним условима рисперидон, нечистоће 1 и 2 доминантно налазе у облику монокатјона, док се јонизационо стање нечистоће 3 мења. У опсегу рН вредности од 3,00 до 5,00 монокатјонски и неутрални облик нечистоће 3 заступљени су у различитом проценту: на рН 3,00 – 91,05% као монокатјон и 8,95% као неутралан; на рН 4,00 – 52,23% као монокатјон и 47,77% као неутралан, док је на

pH 5,00 – 9,87% као монокатјон и 90,13% као неутралан. Дакле, може се очекивати да ће се ретенционо понашање нечистоће 3 и њена осетљивост на присуство хаотропног агенса мењати под дефинисаним експерименталним условима (поглавље 3.5.2.), што даље може условити промене у редоследу елуирања анализата. Предвиђање хроматографског понашања и симулација хроматограма у системима где долази до промене у редоследу елуирања супстанци представља додатни изазов приликом развоја процедуре за симулацију хроматографског понашања.

#### ***4.4.2. Примена тростепене процедуре за израчунавање коефицијената полиномски-модификованог Гаусовог модела за симулацију хроматограма респеридона и његових нечистоћа***

Тростепена процедура за израчунавање коефицијената ПМГ модела описана је у делу 4.3.1. и успешно примењена за праћење промена у облику хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоћа А са променом квантитативних фактора у системима хаотропне хроматографије. Међутим, облик пика је под утицајем како квантитативних фактора тако и квалитативних фактора, па је било потребно испитати погодност предложене процедуре за описивање промена облика пика које настају и услед промене квалитативних фактора као што је нпр. врста стационарне фазе. Са тим циљем, у овој студији је испитивана погодност предложене тростепене процедуре за израчунавање коефицијената ПМГ модела за предвиђање хроматографског понашања респеридона и његове три нечистоће услед промена квалитативних и квантитативних параметара у хаотропној хроматографији.

Први корак тростепене процедуре подразумева директно моделовање ретенционих фактора ( $k$ ) и висине пика ( $H$ ) на основу експерименталног плана добијеног D-оптималним експерименталним дизајном. Овај дизајн је изабран због могућности истовременог испитивања утицаја квалитативних и квантитативних фактора, као и могућности да се унапред дефинише тип математичког модела који ће се применити за моделовање одговора система [49]. У овој студији је одабран квадратни математички модел за описивање зависности између посматраних

одговора система и испитиваних хроматографских фактора. Као одговори система праћени су ретенциони фактори који одговарају почетку пика на 10% висине пика ( $k_B$ ), врху пика ( $k_A$ ), крају пика на 10% висине пика ( $k_E$ ), као и висина пика ( $H_0$ ). Испитивани су следећи квантитативни фактори: садржај ацетонитрила у мобилној фази (20%–30%), рН вредност водене фазе (3,00–5,00) и концентрација хаотропног агенса у воденој фази (50 mM–100 mM); док су као квалитативни фактори одабрани природа хаотропног агенса ( $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ) и врста стационарне фазе (*Zorbax Eclipse XDB*, *Zorbax Extend*). На основу одабраних фактора, одговора и врсте модела, применом *Design Expert 7.0.0.* софтвера креиран је дизајн тачака кандидата (потенцијалне тачке), а затим су применом одговарајућег алгоритма изабране експерименталне тачке дизајна. Избор експерименталних тачака понављан је 5 пута, а коначни сет тачака издвојен је на основу D-оптималног критеријума. Укупан број експеримената предложен од стране софтвера на основу броја фактора и избора модела био је 29, од тога 24 тачке дизајна и 5 репликација у централној тачки (табела 7).

Експериментално добијене вредности одговора система  $k_A$ ,  $k_B$  и  $k_E$  трансформисане су логаритамском функцијом пре моделовања на основу смерница датих од стране Шенмакерса (*Schoenmakers*) [98]. Квадратни модели добијени су помоћу *Design Expert 7.0.0.* софтвера, а поузданост добијених модела потврђена је тестовима анализе варијансе, *lack-of-fit* тестовима и вредностима коефицијента детерминације. Дефинисани модели са коефицијентима израчунатим за реалне вредности фактора, као и одговарајуће вредности  $R^2$ , *adjusted R^2* (*adj. R^2*) и *predicted R^2* (*pred. R^2*) приказане су у табели 17.

**Табела 17.** Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ ,  $adj. R^2$  и  $pred. R^2$ .  
(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, Anal Bioanal Chem 410 (2018) 4855–4866.)

Аналит	Колона и хаотропни агенс	Математички модели	$R^2$	$adj. R^2$	$pred. R^2$
Рисперидон	Zorbax Eclipse NaClO <sub>4</sub>	$\text{Ink}_A \text{ API} = 5,667311721 - 0,167861773x_1 - 0,051262685x_2 + 0,024212275x_3 + 0,00168380x_1x_2 - 0,000303698x_1x_3 - 0,001098373x_2x_3 + 0,000188507x_1^2 + 0,017173129x_2^2 - 6,22149E^{-05}x_3^2$	0,9959	0,9886	0,9234
		$\text{Ink}_B \text{ API} = 5,522082468 - 0,156757032x_1 - 0,049688071x_2 + 0,023961177x_3 + 0,001744979x_1x_2 - 0,000297814x_1x_3 - 0,001095699x_2x_3 - 5,47119E^{-05}x_1^2 + 0,016861743x_2^2 - 6,15759E^{-05}x_3^2$	0,9958	0,9883	0,9211
		$\text{Ink}_E \text{ API} = 5,957697585 - 0,185079275x_1 - 0,086473874x_2 + 0,024437339x_3 + 0,002541969x_1x_2 - 0,000318999x_1x_3 - 0,001184955x_2x_3 - 0,000495987x_1^2 + 0,019642378x_2^2 - 5,87545E^{-05}x_3^2$	0,9961	0,9890	0,9250
		$H \text{ API} = -296,4469611 + 17,37200119x_1 + 54,6492436x_2 - 4,401204496x_3 - 3,976763065x_1x_2 + 0,081984893x_1x_3 + 0,151831649x_2x_3 + 0,149799356x_1^2 + 5,733028819x_2^2 + 0,010056933x_3^2$	0,9935	0,9817	0,8885
	Zorbax Eclipse CF <sub>3</sub> COONa	$\text{Ink}_A \text{ API} = 5,140815772 - 0,192062594x_1 + 0,111627394x_2 + 0,024178569x_3 + 0,001683805x_1x_2 - 0,000303698x_1x_3 - 0,001098373x_2x_3 + 0,000188507x_1^2 + 0,017173129x_2^2 - 6,22149E^{-05}x_3^2$	0,9959	0,9886	0,9234
		$\text{Ink}_B \text{ API} = 5,007974631 - 0,18193428x_1 + 0,114263998x_2 + 0,023982715x_3 + 0,001744979x_1x_2 - 0,000297814x_1x_3 - 0,001095699x_2x_3 - 5,47119E^{-05}x_1^2 + 0,016861743x_2^2 - 6,15759E^{-05}x_3^2$	0,9958	0,9883	0,9211
		$\text{Ink}_E \text{ API} = 5,396984761 - 0,207639094x_1 + 0,078014835x_2 + 0,024264231x_3 + 0,002541969x_1x_2 - 0,000318999x_1x_3 - 0,001184955x_2x_3 + 0,000495987x_1^2 + 0,019642378x_2^2 - 5,87545E^{-05}x_3^2$	0,9961	0,9890	0,9250
		$H \text{ API} = -350,5846447 + 24,12675241x_1 + 23,66299301x_2 - 3,206931939x_3 - 3,976763065x_1x_2 + 0,081984893x_1x_3 + 0,151831649x_2x_3 + 0,149799356x_1^2 + 5,733028819x_2^2 + 0,010056933x_3^2$	0,9935	0,9817	0,8885
	Zorbax Extend NaClO <sub>4</sub>	$\text{Ink}_A \text{ API} = 4,983437907 - 0,157307108x_1 - 0,020676257x_2 + 0,024808846x_3 + 0,001683805x_1x_2 - 0,000303698x_1x_3 - 0,001098373x_2x_3 + 0,000188507x_1^2 + 0,017173129x_2^2 - 6,22149E^{-05}x_3^2$	0,9959	0,9886	0,9234
		$\text{Ink}_B \text{ API} = 4,813891646 - 0,145723348x_1 - 0,017711292x_2 + 0,0245327565x_3 + 0,001744979x_1x_2 - 0,000297814x_1x_3 - 0,001095699x_2x_3 - 5,47119E^{-05}x_1^2 + 0,016861743x_2^2 - 6,15759E^{-05}x_3^2$	0,9958	0,9883	0,9211
		$\text{Ink}_E \text{ API} = 5,340747232 - 0,175743424x_1 - 0,059670203x_2 + 0,024953095x_3 + 0,002541969x_1x_2 - 0,000318999x_1x_3 - 0,001184955x_2x_3 + 0,000495987x_1^2 + 0,019642378x_2^2 - 5,87545E^{-05}x_3^2$	0,9961	0,9890	0,9250
		$H \text{ API} = -333,8831726 + 31,36705047x_1 - 1,82292375x_2 - 4,398541895x_3 - 3,976763065x_1x_2 + 0,081984893x_1x_3 + 0,151831649x_2x_3 + 0,149799356x_1^2 + 5,733028819x_2^2 + 0,010056933x_3^2$	0,9935	0,9817	0,8885
	Zorbax Extend CF <sub>3</sub> COONa	$\text{Ink}_A \text{ API} = 4,396090449 - 0,18150793x_1 + 0,142213822x_2 + 0,024775139x_3 + 0,001683805x_1x_2 - 0,000303698x_1x_3 - 0,001098373x_2x_3 + 0,000188507x_1^2 + 0,017173129x_2^2 - 6,22149E^{-05}x_3^2$	0,9959	0,9886	0,9234
		$\text{Ink}_B \text{ API} = 4,813891646 - 0,145723348x_1 - 0,017711292x_2 + 0,0245327565x_3 + 0,001744979x_1x_2 - 0,000297814x_1x_3 - 0,001095699x_2x_3 - 5,47119E^{-05}x_1^2 + 0,016861743x_2^2 - 6,15759E^{-05}x_3^2$	0,9958	0,9883	0,9211
		$\text{Ink}_E \text{ API} = 5,340747232 - 0,175743424x_1 - 0,059670203x_2 + 0,024953095x_3 + 0,002541969x_1x_2 - 0,000318999x_1x_3 - 0,001184955x_2x_3 + 0,000495987x_1^2 + 0,019642378x_2^2 - 5,87545E^{-05}x_3^2$	0,9961	0,9890	0,9250
		$H \text{ API} = -333,8831726 + 31,36705047x_1 - 1,82292375x_2 - 4,398541895x_3 - 3,976763065x_1x_2 + 0,081984893x_1x_3 + 0,151831649x_2x_3 + 0,149799356x_1^2 + 5,733028819x_2^2 + 0,010056933x_3^2$	0,9935	0,9817	0,8885



Табела 17. (наставак) Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ ,  $adj. R^2$  и  $pred. R^2$ .

Аналит	Колона и хаотронни агенс	Математички модели	$R^2$	$adj. R^2$	$pred. R^2$
Нечистоћа 1	Zorbax Eclipse NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp1} = 4,352572971 - 0,130091913x_1 + 0,046220645x_2 + 0,021439033x_3 + 0,001552861x_1x_2 - 0,000271157 x_1x_3 - 0,000952353 x_2x_3 - 0,000324775 x_1^2 + 0,005509394 x_2^2 - 5,65373E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9850	0,8874
		$\lnk_B \text{ imp1} = 4,231424424 - 0,12061513x_1 + 0,042395778x_2 + 0,021421913x_3 + 0,002017259x_1x_2 - 0,000267067x_1x_3 - 0,000941609x_2x_3 - 0,000573053x_1^2 + 0,004534157x_2^2 - 5,7117E^{-05} x_3^2$	0,9944	0,9844	0,8815
		$\lnk_E \text{ imp1} = 4,698719794 - 0,159810462x_1 + 0,05767041x_2 + 0,022361702x_3 + 0,001615112x_1x_2 - 0,000290184x_1x_3 - 0,001019119x_2x_3 - 0,000292487x_1^2 + 0,003898518x_2^2 - 5,83353E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9849	0,8840
		$H \text{ imp1} = -54,99931669 - 9,842921271x_1 - 34,21231098x_2 - 0,502935933x_3 - 0,161802619x_1x_2 + 0,007429884x_1x_3 + 0,008924868x_2x_3 - 0,158588646x_1^2 + 5,031541566x_2^2 + 0,001853023 x_3^2$	0,9931	0,9806	0,8892
	Zorbax Eclipse CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp1} = 3,944599882 - 0,159685976x_1 + 0,211721867x_2 + 0,021694113x_3 + 0,001552861x_1x_2 - 0,000271157 x_1x_3 - 0,000952353 x_2x_3 - 0,000324775 x_1^2 + 0,005509394 x_2^2 - 5,65373E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9850	0,8874
		$\lnk_B \text{ imp1} = 3,841590308 - 0,152143257x_1 + 0,212922058x_2 + 0,021709201x_3 + 0,002017259x_1x_2 - 0,000267067x_1x_3 - 0,000941609x_2x_3 - 0,000573053x_1^2 + 0,004534157x_2^2 - 5,7117E^{-05} x_3^2$	0,9944	0,9844	0,8815
		$\lnk_E \text{ imp1} = 4,235622257 - 0,186355327x_1 + 0,22309137x_2 + 0,022453481x_3 + 0,001615112x_1x_2 - 0,000290184x_1x_3 - 0,001019119x_2x_3 - 0,000292487x_1^2 + 0,003898518x_2^2 - 5,83353E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9849	0,8840
		$H \text{ imp1} = -53,98103916 + 10,08655848x_1 - 37,11262245x_2 - 0,361581273x_3 - 0,161802619x_1x_2 + 0,007429884x_1x_3 + 0,008924868x_2x_3 - 0,158588646x_1^2 + 5,031541566x_2^2 + 0,001853023 x_3^2$	0,9931	0,9806	0,8892
	Zorbax Extend NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp1} = 3,688082538 - 0,120625289x_1 + 0,08347176x_2 + 0,021762423x_3 + 0,001552861x_1x_2 - 0,000271157 x_1x_3 - 0,000952353 x_2x_3 - 0,000324775 x_1^2 + 0,005509394 x_2^2 - 5,65373E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9850	0,8874
		$\lnk_B \text{ imp1} = 3,552509618 - 0,111201993x_1 + 0,082728601x_2 + 0,021644919x_3 + 0,002017259x_1x_2 - 0,000267067x_1x_3 - 0,000941609x_2x_3 - 0,000573053x_1^2 + 0,004534157 x_2^2 - 5,7117E^{-05} x_3^2$	0,9944	0,9844	0,8815
		$\lnk_E \text{ imp1} = 4,056003666 - 0,150331718x_1 + 0,093565809x_2 + 0,022762443x_3 + 0,001615112x_1x_2 - 0,000290184x_1x_3 - 0,001019119x_2x_3 - 0,000292487x_1^2 + 0,003898518x_2^2 - 5,83353E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9849	0,8840
		$H \text{ imp1} = -46,10574433 + 11,68906683x_1 - 42,89726023x_2 - 0,599507499x_3 - 0,161802619x_1x_2 + 0,007429884x_1x_3 + 0,008924868x_2x_3 - 0,158588646x_1^2 + 5,031541566x_2^2 + 0,001853023 x_3^2$	0,9931	0,9806	0,8892
	Zorbax Extend CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp1} = 3,212125116 - 0,150219352x_1 + 0,248972982x_2 + 0,022017504x_3 + 0,001552861x_1x_2 - 0,000271157 x_1x_3 - 0,000952353 x_2x_3 - 0,000324775 x_1^2 + 0,005509394 x_2^2 - 5,65373E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9850	0,8874
		$\lnk_B \text{ imp1} = 3,093273865 - 0,14273012x_1 + 0,253254881x_2 + 0,021932207x_3 + 0,002017259x_1x_2 - 0,000267067x_1x_3 - 0,000941609x_2x_3 - 0,000573053x_1^2 + 0,004534157 x_2^2 - 5,7117E^{-05} x_3^2$	0,9944	0,9844	0,8815
		$\lnk_E \text{ imp1} = 3,521451727 - 0,176876583x_1 + 0,258986769x_2 + 0,022854223x_3 + 0,001615112x_1x_2 - 0,000290184x_1x_3 - 0,001019119x_2x_3 - 0,000292487x_1^2 + 0,003898518x_2^2 - 5,83353E^{-05} x_3^2$	0,9946	0,9849	0,8840
		$H \text{ imp1} = -35,3052465 + 11,93270404x_1 - 45,7975717x_2 - 0,458152838x_3 - 0,161802619x_1x_2 + 0,007429884x_1x_3 + 0,008924868x_2x_3 - 0,158588646x_1^2 + 5,031541566x_2^2 + 0,001853023 x_3^2$	0,9931	0,9806	0,8892

Табела 17. (наставак) Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ ,  $adj. R^2$  и  $pred. R^2$ .

Аналит	Колона и хаотронни агенс	Математички модели	$R^2$	$adj. R^2$	$pred. R^2$
Нечистоћа 2	Zorbax Eclipse NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp2} = 4,207094775 - 0,16367347x_1 + 0,434887679x_2 + 0,019744615x_3 - 0,000106013x_1x_2 - 0,000234396x_1x_3 - 0,00063559x_2x_3 + 0,000241184x_1^2 - 0,032113533x_2^2 - 6,11865E^{-05}x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp2} = 4,067534395 - 0,154059261x_1 + 0,440880039x_2 + 0,019693274x_3 + 0,000290728x_1x_2 - 0,000228367x_1x_3 - 0,000641782x_2x_3 - 8,3714E^{-06}x_1^2 - 0,033954395x_2^2 - 6,13814E^{-05}x_3^2$	0,9945	0,9847	0,8758
		$\lnk_E \text{ imp2} = 4,440216713 - 0,178639841x_1 + 0,411982719x_2 + 0,019887728x_3 - 0,000209918x_1x_2 - 0,000243606x_1x_3 - 0,000657055x_2x_3 + 0,000579906x_1^2 - 0,028488091x_2^2 - 6,03689E^{-05}x_3^2$	0,9948	0,9853	0,8823
		$H \text{ imp2} = -101,1693106 + 11,86604961x_1 - 19,22825855x_2 - 1,105706976x_3 - 0,339692728x_1x_2 + 0,016342592x_1x_3 + 0,037764455x_2x_3 - 0,16538604x_1^2 + 3,85514444x_2^2 + 0,004206385x_3^2$	0,9927	0,9795	0,8333
	Zorbax Eclipse CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp2} = 3,898388039 - 0,195087777x_1 + 0,586423929x_2 + 0,019330407x_3 - 0,000106013x_1x_2 - 0,000234396x_1x_3 - 0,00063559x_2x_3 + 0,000241184x_1^2 - 0,032113533x_2^2 - 6,11865E^{-05}x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp2} = 3,775822285 - 0,187146641x_1 + 0,596287263x_2 + 0,019308334x_3 + 0,000290728x_1x_2 - 0,000228367x_1x_3 - 0,000641782x_2x_3 - 8,3714E^{-06}x_1^2 - 0,033954395x_2^2 - 6,13814E^{-05}x_3^2$	0,9945	0,9847	0,8758
		$\lnk_E \text{ imp2} = 4,096366666 - 0,207735928x_1 + 0,560423164x_2 + 0,019451648x_3 - 0,000209918x_1x_2 - 0,000243606x_1x_3 - 0,000657055x_2x_3 + 0,000579906x_1^2 - 0,028488091x_2^2 - 6,03689E^{-05}x_3^2$	0,9948	0,9853	0,8823
		$H \text{ imp2} = -98,80594346 + 12,7556198x_1 - 25,61637329x_2 - 0,919355975x_3 - 0,339692728x_1x_2 + 0,016342592x_1x_3 + 0,037764455x_2x_3 - 0,16538604x_1^2 + 3,85514444x_2^2 + 0,004206385x_3^2$	0,9927	0,9795	0,8333
	Zorbax Extend NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp2} = 3,476785521 - 0,15164376x_1 + 0,46687913x_2 + 0,019689734x_3 - 0,000106013x_1x_2 - 0,000234396x_1x_3 - 0,00063559x_2x_3 + 0,000241184x_1^2 - 0,032113533x_2^2 - 6,11865E^{-05}x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp2} = 3,323069283 - 0,141988949x_1 + 0,474880708x_2 + 0,019595618x_3 + 0,000290728x_1x_2 - 0,000228367x_1x_3 - 0,000641782x_2x_3 - 8,3714E^{-06}x_1^2 - 0,033954395x_2^2 - 6,13814E^{-05}x_3^2$	0,9945	0,9847	0,8758
		$\lnk_E \text{ imp2} = 3,752158145 - 0,16695795x_1 + 0,438068427x_2 + 0,019863789x_3 - 0,000209918x_1x_2 - 0,000243606x_1x_3 - 0,000657055x_2x_3 + 0,000579906x_1^2 - 0,028488091x_2^2 - 6,03689E^{-05}x_3^2$	0,9948	0,9853	0,8823
		$H \text{ imp2} = -129,4739795 + 17,05417091x_1 - 32,10630988x_2 - 1,277639445x_3 - 0,339692728x_1x_2 + 0,016342592x_1x_3 + 0,037764455x_2x_3 - 0,16538604x_1^2 + 3,85514444x_2^2 + 0,004206385x_3^2$	0,9927	0,9795	0,8333
	Zorbax Extend CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp2} = 3,102747712 - 0,183058067x_1 + 0,61841538x_2 + 0,019275527x_3 - 0,000106013x_1x_2 - 0,000234396x_1x_3 - 0,00063559x_2x_3 + 0,000241184x_1^2 - 0,032113533x_2^2 - 6,11865E^{-05}x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp2} = 2,964060361 - 0,175076329x_1 + 0,630287931x_2 + 0,019210678x_3 + 0,000290728x_1x_2 - 0,000228367x_1x_3 - 0,000641782x_2x_3 - 8,3714E^{-06}x_1^2 - 0,033954395x_2^2 - 6,13814E^{-05}x_3^2$	0,9945	0,9847	0,8758
		$\lnk_E \text{ imp2} = 3,347410434 - 0,196054037x_1 + 0,586508873x_2 + 0,019427708x_3 - 0,000209918x_1x_2 - 0,000243606x_1x_3 - 0,000657055x_2x_3 + 0,000579906x_1^2 - 0,028488091x_2^2 - 6,03689E^{-05}x_3^2$	0,9948	0,9853	0,8823
		$H \text{ imp2} = -109,3551987 + 17,9437411x_1 - 38,49442462x_2 - 1,091288444x_3 - 0,339692728x_1x_2 + 0,016342592x_1x_3 + 0,037764455x_2x_3 - 0,16538604x_1^2 + 3,85514444x_2^2 + 0,004206385x_3^2$	0,9927	0,9795	0,8333

Табела 17. (наставак) Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ ,  $adj. R^2$  и  $pred. R^2$

Аналит	Колона и хаотронни агенс	Математички модели	$R^2$	$adj. R^2$	$pred. R^2$
Нечистоћа 3	Zorbax Eclipse NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp3} = 7,994523914 - 0,625518776 x_1 + 2,16938362 x_2 + 0,012871504 x_3 + 0,009661479 x_1 x_2 + 0,000416343 x_1 x_3 - 0,001617423 x_2 x_3 + 0,007605092 x_1^2 - 0,30030086 x_2^2 - 0,00011388 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp3} = 7,676928371 - 0,607183334 x_1 + 2,214034054 x_2 + 0,013396426 x_3 + 0,008570146 x_1 x_2 + 0,000412382 x_1 x_3 - 0,001701205 x_2 x_3 + 0,007305817 x_1^2 - 0,302417243 x_2^2 - 0,000116045 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8732
		$\lnk_E \text{ imp3} = 8,293503671 - 0,634890101 x_1 + 2,06580493 x_2 + 0,013975539 x_3 + 0,010616203 x_1 x_2 + 0,00038157 x_1 x_3 - 0,001728154 x_2 x_3 + 0,00777207 x_1^2 - 0,289319105 x_2^2 - 0,000112506 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8794
		$\text{sqrt}(\text{H imp3}) = -6,41588184 + 1,117173787 x_1 - 3,663812685 x_2 - 0,019848787 x_3 - 0,025690341 x_1 x_2 - 0,000252415 x_1 x_3 + 0,001404744 x_2 x_3 - 0,016967363 x_1^2 + 0,560347452 x_2^2 + 0,000134946 x_3^2$	0,9950	0,9860	0,9241
	Zorbax Eclipse CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp3} = 7,995767323 - 0,639384866 x_1 + 2,175813035 x_2 + 0,013851517 x_3 + 0,009661479 x_1 x_2 + 0,000416343 x_1 x_3 - 0,001617423 x_2 x_3 + 0,007605092 x_1^2 - 0,30030086 x_2^2 - 0,00011388 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp3} = 7,692263413 - 0,621903295 x_1 + 2,21795302 x_2 + 0,014502151 x_3 + 0,008570146 x_1 x_2 + 0,000412382 x_1 x_3 - 0,001701205 x_2 x_3 + 0,007305817 x_1^2 - 0,302417243 x_2^2 - 0,000116045 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8732
		$\lnk_E \text{ imp3} = 8,240174664 - 0,647689121 x_1 + 2,081459131 x_2 + 0,014810417 x_3 + 0,010616203 x_1 x_2 + 0,00038157 x_1 x_3 - 0,001728154 x_2 x_3 + 0,00777207 x_1^2 - 0,289319105 x_2^2 - 0,000112506 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8794
		$\text{sqrt}(\text{H imp3}) = -7,767513818 + 1,165853093 x_1 - 3,715684417 x_2 - 0,010446248 x_3 - 0,025690341 x_1 x_2 - 0,000252415 x_1 x_3 + 0,001404744 x_2 x_3 - 0,016967363 x_1^2 + 0,560347452 x_2^2 + 0,000134946 x_3^2$	0,9950	0,9860	0,9241
	Zorbax Extend NaClO <sub>4</sub>	$\lnk_A \text{ imp3} = 8,07474324 - 0,617272794 x_1 + 2,087239073 x_2 + 0,01234447 x_3 + 0,009661479 x_1 x_2 + 0,000416343 x_1 x_3 - 0,001617423 x_2 x_3 + 0,007605092 x_1^2 - 0,30030086 x_2^2 - 0,00011388 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp3} = 7,761232257 - 0,599261481 x_1 + 2,129449072 x_2 + 0,012904611 x_3 + 0,008570146 x_1 x_2 + 0,000412382 x_1 x_3 - 0,001701205 x_2 x_3 + 0,007305817 x_1^2 - 0,302417243 x_2^2 - 0,000116045 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8732
		$\lnk_E \text{ imp3} = 8,395049519 - 0,627326737 x_1 + 1,983444502 x_2 + 0,01348759 x_3 + 0,010616203 x_1 x_2 + 0,00038157 x_1 x_3 - 0,001728154 x_2 x_3 + 0,00777207 x_1^2 - 0,289319105 x_2^2 - 0,000112506 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8794
		$\text{sqrt}(\text{H imp3}) = -6,441174399 + 1,266697949 x_1 - 4,144453286 x_2 - 0,028049597 x_3 - 0,025690341 x_1 x_2 - 0,000252415 x_1 x_3 + 0,001404744 x_2 x_3 - 0,016967363 x_1^2 + 0,560347452 x_2^2 + 0,000134946 x_3^2$	0,9950	0,9860	0,9241
	Zorbax Extend CF <sub>3</sub> COONa	$\lnk_A \text{ imp3} = 7,436819235 - 0,631138885 x_1 + 2,093668488 x_2 + 0,013324483 x_3 + 0,009661479 x_1 x_2 + 0,000416343 x_1 x_3 - 0,001617423 x_2 x_3 + 0,007605092 x_1^2 - 0,30030086 x_2^2 - 0,00011388 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8764
		$\lnk_B \text{ imp3} = 7,145007646 - 0,613981441 x_1 + 2,133368038 x_2 + 0,014010337 x_3 + 0,008570146 x_1 x_2 + 0,000412382 x_1 x_3 - 0,001701205 x_2 x_3 + 0,007305817 x_1^2 - 0,302417243 x_2^2 - 0,000116045 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8732
		$\lnk_E \text{ imp3} = 7,721825992 - 0,640125757 x_1 + 1,999098703 x_2 + 0,014322468 x_3 + 0,010616203 x_1 x_2 + 0,00038157 x_1 x_3 - 0,001728154 x_2 x_3 + 0,00777207 x_1^2 - 0,289319105 x_2^2 - 0,000112506 x_3^2$	0,9940	0,9832	0,8794
		$\text{sqrt}(\text{H imp3}) = -6,571581138 + 1,315377255 x_1 - 4,196325018 x_2 - 0,018647059 x_3 - 0,025690341 x_1 x_2 - 0,000252415 x_1 x_3 + 0,001404744 x_2 x_3 - 0,016967363 x_1^2 + 0,560347452 x_2^2 + 0,000134946 x_3^2$	0,9950	0,9860	0,9241

---

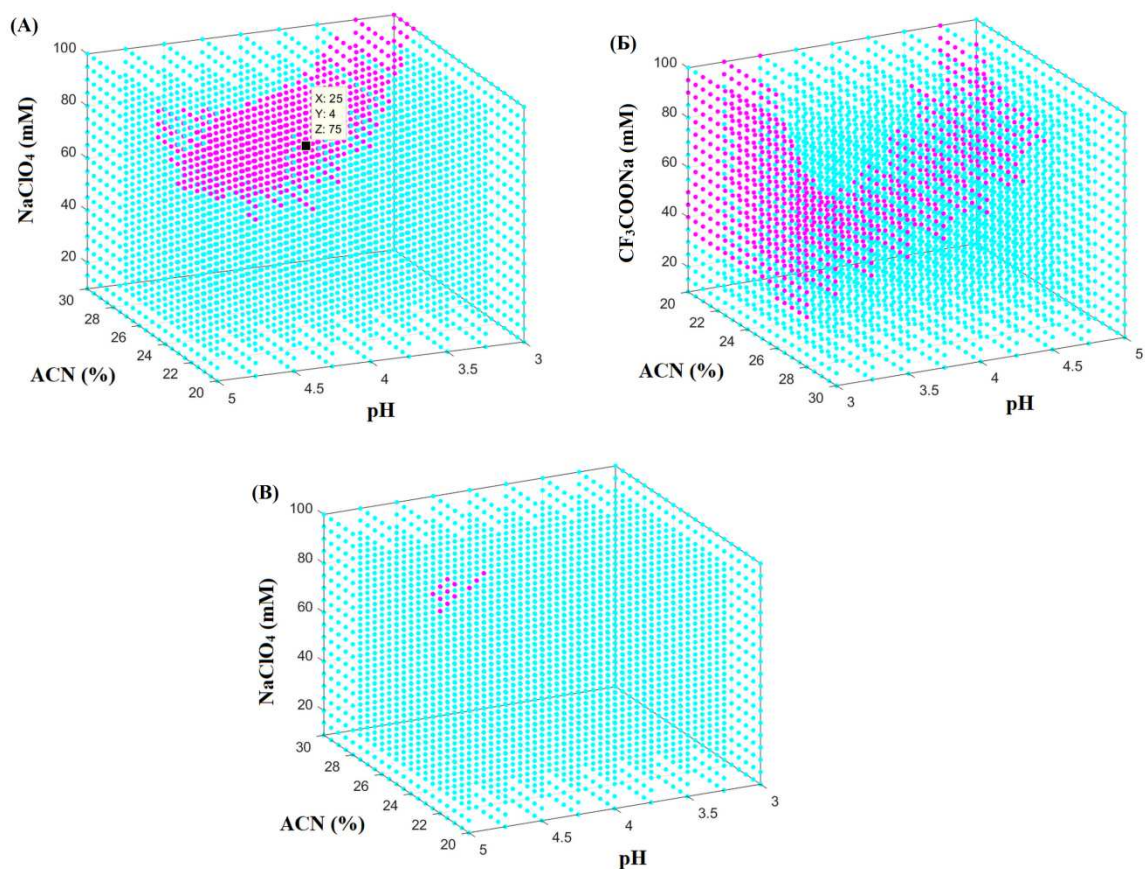
**Табела 17. (наставак)** Математички модели за испитиване одговоре система са одговарајућим вредностима  $R^2$ ,  $adj. R^2$  и  $pred. R^2$ 

---

$k_{Bimp1,2,3}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика нечистоће 1, нечистоће 2 или нечистоће 3;  $k_{Aimp1,2,3}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика нечистоће 1, нечистоће 2 или нечистоће 3;  $k_{Eimp1,2,3}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика нечистоће 1, нечистоће 2 или нечистоће 3;  $H_{oimp1,2,3}$  – висина пика нечистоће 1, нечистоће 2 или нечистоће 3;  $k_{BAPI}$  – ретенциони фактор који одговара почетку пика респеридона;  $k_{API}$  – ретенциони фактор који одговара врху пика респеридона;  $k_{EAPI}$  – ретенциони фактор који одговара крају пика респеридона;  $H_{oAPI}$  – висина пика респеридона

Добијени математички модели имају адекватне предиктивне карактеристике и у следећем кораку извршено је индиректно моделовање. Испитивани експериментални простор дискретизован је на следећи начин: 11 нивоа за садржај ацетонитрила  $\times$  9 нивоа за рН вредност водене фазе  $\times$  19 нивоа за концентрацију хаотропног агенса у воденој фази. Оваквом поделом експерименталног простора добијено је укупно 3591 тачака у којима су израчунате вредности ретенционих фактора ( $k_A$ ,  $k_B$  и  $k_E$ ) и висине пикова ( $H_0$ ) испитиваних супстанци према одговарајућим математичким моделима датим у табели 17. Након тога, за сваку тачку експерименталног простора индиректно су моделоване вредности  $W_{0,1}$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $B/A$ ,  $N$  и  $Tf$  помоћу софтвера *MATLAB*<sup>®</sup> 7.10.0, а на основу израчунатих вредности ретенционих фактора и применом једначина 27–29 и 53–55.

Метода претраге чворова мреже примењена је са циљем утврђивања експерименталних услова при којима се добијају најбоље перформансе стационарних фаза, а као критеријуми одабрани су *tailing* фактор у опсегу  $0,9 \leq Tf \leq 1,2$  и број теоријских платоа  $N \geq 5000$  за све анализе. Уобичајена пракса приликом развоја аналитичких метода је да се претражи експериментални простор у циљу издвајања региона у коме су задовољени претходно дефинисани услови. Применом овог приступа, утврђено је да се задовољавајуће перформансе *Zorbax Eclipse XDB* стационарне фазе могу постићи у присуству обе испитиване хаотропне соли (слика 25А и 25Б). Са друге стране, није било могуће издвојити експериментални регион у коме ће бити испуњени претходно дефинисани критеријуми за *Zorbax Extend* стационарну фазу у системима модификованим додатком  $CF_3COONa$ , док се у системима са  $NaClO_4$ , као адекватан, издваја веома мали део експерименталног домена (слика 25В).



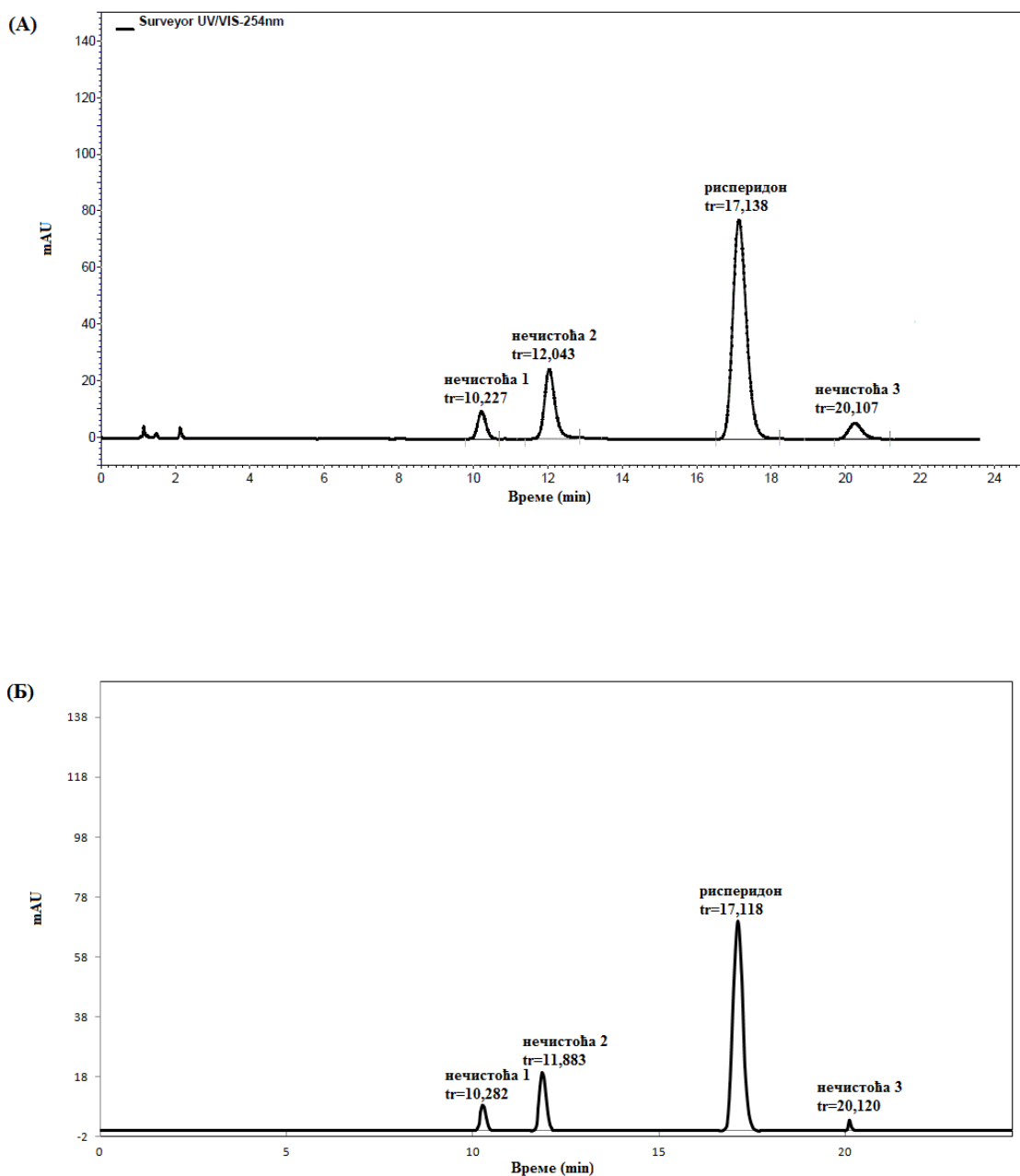
**Слика 25.** Експериментални простор: плаве тачке – експерименталне тачке које не испуњавају дефинисане критеријуме; розе тачке – експерименталне тачке које испуњавају дефинисане критеријуме; црна тачка – одабрана тачка (A) *Zorbax Eclipse XDB* NaClO<sub>4</sub>; (B) *Zorbax Eclipse XDB* CF<sub>3</sub>COONa (mM); (B) *Zorbax Extend* NaClO<sub>4</sub>. (Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.)

За верификацију развијене процедуре одабрана је експериментална тачка из централног дела региона који испуњава дефинисане критеријуме, где је *Zorbax Eclipse XDB* коришћена као колоне док су остали експериментални услови у одабраној тачки били: 25% ацетонитрила, pH вредност водене фазе 4,00 и 75 mM NaClO<sub>4</sub>. За тестирање способности предложене процедуре да предвиђа промене у редоследу елуирања анализата одабрана је тачка којој одговарају следећи

експериментални услови: *Zorbax Eclipse XDB* колона, 21,5% ацетонитрила, рН вредност водене фазе 5,00 и 85 mM NaClO<sub>4</sub>.

Последњи корак тростепене процедуре подразумева израчунавање коефицијената  $s_0$  и  $s_1$  према једначинама 30 и 31 за одабране тачке из испитиваних експерименталних региона.

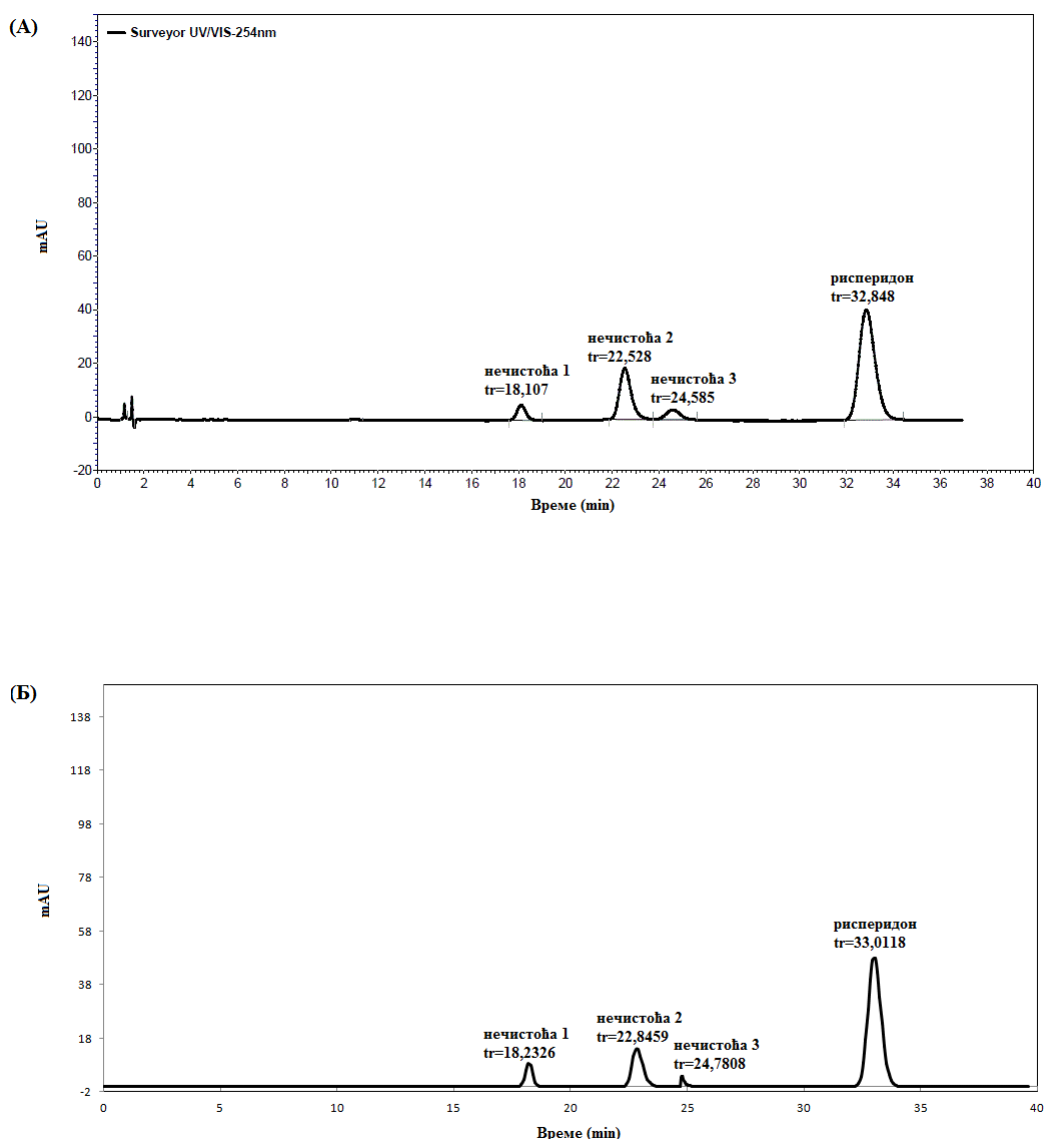
Предвиђени хроматограми добијени предложеном процедуром приказани су на сликама 26Б и 27Б. Изведени су експерименти под експерименталним условима дефинисаним у одабраним тачкама како би се верификовала погодност предложене процедуре за предвиђање хроматографског понашања анализата који мењају редослед елуирања у системима где се мењају и квалитативни и квантитативни хроматографски фактори (слике 26А и 27А). Добро слагање експериментално добијених и симулираних хроматограма потврђује погодност примене предложене процедуре у системима хаотропне хроматографије.



**Слика 26.** Хроматограм раздвајања рисперидона и његове три нечистоће под следећим експерименталним условима: колона *Zorbax Eclipse*, мобилна фаза ацетонитрил-75 mM NaClO<sub>4</sub> (pH 4,00 подешена *conc.* HCl) (25:75 V/V) на 30°C (A) Експериментално добијен хроматограм; (B) Хроматограм симулиран предложеном процедуром.  $T_f$  и  $N$  свих анализа задовољавају дефинисане критеријуме ( $0,9 \leq T_f \leq 1,2$  и  $N \geq 5000$ ).

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.)



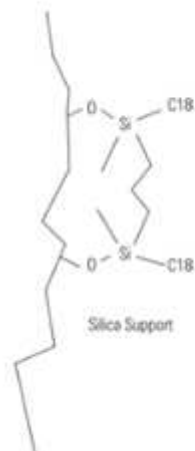
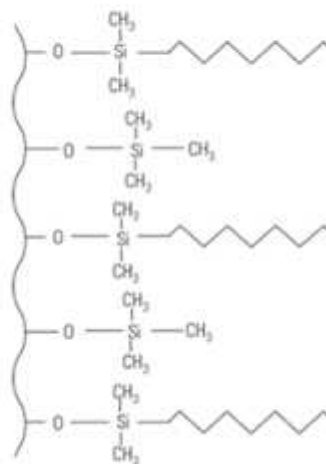


**Слика 27.** Хроматограм раздвајања рисперидона и његове три нечистоће под следећим експерименталним условима: колона *Zorbax Eclipse*, мобилна фаза ацетонитрил-85mM NaClO<sub>4</sub> (pH 5,00 подешена *conc.* HCl) (21,5:78,5 V/V) на 30°C (А) Експериментално добијен хроматограм; (Б) Хоматограм симулиран предложеном процедуром.  $T_f$  и  $N$  свих анализа задовољавају дефинисане критеријуме ( $0,9 \leq T_f \leq 1,2$  и  $N \geq 5000$ ).

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.)

#### 4.4.3. *Процена перформанси стационарних фаза приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика*

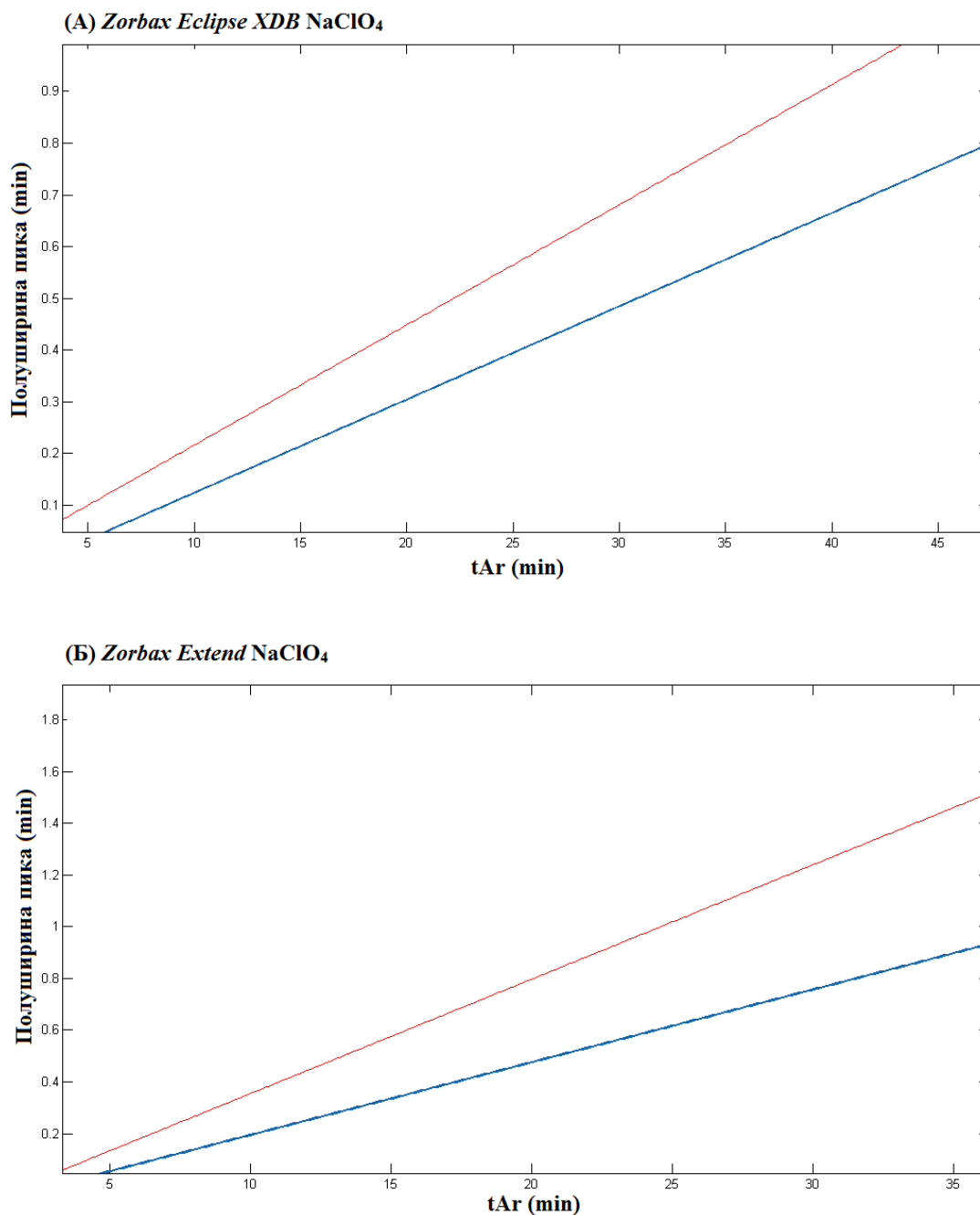
У циљу превазилажења проблема секундарних интеракција које остварују јонизовани базни аналити са слободним силанолним групама стационарне фазе, произвођачи колона улажу пуно средстава у развој стационарних фаза како би добили колоне што бољих карактеристика. Модификације стационарних фаза које су до сада спроведене на *RP C18* стационарним фазама су: блокирање слободних силанолних група са триметилсилил групама, увођење поларних група у алкилни ланац, синтеза силика гела са мање киселих група (као што је силика тип Б) и стерно блокирање секундарних интеракција са слободним силанолним групама уз помоћ волуминозних функционалних група [99]. Перформансе стационарних фаза директно се могу процењивати на основу ширине и асиметрије пика, а ови параметри су дефинисани вредностима ширина узлазног и силазног дела пика. Графици полуширине пикова (поглавље 1.5.2.) су корисни како за предвиђање изгледа хроматографских пикова, тако и за дефинисање перформанси колона и њихово поређење. У овој студији, експерименти су изведени на две модификоване *C18* стационарне фазе код којих су слободне силанолне групе блокиране различитим реагенсима и процесима модификације. Код *Zorbax Extend* стационарне фазе слободне силанолне групе блокиране су бидентатним силанолним мостовима, а поступак примене *endcapping* агенса изведен је у два циклуса. Са друге стране, код *Zorbax Eclipse XDB* стационарне фазе у поступку синтезе је остварено густо паковање *C18* ланаца и поступак примене триметилсилил групе као *endcapping* агенса је изведен у два циклуса (слика 28).

(А) *Zorbax Extend*(Б) *Zorbax Eclipse XDB*

**Слика 28.** Графички приказ структуре стационарних фаза: (А) *Zorbax Extend*; (Б) *Zorbax Eclipse XDB*.

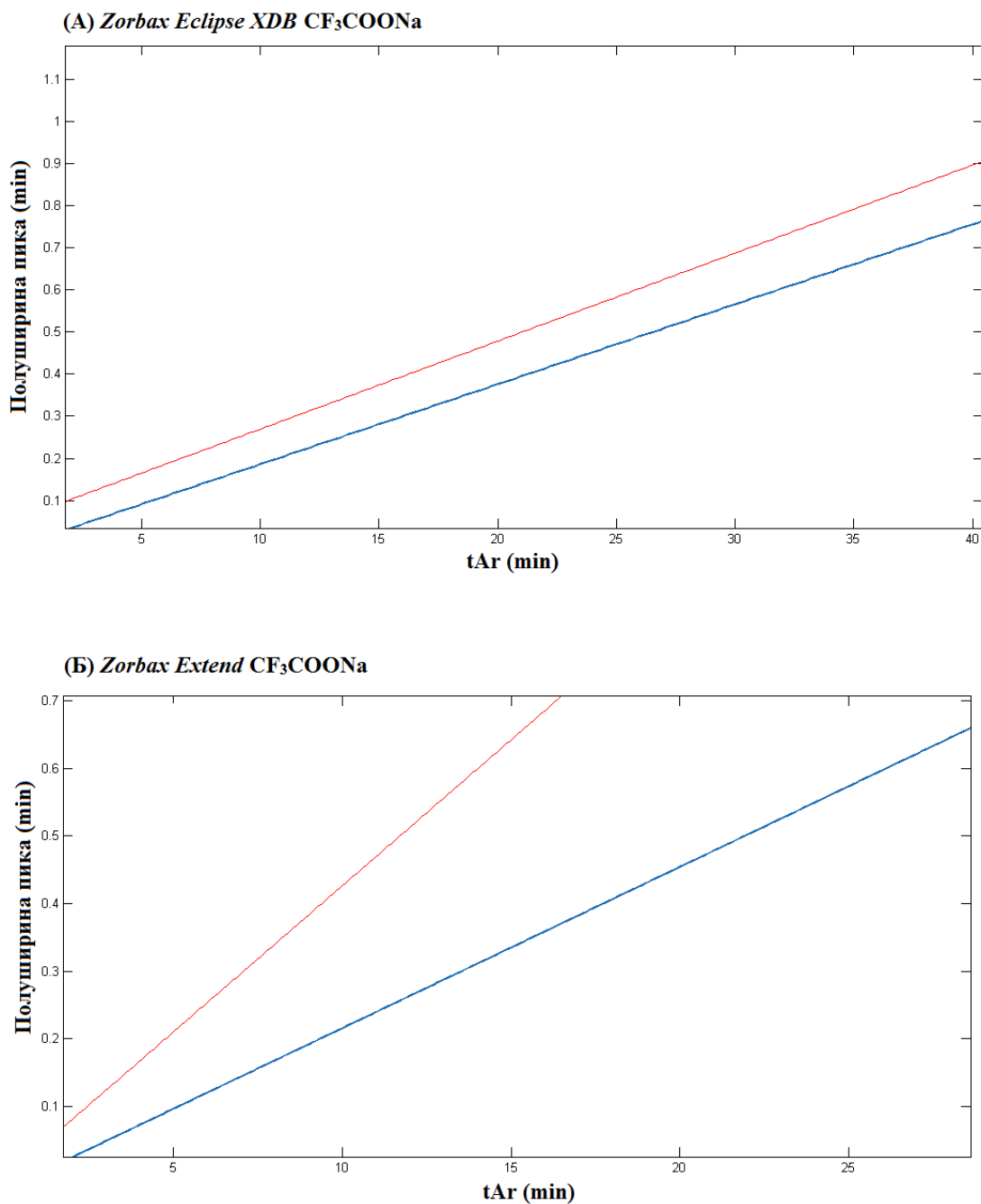
(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.)

Перформансе испитиваних стационарних фаза процењене су приступом праћења промене ширине узлазног и силазног дела пика. Вредности ширина узлазног (А) и силазног (Б) дела пика израчунате су помоћу једначина 32 и 33 за свих 3591 експерименталних тачака испитиваног експерименталног простора (поглавље 4.4.2.). Конструисани су графици полуширине пикова (слика 29 и 30), а на основу једначине 34 израчунате су одговарајуће  $r_{PB}$  вредности које су приказане у табели 18.



**Слика 29.** Графици полуширине пикова  $t_{Ar}$  vs. полуширина пика (ширина узлазног дела пика, *A* – плава линија; ширина силазног дела пика, *B* – црвена линија)  
(A) *Zorbax Eclipse XDB* и NaClO<sub>4</sub>; (B) *Zorbax Extend* и NaClO<sub>4</sub>.

(Прилагођено из: J. Čolović, M. Rmandić, A. Malenović, Anal Bioanal Chem 410 (2018) 4855–4866.)



**Слика 30.** Графици полуширине пикова  $tA_r$  vs. полуширина пика (ширина узлазног дела пика, *A*—плава линија; ширина силазног дела пика, *B*—црвена линија)  
(A) *Zorbax Eclipse XDB* и CF<sub>3</sub>COONa; (Б) *Zorbax Extend* и CF<sub>3</sub>COONa.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, Anal Bioanal Chem 410 (2018) 4855–4866.)

Стрмији нагиб на графику полуширине пикова, као и последични пораст угла између  $A = f(t_r)$  и  $B = f(t_r)$  указује на смањење ефикасности колоне [65]. Мањи угао између  $A = f(t_r)$  и  $B = f(t_r)$  добијен је за хроматографске анализе на колони *Zorbax Eclipse XDB* са обе хаотропне соли него код колоне *Zorbax Extend*, што указује на бољу ефикасност *Zorbax Eclipse XDB* колоне под испитиваним експерименталним условима (слика 29 и 30).

Даља процена утицаја карактеристика колоне на облик пика извршена је поређењем  $r_{PB}$  вредности које представљају проценат ширења пика услед процеса унутар колоне. Веће  $r_{PB}$  вредности одговарају стационарним фазама које остварују јаче секундарне интеракције са анализитима што резултује ширим и асиметричним пиковима. Мање  $r_{PB}$  вредности за све анализите добијене су за *Zorbax Eclipse XDB* (табела 18) што потврђује претходни закључак о бољим перформансама ове колоне у поређењу са *Zorbax Extend* колоном.

**Табела 18.** Вредности  $r_{PB}$  (%) за рисперидон и његове три нечистоће за хроматографске анализе на *Zorbax Eclipse XDB* и *Zorbax Extend C18* колонама у присуству  $\text{NaClO}_4$  и  $\text{CF}_3\text{COONa}$  као хаотропних агенаса.

(Прилагођено из: **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.)

Аналит	Колона и хаотропна со			
	<i>Zorbax Eclipse XDB NaClO<sub>4</sub></i>	<i>Zorbax Eclipse XDB CF<sub>3</sub>COONa</i>	<i>Zorbax Extend NaClO<sub>4</sub></i>	<i>Zorbax Extend CF<sub>3</sub>COONa</i>
Рисперидон	4,128	3,987	7,23	6,695
Нечистоћа 1	2,74	2,988	7,763	5,656
Нечистоћа 2	3,859	3,388	5,692	5,41
Нечистоћа 3	3,561	3,414	5,289	6,044

Сви експериментални подаци указују да модификација стационарне фазе и избор *endcapping* процеса значајно утичу на њихове сепарационе перформансе у хаотропној хроматографији. Код испитиваних стационарних фаза поступак примене *endcapping* агенса изведен је у два циклуса, међутим стационарна фаза код које су

слободне силанолне групе блокиране бидентатним силанолним мостовима показује лошије перформансе него стационарна фаза код које је у поступку синтезе остварено густо паковање C18 ланаца, а триметилсилил групе коришћене као *endcapping* агенс. Експериментално добијени резултати се могу објаснити већим потенцијалом триметилсилил група као малих функционалних група за блокирање слободних силанолних група у поређењу са потенцијалом стерне заштите бидентатних силанолних мостова.

## 5. ЗАКЉУЧАК

1. Експериментално добијени подаци о ретенционом понашању 34 структурно разноврсна анализата омогућили су додатно разјашњавање утицаја најзначајнијих фактора система у хаотропној хроматографији: концентрације  $\text{NaPF}_6$  у мобилној фази, рН вредности воденог дела мобилне фазе и садржаја ацетонитрила у мобилној фази. Резултати ове студије показују да са порастом рН вредности водене фазе од 2,00 до 4,00 долази до продуженог задржавања потпуно јонизованих анализата, што указује на неоправдано занемаривање утицаја рН вредности мобилне фазе на ретенцију у системима хаотропне хроматографије. Разматрањем адсорпционих изотерми ацетонитрила и  $\text{NaPF}_6$  при различитим рН вредностима уочава се да је адсорпција ацетонитрила у одређеном региону рН-зависна, као и да се већа количина хаотропног агенса адсорбује на стационарну фазу са повећањем рН вредности мобилне фазе. Може се закључити да је продужено задржавање анализата при вишим испитиваним рН вредностима условљено бољом адсорпцијом хаотропног агенса која настаје као резултат веће количине адсорбованог ацетонитрила при вишим рН вредностима мобилне фазе. Применом приступа мешовитог моделовања и *support vector machine* алгоритма развијен је регресиони модел у који су укључена три фактора мобилне фазе и четири молекулска дескриптора. Развијени модел је показао добре предиктивне карактеристике, а анализом молекулских дескриптора може се закључити да комплементарност између распореда наелектрисања унутар молекуле и електричног двослоја на површини стационарне фазе представља кључни фактор који условљава ретенцију у системима хаотропне хроматографије.

2. Разматрано је ретенционо понашање 13 потпуно јонизованих анализата са базним функционалним групама у хаотропним хроматографским системима са циљем разграничавања утицаја рН вредности мобилне фазе и јонске јачине на ретенцију. Примећено је да са порастом рН вредности мобилне фазе од 2,00 до 4,00 долази до дужег задржавања анализата на стационарној фази и са варијабилном и са константном јонском јачином мобилне фазе. Међутим, уочени ефекат је мање



изражен када се NaCl додаје у мобилну фазу ради одржавања константне јонске јачине. Анализом вредности електростатског потенцијала при различитим рН вредностима долази се до закључка да додаток јона  $\text{Na}^+$  у мобилну фазу блокира слободне силанолне групе при рН вредностима 3,00 и 4,00, што за последицу има мање вредности електростатског потенцијала у системима са константном јонском јачином. Примена проширеног термодинамичког приступа указала је на значајност јонског спаривања на стационарној фази у системима са варијабилном јонском јачином, док у системима са константном јонском јачином постоји конкуренција додатог  $\text{Na}^+$  јона и протонованог анализата за везивање са адсорбованим хаотопним јоном, па су интеракције са електричним двослојем готово незначајне у овим системима. Методом вишеструке линеарне регресије развијен је емпиријски модел који истовремено укључује параметре молекулске структуре и параметре хроматографског система, а чији коефицијенти имају јасно физичко значење. Развијени модел има добре предиктивне карактеристике, а поређењем његових коефицијената закључено је да јонско спаривање у мобилној фази у испитиваним системима нема утицаја на ретенцију, као и да рН-зависне промене ретенционог понашања у системима са варијабилном јонском јачином потичу од разлика у интеракцијама са развијеним електричним двослојем.

3. Полиномски-модификован Гаусов модел са линеарном функцијом успешно је примењен за описивање облика пика амлодипина и његове нечистоће А у хроматографским системима са додатком перхлорне киселине као хаотропног агенса. Предложена је тростепена процедура за израчунавање коефицијената полиномски-модификованог Гаусовог модела која се заснива на комбинацији експерименталног дизајна и индиректног моделовања вредности ширине пикова на 10% висине ( $W_{0,1}$ ); вредности ширине узлазног (А) и силазног (В) дела пика; ефикасности (N), фактора асиметрије (B/A) и *tailing* фактора (Tf). Погодност предложене процедуре и полиномски-модификованог Гаусовог модела за симулацију хроматографског понашања верификована је поређењем експериментално добијеног и симулираног хроматограма под истим

експерименталним условима, а који су одабрани методом претраге чворова мреже.

4. Процена перформанси две различито модификоване *RP C18* стационарне фазе у системима хаотропне хроматографије при истовременим променама квалитативних и квантитативних хроматографских фактора извршена је процедуром која подразумева комбинацију D-оптималног експерименталног дизајна, индиректног моделовања и полиномски-модификованог Гаусовог модела. Поређењем експериментално добијеног и симулираног хроматограма за исте експерименталне услове верификована је погодност предложене тростепене процедуре за описивање хроматографског понашања респеридона и његове три нечистоће при промени квалитативних и квантитативних параметара система. Ова процедура се показала погодном и за предвиђање ретенционог понашања анализата и када долази до промене у редоследу елуирања испитиваних анализата. Вредности ширине узлазног (*A*) и силазног (*B*) дела пика добијене индиректним моделовањем успешно су искоришћене за конструисање графика полуширине (*half-width plot*) и израчунавање  $r_{PB}$  вредности са циљем додатног поређења две различито модификоване *RP C18* стационарне фазе. Резултати добијени предложеном процедуром и *half-width plot* приступом указују на бољу ефикасност стационарне фазе код које је у поступку синтезе остварено густо паковање *C18* ланаца уз коришћење триметилсилил група као *endcapping* агенса изведен у два циклуса у поређењу са стационарном фазом код које су слободне силанолне групе блокиране бидентатним силанолним мостовима.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] D.T. Manallack, The acid–base profile of a contemporary set of drugs: implications for drug discovery, *SAR QSAR Environ Res.* 20 (2009) 611–655.
- [2] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, New Jersey 2007.
- [3] T. Cecchi, *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2009.
- [4] A. Vemić, M. Kalinić, J. Čolović, S. Erić, A. Malenović, Recent Progress in Fundamental Understanding and Practice of Chaotropic Chromatography : Rationalizing the Effects of Analytes' Structure with Pharmaceutical Applications, *Adv. Chromatogr.* (2017) 1–41.
- [5] F. Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24 (1888) 247–260.
- [6] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, Reversed-phase high-performance liquid chromatography behavior of chaotropic counteranions, *J. Chromatogr. A* 1064 (2005) 9–18.
- [7] T. Cecchi, P. Passamonti, Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1789–1797.
- [8] T. Cecchi, P. Passamonti, Erratum to “Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents” [*J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1789–1797], *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5164.
- [9] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, Extended Thermodynamic Approach to Ion Interaction Chromatography, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2632–2639.

- [10] B.A. Bidlingmeyer, S.N. Deming, W.P. Price, B. Sachok, M. Petrusek, Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 186 (1979) 419–434.
- [11] B.A. Bidlingmeyer, Separation of Ionic Compounds by Reversed-Phase Liquid Chromatography An Update of Ion-Pairing Techniques, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 525–539.
- [12] F.F. Cantwell, Retention model for ion-pair chromatography based on double-layer ionic adsorption and exchange, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2 (1984) 153–164.
- [13] H. Hashem, T. Jira, Effect of chaotropic mobile phase additives on retention behaviour of beta-blockers on various reversed-phase high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 69–75.
- [14] J. Fliieger, Effect of mobile phase composition on the retention of selected alkaloids in reversed-phase liquid chromatography with chaotropic salts, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 207–216.
- [15] A. Vemić, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, The influence of salt chaotropicity, column hydrophobicity and analytes' molecular properties on the retention of pramipexole and its impurities, *J. Chromatogr. A* 1386 (2015) 39–46.
- [16] R. LoBrutto, A. Jones, Y.V. Kazakevich, H.M. McNair, Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 173–187.
- [17] A. Vemić, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 77 (2013) 9–15.

- [18] A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica, The influence of inorganic salts with chaotropic properties on the chromatographic behavior of ropinirole and its two impurities, *Talanta* 123 (2014) 122–127.
- [19] L. Pan, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, R. Thompson, Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 63–73.
- [20] I.L. Kazakevich, N.H. Snow, Adsorption behavior of hexafluorophosphate on selected bonded phases, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 43–50.
- [21] P.C. Sadek, P.W. Carr, Study of solute retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography on hydrocarbonaceous and three fluorinated bonded phases, *J. Chromatogr. A* 288 (1984) 25–41.
- [22] P.C. Sadek, P.W. Carr, M.J. Ruggio, Effect of mobile phase composition and highly fluorinated bonded phases on the apparent free energy of transfer of solute functional groups, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1032–1039.
- [23] D.H. Marchand, K. Croes, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.A. Henry, K.M.R. Kallury et al., Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VIII. Phenylalkyl and fluoro-substituted columns, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 65–78.
- [24] J. Flieger, Application of perfluorinated acids as ion-pairing reagents for reversed-phase chromatography and retention-hydrophobicity relationships studies of selected  $\beta$ -blockers, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 540–549.
- [25] J.H. Knox, G.R. Laird, Soap chromatography—a new high-performance liquid chromatographic technique for separation of ionizable materials: Dyestuff intermediates, *J. Chromatogr. A* 122 (1976) 17–34.

- [26] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal Chem.* 49 (1977) 2295–2305.
- [27] D.P. Wittmer, N.O. Nuessle, W.G. Haney, Simultaneous analysis of tartrazine and its intermediates by reversed phase liquid chromatography, *Anal Chem.* 47 (1975) 1422–1423.
- [28] J.C. Kraak, K.M. Jonker, J.F.K. Huber, Solvent-generated ion-exchange systems with anionic surfactants for rapid separations of amino acids, *J. Chromatogr. A* 142 (1977) 671–688.
- [29] N.E. Hoffman, J.C. Liao, Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions, *Anal Chem.* 49 (1977) 2231–2234.
- [30] P.T. Kissinger, Reverse-phase ion-pair partition chromatography. Comments, *Anal. Chem.* 49 (1977) 883–883.
- [31] J.H. Knox, R.A. Hartwick, Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons, *J. Chromatogr. A* 204 (1981) 3–21.
- [32] J. Flieger, The effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 37–44.
- [33] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the pH, the concentration and the nature of the buffer on the adsorption mechanism of an ionic compound in reversed-phase liquid chromatography: II. Analytical and overloaded band profiles on Symmetry-C18 and Xterra-C18, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 63–75.

- [34] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: I. XTerra-C18, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 43–55.
- [35] M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, The perchlorate anion is more effective than the trifluoroacetate anion as an ion-pairing reagent for reversed-phase chromatography of peptides, *J. Chromatogr. A* 1080 (2005) 49–57.
- [36] Á. Bartha, J. Ståhlberg, Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography, *J. Chromatogr. A* 668 (1994) 255–284.
- [37] J. Dai, P.W. Carr, Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 169–184.
- [38] J. Dai, S.D. Mendonsa, M.T. Bowser MT, Lucy CA, Carr PW. Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals. *J. Chromatogr A* 1069 (2005) 225–234.
- [39] J. Mbuna, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu, Capillary zone electrophoretic studies of ion association between inorganic anions and tetraalkylammonium ions in aqueous–dioxane media, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 261–270.
- [40] S.A. Steiner, D.M. Watson, J.S. Fritz, Ion association with alkylammonium cations for separation of anions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 170–175.
- [41] S. Motomizu, T. Takayanagi, Electrophoretic mobility study on ion–ion interactions in an aqueous solution, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 63–69.

- [42] T.V. Popa, C.T. Mant, Y. Chen, R.S. Hodges, Capillary zone electrophoresis of  $\alpha$ -helical diastereomeric peptide pairs with anionic ion-pairing reagents, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 113–122.
- [43] T.V. Popa, C.T. Mant, R.S. Hodges, Ion-interaction–capillary zone electrophoresis of cationic proteomic peptide standards, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 192–199.
- [44] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke et al., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [45] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen et al., Experimental design and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [46] A. Fenech, T. Fearn, M. Strlic, Use of Design-of-Experiment principles to develop a dose-response function for colour photographs, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 621–625.
- [47] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. da Silva, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David et al., Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 2–14.
- [48] R. Leardi, Chapter 2 - Experimental Design. In: *Chemometrics in Food Chemistry*,. Elsevier, Amsterdam 28 (2013) 9–53.
- [49] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 141–158.
- [50] T.B. Oliveira, L. Gobbo-Neto, T.J. Schmidt, F.B. Da Costa, Study of Chromatographic Retention of Natural Terpenoids by Chemoinformatic Tools, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 26–38.



- [51] R. Kaliszan, QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships, *Chem. Rev.* 107 (2007) 3212–3246.
- [52] L. Auria, R.A. Moro, Support Vector Machines (SVM) as a Technique for Solvency Analysis. Rochester, DIW Berlin Discussion Paper No. 811 (2008).
- [53] F. Ruggieri, A.A. D'Archivio, G. Carlucci, P. Mazzeo, Application of artificial neural networks for prediction of retention factors of triazine herbicides in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 163–169.
- [54] S.Y. Tham, S. Agatonovic-Kustrin, Application of the artificial neural network in quantitative structure–gradient elution retention relationship of phenylthiocarbamyl amino acids derivatives, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 581–90.
- [55] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phase high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1930–1936.
- [56] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Quantitative structure–retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on WHIM and GETAWAY molecular descriptors, *Anal. Chim. Acta.* 628 (2008) 162–172.
- [57] J. Li, Prediction of Internal Standards in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Chromatographia* 60 (2004) 63–71.
- [58] J. Li, Prediction of internal standards in reversed-phase liquid chromatography: IV. Correlation and prediction of retention in reversed-phase ion-pair chromatography based on linear solvation energy relationships, *Anal. Chim. Acta.* 522 (2004) 113–126.

- [59] J. Li, P.A. Rethwill, Systematic Selection of Internal Standard with Similar Chemical and UV Properties to Drug to Be Quantified in Serum Samples, *Chromatographia* 60 (2004) 391–397.
- [60] J. Flieger, R. Świeboda, Application of chaotropic effect in reversed-phase liquid chromatography of structurally related phenothiazine and thioxanthene derivatives, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 218–224.
- [61] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks, *J. Chromatogr. A* 931 (2001) 1–30.
- [62] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17–24.
- [63] J.J. Baeza-Baeza, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, Prediction of peak shape in hydro-organic and micellar-organic liquid chromatography as a function of mobile phase composition, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 119–127.
- [64] J.P. Foley, J.G. Dorsey, Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks, *Anal Chem.* 55 (1983) 730–737.
- [65] J.J. Baeza-Baeza, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, S. Carda-Broch, Half-width plots, a simple tool to predict peak shape, reveal column kinetics and characterise chromatographic columns in liquid chromatography: State of the art and new results, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 142–153.
- [66] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, A Model for the Description, Simulation, and Deconvolution of Skewed Chromatographic Peaks, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822–3831.

- [67] J. Li, Comparison of the capability of peak functions in describing real chromatographic peaks, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 63–70.
- [68] J.J. Baeza-Baeza, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Approaches to estimate the time and height at the peak maximum in liquid chromatography based on a modified Gaussian model, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1385–1392.
- [69] J.J. Baeza-Baeza, S. Pous-Torres, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Approaches to characterise chromatographic column performance based on global parameters accounting for peak broadening and skewness, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2147–2157.
- [70] J.J. Fernández-Navarro, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, 1-Hexyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate: An efficient column enhancer for the separation of basic drugs by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 168–174.
- [71] Marvin 15.1.9, ChemAxon, 2015. <http://www.chemaxon.com>.
- [72] T. Cecchi, Use of lipophilic ion adsorption isotherms to determine the surface area and the monolayer capacity of a chromatographic packing, as well as the thermodynamic equilibrium constant for its adsorption, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 201–206.
- [73] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase adsorbents: Effect on the analyte retention, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 75–87.
- [74] Y.V. Kazakevich, H.M. McNair, Thermodynamic Definition of HPLC Dead Volume, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 317–322.
- [75] RDKit: Open-source Chemoinformatics, version 2015.03.1, <http://www.rdkit.org>.

- [76] J-P. Ebejer, G.M. Morris, C.M. Deane, Freely Available Conformer Generation Methods: How Good Are They? *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 1146–1158.
- [77] P. Tosco, N. Stiefl, G. Landrum, Bringing the MMFF force field to the RDKit: implementation and validation, *J. Cheminformatics* 6 (2014) 37.
- [78] L.A. Kelley, S.P. Gardner, M.J. Sutcliffe, An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies, *Protein. Eng.* 9 (1996) 1063–1065.
- [79] A.B. Yongye, A. Bender, K. Martínez-Mayorga, Dynamic clustering threshold reduces conformer ensemble size while maintaining a biologically relevant ensemble, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24 (2010) 675–686.
- [80] J.J.P. Stewart, MOPAC2012, Stewart Computational Chemistry, ColoradoSprings, CO, USA, 2012, <http://openmopac.net>.
- [81] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Static Dielectric Constants of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye–Hückel A and a0B Parameters for Activity Coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 1103–1107.
- [82] C.W. Yap, PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 1466–1474.
- [83] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch,  $\delta$  Conversion Parameter between pH Scales (and) in Acetonitrile/Water Mixtures at Various Compositions and Temperatures, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3180–3187.
- [84] Marvin 15.10.26, ChemAxon, 2015. <http://www.chemaxon.com>.
- [85] V. Law, C. Knox, Y. Djoumbou, T. Jewison, A.C. Guo et al., DrugBank 4.0: shedding new light on drugmetabolism, *Nucleic Acids Res.* 42 (January (1)) (2014) D1091–D1097, PubMedID: 24203711.

- [86] F. Gritti, G. Guiochon, Adsorption Mechanism in RPLC. Effect of the Nature of the Organic Modifier, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4257–4272.
- [87] R. Put, Y. Vander Heyden, Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure–retention relationships, *Anal. Chim. Acta.* 602 (2007) 164–172.
- [88] M. Aschi, A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 582 (2007) 235–242.
- [89] M. Hechinger, K. Leonhard, W. Marquardt, What is Wrong with Quantitative Structure–Property Relations Models Based on Three-Dimensional Descriptors?, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 1984–1993.
- [90] K. Roy, G. Ghosh, QSTR with Extended Topochemical Atom Indices. 2. Fish Toxicity of Substituted Benzenes, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44 (2004) 559–567.
- [91] A. Bartha, H.A.H. Billiet, L. De Galan, G. Vigh, Studies in reversed-phase ion-pair chromatography: III. The effect of counter ion concentration, *J. Chromatogr. A* 291 (1984) 91–102.
- [92] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography. A mono- and bivariate strategy to model the influence of ionic strength, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1323–1332.
- [93] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, Ion-interaction chromatography of neutral molecules, *Chromatographia* 53 (2001) 27–34.
- [94] L.H. Hall, L.B. Kier, Electrotological State Indices for Atom Types: A Novel Combination of Electronic, Topological, and Valence State Information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 35 (1995) 1039–1045.

- [95] R. Todeschini, P. Gramatica, New 3D Molecular Descriptors: The WHIM theory and QSAR Applications. In: 3D QSAR in Drug Design–Vol.3, Kluwer/ESCOM, Dordrecht, 1998.
- [96] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- [97] T. Jayalakshmi, D.A. Santhakumaran, Statistical Normalization and Back Propagation for Classification, *IJSTE* (2011) 1793–8201.
- [98] P. Schoenmakers, Optimization of Chromatographic Selectivity: A Guide to Method Development, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [99] J.W. Dolan, Column packing: What's at the bottom of it? *LC GC* 16 (1998) 350–354.

## 7. ПРИЛОГ

### **Објављени и саопштени резултати који чине део докторске дисертације**

#### ***Радови објављени у часописима међународног значаја***

1. **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, Investigation into the phenomena affecting the retention behavior of basic analytes in chaotropic chromatography: joint effects of the most relevant chromatographic factors and analytes' molecular properties, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 150-157.  
(KoBSON 2015. IF 3,926, 11/75 Chemistry, Analytical) (M21)
2. **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, Influence of the mobile phase and molecular structure parameters on the retention behavior of protonated basic solutes in chaotropic chromatography, *J. Chromatogr. A* 1511 (2017) 68-76.  
(KoBSON 2016. IF 3,981, 11/76 Chemistry, Analytical) (M21)
3. **J. Čolović**, A. Vemić, N. Kostić, A. Malenović, M. Medenica, Testing the capability of a polynomial-modified gaussian model in the description and simulation of chromatographic peaks of amlodipine and its impurity in ion-interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1797–1804.  
(KoBSON 2014. IF 2,737, 21/74 Chemistry, Analytical) (M21)
4. **J. Čolović**, M. Rmandić, A. Malenović, Characterization of bonded stationary phase performance as a function of qualitative and quantitative chromatographic factors in chaotropic chromatography, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 4855–4866.  
(KoBSON 2016. IF 3,431, 16/76 Chemistry, Analytical) (M21)

#### ***Радови саопштени на скуповима међународног и националног значаја штампани у изводу***

1. **J. Čolović**, M. Kalinić, A. Vemić, S. Erić, A. Malenović, Novel insights into pH-dependent retention behavior of analytes in chaotropic chromatography, *The 39<sup>th</sup> Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds*,

Katowice–Szczyrk, Poland, 2016.

(M34)

2. **J. Čolović**, A. Malenović, Application of a polynomial modified Gaussian model and a half-width plot approach to describe chromatographic peaks and reveal column performance in chaotropic chromatography, *The 40<sup>th</sup> Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds*, Katowice–Szczyrk, Poland, 2017.

(M34)

3. А. Вемић, **Ј. Чоловић**, Н. Костић, А. Маленовић, Тестирање способности модификованог Гаусовог модела полинома за описивање и симулацију хроматографских пикова амлодипина и његове нечистоће у јон-интеракционој хроматографији, *VI конгрес фармацеута Србије са међународним учешћем*, Београд, Србија 2014.

(M64)

**Усмена излагања на скуповима међународног значаја штампани у изводу**

1. A. Malenović, **J. Čolović**, Marko Kalinić, Ana Vemić, Slavica Erić, Investigation into the phenomena affecting the retention behavior of basic analytes in chaotropic chromatography *The 39<sup>th</sup> Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds*, Katowice–Szczyrk, Poland, 2016.

(M32)

4. A. Malenović, **J. Čolović**, Novel insights into the pH-dependent retention behavior of analytes in chaotropic chromatography, *The 40<sup>th</sup> Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds*, Katowice–Szczyrk, Poland, 2017.

(M32)



## **8. БИОГРАФИЈА АУТОРА**

Јелена Чоловић рођена је 1989. године у Прокупљу. Основну школу и Гимназију завршила је у Куршумлији као носилац Вукове дипломе. Интегрисане академске студије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, смер магистар фармације уписала је академске 2008/2009. године и завршила јула 2013. године са просечном оценом 9,37. Током студија била је аутор три студентска научно-истраживачка рада која су саопштена на студентским конгресима. Као члан женске одбојкашке екипе факултета освојила је шест медаља на студентским такмичењима.

Докторске академске студије, модул Аналитика лекова уписала је академске 2013/2014. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду.

Приправнички стаж за магистра фармације обављала је у периоду од септембра 2013. године, а стручни испит за магистра фармације положила је новембра 2014. године. Од септембра 2014. године била је ангажована као сарадник у настави на Катедри за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и учествовала је у извођењу практичне наставе на предметима Фармацеутска анализа, Медицинска средства, Експериментални дизајн у аналитици лекова, Фармацеутска регулатива у контроли квалитета и Спортска фармација. Била је коментор три студентска истраживачка рада и члан 6 Комисија за оцену и одбрану завршног рада. Од јануара 2017. године ради на позицији сарадника у регулативи у компанији Медтроник Србија д.о.о.

До сада је објавила 5 научних радова у часописима међународног значаја и једно поглавље у монографији међународног значаја. На научним скуповима међународног и националног значаја учествовала је са 5 научних радова која су штампана у изводу, а такође је имала и 2 усмена излагања штампана у изводу на скуповима међународног значаја.

Говори енглески језик.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора                      Јелена Чоловић  
Број индекса                                    12/13

### Изјављујем

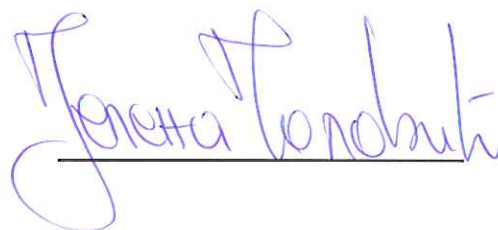
да је докторска дисертација под насловом

*Моделовање утицаја молекулске структуре и параметара хроматографског система на понашање анализата у хаотропној хроматографији*

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

Потпис аутора

У Београду, 06. јула 2018.



Јелена Чоловић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Јелена Чоловић
Број индекса	12/13
Студијски програм	Аналитика лекова
Наслов рада	Моделовање утицаја молекулске структуре и параметара хроматографског система на понашање анализата у хаотропној хроматографији
Ментор	др Анђелија Маленовић, ванредни професор

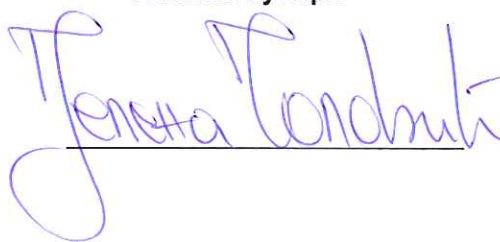
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 06. јула 2018.

Потпис аутора



## Изјава о коришћењу

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

*Моделовање утицаја молекулске структуре и параметара хроматографског система на понашање анализата у хаотропној хроматографији*

која је моје ауторско дело.

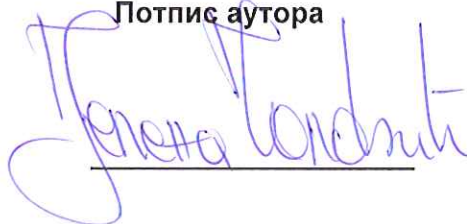
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 06. јула 2018.

Потпис аутора  


1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.