

Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

Aleksandra D. Radoičić

**UTICAJ SADRŽAJA VODE U MOBILNOJ  
FAZI NA MEHANIZAM ODVAJANJA MALIH  
POLARNIH MOLEKULA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of chemistry

Aleksandra D. Radoičić

**THE EFFECT OF MOBILE PHASE WATER  
CONTENT ON THE SEPARATION  
MECHANISM OF SMALL POLAR  
MOLECULES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

## Mentor

---

Dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

## Članovi komisije

---

Dr Živoslav Tešić, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

---

Dr Filip Andrić, docent  
Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

---

Dr Sandra Šegan, viši naučni saradnik  
IHTM - Centar za hemiju

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija realizovana je na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice, koja je predložila temu i učestvovala u svim fazama izrade.*

*Najveću zahvalnost dugujem mentoru na pomoći, sugestijama i savetima u toku izrade i pisanja ovog rada, a pre svega na beskonačnom strpljenju koje je imala svih ovih godina.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Živoslavu Tešiću, kao dugogodišnjem rukovodiocu projekta, na stručnoj pomoći, ukazanom poverenju i saradnji tokom niza godina.*

*Dr Filipu Andriću i dr Sandri Šegan se zahvaljujem na pomoći i korisnim sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se koautorima naučnih radova koji su proistekli iz ove disertacije.*

*Kolegama iz lab. 551, 552 i 553 se zahvaljujem na podršci, smehu i uvek dobroj radnoj atmosferi.*

*Svojoj porodici se zahvaljujem na svemu što su činili i čine za mene.*

*Mom Stefanu hvala na strpljenju i razumevanju kojim mi je olakšao pisanje ovog rada.*

## IZVOD

U okviru ovog rada proučavano je hromatografsko ponašanje serije Ru(II) kompleksa i odabranih anestetika u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC). Sistematski je ispitivan uticaj sastava mobilne faze, tačnije sadržaja vode u mobilnoj fazi, na retenciju ovih jedinjenja u različitim hromatografskim sistemima primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije (High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC) kao brze i efikasne hromatografske tehnike, koja, s obzirom na minimalnu upotrebu rastvarača i potrebu za derivatizacijom, spada u metode zelene analitičke hemije.

Za hromatografsko ispitivanje izabrani su sorbenti različite polarnosti i adsorpcionih karakteristika, a kao mobilna faza izabrane su binarne smeše vode i organskih rastvarača različitog sastava, od čiste vode do čistog organskog rastvarača.

Utvrđeno je da povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi dovodi do promene mehanizma odvajanja, odnosno obrtanja retencionog redosleda ispitivanih jedinjenja i pretpostavljeno da se sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi mehanizam odvajanja menja od adsorpcije do particije, a retencione krive imaju karakterističan U oblik. Prelaz između adsorpcionog i particionog mehanizma je kontinualan i zavisi od hemijske prirode odvajanih supstanci, stacionarne faze kao i organske komponente mobilne faze.

Silika-gel se može smatrati najpogodnijim stacionarnom fazom za odvajanje i sistematsko praćenje hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja u HILIC uslovima, dok se acetonitril pokazao kao najpodesniji rastvarač.

Dobijeni rezultati doprinose razumevanju dominantnog mehanizma odvajanja, odnosno vrste i jačina interakcija koje se ostvaruju između odvajanih supstanci i stacionarne i mobilne faze, a mogu se upotrebiti i za određivanje važnih fizičko-hemijskih karakteristika analita, naročito lipofilnosti. Takođe, predloženi su optimalni sistemi za brzu i efikasnu analizu polarnih supstanci što je od velikog praktičnog značaja za analitiku lekova, hrane i uzoraka iz životne sredine.

Razvijena je i validovana HPTLC metoda za kvantitativno određivanje amigdalina iz različitih uzoraka. Takođe, predložena je i validovana HPTLC metoda za kvantitativno određivanje deset najčešće korišćenih sintetičkih boja za životne namirnice.

Ključne reči: Tankoslojna hromatografija, Hromatografija hidrofilnih interakcija, Ru(II) kompleksi, Lipofilnost

## SUMMARY

In this study, chromatographic behavior of the Ru(II) complex, and selected anesthetics, was studied under conditions of hydrophilic interaction chromatography (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC). The effect of mobile phase composition, precisely, water content in the mobile phase used, on the retention of these compounds in different chromatographic systems was systematically examined using High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) as a fast and efficient chromatographic technique which, given the minimal use solvent and the need for derivatisation, belongs to the methods of green analytical chemistry.

For the chromatographic investigations the sorbents of different polarity and adsorption characteristics were selected, and mixtures of water and organic solvents of various compositions, from pure water to pure organic solvent, were selected as the mobile phase.

It was established that increasing the amount of water in the mobile phase leads to a conversion of the separation mechanism, and assumed that as the water content increases in the mobile phase, the separation mechanism changes from adsorption to the partition, and the retention curves have a characteristic U shape. The conversion between the adsorption and partition mechanisms is most likely continuous and depends on chemical nature of separated substances, stationary phase as well as on organic component of mobile phase.

Silica-gel can be considered as the most suitable stationary phase for the systematic investigation of the chromatographic behavior of the test compounds in HILIC conditions, whereas acetonitrile has been shown to be the most suitable solvent.

Two new HPTLC methods, for the quantitative determination of the ten most commonly used synthetic food colors and amygdalin from different samples, were developed and proposed.

The results obtained contribute to the understanding of the dominant separation mechanism, the type and intensity of the interactions that occur between separated substances and the stationary and mobile phases, and can also be used to determine important physical and chemical characteristics of the compounds investigated, especially lipophilicity. In addition, the optimal systems for rapid and efficient analysis of polar substances have been proposed, which is of great practical importance for the analysis of drugs, food and environmental samples.

Key words: Thin-layer chromatography, Hydrophilic interaction chromatography (HILIC), Ru(II) complexes, Lipophilicity

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Uvod</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. Opšti deo</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.1. Podela hromatografskih metoda</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.2. Tankoslojna hromatografija</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.3. Izbor stacionarne faze</b>  | <b>12</b> |
| <b>2.4. Izbor mobilne faze</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.5. Mehanizam odvajanja polarnih jedinjenja</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>3. Eksperimentalni deo</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.1. Ispitivanje hromatografskog ponašanja Ru-arenskih (II) kompleksa</b>              | <b>29</b> |
| <b>3.2. Ispitivanje hromatografskog ponašanja nekih anestetika</b>                        | <b>31</b> |
| <b>3.3. Razvoj i validacija metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice</b> | <b>32</b> |
| <b>3.3.1. Priprema uzoraka za analizu</b>   | <b>33</b> |
| <b>3.4. Razvoj i validacija metode za određivanje amigdalina</b>                          | <b>34</b> |
| <b>3.4.1. Priprema uzoraka za analizu</b>   | <b>34</b> |
| <b>4. Rezultati i diskusija</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.1. Ispitivanje hromatografskog ponašanja Ru (II)-arenskih kompleksa</b>              | <b>40</b> |
| <b>4.1.1. Proučavanje uticaja sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciju</b>              | <b>49</b> |
| <b>4.1.2. Uticaj prirode stacionarne faze na retenciju</b>                                | <b>51</b> |
| <b>4.1.3. Uticaj prirode organske komponente mobilne faze na retenciju</b>                | <b>52</b> |
| <b>4.1.4. Određivanje lipofilnosti Ru (II)-arenskih kompleksa</b>                         | <b>54</b> |
| <b>4.2. Ispitivanje hromatografskog ponašanja nekih anestetika</b>                        | <b>57</b> |
| <b>4.2.1. Proučavanje uticaja sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciju</b>              | <b>62</b> |
| <b>4.2.2. Uticaj prirode stacionarne faze na retenciju</b>                                | <b>62</b> |
| <b>4.2.3. Uticaj prirode organske komponente mobilne faze na retenciju</b>                | <b>63</b> |
| <b>4.2.4. Uticaj dodatka soli mobilnoj fazi na retenciju</b>                              | <b>64</b> |
| <b>4.2.5. Određivanje lipofilnosti anestetika</b>   | <b>70</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3. Razvoj i validacija metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice</b> | <b>75</b>  |
| <b>4.3.1. Razvoj metode</b>   | <b>76</b>  |
| <b>4.3.2. Validacija metode</b>   | <b>77</b>  |
| <b>4.3.3. Rezultati validacije</b>  | <b>78</b>  |
| <b>4.4. Razvoj i validacija metode za određivanje amigdalina</b>                          | <b>82</b>  |
| <b>4.4.1. Razvoj metode</b>   | <b>83</b>  |
| <b>4.4.2. Rezultati validacije</b>  | <b>85</b>  |
| <b>5. Zaključak</b>   | <b>87</b>  |
| <b>6. Literatura</b>  | <b>91</b>  |
| <b>7. Prilog</b>  | <b>102</b> |



# UVOD

## 1. Uvod

Hromatografske metode zauzimaju značajno mesto u savremenoj analitičkoj hemiji i gotovo su nezamenljive prilikom analize različitih uzoraka, prečišćavanja složenih smeša i razdvajanja i izolovanja pojedinačnih komponenata.

Optimalna kombinacija stacionarne i mobilne faze omogućava razvoj efikasnih i selektivnih metoda analize različitih analita. Normalno-fazna tečna hromatografija, kod koje se koristi polarna stacionarna faza u kombinaciji sa nepolarnom mobilnom fazom, bi trebalo da bude odgovarajuća metoda za odvajanje polarnih jedinjenja. Međutim, slaba rastvorljivost polarnih jedinjenja u nevedenim mobilnim fazama koje se koriste u normalno-faznoj hromatografiji značajno ograničava primenu ovakvih sistema. Zbog toga je reverzno-fazna tečna hromatografija, kod koje se koristi nepolarna stacionarna i polarna mobilna faza, postala jedna od najčešće korišćenih metoda odvajanja. Međutim, reverzno-fazna hromatografija, iako moćna metoda razdvajanja, ima i nedostatke, od kojih je najznačajniji nedovoljno zadržavanje, a samim tim i loše razdvajanje polarnih supstanci. Za polarne i hidrofilne analite, da bi se postigla adekvatna retencija, često je neophodna mobilna faza sa visokim sadržajem vode, što može izazvati brojne probleme, kao što je propadanje stacionarne faze i smanjenje osetljivosti razdvajanja. Teorijski, najbolji način za odvajanje i analizu niskomolekularnih, polarnih supstanci, bila bi obrnuta reverzno-fazna hromatografija, tj. metoda u kojoj se koristi polarna stacionarna faza i mobilna faza koja je smeša vode i nekog organskog rastvarača u različitim odnosima. Ovakva tehnika, koja bi bila pogodna alternativa za odvajanje polarnih jedinjenja, je relativno nova tehnika nazvana hromatografija hidrofilnih interakcija (**H**ydrophilic **I**nteraction **L**iquid **C**hromatography, HILIC). HILIC se često posmatra kao normalno-fazno razdvajanje u reverzno-faznim uslovima. Od prvih radova u kojima je prikazana primena HILIC, pa do danas, ovaj tip hromatografije je primenjivan uglavnom za proučavanje hromatografskog ponašanja polarnih organskih supstanci.

Kako sadržaj vode u mobilnoj fazi predstavlja faktor koji u velikoj meri utiče na retenciju, odnosno određuje dominantni mehanizam hromatografskog razdvajanja, u ovom radu planirano je sistematsko proučavanje uticaja sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciono ponašanje i dominantni mehanizam odvajanja različitih malih polarnih molekula u hromatografskim sistemima koji se sastoje od različitih sorbenata kao

stacionarne faze i binarnih smeša vode i organskih rastvarača kao mobilne faze, primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije (**H**igh **P**erformance **T**hin **L**ayer **C**hromatography, HPTLC) kao brze i efikasne hromatografske tehnike koja, s obzirom na minimalnu upotrebu rastvarača i potrebu za derivatizacijom, spada u metode zelene analitičke hemije.

Proučavanja retencionog ponašanja supstanci u različitim hromatografskim sistemima bila su predmet dugogodišnjih istraživanja i rezultati su objavljeni u brojnim radovima. Nastavljajući ova istraživanja, u ovom radu su za proučavanje izabrane serija anestetika i serija Ru(II) kompleksa, kao pogodnih model jedinjenja. Za hromatografsko ispitivanje izabrani su sorbenti različite polarnosti i adsorpcionih karakteristika, a kao mobilna faza dvofazni sistemi voda/organski rastvarač različitog sastava, od čiste vode do čistog organskog rastvarača.

Naučni cilj planiranih istraživanja je razvoj i optimizacija različitih hromatografskih sistema za razdvajanje malih polarnih jedinjenja i proučavanje njihovog hromatografskog ponašanja, čime bi se doprinelo objašnjavanju njihovog mehanizama odvajanja. Na osnovu dobijenih hromatografskih parametara može se, osim prirode i sastava mobilne faze, razmatrati i uticaj strukture analita, kao i prirode stacionarne faze, na retenciono ponašanje ispitivanih supstanci. Dobijeni rezultati mogu da doprinesu razumevanju dominantnog mehanizma odvajanja, odnosno vrste i jačina interakcija koje se ostvaruju između odvajanih supstanci i stacionarne i mobilne faze, a mogu se upotrebiti i za određivanje važnih fizičko-hemijskih karakteristika analita. Takođe bi na osnovu dobijenih rezultata bilo moguće predložiti optimalne sisteme za brzu i efikasnu analizu polarnih supstanci što je od velikog praktičnog značaja za analitiku lekova, hrane i uzoraka iz životne sredine.

# OPŠTI DEO

## 2. Opšti deo

Hromatografija je analitička metoda odvajanja zasnovana na različitoj raspodeli komponenata smeše između dve faze, stacionarne i mobilne, a svaki hromatografski sistem se sastoji iz tri osnovna elementa, a to su stacionarna faza, mobilna faza i ispitivana smeša. Zavisno od vrste i jačine interakcija komponenata smeše sa stacionarnom i mobilnom fazom dolazi do njihovog različitog zadržavanja na stacionarnoj fazi i do raspodele između ove dve faze.

### 2.1. Podela hromatografskih metoda

Hromatografske tehnike se mogu klasifikovati na nekoliko načina, tj. na osnovu nekoliko različitih kriterijuma kao što je prikazano u Tabeli 1:

Tabela 1. Podela hromatografskih tehnika

| Na osnovu fizičke prirode mobilne faze  | Na osnovu tipa interakcija između analita i stacionarne faze | Na osnovu konfiguracije stacionarne faze |
|---|--|--|
| Tečna hromatografija ( <b>Liquid Chromatography, LC</b> )                               | Adsorpciona hromatografija                                   | Hromatografija na tankom sloju           |
| Gasna hromatografija ( <b>Gas Chromatography, GC</b> )                                  | Jonoizmenjivačka hromatografija                              | Hromatografija na hartiji                |
| Hromatografija superkritičnih fluida ( <b>Supercritical-Fluid Chromatography, SFC</b> ) | Particiona hromatografija                                    | Hromatografija na koloni                 |
|   | Ekskluziona hromatografija                                   |  |

U zavisnosti od odnosa polarnosti stacionarne i mobilne faze hromatografski sistemi se dele na normalno-fazne (**Normal-phase, NP**) i reverzno-fazne (**Reversed-phase, RP**).

Do uvođenja reverzno-fazne hromatografije (RP), ranih 1970-ih, nevodena normalno-fazna (NP) tečna hromatografija je bila dominantna tehnika tečne hromatografije. U normalno-faznim sistemima stacionarna faza je polarnija od mobilne faze, a retencija se pojačava sa povećanjem polarnosti uzorka i stacionarne faze, i sa smanjenjem polarnosti mobilne faze. Kao stacionarna faza, najčešće se koriste silika-gel ili aluminijum-oksidi, kao i hidrofilno modifikovani sorbenti (cijano-, diol-, amino-modifikovani silika-gel), a mobilna faza se sastoji od smeše organskih, relativno nepolarnih, rastvarača (heksan, tetrahidrofur, etil-acetat itd.). Smatra se da je u normalno-faznim uslovima dominantan mehanizam odvajanja adsorpcija na površini stacionarne faze. Sa nevedenim mobilnim fazama odvajanje se zasniva na konkurenciji između uzorka i mobilne faze za vezivanje za polarne adsorpcione centre na površini stacionarne faze, kao što su silanolne grupe na površini silika-gela. Ovaj proces se definiše kao raspodela koja se odvija na površini stacionarne faze, tj. smatra se da je zadržavanje analita na sorbentu zasnovano na specifičnim interakcijama između grupa na površini stacionarne faze i odvajanih supstanci <sup>[1]</sup>.

Uvođenje reverzno-fazne hromatografije kao tehnike razdvajanja dovelo je do značajnog napretka u analitičkoj hemiji. U reverzno-faznim sistemima mobilna faza ima veću polarnost u odnosu na stacionarnu fazu. Stacionarna faza je nepolarna, obično alkil-modifikovani silika-gel (najčešće za silika-gel hemijski vezan oktadecil-silan, RP-18), dok je mobilna faza polarna smeša jednog ili više organskih rastvarača i vode ili pufera. Po pravilu, zadržavanje analita se povećava sa povećanjem lipofilnosti (hidrofobnosti) stacionarne faze i sa smanjenjem koncentracije organskog rastvarača u mobilnoj fazi, a polarne supstance se manje zadržavaju od nepolarnih.

U ovakvim sistemima odvajanje se zasniva na nespecifičnim interakcijama (hidrofobne, disperzione sile) između stacionarne faze i odvajanih supstanci, kao i specifičnim interakcijama između polarne mobilne faze i odvajanih supstanci, a reverzno-fazna hromatografija se može posmatrati i kao adsorpciona i kao particiona hromatografija <sup>[1]</sup>.

Reverzno-fazno razdvajanje, korišćenjem hidrofobnih stacionarnih faza sa polarnim mobilnim fazama, u velikoj meri je povećalo primenu tečne hromatografije. Reverzno-fazna hromatografija je najčešće korišćena i moćna metoda odvajanja koja

ima široku primenu zbog svoje svestranosti tj. mogućnosti razdvajanja velikog broja različitih tipova jedinjenja i stalnog razvoja novih stacionarnih faza i instrumenata.

Međutim, iako je reverzno-fazna tečna hromatografija (RPLC) najšire korišćena metoda razdvajanja u modernoj hromatografiji i može imati razne primene, ona nije uvek najbolji izbor za odvajanje polarnih i hidrofilnih jedinjenja jer ona mogu da pokažu neadekvatno zadržavanje i slabo razdvajanje <sup>[2, 3]</sup>. Da bi se u reverzno-faznim uslovima postigla adekvatna retencija često je neophodna mobilna faza sa visokim sadržajem vode, što može izazvati brojne probleme, kao što je propadanje stacionarne faze i smanjenje osetljivosti razdvajanja <sup>[4]</sup>.

Neka polarna jedinjenja su teška za analizu jer zahtevaju visoku koncentraciju pufera, čak i na veoma inertnim stacionarnim fazama, što dovodi do pojave pikova nesimetričnog oblika. Veoma hidrofilne supstance, kao što su ugljeni hidrati ili mala, jako polarna jedinjenja, se slabo zadržavaju u reverzno-faznim sistemima tako da se njihovo međusobno razdvajanje može teško postići, čak i sa 100% vodenim mobilnim fazama, tzv. vodenom tečnom hromatografijom (**Per Aqueous Liquid Chromatography, PALC**) <sup>[5]</sup>.

S druge strane, drugi režim razdvajanja, normalno-fazna tečna hromatografija, koji uključuje polarnu stacionarnu fazu i nepolarne organske eluente, predstavlja odvajanje niske efikasnosti sa asimetričnim hromatografskim pikovima pri analizi jako polarnih jedinjenja. Normalno-fazna tečna hromatografija bi trebalo da bude odgovarajuća metoda za odvajanje polarnih, jako hidrofilnih komponenata. Međutim, slaba rastvorljivost polarnih jedinjenja u nevodenim mobilnim fazama koje se koriste u NPLC, zajedno sa slabom efikasnošću odvajanja, sužava izbor stacionarne faze i smanjuje reproduktivnost, što značajno ograničava primenu normalno-faznih sistema <sup>[4, 6]</sup>. Takođe, nepolarni rastvarači koji se koriste u NP sistemima su prilično skupi, a često i toksični i nepoželjni sa stanovišta zaštite životne sredine <sup>[3]</sup>.

Slabo ili umereno polarna jedinjenja mogu se razdvojiti i u RP i u NP modu, generalno sa suprotnim redosledom eluiranja, ali se obično uočavaju značajne razlike u selektivnosti između ova dva režima. Jako polarna, hidrofilna jedinjenja se često preterano zadržavaju na površini stacionarne faze u nevodenim normalno-faznim sistemima, ili nisu dovoljno rastvorljiva u nepolarnim ili slabo polarnim organskim

rastvaračima, te zato mogu biti razdvojeni na polarnim stacionarnim fazama samo sa vodom kao jakim eluentom dodatim u mobilnu fazu <sup>[7]</sup>.

Teorijski, najbolji način za odvajanje i analizu malih, polarnih supstanci, bila bi „obrnuta“ reverzno-fazna hromatografija, tj. metoda u kojoj se koristi polarna stacionarna faza i mobilna faza koja je smeša vode i nekog organskog rastvarača u različitim odnosima, što čini sadržaj vode u mobilnoj fazi faktorom koji u velikoj mjeri utiče na retenciju, odnosno određuje dominantni mehanizam hromatografskog razdvajanja.

Takva tehnika, koja je interesantna alternativa za analizu polarnih supstanci, je Hromatografija hidrofilnih interakcija (**H**ydrophilic **I**nteraction **L**iquid **C**hromatography, HILIC) koja se može definisati kao režim razdvajanja koji kombinuje stacionarne faze obično korišćene u NP režimu i mobilne faze koje se koriste u RP odvajanjima. HILIC se pokazala kao korisna analitička tehnika za odvajanje polarnih analita, koja nudi komplementarnu selektivnost u odnosu na RPLC. Ovaj režim razdvajanja koristi polarne stacionarne faze zajedno sa manje polarnim mobilnim fazama, koje u većini slučajeva predstavljaju binarne smeše vode i organskog rastvarača. Tako, tipične primene HILIC uključuju visoko hidrofilne stacionarne faze (na primer, nemodifikovani ili polarnim grupama hemijski modifikovani silika-gel, kao i polarne polimere). U većini slučajeva, mobilna faza je polarni organski rastvarač (najčešće acetonitril (ACN)) koji sadrži do 30% vode <sup>[2]</sup>.

Alpert je 1990. <sup>[8]</sup> predložio termin "HILIC" da opiše režim razdvajanja u kojem polarni analiti interaguju sa hidrofilnom, polarnom stacionarnom fazom kao što je silika-gel, amino- ili cijano-modifikovani silika-gel (slično NPLC), i eluiraju se relativno hidrofobnom mobilnom fazom, binarnom smešom vode i organskog rastvarača kao mobilnom fazom (voda/metanol, voda/acetone ili voda/ACN - slično RPLC), u kojoj je voda jači eluent u smeši <sup>[9]</sup>. Međutim, 1975. godine, Linden i Lavhead <sup>[10]</sup> opisuju veoma uspešno razdvajanje saharida primenom silika-gela hemijski modifikovanog amino grupama, kao stacionarnom fazom i smešom ACN i vode (10-25% vode), kao mobilnom fazom. Iste godine, Palmer <sup>[11]</sup> izvodi sličnu studiju, u kojoj su saharidi analizirani na amino kolonama, koristeći smešu ACN i vode, sa visokim sadržajem acetonitrila, kao eluent. Tako da su drugi autori zapravo već pokazali primenu HILIC i pre Alperta.



Vodena normalno-fazna tečna hromatografija (**Aqueous Normal-Phase Liquid Chromatography, ANPLC**) je korišćena pod različitim imenima dugo vremena pre nego što je Alpert uveo termin "Hromatografija hidrofilnih interakcija" (**HILIC**), analogno "Hromatografiji hidrofobnih interakcija" (**HIC**), modu koji je korišćen za odvajanje biopolimera na blago hidrofobnim stacionarnim fazama, sa vodenim mobilnim fazama koje sadrže soli. Pojam "hidrofilni" se odnosi na afinitet za vodu. HILIC se može okarakterisati kao hromatografska tehnika sa normalno-faznom stacionarnom fazom u kombinaciji sa reverzno-faznom mobilnom fazom koja sadrži više od 50% organskog rastvarača u vodi. Na ovaj način se obezbeđuje dovoljno zadržavanje jako polarnih jedinjenja, za koja se postiže različita selektivnost u odnosu na tradicionalne reverzno-fazne hromatografske sisteme. Zbog manje viskoznih organskih rastvarača koji čine veći deo mobilnih faza, HILIC može da pokaže bolju efikasnost razdvajanja za jako polarna jedinjenja nego reverzno-fazna hromatografija sa vodom bogatim mobilnim fazama.

HILIC ima sličnosti sa NPLC u smislu povećanja retencije kada polarnost analiziranih jedinjenja i/ili stacionarne faze raste. Takođe, povećanje retencije se uočava kada se polarnost mobilne faze smanjuje <sup>[3]</sup>.

HILIC ima mnogo specifičnih prednosti nad konvencionalnim NPLC i RPLC. Na primer, pogodna je za analiziranje jedinjenja u složenim sistemima koja se eluiraju sa frontom rastvarača u reverzno-faznoj hromatografiji. Polarni uzorci uvek pokazuju dobru rastvorljivost u vodenoj mobilnoj fazi koja se koristi u HILIC, čime se prevazilaze nedostaci slabe rastvorljivosti na koju se često nailazi u NPLC. Skupi jon-par reagensi nisu potrebni u HILIC, a, pored toga, može biti pogodno kupovana sa masenom spektrometrijom (MS) <sup>[12, 13]</sup>.

Prvobitno, HILIC je uglavnom primenjivana za određivanje ugljenih hidrata, amino kiselina i peptida. Interesovanje za HILIC tehniku poslednjih godina sve više raste zbog rastućih zahteva za analizu polarnih lekova, metabolita i biološki važnih jedinjenja. HILIC je postepeno pronašla korisne primene u analizi različitih malih polarnih jedinjenja, kao što su lekovi, toksini, biljni ekstrakti i druga jedinjenja važna za prehrambenu i farmaceutsku industriju, a broj radova koji se bave proučavanjem i primenom HILIC stalno raste <sup>[14-28]</sup>.

## 2.2. Tankoslojna hromatografija

Jedna od podvrsta tečne hromatografije je planarna hromatografija koja obuhvata hromatografiju na hartiji (**P**aper **C**hromatography, **PC**) i tankoslojnu hromatografiju (**T**hin-**L**ayer **C**hromatography, **TLC**). Obe tehnike su vrlo jednostavne i izvode se na sličan način, a tankoslojna hromatografija predstavlja jednu od najšire primenjivanih hromatografskih metoda. Može se koristiti za praćenje toka reakcije, identifikaciju komponenata prisutnih u smeši, određivanje čistoće supstance <sup>[29-31]</sup>.

Kod svake hromatografske metode jedinjenja koja se odvajaju se raspoređuju između mobilne i stacionarne faze, a retencija odvajanih supstanci zavisi od vremena koje svako jedinjenje provede u mobilnoj fazi. U uslovima planarne hromatografije, zadržavanje, odnosno retencija jedinjenja, izražava se pomoću  $R_F$  vrednosti, koja predstavlja odnos puta koji je prešla analizirana supstanca (od polazne mrlje do težišta date hromatografske zone) i puta rastvarača (od polazne mrlje do fronta rastvarača). Kretanje supstanci, odnosno retenciju, uslovljavaju dva faktora suprotnog dejstva: eluciona moć mobilne faze i zadržavajuća sposobnost stacionarne faze, a rezultat odvajanja jedinjenja tj. redosled  $R_F$  vrednosti se zasniva na različitim afinitetima ovih jedinjenja prema svakoj od faza.

Tankoslojna hromatografija se, kao brza, jednostavna i jeftina metoda široko primenjuje za odvajanje supstanci, kao i za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu, i predstavlja jednu od osnovnih metoda odvajanja i analize organskih i neorganskih jedinjenja u mnogim laboratorijama. Kod ovog tipa hromatografije stacionarna faza, koja može biti silika-gel, celuloza, aluminijum-oksidi, neki modifikovani silika-gel, organski polimeri, kao i neki drugi porozni čvrsti materijali, naneta je na ravnu površinu (staklenu, metalnu ili plastičnu ploču), a mobilna faza je tečna i sastoji se od jednog ili više rastvarača.

Klasična tankoslojna hromatografija je metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i semikvantitativnu analizu jednostavnih smeša, uz primenu jednostavne i relativno jeftine opreme. Na osnovu retencionih parametara, koji su povezani sa fizičkim karakteristikama i strukturom jedinjenja, mogu se dobiti informacije o ispitivanim jedinjenjima. Međutim, iako je tankoslojna hromatografija korisna za

identifikaciju komponenata smeše, često je nedovoljna za određivanje funkcionalnih grupa pa se u takvim slučajevima kombinuje sa drugim metodama [29].

TLC je jedna od prvih hromatografskih tehnika koje su korišćene za rutinsku analizu u preparativnim hemijskim laboratorijama. Ova metoda se koristi i kao praktična i efikasna metoda za prečišćavanje materijala pre njihove analize sofisticiranim instrumentima. Vremenom je, zbog jednostavnosti i niske cene, TLC postala široko primenjivana metoda, pa se i danas koristi kao efikasna i brza metoda koja omogućava detektovanje svih odvajanih komponenata vizuelno ili skenerom, primenom specifičnih hemijskih reakcija koje se ne mogu primeniti kod HPLC metode. Pored jednostavnosti i brzine izvođenja, značajna prednost TLC metode je i to što analiza ne zahteva velike količine uzoraka i hemikalija, a instrumentalizacija ove tehnike dovela je i do veće tačnosti i reproduktivnosti [30-35].

Danas se moderna, visoko-efikasna tankoslojna hromatografija (**H**igh **P**erformance **T**hin-**L**ayer **C**hromatography, HPTLC) koja je razvijena kao rezultat poboljšanja kvaliteta sorbenata, upotrebe optimizovanih tehnika i opreme za nanošenje uzoraka, razvijanje hromatograma, derivatizaciju i detekciju zona i skeniranje, smatra konkurentnom HPLC ili GC, po svojoj sposobnosti da razdvoji kompleksne smeše i omogući kvantifikaciju komponenata.

U odnosu na visoko-efikasnu tečnu hromatografiju (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, HPLC), HPTLC ima neke prednosti, kao što su: mala količina uzorka potrebna za analizu, veća preciznost i tačnost usled mogućnosti istovremene analize većeg broja uzoraka pod istim hromatografskim uslovima, mala osetljivost na nečistoće, prethodne analize ne mogu da utiču na ishod eksperimenta jer se za svaku analizu koriste nove stacionarne faze, mali utrošak mobilne faze po uzorku, veliki izbor adsorbenasa i rastvarača za razvijanje, mogućnost primene na nepolarnija jedinjenja [31-35].

Tankoslojna hromatografija se, takođe, može uspešno kombinovati sa drugim tehnikama, kao što su tečna hromatografija, masena spektroskopija, infra-crvena spektroskopija ili nuklearna magnetna rezonancija [30-35].

Zbog svih svojih prednosti tankoslojna hromatografija je metoda koja se široko primenjuje za kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih smeša, a danas instrumenti kao što su automatski aplikatori uzoraka, sofisticirani uređaji za razvijanje ploča i

skeneri, značajno doprinose širokoj primeni TLC metode povećanjem njene pouzdanosti i osetljivosti, kao i povećanjem preciznosti i tačnosti dobijenih rezultata. Iako se mnoge prednosti planarne hromatografije mogu iskoristiti i sa vrlo jednostavnim ili čak i bez instrumenata, moderna, kompjuterski kontrolisana, oprema otvara nove mogućnosti kvalitativne i kvantitativne primene planarne, odnosno, tankoslojne hromatografije. Razvoj metode i primena savremenih instrumenata promenila je tankoslojnu hromatografiju od brze i preliminarne, do sofisticirane i precizne tehnike koja danas zauzima značajno mesto u svakoj modernoj analitičkoj laboratoriji. Analitičar danas može da izabere opremu različitog stepena automatizacije bez sniženja kvaliteta analize ili gubitka fleksibilnosti metode.

Zbog svih prednosti, u ovom radu je izabrana tankoslojna hromatografija u cilju određivanja retencionih parametara koji su korišćeni u proučavanju mehanizma odvajanja.

### **2.3. Izbor stacionarne faze**

Kao i u svim vidovima hromatografije, izbor stacionarne faze je veoma važan i kod tankoslojne hromatografije. Pravilan izbor pogodne stacionarne faze je presudan korak za uspešno odvajanje. Stacionarna faza se bira, pre svega, na osnovu prirode odvajanih supstanci, tj. njihove polarnosti, rastvorljivosti, jonizabilnosti itd. Uspešnost razdvajanja složenih smeša u velikoj meri zavisi od izbora stacionarne faze, te je poznavanje karakteristika stacionarne faze veoma važno za pravilan izbor hromatografskog sistema tj. za uspešno razdvajanje analizirane smeše.

Najčešće korišćeni sorbenti u TLC su silika-gel, aluminijum oksid, modifikovani silika-gelovi, celuloza, poliamid, polimerni jonoizmenjivači. HPTLC se od klasične TLC razlikuje po tome što se koriste slojevi sorbenta sitnijih čestica (prosečne veličine čestica od 5  $\mu\text{m}$ ) sa ravnomernijom (ujednačenom) raspodelom veličine čestica.

Silika-gel je najšire primenjivani sorbent i predstavlja dominantnu stacionarnu fazu u TLC odvajanjima.

Ovaj sorbent se koristi u NP i HILIC uslovima i spada u polarne stacionarne faze. To je sorbent koji po hemijskom sastavu predstavlja silicijum-dioksid, na čijoj

površini se nalaze silanolne (Si-OH) i siloksanske (Si-O-Si) grupe koje predstavljaju aktivne, adsorpcione centre preko kojih se ostvaruju interakcije sa odvajanim supstancama. Osnovni mehanizam odvajanja na silika-gelu u uslovima normalno fazne hromatografije je adsorpcija, a interakcije koje određuju retenciju analiziranih jedinjenja mogu biti: vodonične veze, dipol-dipol i druge elektrostatičke interakcije, čiji intenzitet zavisi, pre svega, od broja efektivnih silanolnih grupa, strukture odvajanih supstanci, kao i od elucione moći upotrebljene mobilne faze <sup>[36]</sup>.

U zavisnosti od tehnologije pripreme, komercijalno dostupni silika-gelovi mogu da se razlikuju po čistoći, poroznosti i drugim fizičkim karakteristikama. Istovremeno, silika-gelovi različitih proizvođača mogu da pokazuju značajne razlike u adsorpcionoj efikasnosti i zadržavanju komponenti smeše.

Postoje tri vrste silika-gela, tip A, tip B i tip C <sup>[7, 37, 38]</sup>.

Nemodifikovani silika-gelovi (Tip A i B) su hidrofilne faze sa silanolnim grupama i siloksanskim mostovima, koji mogu da imaju i proton donorske i akceptorske karakteristike. Na pH vrednosti mobilne faze iznad 4-5 silanolne grupe su deprotonovane i jonska izmena može da igra važnu ulogu u retenciji naelektrisanih jedinjenja. Odvajanje se postiže mehanizmom izmene katjona u kome su pozitivno naelektrisani bazni analiti jako zadržani, dok su negativni analiti slabo zadržani zbog elektrostatičkog odbijanja <sup>[37]</sup>.

Tip A je originalni hromatografski materijal za sve namene, proizveden taloženjem iz alkalnih rastvora silikata. On se često kontaminira metalima koji aktiviraju površinske silanolne grupe, i nije pogodan za primenu u HILIC uslovima jer dovodi do jakog zadržavanja nekih jedinjenja i pojave asimetričnih pikova.

Silika-gel tipa B sadrži veoma niske količine metalnih nečistoća i relativno je stabilan na umerenim i višim pH vrednostima (do pH 9). On uglavnom obezbeđuje bolje razdvajanje, posebno za bazne komponente. Na višim pH vrednostima, silanolne grupe su jonizovane i katjonska izmena igra važnu ulogu u zadržavanju, posebno pozitivno naelektrisanih baznih jedinjenja <sup>[37, 38]</sup>.

Tip C silika-gela je manje hidrofilna stacionarna faza u odnosu na prethodna dva tipa. Većina Si-OH grupa su konvertovane u Si-H grupe, koje ne mogu da doprinesu vodoničnim vezama ili elektrostatičkim interakcijama <sup>[37]</sup>. Tip C, "hidridni silika-gel", prvobitno je bio namenjen uglavnom za primenu sa nevodenim mobilnim fazama. Tip C

silika-gela na površini može imati i do 95% nepolarnih silicijum-hidridnih Si-H grupa umesto silanolnih grupa što ga čini manje polarnim. Može se koristiti za razdvajanje kiselina ili baza u HILIC režimu u puferisanim mobilnim fazama koje sadrže više od 50-70% organskog rastvarača (acetonitril).

Proces hidrosilanizacije suštinski menja svojstva silika-gela. Površina silika-gela tipa C može da ima do 95% originalnih Si-OH grupa zamenjenih nepolarnim Si-H grupama, tako da je manje polarna, te pokazuje manji afinitet prema vodi. Silicijum-hidrid je materijal koji je hemijski modifikovan uvođenjem nisko polarnih grupa da bi se povećala hidrofobnost, koja pruža neke nove osobine selektivnosti za razdvajanja manje polarnih jedinjenja. Hidrofobne interakcije modifikuju mehanizam zadržavanja, posebno primenom mobilnih faza sa nižim sadržajem acetonitrila. Silika-hidridne modifikovane stacionarne faze sa nepolarnim grupama pokazuju neke karakteristike dvostrukog mehanizma reverzno-fazne/normalno-fazne retencije i mogu se koristiti bilo u kombinaciji sa mobilnim fazama sa visokim sadržajem vode, u režimu RP, ili u vodenom normalno-faznom (HILIC) modu sa mobilnim fazama koje sadrže više od 50-70% acetonitrila.

Pored silika-gela, aluminijum-oksidi su jedan od najčešće korišćenih polarnih neorganskih sorbenata u TLC. Prema prirodi funkcionalnih grupa postoje tri tipa ovog sorbenta: kiseli, bazni i neutralni. Površina aluminijum-oksida je kompleksnija u odnosu na silika-gel, sadrži hidroksilne grupe, katjone aluminijuma i oksidne anjone pa je i mehanizam odvajanja supstanci složeniji <sup>[36]</sup>.

TLC je dobila još širu primenu uvođenjem prvih komercijalno dostupnih hemijski modifikovanih silika-gelova, a danas su dostupne TLC i HPTLC ploče sa različitim, i polarnim i nepolarnim, hemijski vezanim fazama.

Hemijski modifikovane stacionarne faze obično se dobijaju hemijskom modifikacijom površine silika-gela. Zbog prisustva reaktivnih, slobodnih silanolnih grupa na površini, silika-gel se različitim hemijskim reakcijama može modifikovati tako da se dobiju stacionarne faze sa specifičnim karakteristikama <sup>[7, 36]</sup>.

U RP modu se uobičajeno koriste sorbenti sa vezanim *n*-alkil grupama, od kojih su, zahvaljujući svojim odličnim mogućnostima razdvajanja širokog spektra različitih jedinjenja, oktadecil-silan (ODS, C-18) i oktil-silan (C-8) daleko najšire korišćene među

nepolarnim, hidrofobnim, vezanim fazama. Pored ovih postoje i druge alkil-, aril-, kao i druge modifikovane stacionarne faze koje se koriste u reverzno faznim uslovima.

Umereno polarne stacionarne faze sa hemijski vezanim cijano-, diol-, amino-, ciklodekstrin-, polietilenglikol- (PEG), pentafluorofenilpropil-, amido-, karbamato-grupama i nekim drugim funkcionalnim grupama su prvobitno bile namenjene uglavnom za reverzno-fazna odvajanja primenom vodom bogatih mobilnih faza. Međutim, većina njih pokazuje normalno-fazno ponašanje sa mobilnim fazama sa visokim sadržajem organske komponente (u HILIC uslovima), gde se zadržavanje mnogih jedinjenja pojačava sa povećanjem udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi.

U principu, svaka polarna stacionarna faza koja može da zadržava vodu na svojoj površini može se koristiti i u HILIC modu [37, 39].

Prvi rezultati normalno-faznih odvajanja na silika-gelu i amino-modifikovanom silika-gelu sa vodeno-organskim mobilnim fazama objavljeni su sredinom sedamdesetih, i od tada je dizajniran veliki broj specifičnih HILIC stacionarnih faza. Amido-, cijano-, diol-, polietilenglikol-, sulfoalkilbetain-, ciklodekstrin-, pentafluorofenilpropil-, polivinilalkohol-, polipeptid- i druge polarne hemijski modifikovane stacionarne faze postale su dostupne za HILIC razdvajanja [7, 13]. Neki novi materijali za HILIC odvajanja privlače sve veću pažnju u novije vreme, a strukturne varijacije stacionarnih faza HILIC tipa su brojnije od onih u reverzno-faznim sistemima. Ovi specijalni materijali za HILIC odvajanja pokazuju dobru selektivnost i reproduktivnost za razdvajanje polarnih jedinjenja. Iako broj komercijalno dostupnih stacionarnih faza dizajniranih posebno za HILIC raste, još uvek ne postoji tako "svestrana" stacionarna faza kao što je C-18 u RP [13].

Polarne stacionarne faze uobičajeno korišćene u HILIC razdvajanjima su silika-gel i modifikovani silika-gelovi sa diol-, amino-, amido- i cviterjonskim funkcionalnim grupama. HILIC faze mogu da se podele na neutralne, polarne i jonske. Površina HILIC stacionarnih faza može biti kisela, neutralna ili bazna, pa shodno tome, mehanizam zadržavanja može biti različit [2, 40]. Detaljan pregled hromatografskih sistema, a posebno stacionarnih faza, korišćenih u HILIC dao je Jandera u svom revijalnom radu [7]. Neke stacionarne faze su razvijene baš za upotrebu pod HILIC uslovima, npr. poli(sukcinimid)- ili –sulfoalkilbetain-silika-gel.

Generalno, zadržavanje polarnih analita jača u sledećem nizu različitih polarnih stacionarnih faza: cijanopropil- < diol- < aminopropil- << silika-gel, ali specifične interakcije svake pojedinačne stacionarne faze sa odvajanim supstancama mogu snažno uticati na selektivnost razdvajanja.

Guo i Gaiki <sup>[41]</sup> su poredili zadržavanje malih polarnih jedinjenja (karboksilnih kiselina, nukleozida i nukleotida) na nemodifikovanom silika-gelu i modifikovanim amid-, amino-, aspartamid- i sulfobetain- stacionarnim fazama koje se obično koriste u HILIC, pri čemu su utvrdili da je na silika-gelu najslabije zadržavanje, ali najveća selektivnost u odnosu na druge polarne stacionarne faze.

HILIC stacionarne faze se uobičajeno klasifikuju na osnovu naelektrisanja površinskih funkcionalnih grupa, i mogu se podeliti na neutralne, naelektrisane i cviterjonske faze <sup>[41]</sup>.

Neutralne stacionarne faze sadrže polarne funkcionalne grupe koje nisu naelektrisane u opsegu pH 3-8, koji se obično koristi za mobilne faze u HILIC, stoga, one ne obezbeđuju jonoizmenjivačke interakcije sa bilo kojim tipom analita. Kao posledica toga, HILIC retencija sa neutralnim fazama prvenstveno se zasniva na hidrofilnim interakcijama. Mora se uzeti u obzir da na pH iznad 4-5, faze na bazi silika-gela mogu sadržati deprotonovane preostale silanolne grupe koje nose negativno naelektrisanje i mogu doprineti elektrostatičkim interakcijama. Većina HILIC stacionarnih faza pripada ovoj kategoriji, koja sadrži široki spektar funkcionalnih grupa kao što su amidne, aspartamidne, diol, cijano, ciklodekstrinske i saharidne.

Amidne faze se dobijaju funkcionalizacijom površine silika-gela karbamoil- ili amidnim grupama, vezanim preko alkil nizova. One su pronašle mnoge primene za odvajanje oligosaharida i peptida. Među amidnim fazama, TSKgel amid-80 je jedna od najpopularnijih faza. Diol faze tipično sadrže 2,3-dihidroksipropil ligande, koji pokazuju hidrogen donorske i hidrogen akceptorske aktivnosti preko-OH grupe. U ovom slučaju, vodonične veze, pored hidrofilne particije, doprinose retenciji polarnih analita sa funkcionalnim grupama sa vodonik donornim ili akceptorskim svojstvima. Diol faze pokazuju visoku polarnost i sposobnost vodoničnog vezivanja, a ne sadrže jonizujuće grupe, osim neizreagovanih silanolnih grupa, što znači da su odgovarajuće za HILIC režim. Diol faze se koriste za analizu proteina, polarnih metabolita i vitamina <sup>[7, 13]</sup>.



Poseban tip diol faza predstavljaju umrežene diol faze, kao što je Luna HILIC kolona. Diol grupe su povezane etarskim vezama i formiraju polimerni sloj na površini silika-gela koji sadrži i oksietilen i hidroksilne grupe. Ove faze su stabilnije od klasičnih diol faza, polimerni sloj štiti preostale silanolne grupe, tako da su ove faze potpuno nezavisne od pH vrednosti mobilne faze. Međutim, pomenute faze su manje hidrofilne i polarna jedinjenja se slabije zadržavaju na njima u HILIC uslovima. Aplikacije sa unakrsno-povezanim diol fazama uključuju odvajanje fenola, oligonukleotida i metabolita estrogena [37].

Naelektrisane stacionarne faze sadrže polarne funkcionalne grupe, koje nose pozitivno ili negativno naelektrisanje koje obično zavisi od pH vrednosti mobilne faze. U ovom slučaju, odvajanje naelektrisanih analita uglavnom se zasniva na jonoizmenjivačkom mehanizmu, u kombinaciji sa hidrofilnom raspodelom. Amino faze su bile među prvim naelektrisanim fazama primenjenim za HILIC razdvajanja. Funkcionalna grupa je aminopropil ligand vezan za matriks silika-gela. Primarne amino grupe su pozitivno naelektrisane i pokazuju visok afinitet za anjonska kiselina jedinjenja. Dok se bazni analiti generalno jako zadržavaju na silika-gelu vodoničnim vezama i jonoizmenjivačkim interakcijama sa silanolnim grupama, kiselina jedinjenja pokazuju povećan afinitet za amino faze što može ponekad čak dovesti do ireverzibilne adsorpcije. Hidrofilne interakcije preovlađuju u retenciji nanaelektrisanih polarnih jedinjenja, dok se naelektrisani analiti prvenstveno zadržavaju putem mehanizma anjonske izmene. Amino faze se široko koriste u oblasti proteomike i metabolomike [7, 37].

Cviterjonske stacionarne faze sadrže jednake količine suprotno naelektrisanih grupa vezanih na površini silika-gela. Cviterjonski ligandi obično sadrže jako kisele i jako bazne funkcionalne grupe koje nisu osetljive na pH vrednost mobilne faze. Takve stacionarne faze su prvobitno razvijene za odvajanje neorganskih katjona i anjona u jonoizmenjivačkoj hromatografiji, ali su našle široku primenu u HILIC [41].

Dve cviterjonske faze, poznate kao ZIC-HILIC i ZIC-cHILIC, se često koriste u HILIC. ZIC-HILIC ligandi su sulfobetainske grupe, sastavljene od pozitivno naelektrisanih kvaternarnih amonijum jona i negativno naelektrisanih sulfonatnih grupa. Prisustvo suprotno naelektrisanih grupa u odnosu 1:1 čini površinu elektroneutralnom.

ZIC-cHILIC faze sa fosforilholin grupama pokazuju suprotno ponašanje. Drugačiji prostorni raspored naelektrisanih grupa, sa negativnim fosfatnim grupama

vezanim za silika-gel i pozitivno naelektrisanim kvaternarnim amonijum grupama sa spoljnom orijentacijom, je odgovoran za pozitivno naelektrisanje površine ove stacionarne faze.

Cviterjonski ligandi imaju jaku sposobnost vezivanja vode na površini, te particija hidrofilnih analita ostaje primarni mehanizam retencije. Pored toga, mogućnost elektrostatičkih interakcija ima veliki uticaj na redosled eluiranja. Elektrostatičke interakcije sa cviterjonskim fazama su slabije od onih sa naelektrisanim fazama. Cviterjonske faze su posebno raznovrsne i pronašle su primenu u analizi kiselina, baza i cviterjonskih jedinjenja [7, 41].

Kako izbor odgovarajuće stacionarne faze igra veliku ulogu u primeni HILIC tehnike, poslednjih godina se nastavlja razvoj novih stacionarnih faza pogodnih za odvajanje polarnih molekula u HILIC modu. [42]

Promenom stacionarne i/ili mobilne faze menja se selektivnost hromatografskog sistema i omogućava razdvajanje različitih klasa jedinjenja.

#### **2.4. Izbor mobilne faze**

Mobilna faza je rastvarač, tj. sistem rastvarača izabran u skladu sa osobinama komponenata smeše koja se razdvaja. Naime, izbor odgovarajuće mobilne faze zavisi od prirode odvajane supstance i prirode sorbenta, a bira se tako da, u kombinaciji sa stacionarnom fazom, obezbedi što bolje razdvajanje komponenata smeše. Uloga mobilne faze je da obezbedi transport analita kroz hromatografski sistem, a parametar koji se koristi za rangiranje sposobnosti rastvarača da izazove kretanje analita u hromatografskom sistemu je eluciona moć (snaga) rastvarača. Budući da zavisi i od svojstava stacionarne faze, to je zapravo više svojstvo sistema nego svojstvo rastvarača, jer isti rastvarač može imati različitu snagu u različitim hromatografskim sistemima. Voda se, na primer, smatra jakim rastvaračem na silika-gelu i slabim rastvaračem u reverzno-faznoj hromatografiji.

U tankoslojnoj hromatografiji izbor odgovarajuće mobilne faze je faktor koji ima najveći uticaj na razdvajanje, a često je i jedan od najkomplikovanijih koraka u istraživanju. Samo u retkim slučajevima se mobilna faza sastoji od samo jednog

rastvarača, mnogo češće je to smeša dve ili više komponenti. Obično je pri izboru rastvarača prvi kriterijum rastvorljivost uzorka, pri čemu treba uzeti u obzir i afinitet komponenti smeše prema stacionarnoj i mobilnoj fazi kako bi se postiglo razdvajanje. Kada se bira mobilna faza, najjednostavnije je da se izabere mobilna faza koja je korišćena za jedinjenja slične strukture, a zatim se optimalna mobilna faza dobija menjanjem odnosa rastvarača koji je čine [29-35].

Mobilna faza treba da bude takva da dobro rastvara, ali da ne reaguje hemijski sa komponentama smeše koja se ispituje. Takođe, kad god je moguće, treba izbegavati toksične i rastvarače koji zagađuju životnu sredinu.

U HILIC se u kombinaciji sa polarnim stacionarnim fazama koriste mobilne faze koje obično sadrže 5-40% vode ili pufera u smeši sa organskim rastvaračima. Negde se navodi da je minimalni sadržaj vode u mobilnoj fazi 2-3% [25]. Ova količina je neophodna da bi se obezbedila zadovoljavajuća hidratacija čestica stacionarne faze. Preporučuje se da se izvedu početni eksperimenti sa relativno visokim sadržajem (npr. 40%) vode u acetonitrilu, kako bi se osiguralo eluiranje svih komponenti uzorka, a zatim se snaga eluiranja menja povećanjem koncentracije acetonitrila, dok se ne postigne prihvatljiva retencija uzorka.

U HILIC, kao i u RP modu, kao organska komponenta mobilne faze najčešće se koristi acetonitril, ali se koriste i drugi rastvarači, kao što su niži alkoholi, aceton itd. Pored sastava rastvarača na hromatografski proces zadržavanja takođe utiču vrsta i količina soli, kao i pH vrednost i temperatura [40].

Iz vodeno-organske mobilne faze voda se snažno adsorbuje na površini polarnih adsorbenata. Sa mobilnim fazama koje sadrže više vode adsorpcija uzrokuje formiranje adsorbovanog vodenog sloja koji je dovoljne debljine da se podstakne tečno-tečno raspodela između ostatka mobilne faze i adsorbovanog vodenog sloja. Međutim, i adsorpcija na polarnim površinskim centrima može značajno doprineti zadržavanju odvajanih supstanci.

Sadržaj vode u HILIC odvajanjima je zato veoma važan. HILIC retencija zavisi od sastava i debljine vodenog sloja. Najmanje 2% vode je od suštinskog značaja za formiranje vodenog sloja koji je uključen u razdvajanje i obezbeđuje potpuno rastvaranje hidrofilnih analita. Međutim, pri nižim sadržajima vode u mobilnoj fazi (<5%) direktne interakcije analita sa stacionarnom fazom su više verovatne. Ovo se

ogleda u odstupanju od particionog mehanizma, sa promenom selektivnosti, a sa druge strane visok sadržaj vode u mobilnoj fazi može drastično smanjiti zadržavanje hidrofilnih analita i dovesti do njihovog eluiranja sa frontom. Ovaj vodeni sloj na površini stacionarne faze se smatra pseudo-stacionarnom fazom. Pretpostavlja se da su molekuli vode koji su u neposrednom kontaktu sa površinom silika-gela skoro imobilisani vodoničnim vezama sa silanolnim grupama, dok je sam vodeni sloj promenljive debljine <sup>[13]</sup>.

Osim sadržaja vode, tj. odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi, i sam izbor organskog rastvarača ima takođe jak uticaj na zadržavanje u HILIC režimu. Eluciona moć organskih rastvarača u HILIC režimu povećava se sa povećanjem polarnosti rastvarača i sposobnosti da učestvuje u proton-donor/proton-akceptor interakcijama. Idealni organski rastvarač treba da bude mešljiv sa vodom, ali bez vodonik-donorskih ili akceptorskih funkcionalnih grupa, koje mogu da se takmiče sa vodom u solvataciji površine stacionarne faze. Acetonitril, koji poseduje sve ove karakteristike, se najčešće koristi kao rastvarač za HILIC razdvajanja <sup>[37]</sup>

Acetonitril se koristi kao organska komponenta mobilne faze u većini HILIC aplikacija, jer se sa mobilnim fazama koje sadrže druge organske rastvarače često ne postiže dovoljno zadržavanje i dobijaju se široki ili nesimetrični pikovi. I drugi aprotični rastvarači koji su mešljivi sa vodom (npr. tetrahidrofuran ili dioksan) mogu da se koriste. Oni pokazuju proton akceptorska svojstva kojima mogu da ometaju građenje vodoničnih veza sa stacionarnom fazom i obezbeđuju slabiju retenciju u poređenju sa acetonitriplom <sup>[37]</sup>. Alkoholi se takođe mogu koristiti kao organske komponente mobilne faze, iako je veći udeo potreban u odnosu na aprotične rastvarače da bi se postigao isti stepen zadržavanja analita. Mnogi polarni organski rastvarači takođe mogu da se koriste, ali zbog povoljnih karakteristika ACN (npr. niska viskoznost i efikasna odvajanja na niskim pritiscima) se najviše koristi kao rastvarač u HILIC. ACN ima manju elucionu moć ( $\epsilon_0 = 0,65$ ), u poređenju sa metanolom ( $\epsilon_0 = 0,95$ ), etanolom ( $\epsilon_0 = 0,89$ ) ili izopropanolom ( $\epsilon_0 = 0,82$ ), a upotreba rastvarača veće elucione moći može da dovede do eluiranja nekih analita sa frontom. Iako je snaga eluiranja acetona ( $\epsilon_0 = 0,58$ ) manja nego ACN, njegova visoka apsorbancija ga čini nepraktičnim za primene u kolonskoj visoko-efikasnoj tečnoj hromatografiji sa UV detekcijom, mada se može koristiti sa maseno-spektrometrijskom (MS) detekcijom <sup>[43]</sup>.

Još jedna prednost korišćenja ACN nad drugim organskim rastvaračima je njegova hemijska struktura, koja ne favorizuje formiranje vodoničnih veza. Tako, upotrebom ACN može da se u značajnoj meri izbegne kompeticija između rastvarača i molekula vode za vezivanje za stacionarnu fazu. Zamena molekula vode sa organskim rastvaračem utiče na formiranje vodenog polustacionarnog sloja, što čini stacionarnu fazu hidrofobnijom i smanjuje zadržavanje polarnih analita <sup>[25]</sup>.

Bilo je pokušaja da se ACN zameni manje toksičnim rastvaračima, ali to nije do sada bilo naročito uspešno, osim nekoliko aplikacija, gde je zamenjen tetrahidrofuranom. Aceton ima sličnu polarnost kao acetonitril, ali dovodi do slabije retencije pod HILIC uslovima <sup>[38]</sup>.

Ako se umesto acetonitrila upotrebi neki protičan rastvarač, na primer neki alkohol, on se može, zbog sposobnosti formiranja vodoničnih veza, vezivati za aktivne centre na površini stacionarne faze, istiskujući molekule vode i na taj način formirati hidrofobniju stacionarnu fazu, pa će se polarne komponente slabije zadržavati, tj. retenciono vreme se smanjuje <sup>[44]</sup>. Mnogi autori su ispitivali uticaj zamene acetonitrila kao organske komponente mobilne faze nekim alkoholom <sup>[24]</sup>. Relativna snaga eluiranja za uobičajene HILIC rastvarače sledi redosled: metanol > etanol > izopropanol > tetrahidrofuran > acetonitril <sup>[37]</sup>. Protični rastvarači, kao što su alkoholi, obezbeđuju najslabiju retenciju. Među alkoholima, zadržavanje se povećava sa povećanjem ugljovodoničnog niza (povećana hidrofobnost) i smanjenjem kiselosti (smanjena aktivnosti vodonik-donora) <sup>[37]</sup>. Utvrđeno je da retenciono vreme raste sa povećanjem dužine ugljovodoničnog niza u alkoholu (redosled je metanol < etanol < izopropil-alkohol). Smanjenje polarnosti alkohola bi moglo da dovodi do toga da komponente sve više prelaze u vodeni sloj na površini, što dovodi do povećanja retencionih vremena. Sa druge strane, metanol, koji ima izraženu sposobnost formiranja vodoničnih veza, može da ometa formiranje vodenog sloja na površini stacionarnih faza, a takođe može da formira vodonične veze sa odvajanim komponentama i tako smanji jonsku izmenu u odnosu na hidrofilne interakcije što vodi smanjenju retencije <sup>[45]</sup>.

## 2.5. Mehanizam odvajanja polarnih jedinjenja

Dok je mehanizam hromatografskog razdvajanja u RP modu uglavnom poznat i objašnjen, mehanizam i teorijsko objašnjenje retencije u HILIC je predmet mnogih radova [2, 9, 13, 15, 25, 26, 37, 40, 41]. Različite istraživačke grupe i dalje se ne slažu oko dominantnog mehanizma retencije i najbolje teorije koja bi ga opisala i predvidela.

Teško je jednoznačno definisati HILIC mehanizam. Sam termin "HILIC" može da se koristi za mnoge sisteme koji uključuju polarne stacionarne faze u kombinaciji sa vodenom-organskim mobilnim fazama, i generalno pokazuju normalno-faznu retenciju. Mehanizam zadržavanja u HILIC uslovima istovremeno zavisi od različitih vrsta međumolekulskih interakcija između analita i stacionarne faze, analita i mobilne faze, i stacionarne i mobilne faze.

Prva relevantna studija o mehanizmu razdvajanja u HILIC uključivala je ugljene hidrate, jer su autori smatrali da ova klasa jedinjenja predstavlja idealan model analita. Ove studije su izvedene kada termin "HILIC" još nije bio usvojen, pokazujući da je potraga za objašnjenjem mehanizama uključenih u ovaj režim razdvajanja započela još sa prvim primenama.

Primećeno je da je redosled eluiranja sličan kao u normalno-faznoj hromatografiji, pa je pretpostavljeno da i mehanizam mora biti sličan. Kao u NP sistemima, predložen je mehanizam razdvajanja regulisan adsorpcijom [43]. Međutim, ova ideja je bila ograničena na analite koji poseduju hidroksilne grupe u svojim strukturama, što je smanjilo obim ove hipoteze. Uskoro je pojava novih, boljih ideja dovela do zamene mehanizma direktne adsorpcije. Nekoliko drugih autora su zaključili da je najrelevantniji mehanizam u HILIC režimu particija, nakon posmatranja odvajanja ugljenih hidrata korišćenjem nemodifikovanog i amino-modifikovanog silika-gela [43]. Kasnije, Alpert je predložio kompleksan mehanizam razdvajanja u HILIC režimu, koji je i danas prihvaćen. U njemu, polarne grupe vezane za različite stacionarne faze privlače molekule vode, formirajući vodeni sloj na površini stacionarne faze. Tako, polarni analiti koji se rastvaraju u mobilnoj fazi podležu particiji između dve tečne faze: delimično imobilisanog vodenog sloja i mobilne faze koja takođe sadržaji neku količinu vode. Polarna jedinjenja imaju veći afinitet za delimično imobilisani vodeni sloj nego za pretežno organsku mobilnu fazu, jer su bolje rastvorna u vodi. Povećanje polarnosti

analita dovodi do povećanja interakcija sa vodenim slojem, povećavajući zadržavanje [8].

Orth i Engelhardt [46] su pokazali da povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi takođe povećava količinu površinski zadržane vode na stacionarnoj fazi, formirajući stacionarnu tečnost. Debljina vodenog sloja se povećava do granice zasićenja, koja zavisi od broja i prirode hemijski vezanih polarnih grupa na površini stacionarne faze.

Ponovnim analiziranjem ovih rezultata, Hemstrom i Irgum [9] su zaključili da se zadržavanje rastvorenih supstanci smanjuje sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi, jer je razdvajanje regulisano podelom, a ravnotežna podela između dve faze zavisi od relativne rastvorljivosti, i kako se sadržaj vode u mobilnoj fazi povećava, postaje sličniji adsorbovanom vodenom sloju. Ovo dovodi do povećanja vremena boravka jedinjenja u mobilnoj fazi i smanjenog zadržavanja. Stoga, retencija je direktno proporcionalna polarnosti komponenti smeše i obrnuto proporcionalna polarnosti mobilne faze.

Mehanizmi uključeni u HILIC razdvajanja se još uvek razmatraju. Uprkos nekim sličnostima sa RPLC i NPLC, HILIC mora da se posmatra kao novi tip hromatografije, jer česta poređenja sa drugim tehnikama razdvajanja mogu dovesti u pitanje razumevanje HILIC retencionog mehanizama. Mehanizam HILIC razdvajanja je složeniji i često se posmatra kao mešoviti režim odvajanja. Nasuprot većini drugih hromatografskih tehnika, deo mobilne faze formira sastavni deo stacionarne faze, a raspodela polarnih jedinjenja između vodenog, delimično imobilizovanog (ili "sporo krećućeg") sloja na površini stacionarne faze i ostatka mobilne faze se smatra primarnim mehanizmom [2, 3]. Iako se particija analita između organskim rastvaračima bogate mobilne faze i delimično imobilizovanog vodenog sloja na površini stacionarne faze smatra primarnim mehanizmom zadržavanja, i druge interakcije značajno doprinose HILIC razdvajanju [37]. Kod HILIC razdvajanja na retenciju utiče i adsorpcija, zahvaljujući intermolekulskim silama (elektrostatičke interakcije, vodonične veze, dipol-dipol interakcije i slabe hidrofobne interakcija), tako da se mehanizam može posmatrati kao multimodalni, jer obuhvata i hidrofilne i hidrofobne interakcije.

Jandera i saradnici [47] su predložili istovremeno uključivanje nekoliko mogućih mehanizama sa polarnim stacionarnim fazama korišćenim za razdvajanje nekih flavonoida u RP i HILIC režimu na istoj koloni, samo variranjem udela ACN u

mobilnoj fazi. Ovaj predlog se zasniva na posmatranju hidrofobnih i hidrofilnih razdvajanja sa istom stacionarnom fazom, prvobitno namenjenom za HILIC režim. Ovi rezultati takođe ukazuju na to da nisu sve polarne faze kandidati za multimodalni mehanizam razdvajanja.

Mehanizam zadržavanja u HILIC ne zavisi samo od vrste stacionarne faze, već i od hemijske prirode analita i sastava mobilne faze. Važno je napomenuti da, iako je mehanizam multimodalnog razdvajanja u HILIC dobro prihvaćen, mnogi autori ističu važnost procesa particije u ovom režimu razdvajanja, koji je prvobitno predložen <sup>[42]</sup>.

Polarne stacionarne faze, kao što su one koje se koriste u HILIC, snažno zadržavaju vodu. U prisustvu vodene mobilne faze sa visokim sadržajem acetonitrila, dolazi do stvaranja gradijenta eluenta, koji se kreće od acetonitriлом bogatog ostatka mobilne faze do vodom bogatog sloja na hidrofilnoj površini stacionarne faze. Acetonitriлом bogata mobilna faza i vodom bogati sloj su dve tečne faze različitih polarности i mogu se posmatrati kao tečno-tečni sistem za odvajanje. To podržava mišljenje da je mehanizam odvajanja u HILIC prvenstveno regulisan particijom analita između ove dve faze, na osnovu relativne rastvorljivosti. Kao posledica toga, polarni hidrofilni analiti su prvenstveno rastvoreni u vodenom sloju, i na taj način, snažno zadržani.

Najmanje 2-3% vode u mobilnoj fazi je neophodno za stvaranje vodenog sloja na površini. Zadržavanje polarnih analita se zasniva na visokom sadržaju organske komponente u mobilnoj fazi, jer u ovim uslovima voda interaguje snažnije sa površinom polarnih stacionarnih faza. Povećanje sadržaja vode ima efekat smanjenja razlike u polarности između ostatka mobilne faze i adsorbovanog sloja. Ovo rezultira rastvaranjem analita u ostatku mobilne faze i eluiranjem, tj. smanjenjem retencije <sup>[37]</sup>.

Iako se pretpostavlja da se na površini stacionarne faze formira vodeni sloj, to ne znači da su silanolne grupe na nemodifikovanom ili amino-, amido-, cijano-, diol- grupe na modifikovanim silika-gelovima potpuno deaktivirane, i na taj način sprečene da interaguju sa analiziranim komponentama. Naime, utvrđeno je da se analizirane komponente različito ponašaju na različitim HILIC stacionarnim fazama, pa je pretpostavljeno da mali polarni molekuli mogu da prođu kroz vodeni sloj na površini i direktno interaguju sa grupama na površini stacionarne faze. Ova pretpostavka nije



potvrđena, ali se smatra da je mehanizam odvajanja kombinacija jonske izmene, vodoničnog vezivanja, hidrofobnih i hidrofилnih interakcija <sup>[44]</sup>.

Prisustvo jonizovanih grupa ili, na primer, nederivatizovanih jonizovanih silanolnih grupa, na površini stacionarne faze može da dovede do ostvarivanja elektrostatičkih interakcija sa naelektrisanim analitima. Ove interakcije mogu biti privlačne ili odbojne, u zavisnosti od naelektrisanja analita i stacionarne faze. Elektrostatičko privlačenje između pozitivno naelektrisanih jedinjenja i negativno naelektrisane stacionarne faze, i obrnuto, dovodi do povećanja vremena zadržavanja, dok elektrostatičko odbijanje između analita i stacionarne faze sa istim naelektrisanjem ima suprotan efekat. Mehanizam je delimično sličan mehanizmu u jonoizmenjivačkoj hromatografiji. Međutim, nekoliko studija je pokazalo da se retenciono ponašanje naelektrisanih analita eluiranih pod HILIC uslovima ne može u potpunosti opisati uobičajenim modelima IEC (Ion-Exchange Chromatography) retencije, jer i onda kada se mogu javiti elektrostatičke interakcije, one mogu biti značajne, ali ipak predstavljaju samo jedan od doprinosa ukupnoj retenciji u HILIC uslovima. Elektrostatičke interakcije doprinose retencionom mehanizmu u zavisnosti od prirode stacionarne faze, jonizacije analiziranih jedinjenja i tipa i koncentracije pufera u mobilnoj fazi <sup>[37]</sup>.

U HILIC, mogućnost direktne interakcije, odnosno, vodoničnog vezivanja analita sa stacionarnom fazom, pored particije, se razmatra već duže vreme. Molekuli sa proton-donorskim ili proton-akceptorskim funkcionalnim grupama mogu da grade vodonične veze sa stacionarnom fazom. Ova vrsta interakcije očigledno zavisi od sposobnosti stacionarne faze za stvaranje vodoničnih veza i postaje posebno važna u slučaju nenaelektrisanih analita, kada elektrostatičke interakcije ne mogu da podrže retenciju <sup>[37]</sup>.

Dominantni mehanizam odvajanja u hromatografiji hidrofилnih interakcija nije stalan i nije ga uvek lako predvideti, jer zavisi i od prirode analiziranih komponenti, kao i od prirode primenjene stacionarne, i prirode i sastava mobilne faze, i može da varira od adsorpcije do particije. Na istoj stacionarnoj fazi mehanizam može da se menja od hidrofobnih do hidrofилnih interakcija sa promenom sadržaja vode u mobilnoj fazi, a retencionna kriva ima karakterističan U oblik koji je tipičan za promenu (obrtnanje) retencionog mehanizma <sup>[44]</sup>. Veliki broj polarnih sorbenata koje se koriste kao

stacionarna faza u HILIC pokazuje dualni (HILIC-RP) mehanizam: RP pri visokom sadržaju vode u mobilnoj fazi i HILIC pri visokom sadržaju organske komponente [26].

Dvostruki retencioni mehanizam, gde normalno-fazni i reverzno-fazni efekti istovremeno doprinose zadržavanju, predstavlja uobičajenu pojavu u hromatografiji polarnih jedinjenja na mnogim polarnim vezanim stacionarnim fazama. Čak i na nemodifikovanom silika-gelu siloksanski mostovi mogu pokazati neke reverzno-fazne interakcije. U reverzno-faznim sistemima sa binarnim mobilnim fazama, zadržavanje se smanjuje kako koncentracija manje polarnog rastvarača raste, dok se u normalno-faznoj hromatografiji zadržavanje smanjuje sa povećanjem koncentracije polarnijeg rastvarača (vode). Sastav mobilne faze na minimumu U krive odgovara prelazu iz RP u NP (HILIC) mehanizam. Za mnoga jedinjenja zadržavanje na tzv. U-tački je veoma slabo. Sastav mobilne faze u ovoj tački uglavnom zavisi od stacionarne faze, pa se sa različitim stacionarnim fazama može se očekivati različiti sastav mobilne faze u U-tački.

Tipično normalno-fazno ponašanje je primećeno u celom opsegu nevodenih mobilnih faza, a tipična reverzno-fazna zavisnost je uočena sa mobilnim fazama koje sadrže manje od 80% organskog rastvarača u vodi. Generalno, sa manje polarnim stacionarnim fazama, U tačka se pomera ka većim koncentracijama vode u mobilnoj fazi, omogućavajući korišćenje mobilnih faza sa višim sadržajem vode u HILIC. [7].

Međutim, malo radova je posvećeno prelazu mehanizma iz adsorpcije u particiju u HILIC modu i faktorima koji imaju uticaj na ove promene. Kritični parametri za mehanizam zadržavanja u HILIC su struktura uzorka, sastav mobilne faze i polarne funkcionalne grupe na stacionarnim fazama [2,15].

Kada je sadržaj vode veći od 50% (vodena sredina), zadržavanje polarnih jedinjenja se povećava sa povećanjem hidrofobnosti analita. Povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi dovodi do dužeg zadržavanja, što je slično RP odvajanju. Ovde su hidrofobne interakcije dominantne. Kada je sadržaj vode manji od 50% (organska sredina), povećanje zadržavanja je primećeno kod više hidrofilnih analita. Pod ovim uslovima, voda postaje jači rastvarač i povećanje sadržaja vode smanjuje zadržavanje analita [43].

U ovakvim uslovima retencioni redosled se može pripisati kombinaciji adsorpcionog i particionog mehanizma, a prelaz između ova dva mehanizma je

verovatno kontinualan i zavisi od sadržaja vode u mobilnoj fazi tj. sa povećanjem sadržaja vode particija postaje dominantna <sup>[7, 26]</sup>.

Iako je mehanizam odvajanja polarnih jedinjenja u HILIC uslovima jos uvek nedovoljno objašnjen, poslednjih godina je ipak postignut značajan pomak u objašnjenju najvažnijih procesa koji utiču na retenciju. Primenom više hromatografskih sistema za razdvajanje i proučavanje hromatografskog ponašanja različitih malih polarnih jedinjenja u ovom radu su dobijeni rezultati koji bi mogli doprineti razumevanju dominantnog mehanizma odvajanja u HILIC uslovima, odnosno vrste i jačina interakcija koje se ostvaruju između odvajanih supstanci i stacionarne i mobilne faze.

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3. Eksperimentalni deo

#### 3.1. Ispitivanje hromatografskog ponašanja Ru (II)-arenskih kompleksa

Retenciono ponašanje devet neutralnih Ru(II) arenskih kompleksa sintetisanih u skladu sa postupcima ranije opisanim u literaturi [48, 49] proučavano je primenom hromatografskih sistema koji su navedeni u Tabeli 2.

Za sva ispitivanja korišćene su komercijalno dostupne ploče (Merck, Darmstadt, Nemačka) prevučene slojem silika-gela (Art. 5554), cijano-modifikovanog silika-gela (Art. 16464), diol-modifikovanog silika-gela (Art. 12668), aluminijum-oksida (Art. 5550) ili RP-18 silika-gela (Art. 5559).

Na ploče dimenzija 10×10 cm nanošeni su alikvoti zapremine 1  $\mu\text{l}$  sveže pripremljenih vodenih rastvora odgovarajućih jedinjenja (približne koncentracije 2 mg  $\text{ml}^{-1}$ ).

Pre razvijanja, ploče sa nanetim polaznim mrljama sićene su tokom 15 minuta u hromatografskoj kadi parama mobilne faze koja će se koristiti za njihovo razdvajanje.

Kao mobilna faza korišćene su binarne smeše vode i organskog rastvarača, različitih koncentracija (Tabela 2). Svi upotrebljeni rastvarači bili su analitičkog stepena čistoće.

Posle razvijanja pojedinačne zone Ru kompleksa su detektovane pod UV lampom (254 nm).

Razvijanje hromatograma vršeno je horizontalnom tehnikom u CAMAG HPTLC horizontalnoj kadi (CAMAG, Mutenz, Švajcarska).

Sva ispitivanja izvedena su na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C).

Svi DFT proračuni izvedeni su upotrebom programa *Gaussian 09, revision C.01* [50].

Tabela 2. Hromatografski sistemi za proučavanje ponašanja Ru(II) kompleksa

| R. br. | Stacionarna faza                     | Mobilna faza  |
|--------|--------------------------------------|---|
| 1      | Silika-gel 60 F <sub>254</sub>       | 0-100% (v/v) vode u ACN,<br>u porcijama od 10% (v/v)      |
| 2      | Silika-gel 60 F <sub>254</sub>       | 0-100% (v/v) vode u acetonu,<br>u porcijama od 10% (v/v)  |
| 3      | Silika-gel 60 F <sub>254</sub>       | 0-100% (v/v) vode u metanolu,<br>u porcijama od 10% (v/v) |
| 4      | Aluminijum-oksidi                    | 0-100% (v/v) vode u ACN,<br>u porcijama od 10% (v/v)      |
| 5      | Aluminijum-oksidi                    | 0-100% (v/v) vode u acetonu,<br>u porcijama od 10% (v/v)  |
| 6      | Aluminijum-oksidi                    | 0-100% (v/v) vode u metanolu,<br>u porcijama od 10% (v/v) |
| 7      | Diol-silika-gel                      | 0-100% (v/v) vode u ACN,<br>u porcijama od 10% (v/v)      |
| 8      | Diol-silika-gel                      | 0-100% (v/v) vode u acetonu,<br>u porcijama od 10% (v/v)  |
| 9      | CN-silika-gel F <sub>254S</sub>      | 0-100% (v/v) vode u ACN,<br>u porcijama od 10% (v/v)      |
| 10     | CN-silika-gel F <sub>254S</sub>      | 0-100% (v/v) vode u acetonu,<br>u porcijama od 10% (v/v)  |
| 11     | RP-18 silika-gel 60 F <sub>254</sub> | 0-100% (v/v) vode u ACN,<br>u porcijama od 10% (v/v)      |
| 12     | RP-18 silika-gel 60 F <sub>254</sub> | 0-100% (v/v) vode u metanolu,<br>u porcijama od 10% (v/v) |

### 3.2. Ispitivanje hromatografskog ponašanja nekih anestetika

Retenciono ponašanje devet komercijalno dostupnih anestetika proučavano je primenom hromatografskih sistema koji su navedeni u Tabeli 3.

Za sva ispitivanja korišćene su komercijalno dostupne ploče (Merck, Darmstadt, Nemačka) prevučene slojem silika-gela (Art. 5554) i aluminijum-oksida (Art. 5550).

Na ploče dimenzija 10×10 cm nanošeni su alikvoti zapremine 1  $\mu$ l sveže pripremljenih vodenih rastvora odgovarajućih jedinjenja (približne koncentracije 2 mg  $\text{ml}^{-1}$ ).

Pre razvijanja, ploče sa nanetim polaznim mrljama sićene su tokom 15 minuta u hromatografskoj kadi parama mobilne faze koja će se koristiti za njihovo razdvajanje.

Kao mobilna faza korišćene su binarne smeše vode i organskog rastvarača, različitih koncentracija (Tabela 3). Svi upotrebljeni rastvarači bili su analitičkog stepena čistoće.

Posle razvijanja pojedinačne zone anestetika su izazvane Dragendorfovom reagensom <sup>[51]</sup>.

Razvijanje hromatograma vršeno je horizontalnom tehnikom u CAMAG HPTLC horizontalnoj kadi (CAMAG, Mutenz, Švajcarska).

Sva ispitivanja izvedena su na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C).

Tabela 3. Hromatografski sistemi korišćeni za proučavanje hromatografskog ponašanja anestetika

| R.br. | Stacionarna faza                               | Mobilna faza   |
|-------|--|--|
| 1     | Silika gel 60 F <sub>254</sub>                 | 0-100% (v/v) vode u metanolu, u porcijama od 10% (v/v) |
| 2     | Silika gel 60 F <sub>254</sub>                 | 0-100% (v/v) vode u ACN, u porcijama od 10% (v/v)      |
| 3     | Silika gel 60 F <sub>254</sub>                 | 0-100% (v/v) vode u THF, u porcijama od 10% (v/v)      |
| 4     | Silika gel 60 F <sub>254</sub>                 | 0-100% (v/v) vode u dioksanu, u porcijama od 10% (v/v) |
| 5     | Aluminijum oksid 60 F <sub>254</sub> neutralni | 0-100% (v/v) vode u ACN, u porcijama od 10% (v/v)      |

### 3.3. Razvoj i validacija metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice

Analizirane su sintetičke boje za životne namirnice: Tartrazine (E102) 87% čistoće, Quinoline yellow (E104) 98% čistoće, Sunset Yellow FCF (E110) 96% čistoće, Azorubine (E122) 93% čistoće, Amaranth (E123) 93% čistoće, Ponceau 4R (E124) 75% čistoće, Allura Red AC (E129) 80% čistoće, Patent Blue V (E131) 95% čistoće, Indigo carmine (E132) 94% čistoće, i Brilliant Blue FCF (E133) 95% čistoće, sledećih proizvođača: Aldrich Chemicals (USA), Dr. Ehrenstofer (Nemačka), Fluka (Švajcarska), i Sigma Aldrich (Nemačka).

Korišćene su 10×10cm RP-18 TLC ploče (RP-18 V F254s, art. 5559, Merck, Darmstadt, Nemačka) na koje su nanošeni rastvori primenom Linomat V aplikatora (CAMAG, Mutenz, Švajcarska) i CAMAG mikrolitarskog šprica konstantnom brzinom nanošenja od 50 nls<sup>-1</sup>.



Hromatogrami su razvijeni u horizontalnoj 10×10 cm CAMAG TLC kadi (CAMAG, Muttenz, Švajcarska). Pre razvijanja hromatograma, kada je bila zasićena parama mobilne faze tokom 15 minuta.

Kao mobilna faza korišćen je vodeni rastvor amonijum-sulfata koncentracije 0,5 mol dm<sup>-3</sup> sa dodatkom 30% etanola. Etanol i amonijum-sulfat bili su analitičkog stepena čistoće.

Denzitogrami su snimljeni sa CAMAG TLC Scanner 3 (CAMAG, Mutenz, Švajcarska) na 210 nm, a instrumenti su kontrolisani WinCATS softverom.

HPLC sistem: Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) sa DA (diode array) detektorom sa opsegom talasnih dužina od 190-950 nm, Eclipse KSDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 mm) kolona i ChemStation softver (Agilent Technologies, USA), verzija. B.04.01 (2001-2009). Hromatografski eksperiment je izveden pod sledećim uslovima: sastav mobilne faze: A - amonijum acetat / vodeni rastvor (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 6,5), B-MeOH / ACN (1: 1, v/v). Protok mobilne faze je bio 1,5 ml min<sup>-1</sup> i primenjen je sledeći program gradijenta: na 0, 10, 12, 14 i 20 min; 5, 25, 60, 80 i 90% B. Injekciona zapremina je 5 ml. Identifikacija pojedinačnih boja izvršena je na specifičnim talasnim dužinama, izabranim u blizini apsorpcionih maksimuma: E102 i E04 na 450 nm, E110 - E129 na 520 nm i E131 - E133 na 625 nm sa fiksnom dimenzijom proreza 8 nm.

Svi eksperimenti su izvedeni na na sobnoj temperaturi (22 ± 2 ° C).

### **3.3.1. Priprema uzoraka za analizu**

Za analizu boja 150,0 mg homogenizovanog koncentrata soka u prahu ("Step" voćni sok od pomorandže koji sadrži E102 i E110) je rastvoreno u 5 ml vode, a zatim je dodat etanol. Nakon snažnog mešanja tokom 5 minuta, nerastvoreni zaslađivači i drugi aditivi su ostavljeni da se istalože, a ostatak rastvora je filtriran kroz najlonski 0,22 mm filter. Bistar rastvor je zatim korišćen za dalju analizu.

### 3.4. Razvoj i validacija metode za određivanje amigdalina

Standardna supstanca amigdalina (98% čistoće) proizvođača Sigma Aldrich (USA) korišćena je za pripremu standardnih rastvora.

Osnovni rastvor amigdalina je pripremljen rastvaranjem tačno izmerene količine amigdalina u vodi da bi se dobila koncentracija od  $25 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . Konačni standardni rastvori su pripremljeni razblaživanjem osnovnog rastvora vodom da bi se dobile koncentracije od 20, 10, 5, 2.5 i  $1.25 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ .

Za eksperimente korišćene su  $10 \times 10 \text{ cm}$  RP-18 TLC ploče (RP-18 V F254s, art. 5559, Merck, Darmstadt, Nemačka) i CN F254S (Art. 16464, Merck) na koje su nanošeni standardni rastvori i rastvori uzoraka primenom Linomat V aplikatora (CAMAG, Mutenz, Švajcarska) i CAMAG mikrolitarsko šprica. Rastvori su nanošeni kao 8mm široke trake, 10mm od ivice ploče, konstantnom brzinom nanošenja od  $50 \text{ nls}^{-1}$ .

Hromatogrami su razvijeni u horizontalnoj  $10 \times 10 \text{ cm}$  CAMAG TLC kadi (CAMAG, Muttenz, Švajcarska) mobilnom fazom ACN/voda (50:50 v/v). Pre razvijanja hromatograma, kada je bila zasićena parama mobilne faze tokom 15 minuta.

Denzitogrami su snimljeni sa CAMAG TLC Scanner 3 (CAMAG, Mutenz, Švajcarska) na 210 nm, a instrumenti su kontrolisani WinCATS softverom.

HPLC sistem za uporednu analizu amigdalina: Alliance 2695 (Waters, USA) sa PDA detektorom (2996 Photodiode Array Detector, Waters, USA), kolona: Luna C18 (2) kolona sa predkolonom (Phenomenex, USA). Mobilna faza: metanol:voda 25:75 (% v/v). Injekciona zapremina iznosila je  $100 \mu\text{l}$ . Pod ovim uslovima hromatografski maksimum amigdalina ima vreme zadržavanja od 7 minuta.

Svi korišćeni rastvarači bili su analitičkog stepena čistoće.

Svi eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ ).

#### 3.4.1. Priprema uzoraka za analizu

Za analizu amigdalina, 20 g semenki kajsije je samleveno, homogenizovano i natopljeno metanolom u balonu od 100 ml. Uzorak se posle mlevenja odmah natapao metanolom da bi se inaktivirao enzim emulzin koji je prisutan u opni, a koji bi mogao da razlaže amigdalina iz koštica, i na taj način utiče na rezultat. Metanol je uparen na

40°C u rotacionom uparivaču. Na ovaj način pripremljen uzorak je korišćen za optimizaciju uslova ekstrakcije amigdalina na ASE 100 (Dionex, USA) sa metanolom.

Faktori koji se koriste za optimizaciju su: temperatura (70 i 110° C), broj ciklusa ekstrakcije (1 i 3), trajanje jednog ciklusa ekstrakcije (2 i 10 minuta) i masa uzorka (0,5 i 2,5 g). Eksperimentalni dizajn je uključivao 8 eksperimenata sa različitim kombinacijama faktora. Dve dodatne ekstrakcije izvedene su pod sledećim uslovima: temperatura 90°C, 2 ciklusa ekstrakcije u trajanju od 6 minuta, masa uzorka 1,5 g (tzv. Centralne tačke).

Posle određivanja optimalnih uslova, svi uzorci su pripremljeni na isti način.

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

#### 4. Rezultati i diskusija

U reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji retencija u velikoj meri zavisi od hidrofobnosti vezanih stacionarnih faza (C4, C8, C18, fenil itd.) i relativna retencija na različitim stacionarnim fazama se može jednostavno predvideti na osnovu polarnosti, odnosno strukture stacionarne faze. Na primer, u istim hromatografskim uslovima na stacionarnoj fazi C18 većina nepolarnih jedinjenja ima jaču retenciju nego na C8 ili fenil stacionarnim fazama.

Sa druge strane, u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija teško je proceniti relativnu retenciju samo na osnovu strukture vezanih polarnih stacionarnih faza jer, prvo, teško je porediti hidrofilnost različitih polarnih faza samo na osnovu strukture, i drugo, retencija ne mora direktno da zavisi od hidrofilnosti stacionarne faze jer na retenciju u ovim uslovima odvajanja utiče više faktora. Takođe, ne postoji opšteprihvaćeno test jedinjenje koje se može koristiti za poređenje i procenu retencije na različitim stacionarnim fazama u HILIC kao što su alkilbenzeni (toluen i propilbenzen) jedinjenja koja se obično koriste kao test jedinjenja za procenu retencije na stacionarnim fazama u RPLC.

Kao što je navedeno u Opštem delu, svaka polarna stacionarna faza koja može da zadržava vodu na površini, može se koristiti u HILIC režimu odvajanja. Prve primene su upravo uključivale uobičajene stacionarne faze za NPLC, kao što su silika-gel i amino-modifikovani silika-gel. Silika-gel je i dalje jedna od najčešće korišćenih stacionarnih faza u HILIC, iako je sa porastom interesovanja za HILIC odvajanja razvijeno mnogo novih, specifičnih stacionarnih faza. Na retenciju utiče, pre svega, hidrofilnost stacionarne faze, zatim njen kapacitet da veže vodu na svojoj površini, debljina vodenog sloja, kao i prisustvo naelektrisanih grupa na površini.

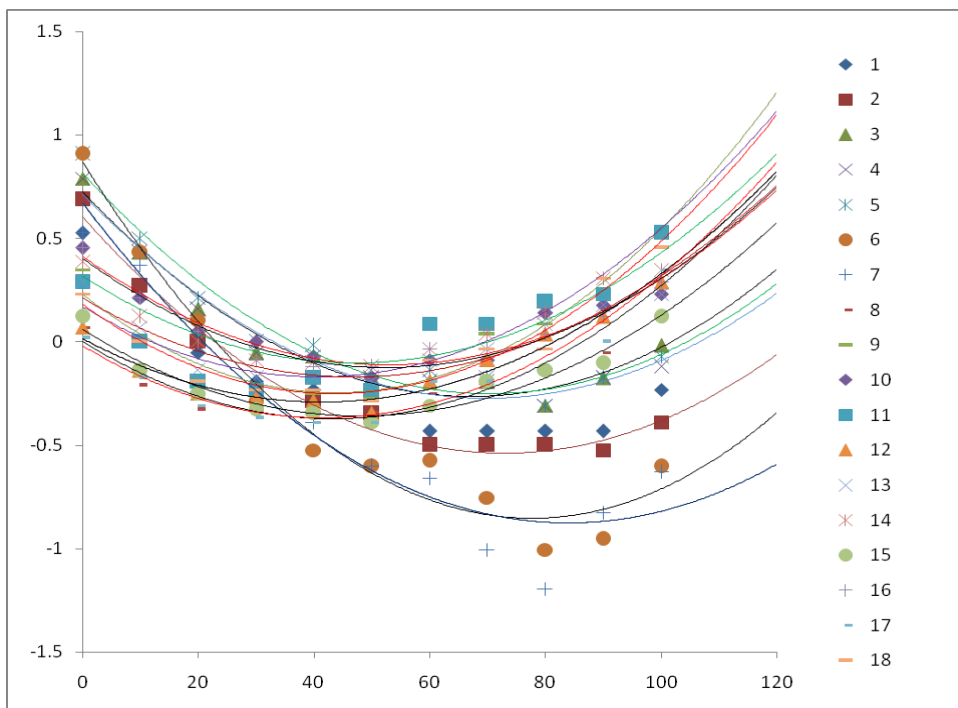
Zbog svega toga, ideja je bila da se u ovom radu odaberu što jednostavnije i lako dostupne stacionarne faze koje imaju široku primenu, i da se na njima ispita mehanizam odvajanja malih polarnih molekula.

Kako selektivnost, odnosno mehanizam odvajanja, ne zavisi samo od prirode stacionarne faze, već i od prirode i sastava mobilne faze kao i strukture odvajanih jedinjenja, potrebno je hromatografisati ista jedinjenja u različitim hromatografskim sistemima i uporediti selektivnost različitih stacionarnih faza.

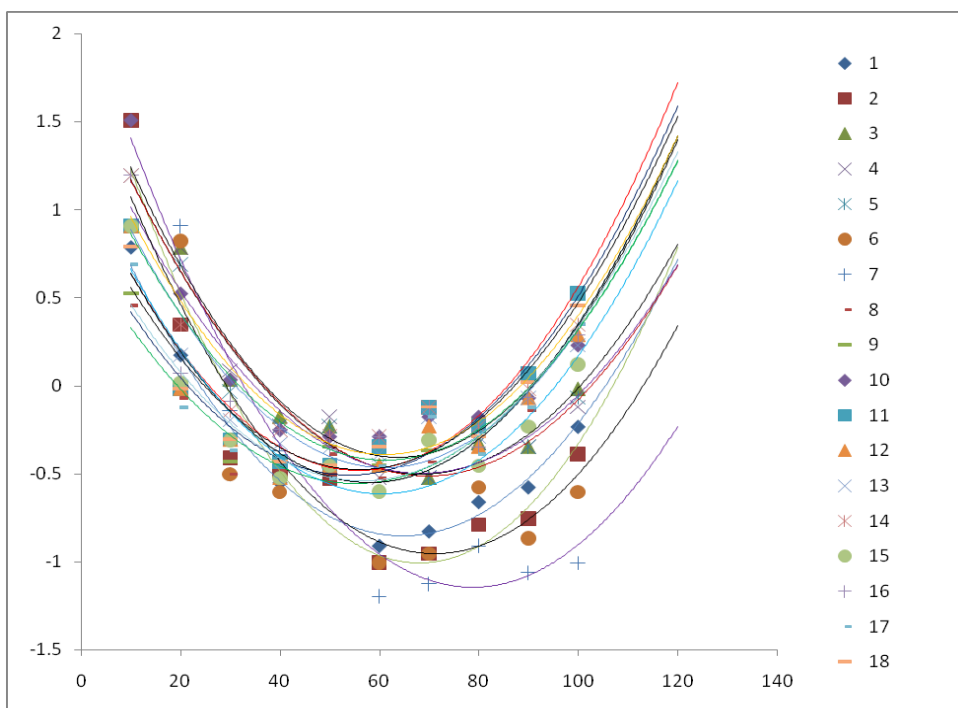
Mobilne faze u HILIC se sastoje od smeše vode i organskog rastvarača. Kao što je već pomenuto, pri visokim sadržajima organske komponente mobilne faze, voda se adsorbuje na površini hidrofilne stacionarne faze, i kada je sadržaj vode iznad 2-3%, adsorbovani vodeni sloj je dovoljne debljine da ostatkom mobilne faze obezbedi sistem za tečno-tečnu particiju. Dakle, sadržaj vode u mobilnoj fazi je faktor koji značajno utiče na retenciju, pa je u ovom radu uticaj sastava mobilne faze na retenciju ispitivan menjanjem udela vode u mobilnoj fazi od 0% do 100%. Mobilna faza je bila jednostavna smeša vode i organskog rastvarača (metanol, dioksan, ACN, aceton ili THF) u različitim proporcijama, od čiste vode do čistog organskog rastvarača.

Sistematsko ispitivanje hromatografskog ponašanja kompleksnih jedinjenja u zavisnosti od sastava mobilne faze započeto je proučavanjem retencije serije u vodi rastvornih kompleksa Co(III) u HILIC uslovima na tankim slojevima različitih adsorbenata <sup>[52]</sup>, a nastavljeno ispitivanjem retencije sedam parova geometrijskih izomera neutralnih i katjonskih kompleksa Co(III) takođe u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija <sup>[53]</sup>. Kako se celuloza nije pokazala kao pogodan sorbent <sup>[52]</sup> isključena je iz daljeg proučavanja. Takođe, aluminijum-oksidi se pokazao kao pogodan sorbent samo u normalno faznoj oblasti, tako da se na njemu ne može posmatrati uticaj promene sastava mobilne faze u celom opsegu koncentracija, kao i na cijano-modifikovanom silika-gelu. Kako se silika-gel pokazao kao najpogodniji sorbent, izabran je za dalja ispitivanja hromatografskog ponašanja kompleksa <sup>[53]</sup>.

U ovim radovima je utvrđeno da u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija postoji takozvani dualni mehanizam odvajanja, odnosno sa promenom sastava mobilne faze dolazi do promene mehanizma iz HILIC u RP kako sadržaj vode u mobilnoj fazi raste. Ova promena mehanizma iz HILIC u RP, najbolje je ilustrovana karakterističnim U krivama retencione zavisnosti prikazanim na Slikama 1 i 2.



Slika 1. Zavisnost retencije Co(III) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi (sistem MeOH/voda na silika-gelu)



Slika 2. Zavisnost retencije Co(III) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi (sistem aceton/voda na silika-gelu)

Rezultati ovih istraživanja, koji su obuhvatali ispitivanje uticaja prirode i sastava mobilne faze, stacionarne faze, kao i strukture samih jedinjenja na retenciju u HILIC uslovima, prethodno su objašnjeni i publikovani [52, 53]. U ovom radu je prokomentarisano samo deo rezultata prethodnih istraživanja, koji se odnosi na uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciju, a u cilju povezivanja sa novim istraživanjima, dok su ostali faktori koji utiču na odvajanje detaljno razmatrani u prethodnim radovima [52, 53, 54]. U okviru ovog rada prikazani su samo rezultati dobijeni na tankom sloju silika-gela, u celom opsegu koncentracija mobilne faze (0-100% vode) (Slike 1 i 2) jer najbolje ilustruju mogućnost odvajanja malih polarnih molekula i u HILIC i u RP modu na istoj stacionarnoj fazi, zbog čega su slični sistemi izabrani za dalja istraživanja.

U ovom radu je proučavano hromatografsko ponašanje malih polarnih molekula različitih struktura koja predstavljaju dobre model supstance za proučavanje retencije u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija, i svih faktora koji doprinose retenciji, a pre svega uticaja sastava mobilne faze, tačnije sadržaja vode u mobilnoj fazi u različitim hromatografskim sistemima. Mobilne faze koje su korišćene su binarne smeše vode i organskog rastvarača karakteristične za RP i HILIC mod odvajanja, koje kada se primene za razdvajanje na polarnim i umereno polarnim stacionarnim fazama, na istom sorbentu se menjanjem sastava mobilne faze mogu posići oba mehanizma odvajanja.

#### **4.1. Ispitivanje hromatografskog ponašanja Ru(II)-arenskih kompleksa**

Kako različiti rutenijumski kompleksi sve više privlače pažnju zbog potencijalne antikancerske aktivnosti, za ovo istraživanje su izabrani Ru(II)-arenski kompleksi. Organorutenijum(II) kompleksi su predmet interesovanja jer pružaju mogućnost dizajniranja novih, biološki aktivnih, kompleksa koji bi mogli da se koriste kao lekovi. Neka od jedinjenja Ru(II) pokazuju značajnu antiproliferativnu aktivnost *in vitro* i/ili *in vivo*, uključujući aktivnost protiv ćelija rezistentnih na cisplatinu. Treba napomenuti i da Ru(II)-arenski kompleksi često imaju dobru rastvorljivost u vodi, u kombinaciji sa zadovoljavajućom lipofilnošću koja je potrebna za prolaz kroz ćelijsku membranu [48, 49]. Ovo ih čini pogodnim za proučavanje i u uslovima reverzno-fazne i hromatografije hidrofilnih interakcija, pa je cilj ovog istraživanja bio je da se dobije sveobuhvatan uvid



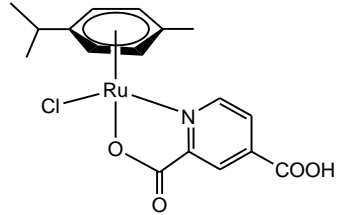
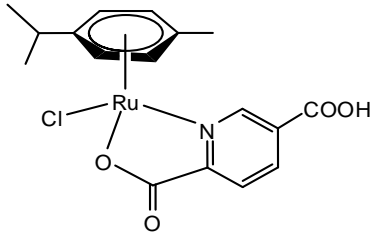
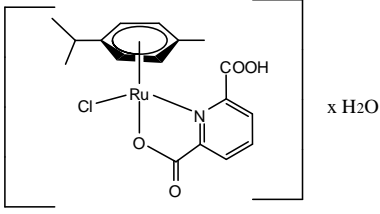
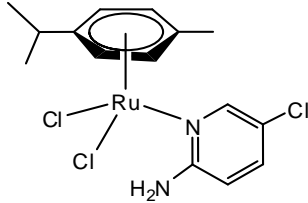
u hromatografsko ponašanje devet kompleksa Ru(II) pod različitim hromatografskim uslovima, kao i da se proceni njihova lipofilnost primenom tankoslojne hromatografije.

Retenciono ponašanje pomenutih kompleksa, čije su strukture date u Tabeli 4, proučavano je primenom 12 hromatografskih sistema koji su navedeni u Tabeli 2.

Na osnovu dobijenih rezultata (Prilog), utvrđeno je da je najmanje pogodan sorbent za sistematsko praćenje hromatografskog ponašanja ispitivanih rutenijumskih kompleksa diol-modifikovani silika-gel. Naime, nađeno je da se, bez obzira na prirodu organske komponente mobilne faze, ovaj sorbent može primeniti samo u normalno-faznoj (HILIC) oblasti tj. u kombinaciji sa rastvaračima koji imaju relativno nizak sadržaj vode (do 20%, odnosno 30% vode).

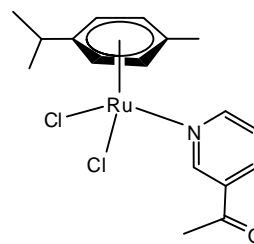
Na ostalim sorbentima zadovoljavajući rezultati se dobijaju u čitavom opsegu koncentracija primenjivanih mobilnih faza, od čistog organskog rastvarača do čiste vode (0-100% vode).

Tabela 4. Strukture ispitivanih Ru(II) kompleksa

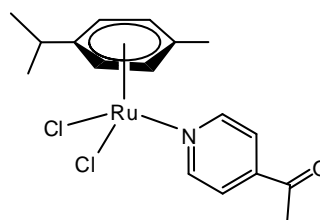
| R.br. | Naziv  | Struktura  |
|-------|--|--|
| 1     | $\eta^6$ -p-cimenchloro-2,4-piridindikarboksilato-rutenijum(II)            |    |
| 2     | $\eta^6$ -p-cimenchloro-2,5-piridindikarboksilato-rutenijum(II)            |   |
| 3     | $\eta^6$ -p-cimenchloro-2,6-piridindikarboksilato-rutenijum(II) monohidrat |  |
| 4     | $\eta^6$ -p-cimenchloro-2-amino-5-hloro-piridin-rutenijum(II)              |  |

---

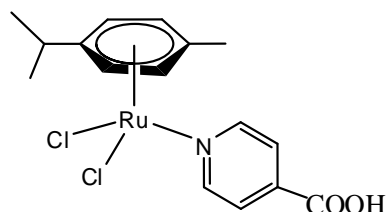
5  $\eta^6$ -p-cimenchloro-3-acetilpiridin-rutenijum(II)



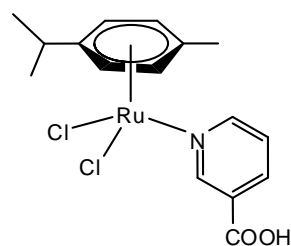
6  $\eta^6$ -p-cimenchloro-4-acetilpiridine-rutenijum(II)



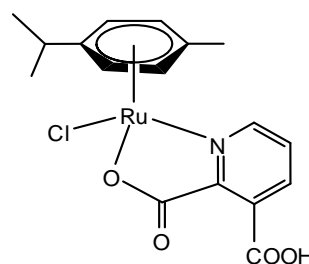
7  $\eta^6$ -p-cimenchloro-izonikotinskakiselina-rutenijum(II)



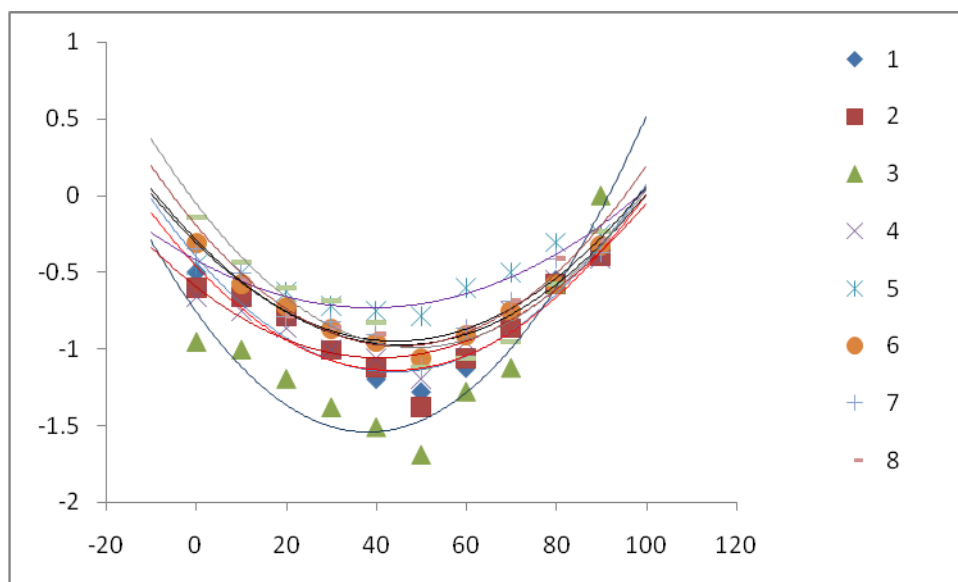
8  $\eta^6$ -p-cimenchloro-nikotinska kiselina - rutenijum(II)



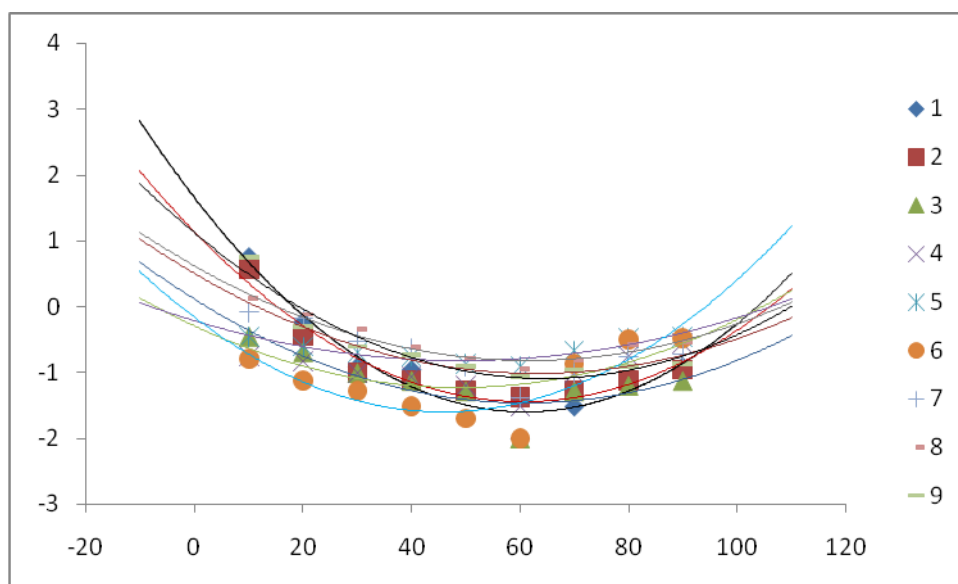
9  $\eta^6$ -p-cimenchloro-2,3-piridindikarboksilato-rutenijum(II)



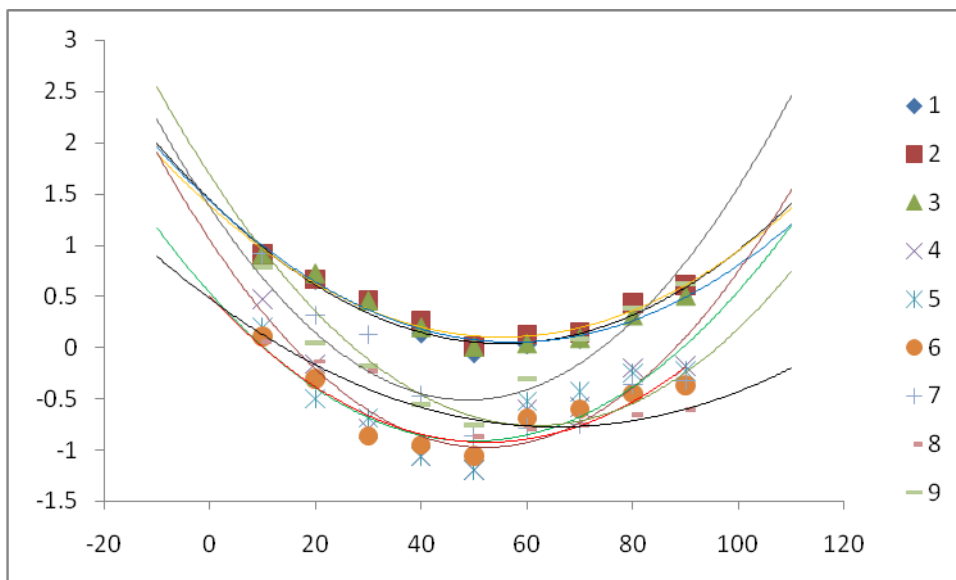
Retenciono ponašanje svih ispitivanih jedinjenja praćeno je izraćunavanjem  $R_M$  vrednosti, primenom jednaćine:  $R_M = \log[(1-R_F)/R_F]$ . Dobijeni rezultati predstavljeni su kao funkcija retencije ( $R_M$  vrednosti na  $y$ -osi) od sastava mobilne faze (% vode u mobilnoj fazi na  $x$ -osi) koji je variran od čistog organskog rastvaraća do čiste vode (0-100% vode) (Slike 3-12).



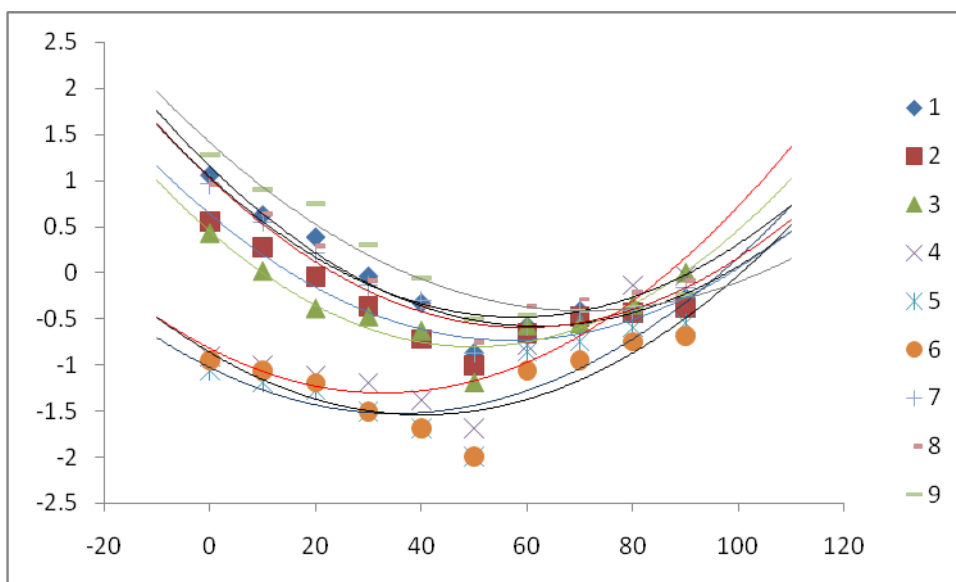
Slika 3. Zavisnost retencije ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu MeOH/voda na tankom sloju silika-gela



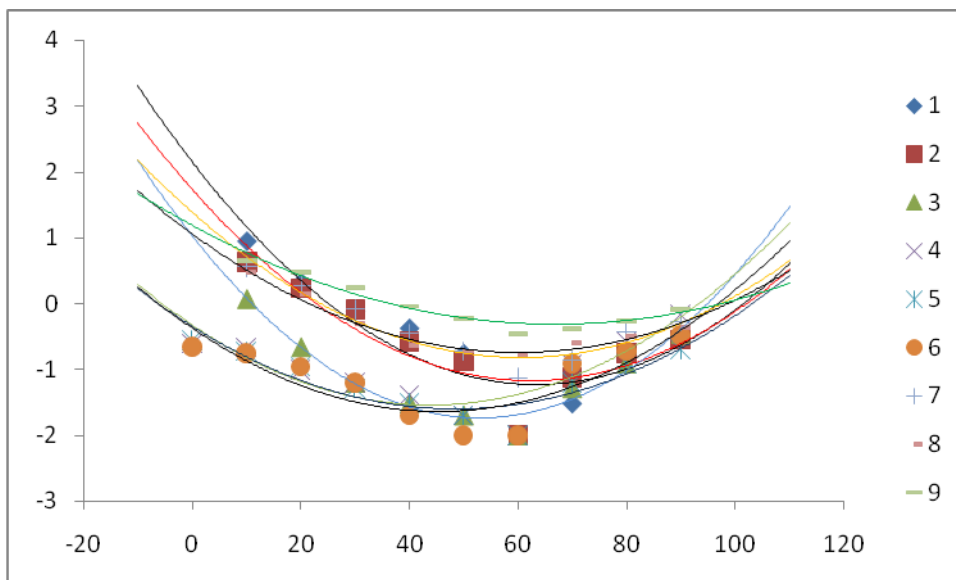
Slika 4. Zavisnost retencije ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu aceton/voda na tankom sloju silika-gela.



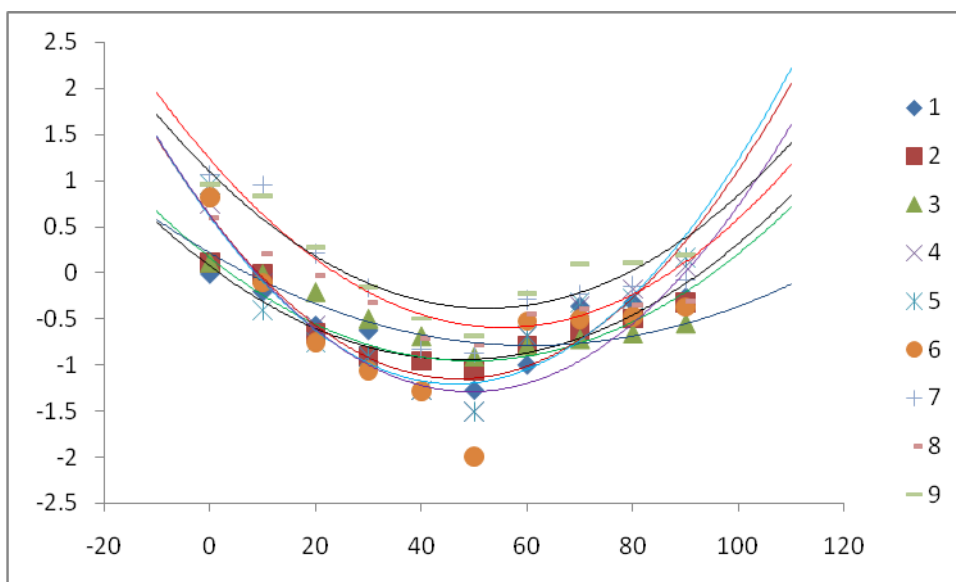
Slika 5. Zavisnost retencije ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu ACN/voda na tankom sloju silika-gela.



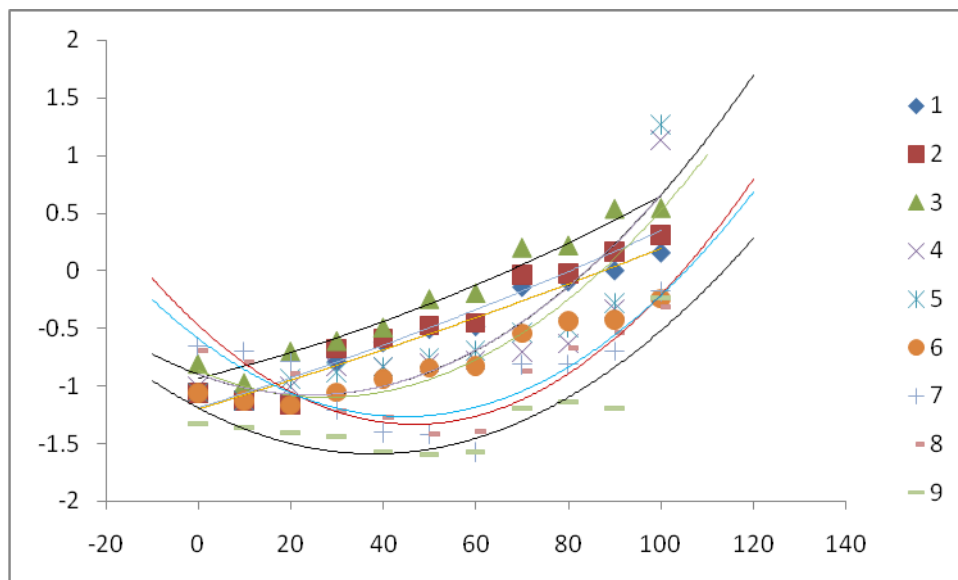
Slika 6. Zavisnost retencije ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu MeOH/voda na tankom sloju aluminijum-oksida.



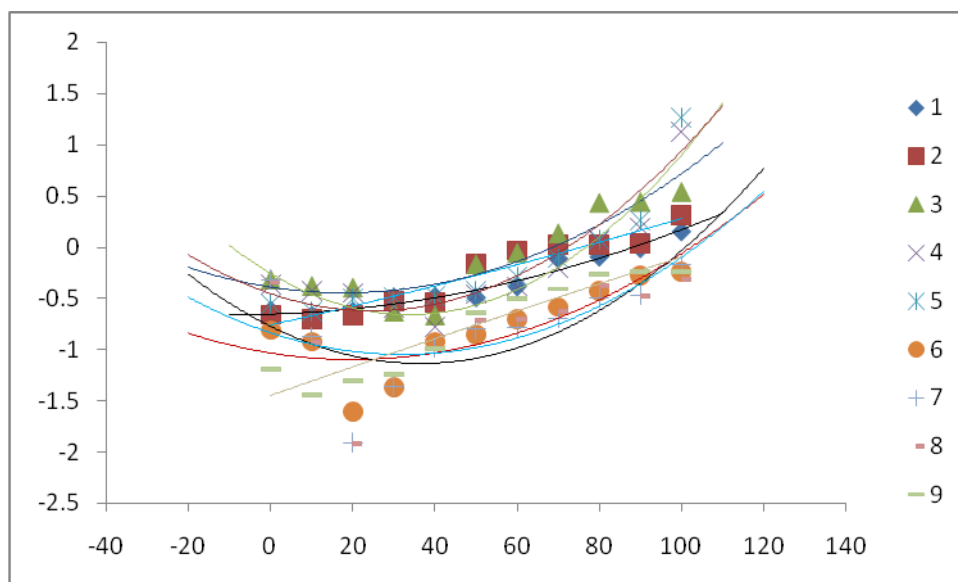
Slika 7. Zavisnost retencije ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu aceton/voda na tankom sloju aluminijum-oksida.



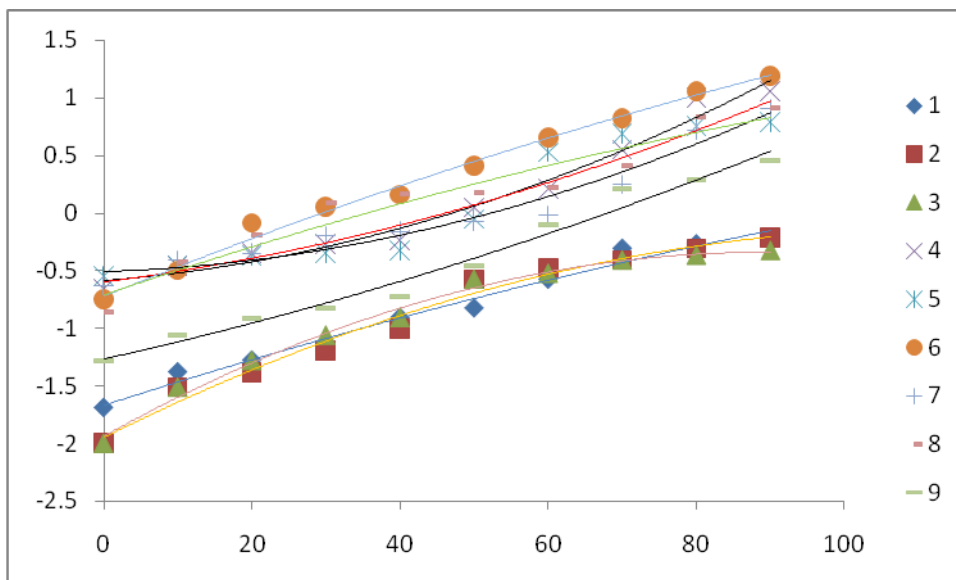
Slika 8. Zavisnost retencije ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu ACN/voda na tankom sloju aluminijum-oksida.



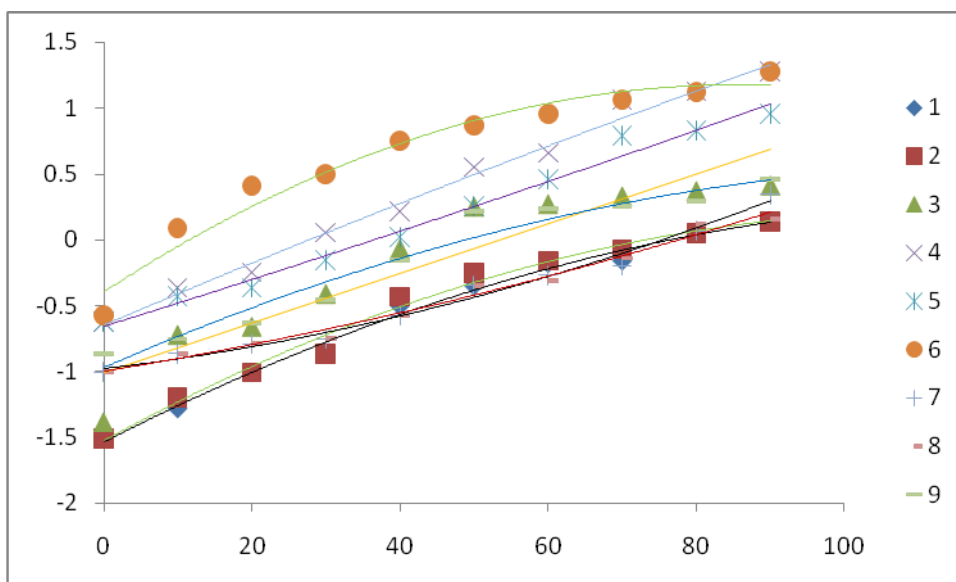
Slika 9. Zavisnost retencije ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu ACN/voda na tankom sloju CN-silika-gela.



Slika 10. Zavisnost retencije ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu aceton/voda na tankom sloju CN-silika-gela.



Slika 11. Zavisnost retencije ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu ACN/voda na tankom sloju RP-18.



Slika 12. Zavisnost retencije ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa od sadržaja vode u mobilnoj fazi u sistemu MeOH/voda na tankom sloju RP-18.



U ovom radu posmatrani su različiti faktori koji utiču na odvajanje, ali kako u ovim sistemima za odvajanje malih polarnih molekula voda predstavlja najjači eluent, pa čak i male promene u njenom sadržaju u mobilnoj fazi mogu značajno uticati na retenciju i promeniti retencioni mehanizam, ovaj faktor je izabran kao okosnica istraživanja.

#### **4.1.1. Proučavanje uticaja sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciju**

Posmatranjem ovako predstavljenih rezultata prvo što se uočava je da u većini slučajeva retencione krive ispitivanih jedinjenja imaju karakterističan U oblik, tj. u ovim hromatografskim sistemima, zadržavanje analita, generalno, prvo opada, a zatim raste sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi, što je u skladu sa hromatografskim ponašanjem u HILIC, odnosno RP uslovima (Slike 3-10).

Naime, kao što je objašnjeno u Opštem delu, kod odvajanja na polarnim i umereno polarnim stacionarnim fazama, u kombinaciji sa binarnim smešama vode i organskog rastvarača, uočava se dualni mehanizam odvajanja, odnosno sa promenom sastava mobilne faze dolazi do promene mehanizma iz HILIC u RP kako sadržaj vode u mobilnoj fazi raste. Ova promena mehanizma iz HILIC u RP, najbolje se ilustruje karakterističnom U krivom retencione zavisnosti.

Kada posmatramo retencione dijagrame ispitivanih kompleksa, uočavamo da retencija opada kako sadržaj vode u mobilnoj fazi raste. Ovakvo ponašanje je već uočeno kao pravilo u HILIC sistemima, a to su sistemi sa relativno niskim sadržajem vode (tipične HILIC mobilne faze, kao što je već navedeno, sadrže 5-40% vode). U ovom opsegu koncentracija retencija je uglavnom kontrolisana polarnim interakcijama između komponenata odvajane smeše i mobilne faze.

Promena retencije sa promenom sastava rastvarača može se objasniti promenom hromatografskih uslova.

Naime, iako se particija između adsorbovanog sloja vode na površini sorbenta (pseudo stacionarne faze) i ostatka mobilne faze, smatra dominantnim mehanizmom razdvajanja u hromatografiji hidrofилnih interakcija, mehanizam nije konstantan i nije ga uvek lako predvideti, jer zavisi od prirode analiziranih komponenti, kao i od prirode stacionarne faze, ali i prirode i sastava mobilne faze, i može varirati od adsorpcije do

particije. Na istoj stacionarnoj fazi mehanizam se može promeniti iz hidrofilnih u hidrofobne interakcije sa promenom sadržaja vode u mobilnoj fazi, a retenciona kriva ima karakterističan U oblik koji je tipičan za promenu mehanizma zadržavanja <sup>[44]</sup>, tako da se u HILIC uslovima retencija može pripisati kombinaciji adsorpcije i particije. Prelaz između ova dva mehanizma verovatno je kontinualan i zavisi od sadržaja vode u mobilnoj fazi, tj. sa povećanjem sadržaja vode particija postaje dominantan mehanizam odvajanja <sup>[7]</sup>.

Posmatranjem retencionih dijagrama prikazanih na Slikama 3-12, uočava se da u većini slučajeva retencione krive imaju manje ili više izražen U oblik koji ilustruje promenu mehanizma odvajanja sa promenom sadržaja vode u mobilnoj fazi. Izuzetak je tanak sloj oktadecil-modifikovanog silika-gela kao tipična stacionarna faza za RP hromatografiju na kojoj je zavisnost praktično linearna i retencija raste sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi kao što je i očekivano u RP uslovima. Takođe, na CN-modifikovanom silika gelu kao umereno polarnoj stacionarnoj fazi, manje je izražena konverzija mehanizma retencije, i ne kod svih jedinjenja, dok se na polarnim stacionarnim fazama jasno uočava promena mehanizma odvajanja sa promenom sastava mobilne faze.

Kao što je pomenuto, u HILIC uslovima se dominantnim mehanizmom smatra particija analita između sloja obogaćenog vodom na hidrofilnoj stacionarnoj fazi i relativno hidrofobnog ostatka eluenta <sup>[9]</sup>, ali mehanizam zadržavanja nije postojan i može da se menja od hidrofobnih do hidrofilnih interakcija na istoj stacionarnoj fazi. Zadržavanje analita je kombinacija adsorpcije i particije, koji zajedno sa drugim mogućim dodatnim efektima, kao što je jonska izmena, kontrolišu zadržavanje analita.

Smatra se da retencija u HILIC uslovima direktno zavisi od sastava i debljine pomenutog vodenog sloja. Prema literaturi <sup>[39]</sup>, pri visokom sadržaju organske komponente u mobilnoj fazi, voda je jako adsorbovana na površini hidrofilne stacionarne faze. Kada je količina vode iznad 5% mobilne faze, adsorbovani sloj vode je dovoljne debljine da stvori sistem za odvajanje tečno-tečnom particijom <sup>[26, 28]</sup>. Pri nižim sadržajima vode u mobilnoj fazi (<5%) veća je verovatnoća direktne interakcije odvajanih komponenti sa aktivnim centrima stacionarne faze, što se ogleda u odstupanju od mehanizma particije.

Može se primetiti da se u nekim slučajevima dobijaju pravilnije, a u nekim manje pravilne U retencione krive, ali se svakako uočava trend da retencija prvo opada a onda raste kako raste sadržaj vode u mobilnoj fazi, što nedvosmisleno ukazuje na promenu mehanizma odvajanja.

Promena selektivnosti, odnosno retencionog mehanizma sa promenom sadržaja vode u mobilnoj fazi posledica je promene relativnog doprinosa adsorpcije (izraženije sa mobilnima fazama sa nižim sadržajem vode) i particije (dominantne sa vodom bogatim mobilnim fazama).

#### **4.1.2. Uticaj prirode stacionarne faze na retenciju**

Sastav mobilne faze u minimumu U krive, što odgovara tački konverzije retencionog mehanizma iz HILIC u RP, zavisi od polarnosti analita i od prirode stacionarne faze. Verovatnoća postizanja dualnog mehanizma na nekoj stacionarnoj fazi generalno raste sa polarnošću stacionarne faze što je u svim ispitivanim slučajevima potvrđeno.

Posmatranjem retencionih dijagrama dobijenih za ispitivane rutenijumske komplekse može se uočiti da je ponašanje kompleksa slično na silika-gelu i aluminijum-oksidu, dok su te razlike nešto veće u slučaju CN-modifikovanog silika-gela. Ovo ukazuje na specifične interakcije CN-modifikovanog silika-gela sa odvajanim supstancama. S obzirom da Ru kompleksi imaju aromatične delove strukture može se pretpostaviti da se verovatno radi o izraženim donorno-akceptorskim interakcijama (charge-transfer) pi-elektronskih sistema odvajanih supstanci i CN grupa sorbenta <sup>[55]</sup>.

Na cijano-modifikovanom silika-gelu, koji zahvaljujući svojoj umerenoj polarnosti i prisustvu i hidrofilnih i hidrofobnih adsorpcionih centara na površini može biti pogodna stacionarna faza i za normalno-faznu i za reverzno-faznu hromatografiju zavisno od prirode ispitivanih jedinjenja i sastava upotrebljene mobilne faze, takođe je uočeno slično obrtanje retencionog redosleda (Slike 9 i 10). Razlika u odnosu na nemodifikovani silika-gel je u tome što na cijano-modifikovanom silika-gelu do obrtanja dolazi pri nižim sadržajima vode u mobilnoj fazi. Ovakvo ponašanje može se objasniti umerenom polarnošću CN-silika gela, odnosno njegovom manjom polarnošću u odnosu na nemodifikovani silika gel. Naime, CN-modifikovani silika-gel se dobija

uvođenjem cijano-propil grupa u matriks silika-gela pa se interakcije sa odvajanim jedinjenjima ostvaruju preko polarnih CN-grupa, nepolarnih propil-nizova, kao i preko nemodifikovanih silanolnih grupa [55]. Sve to čini mehanizam odvajanja na CN-modifikovanom silika-gelu složenim i jedinstvenim. Iako mehanizam još uvek nije potpuno razjašnjen, smatra se da u normalno-faznim uslovima dominiraju specifične interakcije CN-grupa, kao i interakcije nemodifikovanih silanolnih grupa, dok u reverzno-faznim uslovima dominiraju hidrofobne interakcije ugljovodoničnih nizova (propil-grupa) sa odvajanim komponentama. [55-57]. Činjenica da do promene mehanizma dolazi sa mobilnim fazama sa nižim sadržajima vode u odnosu na silika-gel može se objasniti većom polarnošću nemodifikovanog silika-gela, zbog čega se on može primeniti u širem opsegu mobilnih faza u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija, i predstavlja pogodan sorbent za primenu i u HILIC i u RP modu odvajanja.

#### **4.1.3. Uticaj prirode organske komponente mobilne faze na retenciju**

Posmatrajući retencione dijagrame prikazane na slikama 3-10, može se uočiti i to da je najizraženiji prelaz retencionog mehanizma tj. najpravilnija kriva retencije U oblika dobijena sa ACN kao organskom komponentom mobilne faze, dok je sa ostalim organskim rastvaračima ovaj prelaz znatno blaži, ali takođe uočljiv. Ovakvo ponašanje je i očekivano jer je ACN rastvarač koji se pokazao kao veoma dobar izbor i u HILIC i u RP modu [38].

Prednost korišćenja ACN nad drugim organskim rastvaračima u HILIC uslovima je njegova hemijska struktura, koja ne pogoduje formiranju vodoničnih veza. Naime, acetonitril je rastvarač koji se može mešati sa vodom, ali je bez proton donorskih ili akceptorskih funkcionalnih grupa, koje mogu da se takmiče sa vodom u solvataciji na površini stacionarne faze. Prema tome, upotreba ACN je veoma obećavajuća jer može da izbegne konkurenciju između rastvarača i molekula vode za vezivanje za stacionarnu fazu. Supstitucija molekula vode organskim rastvaračem utiče na formiranje vodenog polu-stacionarnog sloja, koji čini stacionarnu fazu hidrofobnijom i smanjuje retenciju polarnih analita.

Eluciona moć organskih rastvarača koji se uobičajeno koriste u HILIC modu generalno se povećava sa povećanjem polarnosti rastvarača i sposobnosti da učestvuje u

interakcijama proton-donor/proton-akceptor, i to u sledećem redosledu: metanol > etanol > 2-propanol > tetrahidrofuran > acetonitril <sup>[39]</sup>. ACN se, dakle, smatra jednim od najslabijih eluenata u HILIC pa je samim tim i najpogodniji kao organska komponenta mobilne faze.

S druge strane, metanol je u ovom nizu najjači eluent pa samim tim i najmanje pogodan. Ono što se može uočiti, a što je takođe u skladu sa podacima iz literature, je činjenica da metanol u ovakvim sistemima daje najslabije rezultate, odnosno pokazao se kao najmanje pogodna organska komponenta mobilne faze, i zato se i retko koristi u HILIC odvajanjima. Naime, sa metanolom kao organskom komponentom mobilne faze se postiže najslabija retencija kao i selektivnost razdvajanja. To se može objasniti njegovom sličnošću sa vodom, tj. time što metanol, kao i drugi niži alkoholi, ima izraženu tendenciju da gradi vodonične veze, pa se takmiči sa vodom u solvataciji polarne površine sorbenta, smanjujući na taj način količinu adsorbovane vode na površini stacionarne faze. Metanol može da poveća rastvorljivost pojedinih komponenti ali značajno smanjuje retenciju u poređenju sa ACN.

Kada se umesto acetonitrila, koji je aprotični rastvarač, koristi neki protični rastvarač, na primer neki alkohol, on se može, zbog sposobnosti formiranja vodoničnih veza, vezivati za aktivne centre na površini stacionarne faze istiskujući molekule vode i tako formirajući hidrofobniju stacionarnu fazu, tako da će se polarne komponente zadržavati slabije, tj. vreme retencije se smanjuje <sup>[44]</sup>. Alkoholi se ređe koriste u HILIC modu, i potrebna je veća koncentracija da bi se postigao isti stepen retencije analita u poređenju sa aprotičnim rastvaračima. Tako, metanol sa proton donorskim osobinama može da učestvuje u stvaranju vodoničnih veza sa stacionarnom fazom. Naime, metanol ima jaku sposobnost da formira vodonične veze i može da ometa formiranje vodenog sloja na površini stacionarne faze, a može da gradi i vodonične veze sa odvajanim komponentama, čime se smanjuje udeo jonske izmene u odnosu na hidrofилne interakcije što dovodi do smanjenja retencije <sup>[45]</sup>.

Povećanje elucione jačine organske komponente mobilne faze dovodi do pomeranja tačke konverzije retencionog mehanizma ka višim sadržajima vode u mobilnoj fazi i proširenju HILIC opsega.

Na silika-gelu, u slučaju mobilne faze metanol/voda, dolazi do konverzije mehanizma odvajanja iz HILIC u RP na 35-50 Vol% sadržaja vode, ako je smeša

ACN/voda korišćena kao mobilna faza na oko 40-65 Vol% sadržaja vode, a sa acetonom kao organskom komponentom mobilne faze na oko 35-65 Vol% sadržaja vode. Na aluminijum-oksidu sa smešom metanol/voda došlo je do konverzije mehanizma razdvajanja na oko 35-60 Vol% sadržaja vode, sa smešom ACN/voda, došlo je do konverzije mehanizma razdvajanja na oko 40-65 Vol% sadržaja vode, a sa acetonom kao organskom komponentom mobilne faze na oko 35-65 Vol% sadržaja vode.

Posmatranjem Slika 3-10, može se uočiti da u svim slučajevima dolazi do konverzije mehanizma odvajanja Ru kompleksa. Uočava se da na silika-gelu do promene dolazi pri nešto nižem sadržaju vode sa metanolom kao organskom komponentom mobilne faze u odnosu na ACN i aceton, što je u skladu sa elucionim karakteristikama ovih rastvarača u HILIC uslovim, dok se na aluminijum-oksidu taj uticaj manje uočava, osim što se ACN opet pokazao kao najbolji izbor u tom smislu da daje najuočljiviji prelaz između mehanizama odvajanja.

#### **4.1.4. Određivanje lipofilnosti Ru(II)-arenskih kompleksa**

Osim proučavanja mehanizma odvajanja u HILIC uslovima, još jedan aspekt ovog rada je primena HILIC metode za određivanje lipofilnosti ispitivanih kompleksa. Naime, lipofilnost je ključni fizičko-hemijski parametar u kvantitativnim odnosima struktura-aktivnost (QSAR), u različitim oblastima, kao što su dizajn lekova i pesticida, toksikološke studije u farmaceutskim i ekološkim istraživanjima, industrijskoj i prehrambenoj hemiji. Lipofilnost je jedan od najvažnijih parametara koji utiču na bitne biološke procese koji prate unos lekova, kao što su adsorpcija, prolaz kroz membrane, interakcije između leka i receptora, metabolizam, i od velikog je značaja u procesu istraživanja i razvoja lekova [58, 59, 60]. Lipofilnost hemikalija se obično izražava kao podeoni koeficijent u sistemu oktanol-voda ( $K_{O/W}$ ). Koriste se različiti, direktni ili indirektni pristupi za eksperimentalno određivanje  $K_{O/W}$  a takođe i različiti teorijski pristupi za proračun i procenu lipofilnosti [58, 59].

Ovaj parametar se obično određuje eksperimentalno, standardnom metodom "shake-flask". Hromatografske metode se zasnivaju na raspodeli analita između faza koje se ne mešaju i široko se koriste za indirektno određivanje lipofilnosti. Zbog

sličnosti sa raspodelom oktanol-voda, RP tečna hromatografija je generalno prihvaćena kao pouzdana metoda za određivanje lipofilnosti <sup>[61]</sup>.

Međutim, uprkos brojnim prednostima i dugoj istoriji uspešne primene za određivanje lipofilnosti malih organskih molekula, moderna tankoslojna hromatografija visokih performansi je samo u sporadičnim slučajevima primenjena za određivanje  $\log K_{O/W}$  kompleksnih jedinjenja. Zbog toga je jedan od ciljeva bio da se u ovom radu odredi i lipofilnost ispitivanih Ru kompleksa primenom HPTLC metode.

S druge strane, savremeni računski pristupi procene lipofilnosti metalnih kompleksa uglavnom se oslanjaju na kvantitativne studije odnosa struktura-aktivnost (QSPR). Drugi računski pristup, koji je izabran u ovom radu, se zasniva na proceni promene slobodne energije solvatacije pri prelazu iz *n*-oktanola u čistu vodenu fazu. Moderne teorijske metode u kvantnoj hemiji, kao što je density functional theory (DFT), imaju veliku prediktivnu snagu i pouzdane su u određivanju slobodne energije solvatacije, a važno je napomenuti da su prednosti DFT-a posebno važne za komplekse prelaznih metala <sup>[59]</sup>.

U ovom radu primenjena je RP-HPTLC kao jednostavna, brza i pouzdana metoda za određivanje  $\log K_{O/W}$  vrednosti rutenijum(II) kompleksa i DFT računski pristup. Eksperimentalno se dobijaju  $R_F$  vrednosti koje se mogu dalje koristiti za izvođenje nekoliko hromatografskih deskriptora za procenu lipofilnosti.

U ovom radu za kalibraciju je odabrano 28 standardnih supstanci, uglavnom mono- i polisupstituisanih fenola, aromatičnih karboksilnih kiselina, ketona, amina, estara i nekoliko poliaromatičnih ugljovodonika, poznatih  $\log K_{O/W}$  vrednosti (Prilog).  $\log K_{O/W}$  su preuzeti iz KOWWIN softvera (EPI Suite, v. 4.11 USEPA)

Na osnovu rezultata dobijenih proučavanjem hromatografskog ponašanja kompleksa uočeno je da se najbolje razdvajanje postiže upotrebom dvokomponentnih rastvarača acetonitril/voda na hemijski modifikovanom RP-18 silika-gelu.

Zatim je, u cilju određivanja  $\log K_{O/W}$  vrednosti kompleksa, primenom sistema rastvarača acetonitril/voda (30-60% ACN, sa promenom sastava za po 5%) hromatografisana serija kompleksa i 28 standardnih supstanci (supstance kojima je eksperimentalno određena  $\log K_{O/W}$  vrednost “shake flask“ metodom) a rezultati su dati u prilogu. Na osnovu dobijenih hromatografskih parametara, primenom DFT metode izračunate su  $\log K_{O/W}$  vrednosti ispitivanih kompleksa (Prilog).

Za sva ispitivana jedinjenja dobijena je dobra linearna zavisnost između retencionih parametara ( $R_M$ ) i zapreminskog udela acetonitrila u mobilnoj fazi, što je rezultovalo dobro određenim hromatografskim deskriptorima ( $R_M^0$  i  $b$ ).

$R_M^0 = R_M + b\varphi$ , gde  $R_M^0$  predstavlja odsečak na pravoj zavisnosti između retencije ( $R_M$ ) i zapreminskog udela organske komponente mobilne faze ( $\varphi$ ), a  $b$  je nagib.

Prateći statistički podaci i jednačine dati su u Prilogu.

Najbolji model je dobijen korišćenjem parametra  $R_M^0$  ( $R^2 = 0,8857$ ), dok je model br. 4 (sistem sa 55% acetonitrila) pokazao najlošiju korelaciju ( $R^2 = 0,6521$ ).  $R_M^0$  i  $b$  mogu da se odrede i za visoko lipofilna i za polarna jedinjenja koja pokazuju merljive  $R_F$  vrednosti (0,2 - 0,8), a zbog svog fizičkog značenja, najpogodniji parameter je  $R_M^0$ . Očigledno je pogoršanje statističkih parametara kalibracionih modela zasnovanih na  $R_M^0$  vrednostima sa povećanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, međutim, sa izuzetkom modela broj 4, nijedan model se ne može statistički opravdati kao pogodniji u odnosu na druge.

Hromatografski određene vrednosti  $\log K_{O/W}$  dobijene su korišćenjem retencionih podataka i utvrđenih kalibracionih modela datih u Prilogu.

Svi modeli (Prilog, jednačine 1-7) daju međusobno koherentne podatke, bez međusobne statističke razlike. Takođe, postoji dobro slaganje između izračunatih DFT i eksperimentalno određenih vrednosti ( $R^2 = 0,8024 - 0,9658$ ).

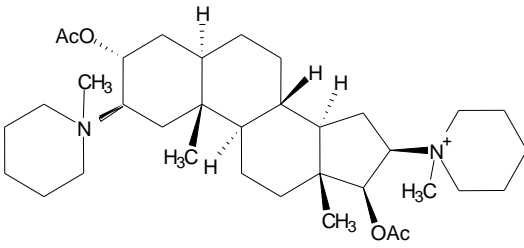
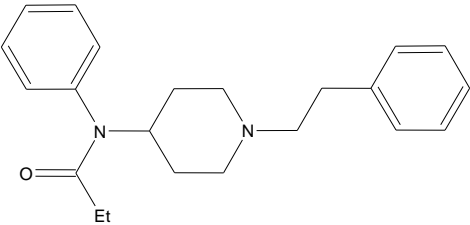
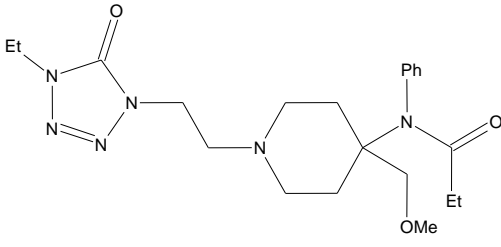
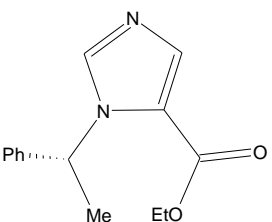
Primećeno je da svi proučavani kompleksi Ru(II) pokazuju neuobičajeno visoku lipofilnost, u poređenju sa  $\log K_{O/W}$  vrednostima nekih rutenijumovih kompleksa slične strukture koja pokazuju značajno niske koeficijente raspodele oktanol-voda [61]. Međutim, navedena jedinjenja su pozitivno naelektrisana, što može objasniti njihovu nisku lipofilnost u poređenju sa neutralnim kompleksima koji su ispitivani u ovom radu.



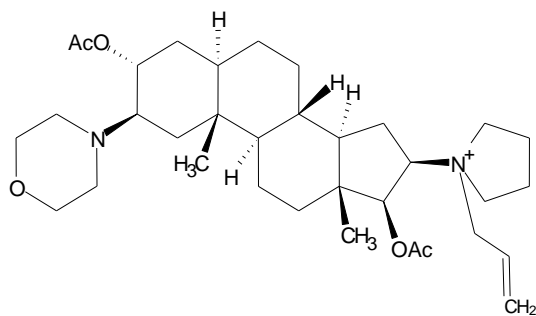
## 4.2. Ispitivanje hromatografskog ponašanja nekih anestetika

Strukture i nazivi izabranih anestetika date su u Tabeli 5:

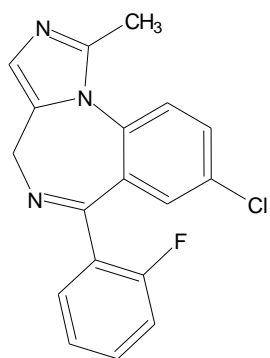
Tabela 5. Strukture proučavanih anestetika

| R.br. | Naziv        | Struktura  |
|-------|--------------|--|
| 1     | Pankuronijum |    |
| 2     | Fentanil     |  |
| 3     | Rapifen      |  |
| 4     | Etomidat     |  |

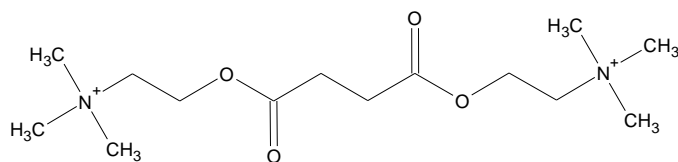
5 Esmeron



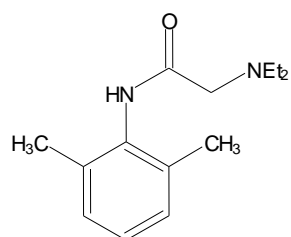
6 Midazolam



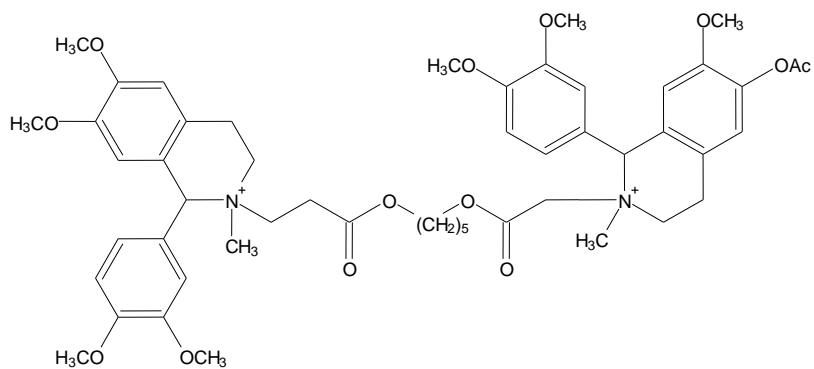
7 Midarin



8 Lidokain



9 Atrakurijum



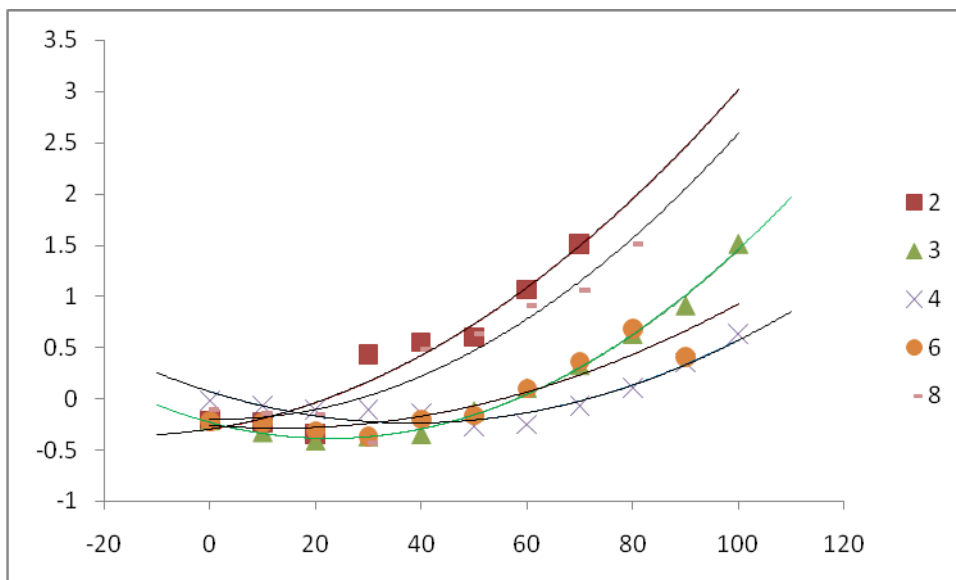
Iz tabele se vidi da sva ispitivana jedinjenja imaju različite prstenaste strukture u svom sastavu, izuzev midarina. Pankuronijum, esmeron, midarin i atrakurijum (jedinjenja 1, 5, 7 i 9) se nalaze u obliku svojih soli, hloridnih i bromidnih, pa će u vodenim rastvorima biti disosovani na odgovarajuće jone.

Do sada je najčešće korišćena metoda za analizu anestetika bila reverzno-fazna visoko efikasna tečna hromatografija (RP-HPLC) sa ultravioletnom detekcijom (HPLC-UV) <sup>[63, 64]</sup>, a anestetici su odvajani uglavnom korišćenjem C18- i C8-silika-gela, pri čemu se koristi mobilna faza koja se sastoji od vode i acetonitrila ili metanola u različitim proporcijama <sup>[65]</sup>.

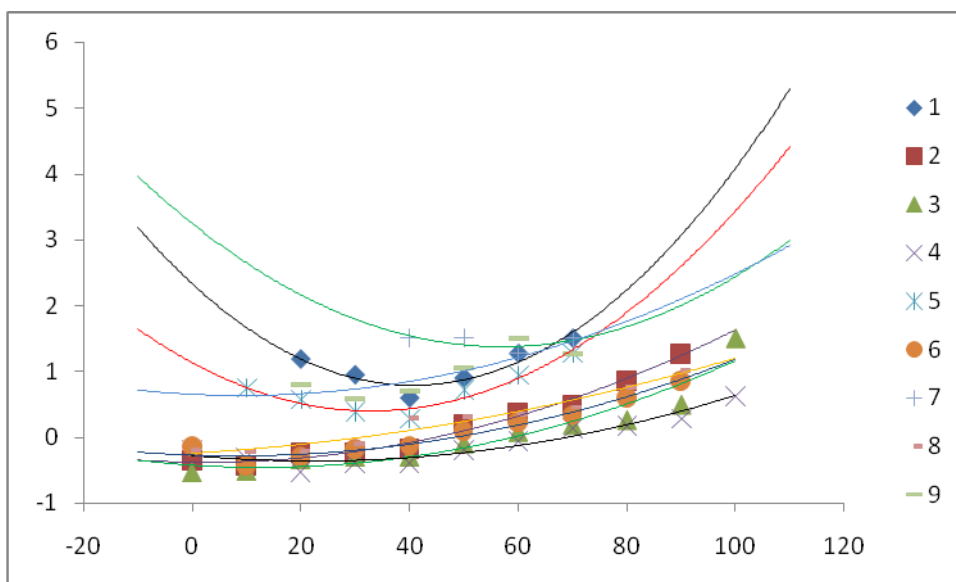
Na osnovu struktura anestetika pretpostavljeno je da bi bili odgovarajuće model supstance za ispitivanje hromatografskog ponašanja u HILIC uslovima. Zato su u ovom radu odabrani hromatografski sistemi koji obuhvataju polarne stacionarne faze u kombinaciji sa binarnim smešama vode i organskog rastvarača, kako bi se u skladu sa ciljem ovog istraživanja posmatrao efekat sastava mobilne faze na retenciju u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija, kao i analizirale eventualne prednosti HILIC u odnosu na RP hromatografski režim odvajanja. Takođe, ispitivan je uticaj prirode organske komponente mobilne faze, kao i efekat dodavanja soli mobilnoj fazi, na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja kako bi se odredili faktori koji regulišu retenciju i dao doprinos objašnjenju mogućeg retencionog mehanizma u uslovima hromatografije hidrofilnih interakcija.

Za proučavanje anestetika izabrani su hromatografski sistemi dati u Tabeli 3.

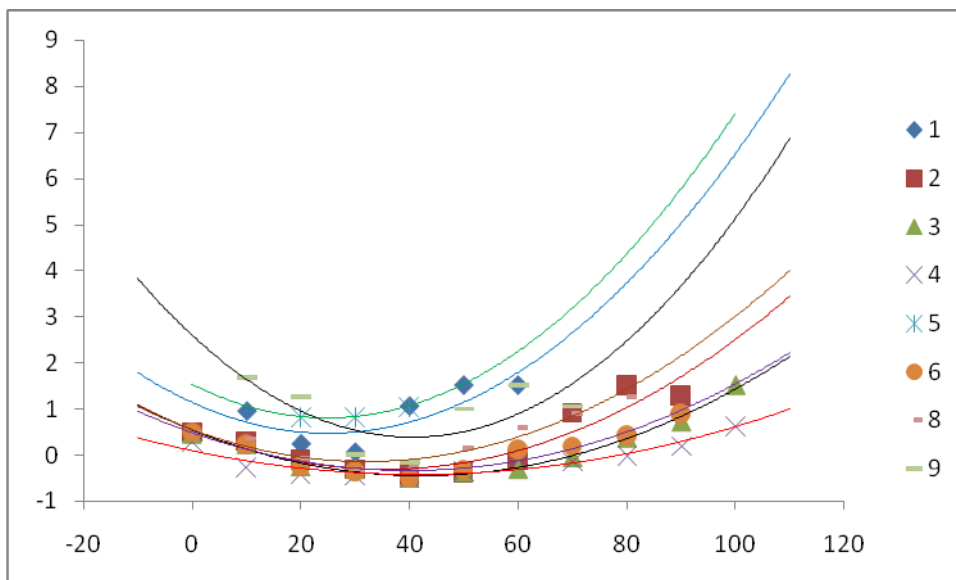
I u slučaju anestetika retenciono ponašanje je praćeno izračunavanjem  $R_M$  vrednosti, a dobijeni rezultati predstavljeni su kao funkcija retencije ( $R_M$ ) od sastava mobilne faze (% vode u mobilnoj fazi) (Slike 13-17).



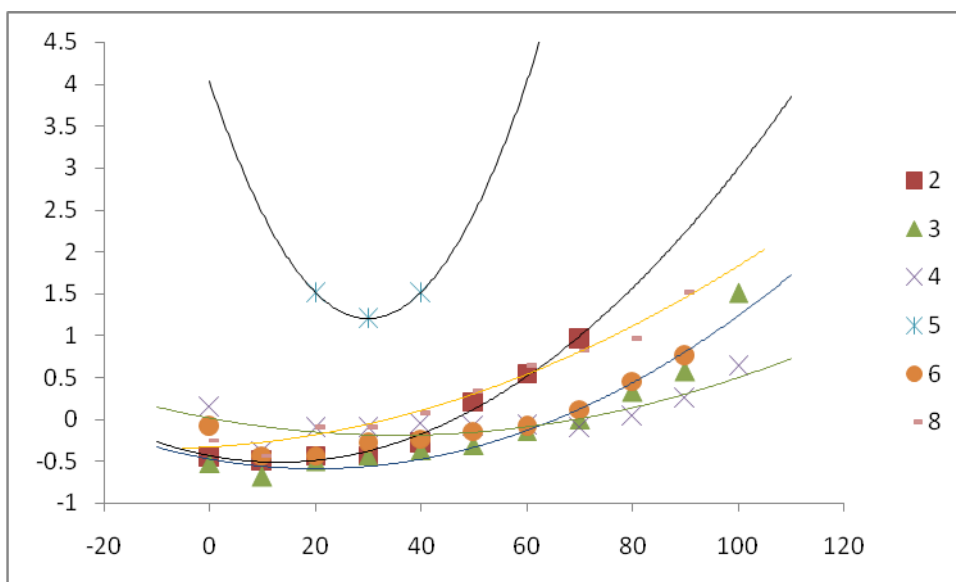
Slika 13. Zavisnost retencije ispitivanih anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi za sistem MeOH/voda na tankom sloju silika-gela



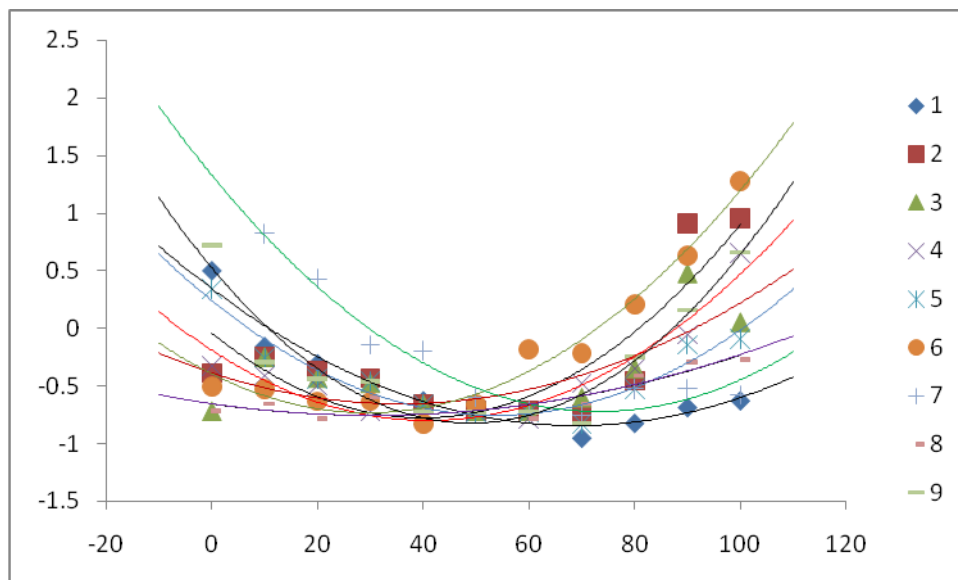
Slika 14. Zavisnost retencije ispitivanih anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi za sistem THF/voda na tankom sloju silika-gela



Slika 15. Zavisnost retencije ispitivanih anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi za sistem ACN/voda na tankom sloju silika-gela



Slika 16. Zavisnost retencije ispitivanih anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi za sistem dioksan/voda na tankom sloju silika-gela



Slika 17. Zavisnost retencije ispitivanih anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi za sistem ACN/voda na tankom sloju aluminijum-oksida

#### 4.2.1. Proučavanje uticaja sadržaja vode u mobilnoj fazi na retenciju

Ako pogledamo dijagrame (Slike 13-17) uočava se slično ponašanje kao i u slučaju Ru(II)-arenskih kompleksa, tj. i kod anestetika dolazi do konverzije mehanizma odvajanja sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi, što je objašnjeno u odeljku 4.1.1.

#### 4.2.2. Uticaj prirode stacionarne faze na retenciju

Kada se posmatraju retencione krive anestetika uočava se da do konverzije retencionog mehanizma (minimum U retencione krive) dolazi sa većim sadržajem vode u mobilnoj fazi na aluminijum-oksidu u odnosu na silika-gel. Ako posmatramo sisteme sa istom mobilnom fazom (ACN/voda) na silika gelu i aluminijum oksidu (Slike 15 i 17) može se primetiti da do konverzije mehanizma na silika-gelu dolazi na oko 30-50% vode u mobilnoj fazi, a na aluminijum-oksidu na oko 40-65% vode. Takvi rezultati se mogu objasniti adsorpcionim karakteristikama stacionarne faze. Prelaz između HILIC i RP hromatografskog mehanizma se odvija pri nižim sadržajima vode u mobilnoj fazi na

manje polarnim stacionarnim fazama nego na polarnijim. U nekim slučajevima je u ovoj tački i razdvajanje najslabije, što zavisi i od prirode analita i od stacionarne faze. Naime, visoka polarnost i jonska struktura površine aluminijum-oksida čini ga pogodnijim za normalno faznu (HILIC) nego za reverzno faznu hromatografiju dok je silika-gel, iako polaran, pogodniji i za NP i RP hromatografiju, u zavisnosti od prirode analita i sastava mobilne faze. Na osnovu činjenice da je HILIC opseg kod aluminijum-oksida širi nego kod silica-gela može se pretpostaviti i da je doprinos adsorpcije u odnosu na particijuna njemu veći. Na polarnijem aluminijum-oksidu minimum U retencione krive pomera se ka višim koncentracijama vode u mobilnoj fazi, omogućavajući upotrebu mobilnih faza sa višim sadržajem vode u HILIC uslovima i dominantni adsorpcioni mehanizam što je od značaja za razdvajanje jako polarnih, odnosno jako hidrofilnih supstanci.

#### **4.2.3. Uticaj prirode organske komponente mobilne faze na retenciju**

Posmatranjem hromatografskih sistema sa silika gelom kao stacionarnom fazom (Slike 13-16) može se uočiti da je u HILIC modu zadržavanje, za one anestetike koji su eluirani, generalno najviše sa ACN kao organskom komponentom mobilne faze. Drugi rastvarači koji se koriste kao organska komponenta mobilne faze pokazuju manju retenciju.

Primećeno je da sistemi koji sadrže metanol kao organsku komponentu mobilne faze ne pokreću sa polazne mrlje sva ispitivana jedinjenja, tačnije, naelektrisane supstance koja su adsorbovana na površini silika gela se ne mogu eluirati.

THF i dioksan su takođe aprotični rastvarači koji se mešaju sa vodom u svim odnosima i koji se mogu koristiti u HILIC uslovima. Međutim, oni pokazuju svojstva proton akceptora i mogu da grade vodonične veze sa stacionarnom fazom što dovodi do slabije retencije u odnosu na sisteme koji sadrže acetonitril kao organsku komponentu mobilne faze <sup>[39]</sup>.

U sistemima sa dioksanom kao organskom komponentom mobilne faze, uočeno je da se ne pokreću sva jedinjenja sa polazne mrlje, slično kao u sistemima sa metanolom, tj. za jedinjenja koja su čvrsto vezana za površinu stacionarne faze dioksan nema dovoljnu elucionu moć.

Na silika-gelu, u slučaju mobilne faze metanol/voda, dolazi do konverzije mehanizma odvajanja iz HILIC u RP na 30-60 Vol% sadržaja vode, ako je smeša ACN/voda korišćena kao mobilna faza na oko 30-50 Vol% sadržaja vode. Do konverzije sa sistemima THF/voda dolazi na 10-40% Vol% sadržaja vode u većini slučajeva, a sa dioksanom/vodom na 10-35 Vol% sadržaj vode. Na aluminijum-oksidu sa smešom ACN/voda, došlo je do konverzije mehanizma razdvajanja na oko 40-65 Vol% sadržaja vode.

#### **4.2.4. Uticaj dodatka soli mobilnoj fazi na retenciju**

Kao što je navedeno u Opštem delu, pored adsorpcije i particije retencionom mehanizmu polarnih supstanci na relativno polarnim stacionarnim fazama doprinose i jonska izmena i vodonično vezivanje. Na silika-gelu kao stacionarnoj fazi, sa vodeno-organskim mobilnim fazama, mehanizam zadržavanja se može pripisati kombinaciji mehanizama tečno-tečno particije, adsorpcije i jonske razmene, u zavisnosti od prirode analita i sastava mobilne faze. Pri višim pH vrednostima jonizacija silanolnih grupa na površini silika-gela je izraženija i može imati važnu ulogu u zadržavanju pozitivno naelektrisanih jedinjenja, koja se generalno jako zadržavaju na silika-gelu zahvaljujući vodoničnim vezama i elektrostatičkim interakcijama jonske izmene. Međutim, iako se može reći da je mehanizam sličan mehanizmu jonske izmene, retenciono ponašanje naelektrisanih analita u HILIC uslovima ne može u potpunosti biti opisano jonskom izmenom, jer čak i kada dođe do elektrostatskih interakcija, one mogu biti značajne, ali su samo jedan od faktora koji doprinosi ukupnom retencionom mehanizmu. Naelektrisane stacionarne faze doprinose retenciji elektrostatičkim interakcijama, što utiče na selektivnost razdvajanja. U takvim slučajevima je potrebno dodati neku so (elektrolit) u mobilnu fazu. I dodatak elektrolita utiče na retenciju u HILIC uslovima, kako količina, tako i vrsta dodate soli. Dodatak soli je nekada neophodan, posebno za naelektrisana jedinjenja ili ona koja mogu da disosuju ili budu protonovana u uslovima hromatografskog odvajanja. Poslednjih godina u nekoliko radova autori se bave uticajem dodatka soli na retenciju pri čemu je uočeno da povećanje koncentracije soli uglavnom dovodi do jačanja retencije <sup>[66]</sup>.



Retencija na nenaelektrisanim polarnim stacionarnim fazama u HILIC sistemima obično se pojačava sa dodatkom i povećanjem koncentracije soli, što se pripisuje pojačanom vodoničnom vezivanju analita za stacionarnu fazu, olakšanom povećanjem broja solvatisanih jona u mobilnoj fazi (efekat izoljavanja) [38]. S druge strane, povećanje koncentracije soli u sistemima sa jonizovanim stacionarnim fazama može da smanji retenciju jer dolazi do jonske izmene i istiskivanja naelektrisanih analita sa stacionarne faze.

U jednom od radova autori su uticaj soli objasnili i povećanjem debljine vodenog sloja zbog hidratacije jona soli što dovodi do jačeg zadržavanja polarnih analita. U HILIC uslovima povećanje koncentracije soli ima dvostruki efekat. Povećanje koncentracije soli u mobilnoj fazi generalno dovodi do slabljenja elektrostatičkih interakcija naelektrisanih analita sa stacionarnom fazom, što u slučaju elektrostatičkog privlačenja naelektrisanih čestica u mobilnoj fazi dovodi do smanjenja retencije, a u slučaju odbijanja do povećanja retencije. Osim uticaja na elektrostatičke interakcije, koncentracija soli menja debljinu vodenog sloja na površini stacionarne faze, što utiče i na retenciju nenaelektrisanih odvajanih supstanci. Visok sadržaj organske komponente u mobilnoj fazi dovodi do toga da elektrolit prelazi u vodeni sloj, čime se povećava debljina vodenog sloja i samim tim jača retencija. Mada dalja istraživanja nisu potvrdila uticaj dodatka soli na strukturu ili zapreminu adsorbovanog vodenog sloja, ta pretpostavka se još uvek razmatra kao moguće objašnjene efekta elektrolita [66].

Kada su odvajane supstance naelektrisane polarne komponente, eluciona moć mobilne faze, čak i kada se radi o vodeno-organskom rastvaraču, je često nedovoljna, te je potrebno dodati neki jak elektrolit da bi se povećala eluciona moć mobilne faze i povećala pokretljivost analita.

Mnoge soli koje se obično koriste u RP nisu pogodne za HILIC zbog loše rastvorljivosti u mobilnim fazama koje sadrže visoku koncentraciju organskih rastvarača.

Posmatranjem rezultata dobijenih u ovom radu može se primetiti da, bez obzira na organsku komponentu primenjene mobilne faze, supstance 1, 5, 7 i 9 pokazuju najjaču retenciju. Ove komponente su anestetici pankuronijum, esmeron, midarin i atrakurijum, koji su u obliku svojih soli, hlorida i bromida, odnosno u vodenom rastvoru su disosovani na jone. Naelektrisani analiti su generalno pogodni za razdvajanje u

HILIC modu, jer su hidrofilniji od njihovog nenaelektrisanog oblika i jače se zadržavaju u HILIC uslovima. Kao što je već rečeno, prisustvo jonizovanih grupa na površini stacionarne faze može dovesti do ostvarivanja elektrostatskih interakcija sa naelektrisanim analitima. Elektrostatskičko privlačenje između pozitivno naelektrisanih odvajanih supstanci i negativno naelektrisane stacionarne faze, i obrnuto, dovodi do povećanja retencije, dok elektrostatskičko odbijanje između analita i stacionarne faze sa istim električnim naelektrisanjem ima suprotan efekat <sup>[37]</sup>.

Ovi anestetici (jedinjenja 1, 5, 7 i 9) koji su pokazali najjače interakcije sa nemodifikovanim silika-gelom poseduju kvaternarni atom azota koji ih čini pozitivno naelektrisanim, pa učestvuju u jonskoj izmeni sa stacionarnom fazom i, čak i sa većim sadržajem vode, snažno su vezani za negativno naelektrisanu površinu silika-gela. U ovom slučaju eluciona moć mobilne faze je mala, jer ne sadrži komponente koje kompetitivno interaguju sa negativno naelektrisanim centrima stacionarne faze. Sa metanolom kao organskom komponentom pomenuti anestetici se ne pokreću sa polazne mrlje, a komponenta 7 ni sa acetonitrilom, ni dioksanom. Navedeni anestetici snažno se zadržavaju na silika-gelu i razdvajanje se postiže jonskom izmenom. Jedinjenje 7, midarin, je jedini anestetik koji nema neku prstenastu strukturu u svom sastavu, a poseduje dva kvaternarna amonijum jona, i pokazuje najjaču retenciju, što bi se moglo objasniti njegovom najvećom polarnošću i naelektrisanjem.

Da bi se postiglo eluiranje ovih jedinjenja i povećala polarnost tj. eluciona moć mobilne faze, neophodno je dodati neki jak elektrolit. Kao elektrolit je korišćen NaCl, a uticaj dodavanja elektrolita na retenciju anestetika ispitivan je dodatkom NaCl u koncentraciji od 1M u mobilne faze: metanol/voda (0-90 vol% metanola) i dioksan/voda (0-90 vol% dioksana) (Tabela 6). Mobilne faze sa ACN i THF kao organskom komponentom nije bilo moguće primeniti zbog raslojavanja faza usled slabe rastvorljivosti soli.

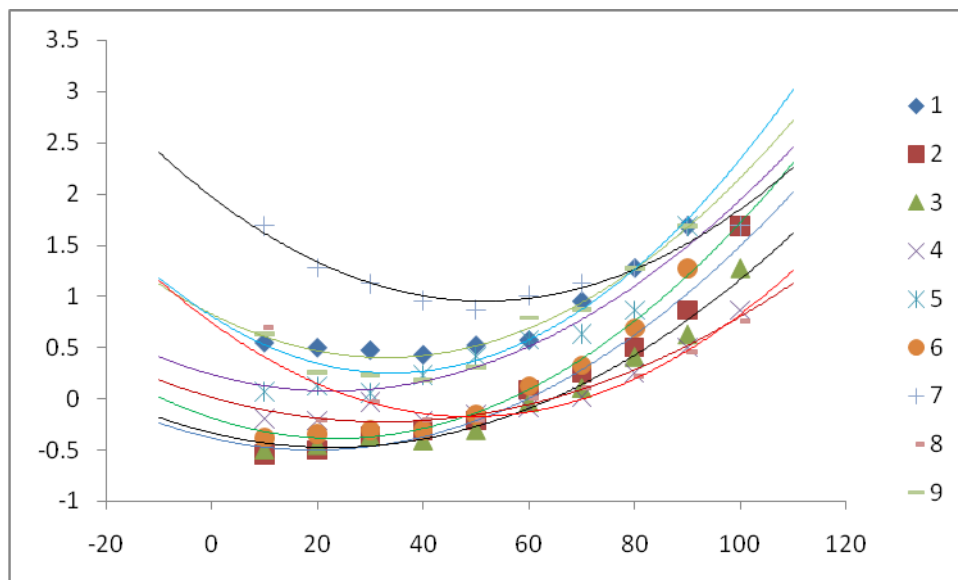
Tabela 6. Hromatografski sistemi za proučavanje uticaja soli na retenciju anestetika

| R. broj | Stacionarna faza               | Mobilna faza                                 |
|---------|--------------------------------|--|
| 1       | Silika-gel 60 F <sub>254</sub> | 0-90% (v/v) vode u metanolu,<br>(1M NaCl)    |
| 2       | Silika-gel 60 F <sub>254</sub> | 0-90% (v/v) vode u dioksanu,<br>(sa 1M NaCl) |

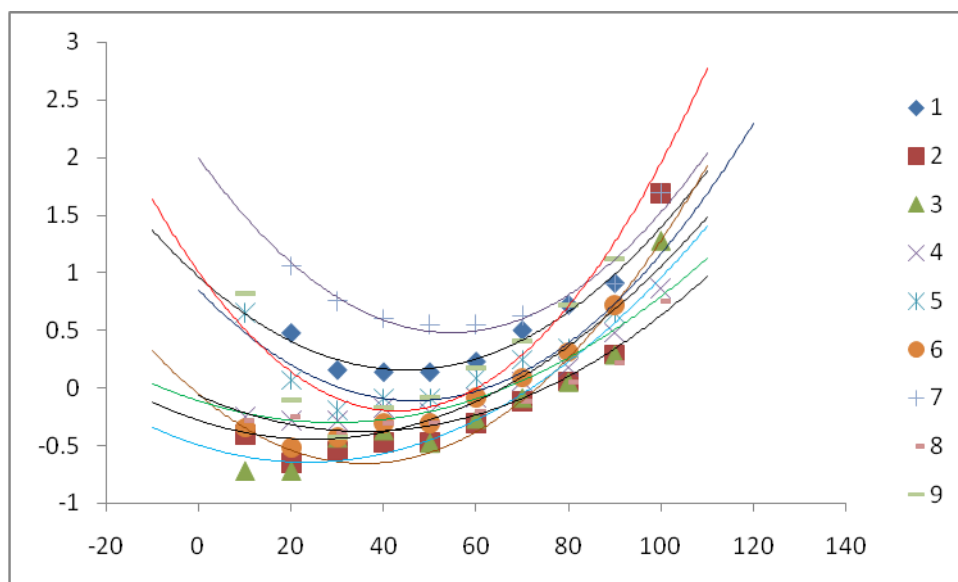
Na ovaj način povećava se eluciona snaga mobilne faze, što dovodi do slabljenja retencije ispitivanih jedinjenja.

Poredeći sisteme sa i bez elektrolita, uočene su izvesne razlike. Generalno, retencija anestetika se smanjuje dodatkom soli. Na osnovu toga, zaključeno je da dodavanje soli povećava rastvorljivost slabo rastvornih supstanci u smešiš rastvarača. Ona jedinjenja koja su snažno zadržana u sistemima bez elektrolita (jedinjenja 1, 5, 7 i 9), pokreću se dodatkom soli. Kako retencija anestetika sa kvaternarnim amonijum jonom opada sa dodatkom soli može se pretpostaviti da su jonizovane grupe silika-gela odgovorne za zadržavanje ovakvih komponenti. Činjenica da naelektrisane komponente pokazuju nešto jaču retenciju u odnosu na nenalektrisane može se pripisati mogućnosti interakcije kvaternarnog amonijum jona sa negativno naelektrisanim silanolnim grupama na stacionarnoj fazi. Očigledno je da jonske interakcije mogu biti oslabljene dodatkom soli.

Retencioni dijagrami pokazuju nešto pravilniji oblik krivih nego u sistemima bez elektrolita (Slike 18 i 19).

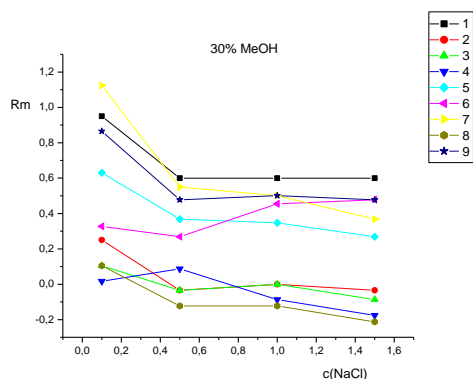


Slika 18. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi (sistem MeOH/voda sa 1M NaCl)

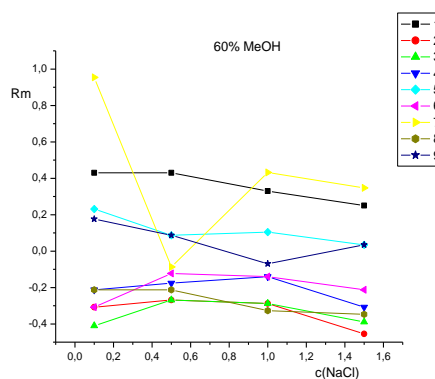


Slika 19. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja vode u mobilnoj fazi (sistem dioksan/voda sa 1 M NaCl)

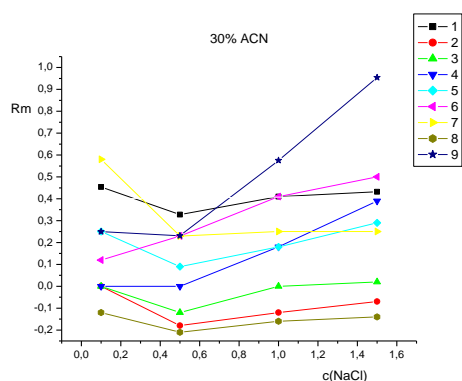
Zatim je posmatrano retenciono ponašanje anestetika sa porastom koncentracije soli u mobilnoj fazi, pri 30% i 60% metanola i 30% i 60% acetonitrila. Koncentracija NaCl u ovim mobilnim fazama je bila 0,1M, 0,5M, 1M i 1,5M. Zavisnost retencije od koncentracije soli prikazana je na Slikama 20-23.



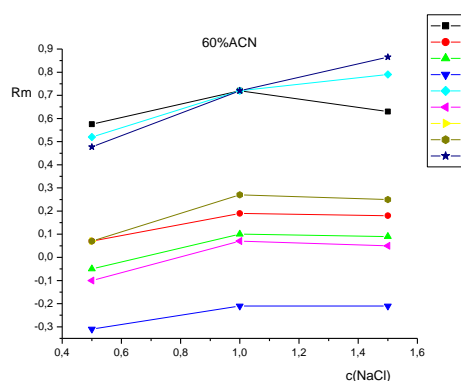
Slika 20. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja NaCl u mobilnoj fazi (sistem metanol/voda 30/70)



Slika 21. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja NaCl u mobilnoj fazi (sistem metanol/voda 60/40)



Slika 22. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja NaCl u mobilnoj fazi (sistem ACN/voda 30/70)



Slika 23. Zavisnost retencije anestetika od sadržaja NaCl u mobilnoj fazi (sistem ACN/voda 60/40)

U većini slučajeva, sa sistemom rastvarača koji sadrži 30% metanola ili ACN, povećanje koncentracije elektrolita u mobilnoj fazi je prvo dovelo do smanjenja retencije (efekat “solting in“), a zatim povećanja retencije (“solting out“). Efekat isoljavanja se pripisuje pojačanom vodoničnom vezivanju između analita i stacionarne faze, što je olakšano povećanom populacijom solvatisanih jona rastvorene soli u mobilnoj fazi. Povećanje jonske sile može da smanji retenciju u HILIC sistemima, pošto se kontra-joni soli takmiče sa jonima uzorka za suprotno naelektrisane grupe u stacionarnoj fazi interakcijama jonske izmene i istiskuju molekule jonizovanog uzorka sa stacionarne faze [38]. Povećanjem koncentracije soli u mobilnoj fazi koja sadrži

metanol, efekat "isoljavanja" nije značajno izražen. Konverzija se odvija sa sistemom rastvarača koji sadrži 0,5M NaCl.

Kada su korišćeni sistemi rastvarača sa većim sadržajem organskih komponenti (60 Vol%) (HILIC uslovi), uočene su neke razlike u efektu organskih rastvarača. Naime, sa sistemom rastvarača koji sadrži 60% metanola, efekat isoljavanja je primećen samo za jedinjenje 7 (midarin). U većini slučajeva veća koncentracija elektrolita u sistemu rastvarača koji sadrži 60% ACN dovela je do jačeg zadržavanja ("isoljavanja"). Model razdvajanja za HILIC pretpostavlja prisustvo vodenog sloja na površini sorbenta. Visok sadržaj organske komponente u mobilnoj fazi čini da so preferira da bude u vodom bogatom sloju. Takođe, veća koncentracija soli dovodi do toga da više solvatisanih jona soli prelazi u sloj tečnosti bogat vodom. To rezultuje povećanjem zapremine ili hidrofilitnosti tečnog sloja, što dovodi do jačeg zadržavanja rastvorenih supstanci [67].

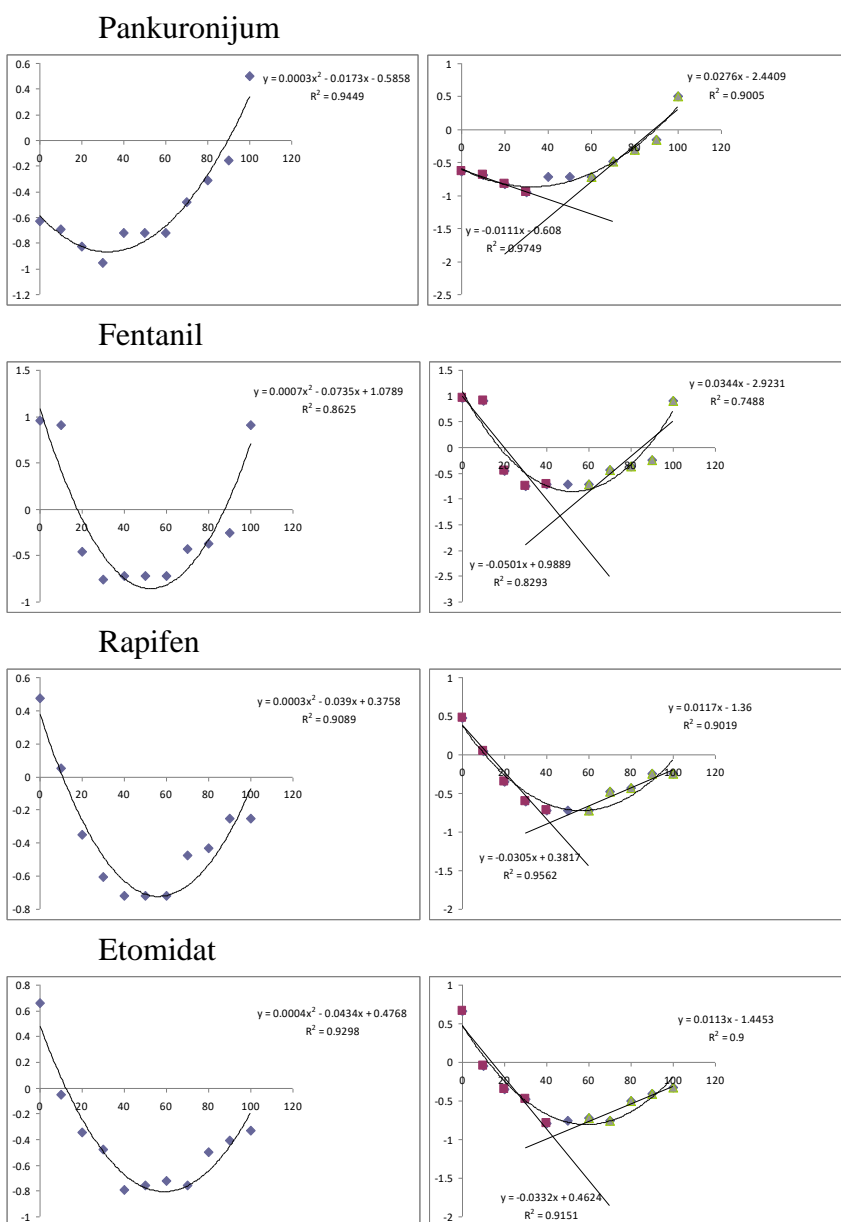
#### 4.2.5. Određivanje lipofilnosti anestetika

Kao što je već istaknuto, lipofilnost predstavlja veoma važan parametar koji utiče na biološku aktivnost lekova, određuje transport kroz ćelijsku membranu i interakcije između leka i receptora. U jednom od skorašnjih radova koji se bave lipofilnošću, autori su pokazali da se i HILIC može primeniti u tu svrhu [68]. Eksperimentalne vrednosti dobijene u bimodalnim HILIC uslovima korelisane su sa  $\log P$  vrednostima izračunatim korišćenjem različitih algoritama. Kako kriva retencije, kao što je već pokazano, ima U oblik, oni su se fokusirali na korelaciju uslova na minimumu krive sa lipofilnošću i pokazali da minimum zadržavanja, tj. sastav mobilne faze koji odgovara minimumu zadržavanja ("isoelution composition" - ISOELUT) dobro korelira sa  $\log P$  vrednostima izračunatim primenom različitih programa.

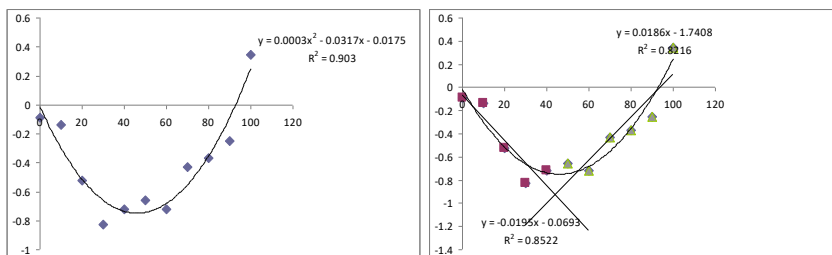
U ovom radu, na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka o aluminijum-oksidu kao stacionarnoj fazi, sa smešom ACN/voda kao mobilnom fazom, izračunati su parametri: ISOELUT,  $\log$ ISOELUT, ISOELUT1 i  $\log$ ISOELUT, a zatim korelisani sa procenjenim vrednostima lipofilnost ispitivanih anestetika. Prvo, na osnovu eksperimentalno dobijenih  $R_F$  vrednosti, izračunate su odgovarajuće  $R_M$  vrednosti koje su korišćene kao retencioni parametar u daljem izračunvanju. Zatim smo dobili

retencione profile prikazane kao funkcionalna zavisnost  $R_M$  vrednosti od sastava mobilne faze, tačnije, od sadržaja organske komponente mobilne faze i tako dobili tipičnu U krivu.

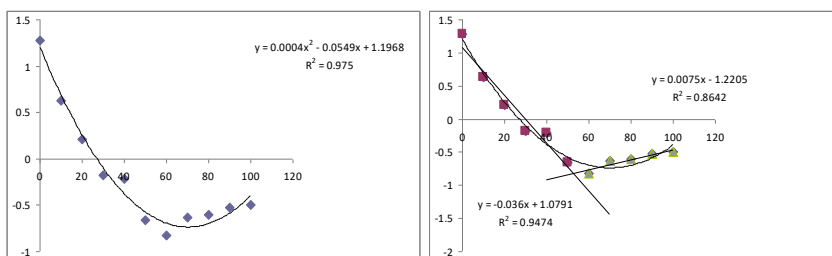
Iz eksperimentalnog seta podataka određeni su minimalni faktori zadržavanja. ISOELUT parametri su određeni primenom dva različita pristupa koja su prikazana na Slici 24. Kao što se sa slike može videti, leva strana U krive odgovara RP ponašanju, a desna strana odgovara HILIC retencionom ponašanju. Najslabija retencija, minimum U krive, odgovara konverziji mehanizma odvajanja i u tom trenutku verovatno deluju oba mehanizma zadržavanja, kao što je već objašnjeno.



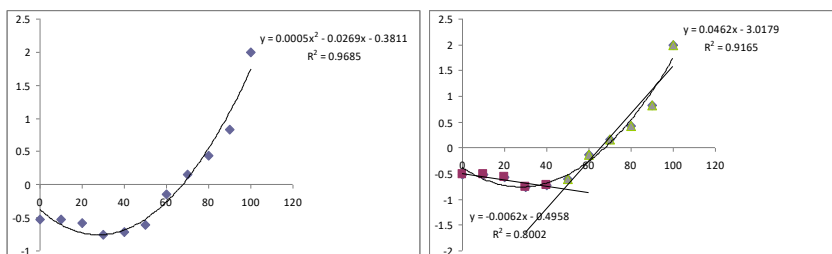
### Esmeron



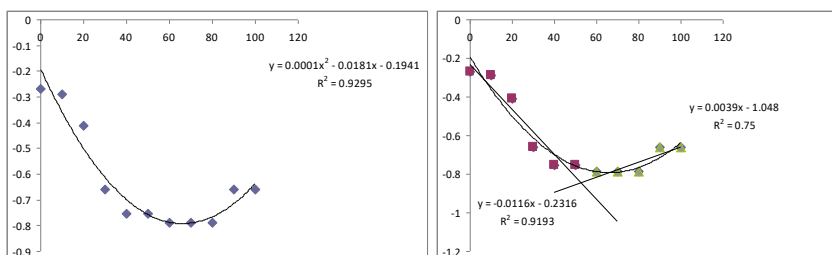
### Midazolam



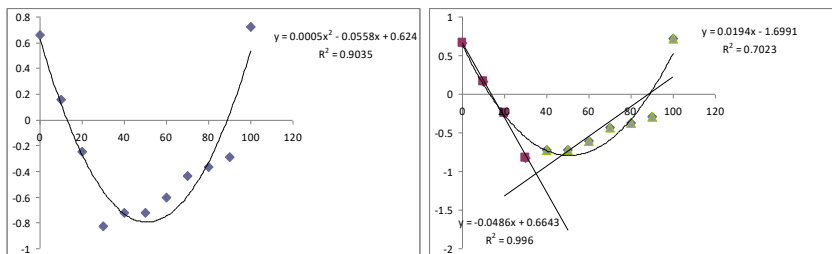
### Midarin



### Lidokain



### Atrakurijum



Slika 24. Retencioni profili anestetika predstavljani kao funkcionalna zavisnost između sastava mobilne faze (% ACN) i retencije ( $R_M$ )



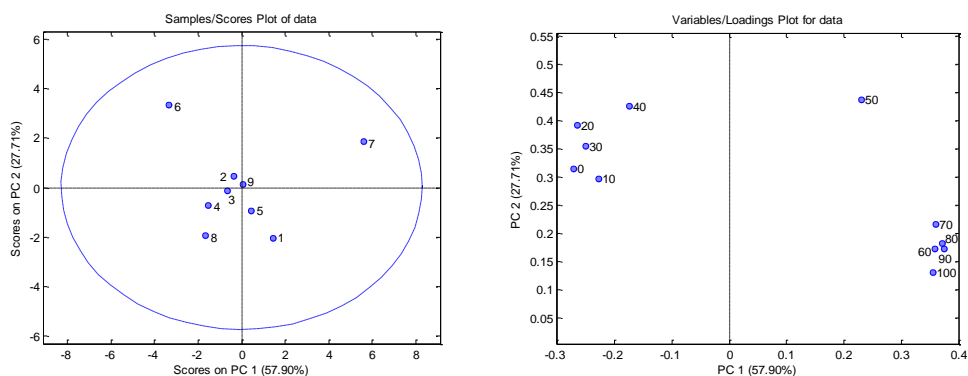
U prvom slučaju minimum krive (ISOELUT) je izračunat primenom jednačine  $ax^2+bx+c$ , kao  $-b/2a$ . Drugi pristup je primena linearnog modela  $bx+a$  za dva seta podataka, jedan za RP i drugi za HILIC deo U retencione krive i minimum (ISOELUT1) je određen kao  $(a_2-a_1)/(b_1-b_2)$ . Izračunate vrednosti su date u Tabeli 7.

Tabela 7. Izračunate vrednosti ISOELUT i ISOELUT1 i njihovih logaritama

| R.br | ISOELUT     | logISOELUT   | ISOELUT1    | logISOELUT1 |
|------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| 1    | 0,00000249  | -5,603800653 | 47,36175711 | 1,675427806 |
| 2    | 0,00002548  | -4,593800576 | 46,29585799 | 1,665542137 |
| 3    | 0,00000573  | -5,241845378 | 41,27251185 | 1,615660901 |
| 4    | 0,00000846  | -5,072629637 | 42,86966292 | 1,632150069 |
| 5    | 0,000004755 | -5,322849479 | 43,87139108 | 1,642181405 |
| 6    | 0,00001098  | -4,95939766  | 52,86436782 | 1,723163043 |
| 7    | 0,000006725 | -5,172307711 | 48,13167939 | 1,682431015 |
| 8    | 0,000000905 | -6,043351421 | 52,67096774 | 1,721571298 |
| 9    | 0,00001395  | -4,855425792 | 34,75588235 | 1,541028318 |

Zatim su izračunate vrednosti korelisane sa  $\log P$  vrednostima izračunatim korišćenjem različitih programa. Uzimajući u obzir korelaciju između faktora retencije, može se zaključiti da ISOELUT parametri (izračunati iz eksperimentalnih podataka) pokazuju dobru korelaciju sa  $\log P$  vrednostima, što ukazuje da tankoslojna HILIC metoda može biti pouzdana alternativa za određivanje lipofilnosti klasičnoj shake-flask metodi.

PCA pokazuje razdvajanje anestetika u dve grupe prema predznaku vrednosti skorova duž prve glavne komponente, jedna u kojoj su anestetici kod kojih dominira RP mehanizam i druga u kojoj su oni kod kojih dominira HILIC mehanizam. Prva grupa se sastoji od jedinjenja 2, 3, 4, 6, 8, a to su (osim jedinjenja 6) anestetici za koje postoje eksperimentalno određene  $\log P$  vrednosti koje pokazuju dobru korelaciju sa izračunatim vrednostima.



Slika 25. Rezultati PCA A) grafik skorova sa karakterističnim rasporedom ispitivanih jedinjenja. B) grafik koeficijenata doprinosa hromatografskih sistema odabranim glavnim komponentama, označenih udelima vode u mobilnoj fazi (0-100%).

Tabela 8. Koeficijenti korelacije izoelutnih parametara, računski procenjenih i literaturno preuzetih eksperimentalnih parametara lipofilnosti određenih primenom *shake-falsk* metode.

|             | ISOELUT  | logISOELUT | ISOELUT1 | logISOELUT1 | AlogPs | Chem Axon | logP exp |
|-------------|----------|------------|----------|-------------|--------|-----------|----------|
| ISOELUT     | 1        |            |          |             |        |           |          |
| LogISOELUT  | 0,866615 | 1          |          |             |        |           |          |
| ISOELUT1    | -0,13094 | -0,35361   | 1        |             |        |           |          |
| logISOELUT1 | -0,10758 | -0,33822   | 0,999613 | 1           |        |           |          |
| AlogPs      | 0,870233 | 0,853604   | 0,179502 | 0,19647     | 1      |           |          |
| ChemAxon    | 0,830643 | 0,584151   | 0,316517 | 0,333835    | 0,8330 | 1         |          |
| LogPexp     | 0,927578 | 0,752162   | 0,02544  | 0,05802     | 0,9449 | 0,7531    | 1        |

### **4.3. Razvoj i validacija metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice**

Sistematsko ispitivanje hromatografskog ponašanja kompleksa i anestetika u zavisnosti od sadržaja vode u mobilnoj fazi pokazalo je da se veliki broj hromatografskih sistema koji uključuju polarne stacionarne faze i vodeno-organske mobilne faze može primeniti za hromatografsku analizu pomenutih supstanci. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog rada bio da se praktična primenljivost ovih ispitivanja proveri, odnosno potvrdi razvojem i validacijom TLC metoda za određivanje različitih polarnih supstanci. U okviru ovog rada validovane su dve metode za kvantitativno određivanje malih polarnih molekula. Prva metoda odnosi se na kvantifikaciju veštačkih boja za životne namirnice metodom tankoslojne hromatografije <sup>[69]</sup>.

Boje za životne namirnice predstavljaju važnu grupu jedinjenja, a mogu se definisati kao čiste supstance, bilo prirodne, ekstrahovane iz prirodnih proizvoda, bilo sintetičke koje se koriste za kompenzaciju potpunog ili delimičnog gubitka boje finalnih prehrambenih proizvoda tokom njihove obrade i skladištenja, ili za specifično označavanje nekih farmaceutskih proizvoda (tableta, kapsula, sirupa, itd.).

Uopšteno, sintetičke boje se na osnovu rastvorljivosti mogu klasifikovati kao rastvorne u vodi ili rastvorne u mastima. U vodi rastvorljive sintetičke boje su među najvažnijim aditivima u prehrambenoj industriji, a time i kontroli kvaliteta hrane. Većina ovih jedinjenja su mono- ili diazo-aromatične sulfonske kiseline, tj. njihove soli, trifenilmetan ili derivati ksantena, ili varijante hinolonske i indigoidne strukture <sup>[70]</sup>.

Sintetičke boje su stabilnije od prirodnih boja <sup>[71, 72]</sup>, što je i glavni razlog njihove upotrebe. Međutim, pod određenim uslovima mogu se razgraditi, precipitirati ili stupiti u interakciju sa drugim sastojcima hrane. Na njihovu stabilnost mogu uticati pH vrednost, temperatura, svetlost ili prisustvo drugih reagenasa za redukciju ili oksidaciju. Nepotpuno poznavanje puteva transformacije je glavni razlog zašto je upotreba boja, iako dozvoljena, strogo ograničena i kontrolisana. Takođe, sintetičke boje mogu da sadrže do 10% neke toksične nečistoće koje se koriste u procesu proizvodnje, kao što je 4-aminobifenil, 4-aminobenzen ili benzidin. Upotreba sintetičkih boja je predmet kritika i polemika u vezi alergijskih reakcija, opstrukcije pluća ili gastrointestinalnog trakta i mogućih promena u ponašanju kod dece, tj. hiperaktivnosti koju mogu izazvati <sup>[73, 74]</sup>.

Do sada su razvijene mnoge hromatografske metode za praćenje i određivanje boja u različitim uzorcima <sup>[75]</sup>. Glavni nedostatak HPLC metoda je dugo trajanje analize. Za razliku od HPLC, TLC obezbeđuje istovremenu analizu desetina uzoraka u relativno kratkom vremenskom periodu. Glavna prednost je, kao što je već rečeno, niska cena, mala potrošnja rastvarača i potrebne male količine uzorka za analizu.

Cilj ovog rada bio je da se predloži nova TLC metoda za brzi skrining i kvantitativno određivanje nekoliko u vodi rastvornih boja, u skladu sa osnovnim principima zelene analitičke hemije uglavnom smanjenjem upotrebe toksičnih rastvarača.

#### **4.3.1. Razvoj metode**

Što se tiče prehrambenih boja, kao metoda izbora odabrana je tankoslojna hromatografija na RP-18 silika-gelu kao stacionarnoj fazi. Razmotreno je nekoliko sastava mobilne faze. Izabran je vodeni rastvor amonijum-sulfata u koncentraciji od 0,5 mol dm<sup>-3</sup> sa dodatkom 30% etanola kao organskog modifikatora. Pored toga, razmatrane su i horizontalna i uzlazna tehnika. Tehnika uzlaznog kretanja je zahtevala malo veću koncentraciju amonijum-sulfata (do 0,7 mol dm<sup>-3</sup>) da bi se postiglo dobro razdvajanje i rezolucija, iako je uočeno značajno širenje hromatografskih zona u odnosu na tehniku horizontalnog razvijanja. Put rastvarača od 8 cm dao je zadovoljavajuće odvajanje nekoliko parova boja, što je omogućilo bolju selektivnost, tj. specifičnost od onih dobijenih za dužinu puta od 5 cm, uprkos značajnom povećanju vremena trajanja analize.

Planirano je da se razvijena metoda uporedi sa HPLC metodom. Metoda koju su predložili Miniotti i saradnici <sup>[70]</sup> usvojena je, sa nekoliko izmena, i optimizovana za HPLC metodu. Uzimajući u obzir prirodu ispitivanih boja, razmatrana su dva hromatografska režima: tečna hromatografija hidrofilnih interakcije (HILIC) i tipični RP uslovi. U tom smislu izabrane su dve kolone: Zorbak RKS-SIL (2,1 × 150 mm, 5 μm) i Eclipse KSDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm). S obzirom da nijedna promena sastava mobilne faze (acetonitril-voda u 20-90% v/v i amonijum-acetatnog pufera u koncentracijama od 5, 10 i 30 mmoldm<sup>-3</sup>) nije pružila zadovoljavajuću selektivnost u prvom slučaju, druga opcija je dalje razrađena. U početku je upotrebljena smeša

acetonitril/metanol (1:1 v/v), puferisana sa  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ( $\text{pH} = 7,0$ ,  $C = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Smanjivanje sadržaja organskog modifikatora postepeno je rezultiralo boljim odvajanjem. Snižavanje  $\text{pH}$  vrednosti na 6,5 rezultiralo je potpunim odvajanjem svih ispitivanih jedinjenja. Konačni uslovi su opisani u Eksperimentalnom delu.

#### 4.3.2. Validacija metode

Validacija metode izvršena je uzimajući u obzir preporuke Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH) <sup>[76]</sup>, AOAC Peer-Verified Methods Programme <sup>[77]</sup> i Odluke Komisije 2002/657/EC <sup>[78]</sup> u odnosu na sledeće parametre:

##### Linearnost i opseg:

Linearnost analitičke metode je njena sposobnost da, u okviru datog opsega, dobije rezultate ispitivanja koji su direktno ili matematičkom transformacijom proporcionalni koncentraciji analita. Kalibracione krive su dobijene kao zavisnost površine pikova od odgovarajućih koncentracija.

Granica (limit) detekcije (Limit of detection, LOD) i granica (limit) kvantifikacije (limit of quantification, LOQ):

Granica detekcije (LOD) je definisana kao najniža koncentracija analita u uzorku koja se može razlikovati od slepe probe, a granica kvantifikacije (LOQ) je definisana kao najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti sa prihvatljivom pouzdanošću.

Specifičnost se određuje analiziranjem standardnih supstanci i ispitivanih jedinjenja.

Preciznost metode je potvrđena studijama ponovljivosti i srednje preciznosti. Analize su ponovljene više puta u istom danu i srednja preciznost metode je proverena ponavljanjem analize u tri različita dana. Svaki put je pripremljen svež kalibracioni standard i analizirani rastvor.

Tačnost je određena primenom metode standardnog dodatka. Standardni rastvor je dodat u uzorak na tri nivoa koncentracije. Svaki eksperiment je ponovljen u triplicatu. Tačnost je izražena kao tzv. povratni prinos, „rikaveri” (recovery).

### 4.3.3. Rezultati validacije

Kalibracija je izvršena nanošenjem 2 ml standardnih rastvora na pločicu da bi se dobio sledeći opseg koncentracija: 20-180 ng/traka u slučaju E102 - E131, tj. 35-300 ng/traka u slučaju E132 i E133 jedinjenja.

Opseg kalibracije, linearnost, vrednosti granica detekcije i kvantifikacije i prateća statistike sumirani su u Tabeli 9, a parametri validacije za HPLC metodu u Tabeli 10.

Tabela 9. Parametri validacije HPTLC metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice

| Jedinjenje | Opseg linearnosti | Koeficijent korelacije | Limit detekcije | Limit kvantifikacije |
|------------|-------------------|------------------------|-----------------|----------------------|
| E102       | 20-180            | 0,9942                 | 3,3             | 6,3                  |
| E104       | 20-180            | 0,9922                 | 10,4            | 19,7                 |
| E110       | 20-180            | 0,9999                 | 4,4             | 8,3                  |
| E122       | 20-180            | 0,9997                 | 3,5             | 6,7                  |
| E123       | 20-180            | 0,9979                 | 7,8             | 14,7                 |
| E124       | 20-180            | 0,9971                 | 4,5             | 8,5                  |
| E129       | 20-180            | 0,9998                 | 3,2             | 6,0                  |
| E131       | 20-180            | 0,9999                 | 1,7             | 3,1                  |
| E132       | 35-300            | 0,9952                 | 5,1             | 9,7                  |
| E133       | 35-300            | 0,9992                 | 2,0             | 3,7                  |

Tabela 10. Parametri validacije HPLC metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice

| Jedinjenje | Opseg linearnosti | Koeficijent korelacije | Limit detekcije | Limit kvantifikacije |
|------------|-------------------|------------------------|-----------------|----------------------|
| E102       | 2-40              | 0,9999                 | 0,12            | 0,39                 |
| E104       | 2-40              | 1,0000                 | 0,34            | 1,14                 |
| E110       | 1-20              | 0,9999                 | 0,06            | 0,21                 |
| E122       | 1-20              | 1,0000                 | 0,06            | 0,21                 |
| E123       | 1-20              | 1,0000                 | 0,08            | 0,27                 |
| E124       | 1-20              | 0,9999                 | 0,09            | 0,30                 |
| E129       | 1-20              | 1,0000                 | 0,06            | 0,21                 |
| E131       | 0,4-8             | 1,0000                 | 0,02            | 0,07                 |
| E132       | 4-80              | 0,9992                 | 0,05            | 0,15                 |
| E133       | 1-20              | 1,0000                 | 0,03            | 0,09                 |

Granica detekcije, odnosno granica kvantifikacije određena je kao koncentracija koja daje odnos signal/šum (S/N) od 3, odnosno 10. Može se primetiti da HPLC metoda za određivanje veštačkih boja daje značajno niže vrednosti LOD i LOQ u poređenju sa TLC tehnikom. Međutim, TLC vrednosti se slažu sa onima dobijenim u sličnim studijama <sup>[79]</sup>, što potvrđuje da je metoda pogodna za detekciju i kvantifikaciju određenih boja u relativno malim koncentracijama (2-20 ppm).

Preciznost je određena kao ponovljivost unutar dana i između dana (intra-dnevna i inter-dnevna varijabilnost) na tri nivoa koncentracije. Rezultati eksperimenata su izraženi u obliku relativnih standardnih devijacija, % RSD i prikazani su u Tabeli 11.

Tačnost je određena primenom metode standardnog dodatka. Količine standarda su dodate na tri nivoa koncentracije i određene. „Rikaveri” se izračunava kao odnos nađene i dodate količine, izražen u procentima, a rezultati su dati u Tabeli 12.

Tabela 11. Parametri preciznosti HPTLC metode za određivanje veštačkih boja za namirnice

| Jedinjenje | (ng/zona) | Intra-dnevna |       | Inter-dnevna |       |
|------------|-----------|--------------|-------|--------------|-------|
|            |           | (ng/zona)    | % RSD | (ng/zona)    | % RSD |
| E102       | 126       | 129,4        | 1,59  | 123,7        | 3,10  |
|            | 63        | 70,4         | 5,13  | 66,1         | 8,75  |
|            | 22        | 28,6         | 7,993 | 26,0         | 11,29 |
| E104       | 126       | 133,3        | 1,48  | 130,6        | 4,75  |
|            | 63        | 70,1         | 4,67  | 63,6         | 8,02  |
|            | 22        | 28,9         | 15,22 | 26,1         | 17,92 |
| E110       | 126       | 130,5        | 1,91  | 127,9        | 2,37  |
|            | 63        | 67,4         | 2,45  | 63,6         | 4,70  |
|            | 22        | 25,4         | 10,44 | 24,5         | 8,75  |
| E122       | 126       | 123,9        | 1,59  | 125,9        | 2,79  |
|            | 63        | 68,4         | 2,71  | 66,0         | 2,87  |
|            | 22        | 23,6         | 4,17  | 24,0         | 4,92  |
| E123       | 126       | 126,0        | 0,91  | 119,1        | 3,65  |
|            | 63        | 64,9         | 3,69  | 59,1         | 9,81  |
|            | 22        | 23,8         | 8,87  | 27,1         | 13,64 |
| E124       | 126       | 132,8        | 1,05  | 128,1        | 2,19  |
|            | 63        | 70,3         | 2,23  | 65,0         | 3,68  |
|            | 22        | 29,0         | 8,68  | 26,0         | 9,18  |
| E129       | 126       | 105,079      | 1,31  | 129,7        | 2,09  |
|            | 63        | 132,4        | 2,16  | 64,1         | 4,01  |
|            | 22        | 66,7         | 6,93  | 24,3         | 8,23  |
| E131       | 126       | 110,7        | 8,00  | 112,6        | 8,94  |
|            | 63        | 66,7         | 2,48  | 65,0         | 4,82  |
|            | 22        | 24,6         | 2,40  | 24,8         | 3,66  |
| E132       | 210       | 180,5        | 1,79  | 187,5        | 4,29  |
|            | 105       | 88,5         | 5,18  | 91,8         | 10,45 |
|            | 36        | 36,9         | 7,41  | 39,8         | 10,05 |
| E133       | 210       | 201          | 0,49  | 198,9        | 4,56  |
|            | 105       | 112          | 2,01  | 109,9        | 3,67  |
|            | 36        | 40,4         | 2,37  | 40,6         | 5,13  |



Tabela 12. Parametri tačnosti HPTLC metode za određivanje veštačkih boja za životne namirnice

| <b>Jedinjenje</b> | <b>Dodata količina<br/>ng/zona</b> | <b>Rikaveri (%)</b> |
|-------------------|------------------------------------|---------------------|
| E102              | 126,0                              | 96,19               |
|                   | 63,0                               | 107,10              |
|                   | 22,0                               | 105,71              |
| E104              | 126,0                              | 108,12              |
|                   | 63,0                               | 102,19              |
|                   | 22,0                               | 102,09              |
| E110              | 126,0                              | 102,73              |
|                   | 63,0                               | 102,99              |
|                   | 22,0                               | 104,32              |
| E122              | 126,0                              | 105,00              |
|                   | 63,0                               | 104,66              |
|                   | 22,0                               | 107,38              |
| E123              | 126,0                              | 81,45               |
|                   | 63,0                               | 108,28              |
|                   | 22,0                               | 110,41              |
| E124              | 126,0                              | 104,04              |
|                   | 63,0                               | 103,84              |
|                   | 22,0                               | 108,96              |
| E129              | 126,0                              | 104,79              |
|                   | 63,0                               | 103,59              |
|                   | 22,0                               | 106,16              |
| E131              | 126,0                              | 94,88               |
|                   | 63,0                               | 107,78              |
|                   | 22,0                               | 120,87              |
| E132              | 210                                | 87,93               |
|                   | 105                                | 84,73               |
|                   | 36                                 | 82,14               |
| E133              | 210                                | 93,79               |
|                   | 105                                | 108,68              |
|                   | 36                                 | 105,45              |

Rezultati ukazuju na to da TLC metoda zadovoljava kriterijume tačnosti u celom radnom opsegu kalibracije.

#### 4.4. Razvoj i validacija metode za određivanje amigdalina

Druga metoda razvijena u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na kvantitativno određivanje amigdalina (D-mandelonitril-b-D-gentiobiozid, D-mandelonitril-b-D-glukozid-6-b-glukozid) metodom tankoslojne hromatografije [80]. Amigdalina je jedan od nitrilozida koji se nalazi u košticama voća (kajsije, breskve, kruške, jabuke, šljive, badema itd.) i daje karakterističan gorak ukus badema [81-84].

Ovaj molekul se sastoji od dva molekula glukoze, jednog molekula benzaldehida i jednog molekula cijanidne kiseline, i hidrolizom, katalizovanom enzimom *b*-glukozidazom (emulzinom) se razlaže na ova jedinjenja. Koštice voća takođe su bogate ovim enzimom [81, 85].

Amigdalina je postao popularan kao potencijalni lek za kancer, i pored toga što nema naučnih dokaza da podrže ove pretpostavke, interesovanje za amigdalina kao deo terapije raste, a negde se ovaj molekul navodi i kao vitamin B17. Kako interesovanje za ovaj molekul raste, a sa druge strane njegovom hidrolizom može nastati HCN, javila se potreba za odgovarajućom metodom za efikasno i jednostavno kvantitativno određivanje amigdalina u prirodnim proizvodima, pre svega košticama voća. U većini radova koji se time bave za kvantitativno određivanje amigdalina koristi se HPLC metoda na C18 koloni, sa smešom ACN/voda različitih odnosa kao mobilnom fazom, a za detekciju se koriste DA (diode array) ili UV detektor [82, 86-91].

U okviru ovog istraživanja razvijena je nova metoda za analizu amigdalina zasnovana na RP HPTLC. Cilj je bio da se razvije jednostavna, precizna, tačna i ekonomična metoda. Izabrali smo HPTLC tehniku jer je jeftina, jednostavna i osetljiva, i danas se može automatizovati, pri čemu je instrumentacija jednostavna i laka za rukovanje.

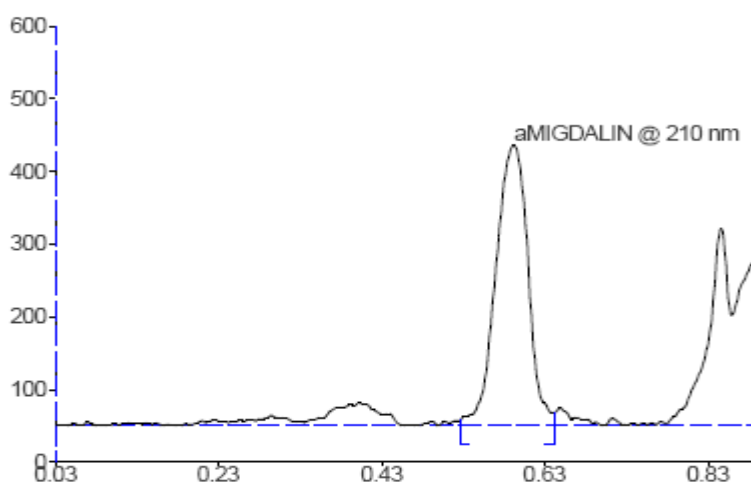
Što se ekstrakcije amigdalina iz koštica voća tiče, ekstrakcija po Soksletu je najčešće korišćena tehnika [86, 89]. Pored jednostavnosti i efikasnosti Soksletove ekstrakcije, postoje i neki nedostaci, kao što su dugo vreme ekstrakcije, nedostatak automatizacije i velika količina rastvarača koji se koristi po uzorku. Poslednjih godina

uvedene su nove tehnike ekstrakcije kako bi se smanjila potrebna količina rastvarača i vreme rada, poboljšala preciznost analize i smanjili troškovi pripreme uzorka. U ovom radu je primenjena alternativa ekstrakciji po Sokslet-u, ubrzana ekstrakcija rastvarača (Accelerated Solvent Extraction, ASE). ASE je relativno skoro predstavljena kao veoma moćna tehnika za pripremu uzoraka pre njihovog instrumentalnog određivanja. ASE je razvijen kao novi postupak ekstrakcije koji koristi organske rastvarače pri visokim pritiscima i temperaturama, iznad tačaka ključanja ekstrakcionih rastvarača, da ubrza proces ekstrakcije <sup>[92]</sup>. Prethodno su sprovedena komparativna istraživanja i ustanovljeno je da je ASE sasvim pogodna za kvantitativnu ekstrakciju. Iako je u istim slučajevima najveća efikasnost postignuta Soksletovom ekstrakcijom, ASE pokazuje bolju reproduktivnost, mnogo je brža i smanjuje potrošnju rastvarača, pa se čini da predstavlja obećavajuću alternativu klasičnim metodama ekstrakcije <sup>[93]</sup>. U poređenju sa Soksletovom ekstrakcijom koja obično traje satima, ASE metoda smanjuje vreme ekstrakcije na manje od 30 min po uzorku i smanjuje količinu rastvarača i time ukupne troškove analize. Takođe, količina nastalog otpada se minimizira izvođenjem postupka ekstrakcije na povišenoj temperaturi i pritisku, što je u skladu sa principima „zelene hemije“.

#### **4.4.1. Razvoj metode**

Optimizacija hromatografskih uslova je delimično zasnovana na našem dosadašnjem radu, ali u cilju pronalaženja odgovarajućeg i jednostavnog hromatografskog sistema, u slučaju amigdalina ispitano je nekoliko smeša rastvarača koje sadrže acetonitril ili metanol i vodu u različitim proporcijama (10-50% v/v u porcijama od 10% v/v) i dva adsorbenta (RP-18 i CN-modifikovani silika-gel).

Dobijeni rezultati pokazuju da CN-modifikovani silika-gel nije pogodna stacionarna faza zbog razvlačenja pikova, bez obzira na sastav mobilne faze. Na RP-18 pločama mobilna faza ACN/voda daje bolje rezultate od onih dobijenih sa smešom metanol/voda, tako da smo izabrali smešu rastvarača koja se sastoji od acetonitrila i vode (50:50, v/v) jer obezbeđuje dobro razdvojene kompaktne zone i oštre i dobro definisane pikove (Slika 26).



Slika 26. Densitogram amigdalina

Nakon određivanja optimalnih uslova ekstrakcije (temperatura 110 °C, masa uzorka 2,5 g, 3 ciklusa ekstrakcije, 10 minuta svaki) primenom eksperimentalnog dizajna (Tabela 13) svi uzorci koštica su pripremljeni pod istim uslovima i analizirani pomoću HPTLC metode (kao što je opisano u Eksperimentalnom delu, poglavlje 3.4.1).

Koristili smo koštice kajsije, šljive, badema i breskve.

Tabela. 13. Rezultati eksperimentalnog dizajna za optimizaciju ekstrakcionog postupka

| Temperatura (°C) | Broj ciklusa | Trajanje jednog ciklusa (min) | Masa uzorka (g) | Koncentracija amigdalina (µg/g) |
|------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| 70               | 1            | 10                            | 2,5             | 666,55                          |
| 70               | 3            | 2                             | 2,5             | 610                             |
| 70               | 1            | 2                             | 0,5             | 423,15                          |
| 70               | 3            | 10                            | 0,5             | 614,78                          |
| 90               | 2            | 6                             | 1,5             | 827,7                           |
| 90               | 2            | 6                             | 1,5             | 806,8                           |
| 110              | 1            | 10                            | 0,5             | 534,33                          |
| 110              | 3            | 2                             | 0,5             | 754,43                          |
| 110              | 1            | 2                             | 2,5             | 875,41                          |
| 110              | 3            | 10                            | 2,5             | 1114,87                         |

#### 4.4.2. Rezultati validacije

Validacija metode je izvršena u odnosu na parametre opisane u poglavlju 4.3.2. Kalibracija je izvršena nanošenjem 2 ml standardnih rastvora na pločicu da bi se dobio sledeći opseg: 2,5-50 µg/traka u slučaju amigdalina. Poređene su  $R_F$  vrednosti standarda i amigdalina ekstrahovanog iz uzorka.

Opseg kalibracije, linearnost, vrednosti granica detekcije i kvantifikacije i prateća statistike sumirani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Parametri validacije HPTLC metode za određivanje amigdalina

| <b>Opseg linearnosti (µg/zona)</b> | <b>Koeficijent korelacije</b> | <b>Limit detekcije (µg/zona za)</b> | <b>Limit kvantifikacije (µg/zona)</b> |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 2,5-50,0                           | 0,9984                        | 1,28                                | 4,28                                  |

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, preciznost je određena kao ponovljivost unutar dana i između dana (intra-dnevna i inter-dnevna varijabilnost) na tri nivoa koncentracije, a tačnost je određena primenom metode standardnog dodatka. Količine standarda su dodate na tri nivoa koncentracije i određene.

Parametri preciznosti su izraženi u obliku relativnih standardnih devijacija, % RSD i prikazani su u Tabeli 15, parametri tačnosti kao odnos nađene i dodate količine, izražen u procentima, a rezultati su dati u Tabeli 16.

Tabela 15. Parametri preciznosti metode HPTLC metode za određivanje amigdalina

| <b>Količina (µg/zona)</b> | <b>Intra-dnevna</b>       |              | <b>Inter-dnevna</b>       |              |
|---------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
|                           | <b>Količina (µg/zona)</b> | <b>% RSD</b> | <b>Količina (µg/zona)</b> | <b>% RSD</b> |
| 40                        | 39,610                    | 1,149        | 39,728                    | 1,322        |
| 20                        | 20,067                    | 1,089        | 20,689                    | 1,755        |
| 10                        | 9,971                     | 0,812        | 10,366                    | 1,888        |

Tabela 16. Parametri tačnosti metode HPTLC metode za određivanje amigdalina

| <b>Dodata količina<br/>(<math>\mu\text{g}/\text{zona}</math>)</b> | <b>Rikaveri (%)</b> |
|---|---------------------|
| 40  | 100,04              |
| 20  | 99,975              |
| 10  | 100,56              |

Na kraju, da bismo proverili validovanu metodu, primenili smo je za određivanje sadržaja amigdalina u dvanaest uzoraka koštica voća. U cilju određivanja sadržaja amigdalina u uzorcima, koštice su fino samlevene, homogenizovane i ekstrahovane metanolom, kao što je opisano u Eksperimentalnom delu. Dobijeni rastvori su naneti na HPTLC ploču, hromatogrami su razvijeni i skenirani.

Utvrđeno je da je koncentracija amigdalina u uzorcima između 0,9988-5,3881 g/100g. Najviše vrednosti su nađene u uzorcima koštica kajsija, a najniže u uzorcima badema. Dobijeni rezultati su dati u Tabeli 17.

Tabela 17. Sadržaj amigdalina u uzorcima koštica voća

| <b>Uzorak</b>                 | <b>Sadržaj amigdalina (g/100g)</b> |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Kajsija 1 (Bela di imola)     | 4,5444                             |
| Kajsija 2 (Palumela)          | 5,3881                             |
| Kajsija 3 (Agat)              | 4,5851                             |
| Breskva 1 (Flaminia spadoni)  | 2,8530                             |
| Breskva 2 (Flaminia otomglo)  | 2,7129                             |
| Breskva 3 (Flaminia samerset) | 2,8597                             |
| Šljiva 1 (Lepotica dz)        | 3,9941                             |
| Šljiva 2 (Stenli)             | 2,6743                             |
| Šljiva 3 (Lepotica st, jul)   | 4,0831                             |
| Badem 1                       | 1,0802                             |
| Badem 2                       | 0,9988                             |
| Badem 3                       | 1,0092                             |

## ZAKLJUČAK

## 5. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije proučavan je retencioni mehanizam u HILIC uslovima ispitivanjem hromatografskog ponašanja različitih malih polarnih jedinjenja, kroz analizu uticaja hromatografskih uslova na njihovu retenciju. Pokazano je da je relativni doprinos particije i adsorpcije retenciji analita povezan sa prirodom stacionarne faze, osobinama odvajanih komponenti, kao i sastavom mobilne faze. Sastav binarnih smeša vode i organskog rastvarača u HILIC uslovima određuje prirodu i jačinu specifičnih interakcija kao što su vodonično vezivanje ili jonska izmena, između analiziranih jedinjenja i površine stacionarne faze, tj. određuje relativni doprinos particije ili adsorpcije retenciji. Mehanizam odvajanja je kompleksan i zasniva se na kombinaciji različitih interakcija koje se ostvaruju između odvajanih supstanci i stacionarne faze, i/ili između odvajanih supstanci i slabo vezane vode na površini stacionarne faze. Koji će mehanizam biti dominantan zavisi od prirode ispitivanih jedinjenja, prirode, odnosno adsorpcionih karakteristika upotrebene stacionarne faze, kao i sadržaja vode u upotrebnoj mobilnoj fazi.

Sistematskim ispitivanjem hromatografskog ponašanja serije arenskih Ru(II) kompleksa i odabranih anestetika tvrđeno je da:

Povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi dovodi do promene mehanizma odvajanja, odnosno obrtanja retencionog redosleda ispitivanih jedinjenja. Naime, sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi retencija prvo opada, što je i očekivano za HILIC razdvajanja, a zatim raste, što je tipično za reverzno-faznu hromatografiju. Može se pretpostaviti da se sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi, mehanizam odvajanja menja od adsorpcije do particije, a retencione krive imaju karakterističan U oblik.

Prelaz između adsorpcionog i particionog mehanizma je kontinualan, a sastav mobilne faze pri kojem dolazi do konverzije zavisi od stepena hidratacije stacionarne faze, kao i od prirode organske komponente mobilne faze.



Silika-gel se može smatrati najpogodnijom stacionarnom fazom za odvajanje i sistematsko praćenje hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja u HILIC uslovima jer se može upotrebiti u najširem opsegu sastava mobilne faze za sva ispitivana jedinjenja.

Na polarnijem aluminijum oksidu minimum U retencione krive pomera se ka višim koncentracijama vode u mobilnoj fazi, omogućavajući upotrebu mobilnih faza sa višim sadržajem vode u HILIC uslovima što je od posebne važnosti za analizu izrazito hidrofilnih supstanci.

Acetonitril je najpogodniji rastvarač u HILIC odvajanjima, verovatno zbog toga što pokazuje različitu selektivnost u odnosu na vodu, i u većini slučajeva se njegova zamena nekim drugim rastvaračem pokazala manje uspešnom. Zamena acetonitrila kao organske komponente mobilne faze nekim rastvaračem koji ima sposobnost građenja vodoničnih veza dovodi do narušavanja formiranja adsorpcionog semi-stacionarnog vodenog sloja i manje selektivnosti razdvajanja.

Sistem ACN/voda na silika-gelu se pokazao kao pogodan za hromatografsku karakterizaciju ispitivanih kompleksa, jer se može primeniti u širokom opsegu sastava mobilnih faza, i u HILIC i u RP uslovima.

Odvajanje naelektrisanih komponenti u HILIC uslovima se može poboljšati dodatkom soli.

HILIC predstavlja interesantnu alternativu za odvajanja onih jedinjenja koja se teško odvajaju primenom klasične NP ili RP hromatografije i ima veliki potencijal za primenu u različitim odvajanjima, između ostalog i za određivanje lipofilnosti. Ovo je posebno važno zbog određivanja lipofilnosti biološki aktivnih kompleksnih jedinjenja za koje je jednako teško eksperimentalno odrediti i pouzdano kompjuterski izračunati parametre lipofilnosti.

U okviru ove doktorske disertacije predložena je nova metoda za ekstrakciju (ASE) i određivanje (HPTLC) amigdalina u uzorcima koštica voća. Razvijena i predložena HPTLC metoda može se koristiti za kvantitativno određivanje amigdalina iz različitih uzoraka. Takođe, predložena je nova HPTLC metoda za kvantitativno određivanje deset najčešće korišćenih sintetičkih boja za životne namirnice. Obe metode su jednostavne, brze i ekonomične u poređenju sa drugim analitičkim tehnikama, i njihova prednost u odnosu na HPLC se ogleda u tome što su jednostavnije, jeftinije, fleksibilnije i potrošnja organskih rastvarača je manja i vreme analize kraće. Obe metode su validovane a statistička analiza njihovih performansi dokazuje da je HPTLC metoda specifična, precizna i ponovljiva, tako da se može reći da se amigdalin može odrediti pomoću HPTLC jednako efikasno i pouzdano kao i pomoću HPLC. Iako se je HPLC tehnika pokazala kao preciznija u slučaju veštačkih boja, obezbeđujući značajno niže vrednosti granica detekcije i kvantifikacije, HPTLC metoda se i u ovom slučaju jasno pokazala kao superiornija ako se uzme u obzir njena niska cena, mala potrošnja rastvarača i mogućnost istovremene analize nekoliko uzoraka čime se skraćuje vreme analize. Upotreba malih količina organskih rastvarača i zamena toksičnih rastvarača ekološki prihvatljivijim, podržava primenu principa zelene analitičke hemije.

# LITERATURA

## 6. Literatura

1. V. R. Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography; Wiley, 2004.
2. A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas; „A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds“, Journal of Chromatography A 1218 (2011) 2871-2879
3. B. Dejaegher, D. Mangelings, Y. V. Heyden; „Method development for HILIC assays“, Journal of Separation Science 31 (2008) 1438-1448
4. Z. Jiang, N. W. Smith, P. D. Ferguson and M. R. Taylor, „Hydrophilic Interaction Chromatography Using Methacrylate-Based Monolithic Capillary Column for the Separation of Polar Analytes“, Analytical Chemistry 79 (2007) 1243-1250
5. A. dos Santos Pereira, F. David, G. Vanhoenacker, P. Sandra; „The acetonitrile shortage: Is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes?“; Journal of Separation Science 32 (2009) 2001-2007
6. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch; „Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum“, Journal of Chromatography A 1058 (2004) 197-201
7. P. Jandera; „Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts“, Journal of Separation Science 31 (2008) 1421-1437
8. A. J. Alpert; „Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds“, Journal of Chromatography A 499 (1990) 177-196
9. P. Hemstrom, K. Irgum; „Hydrophilic interaction chromatography“, Journal of Separation Science 29 (2006) 1784-1821
10. J. C. Linden, C. L. Lawhead; „Liquid chromatography of saccharides“, Journal of Chromatography A 105 (1975) 125-133
11. J. Palmer; „A Versatile System For Sugar Analysis Via Liquid Chromatography“, Analytical Letters 8(3) (1975) 215-224

12. K. Spagou, I. D. Wilson, P. Masson, G. Theodoridis, N. Raikos, M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon, R. S. Plumb, J. K. Nicholson, and E. J. Want; „HILIC-UPLC-MS for Exploratory Urinary Metabolic Profiling in Toxicological Studies”; *Analytical Chemistry* 83 (2011) 382-39
13. B. Buszevski, S. Noga; „Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 402(1) (2012) 231-247
14. H. Schlichtherle-Cerny, M. Affolter, and C. Cerny; „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis”; *Analytical Chemistry* 75 (2003) 2349-2354
15. F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon; „Comparison of the adsorption mechanisms of pyridine in hydrophilic interaction chromatography and in reversed-phase aqueous liquid chromatography”; *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 8496-8504
16. D. V. McCalley; „Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography”; *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3408-3417
17. Ngoc Phuoc Dinh, T. Jonsson, K. Irgum; “Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography”; *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5880-5891
18. S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski; „Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods”; *Journal of Chromatography A* 1278 (2013) 89-97
19. H. Vlckova, K. Jezkova, K. Stetkova, H. Tomsikova, P. Solich, L. Novakova; „Study of 513 the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases 514 used in hydrophilic interaction liquid chromatography”; *Journal of Separation Science* 37 (2014) 1297-1307
20. E. Tyteca, D. Guillarme, G. Desmet; „Use of individual retention modeling for gradient optimization in hydrophilic interaction chromatography: Separation of nucleobases and nucleosides”; *Journal of Chromatography A* 1368 (2014) 125-131

21. E. Tyteca, A. Periat, S. Rudaz, G. Desmet, D. Guillarme; „Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides”; *Journal of Chromatography A* 1337 (2014) 116-127
22. P. Cesla, N. Vankova, J. Krenkova, J. Fischer; „Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides”; *Journal of Chromatography A* 1438 (2016) 179-188
23. B. W. J. Pirok, S. R. A. Molenaar, R. E. van Outersterp, P. J. Schoenmakers; „Applicability of retention modelling in hydrophilic-interaction liquid chromatography for algorithmic optimization programs with gradient-scanning techniques”; *Journal of Chromatography A* 1530 (2017) 104-111
24. D. V. McCalley; „Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography”; *Journal of Chromatography A*, 1483 (2017) 71-79
25. D. V. McCalley; „Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography”; *Journal of Chromatography A*, 1523 (2017) 49-71
26. P. Jandera, P. Janas, „Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review”; *Analytica Chimica Acta* 967 (2017) 12-32
27. P. Jandera, P. Janas, V. Skerikova, J. Urban; „Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography”; *Journal of Separation Science* 40 (2017) 1434-1448
28. P. Jandera, T. Hajek; „Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review”; *Journal of Separation Science* 41 (2018) 145-162
29. G. Milovanovic, *Hromatografske metode odvajanja*, Univerzitet u Beogradu, 1985.
30. J. Sherma, B. Fried, *Handbook of Thin-layer chromatography*, 2nd Edition, Marcel Dekker, NY, 1996.

31. H. J. Issaq; „Recent Developments in Thin-Layer Chromatography – II”; *Journal of Liquid Chromatography and related technologies*. 4, 6 (2006) 955-975
32. R. M. Scott; „The Stationary Phase in Thin Layer Chromatography”; *Journal of Liquid Chromatography and related technologies*. 4, 12 (2006) 2147-2174
33. J. Sherma; *Sample Preparation for Thin Layer Chromatography*. Encyclopedia of Chromatography 2007.
34. L. Cai; *Thin Layer Chromatography. Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 6.3.1–6.3.18; 2014.
35. A. Bele and A. Khale; „An overview on thin layer chromatography”; *International journal of pharmaceutical sciences and research, IJPSR*, 2(2) (2011) 256-267
36. D. Milojković-Opsenica; „Sorbenti u hromatografiji na tankom sloju”; *Hemijski preglad* 41,2 (2000) 38-43
37. G. Greco and T. Letzel; „Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations”; *Journal of Chromatographic Science* 51 (2013) 684-693
38. P. Jandera, „Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review”; *Analytica Chimica Acta* 692 (2011) 1-25
39. Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamotoa, N. Tanakaa; „Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency”; *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5903-5919
40. W. Bicker, J. Y. Wua, H. Yemanc, K. Albertc, W. Lindner; „A study on mixed-mode retention mechanisms and the pivotal role of solute-silanol interactions in the hydrophilic interaction chromatography elution mode”; *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 882-895.
41. Y. Guo and S. Gaiki; „Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography” *Journal of Chromatography A*; 1218 (2011) 5920-5938
42. L. Qiao, X. Shi, G. Xu; „Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography”; *Trends in Analytical Chemistry* 81 (2016) 23-33

43. M. R. Gama, R. G. da Costa Silva, C. H. Collins, C. B.G. Bottoli „Hydrophilic interaction chromatography”; Trends in Analytical Chemistry 37 (2012) 48-60
44. Z. Hao, B. Xiao, N. Weng; „Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)”; Journal of Separation Science 31 (2008) 1449-1464
45. M. Liu, J. Ostovic, E. Chen, N. Cauchon; „Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent”; Journal of Chromatography A 1216 (12) (2009) 2362-2370
46. P. Orth, H. Engelhardt; „Separation of sugars on chemically modified silica gel”; Chromatographia 15 (1982) 91-96
47. P. Jandera, T. Hajek, V. Skerikova, J. Soukup; „Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column”; Journal of Separation Science 33(6-7) (2010) 841-52
48. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanovic, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, V. B. Arion, B. K. Keppler and Ž. LJ. Tešić; „Ruthenium(II)-arene complexes with functionalized pyridines: synthesis, characterization and cytotoxic activity”; European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 3 (2010) 1051-1058
49. I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, Ž. LJ. Tešić and B. K. Keppler; „X-ray structure and cytotoxic activity of a picolinate ruthenium(II)-arene complex”; Journal of the Serbian Chemical Society 76, 1 (2011) 53-61
50. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J.



Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford, Conn, USA, 2009.

51. H. Jork, W. Funk, W. R. Fischer, H. Wimmer, Thin-Layer Chromatography, Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection, VCH, 1994.

52. A. Radoičić, H. Majstorović, T. Sabo, Ž. Tešić, and D. Milojković-Opsenica; „Hydrophilic-Interaction Planar Chromatography of Some Water-Soluble Co(III) Complexes on Different Adsorbents“; Journal of Planar Chromatography 22 (2009) 4, 249-253

53. K. S. A. M. Shweshein, A. Radoičić, F. Andrić, Ž. Tešić, and D. Milojković-Opsenica; “Hydrophilic interaction planar chromatography of geometrical isomers of selected Co(III) complexes” Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies; 35, 10 (2012) 1289-1297

54. A. Radoičić; Planarna hromatografija hidrofилnih interakcija u vodi rastvornih kompleksa Co(III), Magistarski rad, 2010.

55. D. Milojkovic-Opsenica, H. Majstorovic, A. Radoicic, Ž. Tesic, „3-Cyanopropylsiloxane-bonded silica gel: Characteristics and applications in thin-layer chromatography“; JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 28, 2 (2015) 106-114

56. E. L. Weiser, A. W. Sallota, S. M. Flach, L. R. Snyder; „Basis of retention in normal-phase high-performance liquid chromatography with cyano-propyl columns“; Journal of Chromatography A 303 (1984) 1-12

57. H. Nikolić, Proučavanje mehanizma hromatografskog odvajanja supstanci na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela, Magistarski rad, 2003.

58. L. S. Foteeva, D. A. Trofimov, O. V. Kuznetsova, C. R. Kowol, V. B. Arion, B. K. Keppler, A. R. Timerbaev, „A quantitative structure-activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography“; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55 (2011) 409-413

59. K. S. A. M. Shweshein, F. Andrić, A. Radoičić, Matija Zlatar, M. Gruden-Pavlović, Ž. Tešić, and D. Milojković-Opsenica; „Lipophilicity assessment of

ruthenium (II)-arene complexes by the means of reversed-phase thin-layer chromatography and DFT calculations”; Scientific World Journal (2014) Article ID 862796

60. E. Rutkowska, K. Pajk and K. Jewiak; „Lipophilicity-methods of determination and its role in medicinal chemistry”; Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 70 (2013) 3-18

61. Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, TLC determination of drug lipophilicity In: Thin layer chromatography in drug analysis, L. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma (Editors), Taylor and Frensis Group, (2013) ISBN 9781466507159, 225-246

62. A. Martinez, C. S. K. Rajapakse, D. Jalloh, C. Dautriche, and R. A. Sanchez-Delgado, “The antimalarial activity of Ruchloroquine complexes against resistant Plasmodium falciparum is related to lipophilicity, basicity, and heme aggregation inhibition ability near water/n-octanol interfaces,” Journal of Biological Inorganic Chemistry 14 (6) (2009) 863-871

63. A. Koehler, R. Oertel, W. Kirch; „Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”; Journal of Chromatography A 1088 (2005) 126-130

64. S. H. Haidar, Z. Liang, K. Selinger, L. W. Hamlett, N. D. Eddington; „Determination of remifentanil, an ultra-short-acting opioid anesthetic, in rat blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection”; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 14 (1996) 1727-1732

65. M. Baniceru, C. V. Manda, S. M. Popescu; „Chromatographic analysis of local anesthetics in biological samples”; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 54 (2011) 1-12

66. A. J. Alpert; „Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography”; Journal of Chromatography A 1538 (2018) 45-53

67. Y. Guo and S. Gaiki; „Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography“; Journal of Chromatography A 1074 (2005) 71-80

68. V. Voicu, C. Sarbu, F. Tache, F. Micale, S. F. Radulescu, K. Sakurada, H. Ohta, A. Medvedovici; „Lipophilicity indices derived from the liquid chromatographic behavior observed under bimodal retention conditions (reversed phase/hydrophilic interaction): Application to a representative set of pyridinium oximes”; *Talanta*, 122 (2014) 172-179
69. J. Vlajković, F. Andrić, P. Ristivojević, A. Radoičić, Ž. Tešić & D. Milojković-Opsenica; „Development and validation of a tlc method for the analysis of synthetic food-stuff dyes”; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (JLC&RT)*, 36 (2013) 17, 2476-2488
70. K. Minioti, C. Sakellariou, N. Thomaidis; „Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector”; *Analytica Chimica Acta* 583 (2007)103-110
71. C. Socaciu, „Food Colorants: Chemical and Functional Properties” CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, NY, 2008.
72. F. Delgado-Vargas, O. Paredes-Lopez, „Colorants for food and nutraceutical uses” CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, NY, 2003.
73. D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok, L. Porteous, E. Prince, E. Sonuga-Barke, J. Warner, J. Stevenson, „Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial”; *The Lancet*, 370 (2007) 1560-1567
74. B. Weiss, „Synthetic Food Colors and Neurobehavioral Hazards: The View from Environmental Health Research”; *Environmental Health Perspectives* 120(1) (2012) 1-5
75. N. Yoshioka, K Ichihashi, „Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection”; *Talanta* 74 (2008) 1408-1413
76. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, November 2005.

77. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA 1998.
78. Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities, 2002.
79. G. Morlock, C. Oellig, „Rapid planar chromatographic analysis of 25 water-soluble dyes used as food additives”; *Journal of AOAC International* 92(3) (2009) 745-756
80. A. Radoičić, R. Petronijević, F. Andrić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica; „Development and validation of high-performance thin-layer chromatographic method for determination of amygdalin”; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* vol. 40 (2017) 297-303
81. M. K Abdel-Rahman; „Can apricot kernels fatty acids delay the atrophied hepatocytes from progression to fibrosis in dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver injury in rats?”; *Lipids in Health and Disease* 10 (2011) 114
82. V. M. Ghiulai, C. Socaciu, I. Jianu, F. Ranga, F. Fetea, „Identification and quantitative evaluation of amygdalin from apricot, plum and peach oils and kernels”; *Buletin USAMV-CN*, 62 (2006) 246-253
83. L. Yu, H. Ye, L. Zheng, L. Chen, K. Chu, X. Liu, X. Xu, G. Chen, „Determination of the epimerization rate constant of amygdalin by microemulsion electrokinetic chromatography”; *Electrophoresis* 218, 32 (2011) 218-222
84. H. K. Chang, M. S. Shin, H. Y. Yang, J. W. Lee, Y. S. Kim, M. H. Lee, J. Kim, K. H. Kim and C. J. Kim; „Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells”; *Biol. Pharm. Bull.* 29(8) (2006) 1597-1602
85. D. R. Haisman and D. J. Knight; „The enzymic hydrolysis of amygdalin”; *Biochemical Journal* 103 (1967) 528-534
86. F. A. Yildirim<sup>1</sup> and M. A. Askin; „Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey”; *African Journal of Biotechnology* 9(39) (2010) 6522-6524

87. H. J. Kwon, J. S. Jeong, Y. M. Lee, S. P. Hong; „A reversed-phase high-performance liquid chromatography method with pulsed amperometric detection for the determination of glycosides” *Journal of Chromatography A*, 1185 (2008) 251-257
88. J. Yan, S. Tong, and J. Li, „Preparative Isolation and Purification of Amygdalin from *Prunus armeniaca* with High Recovery by High-Speed Countercurrent Chromatography”; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (2006) 1271-1279
89. E. Gomez, L. Burgos, C. Soriano and J. Marn; „Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (1998) 184-186
90. Q. Lv, L. Z. Yi, H. Y. Yi and Y. Z. Liang; „Chromatographic fingerprint of *Semen Armeniacae Amarae* based on high-performance liquid chromatogram and chmometric methods”; *Analytical Methods* 4 (2012) 299-308
91. I. Savić, V. Nikolić, I. Savić, Lj. Nikolić and M. Stanković, „Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of plum kernel”; *Research Journal of Chemistry and Environment* 16 (4) (2012) 80-86
92. A. Spirić, D. Trbović, D. Vranić, J. Đinović, R. Petronijević, V. Matekalo-Sverak; Statistical evaluation of fatty acid profile and cholesterol content in fish (common carp) lipids obtained by different sample preparation procedures”; *Analytica Chimica Acta* 672 (2010) 66-71
93. J. Shen, X. Shao, „A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco”; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383 (2005) 1003-1008

## **PRILOG**

## 7. Prilog

Tabela P1.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema metanol/voda na silika-gelu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1     | 0,76       | 0,82 | 0,86 | 0,91 | 0,94 | 0,95 | 0,93 | 0,87 | 0,78 | 0,70 | 0,76 |
| 2     | 0,80       | 0,82 | 0,86 | 0,91 | 0,93 | 0,96 | 0,92 | 0,88 | 0,79 | 0,71 | 0,80 |
| 3     | 0,90       | 0,91 | 0,94 | 0,96 | 0,97 | 0,98 | 0,95 | 0,93 | 0,79 | 0,50 | 0,90 |
| 4     | 0,82       | 0,85 | 0,88 | 0,91 | 0,92 | 0,94 | 0,90 | 0,85 | 0,78 | 0,72 | 0,82 |
| 5     | 0,74       | 0,76 | 0,81 | 0,84 | 0,85 | 0,86 | 0,80 | 0,76 | 0,67 | 0,64 | 0,74 |
| 6     | 0,67       | 0,79 | 0,84 | 0,88 | 0,90 | 0,92 | 0,89 | 0,85 | 0,79 | 0,68 | 0,67 |
| 7     | 0,69       | 0,76 | 0,86 | 0,87 | 0,89 | 0,93 | 0,88 | 0,83 | 0,72 | 0,70 | 0,69 |
| 8     | 0,58       | 0,78 | 0,86 | 0,88 | 0,89 | 0,93 | 0,88 | 0,83 | 0,72 | 0,66 | 0,58 |
| 9     | 0,58       | 0,73 | 0,80 | 0,83 | 0,87 | 0,93 | 0,92 | 0,90 | 0,79 | 0,63 | 0,58 |

Tabela P2.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema aceton/voda na silika-gelu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0          | 0,15 | 0,63 | 0,89 | 0,9  | 0,95 | 0,99 | 0,97 | 0,93 | 0,89 |     |
| 2     | 0          | 0,21 | 0,74 | 0,91 | 0,93 | 0,95 | 0,96 | 0,95 | 0,93 | 0,9  |     |
| 3     | 0          | 0,74 | 0,83 | 0,91 | 0,93 | 0,95 | 0,99 | 0,95 | 0,94 | 0,93 |     |
| 4     | 0          | 0,85 | 0,87 | 0,91 | 0,92 | 0,94 | 0,97 | 0,91 | 0,85 | 0,78 |     |
| 5     | 0          | 0,74 | 0,8  | 0,83 | 0,85 | 0,88 | 0,89 | 0,82 | 0,75 | 0,74 |     |
| 6     | 0          | 0,86 | 0,93 | 0,95 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,88 | 0,76 | 0,75 |     |
| 7     | 0          | 0,55 | 0,6  | 0,77 | 0,81 | 0,89 | 0,96 | 0,91 | 0,85 | 0,84 |     |
| 8     | 0          | 0,43 | 0,57 | 0,69 | 0,81 | 0,86 | 0,9  | 0,87 | 0,79 | 0,78 |     |
| 9     | 0          | 0,15 | 0,67 | 0,8  | 0,84 | 0,89 | 0,92 | 0,9  | 0,89 | 0,88 |     |

Tabela P3.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa primenom sistema ACN/voda na silika-gelu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0          | 0,11 | 0,18 | 0,26 | 0,42 | 0,53 | 0,48 | 0,45 | 0,27 | 0,22 |     |
| 2     | 0          | 0,11 | 0,18 | 0,26 | 0,36 | 0,5  | 0,43 | 0,42 | 0,27 | 0,2  |     |
| 3     | 0          | 0,11 | 0,16 | 0,26 | 0,39 | 0,5  | 0,48 | 0,45 | 0,33 | 0,24 |     |
| 4     | 0          | 0,25 | 0,59 | 0,86 | 0,92 | 0,94 | 0,8  | 0,79 | 0,61 | 0,6  |     |
| 5     | 0          | 0,39 | 0,76 | 0,83 | 0,92 | 0,94 | 0,77 | 0,73 | 0,64 | 0,63 |     |
| 6     | 0          | 0,44 | 0,67 | 0,88 | 0,9  | 0,92 | 0,83 | 0,8  | 0,74 | 0,7  |     |
| 7     | 0          | 0,11 | 0,33 | 0,43 | 0,75 | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,7  | 0,68 |     |
| 8     | 0          | 0,47 | 0,58 | 0,63 | 0,78 | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,82 | 0,8  |     |
| 9     | 0          | 0,14 | 0,47 | 0,6  | 0,78 | 0,85 | 0,67 | 0,45 | 0,29 | 0,19 |     |

Tabela P4.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema metanol/voda na aluminijum-oksidu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0,08       | 0,19 | 0,29 | 0,52 | 0,68 | 0,88 | 0,79 | 0,72 | 0,71 | 0,65 |     |
| 2     | 0,22       | 0,35 | 0,53 | 0,7  | 0,84 | 0,91 | 0,82 | 0,75 | 0,73 | 0,71 |     |
| 3     | 0,27       | 0,49 | 0,71 | 0,75 | 0,81 | 0,94 | 0,79 | 0,78 | 0,69 | 0,5  |     |
| 4     | 0,89       | 0,91 | 0,93 | 0,94 | 0,96 | 0,98 | 0,86 | 0,75 | 0,58 | 0,52 |     |
| 5     | 0,92       | 0,94 | 0,95 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,88 | 0,85 | 0,8  | 0,78 |     |
| 6     | 0,9        | 0,92 | 0,94 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,92 | 0,9  | 0,85 | 0,83 |     |
| 7     | 0,1        | 0,22 | 0,38 | 0,58 | 0,67 | 0,88 | 0,79 | 0,73 | 0,72 | 0,59 |     |
| 8     | 0,1        | 0,19 | 0,34 | 0,55 | 0,7  | 0,85 | 0,7  | 0,66 | 0,62 | 0,55 |     |
| 9     | 0,05       | 0,11 | 0,15 | 0,33 | 0,53 | 0,76 | 0,74 | 0,72 | 0,7  | 0,63 |     |



Tabela P5.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema aceton/voda na aluminijum-oksidu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0          | 0,1  | 0,32 | 0,56 | 0,7  | 0,85 | 0,99 | 0,97 | 0,86 | 0,75 |     |
| 2     | 0          | 0,19 | 0,37 | 0,55 | 0,79 | 0,88 | 0,99 | 0,93 | 0,85 | 0,78 |     |
| 3     | 0          | 0,46 | 0,82 | 0,94 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,95 | 0,89 | 0,74 |     |
| 4     | 0,8        | 0,82 | 0,91 | 0,94 | 0,96 | 0,98 | 0,99 | 0,89 | 0,79 | 0,59 |     |
| 5     | 0,78       | 0,84 | 0,9  | 0,95 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,94 | 0,89 | 0,83 |     |
| 6     | 0,82       | 0,85 | 0,9  | 0,94 | 0,98 | 0,99 | 0,99 | 0,89 | 0,84 | 0,75 |     |
| 7     | 0          | 0,22 | 0,35 | 0,55 | 0,74 | 0,84 | 0,93 | 0,88 | 0,73 | 0,65 |     |
| 8     | 0          | 0,25 | 0,42 | 0,67 | 0,81 | 0,84 | 0,86 | 0,8  | 0,76 | 0,7  |     |
| 9     | 0          | 0,18 | 0,25 | 0,36 | 0,52 | 0,62 | 0,74 | 0,7  | 0,64 | 0,55 |     |

Tabela P6.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenjskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema ACN/voda na aluminijum-oksidu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0,51       | 0,62 | 0,79 | 0,81 | 0,9  | 0,95 | 0,91 | 0,7  | 0,68 | 0,65 |     |
| 2     | 0,44       | 0,51 | 0,82 | 0,89 | 0,9  | 0,92 | 0,86 | 0,81 | 0,76 | 0,68 |     |
| 3     | 0,44       | 0,51 | 0,62 | 0,76 | 0,83 | 0,89 | 0,86 | 0,84 | 0,82 | 0,78 |     |
| 4     | 0,15       | 0,56 | 0,79 | 0,89 | 0,95 | 0,97 | 0,83 | 0,7  | 0,6  | 0,46 |     |
| 5     | 0,1        | 0,72 | 0,85 | 0,89 | 0,95 | 0,97 | 0,83 | 0,68 | 0,66 | 0,41 |     |
| 6     | 0,13       | 0,56 | 0,85 | 0,92 | 0,95 | 0,99 | 0,77 | 0,76 | 0,75 | 0,7  |     |
| 7     | 0,08       | 0,1  | 0,38 | 0,59 | 0,87 | 0,88 | 0,66 | 0,63 | 0,58 | 0,54 |     |
| 8     | 0,2        | 0,38 | 0,52 | 0,68 | 0,84 | 0,86 | 0,74 | 0,71 | 0,69 | 0,67 |     |
| 9     | 0,1        | 0,13 | 0,35 | 0,59 | 0,76 | 0,83 | 0,63 | 0,45 | 0,44 | 0,39 |     |

Tabela P7.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema metanol/voda na RP-18 silika gelu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0,97       | 0,95 | 0,91 | 0,88 | 0,76 | 0,69 | 0,6  | 0,59 | 0,47 | 0,42 |     |
| 2     | 0,97       | 0,94 | 0,91 | 0,88 | 0,73 | 0,64 | 0,59 | 0,54 | 0,47 | 0,42 |     |
| 3     | 0,96       | 0,84 | 0,82 | 0,72 | 0,54 | 0,36 | 0,35 | 0,32 | 0,3  | 0,28 |     |
| 4     | 0,81       | 0,7  | 0,64 | 0,47 | 0,38 | 0,22 | 0,18 | 0,08 | 0,07 | 0,05 |     |
| 5     | 0,81       | 0,73 | 0,7  | 0,59 | 0,49 | 0,36 | 0,26 | 0,14 | 0,13 | 0,1  |     |
| 6     | 0,79       | 0,45 | 0,28 | 0,24 | 0,15 | 0,12 | 0,1  | 0,08 | 0,07 | 0,05 |     |
| 7     | 0,91       | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,65 | 0,61 | 0,46 | 0,31 |     |
| 8     | 0,91       | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,67 | 0,58 | 0,43 | 0,41 |     |
| 9     | 0,88       | 0,85 | 0,81 | 0,74 | 0,59 | 0,38 | 0,37 | 0,36 | 0,34 | 0,26 |     |

Tabela P8.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenkih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema ACN/voda na RP-18 silika-gelu

| R.br. | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|       | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100 |
| 1     | 0,97       | 0,95 | 0,91 | 0,88 | 0,76 | 0,69 | 0,6  | 0,59 | 0,47 | 0,42 |     |
| 2     | 0,97       | 0,94 | 0,91 | 0,88 | 0,73 | 0,64 | 0,59 | 0,54 | 0,47 | 0,42 |     |
| 3     | 0,96       | 0,84 | 0,82 | 0,72 | 0,54 | 0,36 | 0,35 | 0,32 | 0,3  | 0,28 |     |
| 4     | 0,81       | 0,7  | 0,64 | 0,47 | 0,38 | 0,22 | 0,18 | 0,08 | 0,07 | 0,05 |     |
| 5     | 0,81       | 0,73 | 0,7  | 0,59 | 0,49 | 0,36 | 0,26 | 0,14 | 0,13 | 0,1  |     |
| 6     | 0,79       | 0,45 | 0,28 | 0,24 | 0,15 | 0,12 | 0,1  | 0,08 | 0,07 | 0,05 |     |
| 7     | 0,91       | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,65 | 0,61 | 0,46 | 0,31 |     |
| 8     | 0,91       | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,67 | 0,58 | 0,43 | 0,41 |     |
| 9     | 0,88       | 0,85 | 0,81 | 0,74 | 0,59 | 0,38 | 0,37 | 0,36 | 0,34 | 0,26 |     |

Tabela P9.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema aceton/voda na CN-silika-gelu

| R.br | Vol % vode |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 0          | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    | 60    | 70    | 80    | 90    | 100   |
| 1    | 0,807      | 0,825 | 0,81  | 0,757 | 0,753 | 0,757 | 0,709 | 0,564 | 0,554 | 0,506 | 0,412 |
| 2    | 0,819      | 0,834 | 0,821 | 0,77  | 0,776 | 0,595 | 0,519 | 0,487 | 0,486 | 0,481 | 0,329 |
| 3    | 0,675      | 0,706 | 0,714 | 0,811 | 0,824 | 0,595 | 0,532 | 0,423 | 0,27  | 0,266 | 0,224 |
| 4    | 0,699      | 0,729 | 0,738 | 0,797 | 0,859 | 0,743 | 0,709 | 0,615 | 0,462 | 0,392 | 0,069 |
| 5    | 0,783      | 0,812 | 0,762 | 0,757 | 0,753 | 0,73  | 0,658 | 0,564 | 0,459 | 0,356 | 0,051 |
| 6    | 0,867      | 0,894 | 0,976 | 0,959 | 0,894 | 0,878 | 0,835 | 0,795 | 0,73  | 0,658 | 0,635 |
| 7    | 0,675      | 0,882 | 0,988 | 0,959 | 0,906 | 0,865 | 0,861 | 0,833 | 0,757 | 0,747 | 0,6   |
| 8    | 0,687      | 0,894 | 0,988 | 0,946 | 0,906 | 0,838 | 0,835 | 0,808 | 0,703 | 0,747 | 0,671 |
| 9    | 0,94       | 0,965 | 0,952 | 0,946 | 0,906 | 0,811 | 0,759 | 0,718 | 0,649 | 0,633 | 0,635 |

Tabela P10.  $R_F$  vrednosti ispitivanih arenskih Ru(II) kompleksa dobijene primenom sistema ACN/voda na CN-silika-gelu

| R.br | Vol % vode |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 0          | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    | 60    | 70    | 80    | 90    | 100   |
| 1    | 0,92       | 0,931 | 0,936 | 0,86  | 0,808 | 0,763 | 0,753 | 0,582 | 0,554 | 0,5   | 0,412 |
| 2    | 0,92       | 0,931 | 0,936 | 0,826 | 0,795 | 0,75  | 0,74  | 0,522 | 0,514 | 0,409 | 0,329 |
| 3    | 0,864      | 0,903 | 0,833 | 0,802 | 0,756 | 0,638 | 0,61  | 0,388 | 0,378 | 0,227 | 0,224 |
| 4    | 0,91       | 0,931 | 0,91  | 0,872 | 0,872 | 0,863 | 0,857 | 0,836 | 0,811 | 0,682 | 0,069 |
| 5    | 0,919      | 0,931 | 0,897 | 0,884 | 0,872 | 0,85  | 0,831 | 0,776 | 0,757 | 0,657 | 0,051 |
| 6    | 0,92       | 0,931 | 0,936 | 0,919 | 0,897 | 0,875 | 0,87  | 0,776 | 0,73  | 0,727 | 0,635 |
| 7    | 0,818      | 0,833 | 0,859 | 0,942 | 0,962 | 0,963 | 0,974 | 0,866 | 0,865 | 0,833 | 0,6   |
| 8    | 0,83       | 0,861 | 0,885 | 0,942 | 0,949 | 0,963 | 0,961 | 0,881 | 0,824 | 0,773 | 0,671 |
| 9    | 0,955      | 0,958 | 0,962 | 0,965 | 0,974 | 0,975 | 0,974 | 0,94  | 0,932 | 0,939 | 0,635 |

Tabela P11.  $R_F$  vrednosti ispitivanih anestetika dobijene primenom sistema metanol/voda na silika-gelu

| R.br | Vol% vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | 0         | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1    | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 2    | 0,62      | 0,63 | 0,69 | 0,27 | 0,22 | 0,2  | 0,08 | 0,03 | 0    | 0    | 0    |
| 3    | 0,62      | 0,68 | 0,72 | 0,7  | 0,69 | 0,57 | 0,44 | 0,32 | 0,19 | 0,11 | 0,03 |
| 4    | 0,51      | 0,54 | 0,56 | 0,56 | 0,58 | 0,65 | 0,64 | 0,54 | 0,44 | 0,31 | 0,19 |
| 5    | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 6    | 0,62      | 0,63 | 0,67 | 0,7  | 0,61 | 0,59 | 0,44 | 0,3  | 0,17 | 0,28 | 0    |
| 7    | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 8    | 0,56      | 0,58 | 0,59 | 0,73 | 0,25 | 0,19 | 0,11 | 0,08 | 0,03 | 0    | 0    |
| 9    | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |

Tabela P12.  $R_F$  vrednosti ispitivanih anestetika dobijene primenom sistema ACN/voda na silika-gelu

| R.br | Vol % vode\ |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | 0           | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1    | 0           | 0,1  | 0,36 | 0,46 | 0,08 | 0,03 | 0,03 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 2    | 0,24        | 0,33 | 0,56 | 0,67 | 0,73 | 0,7  | 0,55 | 0,11 | 0,03 | 0,05 | 0    |
| 3    | 0,26        | 0,37 | 0,64 | 0,67 | 0,76 | 0,7  | 0,67 | 0,53 | 0,3  | 0,16 | 0,03 |
| 4    | 0,34        | 0,65 | 0,72 | 0,74 | 0,76 | 0,69 | 0,55 | 0,58 | 0,51 | 0,39 | 0,19 |
| 5    | 0           | 0    | 0,13 | 0,13 | 0,08 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 6    | 0,24        | 0,37 | 0,64 | 0,69 | 0,76 | 0,67 | 0,43 | 0,39 | 0,27 | 0,11 | 0    |
| 7    | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 8    | 0,24        | 0,3  | 0,54 | 0,69 | 0,65 | 0,41 | 0,2  | 0,11 | 0,05 | 0    | 0    |
| 9    | 0           | 0,02 | 0,05 | 0,49 | 0,59 | 0,09 | 0,03 | 0,08 | 0    | 0    | 0    |

Tabela P13.  $R_F$  vrednosti ispitivanih anestetika dobijene primenom sistema THF/voda na silika-gelu

| R.br | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1    | 0          | 0    | 0,06 | 0,1  | 0,2  | 0,11 | 0,05 | 0,03 | 0    | 0    | 0    |
| 2    | 0,69       | 0,73 | 0,63 | 0,63 | 0,6  | 0,38 | 0,29 | 0,24 | 0,12 | 0,05 | 0    |
| 3    | 0,77       | 0,76 | 0,68 | 0,66 | 0,66 | 0,55 | 0,45 | 0,39 | 0,35 | 0,24 | 0,03 |
| 4    | 0,61       | 0,67 | 0,77 | 0,71 | 0,71 | 0,61 | 0,53 | 0,42 | 0,4  | 0,34 | 0,19 |
| 5    | 0          | 0,15 | 0,21 | 0,29 | 0,34 | 0,16 | 0,1  | 0,05 | 0    | 0    | 0    |
| 6    | 0,58       | 0,73 | 0,66 | 0,6  | 0,57 | 0,44 | 0,37 | 0,31 | 0,2  | 0,12 | 0    |
| 7    | 0          | 0    | 0    | 0    | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0    | 0    | 0    |
| 8    | 0,61       | 0,62 | 0,62 | 0,55 | 0,34 | 0,33 | 0,31 | 0,26 | 0,15 | 0,09 | 0    |
| 9    | 0          | 0    | 0,14 | 0,21 | 0,17 | 0,08 | 0,03 | 0,05 | 0    | 0    | 0    |

Tabela P14.  $R_F$  vrednosti ispitivanih anestetika primenom sistema dioksan/voda na silika-gelu

| R.br | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1    | 0          | 0    | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 2    | 0,74       | 0,76 | 0,73 | 0,73 | 0,66 | 0,38 | 0,22 | 0,1  | 0    | 0    | 0    |
| 3    | 0,77       | 0,83 | 0,76 | 0,73 | 0,7  | 0,67 | 0,58 | 0,5  | 0,32 | 0,21 | 0,03 |
| 4    | 0,42       | 0,7  | 0,56 | 0,56 | 0,53 | 0,55 | 0,54 | 0,56 | 0,48 | 0,36 | 0,19 |
| 5    | 0          | 0    | 0,03 | 0,06 | 0,03 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 6    | 0,55       | 0,73 | 0,73 | 0,66 | 0,63 | 0,58 | 0,55 | 0,43 | 0,26 | 0,15 | 0    |
| 7    | 0          | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 8    | 0,64       | 0,73 | 0,56 | 0,56 | 0,46 | 0,32 | 0,19 | 0,13 | 0,1  | 0,03 | 0    |
| 9    | 0          | 0    | 0    | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0    | 0    | 0    |

Tabela P15.  $R_F$  vrednosti ispitivanih anestetika dobijene primenom sistema ACN/voda na aluminijum-oksidu

| R.br | Vol % vode |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|      | 0          | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| 1    | 0,24       | 0,59 | 0,67 | 0,75 | 0,81 | 0,82 | 0,84 | 0,9  | 0,87 | 0,83 | 0,81 |
| 2    | 0,71       | 0,64 | 0,7  | 0,73 | 0,82 | 0,84 | 0,84 | 0,85 | 0,74 | 0,11 | 0,1  |
| 3    | 0,84       | 0,64 | 0,73 | 0,75 | 0,82 | 0,84 | 0,84 | 0,8  | 0,69 | 0,25 | 0,47 |
| 4    | 0,68       | 0,72 | 0,76 | 0,84 | 0,85 | 0,84 | 0,86 | 0,75 | 0,69 | 0,53 | 0,18 |
| 5    | 0,31       | 0,64 | 0,73 | 0,74 | 0,82 | 0,84 | 0,84 | 0,87 | 0,77 | 0,58 | 0,55 |
| 6    | 0,76       | 0,77 | 0,81 | 0,81 | 0,87 | 0,82 | 0,6  | 0,62 | 0,38 | 0,19 | 0,05 |
| 7    | 0          | 0,13 | 0,27 | 0,58 | 0,61 | 0,8  | 0,84 | 0,85 | 0,77 | 0,77 | 0,79 |
| 8    | 0,84       | 0,82 | 0,86 | 0,8  | 0,84 | 0,85 | 0,86 | 0,82 | 0,72 | 0,66 | 0,65 |
| 9    | 0,16       | 0,66 | 0,73 | 0,74 | 0,84 | 0,84 | 0,84 | 0,87 | 0,64 | 0,41 | 0,18 |

Tabela P16. Kalibracioni set standardnih supstanci sa eksperimentalno određenim  $\log K_{OW}$  vrednostima

| R.br. | Jedinjenje               | $\log K_{OW}$ | $pK_a$ | $\alpha$ Stepen jonizacije [%] |
|-------|--------------------------|---------------|--------|--------------------------------|
| 1     | 1,2,3-benzotriazol       | 1,44          | 8,37   | 0,42                           |
| 2     | 4-hlorobenzoeva kiselina | 2,65          | 3,98   | 99,05                          |
| 3     | 2-nitrobenzaldehyd       | 1,74          | -      | -                              |
| 4     | 4-bromanalin             | 2,26          | 3,86   | 99,28                          |
| 5     | Fenol                    | 1,46          | 10,09  | 0,01                           |
| 6     | Benzofenon               | 3,18          | -      | -                              |
| 7     | 3-nitrobenzaldehyd       | 1,46          | -      | -                              |
| 8     | 4-aminobenzoeva kiselina | 0,83          | 4,65   | 95,72                          |
| 9     | Ftalimid                 | 1,15          |        | 100,00                         |
| 10    | 1,4-benzohinon           | 0,20          | -      | -                              |
| 11    | 4-nitrofenol             | 1,91          | 7,15   | 6,61                           |
| 12    | 3-nitrofenol             | 2,00          | 8,28   | 0,52                           |
| 13    | Benzil alkohol           | 1,10          | -      | -                              |
| 14    | Naftilamin*              | 2,25          | 3,92   | 99,18                          |
| 15    | 2-naftol                 | 2,85          | 9,67   | 0,02                           |
| 16    | 4-fluoroanilin           | 1,15          | 4,70   | 95,23                          |
| 17    | 1-naftol                 | 2,85          | 9,34   | 0,05                           |
| 18    | 4-hidroksibenzaldehyd    | 1,35          | -      | -                              |
| 19    | 3-hloronitrobenzen       | 2,46          | -      | -                              |
| 20    | 2,4-dihlorofenol         | 3,06          | 7,85   | 1,39                           |
| 21    | 4-metilfenol             | 1,94          | 10,09  | 0,01                           |
| 22    | 4-hlorofenol             | 2,39          | 9,38   | 0,04                           |
| 23    | Antracen                 | 4,45          | -      | -                              |
| 24    | Acetofenon               | 1,58          | -      | -                              |
| 25    | 2-aminofenol             | 0,62          | 9,44   | 0,04                           |
| 26    | 4-t-butilfenol           | 3,31          | 10,31  | 0,00                           |
| 27    | 1,3,5-trihidroksibenzen  | 0,16          | 9,40   | 0,04                           |
| 28    | 2,6-dimetilfenol         | 2,36          | 10,59  | 0,00                           |

Tabela P17. Eksperimentalno određene  $R_F$  vrednosti standardnih supstanci i ispitivanih rutenijumskih kompleksa

| R.br.. | Jedinjenje               | Zapreminski udeo acetonitirla ( % ) |      |      |      |      |      |      |
|--------|--------------------------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|        |                          | 30                                  | 35   | 40   | 45   | 50   | 55   | 60   |
| 1      | 1,2,3-benzotriazol       | -                                   | -    | 0,31 | 0,39 | 0,48 | 0,51 | 0,53 |
| 2      | 4-hlorobenzoeva kiselina | -                                   | -    | 0,13 | 0,16 | 0,22 | 0,24 | 0,38 |
| 3      | 2-nitrobenzaldehyd       | -                                   | -    | 0,11 | 0,14 | 0,21 | 0,24 | 0,30 |
| 4      | 4-bromanalin             | -                                   | -    | 0,06 | 0,08 | 0,15 | 0,18 | 0,25 |
| 5      | Fenol                    | -                                   | -    | 0,26 | 0,33 | 0,40 | 0,50 | 0,57 |
| 6      | Benzofenon               | -                                   | -    | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,09 | 0,15 |
| 7      | 3-nitrobenzaldehyd       | -                                   | -    | 0,11 | 0,14 | 0,23 | 0,24 | 0,30 |
| 8      | 4-aminobenzoeva kiselina | -                                   | -    | 0,44 | 0,48 | 0,54 | 0,56 | 0,60 |
| 9      | Ftalimid                 | -                                   | -    | 0,24 | 0,30 | 0,41 | 0,43 | 0,48 |
| 10     | 1,4-benzohinon           | -                                   | -    | 0,40 | 0,43 | 0,49 | 0,50 | 0,52 |
| 11     | 4-nitrofenol             | -                                   | -    | 0,24 | 0,28 | 0,33 | 0,46 | 0,52 |
| 12     | 3-nitrofenol             | -                                   | -    | 0,16 | 0,20 | 0,27 | 0,41 | 0,49 |
| 13     | Benzil alcohol           | -                                   | -    | 0,42 | 0,50 | 0,53 | 0,59 | 0,64 |
| 14     | Naftilamin               | -                                   | -    | 0,12 | 0,16 | 0,22 | 0,33 | 0,41 |
| 15     | 2-naftol                 | -                                   | -    | 0,13 | 0,18 | 0,27 | 0,37 | 0,43 |
| 16     | 4-fluoroanilin*          | -                                   | -    | 0,26 | 0,28 | 0,36 | 0,48 | 0,52 |
| 17     | 1-naftol                 | -                                   | -    | 0,12 | 0,13 | 0,19 | 0,33 | 0,39 |
| 18     | 4-hidroksibenzaldehyd    | -                                   | -    | 0,41 | 0,39 | 0,48 | 0,61 | 0,63 |
| 19     | 3-hloronitrobenzen       | -                                   | -    | 0,07 | 0,09 | 0,11 | 0,22 | 0,28 |
| 20     | 2,4-dihlorofenol         | -                                   | -    | 0,09 | 0,12 | 0,27 | 0,33 | 0,40 |
| 21     | 4-metilfenol             | -                                   | -    | 0,26 | 0,30 | 0,36 | 0,48 | 0,54 |
| 22     | 4-hlorofenol             | -                                   | -    | 0,17 | 0,24 | 0,30 | 0,39 | 0,51 |
| 23     | Antracen                 | -                                   | -    | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,09 | 0,15 |
| 24     | Acetofenon               | -                                   | -    | 0,23 | 0,26 | 0,31 | 0,41 | 0,51 |
| 25     | 2-aminofenol             | -                                   | -    | 0,42 | 0,42 | 0,51 | 0,62 | 0,66 |
| 26     | 4-t-butilfenol           | -                                   | -    | 0,07 | 0,09 | 0,16 | 0,28 | 0,39 |
| 27     | 1,3,5-trihidroksibenzen  | -                                   | -    | 0,73 | 0,67 | 0,77 | 0,80 | 0,84 |
| 28     | 2,6-dimetilfenol         | -                                   | -    | 0,11 | 0,16 | 0,23 | 0,33 | 0,41 |
| 29     | Ru-1                     | 0,23                                | 0,28 | 0,32 | 0,37 | 0,44 | 0,49 | -    |
| 30     | Ru-2                     | 0,11                                | 0,15 | 0,23 | 0,27 | 0,33 | 0,45 | -    |



|    |      |      |      |      |      |      |      |   |
|----|------|------|------|------|------|------|------|---|
| 31 | Ru-3 | 0,05 | 0,07 | 0,13 | 0,16 | 0,21 | 0,29 | - |
| 32 | Ru-4 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,15 | - |
| 33 | Ru-5 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,11 | - |
| 34 | Ru-6 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,12 | - |
| 35 | Ru-7 | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,07 | 0,10 | 0,14 | - |
| 36 | Ru-8 | 0,01 | 0,03 | 0,06 | 0,08 | 0,13 | 0,16 | - |
| 37 | Ru-9 | 0,08 | 0,13 | 0,19 | 0,24 | 0,31 | 0,37 | - |

---

Tabela P18. Linearna zavisnost između retencije ( $R_M$ ) i zapreminskog udela organske komponente mobilne faze ( $\varphi$ ); Prateća statistika ( $R$  – coeficijent korelacije,  $F$  – Fišerov parametar,  $S.D.$  – standardna devijacija,  $n$  – broj kalibracionih tačaka) sa vrednostima odsečka ( $R_M^0$ ) i nagiba ( $-b$ )

| Jedinjenje               | Hromatografski parametri |            |        |        |        |     |
|--------------------------|--------------------------|------------|--------|--------|--------|-----|
|                          | $R_M^0$                  | $-b$       | $R$    | $S.D.$ | $F$    | $N$ |
| 1,2,3-benzotriazol       | 1,13±0,16                | 2,05±0,32  | 0,9642 | 0,052  | 39,65  | 5   |
| 4-hlorobenzoeva kiselina | 1,98±0,18                | 2,83±0,36  | 0,9770 | 0,056  | 62,92  | 5   |
| 2-nitrobenzaldehyd       | 1,99±0,11                | 2,73±0,22  | 0,9901 | 0,035  | 149,91 | 5   |
| 4-bromoanilin            | 2,74±0,19                | 3,81±0,38  | 0,9858 | 0,059  | 103,48 | 5   |
| Fenol                    | 1,64±0,05                | 2,94±0,11  | 0,9981 | 0,017  | 768,73 | 5   |
| Benzofenon               | 2,86±0,11                | 3,42±0,23  | 0,9935 | 0,036  | 229,29 | 5   |
| 3-nitrobenzaldehyd       | 1,98±0,20                | 2,73±0,39  | 0,9707 | 0,062  | 48,96  | 5   |
| 4-aminobenzoeva kiselina | 0,65±0,07                | 1,38±0,14  | 0,9848 | 0,022  | 96,39  | 5   |
| Ftalimid                 | 1,40±0,18                | 2,32±0,35  | 0,9671 | 0,056  | 43,29  | 5   |
| 1,4-benzohinon           | 0,61±0,08                | 1,10±0,15  | 0,9723 | 0,024  | 51,88  | 5   |
| 4-nitrofenol             | 1,66±0,13                | 2,83±0,25  | 0,9886 | 0,039  | 129,19 | 5   |
| 3-nitrofenol             | 2,22±0,15                | 3,67±0,30  | 0,9900 | 0,048  | 147,99 | 5   |
| Benzil alkohol           | 0,87±0,07                | 1,86±0,13  | 0,9924 | 0,021  | 195,84 | 5   |
| Naftilamin               | 2,40±0,08                | 3,75±0,15  | 0,9976 | 0,024  | 612,44 | 5   |
| 2-naftol                 | 2,30±0,10                | 3,70±0,21  | 0,9954 | 0,033  | 323,64 | 5   |
| 4-fluoroanilin           | 1,56±0,16                | 2,68±0,32  | 0,9789 | 0,051  | 68,73  | 5   |
| 1-naftol                 | 2,44±0,23                | 3,75±0,46  | 0,9785 | 0,072  | 67,56  | 5   |
| 4-hidroksibenzaldehyd    | 1,16±0,25                | 2,33±0,49  | 0,9396 | 0,078  | 22,59  | 5   |
| 3-hloronitrobenzen       | 2,67±0,25                | 3,75±0,50  | 0,9747 | 0,078  | 57,07  | 5   |
| 2,4-dihlorofenol         | 2,73±0,30                | 4,35±0,60  | 0,9728 | 0,095  | 52,89  | 5   |
| 4-metilfenol             | 1,61±0,10                | 2,80±0,194 | 0,9928 | 0,031  | 207,53 | 5   |
| 4-hlorofenol             | 2,10±0,08                | 3,49±0,16  | 0,9969 | 0,025  | 487,62 | 5   |
| Antracen                 | 4,37±0,50                | 5,96±0,98  | 0,9616 | 0,155  | 36,87  | 5   |
| Acetofenon               | 1,66±0,15                | 2,75±0,29  | 0,9836 | 0,046  | 89,03  | 5   |
| 2-aminofenol             | 1,15±0,19                | 2,37±0,37  | 0,9657 | 0,059  | 41,45  | 5   |
| 4-t-butilfenol           | 3,16±0,17                | 4,93±0,35  | 0,9927 | 0,055  | 204,43 | 5   |
| 1,3,5-trihidroksibenzen  | 0,38±0,29                | 1,79±0,57  | 0,8754 | 0,090  | 9,84   | 5   |
| 2,6-dimetilfenol         | 2,41±0,06                | 3,77±0,13  | 0,9984 | 0,020  | 908,70 | 5   |
| Ru-1                     | 1,13±0,08                | 2,02±0,19  | 0,9875 | 0,039  | 157,10 | 6   |
| Ru-2                     | 1,88±0,14                | 3,22±0,31  | 0,9563 | 0,066  | 42,81  | 6   |
| Ru-3                     | 2,35±0,17                | 3,58±0,40  | 0,9010 | 0,084  | 17,25  | 6   |
| Ru-4                     | 3,96±0,16                | 5,75±0,38  | 0,8263 | 0,079  | 8,61   | 6   |
| Ru-5                     | 3,90±0,32                | 5,45±0,74  | 0,7903 | 0,155  | 6,65   | 6   |
| Ru-6                     | 3,97±0,22                | 5,71±0,51  | 0,8797 | 0,106  | 13,69  | 6   |
| Ru-7                     | 3,24±0,32                | 4,56±0,74  | 0,9351 | 0,154  | 27,86  | 6   |
| Ru-8                     | 3,20±0,30                | 4,69±0,69  | 0,8732 | 0,145  | 12,84  | 6   |
| Ru-9                     | 1,97±0,08                | 3,24±0,18  | 0,9564 | 0,037  | 42,93  | 6   |

Tabela P19. Kalibracioni modeli i prateća statistika

| Broj modela | Model | Jednačina   | Statistički parametric   |
|-------------|-------|---|--|
| 1           | OLS   | $R_{M40\%} = (-0.17 \pm 0.09) + (0.44 \pm 0.04) \log K_{OW}$                      | $R^2 = 0.8067, S.D. = 0.22, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 2           | OLS   | $R_{M45\%} = (-0.17 \pm 0.08) + (0.38 \pm 0.04) \log K_{OW}$                      | $R^2 = 0.7882, S.D. = 0.20, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 3           | OLS   | $R_{M50\%} = (-0.32 \pm 0.09) + (0.37 \pm 0.04) \log K_{OW}$                      | $R^2 = 0.7666, S.D. = 0.20, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 4           | OLS   | $R_{M55\%} = (-0.34 \pm 0.09) + (0.29 \pm 0.04) \log K_{OW}$                      | $R^2 = 0.6521, S.D. = 0.15, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 5           | OLS   | $R_M^0 = (0.3 \pm 0.2) + (0.83 \pm 0.06) \log K_{OW}$                             | $R^2 = 0.8857, S.D. = 0.33, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 6           | OLS   | $b = (1.2 \pm 0.2) + (0.98 \pm 0.08) \log K_{OW}$                                 | $R^2 = 0.8388, S.D. = 0.31, P < 10^{-4}, n = 28$                           |
| 7           | PCR   | $\log K_{OW} = 0.58 R_{M40\%} + 0.63 R_{M45\%} + 0.62 R_{M50\%} - 0.95 R_{M55\%}$ | RMSEC = 0.375; $R^2_{Cal} = 0.8502$<br>RMSECV = 0.418; $R^2_{CV} = 0.8146$ |

Tabela P20. Hromatografski određene i računski procenjene  $\log K_{OW}$  vrednosti ispitivanih rutenijumskih kompleksa

| R.br. | Hromatografski određene |           |           |           |           |           |      | Procenjene                                     |   |               |
|-------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|--|---|---------------|
|       | Model                   |           |           |           |           |           |      | DFT  |   |               |
|       | 1                       | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7    | $\Delta G_{sol}(\text{oktanol})$<br>[kcal/mol] | $\Delta G_{sol}(\text{voda})$<br>[kcal/mol] | $\log K_{OW}$ |
| Ru-1  | 4,26±0,37               | 4,03±0,38 | 4,19±0,42 | 4,31±0,56 | 4,31±0,28 | 4,38±0,34 | 3,72 | -13,85   | -19,81                                      | 4,36          |
| Ru-2  | 4,13±0,37               | 3,91±0,37 | 4,09±0,41 | 4,13±0,55 | 4,39±0,28 | 4,63±0,35 | 3,65 | -13,27   | -19,35                                      | 4,45          |
| Ru-3  | 4,13±0,37               | 3,91±0,37 | 4,09±0,41 | 3,74±0,52 | 4,38±0,28 | 4,68±0,36 | 3,97 | -9,99  | -17,63                                      | 5,59          |
| Ru-4  | 3,42±0,33               | 3,43±0,35 | 3,50±0,38 | 3,86±0,52 | 3,52±0,25 | 3,47±0,30 | 2,91 | -14,48   | -19,60                                      | 3,75          |
| Ru-5  | 3,18±0,32               | 3,24±0,34 | 3,08±0,36 | 3,63±0,51 | 3,47±0,24 | 3,59±0,30 | 2,63 | -14,99   | -19,97                                      | 3,65          |
| Ru-6  | 1,81±0,30               | 1,72±0,32 | 1,81±0,34 | 1,99±0,45 | 2,00±0,22 | 2,11±0,27 | 1,63 | -20,77   | -23,24                                      | 1,81          |
| Ru-7  | 1,15±0,31               | 1,07±0,33 | 1,15±0,35 | 1,24±0,46 | 0,98±0,23 | 0,87±0,28 | 1,14 | -20,51   | -22,57                                      | 1,50          |
| Ru-8  | 1,61±0,30               | 1,59±0,32 | 1,68±0,34 | 1,49±0,45 | 1,88±0,22 | 2,09±0,27 | 1,78 | -19,35   | -21,61                                      | 1,66          |
| Ru-9  | 2,33±0,30               | 2,36±0,32 | 2,39±0,34 | 2,55±0,46 | 2,44±0,22 | 2,46±0,27 | 2,14 | -16,88   | -19,70                                      | 2,06          |

## BIOGRAFIJA

Aleksandra D. Radoičić rođena je 28. juna 1977. godine u Surdulici, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu. Gimnaziju je završila u Vladičinom Hanu, a Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1996. godine. Diplomirala je 2003. godine sa prosečnom ocenom 8,63 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Poslediplomske studije na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2004. godine. Magistarsku tezu pod naslovom “Planarna hromatografija hidrofilnih interakcija u vodi rastvornih kompleksa Co(III)” odbranila je 1. aprila 2010. godine i tako stekla zvanje magistra hemijskih nauka. Treću godinu doktorskih studija Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2016/2017. Godine, a 2018. godine prijavila temu doktorske disertacije pod nazivom “Uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na mehanizam odvajanja malih polarnih molekula”.

Od 01.10.2004. godine bila je zaposlena kao asistent-pripravnik, a od 2010. do februara 2018. kao asistent za užu naučnu oblast Analitička hemija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2018. zaposlena je kao istraživač-saradnik u Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu.

## RADOVI I SAOPŠTENJA KOJI SU DEO OVE DOKTORSKE DISERTACIJE

### Naučni radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. K. S. A. M. Shweshein, F. Andrić, A. Radoičić, Matija Zlatar, M. Gruden-Pavlović, Ž. Tešić, and D. Milojković-Opsenica; „Lipophilicity assessment of ruthenium (II)-arene complexes by the means of reversed-phase thin-layer chromatography and DFT calculations”; Scientific World Journal (2014) Article ID 862796 (IF=1.73) <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/862796/>

### Naučni radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23)

1. J. Vlajković, F. Andrić, P. Ristivojević, A. Radoičić, Ž. Tešić & D. Milojković-Opsenica; „Development and validation of a tlc method for the analysis of synthetic food-stuff dyes”; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (JLC&RT), 36 (2013) 17, 2476-2488 (IF=0.706)

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2013.790771>

2. A. Radoičić, R. Petronijević, F. Andrić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica; „Development and validation of high-performance thin-layer chromatographic method for determination of amygdalin”; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies vol. 40 (2017)297-303 (IF=0.697)

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2017.1298032>

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Aleksandra Radoičić, Jelena Trifković, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Živoslav Lj. Tešić, Dragan Vučović and Mirjana Aleksić, Hydrophilic interaction planar chromatography of some anaesthetics, The XXXIIInd SYMPOSIUM, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds, Katowice - Szczyrk, June 3rd-5th, 2009, Book of Abstracts, p.61.

2. A. Radoičić, R. Petronijević, H. Majstorović, M. Stanojević, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Development and validation of a TLC-densitometric method for the quantitative determination of amygdalin, The XXXVIth SYMPOSIUM 'Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds', Katowice - Szczyrk, June 5th-7th, 2013, Book of Abstracts p.14

**Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. Marija Nikolić, Jelena Trifković, Filip Lj. Andrić, Aleksandra Radoičić, Dragan Vučović, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Planarna hromatografija hidrofилnih interakcija nekih anestetika, 48. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 17-18. april 2010., AH-01, p.13. ISBN 978-86-7132-042-9

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора      **Александра Д. Радоичић**

Број индекса                      **ДХ26/2016**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај садржаја воде у мобилној фази на механизам одвајања малих  
поларних молекула**

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

### Потпис аутора

У Београду, **8. августа 2019.**

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

Име и презиме аутора      **Александра Д. Радоичић**

Број индекса                **ДХ26/2016**

Студијски програм         **доктор хемијских наука**

Наслов рада                 **Утицај садржаја воде у мобилној фази на  
механизам одвајања малих поларних молекула**

Ментор                         **др Душанка Милојковић-Опсеница**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктор 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 аутора**

У Београду, **8. августа 2019. године**



## Изјава о коришћењу

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

### Утицај садржаја воде у мобилној фази на механизам одвајања малих поларних молекула

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство (CCBY)

2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CCBY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CCBY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CCBY-SA)

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, **8. августа 2019. године**

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.