

NASTAVNO–NAUČNOM VEĆU
FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 27. novembra 2014. godine, na osnovu člana 94. Statuta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, doneta je odluka o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod naslovom: *Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija*, kandidata mr. farm. MARKA JOVANOVIĆA.

Izrada ove doktorske disertacije odobrena je na 24. sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, održanoj 29. oktobra 2013. godine.

Komisija u sastavu:

Doc. dr BILJANA STOJANOVIĆ, MENTOR

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr MIRJANA MEDENICA, PREDSEDNIK KOMISIJE

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr MIROSLAV ŠOBER

Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi sledeći IZVEŠTAJ.

Beograd,
16. januar 2015. godine

Doc. dr Biljana Stojanović, mentor

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom *Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija* napisana je na 224 strane, formata A4, uz kratak *Rezime* na srpskom i engleskom jeziku. Sadrži 9 poglavlja: *Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija, Teorijski modeli u hromatografiji i njihova primena u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija, Hemometrijski pristup tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija, Pregled literature, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Prilozi*. Sadrži 38 slika, 23 tabele, 38 jednačina, 72 literaturna navoda, kao i spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja koji predstavljaju publikovane rezultate iz ove disertacije.

Poglavlje *Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija* napisano je na 17 strana i prikazuje značaj primene tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC*) u farmaceutskoj analizi sa posebnim osvrtom na analizu polarnih molekula male molekulske mase. Takođe, navedeni su i osnovni mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu, kao i faktori koji utiču na retenciono ponašanje različitih tipova analita (tipovi stacionarnih faza, sastav mobilne faze i strukturne osobine analita).

Naredno poglavlje, *Teorijski modeli u hromatografiji i njihova primena u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija*, koje je napisano na 13 strana, daje detaljan opis različitih teorijskih modela zasnovanih na termodinamičkim principima a koji su značajni za opisivanje HILIC sistema. Opisani su particioni retencioni model, adsorpcioni retencioni model, dvojni HILIC/RP retencioni model, mešoviti adsorpciono-particioni retencioni model i jonoizmenjivački model. Svi modeli okarakterisani su odgovarajućim jednačinama.

U delu *Hemometrijski pristup tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija* napisanom na 13 strana prikazan je značaj primene hemometrijskog pristupa u analizi HILIC sistema. U poglavlju je posebno naglašen značaj izbora faktora i njihovih nivoa u HILIC sistemu s obzirom na činjenicu da ovaj sistem do sada nije dovoljno istražen. Stoga, hemometrija omogućava dobijanje velikog broja podataka koji su od izrazitog naučnog značaja. Da bi ovaj pristup omogućio adekvatno opisivanje analiziranog HILIC sistema značajan je izbor eksperimentalnog dizajna, pa su u ovom delu posebno

opisani Boks-Benken i D-optimalni dizajn koji su i primenjeni u ovoj doktorskoj disertaciji. U ovom delu definisani su i odgovori hromatografskog sistema koji su praćeni tokom istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Takođe, prikazani su i matematički modeli koji su primenjeni za opisivanje analiziranih sistema, kao i pristupi direktnom i indirektnom modelovanju analiziranih odgovora. Na kraju ovog dela, opisani su načini optimizacije metode, tj. dat je opis grafičkih i numeričkih metoda za optimizaciju koje su primenjene u ovoj doktorskoj disertaciji.

Deo *Pregled literature*, prikazan na 10 strana, daje opis literature i podeljen je na dva dela. Prvi deo se odnosi na publikovane radove u kojima su opisana dosadašnja istraživanja teorijskih modela u HILIC sistemima, dok je u drugom delu dat pregled literature koji se odnosi na do sada publikovane radove u kojima su primenjeni eksperimentalni modeli u HILIC sistemima.

Poglavlje *Cilj rada* napisano je na 2 strane. Kao **prvi cilj** definisano je da se ispituju faktorski uticaji i retenciono ponašanje kiselih i amfoternih analita na primeru model smeše penicilina i cefalosporina na silika koloni primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, kao i da se uradi verifikacija dobijenih modela poređenjem simuliranih i eksperimentalno dobijenih hromatograma u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora. U okviru **drugog cilja**, vrši se analiza retencionih mehanizama baznih analita na primeru model smeše antipsihotika, antihistaminika i antiepileptika na dve silika, dve diolne i jednoj cijano koloni fitovanjem retencionih podataka u particioni, adsorpcioni, katjonsko–izmenjivački i dvojni HILIC/RP retencioni model. Pored toga, definiše se i ispitivanje retencionog ponašanja, kao i međusobnih faktorskih uticaja na *Betasil Silica* koloni na osnovu eksperimentalnih modela dobijenih hemometrijskim pristupom. Kao **treći cilj**, postavlja se analiza retencionih mehanizama kiselih i neutralnih analita na primeru model smeše analita sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom u amino koloni fitovanjem retencionih podataka u particioni, adsorpcioni, anjonsko–izmenjivački i dvojni HILIC/RP retencioni model. Takođe, u okviru ovog cilja vrši se upotpunjavanje znanja o uticaju faktora mobilne faze na retenciono ponašanje ispitivanih analita u amino koloni primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, kao i procena kvaliteta retencionog predviđanja dobijenih modela eksperimentalnom verifikacijom. **Četvrti cilj** uključuje ispitivanje doprinosa procesa raspodele i adsorpcije ukupnom HILIC retencionom mehanizmu neutralnih analita u zavisnosti od sastava mobilne faze na primeru model smeše joheksola i njegove tri srodne supstance u dve silika i dve diolne kolone, primenom mešovito adsorpciono–particionog retencionog modela. U okviru **petog cilja** postiže se građenje

eksperimentalnih modela zavisnosti retencionih faktora joheksola i njegove tri srodne supstance od faktora mobilne faze i tipa kolone, primenom D–optimalnog dizajna. Pored toga, u okviru ovog cilja doktorske disertacije uključena je i optimizacija hromatografskog razdvajanja ispitivanih analita uz indirektno modelovanje faktora selektivnosti kritičnog para smeše sa numeričkom optimizacijom. Na kraju, postavljena HILIC metoda se validira za analizu joheksola i njegovih srodnih supstanci u rastvorima za intravensku primenu.

Poglavlje *Eksperimentalni deo* napisano je na 35 strana. U okviru ovog dela prikazani su aparati i reagensi, uključujući i standardne supstance sa prikazanim strukturnim formulama i hemijskim nazivima, a navedeni su i primenjeni kompjuterski programi.

Za hromatografsku analizu **eksperimentalnih modela β -laktamskih antibiotika** prikazani su hromatografski uslovi, priprema rastvora standarda, kao i mobilnih faza definisanih Boks-Benkenovim planom eksperimenta za tri faktora. Ispitivani faktori bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenom delu mobilne faze.

Za hromatografsku analizu **teorijskih modela odabranih baznih lekova** prikazani su hromatografski uslovi u okviru kojih je navedeno 5 hromatografskih kolona (*Betasil Silica*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica, *Betasil Diol*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica, *Betasil CN*, 100 mm × 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica, *Bakerbond Silica Gel*, 250 mm × 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica i *Bakerbond Cyanopropyl*, 250 mm × 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica), kao i priprema rastvora standarda, priprema mobilnih faza sa pratećim hromatografskim postupkom. Za hromatografsku analizu **eksperimentalnih modela odabranih baznih lekova** prikazani su hromatografski uslovi, priprema rastvora standarda, kao i mobilnih faza definisanih Boks-Benkenovim planom eksperimenta za tri faktora. Ispitivani faktori bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenom delu mobilne faze.

Za hromatografsku analizu **teorijskih modela farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom** prikazani su hromatografski uslovi, kao i priprema rastvora standarda, priprema mobilnih faza sa pratećim hromatografskim postupkom. Za hromatografsku analizu **eksperimentalnih modela farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom** prikazani su hromatografski uslovi, zatim priprema rastvora standarda, kao i mobilnih faza definisanih Boks-Benkenovim planom eksperimenta za tri

faktora. Ispitivani faktori bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenom delu mobilne faze.

Za hromatografsku analizu **teorijskih modela joheksola i njegovih srodnih supstanci** prikazani su hromatografski uslovi u okviru kojih su navedene četiri hromatografske kolone (*Betasil Silica*, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, *Betasil Diol*, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, *Luna HILIC*, 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica i *Kinetex HILIC*, 100 mm × 4,6 mm, 2,6 µm veličina čestica), kao i priprema rastvora standarda, priprema mobilnih faza sa pratećim hromatografskim postupkom. Za hromatografsku analizu **eksperimentalnih modela joheksola i njegovih srodnih supstanci** prikazani su hromatografski uslovi, priprema rastvora standarda, kao i mobilnih faza prema planu eksperimenta definisanim matricom D-optimalnog dizajna. Ispitivani faktori mobilne faze, kao kvantitativni faktori, bili su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenom delu mobilne faze. Pored toga, kao kvalitativni faktor ispitivane su četiri hromatografske kolone.

Za svaku fazu ispitivanja navedeni su prmenjeni kompjuterski programi.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* napisano je na 122 strane. U ovom poglavlju prikazani su svi dobijeni rezultati eksperimentalnih istraživanja u obliku tabela (18) i slika (22). Data je detaljna diskusija rezultata uz teorijsku i literaturnu podršku. Detaljnije o ovom poglavlju u delu B ovog Izveštaja.

Poglavlje *Zaključak* napisano je na 3 strane i sadrži sve zaključke u skladu sa postavljenim ciljevima.

Poglavlje *Literatura* napisano je na 9 strana i sadrži 72 bibliografske jedinice.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U prvom delu *Rezultata i diskusije* prikazana je analiza retencionog ponašanja **β -laktamskih antibiotika** u silikagel koloni primenom Boks-Benken dizajna. Za detaljnu analizu hromatografskog ponašanja u HILIC sistemu odabrani su sledeći β -laktamski antibiotici: cefotaksim-natrijum, cefaleksin-monohidrat, cefaklor, cefuroksim-natrijum, cefuroksim-aksetil, ampicilin-trihidrat i amoksicilin-trihidrat. U okviru preliminarnih istraživanja primenjena je tzv. *one-factor-at-a-time* metodologija koja je omogućila jednostavnu analizu uticaja odabranih hromatografskih faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi) na vrednosti retencionih faktora ispitivanih analita. U cilju dobijanja više informacija o ponašanju ovog hromatografskog sistema kreirani su odgovarajući eksperimentalni modeli primenom Boks-Benken dizajna i urađena je njihova statistička procena. Za analite cefotaksim-natrijum, cefaleksin-monohidrat, cefaklor, cefuroksim-natrijum, ampicilin-trihidrat i amoksicilin-trihidrat dobijeni su matematički modeli čija je adekvatnost potvrđena nizom statističkih testova. Jedino za cefuroksim-aksetil model nije bio adekvatan, što se objašnjava njegovim neretencionim ponašenjem kao posledica nedostatka jonizacionih centara. Nakon toga su uspostavljeni retencioni modeli i eksperimentalno verifikovani izvođenjem četiri dodatna eksperimenta u proizvoljno odabranim tačkama eksperimentalnog prostora. Dobijene vrednosti koeficijenata korelacije r (u opsegu od 0,9594 do 0,9938) potvrđuju dobro predviđanje retencionog ponašanja ispitivanih analita na osnovu kreiranih matematičkih modela. Dobro slaganje potvrđeno je i eksperimentalno dobijenim hromatogramima. U cilju detaljnije analize faktorskih uticaja prikazani su tri-D dijagrami na osnovu kojih je dato dodatno tumačenje hromatografskog ponašanja ispitivanog sistema. Na kraju ovog dela naveden je i uticaj strukturnih osobina β -laktamskih antibiotika na retenciono ponašanje u HILIC sistemu. Kako su pomenuti β -laktamski antibiotici po prvi put ispitivani u HILIC sistemu, ova doktorska disertacija daje značajan naučni doprinos ovim istraživanjem. Pored toga, po prvi put je u naučnoj literaturi razjašnjena veza između strukture opisanih β -laktamskih antibiotika i njihovog retencionog ponašanja u HILIC sistemu. Rezultati su objavljeni u: **Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.**: Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying the Box–Behnken design. *J Sep Sci* 2012; 35: 1424–1431.

Drugi deo *Rezultata i diskusije* prikazuje analizu odabranih **baznih farmaceutski aktivnih supstanci** (tioridazina, klozapina, sulpirida, feniramin-maleata, hlorfeniramin-maleata i lamotrigina) u pet kolona (dve silika, dve cijano i jedna diolna) građenjem teorijskih i eksperimentalnih retencionih

modela. U ovom delu istraživanja najpre se pristupilo građenju katjonsko-izmenjivačkih retencionih modela koji su definisani u silika kolonama. Određeni su koeficijenti katjonsko-izmenjivačkih modela a grafički su prikazani uspostavljeni retencioni modeli. Nakon toga, definisani su particioni i adsorpcioni retencioni modeli za koje su određeni odgovarajući regresioni koeficijenti, kao i koeficijenti determinacije. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički uz prateću diskusiju dobijenih rezultata. Dalje, ispitani su dvojni HILIC/RP retencioni modeli, a iz dobijenih regresionih koeficijenata izračunati su minimumi funkcija (ϕ_{\min}) koji odgovaraju sastavu mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza iz RP retencionog mehanizma u HILIC retencioni mehanizam i obratno. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Kako je u ovom delu bilo od značaja da se ispitati uticaj vrste kolone na retenciono ponašanje baznih lekova, variranjem sadržaja acetoničila u mobilnoj fazi u opsegu od 50% do 90% uz održavanje ostalih hromatografskih faktora na konstantnom nivou, analizirana je smeša tioridazina, klozapina, sulpirida, feniramin-maleata, hlorfeniramin-maleata i lamotrigina u pet kolona. Prikazani su odgovarajući hromatogrami i data je diskusija dobijenih rezultata. Kreirani su eksperimentalni modeli primenom hemometrijskog pristupa. Kao eksperimentalni dizajn primenjen je Boks-Benken dizajn, a na osnovu dobijenih rezultata kreirani su odgovarajući eksperimentalni modeli i urađena njihova statistička procena. Adekvatnost dobijenih modela ispitana je ANOVA testom, a dobijeni rezultati potvrdili su adekvatnost dobijenih matematičkih modela, kao i njihovu dobru sposobnost predviđanja odgovora sistema. U cilju detaljnije analize faktorskih uticaja prikazani su tri-D dijagrami na osnovu kojih je dato dodatno tumačenje hromatografskog ponašanja ispitivanih analita u HILIC sistemu. Ovako sveobuhvatan pristup, koji je uključio definisanje i teorijskih i eksperimentalnih modela na odabranoj grupi baznih farmaceutski aktivnih supstanci u HILIC sistemu, po prvi put je opisan u naučnoj literaturi. Rezultati ovih istraživanja publikovani su u: **Jovanović, M., Jančić Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.:** Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.

Treći deo *Rezultata i diskusije* prikazuje kreiranje teorijskih i eksperimentalnih modela u analizi retencionog ponašanja i retencionih mehanizama **odabranih kiselih i neutralnih analita** u amino koloni. Kao model smeša odabrana je smeša farmaceutski aktivnih supstanci sa amidskom i sulfonamidskom funkcionalnom grupom i to: tropikamid, nikotinamid, levetiracetam, piracetam, sulfanilamid, sulfacetamid-natrijum, sulfametoksazol, sulfafurazol, furosemid i bumetanid. U prvoj fazi ovog dela istraživanja definisani su odgovarajući teorijski retencioni modeli koji su omogućili analizu retencionih mehanizama odgovornih za razdvajanje ispitivanih analita u datom HILIC

sistemu. Kako bi se ispitao doprinos procesa anjonske izmene retencionom mehanizmu u ispitivanom HILIC sistemu, najpre je odabran tip pufera, nakon čega su kreirani odgovarajući anjonsko–izmenjivački teorijski retencioni modeli fitovanjem retencionih podataka dobijenih variranjem koncentracije pufera u mobilnoj fazi. Matematički izrazi kojima je pretpostavljen anjonski proces u HILIC sistemu, a koji su predloženi u ovom delu doktorske disertacije, po prvi put su opisani u naučnoj literaturi. Kako je amino kolona hemijska modifikacija silika kolone ovaj tip stacionarne faze može se smatrati umereno polarnim. Samim tim, očekivano je da će analizirane farmaceutski aktivne supstance biti pod uticajem i HILIC i RP retencionog mehanizma. Prema tome, variranjem odnosa vodenog i organskog dela mobilne faze u širokom rasponu vrednosti omogućeno je građenje dvojnih HILIC/RP retencionih modela. Za svaki analit izračunat je odnos vodenog i organskog dela mobilne faze pri kojem dolazi do prelaza jednog mehanizma u drugi. Nakon toga su i HILIC i RP region sastava mobilnih faza zasebno modelovani pomoću adsorpcionih i particionih retencionih modela. Dobijeni modeli iskorišćeni su u svrhu opisa uticaja organskog rastvarača na retenciono ponašanje analiziranih lekova, kao i na razmatranje udela procesa raspodele i adsorpcije u retencionom mehanizmu u amino koloni u svakom od ispitivanih regiona sastava mobilne faze. U drugoj fazi ovog dela istraživanja primenjen je Boks–Benken dizajn u cilju definisanja uslova za građenje eksperimentalnih retencionih modela. Na ovaj način omogućena je istovremena procena uticaja sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi i drugih faktora mobilne faze (pH vrednost vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi) na retenciono ponašanje analiziranih kiselih i neutralnih lekova. Adekvatnost dobijenih matematičkih modela potvrđena je ANOVA testom, a nakon toga je urađena i eksperimentalna verifikacija dobijenih matematičkih modela. U cilju detaljnije analize faktorskih uticaja prikazani su tri-D dijagrami na osnovu kojih je dato dodatno tumačenje hromatografskog ponašanja ispitivanih analita u HILIC sistemu. Od posebnog značaja je i prikazana analiza uticaja strukturnih osobina kiselih i neutralnih analita na njihovo retenciono ponašanje u amino koloni. Rezultati su objavljeni u: **Jovanović, M.**, Jančić Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.

U narednom delu doktorske disertacije data je procena udela procesa adsorpcije i raspodele u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu **neutralnih** farmaceutski aktivnih supstanci na četiri različite kolone (dve silika i dve diolne). Istraživanje su sprovedena na primeru joheksola i njegovih srodnih supstanci (A, B i C) kao neutralnih analita. Eksperimentalno dobijeni podaci, koji karakterišu retenciono ponašanje variranjem odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi u određenom

rasponu, korišćeni su za građenje odgovarajućih teorijskih modela. Kako linearni teorijski modeli (adsorpcioni i particioni) nisu obezbedili zadovoljavajuću aproksimaciju podataka, u tu svrhu kreirani su nelinearni teorijski modeli (kvadratni particioni i mešoviti adsorpciono-particioni modeli). Ovi modeli omogućili su donošenje zaključaka o retencionim mehanizmima analiziranih neutralnih farmaceutski aktivnih supstanci u datim kolonama. Takođe, u ovom delu doktorske disertacije ispitan je uticaj vrste kolone na retenciono ponašanje joheksola i njegovih srodnih supstanci. Prikazani su odgovarajući hromatogrami, kao i diskusija dobijenih rezultata. Dalje, kreirani su eksperimentalni modeli primenom hemometrijskog pristupa. Za analizu smeše joheksola i njegovih srodnih susptanci primenjen je D-optimalni dizajn, a kao matematički model odabran je kvadratni model za četiri ispitivana faktora i njihove dvofaktorske interakcije. Adekvatnost dobijenih matematičkih modela potvrđena je ANOVA testom. Na osnovu kreiranih eksperimentalnih retencionih modela omogućena je kvantitativna procena faktorskih uticaja i njihovih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih komponenti smeše. U cilju dobijanja optimalnih hromatografskih uslova izabrano je indirektno modelovanje odgovora sistema. Identifikacija optimalnih uslova razdvajanja postignuta je tehnikom pretraživanja čvorova mreže, a izabrani optimum potvrđen je eksternom validacijom. U cilju potvrđivanja pouzdanosti postavljene HILIC metode, izvršena je njena kompletna validacija u okviru koje su ispitani svi značajni parametri validacije i potvrđena mogućnost primene optimizovane metode za analizu odgovarajućeg farmaceutskog preparata. Ovim delom doktorske disertacije dat je značajan naučni doprinos analitici joheksola i njegovih srodnih supstanci uz istovremeno unapređivanje naučnih znanja vezanih za hromatografsko ponašanje neutralnih analita u HILIC sistemu. Rezultati su objavljeni u: **Jovanović, M., Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.:** Retention mechanisms assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.

C. UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Pregled do sada publikovanih radova pokazuje da retenciono ponašanje različitih analita, kao i retencioni mehanizmi u HILIC sistemu nisu dovoljno razjašnjeni. Sticanje novih znanja o ovoj oblasti, kao i tumačenje retencionih mehanizama dalo bi veliki naučni doprinos. To je ujedno i bio glavni cilj ove doktorske disertacije.

Sistem hromatografije hidrofilnih interakcija po prvi put je opisao Alpret koji je u svom radu pretpostavio da je osnovni mehanizam u ovom sistemu raspodela [1]. Međutim, pretpostavio je da postoje i drugi procesi koji doprinose ukupnom retencionom mehanizmu. Kasnije, kada je ovaj sistem pokazao značajnu prednost u analizi polarnih i umereno polarnih analita u odnosu na reversno-fazni sistem, došlo je do pojave istraživanja koja se detaljnije bave mehanizmima u HILIC sistemu. Tako je u radu [2] opisana primena particionih, adsorpcionih i mešovutih adsorpciono-particionih retencionih modela u HILIC sistemu. Takođe, povećao se i broj publikovanih radova u kojima je predložen ovaj sistem kao pogodan u analitici nekih lekova. Pregled takvih primena dat je u radu [3] gde su navedeni tipovi polarnih i umereno polarnih analita male i velike molekulske mase za čiju analizu je pogodna HILIC hromatografija.

Proučavanje retencionih mehanizama naučnoj javnosti postalo je posebno interesantno. Tako su u radu [4] prikazana istraživanja koja su bila usmerena na proučavanje debljine vodenog sloja koji se adsorbuje na površinu stacionarne faze u zavisnosti od sastava mobilne faze. Autori rada [5] su na osnovu dobrog fitovanja retencionih podataka 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiola (TRIS) i 2-amino-2-etil-1,3-propandiola (AEPD) u particioni retencioni model na amino koloni došli do zaključka da je u retencionom mehanizmu ovog HILIC sistema primarno zastupljen proces raspodele. U radu [6] retencioni podaci citozina dobijeni na četiri različite kolone (amino, amidna, silika i cviterjonska) bolje su bili aproksimirani adsorpcionim nego particionim modelima. Na taj način je dokazano prisustvo direktne interakcije između molekula analita i površinskih grupa stacionarnih faza, te je zaključeno da je dominantan proces u retencionom mehanizmu bio proces adsorpcije. Do istog zaključka došlo se i u radu [7] gde su retencioni podaci 10 različitih peptida na amidnoj stacionarnoj fazi adekvatno fitovani adsorpcionim modelima. Na isti način je u radu [8] dokazano da je u retencionom mehanizmu dominantan proces adsorpcije benzokaina i cetilpiridinium-bromida na nederivatizovanoj silikagel koloni. U cilju opisivanja retencionog ponašanja nukleozida u šest različitih HILIC kolona (tri silika, dve diolne i jedna β -ciklodekstrinska), gde ni adsorpcioni ni particioni retencioni model nisu mogli da fituju retencione podatke, Liang i saradnici su predložili nelinearni mešoviti adsorpciono-particioni retencioni model [9]. Slični zaključci izvedeni su i u radu [10], u kome je vršena aproksimacija retencionih podataka dobijenih za hidrosolubilne vitamine na diolnoj stacionarnoj u particioni model. Pored navedenih procesa raspodele, adsorpcije ili mešovutih procesa, u literaturi je opisan i katjonski proces izmene. Tako je na primer u radu [11] okarakterisan mehanizam katjonske izmene derivata hidrazina na cviterjonskoj stacionarnoj fazi. Pored toga, dvojni HILIC/RP retencioni modeli predloženi su u radovima [12–14] u cilju opisivanja retencionog

ponašanja analita u širokom rasponu sadržaja vode u mobilnoj fazi na umereno polarnim stacionarnim fazama. Izračunavanjem njihovih minimuma postignuto i određivanje sastava mobilne faze pri kojoj dolazi do prelaza iz HILIC mehanizma u RP mehanizam i obratno.

Sva navedena istraživanja, pokazala su da je HILIC mehanizam veoma složen i nedovoljno proučen pa da je veoma teško predvideti retenciono ponašanje analita na različitim polarnim stacionarnim fazama. Iz tog razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji u HILIC sistemu analizirani su analiti različite polarnosti (kiseli, bazni i neutralni), a čije retenciono ponašanje do sada nije ispitivano u ovom sistemu. Izabrane model smeše po prvi put su ispitivane u HILIC sistemu što je i preduslov za sticanje novih znanja o retencionim mehanizmima. Pregled literature pokazao je da do sada nisu definisani doprinosi različitih procesa (raspodele, adsorpcije, katjonske ili anjonske izmene) ukupnom retencionom mehanizmu ispitivanih analita prema njihovoj polarnosti na različitim polarnim stacionarnim fazama u HILIC sistemu.

S druge strane, na osnovu pregleda literature, pokazalo se da je publikovan veoma mali broj radova u kojima je primenjen hemometrijski pristup za tumačenje složenih interakcija u HILIC-u, kao i u razvoju ovih metoda za analitiku različitih farmaceutski aktivnih supstanci. Jedan od radova je pregledni rad publikovan 2008. godine [15] u kome je dat pregled postavljenih HILIC metoda. Kako do tog trenutka u literaturi nije pronađena nijedna HILIC metoda razvijena primenom hemometrije, istaknut je potencijal ovog pristupa i mogućnosti njegove primene. U nešto novijoj literaturi opisana je primena 3×5 dizajna [16], kao i centralnog kompozicionog dizajna [17] u analizi retencionog ponašanja pojedinih analita. U radu [18] prikazana je optimizacija hromatografskog razdvajanja salicilne, acetilsalicilne i askorbinske kiseline u silikagel koloni hemometrijskim pristupom u HILIC hromatografiji. Sličan pristup primenjen je i u optimizaciji hromatografskog razdvajanja aminoglikozidnih antibiotika na cviterjonskoj stacionarnoj fazi [19] i antidepresiva na silikagel stacionarnoj fazi [20].

Pregled do sada publikovanih radova u kojima je primenjena hemometrija u analizi retencionog ponašanja analita u HILIC sistemu nije veliki. Iz tog razloga, od posebnog je naučnog značaja primena hemometrijskih alata u definisanju i tumačenju retencionih mehanizama u HILIC sistemu. Hemometrijskim pristupom omogućava se sticanje sveobuhvatnijih znanja jer modelovanje hromatografskih sistema pruža mogućnost da se predvidi ponašanje sistema u svakom delu eksperimentalnog prostora. Pored toga, sagledavanje uticaja istovremene promene više faktora u

ovom nedovoljno poznatom i složenom sistemu, koje je moguće jedino primenom hemometrije, posebno povećava naučni doprinos istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. U ovoj doktorskoj disertaciji hemometrija je poslužila da se prošire postojeća, ali steknu i nova znanja kako o retencionim mehanizmima u HILIC sistemu tako i u razvoju HILIC metoda za primenu u analizi jedinjenja slične strukture. Primenom hemometrije za sve analite ispitivane u HILIC sistemu u okviru ove doktorske disertacije, dobijene su novi i naučno značajni podaci.

Literatura:

- [1] Alpert, A.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 449: 177–196.
- [2] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692: 1–25.
- [3] Hemström, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784–1821.
- [4] Buszewski, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 231–247.
- [5] Guo, Y., Huang, A.: A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31: 1191–1201.
- [6] Guo, Y., Gaiki, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1074: 71–80.
- [7] Yoshida, T.: Prediction of peptide retention time in normal-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 811: 61–67.
- [8] Nakov, N., Acevska, J., Brezovska, K., Petkovska, R., Dimitrovska, A.: Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for simultaneous determination of cetylpyridinium chloride and benzocaine in lozenges. *Maced J Chem Chem En* 2012; 31: 47–54.
- [9] Jin, G., Guo, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Y., Liang, X.: Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta* 2008; 76: 522–527.
- [10] Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D.: Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column. *Chromatographia* 2010; 71: 751–759.
- [11] Greco, G.; Grosse, S.; Letzel, T.: Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J Chromatogr A* 2012; 1235: 60–67.

- [12] Urban, J., Škeříková, V., Jandera, P., Kubíčková, R., Pospíšilová, M.: Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds. *J Sep Sci* 2009; 32: 2530–2543.
- [13] Jandera, P., Hájek, T.: Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J Sep Sci* 2009; 32: 3603–3619.
- [14] Soukup, J., Jandera, P.: Hydrosilated silica-based columns: The effects of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids. *J Chromatogr A* 2012; 1228: 125–134.
- [15] Dejaegher, B., Mangelings, D., Vander Heyden, Y.: Method development for HILIC assays. *J Sep Sci* 2008; 31: 1438–1448.
- [16] Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S.: Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia* 2007; 66: 223–229.
- [17] Quiming, N.S., Denola, N.L., Saito, Y., Catabay, A.P., Jinno, K.: Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC. *Chromatographia* 2008; 67: 507–515.
- [18] Hatambeygi, N., Abedi, G., Talebi, M.: Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 5995–6003.
- [19] Kumar, P., Rubies, A., Companyó, R., Centrich, F.: Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J Sep Sci* 2011; 35: 498–504.
- [20] Rakić, T., Jančić Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Improved chromatographic response function in HILIC analysis: application to mixture of antidepressants. *Talanta* 2012; 98: 54–61.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

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

RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU

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

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U ovoj doktorskoj disertaciji, iz naučne oblasti – Analitika lekova, po prvi put dato je sveobuhvatno ispitivanje retencionih mehanizama u tačnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija na primerima odabranih baznih, kiselih i neutralnih analita. Naučna analiza retencionih mehanizama, primenom teorijskih i hemometrijskih postupaka, omogućila je detaljan opis ispitivanih procesa. U ovoj doktorskoj disertaciji, u HILIC sistemu, ispitivani su različiti analiti: jedinjenja iz grupe penicilina i cefalosporina, odabrane farmaceutski aktivne supstance baznih osobina (iz grupe antiepileptika, antihistaminka i antipsihotika), zatim farmaceutski aktivne supstance sa amidskom i sulfonamidskom grupom, kao i neutralna jedinjenja na primeru joheksola i njegovih srodnih supstanci. Analiza svakog hromatografskog sistema podrazumevala je odgovarajući naučni pristup u kome je sveobuhvatno sprovedeno ispitivanje u cilju potpunog shvatanja i kompletne analize ovog, do sada, slabo proučenog hromatografskog sistema. U ovoj doktorskoj disertaciji, po prvi put, su navedeni analiti ispitivani u HILIC sistemu na različitim stacionarnim fazama i protumačeni retencioni mehanizmi. Pored toga, primena hemometrijskih alata omogućila je da se analizirani sistemi opišu sa odgovarajućim matematičkim modelima čija je adekvatnost potvrđena određenim statističkim metodama. Pokazalo se da u naučnoj literaturi hemometrijski alati do sada nisu primenjivani za analizu HILIC sistema, što dodatno daje na značaju ovoj doktorskoj disertaciji. Zapravo, primenom hemometrijskog pristupa došlo se do sticanja novih, veoma značajnih naučnih saznanja, čime je omogućena celovita analiza HILIC sistema. U ovoj doktorskoj disertaciji definisano je više jasnih naučnih ciljeva koji su i ostvareni, što se može zaključiti iz 5 publikovanih naučnih radova u časopisima kategorije M20.

Iz rezultata objavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji, iz 4 publikovana naučna rada u međunarodnim časopisima (*Journal of Chromatography A* – M21, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – M21, *Journal of Separation Science* – M22, *Central European Journal of Chemistry* – M23), 1 revijalnog rada u časopisu *Instrumentation Science and Technology* – M23 i 3 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima, može se zaključiti da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos u teorijskoj i hemometrijskoj analizi retencionih mehanizama različitih analita u tačnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija.

Članovi Komisije predlažu članovima Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivnu ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom *Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tačnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija*, kandidata mr. farm. MARKA JOVANOVIĆA.

*Komisija za ocenu i odbranu
završene doktorske disertacije kandidata
mr. farm. Marka Jovanovića*

Doc. dr Biljana Stojanović, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Mirjana Medenica
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Miroslav Šober
Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet

Beograd, 16. januar 2015. godine