

Универзитет у Београду

Фармацеутски факултет

Ана М. Вемић

**ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У АНАЛИЗИ
ОДАБРАНИХ АНТИПАРКИНСОНИКА
ПРИМЕНОМ ТЕЧНЕ
ХРОМАТОГРАФИЈЕ – МОДЕЛОВАЊЕ
И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИСТЕМА**

Докторска дисертација

Београд, 2015.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Ana M. Vemić

**CHAOTROPIC AGENTS IN LIQUID
CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF
SELECTED ANTIPARKINSONICS –
MODELING AND SYSTEM
CHARACTERIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Универзитет у Београду
Фармацеутски факултет

Ментор

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

Чланови комисије

Др Мирјана Меденица, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
Катедра физичку хемију и инструменталне методе

Др Мирослав Шобер, редовни професор
Универзитет у Сарајеву – Фармацеутски факултет
Катедра за фармацеутску аналитику

Датум одбране

Београд, _____

Докторска дисертација урађена је на Катедри за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и представља део истраживања у оквиру научноистраживачког пројекта број 172052 (руководилац: проф. др Мирјана Меденица – Фармацеутски факултет у Београду) који је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Желим првенствено да изразим захвалност својој менторки, др Анђелији Маленовић, ванр. проф. за несебично залагање и помоћ, континуирано праћење и стварање услова за самосталан истраживачки рад.

Веома сам захвална проф. др Мирјани Меденици и проф. др Дарку Ивановићу, на професионалности, високим критеријумима и научној доследности којима воде истраживачки тим чији сам део.

Такође, желим да се захвалим и проф. др Мирославу Шоберу са Фармацеутског факултета Универзитета у Сарајеву, који је прихватио да буде члан комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације.

Захвална сам др Славици Ерић, ванр. проф. и колеги Марку Калинићу са Катедре за фармацеутску хемију, на сарадњи и ентузијазму приликом заједничког рада у делу истраживања које се односи на *QSRR* анализу.

Дугујем захвалност колегиници Ивани Перовић и осталим колегама из сектора Контроле квалитета „Галенике“ а.д. који су ми помогли да у тој установи изведем део експеримената на хроматографу са електрохемијским детектором.

Нарочито сам захвална колегама са Катедре за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за лепу тимску и креативну радну атмосферу, а посебно Тијани Ракић, Нађи Костић и Марку Јовановићу за узајамну мотивацију и искрено пријатељство.

На крају, желим да се захвалим својим родитељима и брату за безрезервну подршку и љубав.

ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У АНАЛИЗИ ОДАБРАНИХ АНТИПАРКИНСОНИКА ПРИМЕНОМ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ – МОДЕЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИСТЕМА

Резиме

Хаотропни агенси представљају интересантне и атрактивне адитиве мобилне фазе у системима течне хроматографије, захваљујући њиховом ефекту на ретенцију анализата, симетрију пикова и ефикасност хроматографског раздвајања. Они подражавају ефекат класичних јон-пар реагенса, али показују мање недостатака, због чега проналазе своје место у савременој фармацеутској анализи. Такође, са циљем разјашњавања механизма хроматографског понашања анализата у системима са хаотропним агенсима, развијени су различити математички модели. У овој докторској дисертацији представљена је детаљна стратегија испитивања утицаја хаотропних агенаса на хроматографско понашање смеша активних фармацеутских супстанци и њихових нечистоћа, чије се компоненте разликују по кисело-базним особинама, на примеру одабраних антипаркинсона.

У првом делу истраживања испитан је утицај хаотропних агенаса натријум трифлуороацетата и натријум перхлората на хроматографско понашање једињења базног карактера, на примеру ропинирола и његових нечистоћа. Проширеним термодинамичким приступом показано је да је раздвајање превасходно вођено електростатским интеракцијама које су последица стварања електричног двослоја на површини стационарне фазе. Такође, овим приступом утврђено је да се стварање јонских парова у елуенту, између протонисаних анализата и негативно наелектрисаних хаотропних јона, не сме занемарити. У наставку овог дела истраживања, применом централног композиционог дизајна омогућена је процена ефекта концентрације хаотропног агенса, као и процена интеракције овог фактора са другим факторима који дефинишу хроматографски систем (садржај ацетонитрила у мобилној фази и рН вредност водене фазе) на хроматографско понашање анализата. Мултикритеријумским приступом, методом претраге чворова мреже, извршена је оптимизација методе, а валидацијом је потврђена њена поузданост за фармацеутску анализу ропинирола и нечистоћа у таблетама.

Испитивање интеракција хаотропних соли различите позиције у Хофмајстеровој серији (натријум трифлуороацетат, натријум перхлорат, натријум хексафлуорофосфат) додатих у мобилну фазу са стационарним фазама различите хидрофобности (C8 и C18 XTerra[®] колоне), као и њихов заједнички утицај на ретенционо понашање базних једињења чије се рКа вредности знатно разликују, приказан је на примеру прамипексола и његових нечистоћа. Проширеним термодинамичким приступом омогућено је разумевање ретенционог механизма. Поређењем шест различитих комбинација стационарне фазе и хаотропне соли, уочено је да генерална хидрофобност система, условљена хаотропношћу соли и хидрофобношћу стационарне фазе, фаворизује процес јонског спаривања у стационарној фази у односу на јонско спаривање у елуенту. Такође, испитан је утицај природе анализата на њихово ретенционо понашање у таквим хроматографским системима. Изабрани су и објашњени молекулски дескриптори који на најбољи начин објашњавају експерименталне налазе и резултате добијене термодинамичким приступом. Резултати ове анализе сугеришу да је дистрибуција шарже анализата, као и њена комплементарност структури електричног двослоја формираног на површини стационарне фазе након додатка хаотропног агенса, од велике важности за разумевање разлика у ретенцији структурно сличних анализата. Овакви налази пружају нов допринос разумевању интеракција између свих компоненти у хроматографском систему са хаотропним агенсима и представљају добру основу за даља истраживања, сугеришући развијање генерално применљивих предиктора за студије односа структуре и ретенције молекула у оваквим хроматографским системима.

Поред фундаменталних истраживања која се односе на механизам хроматографског раздвајања прамипексола и његових нечистоћа, приказан је и развој методе течне хроматографије са хаотропним агенсима пратећи принципе концепта „квалитета кроз дизајн“ (енг. *quality by design* – QbD). Ефекат критичних процесних параметара (хемија стационарне фазе, тип и концентрација хаотропне соли, садржај ацетонитрила у мобилној фази и температура колоне) на критичне атрибуте квалитета (ретенциони фактор првог и последњег пика и раздвајање критичних парова пикова) анализиран је применом методологије дизајн експеримената–простор дизајна (енг. *design of experiments-design space* – DoE-DS).

D-оптимални дизајн изабран је како би се кроз минималан број експеримената истовремено испитали категорички и нумерички фактори. Обезбеђење квалитета постигнуто је проценом несигурности модела Монте Карло симулацијама на два начина: пропагирањем грешке која је једнака варијанси резидуала модела и пропагирањем грешке која потиче из прерачуна коефицијената модела. Предност је дата другом приступу који је стриктнији. Додатно је процењена робусност одабране радне тачке пропагирањем грешке фактора која се може јавити приликом лабораторијске примене методе. На овај начин, постигнуто је хроматографско раздвајање прамипексола и његових нечистоћа испуњавајући све претходно дефинисане критеријуме, а валидацијом методе потврђена је њена поузданост.

Последњи део истраживања односи се на развијање ефикасне реверзно-фазне методе течне хроматографије са хаотропним агенсима за истовремену анализу једињења чије се кисело-базне особине разликују, на примеру смеше антипаркинсоника леводопе, карбидопе и ентакапона заједно са шест њихових нечистоћа. За постизање жељеног раздвајања, тестиране су киселине чији анјони поседују различита својства према Хофмајстеровој класификацији (*орто*-фосфорна, трифлуоросирћетна и перхлорна киселина). Такође, комплексност смеше наметнула је потребу за развојем методе са градијентним елуирањем. Двосегментни градијентни програм дефинисан је хеометријским приступом применом Бокс-Бенкеновог експерименталног дизајна и Дерингерове функције пожељних одговора. Спроведена је валидација развијене методе чиме је потврђена њена поузданост за анализу смеше леводопе, карбидопе, ентакапона и њихових нечистоћа у таблетама.

Кључне речи: Хаотропни агенси; Течна хроматографија; Хроматографско понашање; Математичко моделовање; Ропинирол; Прамипексол; Леводопа; Карбидопа; Ентакапон; Сродне супстанце

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Аналитика лекова

УДК број: 615.21:543.544:001.891.54(043.3)

CHAOTROPIC AGENTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SELECTED ANTIPARKINSONICS – MODELING AND SYSTEM CHARACTERIZATION

Summary

Chaotropic agents represent interesting and attractive mobile phase additives in liquid chromatographic systems due to their effect on analytes retention, peak symmetry and separation efficiency. Since they mimic the role of classical ion-pair reagents, but with fewer drawbacks, they have positioned themselves in modern pharmaceutical analysis. Also, with the aim to elucidate and rationalize the mechanism of analytes chromatographic behavior in systems with chaotropic agents, different mathematical models are developed. This doctoral dissertation brings a detailed strategy of the investigation of chaotropic agents' influence on the chromatographic behavior of mixtures consisting of active pharmaceutical ingredients and their impurities, whose components differ in acid-base properties, on the example of selected antiparkinsonics.

In the first part of the investigation, the influence of chaotropic agents sodium trifluoroacetate and sodium perchlorate on the chromatographic behavior of basic analytes ropinirole and its impurities was examined. By the extended thermodynamic approach, it was shown that the separation was predominantly governed by electrostatic interactions that result from the electric double layer development on the stationary phase surface. Also, by this approach, it was demonstrated that the ion-pair complex formation in the eluent, between the protonated analyte and negatively charged chaotropic ion, cannot be neglected. Further, the employment of central composite design enabled the understanding of the effect of chaotropic agent concentration and its interactions with other factors (acetonitrile content and pH of the aqueous phase) that influence the given chromatographic system. Multi-criteria optimization based on grid point search method was performed. The method was validated and thus its adequacy for the pharmaceutical analysis of ropinirole and impurities in tablets was proven.

Investigation of the interaction of the chaotropic salts of different position in Hofmeister series (sodium trifluoroacetate, sodium perchlorate, sodium hexafluorophosphate) added to the mobile phase with the stationary phases of different hydrophobicity (C8 and C18 XTerra® columns), as well as their common influence on

the retention behavior of the basic analytes with significantly different pKa values is represented on the example of pramipexole and its structurally related impurities. The extended thermodynamic approach enabled the understanding of the underlying separation mechanism. It was observed, by comparing six different column-salt systems, that general system hydrophobicity presented by salt chaotropicity and column hydrophobicity favors stationary phase ion-pairing over the ion-pair formation in the eluent. Further, the influence of analytes' nature on their retention behavior in such chromatographic systems is examined. An analysis is performed in order to select and elucidate the molecular descriptors that best explain the experimental evidence and findings obtained by the thermodynamic approach. The results of this analysis suggest that analytes' charge distribution and its complementarity to the structure of the electric double layer formed on the surface of the stationary phase upon the addition of chaotropic additives is important for understanding the differences in retention of structurally related analytes. These findings provide a novel understanding of the interactions between all the components of the chromatographic system containing chaotropic additive and a good basis for further investigations suggesting the development of generally applicable predictors in structure-retention relationship studies in related chromatographic systems.

Besides fundamental research of chromatographic mechanism underlying the separation of pramipexole and its impurities, the development of liquid chromatographic method when chaotropic salts are used as mobile phase additives following the QbD principles is presented. The effect of critical process parameters (column chemistry, salt nature and concentration, acetonitrile content and column temperature) on the critical quality attributes (retention of the first and last eluting peak and separation of the critical peak pairs) was studied applying the design of experiments-design space methodology (DoE-DS). D-optimal design is chosen in order to simultaneously examine both categorical and numerical factors in minimal number of experiments. The assurance of quality was achieved assessing the sources of uncertainty originating from the models by Monte Carlo simulations in two ways: propagating the error equal to the variance of the model residuals and propagating the error originating from the model coefficients' calculation giving priority to the latter, stricter approach. Additionally, the working point robustness was assessed propagating the error in factor

level settings that can occur in method's laboratory use. In this manner, the baseline separation of pramipexole and its five impurities is achieved fulfilling all the required criteria, while the method validation proved its reliability.

The last part of the research relates to the development of an efficient reversed-phase LC method with chaotropic agents for the simultaneous analysis of the analytes with different acid-base properties, on the example of antiparkinsonics levodopa, carbidopa and entacapone along with their six related impurities. For the achievement of desirable separation, different acids with anions possessing different properties according to Hofmeister classification (*ortho*-phosphoric, trifluoroacetic and perchloric acid) were tested. Also, the complexity of the mixture imposed the need for gradient elution. The two-segmented gradient program was defined by optimizing the slopes of each segment employing the Box-Behnken experimental design and Derringer's desirability function. The method validation was performed, thus proving its reliability for the simultaneous analysis of levodopa carbidopa, entacapone and their impurities in tablets.

Key words: Chaotropic agents; Liquid chromatography; Chromatographic behavior; Matematical modelling; Ropinirole; Pramipexole; Levodopa; Carbidopa; Entacapone; Impurities

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Drug analysis

UDK number: 615.21:543.544:001.891.54(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНА ХРОМАТОГРАФИЈА СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА.....	1
1.2 МОДЕЛОВАЊЕ РЕТЕНЦИОНОГ ПОНАШАЊА У ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА.....	3
1.2.1 Теоријски модели.....	4
<i>Проширени термодинамички модел</i>	7
<i>Фронтална анализа</i>	13
1.2.2 Емпиријски модели.....	15
<i>Моделовање односа квантитативно представљене структуре и хроматографског понашања молекула</i>	15
<i>Хеометријски приступ моделовању ретенционог понашања</i> ..	17
1.3 ПОСТУПЦИ ОПТИМИЗАЦИЈЕ ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНИХ ХРОМАТОГРАФСКИХ МЕТОДА СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА.....	24
<i>Дерингерова функција пожељних одговора</i>	25
<i>Претрага чворова мреже</i>	26
<i>Квалитет кроз дизајн: Design space</i>	26
1.4 АНАЛИТИКА ОДАБРАНИХ АНТИПАРКИНСОНИКА.....	29
1.4.1 Ропинирол и нечистоће.....	29
<i>Преглед литературе</i>	30
1.4.2 Прамипексол и нечистоће.....	31
<i>Преглед литературе</i>	35
1.4.3 Леводопа, карбидопа, ентакапон и нечистоће.....	36
<i>Преглед литературе</i>	41
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	42
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	43
3.1 АПАРАТУРА, РЕАГЕНСИ И МАТЕМАТИЧКО-СОФТВЕРСКИ СИСТЕМИ.....	43
3.2 СТАНДАРДНЕ СУПСТАНЦЕ И ФАРМАЦЕУТСКИ ДОЗИРАНИ ОБЛИЦИ.....	45

3.2.1	Стандардне супстанце.....	45
3.2.2	Фармацеутски дозирани облици.....	46
3.3	ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СОЛИ СА ХАОТРОПНИМ ОСОБИНАМА НА РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ РОПИНИРОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА.....	47
3.3.1	Припрема раствора за термодинамичко моделовање ретенционог понашања и оптимизацију методе.....	47
3.3.2	Припрема раствора за валидацију методе.....	47
3.3.3	Хроматографски услови.....	49
	<i>Фронтална анализа</i>	51
3.4	ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ХАОТРОПНОСТИ СОЛИ, ХИДРОФОБНОСТИ КОЛОНЕ И МОЛЕКУЛСКИХ СВОЈСТАВА ПРАМИПЕКСОЛА И НЕЧИСТОЋА НА ЊИХОВО РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ.....	52
3.4.1	Одређивање површине колона.....	52
3.4.2	Одређивање адсорпционих изотерми хаотропних соли.....	53
3.4.3	Хроматографски услови за профилисање анализата – дефинисање термодинамичких модела и анализа односа структуре молекула и хроматографског понашања.....	54
	<i>Припрема раствора</i>	55
3.4.4	<i>In silico</i> анализа структурних карактеристика молекула који утичу на њихово хроматографско понашање.....	56
3.5	ХАОТРОПНЕ СОЛИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРАМИПЕКСОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА ПРАТЕЋИ <i>QUALITY-BY-DESIGN</i> ПРИНЦИПЕ.....	57
3.5.1	Хроматографски услови.....	57
3.5.2	Припрема раствора за дефинисање <i>design space</i> -а.....	57
3.5.3	Припрема раствора за валидацију методе.....	58

3.6	ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ИСТОВРЕМЕНУ АНАЛИЗУ ЛЕВОДОПЕ, КАРБИДОПЕ, ЕНТАКАПОНА И ЊИХОВИХ НЕЧИСТОЋА.....	61
3.6.1	Хроматографски услови.....	61
3.6.2	Припрема раствора за оптимизацију методе.....	63
3.6.3	Припрема раствора за валидацију методе.....	63
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	66
4.1	ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СОЛИ СА ХАОТРОПНИМ ОСОБИНАМА НА РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ РОПИНИРОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА.....	66
4.1.1	Утицај хаотропних агенаса на задржавање анализата на стационарној фази, симетрију пикова и ефикасност раздвајања.....	66
4.1.2	Термодинамички аспект ретенционог механизма.....	69
4.1.3	Емпиријско моделовање и оптимизација методе.....	72
4.1.4	Валидација методе.....	79
4.2	ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ХАОТРОПНОСТИ СОЛИ, ХИДРОФОБНОСТИ КОЛОНЕ И МОЛЕКУЛСКИХ СВОЈСТАВА ПРАМИПЕКСОЛА И НЕЧИСТОЋА НА ЊИХОВО РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ.....	81
4.2.1	Уводна испитивања.....	81
4.2.2	Утицај хаотропности соли и хидрофобности колоне на ретенционо понашање анализата.....	82
4.2.3	Утицај структурних карактеристика анализата на ретенционо понашање.....	94
4.3	ХАОТРОПНЕ СОЛИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРАМИПЕКСОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА ПРАТЕЋИ <i>QUALITY-BY-DESIGN</i> ПРИНЦИПЕ.....	99
4.3.1	Дефинисање циљаног аналитичког профила, критичних атрибута квалитета и критичних процесних параметара.....	99

4.3.2	Испитивање експерименталног простора хемометријским приступом.....	100
4.3.3	Дефинисање <i>design space</i> -а и одабир радне тачке.....	104
4.3.4	Валидација методе.....	109
4.4	ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ИСТОВРЕМЕНУ АНАЛИЗУ ЛЕВОДОПЕ, КАРБИДОПЕ, ЕНТАКАПОНА И ЊИХОВИХ НЕЧИСТОЋА.....	111
4.4.1	Уводна испитивања.....	111
4.4.2	Оптимизација програма градијента.....	113
4.4.3	Валидација методе.....	120
5.	ЗАКЉУЧАК.....	122
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	125
7.	ПРИЛОГ.....	135
8.	БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	136

1. УВОД

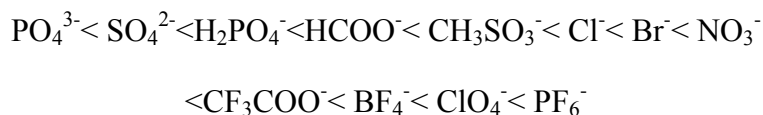
1.1 ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНА ХРОМАТОГРАФИЈА СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА

Течна хроматографија под високим притиском, због велике осетљивости и селективности, представља једну од најчешће примењиваних техника у савременој аналитици лекова. Томе доприноси и стално интересовање истраживача и научника за тумачење механизма процеса сепарације, затим истраживања у погледу развоја нових стационарних фаза, као и испитивања различитих адитива мобилних фаза, што заједно води сталном унапређењу ове технике. Иако је реверзно-фазна течна хроматографија под високим притиском метода избора у анализи највећег броја активних фармацеутских супстанци, показало се да анализа јонизованих једињења базних особина може бити повезана са низом различитих проблема (незадовољавајуће задржавање на стационарној фази, неадекватан облик хроматографског пика, слаба ефикасност раздвајања, неприхватљиве вредности фактора резолуције, итд).

Један од начина који може омогућити превазилажење наведених проблема јесте јон-интеракциона хроматографија, која представља прелаз између реверзно-фазне и јоноизмењивачке хроматографије. Код ове врсте хроматографије, додатком амфифилних или лиофилних јона у мобилну фазу и њиховом адсорпцијом на хидрофобну површину стационарне фазе, површина стационарне фазе трансформише се у псеудојоноизмењивачку стационарну фазу. Услед тога, успостављање јонских интеракција са наелектрисаним аналитом може се остварити како у мобилној фази, тако и са јонима адсорбованим на стационарној фази. Амфифилни јони су обично молекули са релативно дугим алкил ланцем и наелектрисаном групом на једном крају ланца. Одликују се особинама сурфактаната и локализованим наелектрисуњем. У хроматографским системима ови молекули се акумулирају на додирној површини између стационарне фазе и елуента тако да је наелектрисани део молекула оријентисан ка елуенту, а хидрофобни део адсорбован на површину стационарне фазе. Услед тога, долази до наелектрисуња површине које се компензује акумулацијом јона супротног наелектрисуња из мобилне фазе у непосредној близини површине и стварања

одговарајућег електричног двослоја [1]. Још пре неколико деценија, велики број истраживача посветио се проучавању специфичног ефекта амфифилних јона на ретенционо понашање наелектрисаних анализата [2–5] пружајући тако добру основу за даљи развој тзв. јон-пар хроматографије. С друге стране, данас расте интересовање за лиофилне јоне. Иако показују супротан ефекат на структуру воде и површински напон у односу на класичне јон-интеракционе реагенсе, ови агенси подражавају ефекат класичних јон-пар реагенаса на задржавање супротно наелектрисаних анализата у реверзно-фазном хроматографском систему, али са мање недостатака.

Леофилни јони су обично мали неоргански јони које карактерише делокализација наелектрисања и велика поларизабилност. Имају способност да нарушавају солватациони омотач око јонизованог анализата уводећи тзв. „хаос“ у структуру јона у раствору, па се због тога називају и хаотропни јони. Јон-специфични ефекти су свеprisутни и обично се називају Хофмајстерови ефекти. Хофмајстер је 1888. године [6] увео концепт рангирања соли на основу катјона и анјона како би објаснио њихову способност исољавања. Феноменолошки, пораст хаотропности је релативно нејасан, али је повезан са порастом симетрије јона, као и са порастом хидрофобности која је последица веће вероватноће делокализације наелектрисања и изражене поларизабилности јона. На основу позиције јона у Хофмајстеровом низу, могуће је предвидети релативну ефективност њихових соли у огромном броју физичко-хемијских система и објаснити механизам који је у основи тих ефеката. Наиме, положај јона у серији повезан је са различитим хемијским и физичко-хемијским особинама које утичу на активност електролита, структуру мицела и микроемулзија, способност влажења, преципитацију и денатурацију протеина, растворљивост органских супстанци, пораст површинског напона, исољавање раствора соли, јонску хидратацију итд. [7]. У хроматографском смислу, позиција јона у Хофмајстеровој серији заправо представља меру тенденције јона да се акумулира на стационарној фази у реверзно-фазном систему [8]. Адсорпција резултује наелектрисаном међуфазном површином што води продуженом задржавању супротно наелектрисаних анализата, па је тако и хроматографска ефективност јона у складу са класичном Хофмајстеровом серијом:



Са квантитативне тачке гледишта, хаотропни ефекат зависи и од концентрације употребљеног агенса. У хроматографском систему, повећавањем концентрације хаотропног агенса продужава се задржавање на стационарној фази супротно наелектрисаног јонизованог анализата, што подражава ефекат амфифилних јон-пар реагенаса. С друге стране, за разлику од класичних јон-пар реагенаса, утицај хаотропних јона на карактеристике стационарне фазе је потпуно реверзибилан. Као такви, хаотропни агенси постају значајни за контролу ретенционог понашања јонизованих супстанци базног карактера. Механизам којим остварују своје ефекте је веома комплексан и зависи и од других експерименталних услова, као што су нпр. удео органског растварача, јонска јачина мобилне фазе, особине стационарне фазе, итд. Због тога је теоријско и емпиријско тј. експериментално математичко моделовање и описивање оваквих система од изузетног значаја.

1.2 МОДЕЛОВАЊЕ РЕТЕНЦИОНОГ ПОНАШАЊА У ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА

Разумевање, образлагање и предвиђање ретенционог понашања анализата предуслов је за оптимизацију хроматографских раздвајања и поједностављење развоја одговарајућих хроматографских метода. Хроматографски ретенциони модели представљају математички приказ зависности ретенционог понашања анализата од утицаја конституената хроматографског система. Модели могу бити емпиријски и теоријски. Емпиријски модели не захтевају шире теоријско утемељење за описивање ретенционих података, док теоријски модели примењују познате физичко-хемијске принципе и непосредно добијене податке преводе у знање фундаменталног значаја.

1.2.1 Теоријски модели

Ретенциони механизам јон-интеракционе хроматографије је предмет интересовања истраживача већ неколико деценија. Како би се предвидело ретенционо понашање анализата у датом систему, потребно је узети у обзир велики број променљивих као што су природа анализата и његово наелектрисање (нејонизујући, јонизујући, јонски или цвитерјонски), рН вредност мобилне фазе, тип и концентрација јон-интеракционог реагенса, удео органског растварача у мобилној фази, јонска јачина мобилне фазе, као и карактеристике стационарне фазе.

Рана теоријска истраживања јон-интеракционе хроматографије започета су разматрањем физичко-хемијског феномена који лежи у основи ретенционог механизма алтернативно га интерпретирајући као:

1. јонско спаривање, односно стварање комплекса између анализата и јон-интеракционог реагенса у мобилној фази или

2. динамичку јонску измену, тј. стварање комплекса између анализата и јон-интеракционог реагенса на стационарној фази.

Наиме, модел јонског спаривања [3, 9, 10] подразумева стварање неутралног јонског пара између јона анализата и супротно наелектрисаног липофилног јона у мобилној фази, и његово продужено задржавање на неполярној стационарној фази. С друге стране, са становишта динамичке јонске измене [4, 11, 12], прво се наелектрисани липофилни јони адсорбују на површину стационарне фазе, тиме обезбеђујући место за измену јона анализата. Термодинамички, ова два приступа се не разликују: почетно и крајње стање је исто, а различит је само редослед „међу-корака“. Ипак, они представљају основу првих стехиометријских ретенционих модела. Према овим моделима, у јон-интеракционом хроматографском систему успостављају се следеће равнотеже:

а) адсорпција анализата (елуита) E на одговарајуће место на стационарној фази L (угљоводонични лиганд):



б) адсорпција јон-интеракционог реагенса H на L :



в) замена јон-интеракционог реагенса H са елуитом E :



г) формирање јонског пара у мобилној фази (EH), ако су аналит и јон-интеракциони реагенс супротног наелектрисања:



д) формирање јонског пара у стационарној фази (EHL), ако су аналит и јон-интеракциони реагенс супротног наелектрисања:



Круцијални недостатак стехиометријских модела јесте што не узимају у обзир развијање електричног двослоја. Значај стварања електричног двослоја први су истакли Бидлингмејер и сарадници [5, 13]. Адсорпцијом јон-интеракционог реагенса на реверзно-фазну колону ствара се примарни наелектрисани јонски слој са одговарајућим јонима супротног наелектрисања у дифузној региону. Задржавање аналита подразумева његов трансфер кроз електрични двослој, па тако ретенциони механизам зависи и од електричних и Ван дер Валсових сила. У том смислу, валидност стехиометријских модела се доводи у питање, јер у случају трансфера наелектрисаног аналита на наелектрисану стационарну фазу, стехиометријске константе нису константе, већ су модулисане електричним потенцијалом.

С друге стране, термодинамички модели узимају у обзир значај разлике потенцијала која настаје између стационарне фазе и елуента услед различите адсорбофилности јон-интеракционог реагенса и његовог јона супротног наелектрисања. Међутим, два таква модела [14, 15] су искључиво електростатска

и не успевају да објасне велики број експерименталних налаза [16–23] јер занемарују стварање хемијских комплекса између наелектрисаног анализата и јон-интеракционог реагенса.

Први покушаји да се теоријски моделује ретенционо понашање анализата по додатку хаотропних агенаса, као подврсте јон-интеракционих реагенса, такође су били стехиометријски. Велики број аутора [24–30] подржавао је став да јонско спаривање доминира, поготову због тога што су хаотропни јони далеко мање хидрофобни од класичних липофилних јон-интеракционих реагенса. Претпостављено је да хаотропни агенси учествују у јаким интеракцијама спаривања зато што су слабо хидратисани, а као једини разлог продуженог задржавање анализата у колони у условима хаотропне хроматографије, сматрана је продужена интеракција награђеног неутралног комплекса са хидрофобном стационарном фазом.

Казакевич и сарадници [30] посебно истичу значај степена солватације анализата и полазе од становишта да аналит постоји у солватисаном и десолватисаном облику. Такође, сматра се да десолватисани облик постоји само у форми комплекса са хаотропним јоном који јонским спаривањем нарушава солватациони омотач анализата. Равнотежа између солватисаног и десолватисаног облика анализата изражена је равнотежном константом која одговара константи јонског спаривања K_{EH} , приказаној једначином (4). Једначина (8) приказује стехиометријски модел за описивање промена ретенционог фактора анализата додатком хаотропног агенса:

$$k = k_0\theta + k_{EH}(1 - \theta) = \frac{k_0 + k_{EH}K_{EH}[H]}{(1 + K_{EH}[H])} \quad (8)$$

где је k ретенциони фактор анализата, k_0 ретенциони фактор слободног солватисаног анализата, θ фракција солватисаног неспареног анализата, k_{EH} ретенциони фактор десолватисаног јон-спареног анализата, а $(1-\theta)$ фракција анализата у десолватисаном облику.

Кар и сарадници [17] развили су још један стехиометријски модел за описивање ретенционог понашања анализата у условима хаотропне хроматографије, али једначина није коришћена за апроксимацију ретенционих података. Присуство

јонизованих силанолних група водило је ауторе до претпоставке да ће тако негативно наелектрисана површина стационарне фазе спречити адсорпцију анјонског адитива. Овакав приступ опет значи да модел само парцијално разматра ретенциони механизам, односно, није свеобухватан.

Стехиометријски модели се због своје веће алгебарске једноставности чешће примењују од термодинамичких, иако услед недостатка чврсте заснованости на физичко-хемијским принципима овим приступом није математички могуће предвидети и објаснити експерименталне налазе [31] као што су:

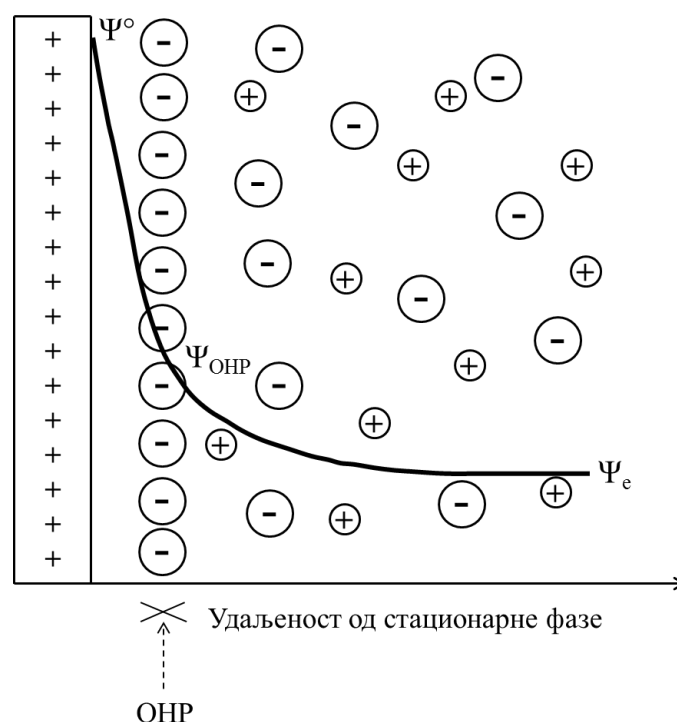
- а) ретенциони максимум на графицима зависности ретенционог фактора од концентрације хаотропног агенса;
- б) смањење ретенције анализата са повећањем концентрације јон-интеракционог агенса истог предзнака наелектрисања;
- в) благи утицај промене концентрације јон-интеракционог агенса на задржавање неутралног анализата.

Цеки и сарадници [16, 32] развили су проширени термодинамички модел који омогућава теоријско моделовање ретенционог понашања, узимајући у обзир налазе и стехиометријских и електростатичких модела. Овај модел тумачи значај стварања комплекса на термодинамичком, а не стехиометријском нивоу, истовремено узимајући у обзир значај стварања електричног двослоја. Због своје свеобухватне утемељености у принципима физичке хемије, овај модел је коришћен за тумачење и предвиђање ретенционог понашања анализата испитиваних у овој дисертацији и у наставку ће бити детаљније објашњен.

Проширени термодинамички модел

У основи ове термодинамичке теорије јон-интеракционе хроматографије јесте Штерн-Гуи-Чапманов модел електричног двослоја (слика 1) [14, 33, 34]. Услед адсорпције јона јон-интеракционог реагенса настаје разлика у електричном потенцијалу (ψ°) између површине стационарне фазе и електронеутралног раствора елуента. У електричном двослоју разликују се два региона: компактни

слој у коме потенцијал опада линеарно, и дифузни слој у коме потенцијал опада готово експоненцијално због ефекта екранирања. Што је већа јонска јачина, то потенцијал брже опада.



Слика 1. Штерн-Гуи-Чапманов модел електричног двослоја. ОНР (енг. *outer Helmholtz plane*) – спољашња Хелмхолцова равна (прилагођено из референце [7])

За развој проширеног термодинамичког модела из стехиометријских модела је преузета реакциона шема (једначине 1–7), али равнотежне константе нису стехиометријске, већ термодинамичке. Како равнотеже приказане једначинама 3, 6 и 7 нису независне од осталих равнотежа, у равнотежним условима важи следеће:

$$\mu_{LE} = \mu_L + \mu_E \tag{9}$$

$$\mu_{LH} = \mu_L + \mu_H \tag{10}$$

$$\mu_{EHL} = \mu_E + \mu_H + \mu_L \tag{11}$$

$$\mu_{EH} = \mu_E + \mu_H \tag{12}$$

где μ представља електрохемијски потенцијал сваке врсте. Електрохемијски потенцијали дати су изразима 13–18:

$$\mu_{LE} = \mu_{LE}^{\circ} + RT \ln a_{LE} + z_E F \psi^{\circ} \quad (13)$$

$$\mu_E = \mu_E^{\circ} + RT \ln a_E \quad (14)$$

$$\mu_L = \mu_L^{\circ} + RT \ln a_L \quad (15)$$

$$\mu_H = \mu_H^{\circ} + RT \ln a_H \quad (16)$$

$$\mu_{LH} = \mu_{LH}^{\circ} + RT \ln a_{LH} + z_H F \psi^{\circ} \quad (17)$$

$$\mu_{EHL} = \mu_{EHL}^{\circ} + RT \ln a_{EHL} \quad (18)$$

где μ° представља стандардни електрохемијски потенцијал, a активитет сваке врсте, F и R су Фарадејева и гасна константа, T је апсолутна температура, а z_E и z_H су наелектрисања E и H .

Како је општи израз за термодинамичку константу равнотеже:

$$K = \exp(-\Delta\mu^{\circ}/RT) \quad (19)$$

где $\Delta\mu^{\circ}$ представља разлику стандардних електрохемијских потенцијала разматране равнотеже, комбинацијом једначина 9–18, изводе се једначине за термодинамичке константе равнотеже:

$$K_{LE} = \frac{a_{LE}}{a_L a_E} \exp(z_E F \psi^{\circ}/RT) \quad (20)$$

$$K_{LH} = \frac{a_{LH}}{a_L a_H} \exp(z_H F \psi^{\circ}/RT) \quad (21)$$

$$K_{EH} = \frac{a_{EH}}{a_E a_H} \quad (22)$$

$$K_{EHL} = \frac{a_{EHL}}{a_E a_H a_L} \quad (23)$$

Ретенциони фактор елуита k , уобичајено се дефинише као

$$k = \Phi \frac{[LE]+[EHL]}{[E]+[EH]} \quad (24)$$

где је $[EHL]$ површинска концентрација комплекса елуита и јон-интеракционог реагенса, $[EH]$ концентрација комплекса елуита и јон-интеракционог реагенса у мобилној фази, $[LE]$ површинска концентрација елуита E , $[E]$ концентрација елуита E у мобилној фази, а Φ представља однос стационарне и мобилне фазе.

Како је обим везивања елуита за доступна везна места стационарне фазе мали, а укупна концентрација лиганда $[L]_T$ очувана, може се написати да је:

$$[L]_T = [L] + [LH] \quad (25)$$

где је $[L]$ површинска концентрација слободних адсорпционих места, а $[LH]$ површинска концентрација јон-интеракционог реагенса [9, 35].

Комбинацијом једначина 20–25, изводи се једначина ретенционог модела:

$$k = \Phi [L]_T \frac{K_{LE} \frac{\gamma_L \gamma_E}{\gamma_{LE}} \exp(-z_E F \psi^\circ / RT) + K_{EHL} \frac{\gamma_E \gamma_H \gamma_L}{\gamma_{EHL}} [H]}{\left(1 + K_{EH} \frac{\gamma_E \gamma_H}{\gamma_{EH}} [H]\right) \left(1 + K_{LH} \frac{\gamma_L \gamma_H}{\gamma_{LH}} \exp(-z_H F \psi^\circ / RT) [H]\right)} \quad (26)$$

где γ представља коефицијенте активитета за сваку врсту.

Први члан бројиоца у једначини 26 описује модификацију адсорпције елуита на стационарну фазу у присуству јон-интеракционог реагенса. Ако су предзнаци наелектрисања елуита и јон-интеракционог реагенса различити, вредност ретенционог фактора k ће расти са порастом концентрације јон-интеракционог реагенса, док обрнуто важи ако су аналит и јон-интеракциони реагенс супротно наелектрисани. Други члан бројиоца се односи на јонско спаривање у стационарној фази које утиче на повећање ретенције. Очигледно, ако је наелектрисање аналита и јон-интеракционог реагенса истог знака или ако је аналит неутралног карактера, овај члан се искључује јер не важи равнотежа приказана једначином 5. Други члан левог фактора имениоца односи се на јонско спаривање у мобилној фази које одвлачи елуит са стационарне фазе ка елуенту и на тај начин смањује ретенцију аналита. Ако су аналит и јон-интеракциони реагенс истог наелектрисања или ако је аналит неутралан, овај члан се искључује јер не важи равнотежа приказана једначином 4. Десни фактор имениоца односи се на конкуренцију у адсорпцији између аналита и јон-интеракционог реагенса. Треба уочити да се потенцијал ψ° који се развија на површини стационарне фазе увек противи даљој адсорпцији јон-интеракционог реагенса, јер је истог знака као и наелектрисање јона јон-интеракционог реагенса z_H .

Као што је већ напоменуто, развијање разлике у електричном потенцијалу (ψ°) настаје услед различите адсорбофилности катјона и анјона јон-интеракционог реагенса. Ако је z_H наелектрисање најадсорбофилнијег јона јон-интеракционог

реагенса H који одређује површински потенцијал, а адсорбофилност његовог јона супротног наелектрисања занемарљива, површинско наелектрисање је $[LH] \cdot |z_H| \cdot F$, па се апсолутна вредност површинског потенцијала може приказати као функција густине наелектрисања стационарне фазе према Гуи-Чапмановој једначини [16]:

$$\Psi^{\circ} = \frac{2RT}{F} \ln \left\{ \frac{[LH] \cdot |z_H| F}{(8\epsilon_0 \epsilon_r RT \sum_i c_{oi})^{0.5}} + \left[\frac{([LH] \cdot z_H F)^2}{8\epsilon_0 \epsilon_r RT \sum_i c_{oi}} + 1 \right]^{0.5} \right\} \quad (27)$$

где је R гасна константа, F Фарадејева константа, T апсолутна температура, ϵ_0 електрична пермитивност вакуума, ϵ_r диелектрична константа мобилне фазе и $\sum c_{oi}$ концентрација једнострукто наелектрисаних јона електролита у мобилној фази (mM). У зависности од природе наелектрисања z_H , површински потенцијал Ψ° може бити позитиван или негативан.

Претпоставка да контрајон јон-интеракционог реагенса није адсорбофилан тачна је за амфифилне јон-интеракционе реагенсе, као што су нпр. натријум додекансулфонат или тетрабутиламонијум хлорид, јер је адсорбофилност малих неорганских контрајона (Na^+ или Cl^-) занемарљива у поређењу са великим органским јонима који дефинишу површински потенцијал (додекансулфонатни јон и тетрабутиламонијум јон). Ако је јонски модификатор $NaClO_4$, што је случај у хаотропној хроматографији, адсорбофилност ањона јесте израженија него адсорбофилност катјона, и површински потенцијал ће имати негативан предзнак. Ипак, адсорпција катјона се не може потпуно занемарити [14], па површинску концентрацију Na^+ јона треба узети у обзир приликом израчунавања густине површинског наелектрисања. Будући да је тешко измерити количину Na^+ јона спарених са адсорбованим ClO_4^- , може се очекивати да је површинска количина ClO_4^- фракција укупно адсорбоване количине $NaClO_4$ која се може одредити адсорпционом изотермом.

Адсорпциона изотерма представља однос количине хаотропног агенса адсорбованог на површину стационарне фазе и његове концентрације у мобилној фази, а њено дефинисање је важно како би се узела у обзир модификација наелектрисања стационарне фазе која настаје услед адсорпције хаотропног адитива. Одређивање адсорпционог профила врши се методом фронталне анализе која ће бити описана у наставку. Однос количине хаотропног агенса адсорбованог

на површину стационарне фазе и његове концентрације у мобилној фази описан је Фројндлиховом адсорпционом изотермом:

$$[LH] = a \cdot [H]^b \quad (28)$$

где су a и b константе, $[LH]$ специфична површинска концентрација адитива ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$), а $[H]$ његова концентрација у мобилној фази (mM).

Коначно, заменом Гуи-Чапмановог израза за потенцијал (једначина 27) и Фројндлихове изотерме (једначина 28), у једначину 26, добија се коначни облик проширеног термодинамичког ретенционог модела:

$$k = \frac{c_1 \left\{ a[H]^b f + [(a[H]^b f)^2 + 1]^{0.5} \right\}^{\pm 2|z_E|} + c_2[H]}{(1+c_3[H]) \left\{ 1+c_4[H] \left\{ a[H]^b f + [(a[H]^b f)^2 + 1]^{0.5} \right\}^{(-2|z_H|)} \right\}} \quad (29)$$

где је, ради једноставности означена константа f (m^2/mol) која се израчунава из експерименталних услова:

$$f = \frac{|z_H|F}{(8\varepsilon_0\varepsilon_rRT \sum_i c_{0i})^{0.5}} \quad (30)$$

У једначини 29, експоненту првог члана бројноца одговара позитиван предзнак ако су аналит и јон-интеракциони реагенс супротно наелектрисани, односно негативан предзнак, ако су аналит и јон-интеракциони реагенс истог наелектрисуња.

Параметри c_1 – c_4 имају јасно физичко значење и могу се приказати следећим једначинама:

$$c_1 = \Phi[L]_T K_{LE} \frac{\gamma_{LYE}}{\gamma_{LE}} \quad (31)$$

$$c_2 = \Phi[L]_T K_{EHL} \frac{\gamma_{EYH\gamma_L}}{\gamma_{EHL}} \quad (32)$$

$$c_3 = K_{EH} \frac{\gamma_{EYH}}{\gamma_{EH}} \quad (33)$$

$$c_4 = K_{LH} \frac{\gamma_{LYH}}{\gamma_{LH}} \quad (34)$$

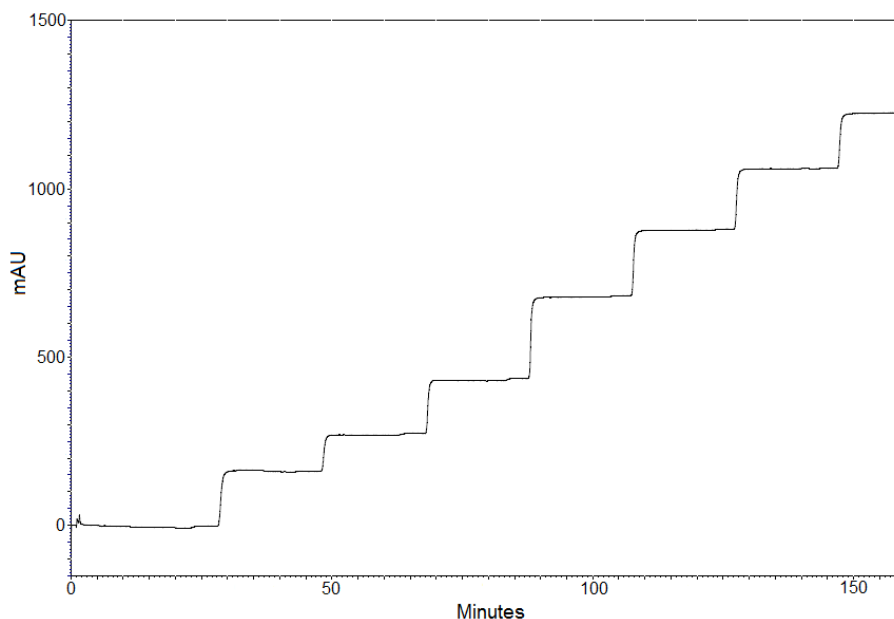
Из једначине 31 се види да параметар c_1 представља ретенциони фактор аналита када јон-интеракциони реагенс није присутан у елуенту, и може се одредити

експерименталним путем. Када је ова вредност позната, једначина 29 се редукује до облика трипараметарске једначине.

Фронтална анализа

Фронтална анализа је први пут развијена и примењена за одређивање адсорпционих изотерми 50-тих година XX века [36, 37]. Изводи се сукцесивним наглим повећањем концентрације дате супстанце на улазу у колону и снимањем тзв. пробојних (енг. *break through*) кривих [38] са циљем да се успостави однос између концентрације посматране супстанце у мобилној фази и концентрације на површини стационарне фазе у одређеном опсегу концентрација. Свакој наглој промени концентрације и последичном трансферу масе на стационарну фазу одговара једна тачка адсорпционе изотерме, што значи да је потребно извести више експеримената. За припрему серије раствора познатих концентрација потребно је доста времена, материјала и рада. Зато је једноставније користити хроматограф са две пумпе, па према градијентном програму допремати тачне и прецизне концентрације дате супстанце и тако смањити експерименталну грешку. Предност ове методе је што тачка инфлексije пробојне криве не зависи од кинетике, већ само од термодинамичких особина система, што фронталну анализу чини најтачнијом хроматографском методом за дефинисање адсорпционих изотерми. На слици 2 приказан је пример пробојне криве добијене фронталном анализом.

Количина агенса која се адсорбује на колону израчунава се из ретенционог времена пробојне криве. За ретенционо време пробојне криве не може се сматрати тачка инфлексije криве нити половина висине платоа, зато што пробојне криве често нису симетричне, нарочито при великим концентрацијама. Наиме, ретенционом времену пробојне криве одговара она тачка у којој нормала, повучена у односу на горњи и доњи плато криве, пресеца пробојну криву тако да са леве и десне стране нормале остану троуглови једнаких површина (слика 3).

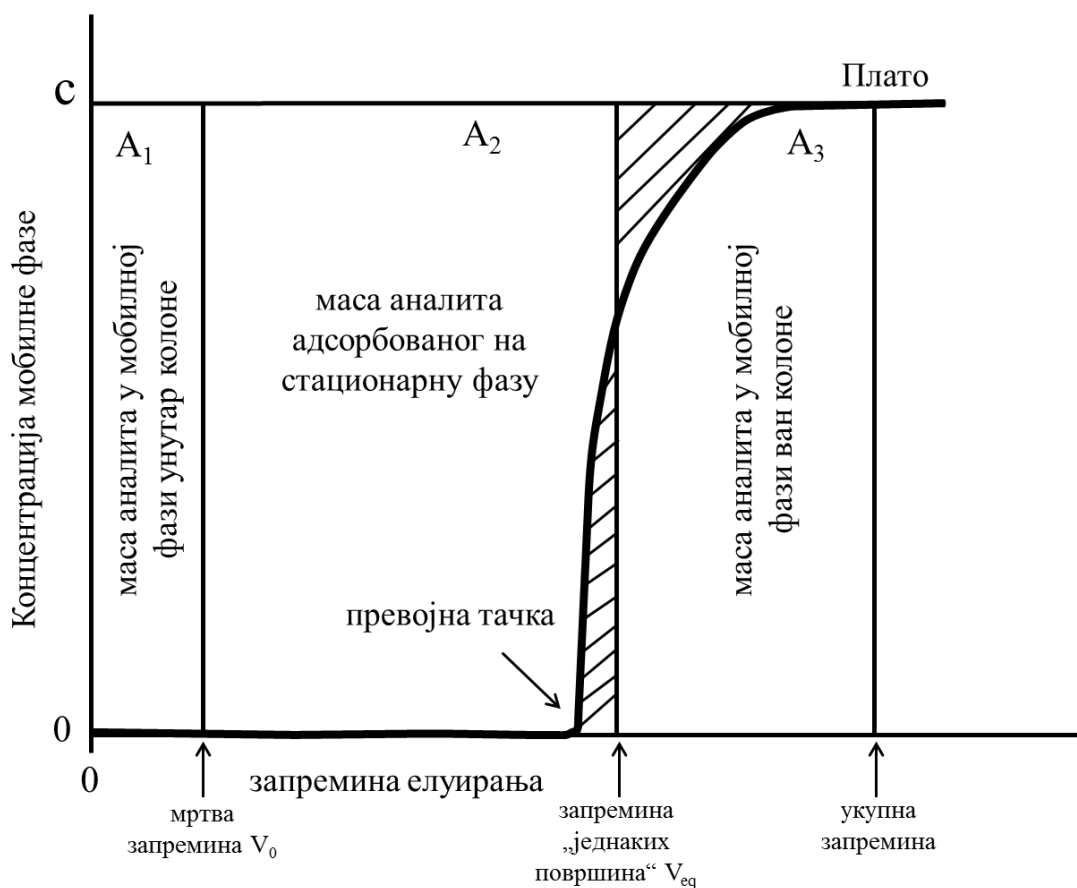


Слика 2. Пример пробојне криве добијене фронталном анализом према градијентном програму

Концентрација адсорбованог агенса, $[LH]$, израчунава се према следећој једначини [35, 39]:

$$[LH] = v \cdot (t_r - t_0) \cdot [H] / A \quad (35)$$

где је v проток мобилне фазе, t_r пробојно ретенционо време умањено за системско време кашњења које је последица мртве запремине система (енг. *system delay time*), t_0 је ретенционо време пика мобилне фазе, $[H]$ је концентрација испитиваног агенса у елуенту, а A представља површину дате стационарне фазе. Време кашњења услед мртве запремине система је време које је потребно да испитивана супстанца стигне од резервоара мобилне фазе до почетка колоне и одређује се као пробојно време ацетона у хроматографском систему када се колоне замени тзв. беззапреминском јединицом.



Слика 3. Очитавање података добијених фронталном анализом. Пробојна крива је дебела црна линија. Две шрафиране зоне са њене леве и десне стране су једнаке површине, а вредност запремине која раздваја ове једнаке површине користи се за израчунавање. Израчунавање на основу вредности превојне тачке може довести до велике грешке. (прилагођено из референце [40])

1.2.2 Емпиријски модели

Моделовање односа квантитативно представљене структуре и хроматографског понашања молекула

Модели односа између квантитативно представљене структуре и особина молекула (енг. *quantitative structure-property relationship* – QSPR) су модели емпиријског карактера који се заснивају на претпоставци да слична једињења поседују сличне физичко-хемијске особине. На основу тога могуће је одредити карактеристике хемијске структуре која за дата и слична једињења у највећој мери

детерминишу проучавану особину. Услед овако поједностављеног приступа, ови односи не представљају израз фундаменталних термодинамичких законитости, па њихова применљивост и поузданост не може бити општег карактера. Циљ QSPR анализе јесте проналажење статистички релевантне математичке зависности између зависно променљиве, а то је нека експериментално окарактерисана особина молекула, и независно променљивих којима се квантификују одређена својства молекулске структуре посматране групе једињења [41]. У остварењу овог циља примењују се различите математичке и статистичке методе анализе података уз примену одговарајућих софтвера, тзв. *in silico* методе. За развој QSPR модела неопходна су три основна елемента:

- униформно добијени експериментални подаци којима се квантификује особина која се проучава (нпр. у овој дисертацији то су ретенциони фактори анализата и израчунати параметри проширеног термодинамичког модела);
- метода којом је могуће превести карактеристике хемијске структуре у нумеричке вредности променљивих које се називају молекулски дескриптори (дескриптори величине молекула, облика молекула, поларности и наелектрисања молекула, тополошки дескриптори, емпиријски и семи-емпиријски дескриптори [42]);
- метода која омогућава успостављање математичке зависности између променљивих (нпр. једноставна линеарна регресија, мултилинеарна регресија (енг. *multiple linear regression* – MLR), метода најмањих квадрата (енг. *partial least squares* – PLS), вештачке неуронске мреже (енг. *artificial neural networks* – ANN), *random forest* регресија (RF), генетски алгоритми (енг. *genetic algorithms* – GA), итд.)

Стандардна пракса развоја QSPR модела обично подразумева неколико корака [43, 44]: формирање и подела сета података, геометријска оптимизација структура и израчунавање молекулских дескриптора, избор најзначајнијих дескриптора, успостављање модела, валидација модела и дефинисање домена применљивости.

У случају успостављања модела нпр. MLR методом, они имају следећи облик:

$$y = a_1x_1 + a_2x_2 \dots + a_nx_n + b \quad (36)$$

где је y експериментално добијена вредност нпр. ретенционог фактора, $a_{(1-n)}$ су регресиони коефицијенти, а $x_{(1-n)}$ молекулски дескриптори. Увидом у предзнак регресионих коефицијената може се утврдити какав утицај дата структурна карактеристика има на ретенцију. Такође, ако се пре успостављања корелације изврши нормализација вредности дескриптора, онда поређење регресионих коефицијената пружа увид и у израженост утицаја дате карактеристике на ретенционо понашање анализата.

Иако није општи у свом обиму, QSPR приступ даје додатну вредност хроматографским студијама и може пружити увид у доминантан молекуларни механизам раздвајања компоненти у датом хроматографском систему.

Хеометријски приступ моделовању ретенционог понашања

Хеометрија је хемијска дисциплина која користи математичке и статистичке методе за дизајн и избор оптималне процедуре и експеримента, као и за пружање максималног броја информација анализом добијених хемијских података. Једна од широко примењиваних хеометријских техника је експериментални дизајн. Експериментални дизајн омогућава истовремено испитивање промена више фактора, а затим и интерпретацију добијених резултата кроз дефинисање појединачног утицаја сваког од фактора, као и утицаја њихових међусобних интеракција на један или више одговора система. У хроматографском систему фактори чији се утицај најчешће процењује су тип и удео органског растварача у мобилној фази, рН вредност мобилне фазе, концентрација пуфера, концентрација јон-интеракционог агенса, температура колоне, проток мобилне фазе, итд. Као одговори система прате се величине које описују хроматографско понашање анализата, односно задржавање анализата у колони, ефикасност раздвајања, облик хроматографског пика, итд. Будући да исход експеримента зависи од експерименталних услова, резултат, односно одговор система може бити представљен као функција експерименталних променљивих:

$$y = f(x) \quad (37)$$

Функција $f(x)$ је апроксимирана полиномском функцијом и даје добар опис везе између експерименталних променљивих и праћеног одговора у ограничену експерименталном домену [45]. Полиномска функција која омогућава дефинисање оптималних услова дата је квадратним моделом. Квадратни модел омогућава дефинисање превојних тачака (максимума или минимума) и тродимензионалну графичку презентацију везе између фактора и одговора система. Општи облик квадратног модела је:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (38)$$

где је y – одговор система, b_0 константа, b_1, b_2, \dots, b_i – коефицијенти главних фактора, $b_{12}, b_{13}, \dots, b_{ij}$ – коефицијенти интеракција, $b_{11}, b_{22}, \dots, b_{ii}$ – квадратни коефицијенти, x_1, x_2, \dots, x_n – фактори чији се утицај испитује и ε – остатак који представља разлику између одговора израчунатих добијеним математичким моделом и експериментално добијених вредности [46]. Остатак ε у моделу настаје као последица грешке самог модела (енг. *lack of fit* – LOF) и експерименталне грешке (енг. *pure error* – PE).

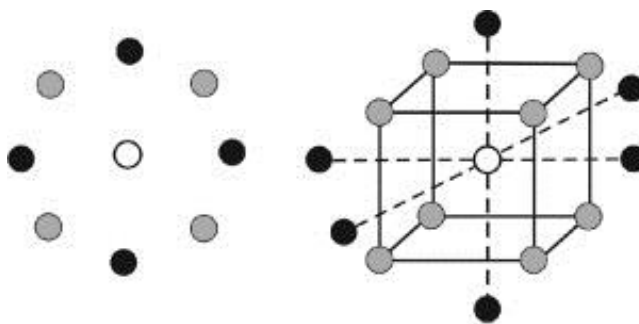
Анализом апсолутних вредности коефицијената израчунатих за кодиране факторе могуће је проценити природу и обим ефеката фактора на одабране одговоре. Што је вредност коефицијента већа, већи је и утицај фактора на одговоре. Такође, у зависности од предзнака коефицијента, утицај фактора на одговоре може бити позитиван или негативан. На исти начин тумаче се и ефекти интеракције фактора. Значај утицаја фактора и факторских интеракција процењује се Студентовим t -тестом статистички и графички.

Да би се добио квадратни модел потребно је применити тзв. дизајн површине одговора (енг. *response surface designs* – RSM), који у зависности од експерименталног домена који испитује може бити симетричан и асиметричан. Међу симетричне дизајне спадају пун факторски дизајн на три нивоа, централни композициони дизајн, Бокс-Бенкенов дизајн и Делертова матрица. У асиметричне дизајне убрајају се D -оптимални дизајн и дизајн конструисан униформним мапирајућим Кенард-Стоуновим алгоритмом [47]. У наставку ће детаљније бити описани они типови дизајна који су коришћени у овој дисертацији.

Централни композициони дизајн (eng. *central composite design* – CCD) састоји се од пуног или фракционог факторског дизајна, звезда дизајна и понављања у централној тачки (слика 4). Како је број експеримената код пуног факторског дизајна 2^n , код звезда дизајна $2n$, а понављања у централној тачки се најчешће изводе 3 до 5 пута, број експеримената у CCD је:

$$N = 2^n + 2n + \text{број понављања у централној тачки} \quad (39)$$

где N представља број експеримената, а n број фактора чији се утицај испитује. Понављања у централној тачки се врше ради постизања веће тачности резултата, за испитивање закривљености површине одговора у испитиваном региону и за процену статистичке валидности модела.



Слика 4. Приказ централног композиционог дизајна са три фактора (сиве тачке припадају пуном факторском дизајну, црне тачке представљају звезда дизајн, а бела тачка понављања у централној тачки)

У табели 1 је приказана матрица експеримента за CCD када се разматра утицај три фактора. Првих 8 експеримената припада пуном факторском дизајну за три фактора ($2^3=8$). Следећих 6 експеримената припада звезда дизајну ($2n=6$), а последњи експерименти представљају понављања у централној тачки и најчешће их је четири. Укупан број експеримената, при праћењу утицаја три фактора са четири понављања у централној тачки, у CCD-у износи осамнаест.

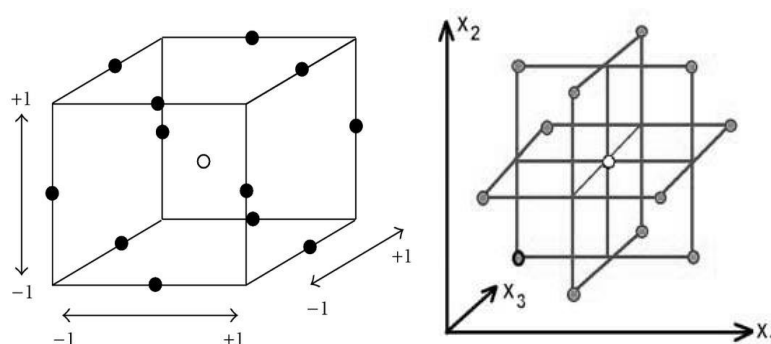
Тачке које припадају пуном факторском дизајну налазе се на нивоима -1 и $+1$, оне које припадају звезда дизајну на факторским нивоима 0 , $-\alpha$ и $+\alpha$, док је централна тачка на факторском нивоу 0 . У зависности од вредности α , постоје две

врсте централног композиционог дизајна: а) ка центру страница коцке оријентисани централни композициони дизајн (енг. *face-centred central composite design* – FCCD) где је $|\alpha|=1$ и фактори се испитују на три нивоа; б) сферни централни композициони дизајн (енг. *circumscribed central composite design* – CCCD) где је $|\alpha|>1$ и фактори се испитују на пет нивоа. За тзв. ротирајући CCCD, α ниво треба да буде $|\alpha|=(2n)^{1/4}$, тј. 1,41 када се испитују два, односно 1,68 када се испитују три фактора [47, 48].

Табела 1. Матрица експеримента за CCD

x_1	x_2	x_3
-1	-1	-1
-1	-1	+1
-1	+1	-1
-1	+1	+1
+1	-1	-1
+1	-1	+1
+1	+1	-1
+1	+1	+1
$-\alpha$	0	0
$+\alpha$	0	0
0	$-\alpha$	0
0	$+\alpha$	0
0	0	$-\alpha$
0	0	$+\alpha$
0	0	0

Бокс-Бенкенов дизајн (енг. *Box-Behnken design* – BBD) представља непотпуни факторски дизајн на три нивоа. Експерименталне тачке налазе се на сфери и на једнаком растојању од централне тачке. Ниједна експериментална тачка нема екстремне вредности свих фактора истовремено. Ово је посебно корисно када се полази од претпоставке да ће извођење експеримената под екстремним условима дати неповољне резултате или је пак експерименте под овим експерименталним условима немогуће извести. За три посматрана фактора, експерименталне тачке у BBD се налазе на средини ивица коцке, као што је приказано на слици 5.



Слика 5. Приказ Бокс-Бенкеновог дизајна за три фактора (бела тачка представља понављања у централној тачки)

Број експеримената за BBD је:

$$N = 2n(n-1) + \text{број понављања у централној тачки} \quad (40)$$

где је N број експеримената, а n број испитиваних фактора.

У табели 2 је приказана матрица експеримената за BBD када се испитују три фактора. Укупно је предвиђено 16 експеримената, укључујући 4 понављања у централној тачки. Матрица се може поделити на 3 блока од по 4 експеримента. Сваки блок чини један пун факторски дизајн на два нивоа (2^2), који се налази на нултом нивоу трећег фактора. Последња 4 експеримента су понављања у централној тачки.

Ако се ефикасност експерименталног дизајна дефинише као број коефицијената математичког модела за одређени број фактора подељен са бројем потребних експеримената, поређењем BBD са другим дизајнима површине одговора, показано је да су BBD и Делертова матрица нешто ефикаснији од

централног композиционог дизајна, али значајно ефикаснији од пуног факторског дизајна [49].

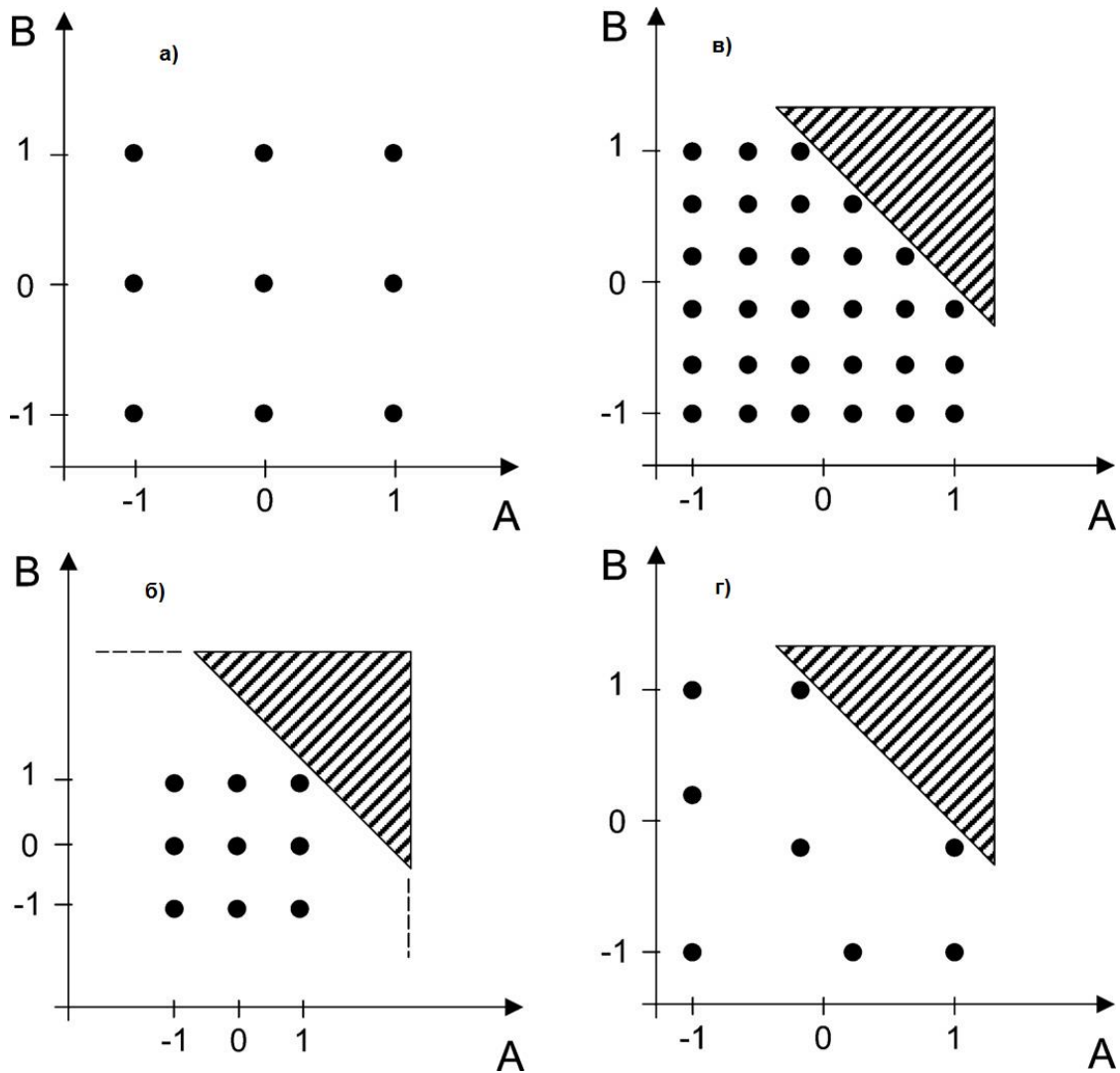
Табела 2. Матрица експеримента за BBD

x_1	x_2	x_3
-1	-1	0
+1	-1	0
-1	+1	0
+1	+1	0
-1	0	-1
+1	0	-1
-1	0	+1
+1	0	+1
0	-1	-1
0	+1	-1
0	-1	+1
0	+1	+1
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Када се испитује асиметрични експериментални домен, потребно је применити асиметрични експериментални дизајн, као што је D -оптимални дизајн. Асиметрични дизајн се користи због тога што је симетрични дизајн у асиметричном домену проблематичан: или је преширок па захтева извођење немогућих експеримената или је превише узак па тако не покрива значајан део експерименталног домена (слика ба и бб).

За конструисање D -оптималног дизајна који испитује n фактора, прво је потребно дефинисати тип математичког модела који захтева минималан број експеримената (N_{\min}) потребних за процену коефицијената модела. Затим се

дефинише број експеримената N који ће бити изведен ($N \geq N_{\min}$). Експериментални домен представљен је тзв. тачкама кандидата (N_{grid}) које у форми мреже покривају асиметрични домен (слика 6в). Експерименталне тачке D -оптималног дизајна које ће бити изведене (N) одабране су на основу критеријума D -оптималности, односно као комбинација са максималном детерминантом за $X^T X$, где је X^T транспонована модел матрица X (слика 6г) [47].



Слика 6. а) Пун факторски 3^2 дизајн у правоугаоном симетричном домену; б) ограничени пун факторски 3^2 дизајн у асиметричном домену; в) мрежа тачака кандидата у асиметричном домену; г) изабране тачке D -оптималног дизајна са 8 експеримената (црне тачке означавају могуће или одабране експерименте) (прилагођено из референце [47])

1.3 ПОСТУПЦИ ОПТИМИЗАЦИЈЕ ЈОН-ИНТЕРАКЦИОНИХ ХРОМАТОГРАФСКИХ МЕТОДА СА ХАОТРОПНИМ АГЕНСИМА

Систематичним испитивањем утицаја хаотропних агенаса на ретенционо понашање анализата, као и разумевањем интеракција овог фактора са другим условима хроматографског система, омогућава се идентификација оптималних хроматографских услова што је од изузетног значаја за методе намењене за идентификацију и одређивање садржаја активних фармацеутских супстанци и њихових нечистоћа. Дефинисање оптималних хроматографских услова може се вршити на различите начине. Најчешће је потребно оптимизовати више различитих одговора система, где оптимални услови за један одговор система нису нужно оптимални и за друге одговоре. Изазов је још већи када одговори имају супротне циљеве, па нпр. треба максимизовати раздвајање критичног пара пикова и истовремено минимизовати укупно трајање хроматографске анализе. Циљ је проналажење глобалног оптимума који представља компромис између индивидуалних оптимума, а резултира жељеним понашањем хроматографског система. Ово је могуће постићи тзв. мултикритеријумским приступом оптимизацији методе [50, 51]. Одабир оптимума може се вршити графички, када се конструише одговарајућа површина одговора (енг. *response surface*), или нумерички, коришћењем одговарајућег оптимизационог алгорита. Графички приступ је практичан једино када се испитује једна или две експерименталне променљиве. Такође, предност нумеричке оптимизације се огледа и у могућности компјутерске аутоматизације [52]. Неке од метода за дефинисање глобалног оптимума мултикритеријумским приступом су: путања највећег нагиба (енг. *path of steepest ascent*), процедура ограничене оптимизације (енг. *constrained optimization procedure*), методе преклапања графикона контура (енг. *overlay of contour plots*), Парето оптималност (енг. *Pareto optimality*), Дерингера функција пожељних одговора (енг. *Derringer's desirability function*) [53], метода претраге чворова мреже [52], итд. У наставку ће бити детаљније описане оне методе за оптимизацију које су коришћене за израду ове дисертације.

Дерингерова функција пожељних одговора

Дерингерова функција пожељних одговора је функција циља чија вредност представља геометријску средину свих трансформисаних одговора хроматографског система и треба да има максималну вредност [54–56]:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (41)$$

где d_i представља вредност појединачне функције пожељних одговора за сваки трансформисани појединачни експериментални одговор, а n је број одговора. Бездимензиона скала вредности трансформисаних пожељних одговора креће се од $d=0$ за непожељне одговоре до $d=1$ за потпуно пожељне одговоре.

За трансформацију експерименталних одговора у d вредност користе се различите функције пожељних одговора по Дерингеру (енг. *Derringer*) и Свику (енг. *Suich*) [55, 57] у зависности да ли је циљ да се одређени одговор максимизује, минимизује или је потребно да досегне унапред дефинисану вредност.

Када је за дефинисање глобалног оптимума потребно да појединачни одговор достигне унапред дефинисану вредност, његова d вредност се израчунава по следећој једначини:

$$d = \begin{cases} \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^w & \text{if } L_i \leq Y_i \leq T_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^t & \text{if } T_i < Y_i \leq U_i \\ 0 & \text{if } Y_i < L_i \vee Y_i > U_i \end{cases} \quad (42)$$

Када је потребно да се појединачни одговор максимизује, његова d вредност се израчунава на следећи начин:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{if } Y_i \leq L_i \\ \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^w & \text{if } L_i < Y_i \leq T_i \\ 1 & \text{if } Y_i \geq T_i = U_i \end{cases} \quad (43)$$

Када је потребно да се појединачни одговор минимизује, његова d вредност се израчунава према следећој функцији:

$$d = \begin{cases} 1 & \text{if } Y_i \leq T_i = L_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^w & \text{if } U_i < Y_i \leq T_i \\ 0 & \text{if } Y_i \geq U_i \end{cases} \quad (44)$$

где је L_i најмања жељена вредност за одговор система Y_i , U_i највећа жељена вредност за одговор система Y_i , а T_i циљана вредност за одговор система Y_i , при чему је $L_i \leq T_i \leq U_i$. Експоненти w и t су тзв. тежине (енг. *weights*) којима се дефинише значај постизања циљане вредности T_i , као и облик функције пожељних одговора.

Претрага чворова мреже

Претрага чворова мреже (енг. *grid point search*) сматра се за најједноставнију нумеричку технику оптимизације [52]. Након дефинисања и статистичке процене математичког модела који повезује испитиване факторе са одговорима система, дискретизацијом вредности испитиваних фактора експериментални простор се дели у мрежу одговарајуће густине, тј. одговарајућег броја чворова. Веома је важно да се густина мреже дефинише на одговарајући начин, јер превелика густина (услед превеликог уситњавања вредности фактора) може условити предуго израчунавање, док премала густина мреже може довести до губитка информација и грешке у дефинисању оптимума. Следећи корак је дефинисање оптимизационих критеријума које треба да испуне одговори који се прате. Претрагом свих чворова мреже, из експерименталног простора издвајају се они чворови који задовољавају дефинисане критеријуме. Било која од ових тачака може се одабрати као оптимална и представљати радну тачку.

Квалитет кроз дизајн. Design space

Концепт „квалитета кроз дизајн“ (енг. *quality by design – QbD*) је недавно усвојен у фармацеутској индустрији кроз документа Америчке администрације за храну и лекове [58, 59], као и објављивањем нових регулаторних смерница ICH Q8 [60], Q9 [61] и Q10 [62]. Циљ овог приступа је да се са претходно примењиване парадигме „квалитета кроз тестирање“ (енг. *quality by testing – QbT*) пређе на

„уграђивање“ квалитета у сам развој процеса и производа, што доводи до побољшања квалитета производа, ефикасности процеса, као и регулаторне флексибилности.

Треба истаћи да су и аналитичке процедуре део процеса фармацеутске производње. Због тога је потребно QbD концепт применити и у њиховом развоју. У литератури су доступни примери развоја метода течне хроматографије засновани на QbD принципима [63–68].

Први корак у QbD развоју методе је дефинисање циљаног аналитичког профила (енг. *analytical target profile* – АТР). Циљани аналитички профил представља скуп критеријума којима се дефинише шта ће се мерити, у ком матриксу, у ком опсегу концентрација, и слично, као и одговарајуће захтеве и спецификације који се односе на сам учинак методе. Ови критеријуми за процену учинка називају се критични атрибути квалитета (енг. *critical quality attributes* – CQAs). Следећи корак у развоју методе је процена ризика. Фактори ризика могу се класификовати у групе које се односе на апаратуру, материјале, методе, хемикалије и реагенсе, мерења, људски фактор, експерименталну средину (нпр. температура лабораторије, светлост, релативна влажност ваздуха), и слично. Инструментални фактори ризика могу се проценити методом експерименталног дизајна. Ови фактори се називају критични процесни параметри (енг. *critical process parameters* – CPPs). Интерпретацијом резултата добијених на овај начин, могуће је дефинисање *design space*-а (DS) аналитичке методе који чини окосницу QbD концепта.

Према смерницама ICH Q8 [60], DS се дефинише као „мултидимензиона комбинација и интеракција улазних променљивих (нпр. материјални атрибути) и процесних параметара за које је показано да обезбеђују гаранцију квалитета“. Фокус ове дефиниције је управо на обезбеђењу квалитета, односно на управљању квалитетом и ризиком. У смислу развоја аналитичких метода, DS се може сматрати „сигурном“ и робусном зоном у којој не долази до значајних промена нивоа критичних атрибута квалитета (CQAs). Због тога је потребно истовремено испитати утицај свих критичних процесних параметара (CPPs) значајних за дати систем (нпр. удео органског растварача у мобилној фази, време трајања и нагиб

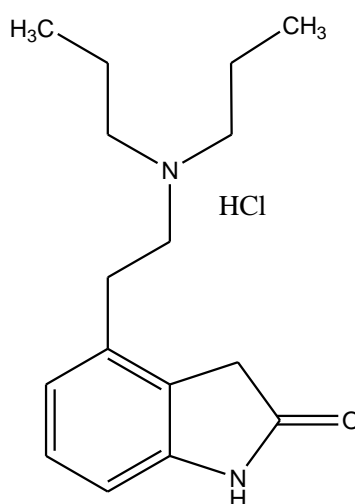
градијента у хроматографској методи и слично). Коначно, за дефинисање *design space*-а није довољно само одабрати регион експерименталног простора у коме све жељене карактеристике аналитичке методе испуњавају критеријуме, већ је важно израчунати и вероватноћу са којом дефинисани атрибути квалитета постижу задовољавајуће вредности, односно пружити гаранцију квалитета. Стога, аналитичка метода није дефинисана једном тачком у простору и једном комбинацијом радних параметара (нпр. једна вредност таласне дужине, једна вредност удела органског модификатора у мобилној фази, или једна рН вредност мобилне фазе), већ низом радних услова дефинисаних аналитичким *design space*-ом [63].

Ипак, QbD развој аналитичких метода се не завршава дефинисањем *design space*-а, већ је потребно осмислити контролну стратегију и спровести тестирање методе са циљем да се осигура погодност методе за даљу примену. У ту сврху примењују се тестови погодности система, као и тестови валидације.

1.4 АНАЛИТИКА ОДАБРАНИХ АНТИПАРКИНСОНИКА

1.4.1 Ропиниrol и нечистоће

Ропиниrol хидрохлорид није официналан ни у једној фармакопеји. Хемијски представља 4-[2-(дипропиламино)етил]-1,3-дихидро-2*H*-индол-2-он хидрохлорид. Његова структурна формула приказана је на слици 7.

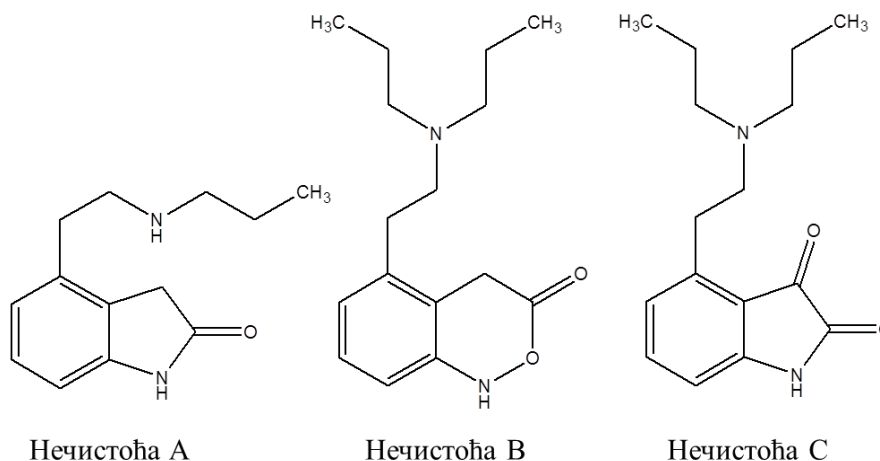


Слика 7. Структурна формула ропиниrol хидрохлорида

Молекулска формула: $C_{16}H_{25}ClN_2O$

Молекулска маса: 296,84 (260,38 као слободна база)

Услед присуства лактамске структуре и активне метиленске групе, ропиниrol је веома реактиван молекул подложен деградацији. Применом методе реверзно-фазне течне хроматографије детектоване су три нечистоће. Њихове хемијске структуре су приказане на слици 8. Карактеризација хемијских структура насталих нечистоћа извршена је применом нуклеарне магнетне резонанције и масене спектроскопије [69].



Слика 8. Хемијске структуре нечистоћа ропинирола

- А. 4-[2-(пропиламино)етил]-1,3-дихидро-2Н-индол-2-он
- В. 5-[2-(дипропиламино)етил]-1,4-дихидро-3Н-бензоксазин-3-он
- С. 4-[2-(дипропиламино)етил]-1Н-индол-2,3-дион

Преглед литературе

Развијено је неколико метода реверзно-фазне течне хроматографије за анализу ропинирола и његових нечистоћа.

Развијена је и валидирана метода за праћење стабилности ропинирола као активне фармацеутске супстанце, као и у фармацеутским дозираним облицима. Лек је изложен оксидацији, хидролизи, фотолизи и загревању као стрес условима. Сепарација је постигнута на реверзно-фазној С18 колони, 250 mm×4,6 mm, величине честица 5 μm. Мобилну фазу чинила је смеша метанол–0,05 М пуфер амонијум ацетата (рН 7,0) 80:20 V/V. Проток мобилне фазе био је 1 mL/min, а UV детекција је изведена на таласној дужини од 250 nm [70].

Изведене су студије форсиране деградације са циљем развоја и валидације реверзно-фазне хроматографске методе за праћење стабилности ропинирола хидрохлорида у таблетама са модификованим ослобађањем. Испитан је утицај хидролизе, оксидације и фотолизе. Раздвајање је постигнуто на *Hypersil* С18 колони са мобилном фазом која се састојала од диамонијум хидроген ортофосфата (0,05 М; рН 7,2), тетраhydroфурана и метанола (80:15:5V/V/V). Проток мобилне

фазе био је 1 mL/min, температура колоне 30 °C, а таласна дужина детекције 250 nm [71].

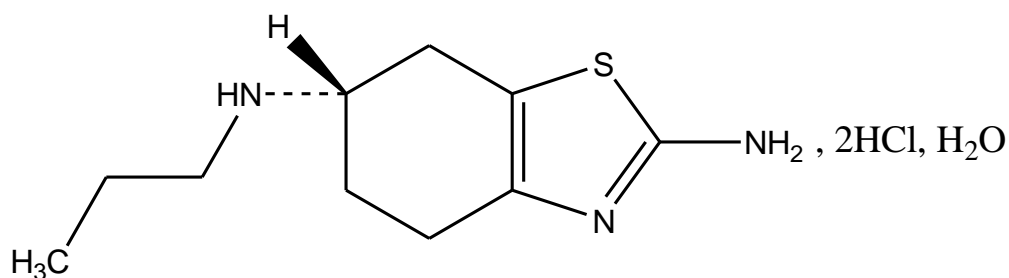
Раздвајање и квантификација ропинирола и пет његових нечистоћа постигнута је капиларном течном хроматографијом. Применом експерименталног дизајна, истовремено су оптимизована три параметра мобилне фазе: рН вредност, концентрација пуфера и садржај ацетонитрила. Коначно, раздвајање је постигнуто на C18 колони са мобилном фазом ацетонитрил–8,7 mM 2-(N-морфолино)етансулфонска киселина (рН 6,0) 55:45 V/V уз проток мобилне фазе 4 µL/min [72].

Развијене су и две методе течне хроматографије за квантификацију ропинирола и његових сродних супстанци у којима се као адитиви мобилне фазе користе класични јон-пар реагенси [73, 74]. Градијентном методом [73] раздвајање је постигнуто на колони *Hypersil BDS C8*, 250 mm×4,6 mm, величине честица 5 µm. Мобилна фаза А састојала се од смеше воденог раствора (0,01 M фосфорне киселине, 0,01 M натријум-1-хексансулфоната, рН 6,5) и ацетонитрила (85:15 V/V), и мобилне фазе В која се састојала од смеше воде и ацетонитрила (40:60 V/V). Проток мобилне фазе био је 1 mL/min, а таласна дужина детекције 215 nm.

Ретенционо понашање ропинирола и његове нечистоће С процењено је хеометријски. Применом FCCD испитан је утицај садржаја ацетонитрила, рН вредности мобилне фазе и концентрације натријум хептансулфоната у воденој фази. За оптимизацију методе коришћена је Дерингерова функција пожељних одговора и дефинисан је оптимални састав мобилне фазе: ацетонитрил–5 mM натријум хептансулфонат (21,6:78,4 V/V), рН вредност мобилне фазе подешена на 2,0 ортофосфорном киселином. Такође је спроведено и тестирање робусности предложене методе [74].

1.4.2 Прамипексол и нечистоће

Прамипексол дихидрохлорид монохидрат је официналан у Европској фармакопеји, 8. издање (Ph. Eur. 8) [75] и хемијски представља (6S)-6-N-пропил-4,5,6,7-тетрахидро-1,3-бензотиазол-2,6-диамин дихидрохлорид монохидрат. Његова структурна формула приказана је на слици 9.



Слика 9. Структурна формула прамипексол дихидрохлорид монохидрата

Молекулска формула: $C_{10}H_{19}Cl_2N_3S, H_2O$

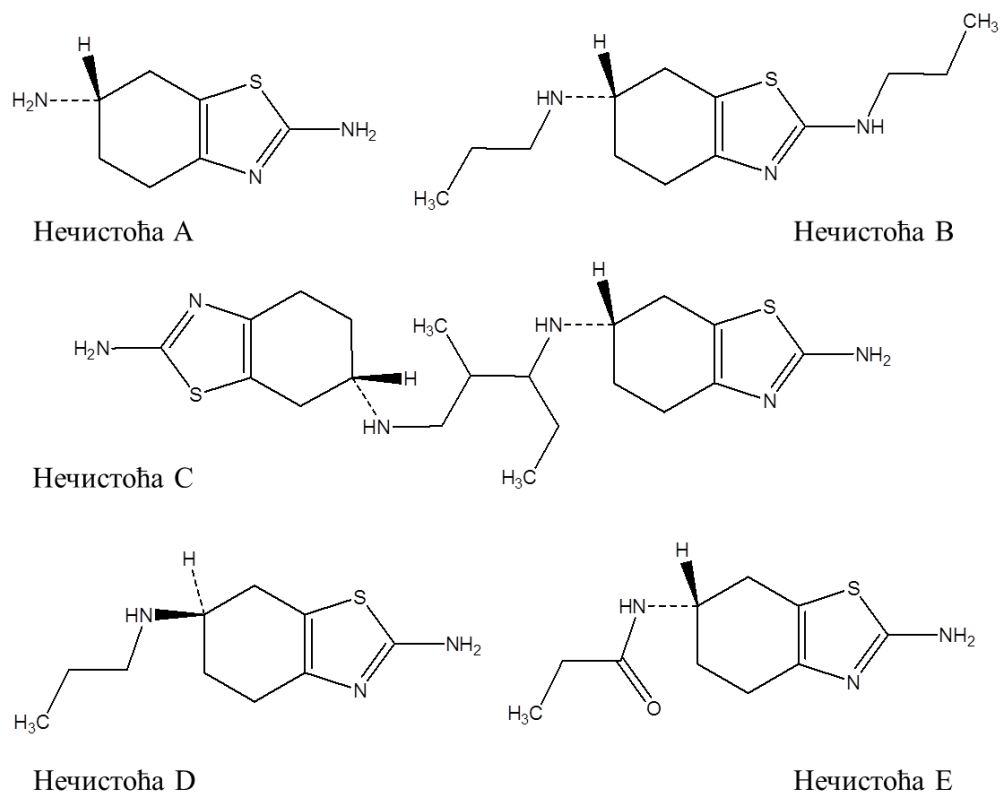
Молекулска маса: 302,3

У монографији прамипексола наведено је пет нечистоћа: А, В, С, D и Е. Њихове структуре су приказане на слици 10

За одређивање сродних супстанци Европска фармакопеја прописује методу течне хроматографије са градијентним елуирањем:

- Колона: C18, 125 mm×4,6 mm, величина честица 5 μm
- Температура колоне: 40 °C
- Мобилна фаза А: раствор пуфера (5 g натријум октансулфонат монохидрата и 9,1 g калијум дихидроген фосфата растворених у води до 1000 mL; pH 3,0 подешен фосфорном киселином)
- Мобилна фаза В: ацетонитрил–раствор пуфера (50:50 V/V)
- Проток мобилне фазе: 1,5 mL/min
- Таласна дужина детекције: 264 nm
- Програм градијента:

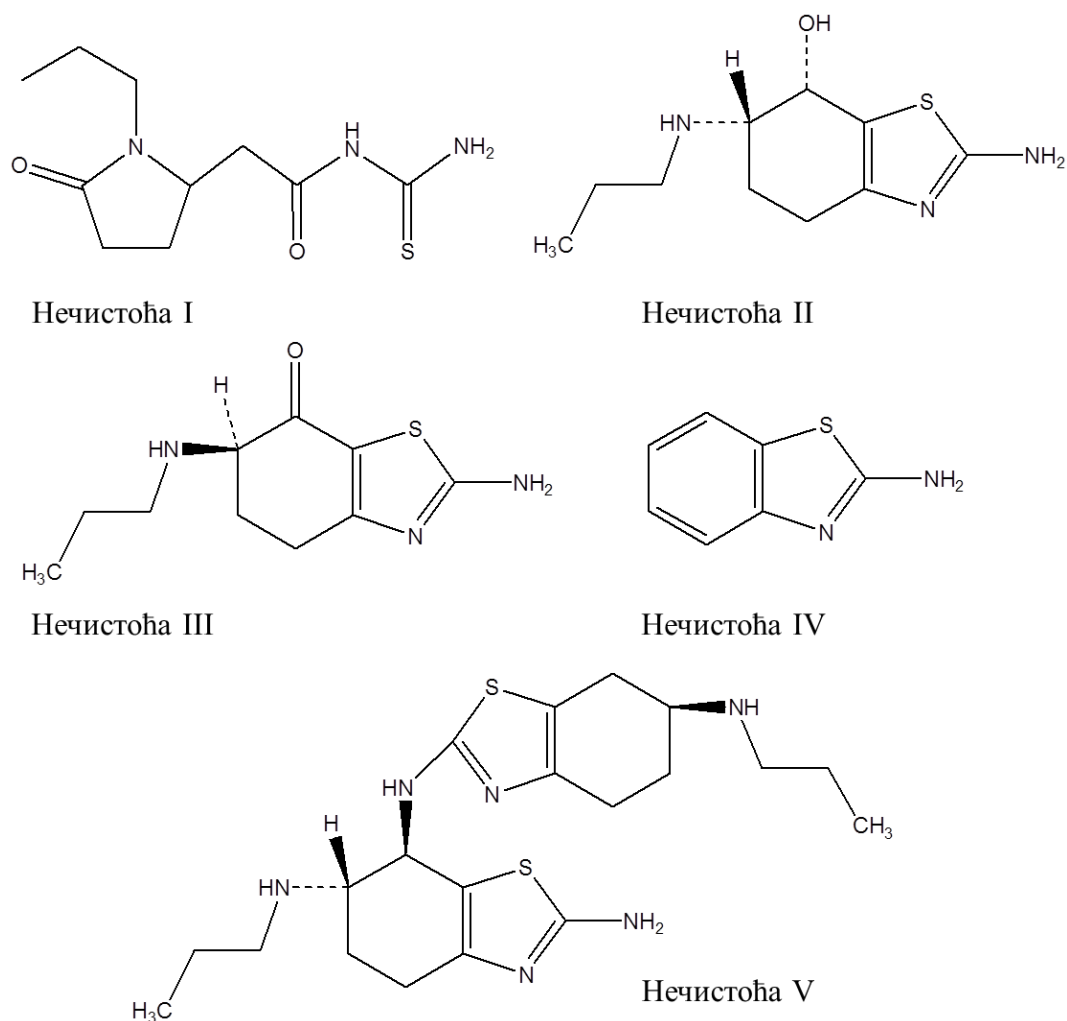
Време (min)	Мобилна фаза А (% V/V)	Мобилна фаза В (% V/V)
0–15	60→20	40→80



Слика 10. Хемијске структуре нечистоћа прамипексола дате у монографији Европске фармакопеје (Ph. Eur. 8):

- A. (6S)-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-2,6-диамин
- B. (6S)-N,N'-дипропил-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-2,6-диамин
- C. смеша диастереоизомера (6S)-6-N-[3-[[6S)-2-амино-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-6-ил]амино]-1-етил-2-метилпропил]-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-2,6-диамин
- D. (6R)-6-N-пропил-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-2,6-диамин
- E. N-[(6S)-2-амино-4,5,6,7-тетра hidro-1,3-бензотиазол-6-ил]пропанамид

Хемијске структуре нечистоћа испитиваних у овој дисертацији (поглавље 3.2.1) приказане су на слици 11.



Слика 11. Хемијске структуре нечистоћа прамипексола испитиваних у овој дисертацији:

- I. 1-(2-(5-оксо-1-пропилпиролидин-2-ил)ацетил)тиоуреа
- II. (6*S*,7*S*)-2-амино-4,5,6,7-тетрахидро-6-(пропиламино)бензо[*d*]тиазол-7-ол
- III. (*R*)-2-амино-5,6-дихидро-6-(пропиламино)бензо[*d*]тиазол-7(4*H*)-он
- IV. 2-аминобензотиазол
- V. (6*S*,7*R*)-4,5,6,7-тетрахидро-*N*⁷-((*S*)-4,5,6,7-тетрахидро-6-(пропиламино)бензо[*d*]тиазол-2-ил)-*N*⁶-пропилбензо[*d*]тиазол-2,6,7-триамин

Преглед литературе

Прамипексол и његове нечистоће досад су анализирани у различитим системима течне хроматографије.

Константе дисоцијације (pK_a) прамипексола и његових нечистоћа одређене су применом HPLC методе уз UV детекцију на 262 nm за прамипексол и нечистоће VI-II 751 хх и 2-аминобензотиазол, и на 326 nm за нечистоћу VI-II 546 CL. Анализа је вршена у широком опсегу рН вредности који је контролисан триетиламонијум фосфатним пуфером [76].

Применом експерименталног дизајна извршена је оптимизација и карактеризација хроматографског понашања прамипексола и његових нечистоћа и тако омогућено његово одређивање из фармацеутских облика. Раздвајање је постигнуто употребом C18 колоне на температури од 25 °C са мобилном фазом ацетонитрил–водена фаза 15:85 V/V (водена фаза: 1% триетиламина – ТЕА, рН подешен на 7,0 орто-фосфорном киселином). Проток мобилне фазе био је 1 mL/min, уз UV детекцију на 262 nm и 326 nm [77].

Извршена је валидација претходно оптимизоване методе [77] за HPLC анализу прамипексола и његових пет нечистоћа у складу за званичном регулативом [78]. Тестирање робусности изведено је применом Плакет-Бурмановог (енг. *Plackett-Burman*) дизајна, а фактори изабрани за тестирање робусности методе били су садржај ацетонитрила у мобилној фази, садржај ТЕА у воденој фази, рН вредност водене фазе, брзина протока мобилне фазе, температура колоне и тип колоне. Робусност је процењена графичким (парцијално-нормална расподела и Парето дијаграм) и статистичким (t -тест) методама. Дефинисани су лимити теста за проверу погодности система и изведени тестови за валидацију тј. процену линеарности, тачности, прецизности, а одређени су и лимити детекције и лимити квантификације за анализиране нечистоће.

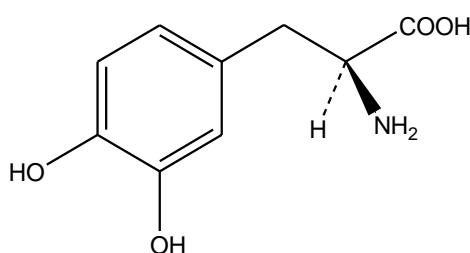
Хроматографско понашање прамипексола и његових пет нечистоћа испитано је у хроматографском систему са микроемулзионом мобилном фазом [79]. Циљ ове студије био је да се испита утицај састава мобилне фазе и својстава микроемулзионих капи, као и липофилности стационарне фазе на хроматографско

понашање прамипексола и његових пет нечистоћа. Истраживање је извршено према експерименталном плану дефинисаном пуним факторским дизајном 2^4 са четири репликације у централној тачки. Одабрани фактори били су садржај сурфактанта SDS/Brij[®]35, садржај бутилацетата, *n*-бутанола и ТЕА, а истраживања су спроведена на колонама *Hypersil GOLD C4*, *C8* и *C18* 4.6 mm×150 mm, величина честица 5 μ m.

Шмит и сарадници [80] описали су процену робусности адаптиране фармакопејске методе за анализу прамипексола и његових сродних супстанци пратећи QbD принципе. Применом пуног факторског дизајна *in silico* је испитано шест параметара: време трајања градијентног програма, температура колоне, рН вредност елуента А, брзина протока мобилне фазе, почетна и крајња концентрација органског растварача у мобилној фази (елуент В). Такође, за елуент А дефинисан је посебан *design space* који омогућава идентификовање оптималног односа концентрације пуфера и јон-пар реагенса.

1.4.3 Леводопа, карбидопа, ентакапон и нечистоће

Леводопа је официнална у Ph. Eur. 8 [75] и хемијски представља (2*S*)-2-амино-3-(3,4-дихидроксифенил)пропанску киселину. Њена структурна формула приказана је на слици 12.

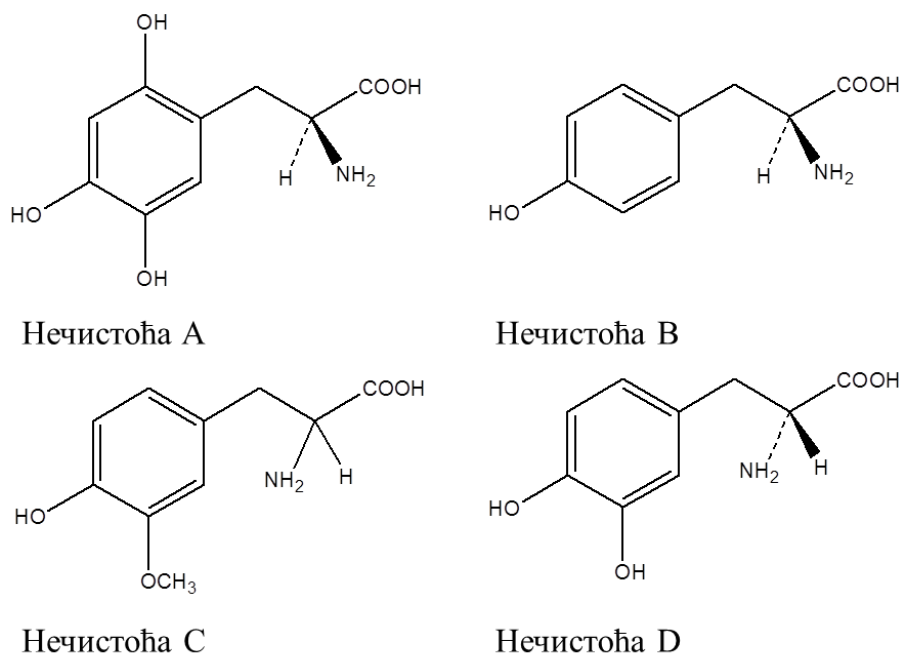


Слика 12. Структурна формула леводопе

Молекулска формула: $C_9H_{11}NO_4$

Молекулска маса: 197,2

У монографији леводопе наведене су четири нечистоће: А, В, С и Д. Њихове структуре су приказане на слици 13.



Слика 13. Хемијске структуре нечистоћа леводопе дате у Ph. Eur. 8:

- A. (2S)-2-амино-3-(2,4,5-трихидроксифенил)пропанска киселина
- B. (2S)-2-амино-3-(4-хидроксифенил)пропанска киселина (тирозин)
- C. (2RS)-2-амино-3-(4-хидрокси-3-метоксифенил)пропанска киселина (3-метокси-DL-тирозин)
- D. (2R)-2-амино-3-(3,4-дихидроксифенил)пропанска киселина (D-допа)

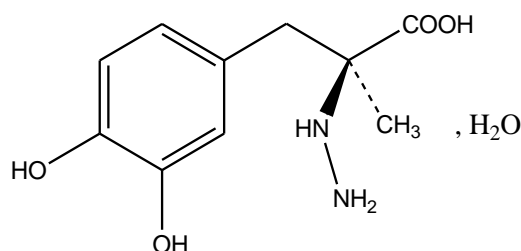
За профилисање сродних супстанци Европска фармакопеја прописује методу течне хроматографије са градијентним елуирањем:

- Колона: 250mm×4,6 mm, сферични ди-изобутилоктадецил силикагел са величином пора 8 nm
- Мобилна фаза А: 0,1 М фосфатни пуфер рН 3,0
- Мобилна фаза В: метанол–0,1 М фосфатни пуфер рН 3,0 (15:85V/V)
- Проток мобилне фазе: 1mL/min
- Таласна дужина детекције: 280 nm

- Програм градијента:

Време (min)	Мобилна фаза А (% V/V)	Мобилна фаза В (% V/V)
0–18	90	10
18–22	90→0	10→100
22–35	0	100

Карбидопа је официнална у Ph. Eur. 8 [75]. Њено хемијско име је (2*S*)-3-(3,4-дихидроксифенил)-2-хидразино-2-метилпропанска киселина монохидрат, а структурна формула је приказана на слици 14.



Слика 14. Структурна формула карбидопе

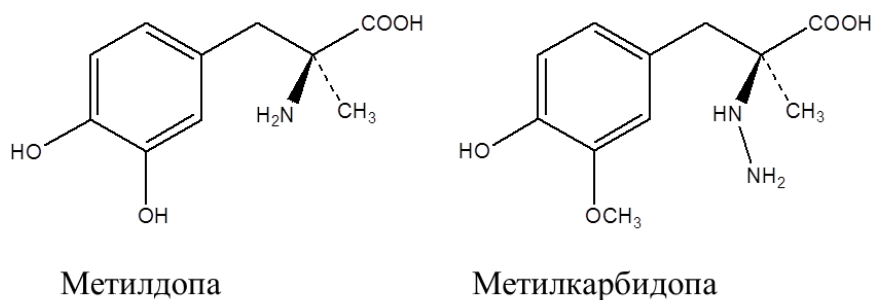
Молекулска формула: $C_{10}H_{14}N_2O_4 \cdot H_2O$

Молекулска маса: 244,2

У монографији карбидопе наведене су три нечистоће: хидразин, метилдопа и метилкарбидопа. Структуре метилдопе и метилкарбидопе приказане су на слици 15.

За анализу метилдопе и метилкарбидопе Европска фармакопеја прописује изократску методу течне хроматографије:

- Колона: C8, 250 mm×4,6 mm, величина честица 5 μ m
- Мобилна фаза: метанол–14 g/L раствор калијум дихидроген фосфата (2:98 V/V)
- Проток мобилне фазе: 1mL/min
- Таласна дужина детекције: 282 nm

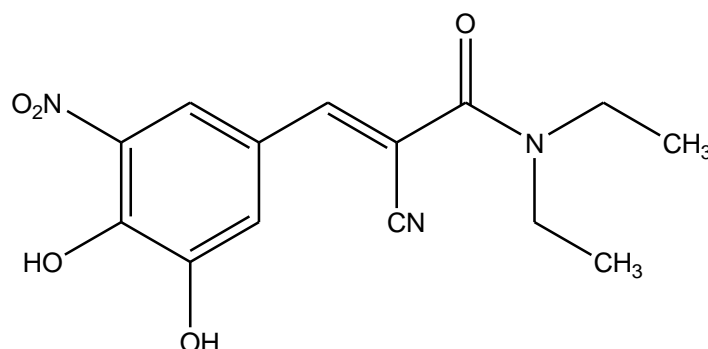


Слика 15. Хемијске структуре нечистоћа карбидопе:

Метилдопа: (2S)-2-амино-2-метил-3-(3,4-дихидроксифенил)пропанска киселина

Метилкарбидопа: (2S)-3-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-2-хидразино-2-метилпропанска киселина

Ентакапон је официналан у Ph. Eur. 8 [75] и хемијски представља (2E)-2-цијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)-N,N-диетилпроп-2-енамид. Његова структурна формула приказана је на слици 16.



Слика 16. Структурна формула ентакапона

Молекулска формула: $C_{14}H_{15}N_3O_5$

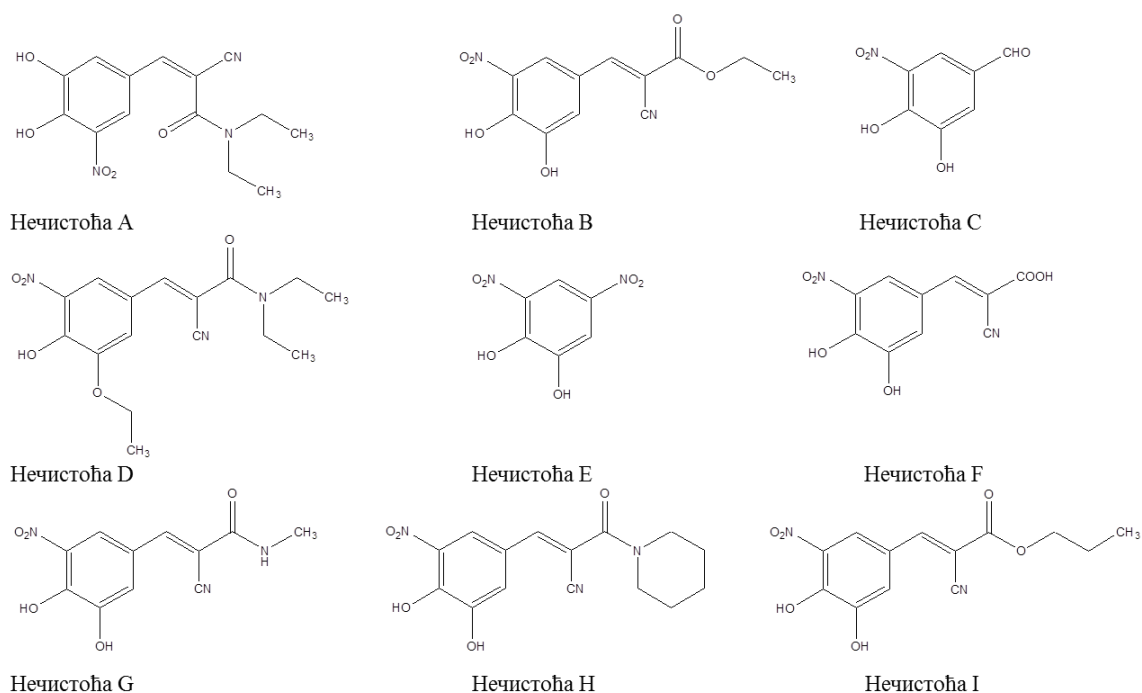
Молекулска маса: 305,3

У монографији ентакапона наведено је девет нечистоћа: А, В, С, D, Е, F, G, H и I. Њихове структуре приказане су на слици 17.

За одређивање сродних супстанци Европска фармакопеја прописује методу течне хроматографије са изократским елуирањем:

- Колона: *end-capped* пропил-2-фенилсилил аморфни органосиликатни полимер organosilica polymer, 250 mm×4,6 mm, величина честица 5 μm

- Мобилна фаза: тетраhydroфуран–метанол–2,34 g/L раствор нагријум дихидроген фосфата са претходно подешеним рН 2,1 фосфорном киселином (2:44:54 V/V/V)
- Проток мобилне фазе: 1 mL/min
- Таласна дужина детекције: 300 nm



Слика 17. Структурне формуле нечистоћа ентакапона дате у Ph. Eur. 8:

- A. (2Z)-2-цијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)-N,N-диетилпроп-2-енамид
- B. етил (2E)-2-дијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)проп-2-еноат
- C. 3,4-дихидрокси-5-нитробензалдеhid
- D. (2E)-2-цијано-3-(3-етокси-4-хидрокси-5-нитрофенил)-N,N-диетилпроп-2-енамид
- E. 3,5-динитробензен-1,2-диол
- F. (2E)-2-цијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)проп-2-енолна киселина
- G. (2E)-2-цијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)-N-метилпроп-2-енамид
- H. (2E)-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)-2-(пиперидин-1-илкарбонил)проп-2-еннитрил
- I. пропил (2E)-2-цијано-3-(3,4-дихидрокси-5-нитрофенил)проп-2-еноат

Преглед литературе

Претрагом литературе утврђено је да нема објављених резултата који предлажу методу за истовремену анализу леводопе, карбидопе и ентакапона са њиховим нечистоћама. С друге стране, доступно је неколико аналитичких метода за симултано одређивање само активних супстанци (леводопа, карбидопа и ентакапон).

Истовремено одређивање леводопе, карбидопе и ентакапона у фармацеутским дозираним облицима постигнуто је методом течне хромаграфије којој је тестирана специфичност, тачност, прецизност и линеарност [81].

Развијена је и валидирана метода високо-ефикасне танкослојне хромаграфије (енг. *high performance thin layer chromatography* – RP-HPTLC) за истовремено одређивање леводопе, карбидопе и ентакапона у комбинованом дозираним облику. Раздвајање је постигнуто на плочи за танкослојну хромаграфију са силикагелом 60 RP-18 F254 уз мобилну фазу која се састојала од ацетонитрила, *n*-бутанола, воде и триетиламина (0,5:9,5:1:0,001 V/V/V/V), рН 3,6 подешена *o*-фосфорном киселином. Дензитометријско мерење је изведено на 282 nm [82].

Развијена је и примењена метода течне хромаграфије за процену *in vitro* ослобађања леводопе, карбидопе и ентакапона из три различите комбиноване формулације које се разликују по јачини. Валидација методе извршена је тестирањем специфичности, линеарност, тачности, прецизности и стабилности раствора [83].

Применом методе течне хромаграфије са електрохемијском детекцијом омогућено је одређивање леводопе, карбидопе, 3-О-метилдопе и ентакапона у хуманој плазми. Симултана анализа леводопе, 3-О-метилдопе и карбидопе постигнута је на C18 колони уз мобилну фазу коју чини смеша метанола и фосфатног пуфера рН 2,88 (8:92 V/V). За анализу ентакапона коришћена је C8 колона и мобилна фаза коју чини смеша метанола, ацетонитрила и фосфатног пуфера рН 1,90 (17,5:22,5:60 V/V/V). Обе методе су валидиране и примењене на узорцима плазме пацијената који су на терапији овим лековима [84].

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви ове докторске дисертације били су:

1. Карактеризација ретенционог понашања једињења базног карактера на примеру ропинирола и његових нечистоћа у хроматографском систему модификованом додатком хаотропних агенаса; Дефинисање термодинамичких модела и процена доприноса развијања електричног двослоја и феномена јонског спаривања механизму ретенције; Испитивање утицаја хаотропних агенаса и других фактора који дефинишу хроматографски систем применом централног композиционог дизајна; Оптимизација хроматографског раздвајања претраживањем чворова мреже испитиваног експерименталног простора и валидација методе развијене за анализу ропинирола и његових нечистоћа у таблетама.
2. Испитивање интеракција хаотропних адитива различитог положаја у Хофмајстеровој серији са стационарним фазама различите хидрофобности и њиховог истовременог утицаја на ретенционо понашање базних једињења чије се R_K вредности знатно разликују, на примеру прамипексола и његових нечистоћа; Разматрање механизма раздвајања ове смеше применом проширеног термодинамичког модела; Идентификација и интерпретација молекулских дескриптора који пружају увид о утицају структурних карактеристика анализата на њихово ретенционо понашање у хроматографском систему са хаотропним агенсима; Развој методе течне хроматографије са хаотропним агенсима према *QbD* принципима применом *D*-оптималног дизајна и дефинисање *design space*-а поређењем два приступа за процену несигурности модела; Валидација методе развијене за анализу прамипексола и његових нечистоћа у таблетама.
3. Анализа утицаја хаотропних агенаса на раздвајање једињења различитих кисело-базних особина на примеру смеше леводопе, карбидопе, ентакапона и њихових нечистоћа; Оптимизација програма градијента применом Бокс-Бенкеновог експерименталног дизајна и Дерингерове функције пожељних одговора; Валидација методе развијене за анализу леводопе, карбидопе, ентакапона и њихових нечистоћа у таблетама.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 АПАРАТУРА, РЕАГЕНСИ И МАТЕМАТИЧКО-СОФТВЕРСКИ СИСТЕМИ

Апаратура

- **Хроматограф:** *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific, САД*
Кватернерна пумпа: *Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo Electron Corporation*
Аутосамплер: *Finnigan Surveyor Autosampler Plus, Thermo Electron Corporation*
Детектор: *Finnigan Surveyor UV/VIS Plus Detector, Thermo Scientific*
Интегратор: *Chrom Quest 4.2.34, Thermo Scientific*
- **Хроматограф:** *Waters 2695 Separations Module, Waters, САД*
Детектор: *Waters 2465 Electrochemical Detector, Waters, САД*
Интегратор: *Empower 2, Waters, САД*
- **Систем за филтрирање:** *Whatman 47 mm Glass/mesh* мембрански носач и мембрански филтри 0,45 µm, *Whatman International Ltd., Енглеска*
- **Аналитичка вага:** *Sartorius, Sartorius Werke GmbH, Немачка*
- **рН-метар** са комбинованом рН електродом, *Dolmen, Немачка*
- **Ултразвучно купатило:** *Fungilab, Шпанија*
- **Систем за добијање воде HPLC квалитета:** *Simplicity 185, Millipore, Немачка*

Реагенси

Сви коришћени реагенси су аналитичког степена чистоће:

- Ацетонитрил (ACN), *Fluka, Немачка*
- Метанол (MeOH), *Fluka, Немачка*

- Натријум трифлуороацетат (CF_3COONa), *Aldrich*, САД
- Натријум перхлорат монохидрат (NaClO_4), *Fluka*, Француска
- Натријум хексафлуорофосфат (NaPF_6), *Aldrich*, САД
- Калијум дихидрогенфосфат, *Merck*, Немачка
- Орто-фосфорна киселина, *J. T. Baker*, Холандија
- Трифлуоросирћетна киселина (CF_3COOH), *Riedel-de Haën AG*, Немачка
- Перхлорна киселина (HClO_4), *Riedel-de Haën AG*, Немачка
- Хлороводонична киселина (HCl), *Zorka Pharma*, Србија
- Пара-толуенсулфонска киселина, *Arcos Organics*, Белгија
- Натријум хидроксид (NaOH), *J. T. Baker*, Холандија
- Вода HPLC квалитета

Математичко софтверски системи

- STATISTICA, StatSoftInc, САД: дефинисање адсорпционих изотерми, израчунавање параметара термодинамичких модела
- Design-Expert[®] 7.0.0., Stat-EaseInc., САД: дефинисање плана експеримената, анализа и обрада података, израчунавања из функције пожељних одговора (енг. *desirability function*)
- MATLAB[®] 7.10.0., The MathWorks, Inc., САД: дефинисање адсорпционих изотерми за одређивање укупне површине стационарних фаза, оптимизација хроматографских услова методом претраге мреже, индиректно моделовање хроматографских одговора, Монте Карло симулације, графичке презентације простора дизајна (енг. *design space*)

- Microsoft Excel, Microsoft, САД: обрада података
- ADMET Predictor™ 5.5, Simulations Plus, Inc. 2011, САД: израчунавање logP и logD вредности анализираних супстанци
- CODESSA, version 2.20., САД [85]: израчунавање молекулских дескриптора и анализа утицаја структурних карактеристика анализираних супстанци на њихово ретенционо понашање
- RDKit: Open source chemoinformatics, Release 2014.09.2 [86]: припрема молекулских модела, генерисање конформера и молекуларно механичка оптимизација структура
- MOPAC 7. [87]: семи-емпиријска оптимизација молекулских структура
- MarvinSketch [88]: израчунавање logP и logD вредности анализираних супстанци

3.2 СТАНДАРДНЕ СУПСТАНЦЕ И ФАРМАЦЕУТСКИ ДОЗИРАНИ ОБЛИЦИ

3.2.1 Стандардне супстанце

- Ропинирол, *LGC GmbH*, Немачка
- Нечистоће ропиринола: нечистоћа А, нечистоћа С, *LGC GmbH*, Немачка; максимална дозвољена концентрација 0,5%
- Прамипексол, *Boehringer Ingelheim Pharma*, Немачка
- Нечистоће прамипексола: VI-II 751 хх – нечистоћа I, VI-II 820 BS – нечистоћа II, VI-II 546 CL – нечистоћа III, 2-аминобензотиазол – нечистоћа IV и VI-II 786 BS – нечистоћа V, *Boehringer Ingelheim Pharma*, Немачка; максимална дозвољена концентрација 0,4%
- Леводопа (LD), *LGC GmbH*, Немачка

- Нечистоће леводопе: нечистоћа В (LD_B), нечистоћа С (LD_C), *LGC GmbH*, Немачка; максимална дозвољена концентрација 0,2%
- Карбидопа (CBD), *LGC GmbH*, Немачка
- Нечистоће карбидопе: метилдопа (MD), 3-О-метилкарбидопа (3-ОМС), *LGC GmbH*, Немачка; максимална дозвољена концентрација 0,5%
- Ентакапон (EN), *LGC GmbH*, Немачка
- Нечистоће ентакапона: нечистоћа А (EN_A), нечистоћа С (EN_C), *LGC GmbH*, Немачка; максимална дозвољена концентрација 0,15%

3.2.2 Фармацеутски дозирани облици

- *Requip*[™] таблете (једна таблета садржи 5 mg ропинирол хидрохлорида), *Glaxo Smith Kline*, Велика Британија
- *Mirapexin*[®] tablete (једна таблета садржи 1 mg прамипексол дихидрохлорид монохидрата, односно 0,7 mg прамипексол базе), *Beohringer Ingleheim*, Немачка
- *Stalevo*[®] филм таблете (једна таблета садржи 150 mg леводопе, 37,5 mg карбидопе и 200 mg ентакапона), *Orion Corporation*, Финска

3.3 ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СОЛИ СА ХАОТРОПНИМ ОСОБИНАМА НА РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ РОПИНИРОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА

3.3.1 Припрема раствора за термодинамичко моделовање ретенционог понашања и оптимизацију методе

У растварачу ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) растварањем одговарајућих количина стандардних супстанци припремљени су основни раствори концентрације:

- 500 µg/mL за ропинирол
- 100 µg/mL за нечистоће А и С

Основни раствори су даље разблажени како би се добила смеша следећих концентрација:

- 50 µg/mL за ропинирол
- 1 µg/mL за нечистоће.

Ова смеша је коришћена за прикупљање експерименталних хроматографских података потребних за термодинамичко моделовање ретенционог понашања анализираних супстанци и за оптимизацију методе.

3.3.2 Припрема раствора за валидацију методе

Припрема раствора за процену селективности

Смеша ексципијенаса (плацебо) и одговарајућих количина стандарда испитиваних супстанци, тзв. лабораторијска смеша, припремљена је у односу концентрација који одговара садржају у таблетама и пренета у одмерни суд од 50 mL. На ултразвучном купатилу екстрахована је смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) у трајању од 30 min. Одмерни суд је растварачем допуњен до ознаке и раствор је затим профилиран. Од овог раствора припремљено је

разблажење које садржи 200 µg/mL ропинирола и 1 µg/mL сваке нечистоће и тај раствор је коришћен за потврду селективности методе.

Припрема раствора за одређивање лимита детекције и лимита квантификације

Од одговарајућих стандардних супстаци нечистоћа А и С припремљена су разблажења раствора у концентрацијама које након хроматографске анализе дају површине пикова 3 пута веће од површине шума базне линије за лимит детекције (LOD), односно 10 пута веће за лимит квантификације (LOQ).

Припрема раствора за процену линеарности

За конструисање калибрационе криве, од одговарајућих стандардних раствора припремљено је шест раствора који садрже ропинирол (100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL и 350 µg/mL) и седам раствора који садрже нечистоће А и С (0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,0 µg/mL и 1,2 µg/mL).

Припрема раствора за процену тачности

Лабораторијска смеша која садржи плацебо и ропинирол, као и лабораторијска смеша која садржи плацебо и нечистоће припремљене су у смеси растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) и екстраховане у ултразвучном купатилу у трајању од 30 min. Припремљене су три серије разблажења раствора лабораторијске смеше са ропиниролом у концентрацијама 160 µg/mL (80%), 200 µg/mL (100%) и 240 µg/mL (120%), и три серије разблажења раствора лабораторијске смеше са нечистоћама у концентрацијама 0,1 µg/mL (одговара лимиту квантификације – LOQ), 1 µg/mL (100%) и 1,2 µg/mL (120% максималне дозвољене концентрације). За сваку серију припремљена су по три раствора за хроматографску анализу, а затим су израчунати одговарајући статистички параметри.

Припрема раствора за процену прецизности

Одмерена је количина таблетне масе (поглавље 3.2.2) која садржи 25 mg ропинирола, пренета у одмерни суд од 50 mL и на ултразвучном купатилу екстрахована смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) у трајању од 30 min. Одмерни суд је растварачем допуњен до ознаке и раствор затим профильтриран. Од овог раствора припремљено је шест разблажења концентрације 200 µg/mL ропиринола. Како су присутне нечистоће биле испод лимита квантификације, прецизност одређивања нечистоћа је процењена на основу резултата поновљених испитивања раствора лабораторијске смеше са нечистоћама припремљених за тестирање тачности.

3.3.3 Хроматографски услови

Хроматограф: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Колона: *XBridge*[®] C18, 150 mm×3 mm, величина честица 3,5 µm, *Waters*, Ирска

Укупна површина стационарне фазе је 99,1 m², а комплетне информације о својствима колоне дате су у референци [89].

Запремина инјекционе петље: 25 µL

Инјекциони волумен: 5 µL

Температура колоне: 30 °C

Проток мобилне фазе: 0,7 mL/min

Таласна дужина детекције за извођење фронталне анализе: 215 nm и 250 nm

Таласна дужина детекције за дефинисање термодинамичких модела и оптимизацију методе: 250 nm

Мобилна фаза за извођење фронталне анализе:

A: ацетонитрил–водена фаза (100 mM CF₃COONa или NaClO₄, pH 2,5 подешена *орто*-фосфорном киселином) 15:85 (*V/V*)

В: ацетонитрил–вода (рН 2,5 подешена *орто*-фосфорном киселином) 15:85 (V/V)

Мобилна фаза за дефинисање термодинамичких модела: ацетонитрил–водена фаза 15:85 (V/V)

водена фаза: 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM CF₃COONa или NaClO₄

рН вредност водене фазе: 2,5 (подешена *орто*-фосфорном киселином)

Мобилна фаза за оптимизацију методе: услови су дефинисани применом FCCD експерименталног дизајна (табела 3).

Табела 3. План експеримента дефинисан FCCD експерименталним дизајном

№	CF ₃ COONa (mM)	ACN (%)	рН водене фазе
1	10	10	2,0
2	50	10	2,0
3	10	20	2,0
4	50	20	2,0
5	10	10	3,0
6	50	10	3,0
7	10	20	3,0
8	50	20	3,0
9	10	15	2,5
10	50	15	2,5
11	30	10	2,5
12	30	20	2,5
13	30	15	2,0
14	30	15	3,0
15	30	15	2,5
16	30	15	2,5
17	30	15	2,5
18	30	15	2,5

Фронтална анализа

За дефинисање адсорпционих изотерми хаотропних агенаса, експериментално су добијени фронтални хроматограми користећи градијентни систем са две пумпе. Програм градијента приказан је у табели 4.

Табела 4. Програм градијента за извођење фронталне анализе

t (min)	Мобилна фаза А (%)	Мобилна фаза В (%)
0,01–20,00	0	100
20,01–40,00	10	90
40,01–60,00	20	80
60,01–80,00	30	70
80,01–100,00	40	60
100,01–120,00	50	50
120,01–140,00	60	40
140,01–160,00	70	30
160,01–180,00	80	20
180,01–200,00	90	10
200,01–220,00	100	0

Ретенциона времена пробојних кривих коригована су за време кашњења услед мртве запремине система. Концентрације хаотропног агенса на стационарној фази израчунате су према једначини (35), а затим су конструисане адсорпционе изотерме.

3.4 ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ХАОТРОПНОСТИ СОЛИ, ХИДРОФОБНОСТИ КОЛОНЕ И МОЛЕКУЛСКИХ СВОЈСТАВА ПРАМИПЕКСОЛА И НЕЧИСТОЋА НА ЊИХОВО РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ

3.4.1 Одређивање површине стационарних фаза

Хроматограф: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Колоне: *XTerra*[®] C8 и C18, 150 mm ×4,6 mm, 5 μm, *Waters*, Ирска

Температура колоне: 25 °C

Проток мобилне фазе: 1 mL/min

Таласна дужина детекције: 235 nm

Мобилна фаза за извођење фронталне анализе:

A: метанол–1 mM *para*-толуенсулфонат у фосфатном пуферу (pH 3,0; I=100 mM) 5:95 (V/V)

B: метанол–фосфатни пуфер (pH 3,0; I=100 mM) 5:95 (V/V)

За одређивање укупне површине стационарне фазе *XTerra*[®] C8 и C18 колоне примењена је фронтална анализа изведена градијентним системом са две пумпе. Програм градијента приказан је у табели 5. Количина *para*-толуенсулфата адсорбована на стационарну фазу *LH* (μmol) израчуната је из пробојних времена коригованих за време кашњења услед мртве запремине система:

$$LH = v \cdot (t_r - t_0) \cdot [H] \quad (45)$$

где је v проток мобилне фазе, t_r пробојно време умањено за време кашњења услед мртве запремине система, t_0 ретенционо време пика мобилне фазе и $[H]$ концентрација *para*-толуенсулфоната у елуенту (mM). На основу вредности $[H]$ и LH конструисане су одговарајуће изотерме, а из једначине изотерме израчуната је површина стационарне фазе доступна за хроматографску анализу.

Табела 5. Програм градијента за извођење фронталне анализе за одређивање површине стационарних фаза

t (min)	Мобилна фаза А (%)	Мобилна фаза В (%)
0,01–20,00	0	100
20,01–40,00	5	95
40,01–60,00	10	90
60,01–80,00	20	80
80,01–100,00	40	60
100,01–120,00	60	40
120,01–140,00	80	20
140,01–160,00	100	0

3.4.2 Одређивање адсорпционих изотерми хаотропних соли

Хроматограф: *Waters 2695 Separations Module*

Детектор: *Waters 2465 Electrochemical Detector*

Колоне: *XTerra[®] C8 и C18, 150 mm ×4,6 mm, 5 μm, Waters, Ирска*

Температура колоне: 25 °C

Проток мобилне фазе: 1 mL/min

Мобилна фаза за извођење фронталне анализе:

А: ацетонитрил–водена фаза (100 mM CF₃COONa, NaClO₄ или NaPF₆, pH 2,5 подешена хлороводоничном киселином) 10:90 (V/V)

В: ацетонитрил–вода (pH 2,5 подешена хлороводоничном киселином) 10:90 (V/V)

За дефинисање адсорпционих изотерми хаотропних соли изведена је фронтална анализа користећи градијентни систем са две пумпе. Програм градијента приказан је у табели 6.

Табела 6. Програм градијента за извођење фронталне анализе за дефинисање адсорпционих изотерми хаотропних соли

t (min)	Мобилна фаза А (%)	Мобилна фаза В (%)
0,01–20,00	0	100
20,01–40,00	5	95
40,01–60,00	10	90
60,01–80,00	25	75
80,01–100,00	50	50
100,01–120,00	75	25
120,01–140,00	100	0

Ретенциона времена пробојних кривих коригована су за време кашњења услед мртве запремине система. Концентрација хаотропне соли на стационарној фази израчуната је према једначини (35), а затим су конструисане адсорпционе изотерме.

3.4.3 Хроматографски услови за профилисање анализата – дефинисање термодинамичких модела и анализа односа структуре молекула и хроматографског понашања

Хроматограф: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Колоне: *XTerra*[®] C8 и C18, 150 mm ×4.6 mm, 5 μm, *Waters*, Ирска

Запремина инјекционе петље: 25 μL

Инјекциони волумен: 5 μL

Температура колоне: 25 °C

Проток мобилне фазе: 1 mL/min

Таласна дужина детекције: 262 nm за прамипексол и нечистоће I, II, IV и V
326 nm за нечистоћу III

Мобилна фаза: ацетонитрил–водена фаза 10:90 (V/V)

водена фаза: 5 mM, 10 mM, 15mM, 25mM, 50 mM, 80mM, 100 mM
CF₃COONa или NaClO₄, или 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM,
50 mM, 80 mM NaPF₆

pH вредност водене фазе: 2,5 (подешена хлороводоничном киселином)

Припрема раствора

У растварачу ацетонитрил–вода (50:50, V/V), растварањем одговарајућих количина стандардних супстанци, припремљени су основни раствори концентрације:

- 500 µg/mL за прамипексол
- 100 µg/mL за нечистоће I, II, III, IV и V

Основни раствори су даље разблажени како би се добила смеша следећих концентрација:

- 50 µg/mL за прамипексол
- 1 µg/mL за нечистоће I, II, III, IV и V

Ова смеша је коришћена за прикупљање експерименталних хроматографских података потребних за термодинамичко моделовање ретенционог понашања анализираних супстанци и анализу утицаја структуре молекула на хроматографско понашање.

3.4.4 *In silico* анализа структурних карактеристика молекула који утичу на њихово хроматографско понашање

Анализа структурних карактеристика анализата које утичу на њихово ретенционо понашање спроведена је у програму CODESSA [85]. За свако једињење у протонованом облику генерисано је 300 случајних конформера чија геометрија задовољава ограничења међуатомске удаљености, алгоритмом имплементираним у RDKit библиотекама [86]. Геометрија сваког конформера итеративно је оптимизирана до конвергенције енергије у MMFF94s пољу сила. Конформер са најнижом енергијом је затим оптимизиран применом MOPAC 7.0 [87], AM1 семи-емпиријском методом, и коришћен за израчунавање преко 400 молекуларних дескриптора у програму CODESSA. Почетни број дескриптора смањен је уклањањем међусобно високо корелираних дескриптора ($R > 0,9$), дескриптора са ниском вредношћу варијансе ($< 5\%$), као и дескриптора за које недостају вредности. Статистички најзначајни дескриптори идентификовани су линеарном регресијом у програму CODESSA.

3.5 ХАОТРОПНЕ СОЛИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРАМИПЕКСОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА ПРАТЕЋИ *QUALITY-BY-DESIGN* ПРИНЦИПЕ

3.5.1 Хроматографски услови

Хроматограф: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Колоне: *XTerra*[®] C8 и C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm, *Waters*, Ирска

Запремина инјекционе петље: 25 μL

Инјекциони волумен: 5 μL

Проток мобилне фазе: 1 mL/min

Таласна дужина детекције: 262 nm за прамипексол и нечистоће I, II, IV и V
326 nm за нечистоћу III

Мобилна фаза: ацетонитрил–водена фаза

Састав мобилне фазе (удео ацетонитрила (%), концентрација [*H*] и тип хаотропне соли), избор колоне и температура колоне модификовани су према плану дефинисаном *D*-оптималним експерименталним дизајном. План експеримента приказан је у табели 7.

3.5.2 Припрема раствора за дефинисање *design space*-а

У растварачу ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) растварањем одговарајућих количина стандардних супстанци припремљени су основни раствори концентрације:

- 500 μg/mL за прамипексол
- 100 μg/mL за нечистоће I, II, III, IV и V

Основни раствори су даље разблажени како би се добила смеша следећих концентрација:

- 50 $\mu\text{g/mL}$ за прамипексол
- 1 $\mu\text{g/mL}$ за нечистоће I, II, III, IV и V

3.5.3 Припрема раствора за валидацију методе

Припрема раствора за процену селективности методе

Смеша ексципијенаса (плацебо) и одговарајућих количина стандарда испитиваних супстанци припремљена је у односу концентрација који одговара садржају у таблетама и пренета у одмерни суд од 50 mL. На ултразвучном купатилу екстрахована је смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) у трајању од 30 min. Одмерни суд је растварачем допуњен до ознаке и раствор је затим профилиран. Од овог раствора припремљено је разблажење које садржи 200 $\mu\text{g/mL}$ прамипексола и 0,8 $\mu\text{g/mL}$ сваке нечистоће и тај раствор је коришћен за процену селективности методе.

Припрема раствора за одређивање лимита детекције и лимита квантификације

Од одговарајућих стандардних супстанци свих нечистоћа прамипексола припремљена су разблажења раствора у концентрацијама које након хроматографске анализе дају површине пикова 3 пута веће од површине шума базне линије за лимит детекције (LOD), односно 10 пута веће за лимит квантификације (LOQ).

Припрема раствора за процену линеарности методе

За конструисање калибрационих кривих, од одговарајућих стандардних раствора припремљено је седам раствора који садрже прамипексол (30 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ и 300 $\mu\text{g/mL}$) и седам

раствора који садрже све нечистоће (0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,8 µg/mL и 1 µg/mL).

Припрема раствора за процену тачности методе

Лабораторијска смеша која садржи *плацебо* и прамипексол, као и лабораторијска смеша која садржи *плацебо* и нечистоће, припремљене су у смеси растварача ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) и екстраховане у ултразвучном купатилу 30 min. За процену тачности методе за одређивање прамипексола припремљене су три серије разблажења концентрације 160 µg/mL (80%), 200 µg/mL (100%) и 240 µg/mL (120%). За процену тачности методе за одређивање нечистоћа, припремљене су три серије раствора у концентрацијама 0,1 µg/mL (LOQ), 0,8 µg/mL (100%) и 0,96 µg/mL (120% максималне дозвољене концентрације). За сваку серију разблажења припремљена су по три раствора раствора за хроматографску анализу, а затим су израчунати одговарајући статистички параметри.

Припрема раствора за процену прецизности

Одмерена је количина таблетне масе (поглавље 3.2.2) која садржи 25 mg прамипексола, пренета у одмерни суд од 50 mL и екстрахована смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, *V/V*) у ултразвучном купатилу у периоду од 30 min. Одмерни суд је допуњен до ознаке истим растварачем, а раствор је потом профилтриран. Од основног раствора припремљено је шест разблажења која садрже 200 µg/mL прамипексола. Како су присутне нечистоће биле испод лимита квантификације, прецизност је процењена на основу резултата поновљених испитивања раствора лабораторијске смеше са нечистоћама припремљених за тестирање тачности.

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

№	A [H] (mM)	B ACN (%)	C T (°C)	D колона	E тип соли
1	53,00	13,63	34,01	C8	CF ₃ COONa
2	50,00	13,79	33,25	C18	CF ₃ COONa
3	58,47	10,74	29,76	C8	NaClO ₄
4	38,97	8,91	27,64	C18	NaClO ₄
5	48,86	11,20	34,55	C8	CF ₃ COONa
6	57,82	9,19	25,79	C18	CF ₃ COONa
7	49,45	11,49	38,82	C8	NaClO ₄
8	53,86	10,79	34,3	C18	NaClO ₄
9	37,92	12,78	38,61	C8	CF ₃ COONa
10	55,18	7,96	23,84	C18	CF ₃ COONa
11	50,62	9,04	26,25	C8	NaClO ₄
12	52,14	10,35	37,77	C18	NaClO ₄
13	41,27	12,39	28,92	C8	CF ₃ COONa
14	43,86	9,88	30,01	C18	CF ₃ COONa
15	56,55	5,00	28,27	C8	NaClO ₄
16	44,31	8,42	28,45	C18	NaClO ₄
17	41,74	8,40	22,09	C8	CF ₃ COONa
18	44,21	9,04	26,53	C18	CF ₃ COONa
19	41,81	9,61	31,23	C8	NaClO ₄
20	65,00	5,47	40,00	C8	CF ₃ COONa
21	35,00	5,00	40,00	C18	CF ₃ COONa
22	35,00	15,00	20,00	C8	NaClO ₄
23	65,00	15,00	20,00	C18	NaClO ₄
24	65,00	13,45	21,59	C8	CF ₃ COONa
25	65,00	15,00	20,00	C18	NaClO ₄
26	35,00	5,00	40,00	C18	CF ₃ COONa
27	35,00	15,00	20,00	C8	NaClO ₄
28	56,55	5,00	28,27	C8	NaClO ₄
29	50,00	13,79	33,25	C18	CF ₃ COONa

(Прилагођено из: А. Вемић, Т. Ракић, А. Маленовић, М. Меденица, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

3.6 ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ИСТОВРЕМЕНУ АНАЛИЗУ ЛЕВОДОПЕ, КАРБИДОПЕ, ЕНТАКАПОНА И ЊИХОВИХ НЕЧИСТОЋА

3.6.1 Хроматографски услови

Хроматограф: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Колона: *Zorbax Extend C18*, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm, *Agilent*, САД

Запремина инјекционе петље: 25 μL

Инјекциони волумен: 10 μL

Проток мобилне фазе: 1 mL/min

Температура колоне: 30 °C

Таласна дужина детекције: 280 nm

Мобилна фаза: метанол–водена фаза

водена фаза: 20 mM TFA

pH вредност водене фазе: 2,0 (подешена 10 M натријум хидроксидом)

Удео органске и водене фазе је мењан према програму градијента. Почетна вредност удела метанола била је 5%, а укупно жељено трајање градијентне анализе ограничено је на 25 min. Остали параметри двосегментног градијентног програма испитивани су према плану дефинисаном Бокс-Бенкеновим експерименталним дизајном (табела 8).

Табела 8. План експеримената за оптимизацију градијента дефинисан Бокс-Бенкеновим дизајном у стварним и кодираним вредностима фактора

№	Фактор x_1	Фактор x_2	Фактор x_3
	t_m (min)	φ_m (%)	φ_e (%)
1	5,0 (-1)	12 (-1)	75 (0)
2	10,0 (+1)	12 (-1)	75 (0)
3	5,0 (-1)	18 (+1)	75 (0)
4	10,0 (+1)	18 (+1)	75 (0)
5	5,0 (-1)	15 (0)	70 (-1)
6	10,0 (+1)	15 (0)	70 (-1)
7	5,0 (-1)	15 (0)	80 (+1)
8	10,0 (+1)	15 (0)	80 (+1)
9	7,5 (0)	12 (-1)	70 (-1)
10	7,5 (0)	18 (+1)	70 (-1)
11	7,5 (0)	12 (-1)	80 (+1)
12	7,5 (0)	18 (+1)	80 (+1)
13	7,5 (0)	15 (0)	75 (0)
14	7,5 (0)	15 (0)	75 (0)
15	7,5 (0)	15 (0)	75 (0)

t_m (min) – време на крају првог сегмента; φ_m (%) – проценат метанола на крају првог сегмента;
 φ_e (%) – проценат метанола на крају другог сегмента

(Из: А. Вемић, В. Јанчић Стојановић, И. Стаменковић, А. Маленовић, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

3.6.2 Припрема раствора за оптимизацију методе

У растварачу ацетонитрил–вода (50:50, V/V) растварањем одговарајућих количина стандардних супстанци припремљени су основни раствори концентрације:

- 500 µg/mL за леводопу, карбидопу и ентакапон
- 100 µg/mL за нечистоће LD_B, LD_C, MD, 3-ОМС, EN_A, EN_C

Основни раствори су даље разблажени 0,1 М хлороводоничном киселином као што је предложено у Ph. Eur. 7 [90], зато што је примећено да облик пика леводопе није задовољавајућ када се користи смеша ацетонитрил–вода. Разблажењем основних раствора добијена је смеша концентрација:

- 10 µg/mL за леводопу, карбидопу и ентакапон
- 1 µg/mL за нечистоће LD_B, LD_C, MD, 3-ОМС, EN_A, EN_C

3.6.3 Припрема раствора за валидацију методе

Припрема раствора за процену селективности методе

Смеша ексципијенаса (плацебо) и одговарајућих количина стандарда испитиваних супстанци припремљена је у односу концентрација који одговара садржају у таблетама и пренета у одмерни суд од 50 mL. На ултразвучном купатилу екстрахована је смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) у трајању од 30 min. Одмерни суд је растварачем допуњен до ознаке и раствор је затим профилиран. Од овог раствора припремљено је разблажење које садржи 100 µg/mL леводопе, 50 µg/mL карбидопе и ентакапона и 1 µg/mL сваке нечистоће и тај раствор је коришћен за процену селективности методе.

Припрема раствора за одређивање лимита детекције и лимита квантификације

Од одговарајућих стандардних супстаци нечистоћа LD_B, LD_C, MD, 3-ОМС, EN_A и EN_C припремљена су разблажења раствора у концентрацијама које након хроматографске анализе дају површине пикова 3 пута веће од површине шума базне линије за лимит детекције (LOD), односно 10 пута веће за лимит квантификације (LOQ).

Припрема раствора за процену линеарности

За конструисање калибрационих кривих, од основних раствора стандарда припремљено је шест раствора који садрже леводопу (20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 120 µg/mL, 160 µg/mL и 200 µg/mL), карбидопу (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL и 100 µg/mL) и ентакапон (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL и 80 µg/mL), као и седам раствора који садрже нечистоће LD_B (0,15 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,75 µg/mL и 1 µg/mL), LD_C (0,1 µg/mL; 0,15 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,35 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,75 µg/mL и 1 µg/mL), MD и 3-ОМС (0,1 µg/mL; 0,15 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,6 µg/mL и 1 µg/mL), EN_A и EN_C (0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL и 0,4 µg/mL).

Припрема раствора за процену тачности методе

Лабораторијска смеша која садржи плацебо, леводопу, карбидопу, ентакапон и нечистоће припремљена је у смеси растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) и екстрахована у ултразвучном купатилу 15 min. За квантитативну анализу лабораторијске смеше, припремљене су три серије разблажења у 0,1 М хлороводоничној киселини: леводопу 80 µg/mL (80%), 100 µg/mL (100%), 120 µg/mL (120%); нечистоће леводопе LD_B и LD_C 0,16 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,24 µg/mL; карбидопу 40 µg/mL (80%), 50 µg/mL (100%), 60 µg/mL (120%); нечистоће карбидопе MD и 3-ОМС 0,2 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,3 µg/mL; ентакапон 40 µg/mL (80%), 50 µg/mL (100%), 60 µg/mL (120%); нечистоће ентакапона EN_A и EN_C 0,08 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,12 µg/mL. За сваку серију разблажења припремљена су по три

раствора за хроматографску анализу, а затим су израчунати одговарајући статистички параметри.

Припрема раствора за процену прецизности методе

За процену прецизности коришћена је комерцијално доступна таблетна формулација која садржи 150 mg леводопе, 37,5 mg карбидопе и 200 mg ентакапона. У том узорку садржај нечистоћа је био испод нивоа LOD па је примењена метода стандардног додатка.

Леводопа, карбидопа и њихове нечистоће. Одмерена је она количина таблетне масе која садржи 200 mg леводопе и 50 mg карбидопе, пренета у одмерни суд од 100 mL и екстрахована смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) у ултразвучном купатилу током 15 min. У раствор су додате нечистоће у количинама које одговарају максимално дозвољеним концентрацијама, односно 0,2 % за LD_B и LD_C и 0,5 % за MD и 3-ОМС. Одмерни суд је допуњен до ознаке, а раствор затим профилиран. Од основног раствора припремљено је шест разблажења која садрже 200 µg/mL леводопе, 50 µg/mL карбидопе, 0,4 µg/mL нечистоћа LD_B и LD_C, и 0,25 µg/mL нечистоћа MD и 3-ОМС.

Ентакапон и његове нечистоће. Одмерена је количина таблетне масе која садржи 50 mg ентакапона, пренета у одмерни суд од 100 mL и екстрахована смешом растварача ацетонитрил–вода (50:50, V/V) у ултразвучном купатилу током 15 min. У раствор су додате нечистоће у количинама које одговарају максимално дозвољеним концентрацијама, односно 0,15 % за EN_A и EN_C. Одмерни суд је допуњен до ознаке, а раствор затим профилиран. Од основног раствора припремљено је шест разблажења која садрже 50 µg/mL ентакапона и 0,075 µg/mL нечистоћа EN_A и EN_C.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације јесте анализа ретенционог понашања одабраних антипаркинсоника (ропинирола, прамипексола, леводопе, карбидопе и ентакапона) и њихових нечистоћа у хроматографским системима реверзних фаза са различитим модификацијама мобилних фаза применом одабраних киселина и соли чији анјони поседују различите особине према Хофмајстеровој класификацији. Да би се то постигло, дефинисани су математички модели који могу тумачити и предвиђати задржавање анализата на стационарној фази у тзв. хаотропној хроматографији. На основу тих сазнања, омогућено је унапређење развоја метода хаотропне хроматографије чиме се додатно учвршћује њено место и значај у савременој фармацеутској анализи.

4.1 ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СОЛИ СА ХАОТРОПНИМ ОСОБИНАМА НА РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ РОПИНИРОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА

У овој студији испитиван је утицај две хаотропне соли (CF_3COONa и NaClO_4) на хроматографско понашање ропинирола и његове две нечистоће.

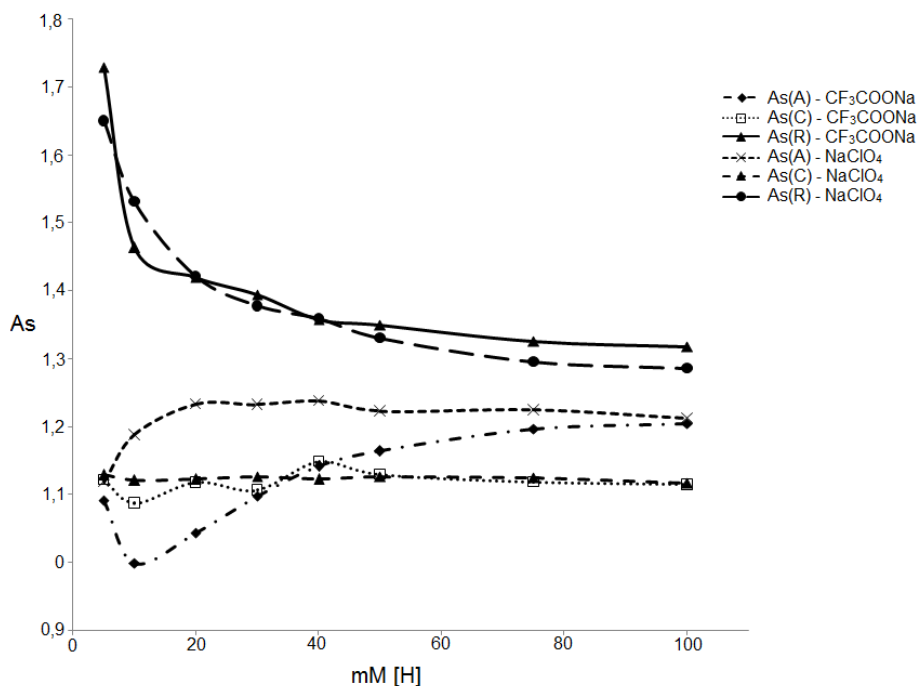
4.1.1 Утицај хаотропних агенаса на задржавање анализата на стационарној фази, симетрију пикова и ефикасност раздвајања

Ропинирол (слика 7) и његове нечистоће А и С (слика 8) су органске базе. Међусобно се разликују по хидрофобности што утиче на њихово задржавање на стационарној фази реверзно-фазног система течне хроматографије. Како би се постигло потпуно протоновање ових анализата, и тиме повећала њихова осетљивост на утицај хаотропних агенаса, рН вредност воденог дела мобилне фазе подешена је на 2,5. У првој фази, квалитативна процена утицаја додатних хаотропних агенаса вршена је праћењем вредности неколико хроматографских параметера: ретенционих фактора анализата (k), фактора асиметрије пикова (A_s) и броја теоријских платоа (N).

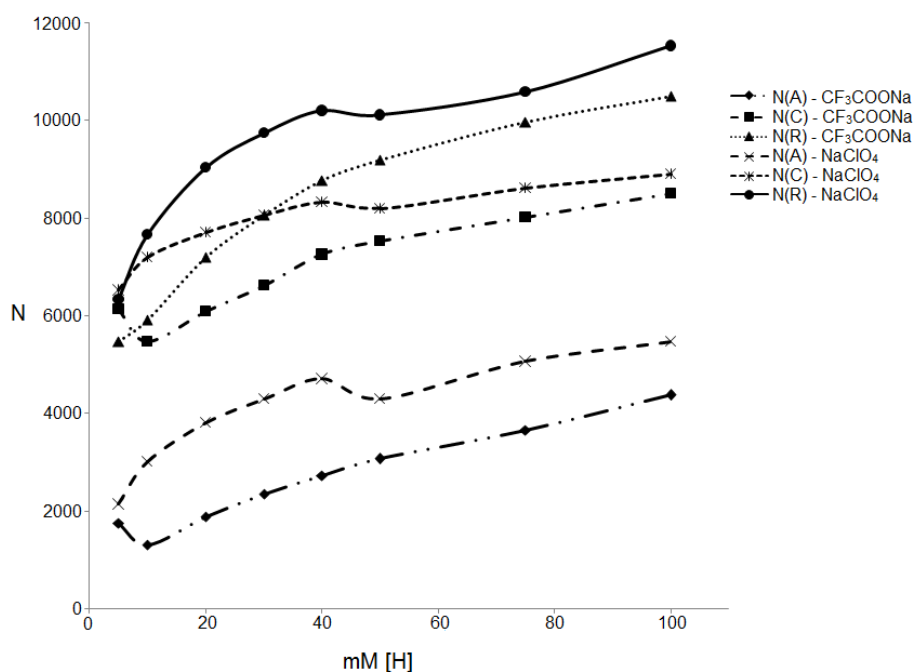
Као што теорија предвиђа, вредности ретенционих фактора сва три анализита расту са порастом концентрације хаотропних агенаса, а израженији ефекат перхлоратног јона у односу на трифлуороацетатни јон је у сагласности са положајем ових анјона у Хофмајстеровој серији. Такође, подложност анализита на утицај растућих концентрација хаотропних адитива расте са њиховом хидрофобношћу [26]. Утицај хаотропних агенаса на задржавање анализита на стационарној фази биће детаљније сагледан и објашњен са термодинамичког аспекта.

Незадовољавајући облик хроматографског пика је чест проблем у течной хроматографији када су анализити протоноване базне супстанце. Додатак хаотропних агенаса у мобилну фазу и њихова адсорпција на површину стационарне фазе могу супримирати неке нежељене секундарне интеракције између анализита и активних хемијских група стационарне фазе, и тако побољшати симетрију пика. Такође, асиметрија пика може бити последица инјектовања великих концентрација узорка у колону [91–93]. Ово је нарочито значајно управо онда када је потребно инјектовати релативно велике концентрације узорка, као што је случај у тестовима за одређивање сродних супстанци. Додатком хаотропних агенаса могуће је побољшати ефикасност раздвајања и облик хроматографског пика [94]. Како су инјектоване концентрације нечистоћа А и С биле мале, проблем асиметрије није био уочен. Ипак, утицај на симетрију пика ропинирола је евидентан и са порастом концентрације хаотропа, вредност фактора асиметрије A_s тежи јединици (слика 18).

Повећање концентрације хаотропног агенса такође је довело до повећања ефикасности раздвајања, представљене повећањем броја теоријских платоа N (слика 19). Овај ефекат се уочава без обзира на инјектоване концентрације анализита. Поново, перхлорат је показао снажнији утицај од трифлуороацетата, што одговара положају у Хофмајстеровој серији.



Слика 18. Промена вредности фактора асиметрије (As) за пикове ропинирола (R), нечистоће А (A) и нечистоће С (C) са променом концентрације $[H]$ хаотропних соли CF_3COONa и $NaClO_4$



Слика 19. Промена вредности броја теоријских платоа (N) за пикове ропинирола (R), нечистоће А (A) и нечистоће С (C) са променом концентрације $[H]$ хаотропних соли CF_3COONa и $NaClO_4$

4.1.2 Термодинамички аспект ретенционог механизма

Како би се потпуније разумели механизми задржавања анализата на стационарној фази након додатка хаотропних агенаса (CF_3COONa и NaClO_4), експериментално добијени ретенциони подаци апроксимирани су проширеном термодинамичким моделом [16, 32]. У ту сврху, било је потребно најпре дефинисати адсорпционе профиле испитиваних хаотропних агенаса методом фронталне анализе (поступак описан у поглављу 3.3.3). Добијени експериментални подаци описани су Фројндлиховом адсорпционом изотермом која је представљена једначином 28. Дефинисање адсорпционих изотерми омогућило је израчунавање вредности површинских потенцијала према Гуи-Чапмановој једначини (једначина 27). Вредности параметра Фројндлихове криве и њихова статистичка процена, као и вредности површинског потенцијала израчунате за највећу концентрацију испитиваних хаотропних агенаса (100 mM) дате су у табели 9. Поређењем утицаја CF_3COONa и NaClO_4 уочава се да су веће вредности површинског потенцијала постигнуте након додатка перхлората, што је у складу са положајем тих јона у Хофмајстеровој серији.

Табела 9. Дефинисање параметара Фројндлихове адсорпционе изотерме и израчунавање вредности површинских потенцијала за одабране хаотропне агенсе

Хаотропни агенс H	a [mM ^{-b}]	SE_a	b	SE_b	r	Ψ^o max [mV]*
CF_3COONa	5,19e-03	6,38e-04	8,86e-01	0,28e-02	0,9976	-39,4
NaClO_4	7,02e-03	4,29e-04	9,81e-01	1,41e-02	0,9991	-68,4

*вредност површинског потенцијала (Ψ^o) израчуната је за $[\text{H}]=100$ mM
 a , b – Фројндлихове константе; SE – стандардна грешка, r – коефицијент корелације

(Прилагођено из: A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

Након дефинисања адсорпционих изотерми и израчунавања површинског потенцијала, ретенциони подаци апроксимирани су проширеним термодинамичким моделом (једначина 29) који узима у обзир Гуи-Чапманову једначину и Фројндлихову адсорпциону изотерму. Како у овој студији јонска јачина мобилне фазе није била константна, узета је у обзир њена промена са

променом концентрације додатог хаотропног агенса, па је израз за f (једначина 30) модификован на следећи начин [95]:

$$f = \frac{|z_H|F}{(8\varepsilon_0\varepsilon_rRT(\sum_i c_{bi}+[H]))^{0.5}} \quad (46)$$

где $\sum c_{bi}$ представља концентрацију пуфера или других јона који дефинишу јонску јачину мобилне фазе, а $[H]$ је концентрација додатог хаотропног агенса. При датим експерименталним условима, у мобилној фази нису присутни други јони па је $\sum c_{bi}=0$.

Генерално, параметар c_1 једначине 29 не сматра се прилагодљивим регресионим параметром јер је једнак k_0 , односно вредности ретенционог фактора анализата када се раздвајање врши елуентом без додатог хаотропног агенса и ова вредност се може експериментално утврдити. Ипак, у овој студији c_1 је укључен у израчунавање као прилагодљив параметар, јер су тако добијени модели са најбољим вредностима коефицијената детерминације. Поред тога, моделом предвиђене вредности су физички и хроматографски у доброј сагласности са експерименталним вредностима. Параметри c_2 , c_3 и c_4 се односе на термодинамичке константе равнотеже за формирање јонских парова у стационарној фази, за формирање јонских парова у елуенту, и за адсорпцију јон-интеракционог агенса на стационарну фазу. Када јонски адитиви који детерминишу површински потенцијал нису јако адсорбофилни, као што је случај са хаотропним агенсима, може се сматрати да десни члан имениоца у једначини 29 није различит од јединице, па се параметар c_4 искључује из фитовања [7, 32]. Вредности параметара и њихова статистичка процена приказани су у табели 10. ANOVA тестом и добијеним F -вредностима потврђена је статистичка значајност модела.

Као што се види из табеле, недостаје параметар c_2 . Будући да је израчунавањем добијена негативна вредност параметра указивала да је утицај формирања јонских парова у стационарној фази занемарљив у овом хроматографском систему, његово укључивање у фитовање није било оправдано [32]. Као што је очекивано, вредности c_3 параметра указују да су константе јонског спаривања мање у случају јона трифлуороацетата него јона перхлората.

Табела 10. Вредности параметара и статистичка процена ретенционих модела за ропинирол и његове нечистоће

	Параметри модела*				Процена модела	
	c_1	SE_{c1}	c_3	SE_{c3}	R^2	
CF_3COONa	k_A	0,54	1,04e-02	5,01e-03	5,00e-04	0,9880
	k_C	1,89	2,63e-02	6,46e-03	3,92e-04	0,9918
	k_R	2,20	2,88e-02	5,80e-03	3,54e-04	0,9935
$NaClO_4$	k_A	0,56	2,71e-02	2,81e-02	2,55e-03	0,9629
	k_C	1,95	7,94e-02	3,04e-02	2,28e-03	0,9706
	k_R	2,23	9,41e-02	2,74e-02	2,20e-03	0,9727

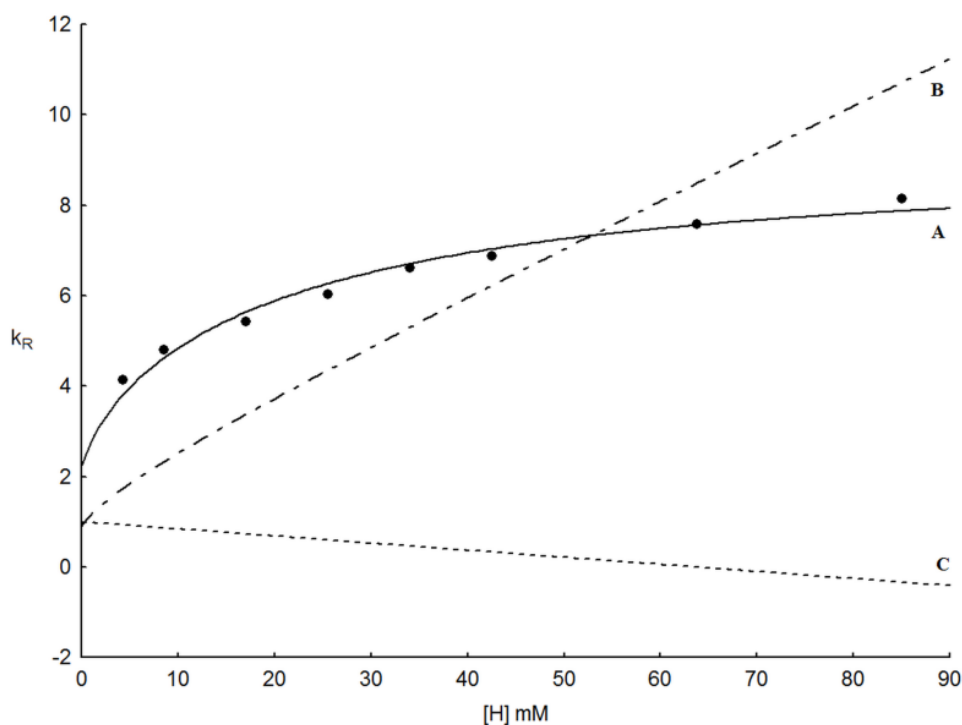
*једначина 29

k_A , k_C , k_R – ретенциони фактори нечистоће А, нечистоће С и ропинирола; SE – стандардна грешка

(Прилагођено из: **A. Vemić**, A. Malenović, M. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

Да би се појаснио значај електростатских интеракција које се јављају услед развоја електричног двослоја на површини стационарне фазе и јонског спаривања у елуенту, извршена је графичка процена доприноса ових феномена на задржавање анализата. Слика 20 приказује само график који се односи на ретенцију ропинирола када се као хаотропни адитив користи $NaClO_4$. Графици осталих анализата, и у комбинацији са другим анализираним адитивом CF_3COONa су слични. Крива А се односи на експерименталне податке апроксимираним ретенционим моделом (једначина 29), док криве В и С одговарају појединачним члановима једначине 29. Очигледно је да електростатска компонента (крива В) даје највећи допринос задржавању анализата на стационарној фази. Наиме, адсорпција хаотропних јона на површину стационарне фазе доводи до развоја електричног двослоја тако стварајући разлику у електростатском потенцијалу између наелектрисане површине и електронеутралног елуента. Као последица, долази до модификације адсорпције анализата на стационарну фазу. Будући да је наелектрисање анализата супротно од наелектрисања хаотропног јона, електростатске интеракције су привлачне што доводи до дужег задржавања анализата на стационарној фази. Ипак, очигледно је да ако би се узео у обзир само

ефекат електростатских привлачних сила, одговарајуће моделовање ретенције анализата не би било могуће. С друге стране, када се узме у обзир стварање јонских парова у елуенту, иако се догађа у малом обиму, бипараметарско фитовање модела је задовољавајуће. Стварање јонских парова у елуенту доводи до смањења ретенције анализата, што је приказано кривом С. Овај феномен такође доприноси облику криве А доводећи до њеног закривљења [16].



Слика 20. Зависност ретенционог фактора ропинирола k_R од концентрације хаотропа NaClO_4 у мобилној фази: А – експериментални подаци апроксимирани ретенционим моделом (једначина 29); В – допринос електростатских интеракција као последице развоја електричног двослоја; С – допринос јонског спаривања у мобилној фази

(Прилагођено из: А. Вемић, А. Маленовић, М. Меденица, *Talanta* 123 (2014) 122–127)

4.1.3 Емпиријско моделовање и оптимизација методе

Даље истраживање хроматографског система који садржи хаотропне адитиве, као и развој методе за анализу дате смеше анализата, спроведено је методологијом експерименталног дизајна. У овој фази, одабрани хаотропни агенс био је CF_3COONa . Циљ је био да се испита утицај састава мобилне фазе, као и интеракције њених компоненти, на хроматографско понашање анализата. Због тога

су одабрани следећи фактори: концентрација хаотропног адитива у воденом делу мобилне фазе (x_1 , 10 mM–50 mM), садржај ацетонитрила у мобилној фази (x_2 , 10%–20%) и рН вредност водене компоненте мобилне фазе (x_3 , 2–3). За прикупљање података који описују ефекте одабраних фактора и омогућавају дефинисање оптималних услова методом претраге мреже примењен је ка страницама коцке оријентисан централни композициони дизајн (енг. *the face-centered central composite design* – FCCD). План експеримента приказан је у табели 3. Као одговори система (табела 11) одабрани су ретенциони фактори свих анализа, као и фактор резолуције између нечистоће С и ропинирола.

Експериментални подаци су апроксимирани квадратним моделом:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (47)$$

где је y одговор система, x_1 – x_3 су променљиве (фактори), b_1 – b_3 су коефицијенти главних фактора; b_{12} , b_{13} и b_{23} су коефицијенти двофакторских интеракција; и b_{11} , b_{22} и b_{33} су коефицијенти квадратних чланова. Коефицијенти израчунати за кодиране вредности фактора приказани су у табели 12. Сматра се да је коефицијент модела значајан за $p < 0,05$, односно за ниво поузданости од 95%. Валидност модела потврђена је ANOVA тестом, *lack-of-fit* тестом и вредностима коефицијената детерминације.

Статистичка анализа је показала да на све одговоре система значајан утицај имају концентрација хаотропа CF_3COONa , као и садржај ацетонитрила. Такође, показано је да промена рН вредности није значајна што се објашњава потпуним протоновањем анализа у читавом анализираном опсегу рН. Као што предзнак параметра сугерише, повећање концентрације CF_3COONa води повећању вредности ретенционих фактора, док промена удела ацетонитрила у мобилној фази има супротан ефекат. Зависност одговора система од овог фактора је квадратна, а сам ефекат је у сагласности са реверзно-фазним механизмом. Ипак, најинтересантнија је интеракција ова два фактора. Наиме, повећање вредности ретенционих фактора изазвано повећањем концентрације хаотропа израженије је при мањем садржају ацетонитрила у мобилној фази, односно, укупна промена вредности ретенционог фактора у испитиваном опсегу је пет до шест пута већа при мањим концентрацијама органског растварача (на пример, на рН 2,0 и 10%

ACN за 50 mM CF₃COONa и 10 mM CF₃COONa $\Delta k_R=18,13-12,59=5,54$; док је на 20% ACN за 50 mM CF₃COONa и 10 mM CF₃COONa $\Delta k_R=2,21-1,37=0,84$). Ово се може објаснити смањењем слободне адсорпционе енергије хаотропа при већим концентрацијама органског растварача, што даље утиче на развој површинског потенцијала. Ефекти ова два фактора, као и њихова интеракција, могу се лако приказати 3D-графиком (слика 21). Ради једноставности, приказан је само ефекат фактора на вредност ретенционог фактора ропинирола, будући да је утицај на остале анализе аналоган.

Табела 11. Експериментално добијени одговори система за ропинирол и његове нечистоће

№	k_A	k_C	k_R	R_{CR}
1	2,930	10,651	12,593	3,805
2	4,218	14,913	18,133	4,974
3	0,393	1,256	1,369	0,414
4	0,626	1,976	2,214	1,469
5	3,085	11,281	13,308	3,632
6	4,388	15,561	18,843	4,805
7	0,419	1,352	1,466	0,374
8	0,627	1,988	2,221	1,427
9	1,039	3,468	4,048	2,547
10	1,346	4,423	5,265	3,109
11	3,846	13,795	16,558	4,402
12	0,485	1,547	1,693	0,524
13	1,150	3,832	4,538	2,841
14	1,336	4,53	5,498	3,560
15	0,996	3,257	3,898	2,445
16	1,154	3,916	4,638	2,942
17	1,268	4,175	4,929	2,996
18	1,266	4,159	4,909	3,070

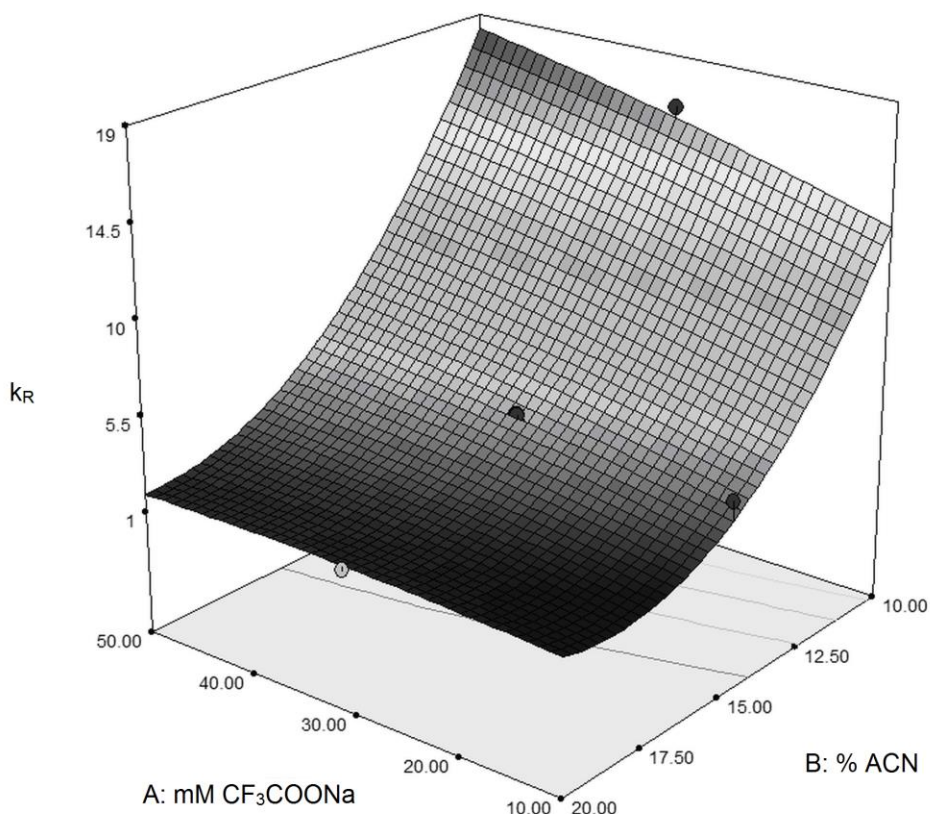
k_A , k_C , k_R – ретенциони фактори нечистоће А, нечистоће С и ропинирола
 R_{CR} – фактор резолуције између нечистоће С и ропинирола

Табела 12. Коefицијенти квадратног модела за кодиране вредности фактора и статистичка процена модела

		k_A	p -вредност	k_C	p -вредност	k_R	p -вредност	R_{CR}	p -вредност
Коefицијенти модела	b_0	1,20	-	4,00	-	4,75	-	2,89	-
	b_1	0,33	< 0,0001	1,09	0,0001	1,39	< 0,0001	0,50	0,0008
	b_2	-1,59	< 0,0001	-5,81	< 0,0001	-7,05	< 0,0001	-1,74	< 0,0001
	b_3	0,054	0,2714	0,21	0,2186	0,25	0,2346	0,029	0,7672
	b_{12}	-0,27	0,0007	-0,90	0,0009	-1,18	0,0006	-0,029	0,7927
	b_{13}	-0,00125	0,9810	-0,00825	0,9635	-0,012	0,9576	0,00025	0,9982
	b_{23}	-0,037	0,4853	-0,15	0,4264	-0,17	0,4675	0,033	0,7705
	b_{11}	-0,044	0,6247	-0,19	0,5500	-0,26	0,5063	-0,093	0,6274
	b_{22}	0,93	< 0,0001	3,54	< 0,0001	4,21	< 0,0001	-0,46	0,0383
	b_{33}	0,006	0,9470	0,048	0,8759	0,10	0,7894	0,28	0,1697
Модел	F -вредност	164,67	<0,0001	178,96	<0,0001	186,72	<0,0001	40,29	<0,0001
	$Lack-of-fit$	1,42	0,4115	1,98	0,3047	1,51	0,3899	1,24	0,4571
	R^2	0,9946	-	0,9951	-	0,9953	-	0,9784	-

k_A , k_C , k_R – ретенциони фактори нечистоће А, нечистоће С и ропинирола; R_{CR} – фактор резолуције између нечистоће С и ропинирола

(Прилагођено из: А. Вемић, А. Malenović, М. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

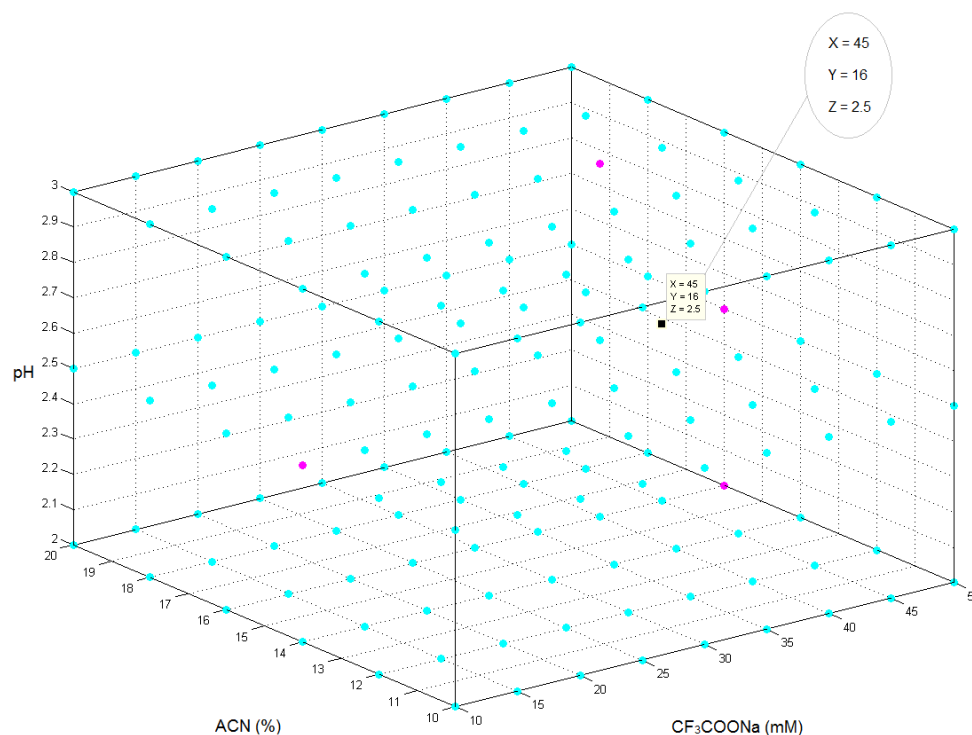


Слика21. 3D графикон површине одговора: зависност ретенционог фактора (k_R) ропинирола од концентрације хаотропа CF_3COONa и удела ацетонитрила у мобилној фази

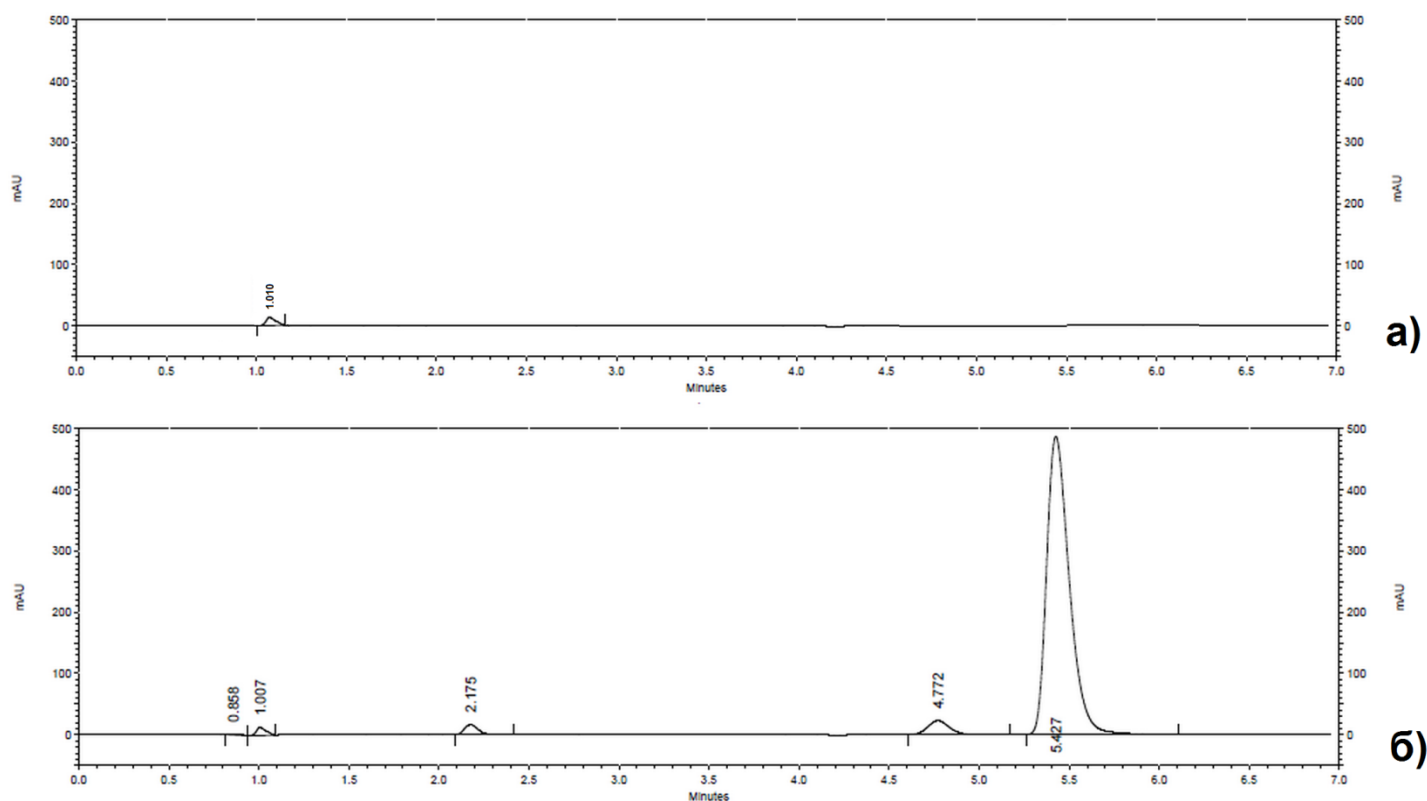
(Прилагођено из: A. Vemić, A. Malenović, M. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

Коначно, како би се извршила оптимизација предложене методе, постављена су три циља: задовољавајућа ретенција првог пика ($k_A > 1,1$), добра резолуција између критичног пара, нечистоћа С–ропинирол ($R_{CR} > 1,3$), и прихватљиво укупно трајање анализе ($k_R < 4,5$). Истовремена оптимизација одабраних одговора постигнута је методом претраге чворова мреже. Експериментални простор подељен је у мрежу дискретизацијом испитиваних фактора. Инкременти за концентрацију CF_3COONa били су 5 mM, за удео ацетонитрила 2% и за рН вредност воденог дела мобилне фазе 0,5 јединица јер су претходни резултати сугерисали да утицај овог фактора није значајан. Из тога следи да су бројеви нивоа за факторе x_1 , x_2 и x_3 били 9, 6 и 3, па је укупан број испитиваних чворова мреже био 162. Према дефинисаним критеријумима одабрана је оптимална тачка која одговара 16% ацетонитрила, 45 mM CF_3COONa

и рН 2,5 (слика 22). Предвиђене вредности одабраних одговора биле су $k_A=1,11$; $R_{CR}=2,84$ и $k_R=4,23$. Хроматограм добијен под оптималним условима приказан је на слици 23. Добро слагање између моделом предвиђених и експериментално добијених вредности одговора ($k_A=1,16$; $R_{CR}=2,94$ и $k_R=4,39$) потврдило је адекватност одабраног оптимума.



Слика 22. Графички приказ мреже експерименталног простора: тачке које не задовољавају све дефинисане критеријуме (плаво), тачке које задовољавају све дефинисане критеријуме (љубичасто), одабрана радна тачка (црно)



Слика23. Хроматограм снимљен при оптималним хроматографским условима ацетонитрил–водена фаза (45 mM CF_3COONa , рН подешен на 2,5 орто-фосфорном киселином) 16:84 (V/V): а) плацебо; б) лабораторијска смеша – нечистоћа А (t_r 2,175 min), нечистоћа С (t_r 4,772 min), ропинирол (t_r 5,427 min)

(Прилагођено из: **A. Vemić**, A. Malenović, M. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

4.1.4 Валидација методе

Како би се доказала поузданост и применљивост развијене методе, извршена је њена валидација. Селективност је доказана одсуством значајних интерферирајућих пикова плацеба на ретенционим временима анализираних супстанци.

Осетљивост методе је одређена дефинисањем лимита детекције (LOD) и лимита квантификације (LOQ). Ове вредности су екпериментално одређене из односа сигнала и шума (енг. *signal-to-noise* – S/N). Однос сигнала и шума од 3:1 се генерално сматра прихватљивим за процену вредности LOD, док за процену LOQ тај однос треба да буде 10:1 (табела 13).

Линеарност методе утврђена је успостављањем линеарних зависности између површине пикова и испитиваних концентрација ропинирола и нечистоћа А и С. Израчунати регресиони коефицијенти су у сагласности са захтеваним критеријумом [96] и дати су у табели 13.

Прецизност методе процењена је израчунавањем релативне стандардне девијације (RSD): ропинирол (1,21%), нечистоћа А (0,96%) и нечистоћа С (2,27%). Добијене вредности испуњавају задате критеријуме (RSD<2% за активне супстанце и RSD<15% за сродне супстанце) [96].

Тачност предложене методе процењена је на основу добијених *Recovery* вредности за испитиване лабораторијске смеше. Резултати су приказани у табели 13 и сви се налазе у оквирима задатих критеријума [96].

Табела 13. Параметри валидације методе

Аналит	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Линеарност				Тачност	
		Опсег концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	a	b	r	Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	$Recovery^*$ (%)
Ропинирол	-	100 – 350	59,27	-75,65	0,9958	160	100,4
						200	98,9
						240	99,8
Нечистоћа А	0,03	0,1 – 1,2	61,03	-2,96	0,9965	0,1	113,0
						1,0	93,2
						1,2	93,3
Нечистоћа С	0,03	0,1 – 1,2	80,03	-1,27	0,9975	0,1	99,6
						1,0	95,8
						1,2	94,4

a – нагиб, b – одсечак, r – коефицијент корелације (прихватљива вредност $>0,99$ за активне супстанце, $>0,98$ за нечистоће)

* $Recovery$: прихватљива вредност 98,0–102,0 % за активне супстанце, 70,0–130,0 % за нечистоће

(Прилагођено из: А. Vemić, А. Malenović, М. Medenica, Talanta 123 (2014) 122–127)

4.2. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ХАОТРОПНОСТИ СОЛИ, ХИДРОФОБНОСТИ КОЛОНЕ И МОЛЕКУЛСКИХ СВОЈСТАВА ПРАМИПЕКСОЛА И НЕЧИСТОЋА НА ЊИХОВО РЕТЕНЦИОНО ПОНАШАЊЕ

4.2.1. Уводна испитивања

Аналити изабрани за ову студију су активна фармацеутска супстанца, антипаркинсоник прамипексол (слика 9) и његове структурно сличне нечистоће (слика 11) које могу да настану као деградациони производи. Анализом њихових хемијских структура уочава се да се међусобно разликују по броју базних центара, од нечистоће **I** која је неутрална и не поседује ниједан базни центар, до нечистоће **V** која има чак четири базна центра доступна протоновању. Како би се експериментално пратио и разјаснио ефекат хаотропних адитива на ретенционо понашање протонованих анализата, рН вредност је подешена на 2,5. На основу рКа вредности предвиђених ADMET софтвером очекује се да при овој рН вредности више од 90% сваког анализата буде у потпуно протонованом облику. С друге стране, ниже рН вредности нису разматране како не би дошло до оштећења стационарне фазе.

Прво је разматрана ретенција анализата без додатог хаотропног агенса и уочено је да је редослед елуирања у сагласности са израчунатим $\log D_{\text{pH}2,5}$ вредностима (табела 14). Наиме, све супстанце са негативним $\log D$ вредностима показале су незадовољавајуће задржавање у колони. Нешто боља ситуација је једино у случају нечистоће **III** што може бити објашњено интеракцијом њене *H*-акцепторске кето групе са *H*-донорским слободним силанолним групама стационарне фазе. Друго интересантно запажање односи се на везу између хидрофобности анализата представљене одговарајућим $\log P$ вредностима и њихове подложности утицајима хаотропних анјона. Поредиши $\log P$ вредности са Δk , односно разликом ретенционих фактора анализата када се као елуент користи мобилна фаза која садржи највишу испитивану концентрацију најјачег хаотропног адитива (80 mM NaPF₆) и када се као елуент користи мобилна фаза која не садржи хаотропне адитиве, може се уочити да већа осетљивост анализата на утицај хаотропних агенаса одговара већој хидрофобности анализата (табела 14) [26, 97].

Табела 14. Поређење утицаја додатог хаотропног агенса на вредности ретенционих фактора са параметрима липофилности анализираних супстанци

Аналит	k_0		Δk		$\log D_{pH2,5}$	$\log P$
	C8	C18	C8	C18		
Прамипексол	0	0	3,936	7,776	-1,63	1,49
Нечистоћа I	3,178	5,579	-0,182	-0,466	0,09	0,17
Нечистоћа II	0	0	2,530	4,766	-1,68	0,57
Нечистоћа III	0,198	0,258	2,584	4,561	-1,32	0,94
Нечистоћа IV	0,923	1,617	5,516	10,016	0,29	1,74
Нечистоћа V	0	0	>50	>50	-1,29	3,13

k_0 – ретенциони фактор аналита када хаотропни агенс није додат у мобилну фазу

$\Delta k = k - k_0$, где је k ретенциони фактор аналита када мобилна фаза садржи 80 mM NaPF₆

(Прилагођено из: А. Вемић, М. Калинић, С. Ерић, А. Маленовић, М. Меденица, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

4.2.2 Утицај хаотропности соли и хидрофобности стационарне фазе на ретенционо понашање аналита

У циљу прикупљања експерименталних података неопходних за дефинисање термодинамичких модела и даљу анализу утицаја карактеристика молекула на ретенционо понашање датих аналита, праћен је утицај три хаотропне соли (CF₃COONa, NaClO₄ и NaPF₆) на две колоне истих димензија, али различите хидрофобности стационарне фазе (C8 и C18). Будући да је за израчунавање површинске концентрације адсорбованих хаотропних соли неопходно знати површину стационарне фазе, а да за дате колоне нису постојали литературни подаци, одређивање површине изведено је експериментално, методом фронталне анализе. Поступак је описан у поглављу 3.4.1, а добијени подаци апроксимирани су следећом једначином [98]:

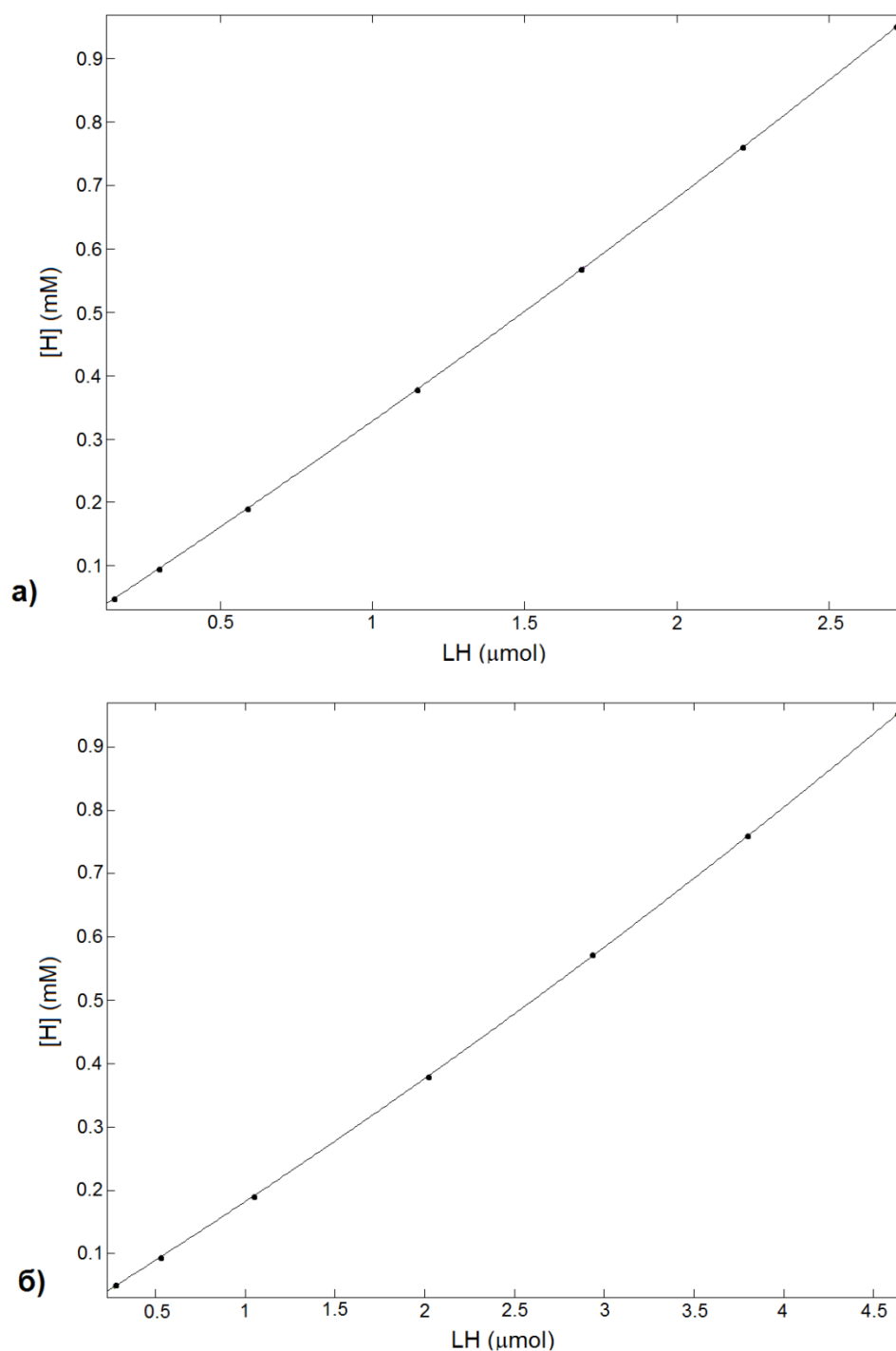
$$[H] = \frac{LH}{K_{LH}(L_T - LH)} \left(\frac{LHf}{A} + \left(\left(\frac{LHf}{A} \right)^2 + 1 \right)^{0.5} \right)^{2|z_H|} \quad (47)$$

где је $[H]$ концентрација *para*-толуенсулфата у мобилној фази, LH представља укупну количину *para*-толуенсулфата адсорбованог на стационарну фазу, а израчуната је коришћењем једначине 45, A је хроматографски доступна површина

колоне, L_T означава укупна слободна места лиганда (капацитет монослоја, μmol), а K_{LH} одговара термодинамичкој константи равнотеже за адсорпцију H на слободно место лиганда стационарне фазе L . Константа f израчунава се из експерименталних услова према једначини 30.

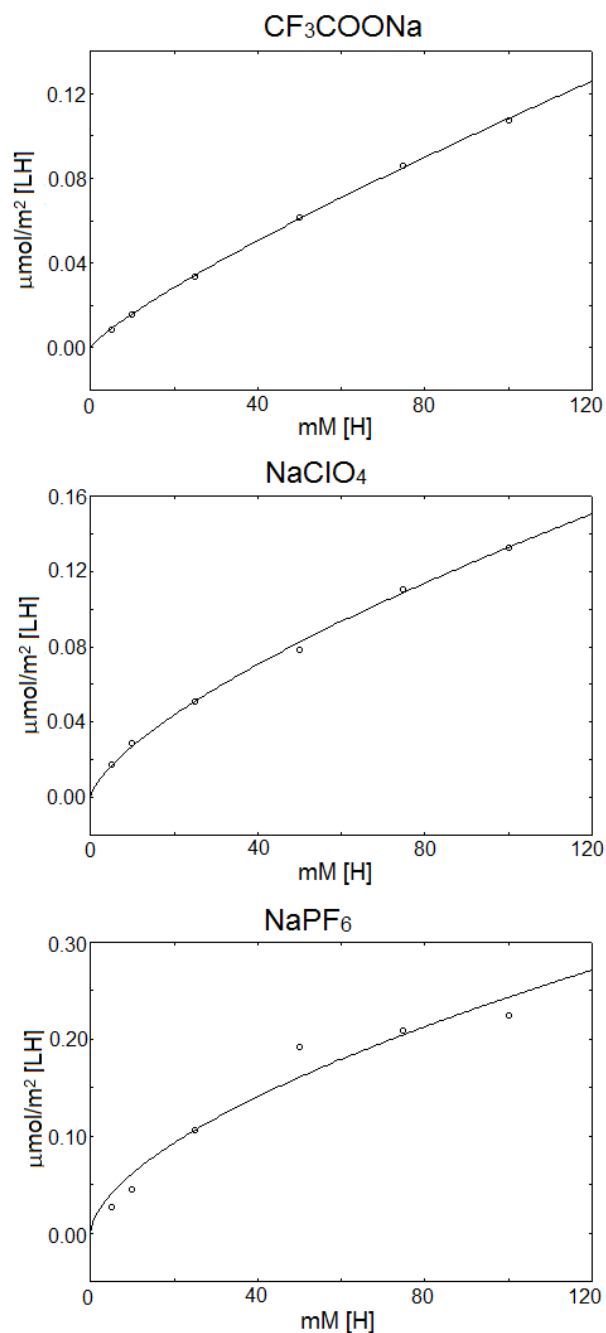
Апроксимирање експерименталних вредности једначином изотерме било је статистички задовољавајуће и израчунате RMSE вредности биле су $1,085\text{e-}03$ за C8 колону и $6,616\text{e-}04$ за C18 колону. На слици 24 приказане су одговарајуће изотерме. Процењене вредности тражених параметара за C8 колону били су $189,6 \text{ m}^2$ за A ; $0,024 \text{ mM}^{-1}$ за K_{LH} ; $132,5 \mu\text{mol}$ за L_T и за C18 колону $214,4 \text{ m}^2$ за A ; $0,045 \text{ mM}^{-1}$ за K_{LH} ; $126,8 \mu\text{mol}$ за L_T . Вредности добијене за укупну површину колоне A коришћене су за израчунавање адсорпционих изотерми хаотропних соли.

Након дефинисања површине стационарних фаза, методом фронталне анализе процењена је површинска концентрација анализираних соли на тим стационарним фазама (поступак описан у поглављу 3.4.2). У ту сврху, примењена је Фројндлихова апсорпциона изотерма (једначина 28), што је даље омогућило израчунавање површинског потенцијала према Гуи-Чапмановој једначини (једначина 27). Адсорпционе изотерме све три анализираних соли (CF_3COONa , NaClO_4 , NaPF_6) приказане су на слици 25 за C8 колону и на слици 26 за C18 колону. У табели 15 дати су параметри адсорпционих изотерми и њихова статистичка процена, као и вредности површинских потенцијала израчунатих за концентрацију од 100 mM хаотропних адитива. Уочава се да је повећање вредности површинског потенцијала у сагласности са позицијом соли у Хофмајстеровој серији. Поред тога, за исту со, нешто веће вредности површинског потенцијала су остварене на хидрофобнијој стационарној фази. Такође, разлике у вредностима потенцијала развијених на две стационарне фазе у присуству исте соли расту са хаотропношћу соли.



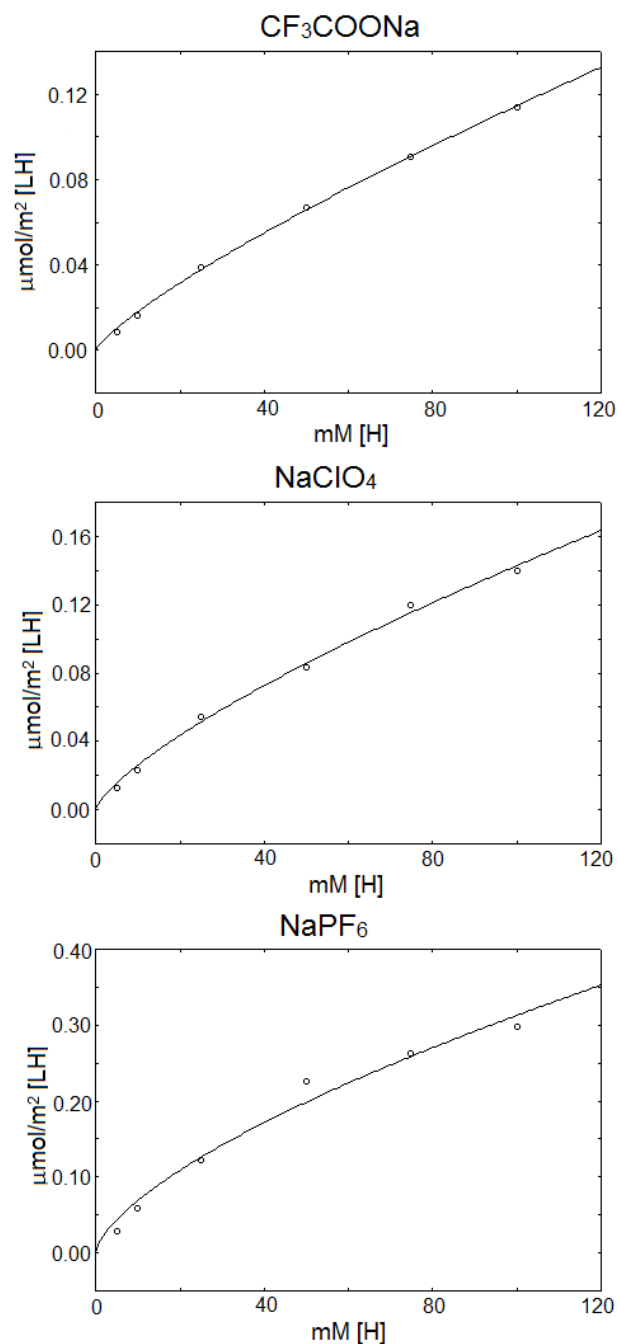
Слика 24. Експерименталне тачке и адсорпционе изотерме *para*-толуенсулфоната дате једначином 47 за а) XTerra® C8 колону, б) XTerra® C18 колону. [H], концентрација *para*-толуенсулфоната у елуенту (mM); LH, количина *para*-толуенсулфоната адсорбованог на стационарну фазу (μmol). Елуент: метанол–фосфатни пуфер (pH 3, I=100 mM) 5:95 (V/V), $t=25\text{ }^\circ\text{C}$

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)



Слика 25. Експерименталне тачке и адсорпционе изотерме испитиваних хаотропних соли (CF_3COONa , NaClO_4 , NaPF_6) дате једначином 28 за XTerra[®] C8 колону. [H], концентрација соли у мобилној фази (mM); [LH], специфична површинска концентрација соли ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$). Елуент: ацетонитрил–водена фаза (pH 2,5 подешена са HCl) 10:90 (V/V), $t=25\text{ }^\circ\text{C}$

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)



Слика 26. Експерименталне тачке и адсорпционе изотерме испитиваних хаотропних соли (CF_3COONa , NaClO_4 , NaPF_6) дате једначином 28 за XТегга[®] С18 колону. [H], концентрација соли у мобилној фази (mM); [LH], специфична површинска концентрација соли ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$). Елуент: ацетонитрил–водена фаза (pH 2,5 подешена са HCl) 10:90 (V/V), $t=25\text{ }^\circ\text{C}$

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

Табела 15. Утицај хаотропних агенаса и хидрофобности стационарне фазе на параметре Фројндлихове адсорпционе изотерме и вредности површинског потенцијала

[H]	Колона	a [mM ^{-b}]	SE_a	b	SE_b	r	Ψ^o [mV]*
CF ₃ COONa	C8	2,33e-03	1,08e-04	8,33e-01	1,06e-02	0,9998	-14,5
	C18	2,84e-03	2,29e-04	8,03e-01	1,86e-02	0,9996	-15,3
NaClO ₄	C8	5,51e-03	5,83e-04	6,91e-01	2,47e-02	0,9988	-17,7
	C18	4,73e-03	7,88e-04	7,40e-01	3,87e-02	0,9976	-19,0
NaPF ₆	C8	1,54e-02	6,35e-03	5,99e-01	9,75e-02	0,9755	-31,1
	C18	1,51e-02	4,59e-03	6,58e-01	7,11e-02	0,9894	-38,7

*вредност површинског потенцијала (Ψ^o) израчуната је за [H]=100 mM

a , b – Фројндлихове константе; SE – стандардна грешка, r – коефицијент корелације

(Прилагођено из: A. Vemić, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

Како би се детаљније објаснио механизам ретенционог понашања позитивно наелектрисаних анализата (прамипексол и нечистоће II-V) извршено је моделовање ретенционих података према проширеном термодинамичком ретенционом моделу (једначина 29) [16, 32], како би се омогућио детаљан увид у механизам који је у основи хроматографског раздвајања. За израчунавање вредности f , узета је у обзир промена јонске јачине мобилне фазе која настаје услед промене концентрације додатог хаотропног агенса (једначина 46). Параметар c_1 одговара ретенционом фактору анализата када мобилној фази није додат хаотропни агенс и ове вредности су утврђене експериментално. Параметри c_2 и c_3 односе се на константе равнотеже формирања јонских парова на стационарној, односно у мобилној фази, а c_4 представља константу равнотеже адсорпције хаотропног реагенса на површину стационарне фазе. Како испитивани хаотропни реагенси нису изразито адсорбофилни, десни члан имениоца (једначина 29) није значајно различит од јединице, па је зато параметар c_4 изостављен из моделовања [32]. Вредности параметара модела и њихова статистичка процена дате су у табели 16, а графици зависности ретенционих фактора од концентрације хаотропних соли приказани су на слици 27 за C8 колону и на слици 28 за C18 колону.

Може се уочити да су вредности параметра c_2 , добијене за исти анализат и исту со на две различите колоне (C8 и C18), веће за колону са дужим алкил ланцем. Ово води закључку да већа хидрофобност колоне стимулише јонско спаривање на стационарној фази. Такође, највећа разлика у вредностима параметра c_2 са две колоне постигнута је када је NaPF_6 коришћен као хаотропни адитив. Ово се могло претпоставити и очекивати, будући да је према Хофмајстеровој серији ова со најјачи хаотроп са најизраженијим афинитетом за стационарну фазу. Коначно, утицај соли и колоне на вредност параметра c_2 био је најизраженији за нечистоћу V, тј. анализат са највећом $\log P$ вредношћу. Вредности параметра c_3 су међусобно упоредиве без великих разлика, сем у случају нечистоће V где је вредност параметра мања за ред величина или чак занемарљива. Такође, може се уочити блага тенденција повећања c_3 вредности са повећањем хаотропности соли.

Табела 16. Вредности параметара проширеног термодинамичког модела за дефинисање ретенционог понашања прамипексола и нечистоћа II–V након додатка различитих хаотропних агенаса у колонама различите хидрофобности

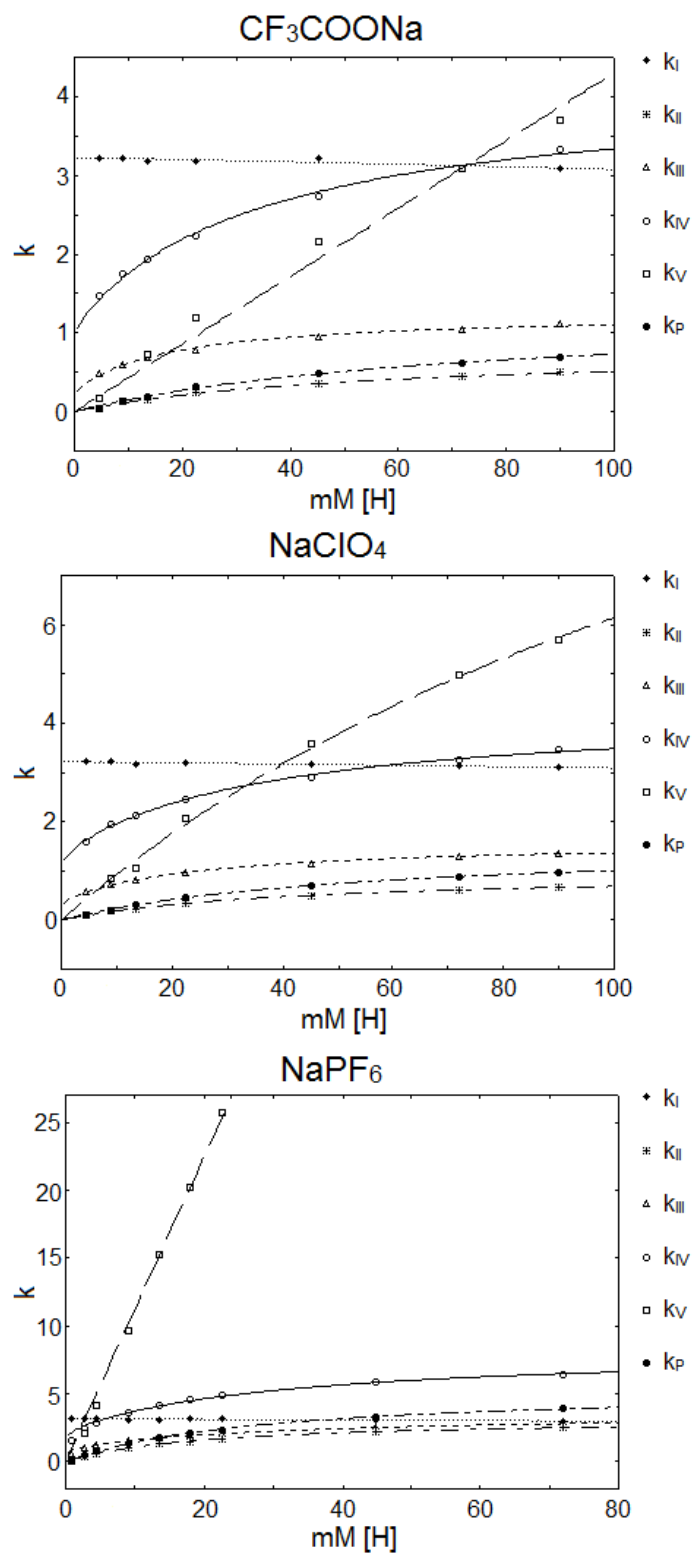
Со	Колона	Одговор	c_2	SE_{c_2}	c_3	SE_{c_3}	R^2	Број података
CF ₃ COONa	C8	k_{II}	0,014	0,002	0,018	0,003	0,9925	7
		k_P	0,017	0,002	0,014	0,002	0,9960	7
		k_{III}	0,057	0,005	0,047	0,005	0,9921	7
		k_{IV}	0,098	0,008	0,024	0,003	0,9949	7
		k_V	0,043	0,002	-	-	0,9825	7
	C18	k_{II}	0,019	0,003	0,011	0,004	0,9813	7
		k_P	0,029	0,004	0,012	0,004	0,9842	7
		k_{III}	0,113	0,02	0,059	0,009	0,9791	7
		k_{IV}	0,141	0,02	0,019	0,003	0,9926	7
		k_V	0,138	0,008	0,003	0,0009	0,9975	7
NaClO ₄	C8	k_{II}	0,023	0,002	0,024	0,003	0,9927	7
		k_P	0,028	0,002	0,018	0,002	0,9982	7
		k_{III}	0,047	0,003	0,030	0,003	0,9969	7
		k_{IV}	0,095	0,006	0,022	0,002	0,9979	7
		k_V	0,098	0,009	0,006	0,002	0,9942	7
	C18	k_{II}	0,043	0,007	0,033	0,009	0,9650	7
		k_P	0,045	0,003	0,019	0,003	0,9947	7
		k_{III}	0,102	0,009	0,044	0,005	0,9925	7
		k_{IV}	0,125	0,007	0,018	0,002	0,9985	7
		k_V	0,221	0,007	0,007	0,0006	0,9993	7
NaPF ₆	C8	k_{II}	0,163	0,005	0,051	0,003	0,9983	9
		k_P	0,194	0,006	0,036	0,002	0,9983	9
		k_{III}	0,071	0,02	0,020	0,007	0,9763	9
		k_{IV}	0,229	0,04	0,028	0,007	0,9814	9
		k_V	1,122	0,03	-	-	0,9945	7
	C18	k_{II}	0,338	0,02	0,058	0,004	0,9973	9
		k_P	0,412	0,02	0,040	0,003	0,9976	9
		k_{III}	0,148	0,02	0,030	0,004	0,9960	9
		k_{IV}	0,498	0,06	0,037	0,006	0,9905	9
		k_V	3,540	0,3	-	-	0,9706	4

*једначина 29

k_P , k_{II-V} – ретенциони фактори прамипексола и нечистоћа II–V;

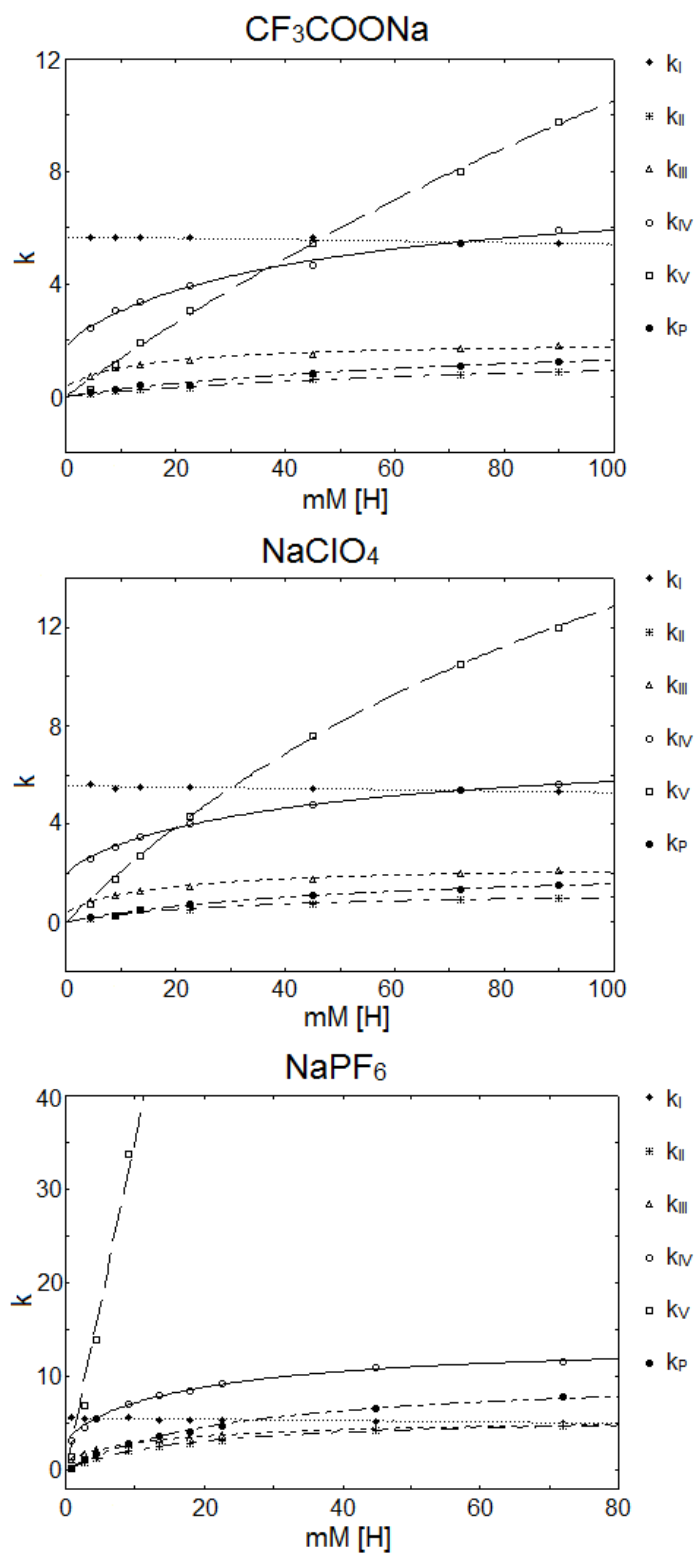
SE – стандардне грешке; R^2 – коефицијенти детерминације модела

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)



Слика 27. Експерименталне тачке и криве зависности ретенционих фактора (k) од концентрације хаотропног агенса ($[H]$) моделоване једначином 29 за прамипексол и нечистоће II–V; и једначином 48 за нечистоћу I. Колона: XTerra[®] C8

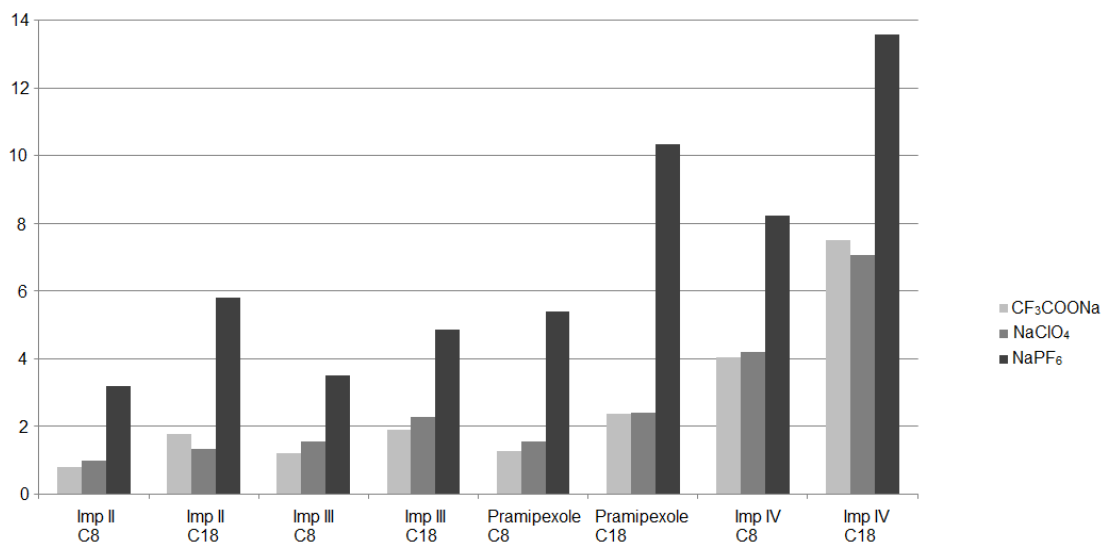
(Прилагођено из: А. Вемић, М. Калинић, С. Ерић, А. Маленовић, М. Меденица, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)



Слика 28. Експерименталне тачке и криве зависности ретенционих фактора (k) од концентрације хаотропног агенса ($[H]$) моделоване једначином 29 за прамипексол и нечистоће II–V; и једначином 48 за нечистоћу I. Колона: XTerra[®] C18

(Прилагођено из: А. Вемић, М. Калинић, С. Ерић, А. Маленовић, М. Меденица, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

На крају, занимљиво је обратити пажњу и на релативни значај c_2 у односу на c_3 , тј. на доминацију формирања јонских парова на стационарној фази у односу на спаривање у мобилној фази са порастом хидрофобности колоне, хаотропности соли и $\log P$ вредностима анализата (слика 29).



Слика 29. Промене односа c_2/c_3 са променом хидрофобности колоне, хаотропности соли и природе анализата

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

Посматрањем табеле 14 уочава се да се, за разлику од базних супстанци, вредност ретенционог фактора за нечистоћу **I** смањује. Питање које се намеће јесте да ли задржавање неутралних супстанци зависи од концентрације додате хаотропне соли и како. Могућност електростатских интеракција и формирања јонских парова не постоји, али може доћи до феномена површинске ексклузије између анализата и хаотропног агенса. Како би се размотрило у ком обиму овај феномен доприноси ретенционом механизму, експериментални ретенциони подаци за нечистоћу **I** су апроксимирани следећом једначином [99]:

$$k = \frac{c_1}{(1 + c_4[H] \exp(-z_H F a [H]^b g / RT))} \quad (48)$$

$$g = \frac{z_H F}{\kappa \epsilon_0 \epsilon_r} \quad (49)$$

где је g ($V \cdot m^2/mol$) константа која се може одредити из експерименталних услова, а κ је инверзна Дебајева дужина. Параметар c_1 представља ретенциони фактор анализата када елуент не садржи хаотропну со и може се експериментално одредити. Ипак, у овом случају c_1 је укључен у израчунавање као прилагодљив параметар, јер су тако добијени модели са најбољим вредностима коефицијената детерминације, а израчунате вредности параметра су хроматографски у доброј сагласности са експериментално добијеним вредностима. Параметар c_4 одговара константи равнотеже адсорпције хаотропне соли на стационарну фазу. Вредности израчунатих параметара, као и њихова статистичка процена, приказане су у табели 17. Због слабе адсорбофилности хаотропних соли, вредности параметра c_4 су веома мале, готово занемарљиве. Ипак, фитовање ретенционих података у ову једначину даје сасвим значајну корелацију, што омогућава објашњење смањења вредности ретенционог фактора, односно краћег задржавања анализата у колони са порастом концентрације хаотропног агенса.

Табела 17. Вредности параметара проширеног термодинамичког модела за дефинисање ретенционог понашања нечистоће I након додатка различитих хаотропних агенаса у колонема различите хидрофобности

Со	Колона	Одговор	c_1	SE_{c_1}	c_4	SE_{c_4}	R^2	Број података
CF ₃ COONa	C8	k_1	3,227	0,02	2,76e-04	0,8e-04	0,7350	7
	C18	k_1	5,673	0,03	2,58e-04	0,6e-04	0,8145	7
NaClO ₄	C8	k_1	3,217	0,01	2,02e-04	0,4e-04	0,8770	7
	C18	k_1	5,547	0,03	2,39e-04	0,5e-04	0,8483	7
NaPF ₆	C8	k_1	3,165	0,02	2,01e-04	0,5e-04	0,7592	9
	C18	k_1	5,576	0,03	2,82e-04	0,4e-04	0,9198	9

*једначина 48

k_1 – ретенциони фактор нечистоће I;

SE – стандардне грешке; R^2 – коефицијенти детерминације модела

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

4.2.3. Утицај структурних карактеристика анализата на ретенционо понашање

Следећи циљ ове студије био је да се испита утицај молекулске структуре прамипексола и његових нечистоћа на њихово ретенционо понашање. Иницијално, корелисане су вредности израчунатих молекулских дескриптора са експерименталним вредностима ретенционих фактора одређених у шест хроматографских система који су дефинисани комбинацијама две колоне различите хидрофобности (C8 и C18) и три хаотропне соли додате мобилној фази (100 mM CF₃COONa, 100 mM NaClO₄, 10 mM NaPF₆ у воденом делу мобилне фазе; за остале експерименталне услове погледати поглавље 3.4.3). Концентрација хаотропне соли коришћена за корелациону анализу изабрана је као максимална концентрација при којој се сви анализати елуирају за мање од 60 min. Иако је велики број молекулских дескриптора статистички значајно корелисан са ретенционим понашањем у сваком индивидуалном хроматографском систему, фокус је стављен на два дескриптора која су значајна у свих шест анализираних система (табела 18): број ароматичних веза (енг. *number of aromatic bonds* – N_{AB}) и парцијално негативно наелектрисана површина молекула (енг. *partially negatively charged surface area* – PNSA-1). Налаз да је N_{AB} добар предиктор задржавања анализата у колони није изненађујућ, с обзиром на то да повећање ароматичности анализата фаворизује дисперзивне интеракције са стационарном фазом. У складу са овим тумачењем, када се упореде β_1 вредности, јасно је да је зависно променљива (k) значајно осетљивија на варијације овог дескриптора у систему у коме је коришћена хидрофобнија C18 колона. С друге стране, значај PNSA-1 на први поглед није сасвим јасан јер се уочава да је овај дескриптор такође позитивно корелисан са ретенцијом, сугеришући да анализати са већом електронегативном површином показују дуже задржавање на стационарној фази. Овакав резултат се супротставља очекиваном закључивању, јер је познато да је ретенција у свим датим анализираним системима примарно вођена интеракцијама протонаног, позитивно наелектрисаног анализата са супротно наелектрисаним хаотропним агенсом.

Како би се проширила иницијална сазнања, сви израчунати дескриптори су корелисани са моделованим вредностима параметара c_2 и c_3 . Пошто ови параметри имају јасно физичко значење, идеја је била да се уочи које молекулске

карактеристике анализата доприносе јонском спаривању на стационарној, односно у мобилној фази. Анализом је утврђено да су PNSA-1 и дескриптор који је директно изведен из њега (енг. *weighted partially negatively charged surface area* – WNSA-1) високо корелисани са вредностима параметра c_2 , сугеришући да се PNSA-1 вероватно односи на неки аспект јонског спаривања на стационарној фази. Узимајући у обзир да транзитрна адсорпција хаотропа на површину стационарне фазе води формирању електричног двоструког слоја, постаје јасно да постоји образложење оваквог резултата утемељено у механизму. Наиме, док се позитивно наелектрисан део молекула спарује за негативно наелектрисаним хаотропом, електронегативни сегмент анализата може да ступи у интеракцију са супротно наелектрисаним јонима из Штерновог слоја. Међутим, оптималне Кулонове интеракције у оквиру електричног двослоја могу се догодити само када је електронегативни део анализата довољно изложен и удаљен од центра позитивног наелектрисувања, што се не може у потпуности објаснити само PNSA-1 дескриптором. Ово је најбоље илустровано на слици 30, где су дати молекулски модели прамипексола и нечистоћа II и III приказаних у протонованом облику са молекулским површинама обојеним тако да одражавају парцијална атомска наелектрисувања изведена AM1-BCC методом [100, 101] из структура оптимизованих у вакууму.

Све три супстанце имају једнако наелектрисување на рН 2,5; њихове вредности за PNSA-1 су 99,24 (прамипексол) 107,36 (нечистоћа II) и 126,75 (нечистоћа III) и могу бити добро раздвојене при већим концентрацијама хаотропног агенса. Иако је нечистоћа III мање липофилна од прамипексола, њено дуже задржавање у колони може се приписати специфичној дистрибуцији наелектрисувања, при чему је парцијално негативна површина насупрот позитивне шарже, што даље омогућава интензивирање Кулонових интеракција у електричном двослоју. С друге стране, суи конфигурација секундарне алкохолне групе и аминок групе нечистоће II резултује пројектовањем парцијално негативне површине у истом правцу као доминантно позитивна шаржа, што је у електричном двослоју мање електростатички повољно и резултује краћим ретенционим временима овог анализата. У складу са предложеним објашњењем, ароматични карактер нечистоће IV олакшава ефикасну делокализацију

наелектрисања, дајући високу вредност PNSA-1 146,24 и пожељну просторну раздвојеност супротно наелектрисаних површина, што заједно са липофилношћу ове супстанце даје добру основу за објашњење њеног дугог задржавања у колони.

Молекулски дескриптори који су добро корелисани са вредношћу параметра c_3 такође указују на значај начина дистрибуције наелектрисања анализата за његово ретенционо понашање. Ипак, за формирање јонских парова у мобилној фази, поларност молекула је релевантнија карактеристика од величине његове негативно наелектрисане површине. Већа раздвојеност наелектрисања, квантификована већим вредностима параметара поларности, позитивно је корелисана са афинитетом анализата према мобилној фази. Како интеракција хаотроп–аналит вероватно подразумева формирање контактнoг јонског пара, ови дескриптори могу објаснити термодинамички аспект разарања хидратационог омотача, који може бити повољнији код анализата са добро раздвојеним шаржама због непосреднијег приступа хаотропа. Такође, дескриптори који се односе на стварање водоничних веза (у системима са NaClO_4 у улози хаотропа) могу објаснити интезитет интеракција анализата са воденом средином.

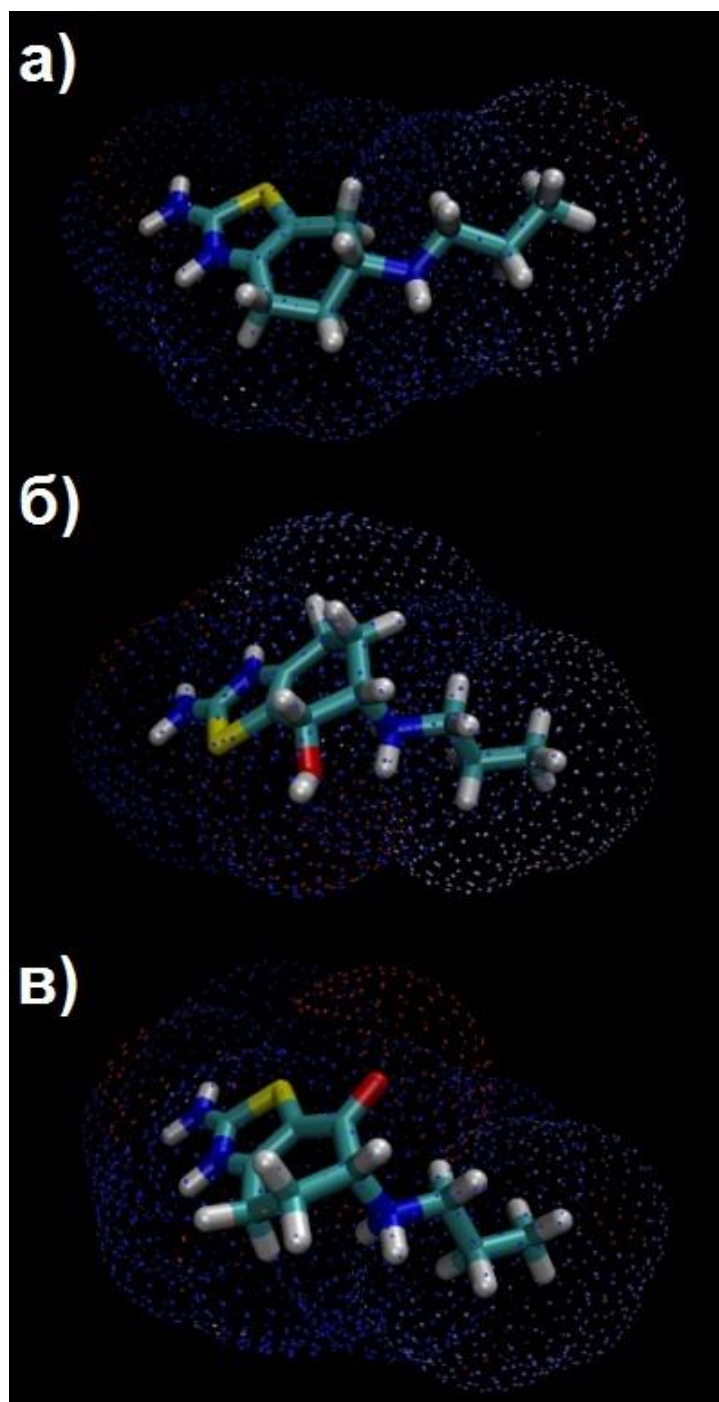
Укратко, резултати ове анализе структурних карактеристика који утичу на задржавање прамипексола и његових нечистоћа у хроматографским системима са хаотропним адитивима сугеришу да расподела наелектрисања и његова комплементарност структури електричног двоструког слоја, формираног на површини стационарне фазе, може бити од великог значаја за разумевање разлике у задржавању структурно сродних анализата. Претходна запажања која су изнели Цеки и сарадници [102], а која се односе на ретенционо понашање цвистерјона након додатка јон-интеракционих реагенаса пружају додатну подршку запажањима изнетим у овом раду. Мали број структура анализираних у овој студији онемогућава генерализацију изнетих закључака, али они пружају добру основу за даље истраживање. Наиме, молекулски дескриптор који би могао да узме у обзир и величину супротно наелектрисаних молекулских површина и њихов просторни однос према доминантној шаржи могао би се показати као користан и генерално применљив предиктор у студијама односа структуре и ретенционог понашања у сродним хроматографским системима.

Табела 18. Молекулски дескриптори корелисани са ретенционим факторима k и моделованим вредностима параметара c_2 и c_3

Хаотропни агенс	Ретенциони фактор k		Параметар c_2		Параметар c_3	
	C8	C18	C8	C18	C8	C18
CF ₃ COONa	N_{AB} $\beta_1 = 0,5274$ $\beta_0 = -1,8209$ $R^2 = 0,95$	N_{AB} $\beta_1 = 1,3426$ $\beta_0 = -5,4759$ $R^2 = 0,98$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0018$ $\beta_0 = -0,0856$ $R^2 = 0,87$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0023$ $\beta_0 = -0,2018$ $R^2 = 0,88$	μ $\beta_1 = 0,0077$ $\beta_0 = -0,0016$ $R^2 = 0,98$	$\beta-POL$ $\beta_1 = 0,0004$ $\beta_0 = 0,0657$ $R^2 = 0,88$
	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0590$ $\beta_0 = -5,6445$ $R^2 = 0,90$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,1435$ $\beta_0 = -14,3470$ $R^2 = 0,84$				
NaClO ₄	N_{AB} $\beta_1 = 0,7378$ $\beta_0 = -2,7332$ $R^2 = 0,97$	N_{AB} $\beta_1 = 1,5653$ $\beta_0 = -6,5086$ $R^2 = 0,93$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0014$ $\beta_0 = -0,1224$ $R^2 = 0,93$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0028$ $\beta_0 = -0,2472$ $R^2 = 0,88$	$HASA-2/TMSA$ $\beta_1 = 2,3226$ $\beta_0 = -0,0296$ $R^2 = 0,99$	$FHACA$ $\beta_1 = 1,1592$ $\beta_0 = -0,0008$ $R^2 = 0,95$
	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,0794$ $\beta_0 = -7,6782$ $R^2 = 0,85$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,1647$ $\beta_0 = -16,5160$ $R^2 = 0,77$				
NaPF ₆	N_{AB} $\beta_1 = 1,1818$ $\beta_0 = -4,8339$ $R^2 = 0,86$	N_{AB} $\beta_1 = 4,1858$ $\beta_0 = -19,5520$ $R^2 = 0,76$	$WNSA-I$ $\beta_1 = 0,0130$ $\beta_0 = -0,5043$ $R^2 = 0,92$	$WNSA-I$ $\beta_1 = 0,0044$ $\beta_0 = -1,8990$ $R^2 = 0,94$	P'' $\beta_1 = 0,0861$ $\beta_0 = -0,0271$ $R^2 = 0,75$	P'' $\beta_1 = 0,0841$ $\beta_0 = -0,0348$ $R^2 = 0,88$
	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,1214$ $\beta_0 = -12,0190$ $R^2 = 0,69$	$PNSA-I$ $\beta_1 = 0,4189$ $\beta_0 = -43,5690$ $R^2 = 0,57$				

β_1 – регресиони параметар одговарајућег молекулског дескриптора; β_0 – одсечак; R^2 – коефицијент детерминације; N_{AB} – број ароматичних веза (енг. *number of aromatic bonds*); $PNSA-I$ – парцијално негативно наелектрисана површина (енг. *partially negatively charged surface area*); $WNSA-I$ – укупном површином молекула (енг. *total molecular surface area* – TMSA) пондерисана парцијално негативно наелектрисана површина (енг. *weighted partially negatively charged surface area*) ($PNSA-I * TMSA / 1000$); μ – тотални молекулски дипол; $\beta-POL$ – хиперполаризабилност молекула првог реда (енг. *first-order hyperpolarizability of the molecule*); $HASA-2/TMSA$ – површином пондерисано површинско наелектрисање акцепторских атома водоничне везе, подељено са TMSA (енг. *area-weighted surface charge of hydrogen bonding acceptor atoms, divided by TMSA*); $FHACA$ – фракционом површином пондерисана H -акцепторска способност молекула (енг. *fractional area-weighted hydrogen bonding acceptor ability of the molecule*); P'' – параметар поларности ($Q_{max} - Q_{min}$) подељен квадратом растојања између најпозитивније (Q_{max}) и најнегативније (Q_{min}) шарже у молекулу

(Прилагођено из: A. Vemić, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)



Слика 30. Молекулски модели прамипексола (а), нечистоће **II** (б), и нечистоће **III** (в). Површине (приказане као обојене тачке) мапиране су коришћењем *1.4 Angstrom probe* и обојене према атомским шаржама, где црвене површине одговарају парцијално негативним, а плаве површине парцијално позитивним атомским шаржама. Структуре су оптимизоване AM1 семи-емпиријском методом у вакууму. Генерисано коришћењем VMD [103]

(Прилагођено из: **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, J. Chromatogr. A 1386 (2015) 39–46)

4.3 ХАОТРОПНЕ СОЛИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРАМИПЕКСОЛА И ЊЕГОВИХ НЕЧИСТОЋА ПРАТЕЋИ *QUALITY-BY-DESIGN* ПРИНЦИПЕ

Циљ ове студије јесте да се представи развој методе течне хроматографије пратећи принципе QbD концепта када се као адитиви мобилне фазе користе хаотропне соли на примеру прамипексола и његових пет нечистоћа. Основна идеја „квалитета кроз дизајн“ односно *Quality by Design* (QbD) приступа је управљање квалитетом и ризиком током самог развоја процеса и производа, што за крајњи циљ има побољшање квалитета производа, ефикасности процеса, као и регулаторне флексибилности.

4.3.1 Дефинисање циљаног аналитичког профила, критичних атрибута квалитета и критичних процесних параметара

Први корак у развоју методе према QbD принципима представља дефинисање циљаног аналитичког профила односно, дефинисање опсега и потребних критеријума карактеристика дате методе. У овом истраживању, као циљани аналитички профил постављени су ефикасно раздвајање и тачно одређивање прамипексола и његових пет нечистоћа из фармацеутског дозирањог облика. Критеријуми за процену карактеристика методе представљени су одговарајућим критичним атрибутима квалитета (CQA), а то су: задовољавајуће задржавање првог пика на стационарној фази, задовољавајућа раздвојеност суседних пикова, и адекватно укупно трајање анализе представљено ретенционим фактором анализе који се последњи елуира.

Како би се одредили критични процесни параметри (CPP) значајни за даље испитивање система, током прелиминарних студија процењено је неколико најзначајнијих хроматографских параметара, као што су: тип и хидрофобност реверзно-фазних стационарних фаза (*ZorbaxExtend* C18, *XBridge* C18, *Luna* C18, *XTerra* C18, *XTerra* C8), врста органског растварача (метанол, ацетонитрил), удео органског растварача у мобилној фази (5%–20% V/V), врста хаотропне соли (CF_3COONa , NaClO_4 , NaPF_6), концентрација хаотропне соли у воденом делу мобилне фазе (1 mM–100 mM), pH вредност воденог дела мобилне фазе (pH 2–6) и

температура колоне (од 20 °C до 40 °C). Такође, важно је било сагледати хемијске структуре и карактеристике анализата (слике 9 и 11). Све анализирани нечистоће могу настати као деградациони производи активне супстанце. Анализати се међусобно разликују по $\log P$ и $\log D_{pH2,5}$ вредностима и по броју базних центара. Због свог неутралног карактера, нечистоћа **I** је била потпуно неосетљива на промене рН и утицај примењених хаотропних соли. С друге стране, степен осетљивости осталих анализата у великој мери зависи од њихове структуре што даље утиче на селективност раздвајања. Нарочито су различите карактеристике неутралне нечистоће **I** и изузетно осетљиве нечистоће **V** водиле до промена у редоследу елуирања, што је условило избор критичних процесних параметара (CPPs). У овој иницијалној фази истраживања испитане су веома киселе рН вредности мобилне фазе при којима се базни анализати налазе у протонаном облику. Коначно, рН вредност је фиксирана на 2,5 зато што мале промене у тој области рН вредности не доводе до значајних промена у степену протоновања анализата, а тиме се поједностављује и дизајн експеримената. Даља модификација облика пика и задржавања анализата у колони може бити постигнута додатком хаотропних соли.

На основу свих налаза прелиминарних студија, одабрана су три нумеричка критична процесна параметра:

A: концентрација хаотропне соли (mM);

B: садржај ацетонитрила у мобилној фази (%);

C: температура колоне (°C);

и два категоричка критична процесна параметра:

D: хидрофобност стационарне фазе (*X*Terra C8 и C18);

E: врста хаотропне соли (CF_3COONa и $NaClO_4$)).

4.3.2 Испитивање експерименталног простора хеометријским приступом

Како би се истовремено проценио утицај и нумеричких и категоричких фактора кроз минималан број експеримената, за испитивање простора знања

одабран је D -оптимални дизајн. Креирање матрице дизајна подразумева претходно дефинисање математичког модела и одабир оптималног броја тачака дизајна. За сваки могући број експерименталних тачака компјутерски алгоритам генерише сет експерименталних тачака које најбоље задовољавају D -оптимални критеријум. Након тога треба одлучити који број тачака је оптималан када се узме у обзир потребан експериментални рад. У овом конкретном случају испитивана је потенцијална квадратна зависност критичних атрибута квалитета од одабраних критичних процесних параметара. Софтверски предложен број експеримената био је 24 плус 5 репликација у централној тачки. У поређењу са класичним факторским дизајном број потребних експеримената је значајно мањи. Наиме, за пун факторски дизајн било би потребно 108 експеримената плус репликације у централној тачки. План експеримената приказан је у табели 7. Као одговори система, праћени су ретенциони фактори анализе (табела 19).

Затим су дефинисани одговарајући математички модели према једначини:

$$\ln(k) = \beta_0 + \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C + \beta_4 \times D + \beta_5 \times E + \beta_{12} \times A \times B + \beta_{13} \times A \times C + \beta_{14} \times A \times D + \beta_{15} \times A \times E + \beta_{23} \times B \times C + \beta_{24} \times B \times D + \beta_{25} \times B \times E + \beta_{34} \times C \times D + \beta_{35} \times C \times E + \beta_{45} \times D \times E \quad (50)$$

где $\ln(k)$ представља логаритамски трансформисане одговоре, β_0 – β_{45} параметре модела, а А–Е претходно дефинисане испитиване факторе.

Након директног моделовања ретенционих фактора анализе, израчунати су преостали одабрани критични атрибути квалитета (фактори селективности за парове суседних пикова: $\alpha_1 = k_I/k_{IV}$, $\alpha_{11} = k_{IV}/k_I$, $\alpha_2 = k_V/k_{IV}$, $\alpha_{22} = k_{IV}/k_V$, $\alpha_3 = k_I/k_V$, $\alpha_{33} = k_V/k_I$). Директно моделовање фактора селективности се генерално не препоручује [104], нарочито у случају сепарационих проблема када супстанце мењају редослед елуирања услед различите осетљивости на ефекте критичних процесних параметара. Због тога су фактори селективности моделовани индиректно користећи моделе добијене за одговарајуће ретенционе факторе. Коефицијенти модела за кодиране вредности фактора укључени у дефинисање критичних атрибута квалитета приказани су у табели 20.

Табле 19. Експерименталне вредности ретенционих фактора (k)

№	k_p	k_I	k_{II}	k_{III}	k_{IV}	k_V
1	0,454	2,297	0,343	0,773	1,936	1,384
2	0,606	3,304	0,386	0,968	2,753	2,246
3	0,866	3,075	0,647	1,285	2,995	3,866
4	1,245	6,821	0,897	2,143	5,420	7,967
5	0,506	2,788	0,380	0,906	2,285	1,759
6	1,188	6,734	0,962	1,988	5,942	7,900
7	0,650	2,621	0,504	1,026	2,281	2,436
8	1,084	4,827	0,802	1,668	4,145	5,948
9	0,217	2,351	0,217	0,741	1,793	1,143
10	1,362	8,038	0,970	2,362	6,936	10,353
11	0,952	3,865	0,697	1,506	3,606	4,707
12	1,001	4,845	0,742	1,615	3,933	5,394
13	0,446	2,731	0,333	0,508	2,172	1,413
14	0,897	5,779	0,582	1,599	4,604	4,881
15	1,135	5,648	0,790	2,056	4,902	7,029
16	1,424	7,683	1,004	2,458	6,174	10,230
17	0,649	4,352	0,476	1,295	3,544	2,677
18	1,038	6,907	0,640	1,907	5,532	6,383
19	0,778	3,460	0,586	1,288	2,994	3,372
20	0,878	4,589	0,649	1,578	3,995	5,036
21	1,416	10,909	0,904	2,977	7,531	12,834
22	0,811	2,464	0,570	1,041	2,464	2,464
23	1,249	3,440	0,924	1,490	3,919	6,196
24	0,543	2,680	0,409	0,893	2,441	1,785
25	1,255	3,459	0,928	1,496	3,960	6,233
26	1,326	10,26	0,872	2,789	7,037	12,127
27	0,738	2,445	0,570	1,037	2,445	2,445
28	1,139	5,647	0,794	2,058	4,909	7,025
29	0,610	3,316	0,392	0,971	2,765	2,260

k_p , k_I , k_{II} , k_{III} , k_{IV} , k_V – ретенциони фактори прамипексола и нечистоћа I, II, III, IV и V

Табела 20. Коefицијенти модела за $\ln(k)$ и њихова статистичка процена

Коefицијенти	Модели			
	$\ln(k_I)$	$\ln(k_{II})$	$\ln(k_{IV})$	$\ln(k_V)$
β_0	1,484	-0,467	1,328	1,463
β_1	-0,010	0,264	0,080	0,256
β_2	-0,595	-0,490	-0,534	-0,848
β_3	-0,126	-0,117	-0,185	-0,203
β_4	0,270	0,206	0,251	0,401
β_5	0,002	0,173	0,034	0,206
β_{12}	0,027	0,258	0,033	0,102
β_{13}	0,019	0,243	0,029	0,060
β_{14}	0,019	0,173	0,030	0,072
β_{15}	0,006	-0,030	0,003	0,001
β_{23}	-0,052	-0,141	-0,037	-0,058
β_{24}	-0,110	-0,202	-0,099	-0,222
β_{25}	-0,032	-0,031	0,014	0,071
β_{34}	-0,012	-0,037	-0,018	-0,041
β_{35}	-0,010	-0,064	-0,040	-0,136
β_{45}	-0,003	-0,048	-0,019	-0,056
R²	0,9989	0,9953	0,9988	0,9994
Adj. R²	0,9977	0,9900	0,9974	0,9986
Pred. R²	0,9843	0,8372	0,9817	0,9924

k_I, k_{II}, k_{IV}, k_V – ретенциони фактори нечистоћа I, II, IV и V

(Прилагођено из: А. Вемић, Т. Ракић, А. Маленовић, М. Меденица, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

Изрaчунати коefицијенти такође приказују природу утицаја фактора на задржавање анализата у колони. Као што је и очекивано, утицај концентрације хаотропних соли на задржавање протонваних анализата је позитиван. Иако утицај ових соли на задржавање неутралне нечистоће I није значајан, занимљиво је уочити негативан предзнак одговарајућег коefицијента. Ово је у сагласности са налазима који се тичу утицаја јон-интеракционих реагенаса на неутралне молекуле. Теоријско објашњење оваквог понашања може бити пронађено у раду Цеки и сарадника [99], а анализа ретенционог понашања саме нечистоће дата је и у поглављу 4.2.

Како би се постигла истовремена оптимизација свих дефинисаних критичних атрибута квалитета ($\ln k_{II} > 0$, $\ln k_V < 2,5$ и све вредности $\alpha \geq 1,2$) за сваку комбинацију изабране стационарне фазе и хаотропног агенса (укупно 4), експериментални простор је подељен у мрежу дискретизацијом нумеричких параметара: концентрација хаотропних соли (mM) [35:3:65], садржај

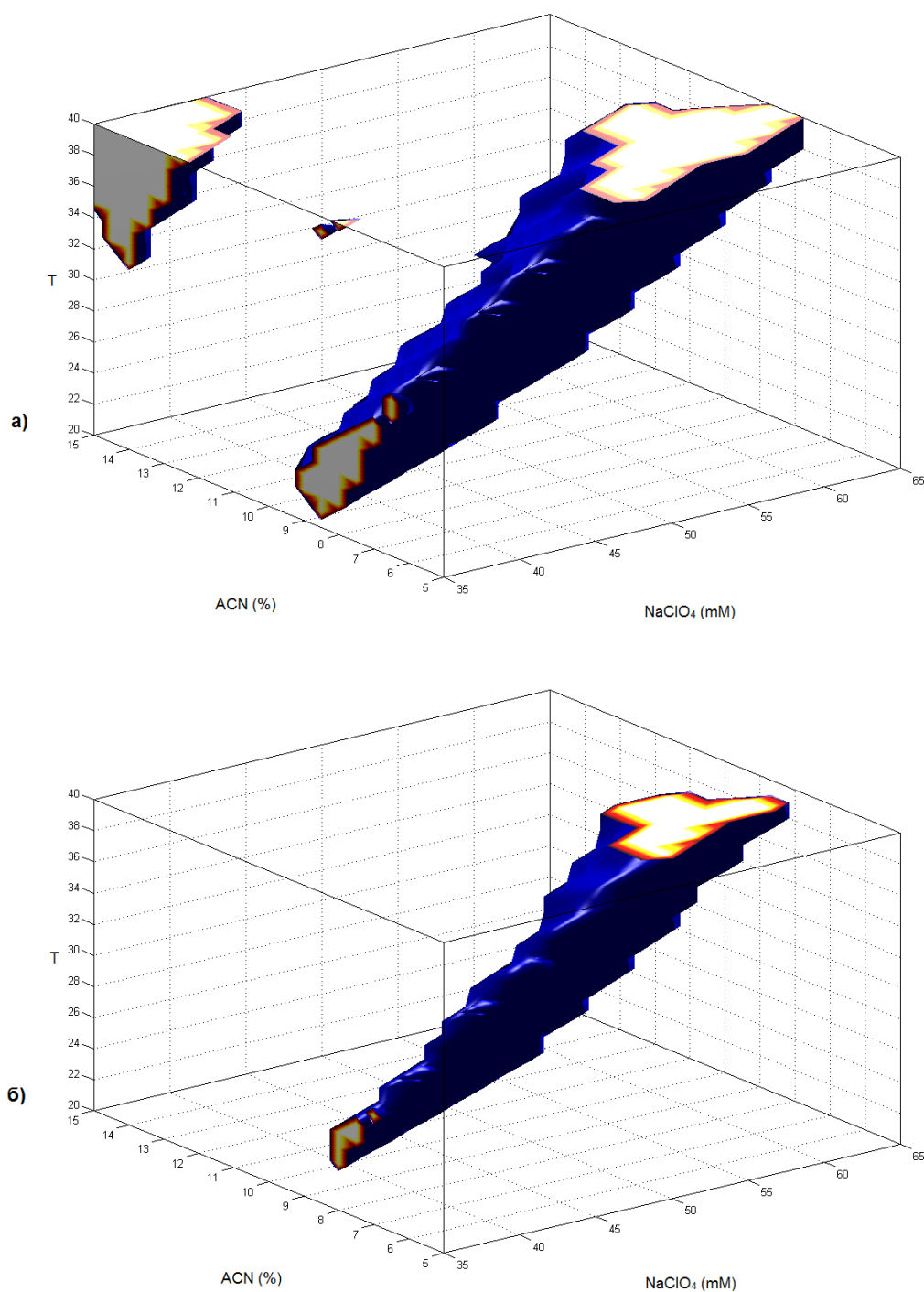
ацетонитрила (%) [5:0,5:15] и температура колоне (°C) [20:1:40]. Одговарајући број нивоа за сваки од испитиваних критичних процесних параметара био је 11, 21 и 21, односно, анализирана је 4851 тачка мреже за сваку комбинацију колоне и соли.

4.3.3 Дефинисање *design space*-а и одабир радне тачке

Поштујући QbD принципе, део експерименталног простора у коме сви критични атрибути квалитета испуњавају захтеве није довољан за дефинисање DS. Због тога је важно пружити гаранцију квалитета, односно израчунати вероватноћу са којом критични атрибути квалитета постижу задовољавајуће вредности. На основу израчунате вероватноће може се проценити ризик да се постављеном методом не добију дефинисане вредности одговора. Један од начина процене ризика је примена Монте Карло симулација за пропагирање грешке која утиче на предвиђене одговоре. У овом истраживању упоређена су два приступа:

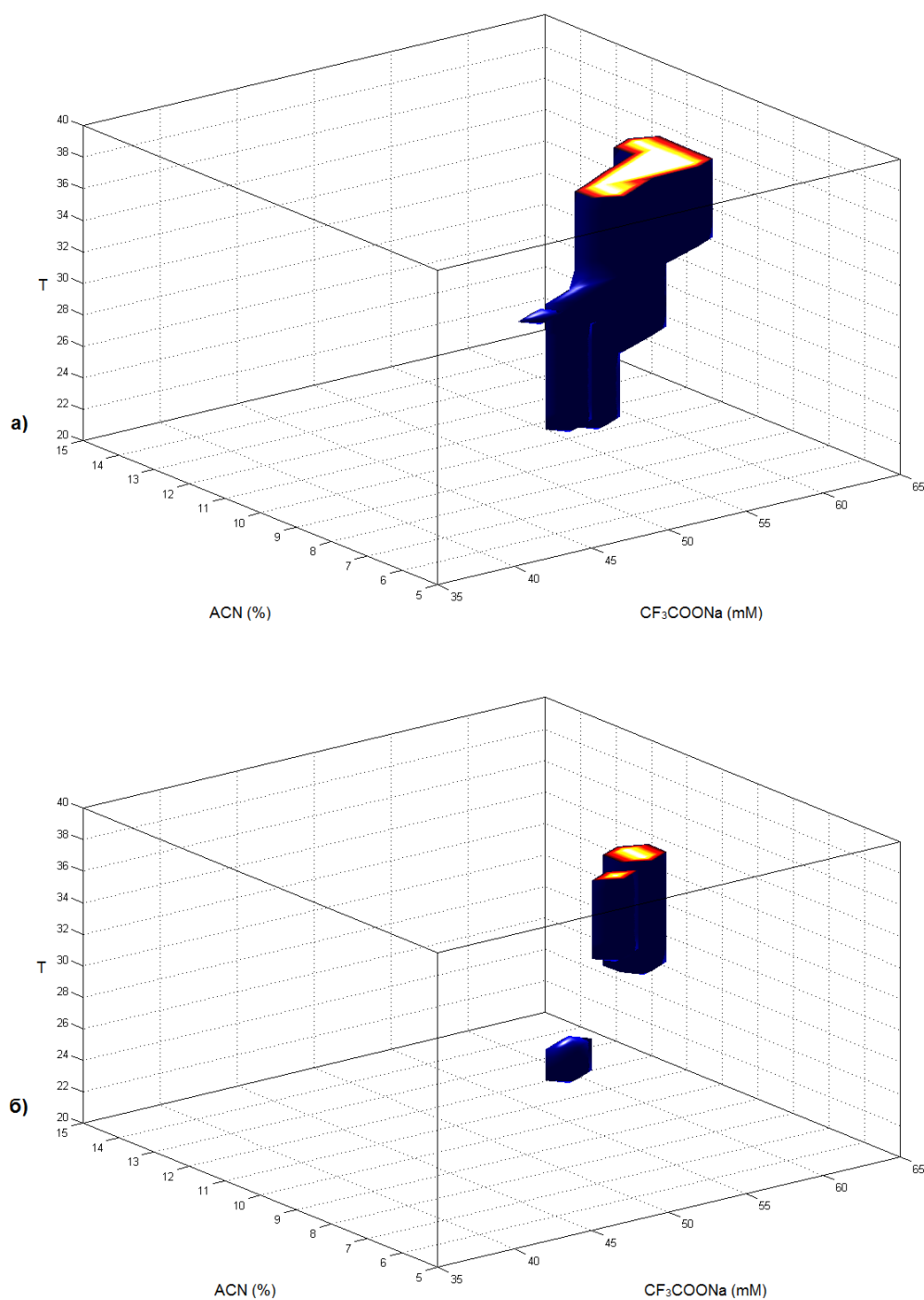
1. пропагирање грешке која је једнака варијанси резидуала модела, када је дистрибуција грешке додата предвиђеним одговорима [67, 68],
2. пропагирањем грешке која потиче из израчунавања коефицијената модела, када је дистрибуција грешке једнака израчунатим стандардним грешкама додата вредностима коефицијената модела [63].

У оба случаја извршена је Монте Карло симулација од 10000 итерација, и добијена је дистрибуција одговора за сваку тачку дискретизоване мреже. Дефинисани су региони експерименталног простора у коме сви атрибути квалитета имају задовољавајуће вредности са жељеним нивоом квалитета (вероватноћа $\pi \geq 95\%$). Само су за хроматографске услове на C18 колони добијени одговарајући простори дизајна, односно *design spaces*. На слици 31 приказано је поређење DS-а генерисаног првим и другим приступом процене несигурности модела за комбинацију C18 колоне са NaClO₄, а на слици 32 за комбинацију C18 колоне са CF₃COONa.



Слика 31. 3D приказ *design space*-а (C18 колона и NaClO₄) за жељене атрибуте квалитета (CQA: $\ln k_{II} > 0$, $\ln k_V < 2,5$ и сваки $\alpha \geq 1,2$) постигнуте са вероватноћом $\pi \geq 95\%$: **а)** пропагирањем грешке једнаке варијанси резидуала; **б)** пропагирањем грешке која потиче из израчунавања коефицијената модела

(Прилагођено из: A. Vemić, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

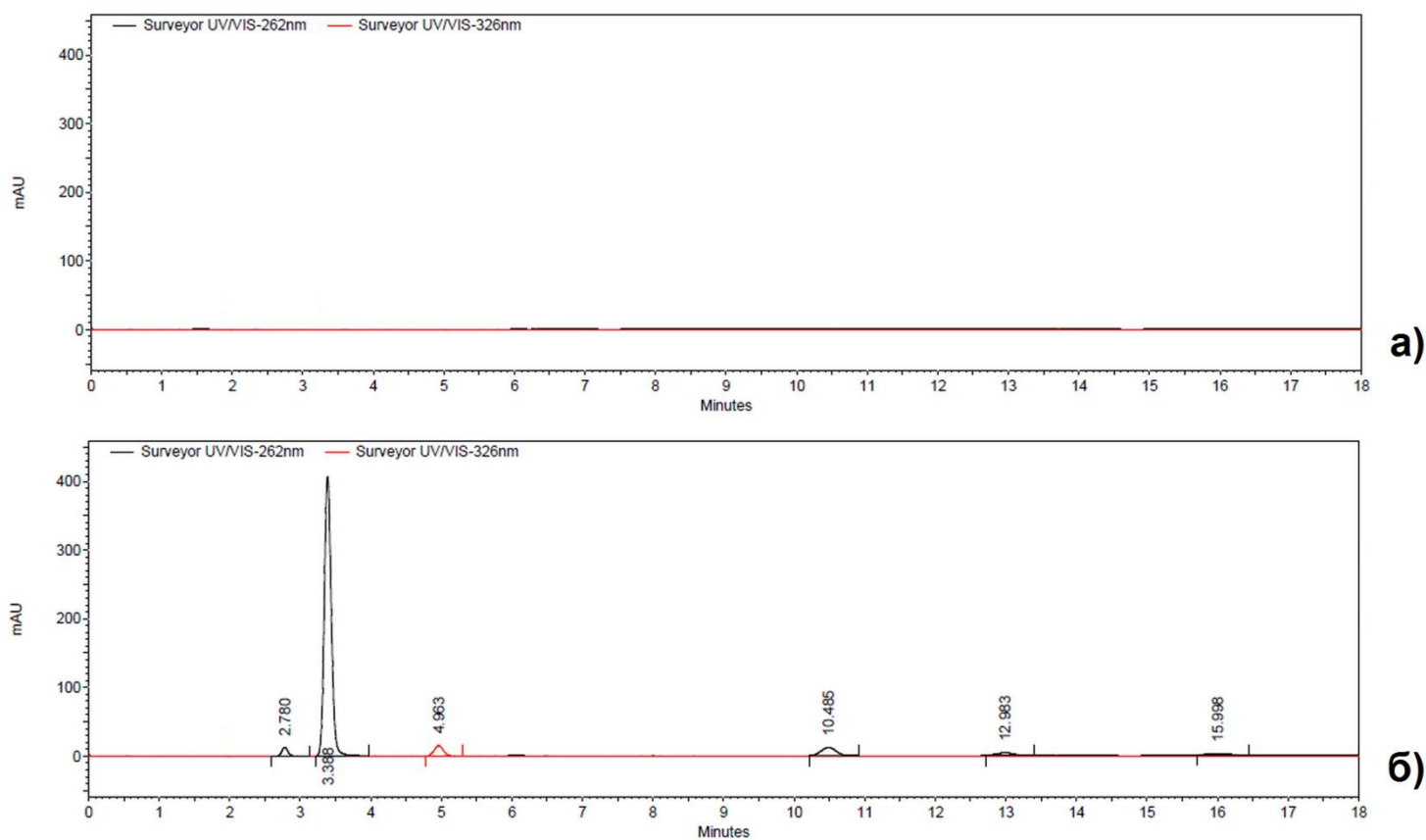


Слика 32. 3D приказ *design space*-а (C18 колона и CF₃COONa) за жељене атрибуте квалитета (CQA: $\ln k_{II} > 0$, $\ln k_V < 2,5$ и сваки $\alpha \geq 1,2$) постигнуте са вероватноћом $\pi \geq 95\%$: **а)** пропагирањем грешке једнаке варијанси резидуала; **б)** пропагирањем грешке која потиче из израчунавања коефицијената модела

(Прилагођено из: A. Vemić, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

Као што се са слика јасно види, *design space* добијен другим приступом је ужи указујући на стриктнија ограничења када се узме у обзир грешка која потиче из израчунавања коефицијената модела. Ово је логично, будући да такав приступ обухвата више извора варирања који потичу од десет коефицијената модела, али води и до веће поузданости дефинисаног DS.

Било која тачка у оквиру *design space*-а може бити одабрана за радну тачку. То може бити тачка са најбољим вредностима неког критичног атрибута квалитета или тачка која је најпогоднија за експериментално извођење. У овом случају, одабрана је тачка која захтева најмањи утросак енергије и реагенаса: колона C18, 41 mM NaClO₄ у воденом делу мобилне фазе, 8% ACN (v/v) и температура колоне 25 °C. Потребно је обратити пажњу да је облик региона који испуњава све дефинисане критеријуме ирегуларан што се лако може уочити посматрањем *design space*-а приказаних на сликама 31 и 32. Због тога, мале промене у вредностима хроматографских параметара могу довести до нежељених вредности одговора. Зато је извршена Монте Карло симулација пропагирања грешке са фактора на одговоре, тако што је вредност хроматографског параметра замењена вредношћу из униформне дистрибуције грешке која се може јавити у рутинској лабораторијској примени методе: ± 1 mM NaClO₄, $\pm 0,1\%$ ACN и ± 1 °C. За одабране одговоре, вероватноће за постизање жељених вредности критичних атрибута квалитета биле су $\pi_{\ln(k_{II})}=100\%$, $\pi_{\ln(k_V)}=99,5\%$, $\pi_{\alpha_1}=100\%$, $\pi_{\alpha_{33}}=100\%$, док је укупна вероватноћа за истовремено постизање жељених вредности свих критичних атрибута квалитета била $\pi=99,5\%$, тиме потврђујући робусност одабране тачке. Хроматограм лабораторијске смеше приказан је на слици 33. Предвиђене (k_p) и експериментално (k_e) добијене вредности критичних атрибута квалитета ($k_{IIp}=1,13$, $k_{IIe}=1,04$; $k_{Vp}=11,45$, $k_{Ve}=10,75$; $\alpha_{1p}=1,23$, $\alpha_{1e}=1,24$; $\alpha_{33p}=1,38$, $\alpha_{33e}=1,23$) су у сагласности и испуњавају претходно дефинисане захтеве тиме још једном потврђујући квалитет развијене методе.



Слика 33. Хроматограм снимљен при хроматографским условима датим изабраном радном тачком: ацетонитрил-водена фаза (41 mM NaClO₄, рН подешен на 2,5 хлороводоничном киселином) 8:92 (v/v): а) плацебо; б) лабораторијска смеша – нечистоћа **II** (t_r 2,780 min), прамипексол (t_r 3,386 min), нечистоћа **III** (t_r 4,963 min), нечистоћа **IV** (t_r 10,485 min), нечистоћа **I** (t_r 12,983 min), нечистоћа **V** (t_r 15,998 min)

(Прилагођено из: **A. Vemić**, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

4.3.4 Валидација методе

На крају, спроведена је валидација развијене методе. Поређењем хроматограма плацеба и лабораторијске смеше утврђено је да нема значајних интерферирајућих пикова који потичу из плацеба на ретенционим временима анализата. Овим је потврђена селективност методе.

Ради процене осетљивости методе, из односа шума и сигнала дефинисани су лимити детекције (LOD) и лимити квантификације (LOQ) за нечистоће. Однос сигнала и шума од 3:1 се генерално сматра прихватљивим за процену вредности LOD, док за процену LOQ тај однос треба да буде 10:1 (табела 21).

Успостављене су линеарне зависности између површине пикова и концентрације прамипексола и свих анализираних нечистоћа. Израчунати регресиони параметри испуњавају критеријуме за линеарност и приказани су у табели 21 [96].

Процена прецизности методе извршена је израчунавањем релативне стандардне девијације (RSD): прамипексол (1,57%), нечистоћа I (7,76%), нечистоћа II (5,10%), нечистоћа III (7,55%), нечистоћа IV (8,06%) и нечистоћа V (4,29%). Добијене вредности испуњавају задате критеријуме (RSD<2% за активне супстанце и RSD<15% за сродне супстанце) [96].

Тачност предложене методе процењена је на основу добијених *Recovery* вредности за лабораторијску смешу. Резултати су приказани у табели 21 и сви одговарају дефинисаним границама [96].

Табела 21. Параметри валидације методе

Аналит	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Линеарност			Тачност		
		Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	a	b	r	Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery* (%)
Прамипексол	-	30–300	43,885	-494,673	0,9958	160	100,1
						200	98,0
						240	99,5
Нечистоћа I	0,03	0,1–1,0	60,613	-1,044	0,9937	0,1	127,8
						0,8	105,7
						0,96	115,4
Нечистоћа II	0,03	0,1–1,0	54,364	0,899	0,9972	0,1	71,1
						0,8	83,1
						0,96	86,5
Нечистоћа III	0,03	0,1–1,0	138,270	-2,482	0,9905	0,1	78,2
						0,8	73,1
						0,96	88,8
Нечистоћа IV	0,03	0,1–1,0	123,897	2,482	0,9993	0,1	79,5
						0,8	96,3
						0,96	98,6
Нечистоћа V	0,03	0,1–1,0	44,481	1,724	0,9903	0,1	74,4
						0,8	90,0
						0,96	98,3

a – нагиб, b – одсечак, r – коефицијент корелације (> 0,99 за активне супстанце; > 0,98 за нечистоће)

*Recovery: прихватљива вредност 98,0%–102,0% за активне супстанце; 70,0%–130,0 % за нечистоће

(Прилагођено из: **A. Vemić**, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 314–320)

4.4 ХАОТРОПНИ АГЕНСИ У РАЗВОЈУ МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ЗА ИСТОВРЕМЕНУ АНАЛИЗУ ЛЕВОДОПЕ, КАРБИДОПЕ, ЕНТАКАПОНА И ЊИХОВИХ НЕЧИСТОЋА

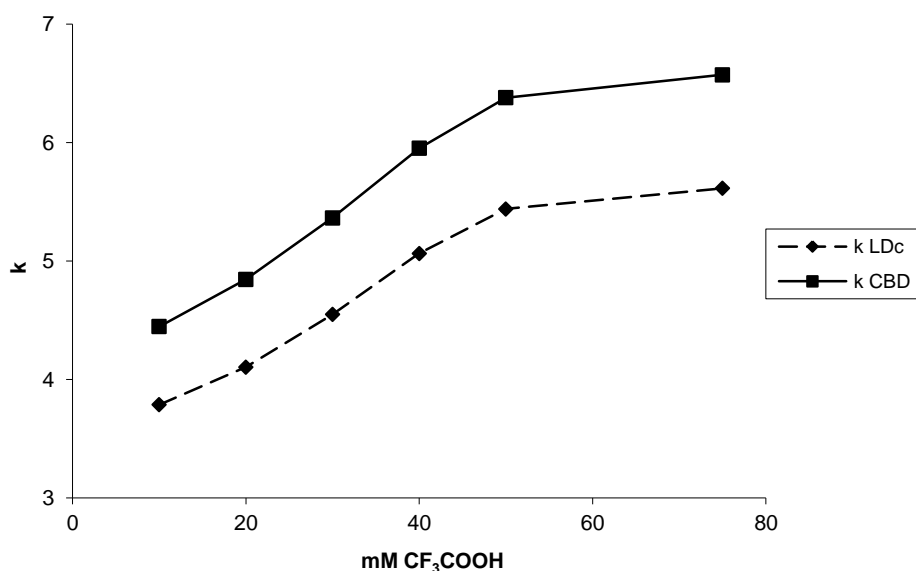
4.4.1 Уводна испитивања

У терапији Паркинсонове болести леводопа се обично примењује у комбинацији са инхибиторима допа-декарбоксилазе као што је карбидопа и, у новије време, са инхибиторима катехол-О-метил-трансферазе као што је ентакапон. Управо из тих разлога, развијени су комбиновани дозирани облици ових лекова и на тржишту су присутни у различитим јачинама. Са аналитичког аспекта, овакви мултикомпонентни лекови представљају изазов због извесног броја нечистоћа које могу пратити сваку активну компоненту и тако повећати укупан број анализата у узорку.

Још један изазов у раздвајању ових супстанци јесте разлика у њиховој поларности и киселости/базности. Наиме, леводопа, карбидопа и њихове нечистоће су слабе базе, док су ентакапон и његове нечистоће слабе киселине. При вишим рН вредностима мобилне фазе, леводопа, карбидопа и њихове нечистоће биле би у молекулском облику, док би ентакапон и нечистоће били у јонизованом облику. У реверзно-фазном хроматографском систему то би могло да омогући задовољавајуће раздвајање компонената смеше, али би, са друге стране, вероватно захтевало доста дуго трајање анализе. Такође, више рН вредности мобилне фазе могу неповољно утицати на стабилност колоне што овај сепарациони проблем чини додатно компликованим. Друга могућност јесте снижавање рН вредности мобилне фазе. При оваквим условима, базни анализати ће бити протонисани што може довести до незадовољавајућег задржавања у колони, односно елуирања у близини пика мобилне фазе чак и при малим процентима органског растварача. У таквом случају, додатком хаотропних агенаса мобилној фази могуће је утицати на задржавање анализата у реверзно-фазном хроматографском систему и тако постићи задовољавајуће раздвајање.

За постизање жељене рН вредности, испитане су *орто*-фосфорна, трифлуоросирћетна и перхлорна киселина. Како би се успешно раздвојио

критичан пар LD_C/CBD (скраћенице назива анализата дате у поглављу 3.2.1) било је неопходно да се рН вредност спусти на 2,0. Уочено је да, у зависности од употребљене киселине, селективност раздвајања између ова два пика варира што је управо последица различитих хаотропних својстава киселина, а у сагласности је са њиховим положајем у Хофмајстеровој серији. Трифлуоросирћетна киселина је одабрана као најпогоднији агенс зато што омогућава задовољавајуће раздвајање критичног пара пикова, а не доводи до значајног подизања базне линије које је уочено након додатка перхлорне киселине у водени део мобилне фазе. Даља истраживања су обављена у циљу испитивања хаотропног ефекта трифлуоросирћетне киселине на задржавање критичног пара пикова (LD_C/CBD), затим разјашњавања њеног ефекта на раздвајање, и коначно, одређивања одговарајуће концентрације трифлуоросирћетне киселине у воденом делу мобилне фазе. Како је било неопходно да рН вредност мобилне фазе буде 2,0 одржавана је на константном нивоу додатком одговарајуће количине натријум-хидроксида у раствору растуће концентрације трифлуоросирћетне киселине. Ови експерименти изведени су изократски (метанол–водена фаза, 10:90 V/V). На слици 34 представљена је зависност ретенционих фактора за LD_C и CBD од повећања концентрације трифлуоросирћетне киселине.



Слика 34. Ретенциони фактори нечистоће леводопе и карбидопе у функцији концентрације трифлуоросирћетне киселине

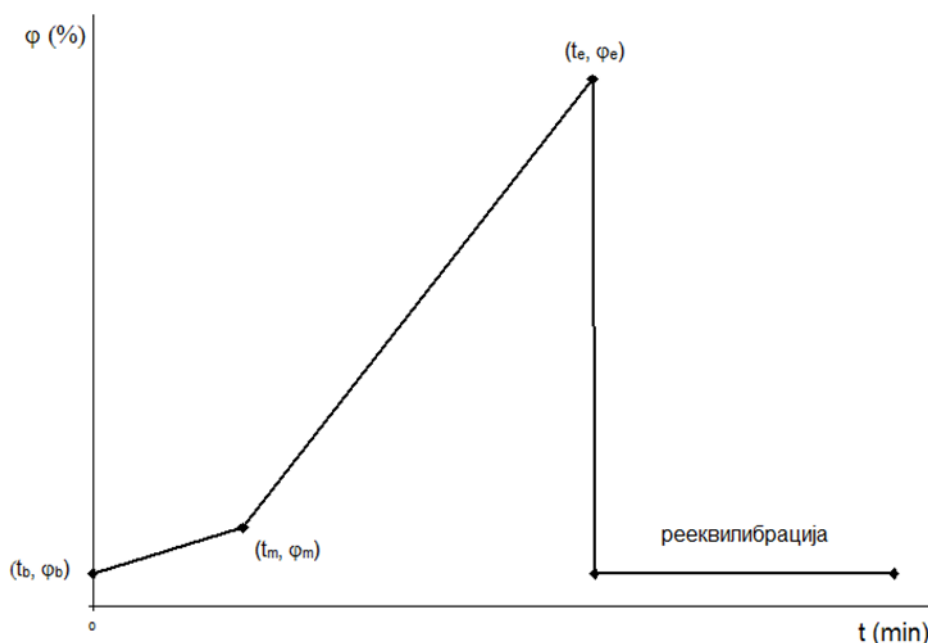
(Из: А. Вемић, В. Јанчић Стојановић, И. Стаменковић, А. Маленовић, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 77 (2013) 9–15)

Запажа се да мале промене у концентрацији анјона доводе до значајних промена у задржавању анализата, док се у области већих концентрација уочава ефекат засићења. Узимајући у обзир вредност фактора селективности који је на константном нивоу у целој испитаној области концентрација од 20 mM трифлуоросирћетне киселине изабрана је за наредне експерименте.

4.4.2 Оптимизација програма градијента

На основу уводних испитивања закључено је да се за анализу испитиване смеше једињења мора применити градијентно елуирање. Утврђено је да нагиб градијента треба да буде тако подешен да пикови који се брзо елуирају (LD , LD_B , MD , LD_C и CBD) буду задовољавајуће раздвојени, али и да се укупно трајање анализе максимално скрати. Из тог разлога, било је неопходно развити двосегментни градијентни програм. У циљу добијања података погодних за објективно сагледавање и процену фактора који утичу на систем, примењен је експериментални дизајн. Испитивани су параметри који одређују нагиб сваког сегмента градијента: t_m – време на крају првог сегмента (фактор x_1), ϕ_m – удео метанола у мобилној фази на крају првог сегмента (фактор x_2) и ϕ_e – удео метанола у мобилној фази на крају другог сегмента (фактор x_3). Процент метанола на почетку програма ($t_b = 0$) фиксиран је на $\phi_b = 5\%$ као најмањи удео органског растварача који омогућава прихватљиво ретенционо понашање леводопе, а уједно спречава оштећење $C18$ колоне током фазе рееквилибрације система. Такође, према иницијалним резултатима и ретенционом времену пика који се последњи елуира, t_e , време на крају другог сегмента, подешено је на 25 min. Слика 35 приказује шему градијента.

Одабрани параметри варирано су према експерименталном плану дефинисаном Бокс-Бенкеновим дизајном (енг. *Box-Behnken design* – BBD). Експериментални опсежи варирања фактора одабрани су на основу уводних испитивања, а план експеримента дат је у табели 8.



Слика 35. Шематски приказ програма градијента. Параметри који одређују нагибе сегмената градијента: t_b и φ_b – време и удео метанола на почетку првог сегмента; t_m и φ_m – време и удео метанола на крају првог сегмента; t_e и φ_e – време и удео метанола на крају другог сегмента

(Из: **A. Vemić**, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

Хроматографски одговори који су праћени били су фактори сепарације $s=t_{2b}-t_{1e}$ између суседних пикова MD/LD_C, LD_C/CBD, 3-ОМС/EN_C и EN_A/EN, где t_{1e} представља крај првог пика, а t_{2b} почетак другог пика. За $s \geq 0$, сматра се да је раздвајање задовољавајуће.

Како би се истовремено проценили сви одговори и донео закључак о оптималном програму градијента, примењена је глобална Дерингерова функција пожељних одговора D (једначина 41). Ова функција је функција циља и представља геометријску средину свих трансформисаних одговора, где d_i представља појединачну функцију пожељних одговора за сваки одговор добијен трансформацијом појединачног експерименталног одговора, а n је број одговора. Бездимензиона скала пожељних одговора креће се од $d=0$ за непожељне одговоре до $d=1$ за потпуно пожељне одговоре. Међутим, у овој студији дефинисан је опсег скале од 0,01 до 1, зато што је за многе експерименте израчуната вредност

глобалне функције пожељних одговора (D), када се користио опсег $d=[0, 1]$, била једнака 0 што је резултовало невалидним моделима. Експериментално добијени параметри s (табела 22) трансформисани су у појединачне функције пожељних одговора d . Како је циљ оптимизације максимизација раздвајања између суседних анализираних пикова, трансформација експериментално добијених одговора је извршена према једначини за максимизацију (једначина 43) [55]. Вредности за доњу (L_i), горњу (U_i) и циљану (T_i) вредност за све трансформисане одговоре су дефинисане на основу добијених експерименталних резултата и приказане су у табели 23 заједно са изабраним вредностима за тежину w којом се дефинише значај достизања циљане вредности. Према овим вредностима израчунате су вредности појединачних функција пожељних одговора за сва четири одговора система, као и вредност глобалне функције пожељних одговора (табела 22).

У следећем кораку, вредности глобалне функције одговора добијене за сваки експеримент (табела 22) коришћене су као коначан одговор хроматографског система. Дефинисање оптималних услова извршено је методологијом површине одговора. Предложени математички модел који описује дати Бокс-Бенкенов дизајн је квадратни полином другог реда:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (51)$$

где y представља експериментални одговор (вредност глобалне функције пожељних одговора D добијена претходним трансформацијама), x је независно променљива, односно испитивани фактор ($x_1=t_m$, $x_2=\phi_m$ и $x_3=\phi_c$), b_0 је просечна вредност експерименталних одговора, коефицијенти b_1 , b_2 и b_3 су процењени ефекти анализираних фактора, док коефицијенти b_{12} , b_{13} и b_{23} представљају интеракције два фактора.

Табела 22. Вредности експериментално добијених параметара s и израчунате вредности појединачне (d) и глобалне (D) функције пожељних одговора

№	$s_{(MD/LDC*)}$	$s_{(LDC/CBD)}$	$s_{(3-OMC/ENC)}$	$s_{(ENA/EN)}$	$d_{(MD/LDC)}$	$d_{(LDC/CBD)}$	$d_{(3-OMC/ENC)}$	$d_{(ENA/EN)}$	D
1.	0,13	0,217	0,380	1,038	0,2500	0,6700	0,3873	0,8667	0,4869
2.	0,364	0,273	0,379	0,752	1,0000	1,0000	0,3808	0,3326	0,5966
3.	0,018	0,135	0,855	0,891	0,0100	0,0100	1,0000	0,6375	0,0894
4.	0,076	0,280	0,449	0,697	0,0100	1,0000	0,7036	0,0100	0,0916
5.	0,047	0,172	0,65	1,178	0,0100	0,2200	1,0000	1,0000	0,2166
6.	0,239	0,255	0,331	0,700	1,0000	1,0000	0,0100	0,0100	0,1000
7.	0,07	0,174	0,859	0,805	0,0100	0,2400	1,0000	0,4726	0,1835
8.	0,072	0,229	0,391	0,725	0,0100	0,7900	0,4528	0,2306	0,1695
9.	0,164	0,390	0,524	0,778	0,5333	1,0000	0,9327	0,4074	0,6709
10.	0,078	0,164	0,587	1,080	0,0100	0,1400	1,0000	0,8992	0,1884
11.	0,212	0,415	0,513	1,092	0,9333	1,0000	0,9028	0,9133	0,9366
12.	0,117	0,225	0,604	0,727	0,1417	0,7500	1,0000	0,2397	0,3995
13.	0,163	0,249	0,449	0,755	0,5250	0,9900	0,7036	0,3421	0,5947
14.	0,119	0,231	0,482	1,055	0,1583	0,8100	0,8124	0,8691	0,5486
15.	0,182	0,298	0,621	0,795	0,6833	1,0000	1,0000	0,4496	0,7445

*скраћенице назива анализата дате у поглављу 3.2.1

(Прилагођено из: **A. Vemić**, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

Табела 23. Критеријуми за трансформацију хроматографског параметра s према функцији пожељних одговора

Y_i	L_i	U_i	T_i	w
$S_{(MD/LDC)}$	0,10	0,364	0,22	1
$S_{(LDC/CBD)}$	0,15	0,415	0,40	1
$S_{(3-OMC/ENC)}$	0,35	0,859	0,55	0,5
$S_{(ENA/EN)}$	0,70	1,178	1,15	0,5

Y_i – експериментално добијен одговор

L_i , U_i и T_i – доња, горња и циљана вредност пожељна за одговор Y_i

w – тежински фактор

(Из: А. Вемић, В. Јанчић Стојановић, И. Стаменковић, А. Маленовић, Ј. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

ANOVA тестом потврђено је да математички модел адекватно описује систем. Вредност *lack of fit* није била значајна, а коефицијент детерминације је имао задовољавајућу вредност ($R^2 = 0,9481$). Коначна једначина за кодиране вредности фактора је следећа:

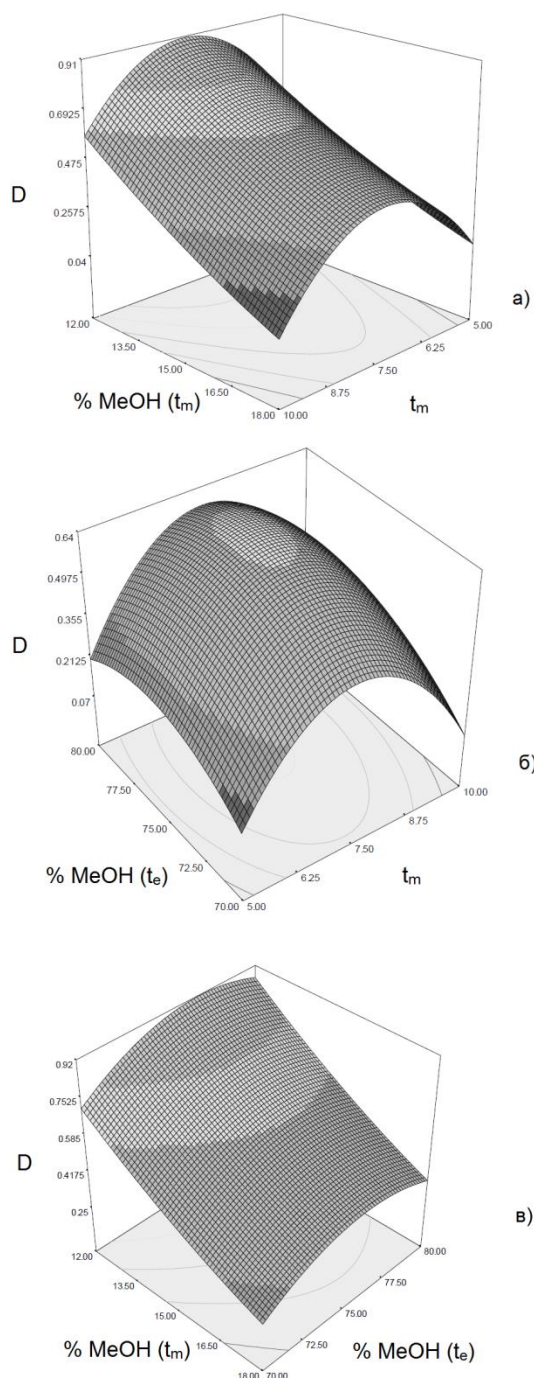
$$D = +0,36 - 0,002x_1 - 0,24x_2 + 0,064x_3 - 0,027x_1x_2 + 0,026x_1x_3 - 0,014x_2x_3 - 0,35x_1^2 + 0,034x_2^2 - 0,11x_3^2 \quad (52)$$

Конструисани 3D графикони површине одговора као функције испитиваних фактора (слика 36) омогућили су дефинисање оптималних хроматографских услова. Коначан програм градијента дат је у табели 24.

Табела 24. Оптимални програм градијента

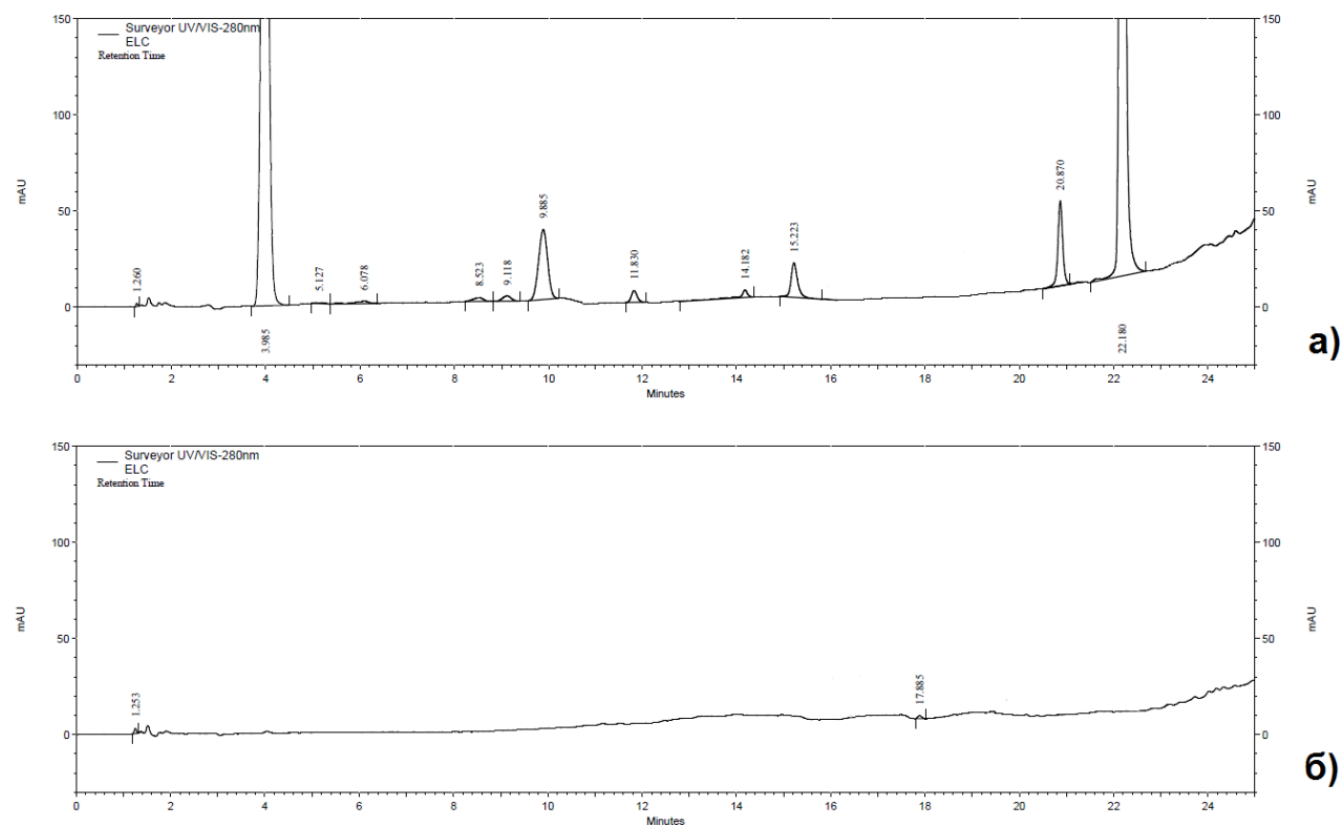
t (min)	% MeOH	% 20 mM CF ₃ COONa (pH 2,0 подешена NaOH)
0,01	5	95
7,50	12	88
25,00	77	23
25,01	5	95
40,00	5	95

(Из: А. Вемић, В. Јанчић Стојановић, И. Стаменковић, А. Маленовић, Ј. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)



Слика 36. 3D графици површине одговора: а) $D = f(x_1, x_2)$; б) $D = f(x_1, x_3)$; в) $D = f(x_2, x_3)$, где су фактори $x_1 = t_m$ (време на крају првог сегмента градијента), $x_2 = \varphi_m$ (удео метанола на крају првог сегмента градијента) и $x_3 = \varphi_e$ (време на крају другог сегмента градијента) (Из: А. Вемић, В. Јанчић Стојановић, И. Стаменковић, А. Маленовић, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

Хроматограм добијен при оптималним условима приказан је на слици 37.



Слика 37. Репрезентативни хроматограми а) лабораторијска смеша: леводопа (3,985 min), непозната нечистоћа (5,127 min), LD_B (6,078 min), MD (8,523 min), LD_C (9,118 min), карбидопа (9,885 min), непозната нечистоћа (11,830 min), 3-ОМС (14,182 min), EN_C (15,223 min), EN_A (20,870 min), ентакапон (22,180 min); б) плацебо

(Прилагођено из: **A. Vemić**, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

4.4.3 Валидација методе

Након дефинисања оптималних услова за раздвајање, метода је валидирана како би се потврдила њена поузданост и применљивост. Први параметар који је био тестиран је селективност. Као што се може видети са хроматограма плацеба (слика 37), на ретенционим временима анализираних супстанци нема значајних интерферирајућих пикова, што значи да је селективност методе потврђена. Успостављена је линеарна зависност између површине пикова и концентрације анализата за LD, LD_B, MD, LD_C, CBD, 3-ОМС, EN_C, EN_A и EN. Израчунати регресиони параметри дати су у табели 25 и испуњавају регулаторне захтеве за процену линеарности методе [96]. Осетљивост методе, значајна за квантитивну анализу, процењена је дефинисањем лимита детекције (LOD) и лимита квантификације (LOQ). Ове вредности за нечистоће су експериментално одређене из односа сигнала и шума (енг. *signal-to-noise* – S/N). Однос сигнала и шума од 3:1 се генерално сматра прихватљивим за процену вредности LOD, док за процену LOQ тај однос треба да буде 10:1 (табела 25). Током извођења експеримената за процену прецизности методе, показало се да је опсег методе дефинисан лимитима самог инструмента на коме су извођени експерименти, па је за извођење анализе узорка потребно припремити растворе у две различите концентрације: једну за анализу леводопе, карбидопе и њихових нечистоћа, другу за анализу ентакапона и његових нечистоћа. Наиме, ентакапон има интензивнију апсорпцију на одабраној таласној дужини, а такође је у таблетама присутан у највећој количини па је зато потребно његову концентрацију у раствору узорка прилагодити карактеристикама коришћеног детектора. За процену прецизности методе, израчунате су вредности релативне стандардне девијације (RSD): LD (1,58%), CBD (1,65%), EN (1,89%), LD_B (5,71%), LD_C (9,34%), MD (11,74%), 3-ОМС (12,06%), EN_C (4,88%) и EN_A (8,17%). Добијене вредности испуњавају захтеване критеријуме (RSD<2% за активне супстанце и RSD<15% за сродне супстанце) [96]. Тачност предложене методе процењена је израчунавањем *Recovery* вредности за лабораторијску смешу. Све вредности одговарају задатим критеријумима [96] и приказане су у табели 25.

Табела 25. Валидација предложене хроматографске методе

	Леводопа	Карбидопа	Ентакапон	LD _B	LD _C	MD	3-ОМС	EN _C	EN _A
LOD (µg/mL)									
	-	-	-	0,05	0,03	0,03	0,03	0,006	0,006
Линеарност									
Концентрације (µg/mL)	20–200	10–100	5–80	0,15–1	0,1–1	0,1–1	0,1–1	0,02–0,4	0,02–0,4
a	42,001	29,666	146,71	13,513	38,317	44,468	25,684	168,805	200,798
b	-310,74	16,593	-253,67	0,567	0,065	-1,358	-1,800	0,850	1,507
r	0,9989	0,9976	0,9964	0,9989	0,9934	0,9941	0,9990	0,9933	0,9955
Тачност									
Концентрација 1 (µg/mL)	80	40	40	0,16	0,16	0,2	0,2	0,08	0,08
* <i>Recovery</i> 1 (%)	100,5	99,6	98,7	97,3	101,1	113,8	88,2	82,2	127,1
Концентрација 2 (µg/mL)	100	50	50	0,2	0,2	0,25	0,25	0,1	0,1
<i>Recovery</i> 2 (%)	101,1	99,5	100,3	94,6	109,4	119,3	86,9	91,2	123,1
Концентрација 3 (µg/mL)	120	60	60	0,24	0,24	0,3	0,3	0,12	0,12
<i>Recovery</i> 3 (%)	99,3	99,4	100,5	102,4	112,3	113,2	82,8	80,9	120,8

a – нагиб, b – одсечак, r – коефицијент корелације (>0,99 за активне супстанце, >0,98 за сродне супстанце)

**recovery*: 98,0%–102,0% за активне супстанце, 70,0%–130,0% за сродне супстанце

(Прилагођено из: А. Vemić, В. Jančić Stojanović, I. Stamenković, А. Malenović, J. Pharm. Biomed. Anal. 77 (2013) 9–15)

5. ЗАКЉУЧАК

1. Карактеризацијом хроматографског понашања једињења базног карактера, на примеру ропинирола и његових нечистоћа, показано је да је ефекат анализираних хаотропних агенаса (CF_3COONa и NaClO_4) на вредности хроматографских параметара у сагласности са њиховим положајем у Хофмајстеровој серији, али и да зависи од концентрације примењеног агенса. Поред тога, осетљивост анализата на утицај хаотропног средства одређена је и хидрофобношћу анализата. Проширеним термодинамичким приступом утврђено је да раздвајање претежно условљавају електростатске интеракције протонованих анализата са електричним двослојем који се развија на површини стационарне фазе, али да се и формирање јонских парова у елуенту не сме занемарити. Применом централног композиционог дизајна дефинисани су емпиријски математички модели који указују да је хаотропни ефекат израженији при мањим концентрацијама органског растварача у мобилној фази. Оптимални хроматографски услови идентификовани су претраживањем чворова мреже добијене дискретизацијом испитиваног експерименталног простора. Процењом селективности, линеарности, тачности и прецизности, потврђена је поузданост развијене методе за одређивање ропинирола и његових нечистоћа.
2. Упоређен је утицај шест различитих система дефинисаних комбинацијама хаотропних соли (CF_3COONa , NaClO_4 , NaPF_6) и стационарних фаза (C8, C18) на ретенционо понашање базних једињења чије се pK_a вредности знатно разликују, на примеру прамипексола и његових нечистоћа. У системима који чине хидрофобнија колона и со са израженијим хаотропним својствима, развија се површински потенцијал виших вредности који израженије модулише задржавање анализата на стационарној фази. Проширеним термодинамичким приступом утврђено је да овакви системи повећавају тенденцију јонског спаривања у стационарној фази у односу на формирање јонских парова у мобилној фази и на тај начин

такође продужавају задржавање анализата на стационарној фази. Анализа утицаја молекулске структуре прамипексола и нечистоћа на њихово ретенционо понашање у хроматографском систему са хаотропним агенсима указује да је дистрибуција наелектрисања анализата и његова комплементарност структури електричног двослоја, формираног на површини стационарне фазе, значајна за разумевање разлике у задржавању структурно сродних анализата на стационарној фази. Ови резултати представљају добру основу за даља истраживања и сугеришу развијање новог молекулског дескриптора који би, узевши у обзир и величину супротно наелектрисаних молекулских површина и њихов просторни однос према доминантној шаржи, могао бити генерално применљив предиктор у студијама односа структуре и ретенционог понашања у сродним хроматографским системима.

Пратећи принципе *QbD*-а развијена је метода течне хроматографије са хаотропним адитивима за анализу прамипексола и његових пет нечистоћа. Као критични процесни параметри одабрана су три нумеричка и два категоричка фактора која су симултано испитани применом *D*-оптималног дизајна. Узимајући у обзир претходно дефинисане критичне атрибуте квалитета и жељени ниво квалитета, дефинисан је *design space* који даје услове за задовољавајуће раздвајање испитиване смеше. У поређењу са пропагирањем грешке која је једнака варијанси резидуала модела, стриктнији приступ у обезбеђивању квалитета представља процена несигурности модела пропагирањем грешке која потиче из израчунавања коефицијената модела. Одабрана је радна тачка, а њена робусност додатно потврђена пропагирањем грешке фактора која се може јавити приликом лабораторијске примене методе. Валидацијом предложене методе потврђена је њена поузданост за фармацеутску анализу прамипексола и његових нечистоћа.

3. Развијена је ефикасна градијентна метода реверзно-фазне течне хроматографије са хаотропним агенсима за истовремену анализу једињења различитих кисело-базних особина, на примеру смеше леводопе, карбидопе, ентакапона и њихових нечистоћа. Показало се да су

трифлуоросирћетна и перхлорна киселина чији анјони поседују различите особине према Хофмајстеровој класификацији од суштинског значаја за раздвајање критичног пара пикова нечистоће С леводопе и карбидопе (LD_C/CBD). Применом Бокс-Бенкеновог дизајна и Деринегерове функције пожељних одговора, дефинисан је двосегментни градијенти програм оптимизацијом нагиба сваког сегмента. Коначно, тестирана је селективност, осетљивост, линеарност, тачност и прецизност методе чиме је потврђена њена погодност и поузданост за квалитативну и квантитативну анализу леводопе, карбидопе, ентакапона и њихових нечистоћа.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, first ed., Wiley, New Jersey, 2007.
- [2] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.* 49 (1977) 142–154.
- [3] J.H. Knox, G.R. Laird, Soap chromatography – a new high-performance liquid chromatographic technique for separation of ionizable materials: Dyestuff intermediates, *J. Chromatogr.* 122 (1976) 17–34.
- [4] J.C. Kraak, K.M. Jonker, J.F.K. Huber, Solvent-generated ion-exchange systems with anionic surfactants for rapid separations of amino acids, *J. Chromatogr.* 142 (1977) 671–688.
- [5] B.A. Bidlingmeyer, S.N. Deming, W.P. Price Jr., B. Sachok, M.J. Petrusek, Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 419–434.
- [6] F. Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24 (1888) 247–260.
- [7] T. Cecchi, Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents. From ion-pair chromatography toward a unified salt chromatography. in: E. Grushka; N. Grinberg (Eds.), *Advances in Chromatography Vol. 49*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2011. pp. 1–35.
- [8] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, Reversed-phase high-performance liquid chromatography behavior of chaotropic counter anions, *J. Chromatogr. A.* 1064 (2005) 9–18.
- [9] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2295–2305.
- [10] D.P. Wittmer, N.O. Nuessle, W.G. Haney Jr., Simultaneous analysis of tartrazine and its intermediates by reversed phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1422–1423.

- [11] N.E. Hoffman, J.C. Liao, Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2231–2234.
- [12] P.T. Kissinger, Comments on reverse-phase ion-pair partition chromatography, *Anal. Chem.* 49 (1977) 883–883.
- [13] B.A. Bidlingmeyer, Separation of ionic compounds by reversed-phase liquid chromatography: an update of ion-pairing techniques, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 525–539.
- [14] Á. Bartha, J. Ståhlberg, Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography, *J. Chromatogr. A* 668 (1994) 255–284.
- [15] F.F. Cantwell, Retention model for ion-pair chromatography based on double-layer ionic adsorption and exchange, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2 (1984) 153–164.
- [16] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2632–2639.
- [17] J. Dai, P.W. Carr, Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 169–184.
- [18] J. Mbuna, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu, Capillary zone electrophoretic studies of ion association between inorganic anions and tetraalkylammonium ions in aqueous–dioxane media, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 261–270.
- [19] J. Dai, S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, C.A. Lucy, P.W. Carr, Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 225–234.
- [20] S.A. Steiner, D.M. Watson, J.S. Fritz, Ion association with alkylammonium cations for separation of anions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 170–175.
- [21] S. Motomizu, T. Takayanagi, Electrophoretic mobility study on ion–ion interactions in an aqueous solution, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 63–69.

- [22] T.V. Popa, C.T. Mant, R.S. Hodges, Ion-interaction–capillary zone electrophoresis of cationic proteomic peptide standards, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 192–199.
- [23] T.V. Popa, C.T. Mant, Y. Chen, R.S. Hodges, Capillary zone electrophoresis of α -helical diastereomeric peptide pairs with anionic ion-pairing reagents, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 113–122.
- [24] H. Hashem, T. Jira, Effect of chaotropic mobile phase additives on retention behaviour of *b*-blockers on various reversed-phase high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 69–75.
- [25] C.R. Harrison, J.A. Sader, C.A. Lucy, Sulfonium and phosphonium, new ion-pairing agents with unique selectivity toward polarizable anions. *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 123–129.
- [26] J. Flieger, Effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 37–44.
- [27] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behaviour of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography I: XTerra-C18, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 43–55.
- [28] F. Gritti, G. Guiochon, Role of the buffer in retention and adsorption mechanism of ionic species in reversed-phase liquid chromatography I: analytical and overloaded band profiles on Kromasil-C18, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 53–66.
- [29] M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, The perchlorate anion is more effective than trifluoroacetate anion as an ion-pairing reagent for reversed-phase chromatography of peptides. *J. Chromatogr. A* 1080 (2005) 49–57.
- [30] R. LoBrutto, A. Jones, Y.V. Kazakevich, Effect of counter-anion concentration on retention in high performance liquid chromatography of protonated basic analytes. *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 189–196.
- [31] T. Cecchi, Theoretical models of ion pair chromatography: A close up of recent literature production, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38 (2015) 404–414.

- [32] T. Cecchi, P. Passamonti, Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1789–1797.
- [33] J. Ståhlberg, Retention models for ions in chromatography, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 3–55.
- [34] D.C. Grahame, The electrical double layer and the theory of electrocapillarity, *Chem. Rev.* 41 (1947) 441–501.
- [35] J.H. Knox, R.A. Hartwick, Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons, *J. Chromatogr.* 204 (1981) 3–21.
- [36] G. Schay, G. Szekely, Gas adsorption measurements in flow systems, *Acta Chim. Hung.* 5 (1954) 167–182.
- [37] D.H. James, C.S.G. Phillips, The chromatography of gases and vapours. Part III. The determination of adsorption isotherms, *J. Chem. Soc.* (1954) 1066–1070.
- [38] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, second ed., Academic Press Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [39] J.F.K. Huber, R.G. Gerritse, Evaluation of dynamic gas chromatographic methods for the determination of adsorption and solution isotherms, *J. Chromatogr.* 58 (1971) 137–158.
- [40] F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, Comparison of the adsorption equilibrium of a few low-molecular mass compounds on a monolithic and a packed column in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 81–107.
- [41] A.R. Katritzky, V.S. Lobanov, M. Karelson, QSPR: the correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 279–287.
- [42] R. Kaliszan, QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships, *Chem. Rev.* 107 (2007) 3212–3246
- [43] T. Puzyn, J. Leszczynski, M.T.D. Cronin, *Recent advances in QSAR studies: Methods and applications*, Springer, New York, 2010.

- [44] A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation, *Mol. Informatics* 29 (2010) 476–488.
- [45] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [46] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L. S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- [47] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 141–158.
- [48] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [49] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 179–186.
- [50] A.N. Armstrong, *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, second ed., CRC Press Taylor & Francis Group, London, 2006.
- [51] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Response surface designs part 2 – types and properties. *LCGC Europe* 22 (2009) 581–585.
- [52] E.J. Klein, S.L. Rivera, A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (2000) 2097–2121.
- [53] NIST/SEMATECH e-Handbook of statistical methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook> (приступљено: март 2015.)

- [54] B. Bourguignon, D.L. Massart, Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function, *J. Chromatogr. A* 586 (1991) 11–20.
- [55] G. Derringer, R. Suich, Simultaneous optimization of several response variables, *J. Qual. Technol.* 12 (1980) 214–219.
- [56] E. Del Castillo, D.C. Montgomery, D.R. McCarville, Modified desirability functions for multiple response optimization, *J. Qual. Technol.* 28 (1996) 337–345.
- [57] C.S. Aksezer, On the sensitivity of desirability functions for multiresponse optimization, *J. Ind. Manage. Optim.* 4 (2008) 685–696.
- [58] US Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services, Pharmaceutical quality for the 21st century a risk-based approach progress report, 2007
(<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm128080.html>).
- [59] US Food and Drug Administration (FDA), Guidance for industry PAT-A framework for innovative pharmaceutical manufacturing and quality assurance, FDA, Washington, DC, USA, 2004.
- [60] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development, ICH, Geneva, Switzerland, 2009.
- [61] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q9: Quality Risk Management, ICH, Geneva, Switzerland, 2005.
- [62] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q10: Pharmaceutical Quality System, ICH, Geneva, Switzerland, 2008.
- [63] E. Rozet, P. Lebrun, B. Debrus, B. Boulanger, P. Hubert, Design Spaces for analytical methods, *Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 157–167.
- [64] S. Furlanetto, S. Orlandini, S. Pasquini, M. Del Bubba, S. Pinzauti, Quality by Design approach in the development of a solvent-modified micellar electrokinetic

chromatography method: Finding the design space for the determination of amitriptyline and its impurities, *Anal. Chim. Acta* 802 (2013) 113–124.

[65] I. Nistora, P. Lebrun, A. Ceccato, F. Lecomte, I. Slama, R. Oprean, E. Badarau, F. Dufour, K. Sourou Sylvestre Dossou, M. Fillet, J.-F. Liégeois, P. Hubert, E. Rozet, Implementation of a design space approach for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74 (2013) 273–283.

[66] B. Debrus, D. Guillarme, S. Rudaz, Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 84 (2013) 215–223.

[67] A. Dispas, P. Lebrun, B. Andri, E. Rozet, P. Hubert, Robust method optimization strategy—A useful tool for method transfer: The case of SFC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 519–524.

[68] B. Debrus, P. Lebrun, E. Rozet, T. Schofield, J.K. Mbinze, R.D. Marini, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, A New Method for Quality by Design Robust Optimization in Liquid Chromatography, *LC GC Eur.* 26 (2013) 370–377.

[69] B. Sahasrabuddhey, R. Nautiyal, H. Acharya, S. Khyade, P.K. Luthra, P.B. Deshpande, Isolation and characterization of some potential impurities in ropinirole hydrochloride, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1587–1593.

[70] A. Azeem, Z. Iqbal, F.J. Ahmad, R.K. Khar, S. Talegaonkar, Development and validation of a stability-indicating method for determination of ropinirole in the bulk drug and in pharmaceutical dosage forms, *Acta Chromatogr.* 20 (2008) 95–107.

[71] G. Parmar, S. Sharma, K. Singh, G. Bansal, Forced degradation study to develop and validate stability-indicating RP–LC for quantification of ropinirole hydrochloride in its modified release tablets, *Chromatographia* 69 (2009) 199–206.

[72] P. Coufal, K. Štulík, H.A. Claessens, M.J. Hardy, M. Webb, Separation and quantification of ropinirole and some impurities using capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 732 (1999) 437–444.

[73] A.Nagarjuna, S.D.V. Rao, S. Eswaraiah, K. Mukkanti, M.V. Suryanarayana, A liquid chromatographic method for quantification of ropinirole hydrochloride and its related impurities, *Indian Drugs* 43 (2006) 813–820.

- [74] B. Jancic-Stojanovic, A. Malenovic, D. Ivanovic, T. Rakic, M. Medenica, Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1263–1269.
- [75] European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe, Strasbourg, 8th ed., 2014.
- [76] B. Jančić, M. Medenica, D. Ivanović, A. Malenović, Chromatographic determination of dissociation constants of pramipexole and its impurities, Chromatographia 65 (2007) 633–635.
- [77] B. Jančić, M. Medenica, D. Ivanović, A. Malenović, Experimental design in chromatographic analysis of pramipexole and its impurities, Acta Chim. Slov. 54 (2007) 49–54.
- [78] A. Malenović, B. Jančić-Stojanović, A. Vemić, D. Ivanović, M. Medenica, Validation of a column liquid chromatographic method for the analysis of pramipexole and its five impurities, J. AOAC Int. 93 (2010) 1102–1112.
- [79] A. Vemić; A. Malenović, T. Rakić; N. Kostić; B. Jančić-Stojanović, D. Ivanović, M. Medenica, Physicochemical factors governing the partition of pramipexole and its five impurities in microemulsion liquid chromatographic systems, J. Braz. Chem. Soc. 23 (2012) 2084–2092.
- [80] A.H. Schmidt, M. Stanic, I. Molnár, *In silico* robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling-Case study pramipexole, J. Pharm. Biomed. Anal. 91 (2014) 97–107.
- [81] Y.M. Issa, M.E.M. Hassoun, A.G. Zayed, Application of high performance liquid chromatographic method for the determination of levodopa, carbidopa, and entacapone in tablet dosage forms, J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 34 (2011) 2433–2447.
- [82] D. Gandhi, P. Mehta, Simultaneous RP-HPTLC method for determination of levodopa, carbidopa, and entacapone in combined tablet dosage form, J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC 24 (2011) 236–241.
- [83] A.S. Doshi, K.J. Upadhyay, T.N. Mehta, Development and application of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of *in vitro* drug

release of levodopa, carbidopa, and entacapone from a tablet formulation, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 394–403.

[84] F. Bugamelli, C. Marcheselli, E. Barba, M.A. Raggi, Determination of l-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC–ED, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 562–567.

[85] A.R. Katritzky, M. Karelson, V.S.Lobanov, CODESSA, version 2.20., Gainesville, University of Florida, Florida, 1996.

[86] RDKit: Open-source cheminformatics; <http://www.rdkit.org>

[87] J. Stewart, MOPAC 7. 1996. Available from: <http://openmopac.net>

[88] <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>

[89] S. Buntz, M. Figus, Z. Liu, Y.V. Kazakevich, Excess adsorption of binary aqueous organic mixtures on various reversed-phase packing materials, *J. Chromatogr A* 1240 (2012) 104–112.

[90] European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe, Strasbourg, 7th ed., 2010.

[91] S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, Overloading study of bases using polymeric RP-HPLC columns as an aid to rationalization of overloading on silica-ODS phases, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4672–4681.

[92] D.V. McCalley, Influence of sample mass on the performance of reversed phase columns in the analysis of strongly basic compounds by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 31–46.

[93] D.V. McCalley, Selection of suitable stationary phases and optimum conditions for their application in the separation of basic compounds by reversed-phase HPLC, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 187–195.

[94] L. Pan, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, R. Thompson, Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 63–73.

- [95] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography. A mono- and bivariate strategy to model the influence of ionic strength, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1323–1332.
- [96] J.B. Crowther, Validation of pharmaceutical test methods, in: S. Ahuja, S. Scypinski (Eds.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York, 2001; pp. 415–443.
- [97] J. Flieger, Application of perfluorinated acids as ion-pair reagents for reversed-phase chromatography and retention-hydrophobicity relationship studies of selected β -blockers, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 540–549.
- [98] T. Cecchi, Use of lipophilic ion adsorption isotherms to determine the surface area and the monolayer capacity of a chromatographic packing, as well as the thermodynamic equilibrium constant for its adsorption, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 201–206.
- [99] T. Cecchi, F. F. Pucciarelli, P. Passamonti, Ion-interaction chromatography of neutral molecules, *Chromatographia* 53 (2001) 27–34.
- [100] A. Jakalian, B.L. Bush, D.B. Jack, C.I. Bayly, Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method, *J. Comput. Chem.* 21 (2000) 132–146.
- [101] A. Jakalian, D.B. Jack, C.I. Bayly, Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation, *J. Comput. Chem.* 23 (2002) 1623–1641.
- [102] T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti, P. Cecchi, The dipole approach in ion-interaction chromatography of zwitterions, *Chromatographia* 54 (2001) 38–44.
- [103] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [104] P. Lebrun, B. Govaerts, B. Debrus, A. Ceccato, G. Caliaro, P. Hubert, B. Boulanger, Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 91 (2008) 4–16.

7. ПРИЛОГ

ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у часописима међународног значаја

1. **A. Vemić**, A. Malenović, M. Medenica, The influence of inorganic salts with chaotropic properties on the chromatographic behavior of ropinirole and its two impurities, *Talanta* 123 (2014) 122–127 (M21)
2. **A. Vemić**, M. Kalinić, S. Erić, A. Malenović, M. Medenica, The influence of salt chaotropicity, column hydrophobicity and analytes' molecular properties on the retention of pramipexole and its impurities, *J. Chromatogr. A* 1386 (2015) 39–46 (M21)
3. **A. Vemić**, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, Chaotropic salts in liquid chromatographic method development for the determination of pramipexole and its impurities following quality-by-design principles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 314–320 (M21)
4. **A. Vemić**, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 77 (2013) 9–15 (M21)

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу

1. **A. Vemić**, M. Jovanović, A. Malenović, The application of chaotropic reagents for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities in liquid chromatography. *9th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods*, Siofok, Hungary, 2013. (M34)

Усмена излагања на скуповима националног значаја штампани у изводу

1. **A. Вемић**, *QbD* у развоју методе реверзно-фазне течне хроматографије модификоване хаотропним агенсима – пример прамипексол и нечистоће. *VI конгрес фармацеута Србије са међународним учешћем*, Београд, Србија, 2014. (M62)

8. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Ана Вемић је рођена 1985. године у Београду, где је завршила основну школу и Трећу београдску гимназију. Студије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду уписала је 2004. године, а дипломирала 2010. године са просечном оценом 9,26. Поред тога, 2006. године дипломирала је и на Факултету музичке уметности у Београду, гудачки одсек – виолина, са просечном оценом 9,80. У оквиру програма студентске размене Међународне федерације студената фармације провела је месец дана на универзитету *Cooperativa de Ensino Superior, Politécnico e Universitário* у Португалији. Током студија била је аутор два студентска истраживачка рада која су саопштена на студентским конгресима. Била је један од оснивача и први председник Хора "Расковник" студената Фармацеутског факултета. Од 2006. године је члан, а затим и концертмајстор Светског оркестра (енг. *The World Orchestra*) са којим је, кроз концерте и образовне активности широм света, ангажована у промовисању међународне сарадње и културне размене.

Докторске академске студије, модул Фармацеутска хемија, уписала је школске 2010/2011. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду. Од јануара 2011. године запослена је на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду као истраживач сарадник на Пројекту број 172052 (руководилац: проф. др Мирјана Меденица) који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Као докторанд учествовала је у реализацији практичне наставе на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду у оквиру предмета *Инструменталне методе*, затим *Медицинска средства* и *Спортска фармација*. Била је коментор шест студентских истраживачких радова.

До сада је објавила 14 научних радова у часописима међународног значаја и два рада у часописима националног значаја. На научним скуповима међународног и националног значаја учествовала је са 15 научних радова који су штампани у изводу, а такође је имала и једно усмено излагање на скупу националног значаја.

Говори енглески и шпански језик.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Вемић
број уписа 36/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

*Хаотропни агенси у анализи одабраних антипаркинсоника применом
течне хроматографије – моделовање и карактеризација система*

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

У Београду, 1. јуна 2015.

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора	Ана Вемић
Број уписа	36/10
Студијски програм	Фармацеутска хемија
Наслов рада	Хаотропни агенси у анализи одабраних антипаркинсоника применом течне хроматографије – моделовање и карактеризација система
Ментор	Др Анђелија Маленовић, ванредни професор

Потписани-а Ана Вемић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 1. јуна 2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Хаотропни агенси у анализи одабраних антипаркинсоника применом течне хроматографије – моделовање и карактеризација система

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 1. јуна 2015.

