



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Дарија М. Кнежевић Ратковић

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

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Бања Лука, 2025. године



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Darija M. Knežević Ratković

**A MULTI-CRITERIA APPROACH IN
DEVELOPING MODELS FOR PREDICTING
THE RETENTION MECHANISMS OF
SELECTED DRUGS IN HYDROPHILIC
INTERACTION LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2025

МЕНТОР:

Проф. др Ирена Касагић-Вујановић, ванредни професор, ужа научна област Аналитика
лијекова, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Проф. др Жарко Гагић, ванредни професор, ужа научна област Фармацеутска хемија,
Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан комисије

Проф. др Радован Кукобат, ванредни професор, ужа научна област Нанопроцеси,
Технолошки факултет Универзитета у Бањој Луци, члан комисије

Проф. др Мирза Дедић, ванредни професор, ужа научна област Аналитика лијекова,
Универзитет у Сарајеву – Фармацеутски факултет, члан комисије

Проф. др Ервина Бечић, редовни професор, ужа научна област Аналитика лијекова,
Универзитет у Сарајеву – Фармацеутски факултет, члан комисије

ДАТУМ ОДБРАНЕ:

Ментор: Проф. др Ирена Касагић-Вујановић, ванредни професор, ужа научна област Аналитика лијекова, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци

Наслов докторске дисертације: Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течної хроматографији хидрофилних интеракција

Резиме: Примјеном теоријских и експерименталних ретенционих модела детаљно су испитани ретенциони механизми различитих једињења у течної хроматографији хидрофилних интеракција (енгл. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC).

Ретенциони механизми базних и неутралних једињења испитани су на примјеру смјеше амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G на амидној, аминокиселинској и силика стационарној фази. Ретенциони механизми киселих и неутралних једињења испитани су на примјеру смјеше диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола на амидној, аминокиселинској и силика стационарној фази. Креирањем двојних HILIC/RP-HPLC и квадратних ретенционих модела омогућена је процјена доприноса HILIC и RP-HPLC ретенционих механизма, као и дефинисање састава мобилне фазе при коме долази до прелаза из једног у други механизам. Креирањем партиционих и адсорпционих ретенционих модела посебно у HILIC, а посебно у RP-HPLC региону омогућено је дефинисање доприноса ових процеса у укупном ретенционом механизму испитиваних једињења. Грађење катјонско-измјењивачких и анијонско-измјењивачких ретенционих модела омогућило је процјену доприноса јонских интеракција у укупном ретенционом механизму јонизованих испитиваних једињења. Дефинисан је утицај врсте стационарне фазе и хемијске структуре испитиваних једињења на њихово ретенционо понашање. Примјеном хеометријског приступа, грађени су експериментални ретенциони модели за истовремену процјену утицаја садржаја органског растварача у мобилној фази, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе.

У наредном дијелу истраживања представљен је развој софтвера за анализу ретенционих механизма. Примјеном неколико различитих *Python* библиотека, процес анализе је у потпуности аутоматизован, а унапређена је тачност и прецизност добијених резултата. Резултати добијени уз помоћ софтвера потврдили су његову тачност, поузданост и примјењивост.

На основу резултата анализе ретенционих механизма, развијене су двије нове HILIC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и парацетамола, односно кофеина и ибупрофена. Примјеном *Analytical Quality by Design* приступа, комбинованог са принципима „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије, новоразвијене методе постигле су задовољавајући ниво ефикасности и еколошке прихватљивости, те су валидиране у складу са смјерницом Међународне конференције за хармонизацију (ICH Q2(R2)).

Кључне ријечи: течна хроматографија хидрофилних интеракција, ретенциони механизми, експериментални дизајн, *Analytical Quality by Design*, *Python*, „зелена“ аналитичка хемија.

Научна област: Медицинске и здравствене науке

Научно поље: Фармација

Ужа научна област: Аналитика лијекова

Класификациона ознака за научну област према CERIF шифрарнику: P 300

Тип одабране лиценце Креативне заједнице: Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY – NC – ND)

Mentor: Irena Kasagić-Vujanović, Associate Professor at the Faculty of Medicine, University of Banja Luka.

Doctoral thesis: A multi-criteria approach in developing models for predicting the retention mechanisms of selected drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography

Summary: By applying both theoretical and experimental models, the retention mechanisms of various compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) were thoroughly investigated.

The retention mechanisms of basic and neutral compounds were examined using a mixture of amitriptyline hydrochloride and its impurities A, B, C, D, F, and G across amide, amino, diol, and silica stationary phases. The retention mechanisms of acidic and neutral compounds were studied with a mixture of diclofenac potassium, ibuprofen, caffeine, and paracetamol in amide, amino, and diol stationary phases. Dual HILIC/RP-HPLC and quadratic models were developed to assess the contributions of HILIC and RP-HPLC retention mechanisms and to define the mobile phase composition at which the transition between these mechanisms occurs. Additionally, partitioning and adsorption retention models were established separately for the HILIC and RP-HPLC regions, allowing for a detailed evaluation of their contributions to the overall retention process of the studied compounds. Cation-exchange and anion-exchange retention models were constructed to assess the role of ionic interactions in the retention behavior of ionized compounds. Furthermore, the impact of the stationary phase type and the chemical structure of the analytes on their retention behavior was clearly defined. Using a chemometric approach, experimental models were developed to simultaneously evaluate the effects of organic solvent content in the mobile phase, buffer concentration, and pH value of the aqueous phase.

In the following part of the study, the development of software for retention mechanism analysis was presented. By leveraging multiple Python libraries, the analysis process was fully automated, enhancing the accuracy and precision of the results. The results obtained using the software confirmed its accuracy, reliability, and applicability.

Based on the findings from the retention mechanism analysis, two new HILIC methods were developed for the qualitative and quantitative analysis of caffeine and paracetamol, as well as caffeine and ibuprofen. By integrating the Analytical Quality by Design approach with the principles of green and white analytical chemistry, the newly developed methods achieved a

high level of efficiency and environmental sustainability. These methods were validated in accordance with the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH Q2(R2)).

Keywords: hydrophilic interaction liquid chromatography, retention mechanisms, design of experiments, Analytical Quality by Design, Python, green analytical chemistry

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific area: Drug Analytics

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: P 300

Type of the selected license of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution–NonCommercial–NoDerivatives (CC BY – NC – ND)

Ову страницу користим како бих се захвалила свим драгим људима који су, на различите начине, допринијели настанку ове докторске дисертације.

Мојој драгој менторки, проф. др Ирени Касагић-Вујановић, захваљујем се на професионалним, пријатељским и практичним савјетима, те времену које је издвајала током свих фаза израде ове докторске дисертације. Бескрајно Вам хвала што сте ми пренијели љубав према овом послу и константно ме подстицали да тежим највишим стандардима. Хвала Вам на прилици да остварим своје прве кораке у свијету науке.

Проф. др Радовану Кукобату неизмјерно се захваљујем за сваки савјет, помоћ и подршку која ми је много значила током израде ове докторске дисертације. Хвала Вам што сте ми проширили видике у научном свијету, а својим примјером постали узор.

Драгој доц. др Анђелки Рачић од срца се захваљујем на свему што ми је пружила током израде ове докторске дисертације. Хвала Вам за увијек отворена врата, топао савјет и срдачну подршку. Неисцрпан сте извор инспирације, труда и залагања.

Мојим дивним родитељима, Милисаву и Мирјани, безгранично се захваљујем на огромној подршци, љубави, разумијевању, пажњи и вјери коју су ми пружали све ове године. Хвала вам што сте ме научили најважније животне лекције и што сте били ту за мене у свим ситуацијама у које нас је ова прича поставила. Ви сте моје најсјајније звијезде водиље.

Мојој драгој сестри Анђели, захваљујем се на свему што је чинила за мене и наше родитеље током свих ових година. Твоја љубав, подршка и савјети омогућили су ми да лакше прођем кроз све изазове. Хвала ти што си увијек ту, као мој најискренији пријатељ.

Мојим пријатељима и драгим колегама са студијског програма фармација Медицинског факултета у Бањој Луци захваљујем се на несебичној подршци, вриједним савјетима и оптимизму који ми је много значио током израде ове докторске дисертације. Хвала вам што сте ми олакшавали тешке и умножавали срећне тренутке.

Највећу захвалност дугујем мом вољеном супругу Николи. Од срца ти се захваљујем што си био моја мирна лука, пуна љубави и разумијевања на сваком кораку овог дугог пута. Хвала ти што си увијек знао како да ми будеш подршка и вјетар у леђа, моје сигурно уточиште након свих изазова. Ти си моја снага и разлог због ког бескрајно вјерујем у љубав.

*Мојој вољеној мајци, која је својом љубављу, снагом, посвећеношћу и пожртвовањем
обликовала сваки мој корак и опленила цијели мој живот.*

С А Д Р Ж А Ј

1. УВОД.....	1
1.1. ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА ХИДРОФИЛНИХ ИНТЕРАКЦИЈА	2
1.1.1. Предности и недостаци течне хроматографије хидрофилних интеракција.....	3
1.1.2. Фактори који утичу на задржавање испитиваних једињења у HILIC систему	3
1.1.2.1. Стационарна фаза.....	4
1.1.2.2. Мобилна фаза	5
1.1.2.3. Структурне особине испитиваних једињења	7
1.1.3. Хеометријски приступ у HILIC системима	8
1.1.3.1. Дерингерава функција пожељности одговора	9
1.1.3.2. Избор испитиваних фактора и факторских нивоа.....	11
1.1.3.3. Избор хроматографских одговора	12
1.1.3.4. Избор експерименталног дизајна и извођење експеримената.....	13
1.1.3.4.1. Фракциони факторски дизајн	13
1.1.3.4.2. Бокс-Бенкен дизајн.....	14
1.1.3.4.3. Централни композициони дизајн	14
1.1.3.5. Креирање математичког модела	15
1.2. РЕТЕНЦИОНИ МОДЕЛИ У ТЕЧНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ ХИДРОФИЛНИХ ИНТЕРАКЦИЈА	17
1.2.1. Партициони ретенциони модел.....	18
1.2.2. Адсорпциони ретенциони модел	19
1.2.3. Квадратни ретенциони модел.....	19
1.2.4. Двојни HILIC/РP-HPLC ретенциони модел	20
1.2.5. Јоноизмјењивачки ретенциони модел	21

1.2.6.	Ретенциони модели креирани употребом експерименталног дизајна	23
1.3.	ПРОГРАМСКИ ЈЕЗИК <i>PYTHON</i>	24
1.3.1.	Интегрисани модули	24
1.3.2.	<i>Numerical Python</i> библиотека	24
1.3.3.	<i>Matplotlib</i> библиотека	25
1.3.4.	Библиотека <i>pandas</i>	26
1.3.5.	<i>Scientific Python</i> библиотека	27
1.4.	РАЗВОЈ, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА HILIC МЕТОДЕ	28
1.4.1.	<i>Analytical Quality by Design</i> концепт у развоју HILIC методе	28
1.4.2.	Теоријске основе <i>Analytical Quality by Design</i> концепта	29
1.4.3.	Валидација HILIC методе	31
1.5.	„ЗЕЛЕНА“ АНАЛИТИЧКА ХЕМИЈА	34
1.5.1.	Основни принципи „зелене“ аналитичке хемије	34
1.5.2.	Концепт „бијеле“ аналитичке хемије	36
1.5.3.	Софтвери и модели за процјену еколошке прихватљивости и ефикасности методе	38
1.5.3.1.	AGREE – <i>Analytical GREEnness Metric</i>	38
1.5.3.2.	<i>Complementary Green Analytical Procedure Index</i> – ComplexGAPI	38
1.5.3.3.	<i>Blue Applicability Grade Index</i> – BAGI	39
1.5.3.4.	<i>Red-Green-Blue (RGB)</i> модел	40
2.	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	41
3.	ХИПОТЕЗЕ	41
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИО	44
4.1.	АПАРАТИ, ПРИБОР И РЕАГЕНСИ	46
4.1.1.	Течни хроматограф под високим притиском	46
4.1.2.	Стационарне фазе	46
4.1.3.	Остала опрема и прибор	46

4.1.4.	Растварачи и реагенси	47
4.1.5.	Стандардне супстанце и готови производи	47
4.1.5.1.	Хемијска структура стандардних супстанци	48
4.1.6.	Компоненте <i>плацеба</i>	50
4.1.7.	Рачунарски програми	51
4.2.	ИСПИТИВАЊЕ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА АМИТРИПТИЛИН-ХИДРОХЛОРИДА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА А, В, С, D, F И G.....	52
4.2.1.	Хроматографски услови	52
4.2.2.	Припрема раствора стандарда	52
4.2.2.1.	Припрема раствора амитриптилин-хидрохлорида.....	52
4.2.2.2.	Припрема раствора нечистоћа.....	52
4.2.2.3.	Припрема раствора смјеше	53
4.2.3.	Припрема мобилних фаза.....	53
4.2.3.1.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте пуфера..	53
4.2.3.2.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја садржаја ацетонитрила	54
4.2.3.3.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја концентрације пуфера.....	54
4.2.3.4.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте стационарне фазе.....	54
4.2.3.5.	Припрема мобилних фаза за испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе	55
4.3.	ИСПИТИВАЊЕ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА ДИКЛОФЕНАК-КАЛИЈУМА, ИБУПРОФЕНА, КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	56
4.3.1.	Хроматографски услови	56
4.3.2.	Припрема раствора стандарда	56
4.3.2.1.	Припрема раствора смјеше	56

4.3.3.	Припрема мобилних фаза.....	57
4.3.3.1.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте пуфера..	57
4.3.3.2.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја садржаја ацетонитрила	57
4.3.3.3.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја концентрације пуфера.....	57
4.3.3.4.	Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте стационарне фазе.....	58
4.3.3.5.	Припрема мобилних фаза за испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе	58
4.4.	ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	59
4.4.1.	Хроматографски услови	59
4.4.2.	Припрема раствора стандарда	59
4.4.2.1.	Припрема раствора смјеше	59
4.4.3.	Припрема мобилних фаза.....	59
4.4.4.	Оптимални хроматографски услови.....	61
4.5.	ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА.....	62
4.5.1.	Хроматографски услови	62
4.5.2.	Припрема раствора узорка	62
4.5.3.	Припрема мобилних фаза.....	62
4.6.	ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА.....	63
4.6.1.	Хроматографски услови	63
4.6.2.	Припрема раствора стандарда	63
4.6.3.	Припрема мобилне фазе	63
4.6.4.	Припрема раствора за испитивање селективности методе.....	63

4.6.5.	Припрема раствора за испитивање линеарности методе	64
4.6.6.	Припрема раствора за испитивање осјетљивости методе	64
4.6.7.	Припрема раствора за испитивање тачности методе	65
4.6.8.	Припрема раствора за испитивање прецизности методе.....	65
4.7.	ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА	66
4.7.1.	Хроматографски услови	66
4.7.2.	Припрема раствора стандарда	66
4.7.2.1.	Припрема раствора смјеше	66
4.7.3.	Припрема мобилних фаза.....	66
4.7.4.	Оптимални хроматографски услови.....	68
4.8.	ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА.....	69
4.8.1.	Хроматографски услови	69
4.8.2.	Припрема раствора узорка	69
4.8.3.	Припрема мобилних фаза.....	69
4.9.	ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА.....	70
4.9.1.	Хроматографски услови	70
4.9.2.	Припрема раствора стандарда	70
4.9.3.	Припрема мобилне фазе	70
4.9.4.	Припрема раствора за испитивање селективности методе.....	70
4.9.5.	Припрема раствора за испитивање линеарности методе	71
4.9.6.	Припрема раствора за испитивање осјетљивости методе	71
4.9.7.	Припрема раствора за испитивање тачности методе	72
4.9.8.	Припрема раствора за испитивање прецизности методе.....	72
4.10.	ХРОМАТОГРАФСКИ ПОСТУПАК	73

4.11. ПРОЦЈЕНА ЕКОЛОШКЕ ПРИХВАТЉИВОСТИ И ЕФИКАСНОСТИ НОВОРАЗВИЈЕНИХ HILIC МЕТОДА	74
5. СОФТВЕРСКИ ДИО	46
5.1. РАЗВОЈ СОФТВЕРА ЗА АНАЛИЗУ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА.76	
5.1.1. Улазне команде.....	76
5.1.2. Анализа двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела	77
5.1.3. Анализа квадратног ретенционог модела	79
5.1.4. Анализа партиционог и адсорпционог ретенционог модела.....	80
6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	82
6.1. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА АМИТРИПТИЛИН-ХИДРОХЛОРИДА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА А, В, С, D, F И G.....	83
6.1.1. Прелиминарна фаза истраживања.....	84
6.1.2. Испитивање утицаја врсте пуферског система на ретенционо понашање.....	86
6.1.3. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел	88
6.1.4. Квадратни ретенциони модел.....	93
6.1.5. Партициони и адсорпциони ретенциони модели	95
6.1.6. Катјонско-измјењивачки ретенциони модели	102
6.1.7. Анјонско-измјењивачки ретенциони модели.....	104
6.1.8. Експериментални ретенциони модели креирани уз помоћ хеометријског приступа на силика стационарној фази	106
6.1.8.1. Дефинисање факторских утицаја на ретенционо понашање испитиваних једињења	109
6.1.9. Утицај врсте стационарне фазе и физичко-хемијских особина испитиваних једињења на ретенционо понашање.....	113
6.2. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА ДИКЛОФЕНАК-КАЛИЈУМА, ИБУПРОФЕНА, КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	118
6.2.1. Прелиминарна фаза истраживања.....	119

6.2.2. Испитивање утицаја врсте пуферског система на ретенционо понашање.....	122
6.2.3. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел.....	123
6.2.4. Квадратни ретенциони модел.....	128
6.2.5. Партициони и адсорпциони ретенциони модели	130
6.2.6. Анјонско-измјењивачки ретенциони модели.....	134
6.2.7. Експериментални ретенциони модели креирани уз помоћ хеометријског приступа на аминокиселинској фази.....	136
6.2.7.1. Дефинисање факторских утицаја на ретенционо понашање испитиваних једињења	139
6.2.8. Утицај врсте стационарне фазе и физичко-хемијских особина испитиваних једињења на ретенционо понашање.....	141
6.3. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА УПОТРЕБОМ НОВОРАЗВИЈЕНОГ PYTHON СОФТВЕРА	145
6.3.1. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел.....	145
6.3.2. Квадратни ретенциони модел.....	148
6.3.3. Партициони и адсорпциони ретенциони модели	151
6.4. РАЗВОЈ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	158
6.4.1. Развој методе – дефинисање жељених особина (енгл. <i>Analytical Target Profile</i> – ATP) и критичних одговора HILIC система (енгл. <i>Critical Method Attributes</i> – CMAs).....	158
6.4.2. Процјена ризика квалитета (енгл. <i>Quality Risk Assessment</i> – QRA) и идентификовање критичних параметара методе (енгл. <i>Critical Method Parameters</i> – CMPs).....	159
6.4.3. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	161
6.4.3.1. Дефинисање робусног региона – <i>Design Space</i> (DS).....	167
6.4.3.2. Дефинисање оптималних хроматографских услова.....	171

6.4.4. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ МЕТОДЕ И ДЕФИНИСАЊЕ ПАРАМЕТАРА ЗА ПРОЦЈЕНУ ПОГОДНОСТИ СИСТЕМА.....	172
6.4.5. ВАЛИДАЦИЈА НІЛІС МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА	175
6.4.5.1. Испитивање селективности методе	175
6.4.5.2. Испитивање линеарности методе.....	175
6.4.5.3. Испитивање осјетљивости методе.....	177
6.4.5.4. Испитивање тачности методе	177
6.4.5.5. Испитивање прецизности методе	178
6.4.6. ПРОЦЈЕНА „ЗЕЛЕНОСТИ“ И ЕФИКАСНОСТИ НІЛІС МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА.....	180
6.4.6.1. Процјена „зелености“ методе примјеном AGREE софтвера.....	180
6.4.6.2. Процјена „зелености“ методе примјеном <i>ComplexGAPI</i> софтвера.....	182
6.4.6.3. Процјена практичности методе примјеном BAGI софтвера.....	184
6.4.6.4. Процјена усклађености методе са принципима „бијеле“ аналитичке хемије.....	185
6.5. РАЗВОЈ НІЛІС МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА	187
6.5.1. Дефинисање жељених особина (енгл. <i>Analytical Target Profile –ATP</i>) и критичних одговора система (енгл. <i>Critical Method Attributes – CMAs</i>)	187
6.5.2. Процјена ризика квалитета (енгл. <i>Quality Risk Assessment – QRA</i>) и идентификовање критичних параметара методе (енгл. <i>Critical Method Parameters – CMPs</i>).....	188
6.5.3. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА	189
6.5.3.1. Дефинисање оптималних хроматографских услова.....	204

6.5.4. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ МЕТОДЕ И ДЕФИНИСАЊЕ ПАРАМЕТАРА ЗА ПРОЦЈЕНУ ПОГОДНОСТИ СИСТЕМА.....	209
6.5.5. ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА.....	215
6.5.5.1. Испитивање селективности методе	215
6.5.5.2. Испитивање линеарности методе.....	215
6.5.5.3. Испитивање осјетљивости методе.....	217
6.5.5.4. Испитивање тачности методе	217
6.5.5.5. Испитивање прецизности методе	218
6.5.6. ПРОЦЈЕНА „ЗЕЛЕНОСТИ“ И ЕФИКАСНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА.....	220
7. ЗАКЉУЧЦИ	221
8. РЕФЕРЕНЦЕ	225
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА.....	243
ИЗЈАВЕ	247
Изјава о ауторству.....	248
Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију/докторски умјетнички рад учини јавно доступним	249
Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације	250
БИОГРАФИЈА АУТОРА	251

1. УВОД

ИНТЕРАКЦИЈА

Течна хроматографија хидрофилних интеракција (енгл. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) је хроматографска метода која се примјењује за анализу врло комплексних смјеша фармацеутски активних супстанци (енгл. *Active Pharmaceutical Ingredient* – API) и њихових сродних супстанци (нечистоће, деградациони производи и метаболити). Иако су прве HILIC анализе изведене много раније, назив „HILIC“ званично је увео *Andrew J. Alpert* тек 1990. године [1 – 3]. У претходном периоду, други назив за HILIC методу био је реверзна реверзно-фазна хроматографија (енгл. *Reverse Reversed-Phase Chromatography*), што се односило на реверзну реверзно-фазну течну хроматографију високих перформанси (енгл. *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC). Такође, наводи се и водена нормално-фазна хроматографија (енгл. *Aqueous Normal-Phase Chromatography*), што се односило на водену нормално-фазну течну хроматографију високих перформанси (енгл. *Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography* – NP-HPLC). Ипак, HILIC метода постала је предмет истраживања тек двијехиљадитих година, првенствено захваљујући производњи посебно развијених стационарних фаза способних да, различитим ретенционим механизмима, задржавају изразито поларна једињења [4 – 7].

За извођење HILIC методе користе се поларне силика-гел стационарне фазе или њихове модификације, које омогућавају анализу једињења различите поларности [8 – 12]. Мобилну фазу чини смјеша органског растварача и воденог раствора пуфера, чија се рН вриједност подешава одговарајућом киселином или базом [13]. Осим поларних и неполарних, HILIC омогућава и анализу наелектрисаних једињења, што је карактеристично за јоноизмјењивачку хроматографију (енгл. *Ion Exchange Chromatography* – IEC). Због свега наведеног, може се закључити да HILIC, комбинујући особине неколико хроматографских метода (NP-HPLC за стационарне фазе, RP-HPLC за мобилну фазу и IEC за анализу јона), пружа могућност истовременог одређивања структурно веома различитих једињења [14 – 16]. Број објављених радова у вези са развојем и употребом HILIC методе драстично се повећао између 2015. и 2022. године, достигавши више од 600 радова годишње од 2017. године. Овако значајан пораст интересовања за HILIC методу последица је њеног неограниченог развојног

потенцијала и важне улоге у многим научним областима, као што су: фармација, хемија, биохемија, медицина, форензика и многе друге [17].

1.1.1. Предности и недостаци течне хроматографије хидрофилних интеракција

Предност HILIC у односу на друге методе течне хроматографије је добра растворљивост поларних једињења у поларној мобилној фази, што је чест проблем код NP-HPLC методе [6, 10]. Због ниског вискозитета, високе испарљивости и ниског површинског напона мобилне фазе, HILIC метода је погодна за повезивање са масеном спектрометријом (енгл. *Mass Spectrometry*) посебно у режиму електроспреј јонизације (енгл. *Electrospray Ionization*) [18]. Омогућава раздвајање малих молекула органских киселина и база [6, 19]. Метода је избора у анализи амфифилних и високо хидрофилних једињења која се не могу задржавати у RP-HPLC систему, а немају наелектрисање које би омогућило ефикасно одређивање ИЕС методом [6, 20]. У поређењу са RP-HPLC методом, HILIC обезбјеђује бољу поновљивост резултата и добијање задовољавајуће оштрине и симетрије хроматографских пикова [21].

Највећи недостатак ове методе је ограничен избор органских растварача, који је сведен првенствено на ацетонитрил, док се рјеђе користе метанол и етанол. Због високе елуационе моћи, други органски растварачи често не омогућавају адекватно задржавање испитиваних једињења у систему. Осим тога, у HILIC методи често се јавља и велика осјетљивост ретенционог понашања испитиваних једињења – мале промјене садржаја ацетонитрила ($\pm 1\%$) доводе до великих промјена у ретенционом времену ($\pm 1-5$ минута). Такође, појединим HILIC стационарним фазама (нпр. амино) потребан је знатно дужи период кондиционирања за успостављање хемијске равнотеже између мобилне и стационарне фазе. Без обзира на наведене недостатке, HILIC је веома значајна и економична метода јер омогућава истовремену анализу структурно различитих једињења [20, 21].

1.1.2. Фактори који утичу на задржавање испитиваних једињења у HILIC систему

Имајући у виду сложеност HILIC система, важно је идентификовати све факторе који имају значајан утицај на ретенционе механизме испитиваних једињења. Наиме, величина промјене коју сваки фактор може да проузрокује у погледу задржавања

испитиваних једињења може се представити, према опадајућем интензитету, на следећи начин [22]:

тип стационарне фазе > рН вриједност воденог дијела мобилне фазе > садржај органског растварача > концентрација пуфера > температура стационарне фазе.

1.1.2.1. Стационарна фаза

Хемијске карактеристике различитих стационарних фаза, укључујући број и природу хемијски везаних група, утичу на ефикасност раздвајања кроз формирање воденог слоја на површини стационарне фазе. Природа хемијских веза утиче на процес адсорпције, што за резултат има површинске интеракције између испитиваног једињења и стационарне фазе (нпр. водоничне везе, дипол-дипол интеракције, јонска измјена и слично) [10, 23].

Стационарне фазе се дијеле на неутралне, наелектрисане и цвитерјонске, а у основи свих је најчешће силика-гел, хемијски модификован према потребама анализе. Функционалне групе којима се силика-гел дериватизује у циљу добијања неутралних стационарних фаза најчешће су: амидна, цијанопрпил, диолна и циклодекстринска. Основна карактеристика ових стационарних фаза је одсуство наелектрисања у распону рН вриједности које су типичне за мобилну фазу у HILIC методи. Највећу примјену имају стационарне фазе дериватизоване амидном функционалном групом, док се често користе и диолне модификације због изражене поларности диолних функционалних група [8, 24].

Наелектрисане стационарне фазе садрже поларне функционалне групе и носе позитивно или негативно наелектрисање, у зависности од рН вриједности воденог дијела мобилне фазе и врсте функционалних група на површини стационарне фазе. Раздвајање наелектрисаних једињења углавном се заснива на механизмима јонске измјене, али су присутни и механизми расподјеле и адсорпције [8]. У HILIC методи, најчешће се примјењују немодификоване силика-гел стационарне фазе, а разликују се три типа: тип А, тип Б и тип Ц. Силика типа А и Б су хидрофилне стационарне фазе са силанолним групама и силоксанским мостовима [25]. Код силика типа Ц до 95% силанолних Si-OH група замијењено је хидросилацијом са Si-H групама, које су много мање поларне и немају могућност грађења водоничних веза, нити електростатичких интеракција [8, 23, 25]. Међу првим представницима наелектрисаних стационарних фаза, добијених модификацијама силика-гела, издваја се аминопрпил модификација. Протонована

примарна аминок-група је позитивно наелектрисана и показује висок афинитет ка киселим једињењима. Хидрофилне интеракције преовлађују код задржавања ненаелектрисаних једињења, док су код негативно наелектрисаних једињења примарно присутни механизми анјонске измјене [8, 25, 26].

Површина цвтерјонских стационарних фаза модификована је тако да садрже позитивно наелектрисане кватернарне амонијум групе и негативно наелектрисане сулфонске групе, које су присутне у моларном односу 1:1. Ипак, на површини ових стационарних фаза је ниска вриједност нето негативног набоја. То се приписује већој удаљености сулфонских остатака од површине силика-гела. Због тога, цвтерјонске стационарне фазе омогућавају веома слабе механизме јонске измјене, у поређењу са силика тип А и Б и аминок стационарним фазама [23, 24, 26].

Поред наведених основних типова HILIC стационарних фаза, постоје и бројни други који имају примјену у анализи специфичних група једињења. Неке од тих стационарних фаза су: полиетилен-гликолне, тиоглицеролске, полисукцинимидске, триазолске, стационарне фазе модификоване шећерима и бројне друге [10, 27 – 29]. Оваква разноликост стационарних фаза омогућава ефикасно раздвајање структурно различитих једињења, али истовремено чини избор одговарајуће стационарне фазе изазовнијим. Због тога је врло важно познавати физичко-хемијске особине испитиваних једињења, процесе који доприносе ефикасном раздвајању и особине стационарних фаза [30, 31].

1.1.2.2. Мобилна фаза

Мобилна фаза која се користи у HILIC методи богата је органским растварачем (30 – 97 %) који има снажан утицај на задржавање и раздвајање испитиваних једињења. Идеалан органски растварач требало би да буде растворљив у води, али без могућности да дјелује као дозор или акцептор водоника. Најчешће кориштен органски растварач, који испуњава наведене захтјеве, је ацетонитрил. Има ниску релативну густину због чега не проузрокује значајно повећање притиска током анализе и компатибилан је са великим бројем детектора. Повећање поларности и способност учествовања у протон-донорским и протон-акцепторским интеракцијама повећава елуациону моћ растварача сљедећим редослиједом:

ацетонитрил < тетрахидрофуран < 2-пропанол < етанол < метанол < вода.

Протон-донорски растварачи (нпр. алкохоли) показују најслабије ефекте задржавања испитиваних једињења, што је посебно корисна особина у случајевима снажних интеракција испитиваних једињења са стационарном фазом. Циклични етри растворљиви у води имају протон-акцепторске карактеристике које могу ометати формирање водоничних веза између испитиваних једињења и површине стационарне фазе, због чега се знатно мање користе [8, 25, 29, 32]. Независно од типа стационарне фазе, у HILIC-у се задржавање испитиваних једињења повећава са повећањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази, што је посебно изражено при садржајима ацетонитрила већим од 90 % [13].

Неоргански дио мобилне фазе чини водени раствор пуфера, најчешће амонијум-ацетата и амонијум-формијата. Ови пуфери показују добру растворљивост у мобилној фази са високим садржајем ацетонитрила, спречавају иреверзибилно везивање испитиваних једињења са стационарном фазом, омогућавају адекватно задржавање једињења и добијање хроматографских пикова задовољавајућег облика [7, 33 – 35]. Ефикасност раздвајања у HILIC-у зависи и од концентрације пуфера [16]. Повећање концентрације пуфера доводи до смањења електростатичких интеракција наелектрисаних једињења на наелектрисаним и цвтерјонским стационарним фазама. Када између испитиваних једињења и површине стационарне фазе постоје привлачне или одбојне електростатичке силе, повећање концентрације пуфера води ка скраћењу или продужавању задржавања испитиваних једињења. Осим тога, промјена концентрације пуфера модификује и дебљину воденог слоја адсорбованог на површини стационарне фазе, што може утицати и на задржавање неутралних једињења [8]. Концентрације пуфера обично су између 5 и 100 mM, а у случају јаких интеракција између испитиваних једињења и стационарне фазе, потребне су концентрације веће од 100 mM. За бољу репродуктивност резултата и симетрију хроматографских пикова, препоручује се концентрација пуфера од минимално 5 mM. Међутим, при садржају ацетонитрила већем од 95 % препоручује се концентрација пуфера до 15 mM, јер при већим концентрацијама може доћи до преципитације пуфера [8, 29].

На облик испитиваних једињења (неутралан/молекулски или наелектрисан/јонизован) значајан утицај има pH вриједност воденог дијела мобилне фазе. Пожељно је одабрати ону pH вриједност при којој се сва испитивана једињења налазе у јонизованом облику, јер су јонизовани облици хидрофилнији од молекулских [36]. У HILIC-у се најчешће користе pH вриједности воденог дијела мобилне фазе у распону од 3,0 до 8,0, док су

стационарне фазе често независне од рН вриједности. Међутим, код силика стационарних фаза тип А и Б при рН вриједностима изнад 4,0 долази до депротонавања силанолних група и површина стационарне фазе постаје негативно наелектрисана. Тада се електростатичке интеракције са позитивно наелектрисаним једињењима драстично повећавају, што за последицу има њихово продужено задржавање [8, 16]. Дакле, оптимизација садржаја органског растварача, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе представља ефикасан алат за контролу ретенционих механизма и времена задржавања једињења [16].

Температура стационарне фазе има мањи утицај на задржавање испитиваних једињења, а њен ефекат је углавном повезан са енталпијом трансфера испитиваног једињења између мобилне и стационарне фазе. Уопштено, задржавање испитиваних једињења у HILIC методи се продужава при нижим температурама стационарне фазе. Осим на задржавање испитиваних једињења, температура стационарне фазе утиче и на ширину хроматографских пикова – ширина пика се смањује са повећањем температуре [8, 37].

1.1.2.3. Структурне особине испитиваних једињења

Структурне особине једињења значајно утичу на његове хемијске особине, које одређују специфичне интеракције са стационарном и мобилном фазом, а тиме и ретенционо понашање [38]. Кинетичка покретачка сила у хроматографском систему произилази из равнотеже расподеле између стационарне (s) и мобилне (m) фазе. Успостављање те равнотеже у отвореним системима, какав је сваки хроматографски систем, подразумева једнакост хемијских потенцијала испитиваног једињења (i) у обје фазе:

$$\mu_i^s = \mu_i^m \quad (1)$$

Параметар μ_i представља интринзични термодинамички афинитет једињења према систему, односно хемијски потенцијал у хипотетичком основном стању, гдје је сваки молекул једињења i , при јединичној концентрацији, окружен растварачем [38, 39]. Вриједност μ_i зависи од два фактора: први је хемијски потенцијал основног стања (μ_i^0), а други је разблажење (c_i). У хроматографским системима, обично се ради са веома ниским концентрацијама испитиваних једињења. У стању равнотеже, хемијски потенцијал (μ_i) за испитивано једињење (i) једнак је у двије фазе које се међусобно не мијешају (стационарна и мобилна). Према томе, ако једна од фаза има мању вриједност μ_i^0 , она ће то надокнадити већом концентрацијом испитиваног једињења (c_i) како би се постигла равнотежа. Дакле, ако је $\Delta\mu_i^0$ позитивна вриједност, μ_i^0 вриједност је већа у

мобилној фази, односно концентрација испитиваног једињења већа је у стационарној фази, због инверзне зависности μ_i и c_i [39].

Такође, веома је значајна и анализа односа квантитативне структуре и ретенционог понашања испитиваних једињења (енгл. *Quantitative Structure-Retention Relationships* – QSRR). Постоје бројни QSRR модели, али најчешће се примјењују они базирани на односима линеарне слободне енергије (енгл. *Linear Free Energy Relations*). Најпознатији међу њима је Абрахамов модел односа линеарне солватационе енергије (енгл. *Linear Solvation Energy Relationship*), који се базира на солватохромним дескрипторима изведеним из спектроскопских експеримената [40]. Користан је за предвиђање задржавања једињења у хроматографским системима, а посебно за разјашњавање ретенционих механизма на различитим стационарним фазама [39].

1.1.3. Хеометријски приступ у HILIC системима

Хеометрија подразумева примјену математичких, статистичких и графичких метода за рјешавање проблема у сложеним системима, какви су HILIC системи. Најчешће се користи за дизајнирање и оптимизацију експеримената, обраду и анализу података, те креирање математичких модела. Примјеном хеометрије може се значајно унаприједити ефикасност истраживања, тј. смањити број неопходних експеримената уз истовремено добијање максималне количине поузданих информација о анализираном систему [41].

Хеометрија се примјењује у различитим научним областима, а посебно у фармацији и хемији, гдје има важну улогу у развоју аналитичких метода. Њен значај огледа се у праћењу утицаја великог броја фактора на испитиване одговоре система. Дизајнирање експеримената употребом хеометрије (*Design of Experiments* – DoE) осигурава тачне и поуздане резултате истраживања. Употреба DoE омогућава да се дефинише повезаност између промјене одговора система и испитиваних фактора истог тог система, као и да се дефинише присуство вишефакторских утицаја. Могућност испитивања вишефакторских утицаја представља највећу предност DoE у односу на традиционални приступ „један фактор у једном тренутку“ (енгл. *one-factor-at-a-time* – OFAT) [42].

OFAT приступ подразумева испитивање утицаја једног фактора на одговор система, док се остали фактори одржавају на константном нивоу. Оптимална вриједност испитиваног фактора се утврђује и задржава, а затим се прелази на испитивање сљедећег фактора. Овакав приступ често доводи до развоја метода које нису робусне, извођење великог броја експеримената, што је временски и економски захтјевно [43].

Први корак у примјени DoE методологије јесте извођење минималног броја пажљиво планираних експеримената и идентификација критичних фактора система. То омогућава креирање одговарајућих математичких модела који, са високим степеном тачности, могу поуздано предвиђати понашање праћених одговора система. Циљ оваквог приступа је развој модела способних да предвиде раздвајање испитиваних једињења под било којим, новим хроматографским условима. Други корак подразумијева симулацију великог броја хроматографских услова с циљем да се изабере најоптималнији одговор система – максималан одговор на глобалном нивоу. На тај начин се превазилази проблем постизања само локалног оптимума, који је карактеристичан за OFAT приступ [44].

1.1.3.1. Дерингера функција пожељности одговора

Дефинисање оптималних услова хроматографске анализе подразумијева трансформацију информација садржаних у хроматограмима у нумеричку вриједност, која се назива циљна функција (енгл. *Objective Function*). Избор ове функције зависи од циљева оптимизације, а у процесу развоја хроматографске методе обично се дефинише као задовољавајући фактор резолуције (R_s), краће вријеме трајања анализе (t_R) или задовољавајући фактор симетрије пика (A_s). Дакле, проблем оптимизације се своди на проналажење најприкладније вриједности циљне функције, која ће омогућити подешавање експерименталних услова тако да се постигне жељено понашање система [44, 45].

На оптималне услове анализе обично истовремено утиче више фактора, што захтијева примјену вишекритеријумске оптимизације. Једна од најпознатијих метода за ову намјену јесте Дерингера функција пожељности одговора (енгл. *Derringer's desirability function*). Њена примјена подразумијева креирање индивидуалних функција пожељности [$d_i(\hat{y}_i)$] за сваки одговор система [$\hat{y}_i(x)$]. Вриједност ових функција варира између 0 и 1, при чему је $d_i(\hat{y}_i) = 0$ вриједност за најнепожељнији, док је $d_i(\hat{y}_i) = 1$ вриједност за најпожељнији одговор.

У зависности од усвојених критеријума оптимизације, могу се креирати различите функције унутар прихватљивог распона вриједности одговора датог са ($U_i - L_i$), гдје је U_i горња, а L_i доња прихватљива вриједност за одговор.

Уколико је циљ оптимизације максимизирање одговора, онда се $d_i(\hat{y}_i)$ описује сљедећим изразом:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{ако је } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (2)$$

гдје је s вриједност степена, названа „тежина“ или значајност, коју одређује сам аналитичар у зависности од тога колико је важно да $\hat{y}_i$ буде близу максимума.

Уколико је циљ оптимизације минимизирање одговора, $d_i(\hat{y}_i)$ се описује сљедећим изразом:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{U_i - \hat{y}_i(x)}{U_i - L_i} \right)^t & \text{ако је } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (3)$$

гдје је t тежински коефицијент – одређује колико је значајно да $\hat{y}_i$ буде близу минимума.

Када је циљна вриједност T_i најпожељнији одговор, функција $d_i(\hat{y}_i)$ се описује једначином:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{ако је } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq T_i \\ 1 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) = T_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right)^s & \text{ако је } T_i < \hat{y}_i(x) < U_i \\ 0 & \text{ако је } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (4)$$

Када се n фактора трансформише у функције пожељности, оне се комбинују у јединствену функцију названу глобална пожељност (D). Ово се постиже кориштењем сљедећег израза:

$$D = (d_1^{r_1} x \cdot d_2^{r_2} x \cdot \dots \cdot d_n^{r_n} x)^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (5)$$

гдје је r_i значај сваке варијабле у односу на остале.

Вриједност $D = 1$ показује да су сви критеријуми унутар жељеног распона и да је постигнута идеална глобална пожељност. Када је вриједност $D = 0$, бар један од критеријума је изван пожељног распона, због чега се не може постићи глобални оптимум [46, 47].

1.1.3.2. Избор испитиваних фактора и факторских нивоа

Прије дизајнирања експеримената, а након постављања циља истраживања, процјењују се критични фактори система који ће бити оптимизовани. То се постиже примјеном скрининг дизајна, или спровођењем прелиминарних експеримената према искуству аналитичара. Како би се смањио број потребних експеримената и олакшало креирање математичких модела, од посебног је значаја свести број испитиваних фактора на минимум. У хроматографским системима постоји много фактора који се могу подијелити на:

- инструменталне (запремина инјектовања, тип детектора, таласна дужина детекције),
- факторе који се тичу узорка (растворљивост, хидрофилност),
- факторе мобилне фазе (брзина протока, врста и садржај органског растварача, врста и концентрација пуфера, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе),
- факторе везане за стационарну фазу (тип стационарне фазе, дужина, пречник, величина честица, температура, вријеме кондиционирања) и
- грешке аналитичара (вагање, одмјеравање и слично).

Поједини фактори (углавном инструментални) имају предвидиве ефекте и обично се не оптимизују. С друге стране, фактори попут садржаја органског растварача, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе немају увијек предвидив утицај. Они су скоро увијек значајни за испитивани систем, те се често идентификују као критични фактори и налазе се у процесу оптимизације [45, 48 – 50].

Након одабира фактора, кључан је избор факторских нивоа. Мали број факторских нивоа је предност DoE, али истовремено захтијева да нивои буду пажљиво дефинисани како би се обезбиједила довољна варијација одговора. Вриједности блиске једна другој могу довести до недовољне статистичке значајности и, посљедично, до проналажења само локалног оптимума – слично као код OFAT приступа. С друге стране, прешироки интервали повећавају сложеност математичких модела. Због тога је важно факторске

нивое подесити тако да се могу описати линеарним и квадратним функцијама, које се најчешће користе у хеометрији. Ипак, када је неопходно испитати јако широке интервале, потребно је размотрити креирање сложенијих (нпр. кубних) математичких модела. Ширина испитиваног интервала зависи и од самог фактора – некада јако мале варијације у вриједностима испитиваног фактора доводе до великих промјена у вриједностима одговора (нпр. утицај садржаја ацетонитрила на ретенционо вријеме испитиваних једињења). Распон рН вриједности воденог дијела мобилне фазе који се испитује треба подесити у складу са рКа вриједностима испитиваних једињења и прилагодити га степену јонизације тих једињења. Због тога се обично бирају оне рН вриједности при којима се испитивана једињења налазе или у молекулском или у јонизованом облику. Присуство оба облика доводи до лоше симетрије или цијепања хроматографских пикова, због различите хидрофилности ових облика. Због свега наведеног, вриједности факторских нивоа требало би подешавати за сваки фактор понаособ [45, 48, 50].

1.1.3.3. Избор хроматографских одговора

Хроматографски одговори који ће се пратити зависе од постављених циљева анализе. Једноставни хроматографски одговори који описују појединачне пикове могу се одредити директним читавањем или једноставним рачунањем, а подразумевају:

- ретенционо вријеме, t_R које се читава директно са хроматограма,
- редуковано ретенционо вријеме, t_R' које се рачуна према слједећем изразу:

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (6)$$

при чему је t_0 ретенционо вријеме мобилне фазе или мртво вријеме,

- ретенциони фактор, k који се рачуна према слједећем изразу:

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (7)$$

Често је важно пратити и одговоре који се тичу раздвајања сусједних пикова, а то су:

- фактор селективности, α који се рачуна на основу вриједности ретенционих фактора сусједних хроматографских пикова:

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (8)$$

- фактор резолуције, R_s , који узима у обзир и ширину хроматографских пикова:

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (w_2 + w_1) \quad (9)$$

гдје су w_1 и w_2 ширине сусједних хроматографских пикова.

Поред наведених одговора могу се пратити и: фактор симетрије хроматографског пика (A_s), ширина хроматографског пика (w) и други [45, 50].

1.1.3.4. Избор експерименталног дизајна и извођење експеримената

Постоје различити типови експерименталног дизајна, а дијеле се према моделу (линеарни или квадратни, са или без интеракција) и према сврси (скрининг или оптимизација). Примјена линеарних модела подразумијева испитивање фактора на два нивоа, док су за квадратне моделе потребна три нивоа. Са порастом броја испитиваних фактора и реда модела, расте и број потребних експеримената. У наставку ће бити описани дизајни кориштени у овој докторској дисертацији – фракциони факторски дизајн (енгл. *Fractional Factorial Design* – FrFD), те оптимизациони дизајни: Бокс-Бенкен дизајн (енгл. *Box-Behnken Design* – BBD) и централни композициони дизајн (енгл. *Central Composite Design* – CCD).

1.1.3.4.1. Фракциони факторски дизајн

Факторски дизајни дефинишу експерименте за све комбинације факторских нивоа (постоји L^k комбинација за L нивоа и k фактора). У пуном факторском дизајну (енгл. *Full Factorial Design* – FFD) изводи се сваки експеримент, док се у FrFD изводи само одређени подскуп експеримената који омогућава израчунавање коефицијената модела. Дизајнима на два нивоа могу се пратити главни и интеракцијски ефекти, али не и ефекти вишег реда [48].

Употреба FFD облика 2^8 , тј. испитивање 8 фактора на два нивоа подразумијева извођење 256 експеримената, при чему се од 255 степени слободе око 64 % односи на интеракције вишег реда, чији је значај често занемарив. Дакле, када је потребно идентификовати само доминантне факторе, а није потребно процјењивати све факторе и њихове заједничке ефекте, примјењују се FrFD. Такви примјери у хроматографији подразумијевају скрининг (идентификација критичних фактора) и испитивање робусности методе [47].

Код примјене FrFD важан је правилан избор фракције. Најчешће кориштени FrFD су: полу-фракциони (број експеримената једнак је половини броја код FFD), четврт-фракциони (број експеримената једнак је четвртини броја код FFD), *saturated main effects*

designs (SMED) и *supersaturated main effects designs* (SSMED). SMED и SSMED су високо фракционисани дизајни који се користе само за процјену главних ефеката фактора [51].

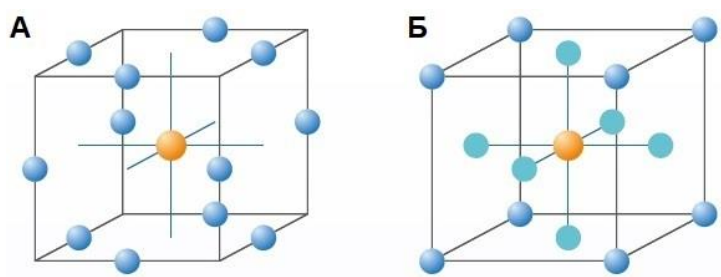
1.1.3.4.2. Бокс-Бенкен дизајн

BBD омогућава креирање квадратних модела, а експериментални простор за три испитивана фактора може се представити у облику коцке, гдје свака димензија представља одговарајући фактор. Тјемена коцке представљају одговарајући фактор на доњем (−1) и горњем (+1) нивоу, а средине страница коцке представљају нулти ниво (слика 1А).

Број експеримената (N) које је потребно извести према матрици овог дизајна дат је изразом:

$$N = 2k(k - 1) + n_c \quad (10)$$

гдје је k број испитиваних фактора, а n_c број репликација у централној тачки.



Слика 1. Шематски приказ факторских комбинација код: (А) Бокс-Бенкен дизајна, (Б) Централног композиционог дизајна. (Припремљено према [52])

За испитивање три фактора на три нивоа потребно је извести 12 експеримената и одабрани број понављања у централној тачки (најчешће 1 или 3), што је мање него код CCD и FFD. Због тога се BBD сматра врло ефикасним дизајном. Овај дизајн не испитује истовремено све факторе на горњим или доњим нивоима, односно при екстремно високим и екстремно ниским вриједностима, што је посебна предност у случајевима када извођење ових експеримената може довести до неприхватљивих резултата. Међутим, употреба овог дизајна није препоручљива уколико су значајни одговори система при екстремним вриједностима фактора [50, 53 – 55].

1.1.3.4.3. Централни композициони дизајн

CCD омогућава испитивање фактора на више нивоа, без потребе за извођењем експеримента за све комбинације факторских нивоа. Више покрива простор ближе

центру, него ка периферији, а комбинује FFD на два нивоа са звјездастим дизајном и централним тачкама (слика 1Б). У зависности од тога како су оријентисане тачке, разликују се:

- описани (енгл. *circumscribed design*) – тачке на истој удаљености од центра,
- уписани (енгл. *inscribed design*) – тачке унутар простора факторског дизајна и
- централно оријентисани (енгл. *face centered design*) – тачке на странама тачака FFD.

CCD захтијева извођење следећег броја експеримената (N):

$$N = L^k + Lk + n_c \quad (11)$$

гдје је L број нивоа, k број испитиваних фактора, а n_c број репликованих централних тачака. То значи да је за испитивање три фактора на три нивоа потребно извести 14 експеримената са одабраним бројем понављања у централној тачки (најчешће 1 или 3), што је значајно мање од 27, колико их је потребно извести кориштењем FFD [48, 56].

1.1.3.5. Креирање математичког модела

Зависност између хроматографских одговора и испитиваних фактора система најчешће се описује линеарним и квадратним моделима, при чему се линеарни модели могу представити следећим изразом:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \dots + \beta_k X_{ik} \quad (12)$$

гдје је y – зависно промјенљива (одговор који се прати), $X_1, X_2, X_3 \dots X_k$ – независне промјенљиве (испитивани фактори), $i = 1$ до n , гдје је n број експеримената, k број испитиваних фактора, β_0 одсјечак, а $\beta_1, \beta_2, \beta_3 \dots \beta_k$ представљају регресионе коефицијенте линеарних чланова.

Квадратни модели се, у свом општем облику, могу представити на следећи начин:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_{11} X_{i1}^2 + \beta_2 X_{i2} + \beta_{22} X_{i2}^2 + \beta_{12} X_{i1} X_{i2} + \dots + \beta_k X_{ik} + \beta_{kk} X_{ik}^2 \quad (13)$$

гдје је y – зависно промјенљива (одговор који се прати), $X_1, X_2, X_3 \dots X_k$ – независне промјенљиве (испитивани фактори), $i = 1$ до n , гдје је n број експеримената, k број испитиваних фактора, β_0 одсјечак, док $\beta_1, \beta_2, \beta_3 \dots \beta_k$ представљају регресионе коефицијенте линеарних чланова (изражавају утицај испитиваних фактора на одговор), $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23} \dots \beta_{k-1k}$ представљају регресионе коефицијенте факторских интеракција

(изражавају утицај интеракције између испитиваних фактора на одговор), а β_{11} , β_{22} , β_{33} ... β_{kk} представљају регресионе коефицијенте квадратних чланова (изражавају квадратни утицај испитиваних фактора на одговор).

За креирање ових модела најчешће се користи вишеструка линеарна регресиона анализа (енгл. *Multiple Linear Regression* – MLR) и метода најмањих квадрата (енгл. *Least Squares Method*). Статистичка анализа, која потврђује поузданост креираног модела, могућа је када се оствари довољан број степени слободe за процјену експерименталне грешке.

Апсолутна вриједност линеарних коефицијента пружа увид у степен утицаја испитиваног фактора на дати одговор, а предзнак означава смјер тог утицаја. Позитиван предзнак значи да са порастом вриједности испитиваног фактора расте и одговор система, док негативан предзнак значи да се одговор система смањује са порастом испитиваног фактора. Статистички значајне двофакторске интеракције могу се представити у виду 3D-графика површине одговора, што значајно олакшава интерпретацију резултата. Наиме, у случају двофакторских интеракција могуће је прецизно визуелно дефинисати двофакторски утицај одабраних фактора на испитивани одговор система (нпр. вишефакторска детаљна анализа сваког појединачног одговора система) [12, 45].

1.2. РЕТЕНЦИОНИ МОДЕЛИ У ТЕЧНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ ХИДРОФИЛНИХ ИНТЕРАКЦИЈА

Познато је да су ретенциони механизми у RP–HPLC методи последица расподеле испитиваних једињења између мобилне и стационарне фазе, или адсорпције на површини стационарне фазе. Ови процеси дефинисани су одговарајућим ретенционим моделима [57, 58]. С друге стране, задржавање испитиваних једињења у HILIC систему је веома сложено, јер више различитих фактора утиче на ретенционе механизме (поглавље 1.1.2) [18]. Ова комплексност потиче од истовременог присуства процеса расподеле (партиције), адсорпције (електростатичке и интермолекулске интеракције: *Van der Waals* силе, водоничне везе, дипол-дипол интеракције и Лондон дисперзионе силе), јонске измјене и хидрофобних интеракција (слика 2) [3, 17, 59 – 61].



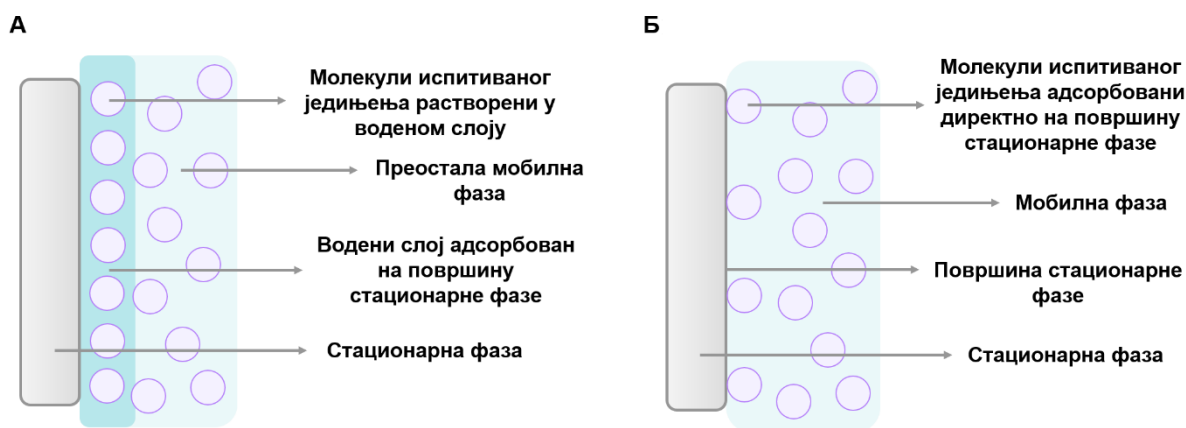
Слика 2. Приказ могућих интеракција између испитиваних једињења и површине стационарне фазе представљен на примјеру силика стационарне фазе.

Механизам раздвајања разликује се за сваку нову комбинацију стационарне и мобилне фазе, а зависи и од структуре испитиваног једињења [53, 62]. Разлог томе је специфичност HILIC система која се огледа у томе да стационарну фазу заправо чине танки, непокретни водени слојеви обогаћени пуфером, тј. псеудо-стационарна фаза. Дакле, дио који у RP–HPLC-у служи као стационарна фаза, у HILIC-у представља истовремено и стационарну фазу, али и „носач“ за псеудо-стационарну фазу, што

омогућава формирање више ретенционих механизма [26, 63]. Како би се што боље разумјела природа присутних, али и доминантних ретенционих механизма, потребно је описати ефекат садржаја заступљенијег елуента у мобилној фази [25]. У ту сврху развијени су различити теоријски ретенциони модели који могу, врло успјешно, вршити процјену заступљености појединих ретенционих механизма.

1.2.1. Партициони ретенциони модел

Основни ретенциони механизам у HILIC систему је хидрофилна распоdjела jедињења између мобилне и псеудо-стационарне фазе (слика 3A) [1].



Слика 3. Илустровани приказ процеса (A) распоdjеле и (B) адсорпције у HILIC систему.

Када се параметри линеарно-логаритамског модела, који је кориштен за описивање ретенционог понашања у RP-HPLC систему, прилагоде HILIC систему добија се:

$$\log k = \log k_0 - m \varphi \quad (14)$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног jедињења, k_0 ретенциони фактор испитиваног jедињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, φ запреминска фракција воденог диjела мобилне фазе, а m нагиб праве добијене прилагођавањем линеарног модела експерименталним подацима.

У довољно уском интервалу односа воденог и органског диjела мобилне фазе, модел представљен изразом (14) представља *партициони ретенциони модел* [64, 65].

1.2.2. Адсорпциони ретенциони модел

Осим процеса расподеле, у HILIC систему се дешава и процес адсорпције (слика 3Б), који је претходно описан у NP-HPLC системима. Адекватним прилагођавањем параметара логаритамског модела HILIC систему, израз:

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \quad (15)$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, φ запреминска фракција воденог дијела мобилне фазе, k_0 екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач и m нагиб праве добијене прилагођавањем линеарног модела експерименталним подацима, представља *адсорпциони ретенциони модел* [25, 65].

1.2.3. Квадратни ретенциони модел

Ретенциони механизми се, осим линеарним, могу изразити и полиномијалним једначинама. Један од таквих модела је *квадратни ретенциони модел*, представљен слjedeћим изразом:

$$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2 \quad (16)$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, S_1 и S_2 регресиони коефицијенти, а φ је запреминска фракција воденог дијела мобилне фазе [66 – 69].

Овај модел заправо представља партициони ретенциони модел примијењен на широки распон односа воденог и органског дијела мобилне фазе. Полином другог реда (израз (16)) математички представља квадратну функцију, која има облик параболе. Како параметар S_2 увијек има вриједност већу од нуле, дата функција има минимум који се достиже у тјемени параболе. Ова минимална вриједност добија се на основу израза:

$$\ln k = (4 S_2 \cdot \ln k_w - S_1^2) / 4 \cdot S_2 \quad (17)$$

Наведена вриједност се достиже се у тачки:

$$\varphi_{min} = - S_1 / 2 \cdot S_2 \quad (18)$$

Параметар φ_{min} представља садржај воденог дијела мобилне фазе при коме ретенциони фактор има најнижу вриједност, која се може добити на сљедећи начин [70]:

$$k = \exp ((4 S_2 \cdot \ln k_w - S_1^2) / 4 \cdot S_2) \quad (19)$$

1.2.4. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел

Претходно описани линеарни и квадратни ретенциони модели не омогућавају прецизан опис ретенционог понашања испитиваних једињења у пуном распону односа воденог и органског дијела мобилне фазе. Због тога је, комбиновањем израза (14) и (15), дефинисан мјешовити ретенциони модел, који узима у обзир и партиционе и адсорпционе ефекте:

$$\ln k = \ln k_0 - b \varphi_{(H_2O)} \quad (20)$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, k_0 екстраполисани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист водени раствор пуфера, b регресиони коефицијент и φ запреминска фракција воденог дијела мобилне фазе [71].

Ипак, при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, ни израз (20) не даје увијек задовољавајући опис ретенционог понашања испитиваних једињења [32]. Због тога је, коначно, представљен двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел дефинисан изразом:

$$\log k = a + m_{RP} \cdot \varphi - m_{HILIC} \cdot \log (1 + b \cdot \varphi) \quad (21)$$

гдје је k ретенциони фактор испитиваног једињења, m_{RP} параметер који описује утицај повећања садржаја воденог дијела мобилне фазе на задржавање испитиваних једињења услед присуства RP-HPLC механизма у мобилним фазама богатим водом, m_{HILIC} мјера утицаја садржаја воденог дијела мобилне фазе на смањење задржавања у HILIC региону, b описује задржавање при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, a емпиријска константа и φ запреминска фракција воденог дијела мобилне фазе [72].

Када се развије двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизам, кривуље добијене прилагођавањем модела описаног изразом (20) експерименталним подацима имају облик параболе. Вриједности параметара m_{RP} , m_{HILIC} , a и b одређују се нелинеарном регресионом анализом. Минимум функције дате изразом (21) достиже се у нули њеног првог извода. Рјешавањем првог извода функције и адекватним трансформацијама добија се да је:

$$\varphi_{min} = (0,434 m_{HILIC})/m_{RP} - 1/b \quad (22)$$

Добијена вриједност представља садржај воденог дијела мобилне фазе при којем се јавља прелаз између HILIC и RP-HPLC механизма [32]. При високим садржајима воденог дијела мобилне фазе доминира RP-HPLC механизам, јер хидрофобне интеракције преовлађују над поларним. Повећањем садржаја органског растварача задржавање испитиваних једињења се смањује до минималне вриједности, када се дешава прелаз из RP-HPLC у HILIC механизам (φ_{min}). На овом прелазу једињења показују веома слабо задржавање на стационарној фази. Даљим повећањем садржаја органског растварача, поларне интеракције постају доминантне у односу на хидрофобне, што доводи до преовлађивања HILIC ретенционих механизма и продуженог задржавања испитиваних једињења [73].

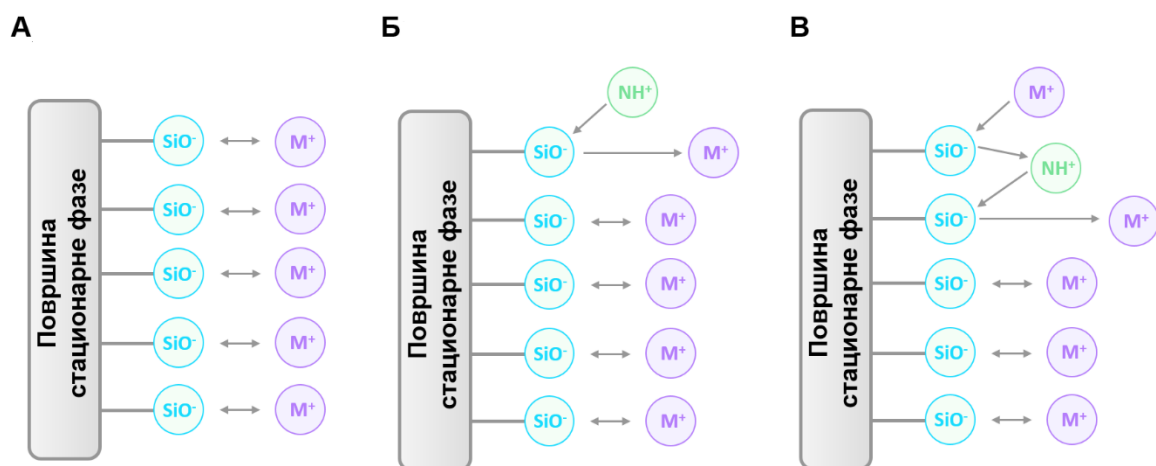
1.2.5. Јоноизмјењивачки ретенциони модел

Када су површине стационарних фаза наелектрисане, а испитивана једињења се налазе у јонизованом облику, присутан је и јоноизмјењивачки ретенциони механизам. Врста и јачина сила које владају између јона испитиваних једињења и наелектрисане површине стационарне фазе зависе од особина испитиваних једињења, те типа и особина стационарне фазе. С обзиром на то да се бројна кисела, базна и амфотерна једињења могу анализирати на различитим поларним стационарним фазама са површинским наелектрисањем, процеси катјонске или ањонске измјене често доприносе укупном HILIC ретенционом механизму.

Већина силанолних група на површини силика стационарних фаза је слабо кисела, док је мали проценат јако кисео и јонизује при нижим рН вриједностима (< 3,50). Поред појединачних, постоји и значајан проценат геминалних силанола. Они се формирају дехидратацијом силика и могу се, под одговарајућим условима, рехидратисати. Како је силика окарактерисана као „живи полимер“, сматра се да се силаноли и силоксанске групе налазе у стању динамичке равнотеже. Због тога је лако претпоставити да је јонска измјена основна интеракција која може настати између наелектрисаних једињења и силанолних група. Процес катјонске измјене (која је у овом случају присутна) може се представити као:



гдје SiO^- представља наелектрисане силанолне групе на површини стационарне фазе, NH^+ јонизовани облик базног једињења, а M^+ супротно наелектрисани јон (слика 4) [74].



Слика 4. Приказ процеса катјонске измјене: (А) Динамичка равнотежа између аниона стационарне фазе и катјона мобилне фазе; (Б) Катјони из узорка замјењују катјоне мобилне фазе и везују се на површину стационарне фазе; (В) Катјони мобилне фазе замјењују катјоне узорка који се помјерају на следећу измјењивачку групу

Константа равнотеже јонске измјене, K_{ix} дата је изразом:

$$K_{ix} = \frac{[\text{SiO}^- \text{NH}^+][\text{M}^+]}{[\text{SiO}^- \text{M}^+][\text{NH}^+]} \quad (24)$$

Коефицијент расподеле повезан је са константом равнотеже јонске измјене, а ретенциони фактор са коефицијентом расподеле, те се након одговарајућих трансформација добија:

$$k = m (1/[C]) + a \quad (25)$$

гдје је k ретенциони фактор једињења, $[C]$ концентрација пуфера, m нагиб праве добијене прилагођавањем модела експерименталним подацима, а a одсјечак модела [74, 75].

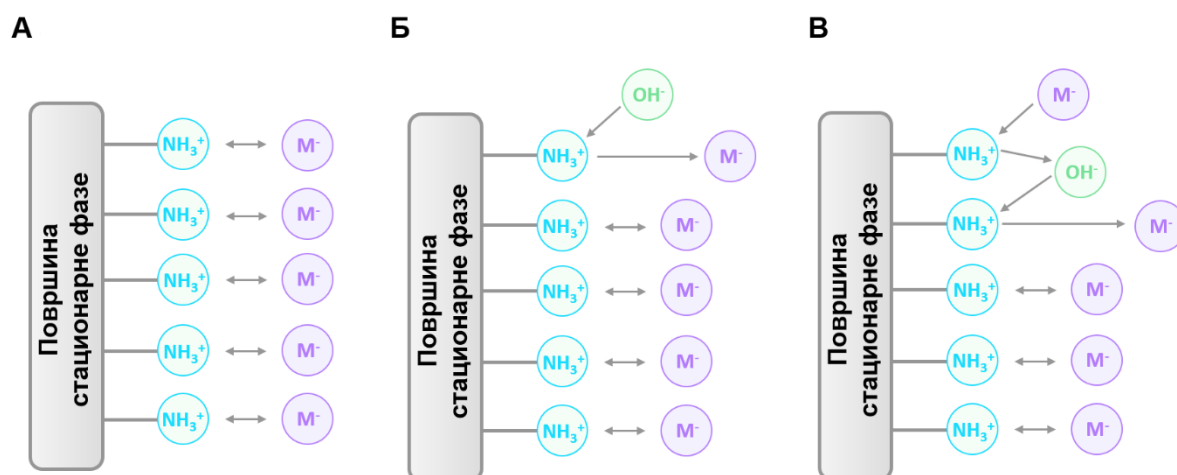
Ова зависност може се представити и логаритамском функцијом:

$$\log k = -s \log [C] + \text{konstanta} \quad (26)$$

гдје s представља однос наелектрисуња јона узорка и контра-јона из мобилне фазе [75, 76].

Изрази (24) и (25) могу се примијенити и на процес анијонске измјене, имајући у виду да површина стационарне фазе и испитивана једињења и тада носе супротно

наелектрисање. Процес који прати анјонску измјену еквивалентан је процесу катјонске измјене и може се илустровати по истом принципу (слика 5).



Слика 5. Приказ процеса анјонске измјене: (А) Динамичка равнотежа између катјона стационарне фазе и анјона мобилне фазе; (Б) Анјони из узорка замјењују анјоне мобилне фазе и везују се на површину стационарне фазе; (В) Анјони мобилне фазе замјењују анјоне узорка који се помјерају на следећу измјењивачку групу

1.2.6. Ретенциони модели креирани употребом експерименталног дизајна

Претходно описани ретенциони модели прате утицај појединачних фактора на ретенционо понашање испитиваних једињења. Међутим, нити један од ових модела не омогућава истовремено испитивање појединачних утицаја више фактора или њихових двофакторских интеракција. Најјачи утицај на ретенционе механизме испитиваних једињења имају: садржај ацетонитрила у мобилној фази, концентрација пуфера и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе. [77 – 79]. За идентификацију и квантитативну процјену значајних двофакторских интеракција, као и за процјену доприноса појединачних фактора, неопходно је примијенити хеометријски приступ. Овај приступ, заснован на DoE методологији, пружа поуздане резултате и веома корисне информације о испитиваном систему, уз оптимизацију потрошње времена и реагенса [80 – 83].

Сложеност ретенционих механизма у HILIC систему намеће потребу примјене експерименталних модела, који омогућавају предвиђање ретенционих механизма у оквиру дефинисаног експерименталног простора, те детаљну и поуздану статистичку и графичку анализу. Испитивање међуфакторских интеракција подразумијева примјену математичких модела (нпр. квадратног), који се креирају примејном DoE методологије [41].

1.3. ПРОГРАМСКИ ЈЕЗИК *PYTHON*

Python је свестран програмски језик који се широко примјењује због своје читљивости, једноставности и богатих библиотека. Једна од кључних предности *Python*-а је његова интерпретативна природа, која омогућава тренутно извршавање кода линију по линију, што отклањање грешака чини релативно једноставним. Стандардна *Python* библиотека је веома обимна и пружа бројне могућности укључујући модуле за системске функционалности (нпр. читање и писање датотека). Осим стандардне, доступан је и велики број екстерних библиотека, као што су *Numerical Python*, *pandas*, *Matplotlib* и *Scientific Python*, које су неопходне за научно рачунање, анализу и визуелизацију података [84 – 86]. Те библиотеке су, заједно са интегрисаним модулима *sys*, *math* и *CSV*, кориштене за писање овог софтвера.

1.3.1. Интегрисани модули

Модул *sys* омогућава интеракцију са системским параметрима и приступ аргументима командне линије. Овај модул, кроз различите функције, омогућава управљање параметрима окружења у коме се извршава *Python* код и приступ промјенљивим које користи или одражава сам интерпретер [87].

Модул *math* омогућава извођење једноставнијих математичких функција али се не може користити за комплексне бројеве (тада је потребно користити модул *cmath*) [88].

CSV (енгл. *Comma Separated Values*) формат је најчешће кориштен формат за увоз и извоз табеларних података. Иако недостаје јасно дефинисан стандард, што доводи до разлика међу апликацијама, основна структура је довољно универзална за ефикасну обраду података. Модул *csv* у *Python*-у омогућава једноставно и ефикасно читање и писање CSV датотека, укључујући формате који се користе у програму *Microsoft Excel*. Овај модул омогућава и дефинисање прилагођених CSV формата или описивање структура које препознају друге апликације [87].

1.3.2. *Numerical Python* библиотека

Numerical Python (NumPy) је фундаментални пакет за научно рачунање у *Python*-у. Ова библиотека омогућава кориштење вишедимензионалних низова, бројних изведених објеката (нпр. маскирани низови и матрице), као и извођење брзих операције над низовима. То укључује математичке, логичке и статистичке операције, манипулацију обликом, трансформације и симулације различитих догађаја [87].

У основи *NumPy* пакета је објекат *ndarray*, који инкапсулира *n*-димензионалне низове хомогених типова података, при чему се многе операције извршавају у компајлираном коду ради бољих перформанси. Кључне карактеристике *NumPy* низова су:

- фиксна величина при креирању – промјена величине *ndarray* објекта креираће нови низ и обрисати претходни;
- хомогени типови података – елементи у *NumPy* низу морају бити истог типа података, а самим тим и исте величине у меморији;
- напредне операције – *NumPy* омогућава ефикасно извршавање математичких и других операција над великим скуповима података са мање кода.

Векторизација у *NumPy* подразумева одсуство експлицитног понављања и индексирања у коду. Овај дио се одвија у тзв. оптимизованом, пре-компајлираном *C* коду. Векторизовани код има бројне предности, међу којима су најважније:

- сажет и лакши за читање,
- мање линија кода значи и мање грешака,
- код више личи на стандардну математичку нотацију (олакшава тачно кодирање математичких конструкција),
- без векторизације, код би био препун неефикасних и тешко читљивих *for* петљи.

Проширивање (енгл. *broadcasting*) омогућава извођење операција на различитим низовима, а користи се у аритметичким, логичким, функционалним и другим операцијама [89 – 91].

1.3.3. *Matplotlib* библиотека

Matplotlib је једна од најпопуларнијих библиотека за визуализацију података која омогућава креирање различитих врста 2D-графика и дијаграма. Иако потиче из настојања да опонаша *Matlab* графичке команде, независна је од *Matlab*-а и користи објектно-оријентисани приступ програмирању. Првенствено написана у чистом *Python*-у, *Matplotlib* широко користи *NumPy* и други екстензиони код за постизање бољих перформанси. Састоји се од три основна дијела:

- *pylab* интерфејс – скуп функција који омогућава једноставно креирање графика слично *Matlab* окружењу, али се његова употреба данас углавном избегава у корист директног коришћења *Matplotlib* API-ја.

- *Matplotlib frontend* или *Matplotlib API* – скуп објектно-оријентисаних класа и функција које омогућавају прецизну контролу изгледа графикона, укључујући управљање осама, текстом, линијама и другим графичким елементима.
- *Backends* (рендерери) – компонента која је одговорна за конверзију интерне репрезентације графикона у специфичан формат излаза (екран или фајл). Примјери *backend*-ова укључују: Познати примјери су: PS који ствара *PostScript®* хардкопију, SVG који ствара *Scalable Vector Graphics* хардкопију, Agg који ствара PNG излаз користећи висококвалитетну *Anti-Grain Geometry* библиотеку и слично.

Дакле, *Matplotlib* подржава више излазних формата, као што су: PNG, SVG, JPEG, али и интерактивне графичке приказе који се могу интегрисати у различите апликације. Ова библиотека омогућава и контролу над различитим параметрима графикона, као што су ознаке координатних оса, боје, стилови линија и слично [92, 93].

1.3.4. Библиотека *pandas*

Библиотека *pandas* користи се за рад са временским серијама, табеларним и векторизованим подацима. Обезбјеђује високе перформансе и једноставна је за употребу. Подржава интеграцију са многим форматима датотека или изворима података (*csv*, *excel*, *sql*, *json*, *parquet* и други) кроз функције са префиксом „*read_*“ за читање и „*to_*“ за чување података.

Библиотека *pandas* обезбјеђује двије врсте класа за рад са подацима:

- *Series* – једнодимензионални означени низ који садржи податке било које врсте, као што су цијели бројеви, *Python* објекти и слично;
- *DataFrame* – дводимензионална структура података која чува податке попут дводимензионалног низа или табеле са редовима и колонама.

Оваква структура омогућава индексирање и селекцију података на основу редова, колона или вриједности што олакшава приступ подацима и пружа бројне функције за прочишћавање и трансформацију података (нпр. уклањање недостајућих вриједности, филтрирање података, груписање и слично). Често се *pandas* користи заједно са другим библиотекама као што су *NumPy*, *Matplotlib* и *SciPy* за детаљну и свеобухватну анализу података у *Python*-у [90].

1.3.5. *Scientific Python* библиотека

Scientific Python (SciPy) је библиотека нумеричких алгоритама која обезбјеђује основне алате за моделовање и рјешавање научних проблема. Укључује алгоритме за оптимизацију, интеграцију, интерполацију, рјешавање проблема сопствених вриједности, алгебарских и диференцијалних једначина, као и за многе друге врсте прорачуна. Дакле, ова библиотека пружа широк спектар напредних математичких функција и алгоритама за научно рачунање због чега је есенцијални алат за ове сврхе у *Python*-у. Често се користи у научним истраживањима, анализи података, статистици, линеарној алгебри и другим областима.

SciPy је надоградња библиотеке NumPy, која обезбјеђује структуре података (нпр. *ndarray*) и брзе нумеричке рутине као основу за напредније библиотеке. *SciPy* садржи дефиниције многих научних константи и јединица, омогућава интерполацију података, апроксимацију графичких кривуља, те различите методе за нумеричку интеграцију и оптимизацију. Поред тога, библиотека подржава статистичку анализу података и израчунавање бројних статистичких параметара [94].

1.4. РАЗВОЈ, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ

Развој HPLC методе је сложен процес, јер је потребно развити репродуктивну, специфичну, тачну, прецизну и осјетљиву методу. Након развоја, неопходно је потврдити да метода испуњава прописане захтјеве квалитета, што се постиже процесом валидације. Због тога је Међународна конференција за хармонизацију (енгл. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* – ICH) издала смјерницу која се односи на стандарде везане за валидацију методе (ICH Q2(R2) – *Validation of analytical procedures*) [95 – 97].

Хроматографске методе обично се развијају употребом покушај-грешка (енгл. *trial-error*) или OFAT приступа, који захтијевају спровођење великог броја експеримената. То је дуготрајан и скуп процес који често доводи до развоја метода са нејасним ефектима мултипараметарских интеракција, због чега методе обично не испуњавају захтјеве за робусност. Како се развој и валидација метода обично изводе у једној, а рутинске анализе у другој лабораторији, варијабилне перформансе могу учинити корак трансфера методе критичним. Чак и када је трансфер успјешан, он представља само једнократну потврду да је метода довољно поуздана на мјесту трансфера, али не доказује њену досљедну поузданост током цијелог животног циклуса. Како методе развијене примјеном OFAT приступа носе висок ризик од неуспјеха у овом погледу, потребан је протокол за ревалидацију, што врло негативно утиче на економску и еколошку прихватљивост [95].

1.4.1. *Analytical Quality by Design* концепт у развоју HPLC методе

Препознајући претходно описане ризике, Америчка управа за храну и лијекове (енгл. *United States Food and Drug Administration* – FDA) је 2004. године увела *Quality-by-Design* концепт. Наредне године, овај концепт је одобрен од стране ICH, чија га смјерница Q8(R2) (*Pharmaceutical Development*) дефинише као: „систематски приступ развоју који почиње са унапријед дефинисаним циљевима и наглашава разумијевање производа и процеса на основу чврстих научних доказа и управљања ризиком по квалитет“.

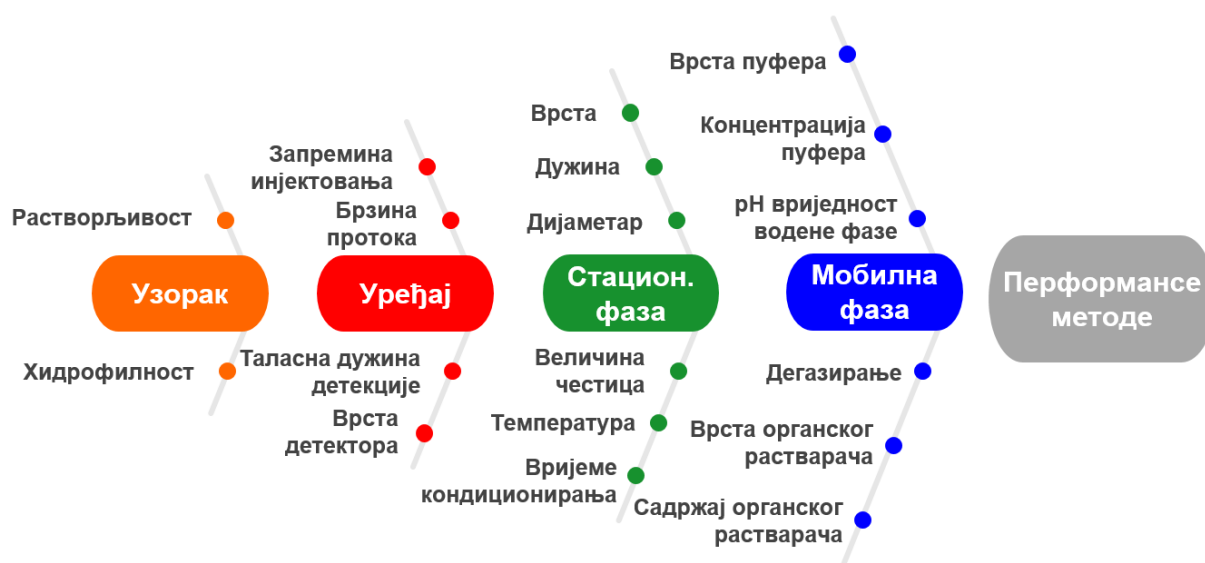
Овакав концепт, који омогућава уградњу квалитета у методу током њеног развоја, наредних година је, низом нових ICH смјерница, проширен и на аналитичке процедуре кроз *Analytical Quality by Design* (AQbD). Смјерница ICH Q14 (*Guideline on analytical*

procedure development) из 2024. године препознаје AQbD као унапријеђен приступ за развој, валидацију, пренос и континуирано побољшање аналитичких метода [98 – 102].

1.4.2. Теоријске основе *Analytical Quality by Design* концепта

Први корак код AQbD концепта подразумева дефинисање захтјева које метода треба да испуни како би била у складу са постављеним циљевима анализе (енгл. *Analytical Target Profile* – ATP). Кључне компоненте ATP су аналитички захтјеви (нпр. робусност, селективност, тачност, прецизност, осјетљивост итд.) и циљеви методе (нпр. квалитативна и/или квантитативна анализа). Други корак је избор критичних параметара методе (енгл. *Critical Method Attributes* – CMAs). Они представљају одговоре који се мјере како би се контролисале перформансе методе и обично су везани за робусност, тачност, прецизност и осјетљивост методе. Фактор резолуције критичног хроматографског пара (R_s) или фактор симетрије пика (A_s) често су једни од CMAs који се прате [95, 100].

Важан корак у развоју нове методе је процјена ризика квалитета (енгл. *Quality Risk Assessment* – QRA) и може се спроводити употребом различитих алата. Један од најчешће коришћених је *Ishikawa* дијаграм (дијаграм рибље кости). Овим дијаграмом идентификују се ризични и потенцијално ризични фактори, а факторски повезани ризици распоређују у категорије које се односе на опрему, мјерења, лабораторијске утицаје, људске факторе и слично (слика 6).



Слика 6. Примјер *Ishikawa* дијаграма. Стацион. фаза – стационарна фаза

Фактори за које се процијени да носе највећи ризик означавају се критичним параметрима методе (енгл. *Critical Method Parameters* – CMPs), који треба да буду контролисани и/или праћени како би се потврдило да метода испуњава жељене захтјеве/циљеве. Ти параметри обично обухватају тип стационарне фазе, састав мобилне фазе, начин елуирања, температуру стационарне фазе и слично [100, 103].

У завршној фази процјене ризика, употребом DoE методологије врши се одабир параметара који имају најзначајнији утицај на хроматографске перформансе. У ову сврху најчешће се користе скрининг дизајни, као што су: FFD на два нивоа, FrFD, *Taguchi* и *Plackett-Burman* дизајн. Ови дизајни омогућавају и испитивање робусности методе [104 – 106].

Након завршеног скрининга, употребом методологије површине одговора (енгл. *Response Surface Methodology* – RSM), приступа се оптимизацији значајних (ризичних) фактора. Фактори се проучавају на више од два нивоа (најчешће три), а њихова веза са одговорима описана је квадратним (израз (13)) или полиномијалним једначинама вишег реда. Увођење квадратних чланова у математички модел омогућава одређивање нелинеарних веза између фактора и одговора. Проучавањем фактора на више од два нивоа, у експериментални домен укључује се и репликована централна тачка, с циљем да се одреди експериментална грешка. Примјери RSM дизајна су: FFD на три нивоа, CCD, BBD и *Doehlert* дизајн [107, 108].

По спровођењу експеримената према RSM дизајну, добијени одговори система се моделују прилагођавањем полиномијалног модела експерименталним подацима. Тиме се добијени одговори повезују са проучаваним факторима и њиховим интеракцијама, а израчунавају се и одговарајући регресиони коефицијенти. Статистичка значајност модела одређује се примјеном анализе варијансе (енгл. *Analysis of variance* – ANOVA). Емпиријско-моделна софтверска рјешења за дизајнирање експеримената и статистичку анализу (*MODDE*[®] и *Design Expert*[®]) омогућавају увид у прилагођену (*adjusted R²*) и предвиђену (*predicted R²*) варијабилност, које су поуздани показатељи квалитета математичког модела. Добијена *adjusted R²* вриједност показује колико поуздано модел описује варијацију у одговору, док *predicted R²* вриједност представља способност предвиђања модела. Вриједности *adjusted R²* $\geq 0,80$ и *predicted R²* $\geq 0,60$ сматрају се задовољавајућим, док вриједности *predicted R²* $\geq 0,80$ указују на изузетно добро предвиђање математичког модела [95].

На основу резултата RSM дизајна, креира се робусни регион (енгл. *Design Space* – DS). Он представља простор унутар граница експерименталног домена, који је формиран мултиваријантним распоном вриједности фактора, а у коме су испуњени сви предефинисани критеријуми CMPs. У том простору сви извори варијабилности се контролишу кориштењем одговарајуће стратегије контроле методе, нпр. тестом погодности система (енгл. *System Suitability Test* – SST), што пружа већу флексибилност методе. Додатно, креирање DS подразумејева провјеру варијација које произилазе из мјерења одговора или из несигурности модела, с циљем да CMAs задовоље дефинисане критеријуме. Процјена несигурности модела најчешће се врши примјеном *Monte-Carlo* симулација. За додатну потврду робусности изабране радне тачке може се примијенити DoE методологија, када се најчешће користи FFD на два нивоа [95, 108, 109].

1.4.3. Валидација HILIC методе

Валидација методе подразумејева низ поступака који слиједе након развоја методе. Циљ валидације је да се покаже да је метода погодна за одређену намјену, а то се постиже испитивањем валидационих параметара. Валидацију методе FDA и ICN дефинишу као:

„процес који показује да аналитичка метода тачно и поуздано одражава специфичне карактеристике анализе, као што су: тачност, прецизност, линеарност и осјетљивост“.

Смјернице ICN Q2(R2) и ICN Q14 пружају јасна упутства за извођење тестова који се спроводе у току валидације аналитичке методе. Поред тога, смјернице дају приједлоге како, на стандардизован начин, изражавати добијене резултате да би се осигурала транспарентност у документацији [81, 102, 110, 111]. Основни параметри који се испитују у току процеса валидације су: селективност, линеарност и распон, осјетљивост, тачност и прецизност. Робусност представља један од кључних валидационих параметара. Дефинише се као мјера поузданости методе да услед малих варијација у параметрима методе остане непромијењена, те осигура добијање репродуктивних, тачних и поузданих резултата. Управо због тога, испитивање робусности је један од првих корака у току процеса валидације методе [96].

Селективност методе (енгл. *selectivity*) се односи на могућност методе да једнозначно (селективно) одреди испитивано једињење у присуству других једињења која се очекивано могу налазити у узорку. Представља одсуство интерференције тј. потврду да ће испитивано једињење при испитиваним условима дати чист сигнал, односно да друга једињења из узорка неће ометати тај сигнал. Селективна је она метода којом се може

анализирати више различитих једињења у узорку, при чему одређивање једног не омета одређивање другог једињења [96, 112].

Линеарност методе (енгл. *linearity*) је могућност да се у јасно дефинисаном распону концентрација добију тачни и поуздани резултати квантитативне анализе. Распон методе (енгл. *range*) представља интервал између највеће и најмање концентрације испитиваног једињења (укључујући и те вриједности), унутар којег се може вршити тачно одређивање (уколико је добијена задовољавајућа линеарност). Линеарност се утврђује израдом калибрационе кривуље за најмање пет раствора израђених од референтног стандарда испитиваног једињења. Линеарна зависност између концентрације испитиваног једињења и одговарајућег аналитичког сигнала (нпр. површина хроматографског пика) описује се једначином праве $y = ax + b$, добијеном методом линеарне регресије. Степен ове зависности изражава се коефицијентом корелације (r), који описује степен расипања тачака око идеалне праве, а FDA препорука је да вриједности буду $\geq 0,9990$ [96, 112].

Осјетљивост методе (енгл. *sensitivity*) изражава се кроз лимит детекције (енгл. *limit of detection* – LOD) и лимит квантификације (енгл. *limit of quantification* – LOQ). Лимит детекције је најнижа концентрација испитиваног једињења у узорку коју је могуће детектовати, али не и одредити, под одговарајућим експерименталним условима. Лимит квантификације је најнижа концентрација испитиваног једињења у узорку која се може одредити са одговарајућом тачношћу и прецизношћу, под датим експерименталним условима. У фармацеутским анализама овај параметар је посебно важан уколико се метода користи за одређивање садржаја нечистоћа или метаболита у готовим фармацеутским облицима. LOD и LOQ могу се одредити на више начина, при чему се најчешће користи однос сигнала и шума (енгл. *Signal to Noise Ratio* – S/N). Вриједност S/N за LOD треба да износи минимално 3, а за LOQ минимално 10 [96, 113].

Тачност методе (енгл. *accuracy*) представља усаглашеност између експериментално добијених и референтних (стварних) вриједности. Најчешће се изражава као проценат приноса (*Recovery* вриједност) код одређивања познате концентрације испитиваног једињења додате плацебо смјеси. Препоручује се испитивање тачности при концентрацијама од 80, 100 и 120 % у односу на декларисану вриједност. На сваком од испитиваних концентрационих нивоа израчунава се релативна стандардна девијација за минимално три мјерења што даје увид у тачност методе [96].

Прецизност методе (енгл. *precision*) је мјера усаглашености резултата добијених, под прописаним условима, из вишеструких анализа узорака исте концентрације, припремљених на идентичан начин. Статистички се процјењује релативном стандардном девијацијом. Прецизност се може разматрати на три нивоа: поновљивост, средња прецизност или међупрецизност и репродуктивност. Поновљивост (енгл. *repeatability*) је прецизност испитана од стране истог аналитичара, на истим узорцима, истом уређају у кратком временском оквиру. Међупрецизност (енгл. *intermediate precision*) је прецизност која се испитује унутар исте лабораторије, на истом уређају, од стране различитих аналитичара у току неколико дана. Репродуктивност (енгл. *reproducibility*) је прецизност испитана од стране различитих аналитичара, у различитим лабораторијама, на различитим уређајима [96, 112].

1.5. „ЗЕЛЕНА“ АНАЛИТИЧКА ХЕМИЈА

Развој и валидација аналитичких метода укључује оптимизацију критичних аналитичких параметара, при чему се параметри који се тичу безбједности аналитичара и утицаја аналитичких метода на животну средину често не разматрају. Деведесетих година прошлог вијека установљено је да поједине аналитичке методе, развијене за анализу различитих узорака из животне средине, доводе до производње велике количине хемијског отпада. Реагенси кориштени за анализу често су били токсичнији од једињења која су одређивана (нпр. одређивање нитрозамина у храни метилен-хлоридом). Потреба за праћењем штетних ефеката фармацеутских анализа навела је лабораторије да контролишу производњу отпада и прикупљају резидуе, у циљу смањења загађења животне средине [114].

У свјетлу ове позадине, ера „зелене“ аналитичке хемије (енгл. *Green Analytical Chemistry* – GAC) је започела као потрага за практичним алтернативама за третман отпада и токсичних резидуа, како би се загађујуће методологије замијениле „зеленим“. Прву дефиницију „зелене“ хемије представио је Анастас 1999. године и она гласи:

“зелена хемија представља употребу хемијских техника и методологија које смањују или елиминишу употребу или стварање сировина, производа, нуспроизвода, растварача и реагенса који су штетни за људско здравље или животну средину“.

Дакле, кључни фокус GAC-а је примјена методологија које смањују загађење на свим нивоима – од прелиминарних истраживања до валидације и даље примјене методе [115].

1.5.1. Основни принципи „зелене“ аналитичке хемије

Најважнији изазов за будућност GAC-а је постизање компромиса између добијања тачних и поузданих резултата анализе и унапређења еколошке прихватљивости метода. То захтијева јасно дефинисане смјернице, представљене кроз 12 основних принципа GAC:

1. примјењивати директне аналитичке технике како би се избјегла обрада узорака, чиме се смањује употреба токсичних растварача и реагенса, а скраћењем времена трајања анализе смањује се и потрошња енергије (енгл. *direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment*);

2. циљеви треба да буду минимална величина и минималан број узорака, јер се на тај начин смањује производња токсичног отпада (енгл. *minimal sample size and minimal number of samples are goal*);
3. мјерења треба вршити на лицу мјеста, чиме се елиминише потреба за превозом који загађује ваздух или за чувањем и складиштењем узорака што троши (електричну) енергију (енгл. *if possible, measurements should be performed in situ*);
4. интегрисати аналитичке процесе и операције, јер смањење броја корака у анализи штеди реагенсе, вријеме и утрошену енергију (енгл. *integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents*);
5. бирати аутоматизоване и минијатуризоване методе, јер се на тај начин смањује количина узорка и, посљедично, количина утрошених реагенаса (енгл. *automated and miniaturized methods should be selected*);
6. избјегавати дериватизацију која обично подразумијева употребу еколошки неприхватљивих реагенаса и производњу велике количине токсичног отпада (енгл. *derivatization should be avoided*);
7. избјегавати производњу велике количине аналитичког отпада, а поступцима рециклаже, деградације и пасивизације смањити његову токсичност (енгл. *generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided*);
8. бирати методе које омогућавају истовремену анализу више једињења или параметара, чиме се смањује количина употребљених растварача и реагенаса, али и вријеме потребно за анализу (енгл. *multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time*);
9. свести на минимум употребу енергије која се троши како за припрему, тако и за превоз, чување у складиштење узорака (енгл. *the use of energy should be minimized*);
10. бирати реагенсе добијене из обновљивих извора (енгл. *reagents obtained from renewable sources should be preferred*);
11. елиминисати токсичне реагенсе или их замијенити еколошки прихватљивим (енгл. *toxic reagents should be eliminated or replaced*);
12. повећати безбједност аналитичара (енгл. *operator's safety should be increased*) [116, 117].

Имплементација ових принципа има и одређене недостатке, јер предложене смјернице могу утицати на смањење вриједности параметара као што су: тачност, прецизност и осјетљивост. Поузданост аналитичких метода може бити доведена у питање услед смањења величине узорка, примјене директних метода и минијатуризације инструмената. Хемијска анализа је комплексан процес који се састоји од неколико корака за које се могу примијенити „зелене“ алтернативе. Због тога је важно сваки процес, који чини дио аналитичке методологије, евалуирати у смислу усклађености са принципима GAC [116].

1.5.2. Концепт „бијеле“ аналитичке хемије

Концепт „одрживог развоја“ наглашава потребу разматрања економских, социјалних и еколошких параметара у развоју аналитичких метода. GAC приступ је у складу са одрживим развојем, али недостају социјални (аналитичка ефикасност) и економски (исплативост и практичност) параметри. Због тога је предложен нови приступ, инспирисан „Црвено-Зелено-Бијелим“ моделом (енгл. *Red-Green-Blue* – RGB). Овај приступ се заснива на формулисању дванаест принципа „бијеле“ аналитичке хемије (енгл. *White Analytical Chemistry* – WAC) за имплементацију одрживог развоја у аналитичке методе.

WAC принципи су подијељени у три комплементарне области према RGB моделу, гдје:

- црвена област представља аналитичку ефикасност,
- зелена област представља еколошку прихватљивост и безбједност и
- плава област представља економску/практичну ефикасност.

Аналитичка ефикасност се односи на степен у којем метода испуњава критеријуме валидације и веома је важна. Валидациони параметри потврђују да су добијени резултати анализе поуздани и могу послужити као основа за њихову даљу примјену. Економска/практична ефикасност зависи од укупних трошкова, једноставности, укупног времена потребног за анализу и слично. Метода се оцјењује на основу RGB модела и додјељује јој се укупна боја која зависи од интензитета примарних боја (црвена, зелена и плава). Као што бијела боја настаје мијешањем црвене, зелене и плаве свјетлости, аналитичка метода постаје „бијела“, односно комплетна, када постигне високу и уједначену сатурацију појединачних боја. Стога, „бјелина“ може да се користи као

квантитативни параметар који одражава уравнотеженост три главна стуба одрживих метода.

Формулација дванаест WAC принципа подразумева синтезу дванаест GAC принципа у четири „зелена“ правила (G1 – G4) која покривају међусобно независне принципе GAC, а који се, затим, спајају са четири „црвена“ (R1 – R4) и четири „плава“ (B1 – B4) принципа:

- G1: токсичност реагенса – минимална примјена токсичних реагенса и максималан садржај биоразградивих/обновљивих реагенса и материјала;
- G2: број и количина реагенса и отпада – минимална потрошња реагенса и производња отпада (без обзира на њихову токсичност);
- G3: енергија и остале услуге – минимална потрошња електричне енергије и других комуналних услуга;
- G4: директни утицаји – кориштење аналитичких метода не би требало директно да утиче на људе, животиње и генетску природност;
- R1: распон примјене – аналитичке методе треба да имају што шири распон примјене, што се изражава нпр. бројем истовремено одређених једињења;
- R2: LOD и LOQ – аналитичке методе треба да буду што осјетљивије;
- R3: прецизност – пожељна је максимална прецизност, изражена као поновљивост и репродуктивност резултата;
- R4: тачност – аналитичке методе треба да буду што тачније (минимална релативна грешка и *Recovery* вриједности што ближе вриједности 100 %);
- B1: економска ефикасност – аналитичке методе треба да буду што економичније;
- B2: временска ефикасност – укупно вријеме анализе, укључујући развој метода и све фазе аналитичког рада, треба да буде најкраће могуће;
- B3: захтјеви – практични захтјеви, укључујући количину узорка, приступ напредним уређајима, квалификовано особље, треба да буду минимални;
- B4: оперативна једноставност – пожељан је највећи могући ниво минијатуризације, интеграције, аутоматизације (*online* методе, технологије вјештачке интелигенције) и преносивости (мјерења на лицу мјеста).

Према WAC-у, све боје и принципи су подједнако важни, како би се испоштовала идеја одрживости. Међутим, стварна корисност и функционалност методе може бити одређена појединим принципима који су критични у датом специфичном случају. Стога,

сваки принцип треба посебно размотрити у складу са захтјевима методе. Усаглашеност методе са предложеним правилима изражава се квантитативним параметром названим „бјелина“, који мјери колико метода одговара планираној намјени [117, 118].

1.5.3. Софтвери и модели за процјену еколошке прихватљивости и ефикасности методе

У овом поглављу биће описани софтвери и алати који су кориштени за процјену усаглашености новоразвијених метода са принципима GAC и WAC, а одабрани су због супериорности у односу на, већ превазиђене, раније развијене моделе.

1.5.3.1. AGREE – *Analytical GREEnness Metric*

AGREE је квантитативни алат за процјену еколошке прихватљивости методе. Омогућава поређење метода кроз оцјене на скали од 0 (за најмање „зелену“ методу) до 1 (за „најзеленију“ методу), при чему се различитим критеријумима могу додијелити различити тежински коефицијенти. Резултат је представљен симболом у облику сата, са укупном оцјеном у обојеном центру и сегментираним ободом који представља појединачне принципе. Боја сегмената указује на усклађеност са појединачним GAC принципима, док боја центра одражава укупну еколошку прихватљивост методе. Оваква визуелна презентација омогућава јасну интерпретацију резултата и идентификацију узрока ниже прихватљивости, што доприноси даљем унапређењу методе. Основни недостатак је што не постоји дефинисан праг изнад којег се метода сматра еколошки прихватљивом, мада је јасно да је метода „зеленија“ што јој је укупна оцјена већа [117, 119].

1.5.3.2. *Complementary Green Analytical Procedure Index* – ComplexGAPI

ComplexGAPI је семиквантитативни алат који процјењује еколошку прихватљивост цјелокупне аналитичке процедуре, укључујући и кораке који претходе самој анализи: узорковање, транспорт, припрему, чување и складиштење узорка. Резултат се приказује у облику пет пентаграма, који омогућавају брз увид у утицај сваког појединачног корака на еколошку прихватљивост и лако визуелно поређење различитих метода. Боја пентаграма указује на ниво „зелености“ параметра који се процјењује – зелена означава „најзеленији“, жута мање „зелени“, а црвена најмање „зелени“ приступ. Круг у центру симбола означава намјену методе – изоставља се код метода намијењених искључиво квалитативној анализи, док је присутан код метода које омогућавају и квантитативну

анализу. Хексагонално поље на дну симбола одговара „зеленом“ карактеру процеса који се дешавају прије анализе, укључујући употребу реагенса, инструмената и услова рада. Боја тог поља одражава еколошки утицај – зелена (низак), жута (средњи) и црвена (висок) [117, 120].

1.5.3.3. *Blue Applicability Grade Index – BAGI*

Blue Applicability Grade Index (BAGI), који представља допуну претходно поменутих софтвера, фокусира се углавном на процјени усклађености методе са WAC принципима. Како би се процијенила практичност и примјењивост аналитичке методе, BAGI разматра следећих 10 важних принципа:

1. тип анализе (енгл. *type of analysis*);
2. број једињења која се истовремено одређују (енгл. *multi- or single-element analysis*);
3. аналитичка техника и потребна опрема (енгл. *analytical technique*);
4. број узорака који се могу истовремено обрадити (енгл. *simultaneous sample preparation*);
5. припрема узорака (енгл. *sample preparation*);
6. број узорака који се могу анализирати по сату (енгл. *samples per hour*);
7. тип реагенса и материјала који се користе у методи (енгл. *reagents and materials*);
8. потреба за пре-концентрацијом (енгл. *fit-for-purpose*);
9. степен аутоматизације (енгл. *degree of automation*) и
10. количина узорка (енгл. *amount of sample*).

Резултат се изражава пиктограмом астероидног облика, са одговарајућом вриједношћу уписаном у централном дијелу слике. Боје пиктограма одражавају ниво усаглашености методе са утврђеним критеријумима, при чему се користи плава палета са четири различита интензитета боје. Тамноплава боја одражава висок, плава средњи, а свијетлоплава низак ниво усаглашености, док бијела представља потпуно одсуство усаглашености методе са процјењиваним параметром. Број у центру пиктограма представља укупну оцјену аналитичке методе и креће се од 25 до 100 поена, при чему најлошији резултат (вриједност 25 поена) указује на лошу примјенљивост методе, док најбољи резултат (вриједност 100 поена) указује на изврсне карактеристике методе. Метода треба да оствари најмању вриједност од 60 поена да би се сматрала практичном.

Овај систем омогућава лако уочавање фактора ризика, али и пожељних карактеристика новоразвијене аналитичке методе. Такође, омогућава поређење практичности различитих аналитичких метода [121].

1.5.3.4. *Red-Green-Blue (RGB)* модел

Процјена усклађености методе са RGB принципима заснива се на унапријеђеном RGB моделу, а резултати се аутоматски рачунају и представљају табеларно. Степен усаглашености методе са одређеним WAC принципом представља се бројчано, као и визуелно – преко засићења одређене примарне боје (вриједност 0 одговара црној боји, док вриједност ≥ 100 одговара потпуном засићењу, односно бијелој боји). Вриједности аритметичких средина за R (%), G (%), B (%), приказују се појединачно, а укупна оцјена (просјечан резултат процјене свих дванаест принципа) означена је параметаром степен „бјелине“ у постоцима (%). Боја коју додјељује RGB-12-алгоритам омогућава визуелно представљање резултата у погледу еколошке прихватљивости аналитичке методе [118].

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати ретенционе механизме базних и неутралних једињења на примјеру модел смјеше амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G на амино, амидној, диолној и силика стационарној фази прилагођавањем партиционог, адсорпционог, катјонско-измјењивачког, ањјонско-измјењивачког, квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела експерименталним подацима.
2. Испитати утицај појединачних фактора и двофакторских интеракција на ретенционо понашање амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G примјеном методологије експерименталног дизајна на силика стационарној фази.
3. Испитати ретенционе механизме киселих и неутралних једињења на примјеру модел смјеше диклофенак-калијума, ибупрофена, парацетамола и кофеина на амино, амидној и диолној стационарној фази прилагођавањем партиционог, адсорпционог, ањјонско-измјењивачког, квадратног и двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела експерименталним подацима.
4. Испитати факторске утицаје на ретенционо понашање диклофенак-калијума, ибупрофена, парацетамола и кофеина на основу експерименталних модела добијених хеометријским приступом на амино стационарној фази.
5. Развити софтвер за анализу ретенционих механизма који ће омогућити аутоматизовану обраду експериментално добијених података у циљу извођења релевантних закључака о присутним и доминантним ретенционим механизмима.
6. Развити и валидирати HILIC методу за истовремену анализу парацетамола и кофеина употребом AQbD приступа.
7. Развити и валидирати HILIC методу за истовремену анализу ибупрофена и кофеина употребом AQbD приступа.
8. Урадити процјену еколошке прихватљивости и ефикасности постављених метода на основу степена усклађености са принципима „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије (*Green Analytical Chemistry* – GAC, *White Analytical Chemistry* – WAC).

3. ХИПОТЕЗЕ

1. Ретенциони механизми испитиваних једињења зависе од састава мобилне фазе (садржаја органског растварача, концентрације пуфера и/или рН вриједности воденог дијела мобилне фазе) и одабраног типа стационарне фазе.
2. Појединачни фактори и двофакторске интеракције значајно утичу на ретенционо понашање испитиваних једињења.
3. Развијени софтвер пружа прецизну и аутоматизовану анализу ретенционих механизма испитиваних једињења.
4. Двије новоразвијене HILIC методе постављене примјеном хеометријског (DoE и AQbD) приступа омогућавају брзу, тачну, прецизну и поуздану истовремену анализу парацетамола и кофеина, односно ибупрофена и кофеина у таблетама и другим готовим производима. Обје методе, као такве могу да се користе у квалитативној и квантитативној анализи наведених лијекова.
5. Усклађивање новоразвијених метода са принципима „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије доприноси развоју еколошки прихватљивих аналитичких метода.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИО

4.1. АПАРАТИ, ПРИБОР И РЕАГЕНСИ

4.1.1. Течни хроматограф под високим притиском

Течни хроматограф под високим притиском: *Agilent 1200 series, Agilent Technologies*, Санта Клара, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе (САД)

Пумпа: *Quaternary Pump G1311A*

Аутосемплер: *ALS G1329A*

Термостат: *TCC G1316A*

Детектор: *DAD G1315D*

Систем за прикупљање и обраду података: *Agilent ChemStation*

4.1.2. Стационарне фазе

Zorbaх NH2 (250 x 4,6 mm; величина честица 5 μ m), *Agilent Technologies*, Санта Клара, Калифорнија, САД

InertSil Amide (250 x 4,6 mm, величина честица 5 μ m), *GL Sciences*, Токио, Јапан

InertSil SIL-100 A (250 x 4,6 mm, величина честица 5 μ m), *GL Sciences*, Tokyo, Japan

InertSil Diol (250 x 4,6 mm, величина честица 5 μ m), *GL Sciences*, Токио, Јапан

4.1.3. Остала опрема и прибор

Систем за филтрирање: *Whatman 47 mm glass/mesh* мембрански носач, *Whatman*, Мејдстон, Велика Британија

Филтри: 0.45 μ m *nylon* мембрански филтри, *Merck*, Дармштад, Њемачка

Електронска аналитичка вага: *Mettler Toledo*, Колумбус, Охајо, САД

Ултразвучно купатило: *Bandelin Sonorex Digitec, Bandelin electronic*, Берлин, Њемачка

Систем за добијање воде HPLC степена чистоће: *Barnstead LabTower EDI, Thermo Fisher Scientific*, Волтам, Масачусетс, САД

pH метар: *ProfiLine pH 3110, Xylem*, Вашингтон, САД и *Ciberscan pH 11, Eutech, Thermo Fisher Scientific*, Волтам, Масачусетс, САД

Магнетна мјешалица: *Falc Instruments*, Тревиљо, Италија

Аутоматске пипете: *Thermo Fisher Scientific*, Волтам, Масачусетс, САД

4.1.4. Растварачи и реагенси

Ацетонитрил, HPLC степена чистоће: *Fisher Scientific*, Питсбург, Пенсилванија, САД

Метанол, HPLC степена чистоће: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Амонијум-ацетат: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Амонијум-формијат: *Honeywell*, Шарлот, Сјеверна Каролина, САД

Калијум-дихидрогенфосфат: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Дикалијум-хидрогенфосфат: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Калијум-хидроксид: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Натријум-хидроксид: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Натријум-цитрат: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Глацијална сирћетна киселина: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Мравља киселина: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Орто-фосфорна киселина: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Лимунска киселина: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

Амонијум-хидроксид: *Lachner*, Нератовице, Чешка Република

4.1.5. Стандардне супстанце и готови производи

Анализиране стандардне супстанце:

- Амитриптилин-хидрохлорид, радни стандард, *Хемофарм*, Србија
- Нечистоћа А, *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* (EDQM), Стразбур, Француска
- Нечистоћа В, EDQM, Стразбур, Француска
- Нечистоћа С, *The Laboratory of the Government Chemist* (LGC), Тедингтон, Енглеска
- Нечистоћа D, LGC, Тедингтон, Енглеска
- Нечистоћа F, LGC, Тедингтон, Енглеска
- Нечистоћа G, LGC, Тедингтон, Енглеска
- Диклофенак-калијум, радни стандард, *Хемофарм*, Србија
- Ибупрофен, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД
- Парацетамол, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД
- Кофеин, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

За анализу су кориштени *CRS European Pharmacopoeia* референтни стандарди и радни стандарди *Хемофарм*, Србија.

Хроматографска анализа испитиваних једињења вршена је подјелом у двије смјеше:

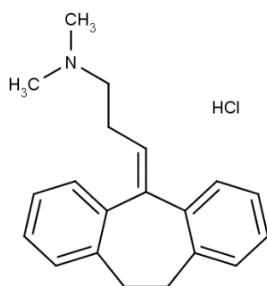
- Смјеша 1: амитриптилин-хидрохлорид и његове нечистоће А, В, С, D, F и G (слика 7);
- Смјеша 2: диклофенак-калијум, ибупрофен, парацетамол и кофеин (слика 8).

Готови производи:

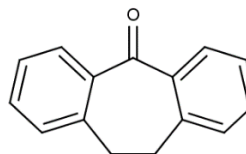
- Panadol Extra® филм таблете (једна филм таблета садржи 500 mg парацетамола и 65 mg кофеина), *GlaxoSmithKline*, Лондон, Енглеска;
- THOMAPYRIN TENSION DUO® филм таблета (једна филм таблета садржи 400 mg ибупрофена и 100 mg кофеина), *Sanofi*, Париз, Француска.

4.1.5.1. Хемијска структура стандардних супстанци

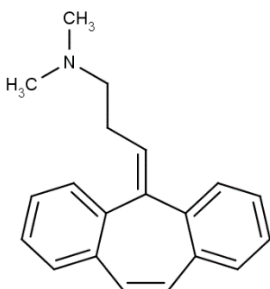
Приказ хемијских структура испитиваних једињења:



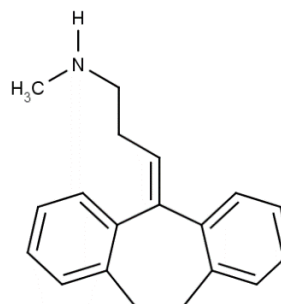
Амитриптилин-хидрохлорид
3-(10,11-дихидро-5H-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-илиден)-*N,N*-диметилпропан-1-амин хидрохлорид



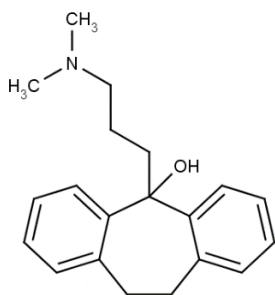
Нечистоћа А
10,11-дихидро-5H-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-он (дibenзосуберон)



Нечистоћа В
3-(5H-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-илиден)-*N,N*-диметилпропан-1-амин (циклобензаприн)

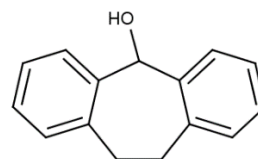


Нечистоћа С
3-(10,11-дихидро-5H-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-илиден)-*N*-метилпропан-1-амин (нортриптилин)



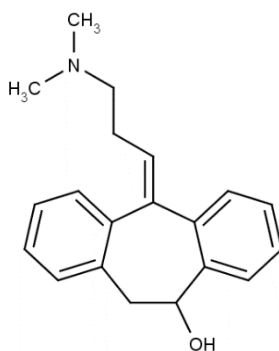
Нечистоћа D

5-[3-(диметиламино)пропил]-10,11-дихидро-5*H*-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-ол



Нечистоћа G

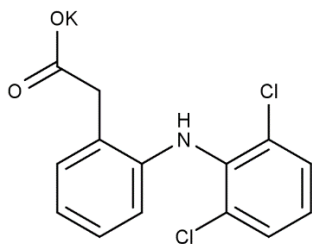
10,11-дихидро-5*H*-дibenзо[*a,d*][7]анулен-5-ол (дibenзосуберол)



Нечистоћа F

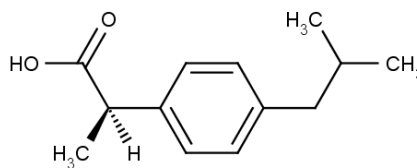
(5*EZ*,10*RS*)-5-[3-(диметиламино)пропилиден]-10,11-дихидро-5*H*-дibenзо[*a,d*][7]анулен-10-ол

Слика 7. Хемијска структура једињења из смјеше 1: амитриптилин-хидрохлорид и његове нечистоће A, B, C, D, F и G.



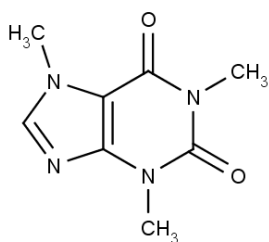
Диклофенак-калијум

Калијум 2-[(2,6-дихлорофенил)амино]фенил]ацетат



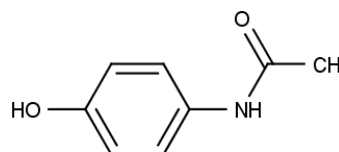
Ибупрофен

(2*RS*)-2-[4-(2-метилпропил)фенил]пропионска киселина



Кофеин

1,3,7-триметил-3,7-дихидро-1*H*-пурин-2,6-дион



Парацетамол

N-(4-хидроксифенил)ацетамид

Слика 8. Хемијска структура једињења из смјеше 2: Диклофенак-калијум, ибупрофен, парацетамол и кофеин.

4.1.6. Компоненте плацеба

Помоћне супстанце које улазе у састав језгра филм таблета Panadol Extra[®] су: скроб, (претходно гелиран), кукурузни скроб, повидон, калијум-сорбат, талк, стеаринска киселина, кармелоза-натријум (умрежена) и пречишћена вода. Помоћне супстанце које улазе у састав филм облоге таблета Panadol Extra[®] су хипромелоза (6CPS) и триацетин.

Помоћне супстанце које улазе у састав језгра филм таблета THOMAPYRIN TENSION DUO[®] су: целулоза (микрокристална), кармелоза-натријум (умрежена), силицијум-диоксид (високо дисперзни) и магнезијум-стеарат. Помоћне супстанце које улазе у састав филм облоге таблета THOMAPYRIN TENSION DUO[®] су: хипромелоза, хипролоза, макрогол 6000, талк и титанијум-диоксид (E171).

4.1.7. Рачунарски програми

Кориштени рачунарски програми и алати:

- *Microsoft Office Excel 2013* (Microsoft, Редмонд, Вашингтон, САД) за статистичку обраду података;
- *Design Expert 13.0.0.* (Stat-Ease, Минеаполис, Минесота, САД) за креирање плана експеримената према FrFD, CCD и BBD те за статистичку и графичку обраду података;
- *Marvin Sketch 15.4.13.* (ChemAxon Kft, Будимпешта, Мађарска) за физичко-хемијску карактеризацију испитиваних једињења;
- *Origin Pro 9.9* (OriginLab Corporation, Нортемптон, Масачусетс, САД) за статистичку обраду података и графичку презентацију резултата;
- Програмски језик *Python* (The Python Software Foundation, Вилмингтон, Делавер, САД) за развој софтвера за анализу ретенционих механизма и за статистичку обраду података;
- *Visual Studio Code 1.90* (Microsoft, Редмонд, Вашингтон, САД) алат за писање кода;
- *GitHub* (GitHub, Сан Франциско, Калифорнија, САД) *hosting* сервис за дистрибуцију кода;
- *MODDE Pro 13* (Sartorius AG, Готинген, Њемачка) за дефинисање DS и предвиђање оптималних и робусних услова;
- *Analytical GREENness Metric Software* за процјену усаглашености хроматографских метода са принципима GAC,
- *Blue applicability grade index* за процјену ефикасности и практичности хроматографских метода;
- *Complementary Green Analytical Procedure Index* за процјену усаглашености преаналитичке припреме и хроматографских метода са принципима GAC;
- *InkScape* (InkScape Team, Бостон, Масачусетс, САД) алат за креирање илустрација;
- *GIMP 2.10.34* (GIMP, Лондон, Енглеска) за графичку обраду слика.

4.2. ИСПИТИВАЊЕ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА АМИТРИПТИЛИН-ХИДРОХЛОРИДА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА А, В, С, D, F И G

4.2.1. Хроматографски услови

Течни хроматограф под високим притиском: *Agilent 1200 series* (поглавље 4.1.1)

Стационарне фазе: *Zorbax NH2*, *InertSil Amide*, *InertSil SIL-100 A* и *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Проток мобилне фазе: 1 mL min^{-1}

Температура стационарне фазе: 30°C

Таласна дужина детекције: 254 nm

Запремина инјектовања: $20 \mu\text{L}$

4.2.2. Припрема раствора стандарда

4.2.2.1. Припрема раствора амитриптилин-хидрохлорида

Одмјерено је $10,00 \text{ mg}$ амитриптилин-хидрохлорида и пренесено у одмјерни суд од $10,00 \text{ mL}$. Додато је око 5 mL ацетонитрила и растварано на ултразвучном купатилу 5 минута. Одмјерни суд је, након хлађења, допуњен ацетонитрилом до ознаке, при чему је добијен основни раствор амитриптилин-хидрохлорида (**ОР** (ами)) концентрације $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

Од раствора (**ОР** (ами)) аутоматском пипетом отпипетирано је $1000 \mu\text{L}$ и пренесено у одмјерни суд од $10,00 \text{ mL}$, те допуњено мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L^{-1} амонијум ацетат, рН вриједности $4,50$ у односу $90:10$ (v/v)) до ознаке. Овако је припремљен радни раствор амитриптилин-хидрохлорида (**РР** (ами)) концентрације $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2.2. Припрема раствора нечистоћа

Појединачно је одмјерено по $1,00 \text{ mg}$ нечистоћа А, В, С, D, F и G и квантитативно пренесено у појединачних шест одмјерних судова од $10,00 \text{ mL}$. У сваки суд додато је око 5 mL ацетонитрила и растварано на ултразвучном купатилу 5 минута. Сваки од одмјерних судова је, након хлађења, допуњен ацетонитрилом до ознаке, при чему су добијени основни раствори нечистоћа: А – (**ОР** (неч. А)), В – (**ОР** (неч. В)), С – (**ОР** (неч.С)), D – (**ОР** (неч. D)), F – (**ОР** (неч. F)) G – (**ОР** (неч. G)) концентрација $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Од основних раствора аутоматском пипетом отпипетирано је по 1000 μL и пренесено у одмјерне судове од 10,00 mL, те допуњено мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L⁻¹ амонијум ацетат, рН вриједности 4,50 у односу 90:10 (v/v)) до ознаке. Овако припремљени радни раствори нечистоћа: А – (PP_(неч. А)), В – (PP_(неч. В)), С – (PP_(неч.С)), D – (PP_(неч. D)), F – (PP_(неч. F)) G – (PP_(неч. G)) имали су концентрације 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2.3. Припрема раствора смјеше

Од раствора (OP_(неч. А)), (OP_(неч. В)), (OP_(неч.С)), (OP_(неч. D)), (OP_(неч. F)) и (OP_(неч. G)) аутоматском пипетом отпипетирано је по 1000 μL и пренесено у одмјерни суд од 10,00 mL, те допуњено мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L⁻¹ амонијум ацетат, рН вриједности 4,50 у односу 90:10 (v/v)) до ознаке. Овако припремљен радни раствор смјеше 1 (PP_(C1)) имао је концентрацију амитриптилин-хидрохлорида 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ и 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за сваку од наведених нечистоћа.

4.2.3. Припрема мобилних фаза

4.2.3.1. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте пуфера

За испитивање утицаја врсте пуфера, мобилна фаза је припремана тако да садржај органске фазе буде 80 %, а садржај воденог дијела мобилне фазе 20 % (v/v). Органску фазу чинио је ацетонитрил, док је водену фазу чинио 20 mmol L⁻¹ раствор пуфера, чија је рН вриједност подешена одговарајућом киселином на 4,50. Као пуфери испитивани су: амонијум-ацетат, амонијум-формијат, натријум-цитрат и калијум-фосфат, а рН вриједности припремљених раствора подешаване су употребом: глацијалне сирћетне, мравље, лимунске и орто-фосфорне киселине. Испитивање је вршено употребом *InertSil SIL-100 A* стационарне фазе (поглавље 4.1.2).

4.2.3.2. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја садржаја ацетонитрила

Утицај садржаја ацетонитрила испитиван је у распону од 4 % до 96 % (v/v). На *Zorbax NH2* стационарној фази (поглавље 4.1.2) водену фазу чинио је 60 mmol L⁻¹ раствор амонијум-ацетата чија је рН вриједност, употребом глацијалне сирћетне киселине, подешена на 4,50. На преостале три стационарне фазе (поглавље 4.1.2) водену фазу чинио је 20 mmol L⁻¹ раствор амонијум-ацетата чија је рН вриједност, употребом глацијалне сирћетне киселине, подешена на 4,50. Мобилне фазе припремане су тако да се у волумним односима органског и воденог дијела мобилне фазе у распонима од 96:4 до 80:20 за HILIC регион и од 20:80 до 4:96 за RP-HPLC регион, однос органског и воденог дијела мијењао за по 2 %. У остатку испитиваног региона (од 80:20 до 20:80) однос органског и воденог дијела мијењао за по 4 %. На овај начин процијењен је допринос: двојног HILIC/RP-HPLC, партиционог, адсорпционог и квадратног ретенционог механизма.

4.2.3.3. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја концентрације пуфера

Испитивање утицаја концентрације пуфера вршено је на *Zorbax NH2* стационарној фази (поглавље 4.1.2), чиме је процијењен допринос ањонско-измјењивачког ретенционог механизма, као и на *InertSil SIL-100 A* стационарној фази (поглавље 4.1.2), чиме је процијењен допринос катјонско-измјењивачког ретенционог механизма за амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће В, С, D и F. Мобилна фаза припремана је тако да садржи ацетонитрил и водени раствор амонијум-ацетата (чија је рН вриједност, употребом глацијалне сирћетне киселине, подешена на 4,50) у односу 80:20 (v/v). Водени раствори амонијум-ацетата припремани су у сљедећим концентрацијама: 5 mmol L⁻¹, 15 mmol L⁻¹, 25 mmol L⁻¹, 35 mmol L⁻¹, 45 mmol L⁻¹, 55 mmol L⁻¹ и 65 mmol L⁻¹.

4.2.3.4. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте стационарне фазе

Утицај врсте стационарне фазе испитиван је на четири различите стационарне фазе чије су карактеристике представљене у поглављу 4.1.2. Мобилне фазе припремане су тако да садрже ацетонитрил и водени раствор 20 mmol L⁻¹ амонијум-ацетата (на аминок стационарној фази 60 mmol L⁻¹), чија је рН вриједност, употребом глацијалне сирћетне

киселине, подешена на 4,50 и то у сљедећим волумним односима: 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 и 90:10.

4.2.3.5. Припрема мобилних фаза за испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и pH вриједности воденог дијела мобилне фазе

Испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и pH вриједности воденог дијела мобилне фазе вршено је на *InertSil SIL-100* стационарној фази (поглавље 4.1.2). Мобилне фазе припремане су према плану експеримената који је дефинисан матрицом BBD и представљен у табели 1.

Табела 1. План експеримената према BBD

No	Ацетонитрил	Пуфер	pH вриједност
1	75,00 (–1) ^a	5,00 (–1)	4,50 (0)
2	85,00 (+1)	5,00 (–1)	4,50 (0)
3	75,00 (–1)	35,00 (+1)	4,50 (0)
4	85,00 (+1)	35,00 (+1)	4,50 (0)
5	75,00 (–1)	20,00 (0)	3,50 (–1)
6	85,00 (+1)	20,00 (0)	3,50 (–1)
7	75,00 (–1)	20,00 (0)	5,50 (+1)
8	85,00 (+1)	20,00 (0)	5,50 (+1)
9	80,00 (0)	5,00 (–1)	3,50 (–1)
10	80,00 (0)	35,00 (+1)	3,50 (–1)
11	80,00 (0)	5,00 (–1)	5,50 (+1)
12	80,00 (0)	35,00 (+1)	5,50 (+1)
13	80,00 (0)	20,00 (0)	4,50 (0)
14	80,00 (0)	20,00 (0)	4,50 (0)
15	80,00 (0)	20,00 (0)	4,50 (0)
16	80,00 (0)	20,00 (0)	4,50 (0)
17	80,00 (0)	20,00 (0)	4,50 (0)

No – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата у воденом дијелу мобилне фазе (mmol L^{–1}), pH вриједност – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе

^a кодиране вриједности фактора приказане у заградама: (+1) горњи, (–1) доњи и (0) нулти ниво

4.3. ИСПИТИВАЊЕ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА ДИКЛОФЕНАК-КАЛИЈУМА, ИБУПРОФЕНА, КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

4.3.1. Хроматографски услови

Течни хроматограф под високим притиском: *Agilent 1200 series* (поглавље 4.1.1)

Стационарне фазе: *Zorbax NH2*, *InertSil Amide* и *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Проток мобилне фазе: 1 mL min^{-1}

Температура стационарне фазе: 25°C

Таласна дужина детекције: 225 nm

Запремина инјектовања: $20 \mu\text{L}$

4.3.2. Припрема раствора стандарда

Појединачно је одмјерено по $10,00 \text{ mg}$ диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола и квантитативно пренесено у одмјерне судове од $10,00 \text{ mL}$. У сваки одмјерни суд додато је око 5 mL ацетонитрила и растварано на ултразвучном купатилу 5 минута. Сви одмјерни судови су појединачно, након хлађења, допуњени ацетонитрилом до ознаке, при чему су добијени основни раствори диклофенак-калијума (**ОР** (дик)), ибупрофена (**ОР** (ибу)), кофеина (**ОР** (коф)) и парацетамола (**ОР** (пар)) концентрација $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

Од сваког основног раствора, аутоматском пипетом је појединачно отпипетирано по $1000 \mu\text{L}$ и пренесено у одмјерне судове од $10,00 \text{ mL}$, те допуњено мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L^{-1} амонијум ацетат, рН вриједности $7,00$ у односу $90:10$ (v/v)) до ознаке. Овако су припремљени појединачни радни раствори диклофенак-калијума (**РР** (дик)), ибупрофена (**РР** (ибу)), кофеина (**РР** (коф)) и парацетамола (**РР** (пар)) концентрација $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.2.1. Припрема раствора смјеше

Од раствора (**ОР** (дик)), (**ОР** (ибу)), (**ОР** (пар)) и (**ОР** (коф)) аутоматском пипетом отпипетирано је по $1000 \mu\text{L}$ и пренесено у одмјерни суд од $10,00 \text{ mL}$, те допуњено мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L^{-1} амонијум ацетат, рН вриједности $7,00$ у односу $90:10$ (v/v)) до ознаке. Овако припремљен радни раствор смјеше **2 (РР (с2))** имао је концентрацију $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ за свако испитивано једињење.

4.3.3. Припрема мобилних фаза

4.3.3.1. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте пуфера

За испитивање утицаја врсте пуфера, мобилна фаза је припремана тако да садржај органске фазе буде 80 %, а садржај воденог дијела мобилне фазе 20 % (v/v). Органску фазу чинио је ацетонитрил, док је водену фазу чинио 20 mmol L⁻¹ раствор пуфера, чија је рН вриједност подешена одговарајућом киселином на 7,00. Као пуфери испитивани су: амонијум-ацетат, амонијум-формијат, натријум-цитрат и калијум-фосфат, а рН вриједности припремљених раствора подешаване су употребом: амонијум-, натријум- и калијум-хидроксида. Испитивање је вршено употребом *Zorbax NH2* стационарне фазе (поглавље 4.1.2).

4.3.3.2. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја садржаја ацетонитрила

Утицај садржаја ацетонитрила испитиван је у волумном односу од 4 % до 96 %. Испитивање је вршено употребом три стационарне фазе наведене у поглављу 4.3.1, чије су карактеристике описане у поглављу 4.1.2. Водену фазу чинио је 20 mmol L⁻¹ раствор амонијум-ацетата, чија је рН вриједност, употребом амонијум-хидроксида, подешена на 7,00. Мобилне фазе припремане су у волумним односима органског и воденог дијела представљеним у поглављу 4.2.3.2. На овај начин процијењен је допринос двојног HILIC/RP-HPLC, партиционог, адсорпционог и квадратног ретенционог механизма.

4.3.3.3. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја концентрације пуфера

Испитивање утицаја концентрације пуфера вршено је на *Zorbax NH2* стационарној фази (поглавље 4.1.2), чиме је процијењен допринос ањонско-измјењивачког ретенционог механизма за диклофенак-калијум и ибупрофен. Мобилна фаза припремана је тако да садржи ацетонитрил и водени раствор амонијум-ацетата (чија је рН вриједност, употребом амонијум-хидроксида, подешена на 7,00) у односу 80:20 (v/v). Водени раствори амонијум-ацетата припремани су у сљедећим концентрацијама: 5 mmol L⁻¹, 15 mmol L⁻¹, 25 mmol L⁻¹, 35 mmol L⁻¹, 45 mmol L⁻¹, 55 mmol L⁻¹ и 65 mmol L⁻¹.

4.3.3.4. Припрема мобилних фаза за испитивање утицаја врсте стационарне фазе

Утицај врсте стационарне фазе испитиван је на стационарним фазама наведеним у поглављу 4.3.1, а њихове карактеристике представљене су у поглављу 4.1.2. Мобилне фазе припремане су тако да садрже ацетонитрил и водени раствор 20 mmol L⁻¹ амонијум-ацетата, чија је рН вриједност, употребом амонијум-хидроксида, подешена на 7,00 у сљедећим односима: 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 и 90:10 (v/v).

4.3.3.5. Припрема мобилних фаза за испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе

Испитивање истовременог утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе вршено је на *Zorbax NH2* стационарној фази (поглавље 4.1.2). Мобилне фазе припремане су према плану експеримената који је дефинисан матрицом BBD и представљен у табели 2.

Табела 2. План експеримената према BBD

No	Ацетонитрил	Пуфер	рН вриједност
1	80,00 (–1) ^a	5,00 (–1)	5,50 (0)
2	90,00 (+1)	5,00 (–1)	5,50 (0)
3	80,00 (–1)	35,00 (+1)	5,50 (0)
4	90,00 (+1)	35,00 (+1)	5,50 (0)
5	80,00 (–1)	20,00 (0)	4,00 (–1)
6	90,00 (+1)	20,00 (0)	4,00 (–1)
7	80,00 (–1)	20,00 (0)	7,00 (+1)
8	90,00 (+1)	20,00 (0)	7,00 (+1)
9	85,00 (0)	5,00 (–1)	4,00 (–1)
10	85,00 (0)	35,00 (+1)	4,00 (–1)
11	85,00 (0)	5,00 (–1)	7,00 (+1)
12	85,00 (0)	35,00 (+1)	7,00 (+1)
13	85,00 (0)	20,00 (0)	5,50 (0)
14	85,00 (0)	20,00 (0)	5,50 (0)
15	85,00 (0)	20,00 (0)	5,50 (0)

No – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата (mmol L⁻¹), рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе.

^a кодиране вриједности фактора приказане су у заградама: (+1) горњи, (–1) доњи и (0) нулти ниво.

4.4. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

4.4.1. Хроматографски услови

Течни хроматограф под високим притиском: *Agilent 1200 series* (поглавље 4.1.1)

Стационарна фаза: *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Проток мобилне фазе: 1 mL min^{-1}

Таласна дужина детекције: 225 nm

Запремина инјектовања: 10 μL

4.4.2. Припрема раствора стандарда

Основни раствори кофеина (**ОР (коф)**) и парацетамола (**ОР (пар)**) концентрација $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ припремани су на исти начин као и за потребе испитивања ретенционих механизма (поглавље 4.3.2).

4.4.2.1. Припрема раствора смјеше

Аутоматском пипетом отпипетирано је 200 μL (**ОР (коф)**) и 1540 μL (**ОР (пар)**) и пренесено у одмјерни суд од 10,00 mL. Суд је допуњен мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L^{-1} амонијум-ацетат, рН вриједности 6,00 у односу 90:10 (v/v)) до ознаке. Овако припремљен раствор смјеше за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и парацетамола (**РР (опткп)**) имао је концентрацију кофеина $20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ и парацетамола $154 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.4.3. Припрема мобилних фаза

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената, који је дефинисан матрицом CCD и представљен у табели 3.

Табела 3. План експеримената према CCD

Но	Ацетонитрил	Пуфер	рН вриједност	Температура
1	93,00 (–1) ^a	5,00 (–1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
2	97,00 (+1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
3	93,00 (–1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
4	97,00 (+1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
5	93,00 (–1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
6	97,00 (+1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
7	93,00 (–1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
8	97,00 (+1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
9	93,00 (–1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
10	97,00 (+1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
11	93,00 (–1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
12	97,00 (+1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
13	93,00 (–1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
14	97,00 (+1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
15	93,00 (–1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
16	97,00 (+1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
17	93,00 (–1)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
18	97,00 (+1)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
19	95,00 (0)	5,00 (–1)	6,00 (0)	25,00 (0)
20	95,00 (0)	25,00 (+1)	6,00 (0)	25,00 (0)
21	95,00 (0)	15,00 (0)	5,00 (–1)	25,00 (0)
22	95,00 (0)	15,00 (0)	7,00 (+1)	25,00 (0)
23	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	15,00 (–1)
24	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	35,00 (+1)
25	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
26	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
27	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
28	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
29	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
30	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)

No – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата (mmol L^{–1}), рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе.

^a кодиране вриједности фактора приказане су у заградама: (+1) горњи, (–1) доњи и (0) нулти ниво.

4.4.4. Оптимални хроматографски услови

Стационарна фаза: *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Састав мобилне фазе: ацетонитрил – водени раствор 17 mmol L^{-1} амонијум-ацетата рН
вриједности 5,80 у односу 94,50:5,50 (v/v)

Температура стационарне фазе: $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Проток мобилне фазе: 1 mL min^{-1}

Таласна дужина детекције: 225 nm

Запремина инјектовања: $10 \text{ }\mu\text{L}$

4.5. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

4.5.1. Хроматографски услови

Испитивање робусности HILIC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и парацетамола спроведено је под хроматографским условима описаним у поглављу 4.4.1.

4.5.2. Припрема раствора узорка

Раствор испитиваног узорка припремљен је на исти начин као и радни раствор за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и парацетамола (PP (опткп)), те је имао концентрацију кофеина $20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ и парацетамола $154 \mu\text{g mL}^{-1}$ (поглавље 4.4.2).

4.5.3. Припрема мобилних фаза

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената који је дефинисан матрицом FrFD 2⁴⁻¹ и представљен у табели 4.

Табела 4. План експеримената према FrFD 2⁴⁻¹

Но	Ацетонитрил	Пуфер	pH вриједност	Температура
1	93,80 (–1) ^a	14,00 (–1)	5,50 (–1)	17,00 (–1)
2	95,20 (+1)	14,00 (–1)	5,50 (–1)	23,00 (+1)
3	93,80 (–1)	20,00 (+1)	5,50 (–1)	23,00 (+1)
4	95,20 (+1)	20,00 (+1)	5,50 (–1)	17,00 (–1)
5	93,80 (–1)	14,00 (–1)	6,10 (+1)	23,00 (+1)
6	95,20 (+1)	14,00 (–1)	6,10 (+1)	17,00 (–1)
7	93,80 (–1)	20,00 (+1)	6,10 (+1)	17,00 (–1)
8	95,20 (+1)	20,00 (+1)	6,10 (+1)	23,00 (+1)
9	94,50 (0)	17,00 (0)	5,80 (0)	20,00 (0)
10	94,50 (0)	17,00 (0)	5,80 (0)	20,00 (0)
11	94,50 (0)	17,00 (0)	5,80 (0)	20,00 (0)

Но – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата у воденој фази (mmol L^{-1}), pH вриједност – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе.

^a кодиране вриједности фактора приказане су у заградама: (+1) горњи (виши) ниво, (–1) доњи (нижи) ниво, (0) – нулти ниво.

4.6. ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

4.6.1. Хроматографски услови

Валидација HPLC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и парацетамола спроведено је под хроматографским условима описаним у поглављу 4.4.1.

4.6.2. Припрема раствора стандарда

Основни раствори кофеина (**ОР (коф)**) и парацетамола (**ОР (пар)**) концентрација $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ припремани су на исти начин као и за потребе испитивања ретенционих механизма (поглавље 4.3.2). Радни раствори смјеше кофеина и парацетамола припремани су непосредно прије употребе, при чему су концентрације подешаване тако да одговарају захтјевима за испитивање валидационих параметара.

4.6.3. Припрема мобилне фазе

Мобилна фаза припремана је тако да одговара саставу мобилне фазе при оптималним хроматографским условима (поглавље 4.4.4).

4.6.4. Припрема раствора за испитивање селективности методе

Селективност методе испитана је припремом раствора стандарда и припремом раствора плацебо смјеше. Претходно је припремљена смјеша која је садржавала све компоненте плацеба које се налазе у Panadol Extra[®] таблетама (поглавље 4.1.6).

Одмјерено је појединачно 20 Panadol Extra[®] таблета и израчуната је просјечна маса једне таблете ($686,20 \text{ mg}$). Од те масе одузета је маса кофеина ($65,00 \text{ mg}$) и парацетамола ($500,00 \text{ mg}$), те је израчуната маса плацеба ($121,20 \text{ mg}$). Потом је израчуната маса плацеба која се налази у маси таблетне смјеше која садржи кофеин и парацетамол у количинама потребним за припрему раствора концентрација $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ (за кофеин) и $7,69 \text{ mg mL}^{-1}$ (за парацетамол). Та маса ($46,60 \text{ mg}$) квантитативно је пренесена у одмјерни суд од 25 mL . У исти одмјерни суд затим је додато око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.6.3) и раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута. Након хлађења, суд је допуњен мобилном фазом до ознаке и профилиран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). На тај начин припремљен је основни раствор плацеба (**ОР (пла)**). Од тог раствора,

аутоматском пипетом, отпипетирано је 500 μL и пренесено у одмјерни суд од 25,00 mL, који је допуњен мобилном фазом (поглавље 4.6.3) до ознаке. Овим је добијен радни раствор плацеба (**РР** (пла)).

Раствор стандарда за испитивање селективности методе припреман је као (**РР** опткп) и имао је концентрацију кофеина 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ и парацетамола 154 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (поглавље 4.4.2.1).

4.6.5. Припрема раствора за испитивање линеарности методе

Линеарност методе испитана је припремом серије раствора парацетамола и кофеина растућих концентрација. Основни раствори кофеина и парацетамола припремљени су на начин описан у поглављу 4.4.2.

Од раствора (**ОР** (коф)) аутоматском пипетом отпипетирано је по 50, 100, 250, 500 и 1000 μL и пренесено у одмјерне судове од 10,00 mL. Судови су допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.6.3). Припремљени раствори имали су редом концентрације: 5, 10, 25, 50 и 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Од раствора (**ОР** (пар)) аутоматском пипетом отпипетирано је по 500, 1000, 1500, 2000 и 2500 μL и пренесено у одмјерне судове од 10,00 mL. Судови су допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.6.3). Припремљени раствори имали су редом концентрације: 50, 100, 150, 200 и 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6. Припрема раствора за испитивање осјетљивости методе

Осјетљивост методе испитана је одређивањем LOD и LOQ за кофеин и парацетамол. Основни раствори кофеина и парацетамола припремљени су на начин описан у поглављу 4.4.2.

Од раствора (**ОР** (коф)) и (**ОР** (пар)) аутоматском пипетом отпипетирано је појединачно 100, 50, 25, 10, 5 и 1 μL и пренесено у одмјерне судове од 100,00 mL. Сви судови су појединачно допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.6.3), а добијени раствори имали су концентрације кофеина, односно парацетамола: 1,00; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05 и 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.7. Припрема раствора за испитивање тачности методе

Одмјерено је 46,60 mg плацеба, 25,00 mg кофеина и 192,25 mg парацетамола и квантитативно пренесено у одмјерни суд од 25 mL. У исти одмјерни суд додато је око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.6.3) и раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута. Након хлађења, суд је допуњен мобилном фазом до ознаке и профилиран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). На тај начин припремљен је основни раствор за испитивање тачности методе (**ОР** (ткп)) у коме је концентрација кофеина била 1,00 mg mL⁻¹, а парацетамола 7,69 mg mL⁻¹. Од раствора (**ОР** (ткп)) припремљена су по три раствора концентрација 16 µg mL⁻¹; 20 µg mL⁻¹ и 24 µg mL⁻¹ за кофеин, односно 123,20 µg mL⁻¹; 154 µg mL⁻¹ и 184,80 µg mL⁻¹ за парацетамол. Ове концентрације одговарају нивоима садржаја API (кофеина и парацетамола) 80 %, 100 % и 120 % у односу на декларисани садржај. Раствори су припремани пипетирањем одговарајућих запремина раствора (**ОР** (ткп)) које су преношене у одмјерне судове, а који су потом допуњавани мобилном фазом (поглавље 4.6.3) до ознаке.

4.6.8. Припрема раствора за испитивање прецизности методе

Одмјерено је појединачно 20 Panadol Extra® таблета и израчуната је просјечна маса једне таблете (686,20 mg). Таблете су хомогенизоване пистилом у тарионику и одмјерено је 263,92 mg таблетне масе (садржи 25 mg кофеина и 192,25 mg парацетамола). Одмјерена маса квантитативно је пренесена у одмјерни суд од 25 mL, гдје је додато око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.6.3). Раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута и, након хлађења, допуњен мобилном фазом до ознаке, а затим профилиран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). Овако припремљен раствор имао је концентрацију кофеина 1,00 mg mL⁻¹ и парацетамола 7,69 mg mL⁻¹. Од овог раствора аутоматском пипетом пипетирано је шест пута по 500 µL у одмјерне судове од 25,00 mL, који су потом допуњени мобилном фазом (поглавље 4.6.3) до ознаке. Припремљено је шест оваквих раствора.

4.7. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

4.7.1. Хроматографски услови

Течни хроматограф под високим притиском: *Agilent 1200 series* (поглавље 4.1.1)

Стационарна фаза: *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Проток мобилне фазе: 1 mL min^{-1}

Таласна дужина детекције: 225 nm

Запремина инјектовања: $10 \text{ }\mu\text{L}$

4.7.2. Припрема раствора стандарда

Основни раствори кофеина (**ОР** (коф)) и ибупрофена (**ОР** (ибу)) концентрација $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ припремани су на исти начин као за испитивање њихових ретенционих механизма (поглавље 4.3.2).

4.7.2.1. Припрема раствора смјеше

Аутоматском пипетом отпипетирано је $250 \text{ }\mu\text{L}$ (**ОР** (коф)) и $1000 \text{ }\mu\text{L}$ (**ОР** (ибу)) и пренесено у одмјерни суд од $10,00 \text{ mL}$. Суд је допуњен мобилном фазом (ацетонитрил – 20 mmol L^{-1} амонијум-ацетат рН вриједности 6,00, у односу 90:10 (v/v)) до ознаке. Овако припремљен раствор смјеше за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и ибупрофена (**РР** (оптки)) имао је концентрацију кофеина $25,00 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ и ибупрофена $100,00 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.7.3. Припрема мобилних фаза

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената који је дефинисан матрицом CCD и представљен у табели 5.

Табела 5. План експеримената према CCD

Но	Ацетонитрил	Пуфер	pH вриједност	Температура
1	93,00 (–1) ^a	5,00 (–1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
2	97,00 (+1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
3	93,00 (–1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
4	97,00 (+1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	15,00 (–1)
5	93,00 (–1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
6	97,00 (+1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
7	93,00 (–1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
8	97,00 (+1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	15,00 (–1)
9	93,00 (–1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
10	97,00 (+1)	5,00 (–1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
11	93,00 (–1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
12	97,00 (+1)	25,00 (+1)	5,00 (–1)	35,00 (+1)
13	93,00 (–1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
14	97,00 (+1)	5,00 (–1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
15	93,00 (–1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
16	97,00 (+1)	25,00 (+1)	7,00 (+1)	35,00 (+1)
17	93,00 (–1)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
18	97,00 (+1)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
19	95,00 (0)	5,00 (–1)	6,00 (0)	25,00 (0)
20	95,00 (0)	25,00 (+1)	6,00 (0)	25,00 (0)
21	95,00 (0)	15,00 (0)	5,00 (–1)	25,00 (0)
22	95,00 (0)	15,00 (0)	7,00 (+1)	25,00 (0)
23	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	15,00 (–1)
24	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	35,00 (+1)
25	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
26	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
27	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
28	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
29	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)
30	95,00 (0)	15,00 (0)	6,00 (0)	25,00 (0)

Но – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата у воденој фази (mmol L^{–1}), pH вриједност – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе

^a кодиране вриједности фактора приказане су у заградама: (+1) горњи (виши) ниво, (–1) доњи (нижи) ниво, (0) – нулти ниво

4.7.4. Оптимални хроматографски услови

Стационарна фаза: *InertSil Diol* (поглавље 4.1.2)

Састав мобилне фазе: ацетонитрил – водени раствор 5 mmol L⁻¹ амонијум-ацетата рН
вриједности 5,30 у односу 95,50:4,50 (v/v)

Температура стационарне фазе: 15 °C

Проток мобилне фазе: 1 mL min⁻¹

Таласна дужина детекције: 225 nm

Запремина инјектовања: 10 µL

4.8. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

4.8.1. Хроматографски услови

Испитивање робусности HILIC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и ибупрофена спроведено је под хроматографским условима описаним у поглављу 4.7.1.

4.8.2. Припрема раствора узорка

Раствор испитиваног узорка припремљен је на исти начин као и радни раствор за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и ибупрофена (PP (оптки)), те је имао концентрацију кофеина $25,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ и ибупрофена $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (поглавље 4.4.2.1).

4.8.3. Припрема мобилних фаза

Мобилне фазе припремане су према плану експеримената који је дефинисан матрицом FrFD 2⁴⁻¹ и представљен у табели 6.

Табела 6. План експеримената према FrFD 2⁴⁻¹

No	Ацетонитрил	Пуфер	pH вриједност	Температура
1	95,00 (–1) ^a	3,00 (–1)	5,00 (–1)	12,00 (–1)
2	96,00 (+1)	3,00 (–1)	5,00 (–1)	18,00 (+1)
3	95,00 (–1)	7,00 (+1)	5,00 (–1)	18,00 (+1)
4	96,00 (+1)	7,00 (+1)	5,00 (–1)	12,00 (–1)
5	95,00 (–1)	3,00 (–1)	5,60 (+1)	18,00 (+1)
6	96,00 (+1)	3,00 (–1)	5,60 (+1)	12,00 (–1)
7	95,00 (–1)	7,00 (+1)	5,60 (+1)	12,00 (–1)
8	96,00 (+1)	7,00 (+1)	5,60 (+1)	18,00 (+1)
9	95,50 (0)	5,00 (0)	5,30 (0)	15,00 (0)
10	95,50 (0)	5,00 (0)	5,30 (0)	15,00 (0)
11	95,50 (0)	5,00 (0)	5,30 (0)	15,00 (0)

No – редни број експеримента (*standard order*), ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази (v/v), пуфер – концентрација амонијум-ацетата у воденој фази (mmol L⁻¹), pH вриједност – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе

^a кодиране вриједности фактора приказане су у заградама: (+1) горњи (виши) ниво, (–1) доњи (нижи) ниво, (0) – нулти ниво

4.9. ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

4.9.1. Хроматографски услови

Валидација HPLC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и ибупрофена спроведено је под хроматографским условима описаним у поглављу 4.7.1.

4.9.2. Припрема раствора стандарда

Основни раствори кофеина (ОР (коф)) и ибупрофена (ОР (ибу)) концентрација 1,00 mg mL⁻¹ припремани су на исти начин као за испитивање ретенционих механизма (поглавље 4.3.2). Радни раствори смјеше кофеина и ибупрофена припремани су непосредно прије употребе, при чему су концентрације подешаване тако да одговарају захтјевима за испитивање валидационих параметара.

4.9.3. Припрема мобилне фазе

Мобилна фаза припремана је тако да одговара саставу мобилне фазе при оптималним хроматографским условима (поглавље 4.7.4).

4.9.4. Припрема раствора за испитивање селективности методе

Селективност методе испитана је припремом раствора стандарда и припремом раствора плацеба. Претходно је припремљена смјеша која је садржавала све компоненте плацеба које се налазе у THOMAPYRIN TENSION DUO® таблетама (поглавље 4.1.6).

Одмјерено је појединачно 20 THOMAPYRIN TENSION DUO® таблета и израчуната је просјечна маса једне таблете (651,20 mg). Од те масе одузета је маса кофеина (100,00 mg) и ибупрофена (400,00 mg), те је израчуната маса плацеба (151,20 mg). Израчуната је маса плацеба која се налази у маси таблетне смјеше која садржи кофеин и ибупрофен у количинама потребним за припрему раствора концентрација 1,00 mg mL⁻¹ (за кофеин) и 4,00 mg mL⁻¹ (за ибупрофен). Та маса плацеба (37,80 mg) квантитативно је пренесена у одмјерни суд од 25 mL. У исти одмјерни суд додато је око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.9.3) и раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута. Након хлађења, суд је допуњен мобилном фазом до ознаке и профилтриран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). На тај начин припремљен је основни раствор плацеба (ОР (пла)). Од раствора (ОР (пла)) аутоматском пипетом отпипетирано је 500 µL и пренесено у одмјерни суд од 25,00

mL, који је допуњен мобилном фазом до ознаке (поглавље 4.9.3). Овим је добијен радни раствор плацеба (**PP** (пла)).

Раствор стандарда за испитивање селективности методе припреман је као (**PP** (оптки)) и имао је концентрацију кофеина $25,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ и ибупрофена $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (поглавље 4.7.2.1).

4.9.5. Припрема раствора за испитивање линеарности методе

Линеарност методе испитана је припремом серије раствора кофеина и ибупрофена растућих концентрација. Основни раствори кофеина и ибупрофена припремљени су на начин описан у поглављу 4.4.2.

Од раствора (**ОР** (коф)) аутоматском пипетом отпипетирано је по 50, 100, 250, 500 и 1000 μL и пренесено у појединачне одмјерне судове од 10,00 mL. Судови су допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.9.3), а добијени раствори имали су редом концентрације: 5, 10, 25, 50 и $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Од раствора (**ОР** (ибу)) аутоматском пипетом отпипетирано је по 100, 500, 1000, 1500 и 2000 μL и пренесено у појединачне одмјерне судове од 10,00 mL. Судови су допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.9.3), а добијени раствори имали су редом концентрације: 10, 50, 100, 150 и $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.9.6. Припрема раствора за испитивање осјетљивости методе

Осјетљивост методе испитана је одређивањем LOD и LOQ за кофеин и ибупрофен. Основни раствори кофеина и ибупрофена припремљени су на начин описан у поглављу 4.7.2.

Од раствора (**ОР** (коф)) и (**ОР** (ибу)) аутоматском пипетом отпипетирано је појединачно 100, 50, 25, 10, 5 и 1 μL и пренесено у одмјерне судове од 100,00 mL. Сви судови су појединачно допуњени до ознаке мобилном фазом (поглавље 4.9.3), а добијени раствори имали су концентрације кофеина, односно ибупрофена: 1,00; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05 и $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.9.7. Припрема раствора за испитивање тачности методе

Одмјерено је 37,80 mg плацеба, 25,00 mg кофеина и 100,00 mg ибупрофена и квантитативно пренесено у одмјерни суд од 25 mL. У исти одмјерни суд додато је око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.9.3) и раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута. Након хлађења, суд је допуњен мобилном фазом до ознаке и профилтриран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). На тај начин припремљен је основни раствор за испитивање тачности методе (**ОР** (тки)) у коме је концентрација кофеина била 1,00 mg mL⁻¹, а концентрација ибупрофена 4,00 mg mL⁻¹. Од раствора (**ОР** (тки)) припремљена су по три раствора концентрација 20 µg mL⁻¹; 25 µg mL⁻¹ и 30 µg mL⁻¹ за кофеин, односно 80 µg mL⁻¹; 100 µg mL⁻¹ и 120 µg mL⁻¹ за ибупрофен. Ове концентрације одговарају нивоима 80 %, 100 % и 120 % у односу на декларисани садржај кофеина и ибупрофена. Раствори су припремани пипетирањем одговарајућих запремина (**ОР** (тки)) које су преношене у одмјерне судове, а који су потом допуњавани мобилном фазом (поглавље 4.9.3) до ознаке.

4.9.8. Припрема раствора за испитивање прецизности методе

Одмјерено је појединачно 20 THOMAPYRIN TENSION DUO® таблета и израчуната је просјечна маса једне таблете (651,20 mg). Таблете су хомогенизоване пистилом у тарионику и одмјерено је 162,80 mg таблетне масе (садржи 25,00 mg кофеина и 100 mg ибупрофена). Одмјерена маса је квантитативно пренесена у одмјерни суд од 25 mL, гдје је додато око 15 mL мобилне фазе (поглавље 4.9.3). Раствор је третиран на ултразвучном купатилу 15 минута и, након хлађења, допуњен мобилном фазом до ознаке, а затим профилтриран кроз мембрански филтар (поглавље 4.1.3). Овако припремљен раствор имао је концентрацију кофеина 1,00 mg mL⁻¹ и ибупрофена 4,00 mg mL⁻¹. Од овог раствора аутоматском пипетом пипетирано је 500 µL у одмјерне судове од 25,00 mL, који су потом допуњени мобилном фазом (поглавље 4.9.3) до ознаке. Припремљено је шест оваквих раствора.

4.10. ХРОМАТОГРАФСКИ ПОСТУПАК

У HPLC систему (поглавље 4.1.1), подешеном према одговарајућим условима анализе, кроз стационарну фазу пропуштана је одговарајућа мобилна фаза до постизања стабилне базне линије. Прије употребе, мобилне фазе су дегазиране 15 минута на ултразвучном купатилу и профилтриране кроз мембранске филтре (поглавље 4.1.3). Уједначеност површина хроматографских пикова постигнута је инјектовањем одговарајућих раствора све док три узастопна мјерења нису дала досљедне резултате. Потом су инјектовани радни раствори стандарда и радни раствори смјеше, који су чувани у фрижидеру на температури 4 – 8 °C, а прије инјектовања у хроматографски систем темперирани су на собну температуру. Са добијених хроматограма читаване су вриједности ретенционог времена, фактора симетрије те површина и ширина хроматографских пикова. На основу тих вриједности израчунати су одговарајући хроматографски параметри: ретенциони фактор, фактор резолуције и слично. Потом су статистичком анализом добијене вриједности параметара који описују креиране математичке моделе, односно омогућавају процјену линеарности, осјетљивости, тачности и прецизности методе.

4.11. ПРОЦЈЕНА ЕКОЛОШКЕ ПРИХВАТЉИВОСТИ И ЕФИКАСНОСТИ НОВОРАЗВИЈЕНИХ НІІС МЕТОДА

За процјену еколошке прихватљивости и ефикасности новоразвијених НІІС метода кориштени су софтвери и модели описани у поглављу 1.5.3.

Анализа еколошке прихватљивости и ефикасности метода кориштењем AGREE, *ComplexGAPI* и BAGI софтвера заснива се на уносу тражених података кроз једноставне интерфејсе. Кориснички интерфејс AGREE софтвера органозован је у 12 поља, при чему свако поље одражава један од 12 принципа GAC-а. Подаци о методи уносе се избором једне од предефинисаних опција или уносом одговарајућих бројчаних и/или текстуалних података. Поред тога, бира се одговарајући тежински коефицијент за сваки процјењивани параметар, што је од посебног значаја када се жели акцентовати одређени GAC принцип. За добијање појединачних оцјена и коначног резултата, софтвер користи унапријед дефинисане формуле. Код *ComplexGAPI* и BAGI софтвера, подаци се уносе искључиво одабиром једне од понуђених опција, што поједностављује процес и смањује могућност грешке. Избором најпогодније опције, одговарајуће поље на пентаграму аутоматски се обоји зелено, жуто или црвено (*ComplexGAPI*), те бијело, свијетло плаво, плаво или тамно плаво (BAGI софтвер).

Анализа према RGB моделу подразумева објективно попуњавање унапријед припремљене *Excel* табеле која је подијелена на три сегмента: R (*Red*), G (*Green*) и B (*Blue*), а који одговарају принципима описаним у поглављу 1.5.2. За сваки принцип уноси се вриједност од 0 до 100, при чему вриједност 0 означава лошу, а вриједност 100 одличну прилагођеност методе принципу који се процјењује. У оправданим случајевима, могуће је додијелити вриједности изнад 100, када метода значајно превазилази очекиване карактеристике (када је метода супериорнија у погледу прилагођености испитиваном принципу у односу на већ постојеће методе). Резултат се формира аутоматски као коначна бројчана вриједност обрадом свих 12 процјениваних принципа и постављен је на обојеној позадини. Боја позадине резултат је усклађености између три испитивана сегмента R (*Red*), G (*Green*) и B (*Blue*) и одражава ниво „бјелине“ методе

5. СОФТВЕРСКИ ДИО

5.1. РАЗВОЈ СОФТВЕРА ЗА АНАЛИЗУ РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА

За развој софтвера за анализу ретенционих механизма кориштен је програмски језик *Python* са библиотекама *NumPy*, *Matplotlib*, *pandas* и *SciPy*. Такође, кориштени су и уграђени модули *sys*, *math* и *csv*, а детаљан опис ових библиотека и модула наведен је у поглављу 1.3.

5.1.1. Улазне команде

Новоразвијени софтвер омогућава унос података кроз различите улазне команде. Функција *getInputValues* добавља податке за улаз у апликацију на два начина: кроз *CSV* датотеку или преко аргумената командне линије. Учитавање *CSV* датотеке врши се употребом функције *read_csv* из *pandas* библиотеке, док се табеларна структура за унесене податке уводи кроз *pd.DataFrame* функцију. Уколико дође до грешке приликом учитавања *CSV* датотеке, било да је датотека недоступна или број улазних аргумената није валидан, софтвер учитава податке из аргумената командне линије. Уколико не пронађе податке ни у аргументима командне линије, *except* блок препознаје грешку и исписује поруку: „*Error occurred, please try with different input values*“. Овај корак је критичан за учитавање експерименталних података. Уколико софтвер пронађе податке, функција *getInputValues* провјерава да ли су дата оба аргумента: *xInput* и *yInput*. Ако неки од аргумената недостаје, у том случају *except* блок препознаје грешку и исписује поруку: „*Please input valid X and Y values from CSV or command line arguments*“.

Након успјешног учитавања, подаци се преводе у *DataFrame* формат, а затим се покреће извршавање софтвера. Први корак јесте превођење *x* и *y* улаза у листу *float* бројева, како би се омогућила манипулација подацима и извршавање различитих операција над њима. У сљедећем кораку, софтвер врши провјеру да ли су улазни низови података исте дужине, јер је за правилну анализу неопходно да сви подаци буду упарени, односно да за сваку вриједност *x* буде унесена одговарајућа вриједност *y*. У случају да дужина улазних низова за *xInput* и *yInput* није једнака, софтвер не може извршити даљу анализу те исписује поруку: „*X and Y values are not the same length*“.

Анализа је смјештена у блок *try-except*, што омогућава софтверу да идентификује све грешке које могу настати током извршавања (нпр. унос невалидних података, грешке у

оптимизацији и слично). Поред тога што приликом проналаска грешке корисник добија одговарајућу поруку са упутствима – сам *Python* истовремено пријављује системску грешку (промјенљива *err*), као и врсту грешке. То омогућава лакшу идентификацију и рјешавање насталог проблема.

Када су сви подаци унесени и све провјере валидности успјешно завршене, започиње анализа различитих ретенционих модела. Сви излазни подаци, употребом варијабле *decimal*, заокружени су на четири децимале, с тим да у коду постоји упутство за прилагођавање броја децимала према потребама анализе. Добијени резултати, као и одговарајући статистички параметри исписују се у виду *CSV* датотеке, а графички приказ резултата омогућен је примјеном *Matplotlib* библиотеке.

5.1.2. Анализа двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела

Анализа ретенционих модела започиње прилагођавањем двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, описаног изразом (21), увезеним експерименталним подацима. За тај прорачун користи се *curve_fit* функција из *SciPy.optimize* дијела *SciPy* библиотеке. Максималне вриједности коефицијената модела (a , m_{HILIC} , m_{RP} , b) ограничене су на вриједност 100, како би се олакшало тумачење добијених резултата у физичком смислу. То је дефинисано варијаблом *bounds*, а промјеном те вриједности могуће је мијењати границе коефицијената модела. Иницијалне вриједности коефицијената подешене су на вриједност 1 и не захтијевају ручно прилагођавање – процес добијања коначних вриједности коефицијената у потпуности је аутоматизован. На тај начин, избјегнута је могућност грешке настале посредством људског фактора, што се може десити кориштењем нпр. *solver* екстензије у *Microsoft Excel* пакету. Наиме, да би се употребом екстензије *solver* добили поуздани резултати нелинеарне регресионе анализе, потребно је да корисник постави иницијалне вриједности промјенљивих што ближе оптималном рјешењу. Овај корак је кључан – уколико су задате вриједности далеко од оптимума, *solver* може дати нетачан резултат, уопште не пронаћи резултат или дати резултат у оквирима локалног оптимума. Међутим, врло је изазовно и временски захтјевно „ручно“ пронаћи вриједности блиске оптималном рјешењу.

Maxfev варијабла, која дефинише број понављања извршавања *curve_fit* функције, ограничена је на вриједност 10 000. То значи да софтвер прави 10 000 различитих комбинација вриједности коефицијената модела у циљу добијања највиших вриједности

коэффициента детерминације, при најнижим могућим вриједностима коэффицијената модела. Такође, вриједност *maxfev* варијабле може се мијењати и прилагођавати жељеном нивоу прецизности. Вриједности *bounds* и *maxfev* варијабли мијењају се у коду на мјесту које је означено са „*adjust bounds and maxfev if needed for different precision*“.

Вриједности коэффициента детерминације – R^2 , који представља статистичку мјеру прилагођености модела експерименталним подацима, добија се низом математичких прорачуна, што укључује рачунање:

- у *fitted* вриједности, које представљају процијењене или предвиђене вриједности зависне варијабле у које модел израчунава на основу улазних података и користи за поређење са стварним, експерименталним вриједностима;
- резидуала, који представљају разлику између експерименталних (y) и предвиђених (y *fitted*) вриједности, а које показују колико су експерименталне вриједности удаљене од процијењених вриједности модела;
- суме квадрата резидуала (*sum of squared residuals* – *ssRes*), која представља збир квадрата резидуалних вриједности, а указује на квалитет модела (мања сума квадрата резидуала указује на бољи модел), мјерећи укупно одступање модела од експерименталних вриједности;
- укупне суме квадрата (*total sum of squares* – *ssTot*), која представља варијацију стварних вриједности зависне варијабле око њихове средње вриједности и мјера је укупне варијабилности података.

Када се добију сви потребни подаци, софтвер рачуна коэффициент детерминације (R^2) према сљедећем изразу [122]:

$$R^2 = 1 - ssRes / ssTot \quad (27)$$

Након тога, а на основу израза (21) софтвер рачуна вриједност ϕ_{min} . За додатну процјену адекватности креираног модела, рачуна се вриједност *Adjusted* R^2 (*Adj* R^2), која узима у обзир број независних варијабли у моделу и величину узорка, према сљедећем изразу:

$$Adjusted R^2 = 1 - ((1 - R^2) \cdot (n - 1) / (n - p - 1)) \quad (28)$$

гдје је n – број узорака, p – број независних варијабли у моделу и R^2 – коэффициент детерминације [122].

Добијени резултати (y fitted вриједности, φ_{min} , статистички параметри) исписују се у CSV датотеку под називом *output-dual-model* одакле се могу преузети за потребе даљег кориштења (креирање графика и слично). Додатно, графички приказ резултата омогућава и сам софтвер формирајући два сета података – координате 1 и 2. Координате 1 су експериментални подаци, а координате 2 чине улазне вриједности варијабле x и модел подаци варијабле y (y fitted). Добијање одговарајућих сетова података омогућено је кориштењем *zip* функције која врши упаривање одговарајућих x и y вриједности.

5.1.3. Анализа квадратног ретенционог модела

Други корак у анализи је прилагођавање квадратног ретенционог модела, описаног изразом (16), истим експерименталним подацима који су кориштени код анализе двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела. За овај прорачун користи се *np.polyfit* функција из *NumPy* библиотеке која омогућава рачунање коефицијената полинома другог реда. Након добијања података о коефицијентима модела ($\ln k_w$, S_1 , S_2) рачуна се и вриједност y fitted на основу увезених вриједности независне варијабле x , дефинисањем степена функције (степен два). Потом се рачунају и вриједности R^2 и *Adjusted* R^2 , према изразима (27) и (28). Такође, на основу добијених вриједности за коефицијенте модела софтвер, према изразу (18) рачуна минимум добијене функције. Додатно, софтвер рачуна и вриједности независне варијабле x при φ_{min} (израз (19)) која, у аналитичком смислу, представља вриједност ретенционог фактора при минималној вриједности функције.

Добијени резултати (y fitted вриједности, φ_{min} , статистички параметри) исписују се у CSV датотеку под називом *output-quadratic-model*, одакле се могу преузети за потребе даљег кориштења (нпр. креирање графика). Графички приказ резултата омогућава и сам софтвер формирајући два сета података на начин описан у поглављу 5.1.2.

5.1.4. Анализа партиционог и адсорпционог ретенционог модела

Трећи корак је прилагођавање модела описаних изразима (14) (партициони ретенциони модел) и (15) (адсорпциони ретенциони модел) дијелу увезених експерименталних података за HILIC и за RP-HPLC регион. Софтвер анализира низове података формиране кориштењем почетних и крајњих тачака двојног HILIC/RP-HPLC односно квадратног ретенционог модела. Због флексибилности рачунања, избор региона који се анализира у оквиру партиционог и адсорпционог ретенционог модела може се мијењати у дијелу кода означеном са: „*adjust these two values below if needed*“. Анализа почиње *getSlicedModelValues* функцијом, која врши подјелу података у низове дужине 5, 6 или 7 тачака за HILIC, односно RP-HPLC регион. Потом се, кориштењем исте функције, рачунају коефицијенти корелације (r) за сваки од формираних низова за партициони и адсорпциони ретенциони модел. Добијене вриједности за низове од 5, 6 или 7 тачака за партициони и адсорпциони ретенциони модел у HILIC, односно у RP-HPLC региону се збрајају, а највећи збир означава се као препоручени. Дакле, подаци о дужини низа са највећим r вриједностима добијају се аутоматски и независно за оба региона.

Након избора најбољег низа, функција *calculateSlicedModel* рачуна коефицијенте партиционог и адсорпционог ретенционог модела, као и коефицијенте детерминације за оба региона. Овај прорачун изводи се кориштењем *np.polyfit* функције степена један из *NumPy* библиотеке, која омогућава рачунање коефицијената линеарног модела. Поређењем коефицијената детерминације партиционог и адсорпционог ретенционог модела за сваки од региона се означава доминантни модел, у случају да се за један од модела добије већа вриједност коефицијента детерминације. На тај начин се долази до података који од механизма има већи допринос у укупном ретенционом механизму испитиваних једињења. Комплетну анализу врши кровна функција *getBestSlicedModel*, која секвенцијално извршава горе наведене функције.

Анализа ретенционих механизма на више сетова података омогућава детаљну процјену доприноса процеса расподеле и адсорпције. Овај приступ није уобичајен, нарочито уколико се анализа спроводи „ручно“ употребом нпр. *Excel*-а или других статистичких софтвера. У том случају, анализа се врши на оном сету података који аналитичар сам одабере. Осим тога, представљени савременији приступ обезбјеђује аутоматизовану обраду података, што значајно смањује утрошак времена а грешку у прорачуну, која се може десити посредством људског фактора, своди на минимум.

Добијени резултати исписују се у CSV датотеке под називом *output-hilic* (за HILIC регион) и *output-rp-hplc* (за RP-HPLC регион), одакле се могу преузети за потребе даљег кориштења. Графички приказ резултата омогућава и сам софтвер креирањем *trendline* на основу експерименталних података и модел (у *Result*) података. Модел подаци се рачунају на основу експерименталних података примјеном, претходно описане, *np.polyfit* функције степена једна

6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

6.1. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА АМИТРИПТИЛИН-ХИДРОХЛОРИДА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА A, B, C, D, F И G

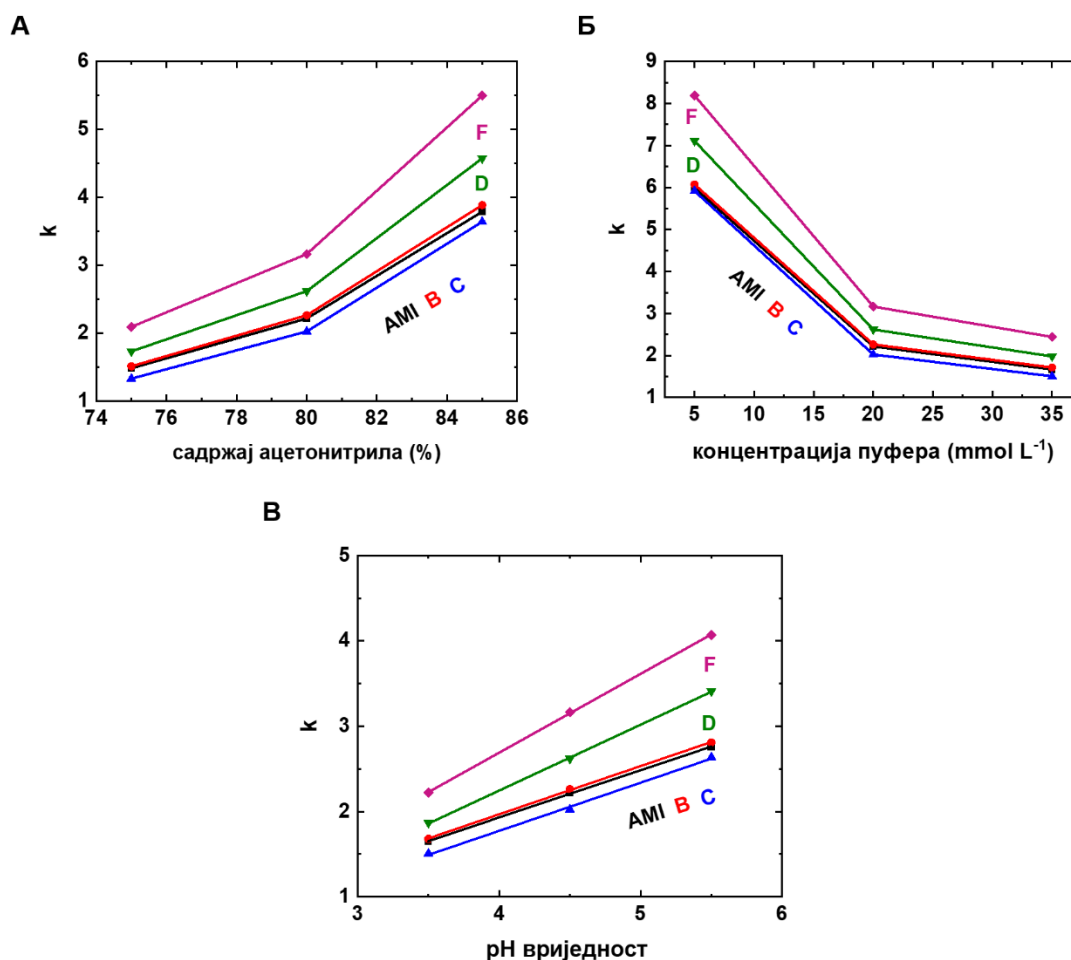
Присуство великог броја фактора који утичу на ретенционо понашање испитиваних једињења указује на неопходност примјене систематичног и свеобухватног приступа анализи ретенционих механизма. У литератури се могу пронаћи бројни радови који проучавају ретенционе механизме различитих једињења на више врста HILIC стационарних фаза [78, 123 – 128]. За опис ретенционог понашања примјењују се теоријски ретенциони модели [8, 18, 65, 73]. Међутим, мали број аутора користи и теоријске и експерименталне ретенционе моделе за потребе истраживања ретенционих механизма, анализирајући смјеше различитих једињења [12, 129]. Систематична анализа ретенционих механизма API и њених нечистоћа до сада није пронађена у литератури. Због тога је циљ овог дијела докторске дисертације био испитивање ретенционих механизма амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа A, B, C, D, F и G на четири различите HILIC стационарне фазе, примјеном теоријских и експерименталних ретенционих модела.

Нечистоће су једињења сличне хемијске структуре, јер представљају споредне процесе синтезе API, као и деградационе производе саме API. С обзиром на структурну сличност амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа B, C, D и F, у овој дисертацији је испитан утицај малих структурних разлика на ретенционо понашање на различитим HILIC стационарним фазама. С друге стране, нечистоће A и G су значајно различите хемијске структуре у односу на амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће B, C, D и F. Наиме, амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће B, C, D и F су се, при испитиваним хроматографским условима, налазиле у јонизованом, а нечистоће A и G у молекулском облику. Присуство оваквих разлика у HILIC систему, омогућило је испитивање ретенционог понашања јонизованих и неутралних једињења, чиме је дат значајан допринос у дефинисању повезаности између хемијске структуре и ретенционих механизма испитиваних једињења.

6.1.1. Прелиминарна фаза истраживања

У прелиминарној фази истраживања извршена је процјена утицаја различитих фактора на ретенционо понашање испитиваних једињења. Током истраживања, на константном нивоу одржавани су физички фактори који су имали предвидив утицај на ретенционо понашање: температура стационарне фазе (30 °C), брзина протока мобилне фазе (1 mL min⁻¹) и запремина инјектовања (20 µL). Таласна дужина детекције одређена је снимањем спектра анализираних једињења, с циљем да се пронађе вриједност која је најприближнија апсорпционом максимуму свих испитиваних једињења. Најприхватљивији резултати постигнути су при таласној дужини детекције од 254 nm, те је она одабрана за даља истраживања ове смјеше испитиваних једињења.

Од фактора мобилне фазе, најснажнији утицај на ретенционо понашање имала је редом: промјена рН вриједности воденог дијела мобилне фазе, садржај органског растварача и концентрација пуфера. Утицај ових фактора процијењен је OFAT приступом на силика стационарној фази. На основу добијених резултата, конструисани су графикони који илуструју зависност ретенционих фактора испитиваних једињења и појединачних фактора мобилне фазе (слика 9). Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису графички приказани. Наиме, молекулски облици имају мали афинитет ка везивању са стационарном фазом, због чега ове нечистоће елуирају са мобилном фазом.



Слика 9. Зависност ретенционих фактора амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа на силика стационарној фази од: (А) садржаја ацетонитрила (рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 4,50, концентрација пуфера (амонијум-ацетат) 20 mmol L⁻¹), (Б) концентрације пуфера (садржај ацетонитрила 80 %, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 4,50), (В) рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (садржај ацетонитрила 80 %, концентрација пуфера 20 mmol L⁻¹). AMI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F, рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, k – ретенциони фактор

Из добијених експерименталних података (слика 9) може се видјети да се вриједности ретенционог фактора амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа В, С, D и F повећавају са повећањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази, повећањем рН вриједности воденог дијела мобилне фазе, те смањењем концентрације пуфера.

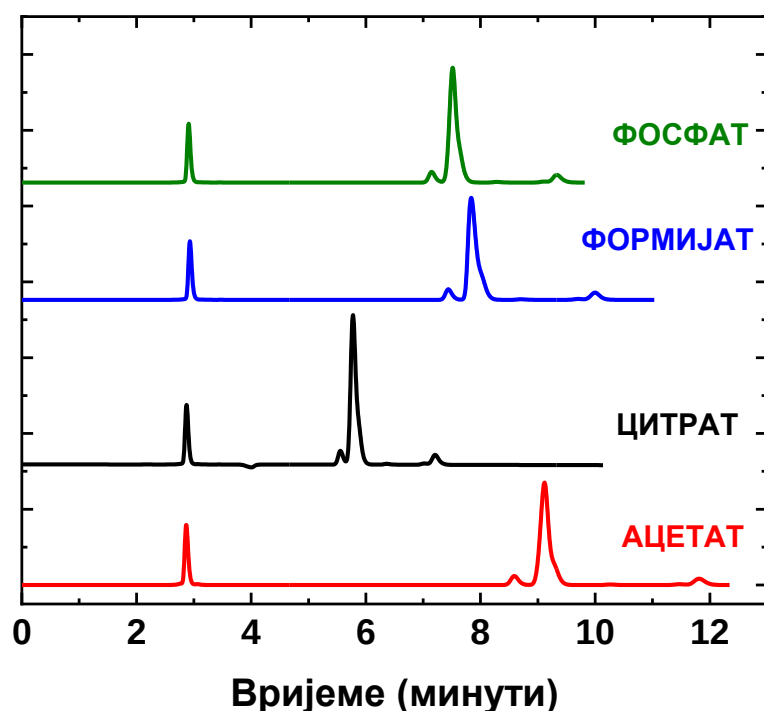
На површини силика стационарне фазе налазе се бројне силанолне групе, чија је рКа вриједност око 4,00. То значи да при рН вриједностима изнад 4,00 долази до постепене јонизације ових група (SiO⁻) што доводи до појаве негативног наелектрисања на површини стационарне фазе. Константна концентрација пуфера не може да „затвори“ све већи број адсорпционих мјеста насталих као посљедица повећања броја јонизованих силанолних група. Управо због овога долази до продуженог задржавања базних испитиваних једињења, што се посебно примјећује код изразито хидрофилних

једињења, као што је нечистоћа F, код које је наведена промјена највећег интензитета [16].

Резултати добијени OFAT приступом послужили су као основа за даља истраживања, омогућивши поузданији избор факторских нивоа, с циљем да се постигне јасно дефинисање ретенционог понашања испитиваних једињења.

6.1.2. Испитивање утицаја врсте пуферског система на ретенционо понашање

Анализа киселих и базних једињења захтијева кориштење мобилних фаза које садрже пуфер. При томе, избор одговарајућег пуфера у HILIC системима са високим садржајем органских растварача, није једноставан. Примјена адекватног пуферског система је кључна за постизање ефикасног раздвајања, добијање хроматографских пикова задовољавајућег облика, добијање репродуктивних резултата, као и оптималног трајања хроматографске анализе [16, 34, 35, 62]. Због свега наведеног, у циљу одабира најпогоднијег пуферског система, тестирани су: ацетатни (амонијум-ацетат/глацијална сирћетна киселина), формијатни (амонијум-формијат/мравља киселина), фосфатни (калијум-дихидрогенфосфат и дикалијум-хидрогенфосфат/ортофосфорна киселина) и цитратни (натријум-цитрат/лимонска киселина) пуферски системи. Током овог истраживања, остали параметри хроматографског система одржавани су на константном нивоу: садржај ацетонитрила 80 %, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 4,50 и концентрација пуфера 20 mmol L⁻¹. Хроматограми добијени под наведеним условима, приказани су на слици 10.



Слика 10. Утицај врсте пуферског система на ретенционо понашање испитиваних једињења. Фосфат – фосфатни пуферски систем, формијат – формијатни пуферски систем, цитрат – цитратни пуферски систем, ацетат – ацетатни пуферски систем

Најприхватљивији резултати, у погледу симетрије хроматографских пикова и трајања анализе, добијени су употребом цитратног пуферског система (слика 10). Међутим, овај пуферски систем није омогућио задовољавајуће раздвајање. Додатно, цитратни и фосфатни пуферски системи нису обезбиједили репродуктивност резултата. Разлог томе је, у случају фосфатног пуферског система, појава таложења при високим садржајима ацетонитрила (и уопштено органских растварача) у мобилној фази. Узрок таложења може бити веома слаба или готово непостојећа растворљивост натријумових и калијумових соли при високом садржају ацетонитрила. Наиме, доказано је да натријум-ацетат и натријум-формијат, при високом садржају органског растварача показују веома органичену растворљивост. С друге стране, амонијум-ацетат и амонијум-формијат су високо растворљиви, чак и при садржајима органског растварача већем од 90 %, што их чини пожељним пуферским системима у HILIC-у. Како је једина разлика између ових пуферских система врста формиране соли (натријумова или амонијумова), то управо и представља главни разлог за појаву различитог ретенционог понашања испитиваних једињења [7]. С обзиром да је у овом истраживању фосфатни пуфер кориштен у облику калијумове соли, а цитратни пуфер у облику натријумове соли, њихова смањена растворљивост при високом садржају ацетонитрила вјероватно је узрок таложења. То је

довело до незадовољавајућег ретенционог понашања испитиваних једињења и добијања неприхватљивих ретенционих параметара.

У многим HILIC мобилним фазама висок садржај ацетонитрила значајно мијења и киселинско-базне особине пуферског система. При томе, долази до промјена у рН распону ефикасности пуферског система, које су узроковане промјеном дисоцијационе константе пуферских компоненти. Ове промјене узрокују разлике у степену јонизације испитиваних једињења, као и промјену броја јонизованих силанолних група на површини стационарне фазе. Посебно значајан ефекат је промјена концентрације анијона и катјона самог пуферског система, који су заслужни за ефекте јонске измјене између испитиваних једињења, јона пуфера у мобилној фази и јона стационарне фазе. Те варијације веома су значајне за манипулацију ретенционих механизма на површини HILIC стационарне фазе, односно могу значајно да утичу на степен и врсту везивања испитиваних једињења на површини стационарне фазе, као и на вријеме њиховог задржавања на стационарној фази. Ефикасност пуферског система и распон рН вриједности у којем пуфер може да дјелује смањује се у HILIC систему. Разлог томе је што је у HILIC систему садржај воденог раствора пуфера у мобилној фази најчешће 4 % – 15 %, што је недовољно за постизање пуне ефикасности пуфера. Управо ово може бити додатни разлог због којег употреба натријумових и калијумових соли пуфера није омогућила задовољавајуће ретенционо понашање испитиваних једињења при рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе од 4,50 [33].

Преостала два пуферска система, ацетат и формијат, обично се и користе у HILIC анализама [6]. С обзиром да није било значајних разлика између резултата добијених употребом једног или другог пуфера, за даље истраживање изабран је амонијум-ацетат [8].

6.1.3. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел

У зависности од састава мобилне фазе, на стационарним фазама могу се испољити HILIC и RP-HPLC ретенциони механизми. У оквиру ове докторске дисертације испитивани су широки распони садржаја ацетонитрила у мобилној фази (4 % – 96 %). Током испитивања уочено је да је смањење садржаја ацетонитрила у мобилној фази од почетних 96 % до одређеног нивоа довело до смањења задржавања јонизованих испитиваних једињења. Након тога, даље смањење садржаја ацетонитрила у мобилној фази водило је ка продуженом задржавању истих једињења. Ова појава указивала је на

постојање двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог механизма [73]. Примјеном нелинеарне регресионе анализе, двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел, дефинисан изразом (21), прилагођен је експериментално добијеним подацима ретенционих фактора испитиваних једињења. На основу вриједности регресионих коефицијената, а према изразу (22) израчунати су минимуми добијених функција (φ_{min}). У аналитичком смислу, вриједност φ_{min} представља садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза из HILIC у RP-HPLC ретенциони механизам. Добијени резултати (коефицијенти модела, коефицијенти детерминације и вриједности φ_{min}) приказани су у табели 7. Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису графички приказани, нити су даље разматрани (поглавље 6.1.1).

Табела 7. Коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела и минималне вриједности функција

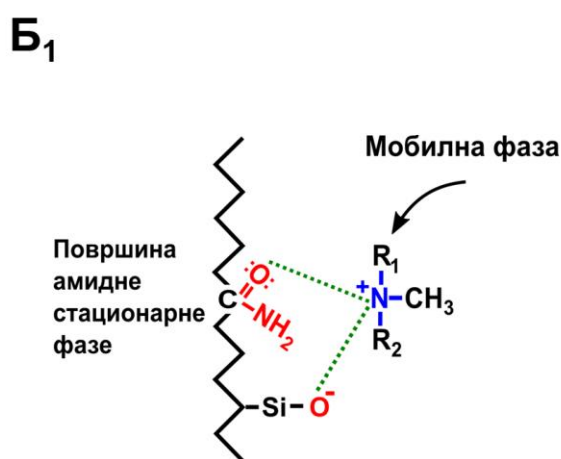
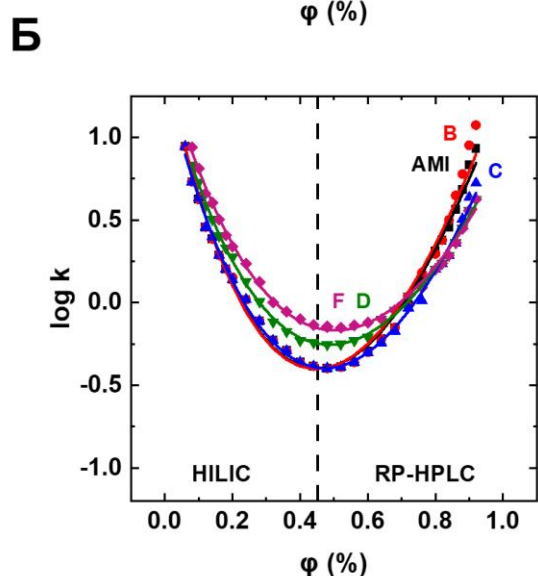
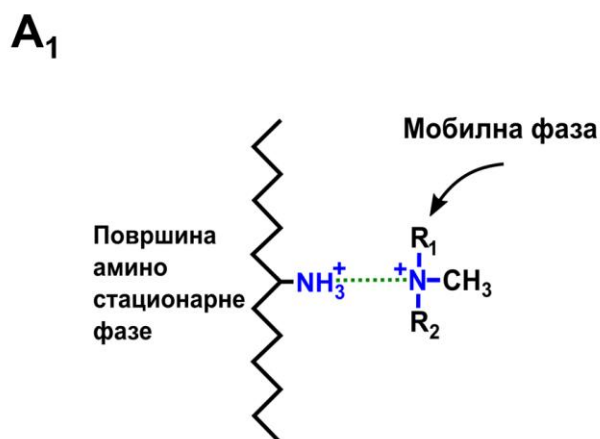
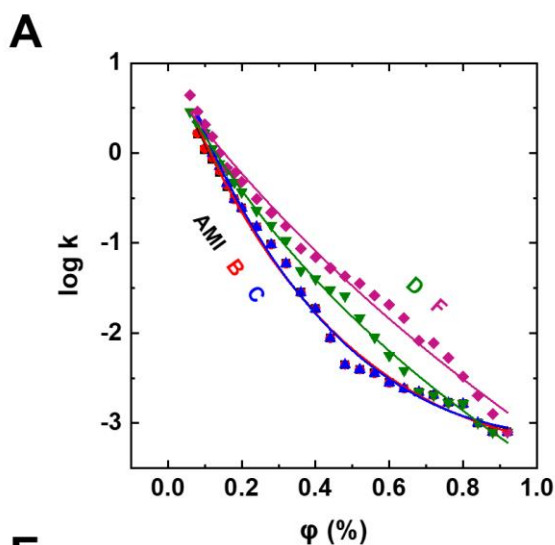
Испитивано јед. Стац. фаза	Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел					
	$\log k = a + m_{RP} \varphi - m_{HILIC} \cdot \log (1 + b \varphi)$					
	a	m_{RP}	m_{HILIC}	b	φ_{min}	R^2
Амидна стационарна фаза						
Амитриптилин HCl	1,44	18,86	58,96	1,10	0,4509	0,9895
Нечистоћа B	1,46	19,49	61,11	1,09	0,4472	0,9804
Нечистоћа C	1,35	20,49	77,18	0,86	0,4722	0,9937
Нечистоћа D	1,37	16,78	60,36	0,93	0,4861	0,9962
Нечистоћа F	1,43	16,04	59,72	0,90	0,5021	0,9938
Диолна стационарна фаза						
Амитриптилин HCl	0,66	19,41	63,14	0,99	0,4049	0,9852
Нечистоћа B	0,68	20,63	67,69	0,97	0,3981	0,9901
Нечистоћа C	0,99	20,38	60,80	1,14	0,4147	0,9951
Нечистоћа D	0,64	15,57	52,54	0,98	0,4446	0,9879
Нечистоћа F	0,77	16,26	60,30	0,89	0,4882	0,9913
Силика стационарна фаза						
Амитриптилин HCl	1,64	16,76	62,25	0,93	0,5402	0,9921
Нечистоћа B	1,67	17,01	63,18	0,93	0,5396	0,9916
Нечистоћа C	1,68	16,46	62,54	0,93	0,5714	0,9943
Нечистоћа D	1,70	15,98	61,69	0,90	0,5669	0,9964
Нечистоћа F	1,77	15,51	61,38	0,88	0,5848	0,9959

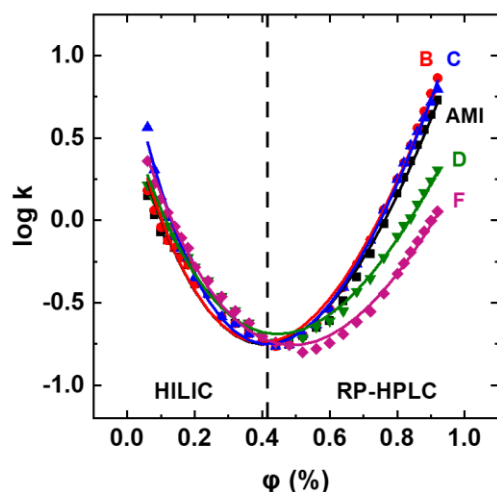
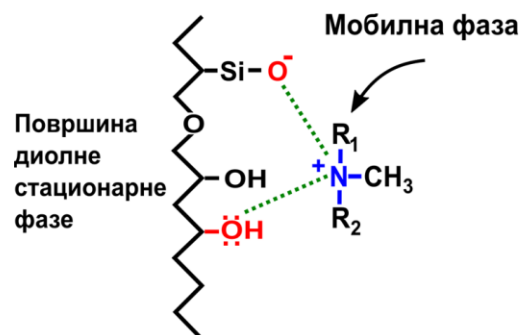
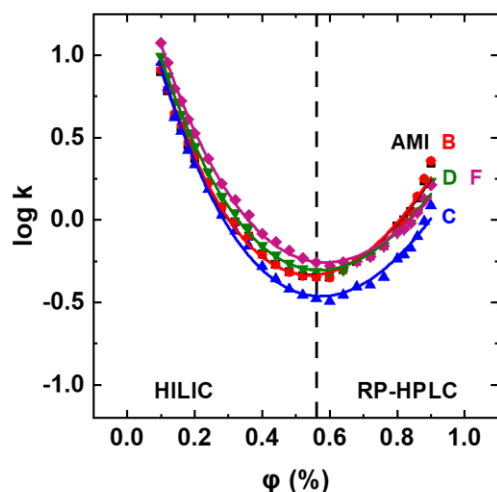
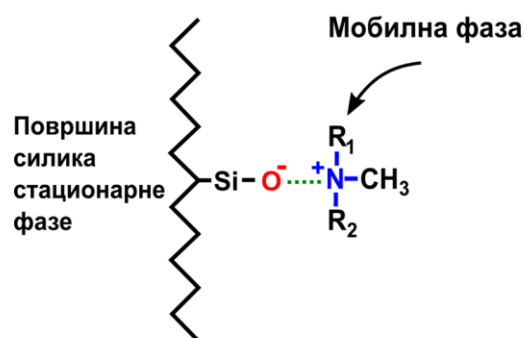
m_{RP} и m_{HILIC} – регресиони коефицијенти HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, b – коефицијент који описује задржавање при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, a – емпиријска константа, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза из HILIC у RP-HPLC механизам, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Амитриптилин-хидрохлорид и његове нечистоће у јонизованом облику имају аминопропил-дибензоануленску структуру, те показују сличне ретенционе механизме са уједначеним вриједностима параметара m_{RP} и m_{HILIC} на истој стационарној фази

(табела 7). Добијене ниже вриједности m_{RP} параметра указују да повећавање садржаја воде у мобилној фази слабије утиче на повећање задржавања због RP-HPLC механизма, него што смањује задржавање усљед HILIC механизма [130].

Експериментални подаци за амитриптилин-хидрохлорид и његове нечистоће представљени су у облику графика приказујући вриједности $\log k$ у односу на вриједности ϕ (слика 11). Због присуства двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог механизма на амидној, диолној и силика стационарној фази, добијене кривуље су облика параболе [73].



B**B₁****Г****Г₁**

Слика 11. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизми. (А) $\log k$ vs. ϕ за аминокиселину, (Б) $\log k$ vs. ϕ за амидну, (В) $\log k$ vs. ϕ за диолну и (Г) $\log k$ vs. ϕ за силика стационарну фазу, те одговарајуће интеракције између испитиваних једињења и (А₁) аминокиселине, (Б₁) амидне, (В₁) диолне и (Г₁) силика стационарне фазе. Експериментални подаци приказани су тачкама, а модел подаци линијама. АМI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В; С – нечистоћа С; D – нечистоћа D; F – нечистоћа F. HILIC – HILIC регион, RP-HPLC – RP-HPLC регион. Зелена тачкаста линија означава потенцијална мјеста везивања између јонизованих испитиваних једињења и површине стационарне фазе. R₁ и R₂ су ароматично-алифатични дијелови молекула различитих нечистоћа, чије су структурне формуле приказане на слици 7.

Графички приказ резултата који описују задржавање испитиваних једињења на силика стационарној фази (слика 11Г) почиње од највиших $\log k$ вриједности. То указује на најјаче интеракције између површине стационарне фазе и испитиваних једињења у HILIC региону, што доводи до њиховог дужег задржавања. Супротно томе, најниже $\log k$ вриједности у RP-HPLC региону указују на слабије интеракције између испитиваних једињења и површине стационарне фазе, што доводи до њиховог краћег задржавања.

Најслабије интеракције у HILIC региону биле су на диолној стационарној фази (слика 11В), јер је површина ове стационарне фазе мање хидрофилна у поређењу са амидном и

силика стационарном фазом [8]. Амидна стационарна фаза је обезбиједила најјаче задржавање испитиваних једињења у RP-HPLC региону. Површина амидне стационарне фазе је хидрофилнија од површине диолне стационарне фазе, због чега су интеракције са испитиваним једињењима јаче у поређењу са интеракцијама на диолној стационарној фази. Ове разлике последица су врсте интеракција између испитиваних једињења и површина стационарних фаза (слика 11A₁–Г₁). Између јонизованих силанолних група силика стационарне фазе и протоноване амино групе амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа В, С, D и F јављају се јаке електростатичке интеракције [8]. Диолне и амидне функционалне групе су у молекулском облику, што указује на слабије интеракције између азота амино групе испитиваних једињења и диолне/амидне функционалне групе на површинама стационарних фаза. Међутим, на амидним и диолним стационарним фазама које су кориштене у овој докторској дисертацији, није урађен „*end-capping*“, што пружа могућност формирања јонских интеракција између преосталих слободних силанолних група на површинама ових стационарних фаза и амино групе испитиваних једињења. Ово доприноси јачању интеракција испитиваних једињења са површинама кориштених стационарних фаза. Ипак, број слободних силанолних група на површинама наведених стационарних фаза је мањи него на површини немодификоване силика стационарне фазе, што доводи до слабијих интеракција на амидним и диолним стационарним фазама у поређењу са силика стационарном фазом. Присуство поларних дихидроксилних група на површини диолне стационарне фазе омогућава формирање водоничних веза [128].

Амино стационарна фаза није омогућила грађење двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих механизма, што се приписује јаким одбојним силама између позитивно наелектрисане површине стационарне фазе и испитиваних једињења у катјонском облику (слика 11A) [59]. Поред тога, двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизам није био присутан код нечистоћа А и G ни на једној од испитиваних стационарних фаза, јер нису биле јонизоване, због чега су показале готово занемарљиво задржавање [131].

Минимум на добијеним кривуљама, φ_{min} , (слика 11) представља садржај воденог дијела мобилне фазе, при коме долази до прелаза између HILIC и RP-HPLC механизма. Прелази се јављају при највећем садржају ацетонитрила на силика стационарној фази, док су најмањи садржаји ацетонитрила били потребни на диолној стационарној фази (табела 7). Вриједност φ_{min} се повећава са повећањем поларности површина стационарних фаза и хидрофилности испитиваних једињења, која показују веома слабо задржавање у

транзиционој зони мобилне фазе (мобилне фазе веома сличног састава као и мобилна фаза при којој се дешава прелаз између HILIC и RP-HPLC механизма) [72]. Подаци о $\log D$ вриједностима (степену хидрофилности испитиваних једињења при одређеним рН вриједностима) добијени су употребом софтвера *MarvinSketch*[®]. Најхидрофилније испитивано једињење је нечистоћа F ($\log D$ при рН = 4,5 је 0,08), затим нечистоћа D ($\log D$ при рН = 4,5 је 0,45), нечистоћа В ($\log D$ при рН = 4,5 је 1,12), нечистоћа С ($\log D$ при рН = 4,5 је 1,19), и амитриптилин-хидрохлорид ($\log D$ при рН = 4,5 је 1,32). Хидрофилност нечистоћа В и С је слична, због чега је пораст вриједности ϕ_{min} безначајан.

6.1.4. Квадратни ретенциони модел

Креирање квадратних ретенционих модела омогућено је на основу података који су кориштени приликом грађења двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих модела, јер и један и други модел описују ретенционо понашање при широком распону садржаја органског и воденог дијела мобилне фазе. Квадратни ретенциони модел, описан изразом (16), прилагођен је експерименталним подацима, а добијене вриједности коефицијената квадратне једначине представљене су у табели 8. Вриједности коефицијената кориштене су да се, примјеном израза (18), дефинише састав мобилне фазе, при коме је задржавање испитиваних једињења минимално (табела 8). Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису графички приказани, нити су даље разматрани (поглавље 6.1.1).

Табела 8. Коефицијенти квадратног ретенционог модела и минималне вриједности функција

Испитивано јед.	Стац. фаза	Квадратни ретенциони модел				
		$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2$				
		$\ln k_w$	S_1	S_2	φ_{min}	R^2
Амидна стационарна фаза						
Амитриптилин HCl		1,22	– 6,75	6,99	0,4828	0,9961
Нечистоћа В		1,26	– 7,01	7,34	0,4775	0,9941
Нечистоћа С		1,18	– 6,35	6,36	0,4992	0,9910
Нечистоћа D		1,18	– 5,62	5,47	0,5137	0,9880
Нечистоћа F		1,26	– 5,46	5,16	0,5291	0,9915
Диолна стационарна фаза						
Амитриптилин HCl		0,47	– 5,57	6,42	0,4338	0,9954
Нечистоћа В		0,50	– 5,74	6,74	0,4258	0,9966
Нечистоћа С		0,74	– 6,58	7,38	0,4458	0,9851
Нечистоћа D		0,50	– 5,00	5,27	0,4744	0,9941
Нечистоћа F		0,63	– 5,44	5,28	0,5152	0,9971
Силика стационарна фаза						
Амитриптилин HCl		1,45	– 6,41	5,71	0,5613	0,9967
Нечистоћа В		1,47	– 6,51	5,79	0,5623	0,9964
Нечистоћа С		1,48	– 6,69	5,67	0,5899	0,9952
Нечистоћа D		1,51	– 6,28	5,36	0,5858	0,9964
Нечистоћа F		1,59	– 6,24	5,18	0,6023	0,9969

k – ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w – екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, S_1 и S_2 регресиони коефицијенти модела, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме је задржавање испитиваних једињења минимално, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Поређењем φ_{min} вриједности двојног HILIC/RP-HPLC и квадратног ретенционог модела, уочава се постојање разлике у самим вриједностима, али се, такође, може видјети да је промјена њиховог раста или смањења иста (табеле 7 и 8). Високе вриједности коефицијената детерминације указују на то да и квадратни и двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел имају способност да опишу зависност ретенционих фактора испитиваних једињења од састава мобилне фазе. Међутим, недостатак квадратног ретенционог модела често је претјерано прилагођавање подацима (енгл. *over-fitting*), што значи да модел изузетно добро интерполира експерименталне податке, али има ограничену способност да предвиђа резултате ван испитиваног региона. У конкретном случају, слабост квадратног ретенционог модела огледа се у томе што не обезбјеђује поуздана предвиђања ретенционих фактора при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе. То значи да модел није довољно робустан да тачно процијени задржавање једињења у условима који нису директно обухваћени експерименталним

подацима. С друге стране, предност двојног HILIC/РP-HPLC ретенционог модела је у томе што параметар b директно описује интеракције испитиваних једињења са стационарном и мобилном фазом у екстремним условима – када је садржај воденог дијела мобилне фазе веома мали. Овај параметар омогућава јасније разумијевање ретенционих механизма у HILIC условима и пружа поузданију основу за предвиђање задржавања у условима који нису директно испитивани [132].

Код аминокиселина стационарне фазе изглед кривуље нема облик параболе, што указује на чињеницу да није развијен двојни HILIC/РP-HPLC ретенциони механизам те рачунање коефицијената квадратне функције нема математички смисао. Такође, подаци о ретенционим параметрима за нечистоће А и G нису графички приказани, нити су даље разматрани, јер ове нечистоће нису показале задовољавајуће ретенционо понашање.

6.1.5. Партициони и адсорпциони ретенциони модели

Након што су дефинисани HILIC и РP-HPLC региони, приступило се моделовању партиционог и адсорпционог ретенционог механизма у оба региона. Креирањем партиционих и адсорпционих теоријских ретенционих модела омогућена је процјена доприноса процеса расподеле и адсорпције у укупном ретенционом механизму испитиваних једињења.

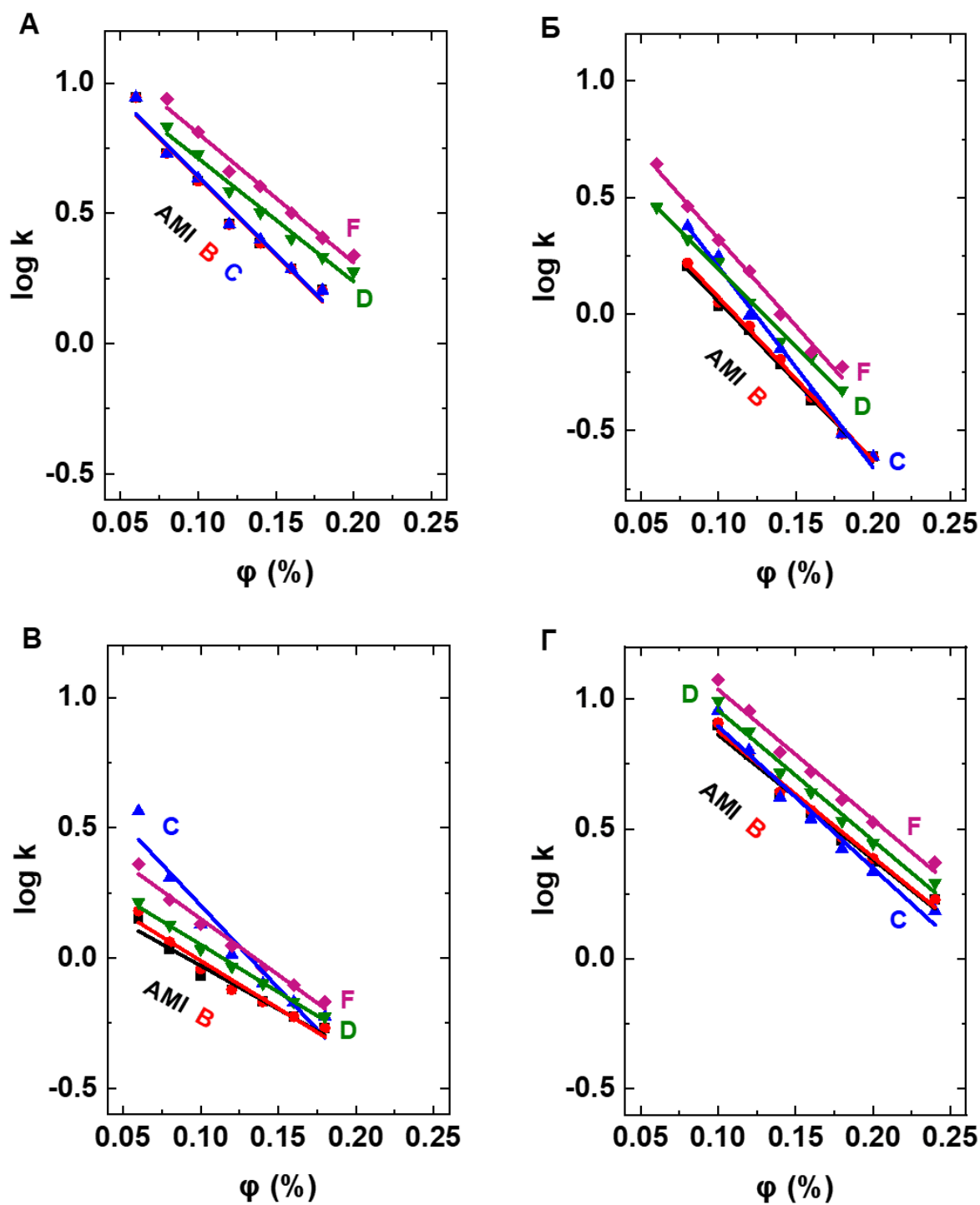
При високим садржајима ацетонитрила у мобилној фази (почетни дио двојног HILIC/РP-HPLC односно квадратног ретенционог модела) присутан је чисти HILIC механизам, док је при високим садржајима воденог раствора пуфера у мобилној фази (крајњи дио двојног HILIC/РP-HPLC односно квадратног ретенционог модела) присутан чисти РP-HPLC механизам [133]. Због тога су за овај дио истраживања кориштени експериментални подаци добијени током креирања HILIC/РP-HPLC односно квадратног ретенционог модела. Резултати добијени прилагођавањем модела описаних изразима (14) и (15) експерименталним подацима, приказани су у табелама 9 и 10.

Табела 9. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа у HILIC региону

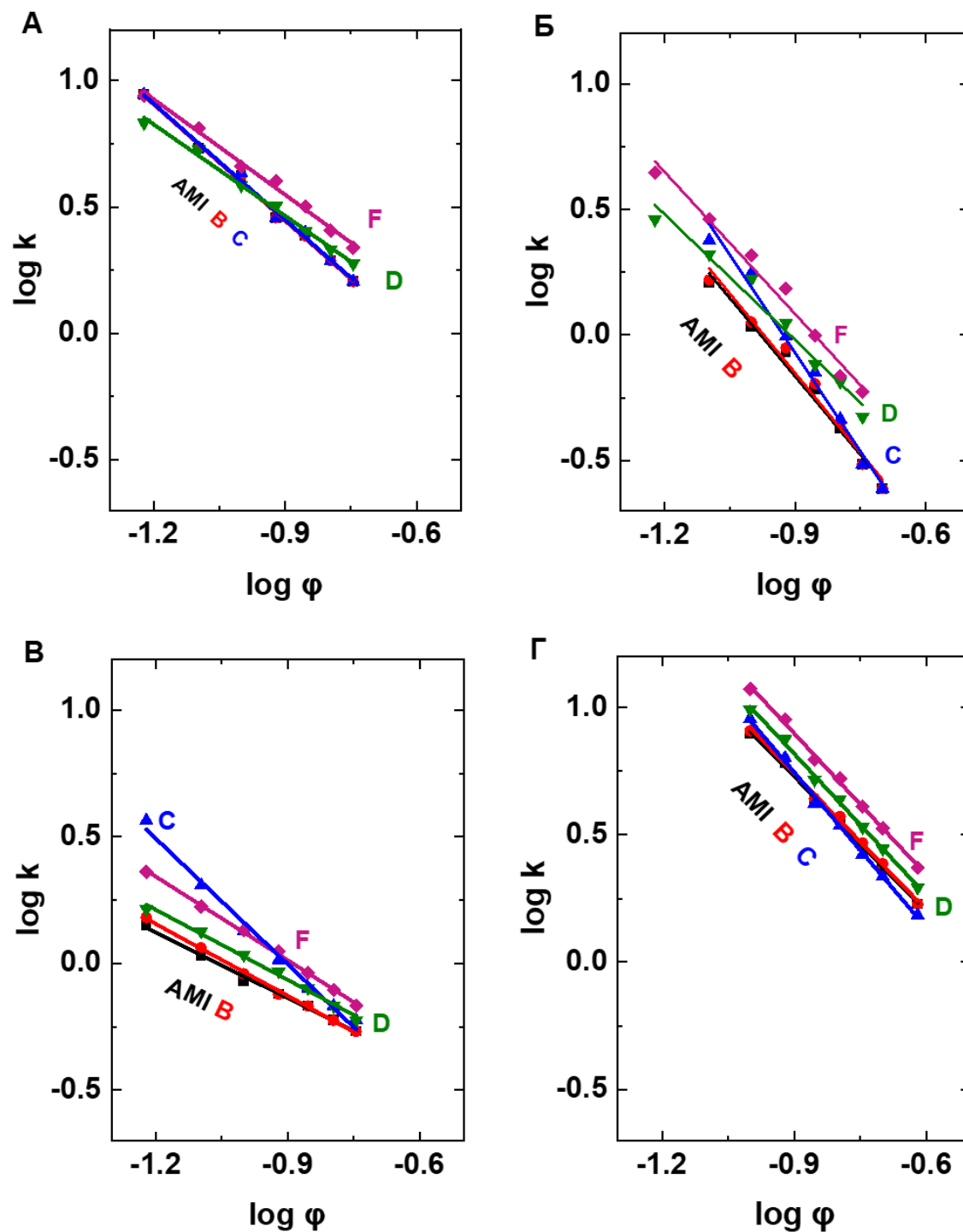
Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R ²		$\log k_0$	m	R ²
Амидна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	1,24	5,98	0,9719		– 0,94	1,54	0,9964
Нечистоћа В	1,24	5,98	0,9719		– 0,94	1,54	0,9964
Нечистоћа С	1,24	5,97	0,9730		– 0,93	1,53	0,9939
Нечистоћа D	1,18	4,73	0,9829		– 0,62	1,21	0,9947
Нечистоћа F	1,30	4,95	0,9848		– 0,59	1,26	0,9930
Амино стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	0,74	6,88	0,9965		– 2,03	2,07	0,9850
Нечистоћа В	0,77	7,01	0,9964		– 2,05	2,11	0,9800
Нечистоћа С	1,06	8,60	0,9919		– 2,41	2,60	0,9864
Нечистоћа D	0,86	6,63	0,9929		– 1,52	1,67	0,9740
Нечистоћа F	1,07	7,46	0,9916		– 1,61	1,89	0,9829
Диолна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	0,30	3,33	0,9604		– 0,91	0,86	0,9960
Нечистоћа В	0,36	3,66	0,9631		– 0,98	0,95	0,9979
Нечистоћа С	0,84	6,33	0,9375		– 1,49	1,65	0,9907
Нечистоћа D	0,42	3,64	0,9934		– 0,90	0,92	0,9931
Нечистоћа F	0,58	4,30	0,9840		– 0,98	1,10	0,9984
Силика стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	1,34	4,78	0,9837		– 0,86	1,77	0,9971
Нечистоћа В	1,36	4,84	0,9868		– 0,87	1,79	0,9967
Нечистоћа С	1,44	5,47	0,9716		– 1,09	2,04	0,9969
Нечистоћа D	1,46	5,01	0,9842		– 0,85	1,85	0,9972
Нечистоћа F	1,54	5,01	0,9844		– 0,77	1,86	0,9973

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Графички приказ ретенционог понашања испитиваних једињења, те прилагођавање паратиционих и адсорпционих ретенционих модела ретенционим подацима представљен је на сликама 12 и 13. Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G у HILIC региону нису графички приказани, нити су даље разматрани.



Слика 12. Партициони ретенциони модели у HILIC региону на (А) амидној, (Б) аминок, (В) диолној и (Д) силика стационарној фази. k – ретенциони фактор, ϕ – садржај воденог дијела мобилне фазе, AMI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, Д – нечистоћа Д, F – нечистоћа F



Слика 13. Адсорпциони ретенциони модели у HILIC региону на (А) амидној, (Б) аминок, (В) диолној и (Д) силика стационарној фази. k – ретенциони фактор, ϕ – садржај воденог дијела мобилне фазе, AMI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F

Поређењем вриједности R^2 (табела 9) може се видјети да су веће вриједности коефицијента детерминације имали адсорпциони ретенциони модели на амидној, диолној и силика стационарној фази за сва испитивана једињења. На основу тога, може се закључити да су ови ретенциони модели успјешнији у апроксимацији добијених ретенционих података у испитиваном распону вриједности садржаја воденог дијела мобилне фазе у HILIC региону.

На силика стационарној фази, до адсорпције долази због јонских интеракција између јонизованих силанолних група (које носе негативно наелектрисање) и протонованих амино група у молекулима испитиваних једињења (које носе позитивно наелектрисање) [27, 123]. Амидне и диолне функционалне групе налазиле су се у молекулском облику, што сугерише да адсорпција на овим стационарним фазама настаје услед постојања нејонских интеракција: водоничних веза, јон-дипол интеракција и других типова нејонских интеракција. Ипак, на површини ових стационарних фаза налази се и мањи број слободних силанолних група (поглавље 6.1.3). То значи да адсорпција на овим стационарним фазама потиче и од јонске интеракције између испитиваних једињења и јонизованих силанолних група на површини амидне и диолне стационарне фазе [22, 24]. Иако је током ове фазе истраживања концентрација пуфера одржавана на константном нивоу, промјена садржаја воденог дијела мобилне фазе довела је до тога да концентрација пуфера у мобилној фази ипак буде промјенљива. Имајући у виду да процес адсорпције може бити посљедица јонских и нејонских интеракција, те да се концентрација пуфера у мобилној фази мијењала, остаје нејасно у којој мјери је процес адсорпције био посљедица јонских, а у којој мјери нејонских интеракција.

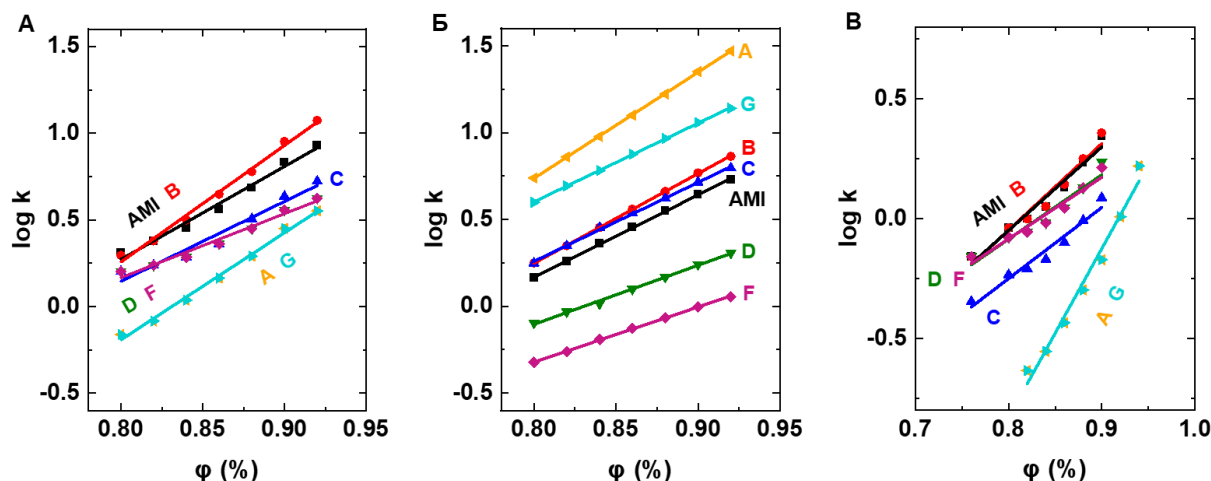
С друге стране, коефицијенти детерминације партиционог ретенционог модела били су већи само на амино стационарној фази, за сва испитивана једињења у HILIC региону, из чега се може закључити да је партициони ретенциони модел успјешнији у апроксимацији података на овој стационарној фази (табела 9, слике 12 и 13). Овакав исход је и очекиван, имајући у виду присуство исте врсте наелектрисања и испитиваних једињења и површине амино стационарне фазе. На овај начин, електростатички спријечена адсорпција, омогућила је да механизам расподеле буде доминантан на овој стационарној фази [128, 134].

Табела 10. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа у RP-HPLC региону

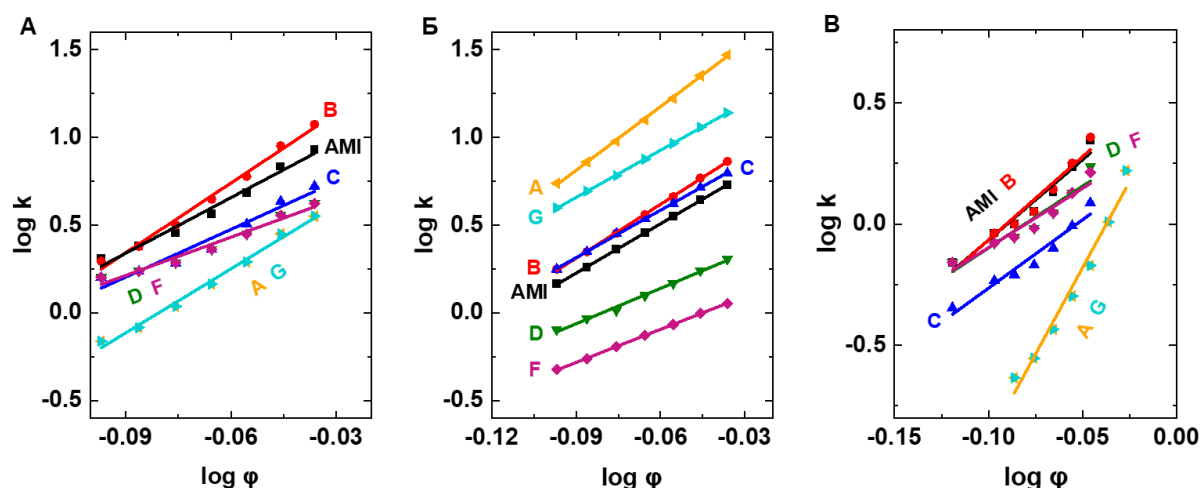
Испитивано јед.	Стац. фаза	Ретенциони модели						
		Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$			Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$			
		$\log k_0$	m	R ²		$\log k_0$	m	R ²
Амидна стационарна фаза								
Амитриптилин HCl		− 4,02	− 5,36	0,9860		1,29	− 10,58	0,9815
Нечистоћа А		− 5,13	− 6,17	0,9942		0,98	− 12,20	0,9916
Нечистоћа В		− 5,12	− 6,72	0,9935		1,54	− 13,26	0,9905
Нечистоћа С		− 3,54	− 4,61	0,9583		1,02	− 9,08	0,9509
Нечистоћа D		− 2,79	− 3,69	0,9769		0,87	− 7,28	0,9711
Нечистоћа F		− 2,79	− 3,69	0,9769		0,87	− 7,28	0,9711
Нечистоћа G		− 5,13	− 6,17	0,9942		0,98	− 12,20	0,9916
Диолна стационарна фаза								
Амитриптилин HCl		− 3,62	− 4,73	0,9995		1,07	− 9,36	0,9999
Нечистоћа А		− 4,15	− 6,11	0,9999		1,90	− 12,08	0,9991
Нечистоћа В		− 3,88	− 5,16	0,9998		1,23	− 10,21	0,9996
Нечистоћа С		− 3,38	− 4,54	0,9984		1,12	− 8,99	0,9994
Нечистоћа D		− 2,82	− 3,40	0,9967		0,54	− 6,72	0,9948
Нечистоћа F		− 2,86	− 3,17	0,9995		0,28	− 6,27	0,9998
Нечистоћа G		− 3,02	− 4,52	0,9997		1,47	− 8,96	0,9998
Силика стационарна фаза								
Амитриптилин HCl		− 2,84	− 3,49	0,9660		0,60	− 6,62	0,9567
Нечистоћа А		− 6,48	− 7,06	0,9807		0,53	− 14,24	0,9750
Нечистоћа В		− 2,94	− 3,61	0,9643		0,62	− 6,86	0,9546
Нечистоћа С		− 2,62	− 2,97	0,9609		0,30	− 5,64	0,9515
Нечистоћа D		− 2,23	− 2,68	0,9333		0,41	− 5,08	0,9203
Нечистоћа F		− 2,14	− 2,58	0,9491		0,39	− 4,89	0,9376
Нечистоћа G		− 6,47	− 7,06	0,9807		0,53	− 14,24	0,9750

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Графички приказ ретенционог понашања испитиваних једињења, те прилагођавање паратиционих и адсорпционих ретенционих модела ретенционим подацима представљен је на сликама 14 и 15.



Слика 14. Партициони ретенциони модели у RP-HPLC региону на (A) амидној, (Б) диолној и (В) силика стационарној фази. k – ретенциони фактор, ϕ – садржај воденог дијела мобилне фазе, А – нечистоћа А, АМI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F, G – нечистоћа G



Слика 15. Адсорпциони ретенциони модели у RP-HPLC региону на (A) амидној, (Б) диолној и (В) силика стационарној фази. k – ретенциони фактор, ϕ – садржај воденог дијела мобилне фазе, А – нечистоћа А, АМI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F, G – нечистоћа G

Анализа вриједности R^2 у RP-HPLC региону (табела 10) говори у прилог томе да су на ретенциони механизам свих испитиваних једињења, на свим стационарним фазама, значајан утицај имали и механизми расподеле и механизми адсорпције. У већем броју случајева незнатно веће вриједности R^2 обезбјеђивали су партициони ретенциони модели, али сличне вриједности коефицијената детерминације оба ретенциона модела онемогућавају стриктно идентификовање доминантног ретенционог механизма. Ако се има у виду изузетна сложеност HILIC система, овакви резултати нису изненађујући, јер је у ретенционе механизме обично укључено више процеса [129, 130]. Међутим, значајна

разлика RP-HPLC региона у односу на HILIC регион јесте то што су нечистоће А и G показале задовољавајуће ретенционо понашање (слике 14 и 15). Разлог томе је што су, под примијењеним хроматографским условима, нечистоће А и G биле у молекулском облику. Овај облик показује боље задржавање и већи афинитет ка испитиваним стационарним фазама у случајевима кад је мобилна фаза богата водом, какве су мобилне фазе у RP-HPLC региону [58].

6.1.6. Катјонско-измјењивачки ретенциони модели

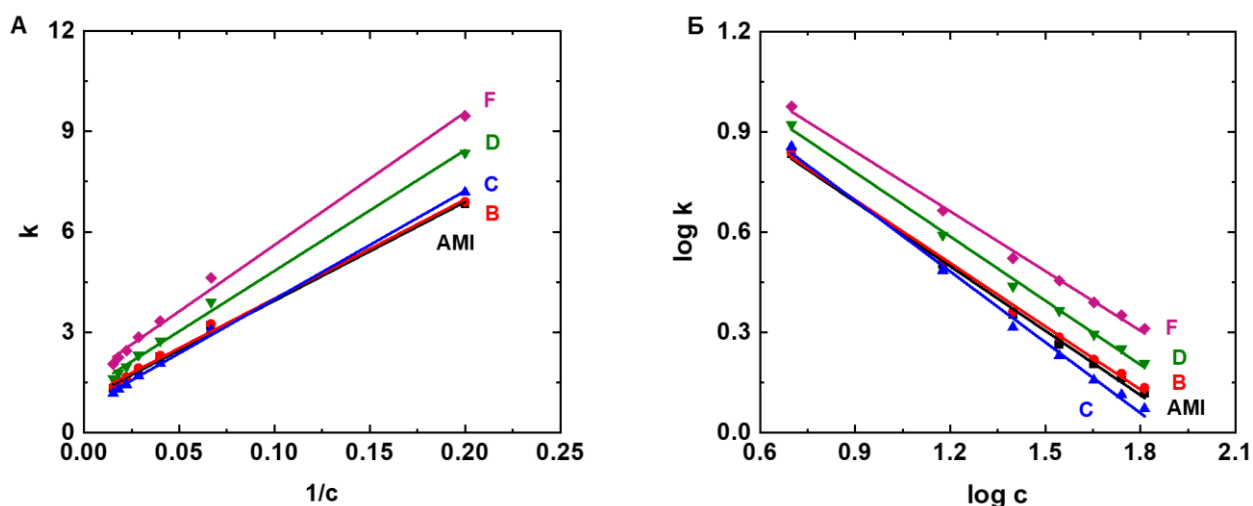
Промјена концентрације пуфера доводи до промјене у вриједностима ретенционих фактора базних једињења на силика стационарној фази, што је утврђено још током прелиминарних истраживања. Разлог томе је чињеница да различите концентрације пуфера (амонијум-ацетат) обезбјеђују различите количине NH_4^+ и CH_3COO^- јона. Ови јони могу реаговати са јонизованим силанолним групама на површини силика стационарне фазе, што доводи до промјене у дужини задржавања испитиваних једињења на стационарној фази [36]. Катјонско-измјењивачки ретенциони модели, описани изразима (25) и (26), прилагођени су вриједностима ретенционих фактора које су добијене варирањем концентрације пуфера од 5 mmol L^{-1} до 65 mmol L^{-1} . Коефицијенти катјонско-измјењивачких ретенционих модела базних испитиваних једињења на силика стационарној фази приказани су у табели 11.

Табела 11. Коефицијенти катјонско-измјењивачких ретенционих модела базних испитиваних једињења на силика стационарној фази

Испитивано једињење	Катјонско-измјењивачки ретенциони модели						
	$k = m (1/[c]) + a$				$\log k = m \log [c] + a$		
	a	m	R^2		a	m	R^2
Амитриптилин HCl	0,99	29,52	0,9960		1,27	– 0,64	0,9969
Нечистоћа В	1,04	29,63	0,9960		1,26	– 0,63	0,9970
Нечистоћа С	0,75	32,36	0,9988		1,33	– 0,71	0,9954
Нечистоћа D	1,22	36,10	0,9962		1,35	– 0,64	0,9970
Нечистоћа F	1,64	39,63	0,9951		1,38	– 0,60	0,9962

Амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид, k – ретенциони фактор испитиваног једињења; m – нагиб линеарног модела; $[c]$ – концентрација пуфера; a – одсјечак линеарног модела.

Граички приказ успостављених катјонско-измјењивачких ретенционих модела представљен је на слици 16. Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису графички приказани.



Слика 16. Графички приказ успостављених катјонско-измјењивачких ретенционих модела. k – ретенциони фактор, c – концентрација пуфера (mmol L^{-1}), AMI – амитриптилин-хидрохлорид, B – нечистоћа B, C – нечистоћа C, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F

Високе вриједности коефицијената детерминације ($R^2 > 0,9950$) указују на значајан допринос процеса катјонске измјене у укупном ретенционом механизму базних испитиваних једињења (табела 11). Ипак, како регресиона права на графикону (слика 16) не пролази кроз координатни почетак, може се претпоставити да је на силика стационарној фази у укупни ретенциони механизам ових једињења укључен још неки процес. Поред тога, вриједности нагиба логаритамских модела (m) приказане у табели 11 различите су од -1 (крећу се у распону од $-0,60$ до $-0,71$) што потврђује овај закључак [76].

С друге стране, механизам катјонске измјене није био присутан код неутралних испитиваних једињења. Ово није изненађујуће с обзиром на то да нечистоћа А (кетон) не може да јонизује. Слично томе, нечистоћа G (слаба киселина) се под примијењеним хроматографским условима налазила у свом молекулском облику, због чега није имала могућност успостављања електростатичких интеракција са јонизованим силанолним групама на површини силика стационарне фазе.

Базна испитивана једињења показују дуже задржавање на силика стационарној фази при мањим концентрацијама пуфера. Ово се објашњава конкуренцијом између јонизованих испитиваних једињења и јона пуфера за мјеста везивања на површини стационарне фазе. Мања концентрација пуфера доводи до мањег броја јона пуфера који се „такмиче“ са јонима испитиваних једињења за везивна мјеста на површини силика стационарне фазе, што за резултат има дуже задржавање испитиваних једињења на стационарној фази. Насупрот томе, веће концентрације пуфера обезбјеђују већу количину јона пуфера, што

доводи до „затварања“ већег броја везивних мјеста на површини стационарне фазе. То за последицу има скраћење времена задржавања испитиваних једињења [16, 135, 136].

6.1.7. Анјонско-измјењивачки ретенциони модели

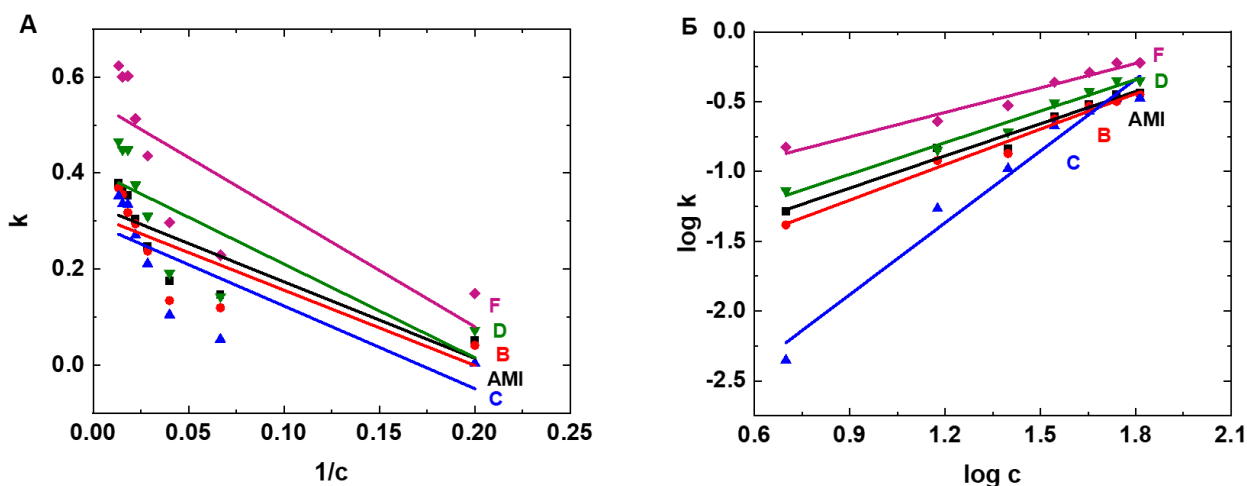
Позитивно наелектрисана површина аминокиселина стационарне фазе омогућава задржавање киселих испитиваних једињења механизмом анјонске измјене. Међутим, у литератури до сада нису пронађени подаци о испитивању доприноса процеса анјонске измјене у укупном ретенционом механизму базних испитиваних једињења. Због тога је, у овом дијелу докторске дисертације, варирањем концентрације пуфера од 5 mmol L⁻¹ до 65 mmol L⁻¹, испитано учешће механизма анјонске измјене у укупном ретенционом механизму базних испитиваних једињења (амитриптилин хидрохлорид и његове нечистоће В, С, D и F) на аминокиселиној стационарној фази. Анјонско-измјењивачки ретенциони модели, описаним изразима (25) и (26), прилагођени су ретенционим факторима испитиваних једињења. Коефицијенти анјонско-измјењивачких ретенционих модела базних испитиваних једињења на аминокиселиној стационарној фази приказани су у табели 12.

Табела 12. Коефицијенти анјонско-измјењивачких ретенционих модела базних испитиваних једињења на аминокиселиној стационарној фази

Испитивано једињење	Анјонско-измјењивачки ретенциони модели					
	$k = m (1/[c]) + a$			$\log k = m \log [c] + a$		
	a	m	R^2	a	m	R^2
Амитриптилин HCl	0,33	- 1,60	0,7149	- 1,81	0,77	0,9687
Нечистоћа В	0,31	- 1,57	0,6556	- 1,97	0,85	0,9803
Нечистоћа С	0,30	- 1,72	0,6172	- 3,43	1,71	0,9724
Нечистоћа D	0,40	- 1,95	0,6361	- 1,70	0,75	0,9795
Нечистоћа F	0,55	- 2,35	0,6375	-1,28	0,59	0,9656

Амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид, k – ретенциони фактор испитиваног једињења; m – нагиб линеарног модела; $[c]$ – концентрација пуфера; a – одсјечак линеарног модела

Графички приказ успостављених катјонско-измјењивачких ретенционих модела представљен је на слици 17. Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису графички приказани.



Слика 17. Графички приказ успостављених анјонско-измјењивачких ретенционих модела. k – ретенциони фактор, ϕ – садржај воденог дијела мобилне фазе, А – нечистоћа А, АМI – амитриптилин-хидрохлорид, В – нечистоћа В, С – нечистоћа С, D – нечистоћа D, F – нечистоћа F, G – нечистоћа G

Између протонисаних амино група на површини амино стационарне фазе и испитиваних једињења постоје јаке електростатичке одбојне силе (слика 11A). Мање концентрације пуфера не обезбјеђују довољну количину јона потребну да „неутралише“ протонисане амино групе на површини стационарне фазе, што доводи до бржег елуирања испитиваних једињења. Веће концентрације пуфера обезбјеђују више јона пуфера (анјона) који реагују са протонисаним обликом амино група на површини стационарне фазе. На овај начин, повлачећи за собом воду, формирају дебљи водени слој који доприноси задржавању испитиваних једињења на стационарној фази [127, 137]. С обзиром да регресиона права на графикону (слика 17) не пролази кроз координатни почетак, а ни нагиби логаритамских модела приказани у табели 12 нису једнаки – 1, јасно је да ретенциони механизми базних испитиваних једињења на амино стационарној фази не зависе само од процеса анјонске измјене. Ово додатно учвршћује чињеницу да је у HPLC региону на амино стационарној фази доминантан процес расподеле, а база испитивана једињења се дуже задржавају са повећањем концентрације пуфера [129].

Упоредјујући вриједности коефицијената детерминације катјонско-измјењивачких и анјонско-измјењивачких ретенционих модела, јасно је да модел катјонске измјене значајније доприноси укупном ретенционом механизму базних испитиваних једињења на силика стационарној фази, него што је то случај са механизмом анјонске измјене на амино стационарној фази (табеле 11 и 12). Међутим, релативно високе вриједности коефицијената детерминације логаритамског модела анјонске измјене ($R^2 > 0,965$) указују на то да овај механизам има важну улогу у ретенционом механизму базних испитиваних једињења на амино стационарној фази (табела 12).

Како су амидне и диолне функционалне групе присутне у свом молекулском облику, а на њиховим површинама се налази релативно мали број слободних силанолних група, процеси катјонске измјене знатно су слабије заступљени, него код силика стационарне фазе. Због тога испитивање њиховог доприноса на овим стационарним фазама није спроведено. Из истог разлога, на овим стационарним фазама није испитиван нити утицај рН вриједности воденог дијела мобилне фазе на ретенционо понашање.

6.1.8. Експериментални ретенциони модели креирани уз помоћ хеометријског приступа на силика стационарној фази

У прелиминарној фази истраживања утврђено је да састав мобилне фазе значајно утиче на ретенционо понашање базних испитиваних једињења на силика стационарној фази. За квантитативну процјену тог утицаја, као и за испитивање утицаја међуфакторских интеракција, примијењен је хеометријски приступ. Овај приступ омогућио је креирање експерименталних ретенционих модела и прецизну статистичку и графичку интерпретацију добијених података.

Експериментални ретенциони модели креирани су примјеном експерименталног дизајна (DoE) и методологије површине одговора (RSM). За креирање сета експеримената и статистичку обраду података одабран је Бокс-Бенкен дизајн, који омогућава испитивање утицаја фактора на три нивоа. Дизајн је допуњен са пет понављања у централној тачки, чиме је обезбијеђена поуздана процјена статистичких параметара модела. План експеримената, са одговарајућим вриједностима испитиваних фактора, приказан је у табели 1 (поглавље 4.2.3.5). Након изведених експеримената, са добијених хроматограма очитана су ретенциона времена базних испитиваних једињења, а примјеном израза (7) израчунати су ретенциони фактори (табели 13).

Табела 13. Експериментално добијене вриједности ретенционих фактора базних испитиваних једињења на силика стационарној фази

No	k (АМИ)	k (неч.В)	k (неч.С)	k (неч.Д)	k (неч.Е)
1	2,484	2,528	2,218	3,199	4,045
2	5,341	5,434	6,679	7,422	8,972
3	1,140	1,165	1,012	1,345	1,655
4	2,860	2,948	2,670	3,440	4,245
5	1,106	1,124	1,005	1,257	1,495
6	3,065	3,137	2,812	3,492	4,212
7	2,163	2,844	2,037	2,679	3,219
8	4,476	4,545	4,936	5,779	6,711
9	2,520	2,571	2,279	2,951	3,603
10	1,796	1,232	1,353	1,928	2,108
11	4,446	4,474	5,089	6,310	7,443
12	2,010	2,079	1,908	2,491	3,132
13	2,274	2,332	2,077	2,686	3,248
14	2,311	2,361	2,114	2,747	3,320
15	2,150	2,190	2,049	2,446	3,103
16	2,242	2,290	2,150	2,643	3,198
17	2,214	2,257	2,020	2,598	3,137

No – Редни број експеримента (*standard order*), k (АМИ) – ретенциони фактор амитриптилин-хидрохлорида, k (неч. В) – ретенциони фактор нечистоће В, k (неч. С) – ретенциони фактор нечистоће С; k (неч. Д) – ретенциони фактор нечистоће Д, k (неч. Е) – ретенциони фактор нечистоће Е

Примјеном полинома другог реда (израз 13), извршена је статистичка процјена утицаја фактора (састав мобилне фазе) на праћене одговоре система (ретенционе факторе). Затим, је примјеном ANOVA извршена процјена адекватности добијених ретенционих модела, при чему су као релевантни статистички параметри кориштене вриједности R^2 , $Adj R^2$ и $Pred R^2$. Коефицијенти креираних ретенционих модела, заједно са њиховом статистичком значајношћу и другим релевантним статистичким параметрима, приказани су у табели 14.

Табела 14. Резултати ANOVA теста – коефицијенти креираних математичких модела и њихова статистичка анализа

Коеф.	k_(АМИ)		k_(неч. В)		k_(неч. С)		k_(неч. D)		k_(неч. F)	
	в. коеф.	<i>p</i> вријед.	в. коеф.	<i>p</i> вријед.	в. коеф.	<i>p</i> вријед.	в. коеф.	<i>p</i> вријед.	в. коеф.	<i>p</i> вријед.
b ₀	2,2400	–	2,2900	–	2,0800	–	2,6200	–	3,2000	–
b ₁	1,1100	< 0,0001*	1,0500	< 0,0001*	1,3500	< 0,0001*	1,4600	< 0,0001*	1,7200	< 0,0001*
b ₂	– 0,8731	< 0,0001*	– 0,9479	< 0,0001*	– 1,1700	< 0,0001*	– 1,3300	< 0,0001*	– 1,6200	< 0,0001*
b ₃	0,5760	< 0,0001*	0,7348	< 0,0001*	0,8151	< 0,0001*	0,9539	< 0,0001*	1,1400	< 0,0001*
b ₁₂	– 0,2842	0,0018*	– 0,2807	0,0071*	– 0,7007	0,0007*	– 0,5320	0,0014*	– 0,5843	0,0034*
b ₁₃	0,0885	0,1731	0,0780	0,3310	0,2730	0,0608	0,2162	0,0757	0,1938	0,1943
b ₂₃	– 0,4280	0,0002*	– 0,2640	0,0095*	– 0,5638	0,0025*	– 0,6990	0,0003*	– 0,7040	0,0012*
b ₁₁	0,3638	0,0004*	0,5281	0,0002*	0,5511	0,0024*	0,5546	0,0009*	0,6829	0,0013*
b ₂₂	0,3543	0,0004*	0,2046	0,0261*	0,5113	0,0036*	0,6729	0,0003*	0,8451	0,0004*
b ₃₃	0,1005	0,1204	0,0984	0,2186	0,0640	0,6081	0,1231	0,2630	0,0252	0,8538
R ²	0,9955		0,9931		0,9888		0,9934		0,9920	
Adj R ²	0,9896		0,9842		0,9744		0,9849		0,9818	
Pred R ²	0,9375		0,9008		0,8246		0,9105		0,8793	

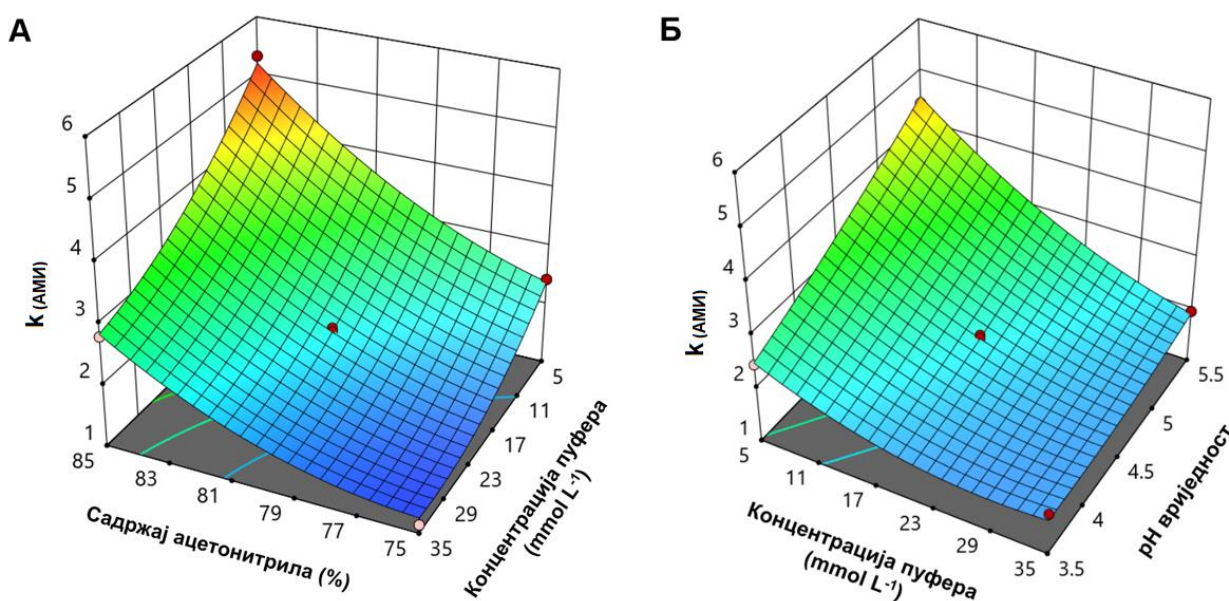
Коеф. – коефицијент модела, в. коеф. – вриједност коефицијента, *p* вријед. – *p* вриједност, b₀ – одсјечак модела, b₁, b₂, b₃ – регресиони коефицијенти линеарних чланова (1 – садржај ацетонитрила [%]; 2 – концентрација пуфера [mmol L⁻¹]; 3 – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе), b₁₂, b₁₃, b₂₃ – регресиони коефицијенти факторских интеракција, b₁₁, b₂₂, b₃₃ – регресиони коефицијенти квадратних чланова, k_(АМИ) – ретенциони фактор амитриптилин-хидрохлорида, k_(неч. В) – ретенциони фактор нечистоће В, k_(неч. С) – ретенциони фактор нечистоће С; k_(неч. D) – ретенциони фактор нечистоће D, k_(неч. F) – ретенциони фактор нечистоће F, R² – коефицијент детерминације, Adj R² – Adjusted R², Pred R² – Predicted R²

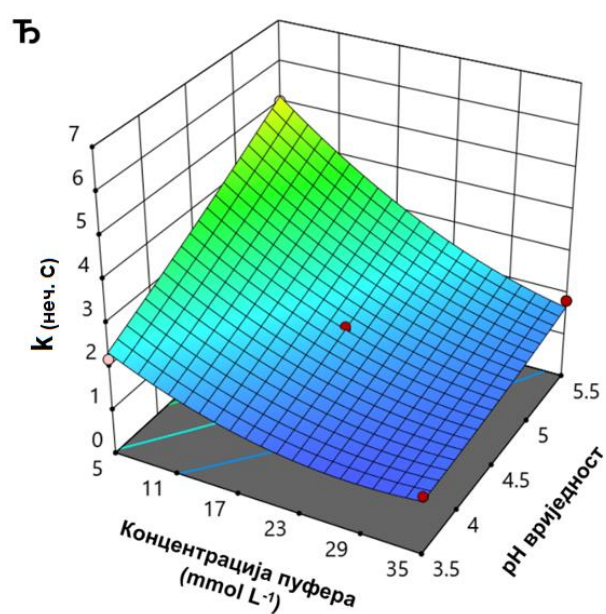
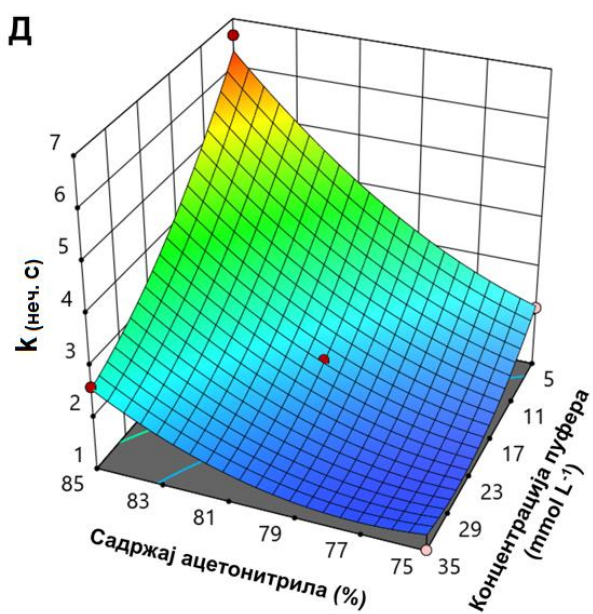
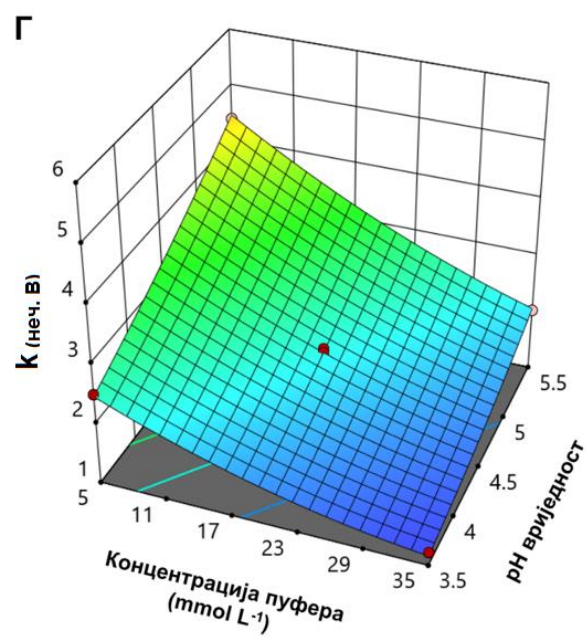
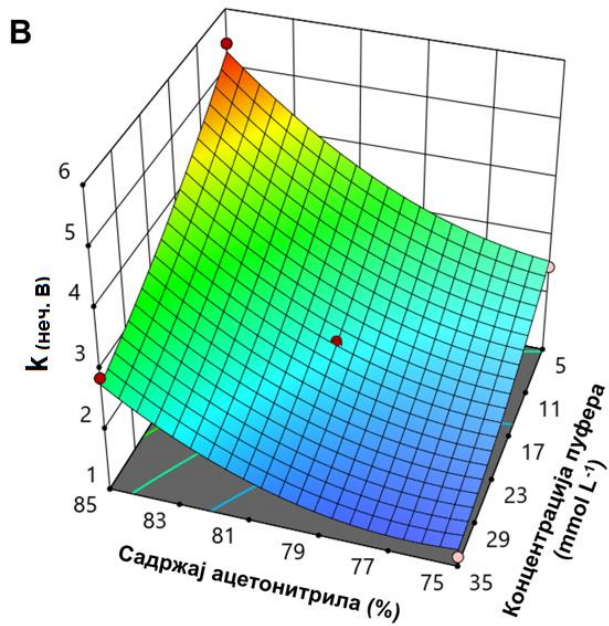
* Статистички значајни коефицијенти за *p* вриједност ≤ 0,05

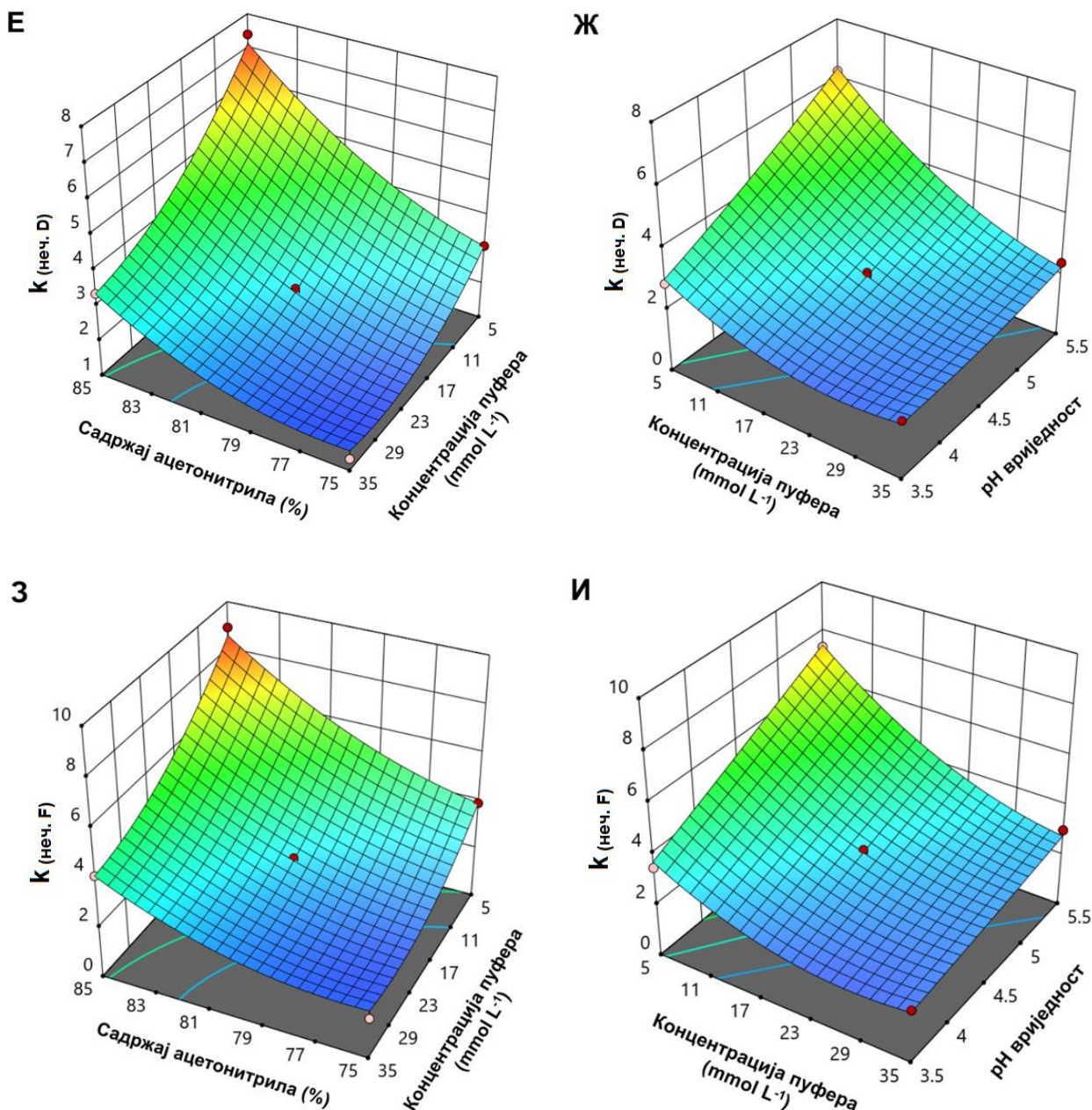
Изузетно високе вриједности R^2 , $Adj R^2$ и $Pred R^2$ потврђују адекватност креираних ретенционих модела и њихове добре предиктивне способности (табела 14). Статистички значајни регресиони коефицијенти (p вриједност $\leq 0,05$) кориштени су за креирање коначних ретенционих модела базних испитиваних једињења. С друге стране, неутрална испитивана једињења (нечистоће А и G) нису показала задовољавајуће ретенционо понашање, те нису могла да се узму у даље разматрање.

6.1.8.1. Дефинисање факторских утицаја на ретенционо понашање испитиваних једињења

Утицај појединачних фактора и двофакторских интеракција на ретенционо понашање базних испитиваних једињења на силика стационарној фази дефинисан је на основу статистичке процјене значајности креираних математичких модела (табела 14). Из добијених резултата може се видјети да на ретенционо понашање испитиваних једињења значајан утицај имају сви појединачни фактори мобилне фазе (садржај ацетонитрила, концентрација пуфера и pH вриједности воденог дијела мобилне фазе). Такође, постоје и значајне двофакторске интеракције, и то: садржај ацетонитрила/концентрација пуфера, те концентрација пуфера/pH вриједност воденог дијела мобилне фазе. На слици 18 двофакторске интеракције представљене су у виду тродимензионалних површина одговора (3D-графикон).







Слика 18. 3D-графикони површине одговора. (А) $k_{(AMI)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (Б) $k_{(AMI)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вредност воденог дијела мобилне фазе})$, (В) $k_{(неч. В)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (Г) $k_{(неч. В)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вредност воденог дијела мобилне фазе})$, (Д) $k_{(неч. С)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (Ђ) $k_{(неч. С)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вредност воденог дијела мобилне фазе})$, (Е) $k_{(неч. D)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (Ж) $k_{(неч. D)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вредност воденог дијела мобилне фазе})$, (З) $k_{(неч. F)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (И) $k_{(неч. F)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вредност воденог дијела мобилне фазе})$, pH вредност – pH вредност воденог дијела мобилне фазе

Анализом статистички значајних коефицијената и њихових предзнака утврђено је да се задржавање базних испитиваних једињења повећава са повећањем садржаја

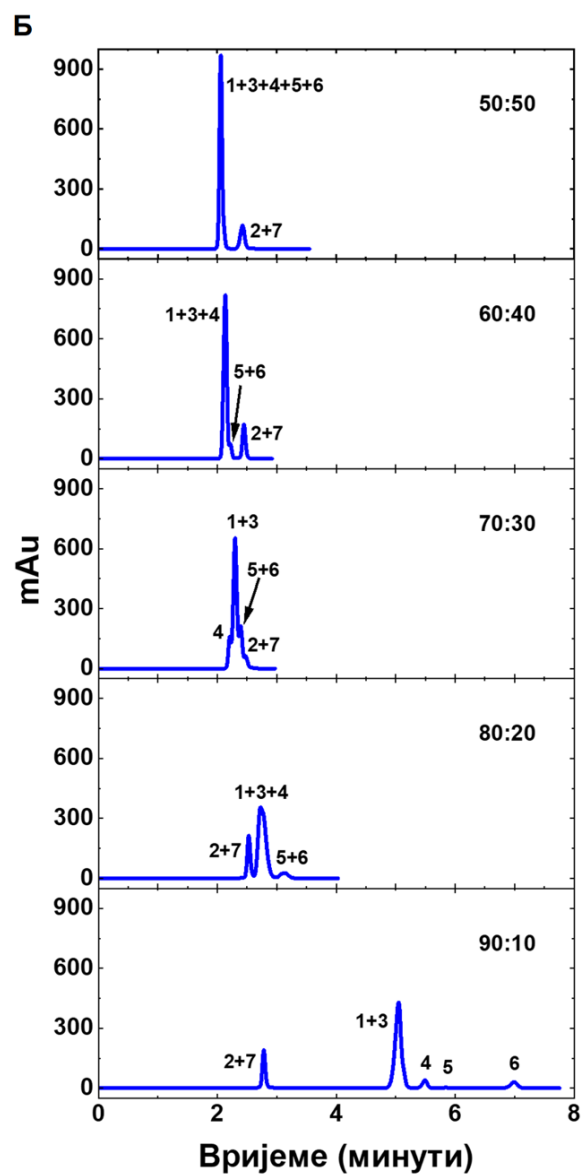
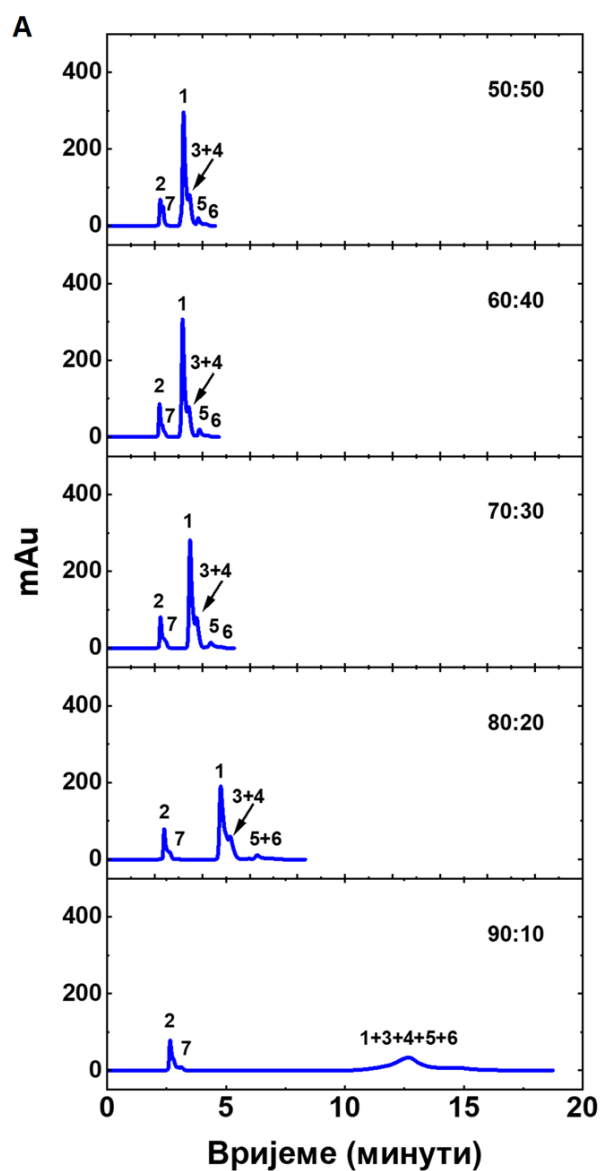
ацетонитрила у мобилној фази – линеарни b_1 , као и квадратни b_{11} коефицијенти су статистички значајни и позитивни. Вриједност коефицијента b_1 расте са порастом поларности испитиваних једињења, што значи да садржај ацетонитрила има највећи утицај на ретенционо понашање најполарнијег испитиваног једињења (нечистоћа F). Негативан предзнак испред коефицијента b_2 указује на то да се задржавање свих базних испитиваних једињења повећава са смањењем јонске јачине пуфера. Позитивне вриједности b_3 коефицијента показују да се задржавање свих базних испитиваних једињења на силика стационарној фази повећава са порастом рН вриједности воденог дијела мобилне фазе. Како садржај ацетонитрила, тако и концентрација пуфера и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе имају најјаче ефекте на ретенционо понашање најхидрофилнијег испитиваног једињења (нечистоћа F), јер су апсолутне вриједности одговарајућих коефицијената највеће за наведене параметре (табела 14). Поређењем апсолутних вриједности коефицијената b_1 , b_2 и b_3 може се видјети да, за свако испитивано једињење, највеће вриједности има коефицијент b_1 , потом слиједи коефицијент b_2 и на самом крају коефицијент b_3 . Из овога се може закључити да на ретенционо понашање испитиваних једињења највећи утицај има управо садржај ацетонитрила, потом концентрација пуфера и на крају рН вриједност воденог дијела мобилне фазе [22]. Детаљно објашњење ових ефеката описано је приликом процјене утицаја садржаја ацетонитрила кроз различите ретенционе моделе (двојни HILIC/RP-HPLC, партициони и адсорпциони), те приликом процјене утицаја концентрације пуфера (јоноизмјењивачки ретенциони модели) и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (поглавља 6.1.3 – 6.1.7).

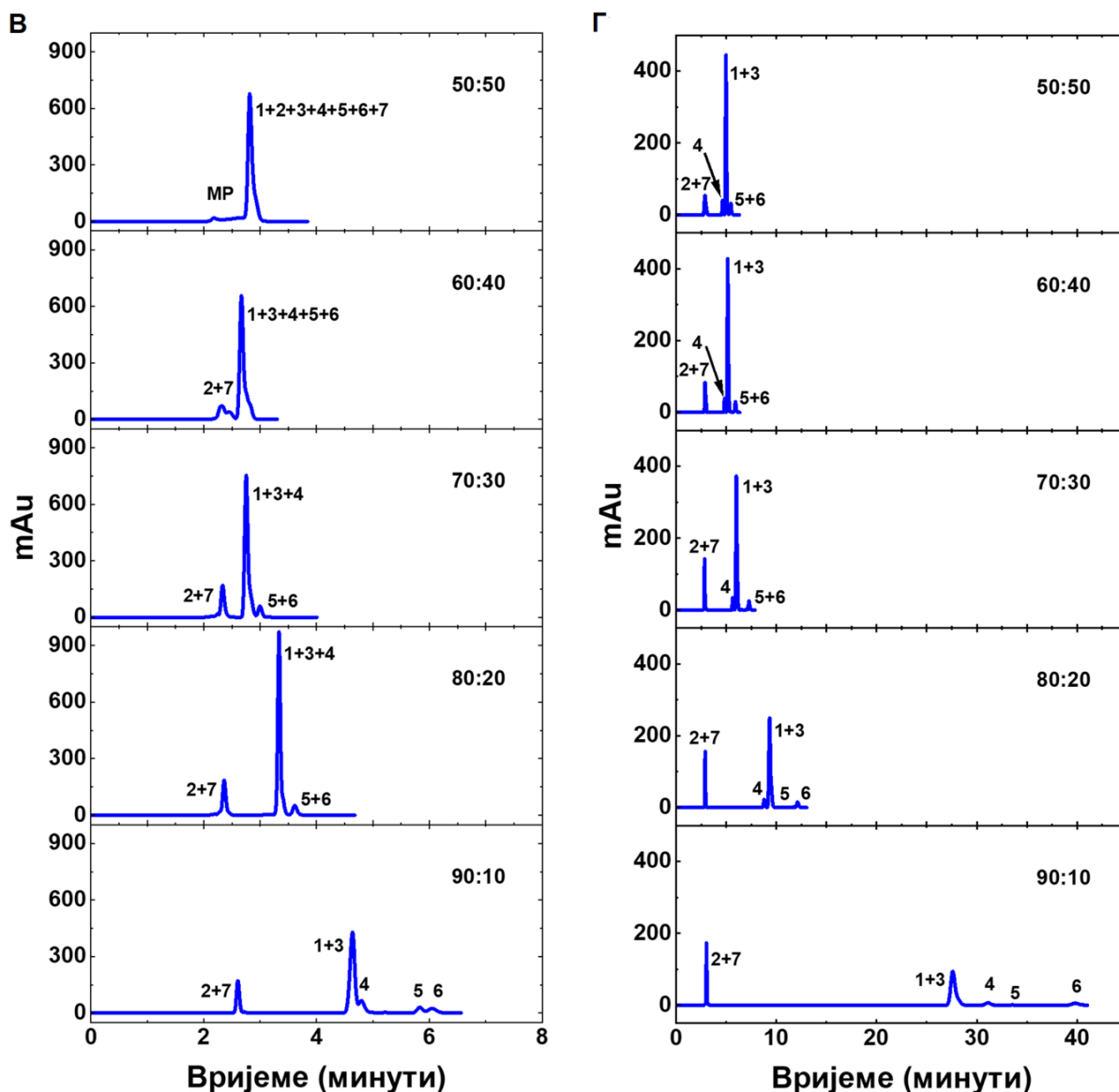
Ефекти факторских интеракција процијењени су на основу статистичких (табела 14) и графичких модела (слика 18). Анализом коефицијената факторских интеракција и графичких приказа (3D-графикони) може се закључити да се базна испитивана једињења дуж задржавају на силика стационарној фази када се у исто вријеме повећа садржај ацетонитрила, а смањи концентрација пуфера (негативан и статистички значајан коефицијент b_{12}). Такође, до оваквих ефеката долази и приликом истовременог смањења концентрације пуфера и повећања рН вриједности мобилне фазе (негативан и статистички значајан коефицијент b_{23}). Квантитативни допринос ових интеракција на задржавање испитиваних једињења доста је сличан, што се види из апсолутних вриједности коефицијената чланова који описују дате интеракције (b_{12} и b_{23} , табела 14).

Статистичка значајност квадратних чланова указује на то да промјена вриједности одговарајућег фактора (повећање или смањење) доводи до нелинеарне промјене ретенционог понашања. Наиме, позитиван и статистички значајан коефицијент b_{11} показује да повећање садржаја ацетонитрила доводи до нелинеарног пораста задржавања испитиваних једињења, што је карактеристично за HILIC системе. Статистичка значајност позитивног b_{22} коефицијента указује на велики допринос јонске измјене у укупном задржавању базних испитиваних једињења на силика стационарној фази. Овај ефекат је потврђен и креирањем катјонско-измјењивачких ретенционих модела (поглавље 6.1.6). Статистички значај квадратних термина b_{11} и b_{22} огледа се и у конвексном облику функција приказаних на 3D-графиконима (слика 18) [138, 139].

6.1.9. Утицај врсте стационарне фазе и физичко-хемијских особина испитиваних једињења на ретенционо понашање

У претходним фазама истраживања, на различитим HILIC стационарним фазама, дефинисан је утицај састава мобилне фазе на ретенционо понашање неутралних и базних испитиваних једињења. Том приликом добијени су важни подаци који описују ретенционо понашање испитиваних једињења – поређење ретенционог понашања неутралних и базних испитиваних једињења на различитим стационарним фазама под истим хроматографским условима. Добијени хроматограми анализирани смјеше неутралних и базних испитиваних једињења приказани су на слици 19.





Слика 19. Хроматограми анализираних смјеше базних и неутралних испитиваних једињења на (А) амидној, (Б) аминок, (В) диолној и (Г) силика стационарној фази добијени при садржају ацетонитрила од 50 %, 60 %, 70 %, 80 % и 90 %, уз константне вриједности концентрације пуфера (20 mmol L⁻¹ за амидну, диолну и силика, те 60 mmol L⁻¹ за аминок стационарну фазу) и pH вриједности воденог дијела мобилне фазе (4,50). Хроматографски пикови испитиваних једињења означени су са: 1 – амитриптилин-хидрохлорид, 2 – нечистоћа А, 3 – нечистоћа В, 4 – нечистоћа С, 5 – нечистоћа D, 6 – нечистоћа F и 7 – нечистоћа G, MP – мобилна фаза

У HILIC условима, задржавање испитиваних једињења се повећава са порастом њихове поларности [25, 43, 140]. За процјену поларности испитиваних једињења користе се молекулски дескриптори $\log P$ и $\log D$. Партициони коефицијент ($\log P$) представља мјеру липофилности испитиваних једињења. Најчешће се изражава као логаритам односа растворљивости у *n*-октанолу и води. При томе, вриједности веће од 1,0 указују на липофилни карактер једињења, а вриједности мање од 1,0 на израженију хидрофилност једињења. Међутим, $\log P$ представља константну вриједност за нејонизовани (молекулски) облик испитиваног једињења, не узимајући у обзир ефекте

промјене рН вриједности средине у којој се једињење налази. С друге стране, дистрибуциони коефицијент ($\log D$) узима у обзир рН вриједност средине, те се ова вриједност мијења са промјеном рН вриједности – услед промјене рН вриједности мијења се концентрација јонизованог и молекулског облика испитиваног једињења. То је веома значајно, јер разлике у поларности молекулског и јонизованог облика могу бити велике, чак при малим промјенама рН вриједности [141]. Због веће прецизности у погледу тумачења резултата, у условима промјене рН вриједности мобилне фазе, $\log D$ је кориштен за дефинисање утицаја физичко-хемијских особина једињења на њихово ретенционо понашање. Како је у поглављу 6.1.3. наведено, при рН 4,5 најхидрофилније испитивано једињење је нечистоћа F ($\log D = 0,08$), затим нечистоћа D ($\log D = 0,45$), нечистоћа B ($\log D = 1,12$), нечистоћа C ($\log D = 1,19$), и амитриптилин-хидрохлорид ($\log D = 1,32$).

При мањим садржајима ацетонитрила у мобилној фази, базна испитивана једињења су елуирала прва са амино стационарне фазе, због присуства исте врсте наелектрисања између испитиваних једињења и површине стационарне фазе (слика 19). Истоимена наелектрисања доводе до појаве одбојних електростатичких сила, што је разлог кратког задржавања базних испитиваних једињења на амино стационарној фази (поглавља 6.1.3. и 6.1.7). Са повећањем садржаја ацетонитрила, редослијед елуирања испитиваних једињења се мијења, у зависности од њихове хидрофилности. Прво елуирају нечистоће А и G (јер су биле присутне у нејонизованом, молекулском облику) , а затим базна испитивана једињења. Од базних испитиваних једињења, посљедња елуира нечистоћа F јер је најхидрофилнија, што потврђује и њена најмања вриједност $\log D$ (0,08). Промјена садржаја ацетонитрила у HILIC систему модификује дебљину воденог слоја који се формира на површини стационарне фазе, што је и узрок промјене редослиједа елуирања испитиваних једињења [3, 13]. У случају амидне, диолне и силика стационарне фазе, нејонизоване нечистоће А и G су елуирале прве при свим односима органског и воденог дијела мобилне фазе (јер су биле присутне у молекулском облику). Након њих, базна испитивана једињења су елуирала са повећањем хидрофилности (поглавље 6.1.3), што је у складу са литературним подацима [140].

У току испитивања ретенционих параметара, вријеме задржавања испитиваних једињења, као и укупно вријеме трајања анализе, било је најкраће при употреби амино стационарне фазе. Међутим, задржавање се прогресивно продужавало на диолној,

амидној и, најизраженије, на силика стационарној фази (слика 19). Упркос најдужем трајању анализе, силика стационарна фаза је обезбиједила најбоље раздвајање испитиваних једињења из смјеше, захваљујући снажним електростатичким интеракцијама између испитиваних једињења и површине стационарне фазе која је богата силанолним групама.

Ови резултати јасно указују на то да задржавање испитиваних једињења у HILIC систему, поред хроматографских карактеристика, зависи и од физичко-хемијских особина, тј. поларности испитиваних једињења. Такође, ретенционо понашање последица је присуства јонизованих функционалних група, врсте наелектрисања, способности грађења електростатичких интеракција те врсте и карактеристика самих стационарних фаза [139].

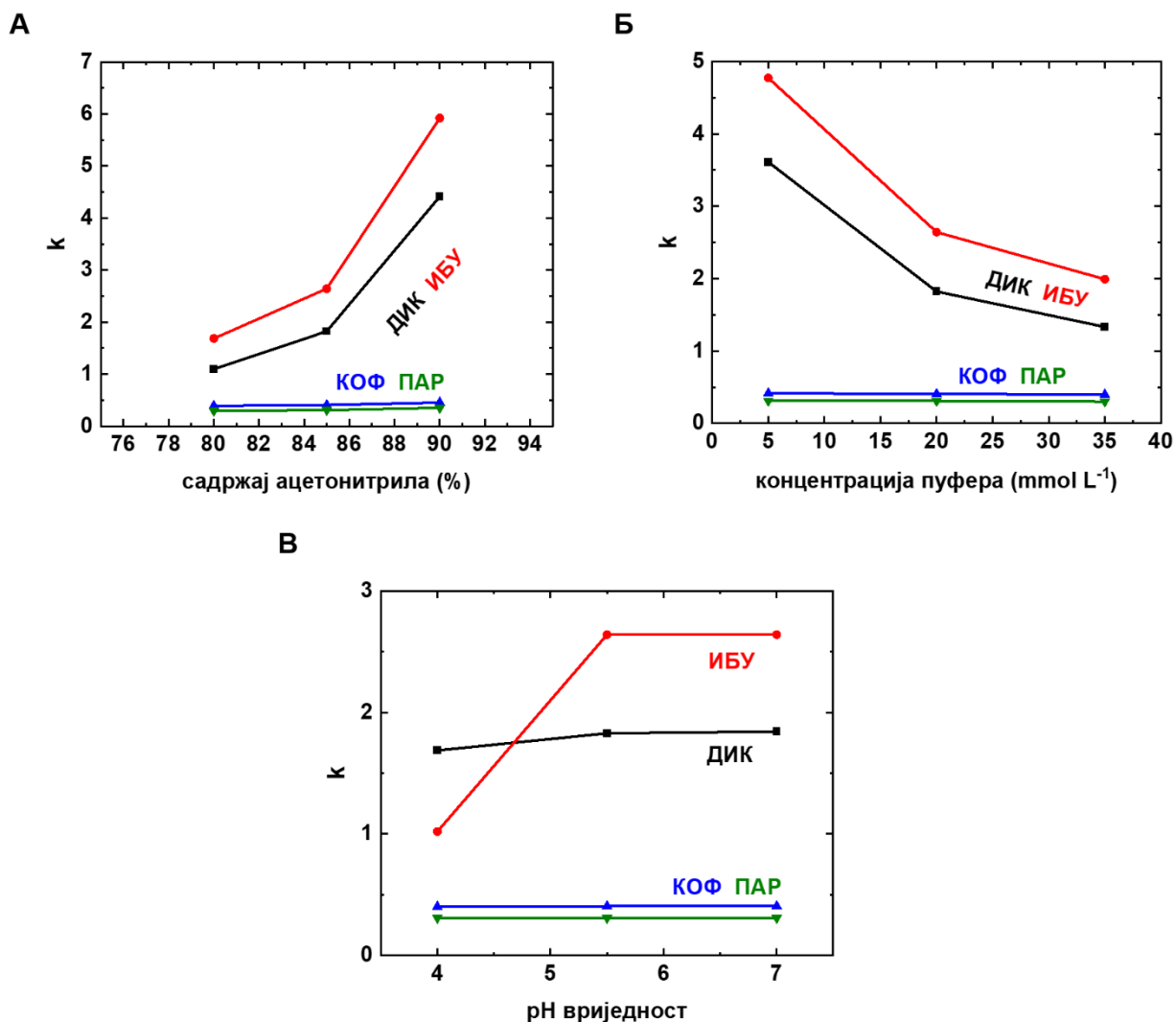
6.2. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА ДИКЛОФЕНАК-КАЛИЈУМА, ИБУПРОФЕНА, КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Будући да су лијекови слабе базе или слабе киселине, равнотежа јонизованог и нејонизованог облика у воденим растворима од значаја је за понашање лијека у организму. Нејонизовани облик лијека пролази кроз липидне мембране, док је јонизовани облик растворљивији (анјонски облик лијека се веже за протеине плазме, док се катјонски облик лијека веже за нуклеинске киселине). Јонизација лијека утиче на растворљивост и хидрофилност. С обзиром на то да је већина лијекова слабо базног карактера, истраживања су углавном била усмјерена на испитивање њихових ретенционих механизма. Међутим, литературни подаци о ретенционим механизмима лијекова који су слабе киселине веома су оскудни. Осим тога, једињења киселог карактера немају изражен афинитет ка, најчешће кориштеној, силика стационарној фази, што доприноси малом броју истраживања на ову тему. Међутим, при распону рН вриједности кориштених у HILIC системима, површина амино стационарне фазе је позитивно наелектрисана, што погодује анализи киселих једињења. Поред тога, ова стационарна фаза пружа могућност анјонске измјене, те омогућава процјену доприноса анјонско-измјењивачког механизма [23, 25]. С друге стране, неутрална испитивана једињења немају могућност грађења јонских интеракција, те се очекује да овај механизам нема утицај на њихово задржавање нити на амино, нити на силика стационарној фази. Како су диклофенак-калијум и ибупрофен киселог, а кофеин и парацетамол неутралног карактера под испитиваним хроматографским условима, ова смјеша ће омогућити процјену утицаја јонских и нејонских интеракција које су од значаја за ретенционо понашање испитиваних једињења. Примјена амидне и диолне стационарне фазе, које не омогућавају значајан допринос јонских интеракција, пружиће увид у ретенционе механизме киселих и неутралних једињења на различитим HILIC стационарним фазама. Грађење теоријских и експерименталних ретенционих модела, те процјена утицаја структурних особина испитиваних једињења на ретенционо понашање на наведеним стационарним фазама, омогућиће детаљну анализу ретенционих механизма испитиваних једињења у HILIC систему.

6.2.1. Прелиминарна фаза истраживања

У оквиру ове фазе, извођењем низа експеримената извршена је уводна процјена утицаја различитих фактора на ретенционо понашање испитиваних једињења. Током истраживања, фактори хроматографског система који су имали предвидив утицај на ретенционо понашање, одржавани су на константном нивоу: температура стационарне фазе (20 °C), брзина протока мобилне фазе (1 mL min⁻¹) и запремина инјектовања (10 µL). Таласна дужина детекције одређена је снимањем спектра анализираних једињења, с циљем да се пронађе вриједност која је најприближнија апсорпционом максимуму свих испитиваних једињења. Најприхватљивији резултати постигнути су при таласној дужини детекције 225 nm, те је ова вриједност одабрана за даља истраживања наведене смјеше једињења.

Примјеном OFAT приступа, испитан је утицај састава мобилне фазе: рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, садржај органског растварача (ацетонитрил) и концентрација пуфера, који имају најснажнији утицај на ретенционо понашање испитиваних једињења. На основу добијених резултата, конструисани су графикони који илуструју зависност ретенционих фактора испитиваних једињења и појединачних фактора мобилне фазе на амино стационарној фази (слика 20).



Слика 20. Зависност ретенционих фактора диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола на аминок стационарној фази од: (А) садржаја ацетонитрила (рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 7,00, концентрација пуфера (амонијум-ацетат) 20 mmol L^{-1}), (Б) концентрације пуфера (садржај ацетонитрила 85 %, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 7,00), (В) рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (садржај ацетонитрила 85 %, концентрација пуфера 20 mmol L^{-1}). ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, ПАР – парацетамол, КОФ – кофеин, рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе

Вриједности ретенционих фактора свих испитиваних једињења повећавају се са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази (слика 20). Ипак, уочљиво је да овај фактор има многоструко јачи ефекат на кисела, него на неутрална испитивана једињења, код којих је пораст ретенционог фактора минималан, што је детаљно објашњено у поглављу 6.2.3. [65].

Промјена концентрације пуфера није значајно утицала на ретенционе механизме неутралних једињења, јер ова једињења немају могућност формирања јонских интеракција са површином стационарне фазе. С друге стране, ретенциони фактор

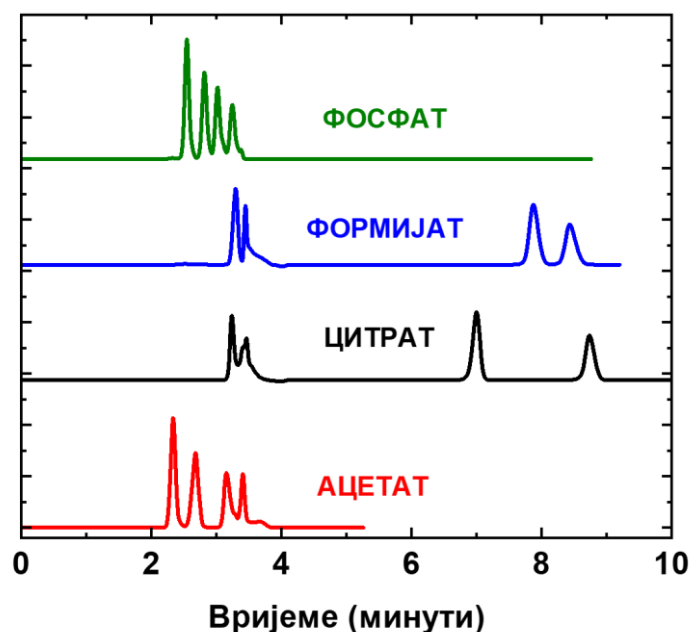
киселих испитиваних једињења опадао је са порастом концентрације пуфера (слика 20), што је детаљно објашњено у поглављу 6.2.2 [36].

Промјена рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (4,00 – 7,00) није показала значајан утицај на ретенционо понашање неутралних испитиваних једињења. Код киселих испитиваних једињења иницијално повећање рН вриједности (4,00 – 5,00) довело је до пораста ретенционог фактора. Овај ефекат достиже свој максимум при рН вриједности око 5,50 након чега даље повећање рН вриједности није изазвало значајне промјене ретенционих фактора. Додатно, са слике 20 се може видјети да је наведени ефекат много израженији у случају ибупрофена у односу на диклофенак-калијум. Може се претпоставити да је узрок томе разлика у јонизацији ових једињења, што доводи до различитих интеракција са у потпуности јонизованом површином амино стационарне фазе (при рН вриједности 2,00 – 8,00). То значи да је на њеној површини, при константној концентрацији пуфера, увијек доступна иста количина слободних везивних мјеста. С друге стране, на површини силика стационарне фазе са порастом рН вриједности расте број јонизованих силанолних група. Због тога, ова стационарна фаза омогућава различито ретенционо понашање испитиваних једињења. Имајући у виду ове разлике, очекивано је да је ефекат рН вриједности на амино стационарној фази знатно слабији у односу на силика стационарну фазу [62, 142]. Разлике које постоје између утицаја рН вриједности воденог дијела мобилне фазе на ретенционо понашање диклофенак-калијума и ибупрофена највјероватније су посљедица постојећих разлика у кисело-базним особинама ових молекула. Наиме, pK_a вриједност диклофенак-калијума је 4,15 а ибупрофена 4,91, док је утицај рН вриједности испитиван у распону од 4,00 до 7,00. Дакле, како рН вриједност воденог дијела мобилне фазе расте изнад pK_a вриједности испитиваног једињења, степен јонизације једињења се повећава. То доводи до остваривања јачих електростатичких интеракција са површином стационарне фазе, што за посљедицу има продужено задржавање на стационарној фази. Како је pK_a вриједност диклофенак-калијума блиска почетној тачки испитиваног распона, то он веома брзо постаје 90 % јонизован (већ при рН вриједности 5,15) . Даљи пораст рН вриједности има све мањи утицај на стапен јонизације и задржавање диклофенак-калијума на стационарној фази. С друге стране, pK_a вриједност ибупрофена од 4,91 указује да је на почетку испитиваног рН распона ово једињење у значајној мјери нејонизовано, а тек при рН вриједности 5,91 проценат јонизације је 90 %. Управо због тога се у распону рН вриједности од 4,00 до 6,00 ретенционо понашање ибупрофена

драстично мијења (продужава се задржавање на стационарној фази, као посљедица формирања јачих електростатичких интеракција са протонованим аминок групама на њеној површини) [62].

6.2.2. Испитивање утицаја врсте пуферског система на ретенционо понашање

Анализа киселих и базних једињења кориштењем HILIC стационарних фаза захтијева употребу мобилних фаза са одређеним садржајем пуфера, при чему врста пуфера има значајан утицај на ретенционо понашање испитиваних једињења [34, 35, 62]. У циљу одабира најпогоднијег пуфера, тестирана су четири пуферска система: ацетатни (амонијум-ацетат и амонијум-хидроксид), формијатни (амонијум-формијат и амонијум-хидроксид), фосфатни (калијум-дихидрогенфосфат, дикалијум-хидрогенфосфат и калијум-хидроксид) и цитратни (натријум-цитрат и натријум-хидроксид). Током овог истраживања, преостали фактори мобилне фазе одржавани су на константном нивоу: садржај ацетонитрила 80 %, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 7,00 и концентрација пуфера 20 mmol L⁻¹. Хроматограми добијени под наведеним условима на аминок стационарној фази, приказани су на слици 21.



Слика 21. Утицај врсте пуферског система на ретенционо понашање испитиваних једињења. Фосфат – фосфатни пуфер, формијат – формијатни пуфер, цитрат – цитратни пуфер, ацетат – ацетатни пуфер

Из добијених хроматограма може се видјети да врста пуфера значајно утиче на ретенционо понашање испитиваних једињења (слика 21). Употребом формијатног и

цитратног пуфера хроматографска анализа имала је најдуже вријеме трајања. С друге стране, цитратни пуфер није обезбиједио адекватну репродуктивност резултата, што је детаљно описано у поглављу 6.1.2. Фосфатни пуфер обезбиједио је најбоље резултате у погледу симетрије свих хроматографских пикова и трајања анализе. Међутим, резултати добијени употребом овог пуферског система нису били репродуктивни, јер при високим садржајима ацетонитрила (и уопштено органских растварача) у мобилној фази долази до таложења соли овог пуфера (поглавље 6.1.2). Због свега наведеног за даља истраживања ретенционих модела, али и развој нове HILIC методе, изабран је ацетатни пуфер. Уједно, ово је и најчешће примјењиван пуфер у HILIC систему. Ацетатни пуфер обезбиједио је задовољавајућу поновљивост резултата у кратком времену трајања анализе. Такође, са повећањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази није показивао знакове преципитације и обезбјеђивао је одличну резолуцију између хроматографских пикова [6].

6.2.3. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел

Имајући у виду да кисела испитивана једињења остварују снажне интеракције са површином амино стационарне фазе, очекивало се да, у широком распону односа воденог и органског дијела мобилне фазе, ретенционо понашање буде описано двојним HILIC/RP-HPLC механизмом. Такође, како су амидна и диолна стационарна фаза за базна испитивана једињења омогућиле грађење двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих модела, исто се очекивало и за кисела испитивана једињења. С друге стране, ова појава није била присутна код неутралних испитивана једињења при претходно примијењеним условима анализе (поглавље 6.1). Због тога, циљ ове фазе истраживања био је анализа присуства двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих модела, који су дефинисани изразом (21) за кисела и неутрална испитивана једињења на амидној, амино и диолној стационарној фази. У ту сврху, садржај ацетонитрила вариран је у широком распону – од 4 % до 96 %, док су остали фактори мобилне фазе одржавани на константном нивоу (поглавље 4.3.3.2). Примјеном нелинеарне регресионе анализе, двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел прилагођен је експериментално добијеним подацима. Након што су добијене вриједности регресионих коефицијената, на основу израза (22) израчунати су минимуми одговарајућих функција (ϕ_{min}). Добијени резултати (коефицијенти ретенционог модела, коефицијенти детерминације и вриједности ϕ_{min}) приказани су у табели 15.

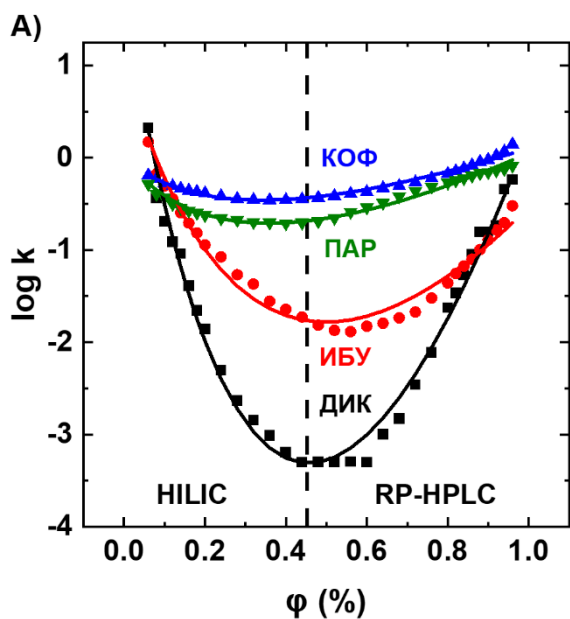
Табела 15. Коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела и минималне вриједности функција

Испитивано јед.	Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел					
	$\log k = a + m_{RP} \varphi - m_{HILIC} \cdot \log (1 + b \varphi)$					
	<i>a</i>	<i>m_{RP}</i>	<i>m_{HILIC}</i>	<i>b</i>	φ_{min}	<i>R</i> ²
<i>Амидна стационарна фаза</i>						
Диклофенак К	1,80	31,91	71,47	1,94	0,4564	0,9921
Ибупрофен	1,01	12,10	24,95	2,52	0,4988	0,9842
Кофеин	0,01	2,46	3,08	4,90	0,3390	0,9895
Парацетамол	0,00	3,69	5,03	4,28	0,3587	0,9897
<i>Амино стационарна фаза</i>						
Диклофенак К	1,82	4,16	5,09	9,10	0,4215	0,9842
Ибупрофен	1,77	3,38	4,71	7,88	0,4790	0,9888
Кофеин	0,00	2,74	5,07	3,03	0,4724	0,9990
Парацетамол	0,00	3,12	4,23	4,58	0,3701	0,9982
<i>Диолна стационарна фаза</i>						
Диклофенак К	0,75	15,61	34,56	1,73	0,3830	0,9968
Ибупрофен	0,81	7,81	10,70	5,01	0,3948	0,9610
Кофеин	0,11	3,82	5,42	4,42	0,3890	0,9917
Парацетамол	0,11	3,86	4,37	5,95	0,3229	0,9976

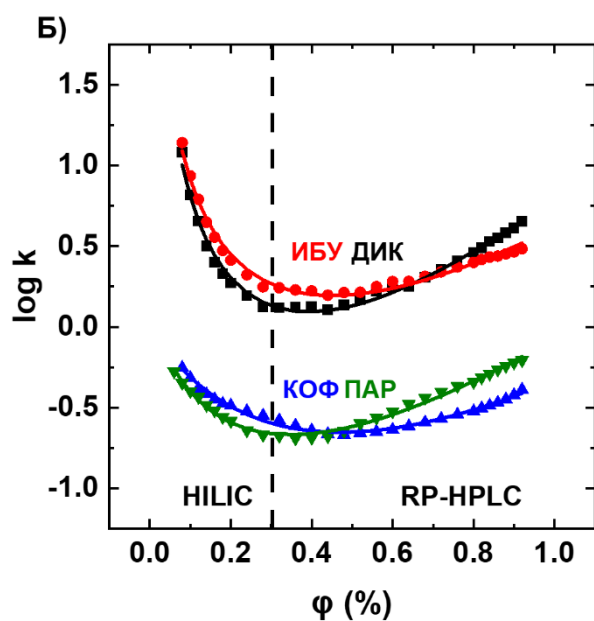
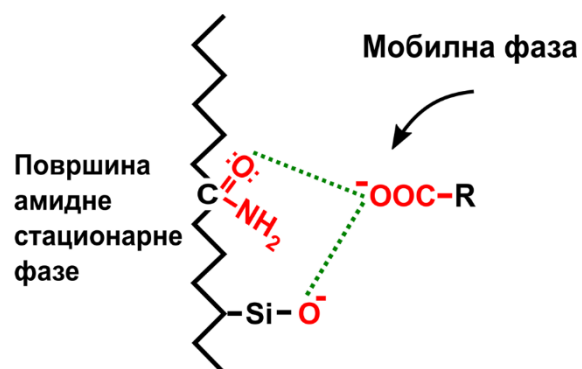
m_{RP} и m_{HILIC} – регресиони коефицијенти HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, b – коефицијент који описује задржавање при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, a – емпијска константа, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза из HILIC у RP-HPLC ретенциони механизам, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

С обзиром да HILIC и RP-HPLC механизми имају различит ефекат на задржавање испитиваних једињења, потребно је нагласити да задржавање хидрофилних испитиваних једињења у HILIC региону опада са порастом садржаја воденог дијела мобилне фазе, док у RP-HPLC региону расте – присутна су два супротна ефекта. Мање вриједности m_{RP} параметра (табела 15) указују да код RP-HPLC механизма повећање садржаја воде у мобилној фази има мањи ефекат на јачину задржавања испитиваних једињења, него што смањује њихово задржавање услед HILIC механизма. Веће вриједности m_{HILIC} параметара, које су посебно изражене код јонизованих једињења на неутралним стационарним фазама (диолна и амидна), указују на већи допринос HILIC ретенционог механизма, у односу на RP-HPLC механизам [130].

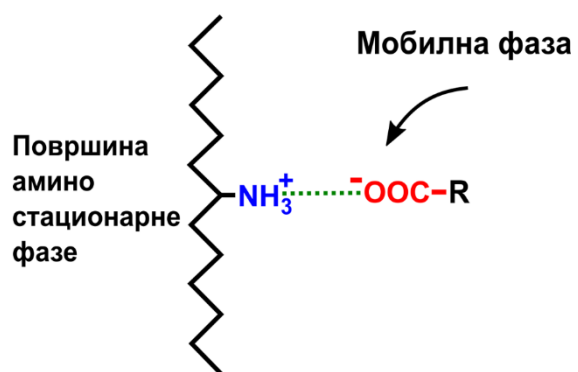
Експериментални подаци за диклофенак-калијум, ибупрофен, кофеин и парацетамол за сваку стационарну фазу представљени су у облику графикана, приказујући вриједности $\log k$ у односу на φ (слика 22). Због присуства двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог механизма, добијене кривуље имају облик параболо [73].

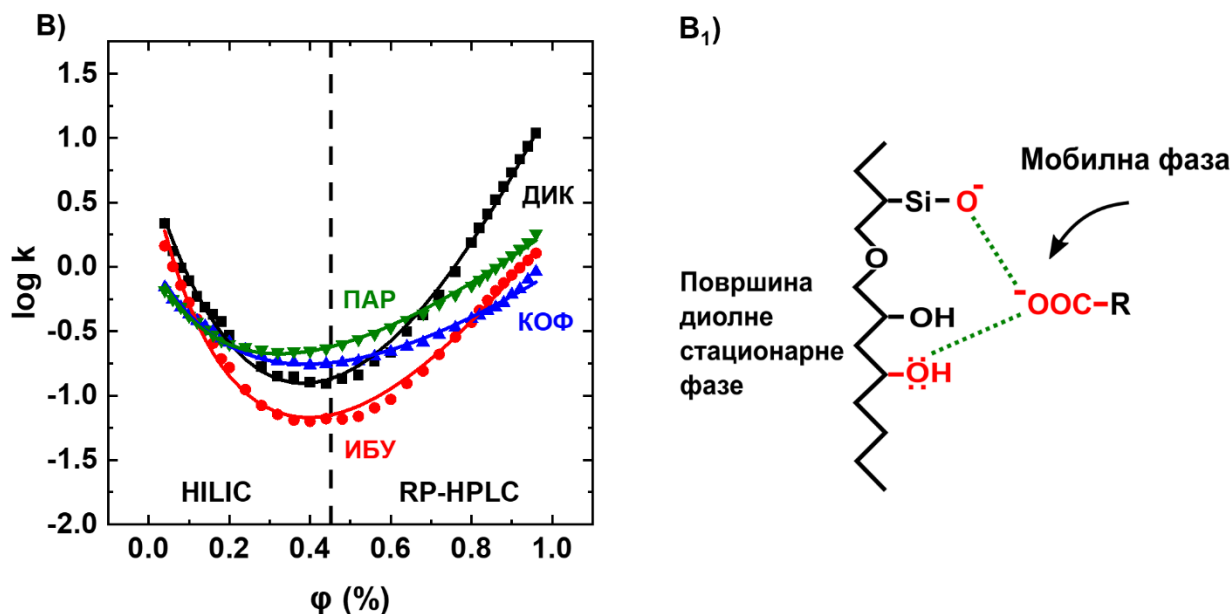


A₁)



Б₁)





Слика 22. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизми. (А) $\log k$ vs. ϕ за амидну, (Б) $\log k$ vs. ϕ за аминокиселинску и (В) $\log k$ vs. ϕ за диолну стационарну фазу, те одговарајуће интеракције између испитиваних једињења и А₁) амидне, Б₁) аминокиселинске и В₁) диолне стационарне фазе. Експериментални подаци приказани су тачкама, а модел подаци линијама. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, КОФ – кофеин, ПАР – парацетамол. HILIC – HILIC регион, RP-HPLC – RP-HPLC регион. Зелена тачкаста линија означава потенцијална мјеста везивања између јонизованих испитиваних једињења и површине стационарне фазе. R представља ароматично-алифатичне дијелове молекула диклофенак-калијума и ибупрофена, чије су структурне формуле приказане на слици 8

Највеће вриједности $\log k$ за кисела испитивана једињења уочавају се на аминокиселинској стационарној фази (слика 22Б). Разлог томе су најјаче интеракције између површине ове стационарне фазе и испитиваних једињења у HILIC региону, што доводи до дужег задржавања. Површина амидне стационарне фазе је хидрофилнија од диолне, због чега се кисела испитивана једињења дуже задржавају на амидној, него на диолној стационарној фази у HILIC региону (слика 22А, 22В). С друге стране, диолна стационарна фаза обезбјеђује најдуже задржавање киселих једињења у RP-HPLC региону, потом слиједи аминокиселинска, па амидна стационарна фаза. Неутрална испитивана једињења показала су врло слично задржавање на свим стационарним фазама. Суптилне разлике у оба региона указују на јаче задржавање на неутралним стационарним фазама него на позитивно наелектрисаној аминокиселинској стационарној фази (слика 22) [8].

Разлике које се јављају у случају киселих и неутралних испитиваних једињења на истим стационарним фазама, или самих киселих испитиваних једињења на различитим стационарним фазама, последица су присуства различитих врста веза/интеракција између испитиваних једињења и површина стационарних фаза (слика 22А₁ – 22В₁). Наиме, јаке електростатичке привлачне силе јављају се између протонисаних аминокиселина и површине диолне стационарне фазе.

група на површини аминокиселинских стационарних фаза и депротонисаних карбоксилних група у молекулима киселих испитиваних једињења. Диолне и амидне функционалне групе су присутне у молекулском облику, што условљава слабије интеракције између карбоксилних група испитиваних једињења и диолне/амидне функционалне групе на површинама ових стационарних фаза. Додатно, како је у поглављу 6.1.3. наведено, на амидним и диолним стационарним фазама које су кориштене у овим истраживањима није урађен „*end-capping*“. Постојање одређеног броја слободних силанолних група на површинама наведених стационарних фаза омогућава појаву електростатичких одбојних сила између резидуалних силанолних група и карбоксилне групе киселих испитиваних једињења (слика 22A₁ – 22B₁). Краће задржавање киселих испитиваних једињења на амидној и диолној стационарној фази може бити последица управо тог ефекта. Дуже задржавање диклофенак-калијума у RP-HPLC региону на диолној стационарној фази вјероватно је последица присуства поларних 2,3-дихидроксипропил функционалних група на површини ове стационарне фазе. Оне омогућавају формирање водоничних веза, које могу бити веома значајне у дефинисању дужине задржавања испитиваних једињења [128]. Постојање 2,3-дихидроксипропил лиганда на површини диолне стационарне фазе може бити одговорно за дуже задржавање парацетамола (неутралног испитиваног једињења), у односу на преостале стационарне фазе. Наиме, амидне и хидроксилне групе у молекулу парацетамола дјелују као донори, док карбонилна и хидроксилна група дјелују као акцептори водоника. Ова појава омогућава молекулу парацетамола грађење интер- и интрамолекуларних водоничних веза. С друге стране, кофеин је поларна молекула због разлика у електронегативности између поларних ковалентних веза угљеник-кисеоник и угљеник-азот. Изражена поларност кофеина доводи до његовог дужег задржавања на амидној стационарној фази, чија је површина поларнија од површине диолне стационарне фазе. Додатно, оба молекула могу да граде и дипол-дипол интеракције које, такође, доприносе њиховом задржавању на испитиваним стационарним фазама [25, 143].

Минимум на кривуљама облика параболе (φ_{min}) представља садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза између HILIC и RP-HPLC механизма. На амидној стационарној фази за кисела једињења, те на аминокиселинској стационарној фази за неутрална једињења, прелазне тачке из једног у други ретенциони механизам јављају се при највећем садржају ацетонитрила. На диолној стационарној фази за HILIC/RP-HPLC прелаз, за сва испитивана једињења, били су потребни најмањи садржаји ацетонитрила

у мобилној фази (табела 15). Вриједност φ_{min} се повећава са повећањем поларности површина стационарних фаза. Сва испитивана једињења на свим анализираним стационарним фазама показала су веома кратко задржавање у транзиционој зони мобилне фазе (мобилне фазе веома сличног састава као и мобилна фаза при којој се дешава HILIC/RP-HPLC прелаз). Овај ефекат посебно је изражен код киселих испитиваних једињења у крајњим тачкама HILIC и RP-HPLC региона, када су разлике у времену задржавања у односу на транзициону зону веома изражене (слика 22A-22B) [72].

6.2.4. Квадратни ретенциони модел

Квадратни, као и двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел, описује ретенционо понашање при широком распону садржаја органског и воденог дијела мобилне фазе. Због тога су, за креирање квадратних ретенционих модела, кориштени исти експериментални подаци као и при анализи двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих модела. Коефицијенти квадратне једначине, добијени прилагођавањем израза (16) експерименталним подацима, приказани су у табели 16. Такође, на основу добијених вриједности коефицијената, а примјеном израза (18) дефинисан је састав мобилне фазе при коме је задржавање испитиваних једињења било минимално (табела 16).

Табела 16. Коефицијенти квадратног ретенционог модела и минималне вриједности функција

Испитивано јед. Стац. фаза	Квадратни ретенциони модел				
	$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2$				
	$\ln k_w$	S_1	S_2	φ_{min}	R^2
<i>Амидна стационарна фаза</i>					
Диклофенак К	0,86	– 16,58	16,46	0,5036	0,9813
Ибупрофен	0,51	– 8,58	7,80	0,5500	0,9945
Кофеин	– 0,14	– 1,52	1,86	0,4086	0,9914
Парацетамол	– 0,33	– 1,69	2,11	0,4005	0,9331
<i>Амино стационарна фаза</i>					
Диклофенак К	1,02	– 3,72	3,72	0,5000	0,8226
Ибупрофен	1,15	– 3,53	3,19	0,5533	0,8642
Кофеин	– 0,17	– 1,89	1,80	0,5250	0,9693
Парацетамол	– 0,27	– 1,76	2,07	0,4251	0,9456
<i>Диолна стационарна фаза</i>					
Диклофенак К	0,44	– 6,14	7,19	0,4270	0,9930
Ибупрофен	0,22	– 5,89	6,23	0,4727	0,9610
Кофеин	– 0,13	– 2,68	2,89	0,4637	0,9832
Парацетамол	– 0,20	– 2,25	2,87	0,3920	0,9799

k – ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w – екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, S_1 и S_2 регресиони коефицијенти модела, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме је задржавање испитиваних једињења минимално, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

Када се упореде φ_{min} вриједности двојног HILIC/RP-HPLC и квадратног ретенционог модела, уочава се постојање разлике у самим вриједностима али се, такође, може видјети да је правац промјене тих вриједности исти (табеле 15 и 16). Високе вриједности коефицијената детерминације квадратног ретенционог модела на неутралним стационарним фазама указују на то да овај модел има способност да добро опише ретенционе податке. Међутим, „over-fitting“ (поглавље 6.1.4) представља значајан недостатак квадратног ретенционог модела те овај модел не обезбјеђује поуздана предвиђања вриједности ретенционих фактора при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе. Због наведеног, релевантнијим се сматрају резултати добијени анализом двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела. Такође, предност двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела огледа се у могућности да опише ретенционо понашање јонизованих једињења на супротно наелектрисаној стационарној фази (диклофенак-калијум и ибупрофен на аминокиселинској стационарној фази). Због нелинеарног пораста задржавања ових једињења, при високим садржајима ацетонитрила у мобилној фази, квадратни ретенциони модел није омогућио адекватан опис њиховог ретенционог

понашања, што се може видјети из добијених мањих вриједности коефицијената детерминације (табела 16). На овај начин је још једном потврђен значај параметра b у двојном HILIC/RP-HPLC ретенционом моделу, чија вриједност одражава утицај промјене поларности мобилне фазе на задржавање испитиваних једињења (веће вриједности указују на израженији утицај састава мобилне фазе на задржавање испитиваних једињења) [132].

6.2.5. Партициони и адсорпциони ретенциони модели

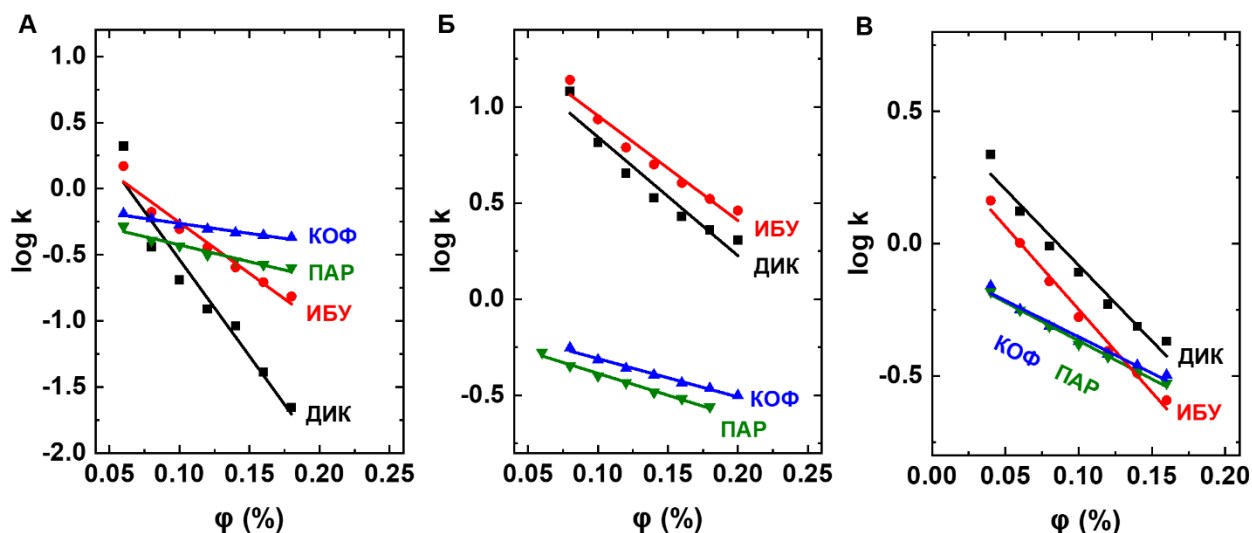
Креирањем партиционих и адсорпционих ретенционих модела приступило се анализи претходно дефинисаних HILIC и RP-HPLC региона, при чему су кориштени крајњи интервали ових региона (поглавље 6.2.3). Резултати добијени прилагођавањем модела датих изразима (14) и (15) експерименталним подацима, приказани су у табелама 17 и 18.

Табела 17. Коефицијенти партиционих и адсорпционих ретенционих модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола у HILIC региону

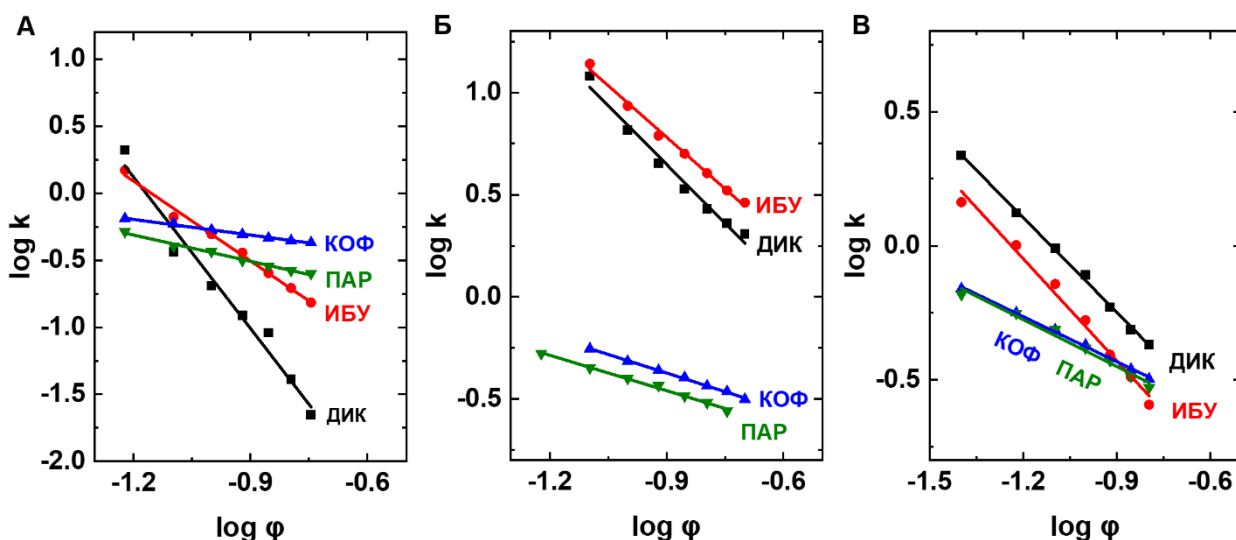
Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2		$\log k_0$	m	R^2
<i>Амидна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	0,92	14,60	0,9395		- 4,40	3,77	0,9717
Ибупрофен	0,51	7,70	0,9600		- 2,29	1,99	0,9918
Кофеин	- 0,11	1,52	0,9689		- 0,66	0,39	0,9959
Парацетамол	- 0,17	2,53	0,9503		- 1,10	0,66	0,9915
<i>Амино стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	1,46	6,17	0,9313		- 1,08	1,92	0,9819
Ибупрофен	1,50	5,45	0,9598		- 0,73	1,68	0,9941
Кофеин	- 0,11	1,99	0,9877		- 0,92	0,61	0,9975
Парацетамол	- 0,16	2,28	0,9881		- 0,98	0,58	0,9950
<i>Диолна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	- 1,53	- 4,85	0,9615		- 1,31	1,18	0,9982
Ибупрофен	0,38	6,27	0,9896		- 1,58	1,27	0,9886
Кофеин	- 0,08	2,74	0,9780		- 0,94	0,56	0,9975
Парацетамол	- 0,08	2,90	0,9944		- 0,97	0,58	0,9818

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

Графички приказ ретенционог понашања испитиваних једињења, те прилагођавање паратиционих и адсорпционих ретенционих модела ретенционим подацима представљен је на сликама 23 и 24.



Слика 23. Партициони ретенциони модели у HILIC региону на (А) амидној, (Б) аминок и (В) диолној стационарној фази. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, КОФ – кофеин, ПАР – парацетамол



Слика 24. Адсорпциони ретенциони модели у HILIC региону на (А) амидној, (Б) аминок и (В) диолној стационарној фази. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, КОФ – кофеин, ПАР – парацетамол

Поређењем вриједности R^2 (табела 17) партиционог и адсорпционог ретенционог модела може се видјети да су веће вриједности пружали адсорпциони ретенциони модели на свим стационарним фазама за већину испитиваних једињења. На основу тога, може се закључити да је, у укупном ретенционом механизму у HILIC региону, доминантнији процес адсорпције у односу на процес расподеле/партиције (слике 23 и 24). Изузетак представља ибупрофен на диолној стационарној фази, при чему је разлика између

вриједности R^2 оба модела врло мала за поуздано дефинисање доминантнијег ретенционог механизма. Такође, изузетак чини парацетамол на диолној стационарној фази, гдје су добијене веће вриједности R^2 за партициони, него за адсорпциони ретенциони модел, што значи да у овом случају знатно преовладава процес расподеле/партиције као ретенциони механизам.

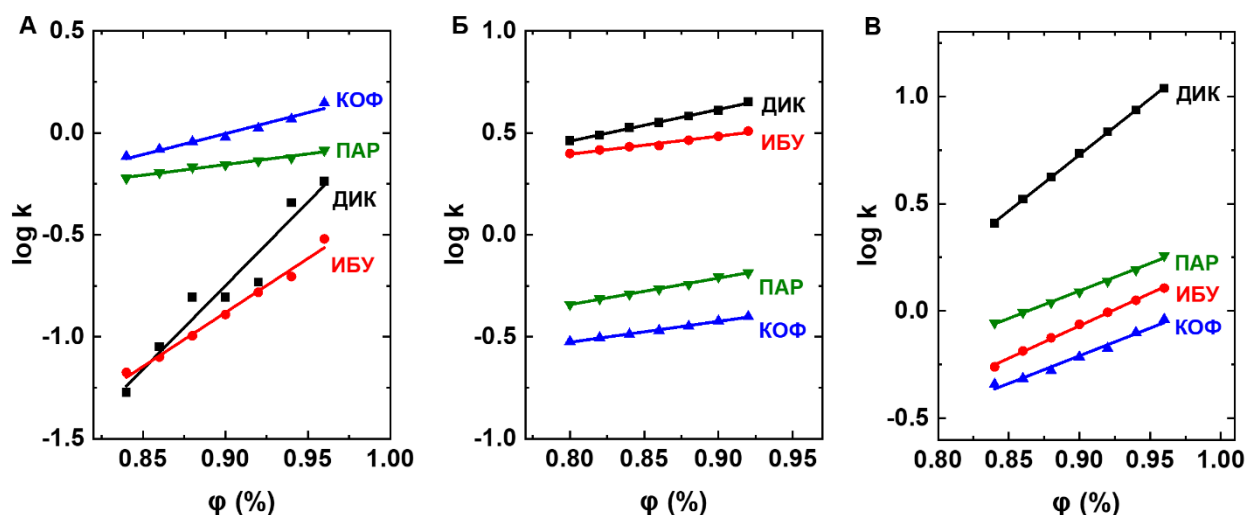
На основу добијених већих вриједности R^2 за адсорпциони модел на амино стационарној фази, може се закључити да је доминантнији процес адсорпције, који је посљедица јаких јонских интеракција између испитиваних једињења и површине стациоанрне фазе (поглавље 6.2.3). С друге стране, адсорпција неутралних испитиваних једињења посљедица је, највјероватније, молекулских интеракција. Амидне и диолне фукционалне групе, омогућавају грађење молекулских интеракција са испитиваним једињењима, као што су: водоничне везе, јон-дипол интеракције и друге. Преовлађивање партиционог ретенционог механизма (процеса расподеле) за парацетамол на диолној стационарној фази посљедица је његове расподеле између мобилне фазе и слоја воде адсорбованог на површини стационарне фазе (процес сличан течно/течној екстракцији) [22, 24].

Табела 18. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола у RP-HPLC региону

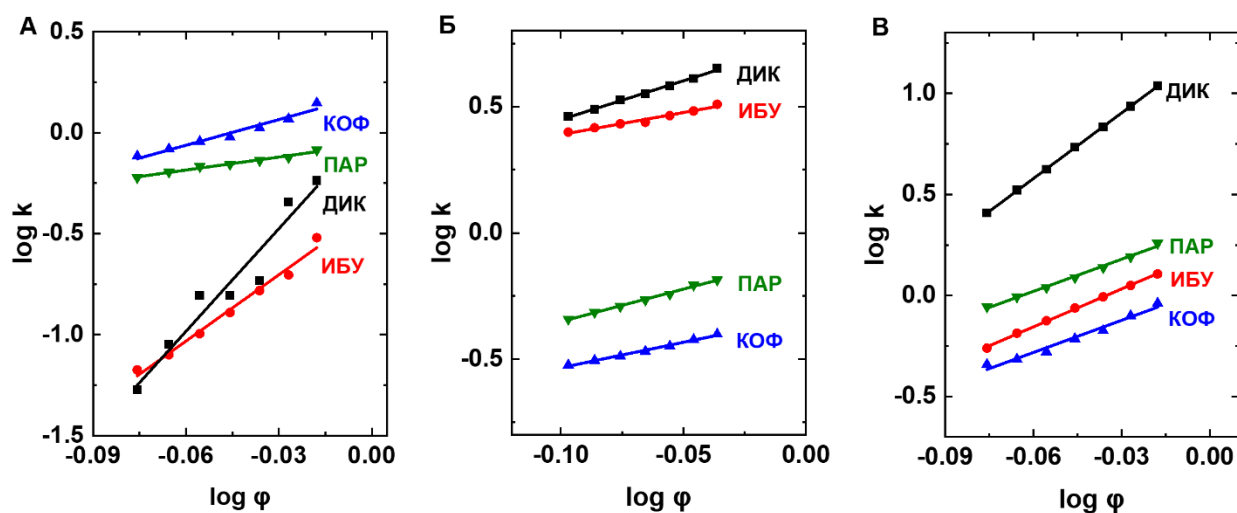
Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R ²		$\log k_0$	m	R ²
Амидна стационарна фаза							
Диклофенак К	− 8,13	− 8,20	0,9437		0,03	− 16,96	0,9421
Ибупрофен	− 5,56	− 5,30	0,9877		− 0,38	− 10,95	0,9843
Кофеин	− 1,85	− 2,06	0,9685		0,19	− 4,24	0,9625
Парацетамол	− 1,09	− 1,04	0,9816		− 0,06	− 2,16	0,9813
Амино стационарна фаза							
Диклофенак К	− 0,78	− 1,56	0,9966		0,76	− 3,08	0,9951
Ибупрофен	− 0,31	− 0,89	0,9779		0,56	− 1,75	0,9730
Кофеин	− 1,34	− 1,02	0,9945		− 0,33	− 2,02	0,9914
Парацетамол	− 1,38	− 1,30	0,9968		− 0,09	− 2,57	0,9956
Диолна стационарна фаза							
Диклофенак К	− 3,98	− 5,23	0,9997		1,23	− 10,82	0,9999
Ибупрофен	− 2,79	− 3,02	0,9977		0,22	− 6,26	0,9991
Кофеин	− 2,53	− 2,58	0,9815		0,04	− 5,32	0,9764
Парацетамол	− 2,21	− 2,56	0,9966		0,34	5,30	0,9943

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

Графички приказ ретенционог понашања испитиваних једињења представљен је сликама 25 и 26.



Слика 25. Партициони ретенциони модели у RP-HPLC региону на (А) амидној, (Б) аминок и (В) диолној стационарној фази. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, КОФ – кофеин, ПАР – парацетамол



Слика 26. Адсорпциони ретенциони модели у RP-HPLC региону на (А) амидној, (Б) аминок и (В) диолној стационарној фази. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, КОФ – кофеин, ПАР – парацетамол

Анализа добијених R^2 вриједности у RP-HPLC региону (табела 18, слике 25 и 26) показује да на ретенциони механизам свих испитиваних једињења, на свим стационарним фазама, значајан утицај имају и процес расподеле и процес адсорпције. У већем броју случајева незнатно веће R^2 вриједности пружали су партициони ретенциони модели (на амидној и на диолној стационарној фази за сва испитивана једињења и на диолној стационарној фази за кофеин), што указује да је овај ретенциони механизам доминантнији. Међутим, диклофенак-калијум, ибупрофен и парацетамол имали су незнатно веће R^2 вриједности за адсорпциони ретенциони модел, што указује да је код њих у малој мјери преовладао адсорпциони ретенциони механизам. Ипак, разлике у добијеним R^2 вриједностима оба ретенциона модела су толико мале да није могуће говорити о јасном дефинисању доминантног ретенционог механизма. Ако се има у виду изузетна сложеност HILIC система, може се претпоставити да су у овом случају оба ретенциона механизма присутна у великој мјери. Овакви резултати нису изненађујући, јер је у ретенционе механизме у HILIC системима обично истовремено укључено више процеса [129, 130].

6.2.6. Анјонско-измјењивачки ретенциони модели

У HILIC систему, позитивно наелектрисана површина аминок стационарне фазе омогућава везивање и задржавање киселих испитиваних једињења механизмом анјонске измјене. Због тога се може користити за процијену доприноса механизма анјонске измјене у укупном ретенционом механизму киселих испитиваних једињења.

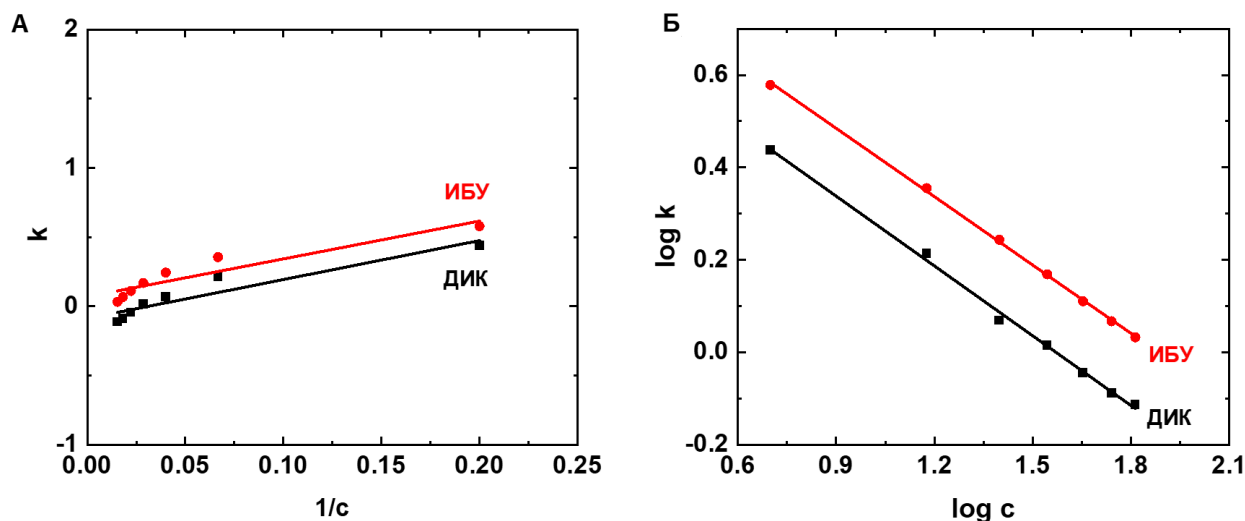
Ово испитивање вршено је варирањем концентрације пуфера у воденом дијелу мобилне фазе у распону од 5 mmol L^{-1} до 65 mmol L^{-1} , док су остали фактори одржавани на константном нивоу (поглавље 4.3.3.3). Анјонско-измјењивачки ретенциони модели, описани изразима (25) и (26), прилагођени су добијеним вриједностима ретенционих фактора. Коефицијенти анјонско-измјењивачких ретенционих модела диклофенак-калијума и ибупрофена на амино стационарној фази приказани су у табели 19.

Табела 19. Коефицијенти анјонско-измјењивачких ретенционих модела базних испитиваних једињења на амино стационарној фази

Испитивано једињење	Анјонско-измјењивачки ретенциони модели						
	$k = m (1/[c]) + a$				$\log k = m \log [c] + a$		
	a	m	R^2		a	m	R^2
Диклофенак К	0,71	10,48	0,9738		0,79	– 0,50	0,9972
Ибупрофен	1,03	14,25	0,9703		0,93	– 0,49	0,9995

Диклофенак К – диклофенак-калијум, k – ретенциони фактор испитиваног једињења; m – нагиб линеарног модела; $[c]$ – концентрација пуфера; a – одсјечак линеарног модела

Граички приказ успостављених анјонско-измјењивачких ретенционих модела представљен је на слици 27. Због одсуства утицаја механизма анјонске измјене, ретенциони подаци кофеина и парацетамола нису разматрани у овом поглављу.



Слика 27. Графички приказ успостављених анјонско-измјењивачких ретенционих модела. ДИК – диклофенак-калијум, ИБУ – ибупрофен, k – ретенциони фактор испитиваног једињења, c – концентрација пуфера [mmol L^{-1}]

Између протонисаних амино група на површини амино стационарне фазе и испитиваних једињења постоје јаке електростатичке привлачне силе (слика 22Б). Високе вриједности коефицијената детерминације, прије свега логаритамског модела, ($R^2 > 0,997$) указују на значајан допринос процеса анјонске измјене у укупном ретенционом механизму киселих

испитиваних једињења. Ипак, како регресиона права на графикону представљеном на слици 27 не пролази кроз координатни почетак, може се закључити да је у укупни ретенциони механизам ових једињења на аминокиселинској фази укључен још неки процес. Поред тога, нагиби логаритамских модела приказани у табели 19 различити су од -1 , што потврђује овај закључак [76].

Кисела испитивана једињења показују дуже задржавање на аминокиселинској фази при мањим концентрацијама пуфера. Ова појава се објашњава конкуренцијом између јонизованих испитиваних једињења и јона пуфера за мјеста везивања на површини стационарне фазе. Мања концентрација пуфера доводи до мањег броја јона пуфера (анјона) који се „такмиче“ са јонима испитиваних једињења (анјона) за везивна мјеста на површини аминокиселинске фазе (катиони). Услјед тога, кисела испитивана једињења (анјони) се у већем степену везују за слободне протонисане аминокиселинске групе (NH^{3+}), што за резултат има њихово дуже задржавање. Насупрот томе, веће концентрације пуфера обезбјеђују већу количину јона пуфера који „затварају“ више адсорпционих мјеста на површини аминокиселинске фазе, скраћујући вријеме задржавања испитиваних једињења [16, 135, 136].

6.2.7. Експериментални ретенциони модели креирани уз помоћ хеометријског приступа на аминокиселинској фази

Након прелиминарне фазе истраживања закључено је да већи број фактора мобилне фазе има значајан утицај на ретенционо понашање киселих испитиваних једињења на аминокиселинској фази. За квантитативну процјену утицаја тих фактора, као и за испитивање утицаја међуфакторских интеракција, кориштен је хеометријски приступ. Овај приступ омогућио је креирање експерименталних ретенционих модела за процјену утицаја садржаја ацетонитрила, концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе на ретенционо понашање киселих и неутралних испитиваних једињења. Иако је на ретенционо понашање неутралних испитиваних једињења значајан утицај показао једино садржај ацетонитрила, приступило се испитивању утицаја међуфакторских интеракција које би могле показати значајан ефекат на ретенционо понашање ових једињења. Такође, примјеном хеометријског приступа могуће је кватификовати мале промјене у ретенционом понашању проузроковане појединим испитиваним факторима, што се примјеном OFAT приступа може превидјети [144].

За развој експерименталних ретенционих модела кориштен је BBD, који омогућава испитивање факторских утицаја на три нивоа. План експеримената са одговарајућим вриједностима испитиваних фактора приказан је у табели 2 (поглавље 4.3.3.5). Након извођења експеримената, примјеном израза (7) израчунати су ретенциони фактори, чије су вриједности приказане у табели 20.

Табела 20. Експериментално добијене вриједности ретенционих фактора базних и неутралних испитиваних једињења на аминокиселинској фази

No	k (дик)	k (ибу)	k (коф)	k (пар)
1	2,684	3,355	0,362	0,298
2	5,415	6,091	0,420	0,346
3	0,956	1,281	0,383	0,304
4	3,117	4,388	0,442	0,350
5	1,708	1,000	0,381	0,300
6	3,235	2,158	0,432	0,340
7	1,235	1,754	0,377	0,301
8	4,354	5,929	0,435	0,347
9	3,952	2,788	0,400	0,306
10	1,829	1,000	0,399	0,310
11	3,672	4,943	0,384	0,312
12	1,402	2,085	0,400	0,316
13	1,933	2,622	0,396	0,310
14	1,910	2,622	0,397	0,312
15	2,023	2,756	0,394	0,312

No – Редни број експеримента (*standard order*), k_{дик} – ретенциони фактор диклофенак-калијума, k_{ибу} – ретенциони фактор ибупрофена, k_{коф} – ретенциони фактор кофеина; k_{пар} – ретенциони фактор парацетамола

Примјеном полинома другог реда (израз 13), извршена је статистичка процјена утицаја фактора (састав мобилне фазе) на праћене одговоре система (ретенционе факторе). Затим је, примјеном ANOVA, извршена процјена адекватности добијених ретенционих модела, при чему су као релевантни статистички параметри кориштене вриједности R^2 , $Adj R^2$ и $Pred R^2$. Коефицијенти креираних ретенционих модела, заједно са њиховом статистичком значајношћу и другим релевантним статистичким параметрима, приказани су у табели 21

Табела 21. Резултати ANOVA теста – коефицијенти креираних математичких модела и њихова статистичка анализа

	k (ДИК)		k (ИБУ)		k (КОФ)		k (ПАР)	
Коеф.	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.
b ₀	1,9600	–	2,6700	–	0,4000	–	0,3110	–
b ₁	1,1900	< 0,0001*	1,4000	< 0,0001*	0,0282	< 0,0001*	0,0226	< 0,0001*
b ₂	– 1,0500	< 0,0001*	– 1,0500	< 0,0001*	0,0073	0,0123*	0,0024	0,0077*
b ₃	– 0,0075	0,9294	0,9708	0,0001*	– 0,0021	0,4189	0,0024	0,0084*
b ₁₂	– 0,1428	0,2665	0,0925	0,5128	-	-	– 0,0002	0,7900
b ₁₃	0,3979	0,0176*	0,7541	0,0022*	-	-	0,0016	0,0982
b ₂₃	– 0,0369	0,7597	– 0,2679	0,0969	-	-	– 0,0001	0,9055
b ₁₁	0,5034	0,0082*	0,5594	0,0094*	-	-	0,0122	< 0,0001*
b ₂₂	0,5839	0,0044*	0,5529	0,0099*	-	-	0,0013	0,1866
b ₃₃	0,1741	0,2029	– 0,5156	0,0130	-	-	– 0,0013	0,1727
R ²	0,9888		0,9910		0,9286		0,9973	
Adj R ²	0,9686		0,9748		0,9092		0,9925	
Pred R ²	0,8250		0,8605		0,8572		0,9612	

Коеф. – коефицијент модела, в. коеф. – вриједност коефицијента, *p* вријед. – *p* вриједност, b₀ – одсјечак модела, b₁, b₂, b₃ – регресиони коефицијенти линеарних чланова (1 – садржај ацетонитрила [%], 2 – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], 3 – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе), b₁₂, b₁₃, b₂₃ – регресиони коефицијенти факторских интеракција, b₁₁, b₂₂, b₃₃ – регресиони коефицијенти квадратних чланова, k (ДИК) – ретенциони фактор диклофенак-калијума, k (ИБУ) – ретенциони фактор ибупрофена, k (КОФ) – ретенциони фактор кофеина; k (ПАР) – ретенциони фактор парацетамола, R² – коефицијент детерминације, Adj R² – *Adjusted* R², Pred R² – *Predicted* R²

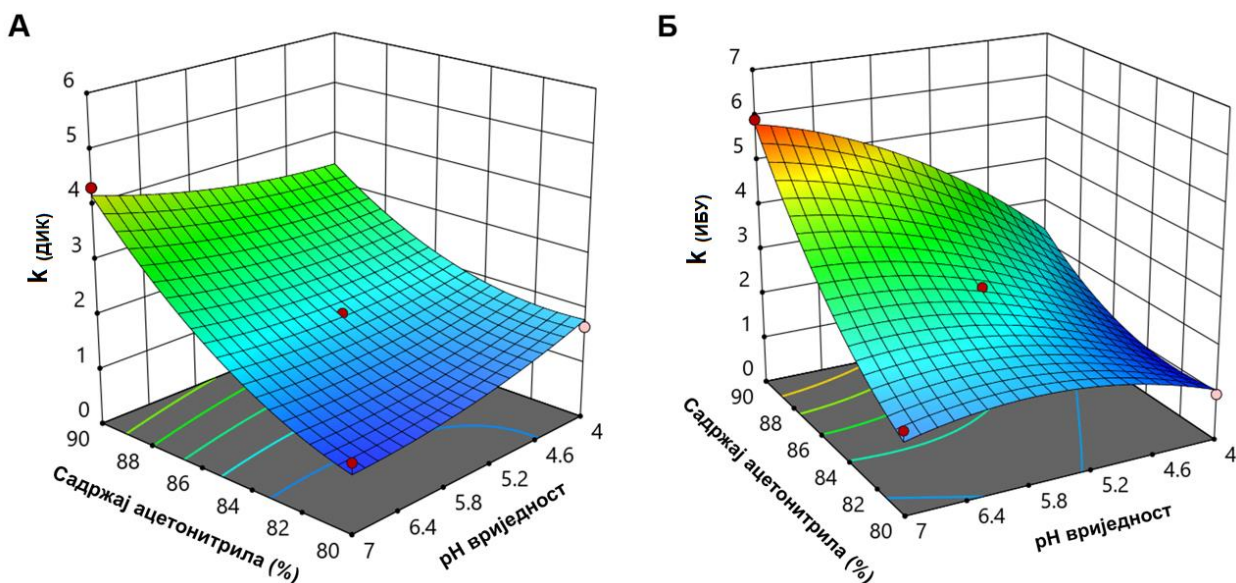
* Статистички значајни коефицијенти за *p* вриједност ≤ 0,05

Високе вриједности R^2 , $Adj R^2$ и $Pred R^2$ потврђују тачност креираних ретенционих модела и њихове добре предиктивне способности (табела 21). Статистички значајни регресиони коефицијенти (p вриједност $\leq 0,05$) кориштени су за креирање математичких модела. За ретенционо понашање кофеина предложен је линеарни модел, јер нису уочене квадратне нити интеракцијске зависности промјене фактора на његов ретенциони механизам. Његово понашање у HILIC систему, на аминокиселинској фази, у потпуности је дефинисано утицајем садржаја ацетонитрила у мобилној фази, а у мањој мјери, значајан ефекат показује и утицај концентрације пуфера, што примјеном OFAT приступа није било уочљиво.

6.2.7.1. Дефинисање факторских утицаја на ретенционо понашање испитиваних једињења

Утицај појединачних фактора и двофакторских интеракција на ретенционо понашање испитиваних једињења на аминокиселинској фази дефинисан је на основу статистичке процјене значајности креираних математичких модела (табела 21). Из добијених резултата се може видјети да су на ретенционе механизме диклофенак-калијума и ибупрофена значајан утицај имали садржај ацетонитрила и концентрација пуфера. На ретенционо понашање парацетамола значајан утицај имали су сви испитивани фактори – садржај ацетонитрила, концентрација пуфера и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе.

Интеракција садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе била је једина статистички значајна интеракција која је показала утицај на ретенционе механизме диклофенак-калијума и ибупрофена. На тај начин, потврђен је и утицај рН вриједности воденог дијела мобилне фазе, иако њен појединачни ефекат није био статистички значајан. Ове интеракције представљене су у виду 3D-графика на слици 28. С друге стране, на ретенционе механизме парацетамола утицај нису имале међуфакторске интеракције.



Слика 28. 3D графикони површине одговора. (А) $k_{\text{дик}} = f(\text{садржај ацетонитрила}, \text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Б) $k_{\text{ИБУ}} = f(\text{садржај ацетонитрила}, \text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$

Анализом статистички значајних коефицијената и визуелном процјеном 3D-графикона (табела 21, слика 28) може се закључити да се задржавање киселих испитиваних једињења повећава са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази. Томе у прилог говоре статистички значајни и позитивни линеарни b_1 , као и квадратни b_{11} коефицијенти. Негативан предзнак коефицијента b_2 показује да се задржавање киселих једињења повећава са смањењем концентрације пуфера, што је у складу са доприносом анјонске измјене у укупном ретенционом механизму (поглавље 6.2.6). Поређењем апсолутних вриједности коефицијената b_1 и b_2 за диклофенак-калијум и ибупрофен, може се уочити да је утицај садржаја ацетонитрила израженији него утицај концентрације пуфера. Детаљно објашњење ових ефеката дато је у поглављима 6.2.3, 6.2.5. и 6.2.6.

Статистичка значајност коефицијената b_1 , b_2 и b_3 који се односе на садржај ацетонитрила, концентрацију пуфера и pH воденог дијела мобилне фазе, указује на њихов утицај на ретенционе механизме парацетамола на амино стационарној фази. Ипак, апсолутне вриједности ових коефицијената показују да је ефекат садржаја ацетонитрила слаб, а утицај концентрације пуфера и pH вриједности воденог дијела мобилне фазе приближно десет пута мањи. Због тога њихов значај није био уочљив у прелиминарној фази истраживања, а последица је, највјероватније, промјена у дебљини воденог слоја на површини стационарне фазе (поглавље 6.2.1). Позитивне вриједности

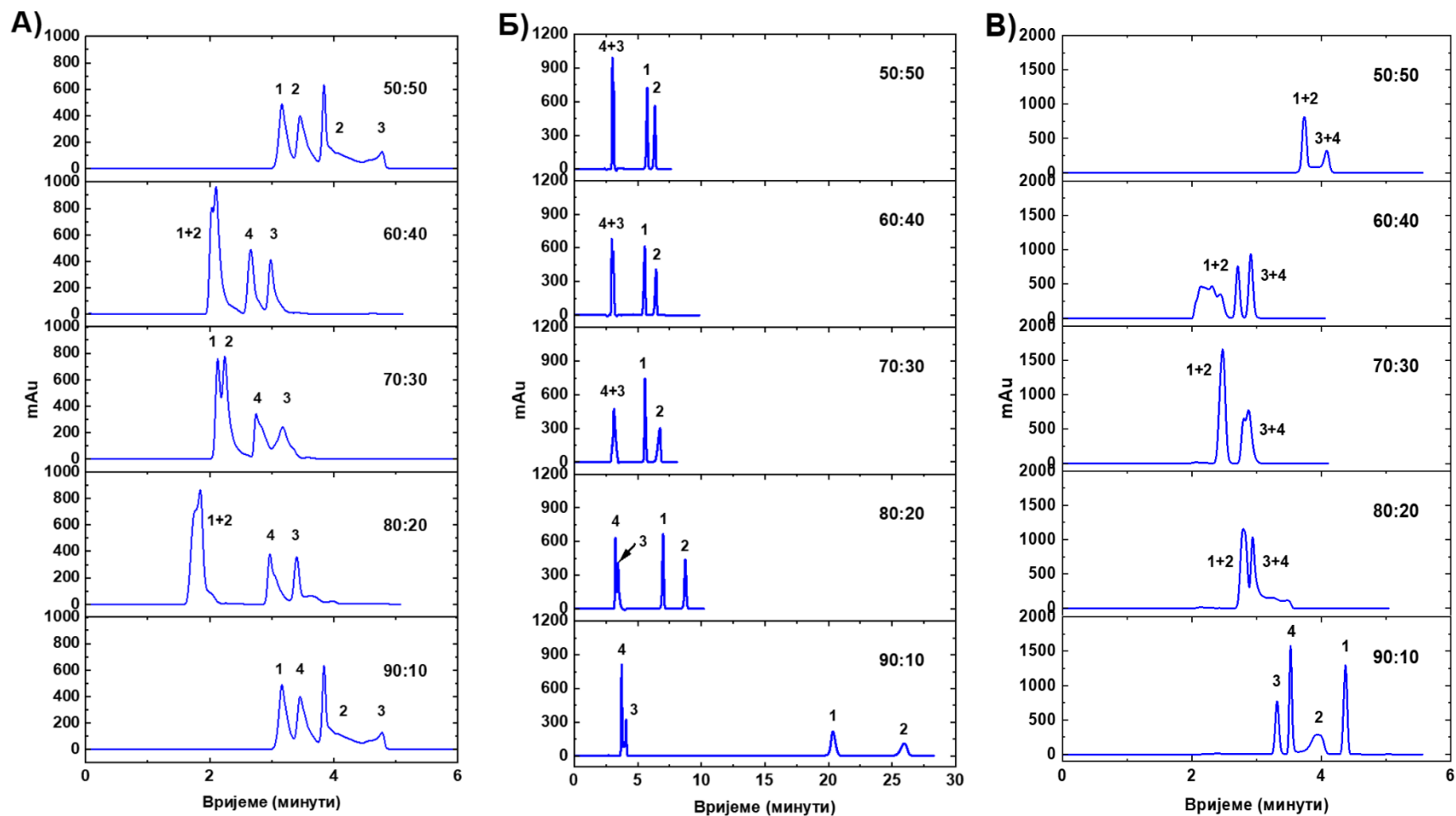
свих коефицијената показују да се задржавање парацетамола повећава са порастом сваког од испитиваних фактора.

Ефекти факторских интеракција процијењени су на основу статистичких (табела 21) и графичких модела (слика 28). Анализом коефицијената факторских интеракција и визуелних приказа представљених 3D-графиконима, може се закључити да се кисела испитивана једињења дуже задржавају на аминокиселинској фази када се истовремено повећа и садржај ацетонитрила и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (позитиван и статистички значајан коефицијент b_{13}). Квантитативни допринос ове интеракције на задржавање киселих испитиваних једињења слабији је него утицаји појединачних фактора (апсолутне вриједности коефицијената b_1 , b_2 и b_{13} у табели 21).

Статистичка значајност квадратних чланова указује на нелинеарну зависност ретенционог понашања од промјене вриједности фактора, што се огледа у конкавном облику 3D-графика. Позитиван и статистички значајан коефицијент b_{11} показује да повећање садржаја ацетонитрила доводи до нелинеарног пораста задржавања испитиваних једињења, што је карактеристично за HILIC системе. Статистичка значајност позитивног b_{22} коефицијента код диклофенак-калијума и ибупрофена указује на изражен допринос јонске измјене у укупном задржавању ових једињења на аминокиселинској фази [129].

6.2.8. Утицај врсте стационарне фазе и физичко-хемијских особина испитиваних једињења на ретенционо понашање

У претходним фазама истраживања дефинисан је утицај фактора мобилне фазе на ретенционо понашање киселих и неутралних испитиваних једињења на различитим стационарним фазама. Том приликом прикупљена је значајна количина информација које описују ретенционе механизме испитиваних једињења, што је омогућило поређење ретенционог понашања наведених испитиваних једињења под истим хроматографским условима, али на различитим стационарним фазама. На тај начин, омогућена је процјена утицаја врсте стационарне фазе, али и физичко-хемијских особина самих испитиваних једињења на њихове ретенционе механизме. Добијени хроматограми анализирани смјеше неутралних и киселих испитиваних једињења приказани су на слици 29.



Слика 29. Хроматограми анализане смјеше киселих и неутралних испитиваних једињења на (А) амидној, (Б) аминок и (В) диолној стационарној фази добијени при садржају ацетонитрила од 50 %, 60 %, 70 %, 80 % и 90 %, уз константне вриједности концентрације пуфера (20 mmol L^{-1}) и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (7,00). Хроматографски пикови испитиваних једињења означени су са: 1 – диклофенак-калијум, 2 – ибупрофен, 3 – кофеин, 4 – парацетамол

У HILIC систему, задржавање испитиваних једињења се повећава са порастом њихове поларности [25, 43, 140]. За процјену поларности користе се молекулски дескриптори $\log P$ и $\log D$. Код једињења која немају способност јонизације, те се увијек налазе у свом молекулском облику, вриједности ових параметара су једнаке, односно вриједности $\log D$ се не мијењају са промјеном рН вриједности. Међутим, због предности $\log D$ у односу на $\log P$ када су у питању јонизована једињења (вриједност $\log D$ се, код јонизованих једињења, мијења са промјеном рН вриједности – поглавље 6.1.9) $\log D$ је кориштен за дефинисање утицаја физичко-хемијских особина на ретенционо понашање. При рН вриједности 7,00, на основу вриједности $\log D$ може се закључити да је најхидрофилније испитивано једињење кофеин (0,55), слиједи парацетамол (0,91), диклофенак-калијум (1,37) и на крају ибупрофен (1,71) са најмањим степеном хидрофилности. Порастом ових вриједности, расте хидрофобност (липофилност) једињења.

При садржајима ацетонитрила у мобилној фази до 90 % на амидној и диолној стационарној фази, први су елуирали диклофенак-калијум и ибупрофен (слика 29А и 29В), што је у складу са претходно поменутих $\log D$ вриједностима. Претежно неутрална површина ових стационарних фаза омогућила је дуже задржавање поларних неутралних једињења. Међутим, при садржајима ацетонитрила од 90 % мијења се дебљина воденог слоја адсорбованог на површини стационарне фазе, те се омогућава директна интеракција испитиваних једињења са површином стационарне фазе. Тада значајну улогу, поред процеса расподеле, имају и друге врсте интеракција, што доводи до промјена у редослиједу елуирања испитиваних једињења [140].

На аминокиселинској фази доминантан је процес јонске измјене. Иако су кофеин и парацетамол хидрофилнији од диклофенак-калијума и ибупрофена, они елуирају први при свим односима органског и воденог дијела мобилне фазе (слика 29Б). Ово се дешава због снажних интеракција између протонованих аминокиселина на површини аминокиселинске стационарне фазе и карбоксилатних анјона у молекулима диклофенак-калијума и ибупрофена. С друге стране, кофеин и парацетамол немају могућност грађења јонских веза са површином стационарне фазе, због чега брже елуирају. Како садржај ацетонитрила у мобилној фази расте, тако је разлика између дужине задржавања једињења на аминокиселинској фази све израженија, што је посебно видљиво при садржају ацетонитрила од 90 % [129].

Када је ријеч о дужини трајања анализе, са слике 29 се може видјети да нема значајне разлике између двије неутралне стационарне фазе (амидна и диолна), док се аминокислотна стационарна фаза издваја најдужим временом трајања анализе. Ово је, такође, последица снажних електростатичких интеракција између јонизованих испитиваних једињења и површине аминокислотне стационарне фазе, а уједно и разлог за постизање најбоље сепарације. Дакле, задржавање испитиваних једињења, поред хроматографских карактеристика, последица је и њихових физичко-хемијских особина, прије свега степена јонизације и поларности [139].

6.3. АНАЛИЗА РЕТЕНЦИОНИХ МЕХАНИЗАМА УПОТРЕБОМ НОВОРАЗВИЈЕНОГ *PYTHON* СОФТВЕРА

Током анализе ретенционих механизма (поглавља 6.1. и 6.2), уочени су недостаци у рјешавању нелинеарних (двојни HILIC/RP-HPLC) ретенционих модела. Наиме, употреба екстензије *solver* из *Microsoft Excel* пакета захтијевала је ручно прилагођавање вриједности коефицијената модела, тако да графикони моделованих података прате експериментално добијене вриједности. Након тога, *solver* је давао задовољавајуће вриједности R^2 . С друге стране, *OriginPro*[®] софтвер је аутоматски вршио оптимизацију ових података, али у оквиру од свега 400 итерација, што је често давало мање вриједности R^2 . Додатни недостатак овог софтвера је ручно дефинисање једначине модела. Осим тога, даља анализа ретенционих механизма је временски захтјевна, јер подразумејева рачунање великог броја података за сваки ретенциони модел који се истражује и за свако испитивано једињење. Кориштење различитих скала (линеарна и логаритамска) додатно компликује процес статистичке анализе и оставља могућност за прављење грешака. Такође, када се моделују крајњи интервали двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, поставља се питање колико тачака узети у разматрање за рачунање доприноса партиционог и адсорпционог ретенционог механизма. Због свега наведеног, у овом дијелу дисертације приказани су подаци добијени кориштењем новоразвијеног софтвера, дизајнираног тако да превазилази поменуте недостатке. За анализу ретенционих механизма кориштени су исти експериментални подаци као и у поглављима 6.1. и 6.2.

6.3.1. Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел

Резултати добијени прилагођавањем двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела (израз (21)) експерименталним подацима, приказани су у табели 22 за амитриптилин-хидрохлорид и његове нечистоће и табели 23 за диклофенак-калијум, ибупрофен, кофеин и парацетамол. Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони механизми нечистоћа А и G нису могли бити праћени (поглавље 6.1.1), те су изостављени из резултата.

Табела 22. Коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа и минималне вриједности функција добијене употребом новоразвијеног софтвера

Испитивано јед.	Стац. фаза	Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел						
		$\log k = a + m_{RP} \varphi - m_{HILIC} \cdot \log (1 + b \varphi)$						
		a	m_{RP}	m_{HILIC}	b	φ_{min}	R^2	$Adj R^2$
Амидна стационарна фаза								
Амитриптилин-хидрохлорид		1,39	24,64	100,00	0,77	0,4579	0,9928	0,9916
Нечистоћа В		1,43	25,27	100,00	0,79	0,4519	0,9849	0,9824
Нечистоћа С		1,33	23,36	100,00	0,72	0,4752	0,9941	0,9931
Нечистоћа D		1,37	16,33	57,15	0,97	0,4854	0,9962	0,9955
Нечистоћа F		1,39	20,87	100,00	0,64	0,5074	0,9944	0,9934
Диолна стационарна фаза								
Амитриптилин-хидрохлорид		0,61	24,22	100,00	0,72	0,4100	0,9887	0,9868
Нечистоћа В		0,65	24,94	100,00	0,75	0,4025	0,9924	0,9911
Нечистоћа С		0,99	20,26	60,04	1,15	0,4145	0,9951	0,9943
Нечистоћа D		0,60	21,50	100,00	0,64	0,4522	0,9917	0,9903
Нечистоћа F		0,74	21,08	100,00	0,64	0,4935	0,9940	0,9930
Силика стационарна фаза								
Амитриптилин-хидрохлорид		1,60	21,48	100,00	0,68	0,5402	0,9938	0,9926
Нечистоћа В		1,62	21,64	100,00	0,68	0,5435	0,9934	0,9921
Нечистоћа С		1,64	21,12	100,00	0,68	0,5714	0,9950	0,9941
Нечистоћа D		1,65	20,63	100,00	0,65	0,5702	0,9970	0,9964
Нечистоћа F		1,72	20,13	100,00	0,59	0,5875	0,9966	0,9960

m_{RP} и m_{HILIC} – регресиони коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, b – коефицијент који описује задржавање једињења при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, a – емпиријска константа, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза из HILIC у RP-HPLC механизам, R^2 – коефицијент детерминације, $Adj R^2$ – *Adjusted R²*, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза

Табела 23. Коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола и минималне вриједности функција добијени употребом новоразвијеног софтвера

Испитивано јед. Стац. фаза	Двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони модел						
	$\log k = a + m_{RP} \varphi - m_{HILIC} \cdot \log (1 + b \varphi)$						
	a	m_{RP}	m_{HILIC}	b	φ_{min}	R^2	$Adj R^2$
Амидна стационарна фаза							
Диклофенак-калијум	1,61	37,81	100,00	1,46	0,4630	0,9872	0,9852
Ибупрофен	0,72	25,25	100,00	0,52	0,5226	0,9879	0,9860
Кофеин	0,00	3,71	6,79	2,35	0,3684	0,9883	0,9865
Парацетамол	0,09	2,67	2,64	9,95	0,3288	0,9887	0,9870
Амино стационарна фаза							
Диклофенак-калијум	3,54	2,10	2,91	100,00	0,3980	0,9939	0,9928
Ибупрофен	3,29	2,29	2,48	100,00	0,4594	0,9972	0,9968
Кофеин	0,00	2,64	4,78	3,19	0,4711	0,9980	0,9976
Парацетамол	0,01	2,59	3,04	6,59	0,3569	0,9989	0,9987
Диолна стационарна фаза							
Диклофенак-калијум	0,61	26,02	100,00	0,79	0,4012	0,9976	0,9972
Ибупрофен	0,59	11,06	21,31	2,39	0,4175	0,9960	0,9954
Кофеин	0,00	6,47	15,50	1,61	0,4193	0,9958	0,9952
Парацетамол	0,00	5,12	8,15	2,87	0,3428	0,9986	0,9984

m_{RP} и m_{HILIC} – регресиони коефицијенти двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела, b – коефицијент који описује задржавање при веома ниским садржајима воденог дијела мобилне фазе, a – емпиријска константа, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме долази до прелаза из HILIC у RP-HPLC механизам, R^2 – коефицијент детерминације, $Adj R^2$ – *Adjusted R²*, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза

Када се упореде резултати добијени употребом *Microsoft Excel*-а (табеле 7 и 15) са резултатима добијеним употребом новоразвијеног софтвера (табеле 22 и 23), може се уочити слједеће:

Табеле 22 и 23 укључују додатну мјеру за процјену тачности модела – *Adjusted R²*, која је важна статистичка мјера квалитета модела, јер прилагођава вриједност *R²* у зависности од броја предиктора.

Вриједности *R²* представљене у табели 22 у свим случајевима су једнаке или веће од одговарајућих вриједности из табеле 7, што говори у прилог бољег прилагођавања модела експерименталним подацима. Додатно, вриједности *Adjusted R²*, које су врло блиске вриједностима *R²*, указју на стабилност модела, односно његову могућност да опише експерименталне податке са задовољавајућом тачношћу и прецизношћу.

У табели 22 максималне вриједности параметара су стандардизоване, што омогућава лакше уочавање обрасца зависности ретенционих карактеристика између различитих испитиваних једињења. Таква уједначеност резултата омогућава и лакшу интерпретацију у физичком смислу. С друге стране, уједначене вриједности параметара указују и на већу тачност и прецизност израчунавања.

Процес добијања резултата представљених у табели 22 у потпуности је аутоматизован, те нити у једном кораку не зависи од аналитичара. Тиме је постигнута значајна уштеда времена и искључена могућност прављења грешке настале посредством људског фактора. То се, у овом случају, посебно односи на добијање вриједности коефицијената модела, али и на рачунање вриједности *R²*.

Резултати приказани у табелама 15 и 23, не показују значајне разлике. Међутим, оно што се значајно разликује јесте аутоматизација процеса која је постигнута употребом *Python* софтвера, те потврда тачности и поузданости модела додавањем *Adjusted R²* вриједности.

6.3.2. Квадратни ретенциони модел

Квадратни ретенциони модел (израз (16)) прилагођен је експерименталним подацима, а примјеном израза (18), дефинисан је састав мобилне фазе, при коме је задржавање испитиваних једињења минимално. Такође, добијене вриједности коефицијената кориштене су да се, према изразу (19), израчуна ретенциони фактор испитиваних једињења у тренутку њиховог минималног задржавања (табела 24 – амитриптилин-

хидрохлорид и његове нечистоће, табела 25 – диклофенак-калијум, ибупрофен, кофеин и парацетамол). Због незадовољавајућег ретенционог понашања, ретенциони подаци нечистоћа А и G нису приказани.

Табела 24. Коефицијенти квадратног ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа и минималне вриједности функција добијене употребом новоразвијеног софтвера

Испитивано јед.	Стац. фаза	Квадратни ретенциони модел					
		$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2$					
		$\ln k_w$	S_1	S_2	φ_{min}	k_{min}	R^2
Амидна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl		1,22	– 6,75	6,99	0,4831	0,3912	0,9961
Нечистоћа В		1,26	– 7,01	7,34	0,4777	0,3814	0,9941
Нечистоћа С		1,18	– 6,35	6,36	0,4994	0,3943	0,9910
Нечистоћа D		1,18	– 5,62	5,47	0,5134	0,5497	0,9880
Нечистоћа F		1,26	– 5,46	5,16	0,5283	0,6625	0,9915
Диолна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl		0,47	– 5,57	6,42	0,4332	0,1836	0,9954
Нечистоћа В		0,50	– 5,74	6,74	0,4257	0,1883	0,9966
Нечистоћа С		0,74	– 6,58	7,38	0,4460	0,1853	0,9851
Нечистоћа D		0,50	– 5,00	5,27	0,4744	0,2037	0,9942
Нечистоћа F		0,63	– 5,44	5,28	0,5153	0,1698	0,9971
Силика стационарна фаза							
Амитриптилин HCl		1,45	– 6,41	5,71	0,5621	0,4403	0,9967
Нечистоћа В		1,47	– 6,51	5,79	0,5616	0,4383	0,9965
Нечистоћа С		1,48	– 6,69	5,67	0,5903	0,3241	0,9952
Нечистоћа D		1,51	– 6,28	5,36	0,5861	0,4697	0,9964
Нечистоћа F		1,59	– 6,24	5,18	0,6015	0,5208	0,9969

k – ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w – екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, S_1 и S_2 регресиони коефицијенти модела, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме је задржавање испитиваних једињења минимално, k_{min} – вриједност ретенционог фактора при φ_{min} , R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Табела 25. Коефицијенти квадратног ретенционог модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофина и парацетамола и минималне вриједности функција добијени употребом новоразвијеног софтвера

Испитивано јед.	Стац. фаза	Квадратни ретенциони модел				
		$\ln k = \ln k_w + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \varphi^2$				
		$\ln k_w$	S_1	S_2	φ_{min}	k_{min}
Амидна стационарна фаза						
Диклофенак-калијум	0,86	– 16,58	16,46	0,5039	0,0005	0,9813
Ибупрофен	0,51	– 8,58	7,80	0,5498	0,0014	0,9945
Кофеин	– 0,14	– 1,52	1,86	0,4080	0,3518	0,9914
Парацетамол	– 0,33	– 1,69	2,11	0,3991	0,2174	0,9331
Амино стационарна фаза						
Диклофенак-калијум	1,02	– 3,72	3,72	0,4989	1,2377	0,8226
Ибупрофен	1,15	– 3,53	3,19	0,5530	1,4808	0,8642
Кофеин	– 0,17	– 1,89	1,80	0,5245	0,2173	0,9693
Парацетамол	– 0,27	– 1,76	2,07	0,4265	0,2278	0,9456
Диолна стационарна фаза						
Диклофенак-калијум	0,44	– 6,14	7,19	0,4272	0,1335	0,9930
Ибупрофен	0,22	– 5,89	6,23	0,4731	0,0671	0,9610
Кофеин	– 0,13	– 2,68	2,89	0,4627	0,1771	0,9832
Парацетамол	– 0,20	– 2,25	2,87	0,3918	0,2310	0,9799

k – ретенциони фактор испитиваног једињења, k_w – екстраполирани ретенциони фактор испитиваног једињења при хипотетичкој мобилној фази коју чини чист органски растварач, S_1 и S_2 регресиони коефицијенти модела, φ_{min} – садржај воденог дијела мобилне фазе при коме је задржавање испитиваних једињења минимално, k_{min} – вриједност ретенционог фактора при φ_{min} , R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза

Поређењем резултата добијених употребом *Microsoft Excel*-а (табеле 8 и 16) са резултатима добијеним употребом новоразвијеног софтвера (табеле 24 и 25), не могу се уочити значајне разлике. Ово је очекивано, будући да се анализа модела описаног полиномом другог реда врши једноставним математичким операцијама. Наиме, квадратни ретенциони модел, који има мањи број параметара у односу на двојни HILIC/РP-HPLC ретенциони модел, је мање осјетљив на варијације у подацима. Рачунање коефицијената модела методом најмањих квадрата, врши се кориштењем истих алгоритама, што увијек даје исте резултате. Међутим, табеле 24 и 25 укључују додатни параметар, k_{min} , који представља вриједност ретенционог фактора при φ_{min} , што омогућава поређење задржавања различитих једињења, а сам процес анализе и овдје је у потпуности аутоматизован.

6.3.3. Партициони и адсорпциони ретенциони модели

Партициони и адсорпциони ретенциони модели (изрази (14) и (15)) прилагођени су експерименталним подацима, а добијени коефицијенти модела приказани су у табелама 26 – 29. За HILIC регион дати су подаци у табелама 26 (амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће) и 27 (диклофенак-калијум, ибупрофен, кофеин и парацетамол), док су за RP-HPLC регион резултати приказани у табелама 28 и 29 за исте смјеше једињења.

Табела 26. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа у HILIC региону добијени новоразвијеним софтвером

Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R ²		$\log k_0$	m	R ²
Амидна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	1,24	5,98	0,9719		– 0,94	1,54	0,9964
Нечистоћа В	1,24	5,98	0,9719		– 0,94	1,54	0,9964
Нечистоћа С	1,24	5,97	0,9730		– 0,93	1,53	0,9938
Нечистоћа D	1,18	4,73	0,9829		– 0,74	1,44	0,9965
Нечистоћа F	1,30	4,95	0,9849		– 0,71	1,51	0,9950
Амино стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	0,77	7,09	0,9971		– 1,96	2,00	0,9816
Нечистоћа В	0,79	7,18	0,9961		– 1,97	2,02	0,9755
Нечистоћа С	1,11	9,06	0,9950		– 2,38	2,56	0,9811
Нечистоћа D	0,86	6,63	0,9929		– 1,52	1,67	0,9739
Нечистоћа F	1,11	7,94	0,9978		– 1,58	1,85	0,9767
Диолна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	0,30	3,33	0,9605		– 0,91	0,86	0,9960
Нечистоћа В	0,36	3,66	0,9631		– 0,98	0,95	0,9979
Нечистоћа С	0,99	8,09	0,9654		– 1,64	1,79	0,9957
Нечистоћа D	0,44	3,91	0,9932		– 0,82	0,85	0,9966
Нечистоћа F	0,63	4,87	0,9877		– 0,94	1,07	0,9986
Силика стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	1,34	4,78	0,9837		– 0,86	1,77	0,9971
Нечистоћа В	1,36	4,84	0,9868		– 0,87	1,79	0,9967
Нечистоћа С	1,44	5,47	0,9716		– 1,09	2,04	0,9969
Нечистоћа D	1,46	5,01	0,9842		– 0,85	1,85	0,9972
Нечистоћа F	1,54	5,01	0,9844		– 0,77	1,86	0,9973

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

Табела 27. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола у HILIC региону добијени новоразвијеним софтвером

Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2		$\log k_0$	m	R^2
<i>Амидна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	0,92	14,60	0,9396		- 4,40	3,77	0,9717
Ибупрофен	0,51	7,70	0,9600		- 2,29	1,99	0,9918
Кофеин	0,11	1,52	0,9689		- 0,66	0,39	0,9959
Парацетамол	0,14	2,82	0,9636		- 1,12	0,68	0,9923
<i>Амино стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	1,65	7,94	0,9601		- 1,30	2,14	0,9898
Ибупрофен	1,50	5,45	0,9598		- 0,73	1,68	0,9941
Кофеин	- 0,10	2,06	0,9852		- 0,90	0,59	0,9985
Парацетамол	- 0,15	2,36	0,9858		- 0,96	0,56	0,9969
<i>Диолна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	0,49	5,73	0,9658		- 1,31	1,18	0,9982
Ибупрофен	0,43	7,09	0,9980		- 1,16	1,18	0,9866
Кофеин	- 0,05	3,18	0,9848		- 0,91	0,54	0,9985
Парацетамол	- 0,07	3,03	0,9965		- 0,94	0,56	0,9817

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

Поређењем резултата добијених употребом *Microsoft Excel*-а (табеле 9 и 17) и употребом новоразвијеног софтвера (табеле 26 и 27) може се видјети да се вриједности R^2 поклапају само у случајевима када се највећа вриједност R^2 може остварити кориштењем свих седам крајњих тачака HILIC региона. Међутим, *Python* софтвер процјењује квалитет модела кориштењем различитих сетова података. Због тога сам софтвер проналази квалитетнија рјешења чак и онда када користи мањи број података (поглавље 5.1.4), што доводи до скраћивања времена статистичке анализе и до већих вриједности R^2 (табеле 26 и 27).

Табела 28. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа у RP-HPLC региону добијени новоразвијеним софтвером

Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R ²		$\log k_0$	m	R ²
Амидна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	- 4,70	- 6,12	0,9965		1,38	- 12,41	0,9961
Нечистоћа А	- 5,41	- 6,49	0,9977		1,02	- 12,98	0,9971
Нечистоћа В	- 5,44	- 7,09	0,9979		1,58	- 14,18	0,9968
Нечистоћа С	- 4,56	- 5,75	0,9906		1,15	- 11,65	0,9902
Нечистоћа D	- 3,38	- 4,36	0,9958		0,95	- 8,84	0,9954
Нечистоћа F	- 3,38	- 4,36	0,9958		0,95	- 8,84	0,9954
Нечистоћа G	- 5,41	- 6,49	0,9977		1,02	- 12,98	0,9971
Диолна стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	- 3,62	- 4,73	0,9995		1,07	- 9,36	0,9999
Нечистоћа А	- 4,22	- 6,19	0,9999		1,92	- 12,54	0,9997
Нечистоћа В	- 3,89	- 5,17	0,9998		1,24	- 10,35	0,9999
Нечистоћа С	- 3,17	- 4,32	0,9997		1,11	- 8,74	0,9994
Нечистоћа D	- 3,03	- 3,63	0,9982		0,58	- 7,36	0,9990
Нечистоћа F	- 2,78	- 3,09	0,9997		0,28	- 6,26	0,9999
Нечистоћа G	- 2,98	- 4,49	0,9995		1,47	- 9,10	0,9998
Силика стационарна фаза							
Амитриптилин HCl	- 3,62	- 4,38	0,9816		0,72	- 8,66	0,9774
Нечистоћа А	- 7,40	- 8,08	0,9878		0,63	- 16,71	0,9850
Нечистоћа В	- 3,78	- 4,59	0,9845		0,76	- 9,07	0,9808
Нечистоћа С	- 3,32	- 3,77	0,9771		0,41	- 7,45	0,9725
Нечистоћа D	- 3,07	- 3,64	0,9655		0,54	- 7,19	0,9597
Нечистоћа F	- 2,87	- 3,41	0,9786		0,50	- 6,73	0,9741
Нечистоћа G	- 7,40	- 8,08	0,9878		0,63	- 16,71	0,9850

$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, амитриптилин HCl – амитриптилин-хидрохлорид

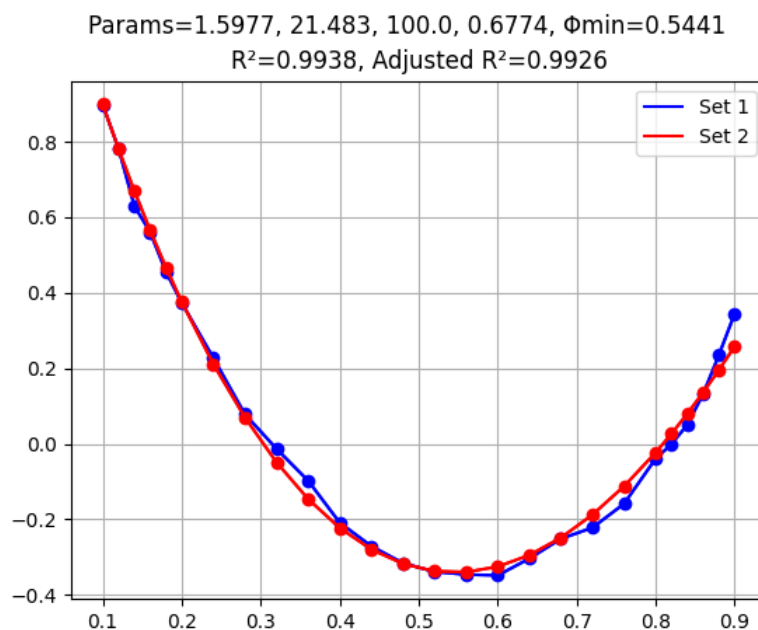
Табела 29. Коефицијенти партиционог и адсорпционог ретенционог модела диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола у RP-HPLC региону добијени новоразвијеним софтвером

Испитивано јед. Стац. фаза	Ретенциони модели						
	Партициони модел $\log k = \log k_0 - m \varphi$				Адсорпциони модел $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$		
	$\log k_0$	m	R^2		$\log k_0$	m	R^2
<i>Амидна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	– 8,13	– 8,20	0,9437		0,03	– 16,96	0,9422
Ибупрофен	– 5,65	– 5,30	0,9877		– 0,38	– 10,95	0,9845
Кофеин	– 1,85	– 2,06	0,9685		0,19	– 4,24	0,9629
Парацетамол	– 1,09	– 1,04	0,9815		– 0,06	– 2,16	0,9815
<i>Амино стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	– 0,78	– 1,56	0,9966		0,76	– 3,08	0,9952
Ибупрофен	– 0,31	– 0,89	0,9779		0,56	– 1,75	0,9731
Кофеин	– 1,42	– 1,11	0,9973		– 0,32	– 2,25	0,9959
Парацетамол	– 1,38	– 1,30	0,9968		– 0,09	– 2,58	0,9955
<i>Диолна стационарна фаза</i>							
Диклофенак К	– 3,98	– 5,23	0,9997		1,23	– 10,82	0,9999
Ибупрофен	– 2,69	– 2,92	0,9994		0,21	– 6,11	0,9998
Кофеин	– 2,89	– 2,97	0,9939		0,07	– 6,28	0,9926
Парацетамол	– 2,21	– 2,56	0,9966		0,34	5,30	0,9944

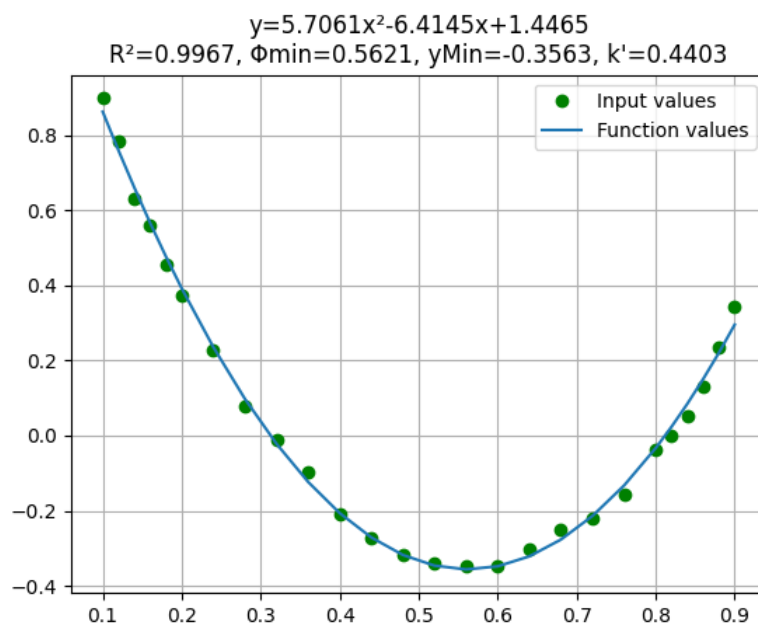
$\log k_0$ – одсјечак линеарног модела, m – нагиб линеарног модела, R^2 – коефицијент детерминације, испитивано јед. – испитивано једињење, стац. фаза – стационарна фаза, диклофенак К – диклофенак-калијум

Употребом новоразвијеног софтвера, добијени статистички резултати из RP-HPLC региона (табеле 28 и 29) показују да постоји квалитетнија процјена анализираних ретенционих модела, с тим да су разлике у појединим случајевима доста израженије (нпр. вриједности R^2 за амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће C, D, F и G на амидној, те амитриптилин-хидрохлорид и нечистоће B, C, D и F на силика стационарној фази (табеле 10 и 28)).

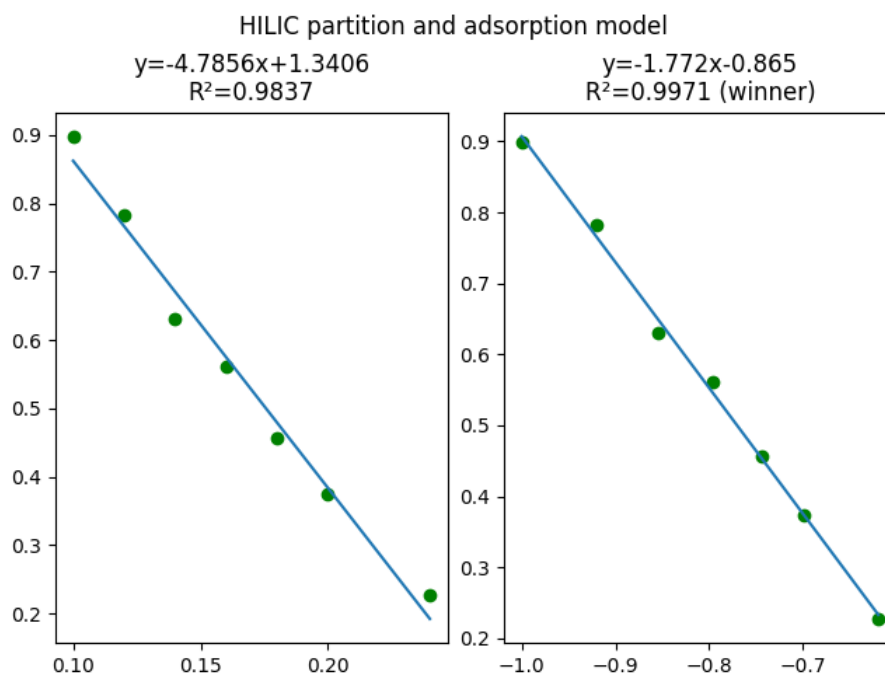
Графички приказ свих резултата омогућен је кориштењем *Matplotlib* библиотеке, а примјери резултата приказани су на сликама 30 – 33.



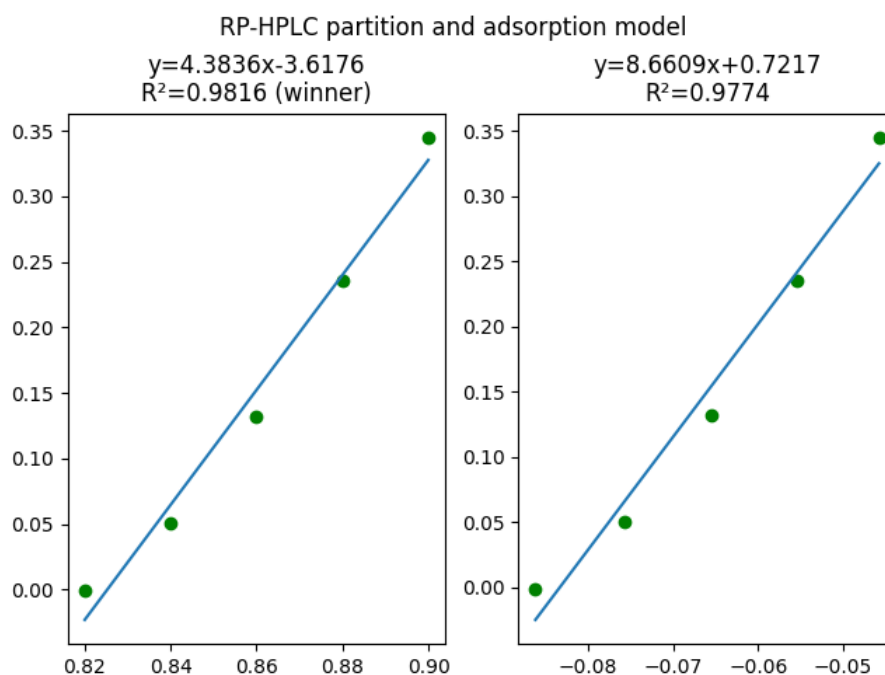
Слика 30. Графички приказ добијених резултата кориштењем *Matplotlib* библиотеке за амитриптилин-хидрохлорид на силика стационарној фази примјеном двојног HILIC/RP-HPLC ретенционог модела



Слика 31. Графички приказ добијених резултата кориштењем *Matplotlib* библиотеке за амитриптилин-хидрохлорид на силика стационарној фази примјеном квадратног ретенционог модела



Слика 32. Графички приказ добијених резултата кориштењем *Matplotlib* библиотеке за амитриптилин-хидрохлорид на силика стационарној фази примјеном партиционог (лијево) и адсорпционог (десно) ретенционог модела у HILIC региону



Слика 33. Графички приказ добијених резултата кориштењем *Matplotlib* библиотеке за амитриптилин-хидрохлорид на силика стационарној фази примјеном партиционог (лијево) и адсорпционог (десно) ретенционог модела у RP-HPLC региону

Анализом графикана двојних HILIC/RP-HPLC ретенционих модела (слике 11, 22 и 30) може се видјети да је облик и правац графикана исти независно од софтвера који је кориштен за статистичку анализу и графичку презентацију резултата. Такође, исти је

облик и правац графикана који описују двојне HILIC/RP-HPLC и квадратне ретенционе моделе (слике 11, 22, 30 и 31). То указује на стабилност наведених модела. Разлози због којих наведени графикони имају исти облик и правац су математичке природе (оба модела имају сличну математичку основу – описују нелинеарну зависност ретенционих фактора од састава мобилне фазе) и физичко-хемијске природе (интеракције између испитиваних једињења и мобилне/стационарне фазе су независне од статистичке анализе). Разлика у свим наведеним случајевима може се огледати у самом положају кривуља, који зависи од вриједности коефицијената модела представљених у одговарајућим табелама (табеле 7, 8, 15, 16, 22, 23, 24 и 25). Наиме, различити софтвери могу користити различите алгоритме за оптимизацију коефицијената модела. Начин на који се прилагођавају модели (нпр. метод најмањих квадрата) може довести до малих разлика у вриједностима коефицијената, што мијења апсолутни положај кривуље, али не и њен општи ток.

Анализом графикана партиционих и адсорпционих ретенционих модела у HILIC и RP-HPLC региону (слике 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25 и 26) такође се може видјети да је облик и правац графикана исти независно од софтвера који је кориштен за статистичку анализу и графичку презентацију резултата. Разлике се, и у овом случају, могу односити на сам положај кривуља, који зависи од вриједности коефицијената модела представљених у одговарајућим табелама (табеле 9, 10, 17, 18, 26, 27, 28 и 29). Додатно, може постојати разлика у броју сетова података на графиконима добијеним употребом новоразвијеног софтвера или нпр. *Microsoft Excel*-а. Разлог томе је, већ описано (поглавље 5.1.4), постојање разлика у броју сетова података са којима новоразвијени софтвер добија најбоље вриједности статистичких параметара (креће се од 5 до 7), док је употребом *Microsoft Excel*-а број тачака увијек 7, односно ручно подешен од стране аналитичара (нпр. слике 14B, 15B и 33).

6.4. РАЗВОЈ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Резултати добијени током детаљног испитивања ретенционих механизма кофеина и парацетамола послужили су као свеобухватна прелиминарна истраживања за развој, оптимизацију и валидацију нове HILIC методе. Планирање експеримената вршено је тако да се развије поуздана, тачна и репродуктивна метода, али и да се истовремено у највећој могућој мјери испоштују принципи еколошке прихватљивости (GAC и WAC). Једним дијелом, све наведено је постигнуто примјеном AQbD приступа.

До сада је развијено више спектрометријских [145 – 147], хроматографских [148 – 152] и ултразвучно-микроекстракцијских метода [153, 154] за анализу кофеина и парацетамола. Ипак, прегледом литературе утврђено је да до сада није развијена HILIC метода за анализу ових једињења. AQbD приступ кориштен је за развој метода за анализу антихипертензивних лијекова [155, 156], лијекова из групе антидепресива [103, 157] и бројних других лијекова [49, 158 – 161]. Међутим, литературни подаци о развоју хроматографских метода примјеном AQbD концепта у комбинацији са принципима „зелене“ аналитичке хемије су врло оскудни, док додатна интеграција са принципима „бијеле“ аналитичке хемије није описана.

6.4.1. Развој методе – дефинисање жељених особина (енгл. *Analytical Target Profile* – ATP) и критичних одговора HILIC система (енгл. *Critical Method Attributes* – CMAs)

Први корак код примјене AQbD приступа у развоју методе јесте дефинисање ATP према планираној намјени методе. С обзиром да новоразвијена метода треба да омогући идентификацију и одређивање садржаја API, минимални захтјеви које мора да испуни су задовољавајуће задржавање (k – ретенциони фактор) и потпуно раздвајање испитиваних једињења (R_s – фактор резолуције), те прихватљиве вриједности фактора симетрије хроматографских пикова (A_s). Када се говори о поштовању принципа GAC и WAC, томе се може додати и оптимално вријеме трајања хроматографске анализе (t_R – ретенционо вријеме једињења које последње елуира), у циљу смањења продукције отпада [115, 162, 163].

Пратећи постављене АТР захтјеве, дефинишу се одговарајући СМАС, чије праћење/контролисање омогућава постизање задатог АТР. С тим у вези, СМАС су дефинисани као:

- задовољавајући ретенциони фактор једињења које прво елуира ($k_{(КОФ)} > 1,00$),
- задовољавајући фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола ($R_{s(КОФ, ПАР)} \geq 1,20$),
- фактор симетрије критичног хроматографског пика ($A_{s(ПАР)}$ између 0,80 и 1,50 при чему је циљ постизање вриједности 1,00) и
- минимално прихватљиво ретенционо вријеме једињења које посљедње елуира ($t_{R(ПАР)}$ минимално) [164].

6.4.2. Процјена ризика квалитета (енгл. *Quality Risk Assessment – QRA*) и идентификовање критичних параметара методе (енгл. *Critical Method Parameters – CMPs*)

Наредни корак у примјени АQbD приступа подразумијева процјену ризика квалитета (QRA) и идентификовање критичних параметара методе (CMPs) [100]. За QRA је кориштен *Ishikawa* дијаграм, чија је употреба омогућила подјелу параметара методе у различите категорије које се тичу: узорка, уређаја, стационарне и мобилне фазе (слика 6). Хидрофилност узорка је пожељна особина, када се једињења анализирају HPLC методом. Провјером растворљивости утврђено је да овај фактор није критичан, јер се парацетамол и кофеин добро растварају у свим растварачима који су кориштени у овим истраживањима (ацетонитрил, метанол, етанол и вода). Инструментални параметри идентификовани су као некритични, јер се могу лако физички контролисати (оптималне вриједности утврђене током прелиминарне фазе истраживања – проток мобилне фазе 1 mL min⁻¹, таласна дужина детекције 225 nm и запремина инјектовања 10 µL). Избор одговарајуће стационарне фазе је кључни корак за успјешно раздвајање испитиваних једињења, те су и фактори који се тичу стационарне фазе веома значајни [25]. Прегледом резултата истраживања утицаја врсте стационарне фазе на ретенционо понашање (поглавље 6.2.8), може се закључити да ће се примјеном диолне стационарне фазе добити најоптималнији резултати за анализу испитиваних једињења. Температура стационарне фазе, чије вриједност треба да буде контролисана, означена је као један од CMPs. На крају, процијењен је утицај фактора мобилне фазе. Одговарајући тип пуфера (ацетатни пуфер) одабран је још током процјене утицаја врсте пуфера на ретенционо

понашање испитиваних једињења (поглавље 6.2.2). Тип органског растварача је веома значајан фактор, посебно када се узме у обзир да је један од циљева новоразвијене методе еколошка прихватљивост. Ипак, приликом испитивања различитих „зелених“ органских растварача (метанол, етанол и вода) дошло се до закључка да нити један од њих не обезбјеђује задовољавајуће задржавање испитиваних једињења на стационарној фази, као ни фактор симетрије њихових хроматографских пикова. Због тога је, за даља истраживања, одабран ацетонитрил чија примјена превазилази ове недостатке. Наиме, ацетонитрил омогућава формирање стабилног воденог слоја на површини поларних стационарних фаза. То омогућава ефикаснију интеракцију испитиваних једињења са псеудо-стационарном фазом, што доводи до дужег задржавања испитиваних једињења на стационарној фази. Такође, ацетонитрил је мање поларан у поређењу са метанолом, етанолом и водом те има слабију елуациону моћ од наведених растварача (што доводи до продуженог задржавања испитиваних једињења). Додатно, метанол, етанол и вода могу довести до формирања јаким секундарних интеракција (нпр. водоничним везама) између испитиваних једињења и стационарне фазе. То може довести до појаве асиметричних хроматографских пикова [8, 32]. Фактори мобилне фазе: концентрација пуфера, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе и садржај органског растварача, означени су као СМРс.

6.4.3. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Истраживање ретенционих механизма омогућило је идентификацију CQAs и CMPs, као и дефинисање распона CMPs који ће се примијенити у току процеса оптимизације хроматографског раздвајања кофеина и парацетамола. Границе за поједине CMPs постављене су на сљедећи начин:

- садржај ацетонитрила: 93 % – 97 %
- концентрација пуфера: 5 – 25 mmol L⁻¹
- рН вриједност воденог дијела мобилне фазе: 5,00 – 7,00
- температура стационарне фазе: 15 – 35 °C.

У складу са AQbD концептом, овај корак спроводи се употребом DoE вишег реда. За ову анализу је одабран CCD, због тога што, за разлику од BBD за који је потребан нешто мањи број експеримената, обезбјеђује испитивање фактора и на горњим и на доњим нивоима (поглавље 1.1.3.4). Оваква свеобухватност у истраживању оптималних вриједности CMPs може бити од значаја, посебно када се ради о садржају органског растварача. По спровођењу експеримената према плану CCD (табела 3), праћене су вриједности ретенционих времена испитиваних једињења, фактор симетрије хроматографског пика парацетамола и ширине хроматографских пикова кофеина и парацетамола. На основу тих вриједности израчунате су одговарајуће вриједности ретенционог фактора кофеина (израз (7)) и фактора резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола (израз (9)) и представљене у табели 30.

Табела 30. Резултати оптимизације методе добијени према плану CCD

No	k (коф)	t _R (пар) (min)	As (пар)	Rs (коф, пар)
1	1,07	4,01	0,88	5,18
2	1,24	4,64	1,05	11,77
3	1,08	3,99	0,82	4,08
4	1,24	4,65	0,94	11,90
5	1,09	4,01	0,99	4,11
6	1,23	4,62	1,06	11,76
7	1,07	4,02	0,96	4,47
8	1,23	4,62	1,04	11,82
9	0,97	3,77	1,23	5,00
10	1,12	4,15	0,96	8,82
11	0,97	3,74	1,20	4,37
12	1,12	4,14	0,94	8,41
13	0,97	3,76	1,25	4,65
14	1,13	4,14	0,83	8,40
15	0,98	3,76	1,22	3,81
16	1,12	4,15	0,82	8,50
17	1,02	3,87	1,07	4,46
18	1,17	4,34	1,00	10,24
19	1,09	4,19	0,95	9,16
20	1,09	4,16	0,92	8,68
21	1,09	4,16	0,94	8,76
22	1,09	4,19	0,90	9,09
23	1,14	4,38	0,98	9,51
24	1,04	4,00	0,93	8,07
25	1,09	4,17	0,94	8,82
26	1,09	4,17	0,94	8,81
27	1,09	4,18	0,86	8,65
28	1,09	4,17	0,92	6,95
29	1,09	4,17	0,94	8,70
30	1,09	4,16	0,93	8,57

No – Редни број експеримента (*standard order*), k (коф) – ретенциони фактор кофеина, t_R (пар) – ретенционо вријеме парацетамола, As (пар) – фактор симетрије хроматографског пика парацетамола, Rs (коф, пар) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола

Полином другог реда, представљен изразом (13), прилагођен је експериментално добијеним подацима. Примјена ANOVA омогућила је детаљну анализу коефицијената креираних математичких модела (табела 31).

Табела 31. Резултати ANOVA теста – коефицијенти креираних математичких модела и њихова статистичка анализа

Коеф.	k (КОФ)		Rs (КОФ, ПАР)		As (ПАР)		tr (ПАР) (min)	
	в.коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.	в.коеф.	p вријед.	в.коеф.	p вријед.
b ₀	1,0900	–	8,6200	–	0,9312	–	4,1700	–
b ₁	0,0767	< 0,0001 *	2,8600	< 0,0001*	– 0,0544	< 0,0001*	0,2511	< 0,0001*
b ₂	– 0,0006	0,6489	– 0,1561	0,2087	– 0,0189	0,0448*	– 0,0033	0,2353
b ₃	0,0006	0,6489	– 0,0933	0,4445	0,0061	0,4896	0,0011	0,6860
b ₄	– 0,0539	< 0,0001 *	– 0,8094	< 0,0001*	0,0367	0,0007*	– 0,1850	< 0,0001*
b ₁₂	– 0,0006	0,6294	0,1306	0,3165	– 0,0006	0,9464	0,0031	0,2916
b ₁₃	– 0,0019	0,1601	0,0731	0,5704	– 0,0269	0,0102*	– 0,0056	0,0679
b ₁₄	– 0,0019	0,1601	– 0,8194	< 0,0001*	– 0,1119	< 0,0001*	– 0,0594	< 0,0001*
b ₂₃	– 0,0019	0,1601	0,1056	0,4152	0,0081	0,3886	0,0044	0,1468
b ₂₄	0,0006	0,6294	– 0,0769	0,5511	0,0081	0,3886	– 0,0019	0,5219
b ₃₄	0,0019	0,1601	– 0,0294	0,8189	– 0,0356	0,0014*	0,0019	0,5219
b ₁₁	0,0069	0,0440 *	– 1,4700	0,0003*	0,0942	0,0009*	– 0,0648	< 0,0001*
b ₂₂	0,0019	0,5496	0,1049	0,7423	– 0,0058	0,8025	0,0052	0,4776
b ₃₃	0,0019	0,5496	0,1099	0,7305	– 0,0208	0,3750	0,0052	0,4776
b ₄₄	0,0019	0,5496	– 0,0251	0,9372	0,0142	0,5414	0,0202	0,0124*
R ²	0,9976		0,9797		0,9489		0,9989	
Adjusted R ²	0,9953		0,9607		0,9011		0,9979	
Predicted R ²	0,9808		0,9503		0,7911		0,9940	
Adeq Precision	75,60		22,33		16,27		111,61	
Lack of fit	–		0,9782		0,3264		–	

Коеф. – коефицијент модела, в. коеф. – вриједност коефицијента, *p* вријед. – *p* вриједност, b₀ – одсјечак модела, b₁, b₂, b₃ – регресиони коефицијенти линеарних чланова (1 – садржај ацетонитрила [%], 2 – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], 3 – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, 4 – температура стационарне фазе [°C]), b₁₂, b₁₃, b₂₃ – регресиони коефицијенти факторских интеракција, b₁₁, b₂₂, b₃₃ – регресиони коефицијенти квадратних чланова, k (КОФ) – ретенциони фактор кофеина, Rs (КОФ, ПАР) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола, As (ПАР) – фактор симетрије хроматографског пика парацетамола, tr (ПАР) – ретенционо вријеме парацетамола

* статистички значајан коефицијент за *p* вриједност ≤ 0,05

Експериментални резултати показују снажну корелацију са вриједностима које су предвиђене математичким моделом (табела 31), што потврђују високе вриједности R^2 ($> 0,94$) и $Adj R^2$ ($> 0,90$), који су у прихватљивим границама ($\geq 0,80$). Ово указује на добре предиктивне способности модела. Одсуство значајних вриједности *Lack of fit*, мале разлике између $Adj R^2$ и $Pred R^2$ ($\leq 0,11$), као и високе вриједности *Adeq Precision* (≥ 16), указују да се овај модел може користити за предвиђање DS-a [95, 117].

Овом анализом добијене су једначине које обухватају само статистички значајне CMPs: за k (КОФ):

$$y = 1,09 + 0,08 A - 0,05 D + 0,01 A^2 \quad (29)$$

за Rs (КОФ, ПАР):

$$y = 8,62 + 2,86 A - 0,81 D - 0,82 AD - 1,47 A^2 \quad (30)$$

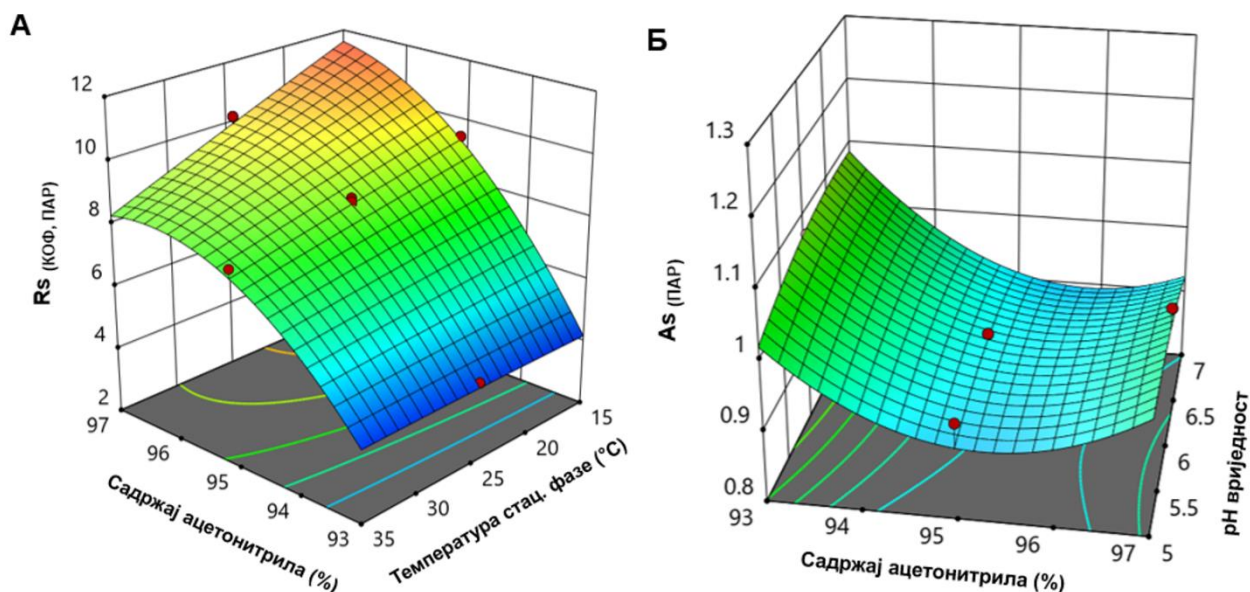
за As (ПАР):

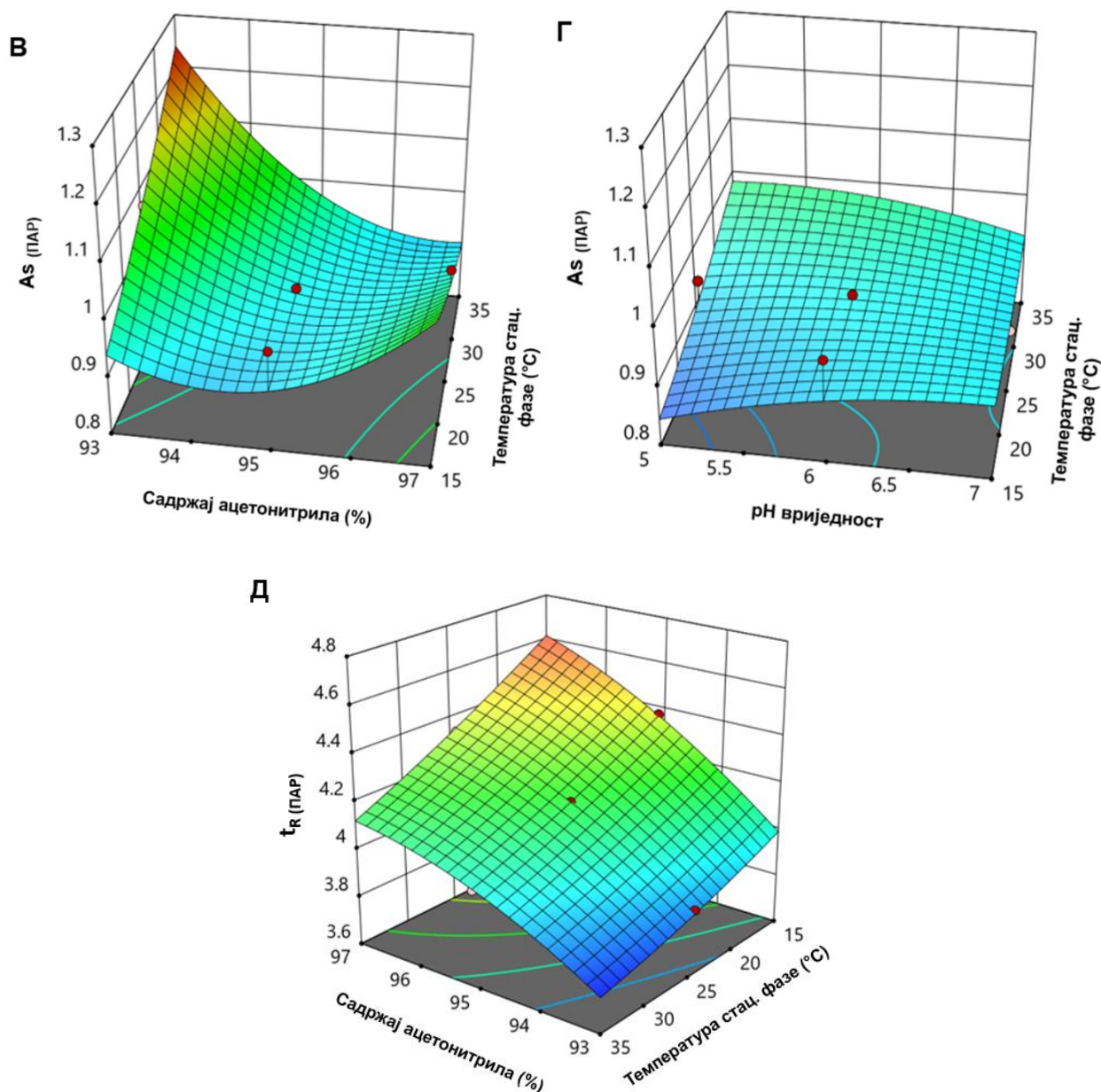
$$y = 0,93 - 0,05 A - 0,02 B + 0,04 D - 0,03 AC - 0,11 AD - 0,04 CD + 0,09 A^2 \quad (31)$$

за tr (ПАР):

$$y = 4,17 + 0,25 A - 0,19 D - 0,06 AD + 0,04 A^2 \quad (32)$$

Статистички значајне факторске интеракције представљене су у виду 3D-графикана површине одговора (слика 34).





Слика 34. 3D-графикони површине одговора за (А) $Rs_{(КОФ,ПАР)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, (Б) $As_{(ПАР)} = f(\text{садржај ацетонитрила, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (В) $As_{(ПАР)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, (Г) $As_{(ПАР)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$ и (Д) $t_{R(ПАР)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, pH вриједност – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе

Статистичка (табела 31) и графичка (слика 34) интерпретација добијених резултата омогућила је дефинисање утицаја CMPs на CMAs, што је довело до сљедећих закључака:

$k_{(КОФ)}$ је под снажним утицајем садржаја ацетонитрила (b_1) и температуре стационарне фазе (b_4), при чему његове вријености расту са повећањем садржаја ацетонитрила и смањењем температуре стационарне фазе. Наиме, повећањем садржаја ацетонитрила у мобилној фази истовремено се смањује садржај воденог дијела мобилне фазе и

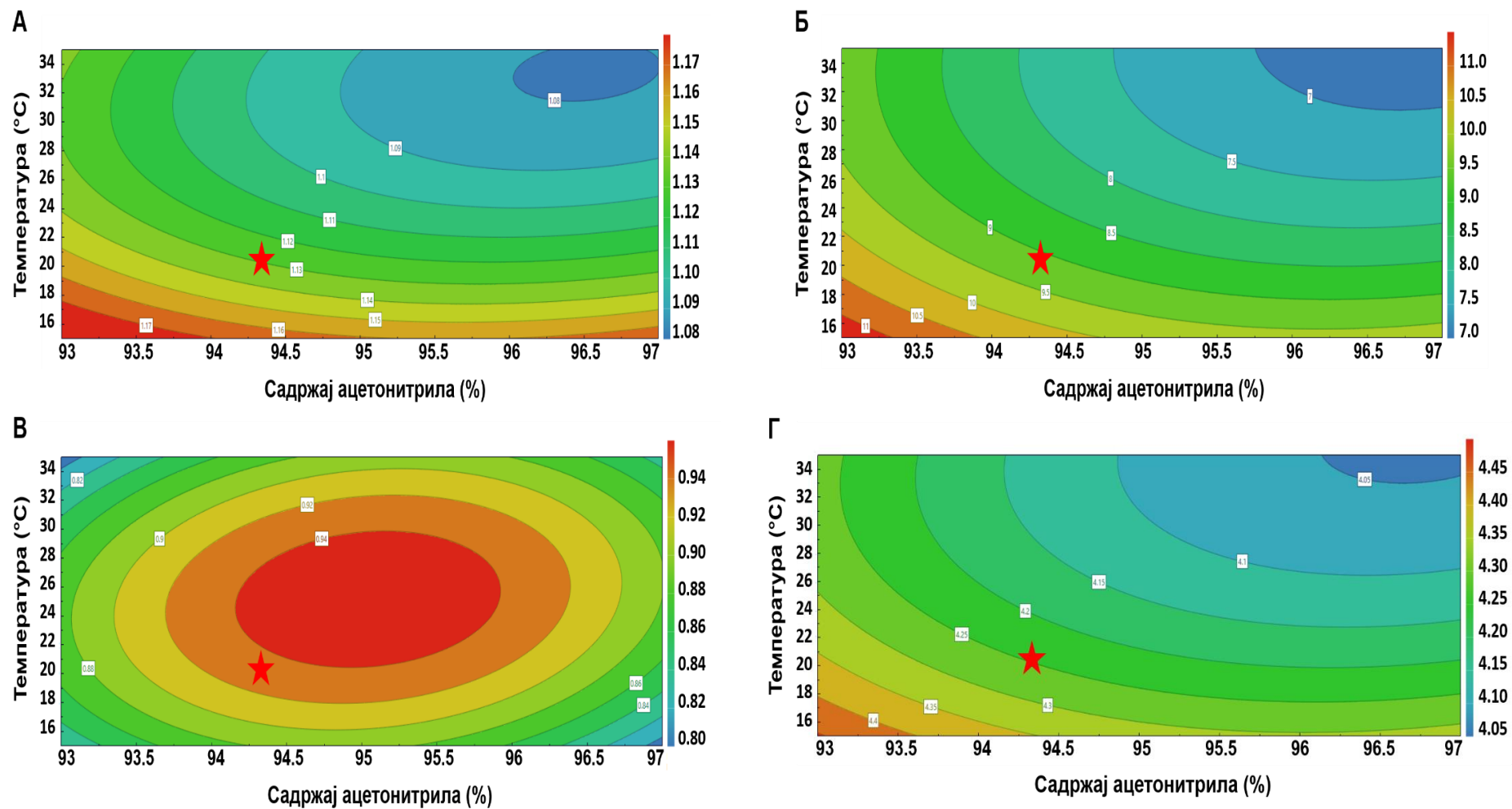
концентрација расположивих јона пуфера. То доводи до повећања хидрофобности мобилне фазе, због чега се на површини стационарне фазе формира псеудо-стационарна фаза гдје се дешавају интеракције између поларних испитиваних једињења и поларне стационарне фазе. Са повећањем садржаја ацетонитрила, поларна једињења у већем степену остварују интеракције са површином стационарне фазе, што доводи до њиховог продуженог задржавања у стационарној фази [6]. Смањењем температуре стационарне фазе успоравају се кинетички процеси расподјеле, те долази до појачања интеракција између испитиваних једињења и стационарне фазе, чиме се постиже дуже задржавање испитиваних једињења [22]. R_s (КОФ, ПАР) био је под утицајем садржаја ацетонитрила (b_1), температуре стационарне фазе (b_4) и њихове двофакторске интеракције (b_{14}), при чему се вриједност R_s повећавала са повећањем садржаја ацетонитрила и смањењем температуре колоне (слика 34А) [165]. A_s (ПАР) био је под утицајем: садржаја ацетонитрила (b_1) (повећава се са смањењем садржаја ацетонитрила), концентрације пуфера (b_2) (повећава се са смањењем концентрације пуфера), температуре стационарне фазе (b_4) (повећава се са повећањем температуре стационарне фазе), као и интеракција: садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_{13}), садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе (b_{14}) и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе (b_{34}) (слика 34Б, 34В и 34Г).

Диолна стационарна фаза, кориштена у овом истраживању, није била подвргнута *end-capping* процедури приликом производње, због чега на њеној површини постоји одређена количина слободних силанолних група. Ове групе омогућавају стварање јонских интеракција које, у комбинацији са утицајем рН вриједности воденог дијела мобилне фазе, доводе до варирања дебљине воденог слоја адсорбованог на површини стационарне фазе, те посљедично утичу на A_s (ПАР) [17, 143]. Параметар t_R (ПАР) био је под утицајем садржаја ацетонитрила, температуре стационарне фазе и њихове интеракције. Парацетамол је показивао продужено задржавање са повећањем садржаја ацетонитрила и смањењем температуре стационарне фазе. У HPLC систему, t_R и k испитиваног једињења повећавају се са повећањем садржаја ацетонитрила. Разлог томе је што висок садржај ацетонитрила омогућава да вода (из воденог дијела мобилне фазе) буде снажно адсорбована на површини стационарне фазе. Формирањем воденог слоја успоставља се додатни ретенциони механизам раподјеле/партиције (течно-течна расподјела) испитиваних једињења, те се продужава задржавање поларних једињења [17, 166, 167]. Више температуре стационарне фазе доприносе бољој растворљивости и дифузивности

испитиваних једињења, смањују вискозитет растварача и унапређују кинетику расподеле. Као резултат тога, добијају се повољнији облици хроматографских пикова, већа ефикасност стационарне фазе и краће вријеме задржавања. Повишене температуре обично смањују задржавање испитиваних једињења у HILIC системима, смањујући разлике у кохезивној енергији и поларним интеракцијама између мобилне и стационарне фазе [22, 49].

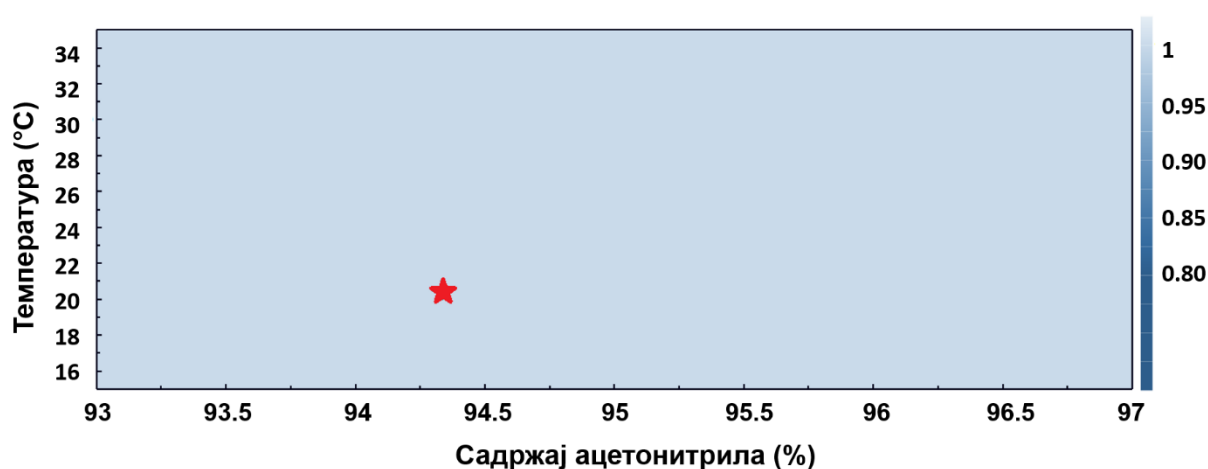
6.4.3.1. Дефинисање робусног региона – *Design Space* (DS)

На основу резултата описаних у претходном поглављу, уз кориштење MODDE софтвера, а према дефинисаном АТР, креирани су одговарајући 2D-графикони, који приказују утицај CMPs на испитиване CMAs (слика 35).



Слика 35. 2D контуре површине одговора за (А) ретенциони фактор кофеина, (Б) фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола, (В) фактор симетрије хроматографског пика парацетамола и (Г) ретенционо вријеме парацетамола. Црвена звјезда представља позицију робусне тачке

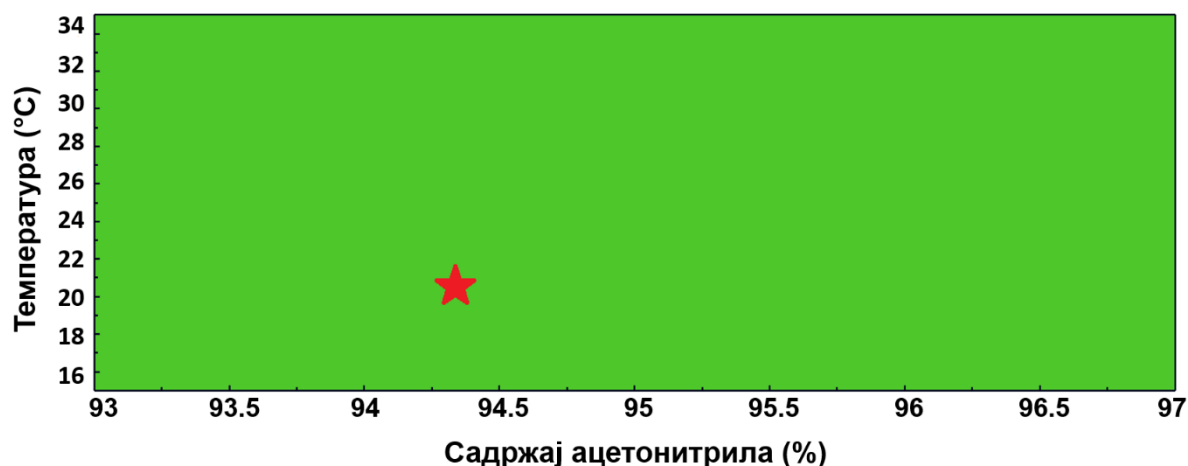
2D графикони служе за идентификацију оптималних вриједности CMPs, осигуравајући да CMAs испуне дефинисане захтјеве (слика 35). Међутим, истовремена оптимизација више одговора је изазовна због потенцијално супротстављених захтјева праћених одговора. Због тога је дио MODDE® софтвера Дерингера функција пожељности одговора која, кроз скалу пожељности представљену *Desirability* плотом, врши трансформацију више одговора у један обједињени критеријум, чији је циљ постизање глобалног оптимума. Глобални оптимум дефинише се на основу вриједности Дерингерове функције за сваки појединачни одговор, које одговарају постављеним ATPs (слика 36) [47].



Слика 36. *Desirability* плот. Црвена звјездица представља позицију робусне тачке

Циљна вриједност функције (1,00) постиже се у широком распону садржаја ацетонитрила и температуре стационарне фазе, при рН вриједности воденог дијела мобилне фазе 5,80 и концентрацији пуфера 17 mmol L⁻¹ (слика 36).

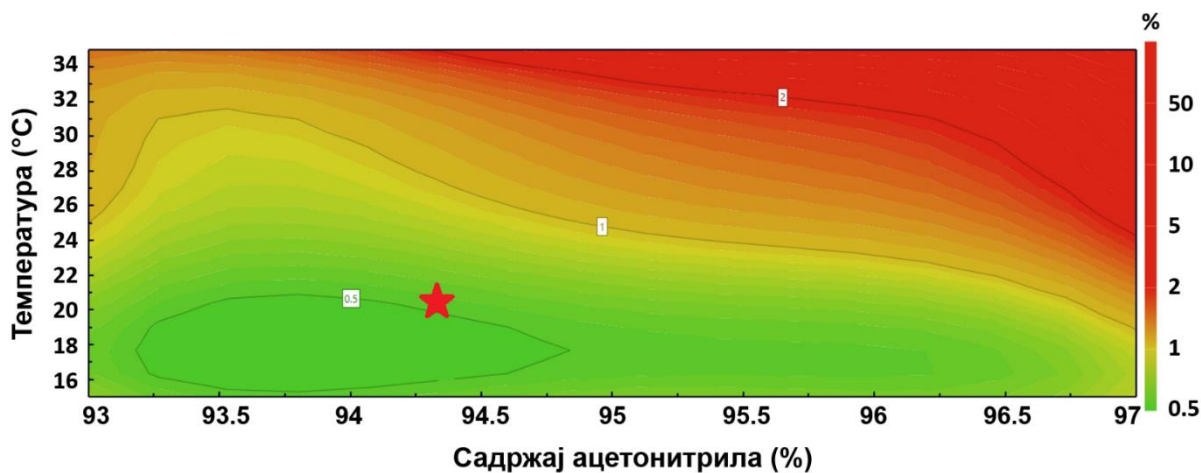
На основу вриједности Дерингерове функције пожељности, преклапањем 2D-графика дефинише се *sweet spot* област, која представља област у којој су сви постављени критеријуми АТР испуњени (слика 37).



Слика 37. *Sweet spot* област. Црвена звјезда представља позицију робусне тачке

Пространа зелена површина указује на флексибилност у подешавању различитих комбинација CMPs уз задржавање жељених одговора унутар дефинисаних граница (слика 37). Важно је напоменути да нису сви одговори унутар зелене зоне нужно робусни. Стога, овај графикон приказује само распон температуре стационарне фазе и садржаја ацетонитрила као област у којој ће бити постигнуте жељене вриједности CQAs. Међутим, како би се дефинисала област робусног региона потребно је креирати DS (распон CMPs као област унутар које су вриједности CQAs робусне) [103]. Овај робусни регион је утврђен кориштењем *Monte Carlo* симулација и математичких модела добијених кроз MODDE[®] софтвер са нивоом прихватања од 1 % (слика 38) и дефинисан је на следећи начин:

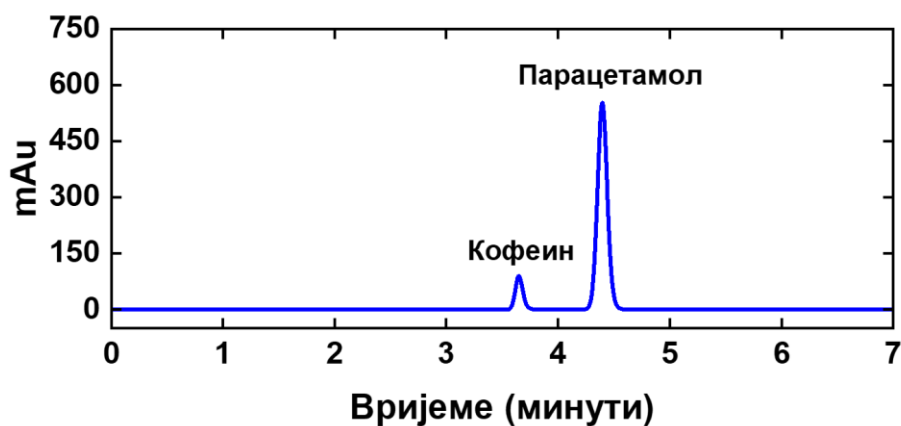
- 93,08 % – 96,58 % за садржај ацетонитрила,
- 12,10 – 23,30 mmol L⁻¹ за концентрацију пуфера,
- 5,05 – 6,80 за pH вриједност воденог дијела мобилне фазе и
- 15,30 – 27,80 °C за температуру стационарне фазе.



Слика 38. *Design Space*. Црвена звјезда представља позицију робусне тачке

6.4.3.2. Дефинисање оптималних хроматографских услова

На основу креирања и постављених јасних граница DS-а, софтвер је предложио робусну тачку – скуп вриједности CMPs за које су посматрани CMAs дефинисани као робусни: 94,50 % за садржај ацетонитрила; 17,10 mmol L⁻¹ за концентрацију пуфера; 5,80 за pH вриједност воденог дијела мобилне фазе и 20 °C за температуру стационарне фазе. Ове вриједности представљају уједно и оптималне хроматографске услове. Међутим, из практичних разлога, у експерименталним условима је вриједност концентрације пуфера заокружена на 17,00 mmol L⁻¹, без утицаја на квалитет методе. Хроматограм добијен под наведеним оптималним условима приказан је на слици 39.



Слика 39. Хроматограм раздвајања кофеина и парацетамола на диолној стационарној фази добијен под оптималним хроматографским условима: садржај ацетонитрила 94,50 %, концентрација пуфера 17 mmol L⁻¹, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе 5,80 и температура стационарне фазе 20 °C

6.4.4. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ МЕТОДЕ И ДЕФИНИСАЊЕ ПАРАМЕТАРА ЗА ПРОЦЈЕНУ ПОГОДНОСТИ СИСТЕМА

Када се развој и оптимизација спроводе у оквиру AQbD концепта, квалитет аналитичке методе се континуирано унапређује током свих фаза њеног животног циклуса. Стога испитивање робусности представља само потврду стабилности методе у изабраним хроматографским условима. За испитивање робусности методе кориштен је FrFD⁴⁻¹ који је омогућио процјену утицаја четири испитивана CMPs на дефинисане CMAs (табела 4). Испитивани CMPs и праћени CMAs нису показали значајна одступања у току процеса оптимизације методе, иако су у питању фактори који имају велики утицај на CMAs и обавезан су дио студија робусности (поглавља 6.4.1. и 6.4.2). Резултати испитивања робусности методе приказани су у табели 24.

Табела 32. Резултати робусности методе примјеном FrFD⁴⁻¹

No	k (коф)	Rs (коф, пар)	As (пар)	tr (пар)
1	1,10	7,66	1,12	4,20
2	1,11	9,32	1,02	4,26
3	1,07	6,90	1,16	4,07
4	1,15	6,63	0,96	4,37
5	1,06	6,34	1,01	4,05
6	1,15	8,89	0,96	4,39
7	1,09	6,26	1,06	4,15
8	1,11	9,23	0,92	4,24
9	1,11	9,34	0,98	4,26
10	1,11	9,40	0,96	4,27
11	1,10	9,38	1,04	4,22

No – редни број експеримента (*standard order*), k (коф) – ретенциони фактор кофеина, tr (пар) – ретенционо вријеме парацетамола [min], As (пар) – фактор симетрије хроматографског пика парацетамола, Rs (коф, пар) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола

Анализом добијених резултата (табела 32) може се видјети да са малим промјенама у вриједностима CMPs неће доћи до значајних промјена у вриједностима CMAs, што потврђује робусност методе. Поред тога, може се видјети да је за све критичне експерименталне услове:

- вриједност $k_{(коф)} \geq 1,00$ (минимална вриједност при којој је задржавање испитиваног једињења задовољавајуће),
- вриједност $R_{s(коф, пар)}$ значајно веће од 1,20 (минимална вриједност при којој се раздвојеност хроматографских пикова сматра задовољавајућом за квантитативну анализу 1,20),

- вриједност $As_{(ПАР)}$ између 0,80 и 1,50 (блиске идеалној, Гаусовој симетрији), те да је
- вриједност $t_{R(ПАР)}$, као једињења које последње елуира увијек око 4 минуте (задовољавајуће кратко вријеме хроматографске анализе).

Резултати добијени спровођењем експеримената према плану FrFD⁴⁻¹ омогућили су, кориштењем *Dong*-овог алгоритма, дефинисање најкритичнијих фактора који значајно утичу на праћене одговоре (нарочито на t_R испитиваних једињења). Овај приступ омогућио је процјену погодности система (SST) и одређивање SST лимита. За све факторе израчунате су вриједности факторских ефеката, као и одговарајуће вриједности $E_{critical}$ (табела 33).

Табела 33. Факторски ефекти CMPs и добијени резултати $E_{critical}$ за CMAs

Фактори	k (КОФ)	Rs (КОФ, ПАР)	As (ПАР)	tr (ПАР)
ацетонитрил	0,0500	1,7275	– 0,1225	0,1975
пуфер	0,0000	– 0,7975	– 0,0025	– 0,0175
pH вриједност	– 0,0050	0,0525	– 0,0775	– 0,0175
температура	– 0,0350	0,5875	0,0025	– 0,1225
$E_{critical} (\alpha = 0,05)$	0,0851	2,7689	0,2016	0,3249

ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази [%], пуфер – концентрација пуфера [mmol L^{-1}], температура – температура стационарне фазе [$^{\circ}\text{C}$], k (КОФ) – ретенциони фактор кофеина, Rs (КОФ, ПАР) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола, As (ПАР) – фактор симетрије хроматографског пика парацетамола, $t_{R(ПАР)}$ – ретенционо вријеме парацетамола [min], $E_{critical}$ – критична вриједност ефекта

Апсолутне вриједности CMAs које су мање од одговарајућих вриједности за $E_{critical}$ (за вјероватноћу од 0,05) потврђују да ни један фактор у испитиваном распону не угрожава квалитет резултата CMAs, што потврђује да је метода робусна (табела 33) [103].

Факторски нивои за најризичније услове анализе (при којима хроматографска анализа даје најлошије резултате) приказани су у табели 34, са одговарајућим SST лимитима (вриједност фактора добијена при најризичнијим условима анализе).

Табела 34. Факторски нивои при најризичнијим условима анализе и SST лимити

Фактори	k (КОФ)	Rs (КОФ, ПАР)	As (ПАР)	t _R (ПАР)
ацетонитрил	– 1	– 1	– 1	+ 1
пуфер	– 1	+ 1	+ 1	– 1
рН вриједност	+ 1	+ 1	– 1	+ 1
температура	+ 1	– 1	+ 1	– 1
SST лимит	1,06	6,26	1,16	4,39

ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази [%], пуфер – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], температура – температура стационарне фазе [°C], k (КОФ) – ретенциони фактор кофеина, Rs КОФ, ПАР) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и парацетамола, As (ПАР) – фактор симетрије хроматографског пика парацетамола, t_R (ПАР) – ретенционо вријеме парацетамола [min], SST – тест погодности система

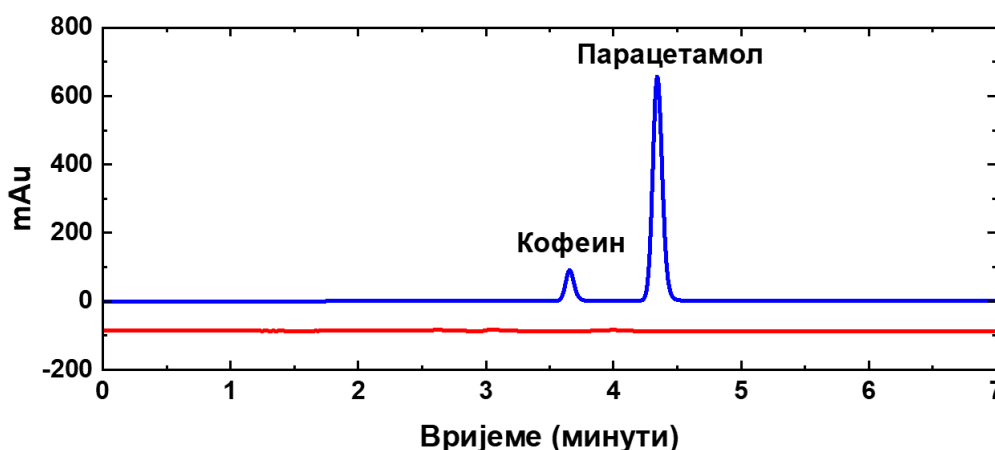
Дефинисани SST лимити потврђују да ће, чак и при најризичнијим условима анализе, метода обезбиједити добијање задовољавајућих резултата, односно резултата који су у складу са дефинисаним АТР (табела 34) [103].

6.4.5. ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Развој методе обухвата три кључне фазе: прелиминарна истраживања, оптимизацију и валидацију. Савремени приступ развоју методе, базиран на AQbD концепту, омогућио је дефинисање оптималних услова унутар робусног региона. Након потврде робусности, спроведено је испитивање преосталих валидационих параметара: селективности, линеарности, осјетљивости, тачности и прецизности.

6.4.5.1. Испитивање селективности методе

Селективност методе испитана је поређењем хроматограма смјеше испитиваних једињења и раствора плацеба (поглавље 4.6.4), добијених под оптималним хроматографским условима (слика 40).

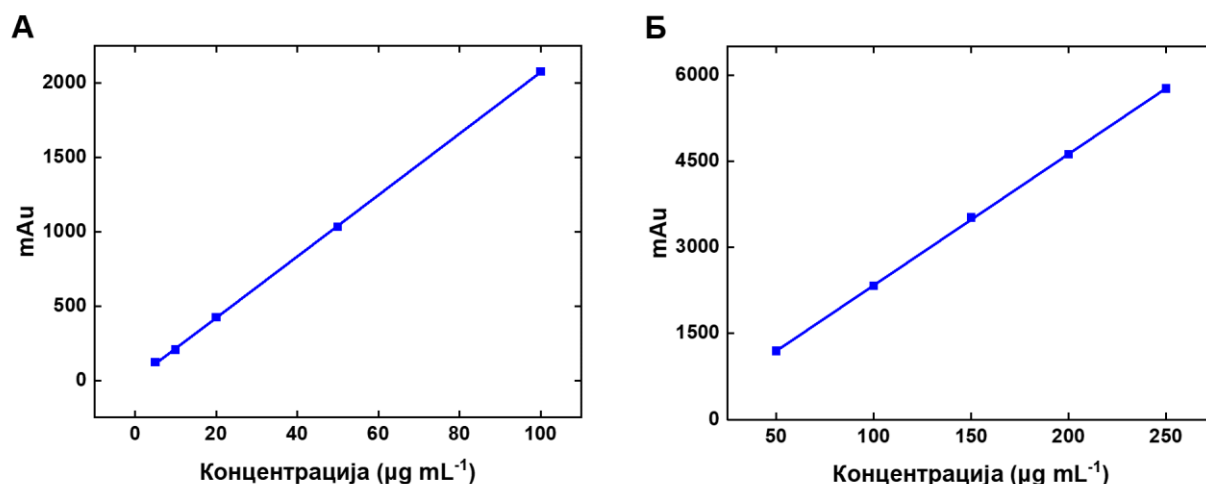


Слика 40. Испитивање селективности методе. Плава линија представља хроматограм смјеше испитиваних једињења, док црвена линија представља хроматограм плацебо смјеше

Анализом добијених хроматограма може се видјети да на положају t_R кофеина и парацетамола, у раствору плацеба, нема пикова који би показали интерференцију са испитиваним једињењима (слика 40), што потврђује селективност методе.

6.4.5.2. Испитивање линеарности методе

Линеарност методе испитана је инјектовањем растућих концентрација раствора кофеина и парацетамола (поглавље 4.6.5), при чему је као одговор система праћена површина њихових хроматографских пикова. На основу добијених резултата, конструисане су одговарајуће калибрационе кривуље које приказују зависност промјене површине хроматографских пикова и концентрације испитиваних једињења (слика 41).



Слика 41. Приказ графика зависности површине хроматографских пикова и концентрације (А) кофеина и (Б) парацетамола. mAu – *miliabsorptive unit*

Са слике 41 може се видјети да повећање концентрације испитиваних једињења доводи до линеарног пораста одговарајућих површина хроматографских пикова. Испитивање линеарности методе извршено је линеарном регресионом анализом, а релевантни статистички параметри приказани су у табели 35.

Табела 35. Статистички параметри за испитивање линеарности методе

Испитивано једињење	Кофеин	Парацетамол
Распон концентарција (µg cm ⁻³)	5,00 – 100,00	50,00 – 250,00
$y = ax + b$	$y = 20,621 x + 10,406$	$y = 22,882 x + 53,34$
Sa	0,1425	0,1447
Sb	7,3360	23,9935
t _b	1,4184	2,2231
Pearson r	1,0000	0,9999

Sa – стандардна девијација нагиба, Sb – стандардна девијација одсјечка, Pearson r – Pearson-ов коефицијент корелације

Анализом добијених резултата (табела 35), прије свега вриједности коефицијената корелације (*Pearson r*) које су веће од 0,9990, може се закључити да у распону испитиваних концентрација метода показује задовољавајућу линеарну зависност промјене површине пика са промјеном концентрације, те да се добијене једначине правих могу користити за поуздану квантитативну анализу испитиваних једињења (табела 35) [168].

6.4.5.3. Испитивање осјетљивости методе

Осјетљивост методе, која се дефинише параметрима LOQ и LOD, испитана је припремом серије раствора испитиваних једињења опадајућих концентрација (поглавље 4.6.6). LOQ изражава ону вриједност која се као најмања концентрација испитиваног једињења може одредити, односно детектовати (LOD), са одговарајућом тачношћу и прецизношћу. Подаци о LOQ и LOD су добијени на основу директног мјерења односа *Signal-to-Noise* (S/N), а добијене вриједности приказане су у табели 36.

Табела 36. Лимит детекције и лимит квантификације кофеина и парацетамола

Испитивано једињење	концентрација ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Signal-to-Noise</i>
Кофеин	0,0250 ¹	21,30
	0,0100 ²	7,60
	0,0050	2,80
Парацетамол	0,0100 ¹	10,70
	0,0050 ²	5,90
	0,0025	3,70

¹ LOQ – лимит квантификације, ² LOD – лимит детекције

Као LOQ означена је она вриједност концентрације за коју је S/N минимално 10 (за кофеин 0,0250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, за парацетамол 0,0100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), док је као LOD означена вриједност концентрације за коју је S/N минимално 3 (за кофеин 0,0100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, за парацетамол 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (табела 36) [110]. Ниске вриједности ових параметара за оба испитивана једињења указују на задовољавајућу осјетљивост методе, односно показују да новоразвијена HILIC метода може да детектује/одреди мале концентрације испитиваних једињења у узорку. То је чини погодном за различите намјене, као што је нпр. праћење фармакокинетичких параметара ових лијекова у биолошким узорцима.

6.4.5.4. Испитивање тачности методе

Тачност методе, која се најчешће изражава као проценат приноса одређивања (*Recovery* вриједност) за познату количину испитиваног једињења додату плацебу, испитана је при концентрацијама од 80 %, 100 % и 120 % у односу на декларисану вриједност (поглавље 4.6.7). На сваком од испитиваних нивоа, израчуната је релативна стандардна девијација, а добијени резултати приказани су у табели 37.

Табела 37. Резултати испитивања тачности методе

Испитивано једињење	Инјектована концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Детектована концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	<i>Recovery</i> * (%)	RSD (%)
Кофеин	16,00 (80 %)	16,03	100,19	0,28
		16,14	100,88	
		16,09	100,56	
	20,00 (100 %)	20,02	100,10	0,22
		19,91	99,55	
		19,96	99,80	
	24,00 (120 %)	24,21	100,88	0,07
		24,22	100,92	
		24,18	100,75	
Парацетамол	123,20 (80 %)	122,81	99,68	0,22
		123,26	100,05	
		123,46	100,21	
	154,00 (100 %)	155,32	100,86	0,13
		155,03	100,67	
		155,54	101,00	
	184,80 (120 %)	183,23	99,15	0,38
		183,61	99,36	
		184,87	100,47	

RSD – релативна стандардна девијација

* *Recovery* вриједност добијена као средња вриједност три узастопна инјектовања истог раствора

Recovery вриједности у границама прихватљивости (100 ± 5 %) и RSD вриједности мање од 2,00 % потврђују да су резултати ових испитивања задовољавајући, те се метода може означити као тачна (табела 37) [110].

6.4.5.5. Испитивање прецизности методе

Прецизност методе, која се изражава релативном стандардном девијацијом између серије мјерења шест раствора исте концентрације, припремљених идентичним поступком, испитана је на нивоу поновљивости на начин описан у поглављу 4.6.8. Добијене вриједности RSD представљене су у табели 38.

Табела 38. Резултати испитивања прецизности методе

Испитивано једињење	Инјектована концентрација (μg cm ⁻³)	Детектована концентрација (μg cm ⁻³)	<i>Recovery</i> [*] (%)	RSD (%)
Кофеин	20,00	20,61	103,05	0,54
		20,72	103,60	
		20,73	103,65	
		20,89	104,45	
		20,90	104,50	
		20,64	103,20	
Парацетамол	154,00	153,40	99,61	0,45
		154,35	100,23	
		153,50	99,68	
		154,81	100,53	
		154,53	100,34	
		152,91	99,29	

RSD – релативна стандардна девијација

* *Recovery* вриједност добијена као средња вриједност три узастопна инјектовања истог раствора

Recovery вриједности (табела 38) које су у границама прихватљивости ($100 \pm 5 \%$) и RSD вриједности за кофеин 0,54 и за парацетамол 0,45, које су мање од 1,00 %, потврђују да је метода прецизна [110].

6.4.6. ПРОЦЈЕНА „ЗЕЛЕНОСТИ“ И ЕФИКАСНОСТИ NILIS МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Развој методе који се одвија примјеном AQbD концепта значајно штеди и вријеме и ресурсе, што доприноси смањењу утицаја цјелокупног процеса развоја, оптимизације и валидације методе на животну средину. Увођењем принципа „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије у процес развоја, могуће је развити врло квалитетну, ефикасну и поуздану методу која је и еколошки прихватљива. Међутим, да би се детаљно процијенила усклађеност новоразвијене методе са GAC и WAC принципима, приступило се анализи методе са различитих становишта. У ову сврху кориштени су најновији софтвери и модели (описани у поглављу 1.5.3), који су изабрани због предности (у погледу свеобухватније и детаљније анализе) у односу на прве верзије софтвера који су кориштени у зачецима GAC. Кориштење више од једног софтвера за процјену истог параметра (нпр. „зеленост“ методе) оправдана је њиховом комплементарношћу. Резултат овог приступа је детаљна процјена усклађености преаналитичког и аналитичког дијела методе са принципима GAC и WAC [169].

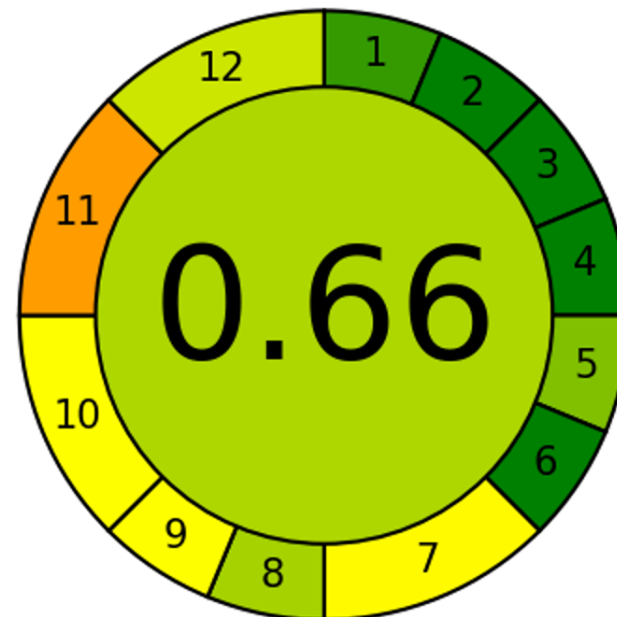
6.4.6.1. Процјена „зелености“ методе примјеном AGREE софтвера

Процјена „зелености“ методе употребом AGREE софтвера спроведена је уносом одговарајућих параметара у кориснички интерфејс. Испитивани параметри груписани су тако да представљају свих 12 принципа GAC (поглавље 1.5.3.1), што омогућава веома лако и брзо идентификовање критичних параметара методе. Након креирања одговарајућег профила методе генерисан је извјештај о „зелености“ методе, који је представљен на слици 42.

A

Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.9	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	1.0	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	1.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.75	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.49	4
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.68	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.5	4
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.31	4
12. Operator's safety should be increased.	0.6	4

Б



Слика 42. Процјена „зелености“ методе примјеном AGREE софтвера. (А) Извјештај генерисан на основу унесених вриједности за испитиване параметре, (Б) Укупан резултат заснован на вриједностима појединачних поља

Анализом појединачних поља (слика 42) може се видјети да је највећи недостатак методе употреба токсичног органског растварача ацетонитрила – резултат 0,31 на пољу 11, које је једино обиљежено наранџастом бојом. Зелена боја представља најприхватљивији резултат, а преласком у жуту, наранџасту и црвену боју, резултат постаје еколошки неприхватљивији. На слици 42 може се видјети да је већина параметара зелене боје (осим већ поменутог поља 11). Међутим, на пољима 7 (запремина аналитичког отпада), 9 (употреба електричне енергије) и 10 (поријекло реагенаса), појављује се жута боја. То указује на одређене недостатке методе: употребу течне хроматографије, реагенаса који нису у потпуности из обновљивих извора и производњу < 5 g отпада. Из тог разлога, наведена поља означена су жутом бојом са вриједностима 0,49, 0,50 и 0,50. Жуто-зелена боја поља 12 и резултат 0,60, добијени су због токсичности ацетонитрила по водени свијет и изузетне запаљивости. Параметрима везаним за ацетонитрил, поријекло реагенаса и продукцију отпада додијелене су највеће вриједности тежинских степени (четири), док су преостали задржани на вриједности два. Што је тежински степен већи, то је утицај и значајност датог параметра на коначан резултат већа [119]. Вриједности преосталих поља варирале су у распону од 0,68 до 1,00, те се може закључити да су сви ови параметри имали висок степен еколошке прихватљивости. На основу добијених вриједности и процјене значаја појединачних поља, формиран је укупан резултат који представља степен „зелености“ методе (слика 42Б).

Недостатак овог софтвера је то што не дефинише јасну граничну вриједност изнад које се метода сматра еколошки прихватљивом. Процјена „зелености“ заснива се на приближавању резултата вриједности 1,00, као и на интензитету зелене боје у централном пољу. У том контексту, резултат 0,66 и средње зелена обојеност указују на задовољавајући еколошки профил методе (слика 42Б) [119].

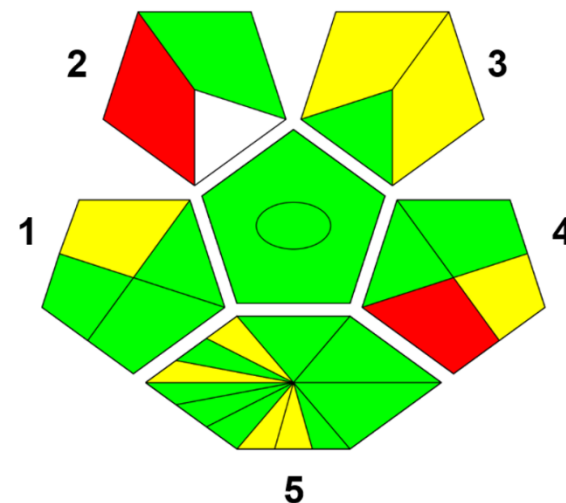
6.4.6.2. Процјена „зелености“ методе примјеном ComplexGAPI софтвера

„Зеленост“ методе додатно је процијењена *ComplexGAPI* софтвером, који узима у обзир и процедуре које претходе анализи. На слици 43А приказани су одговори за сваки од параметара који се овим процјењује. Резултати анализе исцртавају се директно на слици коју генерише сам софтвер, а која је облика пиктограма представљеног на слици 43Б. Додијелене боје на пиктограму имају исто значење као код претходно описаног AGREE графикана.

A

SAMPLE PREPARATION		YIELD AND CONDITIONS	
1. Collection:	In-line ▼	16. Yield:	>=89% ▼
2. Preservation:	None ▼	17. Temperature/time:	Room temp., < 1 h ▼
3. Transport:	None ▼	REAGENTS AND SOLVENTS	
4. Storage:	Under normal conditio ▼	18. Price of reagents:	Inexpensive< 10\$ ▼
5. Type of method:	No sample preparation ▼	19. Amount:	< 10 mL (mg) ▼
6. Scale of extraction:	n.a. ▼	20. Health hazard:	Moderately toxic; couli ▼
7. Solvents/reagents used:	Non-green solvents/re ▼	21. Safety hazard:	Highest NFPA flammal ▼
8. Additional treatments:	None ▼	INSTRUMENTATION	
REAGENTS AND SOLVENTS		22. Technical setup :	Common setup ▼
9. Amount:	< 10 mL (< 10 g) ▼	23. Energy:	≤0.1 kWh per sample ▼
10. Health hazard:	Moderately toxic; couli ▼	24. Occupational hazard:	Hermetization of analy ▼
11. Safety hazard:	Highest NFPA flammal ▼	WORKUP AND PURIFICATION	
INSTRUMENTATION		25. End products workup, purification:	Standard purification t: ▼
12. Energy:	<= 0.1 kWh per sample ▼	26. Purity:	>98% ▼
13. Occupational hazard:	Hermetic sealing of the ▼	27. Waste:	1-10 mL (1-10 g) ▼
14. Waste:	1-10 mL (1-10 g) ▼		
15. Waste treatment:	No treatment ▼		
METHOD TYPE			
Type of analysis:	Qualitative and quantit ▼		

Б



Слика 43. Процјена „зелености“ методе примјеном ComplexGAPI софтвера. (А) Унесени одговори за испитиване параметре, (Б) Пиктограм са одговарајућим бојама појединачних поља. Sample preparation – припрема узорка, collection – прикупљање, preservation – конзервисање, none – нема, transport – транспорт, storage – чување, under normal conditions – под нормалним условима, type of method – врста методе, no sample preparation – без припреме узорка, scale of extraction – обим екстракције, n.a. – није примјењиво, solvents/reagents used – кориштени растварачи/реагенси, additional treatments – додатне обраде, amount – количина, health hazard – опасност по здравље, moderately toxic – умјерено токсично, safety hazard – безбједносни ризик, highest NFPA flammability rating – највиши ниво NFPA запаљивости, instrumentation – опрема, energy – потрошња енергије, occupational hazard – радни ризик, hermetic sealing of the analytical system – херметичко затварање аналитичког система, waste treatment – обрада отпада, method type – врста методе, yield and conditions – принос и услови, room temperature – собна температура, price – цијена, common technical setup – стандардна техничка поставка, end products workup, purification – обрада и пречишћавање производа, purity – чистоћа

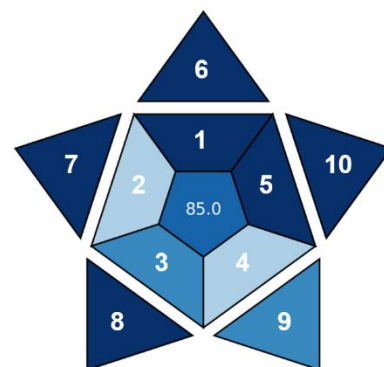
Анализом слике 43Б може се видјети да метода остаје задовољавајуће „зелена“ и када се у процјену укључи преаналитички поступак, као и врста и принос процеса. Једини критичан корак и даље је употреба ацетонитрила, што је означено црвеном бојом на другом пиктограму. Одсуство третирања отпада у циљу смањења његове токсичности, такође је означено црвеном бојом на четвртом пиктограму (слика 43Б). Жута боја на првом пиктограму приписује се условима складиштења, јер постоји умјерен ризик повезан са стабилношћу реагенаса и њиховом осјетљивошћу на температуру просторије у којој се чувају. На трећем пиктограму, жута боја указује на здравствене и безбједоносне ризике реагенаса кориштених за припрему узорака (означава умјерену токсичност). На четвртом пиктограму жута боја означава професионалне ризике и ниво производње отпада, док на петом пиктограму означава опасност по здравље и безбједност аналитичара, као и количину генерисаног отпада (постоји умјерен утицај на здравље аналитичара због изложености кориштеним реагенсима и производи се умјерена количина отпада током анализе). Бијела боја на другом пиктограму означава одсуство процеса екстракције у преаналитичкој припреми. Појава круга у центру симбола указује на то да је метода погодна за квалитативну и квантитативну анализу. Узимајући у обзир све процијењене параметре, ова метода се сматра еколошки прихватљивом, јер зелена боја заузима више од 60 % поља и доминантна је на слици 43Б. Односно, 16 од укупно 27 поља је еколошки прихватљиво и зелено обојено [120]. Недостатак овог софтвера је то што као крајњи резултат не даје бројчану вриједност која би олакшала поређење еколошке прихватљивости различитих метода.

6.4.6.3. Процјена практичности методе примјеном BAGI софтвера

Интензитет плаве боје, која одражава практичност методе, процијењен је BAGI софтвером. Фактори који се процјењују и унесени одговори приказани су на слици 44А. Након уноса одговора, формира се слика у виду астероидног пиктограма која се састоји из 10 дијелова, при чему сваки дио одговара једном процјењиваном фактору. Дијелови се боје нијансама плаве или бијелом бојом у зависности од изабраног одговора – тамноплава боја одражава висок, плава средњи, свијетлоплава низак ниво усаглашености, док бијела представља потпуно одсуство усаглашености методе са процјењиваним фактором (поглавље 1.5.3.3). Број у центру пиктограма представља збирну вриједност, односно укупну процјену практичности методе. (слика 44Б).

A

1. Type of Analysis Quantitative and Confirmatory ▼	6. Samples per hour > 10 ▼
2. Multi- or single-element analysis Multi-element analysis for 2-5 con ▼	7. Reagents and materials Common commercially available i ▼
3. Analytical technique Simple instrumentation available i ▼	8. Fit-for-purpose No preconcentration required. Rec ▼
4. Simultaneous sample preparation 2-12 ▼	9. Degree of automation Semi-automated with common de ▼
5. Sample preparation Not required or on-site sample pre ▼	10. Amount of sample < 100 µL (or mg) bioanalytical sam ▼

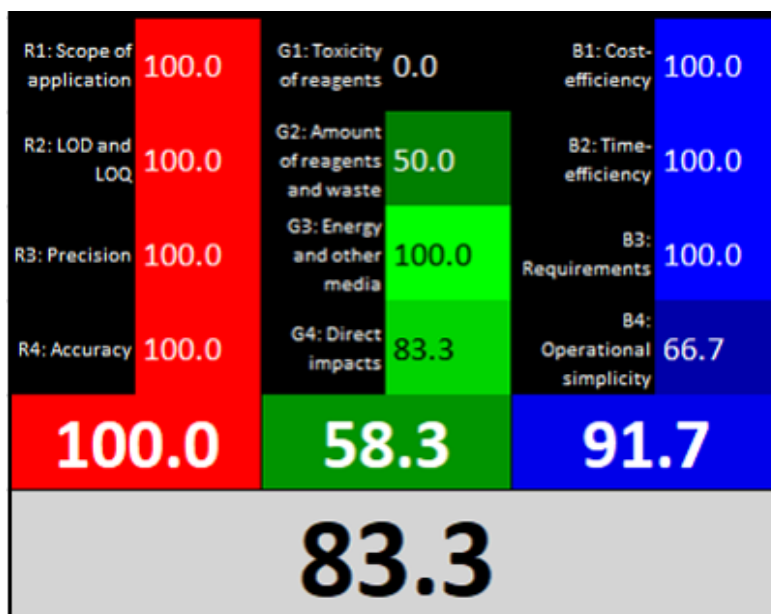
Б

Слика 44. Процјена практичности методе примјеном BAGI софтвера. (А) Унесени одговори за испитиване параметре, (Б) Пиктограм са одговарајућим бојама појединачних поља

Свијетлоплава боја на другом и четвртом пиктограму приписује се броју анализираних једињења по узорку и припреми узорака (слика 44Б). Овај резултат је бољи што је већи број анализираних једињења по узорку и што се већи број узорака узорака може истовремено припремити. Плава боја на трећем и деветом пиктограму приказује тип аналитичке технике и степен аутоматизације, који зависе од самог уређаја и технике. Број у центру пиктограма представља укупан резултат методе. Да би се метода сматрала практичном, треба да има резултат од најмање 60,0 поена. Са слике 44Б може се видјети да је коначан резултат ове анализе 85,0 што потврђује задовољавајућу ефикасност новоразвијене методе [121].

6.4.6.4. Процјена усклађености методе са принципима „бијеле“ аналитичке хемије

У посљедњем кораку, примјеном RGB модела процијењена је усклађеност методе са принципима WAC. Резултати ове анализе, заједно са параметрима који се процјењују, приказани су на слици 45.



Слика 45. Процјена усклађености методе са принципима WAC примјеном RGB модела

Укупан резултат од 83,3 указује на то да је метода задовољавајућег квалитета како у погледу „зелености“, тако и у погледу практичности, с обзиром на то да већа вриједност (приближна 100) представља бољу усклађеност са принципима бијеле аналитичке хемије (слика 45). Боја централног поља, на којем је приказан укупни резултат, генерише се на основу интензитета три компоненте: црвене (R – аналитичке карактеристике), зелене (G – утицај на животну средину) и плаве (B – практичност). Потпуна и уједначена засићеност сва три стуба за резултат има чисто бијелу боју, док смањење интензитета једне или више компоненти доводи до појаве различитих нијанси и смањења степена „бјелине“. Ове нијансе одражавају степен равнотеже између три главна принципа одрживости. У овом случају, свијетлосива боја централног поља указује на благо нарушену равнотежу – прије свега због мање оцјене зелене компоненте (58,3), проузроковане токсичношћу реагенса (0,0) и већом количином генерисаног отпада (50,0). Упркос томе, високе оцјене за аналитичке параметре (100,0) и практичност методе (91,7) значајно доприносе побољшању укупне оцјене, те се метода може окарактерисати као еколошки прихватљива и добро уравнотежена у контексту WAC [118].

6.5. РАЗВОЈ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

Како је прегледом литературе утврђено, до сада су развијене различите спектроскопске [145, 147, 170, 171], хроматографске [146, 172 – 174], методе капиларне електрофорезе [175] и методе засноване на вишепулсној амперометријској детекцији [176] за анализу кофеина и ибупрофена. Међутим, до сада није развијена HILIC метода за истовремену анализу ових једињења. Пошто је претходно спроведена детаљна анализа ретенционих механизма (поглавља 6.2. и 6.3) пружила детаљан увид у утицаје различитих фактора на ретенционо понашање ових једињења, приступило се развоју, оптимизацији и валидацији HILIC методе. Развој нове методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и ибупрофена, спроведен је употребом AQbD приступа и у складу са принципима GAC и WAC.

6.5.1. Дефинисање жељених особина (енгл. *Analytical Target Profile –ATP*) и критичних одговора система (енгл. *Critical Method Attributes – CMAs*)

Минимални захтјеви које метода намијењена за квалитативну и квантитативну анализу мора да испуни су: задовољавајуће задржавање (k – ретенциони фактор) и потпуно раздвајање испитиваних једињења (R_s – фактор резолуције), те прихватљиве вриједности фактора симетрије хроматографских пикова (A_s). Додатно, ради усклађености са принципима GAC и WAC, томе је потребно додати и оптимално вријеме трајања анализе (t_R – ретенционо вријеме једињења које последње елуира), како би се смањила производња токсичног отпада [162, 163]. Ови захтјеви представљају дефинисање жељених особина (ATP), на основу ког ће се, у другом кораку AQbD приступа, дефинисати одговарајући критични одговори система (CMAs) [115]. Праћење/контролисање CMAs омогућава постизање задатог ATP-а. С тим у вези, CMAs су дефинисани као:

- задовољавајући ретенциони фактор једињења које прво елуира ($k_{(КОФ)} \geq 1,00$),
- задовољавајући фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена ($R_{s(КОФ, ИБУ)} > 1,20$),
- фактор симетрије критичног хроматографског пика ($A_{s(ИБУ)}$ између 0,80 и 1,50, при чему је циљ 1,00) и
- ретенционо вријеме једињења које последње елуира ($t_{R(ИБУ)}$ минимално) [164].

6.5.2. Процјена ризика квалитета (енгл. *Quality Risk Assessment – QRA*) и идентификовање критичних параметара методе (енгл. *Critical Method Parameters – CMPs*)

Процјена ризика квалитета (QRA) извршена је примјеном *Ishikawa* дијаграма, што је омогућило идентификацију CMPs (слика 6) [115]. Важне особине узорка, растворљивост и хидрофилност, означене су као некритични фактори, јер су оба испитивана једињења хидрофилна и добро растворљива у свим кориштеним растварачима. Инструментални фактори, такође су означени као некритични, јер се лако физички контролишу и њихове оптималне вриједности дефинисане су током прелиминарне фазе истраживања ретенционих механизма (проток мобилне фазе 1 mL min^{-1} , таласна дужина детекције 225 nm, запремина инјектовања $10 \text{ }\mu\text{L}$). Избор одговарајуће стационарне фазе је кључни корак за успјешно раздвајање испитиваних једињења [25]. На основу података прикупљених током истраживања ретенционих механизма (слика 29, поглавље 6.2.8) могло се закључити да амино стационарна фаза обезбјеђује најбоље вриједности фактора симетрије хроматографских пикова, као и најбоље раздвајање ибупрофена и кофеина. Међутим, имајући у виду да је један од циљева смањење производње отпада, које се најлакше постиже краћим временом трајања анализе, јасно је да амино стационарна фаза није најбољи избор, јер се ибупрофен на овој стационарној фази најдуже задржава (слика 29). Посматрано из тог угла, примјена диолне стационарне фазе (поглавље 6.2.8) пружа најприхватљивије резултате. Температура стационарне фазе, чија вриједност треба да буде контролисана, означена је као један од CMPs који ће бити праћени током процеса оптимизације. Након тога, вршена је процјена утицаја фактора мобилне фазе. Одговарајући тип пуфера (амонијум-ацетат) одабран је током процјене утицаја врсте пуфера на ретенционо понашање (поглавље 6.2.2). Веома значајан фактор, посебно када се посматра из угла еколошке прихватљивости методе, јесте тип органског растварача. Међутим, испитивање различитих „зелених“ органских растварача (метанол, етанол и вода) довело је до закључка да нити један од њих не обезбјеђује задовољавајуће задржавање испитиваних једињења на стационарној фази. Због тога је, за даља истраживања, одабран ацетонитрил чија примјена у погледу скраћивања времена трајања анализе превазилази наведени недостатак. Преостали фактори мобилне фазе (концентрација пуфера, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе и садржај органског растварача) означени су као CMPs.

6.5.3. ОПТИМИЗАЦИЈА ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

Истраживање ретенционих механизма омогућило је једноставну идентификацију CQAs и SMPs, али и омогућило дефинисање распона SMPs који ће се примијенити током процеса оптимизације. Границе за поједине SMPs постављене су на сљедећи начин:

- садржај ацетонитрила: 93 % – 97 %
- концентрација пуфера: 5 – 25 mmol L⁻¹
- рН вриједност воденог дијела мобилне фазе: 5,00 – 7,00
- температура стационарне фазе: 15 – 35 °C.

Оптимизација хроматографског раздвајања спроведена је употребом CCD (поглавље 4.7). По спровођењу експеримената према плану дефинисаном у табели 5, праћене су вриједности t_R и ширине хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, као и A_S (ИБУ). На основу тога, израчунате су одговарајуће вриједности k (КОФ) (израз (7)) и R_S (КОФ, ИБУ) (израз (9)). Добијени резултати приказани су у табели 39.

Табела 39. Резултати добијени спровођењем експеримената према плану CCD

No	k (коФ)	Rs (коФ, иБУ)	As (иБУ)	tr (иБУ) (min)
1	1,01	3,67	0,99	3,66
2	1,14	11,53	1,27	3,93
3	1,04	2,89	0,91	3,61
4	1,20	11,49	1,14	3,95
5	0,95	6,55	1,10	3,61
6	1,15	9,72	1,14	3,95
7	1,08	1,38	1,02	3,59
8	1,22	5,29	1,18	3,93
9	0,96	0,00	1,29	3,56
10	1,12	2,05	1,57	3,56
11	0,97	3,67	1,28	3,56
12	1,13	6,32	1,32	3,63
13	1,03	3,98	1,05	3,58
14	1,16	3,12	1,14	3,63
15	1,09	3,00	1,00	3,50
16	1,26	3,00	1,00	3,69
17	1,00	0,00	1,00	3,61
18	1,18	2,69	1,18	3,84
19	1,06	3,13	1,10	3,56
20	1,09	2,68	0,93	3,58
21	1,06	1,50	1,10	3,58
22	1,12	2,41	1,32	3,56
23	1,19	3,13	0,87	3,69
24	1,06	2,63	0,94	3,50
25	1,10	0,00	1,02	3,61
26	1,08	0,00	1,07	3,61
27	1,09	0,00	1,10	3,58
28	1,11	0,00	1,07	3,61
29	1,12	0,00	1,07	3,61
30	1,08	0,00	0,87	3,61

No – Редни број експеримента (*standard order*), k (коФ) – ретенциони фактор кофеина, tr (иБУ) – ретенционо вријеме ибупрофена, As (иБУ) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, Rs (коФ, иБУ) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена

Полином другог реда, представљен изразом (13), прилагођен је експериментално добијеним подацима. Примјена ANOVA омогућила је детаљну анализу коефицијената креираних математичких модела (табела 40).

Табела 40. Резултати ANOVA теста – коефицијенти креираних математичких модела и њихова статистичка анализа

Коеф.	k (коф)		Rs (коф, ибу)		As (ибу)		tr (ибу) (min)	
	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.	в. коеф.	p вријед.
b ₀	1,1000	нв	0,5939	нв	1,0300	нв	3,6000	нв
b ₁	0,0794	< 0,0001 *	1,6700	< 0,0001 *	0,0722	0,0033 *	0,1017	< 0,0001 *
b ₂	0,0278	0,0005 *	– 0,2239	0,2876	– 0,0483	0,0340 *	0,0000	1,0000
b ₃	0,0239	0,0016 *	– 0,2594	0,2208	– 0,0511	0,0262 *	0,0000	1,0000
b ₄	– 0,0111	0,0944	– 1,5500	< 0,0001 *	0,0539	0,0201 *	– 0,0950	< 0,0001 *
b ₁₂	0,0006	0,9258	0,1837	0,4070	– 0,0162	0,4712	0,0175	0,0023 *
b ₁₃	0,0019	0,7802	– 0,9338	0,0006 *	– 0,0337	0,1455	0,0150	0,0068 *
b ₁₄	– 0,0006	0,9258	– 1,2300	< 0,0001 *	– 0,0187	0,4071	– 0,0612	< 0,0001 *
b ₂₃	0,0156	0,0318 *	– 1,1100	0,0001 *	0,0150	0,5054	– 0,0062	0,2112
b ₂₄	– 0,0069	0,3141	1,0800	0,0002 *	– 0,0125	0,5780	0,0075	0,1379
b ₃₄	0,0219	0,0047 *	0,4812	0,0411 *	– 0,0875	0,0012 *	0,0100	0,0541
b ₁₁	– 0,0054	0,7448	0,1573	0,7729	0,0651	0,2520	0,1309	< 0,0001 *
b ₂₂	– 0,0204	0,2319	1,7200	0,0059 *	– 0,0099	0,8584	– 0,0241	0,0607
b ₃₃	– 0,0054	0,7448	0,7673	0,1722	0,1851	0,0041 *	– 0,0241	0,0607
b ₄₄	0,0296	0,0916	1,6900	0,0064 *	– 0,1199	0,0443 *	0,0009	0,9422
R ²	0,9368		0,9627		0,8317		0,9890	
Adjusted R ²	0,8779		0,9278		0,6746		0,9787	
Lack of fit	0,0935		–		0,4698		0,1077	

Коеф. – коефицијент, в. коеф. – вриједност коефицијента, *p* вријед. – *p* вриједност, b₀ – одсјечак модела, b₁, b₂, b₃ – регресиони коефицијенти линеарних чланова (1 – садржај ацетонитрила [%], 2 – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], 3 – pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, 4 – температура стационарне фазе [°C]), b₁₂, b₁₃, b₁₄, b₂₃, b₂₄, b₃₄ – регресиони коефицијенти факторских интеракција, b₁₁, b₂₂, b₃₃, b₄₄ – регресиони коефицијенти квадратних чланова, k (коф) – ретенциони фактор кофеина, Rs (коф, ибу) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, As (ибу) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, tr (ибу) – ретенционо вријеме ибупрофена

* статистички значајан коефицијент за *p* вриједност ≤ 0,05

Експериментални резултати показују задовољавајућу корелацију са вриједностима које су предвиђене математичким моделом (табела 40). Томе у прилог говоре високе вриједности коефицијената детерминације ($> 0,93$) и вриједности прилагођеног коефицијента детерминације које се не разликују од вриједности коефицијента детерминације за више од 0,20 и веће су од 0,80 за све одговоре (изузев фактора симетрије хроматографског пика ибупрофена). Одсуство значајних вриједности параметра *Lack of fit* додатно потврђује да квадратни модел ефикасно представља однос између експериментално добијених и моделом израчунатих параметара. То значи да модел поуздано описује варијабилност система те да је системска грешка у предвђању одговора безначајна [95, 117].

Статистичка анализа омогућава и креирање израза заснованих на статистички значајним параметрима за поједине СМAs, а који се могу представити на сљедећи начин:

за k (КОФ) :

$$y = 1,1000 + 0,0794 A + 0,0278 B + 0,0239 C + 0,0156 BC + 0,0219 CD \quad (33)$$

за R_s (КОФ, ИБУ):

$$y = 0,5939 + 1,6700 A - 1,5500 D - 0,9338 AC - 1,2300 AD - 1,1100 BC + 1,0800 BD + 0,4812 CD + 1,7200 B^2 + 1,6900 D^2 \quad (34)$$

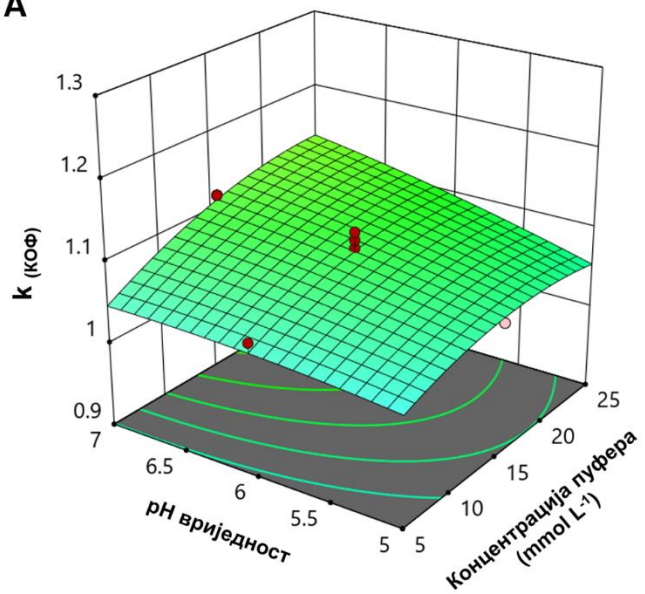
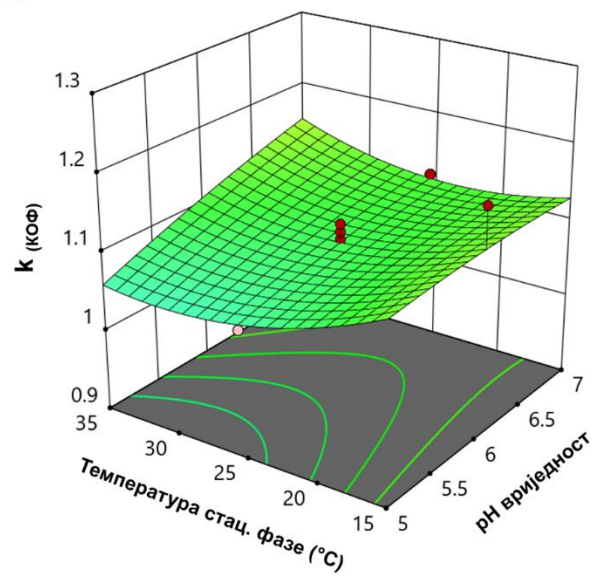
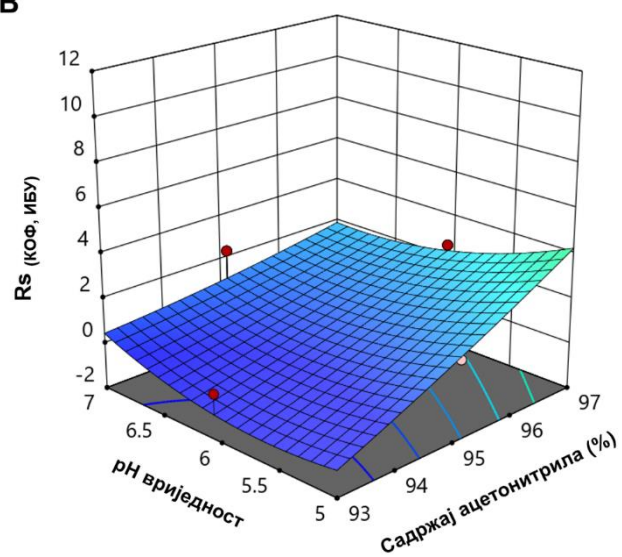
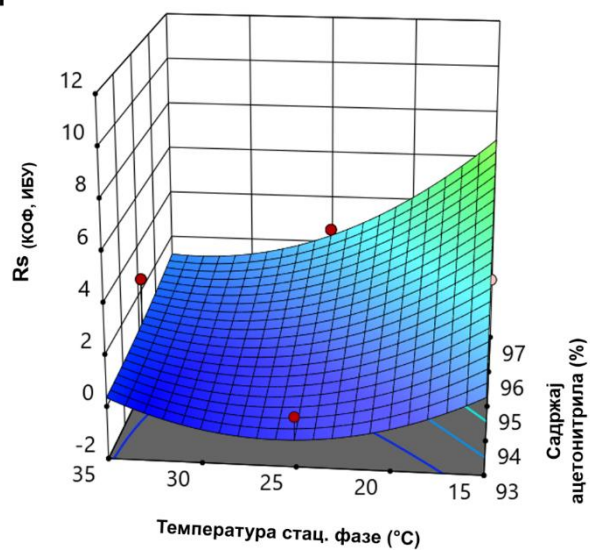
за A_s (ИБУ):

$$y = 1,0300 + 0,0722 A - 0,0483 B - 0,0511 C + 0,0539 D - 0,0875 CD + 0,1851 C^2 - 0,1199 D^2 \quad (35)$$

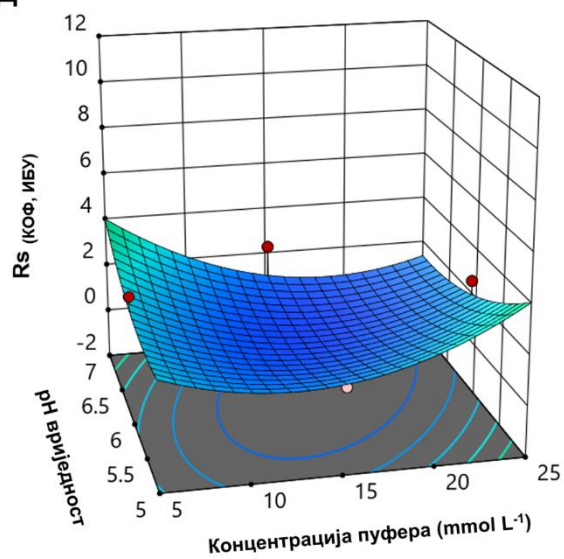
за t_R (ИБУ) :

$$y = 3,600 + 0,1017 A - 0,0950 D + 0,0175 AB + 0,0150 AC - 0,0612 AD + 0,1309 A^2 \quad (36)$$

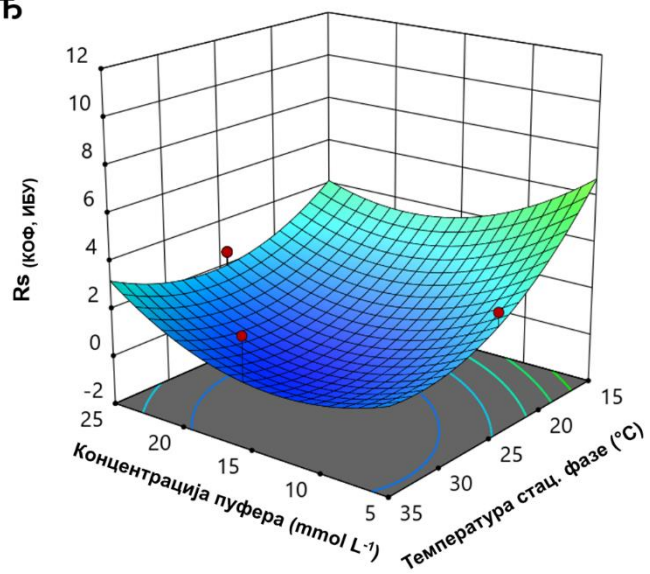
Статистички значајне факторске интеракције представљене су у виду 3D-графика на слици 46.

А**Б****В****Г**

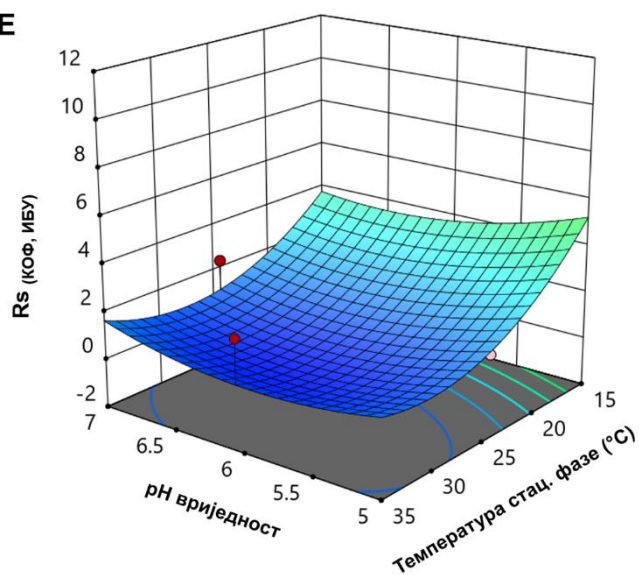
Д



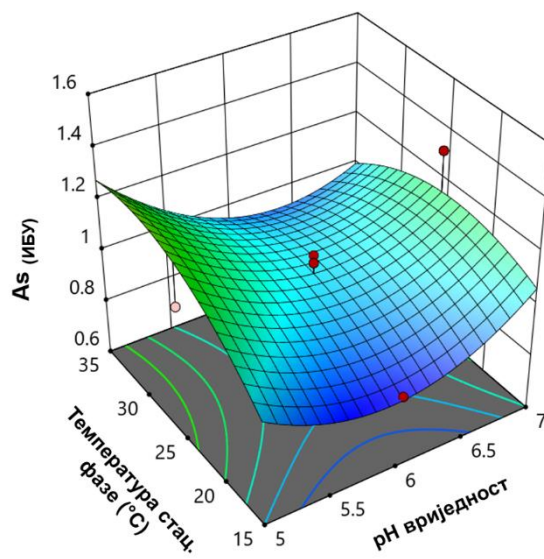
Ђ



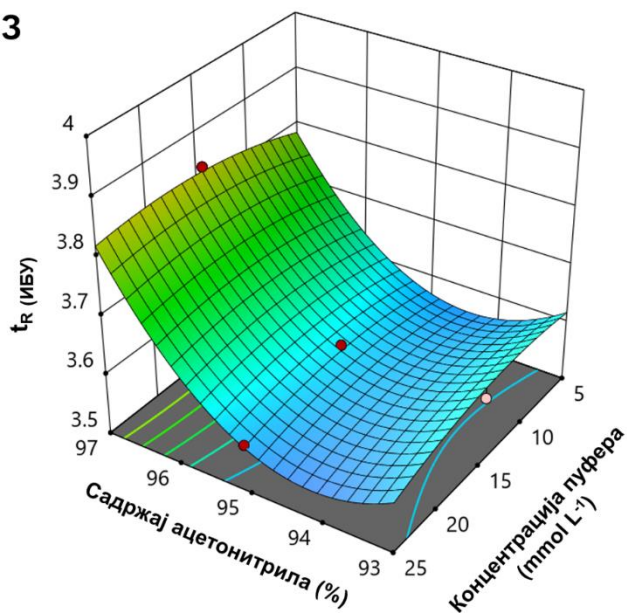
Е



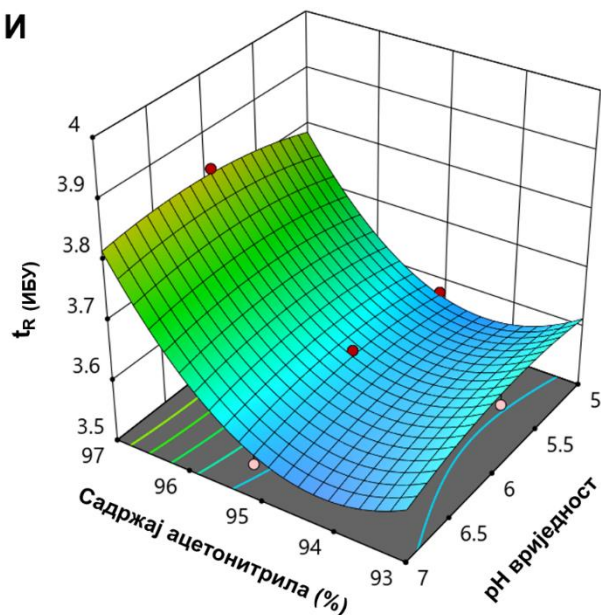
Ж



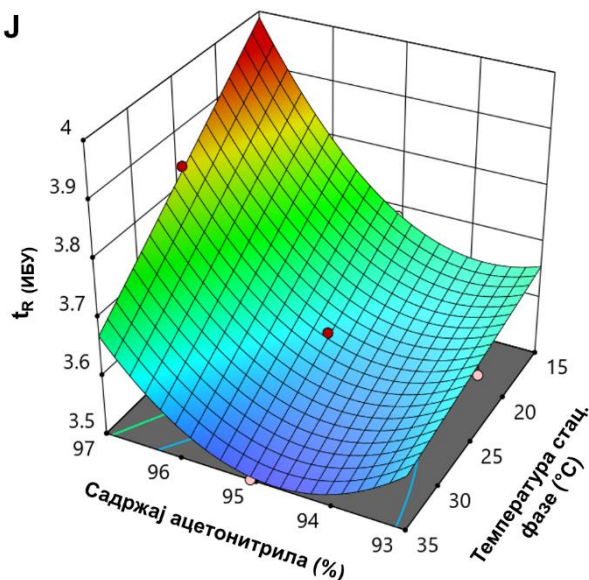
3



И



J



Слика 46. 3D-графикони површине одговора за (А) $k_{(КОФ)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Б) $k_{(КОФ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (В) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Г) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, (Д) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Ђ) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{концентрација пуфера, температура стационарне фазе})$, (Е) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (Ж) $As_{(ИБУ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (З) $t_R(ИБУ) = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (И) $t_R(ИБУ) = f(\text{садржај ацетонитрила, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Ј) $t_R(ИБУ) = f(\text{садржаја ацетонитрила, температура стационарне фазе})$

Статистичка (табела 40) и графичка (слика 46) интерпретација добијених резултата омогућила је дефинисање утицаја CMPs на CMAs, што је довело до сљедећих закључака: $k_{(КОФ)}$ је био под утицајем садржаја ацетонитрила у мобилној фази (b_1), концентрације пуфера (b_2) и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (b_3), те интеракција: концентрација пуфера/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_{23}) и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе (b_{34}) (табела 40). Утицај појединачних фактора био је такав да пораст свих наведених фактора доводи до пораста $k_{(КОФ)}$, с тим да највећи утицај има садржај ацетонитрила у мобилној фази, док су релативни доприноси осталих фактора били слабијег интензитета (табела 32). Са слике 46А може се видјети да вриједности $k_{(КОФ)}$ благо расту са порастом концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе. Међутим, релативно равна површина 3D-графикона (слика 46А) показује да ова двофакторска интеракција нема велики утицај на $k_{(КОФ)}$. До повећања вриједности $k_{(КОФ)}$ доводе и ниже вриједности температуре стационарне фазе у комбинацији са већим рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе (слика 46Б). Површина 3D-графикона указује на благу нелинеарну двофакторску интеракцију, с тим да је и овдје интензитет утицаја интеракције низак, при чему већи допринос показује смањење вриједности температуре стационарне фазе, у односу на повећање рН вриједности воденог дијела мобилне фазе. Поређењем 3D-графикона (слика 46А и 46Б) може се видјети да на вриједности $k_{(КОФ)}$ нешто већи утицај има двофакторска интеракција рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе. Одсуство статистички значајних квадратних чланова у складу је са облицима добијених графикона – утицаји фактора су линеарне природе, те су и површине добијених 3D-графикона релативно равне [6, 17, 22].

Вриједност $R_s_{(КОФ, ИБУ)}$ била је под значајним утицајем садржаја ацетонитрила у мобилној фази (b_1) и температуре стационарне фазе (b_4), али и двофакторских интеракција: садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_{13}), садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе (b_{14}), концентрација пуфера/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_{23}), концентрација пуфера/температура стационарне фазе (b_{24}) и рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе (b_{34}) (табела 40). Анализом утицаја појединачних фактора на $R_s_{(КОФ, ИБУ)}$ може се видјети да се његова вриједност повећава са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази и смањењем температуре стационарне фазе, при чему је утицај садржаја ацетонитрила нешто израженији (табела 32). Са слике 46В може се

видјети да вриједност R_s (коф, ибу) расте са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази, при чему је овај утицај посебно изражен при већим вриједностима садржаја ацетонитрила. С друге стране, повећање рН вриједности воденог дијела мобилне фазе доводи до смањења вриједности R_s (коф, ибу). Изглед површине 3D-графикана указује на то да је утицај ове интеракције умјерен, те да се оптимална вриједност R_s (коф, ибу) постиже при већим вриједностима садржаја ацетонитрила и мањим рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе. Повећање садржаја ацетонитрила и смањење температуре стационарне фазе узрокује значајно високе вриједности R_s (коф, ибу) (слика 46Г). При томе, смањење температуре стационарне фазе има значајан ефекат само при високим вриједностима садржаја ацетонитрила. С тим у вези, може се закључити да је за постизање најбоље вриједности R_s (коф, ибу) потребно користити температуру стационарне фазе између 15 °C и 20 °C, при садржајима ацетонитрила између 95 % и 97 %. Вриједност R_s (коф, ибу) расте са повећањем концентрације пуфера, посебно при вриједностима изнад 15 mmol L⁻¹ и повећањем рН вриједности воденог дијела мобилне фазе изнад 6,00 (слика 46Д). Депресија на површини овог 3D-графикана показује да ниске вриједности оба наведена фактора доводе до мањих вриједности R_s (коф, ибу). Међутим, поређењем степена овог утицаја са утицајем двофакторске интеракције садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе (слика 46Г) може се видјети да је овај утицај много мањег интензитета у поређењу са претходно описаним. Са слике 46Ђ може се видјети да веће вриједности концентрације пуфера (20 – 25 mmol L⁻¹) уз ниже вриједности температуре стационарне фазе (око 15 °C) доводе до постизања најприхватљивијих вриједности R_s (коф, ибу). Утицај ове двофакторске интеракције је умјереног интензитета, а у доњем дијелу 3D-графикана може се видјети да комбинација високих вриједности температуре стационарне фазе и мањих вриједности концентрације пуфера доводи до мањих вриједности R_s (коф, ибу). Мање рН вриједности воденог дијела мобилне фазе у комбинацији са вишим вриједностима температуре стационарне фазе доводе до лошијих вриједности R_s (коф, ибу), док комбинација већих рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (> 6,50) и нижих температура стационарне фазе (око 15 °C) обезбјеђује добијање бољих резултата у погледу R_s (коф, ибу) (слика 46Е). Са 3D-графикана може се јасно видјети да температура стационарне фазе има јачи утицај на R_s (коф, ибу) у односу на рН вриједност воденог дијела мобилне фазе. Када се упореде доприноси свих испитиваних интеракција на R_s (коф, ибу) може се закључити да највећи утицај има двофакторска интеракција садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе, а прати је интеракција рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура

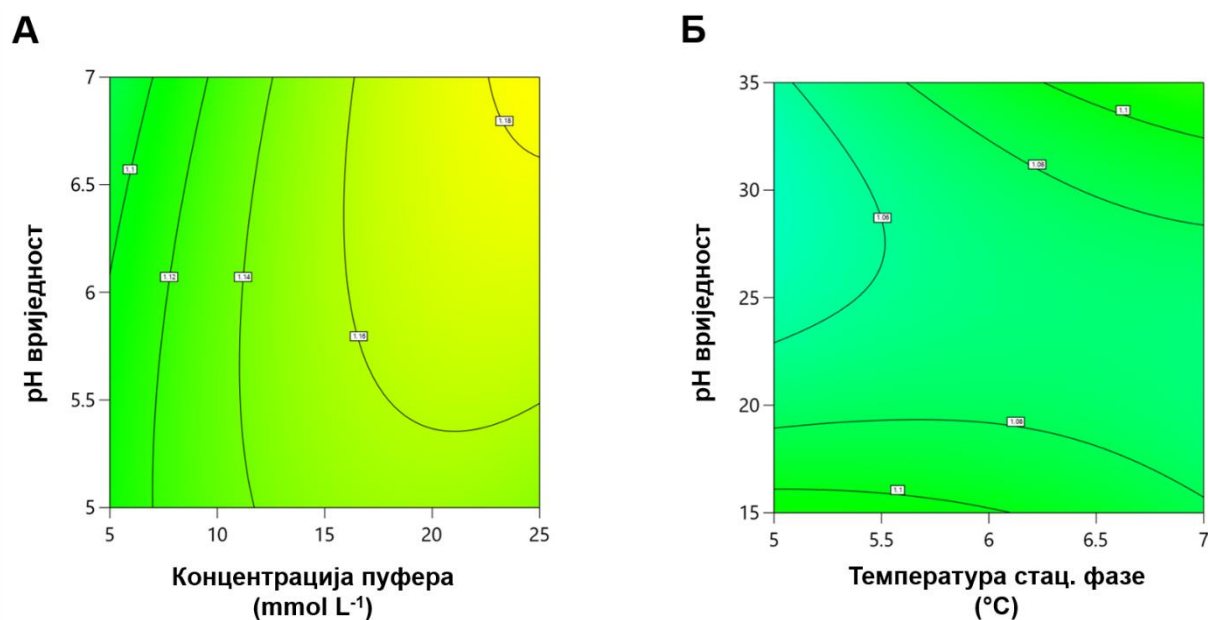
стационарне фазе. Статистички значајни квадратни чланови који се односе на вриједности концентрације пуфера (b_{22}) и температуре стационарне фазе (b_{44}) осликавају се кроз постојање нелинеарне зависности, а која се најбоље може видјети на слици 46Ђ – представљена двофакторска интеракција формира графикон конкавног облика [165].

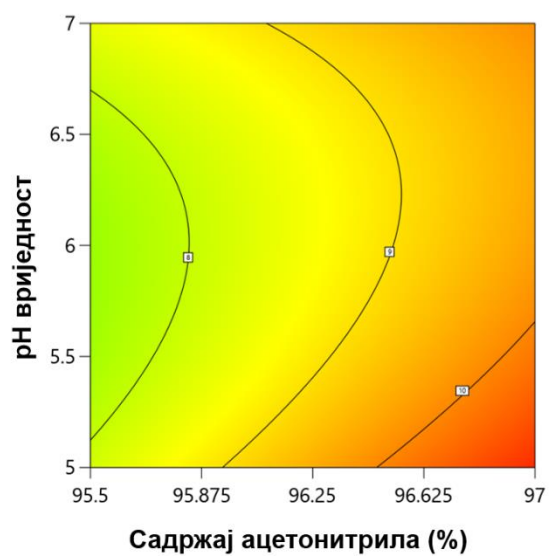
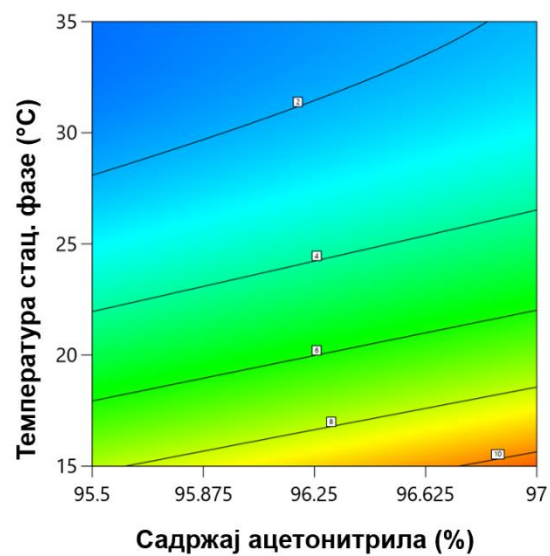
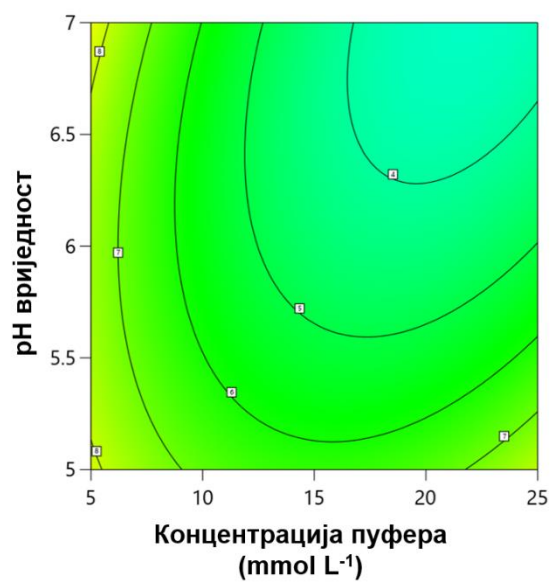
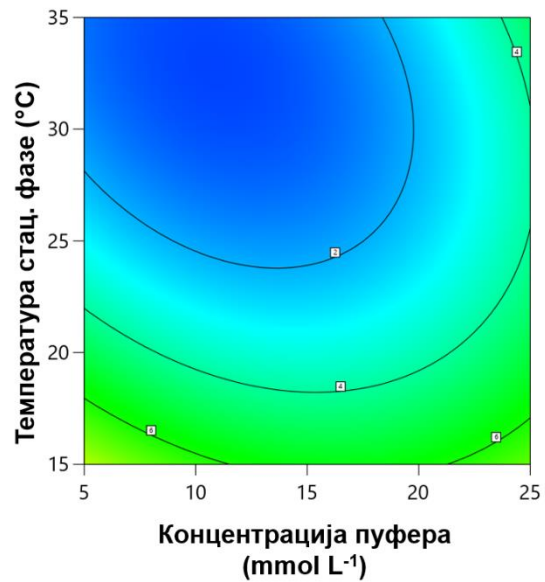
На вриједности $As_{(ИБУ)}$ значајан утицај имали су садржај ацетонитрила у мобилној фази (b_1), концентрација пуфера (b_2), рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_3) и температура стационарне фазе (b_4), те двофакторска интеракција рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе (b_{34}) (табела 40). Појединачни фактори имали су подијељен утицај на вриједности $As_{(ИБУ)}$, тако да је до повећања вриједности $As_{(ИБУ)}$ водило повећање садржаја ацетонитрила и температуре стационарне фазе, те смањење концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе (табела 40). Међутим, анализом двофакторске интеракције (слика 46Ж) рН вриједност воденог дијела мобилне фазе/температура стационарне фазе, може се видјети да је њихова зависност нелинеарна. Односно, $As_{(ИБУ)}$ има лошије вриједности при већим рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе и нижим вриједностима температуре стационарне фазе. Најпожељније вриједности $As_{(ИБУ)}$ (1,00) могу се постићи при рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе 5,00 – 6,00 и вриједностима температуре стационарне фазе 25°C – 30 °C. Екстремно ниске вриједности ових фактора доводе до лошијих вриједности $As_{(ИБУ)}$ [165].

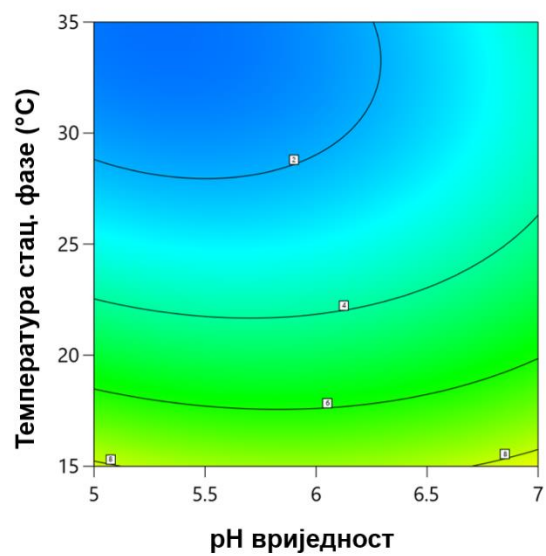
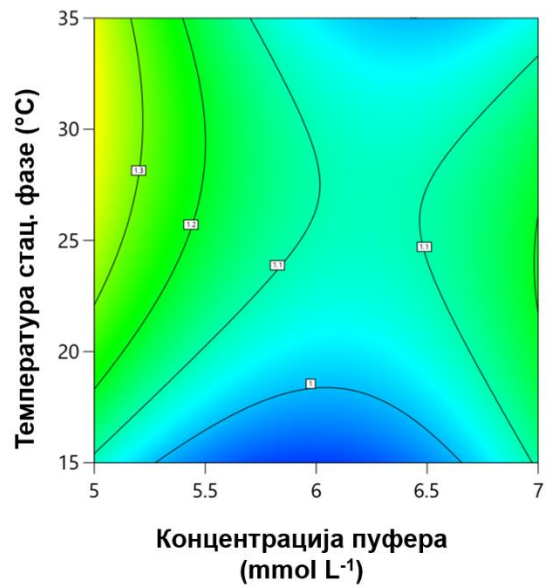
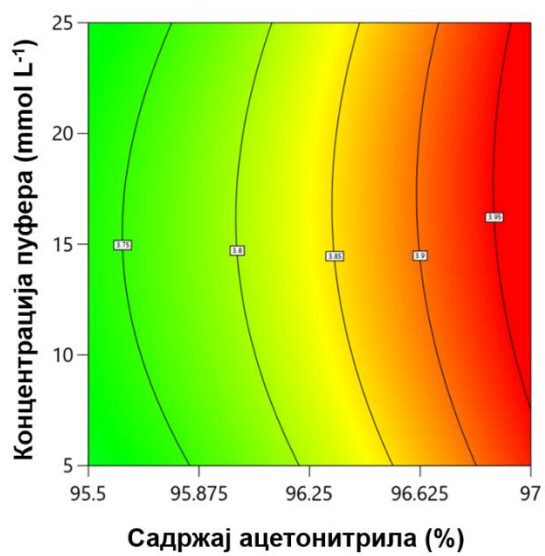
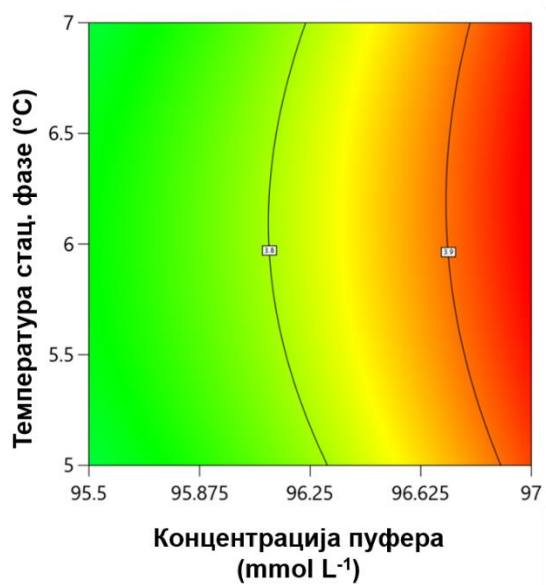
У случају $t_R_{(ИБУ)}$ значајан утицај имали су садржај ацетонитрила у мобилној фази (b_1) и температура стационарне фазе (b_4), те двофакторске интеракције: садржај ацетонитрила/концентрација пуфера (b_{12}), садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе (b_{13}) и садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе (b_{14}) (табела 40). Утицај појединачних фактора је такав да повећање садржаја ацетонитрила у мобилној фази и смањење температуре стационарне фазе доводе до повећања вриједности $t_R_{(ИБУ)}$, с тим да је утицај ацетонитрила нешто већег интензитета у односу на утицај температуре стационарне фазе. Анализом 3D-графика са слике 46З може се видјети да повећање садржаја ацетонитрила проузрокује повећање вриједности $t_R_{(ИБУ)}$, што је посебно изражено при садржају ацетонитрила већем од 96 %. Утицај концентрације пуфера је нешто мањег интензитета, али се може видјети да ће веће концентрације пуфера довести до повећања $t_R_{(ИБУ)}$. Дакле, најкраће $t_R_{(ИБУ)}$ постиже се смањењем вриједности оба посматрана фактора. Слика 46И која приказује зависност $t_R_{(ИБУ)}$ од двофакторске интеракције садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела

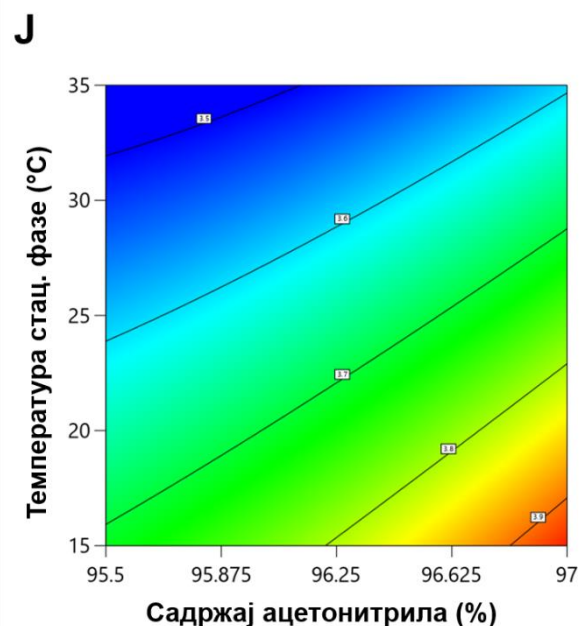
мобилне фазе врло је слична 3D-графикону са слике 463. Зависност која је овде приказана врло је слична и по интензитету и по врсти утицаја – повећање садржаја ацетонитрила уз повећање рН вриједности воденог дијела мобилне фазе доводи до продуженог задржавања ибупрофена на стационарној фази, при чему је ефекат ацетонитрила израженији него ефекат рН вриједности воденог дијела мобилне фазе. Високе вриједности садржаја ацетонитрила у комбинацији са ниским вриједностима температуре стационарне фазе, посебно при њиховим екстремним вриједностима, доводе до значајног повећања вриједности t_R (ИБУ) (слика 46J). Управо је ефекат ове двофакторске интеракције највећи у поређењу са осталим статистички значајним интеракцијама, а које имају утицај на t_R (ИБУ). Статистички значајан квадратни члан (b_{11}) који се односи на садржај ацетонитрила у мобилној фази (табела 40) потврђује нелинеарну зависност t_R (ИБУ) и садржаја ацетонитрила у мобилној фази, што се може видјети на сва три 3D-графикана (слика 463 – 46J) [6, 17, 22].

Да би се што прецизније интерпретирали добијени коефицијенти модела (табела 40), конструисани су, додатно, одговарајући 2D-графикони – добијени преклапањем контура статистички значајних двофакторских интеракција (слика 47).



В**Г****Д****Ђ**

Е**Ж****З****И**



Слика 47. 2D-графикони контура за (А) $k_{(КОФ)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Б) $k_{(КОФ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (В) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Г) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, (Д) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{концентрација пуфера, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Ђ) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{концентрација пуфера, температура стационарне фазе})$, (Е) $Rs_{(КОФ, ИБУ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (Ж) $As_{(ИБУ)} = f(\text{pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура стационарне фазе})$, (З) $t_{R(ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, концентрација пуфера})$, (И) $t_{R(ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, pH вриједност воденог дијела мобилне фазе})$, (Ј) $t_{R(ИБУ)} = f(\text{садржај ацетонитрила, температура стационарне фазе})$, температура стац. фазе – температура стационарне фазе

Анализом добијених графикана може се закључити сљедеће:

Највеће вриједности $k_{(КОФ)}$ добијају се при комбинацији мањих вриједности концентрације пуфера (око 7 mmol L^{-1}), већих pH вриједности воденог дијела мобилне фазе (6,50 – 7,00) и нижих вриједности температуре стационарне фазе ($15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (слика 47А, 47Б). Са 2D-графикона (слика 47В – 47Е) може се видјети да ће се оптималне вриједности $Rs_{(КОФ, ИБУ)}$ постићи при високом садржају ацетонитрила ($\sim 97 \%$), већим вриједностима концентрације пуфера (20 mmol L^{-1} – 25 mmol L^{-1}), већим pH вриједностима воденог дијела мобилне фазе (6,50 – 7,00), те нижим вриједностима температуре стационарне фазе ($15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Идеалне вриједности $As_{(ИБУ)}$ ($\sim 1,00$) добијају се при мањим вриједностима концентрације пуфера ($5 - 7 \text{ mmol L}^{-1}$) и вишим вриједностима температуре стационарне фазе ($15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (слика 47Ж). Најкраће $t_{R(ИБУ)}$ добија се при комбинацији мањег садржаја ацетонитрила (око 95,50 %), мање

концентрације пуфера (око 5 mmol L^{-1}) и више вриједности температуре стационарне фазе ($\sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Општепознато је да задржавање испитиваних једињења у HILIC системима, које се описује кроз k и t_R , расте са порастом садржаја ацетонитрила у мобилној фази и са смањењем температуре стационарне фазе [6]. Већи садржај ацетонитрила у мобилној фази значи уједно мањи садржај воденог дијела мобилне фазе, што доприноси повећању хидрофобности мобилне фазе. То доводи до концентрисања воде на површини стационарне фазе, чиме се формира псеудо-стационарна фаза. Управо на њој се дешавају додатне HILIC интеракције поларних испитиваних једињења – процес расподеле/партиције (поглавље 1.2) [6]. Смањењем температуре стационарне фазе успоравају се кинетички процеси расподеле, те долази до повећања интеракција између испитиваних једињења и стационарне фазе, чиме се постиже дуже задржавање испитиваних једињења на стационарној фази [22].

Јонске интеракције, чији интензитет се модификује промјеном концентрације пуфера и/или рН вриједности воденог дијела мобилне фазе, такође значајно утичу на задржавање испитиваних једињења у HILIC систему (поглавље 6.2.6). Утицај промјене рН вриједности воденог дијела мобилне фазе има двоструки ефекат: утиче на степен јонизације испитиваних једињења (у овом случају само ибупрофена), те на степен јонизације преосталих силанолних група на површини стационарне фазе [32].

Удружени ефекат концентрације пуфера и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе показао се као значајан фактор за манипулацију како задржавања испитиваних једињења у систему, тако и за постизање оптималне резолуције између њихових хроматографских пикова. Веће рН вриједности доводе до побољшања вриједности R_s . Разлог томе је повећање степена јонизације ибупрофена, што доводи до бољег раздвајања. Наиме, при већим рН вриједностима воденог дијела мобилне фазе ибупрофен постаје све више јонизован, а кофеин не мијења свој молекулски облик. То доводи до разлика у њиховим афинитетима за везивање на површини стационарне фазе. Повећање концентрације пуфера доводи до стабилизације јонских интеракција између мобилне и стационарне фазе. То доводи до стабилизације разлика у задржавању испитиваних једињења и има синергистички ефекат са ефектом рН вриједности воденог дијела мобилне фазе [36, 136].

Повећање садржаја ацетонитрила у мобилној фази проузрокује различит пораст задржавања кофеина и ибупрофена, будући да су различите поларности, што фаворизује

повећање вриједности R_s . Повећањем вриједности температуре стационарне фазе, убрзава се елуирање испитиваних једињења и смањује се вриједност фактора резолуције, што може довести до преклапања хроматографских пикова испитиваних једињења [165].

Повишена температура стационарне фазе неповољно утиче и на вриједност A_s (ИБУ), јер убрзање елуирања које је последица повећања температуре може довести до дисторзије хроматографског пика. С друге стране, промјене рН вриједности воденог дијела мобилне фазе показују значајан ефекат и на A_s (ИБУ) као јонизованог једињења (смањење рН вриједности испод 5,00 и повећање изнад 6,00 неповољно утичу на вриједност фактора симетрије). То се остварује кроз удружен утицај јонских интеракција и модификације дебљине воденог слоја адсорбованог на површини стационарне фазе [17, 143].

6.5.3.1. Дефинисање оптималних хроматографских услова

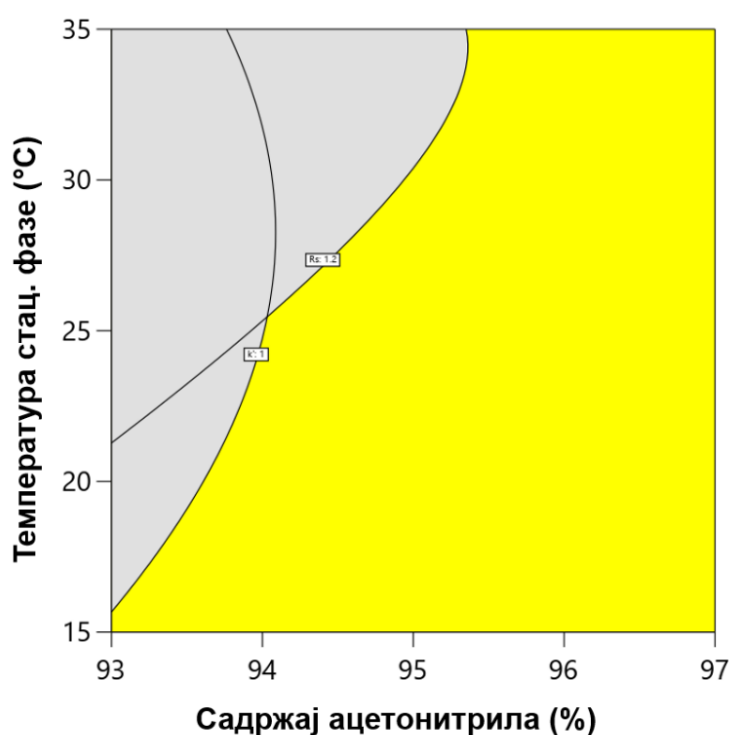
Увидом у успостављене зависности $CMAs$ од $CMRs$, јасно је да се не постижу оптималне вриједности свих $CMAs$ при истим вриједностима $CMRs$. Због тога је у процесу постизања глобалног оптимума неопходно примијенити Дерингерову функцију пожељности одговора, која омогућава мултикритеријумску оптимизацију (поглавље 1.1.3.1). У складу са резултатима приказаним на сликама 46 и 47, а уз поштовање критеријума постављених кроз АТР, дефинисане су граничне вриједности и степен значајности појединих $CMAs$, али и $CMRs$ који ће се користити за проналажење оптималних хроматографских услова анализе (табела 41). Минималан садржај ацетонитрила у мобилној фази и минимална вриједност температуре стационарне фазе од посебног су значаја (због параметара еколошке прихватљивости методе) [116].

Табела 41. Граничне вриједности и степен значајности СМAs и СМРs за постизање глобалног оптимума

Назив	Циљ	Нижа вриједност	Виша вриједност	Ниво значајности
Ацетонитрил	минималан	95,50	97,00	5
Пуфер	у распону	5,00	25,00	3
рН вриједност	у распону	5,00	7,00	3
Температура	минималан	15,00	35,00	3
k (коФ)	у распону	1,00	1,26	5
Rs (коФ, иБУ)	у распону	3,50	3,95	5
As (иБУ)	у распону	1,20	11,53	4
t _R (иБУ)	у распону	0,87	1,50	3

Ацетонитрил – садржај ацетонитрила [%], пуфер – концентрација пуфера [mmol L^{-1}], рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе [$^{\circ}\text{C}$], k (коФ) – ретенциони фактор кофеина, Rs (коФ, иБУ) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, As (иБУ) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, t_R (иБУ) – ретенционо вријеме ибупрофена

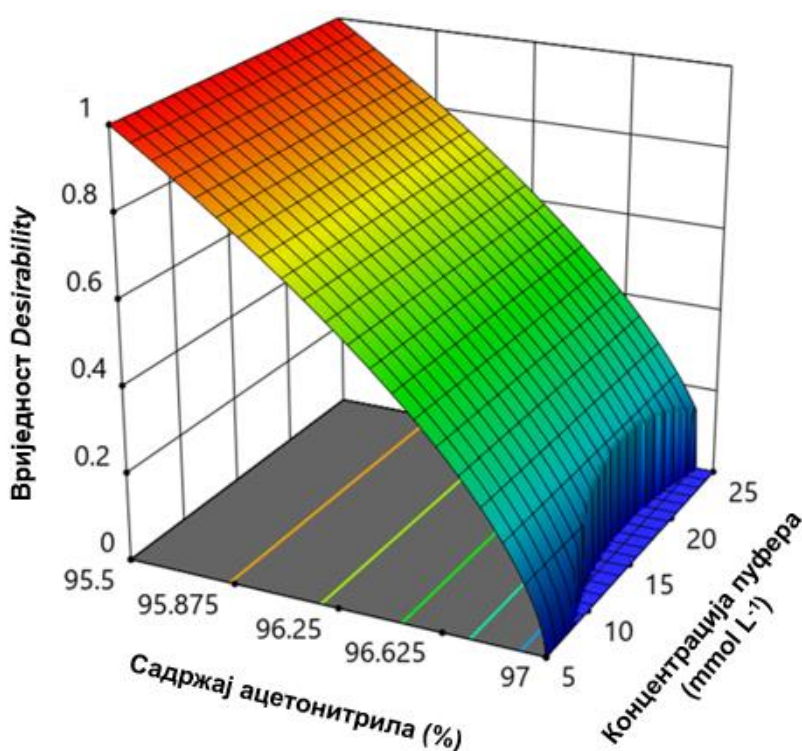
За одређивање глобалног оптимума кориштен је и 2D-графикон добијен преклапањем контура свих СМAs за све комбинације факторских интеракција СМРs (слика 48).



Слика 48. Графикон добијен преклапањем контура температуре стационарне фазе и садржаја ацетонитрила у мобилној фази, при концентрацији пуфера 5 mmol L^{-1} и рН вриједности воденог дијела мобилне фазе 5,30 који задовољавају дефинисане вриједности СМAs, температура стац. фазе – температура стационарне фазе

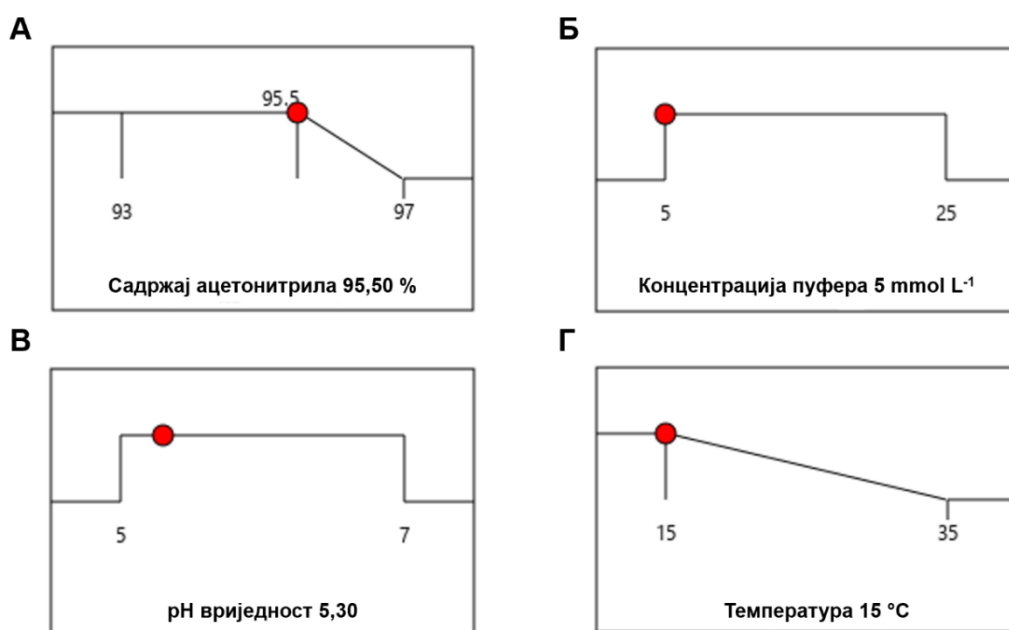
Сива зона на слици 48 представља област у којој одређени СМАС немају задовољавајућу вриједност. На примјер, при температури стационарне фазе мањој од 20 °C и садржају ацетонитрила мањем од 95 % неће се постићи оптимална вриједност R_s (КОФ, ИБУ). Додатно, при температури стационарне фазе већој од 30 °C и садржају ацетонитрила мањем од 94 % неће се постићи задовољавајућа вриједност k (КОФ). С друге стране, жута зона на слици 48 представља регион у коме се постижу задовољавајуће вриједности свих СМАС и служи као област унутар које је могуће дефинисати оптималне хроматографске услове анализе.

Циљ оптимизације јесте постизање максималне вриједности Дерингерове функције пожељности одговора, односно постизање глобалног оптимума ($D = 1,000$). Употребом *Design Expert*® софтвера, на основу претходно описаних резултата, креиран је 3D-графикон вриједности Дерингерове функције, који омогућава идентификовање *Desirability* (D) вриједности, односно вриједности пожељног одговора (слика 49).



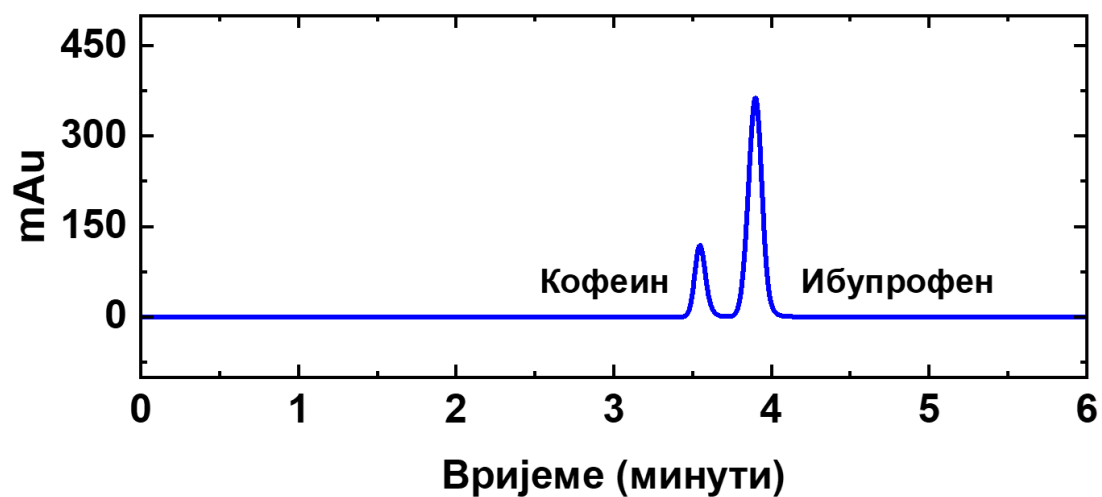
Слика 49. 3D-графикон са приказаним вриједностима *Desirability* у функцији температуре садржаја ацетонитрила и концентрације пуфера, а при рН вриједности воденог дијела мобилне фазе 5,30 и температури стационарне фазе 15 °C

Са слике 49 може се видјети да се максималне вриједности D постижу при садржају ацетонитрила 95,50 % – 96,25 %, уз концентрацију пуфера 5 – 8 mmol L⁻¹. Коначно, добијене D вриједности дефинисане помоћу Дерингерове функције пожељности одговора омогућиле су идентификацију оптималних хроматографских услова, при којима је вриједност $D = 1,000$. Вриједности појединих CMPs, при којима се постижу оптимални хроматографски услови, представљена је на слици 50.



Слика 50. Графички приказ вриједности појединих CMPs при оптималним хроматографским условима. рН вриједност – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, температура – температура стационарне фазе

Хроматограм добијен под препорученим оптималним условима, гдје је постигнут глобални оптимум свих CMAs и CMPs, приказан је на слици 51.



Слика 51. Хроматограм раздвајања кофеина и ибупрофена на диолној стационарној фази добијен под оптималним хроматографским условима: садржај ацетонитрила 95,50 %, концентрација пуфера 5 mmol L⁻¹, рН вриједност воденог дијела мобилне фазе 5,30 и температура стационарне фазе 15 °C

6.5.4. ИСПИТИВАЊЕ РОБУСНОСТИ МЕТОДЕ И ДЕФИНИСАЊЕ ПАРАМЕТАРА ЗА ПРОЦЈЕНУ ПОГОДНОСТИ СИСТЕМА

Испитивање робусности методе представља анализу/потврду робусности методе креиране према AQbD концепту [100]. За испитивање робусности кориштен је FrFD⁴⁻¹, који омогућава анализу утицаја четири испитивана CMPs на дефинисане CMAs. Испитивани CMPs, као и праћени CMAs задржани су као у процедури оптимизације методе јер су показали најзначајнији утицај (поглавља 6.5.1. и 6.5.2). Резултати добијени по спровођењу експеримената према плану FrFD⁴⁻¹ (табела 6) приказани су у табели 42.

Табела 42. Резултати робусности добијени примјеном FrFD⁴⁻¹

No	k (коф)	Rs (коф, ибу)	As (ибу)	tr (ибу)
1	1,00	3,40	1,30	3,76
2	1,09	2,39	1,31	3,79
3	1,00	3,32	0,98	3,71
4	1,05	3,14	1,45	3,85
5	1,00	4,87	1,08	3,71
6	1,03	4,03	1,39	3,85
7	1,00	5,04	1,27	3,78
8	1,09	2,29	1,40	3,77
9	1,03	3,47	1,21	3,78
10	1,00	4,35	1,41	3,77
11	1,00	4,01	1,26	3,77

No – Редни број експеримента (*standard order*), k (коф) – ретенциони фактор кофеина, Rs (коф, ибу) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, As (ибу) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, tr (ибу) – ретенционо вријеме ибупрофена [min]

Анализом добијених резултата може се видјети да мале промјене у вриједностима CMPs неће проузроковати значајне промјене у вриједностима CMAs, што потврђује да је метода робусна (табела 42) . Поред тога, може се видјети да је за све експерименталне услове:

- вриједност $k_{(коф)} \geq 1,00$, што је минимална вриједност при којој је задржавање испитиваног једињења задовољавајуће,
- вриједност $R_{s(коф, ибу)}$ значајно $> 1,20$, што је минимална вриједност при којој се раздвојеност хроматографских пикова сматра потпуном,
- вриједност $A_{s(ибу)}$ 0,80 – 1,50, те
- вриједност $t_{r(ибу)}$, као једињења које посљедње елуира увијек око 4 минуте, што је задовољавајуће кратко вријеме хроматографске анализе.

Резултати добијени спровођењем експеримената према плану FrFD⁴⁻¹ омогућили су, кориштењем *Dong*-овог алгоритма, дефинисање најкритичнијих фактора који значајно утичу на праћене одговоре (нарочито на ретенционо вријеме испитиваних једињења). Овај приступ омогућио је процјену погодности система (SST) и одређивање SST лимита. За све факторе израчунате су вриједности факторских ефеката, као и одговарајуће вриједности $E_{critical}$ (табела 43).

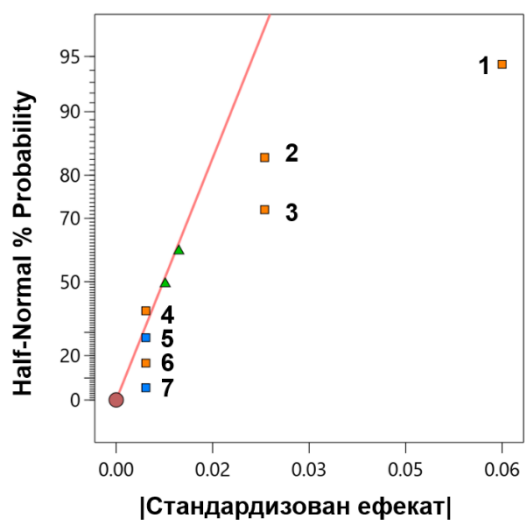
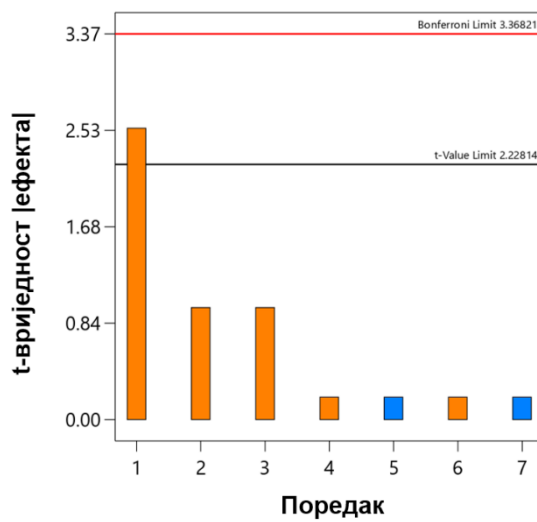
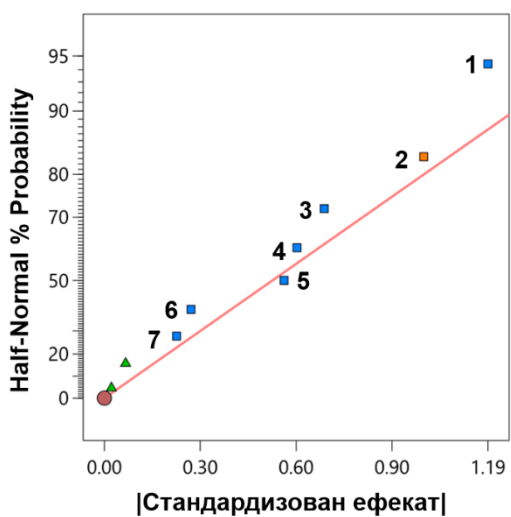
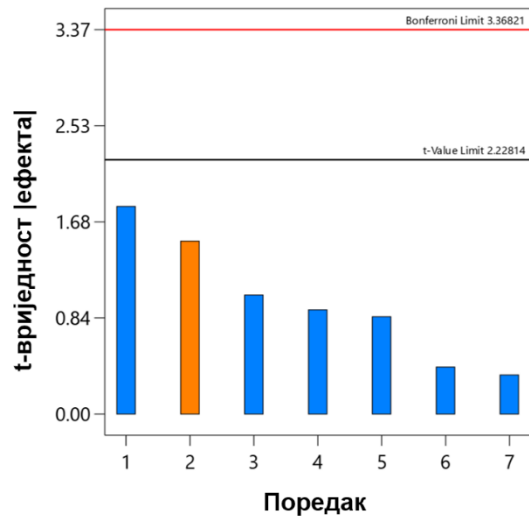
Табела 43. Факторски ефекти CMPs и добијени резултати $E_{critical}$ за CMAs

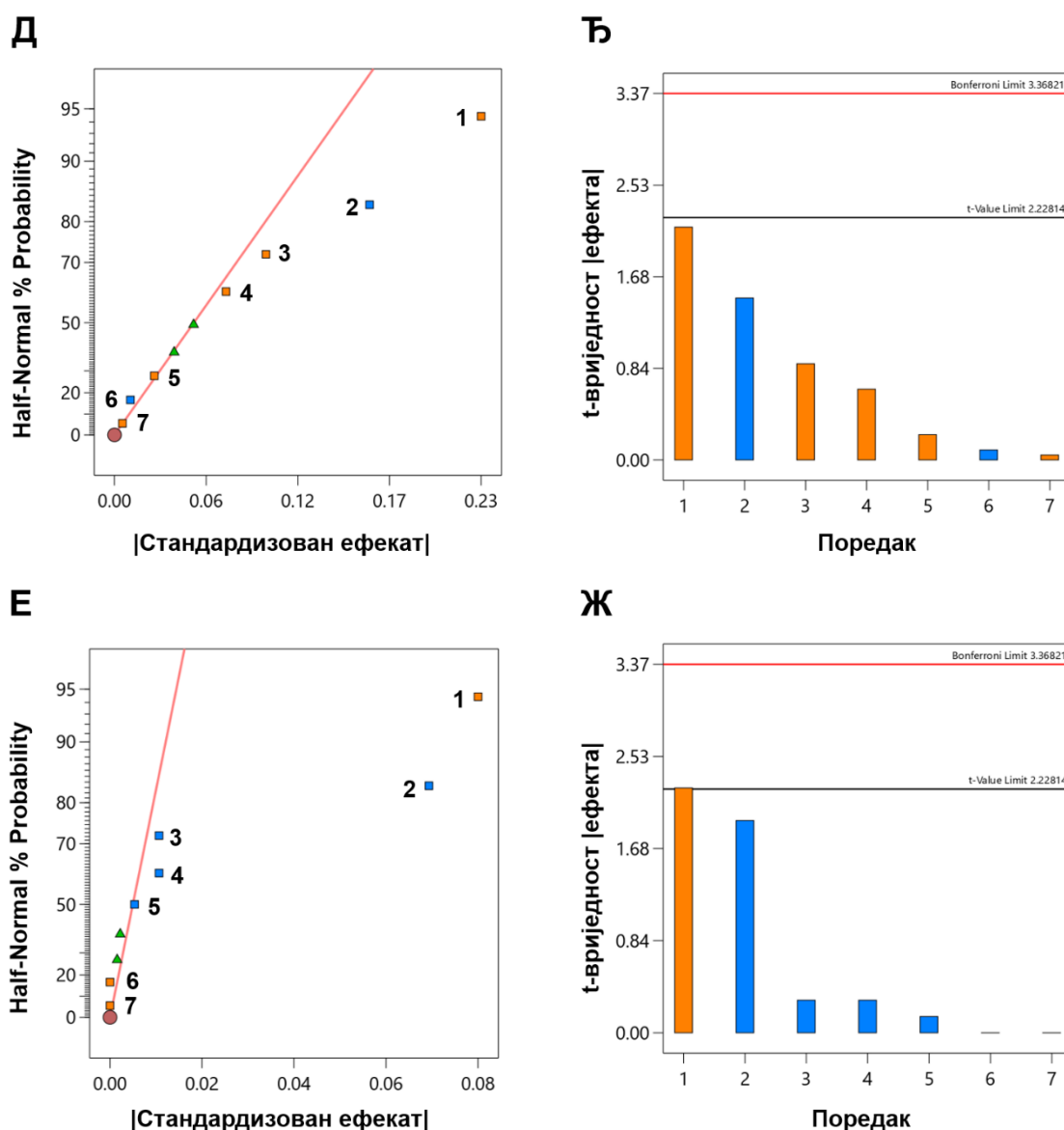
Фактори	k (коф)	Rs (коф, ибу)	As (ибу)	tr (ибу)
ацетонитрил	0,0650	– 1,195	0,2300	0,0750
пуфер	0,0050	– 0,2250	0,0050	0,0000
рН вриједност	– 0,0050	1,5925	0,0250	– 4,44 · e ⁻¹⁶
температура	0,0250	– 0,6850	– 0,1600	– 0,0650
$E_{critical} (\alpha = 0,05)$	0,0973	2,9434	0,3911	0,1380

ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази [%], пуфер – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], температура – температура стационарне фазе [°C], k (коф) – ретенциони фактор кофеина, Rs (коф, ибу) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, As (ибу) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, tr (ибу) – ретенционо вријеме ибупрофена [min], $E_{critical}$ – критична вриједност ефекта

Апсолутне вриједности CMAs које су мање од одговарајућих вриједности за $E_{critical}$ (за вјероватноћу од 0,05) потврђују да нити један фактор у испитиваном распону не угрожава квалитет резултата CMAs, што потврђује да је метода робусна (табела 43) [103].

Поред статистичке анализе, робусност методе додатно је испитана и анализом графикана факторских ефеката кориштењем *half-normal probability* плотова и Парето графикана (слика 52).

A**Б****В****Г**



Слика 52. Half-normal probability плотови (лијево) и Парето графикони (десно) за (А) и (Б) k (КОФ) (1 – садржај ацетонитрила, 2 – интеракција садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе, 3 – температура стационарне фазе, 4 – интеракција садржај ацетонитрила/концентрација пуфера, 5 – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 6 – концентрација пуфера, 7 – интеракција садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе), (В) и (Г) R_s (КОФ, ИБУ) (1 – садржај ацетонитрила, 2 – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 3 – температура стационарне фазе, 4 – интеракција садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 5 – интеракција садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе, 6 – интеракција садржај ацетонитрила/концентрација пуфера, 7 – концентрација пуфера), (Д) и (Ђ) A_s (ИБУ) (1 – садржај ацетонитрила, 2 – температура стационарне фазе, 3 – интеракција садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе, 4 – интеракција садржај ацетонитрила/концентрације пуфера, 5 – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 6 – интеракција садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 7 – концентрација пуфера), (Е) и (Ж) t_r (ИБУ) (1 – садржај ацетонитрила, 2 – температура стационарне фазе, 3 – интеракција садржај ацетонитрила/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе, 4 – интеракција садржај ацетонитрила/концентрације пуфера, 5 – интеракција садржај ацетонитрила/температура стационарне фазе, 6 – концентрација пуфера, 7 – рН вриједност воденог дијела мобилне фазе). Плавом бојом означени су позитивни ефекти, а наранџастом негативни, док зелени троуглови представљају процјену утицаја грешке у моделу

Нормалност расподеле података испитана је *Shapiro-Wilk* тестом, а добијене *W* вриједности блиске 1,000 (0,837 за *k*_(КОФ), 0,870 за *Rs*_(КОФ, ИБУ), 0,962 за *As*_(ИБУ) и 0,837 за *t_R*_(ИБУ)) указују на нормалну расподелу. Додатно, *p* вриједности > 0,05 (0,092 за *k*_(КОФ), 0,187 за *Rs*_(КОФ, ИБУ), 0,832 за *As*_(ИБУ) и 0,093 за *t_R*_(ИБУ)) потврђују да нема јаког доказа за одбацивање хипотезе да су подаци нормално расподељени, што подразумева нормалност [176].

Удаљеност тачака од црвене линије на *half-normal probability* графиконима указује на величину коју дати фактор има на праћени одговор система – што је тачка удаљенија од црвене линије, то је утицај датог фактора већи. Парето дијаграм сортира ефекте по величини – висина сваке траке представља величину *t*-вриједности ефекта тог фактора, док *t*-вриједност мјери колико је ефекат значајан, при чему постоје двије границе:

- црном линијом означена *t*-вриједност (фактори чије траке прелазе ову вриједност сматрају се значајним, односно имају статистички значајан утицај на одговор), и
- црвеном линијом означена *Bonferroni* вриједност (представља строжи критеријум, те се фактори чије траке прелазе ову вриједност сматрају изузетно значајним, јер се узима у обзир већа могућност грешке услед вишеструких анализа).

Дакле, сваки фактор који прелази *t*-вриједност потребно је контролисати у циљу очувања квалитета резултата добијених употребом ове методе. С друге стране, појава фактора који прелазе *Bonferroni* корекцију, указује на угрожавање поузданости, тачности и репродуктивности методе. Анализом свих Парето дијаграма (слика 52) може се закључити да је метода робусна, јер нити један од фактора не прелази *Bonferroni* корекцију, а садржај ацетонитрила (означен бројем 1 на графиконима 52Б и 52Ж – показао значајну удаљеност од праве) једини је фактор којег је потребно контролисати у циљу постизања задовољавајућих вриједности ретенционог фактора кофеина [176].

Након статистичке и графичке потврде робусности методе, дефинисани су факторски нивои за најризичније услове анализе (услови при којима се добијају најлошији резултати анализе). Факторски нивои са одговарајућим SST лимитима приказани су у табели 44.

Табела 44. Факторски нивои при најризичнијим условима анализе са SST лимитима

Фактори	k (коф)				Rs (коф, ибу)	As (ибу)	tr (ибу)	
ацетонитрил	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
пуфер	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1
рН вриједност	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1
температура	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	- 1
SST лимит	1,00				2,29	1,45	3,85	

ацетонитрил – садржај ацетонитрила у мобилној фази [%], пуфер – концентрација пуфера [mmol L⁻¹], температура – температура стационарне фазе [°C], k (коф) – ретенциони фактор кофеина, Rs (коф, ибу) – фактор резолуције између хроматографских пикова кофеина и ибупрофена, As (ибу) – фактор симетрије хроматографског пика ибупрофена, tr (ибу) – ретенционо вријеме ибупрофена [min], SST – тест погодности система

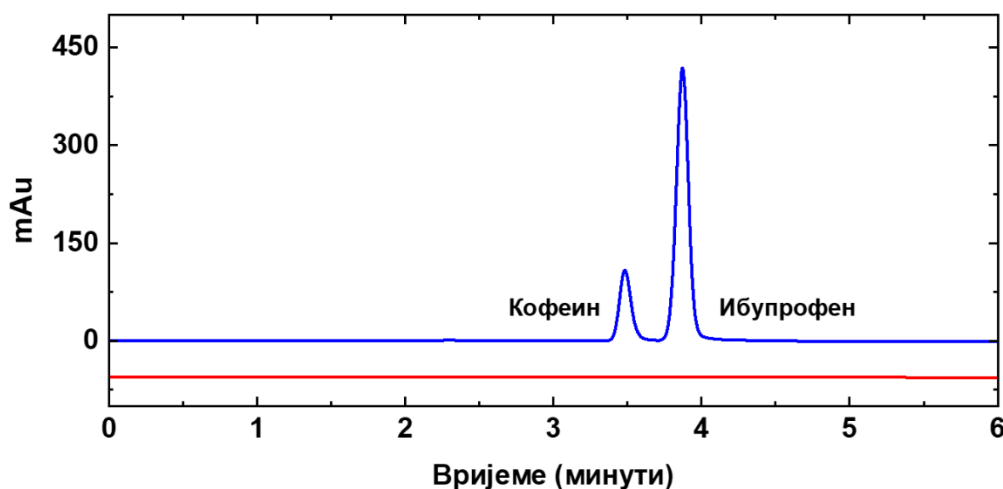
Дефинисани SST лимити потврђују да ће, чак и при најризичнијим условима анализе, метода обезбиједити добијање задовољавајућих резултата, односно резултата који су у складу са дефинисаним АТР (табела 44) [103].

6.5.5. ВАЛИДАЦИЈА HPLC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

Развој методе обухвата три кључне фазе: прелиминарна истраживања, оптимизацију и валидацију. Након дефинисања оптималних хроматографских услова и потврде робусности, спроведено је испитивање преосталих валидационих параметара: селективности, линеарности, осјетљивости, тачности и прецизности.

6.5.5.1. Испитивање селективности методе

Селективност методе испитана је поређењем хроматограма, добијених под оптималним хроматографским условима, који представљају резултате анализе смјеше испитиваних једињења и раствора плацеба (поглавље 4.9.4), а приказани су на слици 53.

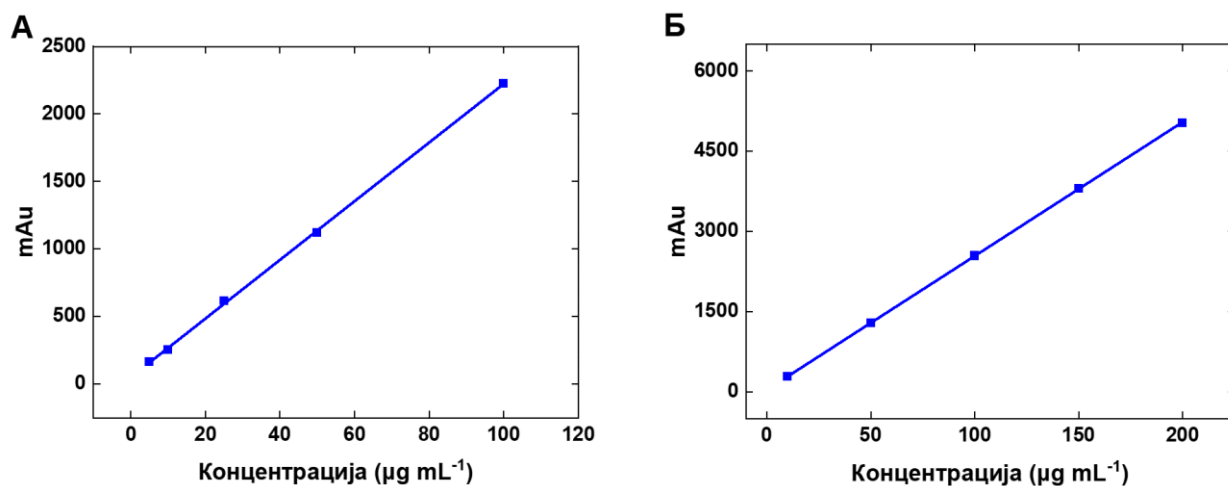


Слика 53. Испитивање селективности методе. Плава линија представља хроматограм смјеше испитиваних једињења, док црвена линија представља хроматограм плацебо смјеше

Анализом добијених хроматограма може се видјети да на положају t_R кофеина и ибупрофена, у раствору плацеба, нема пикова који би показали интерференцију са испитиваним једињењима (слика 53), што потврђује селективност методе.

6.5.5.2. Испитивање линеарности методе

Линеарност методе испитана је инјектовањем растућих концентрација раствора кофеина и ибупрофена (поглавље 4.9.5), при чему је као одговор система праћена површина њихових хроматографских пикова. На основу добијених резултата, конструисане су одговарајуће калибрационе кривуље (слика 54), које приказују зависност промјене површине хроматографских пикова и концентрације испитиваних једињења.



Слика 54. Приказ графикаона линеарне зависности површине хроматографских пикова и концентрације (А) кофеина и (Б) ибупрофена. mAu – *miliapsorptive unit*

Са слике 54 може се видјети да повећање концентрације испитиваних једињења доводи до линеарног пораста одговарајућих површина хроматографских пикова. Испитивање линеарности методе извршено је линеарном регресионом анализом, а релевантни статистички параметри приказани су у табели 45.

Табела 45. Статистички параметри за испитивање линеарности методе

Испитивана једињења	Кофеин	Ибупрофен
Распон концентарција (µg cm ⁻³)	5,00 – 100,00	10,00 – 200,00
$y = ax + b$	$y = 21,721 x + 50,819$	$y = 25,042 x + 36,583$
Sa	0,2281	0,0796
Sb	11,7446	9,7552
t _b	4,3270	3,7500
Pearson r	0,9998	1,0000

Sa – стандардна девијација нагиба, Sb – стандардна девијација одсјечка, Pearson r – Pearson-ов коефицијент корелације

Анализом добијених резултата (табела 45), може се закључити је да је у распону испитиваних концентрација метода линеарна (*Pearson r* > 0,9990), односно, постоји задовољавајућа линеарна зависност промјене вриједности површина хроматографских пикова испитиваних једињења са промјеном њихове концентрације. Дакле, добијене једначине правих (табела 45) могу се користити за квантитативну анализу испитиваних једињења [164].

6.5.5.3. Испитивање осјетљивости методе

Осјетљивост методе, која се дефинише лимитом детекције и лимитом квантификације, испитана је припремом серије раствора испитиваних једињења опадајућих концентрација (поглавље 4.9.6). Изражена је као најнижа концентрација испитиваног једињења која се може одредити (LOQ) или детектовати (LOD), са одговарајућом тачношћу и прецизношћу. Вриједности о LOQ и LOD добијене су на основу директног мјерења односа *Signal-to-Noise* (S/N) и приказане су у табели 46.

Табела 46. Лимит детекције и лимит квантификације кофеина и ибупрофена

Испитивано једињење	Концентрација ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹⁾	<i>Signal-to-Noise</i>
Кофеин	0,0100	32,60
	0,0050 ¹	17,40
	0,0025 ²	3,60
Ибупрофен	0,0100 ¹	10,90
	0,0050 ²	5,10
	0,0025	—

¹ LOQ – лимит квантификације, ² LOD – лимит детекције

Као LOQ означена је она вриједност концентрације за коју је S/N минимално 10 (за кофеин 0,0050 $\mu\text{g mL}^{-1}$, за ибупрофен 0,0100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), док је као LOD означена вриједност концентрације за коју је S/N минимално 3 (за кофеин 0,0025 $\mu\text{g mL}^{-1}$, за ибупрофен 0,0050 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (табела 46). Ниске вриједности LOD и LOQ за оба испитивана једињења указују на задовољавајућу осјетљивост методе, односно показују да је методу могуће користити у анализама врло малих концентрација испитиваних једињења у узорку, што је чини погодном за различите намјене (нпр. праћење фармакокинетичких/фармакодинамичких параметара или одређивање трагова једињења у сложеним смјешама какве су биолошки узорци) [164, 168].

6.5.5.4. Испитивање тачности методе

Тачност методе, која се најчешће изражава као проценат приноса одређивања (*Recovery* вриједност) за познату количину испитиваног једињења додату плацебу, испитана је при концентрацијама од 80 %, 100 % и 120 % у односу на декларисану вриједност (поглавље 4.9.7). На сваком од испитиваних нивоа, израчуната је релативна стандардна девијација, а добијени резултати приказани су у табели 47.

Табела 47. Резултати испитивања тачности методе

Испитивано једињење	Инјектована концентрација (µg cm ⁻³)	Детектована концентрација (µg cm ⁻³)	Recovery* (%)	RSD (%)
Кофеин	20 (80 %)	20,24	101,22	1,33
		19,71	98,57	
		20,31	101,56	
	25 (100 %)	24,63	98,52	1,01
		25,24	100,57	
		25,00	100,00	
	30 (120 %)	29,96	99,88	0,54
		29,64	98,80	
		30,00	100,00	
Ибупрофен	80 (80 %)	81,54	101,92	0,23
		81,27	101,59	
		81,09	101,37	
	100 (100 %)	99,35	99,35	0,65
		100,67	100,67	
		100,80	100,80	
	120 (120 %)	121,71	101,43	0,53
		121,70	101,42	
		120,33	100,28	

RSD – релативна стандардна девијација

(*) – *Recovery* вриједност добијена као средња вриједност три узастопна инјектовања истог раствора

Recovery вриједности (табела 47) у границама прихватљивости ($100 \pm 5 \%$) и RSD вриједности мање од 2,00 % потврђују тачност методе [164].

6.5.5.5. Испитивање прецизности методе

Прецизност методе, која се изражава релативном стандардном девијацијом, испитана је мјерењем концентрације шест идентично припремљених раствора исте концентрације (поглавље 4.9.8). Добијене вриједности RSD представљене су у табели 48.

Табела 48. Резултати испитивања прецизности методе

Испитивано једињење	Инјектована концентрација (µg cm ⁻³)	Детектована концентрација (µg cm ⁻³)	<i>Recovery</i> [*] (%)	RSD (%)
Кофеин	25,00	25,88	103,52	0,24
		25,74	102,96	
		25,76	103,04	
		25,86	103,44	
		25,90	103,60	
		25,79	103,16	
Ибупрофен	100,00	98,32	98,32	0,15
		98,31	98,31	
		98,70	98,70	
		98,27	98,27	
		98,45	98,45	
		98,32	98,32	

RSD – релативна стандардна девијација

(*) – *Recovery* вриједност добијена као средња вриједност три узастопна инјектовања истог раствора

Добијене *Recovery* вриједности (табела 48) у границама прихватљивости (100 ± 5 %) и RSD за кофеин 0,24 и за ибупрофен 0,15, а које су мање од 1,00 %, потврђују прецизност методе [164, 168].

6.5.6. ПРОЦЈЕНА „ЗЕЛЕНОСТИ“ И ЕФИКАСНОСТИ HILIC МЕТОДЕ ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ КОФЕИНА И ИБУПРОФЕНА

По завршетку процеса развоја, оптимизације и валидације HILIC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и ибупрофена, спроведена је процјена еколошке прихватљивости и ефикасности методе, употребом софтвера и модела описаних у поглављу 1.5.3. Резултати добијени током тих анализа били су идентични резултатима добијеним приликом процјене претходно описане методе за анализу кофеина и парацетамола (поглавље 6.4.6). Разлог томе је што су кориштени исти реагенси, вријеме трајања анализе је врло слично, као и број испитиваних једињења. Такође, у питању је иста врста хроматографске технике (HILIC), а и хроматографски услови (прије свега састав мобилне фазе) били су готово исти.

Највећи недостатак и ове методе је употреба токсичног органског растварача ацетонитрила, те одсуство третирања отпада који се произведе током анализе. Мање критични су: запремина аналитичког отпада, употреба електричне енергије, кориштење реагенса који нису у потпуности добијени из обновљивих ресурса те запаљивост ацетонитрила и његова токсичност по водени свијет (слика 42 и 43)). Будући да је већина испитиваних параметара била „зелена“ процијењено је да метода има задовољавајући ниво еколошке прихватљивости. Практичност методе потврђена је резултатом 85,0 који прелази границу од 60,0 поена (колико је потребно остварити процјеном уз BAGI софтвер да би се метода сматрала практичном – слика 44). У коначници, процјеном усклађености методе са принципима WAC, употребом RGB модела (слика 45), потврђена је њена одрживост као и задовољавајућа еколошка прихватљивост (резултат 83,3 који одговара свијетлосивој боји).

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Ретенциони механизми базних и неутралних једињења испитани су на примјеру смјеше амитриптилин-хидрохлорида и његових нечистоћа А, В, С, D, F и G на амидној, аминок, диолној и силика стационарној фази. Употребом ацетатног пуфера постигнуто је ефикасно раздвајање испитиваних једињења и репродуктивност резултата. У широком распону садржаја ацетонитрила (4 % – 96 %), на амидној, диолној и силика стационарној фази креирани су двојни HILIC/RP-HPLC ретенциони механизми и утврђени су састави мобилних фаза на прелазу из HILIC у RP-HPLC механизам за базна једињења. Након тога, испитан је допринос процеса расподеле и адсорпције у HILIC и RP-HPLC регионима. Утврђено је да партициони ретенциони модел успјешно предвиђа задржавање само на аминок стационарној фази, док је адсорпциони ретенциони модел у HILIC региону преовладавао на преосталим стационарним фазама. У RP-HPLC региону, разлика између коефицијената детерминације ових модела била је статистички занемарљива, што указује на присуство оба механизма. Неутрална испитивана једињења показала су ретенционо понашање само у RP-HPLC региону.
2. Катјонско-измјењивачки ретенциони модели значајно су утицали на укупно задржавање базних испитиваних једињења на силика стационарној фази. Задржавање базних испитиваних једињења на овој стационарној фази повећавало се са повећањем рН вриједности воденог дијела мобилне фазе и са смањењем концентрације пуфера. Насупрот томе, задржавање базних испитиваних једињења повећавало се са повећањем концентрације пуфера на аминок стационарној фази, на којој је присутан слабији механизам анјонске измјене. Потврђено је да су врста стационарне фазе и физичко-хемијске особине испитиваних једињења значајно утицали на ретенционо понашање. Примјена експерименталних ретенционих модела омогућила је квантитатвну процјену ефеката појединачних фактора и двофакторских интеракција на ретенционо понашање испитиваних једињења. Утврђено је да је највећи утицај имао садржај ацетонитрила у мобилној фази, затим концентрација пуфера и на крају рН вриједност воденог дијела мобилне фазе. На ретенционо понашање базних испитиваних једињења значајан утицај имале су и двофакторске интеракције: садржај ацетонитрила/концентрација пуфера и концентрација пуфера/рН вриједност воденог дијела мобилне фазе.

3. Ретенциони механизми киселих и неутралних једињења испитани су на примјеру смјеше диклофенак-калијума, ибупрофена, кофеина и парацетамола на амидној, аминок и диолној стационарној фази. Примјена ацетатног пуфера и у овом случају омогућила је добијење репродуктивних резултата, уз постизање ефикасног раздвајања испитиваних једињења. На све три стационарне фазе, при широком распону садржаја ацетонитрила (4 % – 96 %), развијени су двојни HILIC/ RP-HPLC ретенциони механизми, за сва испитивана једињења. Дефинисан је састав мобилне фазе при којима је остварен прелаз из HILIC у RP-HPLC ретенциони механизам. Потом су у оба региона испитани механизми расподеле и адсорпције. Добијени резултати показали су да адсорпциони ретенциони модел успјешније описује ретенционо понашање испитиваних једињења на свим стационарним фазама, изузев парацетамола и ибупрофена код којих је на диолној стационарној фази доминантан био партициони ретенциони модел. Неутрална испитивана једињења су, под хроматографским условима примијењеним у овом дијелу истраживања, показала задовољавајуће ретенционо понашање и у HILIC и у RP-HPLC региону.
4. Кисела испитивана једињења показала су дуже задржавање на аминок стационарној фази при мањим концентрацијама пуфера. То је утврђено испитивањем доприноса анијонско-измјењивачког ретенционог механизма на аминок стационарној фази. С друге стране, процес анијонске измјене није значајно утицао на ретенционо понашање неутралних једињења, што је последица њихових физичко-хемијских особина. Анализом хроматограма смјеше испитиваних једињења описан је и утицај врсте стационарне фазе и физичко-хемијских особина испитиваних једињења на ретенционо понашање. Примјеном хеометријског приступа на аминок стационарној фази утврђено је да су на ретенционо понашање диклофенак-калијума утицали садржај ацетонитрила и концентрација пуфера, те двофакторска интеракција садржај ацетонитрила/pH вриједност воденог дијела мобилне фазе. На ретенционо понашање ибупрофена утицали су: садржај ацетонитрила, концентрација пуфера и pH вриједност воденог дијела мобилне фазе, те двофакторска интеракција садржај ацетонитрила/pH вриједност воденог дијела мобилне фазе. С друге стране, на ретенционо понашање кофеина, које је у потпуности описано линеарним моделом, утицај су имали само садржај ацетонитрила и концентрација пуфера.

Ретенционо понашање парацетамола дефинисано је појединачним утицајима свих испитиваних фактора, уз одсуство двофакторских интеракција.

5. Развојем софтвера за анализу ретенционих механизма, који омогућава статистичку анализу и графички приказ резултата, у потпуности је аутоматизован временски захтјеван процес анализе. Додатно, боље прилагођавање анализираних модела експерименталним подацима, уз висок степен прецизности при рачунању, омогућило је добијање прецизнијих резултата. Ово је постигнуто примјеном неколико различитих библиотека програмског језика *Python*, који подржава напредне математичке операције, уз високу тачност при обради резултата. На крају, софтвер је примијењен у анализи експерименталних података добијених за ретенционе механизме свих испитиваних једињења, чиме је потврђена његова тачност, поузданост и примјењивост у реалним условима анализе.
6. На основу резултата добијених током испитивања ретенционих механизма киселих и неутралних једињења, развијене су нове HILIC методе за квалитативну и квантитативну анализу кофеина и парацетамола, као и кофеина и ибупрофена. Примјеном *Analytical Quality by Design* концепта, комбинованог са принципима „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије, новоразвијене методе постигле су задовољавајући ниво поузданости, ефикасности и еколошке прихватљивости. То је потврђено анализом метода различитим софтверима и моделима који су базирани на процјени принципа „зелене“ и „бијеле“ аналитичке хемије. На овај начин представљен је нови приступ развоју метода који је имао за циљ постизање већег нивоа заштите животне средине, без угрожавања квалитета резултата добијених овим методама. Новоразвијене методе валидиране су у складу са смјерницом ICH Q2(R2).

8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr A*. 1990;499:177–196. doi: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3
2. Periat A, Krull IS, Guilleme D. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins: liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2015;38(3):357–367. doi: 10.1002/jssc.201400969
3. Guo Y, Bhalodia N, Fattal B, Serris I. Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Separations*, 2019;6(2):19. doi: 10.3390/separations6020019
4. Zhang Q, Yang F, Ge L, Hu Y, Xia Z. Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci*. 2017;40(1):49–80. doi: 10.1002/jssc.201600843
5. Kohler I, Giera M. Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics. *J Sep Sci*. 2017;40(1):93–108. doi: 10.1002/jssc.201600981
6. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(1):231–247. doi: 10.1007/s00216-011-5308-5
7. Karatapanis AE, Fiamegos YC, Stalikas CD. HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column. *J Sep Sci*. 2009;32(7):909–917. doi: 10.1002/jssc.200800525
8. Greco G, Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(7):684–693. doi: 10.1093/chromsci/bmt015
9. Guo Y. A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity. *Biomed Chromatogr*. 2022;36(4):e5332. doi: 10.1002/bmc.5332
10. Gama MR, Da Costa Silva RG, Collins CH, Bottoli CBG. Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends Anal Chem*. 2012;37:48–60. doi: 10.1016/j.trac.2012.03.009
11. Dejaegher B, Vander Heyden Y. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci*. 2010;33(6–7):698–715. doi: 10.1002/jssc.200900742
12. Jovanović M, Stojanović B, Rakić T, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid

- chromatography. *Open Chem.* 2013;11(7):1150–1162. doi: 10.2478/s11532-013-0245-0
13. Redón L, Subirats X, Rosés M. Evaluation of hold-up volume determination methods and markers in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Molecules.* 2023;28(3):1372. doi: 10.3390/molecules28031372
 14. Zhang S, Zhang F, Yang B, Liang X. A reversed phase/hydrophilic interaction/ion exchange mixed-mode stationary phase for liquid chromatography. *Chin Chem Lett.* 2019;30(2):470–472. doi: 10.1016/j.cclet.2018.04.013
 15. Geng H, Wang Z, Zhang F, Li Z, Yang B. A hyperbranched polyglycerol-functionalized polymer polar stationary phase. *J Chromatogr A.* 2022;1670:462946. doi: 10.1016/j.chroma.2022.462946
 16. Kozlik P, Vaclova J, Kalikova K. Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography – separation potential in peptide analysis. *Microchem J.* 2021;165:106158. doi: 10.1016/j.microc.2021.106158
 17. Sheng Q, Liu M, Lan M, Qing G. Hydrophilic interaction liquid chromatography promotes the development of bio-separation and bio-analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2023;165:117148. doi: 10.1016/j.trac.2023.117148
 18. Euerby MR, Hulse J, Petersson P, Vazhentsev A, Kassam K. Retention modelling in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(30):9135–9152. doi: 10.1007/s00216-015-9079-2
 19. McCalley DV. Hydrophilic interaction liquid chromatography: an update. *LC GC Eur.* 2019;32(3):114–125
 20. Heaton J, Smith NW. Advantages and disadvantages of HILIC; a brief overview. *Chromatogr. Today.* 2012;5:44–47
 21. Hanai T. Definition of HILIC system and quantitative analysis of retention mechanisms. *Curr Chromatogr.* 2018;5(1):43–52. doi: 10.2174/2213240605666180207093716
 22. McCalley DV. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2017;1523:49–71. doi: 10.1016/j.chroma.2017.06.026
 23. Jandera P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J Sep Sci.* 2008;31(9):1421–1437. doi: 10.1002/jssc.200800051

24. Guo Y, Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2011;1218(35):5920–5938. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.052
25. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta*. 2011;692(1–2):1–25. doi: 10.1016/j.aca.2011.02.047
26. Jandera P, Janás P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. a review. *Anal Chim Acta*. 2017;967:12–32. doi: 10.1016/j.aca.2017.01.060
27. Vlčková H, Ježková K, Štětková K, Tomšíková H, Solich P, Nováková L. Study of the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases used in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2014;37(11):1297–1307. doi: 10.1002/jssc.201400020
28. Ikegami T, Tomomatsu K, Takubo H, Horie K, Tanaka N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2008;1184(1–2):474–503. doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.075
29. Jandera P. Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in *Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques*, Elsevier, 2017:39–87. doi: 10.1016/B978-0-12-811732-3.00002-9
30. Navarro-Reig M, Ortiz-Villanueva E, Tauler R, Jaumot J. Modelling of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phases Using Chemometric Approaches. *Metabolites*. 2017;7(4):54. doi: 10.3390/metabo7040054
31. Kartsova LA, Bessonova EA, Somova VD. Hydrophilic interaction chromatography. *J Anal Chem*. 2019;74(5):415–424. doi: 10.1134/S1061934819050058
32. Jandera P, Hájek T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *J. Sep Sci*. 2018;41(1):145–162. doi: 10.1002/jssc.201701010
33. Alvarez-Segura T, Subirats X, Rosés M. Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2019;1050:176–184. doi: 10.1016/j.aca.2018.11.021
34. Olsen BA. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J Chromatogr A*. 2001;913(1–2):113–122. doi: 10.1016/S0021-9673(00)01063-3
35. Heaton JC, Russell JJ, Underwood T, Boughtflower R, McCalley DV. Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and

- simple acid solutions. *J Chromatogr A*. 2014;1347:39–48. doi: 10.1016/j.chroma.2014.04.026
36. Kalíková K, Boublík M, Kučerová G, Kozlík P. The effect of buffer concentration and cation type in the mobile phase on retention of amino acids and dipeptides in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chem Pap*. 2018;72(1):139–147. doi: 10.1007/s11696-017-0265-x
 37. Hao Z, Xiao B, Weng N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J Sep Sci*. 2008;31(9):1449–1464. doi: 10.1002/jssc.200700624
 38. Kaliszan R. Recent advances in quantitative structure-retention relationships (QSRR) in *Handbook of Analytical Separations*. Elsevier, 2000;1:503–534. doi: 10.1016/S1567-7192(00)80014-5
 39. Kaliszan R. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chem Rev*. 2007;107(7):3212–3246. doi: 10.1021/cr068412z
 40. Redón L, Safar Beiranvand M, Subirats X, Rosés M. Characterization of solute-solvent interactions in liquid chromatography systems: A fast method based on Abraham's linear solvation energy relationships. *Anal Chim Acta*. 2023;1277:341672. doi: 10.1016/j.aca.2023.341672
 41. Otto M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*, third edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017
 42. *Chemometrics: data treatment and applications*. S.l.: Elsevier, 2024
 43. Taraji M et al. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: a review. *Anal Chim Acta*. 2018;1000:20–40. doi: 10.1016/j.aca.2017.09.041
 44. García-Álvarez-Coque MC, Torres-Lapasió JR, Baeza-Baeza JJ. Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatograph. *Anal Chim Acta*. 2006;579(2):125–145. doi: 10.1016/j.aca.2006.07.028
 45. Rakić T. Hemometrijsko unapređenje razvoja metoda tečne hromatografije kroz matematičko modelovanje i nove funkcije hromatografskog odgovora. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2013
 46. Bystrzanowska M, Tobiszewski M. Multi-objective optimization of microextraction procedures. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019;116:266–273. doi: 10.1016/j.trac.2018.12.031

47. Vera Candioti L, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014;124:123–138. doi: 10.1016/j.talanta.2014.01.034
48. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B*. 2012;910:2–13. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.020
49. Sha’at M et al. Implementation of QbD Approach to the Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Metformin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms by HPLC. *Pharmaceutics*. 2022;14(6):1187. doi: 10.3390/pharmaceutics14061187
50. Jovanović M. Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tačnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2015
51. Gunst RF, Mason RL. Fractional factorial design. *WIREs Comput Stat*. 2009;1(2):234–244. doi: 10.1002/wics.27
52. Method Development System – Features : Shimadzu (Österreich). Accessed: Dec. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.shimadzu.at/products/liquid-chromatography/hplc-system/mss/features.html>
53. Marrubini G, Tumminelli E, Corman C, Appelblad P, Melzi C, Collina S. A design of experiments robustness study on gradient elution conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography. SSRN, preprint, 2023. doi: 10.2139/ssrn.4524981
54. Ferreira SLC et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1–2):2–14. doi: 10.1016/j.chroma.2007.03.051
55. Beg S, Akhter S. Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development in *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development*. Springer Singapore, 2021:77–85. doi: 10.1007/978-981-33-4717-5_7
56. Rakić T, Kasagić-Vujanović I, Jovanović M, Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Comparison of Full Factorial Design, Central Composite Design, and Box-Behnken Design in Chromatographic Method Development for the Determination of Fluconazole and Its Impurities. *Anal Lett*. 2014;47(8):1334–1347. doi: 10.1080/00032719.2013.867503
57. Pesek JJ, Matyska MT, Larrabee S. HPLC retention behavior on hydride-based stationary phases. *J Sep Sci*. 2007;30(5):637–647. doi: 10.1002/jssc.200600414

58. Rafferty JL, Zhang L, Siepmann JI, Schure MR. Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: a molecular perspective. *Anal Chem.* 2007;79(17):6551–6558. doi: 10.1021/ac0705115
59. Dinh NP, Jonsson T, Irgum K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2011;1218(35):5880–5891. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.037
60. Jandera P, Janás P, Škeříková V, Urban J. Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2017;40(7):1434–1448. doi: 10.1002/jssc.201601044
61. Al-Aphalahy BA, Qassim AW, Karabat RR. Knowledge of the HILIC retention behaviors of two quinolone antibiotics on sulfobetaine-type zwitterionic stationary phases. *Int J Drug Deliv Technol.* 2023;13(1):372–375. doi: 10.25258/ijddt.13.1.60
62. Subirats X, Casanovas L, Redón L, Rosés M. Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC. *Adv Sample Prep.* 2023;6:100063. doi: 10.1016/j.sampre.2023.100063
63. Redón L, Subirats X, Rosés M. HILIC characterization: estimation of phase volumes and composition for a zwitterionic column. *Anal Chim Acta.* 2020;1130:39–48. doi: 10.1016/j.aca.2020.06.035
64. Snyder LR, Dolan JW, Gant JR. Gradient elution in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1979;165(1):3–30. doi: 10.1016/S0021-9673(00)85726-X
65. Guo Y, Baran D. Hydrophilic partitioning or surface adsorption? A quantitative assessment of retention mechanisms for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Molecules.* 2023;28(18):6459. doi: 10.3390/molecules28186459
66. Schoenmakers PJ, Billiet HAH, Tussen R, De Galan L. Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1978;149:519–537. doi: 10.1016/S0021-9673(00)81008-0
67. Tyteca E, Périat A, Rudaz S, Desmet G, Guillarme D. Retention modeling and method development in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2014;1337:116–127. doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.032
68. Tumpa A, Mišković S, Stanimirović Z, Jančić-Stojanović B, Medenica M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. *J Chemom.* 2017;31(9):e2910. doi: 10.1002/cem.2910

69. Greco G, Grosse S, Letzel T. Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J Chromatogr A*. 2012;1235:60–67. doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.031
70. Obradović D, Komsta Ł, Agbaba D. Novel computational approaches to retention modeling in dual hydrophilic interactions/reversed phase chromatography. *J Chromatogr A*. 2020;1619:460951. doi: 10.1016/j.chroma.2020.460951
71. Jin G, Guo Z, Zhang F, Xue X, Jin Y, Liang X. Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*. 2008;76(3):522–527. doi: 10.1016/j.talanta.2008.03.042
72. Jandera P, Hájek T. Dual-mode hydrophilic interaction normal phase and reversed phase liquid chromatography of polar compounds on a single column. *J Sep Sci*. 2020;43(1):70–86. doi: 10.1002/jssc.201900920
73. Jandera P, Hájek T, Škeříková V, Soukup J. Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *J Sep Sci*. 2010;33(6–7):841–852. doi: 10.1002/jssc.200900678
74. Cox GB, Stout RW. Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under ‘pseudo-reversed-phase’ conditions. *J Chromatogr A*. 1987;384:315–336. doi: 10.1016/S0021-9673(01)94680-1
75. Jovanović M, Rakić T, Jančić–Stojanović B. Theoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Instrum Sci Technol*. 2014;42(3):230–266. doi: 10.1080/10739149.2013.865214
76. Liu M, Ostovic J, Chen EX, Cauchon N. Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. *J Chromatogr A*. 2009;1216(12):2362–2370. doi: 10.1016/j.chroma.2009.01.012
77. Wang F, Yang F, Liu J, Bai Q. Studies on the retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography using stoichiometric displacement theory II. HILIC/RPLC dual-retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography over the entire range of water concentration in mobile phase. *Talanta*. 2023;265:124858. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124858
78. Ziobrowski P, Zapala L, Zapala W. Studies on the retention behavior of quercetin, phenol, and caffeine as test substances on selected neutral and charged hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases. *Sep Sci Plus*. 2022;5(7):267–274. doi: 10.1002/sscp.202200027

79. Kalisz O, Dembek M, Studzińska S, Bocian S. Beta-blocker separation on phosphodiester stationary phases—the application of intelligent peak deconvolution analysis. *Molecules*. 2023;28(7):3249. doi: 10.3390/molecules28073249
80. Guo Y, Fattal B. Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta*. 2021;1184:339025. doi: 10.1016/j.aca.2021.339025
81. Gao W, Liu X, Wang Y, Liang C, Lian H, Qiao J. Insight into the hydrophilic interaction liquid chromatographic retention behaviors of hydrophilic compounds on different stationary phases. *Talanta*. 2020;219:121363. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121363
82. Roca LS, Schoemaker SE, Pirok BWJ, Gargano AFG, Schoenmakers PJ. Accurate modelling of the retention behaviour of peptides in gradient-elution hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2020;1614:460650. doi: 10.1016/j.chroma.2019.460650
83. Antony J. *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, third Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2023
84. Agarwal B, Baka B, *Data structures and algorithms with Python*, second edition. Birmingham, UK: Packt Publishing, 2018
85. Navlani A, Fandango A, Idris I. *Python Data Analysis: perform data collection, data processing, wrangling, visualization, and model building using Python*, third edition. Birmingham: Packt Publishing, 2021
86. Fandango A. *Python data analysis: data manipulation and complex data analysis with Python*, second edition. Birmingham Mumbai: Packt Publishing, 2017
87. Langtangen HP, *A Primer on Scientific Programming with Python in Texts in Computational Science and Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 2016. doi: 10.1007/978-3-662-49887-3
88. Oliphant TE. *Python for Scientific Computing*. *Comput Sci Eng*. 2007;9(3):10–20. doi: 10.1109/MCSE.2007.58
89. Oliphant TE. *Guide to NumPy*, second edition. Austin, Texas: Published by Continuum Press, a division of Continuum Analytics, Inc., 2015
90. McKinney W. *Python for data analysis: data wrangling with pandas, NumPy, and Jupyter*, third edition. Beijing: O'Reilly, 2022
91. Haslwanter T. *An Introduction to Statistics with Python: With Applications in the Life Sciences in Statistics and Computing*. Cham: Springer International Publishing, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-97371-1

92. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* 2007;9(3):90–95. doi: 10.1109/MCSE.2007.55
93. VanderPlas J. *Python data science handbook: essential tools for working with data*, first edition in Python / Data, Beijing Boston Farnham Sebastopol Tokyo: O'Reilly, 2016
94. Virtanen P et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods.* 2020;17(3):261–272. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2
95. Tome T, Žigart N, Časar Z, Obreza A. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Org Process Res Dev.* 2019;23(9): 1784–1802. doi: 10.1021/acs.oprd.9b00238
96. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q2(R2) Validation of Analytical Procedures, Step 5 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
97. Kasagić-Vujanović I. *Farmakopejske metode u kontroli kvaliteta lijekova*. Medicinski fakultet; Univerzitet u Banjoj Luci, 2021
98. Parr MK, Schmidt AH. Life cycle management of analytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:506–517. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.020
99. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q8(R2) Pharmaceutical Development, Step 4 Version. Geneva, Switzerland, 2009. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development-scientific-guideline>
100. Park G, Kim MH, Go SH, Choi M, Jang YP. Analytical Quality by Design (AQbD) Approach to the Development of Analytical Procedures for Medicinal Plants. *Plants.* 2022;11(21):2960. doi: 10.3390/plants11212960
101. Martin GP et al. Stimuli to the Revision Process: Proposed New USP General Chapter: The Analytical Procedure Lifecycle (1220),” *Pharmacopeial Forum*, 43(1). [Online]. Available: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/s201784.pdf
102. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q14 Analytical Procedure Development, Step 2 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available:

<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q14-analytical-procedure-development-scientific-guideline>

103. Kasagić-Vujanović I, Jančić-Stojanović B. Quality by design oriented development of hydrophilic interaction liquid chromatography method for the analysis of amitriptyline and its impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;173:86–95. doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.026
104. Kumar SL. Quality-by-design driven analytical method (AQbD) development and validation of HPLC–UV technique to quantify rivastigmine hydrogen tartrate in lipidic nanocarriers: Forced degradation, and assessment of drug content and in vitro release studies. *Microchem J.* 2023;193:108944. doi: 10.1016/j.microc.2023.108944
105. Prajapati P, Gandhi A, Shah S. Method Greenness Profile Assessment to AQbD-Driven Stability Indicating HPTLC Method for Estimation of Aripiprazole Using Screening Design and Response Surface Modeling. *J AOAC Int.* 2023;106(2):501–513. doi: 10.1093/jaoacint/qsac107
106. Mishra V, Thakur S, Patil A, Shukla A. Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(8):737–758. doi: 10.1080/17425247.2018.1504768
107. Tiwari R et al. Analytical quality-by-design (AQbD) guided development of a robust HPLC method for the quantification of plumbagin from *Plumbago* species. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2021;44(11–12):529–537. doi: 10.1080/10826076.2021.1973027
108. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira CDS, Saviano AM, Lourenço RF. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Braz J Pharm Sci.* 2018;54. doi: 10.1590/s2175-97902018000001006
109. Broadhurst D et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics.* 2018;14(6):72. doi: 10.1007/s11306-018-1367-3
110. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Topic: Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Step 4 Version. Geneva, Switzerland, 2023. Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
111. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B.* 2009;877(23):2224–2234. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030

112. Ivanović D, Zečević M, Malenović A. *Analitika lekova, udžbenik za laboratorijsku nastavu*. Beograd, 2004
113. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends Anal Chem.* 2004;23(8):535–552. doi: 10.1016/j.trac.2004.04.001
114. Armenta S, Garrigues S, De La Guardia M. Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2008;27(6):497–511. doi: 10.1016/j.trac.2008.05.003
115. Anastas PT. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1999;29(3):167–175. doi: 10.1080/10408349891199356
116. Gałuszka A, Migaszwski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;50:78–84. doi: 10.1016/j.trac.2013.04.010
117. Stojanović J, Krmar J, Otašević B, Protić A. Resource management in HPLC: Unveiling a green face of pharmaceutical analysis. *Arh za farm.* 2023;73(2):146–171. doi: 10.5937/arhfarm73-43479
118. Nowak PM, Wietecha-Posłuszny R, Pawliszyn J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Trends Anal Chem.* 2021;138:116223. doi: 10.1016/j.trac.2021.116223
119. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Anal Chem.* 2020;92(14):10076–10082. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01887
120. Płotka-Wasyłka J, Wojnowski W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chem.* 2021;23(21):8657–8665. doi: 10.1039/D1GC02318G
121. Manousi N, Wojnowski W, Płotka-Wasyłka J, Samanidou V. Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality. *Green Chem.* 2023;25(19):7598–7604. doi: 10.1039/D3GC02347H
122. Karch J. Improving on Adjusted R-Squared. *Collabra Psychol.* 2020;6(1):45. doi: 10.1525/collabra.343
123. McCalley DV. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2010;1217(20):3408–3417. doi: 10.1016/j.chroma.2010.03.011

124. Guo Y, Shah R. Detailed insights into the retention mechanism of caffeine metabolites on the amide stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2016;1463:121–127. doi: 10.1016/j.chroma.2016.08.018
125. Noga S, Jandera P, Buszewski B. Retention Mechanism Studies of Selected Amino Acids and Vitamin B6 on HILIC Columns with Evaporative Light Scattering Detection. *Chromatographia*. 2013;76(15–16):929–937. doi: 10.1007/s10337-013-2502-y
126. Karatapanis AE, Fiamegos YC, Stalikas CD. A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A*. 2011;1218(20):2871–2879. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.069
127. Guo Y. Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *The Analyst*. 2015;140(19):6452–6466. doi: 10.1039/C5AN00670H
128. Kasagić-Vujanović I, Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Investigation of the retention mechanisms of amlodipine besylate, bisoprolol fumarate, and their impurities on three different HILIC columns. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2018;41(9):523–531. doi: 10.1080/10826076.2018.1476380
129. Jovanović M, Jančić Stojanović B. Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2013;1301:27–37. doi: 10.1016/j.chroma.2013.05.034
130. Jandera P, Hájek T. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J Sep Sci*. 2009;32(21):3603–3619. doi: 10.1002/jssc.200900344
131. Gilar M, Berthelette KD, Walter TH. Contribution of ionic interactions to stationary phase selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*. 2022;45(17):3264–3275. doi: 10.1002/jssc.202200165
132. Peris-García E, Ruiz-Angel MJ, Baeza-Baeza JJ, García-Alvarez-Coque MC. Comparison of the Fitting Performance of Retention Models and Elution Strength Behaviour in Hydrophilic-Interaction and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Separations*. 2021;8(4):54. doi: 10.3390/separations8040054
133. Redón L, Subirats X, Rosés M. Volume and composition of semi-adsorbed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of water

- adsorption in common stationary phases and eluents. *J Chromatogr A*. 2021;1656:462543. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462543
134. Van Henten GV, Bos TS, Pirok BWJ. Approaches to accelerate liquid chromatography method development in the laboratory using chemometrics and machine learning. *LCGC Eur*. 2023;202–209. doi: 10.56530/lcgc.eu.rh7676j5
 135. Al-Tannak NF, Bawazeer S, Watson DG. Exploring the effect of buffer strength on the retention time of weak acids, neutral and weak bases in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mode. *Curr Anal Chem*. 2018;15(1):34–46. doi: 10.2174/1573411014666180806152818
 136. McCalley DV. Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2017;1483:71–79. doi: 10.1016/j.chroma.2016.12.035
 137. Soukup J, Jandera P. Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2014;1374:102–111. doi: 10.1016/j.chroma.2014.11.028
 138. Rakić T, Jančić Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Improved chromatographic response function in HILIC analysis: Application to mixture of antidepressants. *Talanta*. 2012;98:54–61. doi: 10.1016/j.talanta.2012.06.040
 139. Jovanović M, Rakić T, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying Box–Behnken Design. *J Sep Sci*. 2012;35(12):1424–1431. doi: 10.1002/jssc.201200099
 140. Witting M, Böcker S. Current status of retention time prediction in metabolite identification. *J Sep Sci*. 2020;43(9–10):1746–1754. doi: 10.1002/jssc.202000060
 141. Bharate SS, Kumar V, Vishwakarma RA. Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2016;19(6):461–469. doi: 10.2174/1386207319666160502123917
 142. Walter TH, Boissel C, Field JA, Lawrence NL. Further Evaluation of the Base Stability of Hydrophilic Interaction Chromatography Columns Packed with Silica or Ethylene-Bridged Hybrid Particles. *Separations*. 2023;10(3):175. doi: 10.3390/separations10030175
 143. Kasagić-Vujanović I, Knežević D. Design of experiments in optimization and validation of hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of

- amlodipine besylate and its impurities. *Acta Chromatogr.* 2021;34(1):41–52. doi: 10.1556/1326.2020.00875
144. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, fourth edition. in Wiley series in probability and statistics. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2016
 145. Vu Dang H, Truong Thi Thu H, Dong Thi Ha L, Nguyen Mai H. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Analysis of Paracetamol, Ibuprofen, and Caffeine in Solid Pharmaceutical Dosage Forms by Derivative, Fourier, and Wavelet Transforms: A Comparison Study. *J Anal Methods Chem.* 2020:1–13. doi: 10.1155/2020/8107571
 146. Darkwah EK, Acquah CK, Lambon PS, Ameko DK, Akanji O, Ayim JSK. Simultaneous Quantification of Acetaminophen, Caffeine, and Ibuprofen in Fixed Dose Combination Drug Using HPLC with UV Detection. *J Adv Med Pharm Sci.* 2019;1–19. doi: 10.9734/jamps/2019/v20i230105
 147. Tran BT, Tran TN, Tran AMT, Nguyen GCD, Nguyen QTT. Simultaneous Determination of Paracetamol, Ibuprofen, and Caffeine in Tablets by Molecular Absorption Spectroscopy Combined with Classical Least Square Method. *Molecules.* 2022;27(9):2657. doi: 10.3390/molecules27092657
 148. Aminu N, Chan SY, Khan NH, Farhan AB, Umar MN, Toh SM. A simple stability-indicating HPLC method for simultaneous analysis of paracetamol and caffeine and its application to determinations in fixed-dose combination tablet dosage form. *Acta Chromatogr.* 2019;31(2):85–91. doi: 10.1556/1326.2018.00354
 149. Alam P et al. Simultaneous Determination of Caffeine and Paracetamol in Commercial Formulations Using Greener Normal-Phase and Reversed-Phase HPTLC Methods: A Contrast of Validation Parameters. *Molecules.* 2022;27(2):405. doi: 10.3390/molecules27020405
 150. Ahmad W et al. A Simple Stability-Indicating UPLC Method for the Concurrent Assessment of Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Formulations. *Separations.* 2023;10(1):50. doi: 10.3390/separations10010050
 151. Fekry RA, Kelani KM, Fayez YM, Tantawy MA. Comparative validated chromatographic methods for the simultaneous determination of caffeine, codeine, paracetamol along with the related compound ‘p-aminophenol’ in tablets. *J Planar Chromatogr Mod TLC.* 2022;35(1):51–59. doi: 10.1007/s00764-022-00150-y

152. Mohammed OJ, Hamzah MJ, Saeed AM. RP–HPLC Method Validation for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Caffeine in Formulating Pharmaceutical Form. *Res J Pharm Technol*. 2021;4743–4748. doi: 10.52711/0974-360X.2021.00825
153. Rahimi M, Khorshidi N, Heydari R. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in aqueous samples by ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Sep Sci Plus*. 2020;3(11–12):561–570. doi: 10.1002/sscp.202000069
154. Kelani KM, Fekry RA, Fayez YM, Hassan SA. Advanced chemometric methods for simultaneous quantitation of caffeine, codeine, paracetamol, and p-aminophenol in their quaternary mixture. *Sci Rep*. 2024;14(1):2085. doi: 10.1038/s41598-024-52450-4
155. Prajapati P, Patel A, Shah S. DoE-Based Analytical Quality Risk Management for Enhanced AQbD Approach to Economical and Eco-Friendly RP-HPLC Method for Synchronous Estimation of Multiple FDC Products of Antihypertensive Drugs. *J Chromatogr Sci*. 2021;bma123. doi: 10.1093/chromsci/bma123
156. Mandić-Kovačević N, Kasagić-Vujanović I, Popović Bijelić A. Analysis of Fixed-Dose Combination of Three Antihypertensive Drugs by a Green and Quality by Design Approach. *J Chromatogr Sci*. 2023;61(3):256–268. doi: 10.1093/chromsci/bmac044
157. Masne DD, Chakole RD, Charde MS. QbD Approached in Method Development, Validation and Degradation Profiling of Aripiprazole a Antidepressant Agent. *Asian J Pharm Anal*. 2022;29–34. doi: 10.52711/2231-5675.2022.00006
158. Vyas AJ et al. Implementing Analytical Quality by Design (AQbD) Approach for Simultaneous Estimation of Tadalafil and Macitentan by RP-HPLC Method. *Anal Chem Lett*. 2021;11(4):539–552. doi: 10.1080/22297928.2021.1938215
159. Patel KY, Dedania ZR, Dedania RR, Patel U. QbD approach to HPLC method development and validation of ceftriaxone sodium. *Future J Pharm Sci*. 2021;7(1):141. doi: 10.1186/s43094-021-00286-4
160. Jayagopal B, Muruges S. QbD-mediated RP-UPLC method development invoking an FMEA-based risk assessment to estimate nintedanib degradation products and their pathways. *Arab J Chem*. 2020;13(9):7087–7103. doi: 10.1016/j.arabjc.2020.07.014
161. Sen S, Ranjan OP. A Quality by Design (QbD) driven gradient high performance liquid chromatography method development for the simultaneous estimation of dasatinib and nilotinib in lipid nanocarriers. *J Chromatogr B*. 2024;1243:124229. doi: 10.1016/j.jchromb.2024.124229

162. Zimmerman JB, Anastas PT, Erythropel HC, Leitner W. Designing for a green chemistry future. *Science*. 2020;367(6476):397–400. doi: 10.1126/science.aay3060
163. Abdussalam-Mohammed W, Ali AQ, Errayes AO. Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages. *Chem Methodol*. 2020;4(4):408–423. doi: 10.33945/SAMI/CHEMM.2020.4.4
164. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF) (42nd ed.). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2024
165. Le Rouzo G, Lamouroux C, Bresson C, Guichard A, Moisy P, Moutiers G. Hydrophilic interaction liquid chromatography for separation and quantification of selected room-temperature ionic liquids. *J Chromatogr A*. 2007;1164(1–2):139–144. doi: 10.1016/j.chroma.2007.06.053
166. Miotke-Wasilczyk M, Józefowicz M, Strankowska J, Kwela J. The Role of Hydrogen Bonding in Paracetamol–Solvent and Paracetamol–Hydrogel Matrix Interactions. *Materials*. 2021;14(8):1842. doi: 10.3390/ma14081842
167. Pereira FJ, Rodríguez-Cordero A, López R, Robles LC, Aller AJ. Development and Validation of an RP-HPLC-PDA Method for Determination of Paracetamol, Caffeine and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceuticals*. 2021;14(5):466. doi: 10.3390/ph14050466
168. Kazakevich Y, LoBrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, first edition. Wiley, 2007. doi: 10.1002/0470087951
169. Gamal M, Naguib IA, Panda DS, Abdallah FF. Comparative study of four greenness assessment tools for selection of greenest analytical method for assay of hyoscine N - butyl bromide. *Anal Methods*. 2021;13(3):369–380. doi: 10.1039/D0AY02169E
170. Anh Thu N. Quantification of Acetaminophen, Caffeine and Ibuprofen in Solid Dosage Forms by UV Spectroscopy coupled with Multivariate analysis. *Asian J Pharm Anal*. 2021;127–132. doi: 10.52711/2231-5675.2021.00022
171. Alsamarrai KF, Ameen ST. Simultaneous Ratio Derivative Spectrophotometric Determination of Paracetamol, Caffeine and Ibuprofen in Their Ternary Form. *Baghdad Sci J*. 2022;19(6):1276. doi: 10.21123/bsj.2022.6422
172. Zambakjian C, Sakur AA. A new gas chromatographic method development and validation for the simultaneous determination of ibuprofen and caffeine in bulk and pharmaceutical dosage form. *Future J Pharm Sci*. 2020;6(1):110. doi: 10.1186/s43094-020-00123-0

173. Alqarni MH et al. Simultaneous estimation of ibuprofen, caffeine, and paracetamol in commercial products using a green reverse-phase HPTLC method. *Green Process Synth.* 2024;13(1):20230220. doi: 10.1515/gps-2023-0220
174. Cunha RR et al. Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *J Sep Sci.* 2015;38(10):1657–1662. doi: 10.1002/jssc.201401387
175. Chaves SC et al. Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. *Electroanalysis.* 2015;27(12):2785–2791. doi: 10.1002/elan.201500306
176. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5–6):723–753. doi: 10.1016/S0731-7085(00)00529-X

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

API – Active Pharmaceutical Ingredient

RP-HPLC – Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

NP-HPLC – Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography

IEC – Ion-Exchange Chromatography

QSRR – Quantitative Structure-Retention Relationships

DoE – Design of Experiments

OFAT – One Factor At A Time

FFD – Full Factorial Design

FrFD – Fractal Factorial Design

SMED – Saturated Main Effects Designs

SSMED – Supersaturated Main Effects Designs

BBD – Box-Behnken Design

CCD – Central Composite Design

MLR – Multiple Linear Regression

ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

FDA – Food and Drug Agency

AQbD – Analytical Quality by Design

ATP – Analytical Target Profile

CMAs – Critical Method Attributes

QRA – Quality Risk Assessment

CMPs – Critical Method Parameters

RSM – Response Surface Methodology

ANOVA – Analysis of Variance

DS – Design Space

SST – System Suitability Test

LOQ – Limit of Quantification

LOD – Limit of Detection

S/N – Signal-to-Noise

GAC – Green Analytical Chemistry

RGB – Red-Green-Blue

WAC – White Analytical Chemistry

AGREE – Analytical GREENness Metric

ComplexGAPI – Complementary Green Analytical Procedure Index

BAGI – Blue Applicability Grade Index

CSV – Comma Separated Values

NumPy – Numerical Python

SciPy – Scientific Python

EDQM – *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*

LGC – *The Laboratory of the Government Chemist*

САД – Сједињене Америчке Државе

ОР_(АМИ) – основни раствор амитриптилин-хидрохлорида

РР_(АМИ) – радни раствор амитриптилин-хидрохлорида

ОР_(неч А) – основни раствор нечистоће А

ОР_(неч В) – основни раствор нечистоће В

ОР_(неч С) – основни раствор нечистоће С

ОР_(неч D) – основни раствор нечистоће D

ОР_(неч F) – основни раствор нечистоће F

ОР_(неч G) – основни раствор нечистоће G

РР_(неч А) – радни раствор нечистоће А

PP_(неч В) – радни раствор нечистоће В

PP_(неч С) – радни раствор нечистоће С

PP_(неч D) – радни раствор нечистоће D

PP_(неч F) – радни раствор нечистоће F

PP_(неч G) – радни раствор нечистоће G

PP_(C1) – радни раствор смјеше 1

OP_(ДИК) – основни раствор диклофенак-калијума

OP_(ИБУ) – основни раствор ибупрофена

OP_(КОФ) – основни раствор кофеина

OP_(ПАР) – основни раствор парацетамола

PP_(ДИК) – радни раствор диклофенак-калијума

PP_(ИБУ) – радни раствор ибупрофена

PP_(КОФ) – радни раствор кофеина

PP_(ПАР) – радни раствор парацетамола

PP_(C2) – радни раствор смјеше 2

PP_(ОПТКП) – радни раствор смјеше за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и парацетамола

OP_(ПЛА) – основни раствор плацебо смјеше

PP_(ПЛА) – радни раствор плацебо смјеше

OP_(ТКП) – основни раствор за испитивање тачности HPLC методе за одређивање кофеина и парацетамола

PP_(ОПТКИ) – радни раствор за оптимизацију хроматографског раздвајања кофеина и ибупрофена

OP_(ТКИ) – основни раствор за испитивање тачности HPLC методе за одређивање кофеина и ибупрофена

ИЗЈАВЕ

Изјава о ауторству

Изјава 1

Прилог 3.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем

да је докторска дисертација

Наслов рада „Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течној хроматографији хидрофилних интеракција”

Наслов рада на енглеском језику "A multi-criteria approach in developing models for predicting the retention mechanisms of selected drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography"

☒ резултат сопственог истраживачког рада,

☒ да докторска дисертација, у цјелини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,

☒ да су резултати коректно наведени и

☒ да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци, дана 25.04.2025. године

Потпис докторанда

Зарија Кнежевић Рајиковић

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију/докторски умјетнички рад учини јавно доступним

Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом

„Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течној хроматографији хидрофилних интеракција“

која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

Докторску дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучила.

- ☐ Ауторство
- ☐ Ауторство – некомерцијално
- ☒ Ауторство – некомерцијално – без прераде
- ☐ Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- ☐ Ауторство – без прераде
- ☐ Ауторство – дијелити под истим условима

У Бањој Луци, дана 25.04.2025. године

Потпис докторанда

Зарија Кнежевић Рајићковић

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Изјава 3

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Дарија Кнежевић Ратковић

Наслов рада „Мултикритеријумски приступ у грађењу модела за предвиђање ретенционих механизма одабраних лијекова у течној хроматографији хидрофилних интеракција”

Ментор Проф. др Ирена Касагић-Вујановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предала за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 25.04.2025. године

Потпис докторанда

Дарија Кнежевић Ратковић

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Дарија Кнежевић Ратковић је рођена 21.12.1991. године у Санском Мосту. Основну школу „Десанка Максимовић“ завршила је 2006. године у Лакташима. Средњу Медицинску школу завршила је у Бањој Луци, а студије фармације уписала је 2010. године на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци. Била је стипендиста Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање Републике Српске и Фонда „Др Милан Јелић“. Дипломирала је 2015. године са просјечном оцјеном 9,58.

Од 2020. године запослена је у звању асистента, а тренутно у звању вишег асистента на Катедри за аналитику лијекова Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци. Докторске академске студије на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци уписала је академске 2018/2019. године.

Говори енглески и шпански језик.

Удата је.