

UNIVERZITET U BEOGRADU - HEMIJSKI FAKULTET

Helena J. Majstorović

**CIJANO-MODIFIKOVANI SILIKA-GEL KAO  
SORBENT  
U PLANARNOJ HROMATOGRAFIJI**

*Doktorska disertacija*

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE - FACULTY OF CHEMISTRY

Helena J. Majstorović

CYANO-MODIFIED SILICA-GEL AS A SORBENT  
IN PLANAR CHROMATOGRAPHY

*Doctoral dissertation*

Belgrade, 2016

*Mentor:*

**dr Dušanka Milojković-Opsenica**

redovni profesor Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

*Članovi komisije:*

**dr Živoslav Tešić**

redovni profesor Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Vlatka Vajs**

naučni savetnik  
Centar za hemiju, IHTM, Beograd

**dr Filip Andrić**

docent Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta u Beogradu.*

*Autor koristi priliku da se zahvali prof. dr Dušanki Milojković-Opsenici na svesrdnoj pomoći i podršci u toku izrade i pisanja rada, kao i na ukazanom poverenju tokom niza godina zajedničkog rada.*

*Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Živoslavu Tešiću na dragocenoj pomoći u toku izrade i pisanja rada, na korisnim savetima i stručnom usmeravanju.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i dr Filipu Andriću na stalnom interesovanju, savetima i nesebičnoj pomoći pri postavci i izradi ove disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Vlatki Vajs na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama pri završnoj izradi rada.*

*I hvala mojim najdražima Aleksu, Lani i Nikoli. Ovaj rad posvećujem njima.*

## **Cijano-modifikovani silika-gel kao sorbent u planarnoj hromatografiji**

Cilj ove disertacije bio je ispitivanje karakteristika i mogućnosti primene cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta umerene polarnosti za odvajanja kako u normalno-faznoj tako i u reverzno-faznoj planarnoj hromatografiji. Planarna, odnosno tankoslojna hromatografija kao podvrsta tečne hromatografije je odabrana pre svega zbog svoje jednostavnosti, brzine i efikasnosti.

Cijano-modifikovani silika-gel, zahvaljujući prisustvu različitih površinskih aktivnih centara (cijano-grupa i alkil-nizova unetih modifikacijom kao i nemodifikovanih silanolnih grupa), može da ostvaruje nekoliko vrsta specifičnih interakcija sa odvajanim supstancama. Stoga je u okviru ovog rada detaljno proučavano retenciono ponašanje različitih klasa neorganskih i organskih supstanci na tankom sloju pomenutog sorbenta za koje je pretpostavljeno da bi mogle specifično da interaguju pre svega sa cijano-grupama sorbenta i svojim ponašanjem ukažu na učešće ovih aktivnih centara u procesu hromatografskog razdvajanja. U tom smislu, posebna pažnja je posvećena ispitivanju sorbenata koji sadrže aromatične delove strukture, kao što su mešoviti ( $\beta$ -diketonato) i ( $\beta$ -ketoiminato) kompleksi prelaznih metala sa različitim brojem fenil-grupa u molekulu, različiti derivati fenola, kao i triazinski derivati i fenoksikarboksilne kiseline, primenom različitih reverzno-faznih i normalno-faznih hromatografskih sistema. U istom cilju poređeni su rezultati ispitivanja hromatografskog ponašanja istih analita u različitim hromatografskim sistemima, odnosno na tankim slojevima sorbenata sa definisanim površinskim aktivnim sorpcionim centrima.

Pored toga, jedan od ciljeva istraživanja bio je i proširenje primene cijano-modifikovanog silika-gela kao specifičnog sorbenta za hromatografiju hidrofilnih interakcija (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) kao relativno novu hromatografsku tehniku.

Takođe, cilj ovoga rada bio je da se, osim teorijskog, istakne i praktičan značaj izvedenih hromatografskih odvajanja, pa je stoga u okviru RP hromatografskih uslova proučavana primenljivost cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u hromatografskim sistemima koji se koriste za modelovanje zemljište-voda podeonih

koeficijenta normiranih na sadržaj organskog ugljenika ( $\log K_{OC}$ ) kao jednim od ključnih parametara koji određuju sudbinu organskih jedinjenja u životnoj sredini.

**Ključne reči:** Tankoslojna hromatografija, cijano-modifikovani silika-gel, mehanizmi odvajanja, normalno-fazna hromatografija, reverzno-fazna hromatografija, hromatografija hidrofилnih interakcija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

## Cyano-modified silica-gel as a sorbent in planar chromatography

The aim of this thesis is testing features and possibilities of using cyano-modified silica-gel as a sorbent of medium polarity for separation in both normal-phase and reversed-phase planar chromatography. Planar *i.e.* thin-layer chromatography as subgroup of liquid chromatography was chosen due to its simplicity, rapidity and efficiency.

Cyano-modified silica-gel, due to the presence of various surface-area active centers (cyano-groups and alkyl-chains inserted by modification as well as non-modified silanol groups), may achieve several types of specific interactions with separated substances. Thus, within this thesis we thoroughly carried out testing of retention behaviour of different inorganic and organic substances on a thin layer of mentioned sorbent that we assume may have specific interaction mainly with cyano groups of sorbent and, consequently indicate the participation of these active centers in the process of chromatographic separation. In that sense, special attention was paid to investigating sorbents which contain aromatic structure parts, such as mixed ( $\beta$ -diketonate) and ( $\beta$ -ketoiminato) complexes of transition metals with different number of phenyl groups in molecule, various derivatives of phenols as well as triazines and phenoxy-carboxylic acids by applying different normal-phase and reversed-phase chromatographic systems. With the same aim, we compared chromatographic behaviour of the same analytes in different chromatographic systems, *i.e.* on thin layers of sorbents with defined surface active sorption centers. Apart from that, one of the aims of this research was to enhance the use of cyano-modified silica-gel as specific sorbent for hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) as a relatively new chromatographic technique.

In addition, the aim of this thesis is to emphasize the practical significance of studied chromatographic besides the theoretical one. Thus, within reversed-phase chromatographic conditions, we examined the use of cyano-modified silica-gel as sorbent for modeling of soil-water partition coefficients normalized to the organic

carbon content ( $\log K_{oc}$ ) as one of the key parameters that define the destiny of organic substances in the environment.

**Key words:** Thin-layer chromatography, cyano-modified silica-gel, separation mechanisms, normal-phase chromatography, reversed-phase chromatography, chromatography of hydrophilic interactions.

Scientific area: Chemistry

Scientific sub-area: Analytical chemistry

UDC Number: 543



## Sadržaj:

		<b>Br.</b>
		<b>str.</b>
<b>1. Uvod</b>	1	1
<b>2. Opšti deo</b>	3	3
2. Planarna hromatografija		3
2.1. Sorbenti u planarnoj hromatografiji		6
2.1.1. Silika-gel		6
2.1.2. Aluminijum oksid		8
2.1.3. Celuloza		10
2.1.4. Hemijski modifikovane stacionarne faze		11
2.2. Mobilne faze u planarnoj hromatografiji		16
2.3. Mehanizmi hromatografskog odvajanja supstanci u planarnoj hromatografiji		19
2.4. Karakterizacija cijano-modifikovanog silika-gela		26
2.5. Primena cijano-modifikovanog silika-gela		35
<b>3. Naši radovi</b>	42	42
3.1. Normalno-fazna planarna hromatografija herbicida		44
3.1.1. Normalno-fazna hromatografija triazina		45
3.1.2. Normalno-fazna hromatografija fenoksikarboksilnih kiselina		50
3.2. Normalno-fazna planarna hromatografija neutralnih metalnih kompleksa		52
3.2.1. Normalno-fazna hromatografija ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa		54
3.2.2. Normalno-fazna hromatografija ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa		58
3.2.3. Normalno-fazna hromatografija <i>tris</i> (alkilksantato)-Co(III) i <i>bis</i> (alkilksantato)-Ni(II) kompleksa		60
3.3. Planarna hromatografija hromatografija fenola		63
3.3.1 Normalno-fazna hromatografija fenola		63

	3.4. Reverzno-fazna planarna hromatografija herbicida	70
	3.4.1. Reverzno-fazna hromatografija triazina	70
	3.4.2. Reverzno-fazna hromatografija fenoksikarboksilnih kiselina	72
	3.5. Reverzno-fazna planarna hromatografija neutralnih metalnih kompleksa	74
	3.5.1. Reverzno-fazna hromatografija ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa	74
	3.5.2. Reverzno-fazna hromatografija ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa	76
	3.5.3. Reverzno-fazna hromatografija <i>tris</i> (alkilksantato)-Co(III) i <i>bis</i> (alkilksantato)-Ni(II) kompleksa	77
	3.6. Reverzno-fazna planarna hromatografija fenola	77
	3.7. Linearno modelovanje zemljište-voda podeonih koeficijenta normiranih na sadržaj organskog ugljenika ( $K_{oc}$ ) reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom	81
	3.7.1. Modelovanje retencija - $\log K_{OC}$ zavisnosti	84
	3.7.2. Određivanje $\log K_{OC}$ vrednosti; poređenje hromatografskog i <i>in silico</i> pristupa	91
	3.7.3. Uticaj stacionarne i mobilne faze na modelovanje $\log K_{OC}$ (CN- nasuprot RP-18-modifikovanog silikagela)	94
	3.8. Hromatografija hidrofilnih interakcija (HILIC) Co(III) kompleksa	95
<b>4. Eksperimentalni deo</b>	101	
	4.1. Ispitivane supstance	101
	4.2. Tankoslojna hromatografija	101
	4.3. HPLC	102
	4.4. <i>In silico</i> procena $\log K_{OC}$ vrednosti	103
	4.5. Modelovanje i analiza podataka	103
<b>5. Zaključak</b>	105	105
<b>6. Literatura</b>	108	108
<b>7. Prilog</b>	124	124

## 1. UVOD

Među širokokorišćenim hromatografskim metodama tankoslojna hromatografija (Thin-Layer Chromatography, TLC) je najjednostavnija za izvođenje. Ova brza, osetljiva i ekonomična tečno-hromatografska metoda može se koristiti za analizu različitih uzoraka, prečišćavanje složenih smeša i razdvajanje i izolovanje pojedinačnih komponenata. Mnoge standardne analitičke metode, uključujući i one koje propisuju različite farmakopeje, su metode tankoslojne hromatografije. Prednost tankoslojne hromatografije u odnosu na druge metode odvajanja ogleda se i u činjenici da ona zahteva male količine i analita i rastvarača čime se uklapa u savremene trendove zelene analitičke hemije<sup>1</sup>.

Takođe, jedan od razloga široke primene tankoslojne hromatografije je i mogućnost izbora i kombinacija velikog broja stacionarnih i mobilnih faza. Poznavanje svojstava stacionarnih faza omogućava njihov pravilan izbor prilikom rešavanja različitih problema vezanih za proces hromatografskog razdvajanja<sup>2</sup>.

Među brojnim stacionarnim fazama koje se primenjuju u TLC, posebno su značajni hemijski-modifikovani sorbenti naročito oni koji sadrže specifične aktivne centre na svojoj površini. Polarne funkcionalne grupe, kod svih ovih sorbenata, vezane su za matriks silika-gela pomoću kratkog nepolarnog dela. Preko polarnih grupa ovi sorbenti ostvaruju specifične interakcije sa sorbendima (normalno-fazna hromatografija), a prisustvo nepolarnih ugljovodoničnih delova na njihovoj površini, omogućava primenu i u reverzno-faznoj hromatografiji<sup>2,3</sup>.

Cijano-modifikovani silika-gel takođe, zahvaljujući prisustvu različitih površinskih aktivnih centara (cijano-grupa i alkil-nizova unetih modifikacijom, kao i nemodifikovanih silanolnih grupa), može da ostvaruje nekoliko vrsta specifičnih interakcija sa odvajanim supstancama. Opsežna ispitivanja su izvedena u cilju razumevanja osnova retencije u normalno- i reverzno-faznoj (RP) hromatografiji sa cijano-vezanim fazama. Pri normalno-faznim (NP) uslovima, cijano-modifikovani silika-gel se ponaša uglavnom kao deaktivirani silika-gel što rezultuje interakcijama analita sa rezidualnim silanolnim grupama. Ukoliko polarnost rastvarača u NP uslovima raste, efekat silanolnih grupa biva potisnut što omogućava cijano-grupama da postanu primarni adsorpcioni centri<sup>4,5</sup>. Pri reverzno-faznim uslovima, smatra se da ulogu

primarnih adsorpcionih centara imaju cijano-grupe, čija koncentracija (relativna populacija) određuje “hidrofobnost” površine sorbenta. Potrebno je istaći da pomenuta “hidrofobnost” sorbenta ustvari predstavlja smanjenje njegovog hidrofilnog karaktera usled supstitucije silanolnih grupa cijano-grupama. Osim toga, utvrđeno je da preostale nemodifikovane silanolne grupe takođe igraju važnu ulogu u određivanju opštih adsorpcionih karakteristika ovog sorbenta i pri RP uslovima<sup>5</sup>. Dobijeni rezultati praktično govore o nepostojanju suštinske razlike u mehanizmu odvajanja prilikom promene eksperimentalnih uslova (NP ili RP sistemi), što je naravno ukazalo da postoji potreba za detaljnim proučavanjem mehanizama odvajanja na ovom sorbentu.

U okviru ovoga rada planirano je ispitivanje retencionog ponašanja različitih neorganskih i organskih supstanci na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela, kao i razjašnjavanje složenih mehanizama ovih odvajanja. Posebna pažnja će biti posvećena ispitivanju hromatografskog ponašanja sorbenada koji sadrže aromatične delove strukture, kao što su mešoviti ( $\beta$ -diketonato) i ( $\beta$ -ketoiminato) kompleksi prelaznih metala sa različitim brojem fenil-grupa u molekulu, različitih derivata fenola, kao i nekih klasa herbicida: triazinskih derivata i fenoksikarboksilnih kiselina. Primena cijano-modifikovanog silika-gela za razdvajanje navedenih klasa neorganskih i organskih supstanci bi mogla da ukaže na ušesće pojedinih aktivnih centara prisutnih na površini ovog sorbenta u ostvarivanju nekih od mogućih specifičnih interakcija. U istom cilju planirano je i poređenje rezultata ispitivanja hromatografskog ponašanja istih analita u različitim hromatografskim sistemima, odnosno na tankim slojevima sorbenata sa različitim (odgovarajućim) površinskim aktivnim sorpcionim centrima. Takođe, brojnost i raznovrsnost razmatranih hromatografskih sistema, pored doprinosa teoriji planarne hromatografije, daće i širi praktičan značaj proširenju primene postojećih i razvoju novih metoda hromatografske analize.

Pored toga, jedan od ciljeva planiranih istraživanja je i ispitivanje mogućnosti primene cijano-modifikovanog silika-gela kao specifičnog sorbenta za planarnu hromatografiju hidrofilnih interakcija (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) kao relativno novu hromatografsku tehniku.

## 2. PLANARNA HROMATOGRAFIJA

U savremenoj analitičkoj hemiji, koja je zasnovana na primeni novih, naprednih metoda i izuzetno sofisticirane opreme, hromatografija zauzima značajno mesto. Praktično je nemoguće zamisliti laboratoriju bez hromatografske opreme. Kontrola kvaliteta, kako sirovina tako i gotovih proizvoda, kontrola proizvodnih procesa, zatim različita medicinska, biohemijska ili istraživanja vezana za kvalitet resursa životne sredine samo su neka od područja primene raznih hromatografskih metoda<sup>6</sup>.

Planarna hromatografija (PC), odnosno hromatografija na ravnoj površini, obuhvata dve tehnike: hromatografiju na hartiji i tankoslojnu hromatografiju (TLC, thin-layer chromatography). Tokom godina, TLC je zamenila hromatografiju na hartiji zahvaljujući većoj brzini, svestranosti i reproduktivnosti<sup>7</sup>. Danas se pod planarnom hromatografijom podrazumeva moderna, odnosno instrumentalna TLC. To je podvrsta tečne hromatografije u kojoj se kao stacionarna faza koristi tanak sloj sorbenta nanet na neku ravnu površinu (staklenu, metalnu ili plastičnu ploču). Kao i svaka druga hromatografska tehnika, tankoslojna hromatografija je višestepeni proces raspodele supstanci između dve faze. Do razdvajanja u TLC dolazi zbog različite brzine kretanja odvajanih supstanci kroz sloj sorbenta tokom određenog vremena razvijanja hromatograma. Zadržavanje, odnosno retencija, supstanci u ovom sistemu izražava se pomoću retardacionog faktora, odnosno  $R_F$  vrednosti, koja predstavlja odnos puta koji je prešla analizirana supstanca i puta rastvarača:

$$R_F = \frac{x}{f} \quad (1)$$

gde je  $x$  pređeni put supstance od polazne mrlje do težišta hromatografske zone, dok je  $f$  pređeni put rastvarača od polazne mrlje do fronta rastvarača<sup>2</sup>. Zone sa pojedinačnim odvajanim supstancama (hromatografske mrlje) su fiksirane u prostoru po završetku odvajanja, omogućavajući „off-line“ praćenje hromatografskog procesa<sup>7,8</sup>.

Među širokokorišćenim hromatografskim metodama TLC je najjednostavnija za izvođenje. Ova brza, osetljiva i ekonomična tečno-hromatografska metoda može se koristiti za razdvajanje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu raznih organskih i neorganskih supstanci. TLC je tehnika koja se razlikuje od HPLC u konfiguraciji

stacionarne faze, dok su mehanizmi odvajanja ove dve metode isti<sup>9</sup>. Tako, u brojnim studijama HPLC se zamenjuje jednako efikasnom, ali jednostavnijom TLC<sup>9,10</sup>.

Intenzivan razvoj TLC kao metode za analizu različitih uglavnom organskih jedinjenja, je počeo sredinom dvadesetog veka. Tankoslojna hromatografija je uvedena 1938. godine od strane M.S.Shraiber-a i N.A. Izmailov-a. Sredinom XX veka, zahvaljujući radu E. Stah-a ova tehnika je zauzela veoma važno mesto u kvalitativnim i semikvantitativnim analizama kompleksnih smeša kao što su prirodni proizvodi, farmaceutski, hemijski i mikrobiološki sintetički proizvodi<sup>9,10</sup>. Stahl-ov najveći doprinos za razvoj TLC kao hromatografske tehnike se ogleda u standardizaciji materijala, postupaka, nomenklature i utvrđivanju selektivnih sistema rastvarača za postizanje zadovoljavajućeg odvajanja važnih klasa jedinjenja<sup>3</sup>.

Kontinuirano unapređenje TLC u pogledu intenzivog razvoja teorije, prakse i instrumentacije rezultiralo je metodama nazvanim “visoko-efikasna tankoslojna hromatografija, high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)” i “instrumental HPTLC”<sup>9-12</sup>. HPTLC, koja se kao moderna planarna hromatografska tehnika široko koristi u mnogim oblastima nauke i tehnologije, predstavlja napredan oblik instrumentalne TLC koja podrazumeva korišćenje slojeva adsorbenata visokih performansi, složene opreme, standardizovanje metodologija za razvoj, dokumentovanje i optimizaciju procesa razdvajanja, kao i korišćenje validovanih metoda analize<sup>10</sup>.

Savremena TLC je instrumentalna tehnika koja se po svojoj tačnosti i preciznosti može porediti sa gasnom hromatografijom (GC) i HPLC<sup>10</sup>. Štaviše, HPTLC ima nekoliko prednosti nad HPLC i drugim tehnikama, kao što su: (1) mala količina uzorka je potrebna za analizu, (2) niska osetljivost na nečistoće, (3) širok izbor adsorbenata i rastvarača za razvijanje, (4) ne postoji mogućnost interferencije sa prethodnim analizama budući da se sveže stacionarne faze koriste za svaku analizu, (5) potrošnja mobilne faze po uzorku je izuzetno niska, (6) mnogi uzorci mogu biti odvojeni paralelno na istoj ploči rezultirajući visokom produktivnošću i brzim i jeftinijim analizama, (7) bolja preciznost i tačnost uzrokovana simultanim analizama uzorka i standarda pod istim uslovima, (8) instrumentacija je relativno jeftina i jednostavna za rukovanje, (9) laka i brza optimizacija, (10) kratko vreme analize, (11) mogućnost čuvanja hromatograma sa odvojenim uzorcima i njihova kasnija detekcija

(bez obzira na mesto i vreme izvođenja procesa odvajanja), (12) mogućnost kvantitativne obrade hromatograma dobijenih na različitim mestima korišćenjem istog denzitometra, (13) mogućnost spektroskopske identifikacije hromatografskih zona nakon razdvajanja (preko bilo kog opsega talasnih dužina uključujući i IR oblast), (14) mogućnost planiranja pojedinih operacija (nanošenje uzoraka, razvijanje, detekcija i kvantitativna analiza), zato što ove operacije mogu biti izvedene nezavisno od vremenskog intervala između njih<sup>9,10,13</sup>.

Dalji razvoj tečno-hromatografskih metoda rezultirao je primenom monolitnih materijala u hromatografiji. Ovaj revolucionarni napredak doveo je do uvođenja takozvane ultra-efikasne TLC (ultra-performance thin-layer chromatography, UPTLC) početkom XXI veka. UPTLC, bilo sa monolitnim ili nanostrukturnim sorbentima, ima mnogo prednosti u odnosu na HPTLC kao što su: brže razdvajanje (1-6 min, umesto 3-20 min u HPTLC) na kraćem putu (1-3 cm, umesto 3-5 cm) kako zbog manje debljine sloja stacionarnih faza (10  $\mu\text{m}$  u odnosu na 100-200  $\mu\text{m}$ ) tako i zbog finijih pora (1-2  $\mu\text{m}$  makropore i 3-4 nm mezopore). Shodno tome, potrošnja mobilnih faza se smanjuje na desetine puta. U većini slučajeva, UPTLC odlikuje niska granica detekcije, ali i lošija rezolucija zbog kraćeg puta razvijanja i manje dostupnosti specifične površine. To je razlog što je još uvek HPTLC najrasprostranjenija PC metoda<sup>10</sup>.

Tankoslojna hromatografija može biti veoma uspešno kombinovana sa visoko-efikasnom tečnom hromatografijom, masenom spektroskopijom (MS), infra-crvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (FT-IR), nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR) i Ramanovom spektroskopijom dajući daleko više detaljnih analitičkih podataka o odvajanim supstancama<sup>3,7,11,14</sup>.

## 2.1. Sorbenti u planarnoj hromatografiji

TLC nudi veći izbor stacionarnih faza nego bilo koja druga hromatografska tehnika, uključujući neorganske, organske, adsorpcione, podeone, jonsko izmenjivačke, hiralne, mehanički impregnirane, polarne i nepolarne hemijski modifikovane, pufervane, mešovite i gradijentne slojeve<sup>15</sup>. Prema CAMAG-ovoj bibliografiji, 34 stacionarnefaze se koriste u planarnoj hromatografiji pri čemu oko 92% svih aplikacija je izvedeno na silika-gelu<sup>9</sup>.

Da bi se mogao koristiti u PC sorbent mora ispunjavati određene uslove:

- ✓ treba da formira hemijski i fizički stabilan sloj,
- ✓ ne sme da gradi kovalentne veze sa odvajanim supstancama,
- ✓ treba da bude nerastvorljiv u mobilnoj fazi,
- ✓ ne bi trebalo da migrira sa mobilnom fazom duž ploče,
- ✓ ne bi trebalo da sadrži komponente koje ometaju odvajanje ili detekciju,
- ✓ ne bi trebalo da bude obojen i ne bi trebalo da apsorbuje svetlost.

Staklo, aluminijumske folije i polimerni filmovi (pre svega, polietilen tereftalat) se koriste kao podloga za sorbente. Veziva, kao što su gips (5-10%), silicijumove soli, alkalni silikati, poliakril-amid, poliakrilni estri i skrob, koriste se za stabilizaciju sloja sorbenta na podlozi<sup>9</sup>.

Među brojnim neorganskim i organskim sorbentima koji se upotrebljavaju u TLC najznačajniji su: silika-gel, aluminijum-oksidi, celuloza, poliamidi i hemijski modifikovani silika-gelovi<sup>2</sup>.

Postoji više različitih načina klasifikacije sorbenata koji se koriste u TLC. Najpraktičnija je podela prema hemijskoj prirodi sorbenta na sorbente sa uniformnim hemijskim karakteristikama (silika-gel, aluminijum-oksidi, celuloza, poliamid) i sorbente sa kombinovanim hemijskim karakteristikama (modifikovani silika-gelovi)<sup>16</sup>.

### 2.1.1. Silika-gel

Silika-gel je najznačajnija od svih stacionarnih faza dostupnih za TLC i ujedno najčešće korišćeni sorbent sa uniformnim karakteristikama<sup>2,17</sup>. Osim toga, on je i najčešće korišćeni materijal za pripremu većine tzv. vezanih faza, odnosno hemijski modifikovanih sorbenata. Silika-gel može biti proizveden različitim postupcima kao što



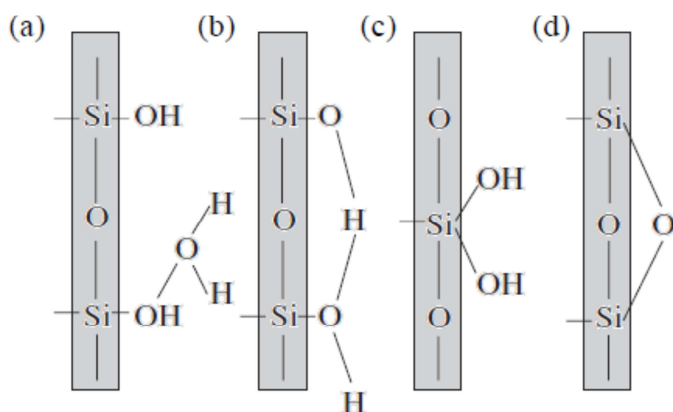
su potpuna hidroliza natrijum-silikata ili polikondenzacija i dehidracija emulzije etoksisiloksana. U zavisnosti od primenjenog postupka dobijeni proizvodi se međusobno razlikuju po specifičnoj površini i poroznosti<sup>2</sup>. Osim toga, karakteristike krajnjeg proizvoda zavise od eksperimentalnih uslova u kojima se postupak sinteze odvija (pH-vrednost, koncentracija, prisustvo aditiva, sadržaj metala, brzina mešanja i veličina reakcione posude)<sup>6,18</sup>. Sadržaj metala u početnom materijalu je jedan od veoma važnih parametara jer određuje koncentraciju kiselih silanolnih grupa. “Standardni” silika-gel sadrži do 250 ppm natrijuma i 150 ppm aluminijuma pored ostalih katjona. Njegova reakciona površina može biti i bazna, zavisno od tipa i koncentracije prisutnih jona. “Novi”, silika-gelovi sa niskim sadržajem metalnih jona ne sadrže više od 1 ppm natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, kao i aluminijum i gvožđe u neznatno višoj koncentraciji<sup>19</sup>.

Velika specifična površina od 400-600 m<sup>2</sup>/g čini silika-gel odličnim adsorbentom. Međutim, to izaziva veoma visok afinitet za molekule vode iz okruženja<sup>9</sup>. Step en pokrivenosti površine silika-gela molekulima vode je važan parametar koji određuje aktivnost ovog sorbenta. Termalna gravimetrijska analiza i FTIR spektroskopija pokazuju da se fizički adsorbovana voda može ukloniti na oko 200 °C. Dehidracija na višim temperaturama rezultuje nastajanjem siloksanskih grupa. Uklanjanje reakciono sposobnih silanolnih grupa praćeno je smanjenjem specifične površine adsorbenta. Potpuno dehidratirana površina silika-gela je u najvećoj meri fizički i hemijski neaktivna, pa takav sorbent nije pogodan za primenu u adsorpcionoj hromatografiji<sup>2,5,20</sup>.

Osnovne hromatografske karakteristike silika-gela određene su prisustvom specifičnih aktivnih centara na njegovoj površini<sup>2,17,18</sup>, odnosno silanolnih (-Si-OH) i siloksanskih (-Si-O-Si-) grupa, (Slika 1)<sup>9</sup>. Premda se sve funkcionalne grupe na površini ponašaju kao adsorpcioni centri, one imaju različite karakteristike.

Silanolne grupe su jaki adsorpcioni centri hidrofilne prirode. Postoje tri vrste silanolnih grupa na površini silika-gela: slobodne, geminalne i vicinalne silanolne grupe. Ova tri tipa imaju različitu adsorpcionu aktivnost i brojna istraživanja su sprovedena u cilju određivanja koja vrsta silanolnih grupa je dominantna kao primarni adsorpcioni centar<sup>17</sup>. Raspodela silanolnih grupa na površini silika-gela, kao i njihova lokalna gustina uslovljavaju razlike u retenciji supstanci na različitim silika-gelovima, a

osim toga utiču i na tok derivatizacionih reakcija u procesu dobijanja hemijski modifikovanih silika-gelova<sup>17</sup>. Siloksanske grupe su proizvod kondenzacije vicinalnih silanolnih grupa, hidrofobnog su karaktera i pokazuju manji uticaj na retenciju supstanci izražavajući proton-akceptorska svojstva<sup>16</sup>.



Slika 1. Vrste aktivnih grupa na površini silika-gela: a) slobodne silanolne grupe, b) geminalne silanolne grupe, c) vicinalne silanolne grupe i d) siloksanske grupe<sup>9</sup>.

Kao moguće interakcije koje određuju retenciju odvajanih supstanci na silika-gelu, mogu da se jave vodonične veze, dipol-dipol i druge elektrostatičke interakcije. Jačina navedenih interakcija zavisi, pre svega, od broja efektivnih silanolnih grupa, hemijske strukture odvajanih supstanci, kao i od elucione moći upotrebljene mobilne faze<sup>2,21</sup>.

Osim velike primene u adsorpcionoj hromatografiji, silika-gel se koristi i kao nosač tečne stacionarne faze u particionoj hromatografiji. Za ovu svrhu naročito su pogodni silika-gelovi koji imaju veliku zapreminu pora i malu specifičnu površinu<sup>21</sup>. U idealnom slučaju particione hromatografije, tj. kada nema adsorpcionih interakcija, retencija supstanci zavisi od odgovarajućih podeonih koeficijenata kao i od zapremina stacionarne i mobilne faze<sup>2</sup>.

### 2.1.2. Aluminiјum-oksид

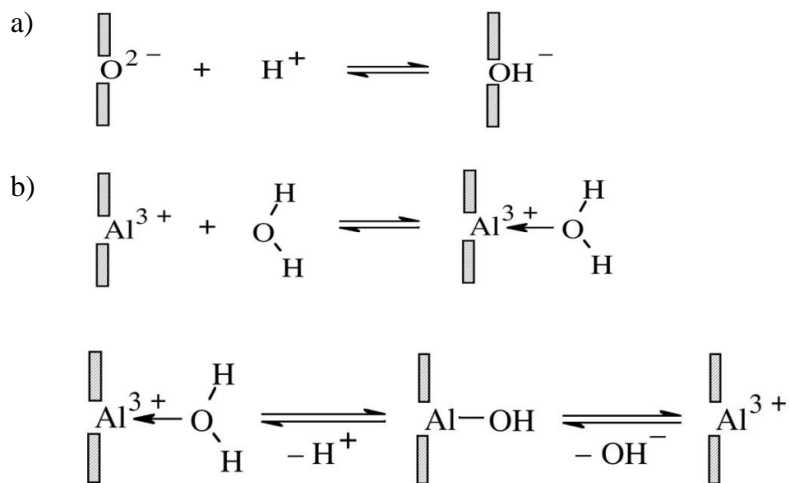
Pored silika-gela, aluminiјum-oksид je najrasprostranjeniji polarni neorganski adsorbent u TLC<sup>2,22</sup>. Dobija se termičkom dehidratacijom hidratisanog aluminiјum-

oksida. U zavisnosti od karakteristika polaznog materijala i temperature dehidracije, dobijaju se različiti kristalni oblici aluminijum-oksida. Njih karakteriše različita specifična površina, zapremina i prečnik pora, pa zbog toga imaju i različita hromatografska svojstva<sup>2</sup>. U tankoslojnoj hromatografiji najčešće se koristi  $\gamma$ -kristalna modifikacija  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , specifične površine od 100 do 200  $\text{m}^2/\text{g}$  i prečnikom pora od 6, 9 i 15 nm (60, 90 i 150 Å)<sup>22</sup>.

Hromatografske karakteristike aluminijum-oksida i silika-gela su slične, ali se tanak sloj aluminijum-oksida odlikuje većom energijom adsorpcije molekula sa dvostrukim ugljenik-ugljenik vezama i boljom selektivnošću odvajanja aromatičnih ugljovodonika i njihovih derivata, što čak omogućava razdvajanje izomera. Mehanizam hromatografskog odvajanja supstanci na aluminijum-oksidu složeniji je nego na silika-gelu budući da je površina aluminijum-oksida heterogenija od površine silika-gela<sup>2,22</sup>. Slično silika-gelu, aluminijum-oxid gubi vodu na temperaturama iznad 200 °C, ali dok silika-gelu aktivnost pri tome opada, kod aluminijum-oksida raste. Ova činjenica ukazuje na to da površinske hidroksilne grupe ovog sorbenta nisu jedine koje doprinose njegovoj aktivnosti i da građenje vodoničnih veza između sorbenda i površinskih hidroksilnih grupa ili atoma kiseonika sorbenta nema značajnije učešće u adsorpciji na aluminijum-oksidu<sup>2,22</sup>. Važnu ulogu u adsorpcionim procesima na aluminijum-oksidu igraju Luisovi (Lewis) kiseli centri ili proton-donorski centri (odgovorni za adsorpciju većine polarnih i nezasićenih jedinjenja) i Luisovi bazni centri ili proton-akceptorski centri (odgovorni za adsorpciju kiselina)<sup>2,6</sup>.

Komercijalno su dostupne tri vrste aluminijum-oksida za hromatografiju na tankom sloju: kiseli, bazni i neutralni<sup>22,23</sup>. Kiseli aluminijum-oxid ima svojstva anjonskog izmenjivača<sup>2,21</sup>. Koristi se za razdvajanje kiselih pigmenta (prirodnih i sintetičkih) i jakih kiselina. Bazni aluminijum-oxid je pogodan za odvajanje različitih baznih i neutralnih jedinjenja (baza, alkohola, ugljovodonika, steroida, alkaloida, prirodnih pigmenta), a može imati i svojstva katjonita. Njegov nedostatak je da može da izazove reakcije polimerizacije, kondenzacije i dehidracije, zbog čega se isključuje korišćenje acetona ili etilacetata kao eluenta. Takođe, na njemu može dolaziti do jakog vezivanja katjonskih supstanci ili do razlaganja jedinjenja osetljivih na dejstvo baza<sup>2</sup>. Neutralni aluminijum-oxid ne pokazuje jonsko-izmenjivačka svojstva i primenjuje se

za razdvajanje aldehida, ketona, estara, hinona, laktona i glukozida. Njegov nedostatak je znatno manja aktivnost od odgovarajućeg baznog oblika.



Slika 2. Aktivni centri na površini alumijum-oksida<sup>2</sup>: a) Luisovi kiseli centri; b) Luisovi bazni centri

Oktil-, oktadecil-, perfluoroacil-, polibutadien- i cijano- polimerno modifikovani aluminijum-oksidi predstavljaju pet tipova hidrofobnih modifikacija ovog sorbenta. Poslednji pomenuti modifikovani sorbent daje selektivnost sličnu onoj na cijano-modifikovanom silika-gelu, s tim što pokazuje stabilnost u pH opsegu 2-13<sup>18</sup>. Konačno, brojne uspešne aplikacije opisane za različite hemijski modifikovane aluminijum-oksidi ilustruju njihovu potencijalnu primenljivost u daljim hromatografskim istraživanjima<sup>24</sup>.

### 2.1.3. Celuloza

Celuloza je polaran organski sorbent često primenjivan u hromatografiji na tankom sloju. To je visoko polimerizovani polisaharid sastavljen od  $\beta$ -glukopiranoznih jedinica<sup>21,22</sup>. Prisustvo velikog broja slobodnih hidroksilnih grupa na površini celuloze omogućuje adsorpciju vode i alkohola iz upotrebljenih hromatografskih rastvarača. Ovo čini celulozu naročito pogodnim sorbentom za odvajanje hidrofilnih supstanci i to najčešće mehanizmom normalno-fazne podeone hromatografije<sup>2</sup>. U hromatografiji na tankom sloju primenjuju se dva osnovna tipa celuloze: prirodna (vlaknasta) celuloza, koja ima između 400 i 500 jedinica u lancu, i mikro-kristalna celuloza koja se dobija

delimičnom hidrolizom regenerisane celuloze i ima između 40 do 200 jedinica po lancu<sup>23</sup>.

Hromatografske karakteristike ova dva sorbenta veoma su slične, ali su zone koje se dobijaju na tankim slojevima mikrokristalne celuloze mnogo kompaktnije. Hemijskim modifikacijama ili impregnacijom celuloze mogu se dobiti različiti slojevi sa reverzno-faznim odnosno jonsko-izmenjivačkim karakteristikama. Acetilovana celuloza (modifikacija sa reverzno-faznim karakteristikama) se uglavnom koristi za odvajanje enantiomera, dok su slojevi sa jonsko-izmenjivačkim karakteristikama našli primenu kod odvajanja visokomolekularnih organskih jedinjenja (proteina, nukleinskih kiselina i njihovih derivata i sl.)<sup>2,23</sup>.

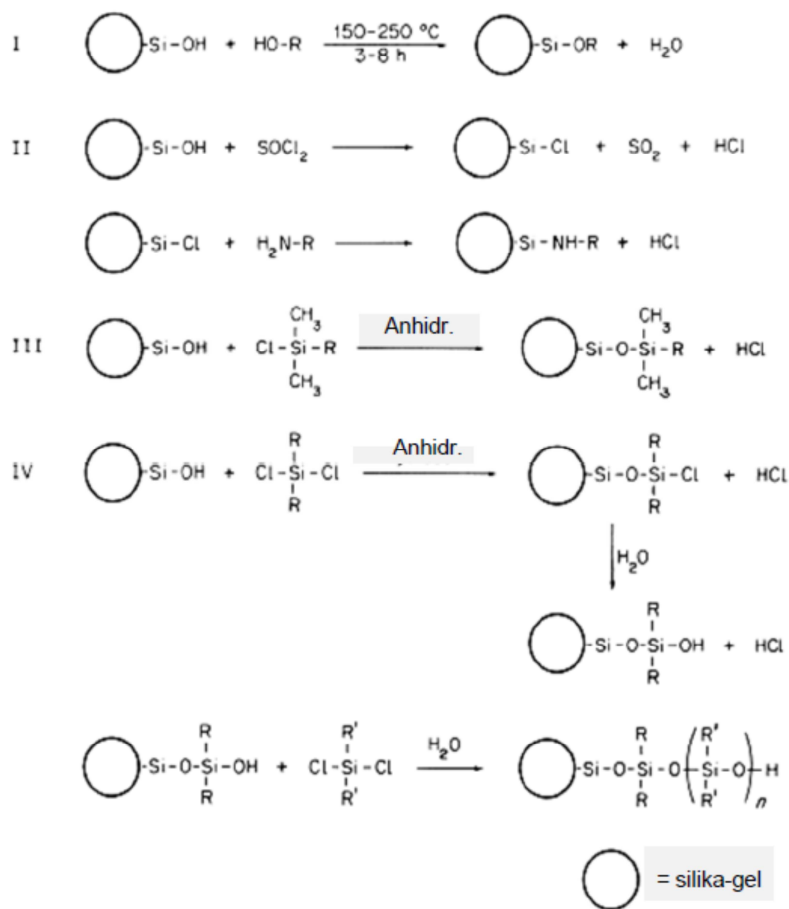
Za razliku od jonsko-izmenjivačkih smola na bazi organskih kopolimera, odvajane supstance na tankim slojevima celuloznih jonskih izmenjivača pokazuju normalno-fazni redosled, što je posledica hidrofilnosti celuloznog matriksa<sup>2</sup>.

#### 2.1.4. Hemijski modifikovane stacionarne faze

Hemijski modifikovani silika-gelovi su posebna kategorija sorbenata uvedenih i prvobitno razvijanih za kolonsku hromatografiju, koji su, međutim, veoma brzo našli široku primenu i kao sorbenti u hromatografiji na tankom sloju<sup>2</sup>. Termalna i hidrolitička stabilnost ovih slojeva je jako dobra<sup>5</sup>.

Najveći deo hemijski vezanih stacionarnih faza koje se u današnje vreme široko primenjuju je zasnovan na modifikaciji silika-gela<sup>6</sup>. Dobijaju se reakcijom površinskih silanolnih grupa silika-gela sa različitim organskim i organo-silikonskim jedinjenjima<sup>1</sup>. Sinteza hemijski vezanih silika-gelova se izvodi na dva načina<sup>2,18</sup>: “*zapreminskom modifikacijom*” koja podrazumeva vezivanje organskog modifikatora u toku procesa formiranja poroznog sorbenta ili “*površinskom modifikacijom*”, koja obuhvata reakcije između površinskih silanolnih grupa silika-gela sa različitim organskim i organo-silikonskim jedinjenjima (organskim modifikatorima). Površinska modifikacija se smatra lakšom za izvođenje, pa se zbog toga češće koristi.

Vezivanje organskih modifikatora za površinu silika-gela može biti ostvareno na četiri različita načina, koji su detaljno proučeni i opisani u literaturi (Slika 3)<sup>2,6,19-21</sup>.

Slika 3. Hemijske modifikacije silika-gela<sup>19</sup>.

I) *Modifikacija tipa Si-O-C* nastaje esterifikacijom silika-gela alkoholom, ROH, gde R može biti alkil- ili bilo koja druga funkcionalna grupa (Slika 3, I). Ovakvi silikatni estri imaju nezadovoljavajuću hidrolitičku stabilnost, ali zbog lakoće izvođenja postupka sinteze, ovaj tip modifikacije postaje standardna procedura vezivanja svih klasa vezanih faza.

II) *Modifikacija tipa Si-N* se postiže prvobitnim hlorovanjem silanolnih grupa prisutnih na površini silika-gela tionilhloridom, a zatim reakcijom novonastalih hlornih derivata sa alifatičnim aminima, odnosno njihovim derivatima pri čemu nastaju aminosilani (Slika 3, II).

Ovakve stacionarne faze imaju zadovoljavajuću stabilnost čak i u vodenim sistemima.

III) *Modifikacija tipa Si-O-Si-C* nastaje kao posledica reakcije silika-gela sa funkcionalizovanim hlorsilanolnim reagensom (Slika 3, III).

Sorbenti dobijeni na ovaj način imaju dobru hidrolitičku i termalnu stabilnost u pH oblasti od 1 do 8 i nalaze sve veću primenu u reverzno-faznoj hromatografiji.

IV) *Vezivanje tipa Si-C* može biti ostvareno Grinjarovom reakcijom pri čemu se alkil- i aril- supstituenti hemijski vezuju na površinu silika-gela formirajući veoma stabilne (termalno i solvolitički) Si-C veze (Slika 3, IV).

Prisustvo ili odsustvo vode u toku procesa formiranja, odnosno sinteze hemijski modifikovanih sorbenata, utiče na debljinu formiranog sloja, pa se prema tome mogu razlikovati monomerni, polimerni i oligomerni slojevi<sup>18</sup>.

Monomerno vezivanje se ostvaruje sa monofunkcionalnim, difunkcionalnim i trifunkcionalnim silanima u odsustvu bilo kakve količine vode. Ovakav način vezivanja karakteriše praktično idealno definisana struktura, koja sadrži površinu sa funkcionalizovanim i nefunkcionalizovanim alkil-lancima. Vezivanje analita se u ovom slučaju ostvaruje njegovim prodiranjem unutar, u manjoj ili većoj meri, orijentisanih lanaca, pri čemu će se veći hromatografski uticaj preostalih silanolnih grupa osećati utoliko više ukoliko su brojnije i ukoliko su pristupačnije na površini silika-gela. Suprotno, veoma gust sloj alkil-lanaca će prouzrokovati da se vezivanje analita dešava samo na krajevima vezanih alkil-lanaca. U okviru ovakve strukture gusto raspoređenih alkil-lanaca hromatografski uticaj nemodifikovanih silanolnih grupa je praktično beznačajan.

Korišćenjem trifunkcionalnih silana u prisustvu vode, silanolne grupe i adsorbovana voda mogu reagovati sa reagensom uzrokujući reakcije unakrsnog povezivanja koje vode vertikalnoj polimerizaciji. Ovaj tip vezivanja rezultuje formiranjem polimernih slojeva kod kojih vezivanje analita može biti ostvareno na dva načina: prodiranjem supstance između lanaca ili potpunim rastvaranjem supstance u stacionarnoj fazi. Stacionarne faze ovog tipa, uopšteno govoreći, nisu orijentisane kao što je slučaj sa monomernim vezivanjem. Ove stacionarne faze karakteriše niska efikasnost, nedovoljna reproduktivnost i otežano merenje stepena polimerizacije.

Poslednji tip vezivanja je oligomerno vezivanje. Postupak se sastoji u potpuno kontrolisanoj vertikalnoj polimerizaciji, gde je praktično svaki korak zapravo sinteza

monomernog tipa. Rezultujući materijal je nepolaran i veoma stabilan, a retencija supstanci je isključivo kontrolisana disperzionim interakcijama. Ova struktura je veoma stabilna i dozvoljava rad na niskim pH-vrednostima. Nedostatak ovih oligomernih faza je njihova izuzetno teška sinteza, te stoga one još uvek nisu komercijalno široko dostupne, mada pokazuju čitav niz prednosti u odnosu na monomerne i polimerne slojeve.

Prilikom procesa modifikacije, prvenstveno usled sternih smetnji, oko 40-50% silanolnih grupa ostaje nemodifikovano. Nemodifikovane silanolne grupe reaguju sa odvajanim supstancama uzrokujući razvlačenje pikova i smanjenje rezolucije (lošije razdvajanje). Problem nepotpune modifikacije može biti rešen modifikacijom mobilne ili stacionarne faze. Modifikacija mobilne faze obuhvata nekoliko alternativnih rešenja<sup>18</sup>.

- suzbijanje protolize silanolnih grupa korišćenjem jako kisele mobilne faze;
- suzbijanje protolize baznih (odnosno kiselih) analita povećanjem (odnosno smanjenjem) pH- vrednosti mobilne faze;
- dodavanje konkurentnih reagenasa u mobilnu fazu kao što su tretilamin, alkilamonijum komponenti ili dvovalentnih jona, na primer barijuma, koji će dodatno smanjiti razvlačenje pikova “blokiranjem” silanolnih grupa.

Ukoliko se, pak, problem rešava modifikacijom stacionarne faze, tada su na raspolaganju sledeće mogućnosti<sup>18</sup>:

- eliminacija silanolnih grupa
  - ✓ takozvani “end capping” postupak – vrsta maskiranja preostalih silanolnih grupa nakon procesa modifikacije tretiranjem silika-gela odgovarajućim silanizirajućim agensima npr. trimetilhlorsilanom ili trimetilsililimidazolom;
  - ✓ unakrsno umrežavanje – prisustvo silanolnih grupa je poništeno prevlačenjem površine silika-gela polimerima npr. skvalenom;
  - ✓ horizontalna polimerizacija – horizontalnom polimerizacijom smešom trifunkcionalnih silanizirajućih agenasa gradi se dvodimenzionalna mreža iznad hromatografske površine silika-gela koja smanjuje disocijaciju površinskih silanolnih grupa.



- sterna zaštita silanolnih grupa

- ✓ vezivanjem sa dugolančanim alkilmonohlorosilanima C-22 ili C-30 alkil-lanci će interagovati prvenstveno jedni sa drugima, formirajući preklapajuće lance koji smanjuju pristupačnost površinskih silanolnih grupa;
- ✓ visokom gustinom vezivanja – pri visokoj gustini vezivanja, alkil-lanci interaguju prevashodno jedni sa drugima ometajući na taj način pristup površinskim silanolnim grupama:
- ✓ sternom zaštitom silika-gela – voluminozne, diizobutil- ili diizopropil-grupe, stabilizuju kako duge tako i kratke lance monofunkcionalnih liganada i štite ih od hidrolize na niskim pH-vrednostima;
- ✓ formiranjem bidetantnih silika-gel stacionarnih faza – modifikacija sa bidetantnim alkil-lancima ograničava pristup neizreagovanim silanolnim grupama kroz zajednički uticaj uvedenih bidetantnih silana i dvostrukog “end capping” procesa u cilju zaštite silika-gela od hidrolize na visokim pH-vrednostima;

- elektrostatička zaštita (uvođenje polarnih grupa)

- ✓ monoslojno vezivanje – alkil-lanci koji sadrže amidne, karbamatne ili kvaternarne amonijum grupe vezivanjem za površinu silika-gela formiraju elektrostatički štiti za silanolne grupe od visoko polarnih analita;
- ✓ višeslojno vezivanje – alkil-lanci koji sadrže amidne grupe su vezani za površinu silika-gela a reakcije između silanolnih grupa i analita su ograničene elektrostatičkim štitiom;
- ✓ formiranje poliglikol-alkil vezanih faza – vezivanjem tetraetilen glikola putem hidrofobnih lanaca će u manjoj meri ukloniti silanolni efekat.

Karakteristike hemijski modifikovanih silika-gelova zavise kako od karakteristika organskog modifikatora i primenjenog procesa modifikacije, tako i od fizičkih karakteristika upotrebljenog silika-gela. Usled prisustva funkcionalnih grupa unetih modifikacijom, s jedne strane, i nemodifikovanih hidroksilnih grupa s druge strane, hemijski modifikovani silika-gelovi predstavljaju sorbente okarakterisane složenom površinom. Neki od tipičnih primera hemijski modifikovanih silika-gelova navedeni su u Tabeli 1<sup>2,19,20</sup>.

Tabela 1. Funkcionalne grupe nekih hemijski modifikovanih silika-gelova

Grupa	Formula	Grupa	Formula
Oktadecil	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	Amino	$-\text{NH}_2$
Oktil	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	Nitro	$-\text{NO}_2$
Heksil	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	Cijano	$-\text{CN}$
Trimetil	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	Oksipropionitril	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
Alikilkarmabamat	$-\text{CO}(\text{CO})\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	<i>vic</i> -Hidroksil (diol)	$-\text{CH}-\text{CH}_2$     OH OH
Cikloheksil	$-\text{C}_6\text{H}_{11}$	Fluoroalkil	$-(\text{CF}_2)_n\text{CF}_3$
Fenil	$-\text{C}_6\text{H}_5$	Polikaprolaktam (poliamid, najlon)	$-\text{[NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}]_n-$
Difenil	$-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$		
Dimetilamino	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$		

Prema prirodni funkcionalnih grupa unetih modifikacijom, uobičajena je podela hemijski modifikovanih silika-gelova na hidrofilno i hidrofobno modifikovane. Modifikovani silika-gelovi koji sadrže nepolarne (hidrofobne) grupe, najčešće dimetil- (C2), oktil- (C8), dodecil- (C12) ili oktadecil- (C18) ugljovodonične nizove, kombinovani sa polarnim mobilnim fazama primenjuju se kao sorbenti u reverzno-faznoj hromatografiji<sup>2</sup>. Reverzno-fazni sistemi su pogodni za odvajanje supstanci koje su rastvorne u relativno polarnim rastvaračima i čija je sorpcija iz takvih rastvarača slaba. Pored toga, ovakvi sistemi pogodni su i za odvajanje nepolarnih jedinjenja koja se slabo sorbuju na polarnim sorbentima iz nepolarnih rastvarača<sup>2</sup>.

Među polarnim (hidrofilno) modifikovanim silika-gelovima najveću primenu u hromatografiji na tankom sloju imaju cijano-propil-, amino-propil- i diol-modifikovani silika-gelovi<sup>2,19</sup>. Polarne vezane faze primenjuju se za normalno-faznu hromatografiju umereno do jako polarnih supstanci. Međutim, kako one sadrže i nepolarne ugljovodonične segmente, koji ovim sorbentima daju određeni hidrofobni karakter, one se mogu primeniti i za reverzno-faznu hromatografiju<sup>2</sup>.

## 2.2. Mobilne faze u planarnoj hromatografiji

Međumolekulske interakcije između ispitivanih supstanci i stacionarne, odnosno mobilne faze upotrebljenog hromatografskog sistema su odgovorne za njihovo odvajanje. Međutim, nisu svi rastvarači (eluenti) pogodni za upotrebu u planarnoj hromatografiji. Da bi eluent, odnosno smeša više rastvarača bio odgovarajući za primenu u planarnoj hromatografiji treba da ispunjava određene zahteve:

- ✓ eluent treba biti netoksičan;
- ✓ mobilna faza treba da sadrži minimalan broj komponenata (budući da su rezultati dobijeni korišćenjem mobilne faze koja sadrži četiri ili više komponenata teški za reprodukovanje)<sup>9</sup>;
- ✓ neophodno je da mobilna faza ima odgovarajuću elucionu moć ( $R_F$ -vrednosti 0,2–0,8 su optimalne) i selektivnost u odnosu na sloj (sorbent) i smešu koja se odvaja<sup>4,15</sup>. Eluciona moć rastvarača u velikoj meri zavisi od upotrebljenog sorbenta i predstavlja meru njegovog kapaciteta da stupi u međumolekulske interakcije, dok je selektivnost rastvarača mera njegove sposobnosti da ostvaruje specifične interakcije, kao što su Keesom-ove (dipol-dipol) interakcije i vodonične veze. Parametar selektivnosti se karakteriše sa dva različita aspekta, polarnosti i parametra lokalizacije. Polarnost predstavlja meru solvatacione snage rastvarača i određuju ga parametri baznosti, kiselosti i dipolarnosti. Lokalizacioni parametar predstavlja meru sposobnosti rastvarača da ostvari interakcije sa sorbentom, tj. da interaguje na tačno definisan način<sup>16</sup>;
- ✓ ne treba da sadrže vlagu, koja deaktivira sorbent (u slučaju kada voda nije komponenta eluenta);
- ✓ ne smeju da učestvuju u hemijskoj reakciji sa sorbentom i komponentama odvajane smeše;
- ✓ često je poželjno dodati modifikator (kiselinu ili baznu supstancu) u mobilnu fazu za suzbijanje disocijacije komponenti odvajane smeše;
- ✓ mobilne faze treba da budu isparljive u dovoljnoj meri da nakon procesa odvajanja mogu lako biti uklonjene sa površine sorbenta;
- ✓ ukoliko se koriste eluenti niskog vizkoziteta, odvajanja je potrebno izvesti u što kraćem vremenskom periodu da bi se sprečilo širenje hromatografskih zona usled difuzije<sup>9</sup>.

Uopšteno govoreći, mobilna faza se obično bira na osnovu eksperimentalnog iskustva i/ili literaturnih podataka<sup>15</sup>. Takođe, kao polazna osnova za izbor komponenata mobilne faze može se koristiti Stahl-ov trougao. Ovaj trougao daje orijentir za izbor mobilne i stacionarne faze za odvajanje test-supstanci uzimajući u obzir prirodu hromatografskog mehanizma: adsorpciju ili particiju. Tada, ukoliko se jedan ugao rotirajućeg trougla postavi na karakteristično svojstvo uzorka (lipofilnost

ili hidrofilitnost) drugi uglovi trougla ukazuju na karakteristike stacionarne i mobilne faze potrebne za uspešno odvajanje<sup>9</sup>.

Brojne klasifikacije mobilnih faza su trenutno dostupne. One su uglavnom zasnovane na fizičkim karakteristikama komponenti prisutnih u mobilnoj fazi. Sledeće od njih su u najširoj upotrebi:

1. Klasifikacija na eluotropne serije

Trappe je bio prvi koji je koristio termin eluotropne serije<sup>7</sup>. Rastvarači su raspoređeni po redosledu rastuće elucione moći ( $\epsilon^0$ ). Eluciona moć rastvarača je bezdimenziona veličina koja zavisi samo od viskoznosti i površinskog napona rastvarača. Eluciona moć *n*-pentana je uzeta kao nula.

2. Klasifikacija prema Snyder-u.

Snyder je podelio većinu rastvarača u osam grupa na osnovu njihovih proton-donorskih i proton-akceptorskih karakteristika<sup>9</sup>. Ove grupe su raspoređene u trougao gde svaka strana pokazuje povećanje (ili smanjenje) proton-donorskih ili proton-akceptorskih karakteristika i sklonosti ka dipolnim interakcijama. Na osnovu hromatografskih karakteristika svakom eluentu je dodeljena određena eluciona moć. Eluciona moć smeša ( $S_i$ ) se uzračunava na osnovu elucionih moći pojedinih komponenti i zapreminskih frakcija ( $v_i$ ) ovih komponenata u smeši.

$$S_i = \sum_*^i S_i^x v_{i*} \quad (2)$$

3. Klasifikacija na osnovu tzv. solvatohromnih skala selektivnosti rastvarača Kamleta i Taft-a<sup>16</sup>. Solvatohromni parametri su parametar  $\pi^*$ , koji je mera dipolarnosti i polarizabilnosti rastvarača, kao i parametri  $\alpha_1$  i  $\beta_1$ , koji opisuju sposobnosti vodoničnog vezivanja kao proton-donori, odnosno proton-akceptori, redom. Rastvarači se na osnovu pomenutih parametara klasifikuju u određene grupe slične selektivnosti prema polarnim interakcijama.

4. Klasifikacija zasnovana na Abraham-ovim parametrima<sup>16</sup>

Najnovija, a istovremeno relativno široko prihvaćena, skala selektivnosti zasnovana je na Abraham-ovim parametrima. Svojstva rastvarača data su veličinama E, S, A, B i V i odnose se redom na: polarizabilnost u višku (u odnosu na *n*-alkan iste molarne zapremine), dipolarnost, sposobnost građenja vodoničnih veza, pri čemu se supstanca može ponašati kao proton-donor, odnosno proton-akceptor. Date veličine korelišu se sa svojstvom rastvarača koje

se odnosi na raspodelu istog između dve faze, za različite grupe supstanci, pri čemu se dobijaju odgovarajući regresioni koeficijenti<sup>16</sup>.

Takođe prilikom odabira rastvarača dostupne su i različite kompjuterski zasnovane optimizacione procedure, takve kao što su PRISMA i Snajder-Soczewinski model, pri čemu njihovo korišćenje za izbor rastvarača mobilne faze i njihovog odnosa je retko obrađivan u literaturi<sup>15</sup>.

### 2.3. Mehanizmi hromatografskog odvajanja supstanci u planarnoj hromatografiji

Imajući u vidu da je planarna hromatografija verzija LC, glavni mehanizmi odvajanja, koji su tipični za tečnu hromatografiju u koloni, takođe se odvijaju i u slučaju planarne hromatografije: adsorpcija, particija, jonska izmena, ekсклюzija ili gel-filtracija, kao i odvajanja enantiomera primenom hirlnih stacionarnih faza<sup>4</sup>.

Navedena klasifikacija se zasniva na razlikama u prirodi sila koje deluju između odvajanih supstanci i stacionarne i mobilne faze tokom hromatografskih procesa. Pri tome je neophodno uzeti u obzir različite fizičke i hemijske faktore koji određuju mehanizam odvajanja, tj. daju prioritet adsorpciji, particiji, jonskoj izmeni, gel-filtraciji ili pak zajedničkom delovanju nekog od ovih mehanizama<sup>6</sup>.

Adsorpcija se definiše kao raspodela koja se odigrava na površini stacionarne faze, te je stoga od velikog značaja za sisteme kod kojih je jedna faza čvrsta. Adsorpciona površina poseduje aktivne centre na kojima dolazi do adsorpcije. Potencijal adsorpcije zavisi uglavnom od hemijskog karaktera ovih centara. Ako je komponenta smeše (odvajana supstanca) slabo adsorbovana na površini čvrste stacionarne faze, ona će se brže od drugih, jače adsorbovanih supstanci, kretati kroz sistem. Prema tome, odvajanje supstanci je moguće samo ukoliko su različite njihove adsorpcione sposobnosti (afiniteti) prema čvrstoj fazi<sup>20,25</sup>. Molekuli odvajanih supstanci zauzimaju mesta na aktivnim centrima adsorpcione površine zahvaljujući delovanju vodoničnih veza, dipol-dipol interakcija i elektrostatičkih interakcija, pri čemu intezitet ovih interakcija zavisi od sledećih faktora<sup>26</sup>:

- broja aktivnih centara na adsorpcionoj površini;
- prisustva polarnih ili polarizabilnih funkcionalnih grupa koje uslovljavaju jače interakcije sa aktivnim centrima, što je praćeno povećanjem retencije odvajanih supstanci;

- elucione moći upotrebljene mobilne faze (retencija opada sa povećanjem rastvorljivosti uzorka u mobilnoj fazi).

Rastvoreni molekuli odvajane supstance (X) se takmiče sa molekulima mobilne faze (S) za mesta na površini adsorbenta<sup>25</sup>:



Jačina interakcije između adsorbenta i molekula rastvarača raste sa porastom polarnosti rastvarača. To omogućava da se poveća retencija odvajane supstance smanjenjem polarnosti mobilne faze, koja uslovljava pomeranje ravnoteže nadesno.

Podeona hromatografija podrazumeva sistem u okviru kojeg se komponente uzorka raspodeljuju između dve tečne faze kao što bi se desilo i da su “promućkane” u levku za odvajanje. Ovo tzv. “mućkanje” ili uravnotežavanje se dešava i po nekoliko hiljada puta, tako da dolazi do male, ali visoko efikasne raspodele. Jedna od tečnih faza je mobilna faza, dok je tečna stacionarna faza u vidu tankog filma naneta preko inertne čvrste podloge-nosača, koji ne bi trebalo da ima bilo kakvu ulogu u hromatografskom procesu<sup>6,19</sup>. Stacionarna i mobilna faza mogu se tako izabrati da se uzajamno slabo rastvaraju, ali da su dovoljno dobri rastvarači za sve komponente uzorka. Eksperimentalni uslovi treba da budu tako podešeni da mobilna faza prilikom prolaska kroz hromatografski sistem “ne ispira” stacionarnu fazu i na taj način menja svojstva samog sistema. Svaka komponenta uzorka X raspodeljuje se između stacionarne i mobilne faze, pri čemu se uspostavlja ravnotežno stanje:



Odvajanje supstanci je uslovljeno njihovim različitim podeonim koeficijentima između stacionarne tečnosti i tečne mobilne faze. S obzirom da raspodela uzorka zavisi od uzajamnog dejstva molekula uzorka i molekula stacionarne i mobilne faze, koje je utoliko veće ukoliko je tečnost polarnija, to se promenom polarnosti faza može uticati na podeone koeficijente. Retencija supstanci u uslovima idealnim za podeonu hromatografiju (slučaj kada ne postoje adsorptivne interakcije sa nosačem) uslovljena je sledećim faktorima<sup>26</sup>:

- hemijskom prirodom tečne stacionarne faze (retencija raste sa povećanjem rastvorljivosti molekula uzorka u ovoj fazi);

- zapreminom stacionarne faze prisutne u porama nosača (maksimalna moguća zapremina je ograničena specifičnom zapreminom pora matriksa);
- hemijskom strukturom molekula uzorka (jačina retencije raste sa povećanjem rastvorljivosti uzorka u tečnoj stacionarnoj fazi, tj. sa povećanjem hemijske sličnosti obe komponente);
- sastavom mobilne faze (za datu tečnu stacionarnu fazu, retencija opada sa povećanjem rastvorljivosti uzorka u mobilnoj fazi, pri čemu su različite verovatnoće rastvaranja supstance u mobilnoj ili stacionarnoj fazi izražene odgovarajućim podeonim koeficijentima).

S obzirom na to da i adsorpciona i podeona hromatografija mogu funkcionisati u okviru normalno-faznih odnosno reverzno-faznih sistema, korisno je razmotriti koje su interakcije odgovorne za sorpciju u ovim sistemima.

Retencija supstanci u reverzno-faznim hromatografskim sistemima je veoma kompleksan proces, koji zavisi od više faktora: karakteristika stacionarne faze, tipa organskog modifikatora kao i sastava mobilne faze. Prema tome, proučavanje uticaja koncentracije modifikatora u mobilnoj fazi na retenciju u različitim reverzno-faznim hromatografskim sistemima je veoma važno za razumevanje pravila koja upravljaju retencijom i mehanizmima odvajanja supstanci tokom hromatografskih procesa. Promene sastava i prirode mobilne faze omogućavaju podešavanje retencije odvajanih analita preko širokog opsega retencionih parametara i optimizacije hromatografskih procesa. S druge strane, retencija supstanci zavisi i od molekularnih karakteristika odvajanih jedinjenja. Ispitivanja koja se odnose na retencione mehanizme i promene selektivnosti u okviru RP hromatografije su malo napredovala uprkos mnogobrojnim objavljenim radovima iz ove oblasti. Glavni razlog za ovu situaciju je složenost RP hromatografskih sistema gde se karakteristike sistema menjaju kao funkcija sastava mobilne faze i tipa stacionarne faze<sup>27</sup>. Prvobitno je pretpostavljeno da je retencija supstanci u RP hromatografiji uglavnom određena interakcijama odvajane supstance sa mobilnom fazom. Tako, prema solvofobnoj teoriji Horváth-a i saradnika, stacionarna faza ima pasivnu ulogu u procesu odvajanja analita i zadržavanje je u najvećoj meri određeno favorizovanim promenama slobodne energije mobilne faze, odnosno mobilna faza potiskuje analit prema stacionarnoj fazi<sup>16</sup>. Međutim, većina novijih istraživanja uzima u obzir aktivnu ulogu stacionarne faze<sup>27</sup>. Prema Carr-u i saradnicima, stacionarna

faza ima značajnu ulogu u retenciji, odnosno ukupna slobodna energija retencije nepolarnih jedinjenja je, pre svega, određena doprinosom slobodne energije koja potiče od stacionarne faze<sup>4</sup>. Brojni različiti retencioni modeli su razvijani u cilju opisivanja retencionih mehanizama u različitim RP-TLC sistemima sa polarnim vezanim stacionarnim fazama. Za analizu retencionih procesa u većini takvih sistema primenjujvana su tri različita retencionna modela: podeoni, adsorpciono/podeoni i adsorpcioni model predloženi od Snyder-a, Kaczmarškog i saradnika i Zapala i saradnika<sup>27,28</sup>.

Snyder je izveo sledeću linearnu zavisnost<sup>27</sup>:

$$\ln k = p_1 - p_2 \cdot \varphi \quad (5)$$

gde je  $\varphi$  molarni udeo organskog modifikatora sadržanog u binarnom eluentu,  $p_1$  i  $p_2$  su konstante. Ovaj model takođe predstavlja osnovu veoma popularnih programa takvih kao DryLab ili ChromSword koji se koriste za optimizaciju HPLC odvajanja<sup>27</sup>.

Adsorpciono/particioni model za opisivanje retencionih koeficijenata kao funkcija sastava mešanih mobilnih faza je pretpostavljen od Kaczmarškog i saradnika<sup>27</sup>. Za reverzno-faznu hromatografiju ovaj model je predstavljen na sledeći način:

$$k = \exp(p_1 + p_2 \cdot \varphi) + \frac{1}{p_3 \cdot \varphi + p_4 \cdot (1 - \varphi)} \quad (6)$$

gde su:  $p_1$ – $p_4$  konstante. Jednačina (6) pretpostavlja particiju analita unutar hemijski vezanih liganada i adsorpciju konstituenata tečne faze na nemodifikovanom silika-gel matriksu. Zapravo, uočava se dvojna priroda retencionih procesa tj. s jedne strane molekuli supstanci interaguju s organskim ligandima stacionarne faze pomoću disperzionih sila (particija), ali istovremeno se i nadmeću sa molekulima mobilne faze za aktivne centre na površini neorganskog matriksa (adsorpcija)<sup>28</sup>.

Konačno, Zapala i saradnici su formulisali adsorpcioni model za analizu promene retencionih faktora  $R_F$  kao funkciju koncentracije modifikatora u mobilnoj fazi ( $\varphi$ ) u različitim TLC sistemima<sup>27</sup>.

$$R_F = \frac{1 + p_1 \cdot \varphi}{p_2 \cdot (1 + p_3 \cdot \varphi + \frac{p_4}{\varphi})} \quad (7)$$



gde su:  $p_1 - p_4$  konstante. Ovaj model pretpostavlja Langmuirov tip interakcija analita sa hemijski vezanim ligandima i sa slobodnim aktivnim centrima matriksa silika-gela.

Rezultati dobijeni za različite RP-TLC sisteme pokazuju da su najbolja slaganja između eksperimentalnih i računski dobijenih  $R_F$  vrednosti dobijena korišćenjem nove generacije retencionih modela (prestavljenih jednačinama (6) i (7)), koji pretpostavljaju heterogenost adsorpcione površine. Izvedeni zaključci pokazuju da heterogenost adsorpcione površine može biti važna u analizi elucionih procesa u tečnoj hromatografiji<sup>27</sup>.

S druge strane, za opisivanje retencije u normalno-faznim hromatografskim sistemima upotrebljavaju se modeli prema kojima je retencija odvajanih supstanci funkcija sastava binarnih mobilnih faza. Prvi model za analizu retencionih procesa u adsorpcionoj hromatografiji su predložili Snyder i Poppe<sup>29,30</sup>. Oni su razmatrali ulogu mobilne faze u procesima odvajanja supstanci u tečno-čvrstoj adsorpcionoj hromatografiji. Snyder i Glajch su nastavili ova ispitivanja razmatrajući uticaj elucione moći višekomponentnih mobilnih faza u tečno-čvrstoj hromatografiji. Navedeni modeli su kasnije spojeni sa paralelno razvijanim modelom Soczewinski i Wachtmeister u Snyder-Soczewinski model, gde je eluiranje supstanci opisano kao razmena mesta (položaja) između supstanci i solventa na površini stacionarne faze<sup>30,31</sup>. Suprotno Snyder-Soczewinski modelu razvijan je Scott-Kucera model<sup>30,31</sup>, koji je u literaturi mnogo osporavan. Scott i Kucera su proučavali interakcije supstanci sa mobilnom i stacionarnom fazom u tečno-čvrstoj hromatografiji u cilju određivanja ravnotežnih konstanti ispitivanih supstanci tokom njihove raspodele između mobilne i stacionarne faze<sup>31</sup>. Oba navedena modela su veoma komplikovana i teška za objašnjavanje. Reticioni modeli su dalje razvijani za klasičnu tečno-čvrstu hromatografiju, gde je retencija supstanci objašnjena adsorpcijom (bilo kroz direktne površinske interakcije prema Snyder-Soczewinski modelu ili kroz interakcije sa absorbovanim slojem rastvarača prema Scott-Kucera modelu) uz primenu nepolarnih odnosno neamfoternih polarnih solvenata<sup>30</sup>.

Za uobičajene NP hromatografske sisteme, gde je retencija ispitivanih supstanci zasnovana na adsorpciji ostvarenoj kroz površinske interakcije, odnos između retencije i

molskog udela eluciono snažnije komponente mobilne faze predstavljen je sledećim izrazom:

$$\log k' = \log k'_B - \frac{A_S}{n_B} \log N_B \quad (8)$$

gde je  $k'$  retencioni faktor supstance eluirane sa binarnom mobilnom fazom,  $k'_B$  retencioni faktor supstance eluirane sa čistim jačim solventom kao eluentom,  $A_S$  i  $n_B$  su površine zauzete od strane molekula odvajane supstance i molekula eluciono jače komponente mobilne faze i  $N_B$  je molski udeo eluciono snažnije komponente mobilne faze<sup>29,30</sup>.

Međutim, ukoliko se pri NP hromatografskim uslovima pretpostavi da se supstance adsorbuju na hemijski vezanim ligandima na isti način kao i na aktivnim centrima silika-gela<sup>28</sup>, tada se za opisivanje zavisnosti  $k = f(\varphi)$ , može upotrebiti model (6) (adsorpciono-particioni model korišćen za reverzno-fazne hromatografske sisteme), premda u neznatno modifikovanoj formi tj. bez prvog segmenta originalne formule:

$$k = \frac{1}{p_3 \cdot \varphi + p_4 \cdot (1 - \varphi)} \quad (9)$$

gde je  $\varphi$  molska frakcija organskog modifikatora sadržanog u binarnom eluentu, a  $p_3$  i  $p_4$  su konstante.

Pored adsorpcionog i podeonog mehanizma koji dominiraju procesima odvajanja u okvirima TLC, prisutan je i jonsko-izmenjivački mehanizam<sup>30</sup>. Naziv jonska izmena je prikladan za opisivanje preseca korišćenih u hromatografiji za odvajanje jona i nekih polarnih molekula. U jonsko-izmenjivačkoj hromatografiji stacionarna faza je jonsko-izmenjivačka smola, definisana kao polivalentan materijal, nerastvoran u vodi, koji sadrži vezane jonizabilne grupe i pokazuje sposobnost protolize i izmenjivanja protolizovanih jona sa jonima iz rastvora. Iako postoje prirodni jonski izmenjivači, većina jonskih izmenjivača se dobija sintetički. Površina matriksa jonsko-izmenjivačke smole sadrži jonizabilne grupe (“položaje”) koje mogu nositi pozitivno ili negativno naelektrisanje. Svaki od ovih “položaja” takođe zahteva suprotno naelektrisani jon (kontra-jon) za potpunu neutralizaciju. Ako su jonizabilne grupe pozitivno naelektrisane, kontra jon je anjon i smola se ponaša kao anjonski izmenjivač prema sledećem opštem obrascu:



(smola) (rastvor)      (smola) (rastvor)

Kontra-jon  $Y^-$  koji je vezan na “položaju”  $R^+$  (na smoli) biva zamenjen drugim jonom  $X^-$  iz rastvora. Izmena katjona zahteva strukturu sa izmenjivačkim grupama koje su negativno naelektrisane i stoga sposobne da se vezuju sa pozitivnim kontra-jonima:



(smola) (rastvor)      (smola) (rastvor)

Smeša jona može biti uspešno odvojena samo ukoliko postoji različita jačina elektrostratičkih interakcija između jona prisutnih u rastvoru i fiksiranih izmenjivačkih grupa na stacionarnoj fazi. Budući da su jonske strukture favorizovane u vodenim rastvorima, mobilna faza u IEC (jonsko-izmenjivačkoj hromatografiji) je vodena, najčešće puferisana na određenu pH-vrednost.

Retencija supstanci u jonoizmenjivačkoj hromatografiji je određena prirodom samog uzorka (analita), vrstom i koncentracijom ostalih jona prisutnih u mobilnoj fazi, pH-vrednošću mobilne faze i temperaturom. Stoga je ponekad veoma teško predvideti promene koje bi eventualno izazvala promena nekog od navedenih eksperimentalnih uslova<sup>5,19,25,32</sup>.

U okviru hromatografije na tankom sloju poznat je još jedan mehanizam odvajanja koji nema značajniju primenu (po brojnosti aplikacija) ali ga je korisno spomenuti u svetlu razjašnjavanja mehanizama odvajanja odgovornih za sorpciju supstanci. Ekskluziona hromatografija (SEC) je tehnika odvajanja zasnovana na efektu relativne veličine i oblika molekula odvajanih supstanci. Ekskluziona hromatografija je tehnički drugačija od svih ostalih LC metoda zato što je u okviru ove tehnike odvajanje zasnovano fizičkom „prosejavanju“ supstanci, a ne na hemijskim interakcijama. Tehnika je poznata pod nazivom gel-hromatografija ukoliko se koristi mobilna fazakoja se sastoji od organskih rastvarača, odnosno gel-filtracija ako se primenjuju vodene mobilne faze. Kod ove metode stacionarna faza je matrica poroznog polimera čije su pore ispunjene rastvaračem koji se koristi kao mobilna faza. Veličina pora je različita s obzirom da se odvajanje zasniva na principu da molekulima određene veličine nisu dostupne pore, dok je unutrašnjost pora, delimično ili potpuno, dostupna manjim

molekulima. Kretanje mobilne faze utiče da veliki molekuli prolaze bez prodiranja u gel, dok manji molekuli bivaju zadržani u zavisnosti od stepena njihovog prodiranja u gel. Razlika između drugih hromatografskih metoda i ekskluzione hromatografije je u nepostojanju interakcija između odvajanih supstanci i površine stacionarne faze, s obzirom na to da je mehanizam raspodele objašnjen sternim isključivanjem<sup>6</sup>. Primarna primena ove tehnike je u analizi polimera, gde je uobičajeno njihova molekulska masa osnov za odvajanje<sup>6,19,32</sup>.

Odvajanje enantiomera u LC je tehnika koja postaje sve značajnija, posebno u farmaceutskoj industriji<sup>25</sup>. Najšire primenjivani pristup odvajanju enantiomera u uslovima hromatografije na tankom sloju zasnovan je na mehanizmu ligandne izmene primenom komercijalno dostupnih reverzno-faznih ploča impregniranih rastvorima bakar-acetata i hiralnih selektora na bazi amino-kiselina. Enantiomeri se odvajaju na osnovu razlike u stabilnosti diastereomernih kompleksa nagrađenih između odvajanih supstanci, bakra i hiralnog selektora<sup>20,26</sup>. Ovakvi hromatografski sistemi primenjeni su za odvajanje amino-kiselina i njihovih derivata, kao i nekih  $\alpha$ -supstituisanih karboksilnih kiselina<sup>2,20</sup>.

Međutim, činjenica je da je u praksi odvajanje posledica odvijanja dva ili više mehanizama istovremeno. Adsorpciona hromatografija je praćena podeonom hromatografijom tokom procesa razdvajanja na slabo aktivnim adsorbentima ili u prisustvu vode u eluentu. Takođe po pravilu, podeona hromatografija i jonsko-izmenjivačka hromatografija prate adsorpcione procese<sup>9</sup>. Stoga svakodnevna hromatografska praksa vodi ka stalnom ispitivanju ispravnosti definicija retencionih modela i dominantnih retencionih mehanizama u okviru različitih hromatografskih sistema.

#### 2.4. Karakterizacija cijano-modifikovanog silika-gela

Uvođenje cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta suštinski proširuje selektivnost stacionarnih faza koje se koriste u tankoslojnoj hromatografiji<sup>33-35</sup>. Sintaza ovog sorbenta ostvarena je kroz reakciju silanolnih grupa matriksa sa cijano-propil supstituisanim silanima. Cijano-grupa je hemijski vezana za površinu matriksa u formi  $\gamma$ -cijano-propil grupe, tako da se uneta modifikacija sastoji od nepolarnog dela (alkilniza) i polarnog ostatka (cijano-grupe). Zahvaljujući pomenutoj strukturi i umerenoj

polarnosti, ovaj sorbent se može koristiti u normalno-faznoj kao i u reverzno-faznoj hromatografiji<sup>4,19,26,36,37</sup>.

Prilikom proširenja primene cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta javili su se ozbiljni problemi sa reproduktivnošću<sup>5,18,38</sup>. Glavna smetnja se ogledala u promenljivosti osnovnih karakteristika sloja, koja je uočena kod različitih serija ovog sorbenta istog proizvođača. Osim toga, dalja istraživanja ukazala su da cijano-modifikovane stacionarne faze različitih proizvođača takođe poseduju vrlo promenljive karakteristike površine. Pomenute razlike verovatno potiču od različitog hemizma vezivanja u toku procesa modifikacije koji je specifičan za svakog proizvođača. Uočene razlike nastaju kao posledica prisustva hidrofobnog, hidrofilnog i jonsko-izmenjivačkog karaktera razmatranih cijano-modifikovanih stacionarnih faza.

Stepen hidrofobnosti cijano-modifikovanog silika-gela je određen prvenstveno prisustvom cijano-grupa, zatim stepenom blokiranja nemodifikovanih silanolnih grupa, kao i odnosom cijano-grupa (unetih modifikacijom) i reagenasa za blokiranje nemodifikovanih silanolnih grupa. Teorijski, ukoliko ne dolazi do hidrolize cijano-grupa, vrednost C/N odnosa može biti upotrebljena za određivanje relativne gustine populacije cijano- i blokiranih silanolnih grupa. Potreba za određivanjem ovog parametra se ogleda u činjenici da visoka vrednost C/N odnosa ukazuje na smanjenje sadržaja cijano-grupa na površini sorbenta, što u velikoj meri određuje njegove hromatografske karakteristike<sup>5</sup>. Pored toga, određivanjem selektivnosti LC sistema pomoću “analize faktora podudarnosti” (correspondence factor analysis – CFA), cijano-vezane vaze su, saglasno svojim karakteristikama, svrstane u hidrofobne faze. CFA se pokazala kao veoma uspešna tehnika ne samo za klasifikaciju separacionih sistema (reverzno-faznih (RP), jonsko-izmenjivačkih (IE) i hromatografiji hidrofilnih interakcija (HILIC)) i supstanci pogodnih za odvajanje, nego takođe i kao ključni faktor za tumačenje retencionih mehanizama<sup>39</sup>.

Hidrofilni karakter cijano-modifikovanog silika-gela je nesumnjivo u velikoj meri određen prisustvom nemodifikovanih silanolnih grupa na površini ovog sorbenta<sup>5</sup>. Cijano-grupe unete modifikacijom su takođe hidrofilne prirode. Međutim, njihovo prisustvo umanjuje ukupnu hidrofilnost ovog sorbenta, budući da su cijano-grupe manje polarne od silanolnih grupa. Nemodifikovane silanolne grupe mogu interagovati sa

odvajanim supstancama, što zapravo isključuje, ili bar u bitnoj meri umanjuje, efekat prisustva modifikacijom unetih cijano-grupa. Problem prisustva silanolnih grupa može biti donekle rešen modifikacijom mobilne ili stacionarne faze<sup>18</sup>. Najčešće eliminacija uticaja silanolnih grupa se odvija kroz takozvani "endcapping" postupak (vrstu maskiranja preostalih silanolnih grupa nakon procesa vezivanja tretiranjem silika-gela odgovarajućim silanizirajućim jedinjenjima kao što su trimetilhlorsilan ili trimetilsilimidazolom)<sup>18</sup>. U reverzno-faznoj hromatografiji, primena "endcapping" cijanopropil-modifikovanog silika-gela prouzrokuje opadanje selektivnosti odvajanja i postojanosti sloja. U normalno-faznoj hromatografiji, "endcapping" postupak umanjuje retenciju manje polarnih supstanci i utiče na inhibiciju adsorpcije baznih supstanci. Takođe, adsorpcija baznih supstanci biva onemogućena i prisustvom velike koncentracije cijanopropil-grupa na površini sorbenta<sup>40</sup>.

Treći parametar razmatran prilikom proučavanja svojstava cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta odnosi se na njegove jonsko-izmenjivačke karakteristike. Ovo svojstvo sorbenta nastaje kao posledica neodgovarajućih uslova u toku procesa proizvodnje koji mogu da dovedu do hidrolize cijano-grupa u amidne i karboksilne grupe, pri čemu nastaju stacionarne faze sa jonsko-izmenjivačkim karakteristikama. Zaključeno je da se navedeni problem sa cijano fazama očigledno dešava zbog relativno visoke koncentracije amidnih grupa koje, kao što je navedeno nastaju kao prvi korak procesa hidrolize cijano grupa. Zbog toga cijano-modifikovani sorbenti danas nailaze na strogu specifikaciju sadržaja cijano i amidnih grupa određenu na osnovu FTIR spektara<sup>5,41</sup>.

Dalje, u okviru programa razvijanja stabilnijih cijano-modifikovanih stacionarnih faza, procenjivana je hidrolitička stabilnost ovog sorbenta kao funkcija prisustva liganada, dužine lanaca uvedenih liganada, sterne zaštićenosti i pH-vrednosti mobilne faze<sup>38</sup>. Utvrđeno je da stabilnost CN-faza zavisi kako od hemijske strukture liganada tako i od pH-vrednosti. Trifunkcionalne i sterno zaštićene cijanopropil-faze su značajno stabilnije pri niskim pH-vrednostima. Upotreba mobilnih faza sa umerenim (srednjim), odnosno visokim pH-vrednostima uslovljava kratak "životni vek" sorbenta usled ubrzanog rastvaranja silika-gela kao nosača. Pri navedenim uslovima korišćenje stacionarnih faza sa dimetiloktil funkcionalnošću pruža veću stabilnost, verovatno usled bolje sterne zaštite silika-gel nosača od rastvaranja<sup>19,40,42</sup>.

Konačno, pri karakterizaciji cijanopropil-faza razmatrana je činjenica da selektivnost vezanih faza može biti izmenjena promenama selektivnosti mobilne faze. Naime, cijano-modifikovani silika-gel može posedovati kiseli ili bazni karakter, zavisno od polarne komponente upotrebljenog binarnog rastvarača. Tako na primer, ovaj sorbent pokazuje bazne karakteristike kada se kao mobilne faze upotrebe binarni sistemi heksan-hloroform, odnosno kisele karakteristike prilikom upotrebe mobilne faze heksan-metil-*terc*-butiletar. Smatra se da je ovo ponašanje jedinstveno za cijano-modifikovani silika-gel kao sorbent<sup>43,44</sup>. Osim toga, neki autori navode da su za retenciju supstanci na cijano-sorbentima dominantni uticaji polarosti i baznosti stacionarne faze. Ovi zaključci se prilično razlikuju od navoda iz nekih ranijih radova u okviru kojih je sugerisano da baznost cijano-faza nije bitna za retenciju i selektivnost<sup>45</sup>.

Nasuprot relativno brojnim radovima u kojima je opisana primena cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta za hromatografsko odvajanje različitih supstanci, znatno manje ima radova u kojima se detaljnije razmatraju mehanizmi tih odvajanja. Struktura ovog sorbenta (prisustvo nepolarnog dela (alkil-niza) i polarnog ostatka (cijano-grupe)), kao i umerena polarlost, omogućavaju njegovu primenu u normalno-faznoj kao i u reverzno-faznoj hromatografiji<sup>4,19,26,36,37</sup>. Međutim istovremeno, sama hemijska priroda površine cijano-modifikovanog silika-gela čini mehanizme odvajanja supstanci na ovom sorbentu veoma složenim i još uvek nedovoljno razjašnjenim<sup>45</sup>.

Opsežna ispitivanja su izvedena u cilju razumevanja osnova retencije u normalno- i reverzno faznoj hromatografiji sa cijano-vezanim fazama. Pri normalno-faznim uslovima, cijano sloj se ponaša uglavnom kao deaktivirani silika-gel što rezultuje interakcijama analita sa rezidualnim silanolnim grupama. Ukoliko polarlost rastvarača u NP uslovima raste, efekat silanolnih grupa biva potisnut što omogućava cijano-grupama da postanu primarni adsorpcioni centri<sup>4,5</sup>. Pri reverzno-faznim uslovima, smatra se da ulogu primarnih adsorpcionih centara imaju cijano-grupe, čija koncentracija (relativna populacija) određuje "hidrofobnost" površine sorbenta. Potrebno je istaći da pomenuta "hidrofobnost" sorbenta ustvari predstavlja smanjenje njegovog hidrofilnog karaktera usled supstitucije silanolnih grupa cijano-grupama. Osim toga, utvrđeno je da preostale nemodifikovane silanolne grupe takođe igraju važnu ulogu u određivanju opštih adsorpcionih karakteristika ovog sorbenta i pri RP

uslovima<sup>5</sup>, što zapravo govori o nepostojanju suštinske razlike u mehanizmu odvajanja prilikom promene eksperimentalnih uslova (NP ili RP sistemi).

Budući da je u okviru reverzno-faznih uslova, retencija supstanci određena ostvarivanjem nespecifičnih interakcija sa sorbentom i specifičnih interakcija sa mobilnom fazom, dalja proučavanja cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta su bila usmerena na proučavanje prirode njegovih interakcija u ovim uslovima. Proučavanja su se, pre svega, odnosila na utvrđivanje prisustva i inteziteta disperzionih interakcija, zatim interakcija koje uključuju prisustvo dipolarnih molekula (zapravo, razmatra se sposobnost polarizacije) i konačno na sposobnost građenja vodoničnih veza donorskog, odnosno akceptorskog tipa pod RP hromatografskim uslovima<sup>47</sup>. U cilju procene važnosti disperzionih interakcija za cijano-modifikovane sorbente određeni su koeficijenti koji predstavljaju kombinaciju jačine kohezionih i disperzionih interakcija, a utvrđeno je da su oni za cijano-sorbente manji od onih utvrđenih za druge RP sorbente. Ovaj podatak ukazuje da modifikovani silika-gelovi koji sadrže nepolarne grupe imaju veću sposobnost u odnosu na cijanopropil stacionarne faze da odvoje supstance koje su slične po sposobnosti donorskog, odnosno akceptorskog vezivanja, a različite po veličini.

Dalje, značaj sledećeg analiziranog parametra je utvrđen na osnovu vrednosti koeficijenta polarizabilnosti, pri čemu je pokazano da dipolarnost supstanci igra veoma malu ulogu u određivanju retencije i selektivnosti. Praktično, u RPC cijano-modifikovani silika-gel ne pokazuje selektivnost ka interakcijama dipolnog tipa, i ponašase kao kratkolančana alkil-siloksan vezana stacionarna faza<sup>4,5,47,48</sup>. Međutim, neka novija ispitivanja pokazuju da u određenim slučajevima (prilikom odvajanja supstanci sa velikim dipolnim momentom) dipol-dipol mogu biti od važnosti na cijano-propil kolonama<sup>49</sup>.

Poređenjem vrednosti koeficijenta koji govore o sposobnosti cijano-modifikovanih sorbenata da ostvare vodonične veze donorskog tipa, utvrđeno je da su ove vrednosti generalno manje za polarne cijano-faze u odnosu na nepolarne alkil- i fenil- RP vezane faze<sup>38,47,50,51</sup>. Čini se da su polarne cijano-faze bolje solvativizovane usled snažnijih dipolarnih interakcija i interakcija tipa vodonične veze (HB interakcija) cijano-grupa sa komponentama mobilne faze, nego nepolarne (alkil- i fenil-) RP faze.



Ovo se dešava zato što su nemođifikovane silanolne grupe RP faza više izložene odvajanim supstancama, pa samim tim HB interakcije između supstanci i stacionarne faze kod ovih sorbenata postaju značajnije. Ovo je saglasno ranijim literaturnim podacima o redukciji preteranog razvlačenja pikova baznih supstanci usled HB interakcija na cijano-propil-fazama<sup>47</sup>. Sličan trend postoji i u promeni koeficijenata koji karakterišu vodonično vezivanje akceptorskog tipa. Vrednosti ovih koeficijenata su takođe male, što ide u prilog pretpostavci da vodonično vezivanje akceptorskog tipa ima nezatnu ulogu u okviru interakcija odgovornih za hromatografska odvajanja na cijano-modifikovanom silika-gelu<sup>47,50</sup>.

Istovremeno su rađene studije u NP-HPLC modu na cijano- i silika-gel stacionarnim fazama, pri čemu su dobijeni rezultati suprotni onim dobijenim u RP modu. Ovi rezultati pokazuju da dipol-dipol interakcije i vodonične veze podstiču retenciju i da su alifatični cijano-ligandi bolji proton-akceptori nego proton-donori<sup>45,52</sup>. Povećanje kiselosti cijanopropil-vezanih sorbenata je moguće zahvaljujući prisustvu amidnih i karboksilnih grupa uvedenih prilikom sinteze vezane faze<sup>41</sup>. Osim toga, bilo kakva proton-donorska sposobnost ove stacionarne faze je posledica prisustva rezidualnih silanolnih grupa i/ili prisustva adsorbovanog organskog rastvarača. Vodonične veze (akceptorske i donorske) su u osnovi jače na silika-gelu nego na cijano-modifikovanom silika-gelu. Ovo se pre svega odnosi na bazne supstance, budući da se one jače zadržavaju na silika-gelu nego na cijano-modifikovanom silika-gelu. Pored toga, policiklični aromatični ugljovodonici (PAH-ovi) pak pokazuju jaču retenciju na cijano-modifikovanom silika-gelu, iako dipol-dipol interakcije i polarizabilnost ove dve faze nisu mnogo različite. U ovom slučaju, jače disperzione interakcije na cijano-modifikovanom silika-gelu mogu objasniti karakterističnu retenciju PAH-ova. Prema tome, zamena silika-gela cijano-modifikovanim silika-gelom, će uglavnom uticati na veoma bazne i/ili voluminozne supstance<sup>41,52</sup>.

Dalja karakterizacija ovog sorbenta se ogledala u njegovom poređenju i utvrđivanju sličnosti, odnosno razlika sa silika-gelom, pri čemu se imalo u vidu da je silika-gel korišćen kao početni materijal čijom modifikacijom je dobijen cijano-modifikovani silika-gel<sup>2,6,18,20</sup>.

Neki autori smatraju da se cijano-modifikovani silika-gel ponaša kao deaktivirani silika-gel prilikom hromatografskog odvajanja nepolarnih i srednje polarnih supstanci<sup>46,53</sup>. Da bi dokazali da je to zaista tako pretpostavili su suprotno tj. da cijano-grupe deluju kao primarni adsorpcioni centri. S tim ciljem su posmatrali ovaj sorbent sa stanovišta termova trougla selektivnosti, očekujući da cijano-modifikovani silika-gel pokaže ponašanje svojstveno dipolarnim sorbentima, tj. ponašanje slično onome koje imaju različiti nitrili kao rastvarači. Poređenje ovog sorbenta sa silika-gelom bi u tom slučaju trebalo da pokaže jaču retenciju supstanci koje nemaju bazni karakter, a karakterišu se velikim dipolnim momentom (npr. nitrili i nitro-jedinjenja). Međutim, analiza retencionih vremena supstituisanih aromata, odnosno njihovih nesupstituisanih analoga pokazala je da su ona slična onima na silika-gelu (sem što su  $\Delta R_M$  vrednosti umanjene za faktor 5), bez velikih tendencija ka jačoj retenciji cijano- ili nitro-grupa<sup>53</sup>. Na osnovu ovih podataka zaključeno je da cijano-grupe nisu primarni adsorpcioni centri na cijano-modifikovanom silika-gelu, što je zapravo u skladu sa pretpostavkom da su nemodifikovane silanolne grupe odgovorne za retenciju sličnu onoj na silika-gelu. Slabija retencija na cijano-modifikovanom silika-gelu objašnjena je sternom zaštitom silanolnih grupa susednim cijano-propil grupama. Praktično, ovim je pokazano da se cijano-modifikovani silika-gel ponaša kao deaktivirani silika-gel, tj. kao silika-gel niskog kapaciteta<sup>48</sup>.

Ovakav prilaz je naišao na prihvatanje u slučajevima primene hromatografskih sistema koji obuhvataju nepolarne ili umereno polarne supstance i rastvarače<sup>53</sup>. Nepolarne ili umereno polarne supstance u kombinaciji sa solventima istih karakteristika predstavljaju sisteme koji su manje opterećeni efektom supstanca-solvent interakcija, te su stoga pogodniji za razumevanje osnovnih karakteristika cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta.

U prilog pretpostavci da se cijano-faze ponašaju kao delimično deaktivirani silika-gel ide i podatak o sličnosti vrednosti delokalizacionih funkcija ovih sorbenata (0,45 za silika-gel odnosno 0,35 za cijano-modifikovani silika-gel). Praktično, ukoliko se pretpostavi da su nemodifikovane silanolne grupe centri lokalizacijena cijano-modifikovanom silika-gelu tada vrednost delokalizacione funkcije treba da bude zanemarljivo mala, što, kao što je već rečeno, nije utvrđeno<sup>54</sup>.

Takođe, s aspekta analize primarnih efekata rastvarača, cijano-faze su ekvivalentne delimično deaktiviranom silika-gelu<sup>54</sup>.

Koristan podatak u razmatranju sličnosti između silika-gela i cijano-modifikovanog silika-gela (pod pretpostavkom da se ponaša slično delimično deaktiviranom silika-gelu) je da mnogobrojna iskustva o silika-gelu kao sorbentu, kojima se raspolaže na osnovu velike količine postojeće literature, mogu biti korišćena za predviđanje ishoda procesa hromatografskih odvajanja na cijano-modifikovanim sorbentima.

Međutim, pored već razmatranih radova postoje i neki drugi koji ukazuju na jedinstvene adsorpcione karakteristike cijano-modifikovanog silika-gela<sup>46</sup>.

Primena cijano-modifikovanog silika-gela za odvajanje polarnih supstanci, uz primenu polarnih rastvarača ukazuje na značajne razlike između cijanopropil-silika-gela i silika-gela kao sorbenata i potencira jedinstvene adsorpcione karakteristike cijano-modifikovanog silika-gela. Osim toga, uočeni su jedinstveni lokalizacioni efekti koji se smatraju odgovornim za očigledne razlike dva pomenuta aspekta karaktera cijano-modifikovanog silika-gela<sup>43,44</sup>.

Pojam “lokalizacioni efekat” upućuje na tri specifična, srodna efekta: lokalizaciju supstance, zatim delokalizaciju takmičenjem za adsorpcione centre (supstance i/ili rastvarača) i delokalizaciju ograničenog pristupa (lokalizaciju rastvarača). Ovi efekti se po svom dejstvu međusobno prepliću i ne mogu biti razmatrani nezavisno jedan od drugog<sup>44</sup>.

Prvi razmatrani parametar odnosi se na lokalizaciju odvajane supstance na adsorpcionim centrima cijano-modifikovanog sorbenta. Lokalizacija supstance na cijano-grupama kao adsorpcionim centrima može biti objašnjena sledećim mehanizmima: građenjem vodoničnih veza između proton-donorskih grupa sorbenata i cijano-grupa sorbenta ili jonsko-dipolnim interakcijama između katjonskih sorbenata i cijano-grupa sorbenata, ili, što je takođe moguće, donorsko-akceptorskim interakcijama između  $\pi$ -elektronskih sistema odvajanih supstanci i cijano-grupa sorbenta. U slučaju da se lokalizacija odvajanih supstanci dešava na nemodifikovanim silanolnim grupama ona može biti objašnjena građenjem vodoničnih veza donorskog tipa sa silanolnim grupama sorbenta.

Ispoljavanje drugog razmatranog efekta tj. delokalizacije takmičenjem za centre je praktično povezano sa pojavom ometanja lokalizacije odvajanih supstanci, do koje dolazi zahvaljujući sposobnosti molekula polarnog rastvarača da mogu laterarno interagovati sa adsorpcionim centrima na kojima su lokalizovani molekuli supstance. Tako na primer, odvajana supstanca sa proton-donorskim karakteristikama može biti vodonično vezana sa cijano-grupama, i prema tome, lokalizovana na mobilnim centrima vezane faze. Molekuli bazne komponente mobilne faze se lokalizuju na susednim silanolnim centrima na površini sorbenta i istovremeno nastoje da ostvare interakcije sa cijano-grupama (mobilnim centrima vezane faze) tj. da se na njima sorbuju, ometajući na taj način lokalizaciju odvajane supstance. Ova pojava praktično predstavlja delokalizaciju takmičenjem za centre.

Razmatranje fenomena delokalizacije ograničenog pristupa (lokalizacije rastvarača) je povezano sa prisustvom rigidnih nemodifikovanih silanolnih grupa na površini cijano-modifikovanog silika-gela. Vezane faze (uneta modifikacija) zbog pokretljivosti i niskog stepena površinskog prekrivanja nisu najpodesnije za delokalizaciju ograničenog pristupa za razliku od silanolnih grupa koje su rigidne (nepokretne). Razmatranje ovog fenomena je, prema tome, pokazatelj prisustva pristupačnih rezidualnih silanolnih grupa, pri čemu se efekat delokalizacije ograničenog pristupa dešava samo kada se supstanca i molekuli mobilne faze takmiče za iste adsorpcione centre<sup>44</sup>. Molekuli lokalizovanog rastvarača pri nižim koncentracijama zauzimaju prvenstveno nemodifikovane silanolne grupe, usled viših rezultujućih adsorpcionih energija u odnosu na funkcionalne grupe organskog dela unete modifikacije (cijano-grupe). Pri višim koncentracijama, mobilna faza će takođe postepeno zauzimati i organske delove.

Razmatranje svih efekata podvedenih pod naziv "lokalizacioni efekat" upućuje na zaključak da se upotrebom lokalizacionih odnosno nelokalizacionih rastvarača menja karakter cijano-modifikovanog silika-gela kao stacionarne faze. Proučavani lokalizacioni efekti ukazuju da se supstanca i rastvarač mogu adsorbovati na silanolnim grupama podjednako dobro kao na centrima vezane faze i da takmičenje za ove centre ima izražen uticaj na retenciju. Relativna važnost silanolnih grupa u retenciji i selektivnosti menja se kao funkcija pristupačnosti i prirode supstanci, rastvarača i vezane faze<sup>44</sup>. U bilo kom slučaju, karakterizacija vezanih faza mora uključiti ulogu

rezidualnih silanolnih grupa čije prisustvo ne treba obavezno posmatrati u negativnom svetlu. Dodatno, pristupačnost rezidualnih silanola može biti kontrolisana kroz korišćenje lokalizacionih ili nelokalizacionih rastvarača, dalje proširujući mnogostranost primene cijano-modifikovanog silika-gela.

Dalji radovi koji se bave problematikom mehanizama sorpcije na cijano-modifikovanom silika gelu ukazuju na specifično ponašanje ovog sorbenta u normalno-faznim hromatografskim uslovima. Pri tome je posebno istaknuta činjenica da particiono-adsorpcioni mehanizam upravlja retencijom odvajanih supstanci, sa ipak izraženom dominacijom particije. Osim toga, istaknuto je da kvalitativni sastav mobilne faze utiče na odnos udela particije i adsorpcije<sup>55</sup>.

Istovremeno, eksperimenti na CN-fazama u reverzno-faznim uslovima ukazuju na dvojnu prirodu retencionih procesa: disperzione interakcije molekula odvajanih supstanci sa organskim ligandima stacionarne faze (particija) i specifične interakcije aktivnih centara površine matriksa silika gela sa molekulima odvajanih supstanci (adsorpcija)<sup>28,55</sup>.

Konačno, u cilju daljeg rasvetljavanja mehanizama odvajanja supstanci na cijano-modifikovanom silika-gelu usledila je serija radova u okviru kojih je ispitivano hromatografsko ponašanje različitih klasa jedinjenja, za koje je pretpostavljeno da bi mogli razjasiti ulogu cijano-grupa u procesima hromatografskih odvajanja na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela i doprineti proširenju primene ovog sorbenta.

## 2.5. Primena cijano-modifikovanog silika-gela

U poslednjih nekoliko decenija, primenljivost cijano-modifikovanog silika-gela, kao sorbenta u tankoslojnoj hromatografiji potvrđena je brojnim razdvajanjima različitih supstanci. Ove aplikacije su u navođene u literaturi i sumirane periodično<sup>15,56-60</sup>. Neke od publikovanih primena ovog sorbenta objavljenih u poslednjoj deceniji su navedene u Tabeli 2<sup>61</sup>.

Cijano-modifikovani silika-gel je takođe našao veoma uspešnu primenu i u sledećim oblastima:

- Za kapilarnu elektrochromatografiju (CEC) sa monolitnim silika-gel kolonama. Upotrebljivost monolitnih silika-gel kapilarnih kolona koje sadrže vezanu CN-grupu je

ispitivana analizom elektrohromatografskog ponašanja polarnih jedinjenja (ugljenih hidrata, peptida). Navedena ispitivanja su pokazala da su 2CN-OH-monolitna pakovanja pogodna stacionarna faza za normalno-faznu kapilarnu elektrohromatografiju (NP-CEC). Dodatno pokazano je da nova generacija 2CN-OH-monolitnih silika-gel kolona pokazuje bolje retencione karakteristike i selektivnost od monofunkcionalnih, što predstavlja značajan napredak u dizajniranju polarnih monolitnih silika-gela kolona u smislu njihove primene kako za normalno-faznu hromatografiju tako i za NP-CEC<sup>62,63</sup>

- Za čvrsto-tečnu ekstrakciju (solid phase extraction, SPE). Među mnogobrojnim ekstrakcionim tehnikama za tečne i čvrste uzorke, SPE su se pokazale vrlo efikasnim za dobijanje prečišćenih uzoraka iz različitih matriksa. Ova tehnika često ima jedinstvene prednosti u visokom koncentrovanju finalnog ekstrakta, selektivnosti i velikom izboru čvrstih faza, što omogućava ekstrakciju najrazličitijih uzoraka iz vodenih ili organskih matriksa<sup>64</sup>. Cijano-stacionarne faze su u okviru ove tehnike uspešno korišćene pri određivanju policikličnih aromatičnih ugljovodonika u ekstraktima taloga otpadnih voda<sup>65</sup>.

- Za dvodimenzionalna (2D) TLC odvajanja. Cijano-modifikovane silika-gel stacionarne faze su korišćene za izvođenje NP i RP odvajanja na istim pločama jednostavnom promenom sastava mobilne faze<sup>66-69</sup>.

- Za hromatografiju hidrofilnih interakcija, HILIC<sup>70,71</sup>. HILIC je postala veoma popularna za odvajanja polarnih uzoraka na polarnim stacionarnim fazama kao što su CN-modifikovani silika-gel, propandiol silika-gel i aminopropil silika-gel, sa mobilnim fazama na bazi voda-organski rastvarač (u kojima preovlađuje organski rastvarač, obično ACN). Generalno, jačina polarnih interakcija sa analitima raste sledećim redosledom: cijanopropil < diol < aminopropil < „čist“ silika gel, ali selektivnost interakcija ne prati navedeni redosled<sup>30</sup>.

- Za određivanje lipofilnosti različitih supstanci kao parametra koji je u korelaciji sa biološkom aktivnosti i drugim važnim fizičko-hemijskim svojstvima jedinjenja. Primenom cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta dobijene su zadovoljavajuće korelacije između hromatografskih parametara lipofilnosti  $R_M^0$  i izračunavanih  $\log P$  vrednosti za različite ispitivane supstance primenom određenih hromatografskih sistema<sup>72-75</sup>

Tabela 2. Neke od skorije publikovanih primena cijano-modifikovanog silika-gela u TLC<sup>61</sup>

<b>Analit</b>	<b>Stationarna faza</b>	<b>Mobilna faza</b>	<b>Modalitet</b>
Alkaloidi	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	MeOH–diizopropiletar (20:80) i amonijak; MeOH–diizopropil etar (20:80) i dietilamin;	NP
	Merck	MeOH–voda (70:30) i amonijak; MeOH–voda (70:30) i različiti dodaci	RP
Alkaloidi	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	10% MeOH–diizopropileteri 2% NH <sub>3</sub>	NP
Oksindol-alkaloidi iz <i>Uncaria tomentosa</i>	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	Etilacetat–MeOH–voda–sirćetnacid (100:2,7:5:3)	RP
Žučne kiseline	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	<i>n</i> -Heksan–etilacetat–sirćetnacid (49:49:2), (47,5:47,5:5), (37,5:37,5:25)	NP
Žučne kiseline i njihovi derivati	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	MeOH–voda, 45-65% v/v u pocijama od 5%	RP
Steroli	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	Petroletar–aceton (7:3); Hloroform–heksan–MeOH (25:70:5) ili (65:25:10)	NP
	Merck	Petroletar–aceton (80:20); Aceton–voda	RP
Ecdy-steroidi	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	<i>n</i> -Heksan–aceton (6:4);	NP
	Merck	ACN–voda (2:8)	RP
Ecdy-steroidi	HPTLC CN F <sub>254s</sub>	Dihlormetan–etanol (96%) (8:2); Etil acetat–metanol–amonijak (25%); (85:15:5); Toluen–aceton–etanol (96%)–amonijak (25%) (100:140:32:9); Hloroform–MeOH–benzen (25:5:3); Etil acetat–etanol (96%)–voda (16:2:1) MeOH–voda (6:4); ACN–voda (35:65); ACN–voda–trifluorsirćetna kiselina (35:65:0.1); THF–voda (45:55); <i>n</i> -Heksan–aceton (6:4); ACN–voda (2:8)	NP

Tabela 2. Nastavak

<b>Analit</b>	<b>Stationarna faza</b>	<b>Mobilna faza</b>	<b>Modalitet</b>
Atipični antidepresivi	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	Smeše 40% (v/v) acetona, 40% (v/v) dietilamina, 60% (v/v) dioxana, 20% (v/v) etanola, 40% (v/v) izopropanola i 60% (v/v) THF u <i>n</i> -heksanu	NP
Fenoli, anilini	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	MeOH (20–90%), THF (20–70%), i ACN (20–70%) u vodi	RP
Polifenoli pepermintna	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	<i>n</i> -Heksan–THF (60:40)	NP
Fenolna jedinjenja	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	Petrol etar–aceton (80:20); petrol etar–aceton–hloroform (40:30:25); benzen–MeOH–sirćetna kiselina (94:5:1); benzen–2–propanol–sirćetna kiselina (95:5:1); benzen–aceton (90:10); cikloheksan–dioxan (60:40); <i>n</i> -heksan–hloroform (60:40); <i>n</i> -heksan–dihlorometan (60:40); <i>n</i> -heksan–etil acetat (90:10);	NP
		MeOH–voda–sirćetna kiselina (40:59:1); 2-propanol–voda–sirćetna kiselina (40:59:1); aceton–voda–sirćetna kiselina (60:39:1); etanol–voda (60:40); THF–voda–sirćetna kiselina (40:59:1)	RP
Mono- i polisupstituisani fenoli	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	MeOH–voda (30-60% v/v) ACN–voda (30-55% v/v)	RP
N-Supstituisani 2-alkiliden- 4-oksotiazolidini	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	MeOH–voda u različitim zapreminskim odnosima; ACN–voda u različitim zapreminskim odnosima; THF–voda u različitim zapreminskim odnosima	RP



Tabela 2. nastavak

Analit	Stationarna faza	Mobilna faza	Modalitet
Hinolini	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	60% MeOH i fosfatni pufer različite pH (2–10); 60% MeOH + 20% acetatni pufer pH 3,5 i različite koncentracije jon-par reagensa natrijumove soli oktansulfonske kiseline OSA-Na (0,001 M, 0,005M, 0,0075M, 0,01M, 0,015M, 0,02M, 0,025M); 60% MeOH, acetatni pufer pH 3,5 i različitim koncentracijama blokatora silanolnih grupa, dietilamina DEA (0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1); 60% MeOH, acetatni pufer pH 3,5 i različiti blokatori silanolnih grupa (tetrabutilamonijumhlorid (TBA-Cl), dietanolamin (DEOA), triizopentilamin (TiPN), trietanolamin (TEOA), dietilamin (DEA)); Različiti organski modifikatori (50% THF, 50% dioksan, 60% MeOH, 60% ACN, 60% izopropanol), acetatni pufer pH 3,5 i 0,01 mol L <sup>-1</sup> OSA-Na; Različiti organski modifikatori (60% MeOH, 60% ACN, 60% izopropanol, 50% THF, 50% dioksan), 20% acetatni pufer pH 3,5 i 0,05 mol L <sup>-1</sup> DEA	RP
Derivati holne kiseline <i>cis-trans</i> izomeri bis-steroidnih tetraoksana	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	10–30 vol% voda u MeOH u porcijama od 5%; 10–40 vol% voda u acetonu u porcijama od 5%	RP
s-Triazini	Nano-Sil-CN/UV <sub>254</sub> (Macherey-Nagel)	Vodeni rastvori ACN, 50–70% v/v; THF, 50–80% v/v i dioksana 60–84% v/v	RP
Vodorastvorljivi Co(III) kompleksi	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	0–100% (v/v) vode u MeOH, u porcijama od 10% (v/v)	HILIC
Pesticidi (herbicidi, fungicidi, insekticidi, sinergisti)	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	THF– <i>n</i> -heptan, 1:4 (v/v); Etilacetat– <i>n</i> -heptan, 1:4 (v/v); Dioksan– <i>n</i> -heptan, 3:7 (v/v); Etilacetat–diizopropiletar, 1:19 (v/v); Etilacetat–to1uen, 1:19 (v/v); ACN–voda, 1:1 (v/v); MeOH–voda, 3:2 (v/v); MeOH–voda, 7:3 (v/v); Dioksan–voda, 1:1 (v/v)	NP 2D RP
Pesticidi	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	MeOH–voda, 60:40 (v/v)	RP 2D

Tabela 2. nastavak

<b>Analit</b>	<b>Stationarna faza</b>	<b>Mobilna faza</b>	<b>Modalitet</b>
Neka fenolna jedinjenja – dve vrste <i>Polygonum</i> : <i>P. Hydropiper</i> i <i>P.</i> <i>cuspidatum</i>	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	Propan-2-ol i <i>n</i> -heptan ( 20%, 25%, 30%, 35% i 50% (v/v))	NP 2D
		Etil-acetat i <i>n</i> -heptan ( 40%, 50%, 55%, 60% and 70% (v/v)); MeOH i voda ( 20%, 30%, 40% , 50% i 60% (v/v))	RP
Kumarini	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	35 % Etil acetat- <i>n</i> -heptan	NP 2D
		30% ACN–voda	RP
Ekstrakt korena <i>Serratula wolffi</i>  Ekstrakt <i>Silene</i> <i>viridifloras</i>	LiChrospher CN, Merck	Aceton-etanol (96%)–amonijak (25%) (140:3:9)	NP 2D
		Etil acetat–etanol (96%)–voda (16:2:1) Toluen–aceton–etanol (96%)–amonijak (25%) (100:140:32:9); voda–ACN (4:1); <i>n</i> -Heksan-aceton (3:2)	RP
Biljni ekstrakti ( <i>Polygonum hydropiper</i> , <i>Betula verrucosa</i> i <i>Pulmonaria officinalis</i> )	HPTLC CN F <sub>254s</sub> Merck	40% Propan-2-ol u <i>n</i> -heptanu; 50% THF u <i>n</i> -heptanu;	NP 2D
		50% MeOH u vodi; 40 % MeOH u vodi	RP

Značaj primenljivosti cijano-propil silika-gela u navedene svrhe se ogleda u činjenici da ukoliko se dobije statistički značajan i razumljiv model kvantitativnog odnos strukture i retencije (*Quantitative Structure-Retention Relationships*, QSRR), on može da se iskoristi za predviđanje retencije novih, srodnih jedinjenja; za objašnjenje mehanizma razdvajanja u primenjenom hromatografskom sistemu; za određivanje složenih fizičko-hemijskih svojstava jedinjenja (različitih od hromatografskih); za identifikaciju strukturnih deskriptora koji najviše utiču na retenciono ponašanje u posmatranim uslovima; kao i za predviđanje relativne biološke aktivnosti saglasno činjenici da je ista određena lipofilnošću jedinjenja i interakcijama sa aktivnim centrom receptora<sup>16</sup>.

Konačno smatra se da su cijano faze podjednako atraktivne za bilo kakva jedno- ili multi- stepena odvajanja zato što im se karakteristike vrlo jednostavno mogu značajno promeniti, pravilnim odabirom sastava mobilne faze<sup>43</sup>.

### 3. NAŠI RADOVI

Primenljivost cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u tankoslojnoj hromatografiji je potvrđena odvajanjem najrazličitijih klasa jedinjenja u okviru fitohemijskih, biohemijskih i farmaceutskih analiza, analiza kvaliteta resursa životne sredine i čitavom nizu drugih oblasti<sup>61-75</sup>.

Opsežna ispitivanja su izvedena u cilju razumevanja osnova retencije u normalno- i reverzno-faznoj hromatografiji na cijano-vezanim fazama. Pri NP uslovima, cijano-modifikovani silika-gel se ponaša uglavnom kao deaktivirani silika-gel što rezultuje interakcijama analita sa rezidualnim silanolnim grupama. Ukoliko polarnost rastvarača u NP uslovima raste, efekat silanolnih grupa biva suzbijen što omogućava cijano-grupama da postanu primarni adsorpcioni centri<sup>4,5</sup>. Pri reverzno-faznim uslovima, smatra se da cijano-grupe imaju ulogu primarnih adsorpcionih centara, čija koncentracija (relativna populacija) određuje "hidrofobnost" površine sorbenta. Međutim, utvrđeno je da i preostale nemodifikovane silanolne grupe takođe igraju važnu ulogu u određivanju opštih adsorpcionih karakteristika ovog sorbenta i pri RP uslovima<sup>5</sup>. Dobijeni rezultati praktično govore o nepostojanju suštinske razlike u mehanizmu odvajanja prilikom promene eksperimentalnih uslova (NP ili RP sistemi), što je ukazalo da postoji potreba za detaljnim proučavanjem mehanizama odvajanja na ovom sorbentu.

Stoga, u cilju daljeg rasvetljavanja mehanizama odvajanja supstanci na CN-modifikovanom silika-gelu u okviru ovoga rada planirano je ispitivanje hromatografskog ponašanja različitih klasa hemijskih jedinjenja, za koje je pretpostavljeno da bi mogli razjasiti ulogu cijano-grupa u procesima hromatografskih odvajanja.

Pretpostavljeno je da bi poređenje rezultata dobijenih na cijano-modifikovanom silika-gelu (koji pored silanolnih-grupa sadrži i cijano-grupe) sa rezultatima dobijenim na silika-gelu (koji sadrži samo silanolne-grupe) i rezultatima dobijenim na poliakrilonitrilnom sorbentu (koji sadrži samo cijano-grupe), dalo izvestan doprinos tumačenju mehanizama odvajanja na CN-silika-gelu. Slično, preliminarno ispitivanje hromatografskog ponašanja 1,4-benzodiazepina uporedo na sva tri sorbenta<sup>76</sup>, ukazalo je na izvesnu pravilnost u jačini retencije na pomenutim sorbentima, koja je

protumačena kao posledica njihove polarnosti. Međutim, značajnije specifičnosti u hromatografskom ponašanju, koje bi bile posledica interakcija CN-grupa sa odvajanim supstancama, nisu uočene. Zato je tokom daljih proučavanja posebna pažnja posvećena ispitivanju hromatografskog ponašanja sorbenada koji sadrže aromatične delove strukture, kao što su mešoviti ( $\beta$ -diketonato) i ( $\beta$ -ketoiminato) kompleksi prelaznih metala sa različitim brojem fenil-grupa u molekulu, različiti derivati fenola, kao i triazinski herbicidii fenoksikarboksilne kiseline. Naime, na osnovu rezultata ispitivanja hromatografskog ponašanja navedenih supstanci na PANS-u, pretpostavljeno je da bi jedinjenja ovakve strukture mogla specifično da interaguju sa cijano-grupama sorbenta, odnosno da svojom retencijom ukažu na učešće ovih aktivnih centara u procesu hromatografskog odvajanja.

Takođe, u okviru RP hromatografskih uslova planirano je proučavanje primenljivosti cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u hromatografskim sistemima za modelovanje zemljište-voda porednih koeficijenata normiranih na sadržaj organskog ugljenika ( $\log K_{OC}$ ) kao jednim od ključnih parametara koji određuju sudbinu organskih jedinjenja u životnoj sredini. Obrazloženje za korišćenje modelovanja primenom  $K_{OC}$  leži u činjenici da je sorpcija, između ostalog, direktno proporcionalna sadržaju organske supstance u zemljištu (SOM)<sup>77</sup>. Dosada, sa izuzetkom jedne studije<sup>73</sup>, koja je bila fokusirana na grupu fenolnih jedinjenja sa ograničenim brojem supstanci, TLC metoda nije korišćena za određivanje  $\log K_{OC}$ . Pretpostavljeno je da bi raznovrsnost i značajno veći broj jedinjenja koja bi u okviru ovoga rada bila uključena u ispitivanje omogućile nov uvid i dobijanje više opštih zaključaka koji se odnose na: (i) pogodnost upotrebe reverzno-faznih tankoslojnih hromatografskih (RP-TLC) metoda za jedinjenja sa različitom sposobnošću ostvarivanja specifičnih interakcija kao što su: vodonične veze, dipolarne i polarizabilne interakcije, i (ii) postizanje optimalnog  $\log K_{OC}$  kalibracionog opsega. U tom smislu, sistemski je procenjivana primenljivost RP-TLC odnosno cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u  $\log K_{OC}$  modeliranju, a osim toga određene su  $\log K_{OC}$  vrednosti za veliki broj ekološki i farmaceutski važnih jedinjenja za koje  $K_{OC}$  vrednosti još nisu determinisane. Pretpostavljeno je da bi povećana polarnost CN-slojeva u kombinaciji sa odgovarajućim mobilnim fazama, kroz značajno slabljenje dipolarnog i proton akceptorskog uticaja mobilne faze kao i jačanje

molarne refraktivnosti mogla biti ključna za bolje modeliranje  $\log K_{OC}$  u hromatografskim sistemima.

Pored toga, kao poslednji deo planiranih istraživanja je i proširenje primene cijano-modifikovanog silika-gela kao specifičnog sorbenta za hromatografiju hidrofilnih interakcija (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) kao relativno novu hromatografsku tehniku, u okviru koje analit (visoko polarna supstanca) interaguje sa hidrofilnom stacionarnom fazom (slične onim korišćenim u NPLC) i eluiran je sa relativno hidrofobnim binarnim mobilnim fazama (voda-metanol, voda-aceton ili voda-acetonitril, slično onima korišćenim u RPLC) u kojima je voda snažniji eluent<sup>30</sup>. Saglasno tome planirana su ispitivanja različitih klasa metalnih kompleksa za koje pretpostavljeno da bi mogli specifično da interaguju sa cijano-grupama sorbenta, odnosno da svojom retencijom ukažu na aktivno učešće ovih aktivnih centara u procesima hromatografskog odvajanja na ovom sorbentu. S druge strane u drugom segmentu ispitivanja razmatrana je upotrebljivost cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u hromatografiji hidrofilnih interakcija.

### 3.1 Normalno-fazna planarna hromatografija herbicida

Proučavanje mogućnosti primene cijano-modifikovanog silika-gela kao sorbenta u TLC i mehanizama tih odvajanja u okviru ovoga rada započeto je ispitivanjem hromatografskog ponašanja dve klase herbicida: derivata triazina i fenoksikarboksilnih kiselina, uporedo na tankim slojevima PANS-a, silika-gela i CN-silika-gela. Pomenute klase herbicida su do sada odvajane pre svega na tankom sloju silika-gela, zatim na silika-gelu impregnisanom rastvorom  $\text{AgNO}_3$  odnosno parafinskim uljem, poliamidu, aminoplastu, celulozi,  $\text{C}_{18}$ -silika-gelu kao i nekim drugim sorbentima<sup>78-82</sup>.

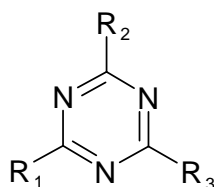
Hromatografsko ponašanje pet triazinskih derivata i četiri fenoksikarboksilne kiseline na tankim slojevima tri pomenuta sorbenta u uslovima NP hromatografije razmatrano je primenom 7 hromatografskih rastvarača (Tabela 3). Dobijene  $\text{hR}_F$ -vrednosti date su u Prilogu, Tabele P1-P3.

Tabela 3. Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanje triazinskih derivata i fenoksikarboksilnih kiselina u uslovima NP hromatografije

Redni broj	Rastvarač	Zapreminski odnos
1	Ugljentetrahlorid	
2.	Hloroform	
3.	Etilacetat	
4.	Petroletar / THF	85:15
5.	Petroletar / Dioksan	85:15
6.	Petroletar / Etilacetat	85:15
7.	Petroletar / Aceton	70:30

### 3.1.1 Normalno-fazna hromatografija triazina

Simetrični triazini ili 1,3,5-*triazini* su heterociklična jedinjenja azota. Njihov originalni naziv (simetrični triazini) se najčešće skraćuje na *s*- ili *sim*-triazini. Struktura ispitivanih triazinskih herbicida prikazana je na Slici 4.



Herbicid	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Simazin	Cl-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -
Atrazin	Cl-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -
Propazin	Cl-	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -
Ametrin	SCH <sub>3</sub> -	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -
Prometrin	SCH <sub>3</sub> -	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -

Slika 4. Struktura proučavanih triazinskih herbicida

U hemijskom pogledu *s*-triazini su slabo bazne, polarne supstance na čija bazna svojstva najveći uticaj ima supstituent u položaju 2<sup>83-85</sup>. U zavisnosti od supstituenta, bazne karakteristike rastu u nizu Cl < SCH<sub>3</sub>. Alkil-grupe u položajima 4 i 6 imaju

znatno manji, ali takođe izražen uticaj na bazna svojstva ovih supstanci, što se odražava na njihove p*K*<sub>a</sub> vrednosti<sup>86,87</sup> (Tabela 4)<sup>88</sup>.

Tabela 4. p*K*<sub>a</sub> vrednosti ispitivanih triazina

Naziv	p <i>K</i> <sub>a</sub> vrednost
Simazin	1,90
Atrazin	1,70
Propazin	1,85
Ametrin	4,10
Prometrin	4,09

Molekuli *s*-triazina u svojoj strukturi imaju tri simetrično raspoređena atoma azota i zahvaljujući tome mogu ostvarivati različite nekovalentne interakcije. U ove interakcije mogu biti uključeni slobodni elektronski parovi na atomima azota (koordinaciona i vodonična veza), zatim delokalizovani  $\pi$ -elektroni *s*-triazinskog prstena ( $\pi$ - $\pi$ -interakcije i katjon- $\pi$  interakcije), čak i  $\sigma$ -elektroni osnovne strukture (anjon- $\sigma$  i elektron- $\sigma$ -interakcije). Takođe, imajući u vidu da je *s*-triazinski prsten heteroaromatičan sa delokalizovanom strukturom, može se ponašati i kao  $\sigma$ -donor, i kao  $\pi$ -akceptor. Veoma stabilni kompleksi molekula *s*-triazina sa prelaznim metalima, nastaju preklapanjem popunjenih *d*-orbitala metala i nepopunjenih  $\pi^*$  orbitala *s*-triazinskog prstena<sup>84</sup>. Sa druge strane, do formiranja vodoničnih veza može doći zahvaljujući slobodnim elektronskim parovima na atomima azota koji se ponašaju kao akceptori u vodoničnij vezi<sup>84,85</sup>.

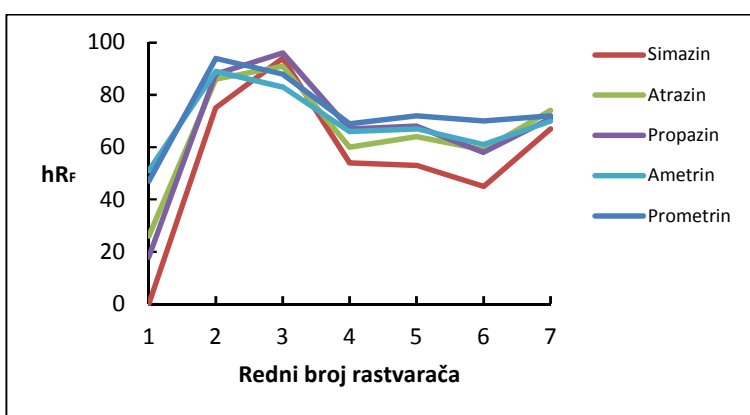
Hromatografsko ponašanje triazinskih derivata na sva tri primenjena sorbenta primenom rastvarača 1-7 (Tabela 3) potvrđuje normalno-fazne uslove odvajanja (Slike 5, 6 i 7). U najvećem broju razmatranih slučajeva povećanje dužine ugljovodoničnog niza supstituenata (povećanje hidrofobnosti molekula) rezultuje povećanjem pokretljivosti analiziranih supstanci. Dobijeni rezultati su saglasni sa literaturnim podacima<sup>78</sup>.

Priroda R<sub>1</sub> supstituenta ne utiče na uočeno hromatografsko ponašanje, odnosno do porasta hR<sub>F</sub> vrednosti sa povećanjem hidrofobnosti ispitivanih supstanci dolazi bez

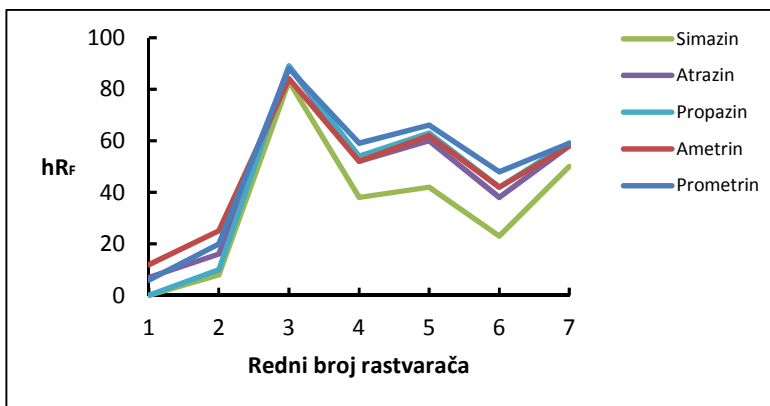


obzira na to da li se radi o hloro- ili tiometil-derivatima. Odstupanje je primećeno samo na PANS-u, u smislu da povećanje hidrofobnosti samo  $R_2$  supstituenta ne uslovljava povećanje  $hR_F$  vrednosti ispitivanih supstanci, ukoliko je  $R_1$  supstituent Cl (slučaj atrazin-propazin).

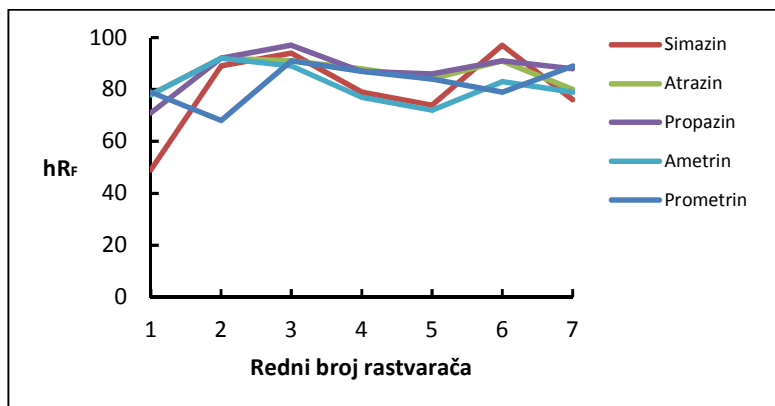
Rezultati dobijeni hromatografisanjem triazinskih derivata koji se razlikuju samo u  $R_1$  supstituentu (parovi: atrazin-ametrin i propazin-prometrin), ukazuju na različito hromatografsko ponašanje u zavisnosti od upotrebljenog sorbenta.



Slika 5.  $hR_F$  vrednosti triazina na tankom sloju CN-silika-gela primenom NP mobilnih faza



Slika 6.  $hR_F$  vrednosti triazina na tankom sloju silika-gela primenom NP mobilnih faza



Slika 7.  $hR_F$  vrednosti triazina na tankom sloju PANS-a primenom NP mobilnih faza

Hromatografisani triazini sa Cl kao  $R_1$  supstituentom na PANS-u u NP uslovima imaju veće  $hR_F$  vrednosti. Međutim, primena silika-gela i CN-modifikovanog silika-gela kao sorbenata pokazuje veće  $hR_F$  vrednosti kod derivata koji sadrže  $SCH_3$ -grupu kao  $R_1$  supstituent. Identično ponašanje je utvrđeno prilikom odvajanja triazinskih derivata na  $NH_2$  vezanim fazama<sup>84</sup>. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da je uočeno ponašanje triazinskih derivata posledica kako prirode supstituenata tako i razlike u prirodnoj interakciji između odvajanih supstanci i sorbenata. Uvođenje  $SCH_3$  grupe kao  $R_1$  supstituenta ima dvojni efekat. Naime, prisustvo elektronegativnog atoma S u ovom supstituentu dovodi do privlačenja elektrona. Međutim, od ovog efekta mnogo je izraženija sklonost pomenute grupe ka rezonanciji i raspodeli elektrona sa aromatičnim jezgrom triazina<sup>89</sup>. S druge strane, halogeni na osnovu svog induktivnog efekta privlače elektrone. Sorpcija odvajanih triazina na silika-gelu i CN-modifikovanom silika-gelu je verovatno zasnovana na građenju vodoničnih veza između elektronegativnih atoma  $R_1$  supstituenta i silanolnih grupa sorbenta. Pri tome  $hR_F$  vrednosti derivata sa  $SCH_3$  grupom su veće od derivata sa Cl- kao  $R_1$  supstituentom usled rezonancije  $SCH_3$  grupe sa aromatičnim jezgrom, što umanjuje baznost odgovarajućih derivata. Istovremeno, derivati sa veoma elektronegativnim atomom Cl kao  $R_1$  supstituentom se jače sorbuju tj. ostvaruju jače vodonične veze sa silanolnim grupama sorbenta. S druge strane, retencija ovih triazinskih derivata na PANS-u uslovljena je ne samo građenjem vodoničnih veza kao kod silika-gela i CN-silika-gela, već verovatno i donorsko-akceptorskim interakcijama između  $\pi$ -elektronskih sistema odvajanih supstanci i cijano-grupa sorbenta, budući da derivati sa  $SCH_3$  supstituentom pokazuju jaču retenciju.

Naime 1,3,5-triazabenzen (1,3,5-triazin), čijom derivatizacijom su dobijene hromatografisane supstance, pokazuje povećani efekat aza-supstitucije, što se posebno ogleda u povećanju elektron-deficitarnosti<sup>89</sup>. Stoga prisustvo SCH<sub>3</sub> grupe povećava (usled rezonancije) elektronsku gustinu aromatičnog jezgra i uslovljava jaču sorpciju derivata sa ovim supstuentom<sup>80</sup>.

Ukoliko se pak grupišu analiziran triazinski derivati na osnovu identičnosti R<sub>3</sub> supstituenta, pri čemu su R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> supstituenti promenljivi (parovi: atrazin-prometrin, propazin-ametrin) ponovo primećujemo razliku između sorbenata. U slučaju PANS-a, priroda R<sub>1</sub> supstituenta praktično uslovljava hromatografsko ponašanje odvajanih supstanci dok priroda R<sub>2</sub> supstituenta nije od značaja. Naime, supstance sa Cl kao R<sub>1</sub> supstuentom imaju veće hR<sub>F</sub> vrednosti u normalno-faznim uslovima. Međutim, rezultati dobijeni na preostala dva sorbenta ukazuju na veći značaj prirode R<sub>2</sub> supstituenta. Na osnovu toga se može pretpostaviti da su interakcije OH-grupa silika-gela i CN-modifikovanog silika-gela sa  $\pi$  elektronima prstena *s*-triazina ili elektronskim parovima atoma azota u supstuentima odgovorne za retenciju odvajanih supstanci na pomenutim sorbentima. Stoga, budući da su veze silanolnih grupa silika-gela i cijano-modifikovanog silika-gela sa elektronskim parom na N-atomu od osnovne važnosti dok su međusobno suprotni efekti donorske sposobnosti supstuentata (izopropil < etil) i sterne pristupačnosti (koja raste sa entropijski faktorom u ravnoteži) od manjeg značaja, pretpostavlja se da će ravnotežne konstante Si-OH ...N-triazin veza opadati sa povećanjem voluminoznosti alkil-grupa, što je potvrđeno eksperimentalno, a takođe je i u skladu sa literaturnim podacima<sup>80,84,89</sup>. Saglasno tome, supstance sa hidrofobnijim (voluminoznijim) R<sub>2</sub> supstuentom pokazuju u NP uslovima slabiju retenciju, dok primena rastvarača veće polarnost dovodi do povećanja njihove retencije. Odnosi hR<sub>F</sub> vrednosti atrazina i prometrina, odnosno propazina i ametrina su u skladu sa literaturnim podacima dobijenim u NP i/ili RP hromatografskim sistemima<sup>78</sup>. Dobijeni rezultati prema tome, ponovo ukazuju na sličnost između silika-gela i CN-silika-gela prilikom odvajanja triazinskih derivata u NP uslovima.

Poređenjem jačine sorpcije triazinskih derivata u ispitivanim hromatografskim sistemima uočeno je da je najjača retencija ispitivanih supstanci je na tankom sloju silika-gela, zatim na CN-modifikovanom silika-gelu i najslabija na PANS-u. Najjače zadržavanje triazinskih derivata na silika-gelu u odnosu na druga dva primenjena

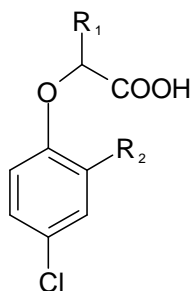
sorbenta je saglasno ranijoj pretpostavci da se odvajanje navedenih supstanci ostvaruje građenjem vodoničnih veza. Pomenuti zaključak je podržan činjenicom da je površina silika-gela prekrivena aktivnim silanolnim grupama (donorima vodonika) sposobnim za stvaranje vodoničnih veza, koji imaju ulogu primarnih adsorpcionih centara. Takođe, kao što je već navedeno, povećanje hidrofobnosti molekula triazina rezultuje povećanjem pokretljivosti analiziranih supstanci. Takvo retenciono ponašanje može biti objašnjeno povećanjem rastvorljivosti triazinskih derivata u korišćenim mobilnim fazama (pozitivni solvatacioni efekat).

Supstance pokazuju slabije zadržavanje na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela što je verovatno posledica činjenice da pomenuti sorbent na površini sadrži pored cijano-propil grupa unetih modifikacijom (koje ostvaruju slabije interakcije) i oko 50% silanolnih grupa sposobnih za ostvarivanje jačih interakcija.

Konačno, analizirane supstance se najmanje zadržavaju na PANS-u, budući da se površina ovog sorbenta odlikuje samo prisustvom cijano-grupa koje mogu ostvariti slabije interakcije u odnosu na ranije pomenute silanolne grupe.

### 3.1.2. Normalno-fazna hromatografija fenoksikarboksilnih kiselina

U nastavku rada ispitivano je hromatografsko ponašanje fenoksikarboksilnih kiselina (Slika 8). Hemijske karakteristike ovih herbicida su određene prisustvom kako aromatičnog dela strukture (fenil-grupe) tako i prisustvom karboksilne grupe. Sa druge strane, njihova fiziološka aktivnost raste uvođenjem halogena kao supstituenata u aromatični prsten, pri čemu je položaj halogen-supstituenta od velikog značaja. Na primer, u seriji dihlorofenoksisirćetnih kiselina, 2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina ima najveću fiziološku aktivnost.

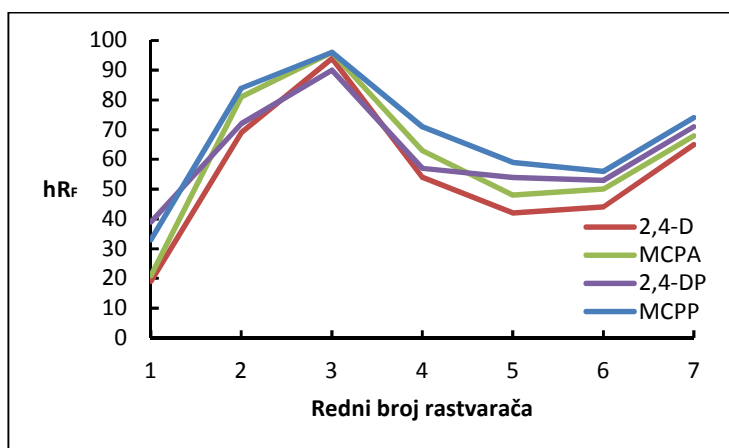


Fenoksikarboksilna kiselina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
2,4 D	H	Cl
2,4 DP	CH <sub>3</sub>	Cl
MCPA	H	CH <sub>3</sub>
MCPP	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

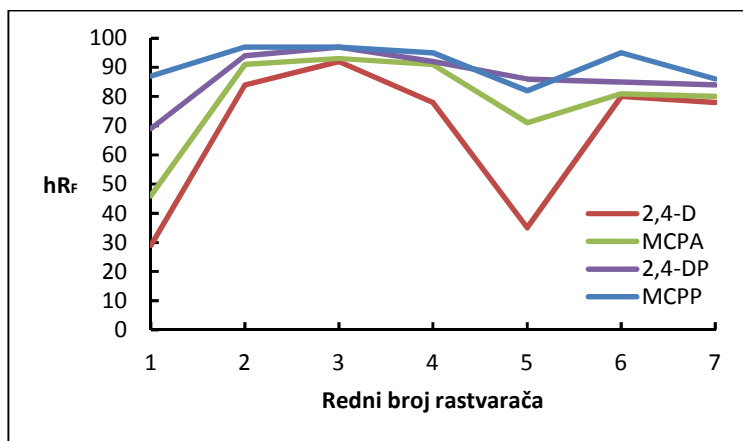
Slika 8. Strukturne formula ispitivanih fenoksikarboksilnih kiselina

S druge strane, kada je jedan atom vodonika zamenjen alifatičnim ugljovodoničnim supstituentom u molekulu fenoksisirćetne kiseline aktivnost jedinjenja raste neznatno<sup>91</sup>.

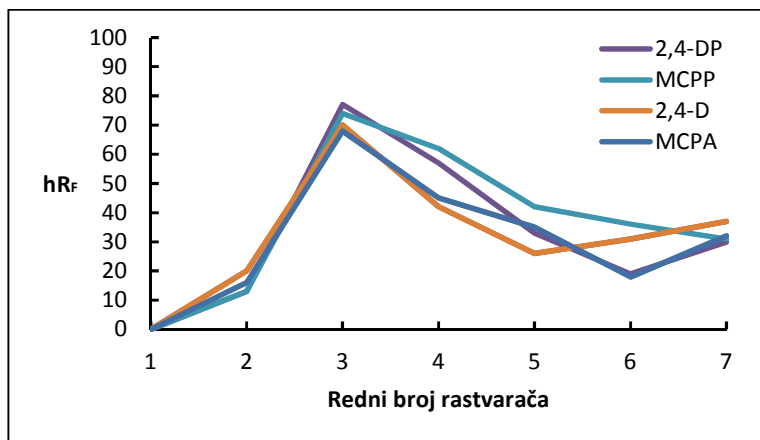
Razmatranjem hromatografskog ponašanja ispitivanih fenoksi-kiselina na PANS-u i CN-modifikovanom silika-gelu u NP uslovima uočava se da retencija generalno opada sa povećanjem broja CH<sub>3</sub> grupa, a raste sa uvođenjem Cl supstituenta. Prema tome, utvrđeni retencioni redosled je saglasan sa povećanjem kiselosti ispitivanih supstanci i literaturnim podacima<sup>81</sup>. Na silika-gelu nije uočena navedena pravilnost u retencionom ponašanju, tako da se može zaključiti da proučavanje hromatografskog ponašanja fenoksikarboksilnih kiselina ističe sličnost između PANS-a i CN-silika-gela kao sorbenata (Slike 9, 10 i 11).



Slika 9. hR<sub>F</sub> vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela primenom NP mobilnih faza



Slika 10. hR<sub>F</sub> vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju PANS-a primenom NP mobilnih faza



Slika 11.  $hR_F$  vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju silka-gela primenom NP mobilnih faza

Kao i prilikom ispitivanja triazinskih herbicida, i kod fenoksi-kiselina je utvrđena najjača sorpcija na tankom sloju silika-gela, zatim na CN-modifikovanom silika-gelu i najviše  $hR_F$  vrednosti su utvrđene na PANS-a. Utvrđeni retencioni redosled je, kao i prilikom odvajanja triazinskih derivata, posledica jačine formiranih vodoničnih veza i prirode upotrebljenih sorbenata.

### 3.2. Normalno-fazna planarna hromatografija neutralnih metalnih kompleksa

Imajući u vidu cilj i oblast ispitivanja ovog rada posebna pažnja je posvećena razmatranju hromatografskog ponašanja tri klase neutralnih metalnih helatnih kompleksa. Retencija ovih kompleksa je ispitivana u toku ranijih studija na tankom sloju silika-gela<sup>92-96</sup> i PANS-a<sup>97-100</sup> pri čemu je ustanovljeno specifično hromatografsko ponašanje tris( $\beta$ -diketonato) kompleksa tipa  $[Co(acac)_{3-n}(phacphac)_n]$  ( $n=0-3$ ) prilikom korišćenja PANS-a kao sorbenta, posebno u NP uslovima. Takvo hromatografsko ponašanje, za koje je pokazano da je posledica donorsko-akceptorskih interakcija CN-grupa sorbenta sa  $\pi$ -elektronskim sistemima aromatičnih liganada, bi moglo da ukaže na eventualno učešće pomenutih grupa u procesima odvajanja na CN-modifikovanom silika-gelu.

Proučavanje hromatografskog ponašanja serije navedenih neutralnih metalnih kompleksa je izvedeno primenom 13 nevodnih rastvarača (Tabela 5). Neke od navedenih mobilnih faza su ranije bile primenjene za odvajanje istih supstanci na tankim slojevima PANS-a i/ili silika-gela<sup>92-99</sup>.

Tabela 5. Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanja neutralnih metalnih kompleksa u NP uslovima.

Redni broj	Rastvarač	Zapreminski odnos
1	Cikloheksan	
2	Hloroform	
3	Dihlormetan	
4	Ugljentetrahlorid	
5	<i>n</i> -Heksan / Ugljentetrahlorid	80:20
6	<i>n</i> -Heksan / Ugljentetrahlorid	70:30
7	<i>n</i> -Heksan / Benzen	80:20
8	<i>n</i> -Heksan / Benzen	60:40
9	<i>n</i> -Heksan / Aceton	90:10
10	<i>n</i> -Heksan / Aceton	85:15
11	<i>n</i> -Heksan / Aceton	70:30
12	<i>n</i> -Heksan / Aceton	60:40
13	<i>n</i> -Heksan / Aceton	40:60

Hromatografisana su četiri ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa tipa  $[\text{Co}(\text{acac})_3\text{-}_n(\text{phacphac})_n]$  ( $n = 0 - 3$ ), tri ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa, dva *tris*(alkil-ksantato)-Co(III) kompleksa i pet *bis*(alkil-ksantato)-Ni(II) kompleksa. Dobijeni rezultati su navedeni u Tabeli 6.

Tabela 6.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih kompleksa na cijano-modifikovanom silika-gelu

Redni broj	Kompleks <sup>a</sup>	Rastvarač <sup>b</sup>												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	$[\text{Co}(\text{acac})_3]$	6	F <sup>c</sup>			8	42	18	36	16	23	48	65	92
2	$[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{phacphac})]$	4	F			6	44	15	39	10	20	45	68	94
3	$[\text{Co}(\text{acac})(\text{phacphac})_2]$	2	F			5	48	13	45	6	15	40	71	96
4	$[\text{Co}(\text{phacphac})_3]$	0	F			4	51	8	50	3	11	36	73	97
5	$[\text{Co}(\text{acac}_2\text{en})]$			84	32	5		2		15	32	44	69	74
6	$[\text{Co}(\text{acacphacacen})]$			88	41	8		7		12	13	43	71	78
7	$[\text{Co}(\text{phacacen})]$			88	43	25		43		0	0	42	72	79
8	$[\text{Co}(\text{Et-xanthat})_3]$	15	F			24	54	47	68	29	34	58	76	96
9	$[\text{Co}(\text{Pr-xanthat})_3]$	24	F			38	67	61	77	42	49	65	80	95
10	$[\text{Ni}(\text{Et-xanthat})_2]$					27		37		45		68	79	94
11	$[\text{Ni}(\text{Pr-xanthat})_2]$					39		49		55		73	82	95
12	$[\text{Ni}(\text{Bu-xanthat})_2]$					44		59		62		74	82	96
13	$[\text{Ni}(\text{sec-Bu-xanthat})_2]$					67		61		65		75	81	96
14	$[\text{Ni}(\text{iso-Bu-xanthat})_2]$					50		61		65		76	81	96

<sup>a</sup> acac = 2,4-pentandionato jon; phacphac = 1,3-difenil-1,3-propandionato jon;

en = 1,2-diaminoetan.

<sup>b</sup> Vidi Tabelu 5; <sup>c</sup>F = Front rastvarača.

3.2.1. Normalno-fazna hromatografija ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa

Poređenjem  $hR_F$  vrednosti ispitivanih *tris*( $\beta$ -diketonato)-kompleksa dobijenih primenom rastvarača (1, 2 i 7) na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela sa ranije utvrđenim rezultatima na silika-gelu i PANS-u može se uočiti da jačina sorpcije ispitivanih kompleksa (Slika 12) raste u nizu sorbenata: PANS < CN-silika-gel < silika-gel.

Pored toga, primenom rastvarača 1 i 7 utvrđen je retencioni redosled analogan rezultatima dobijenim na PANS-u<sup>97,98</sup>, odnosno suprotan rezultatima dobijenim na silika-gelu<sup>139</sup>. Radi detaljnijeg ispitivanja ovog redosleda, primenjena je serija dvokomponentnih nevedenih rastvarača. Za polarniju organsku komponentu u ovim sistemima odabrani su rastvarači koji se međusobno razlikuju, između ostalog, po vrednostima lokalizacionog parametra,  $m$ <sup>19</sup>. Lokalizacioni parametar ( $m$ ) predstavlja meru sposobnosti molekula rastvarača da ostvari interakcije sa sorbentom, tj. da interaguje na tačno definisani način. S druge strane, nelokalizovani rastvarači takođe mogu ostvariti interakcije sa sorbentom, ali su pomenute interakcije znatno slabije i slučajne (nasumične). Lokalizacioni parametri nekih od rastvarača upotrebljenih u ovom radu dati su u Tabeli 7.

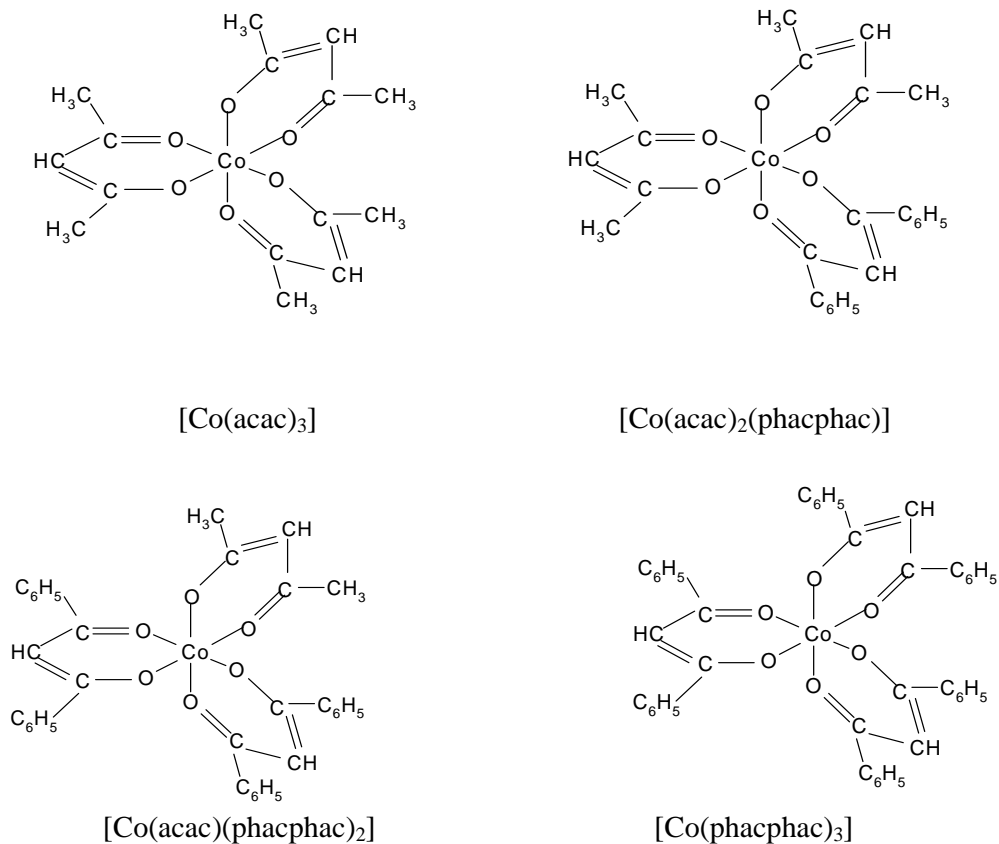
Tabela 7. Lokalizacioni parametri rastvarača

Redni broj	Rastvarač	Lokalizacioni parametar ( $m$ )
1	Benzen	-0,42
2	Hloroform	0,10
3	Dihlormetan	0,10
4	Tetrahidrofuran	0,65
5	Aceton	0,87

Potrebno je istaći da čak i mala količina snažno lokalizujućeg rastvarača ima veliki uticaj na retenciju uzorka (lokalizaciju molekula uzorka)<sup>19</sup>. Eventualni značaj lokalizacionih efekata je istaknut kao posledica mišljenja nekih autora da su pomenuti efekti odgovorni za jedinstvene adsorpcione karakteristike CN-modifikovanog silika-gela<sup>43,44</sup>. Pri tome je pretpostavljeno da će aceton, koji pokazuje najveći lokalizacioni efekat na silika-gelu, značajno smanjiti učešće silanolnih grupa u mehanizmu odvajanja pomenutih jedinjenja na CN-modifikovanom silika-gelu.



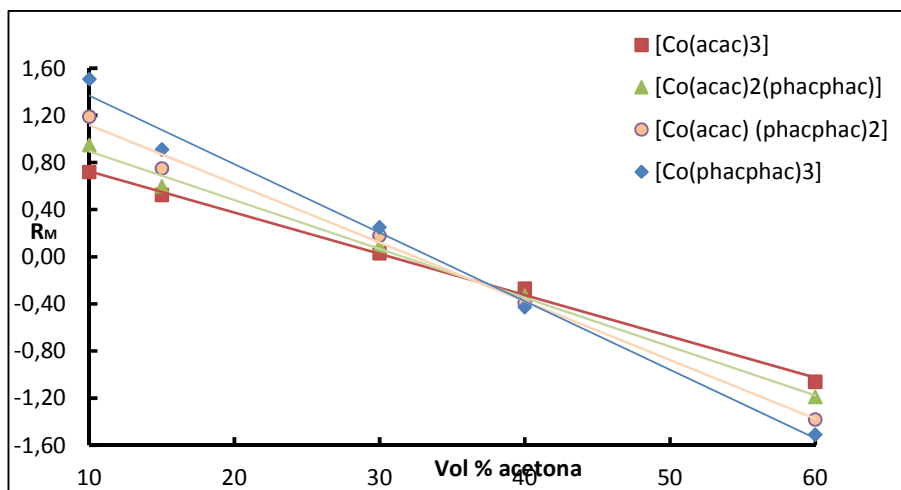
Razmatranjem hromatografskog ponašanja ispitivanih ( $\beta$ -diketonato) kompleksa upotrebom rastvarača sa manjim sadržajem polarnije organske komponente (bilo da se radi o acetonu ili benzenu) uočeno je da u svim ispitivanim slučajevima supstitucija *acac* liganada *phacphac* ligandima vodi jačoj retenciji odgovarajućih kompleksa<sup>97,101</sup>. Dobijeni rezultati su saglasni sa ranije utvrđenim hromatografskim ponašanjem kompleksa  $[M(acac)_{3-n}(phacphac)_n]$  tipa na tankom sloju PANS-a. Prema tome, činjenica da pri korišćenju nevedenih mobilnih faza (NP hromatografija),  $hR_F$  vrednosti razmatranih kompleksa opadaju sa povećanjem broja fenil-grupa u njihovim molekulima, može biti objašnjena kako je ranije opisano donorsko-akceptorskim interakcijama između  $\pi$  elektronskih sistema odgovarajućih  $\beta$ -diketonato liganada i cijano-grupa sorbenta<sup>97</sup>.



Slika 12. Strukturne formule hromatografisanih ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa

Međutim, povećanje sadržaja polarnije komponente dovodi do slabije retencije, ali i do obrtanja redosleda  $hR_F$  vrednosti ispitivanih kompleksa<sup>101</sup>. Slabljenje retencije ispitivanih ( $\beta$ -diketonato) kompleksa koje se dešava uporedo sa povećanjem broja fenil-grupa unutar njihovih molekula može biti objašnjeno slično razmatranjima izvedenim proučavanjem hromatografskog ponašanja ovih supstanci na silika-gelu, gde je građenje vodoničnih veza između silanolnih grupa sorbenta i donorskih atoma liganada kompleksa predloženo kao dominantni mehanizam odvajanja. Do slabljenja retencije najverovatnije dolazi usled slabljenja vodoničnih veza između ligatorskih atoma helatnih kompleksa i nemodifikovanih silanolnih grupa sorbenta (cijano-modifikovanog silika-gela). Pri tome do slabljenja vodoničnih veza dolazi ne samo usled negativnog induktivnog efekta fenil-grupa, već i usled sternih smetnji koje potiču od voluminoznosti ovih grupa. Takođe, uočeno obrtanje redosleda  $hR_F$  vrednosti ispitivanih kompleksa verovatno se dešava kao posledica promene retencionog mehanizma tj. usled dominacije interakcija odvajanih kompleksa sa nemodifikovanim silanolnim grupama sorbenta. Takođe je zapaženo da, bez obzira na prirodu upotrebljene polarnije komponente hromatografskog rastvarača (benzen ili aceton), dolazi do obrtanja redosleda  $hR_F$  vrednosti ispitivanih kompleksa.

Osim toga, utvrđena je i linearna zavisnost  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa od zapreminskog procenta acetona u mobilnoj fazi, koja je prikazana na Slici 13.



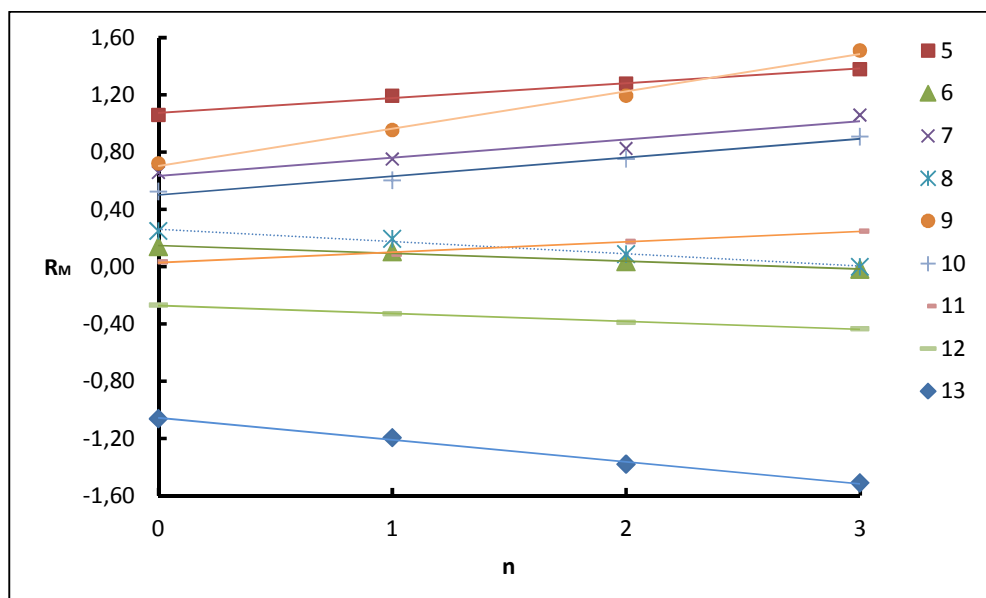
Slika 13. Zavisnost između  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa i zapreminskog procenta acetona (% v/v) u binarnim heksan-aceton mobilnim fazama.

Tabela 8. Parametri linearne korelacije (Slika 13)

Redni broj	Kompleks	A	B	r
1	[Co(acac) <sub>3</sub> ]	1,0719+/-0,0370	-0,0350+/-0,0010	-0,9987
2	[Co(acac) <sub>2</sub> (phacphac)]	1,3084+/-0,0559	-0,0414+/-0,0016	-0,9979
3	[Co(acac)(phacphac) <sub>2</sub> ]	1,6143+/-0,0779	-0,0498+/-0,0022	-0,9972
4	[Co(phacphac) <sub>3</sub> ]	1,9482+/-0,1194	-0,0581+/-0,0033	0,9951

A-osečak; B-nagib; r-korelacioni koeficijent;

U svim slučajevima gde su dobijene jasne i merljive razlike u  $hR_F$ -vrednostima, bez obzira na retencioni redosled, utvrđena je linearna zavisnost između broja *acac* liganada supstituisanih *phacphac* ligandima i odgovarajućih  $R_M$ -vrednosti kompleksa. Ove zavisnosti su prikazane na Slici 14.



Slika 14. Zavisnost između  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa i broja *acac* liganada supstituisanih *phacphac* ligandima. Brojevi u legendi odgovaraju mobilnoj fazi u Tabeli 5.

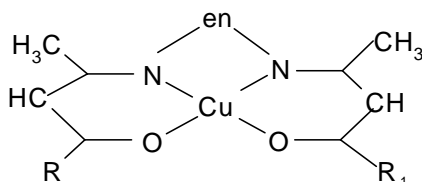
Tabela 9. Parametri linearne korelacije (Slika 14)

Redni broj	Rastvarač br.	A	B	r
1	5	1,070 +/- 0,1107	0,105 +/- 0,0059	0,9968
2	6	0,145 +/- 0,0073	-0,055 +/- 0,0039	0,9951
3	7	0,633 +/- 0,0465	0,128 +/- 0,0249	0,9643
4	8	0,260 +/- 0,0111	-0,085 +/- 0,0059	0,9952
5	9	0,701 +/- 0,0282	0,261 +/- 0,0151	0,9967
6	10	0,497 +/- 0,0250	0,132 +/- 0,0133	0,9899
7	11	0,025 +/- 0,0073	0,075 +/- 0,0039	0,9973
8	12	-0,274 +/- 0,0065	-0,054 +/- 0,0035	0,9959
9	13	-1,054 +/- 0,0159	-0,154 +/- 0,0085	0,9970

A-osečak; B-nagib; r-korelacioni koeficijent

### 3.2.2. Normalno-fazna hromatografija ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa

Posmatrajući  $hR_F$  vrednosti dobijene odvajanjem ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II)-kompleksa (Tabela 6, kompleksi 5-7, Slika 15) primenom NP rastvarača (Tabela 5, rastvarači 1-13) uočeno je relativno slabo razdvajanje ispitivanih kompleksa.



Redni broj	Kompleks	R	R <sub>1</sub>
1	[Cu(acac <sub>2</sub> en)]	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2	[Cu(acacphacacen)]	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
3	[Cu(phacac <sub>2</sub> en)]	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

Slika 15. Strukturne formule hromatografisanih ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II)-kompleksa

Uticaj sastava rastvarača na retenciju ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II)-kompleksa je proučavan primenom serije rastvarača u kojima varira sadržaj acetona kao polarnije komponente (rastvarači 9-13, Tabela 5). Upotreba rastvarača sa manjim sadržajem acetona, dovodi do porasta retencije ispitivanih ketoiminato kompleksa uporedo sa povećanjem broja aromatičnih prstenova u molekulu od 0 do 2. Rezultati jasno pokazuju da mobilnost kompleksa opada kod supstitucije niskopolarnih CH<sub>3</sub> grupa u  $\beta$ -

ketoiminato ligandima polarnijim grupama ( $C_6H_5$ ). Ovo ponašanje, suprotno je onom uočenom na silika-gelu, odnosno odgovara ponašanju uočenom na PANS-u<sup>94,100</sup>.

Uzimajući u obzir karakteristike PANS-a, odnosno prisustvo cijano-grupa kao zajedničkih aktivnih centara oba sorbenta (PANS-a i CN-modifikovanog silika-gela) može se pretpostaviti da je jedan od sledećih mehanizama odgovoran za odvajanja ispitivanih ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II)-kompleksa. Prvi mogući mehanizam je formiranje vodoničnih veza između cijano-grupa sorbenta i atoma vodonika metinskih grupa  $\beta$ -ketoiminato liganada. Ukoliko je ova vrsta interakcija dominantna može se očekivati da će supstitucija  $CH_3$  grupa u  $\beta$ -ketoiminato liganadima sa  $C_6H_5$  povećati kiselost vodoničnog atoma u metilenskoj grupi  $\beta$ -ketoiminato liganada, dovodeći do formiranja jačih vodoničnih veza i jače retencije kompleksa.

Drugi mogući mehanizam kojim može biti objašnjena sorpcija ispitivanih kompleksa je zasnovan na donorsko-akceptorskim interakcijama između  $\pi$ -elektronskih sistema odvajanih supstanci i cijano-grupa sorbenta. Učešće ovih interakcija u procesima odvajanja dovodi do jače retencije kompleksa koji sadrže aromatične prstenove u ligandima. Poznato je da se elektronegativnost cijano-grupa ispoljava kao elektron-akceptorsko svojstvo i da supstance sa  $\pi$  – elektronskim sistemima niske jonizacione energije (aromatične supstance) su snažnije zadržane na nitrilnim stacionarnim fazama<sup>100</sup>.

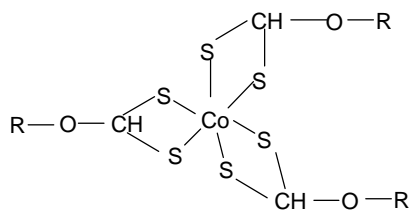
Povećanje sadržaja acetona u dvokomponentnom sistemu *n*-heksan-aceton rezultuje porastom  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih kompleksa, ali takođe i obrtanjem njihovog retencionog redosleda (što odgovara rezultatima dobijenim na silika-gelu). Takođe, primenom ostalih mono- i dvokomponentnih NP rastvarača utvrđeno je da retencija ispitivanih ketoiminato kompleksa opada uporedo sa povećanjem broja fenil-grupa u njihovim molekululima. Takvo ponašanje, kao što je već naglašeno, može biti objašnjeno generalno prihvaćenim mehanizmom odvajanja ovih kompleksa na silika-gelu, za koji se veruje da je zasnovan na specifičnim interakcijama sa sorbentom, tj. na formiranju vodoničnih veza između silanolnih grupa silika-gela i ligatorskih atoma (O) helata. Na jačinu vodoničnih veza utiču dva faktora - induktivni i sterni efekat. Prema tome, usled negativnog induktivnog efekta  $C_6H_5$  grupe, elektronska gustina na ligatoru

(O)  $\beta$ -ketoiminato liganada je manja nego u slučaju acetilacetona i uzrokuje slabije vodonične veze sa sorbentom i veću pokretljivost ispitivanih kompleksa<sup>94,100</sup>.

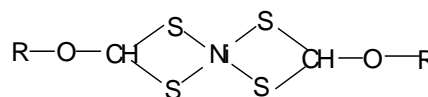
### 3.2.3 Normalno-fazna hromatografija *tris*(alkilksantato)-Co(III) i *bis*(alkilksantato)-Ni(II) kompleksa

Kao poslednji segment ispitivanja hromatografskog ponašanja kompleksa na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela hromatografisana su i dva *tris*(alkilksantato)-Co(III) kompleksa (Slika 16 (I)) i pet *bis*(alkilksantato)-Ni(II)-kompleksa (Slika 16 (II)), i dobijene  $hR_F$  vrednosti su takođe navedene u Tabeli 6 (kompleksi 8 i 9, odnosno 10-14).

Dobijeni rezultati pokazuju da prilikom primene nevodenih mobilnih faza retencija helata opada sa povećanjem dužine *n*-alkil niza liganda. Ovakvo ponašanje analogno je ranije utvrđenim rezultatima hromatografskog odvajanja alkilksantata u normalno-faznim uslovima kako na silika-gelu<sup>95,96</sup>, tako i na PANS-u<sup>99</sup>.



I. *tris*(alkilksantato)-Co(III) kompleksi



II. *bis*(alkilksantato)-Ni(II)-kompleksa

Redni broj	Kompleks	R	Redni broj	Kompleks	R
1	[Co(S <sub>2</sub> COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3	[Ni(S <sub>2</sub> COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
2	[Co(S <sub>2</sub> CO <sub>n</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> ]	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4	[Ni(S <sub>2</sub> CO <sub>n</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> ]	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
			5	[Ni(S <sub>2</sub> CO <sub>n</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> ]	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
			6	[Ni(S <sub>2</sub> CO <sub>sec</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> ]	sec-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
			7	[Ni(S <sub>2</sub> CO <sub>iso</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> ]	iso-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>

Slika 16. Strukturne formule hromatografisanih *tris*(alkilksantato)-Co(III) kompleksa i *bis*(alkilksantato)-Ni(II)-kompleksa

Sorpcija ispitivanih alkilksantato kompleksa u uslovima NP hromatografije na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela može biti objašnjena mehanizmom formiranja vodoničnih veza između elektronegativnih atoma kompleksa i silanolnih grupa sorbenta. Kao što je poznato, jačina (energija) formiranih vodoničnih veza zavisi

od elektronske gustine na odgovarajućim elektronegativnim atomoma. Stoga, sa povećanjem dužine sporednih lanaca pozitivni induktivni efekat alkil-grupa takođe raste, što uzrokuje povećanje elektronske gustine elektronegativnog atoma kiseonika, što opet vodi jačim vodoničnim vezama između ovih atoma i silanolnih grupa CN-modifikovanog silika-gela<sup>95,96</sup>.

Međutim, činjenica da su dobijeni rezultati upravo suprotni (porast dužine *n*-alkil niza liganda vodi porastu  $hR_F$  vrednosti) govori o tome da jačina vodoničnih veza odgovornih za sorpciju helata zavisi uglavnom od drugih faktora. To mogu biti sterne smetnje, kako je pretpostavio Snajder<sup>99</sup>, analogno rezultatima dobijenim pri hromatografskom razdvajanju nekih strukturno sličnih metalnih dialkilditiofosfata na silika-gelu, ili rastvorljivost ispitivanih kompleksa u odgovarajućim solventima<sup>99</sup>. Sterni efekti se sa povećanjem dužine lanca manifestuju u otežanom pristupu jako elektronegativnih atoma kompleksa silanolnim grupama sorbenta, sa kojima mogu biti formirane vodonične veze. To će uzrokovati slabiju retenciju kompleksa sa povećanjem dužine bočnih lanaca, što je eksperimentalno potvrđeno za ispitivane komplekse. Ovaj fenomen je takođe ranije zabeležen pri hromatografskim odvajanjima homologe serije kompleksa prelaznih metala sa istim ili sličnim ligandima<sup>95,96,99</sup>.

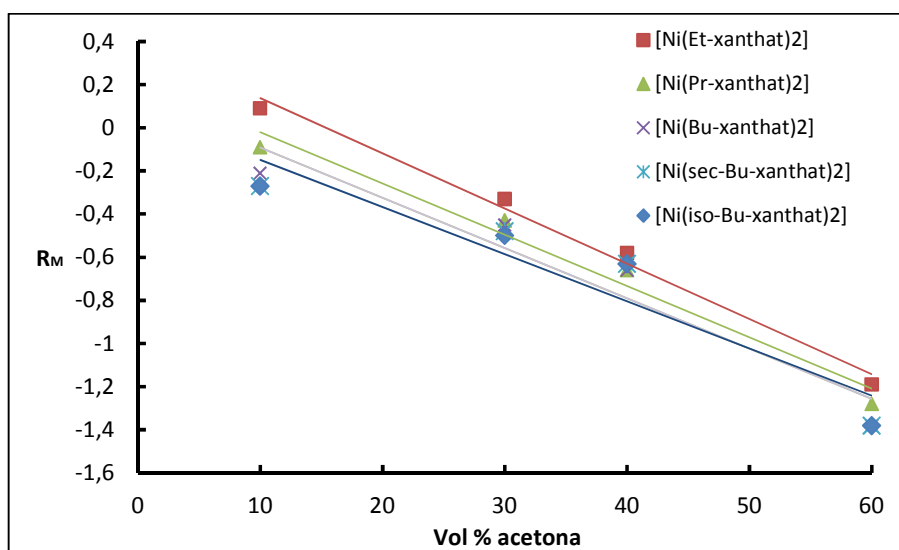
Izomeri *bis*(alkilksantato)-Ni(II)kompleksa, bez obzira na male razlike u dobijenim  $R_F$  vrednostima, pokazuju isti redosled pri NP hromatografiji primenom svih nevodenih mobilnih faza. Takvo ponašanje izomernih butilksantato-kompleksa nije u skladu sa sternim efektima odgovarajućih delova liganada, budući da su, bez obzira na velike razlike u sternim efektima izomernih butil-supstituenata, razlike u  $R_F$ -vrednostima kompleksa veoma male. S druge strane, pokazano je da redosled  $R_M$ -vrednosti izomernih butilksantato-kompleksa takođe nije u skladu ni sa njihovim rastvorljivošću.

Tabela 10. Induktivne konstante ( $\sigma^*$ ) alkil - supstituenata

Redni broj	Alkil grupa	Induktivna konstanta
1.	Metil	0,0000
2.	Etil	-0,100
3.	n-Propil	-0,115
4.	n-Butil	-0,130
5.	Izobutil	-0,125
6.	sec-Butil	-0,210

Prema tome, pretpostavljeno je da u ovom slučaju induktivni efekat odgovarajućih lanaca liganada, koji utiče na elektronsku gustinu na elektron-negativnom atomu liganda, igra odlučujuću ulogu saglasno odgovarajućim induktivnim konstantama izomernih butil-supstituenata<sup>96,99</sup> prikazanim u Tabeli 10.

Pri ovim razmatranjima utvrđena je i linearna zavisnost  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa od zapreminskog procenta acetona u mobilnoj fazi, koja je prikazana na Slici 17.



Slika 17. Zavisnost između  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa i zapreminskog procenta acetona (% v/v) u binarnim heksan-aceton mobilnim fazama.

Tabela 11. Parametri linearne korelacije (Slika 17)

Redni broj	Kompleks	A	B	$r$
1	[Ni(Et-xanthat) <sub>2</sub> ]	0,3927+/-0,0734	-0,0256+/-0,0019	-0,9947
2	[Ni(Pr-xanthat) <sub>2</sub> ]	0,2169+/-0,1082	-0,0237+/-0,0028	-0,9869
3	[Ni(Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	0,1408+/-0,1858	-0,0233+/-0,0047	-0,9614
4	[Ni(sec-Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	0,0865+/-0,2084	-0,0221+/-0,0053	-0,9472
5	[Ni(iso-Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	0,0789+/-0,2032	-0,0220+/-0,0052	-0,9493

A-osečak; B-nagib;  $r$ -korelacioni koeficijent



### 3.3. Planarna hromatografija fenola

Hromatografsko ponašanje različitih fenolnih derivata je do sada proučavano u uslovima tankoslojne hromatografije na različitim sorbentima (celulozi impregnisanom aluminijum(III)-oksidom, aluminijum(III)-oksidu, silika gelu F<sub>254</sub> nm, amino-modifikovanom silika-gelu, cijano-modifikovanom silika-gelu, alkil-modifikovanim silika-gelovima (RP-2, RP-8, RP-18), silika-gelu impregnisanom jonima Cu(II) i Al(III))<sup>33,69,102-106</sup>. U nekim od ovih radova proučavani su i mehanizmi odvajanja fenolnih supstanci. Takođe je proučavana priroda vodoničnih veza koje se javljaju između fenolnih hidroksilnih grupa i silanolnih grupa silika-gela, kao i vodoničnih veza fenolnih hidroksilnih grupa i cijano-grupa CN-modifikovanog silika-gela<sup>103</sup>. Koristeći dosadašnja ispitivanja kao polaznu osnovu, a u cilju boljeg razumevanja uloge cijano-grupa u mehanizmima hromatografskih odvajanja na CN-silika-gelu kao sorbentu, različiti derivati fenola su odvajani uporedo na tankim slojevima silika-gela, CN-silika-gela i PANS-a čije adsorpcione površine sadrže samo silanolne grupe, zajedno silanolne i cijano-grupe i samo cijano-grupe.

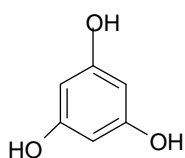
#### 3.3.1. Normalno-fazna hromatografija fenola

Primenom devet nevodenih rastvarača (Tabela 12) odvajano je devet fenola (Slika 18) na tankim slojevima pomenuta tri sorbenta u uslovima NP hromatografije. Dobijene  $R_F$ -vrednosti navedene su u Tabelama 13-15.

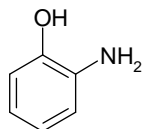
Tabela 12. Sastav upotrebljenih hromatografskih rastvarača za odvajanje fenola

Redni broj	Rastvarač	Zapreminski odnos
1	Petroletar / Aceton	80:20
2	Petroletar / Aceton / Hloroform	40:30:25
3	Benzen / Metanol / Sirćetna kiselina	94:5:1
4	Benzen / Izopropanol / Sirćetna kiselina	94:5:1
5	Benzen / Aceton	90:10
6	Cikloheksan / Dioksan	60:40
7	<i>n</i> -Heksan / Hloroform	60:40
8	<i>n</i> -Heksan / Metilenhlorid	60:40
9	<i>n</i> -Heksan / Etil-acetat	90:10

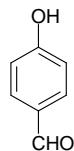
Na osnovu dobijenih  $hR_F$ -vrednosti očigledno je da jačina sorpcije ispitivanih fenola raste sledećim redom PANS < CN-modifikovani silka-gel < silika-gel.



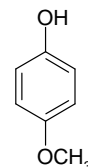
Floroglucinol



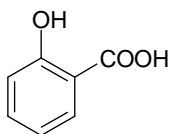
2-Aminofenol



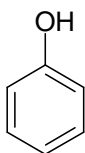
4-Hidroksibenzaldehid



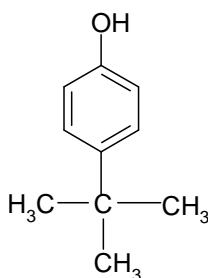
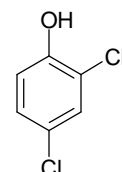
4-Metoksifenol



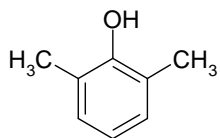
Salicilna kiselina



Fenol

4-*tert*-Butilfenol

2,4-Dihlorfenol



2,6-Dimetilfenol

Slika 18. Strukturne formule hromatografisanih fenola

Uzimajući u obzir prisustvo hidroksilnih grupa u molekulima odvajanih supstanci i činjenicu da sva tri sorbenta mogu graditi vodonične veze sa fenolima, može se pretpostaviti da je građenje vodoničnih veza odvajanih supstanci sa sorbentom odgovorno za njihovo odvajanje. Prema tome, retencija fenola na ova tri sorbenta može biti objašnjena kako karakteristikama stacionarne faze tako i jačinom i prirodom vodoničnih veza između sorbenta i hidroksilnih grupa fenola.

Vodonične veze formirane između fenolnih hidroksilnih grupa i silanolnih grupa silika-gela i atoma vodonika fenolnih hidroksilnih grupa i azota cijano-grupa CN-modifikovanog silika-gela detaljno su studirane i objašnjene<sup>103</sup>. Zaključeno je da je prva vrsta interakcija jača od druge, što se i moglo očekivati imajući u vidu da je konstanta

disocijacije silanolnog vodonika oko  $10^{-6}$  do  $10^{-8}$ , a konstanta disocijacije većine fenolnih hidroksilnih vodonika je oko  $10^{-10}$ . Interakcije fenola sa cijano-grupom sorbenta se ostvaruju između fenolnog hidroksilnog vodonika i azota cijano-grupe<sup>103</sup>. Saglasno tome, jača retencija fenola na silika-gelu nego na druga dva sorbenta rezultat je formiranja jačih vodoničnih veza između fenola i površinskih silanolnih grupa sorbenta. Slabija retencija na CN-modifikovanom silika-gelu može biti pripisana prisustvu površinskih cijanopropil-grupa koje formiraju slabije vodonične veze. Konačno, najslabija retencija fenolnih derivata na PANS-u može biti objašnjena prisustvom samo cijano grupa na površini sorbenta i činjenicom da ove grupe formiraju slabije vodonične veze od silanolnih grupa.

Uzimajući u obzir selektivnost ovih odvajanja može se zaključiti da je bolje odvajanje fenola sa polarnim supstituentima (2-aminofenol, 4-hidroksibenzaldehid) postignuto na CN-modifikovanom silika-gelu nego na nemodifikovanom silika-gelu, što je u skladu sa literaturnim podacima<sup>33</sup>. Selektivnost za navedene fenole je bolja na PANS-u nego na silika-gelu, dok je selektivnost CN-modifikovanog silika-gela i PANS slična.

Tabela 13.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih fenola na PANS-u

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Fluoroglucinol	0	73	0	29	8	41	0	0	0
2	2-Aminofenol	27	70	9	7	51	46	8	4	24
3	4-Hidroksibenzaldehid	60	92	19	66	44	53	13	10	34
4	4-Metoksifenol	66	91	76	73	88	78	49	29	65
5	Salicilna kiselina	74	92	84	82	96	81	38	44	83
6	Fenol	82	90	72	76	85	82	42	34	83
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	86	95	81	77	91	82	60	57	87
8	2,4-Dihlorfenol	86	92	92	85	97	84	81	67	83
9	2,6-Dimetilfenol	86	92	93	80	93	81	76	71	90

\* Vidi Tabelu 12.

Na osnovu rezultata dobijenih tokom hromatografskog odvajanja fenola takođe su ispitivani efekti supstituenata na retenciju fenolnih derivata. Analizirajući  $hR_F$  vrednosti dobijene prilikom upotebe tipičnih NP mobilnih faza (Tabela 12) očigledno je da retencija fenolnih derivata opada pravilno u sledećem nizu: fluoroglucinol > 2-aminofenol > 4-hidroksibenzaldehid > 4-metoksifenol > salicilna kiselina > fenol > 4-*tert*-butilfenol > 2,4-dihlorfenol > 2,6-dimetilfenol.

Tabela 14.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih fenola na CN-modifikovanom silika-gelu

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Fluoroglucinol	21	55	0	13	24	19	0	0	0
2	2-Aminofenol	28	57	21	31	40	37	5	5	3
3	4-Hidroksibenzaldehid	36	75	43	58	68	43	14	11	13
4	4-Metoksifenol	43	71	46	67	74	57	32	23	28
5	Salicilna kiselina	50	78	57	70	78	62	41	30	39
6	Fenol	59	76	60	70	79	62	44	38	42
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	59	83	63	75	82	71	51	43	49
8	2,4-Dihlorfenol	64	75	74	74	83	69	57	54	52
9	2,6-Dimetilfenol	66	80	80	81	88	70	69	62	54

\* Vidi Tabelu 12.

Tabela 15.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih fenola na silika-gelu

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Fluoroglucinol	0	52	0	0	6	8	0	0	0
2	2-Aminofenol	23	65	8	10	29	32	0	0	5
3	4-Hidroksibenzaldehid	27	77	17	22	41	36	0	0	8
4	4-Metoksifenol	13	63	31	37	82	32	4	11	17
5	Salicilna kiselina	40	59	32	45	28	58	16	29	34
6	Fenol	41	84	37	48	60	54	10	29	26
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	32	83	35	39	58	63	16	18	24
8	2,4-Dihlorfenol	35	73	54	54	73	58	23	39	29
9	2,6-Dimetilfenol	48	78	50	50	72	69	28	39	44

\* Vidi Tabelu 12.

Fluoroglucinol pokazuje najjaču retenciju na sva tri sorbenta. Ovo ponašanje je posledica prisustva tri hidroksilne grupe tj. tri polarne funkcionalne grupe u molekulu<sup>104</sup>. Jača retencija 2-aminofenola u poređenju sa samim fenolom može biti objašnjena polarnošću *orto*-NH<sub>2</sub>-grupe. Monosupstituisani fenoli (4-hidroksibenzaldehid, 4-metoksifenol i salicilna kiselina) takođe pokazuju jače zadržavanje od fenola, pri čemu je navedeno ponašanje najverovatnije posledica negativnog induktivnog efekta uvedenih supstituenata. Jače zadržavanje 4-hidroksibenzaldehida od 4-metoksifenola može biti objašnjeno negativnijim induktivnim efektom aldehidne grupe u odnosu na metoksi-grupu. Saglasno tome,  $hR_F$ -vrednost salicilne kiseline trebalo bi da je niža od  $hR_F$ -vrednosti 4-metoksifenola, zbog većeg negativnog induktivnog efekta karboksilne u odnosu na aldehidnu grupu.

Međutim, eksperimentalno utvrđena  $hR_F$ -vrednost je veća, najverovatnije zbog sternih smetnji karboksilne grupe koja se nalazi u *orto*-položaju u odnosu na fenolnu hidroksilnu grupu. Retencija poslednjeg hromatografisanog monosupstituisanog fenola, 4-*tert*-butilfenola, je slabija u odnosu na fenol što je najverovatnije posledica pozitivnog induktivnog efekta alkil-supstituenata tj. *tert*-butil grupe.

Retencija disupstituisanih fenola je slabija u odnosu na monosupstituisane fenole pri čemu je retencija 2,4-dihlorfenola nešto jača u odnosu na 2,6-dimetilfenol. Ovaj retencioni redosled može biti objašnjen negativnim induktivnim efektom hlora u odnosu na pozitivan induktivni efekat metil-grupa.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je priroda *orto*-supstituenata od esencijalnog značaja za retenciju fenola. Ovo objašnjenje je primenljivo za sve derivate fenola (halogenovane, alkoksi-, karboksi-, amino- i polihidroksi-fenole). Najslabija retencija je utvrđena kod 2,6-dimetilfenola koji ima dve *orto*-supstituisane grupe, dok 2,4-dihlorfenol, sa jednim *orto*-supstituentom, pokazuje nešto jaču retenciju. Povećanu retenciju pokazuju i fenoli bez *orto*-supstituenata: 4-*tert*-butilfenol, salicilna kiselina, 4-metoksifenol, 4-hidroksibenzaldehid, floroglucinol. Izuzetak predstavlja 2-aminofenol koji, uprkos činjenici da poseduje *orto*-supstituisanu amino-grupu, pokazuje jaču retenciju u odnosu na već pomenute monosupstituisane fenole, verovatno zbog mogućnosti stvaranja još jedne vodonične veze.

Selektivnost razdvajanja ispitivanih fenola primenom različitih sorbenata i mobilnih faza može biti procenjena grafičkim poređenjem  $R_M$ -vrednosti (dijagrami  $R_M(I)$ - $R_M(II)$ ). Retencioni podaci za fenole za sve ispitivane sisteme su poređeni (nemodifikovani silika-gel je poređen sa CN-silika-gelom; PANS sa CN-silika-gelom i PANS sa nemodifikovanim silika-gelom). Izračunati statistički koeficijenti su dati u Tabeli 16, dok su reprezentativni primeri korelacija prikazani grafički na Slikama 19-21.

Kao što se može videti u Tabeli 16, između PANS-a i CN-modifikovanog silika-gela su dobijene relativno dobre korelacije sa nevodenim mobilnim fazama (NP uslovi). Ovaj podatak govori o sličnosti sorpcionih karakteristika ova dva sorbenta i ukazuje na nesumnjivi doprinos cijano-grupa u mehanizmima odvajanja na cijano-modifikovanom silika-gelu. Poređenje  $R_M$ -vrednosti dobijenih za fenole na CN-modifikovanom silika-

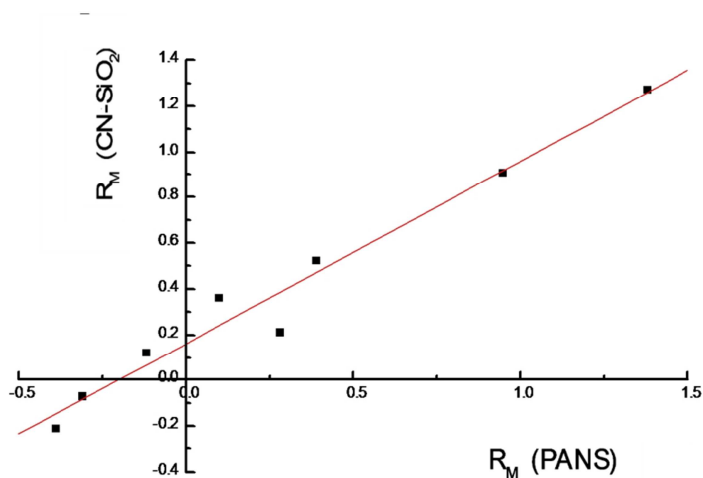
gelu sa onim dobijenim na nemodifikovanom silika-gelu pokazuje zadovoljavajuće korelacije samo u NP uslovima.

Tabela 16. Korelacioni koeficijenti ( $r$ ) i F-test korelacija između  $R_M$  vrednosti fenola u različitim hromatografskim sistemima

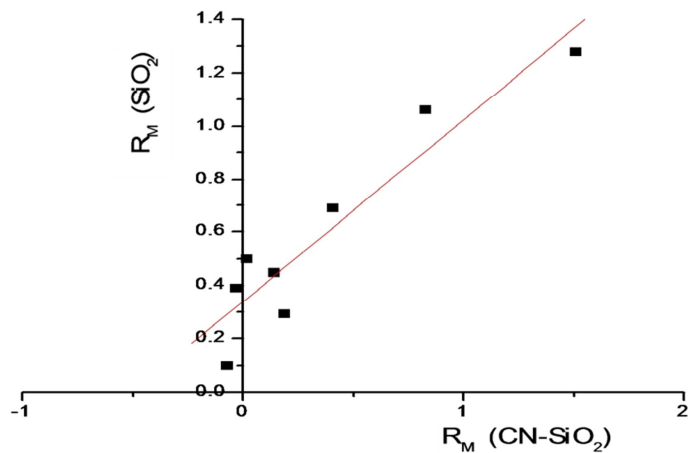
Mobilna faza <sup>a)</sup>	$R_{M(\text{PANS})}$ i $R_{M(\text{CN-silika-gel})}$			$R_{M(\text{Silika gel})}$ i $R_{M(\text{CN-silika-gel})}$			$R_{M(\text{PANS})}$ i $R_{M(\text{Silika-gel})}$		
	$r$	F	n <sup>b)</sup>	$r$	F	n	$r$	F	n
1	0,9637	78,061	8	0,6725	4,954	8	0,5876	3,165	8
2	0,9594	81,054	9	0,6970	6,613	9	0,6074	4,093	9
3	0,9131	30,102	8	0,9742	111,971	8	0,9624	75,350	8
4	0,8251	14,924	9	0,9393	44,941	8	0,9241	35,090	8
5	0,8983	29,259	9	0,8236	14,763	9	0,7554	9,302	9
6	0,9428	56,004	9	0,9509	66,093	9	0,8310	15,623	9
7	0,9445	49,609	8	0,8964	16,360	6	0,6403	2,780	6
8	0,9833	175,349	8	0,7794	6,189	6	0,6898	3,630	6
9	0,9600	70,581	8	0,9366	42,892	8	0,9684	90,353	8

<sup>a)</sup> Tabela 12

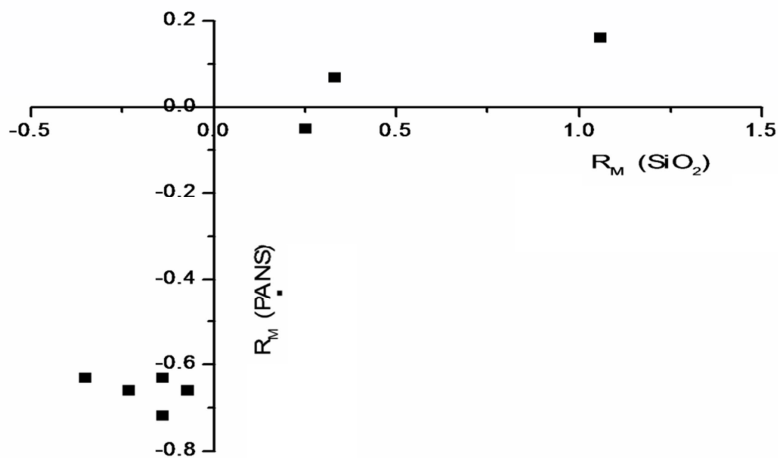
<sup>b)</sup> Broj tačaka



Slika 19. Korelacija između  $R_M$ -vrednosti fenola na PANS-u i CN-modifikovanom silika-gelu primenom rastvarača br.8



Slika 20. Korelacija između  $R_M$ -vrednosti fenola na CN-modifikovanom silika-gelu i silika-gelu primenom rastvarača br. 9



Slika 21. Korelacija između  $R_M$ -vrednosti fenola na silika-gelu i PANS-u primenom rastvarača br. 6

Ova činjenica može biti pokazatelj značaja druge vrste adsorpcionih centara (nemodifikovanih silanolnih grupa) na površini CN-modifikovanog silika-gela. Korelacije između  $R_{M(\text{PANS})}$  -  $R_{M(\text{Silika-gel})}$  su znatno lošije u odnosu na druge sorbente. Ovakvi rezultati su i očekivani ukoliko uzmemo u obzir različitu prirodu pomenutih sorbenata.

### 3.4. Reverzno-fazna planarna hromatografija herbicida

Hromatografsko ponašanje herbicida (triazinskih derivata i derivata fenoksikarboksilne kiseline) na tankim slojevima PANS-a, CN-modifikovanog silika-gela i silika-gela u uslovima RP hromatografije razmatrano je primenom 7 vodenih rastvarača (Tabela 17). Rezultati hromatografskih odvajanja navedenih jedinjenja dati su u Prilogu (Tabele P1-P3).

Tabela 17. Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanje triazinskih derivata i fenoksikarboksilnih kiselina u uslovima RP hromatografije

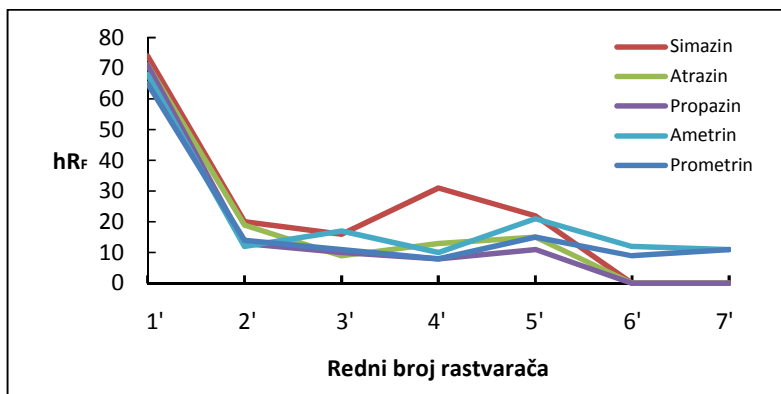
Redni broj	Rastvarač	Zapreminski odnos
1'	Aceton / Voda	70:30
2'	Aceton / Voda	20:80
3'	Aceton / 0,5 mol dm <sup>-3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20:80
4'	THF / 0,5 mol dm <sup>-3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20:80
5'	Dioksan / 0,5 mol dm <sup>-3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20:80
6'	Acetonitril / 0,5 mol dm <sup>-3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20:80
7'	Metanol / 0,5 mol dm <sup>-3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20:80

#### 3.4.1 Reverzno-fazna hromatografija triazina

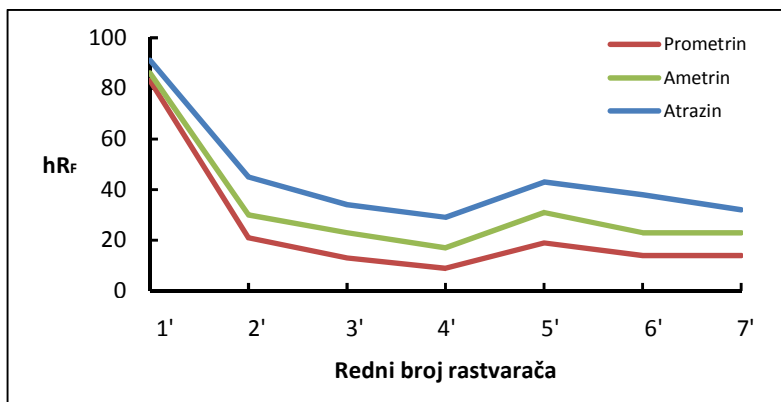
Analizom retencionog ponašanja triazinskih derivata u RP uslovima (Tabela 16, rastvarači 1'-7') uočeno je da je porast hidrofobnosti supstituenata praćen jačanjem retencije ovih supstanci (Slike 22, 23 i 24), što je u skladu sa podacima navedenim u literaturi<sup>78</sup>. Porast retencije sa porastom hidrofobnog dela sorbenda može se objasniti RP mehanizmom odvajanja kod kojeg se sorpcija zasniva na nespecifičnim hidrofobnim interakcijama sa sorbentom i specifičnim interakcijama sa polarnim molekulima mobilne faze.

Odvajanje svih ispitivanih triazina u RP uslovima je postignuto samo upotrebom cijano-modifikovanog silika-gela, dok je kod preostala dva sorbenta utvrđeno samo odvajanje tiometil-derivata. Takođe, na cijano-modifikovanom silika-gelu je uočena i najjača retencija navedenih triazina. Odnos  $hR_F$ -vrednosti triazina koji pokazuju merljivu retenciju na sva tri sorbenta (ametrin, prometrin) u skladu je sa literaturnim podacima<sup>78</sup> i činjenicom da povećanje hidrofobnosti supstituenata analiziranih supstanci dovodi do njihovog jačeg zadržavanja.

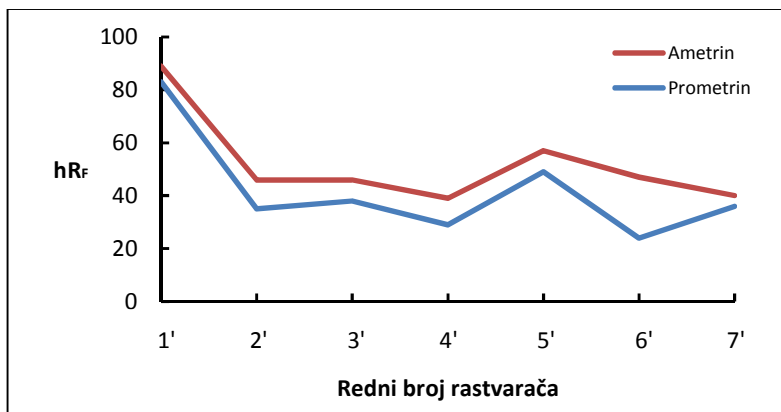




Slika 22.  $hR_F$ -vrednosti triazina na tankom sloju CN-silika-gela primenom RP mobilnih faza



Slika 23.  $hR_F$ -vrednosti triazina na tankom sloju silika-gela primenom RP mobilnih faza



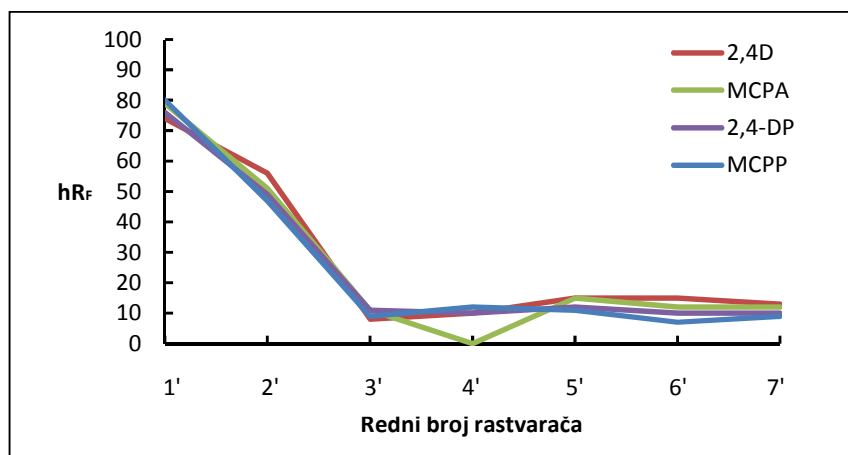
Slika 24.  $hR_F$ -vrednosti triazina na tankom sloju PANS-a primenom RP mobilnih faza

Osim toga, primena tipičnih RP rastvarača dovodi do pravilnog obrtanja  $hR_F$ -vrednosti (navedenog i u literaturi<sup>78</sup>) triazinskih tiometil-derivata u odnosu na NP-uslove.

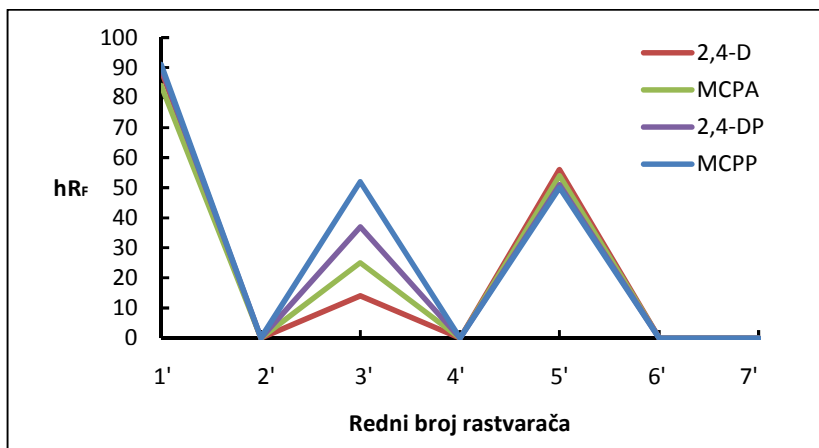
Uticaj prirode supstituenata u RP hromatografiji je razmatran samo na CN-modifikovanom silika-gelu. Pri tome, ukoliko se porede  $hR_F$ -vrednosti triazinskih derivata sa identičnim  $R_1$  supstituentom utvrđeno je da supstance sa hidrofobnijim (voluminoznijim)  $R_2$  ili  $R_3$  supstituentom pokazuju u RP uslovima jaču retenciju. Istovremeno, dok u NP uslovima priroda  $R_1$  supstituenta praktično uslovljava hromatografsko ponašanje odvajanih supstanci, ovakvo ponašanje nije utvrđeno upotrebom tipičnih RP rastvarača, što govori u prilog promeni mehanizma odvajanja tj. odvajanju zasnovanom na nespecifičnim hidrofobnim interakcijama.

#### 3.4.2. Reverzno-fazna hromatografija fenoksikarboksilnih kiselina

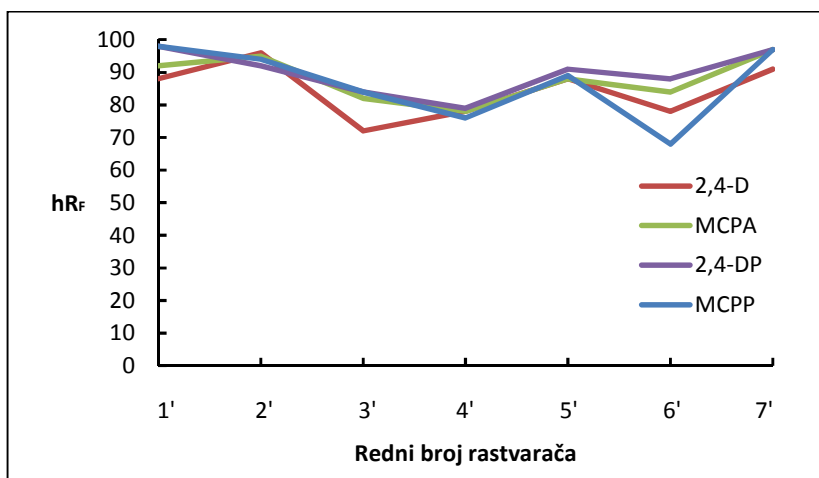
Rezultati dobijeni hromatografskim odvajanjem fenoksikarboksilnih kiselina (Slika 8) u RP uslovima na tankim slojevima PANS-a, CN-modifikovanog silika-gela i silika-gela prikazani su na Slikama 25, 26 i 27.



Slika 25.  $hR_F$ -vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju CN-silika-gela primenom RP mobilnih faza



Slika 26. hR<sub>F</sub>-vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju PANS-a primenom RP mobilnih faza



Slika 27. hR<sub>F</sub>-vrednosti fenoksi-kiselina na tankom sloju silika-gela primenom RP mobilnih faza

Nasuprot rezultatima dobijenim u NP hromatografiji, ispitivane fenoksikarboksilne kiseline u reverzno-faznim uslovima na tankom sloju PANS-a i CN-modifikovanom silika-gelu pokazuju pojačanu retenciju. Retencija ispitivanih supstanci raste sa povećanjem broja metilenskih-grupa u alifatičnim delovima molekula i sa povećanjem broja metil- i hloro-supstituenata u benzenskom prstenu. Doprinosi CH<sub>2</sub> grupa, pojedinačnih CH<sub>3</sub> grupa i Cl atoma retenciji fenoksi-kiselina su približno izjednačeni. Supstituent u *o*-položaju sa uvažavanjem doprinosa –O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH niza znatno manje doprinosi retenciji nego supstituent u *m*-položaju. Ovakvo retenciono ponašanje je u saglasnosti sa opštim strukturnim efektima u RP hromatografiji na

hemijski modifikovanim silika-gelovima, gde se ispitivane supstance eluiraju po redosledu rastuće hidrofobnosti<sup>81,107</sup>. Iz navedenih razloga odvajanje parova fenoksi-kiselina 2,4-D i MCPA odnosno 2,4-DP i MCPP je teško na oktadecil silika-gel kolonama<sup>81</sup> ali su navedeni parovi fenoksi-kiselina veoma uspešno odvajani na umereno polarnim cijano-modifikovanim silika-gel stacionarnim fazama. Uočeno ponašanje nije prisutno na silika-gelu gde je primećena povećana pokretljivost ispitivanih supstanci (porast  $hR_F$  vrednosti). Takođe, prilikom odvajanja fenoksi-kiselina tamo gde su dobijene jasne i merljive  $hR_F$ -vrednosti, najjača sorpcija je utvrđena na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela, zatim PANS-a i konačno najviše  $hR_F$  vrednosti su dobijene kod silika-gela. Utvrđeni retencioni redosled ukazuje na sličnost između CN-silika-gela i PANS-a prilikom odvajanja fenoksikarboksilnih kiselina kako u NP tako i u RP uslovima. Osim toga, rezultati dobijeni primenom silika-gela kao sorbenta su očekivani imajući u vidu njegovu ukupnu polarost usled koje je manje pogodan za primenu u RP hromatografiji.

### 3.5. Reverzno-fazna planarna hromatografija neutralnih metalnih kompleksa

Proučavanje hromatografskog ponašanja serije neutralnih metalnih kompleksa u reverzno-faznim uslovima je izvedeno primenom dva vodena rastvarača i to aceton – voda, 70:30 (1) i THF – voda, 60:40 (2).

Rezultati dobijeni hromatografisanjem četiri ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa tipa  $[Co(acac)_{3-n}(phacphac)_n]$  ( $n = 0 - 3$ ), tri ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa, dva *tris*(alkil-ksantato)-Co(III) kompleksa i pet *bis*(alkil-ksantato)-Ni(II) kompleksa su navedeni u Tabeli 18.

#### 3.5.1 . Reverzno-fazna hromatografija ( $\beta$ -diketonato)-Co(III) kompleksa

U slučaju primene vodenih mobilnih faza (rastvarači 1 i 2) utvrđeno je da sa povećanjem broja fenil-grupa u kompleksima  $hR_F$ -vrednosti opadaju, kako je i očekivano<sup>98</sup>.

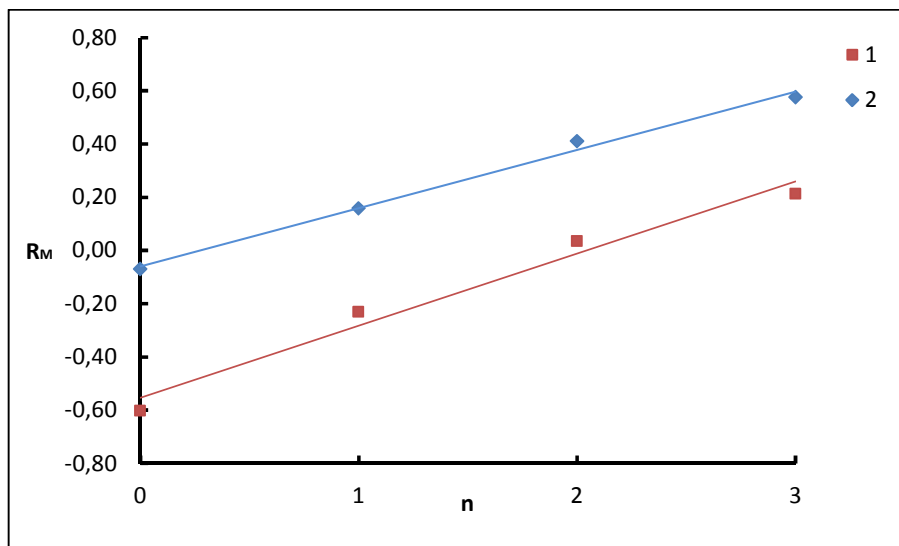
Tabela 18.  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih kompleksa na cijano-modifikovanom silika-gelu

Redni broj	Kompleks <sup>a</sup>	Rastvarač	
		1	2
1	[Co(acac) <sub>3</sub> ]	80	54
2	[Co(acac) <sub>2</sub> (phacphac)]	63	41
3	[Co(acac)(phacphac) <sub>2</sub> ]	48	28
4	[Co(phacphac) <sub>3</sub> ]	38	21
5	[Co(acac <sub>2</sub> en)]	72	58
6	[Co(acacphacacen)]	56	42
7	[Co(phacacen)]	44	34
8	[Co(Et-xanthat) <sub>3</sub> ]	37	26
9	[Co(Pr-xanthat) <sub>3</sub> ]	28	14
10	[Ni(Et-xanthat) <sub>2</sub> ]	71	35
11	[Ni(Pr-xanthat) <sub>2</sub> ]	68	27
12	[Ni(Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	66	22
13	[Ni( <i>sec</i> -Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	64	22
14	[Ni( <i>iso</i> -Bu-xanthat) <sub>2</sub> ]	61	25

<sup>a</sup> acac = 2,4-pentandionato jon; phacphac = 1,3-difenil-1,3-propandionato jon; en = 1,2-diaminoetan.

Uočeno povećanje retencije sa porastom hidrofobnog dela sorbenda objašnjava se reverzno-faznim mehanizmom odvajanja kod kojeg se sorpcija zasniva na nespecifičnim hidrofobnim interakcijama između ugljovodoničnih lanaca sorbenta i nepolarnih delova  $\beta$ -diketonato liganada i specifičnim interakcijama sa polarnim molekulima mobilne faze (tj. sa vodom)<sup>97</sup>. U prilog ovakvom tumačenju utvrđenog ponašanja ide i činjenica da upotrebljeni rastvarači sadrže značajan udeo vode, odnosno imaju veliku ukupnu polarnost.

Osim toga, utvrđena je linearna zavisnost između broja *acac* liganada supstituisanih *phacphac* ligandima i odgovarajućih  $R_M$ -vrednosti kompleksa. Ove zavisnosti su prikazane na Slici 28.



Slika 28. Zavisnost između  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa i broja *acac* liganada supstituisanih *phacphac* ligandima. Brojevi u legendi odgovaraju upotrebljenim mobilnim fazama.

Tabela 19. Parametri linearne korelacije (Slika 28)

Redni broj	Rastvarač br.	A	B	<i>r</i>
1	1	-0,551+/-0,0563	0,269+/-0,0301	0,9877
2	2	-0,060+/-0,0221	0,220+/-0,0118	0,9971

A-osečak; B-nagib; *r*-korelacioni koeficijent

### 3.5.2. Reverzno-fazna hromatografija ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II) kompleksa

Posmatrajući  $hR_F$ -vrednosti dobijene odvajanjem ( $\beta$ -ketoiminato)-Cu(II)-kompleksa (Tabela 18, kompleksi 5-7, Slika 12) primenom tipičnih reverzno-faznih rastvarača uočena je znatno bolja selektivnost odvajanja ovih jedinjenja od one postignute u NP uslovima (Tabela 6, rastvarači 1 - 13).

Retenciono ponašanje helata pri RP uslovima je saglasno sa mehanizmom hidrofobnih interakcija koje su sve jače sa opadanjem polarnosti odvajanih supstanci, odnosno sa povećanjem broja fenil-grupa u liganadima ispitivanih helatnih kompleksa.

### 3.5.3 Reverzno-fazna hromatografija *tris*(Alkilksantato)-Co(III) i *bis*(alkilksantato)-Ni(II) kompleksa

Rezultati dobijeni za ispitivane alkilksantato-komplekse u uslovima RP hromatografije su u skladu sa očekivanim tj. sa povećanjem dužine *n*-alkilniza liganda, povećava se hidrofobni deo sorbenda, što rezultuje povećanjem retencije ispitivanih kompleksa. Uočeno ponašanje može biti objašnjeno promenom mehanizma odvajanja tj. ostvarivanjem nespecifičnih hidrofobnih interakcija ispitivanih supstanci sa sorbentom. Dodatno, utvrđeni retencioni redosled ispitivanih alkilksantata u RP hromatografiji na CN-modifikovanom silika-gelu je analogan onom dobijenom pri RP hromatografiji homologe serije ovih helata na tankom sloju nekih alkil-modifikovanih silika-gelova i PANS-a<sup>95-97</sup>.

### 3.6. Reverzno-fazna planarna hromatografija fenola

Hromatografsko ponašanje fenolnih derivata (Slika 18) na tankim slojevima PANS-a, CN-modifikovanog silika-gela i silika-gela, u RP uslovima je proučavano primenom pet rastvarača (Tabela 20). Dobijene  $hR_F$ -vrednosti navedene su u Tabelama 21-23.

Tabela 20. Sastav upotrebljenih hromatografskih rastvarača za RP odvajanje fenolnih derivata

Redni broj	Rastvarač	Zapreminski odnos
1	Metanol / Voda / Sirćetna kiselina	40:59:1
2	Izopropanol / Voda / Sirćetna kiselina	40:59:1
3	Aceton / Voda / Sirćetna kiselina	60:39:1
4	Etanol / Voda	60:40
5	Tetrahidrofuran / Voda / Sirćetna kiselina	40:59:1

Pri reverzno-faznim uslovima pravilan obrnut redosled  $hR_F$  vrednosti u odnosu na onaj dobijen pod NP uslovima je utvrđen samo na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela. Nešto niža  $hR_F$ -vrednost *tert*-butilfenola je verovatno posledica jačih hidrofobnih interakcija između sorbenta i *tert*-butil-grupe. Floroglucinol ima najviše  $hR_F$ -vrednosti na sva tri sorbenta, suprotno rezultatima dobijenim primenom tipičnih NP-rastvarača. Takođe je primećeno opadanje  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih fenola u nizu 4-

metoksifenol > 4-*tert*-butilfenol > 2,6-dimetilfenol, što je saglasno sa sa podacima navedenim u literaturi<sup>108</sup>.

Tabela 21.  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih fenola na PANS-u

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5
1	Fluoroglucinol	87	84	100	88	78
2	2-Aminofenol	67	75	56	45	49
3	4-Hidroksibenzaldehid	61	76	80	82	57
4	4-Metoksifenol	64	82	82	90	46
5	Salicilna kiselina	57	79	77	85	43
6	Fenol	47	76	86	69	44
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	55	73	59	85	23
8	2,4-Dihlorfenol	48	71	50	69	68
9	2,6-Dimetilfenol	52	59	76	71	21

\* Vidi Tabelu 20.

Tabela 22.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih fenola na CN-modifikovanom silika-gelu

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5
1	Fluoroglucinol	69	49	74	85	53
2	2-Aminofenol	61	61	64	54	48
3	4-Hidroksibenzaldehid	48	57	59	74	30
4	4-Metoksifenol	47	56	60	75	27
5	Salicilna kiselina	30	52	46	75	13
6	Fenol	46	58	59	72	23
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	12	54	40	62	6
8	2,4-Dihlorfenol	17	37	40	66	7
9	2,6-Dimetilfenol	25	44	47	61	9

\* Vidi Tabelu 20.

Tabela 23.  $hR_F$  vrednosti ispitivanih fenola na silika-gelu

Redni broj	Supstanca/Rastvarač*	1	2	3	4	5
1	Fluoroglucinol	95	100	82	91	96
2	2-Aminofenol	88	93	65	86	89
3	4-Hidroksibenzaldehid	99	81	72	93	78
4	4-Metoksifenol	94	93	97	94	93
5	Salicilna kiselina	86	100	96	91	91
6	Fenol	71	98	64	92	40
7	4- <i>tert</i> -Butifenol	82	81	74	97	30
8	2,4-Dihlorfenol	66	91	78	93	86
9	2,6-Dimetilfenol	83	94	79	94	82

\* Vidi Tabelu 20



Jačanje retencije ispitivanih supstanci sa povećanjem hidrofobnosti (porast hidrofobnog dela sorbenda – dimetil-, *tert*-butil- grupe) može se objasniti reverzno-faznim mehanizmom odvajanja kod kojeg se sorpcija zasniva na nespecifičnim interakcijama sa sorbentom i specifičnim interakcijama sa polarnim molekulima mobilne faze (tj. sa vodom).

Takođe, u RP uslovima priroda *orto*-supstituenata ne utiče značajno na hromatografsko ponašanje ispitivanih derivata fenola.

Pri RP uslovima retencija ispitivanih fenolnih derivata raste u nizu sorbenata silka-gel < PANS < CN-modifikovani silika-gel. Slabija retencija na silika-gelu je verovatno posledica njegove visoke polarosti, što ga čini neodgovarajućim za RP hromatografiju. Jača retencija fenola na CN-modifikovanom silika-gelu nego na PANS-u može biti posledica polarosti sorbenta. Retencija pod RP uslovima može biti objašnjena nespecifičnim hidrofobnim interakcijama tj. disperzionim i indukcionim silama uz učešće  $\pi$ -efekta aromatičnih jezgara<sup>109</sup>.

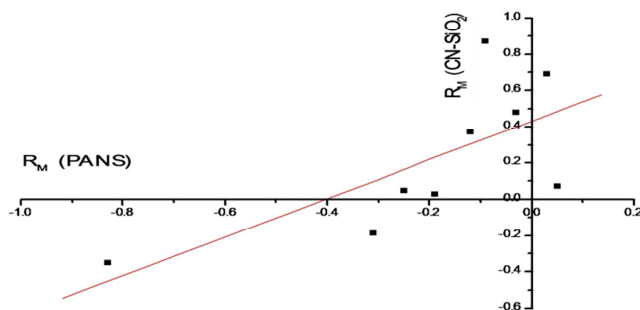
Retencioni podaci za fenole za sve ispitivane sisteme su grafički poređeni (dijagrami  $R_M(\text{CN-silika-gel})-R_M(\text{PANS})$ ,  $R_M(\text{silika-gel})-R_M(\text{CN-silika-gel})$  i  $R_M(\text{PANS})-R_M(\text{silika-gel})$ ) u RP uslovima u cilju procene selektivnosti odvajanja. Izračunati statistički koeficijenti su dati u Tabeli 24, dok su reprezentativni primeri korelacija prikazani grafički na Slikama 29-31.

Tabela 24. Korelacioni koeficijenti ( $r$ ) i F-test zavisnosti između  $R_M$ -vrednosti fenola u različitim hromatografskim sistemima

Mobilna faza <sup>a)</sup>	$R_M(\text{PANS})$ i $R_M(\text{CN-silika-gel})$			$R_M(\text{Silika gel})$ i $R_M(\text{CN-silika-gel})$			$R_M(\text{PANS})$ i $R_M(\text{Silika-gel})$		
	$r$	F	n <sup>b)</sup>	$r$	F	n	$r$	F	n
1	0,7029	6,835	9	0,5277	2,701	9	0,5250	2,662	9
2	0,4064	1,385	9	0,0727	0,027	7	0,0716	0,026	7
3	0,4609	1,618	8	0,0674	0,032	9	0,3002	0,594	8
4	0,6639	5,517	9	0,0811	0,046	9	0,5211	2,609	9
5	0,5723	3,409	9	0,5015	2,352	9	0,5785	3,520	9

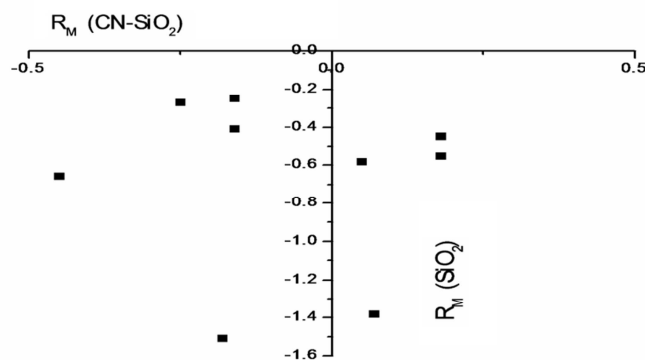
<sup>a)</sup> Tabela 20; <sup>b)</sup> Broj tačaka

U RP uslovima nisu dobijene zadovoljavajuće korelacije, mada su one uopšteno govoreći, bolje za dijagrame  $R_M(\text{CN-silika-gel}) - R_M(\text{PANS})$  nego za druge dijagrame.



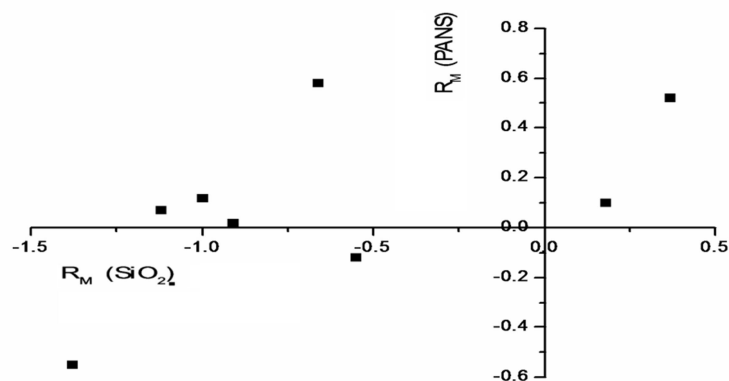
Slika 29. Korelacije između  $R_M$ -vrednosti fenola na PANS-u i CN-modifikovanom silika-gelu primenom rastvarača br.1

Takvi rezultati ukazuju da dva sorbenta imaju slične adsorpcione karakteristike. Poređenje  $R_M$ -vrednosti dobijenih za fenole na CN-modifikovanom silika-gelu sa onim dobijenim na nemodifikovanom silika-gelu pokazuje zadovoljavajuće korelacije samo u NP uslovima. Odsustvo korelacije u RP uslovima verovatno je posledica činjenice da silika-gel, usled svoje ukupne polarnosti, nije naročito pogodan kao sorbent za odvajanja u RP sistemima.



Slika 30. Korelacije između  $R_M$ -vrednosti fenola na CN-modifikovanom silika-gelu i silika-gelu primenom rastvarača br. 3

Korelacije između  $R_{M(\text{PANS})}$  -  $R_{M(\text{Silika-gel})}$  su loše kako u NP tako i u RP uslovima. Ovakvi rezultati su i očekivani imajući u vidu različitu prirodu pomenutih sorbenata.



Slika 31. Korelacije između  $R_M$ -vrednosti fenola na silika-gelu i PANS-u primenom rastvarača br. 5

### 3.7. Linearno modelovanje zemljište-voda porednih koeficijenata normiranih na sadržaj organskog ugljenika ( $K_{OC}$ ) reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom

U cilju izvođenja opštih zaključaka u vezi primene TLC u modelovanju  $\log K_{OC}$ , odabran je reprezentativni set 50 ekološki i farmakološki značajnih jedinjenja različitih struktura, oblika i veličine molekula (Tabela 25). Od toga 29 standardnih supstanci (5 fenola, 9 poliaromatičnih ugljovodonika (PAH), 4 triazinska herbicida i drugi aromatični amini, ketoni i aldehidi) s poznatim, eksperimentalno određenim vrednostima  $\log K_{OC}$  preuzetim iz KOCWIN baze podataka (EPI Suite, 146 EPA USA) i 21 jedinjenja sa nepoznatim vrednostima, među kojima je 9 benzodiazepina i 7 fenola. Standardne supstance su izabrane tako da pokrivaju širok opseg zemljište-voda sorpcionih koeficijenata (1,10 - 6,22 log jedinica), sa različitom sposobnošću da formiraju vodonične veze, dipolarne ili polarizabilne interakcije date kroz Abrahamove solvatochromne parametare: A – sposobnost građenja vodoničnih veza proton-donorskog tipa: 0,00-0,94; B - sposobnost građenja vodoničnih veza proton-akceptorskog tipa: 0,15-1,63; S - dipolarne interakcije: 0,79 – 2,49; E – molarna refraktivnost: 0,80-3,43 i V - McGovan molekularna zapremina: 0,78 do 2,19 (Tabela P4 data u Prilogu). Eksperimentalno određeni solvatochromni parametri su prikupljeni kroz online dostupne računarske alate, deo ACD / I-Lab (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>). Sve supstance, sa izuzetkom 4-nitrofenola, 2,4,6-trihlorfenola, i 4-aminobenzojeve kiseline, su pri proučavanju hromatografskim uslovima prisutne u neutralnom obliku, tj. sa stepenom

jonizacije  $\alpha < 5,00\%$  na  $\text{pH} = 6$ . Spisak proučavanih jedinjenja zajedno sa  $\log K_{OC}$  vrednostima, Abrahamovim solvatohromnim parametarima,  $\text{p}K_a$  vrednostima i retencionim parametrima dat je u Prilogu (Tabele P4-P5), kao dopunska Excel tabela.

**Tabela 25.** Lista standardnih jedinjenja sa  $\log K_{OC}$  vrednostima direktno merenim i preporučenim od strane U.S. EPA i lista jedinjenja sa nepoznatim  $\log K_{OC}$  vrednostima

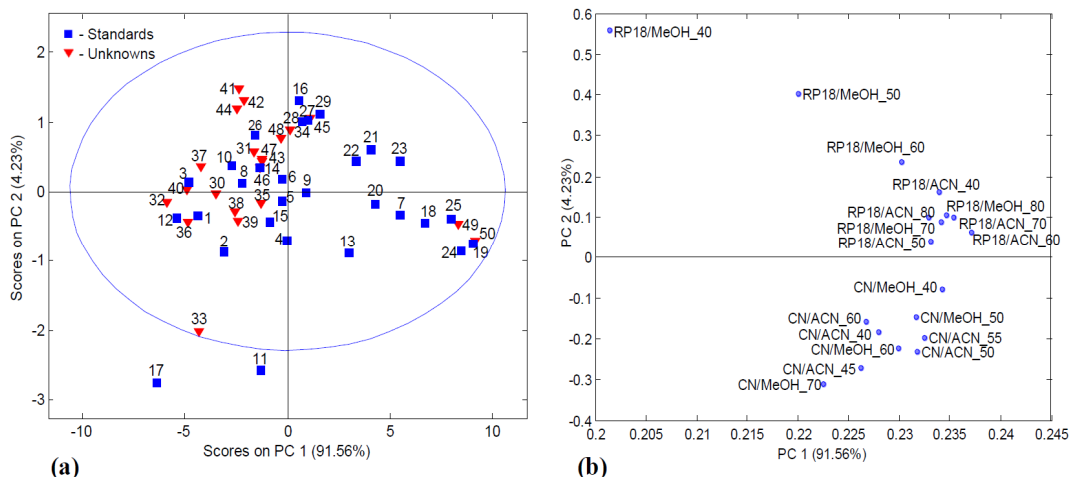
Red. br.	Jedinjenje	$\log K_{OC}$	Ref	Red. br.	Jedinjenje
<i>Standardna jedinjenja</i>				<i>Jedinjenja sa nepoznatim <math>\log K_{OC}</math> vrednostima</i>	
1	Fenol	1,43	[110]	30	3-Nitrofenol
2	4-Nitrofenol	2,37	[110]	31	2-Naftol
3	Benzil alkohol	1,10	[111]	32	4-Hidroksibenzaldehid
4	1-Naftilamin	3,51	[110]	33	2-Aminofenol
5	1-Naftol	3,10	[110]	34	4- <i>t</i> -Butilfenol
6	2,4-Dihlorofenol	2,81	[110]	35	2,6-Dimetilfenol
7	Antracen	4,31	[110]	36	4-Metoksifenol
8	Acetofenon	1,80	[111]	37	Metil- <i>p</i> -hidroksibenzoat
9	2,4,6-Trihlorofenol	3,03	[110]	38	2-Nitrobenzaldehyd
10	Etil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	2,21	[110]	39	3-Nitrobenzaldehyd
11	<i>p</i> -Anizidin	1,93	[112]	40	Ftalimid
12	1,2,3-Benzotriazol	1,69	[110]	41	Oksazepam
13	Difenilamin	2,78	[110]	42	Lorazepam
14	2,2'-Dipiridin	1,60	[110]	43	Klonazepam
15	4-Bromoanilin	1,96	[110]	44	Bromazepam
16	Benzofenon	2,63	[110]	45	Diazepam
17	4-Aminobenzojeva kiselina	1,70	[110]	46	Nitrazepam
18	Piren	4,90	[110]	47	Hlordiazepoksid
19	Benzo[ <i>a</i> ]piren	5,95	[111]	48	Klobazam
20	Fluoren	3,70	[110]	49	Medazepam
21	Acenaften	3,59	[110]	50	Hzizen
22	Naftalen	2,96	[110]		
23	Fenantren	4,35	[110]		
24	Dibenz[ <i>a,h</i> ]antracen	6,22	[110]		
25	Benz[ <i>a</i> ]antracen	5,30	[110]		
26	Simazin	2,10	[110]		
27	Propazin	2,40	[110]		
28	Ametrin	2,59	[110]		
29	Prometrin	2,85	[110]		

Hromatografski eksperimenti su izvedeni korišćenjem komercijalno dostupnog oktadecil- i cijanopropil-modifikovanog silika-gela. Metanol – voda i acetonitril – voda binarne smeše su korišćene kao mobilne faze sa variranjem sadržaja organske komponente u opsegu od 40 – 80%, v/v. U svim navedenim slučajevima, sadržaj organske komponente u mobilnoj fazi je povećavan u porcijama od 5 Vol%.

U cilju pronalaženja sporednih efekata na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja, mogućih obrazaca ponašanja, grupa i sličnosti među korišćenim hromatografskim sistemima, kao i radi ilustracije reprezentativnosti odabranih setova jedinjenja, urađene su analiza glavnih komponenata (PCA) i hijerarhijska klasterska analiza (HCA) na standardizovanim retencionim podacima i Abrahamovim solvatohromnim parametrima. PCA retencionih faktora otkriva relativno heterogenu prirodu čitavog seta jedinjenja (Slika 32a). PC1 prema PC2 grafik skorova pokazuje prisustvo dve glavne grupe. Prva se nalazi na desnoj strani grafika i uglavnom sadrži poliaromatične ugljovodonike (supstance br. 7, 18-15), dok se benzodiazepini, fenoli i ostala aromatična jedinjenja nalaze na levoj strani grafika. Dva jedinjenja: *p*-aminobenzoeva kiselina (br. 17) i *p*-anisidin (br. 11) se nalaze izvan Hotteling-elipse za verovatnoću od 95%. Iako sporedni efekat nije značajan, u slučaju *p*-aminobenzoeve kiseline može se pripisati izrazitoj disocijaciji pod primenjenim hromatografskim uslovima ( $\alpha = 95,6\%$ ).

Tako pravilna raspodela standardnih jedinjenja i jedinjenja sa nepoznatim vrednostima unutar PC prostora, omogućava primenu opštih zaključaka na čitav set podataka. Reprezentativna podela podataka je dodatno potvrđena izvođenjem PCA na Abrahamovim solvatohromnim parametrima. Grafik koeficijenata latentnih varijabli za retencione podatke (Slika 32b) pokazuje razliku u hromatografskim uslovima duž PC2 ose koja opisuje 4,23% varijabilnosti podataka. Hromatografski sistemi sa C18 silika-gelom imaju pozitivne vrednosti ovih koeficijenata, dok su za sisteme sa cijano-modifikovanim sorbentom vrednosti negativne. Ovakav grafik pokazuje očiglednu razliku u interakcijama ove dve stacionarne faze, tj. uticaja polarnih grupa CN-silika-gela sa jedne strane i dugolančanih hidrofobnih ugljovodoničnih lanaca C18 silika-gela, sa druge strane.

HCA preciznije pokazuje grupisanje na osnovu retencionih podataka standardnih jedinjenja (Slika 33a). Dva klastera (A i B) su evidentna na rastojanju od 40 jedinica, što je slično rezultatima PCA.



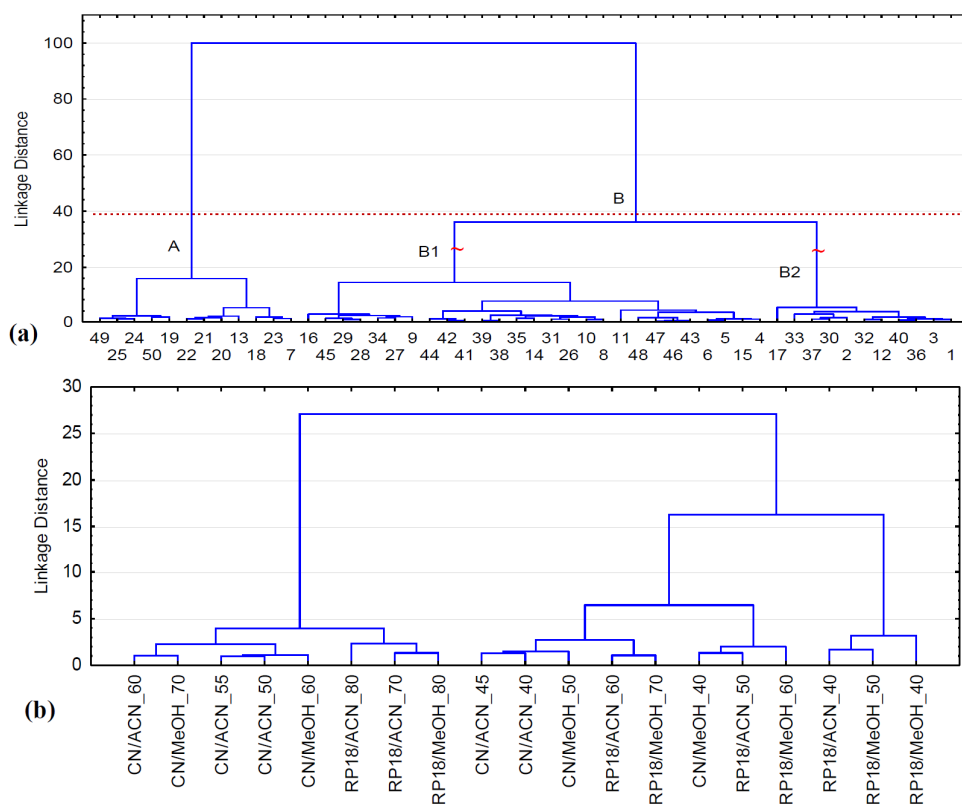
Slika 32. PCA primenjena na retencione podatke; Grafik skorova PC1 prema PC2 (a), pokazuje karakteristično grupisanje jedinjenja prilikom unosa podataka (b), ilustruje sličnosti i razlike između hromatografskih sistema.

Međutim, finija strukturna pod-grupa B se javlja na razdaljini od oko 20 jedinica. Prvi sub-klaster označen kao B1 se sastoji od benzodiazepina, triazinskih herbicida, većine fenola i aromatičnih amina, što odgovara gornjem levom kvadrantu PCA dijagrama. Drugi sub-klaster, označen kao B2, se sastoji od jedinjenja koja se uglavnom nalaze u donjem levom kvadrantu PCA dijagrama. Međutim, kao što se može videti na Slici 33b primenom HCA ne može biti postignuto jasno odvajanje hromatografskih sistema prema vrsti stacionarne ili mobilne faze.

### 3.7.1. Modelovanje retencija - $\log K_{OC}$ zavisnosti

U cilju dobijanja kalibracionog modela koji povezuje  $\log K_{OC}$  sa retencionim podacima, razmatrana su dva pristupa. Prvi je jednostavni jednovarijantni pristup koji pruža pojedinačni model za svaki hromatografski sistem. Drugi pretpostavlja izgradnju multivarijantnih modela zasnovanih na zbirnim informacijama dobijenim iz svih hromatografskih eksperimenata. Jednovarijantni pristup je jednostavniji; međutim,

multivarijantni model ima veću snagu usled istovremene obrade više promenljivih. Zbog svoje jednostavnosti, linearni pristup modelovanju je od primarne važnosti.



Slika 33. HCA standardnih TLC retencionih podataka dobijena korišćenjem Euclidean-ove razdaljine i Ward-ovog aglomerativnog pravila; Karakteristično grupisanje (a) jedinjenja i (b) hromatografskih sistema.

Regresija glavnih komponenta (PCR) i PLC regresija su najčešće primenjivane metode u modelovanju hromatografskih podataka okarakterisanih visokim stepenom korelacije<sup>113-115</sup>. Iako su ove metode međusobno povezane, među njima postoje značajne razlike. PLS regresija ne formira latentne varijable samo maksimiziranjem varijabilnosti skorova u oblasti nezavisnih promenljivih, koji je ključan za koncept PCR, već maksimiziranjem korelacija između projekcija skorova u oblasti i nezavisnih i zavisnih promenljivih. Zbog toga je od posebnog interesa poređenje oba navedena pristupa sa mnogo jednostavnijim metodama jednovarijantne kalibracije koje ne zahtevaju veliki broj hromatografskih eksperimenata.

Svih 29 standardnih jedinjenja je upotrebljeno za formiranje kalibracionih modela. Za procenu predikativnosti u slučaju jednovarijantne kalibracije TLC modela primenjena je unakrsna validacija. U slučaju PLS i PCR modela, s obzirom na ograničen broj jedinjenja, pristup dvostruke unakrsne validacije je primenjen za odabir modela optimalne složenosti, procenu njihove prediktivne moći i testiranje značajnosti regresionih koeficijenata. Spisak svih 19 jednostavnih kalibracionih TLC modela dat je u Prilogu (Tabela P6). Samo dva hromatografska sistema zasnovana na RP18-silika-gelu i sadržaju metanola od 40 i 50% v/v, redom, rezultirala su kalibracionim modelima sa neprihvatljivo visokom greškom kalibracije i predikacije (0,8 - 0,9 log jedinica). Kalibracija deset sistema rezultirala je umereno dobrim predikativnim mogućnostima (procenjena greška između 0,6 i 0,7 log jedinica, i  $R^2_{\text{Cal}}$  i  $R^2_{\text{PRED}}$  vrednosti u opsegu od 0,7 - 0,8). Za sedam modela dobijenih na: CN-silika-gelu u kombinaciji sa smešama metanol-voda (40-70% v/v), acetonitril-voda (50% v/v), i RP18-silika-gelu u kombinaciji sa većim sadržajem metanola (70 i 80% v/v) je utvrđeno da imaju zadovoljavajuće statističke parametre (greške 0,4 – 0,6 log jedinica,  $R^2_{\text{Cal}}$  i  $R^2_{\text{PRED}} > 0,8$ ) i oni su prikazani u Tabeli 26, zajedno sa za HPLC kalibracionim modelom, kao i PCR i PLS regresionim modelima.

Konačno odabrani modeli (Tabela 26) pokazuju vrlo slične i sasvim dobre prediktivne karakteristike, sa vrednostima korena srednjeg kvadratnog odstupanja u sledećim opsezima:  $\text{RMSE}_{\text{Cal}} = 0,401 - 0,537$ ,  $\text{RMSE}_{\text{CV}} = 0,496 - 0,517$ ;  $\text{RMSE}_{\text{PRED}} = 0,441 - 0,608$  i koeficijentima determinacije:  $R^2_{\text{Cal}} = 0,8340 - 0,9124$ ;  $R^2_{\text{CV}} = 0,8640 - 0,8585$ ;  $R^2_{\text{PRED}} = 0,8140 - 0,8878$ .

Slično, HPLC eksperimentom dobijen je jednovarijantni linearni kalibracioni model korišćenjem regresije metodom najmanjih kvadrata:  $\log k = -0,45 (\pm 0,10) + 0,274 (\pm 0,031) \log K_{\text{OC}}$  ( $R^2_{\text{cal}} = 0,865$ , S.D. = 0,219,  $P = 80,18$ ,  $P = 1,4 \cdot 10^{-9}$ ,  $n = 29$ ). Sve ostale vrednosti su normalno distribuirane bez prisustva bilo kakvih trendova (testirane Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilks i Lilliefors testovima,  $p > 0,20$  u svim slučajevima). Ovo potvrđuje da je linearni pristup odgovarajući za ispravno modelovanje  $K_{\text{OC}}$  podataka u približnom opsegu od 1 - 6 log jedinica, uz grešku predikcije koja ne prelazi 0,4 – 0,6 log jedinica.



**Tabela 26.** Odabrani hromatografski modeli za predikciju  $\log K_{OC}$ -vrednosti sa pratećim statističkim parametrima

Red. br.	Hrom. metoda	Model tip	Statistički parametri
1	TLC	PCR	$n(PC) = 2$ ; $RMSE_{Cal} = 0,433$ , $RMSE_{CV} = 0,517$ , $RMSE_{PRED} = 0,494$ , $\max RMSE_{PRED} = 0,568$ ; $R^2_{cal} = 0,8921$ , $R^2_{CV} = 0,8460$ , $R^2_{PRED} = 0,8596$ ; Procenat varijanse svake od glavnih komponenti u X i Y oblasti, redom: $PC1$ : 91,88%, i 86,40% $PC2$ : 4,49%, i 2,70%
2		PLS	$n(LV) = 2$ ; $RMSE_{Cal} = 0,401$ , $RMSE_{CV} = 0,496$ , $RMSE_{PRED} = 0,492$ , $\max RMSE_{PRED} = 0,608$ ; $R^2_{cal} = 0,9124$ , $R^2_{CV} = 0,8585$ , $R^2_{PRED} = 0,8605$ ; Procenat varijanse svake od latentnih varijabli u X i Y oblasti, redom: $PLS1$ : 91,92 %, i 86,73 % $PLS2$ : 4,33 %, i 3,94 %
3		OLS	RP18-silika-gel, MeOH 70% v/v $\log K_{oc} = (2,00 \pm 0,14) + (2,11 \pm 0,19) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,500$ , $RMSE_{PRED} = 0,527$ , $R^2_{cal} = 0,8557$ , $F = 160,17$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8397$ , $n = 29$
4			RP18-silika-gel, MeOH 80% v/v $\log K_{oc} = (2,57 \pm 0,12) + (2,60 \pm 0,25) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,516$ , $RMSE_{PRED} = 0,557$ , $R^2_{cal} = 0,8465$ , $F = 148,90$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8210$ , $n = 29$
5			CN-silika-gel, MeOH 40% v/v $\log K_{oc} = (1,55 \pm 0,16) + (2,21 \pm 0,19) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,471$ , $RMSE_{PRED} = 0,506$ $R^2_{cal} = 0,8722$ , $F = 184,31$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8522$ , $n = 29$
6			CN-silika-gel, MeOH 50% v/v $\log K_{oc} = (2,27 \pm 0,10) + (2,67 \pm 0,19) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,403$ , $RMSE_{PRED} = 0,441$ , $R^2_{cal} = 0,9062$ , $F = 260,93$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8878$ , $n = 29$

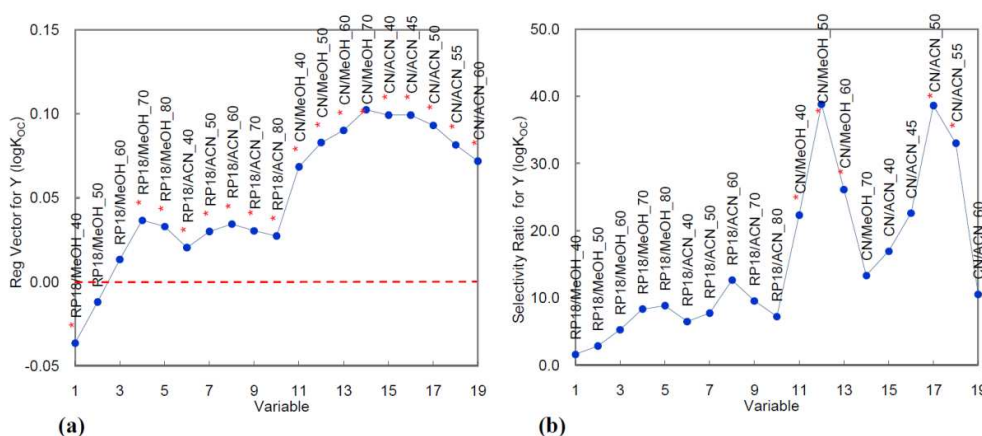
Tabela 26. (nastavak)

Red. br.	Hrom. metoda	Model tip	Statistički parametri
7			CN-silika-gel, MeOH 60% v/v $\log K_{oc} = (2,94 \pm 0,10) + (3,36 \pm 0,26) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,439$ , $RMSE_{PRED} = 0,474$ , $R^2_{cal} = 0,8892$ , $F = 216,65$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8716$ , $n = 29$
8			CN-silika-gel, MeOH 70% v/v $\log K_{oc} = (3,69 \pm 0,13) + (4,13 \pm 0,40) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,531$ , $RMSE_{PRED} = 0,556$ , $R^2_{cal} = 0,8373$ , $F = 138,92$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8220$ , $n = 29$
9			CN-silika-gel, ACN 50% v/v $\log K_{oc} = (2,72 \pm 0,12) + (4,43 \pm 0,44) R_M$ , $RMSE_{Cal} = 0,537$ , $RMSE_{PRED} = 0,568$ , $R^2_{cal} = 0,8340$ , $F = 135,68$ , $p < 1 \cdot 10^{-4}$ , $R^2_{PRED} = 0,8140$ , $n = 29$
10	HPLC	OLS	$\log k = -0,45 (\pm 0,10) + 0,274 (\pm 0,31) \log K_{OC}$ $R^2_{cal} = 0,865$ , $S,D, = 0,219$ , $F = 80,18$ , $P = 1,4 \cdot 10^{-9}$ , $n = 29$

Očigledno je da postoji veliki stepen slaganja statističkih parametara zvanično preporučene HPLC metode sa proučavanjem modelima zasnovanim na TLC. Štaviše, kvalitet PCR i PLS regresija se može porediti sa već objavljenim podacima dobijenim metodom najmanjih kvadrata u HPLC studijama. Naime, Koerdel i saradnici<sup>116</sup> su utvrdili sledeći model između  $\log k$  i  $\log K_{OC}$  dobijen na CN-modifikovanom silika-gelu:  $\log K_{OC} = 1,5 \log k + 2,8$  ( $R = 0,83$ ,  $n = 50$ ). Gavlik i saradnici<sup>117</sup> su procenjivali odnos između  $\log K_{OC}$  i  $\log k$  na CN-modifikovanom silika-gelu korišćenjem pet različitih standarda zemljišta i 47 ispitivanih jedinjenja (uglavnom pesticida). Dobijene su  $R^2$  vrednosti u rasponu od 0,89 do 0,94. Szabo i saradnici su utvrdili dobru linearanu zavisnost između retencionih faktora dobijenih na CN-modifikovanom silika-gelu ekstrapolacijom na sadržaj čiste vode u mobilnoj fazi ( $\log k_w$ ) i  $\log K_{OC}$ :  $\log K_{OC} = 1,729 + 0,612 \log k_w(\text{CN})$  sa  $R^2 = 0,91$ <sup>118</sup>.

Pored detaljnih statističkih karakteristika koje su već date u Tabeli 26, PCR i PLS modeli su takođe okarakterisani dijagramima regresionih vektora, graficima koeficijenata osetljivosti i tzv. VIP dijagramima (Variable Importance for Projection - varijable značajne za projekciju) (poslednji je dostupan samo u slučaju PLS). Pri tome,

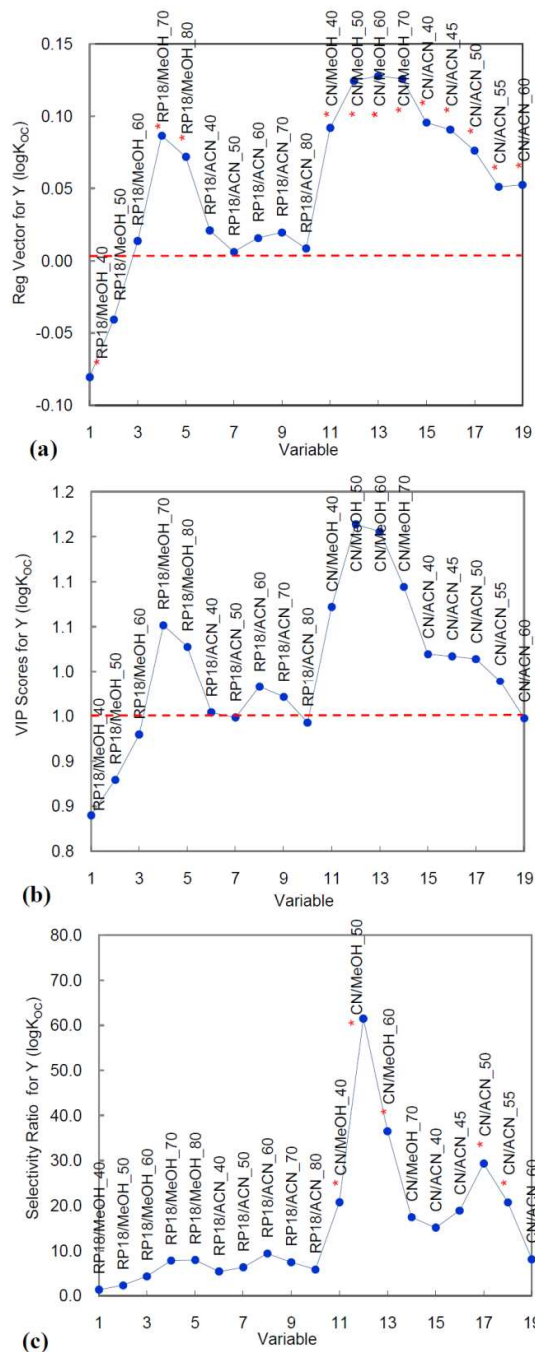
sve promenljive ne doprinose jednako ukupnom modelu. U slučaju PCR 17 regresionih koeficijenta se statistički razlikuje od nule ( $t$ -testom testiranih vrednosti unakrsne validacije, na nivou značajnosti  $p = 0,05$ ). Izuzetak su samo dva koeficijenta koja se odnose na hromatografske sisteme: RP18/MeOH\_50 i RP18/MeOH\_60 (Slika 34a). Prema vrednostima koeficijenata osetljivosti (granična vrednost = 20) pet od ovih sedamnaest koeficijenata se može smatrati najuticajnijim. Oni predstavljaju hromatografske sisteme zasnovane na CN-silika-gelu u kombinaciji sa sadržajem metanola od 40 - 60% v/v ili acetonitrila 50 - 55% v/v (Slika 34b).



Slika 34. PCR model – grafik regresionih vektora (a) i grafik koeficijenata osetljivosti (b); Regresioni koeficijenti statistički značajno različiti od nule i sistemi sa visokim koeficijentima osetljivosti su označeni zvezdicom.

U slučaju PLS modela ima trinaest statistički značajnih regresionih koeficijenta. Izuzeci su šest koeficijenta koji se odnose na hromatografske sisteme uglavnom sastavljene od RP18-silika-gela u kombinaciji sa smešama acetonitril-voda (Slika 35a).

Budući da VIP rezultati u osnovi opisuju doprinos svake varijable u ukupnom modelu u poređenju sa prosečnim doprinosom ostalih varijabli, lako je sagledati one koje doprinose više od proseka ( $VIP > 1$ ). U tom smislu, od trinaest hromatografskih sistema koji doprinose ukupnom PLS modelu bolje od proseka, većina njih je dobijena na CN-silika-gelu u kombinaciji sa metanolom ili acetonitriлом kao organskim modifikatorom (Slika 35b).



Slika 35. PLS model – grafik regresionih vektora (a) grafik VIP skorova (b) i grafik koeficijena osetljivosti (c). Regresioni koeficijenti statistički značajno različiti od nule ( $p = 0,05$ ) i sistemi sa visokim koeficijentima osetljivosti su označeni zvezdicom.

Grafik koeficijenta selektivnosti (Slika 35b) ukazuje na to da su najuticajnije hromatografski sistemi (granična vrednost = 20) oni zasnovani na CN-silika-gelu u kombinaciji sa sadržajem metanola 40 - 60% v/v i acetonitrila 50 - 55% v/v (Slika 35c).

Upotreba slojeva CN-silika-gela ima veći uticaj na ukupno modelovanje  $\log K_{OC}$  od oktadecil-modifikovane stacionarne faze. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da će CN-modifikovani slojevi biti pogodniji za hromatografsko određivanje  $\log K_{OC}$  od hidrofobnih, dugolančanih alkil-modifikovanih silika-gelova. To je u skladu sa OECD preporukama vezanim za postizanje što veće tačnosti<sup>119</sup>. Međutim, PCR i PLS se ne koriste u ovom trenutku za poređenje i izbor idealnih hromatografskih uslova (varijabli).

### 3.7.2. Određivanje $\log K_{OC}$ vrednosti; poređenje hromatografskog i *in silico* pristupa

Hromatografski modeli prikazani u Tabeli 26 su korišćeni za određivanje  $\log K_{OC}$  vrednosti 31 jedinjenja koja nemaju eksperimentalno određene vrednosti, kao i 29 standardnih jedinjenja. Utvrđene vrednosti su dalje poređene sa *in silico* procenama, tj. LSER modelom Poole i Poole<sup>120</sup>, Nguyen i saradnika<sup>121</sup>, KOCWIN procenom zasnovanom na indeksu molekularnog povezivanja i oktanol-voda particionim koeficijentima. Dobijene  $\log K_{OC}$  vrednosti su navedene u Prilogu (Tabela P7).

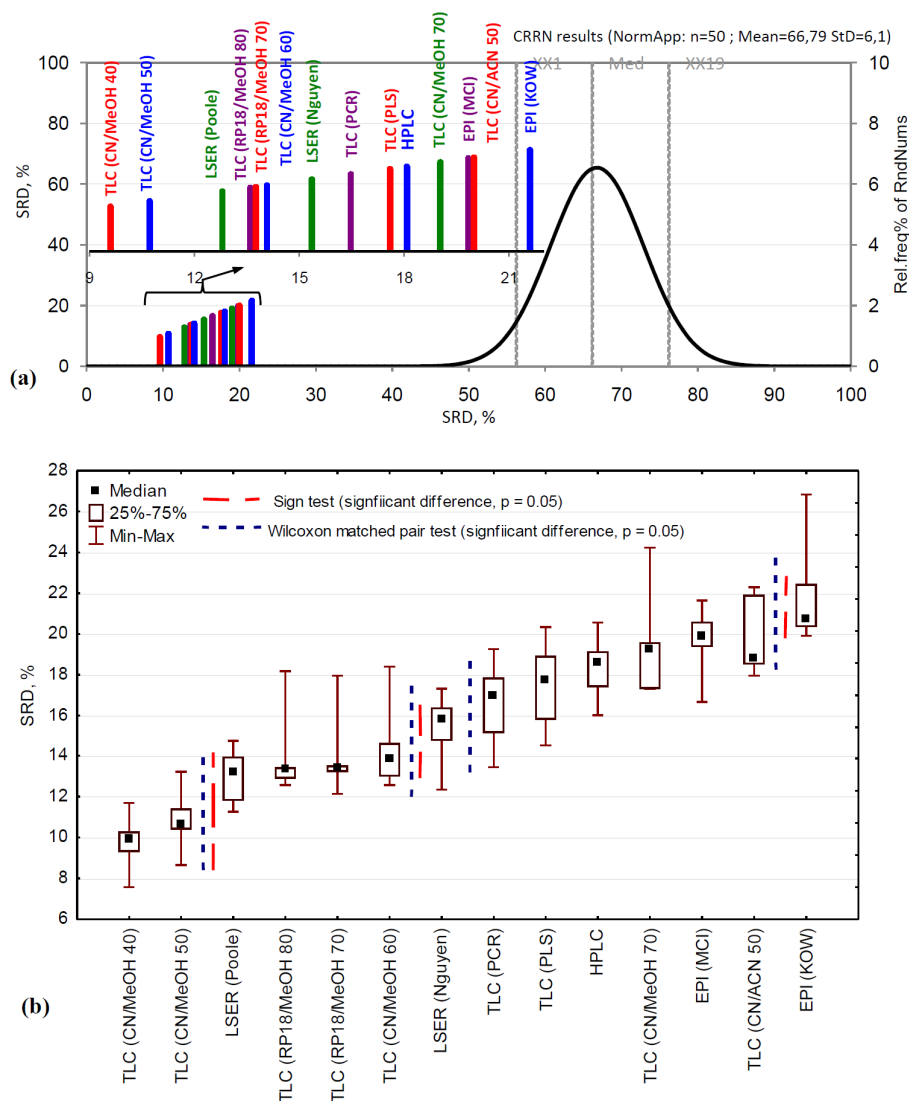
Kalibracioni set jedinjenja i ukupni set jedinjenja su tretirani odvojeno. Razlog za to je jednostavan. Analiza podataka kalibracionog seta može da pruži informacije u vezi sa  $\log K_{OC}$  vrednostima dobijenim iz sorpcionih eksperimenata. Podaci ukupnog seta jedinjenja, koji uključuje nepoznata kao i standardna jedinjenja, obezbeđuju znatno viši nivo pouzdanosti u finalne statističke zaključke (povećan broj i raznovrsnost jedinjenja). Međutim, informacije vezane za vrednosti  $\log K_{OC}$  iz sorpcionih eksperimenata se u ovom slučaju gube.

Poređenje metoda određivanja izvršeno je sa nekoliko različitih pristupa: (i) parametrijskom i neparametrijskom korelacijom, (ii) jednofaktorskom analizom varijanse i (iii) novim neparametrijskim poređenjenjima zasnovanim na zbiru razlika između rangova (Sum and Ranking Differences - SRD).

Pri tome je utvrđeno da su sve metode za određivanje  $\log K_{OC}$  međusobno u značajnoj korelaciji sa Pearson-ovim korelacionim koeficijentima u rasponu od 0,732

do 0,998 i Spearman-ovim rangiranjem između 0,699 – 0,993, što ukazuje na statistički značajnu razliku među njima. U cilju daljeg istraživanja ovih razlika i mogućeg grupisanja i rangiranja hromatografskih i *in silico* metoda upotrebljen je SRD postupak. SRD je uveden u oblast analitičke hemije kao pristup za nepristrasno poređenje metoda<sup>122</sup>. Ova metoda je u stanju da rangira grupe varijabli, pronalaženjem statistički značajne razlike čak i ako su promenljive tesno povezane. Metoda je već upotrebljavana u različitim oblastima, najčešće za poređenje stacionarnih faza u SFC (supercritical fluid chromatography)<sup>123</sup>, poređenje hromatografskih i *in silico* skala lipofilnosti<sup>124,125</sup>, odabir najboljih molekularnih sličnosti<sup>126</sup>, poređenje testova antioksidativnog kapaciteta<sup>127</sup>, proučavanje konzistentnosti QSAR modela<sup>128</sup> itd. SRD metod zahteva referentne vrednosti (reper) za rangiranje. Varijable, u ovom slučaju  $\log K_{OC}$  vrednosti određene različitim metodama i jedinjenja (objekti) su raspoređene u obliku matrica, tj. kolona i redova, redom. Objekti su zatim procenjivani za svaku varijablu zasebno; redovi se oduzimaju od referentnih vrednosti i sabiraju u cilju dobijanja jedinstvene SRD vrednost za svaku pojedinačnu varijablu. SRD vrednosti se obično kreću u opsegu od 0 do 100, a varijable su raspoređene (grupisane) u rastućem redosledu vrednosti SRD. Što je SRD vrednost niža, varijabla je bliža referentnoj vrednosti. Reper može biti izabran na nekoliko načina. To može biti „zlatna“ referentna metoda ili „row-wise“ izračunati minimum, maksimum ili prosek. U ovom slučaju je odabran prosek. Takav pristup zasnovan na konsenzusu opravdan je sa dva glavna stanovišta: (i) princip maksimalne verovatnoće koji daje izbor onome ko se bavi procenom da odabere vrednosti parametara tako da posmatrani podaci budu najverovatniji (viši od proseka) i (ii) sve slučajne i sistematske greške metode su poništene tako što su u izvesnoj meri uprosečene.

Rangiranjem izvedenim na ukupnom setu podataka odabran je jednovarijantni kalibracioni TLC model dobijen na CN-modifikovanom silika-gelu u kombinaciji sa sadržajem metanola 40% i 50% v/v, redom, kao najbolji za procene  $\log K_{OC}$  (najbliži proseku) (Slika 36a). Zatim sledi LSER model predložen od Poole-a, jednovarijantna TLC kalibracija dobijena na RP18-silika-gelu korišćenjem smeše metanol-voda sa većimsadržajem metanola (80% i 70% v/v) i CN-silika-gel u kombinaciji sa umerenim sadržajem metanola (60% v/v).



Slika 36. SRD poređenje slučajnih brojeva (CRRN) hromatografskog i *in silico* pristupa za određivanje  $\log K_{OC}$  (a);  $x$ -osa i leva strana  $y$ -ose predstavljaju skalu SRD vrednosti (%), desna strana  $y$ -ose predstavlja relativnu frekvenciju slučajnih brojeva (%); Dodatno rangiranje i grupisanje na osnovu sedmostruke SRD unakrsne validacije (b); isprekidane linije označavaju statistički značajne razlike između varijabli (pristupa) za  $p = 0,05$ .

### 3.7.3 Uticaj stacionarne i mobilne faze na modelovanje $\log K_{OC}$ (CN- nasuprot RP-18-modifikovanog silika-gela)

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja očigledno je da upotreba različitih hromatografskih sistema ima za posledicu procene  $\log K_{OC}$  različite pouzdanosti. Među njima CN-modifikovani silika-gel u kombinaciji sa umerenim sadržajem metanola daje vrednosti najbliže konsenzusu (najbolje procene). Osim toga, čak i PCR i PLS modeli ukazuju na to da nisu svi TLC sistemi podjednako značajni u doprinosu ukupnom modelovanju  $K_{OC}$ .

Zbog toga je od izuzetne važnosti imati uvid u interakcije koje upravljaju retencijom u ispitivanim hromatografskim sistemima. U tom smislu izvršeno je modelovanje linearnih odnosa solvatacione energije (LSER).

LSER modeli koji koriste Abrahamove solvatohromne parametre svih 50 jedinjenja kao nezavisne varijable i retencione faktore kao zavisne, izvedeni su za svaki TLC sistem korišćenjem višestruke linearne regresije, prema jednačini (12).

$$R_M = I + aA + bB + eE + sS + vV \quad (12)$$

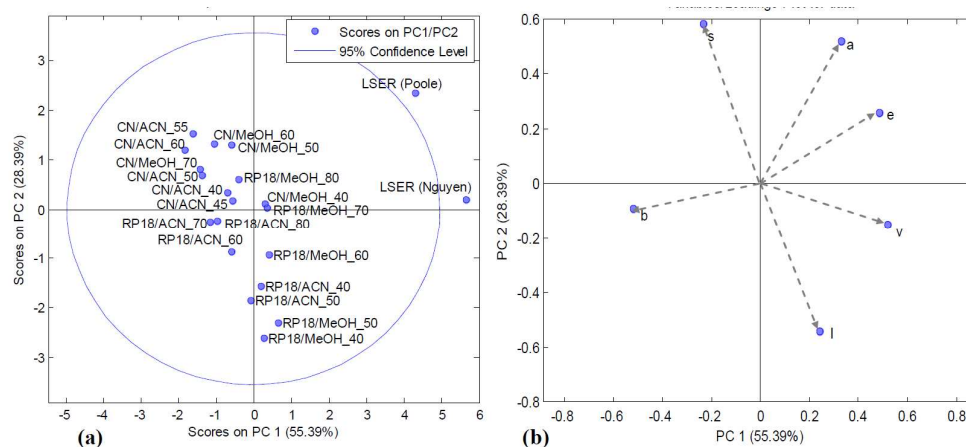
Odsečak i regresioni koeficijenti  $a$ ,  $b$ ,  $e$ ,  $s$  i  $v$  su navedeni u Tabeli P8 (Prilog) sa pratećim statističkim podacima. Oni opisuju efekte sposobnosti formiranja vodoničnih veza proton-donorskog tipa ( $a$ ), sposobnosti formiranja vodoničnih veza proton-akceptorskog tipa ( $b$ ), molarne refraktivnosti/polarizabilnosti ( $e$ ), dipolarnosti ( $s$ ) i sposobnost za formiranje praznog prostora ( $v$ ) u hromatografskom sistemu.

Svi modeli pokazuju dobre statističke performanse sa zadovoljavajućim vrednostima standardne greške i koeficijentima određenim u rasponu od 0,8314 do 0,9331 u slučaju RP-18 silika-gela i 0,7761 do 0,8983 u slučaju CN-silika-gela.

U svim TLC sistemima regresioni koeficijenti prate obrazac koji je tipičan za reverzno-fazne uslove, tj. negativne vrednosti za  $a$ ,  $b$  i  $s$ , pozitivne vrednosti za  $e$  i  $v$  i visoke apsolutne vrednosti  $a$ ,  $b$  i  $v$ <sup>129,130</sup>. Ovo jasno pokazuje značajnu ulogu vodenih mobilna faza u poređenju sa hidrofobnom (manje polarnom) stacionarnom fazom i njen jak doprinos formiranju vodoničnih veza sa ispitivanim supstancama, kao i značajnu



otpornost na formiranje praznog prostora za prenos supstance od stacionarne faze u mobilnu fazu<sup>120,129,130</sup>.



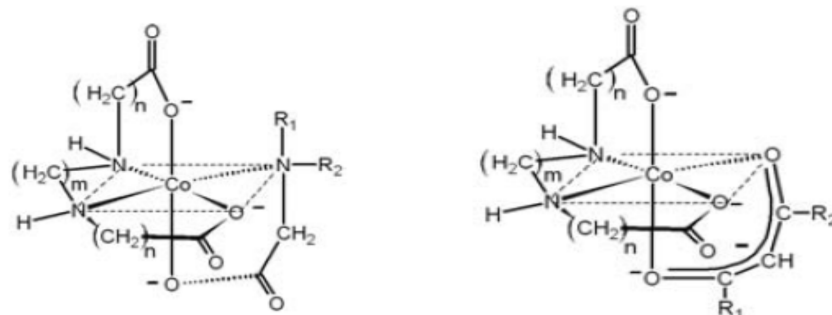
Slika 37. PCA od LSER regresioni koeficijenti *a*, *b*, *s*, *e* i *v*; Grafik skorova (a) i grafik opterećenja (b).

PSA i LSER regresioni koeficijenti *a*, *b*, *s*, *e*, i *v* svih TLC sistema, kao i Nguyen i Pool  $\log K_{OC}$  modeli predstavljeni suna Slici 37. Dijagram skorova prve dve glavne komponente (Slika 37a) pokazuje da generalno TLC sistemi bazirni na CN-silika-gelu, posebno oni sa 40 i 50% v/v metanola, kao i oni koji uključuju RP-18 u kombinaciji sa većim sadržajem metanola (70 - 80% v/v), su najbliži Nguyen i Pool  $\log K_{OC}$  modelima. Dijagram opterećenja (Slika 37b) sugerije da koeficijenti *e* i *a* predstavljaju najvažnije interakcije odgovorne za sličnosti između predloženih hromatografskih uslova i zemljište-voda raspodele.

### 3.8. Hromatografija hidrofilnih interakcija (HILIC) Co(III) kompleksa

Ispitivanje primenljivosti cijano-modifikovanog silika-gela kao specifičnog sorbenta za hromatografiju hidrofilnih interakcija započeto je razmatranjem hromatografskog ponašanja serije neutralnih Co(III) kompleksa. Strukture ispitivanih dvanaest neutralnih mešoviti vodorastvorljivih Co(III) kompleksa koji, pored tetradentnih liganada (*edda*, *pdda*, *eddp*) sadrže i ligande različite polarnosti prikazane su na Slici 38.

Pored cijano-modifikovanog silika-gela, kao sorbenti su korišćeni i nemodifikovani silika-gel, celuloza i aluminijum-oksidi. Upotrebjene mobilne faze bile su jednostavne smeše vode i organskih rastvarača (metanola ili acetona), pri čemu je tanak sloj CN-modifikovanog silika-gela kombinovan sa smešama koje su sadržavale od 0 do 100% metanola u vodi.



Red. br.	Kompleks	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	m	n	Red. br.	Kompleks	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	m	n
1	[Co(edda)Me <sub>2</sub> Gly]	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	1	6	[Co(eddp)bztfac]	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CF <sub>3</sub>	2	1
2	[Co(edda)Sar]	CH <sub>3</sub>	H	2	1	7	[Co(eddp)acac]	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	1
3	[Co(eddp)Sar]	CH <sub>3</sub>	H	2	2	8	[Co(eddp)dibzac]	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2	2
4	[Co(pddp)Sar]	CH <sub>3</sub>	H	3	1	9	[Co(eddp)dipime]	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3	1
5	[Co(eddp)Gly]	H	H	2	2	10	[Co(eddp)bzac]	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	2	2
						11	[Co(eddp)tfac]	CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
						12	[Co(eddp)thtfac]	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> S	CF <sub>3</sub>		

Slika 38. Strukture ispitivanih Co(III) kompleksa

Od svih upotrebljenih sorbenata silika-gel se pokazao kao najupotrebljiviji za sistematsko ispitivanja hromatografskog ponašanja ispitivanih kompleksa, budući da su dobijene merljive R<sub>F</sub>-vrednosti kroz čitav koncentracioni opseg korišćenih mobilnih faza (od 0 do 100% vode).

Pretpostavljeno je da će CN-silika-gel, zbog umerene polarnosti i prisustva kako hidrofilnih tako i hidrofobnih adsorpcionih centara, biti pogodan kako za NP tako i za RP hromatografiju u zavisnosti od prirode ispitivanih analita i sastava upotrebjene mobilne faze. Shodno tome, za komplekse 1-5 zadovoljavajući rezultati su dobijeni samo u NP oblasti, dok su za ostale ispitivane supstance (kompleksi 6-12)

zadovoljavajući rezultati dobijeni samo u RP oblasti i to u ograničenom opsegu odnosa voda-organski rastvarač (Tabela 27, Slika 39).

Tabela 27.  $R_F$ -vrednosti ispitivanih kompleksa dobijene na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela

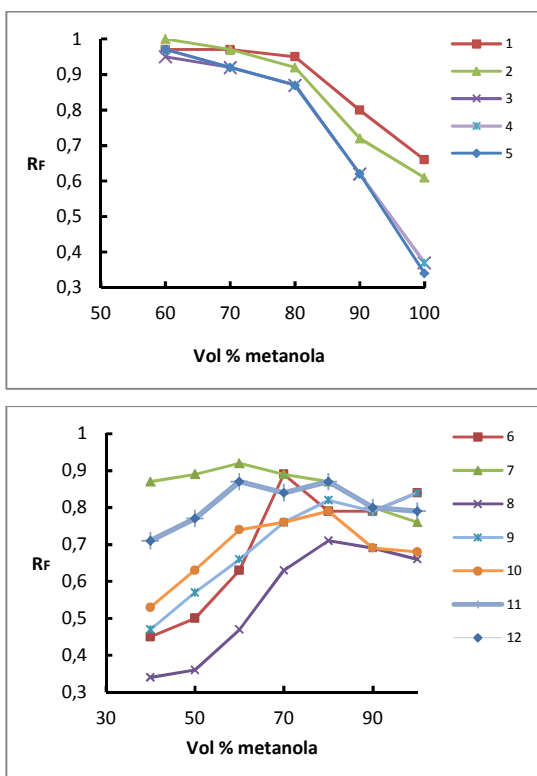
Broj kompleksa <sup>a</sup>	Vol % methanol										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1							0,97	0,97	0,95	0,80	0,66
2							1,00	0,97	0,92	0,72	0,61
3							0,95	0,92	0,87	0,62	0,37
4							0,97	0,92	0,87	0,62	0,37
5							0,97	0,92	0,87	0,62	0,34
6					0,44	0,50	0,62	0,87	0,78	0,77	0,79
7					0,87	0,89	0,92	0,89	0,87	0,80	0,76
8					0,34	0,36	0,47	0,63	0,71	0,69	0,66
9					0,47	0,57	0,66	0,76	0,82	0,79	0,84
10					0,56	0,65	0,75	0,77	0,81	0,71	0,70
11					0,73	0,77	0,87	0,86	0,87	0,77	0,79
12					0,46	0,59	0,70	0,78	0,83	0,77	0,77

<sup>a</sup>Vidi Sliku 38

Kao i u slučaju silika-gela, uočeno je da povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi rezultuje promenom mehanizma odvajanja:  $R_F$ -vrednosti kompleksa rastu sa povećanjem količine vode u mobilnoj fazi, što je tipično za NPC, a zatim opadaju što je tipično za RPC. Uočena promena retencionog mehanizma sa povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi za komplekse 6-12 na CN-modifikovanom silika-gelu je ispitivana primenom voda-metanol mobilne faze. Do promene u retencionom redosledu dolazi pri manjem sadržaju vode u mobilnoj fazi (20-30% v/v) u odnosu na nemedifikovani silika-gel, verovatno zbog niže polarnosti CN-silika-gela.

Za komplekse koji se međusobno razlikuju po dužini bočnog niza (parovi 1-2 i 3 i 5) uočena loša selektivnost odvajanja na ispitivanim sorbentima je verovatno posledica malih razlika u strukturi analita. Međutim, bez obzira na male razlike u  $R_F$ -vrednostima, u NP uslovima je u svim sličajevima utvrđeno da veća dužina ugljovodoničnog lanca liganda rezultuje povećanjem mobilnosti kompleksa. Takvo retenciono ponašanje može biti objašnjeno povećanjem rastvorljivosti kompleksa u korišćenim mobilnim fazama (pozitivni solvatacioni efekat).

Kompleksi sa različitom veličinom diaminskog helatnog prstena (parovi 2-4 i 2-3) pokazali su specifično retenciono ponašanje. Nezavisno od tipa i količine organske komponente mobilne faze, na nemodifikovanom i CN-modifikovanom silika-gelu utvrđeno je da  $R_F$ -vrednosti kompleksa opadaju sa povećanjem ugljovodoničnog dela liganda tj. povećanjem veličine helatnog prstena. Takvo ponašanje je u saglasnosti sa literaturnim podacima za mobilne faze u kojima dominira voda kao komponenta (RP uslovi)<sup>131,132</sup>. Međutim, za mobilne faze u kojima je organska komponenta preovlađujuća po sadržaju (NP uslovi) dobijeni rezultati su suprotni literaturnim podacima. Isti retencioni redosled pri RP i NP uslovima je verovatno posledica specifičnih efekata prisustva vode u mobilnoj fazi na retenciono ponašanje kompleksa.

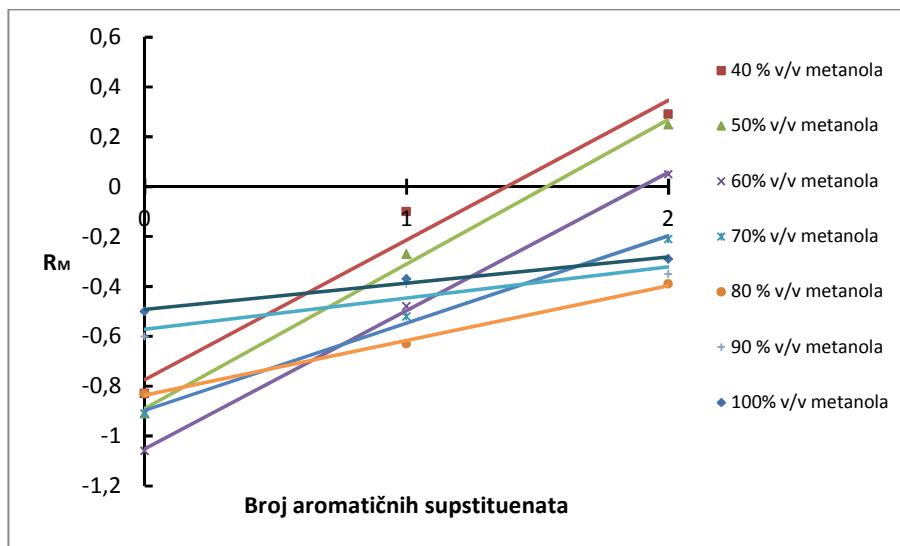


Slika 39.  $R_F$ -vrednosti kompleksa na CN-silika-gelu sa voda-metanol mobilnim fazama

Ispitivanje hromatografskog ponašanja kompleksa 7, 8 i 10 koji sadrže nula, jedan ili dva aromatična prstena u  $\beta$ -diketonato ligandu, pokazuje značajne razlike između

korišćenih sorbenata. U NPC na silika-gelu, supstitucija *acac* liganada *bzac* i *dibzac* ligandima tj. porast broja aromatičnih prstenova u molekulu, rezultovao je povećanjem  $R_F$ -vrednosti kompleksa. Suprotno retenciono ponašanje je uočeno na CN-modifikovanom silika-gelu, gde je, bez obzira na sadržaj vode u mobilnoj fazi, uočen jedinstven retencioni redosled za pomenute komplekse, tj.  $R_F(7) > R_F(8) > R_F(10)$ . Specifično jačanje retencije sa povećanjem aromatičnih delova kompleksa može biti objašnjeno pre svega donorsko-akceptorskim interakcijama između CN-grupa sorbenta i  $\pi$ -elektronskih sistema liganada. Ova pretpostavka je saglasna ranije utvrđenom hromatografskom ponašanju  $\beta$ -diketonato-kompleksa na stacionatnim fazama koje sadrže CN grupe<sup>98,133</sup>. Osim toga, utvrđena je i linearna zavisnost  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa od zapreminskog procenta metanola u vodi (Slika 40).

Hromatografsko ponašanje drugih kompleksa koji sadrže  $\beta$ -diketonato ligande (kompleksi 6, 9, 11 i 12) je u skladu sa negativnim induktivnim efektom supstituenata tj. pozitivnim solvatacionim efektom uzrokovanim voluminoznim ugljovodoničnim supstituentima (*tert*-butil-grupa u kompleksu 9). Ovi efekti su odgovorni za slabije interakcije sa stacionarnom fazom (što vodi većim  $R_F$ -vrednostima) i na nemodifikovanom i na CN-modifikovanom silika-gelu pod NPC (HILIC) uslovima.



Slika 40. Zavisnost odgovarajućih  $R_M$ -vrednosti ispitivanih kompleksa i broja aromatičnih supstituenata liganada

Tabela 28. Parametri linearne korelacije (Slika 40)

<b>Red. br.</b>	<b>Rastvarač</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b><i>r</i></b>
<b>1</b>	40 % v/v metanola u vodi	0,560	-0,773	0,970
<b>2</b>	50 % v/v metanola u vodi	0,580	-0,890	0,996
<b>3</b>	60 % v/v metanola u vodi	0,555	-1,051	0,999
<b>4</b>	70 % v/v metanola u vodi	0,350	-0,896	0,995
<b>5</b>	80 % v/v metanola u vodi	0,220	-0,836	0,997
<b>6</b>	90 % v/v metanola u vodi	0,125	-0,571	0,866
<b>7</b>	100 % v/v metanola u vodi	0,105	-0,491	0,981

A-osečak; B-nagib; *r*-korelacioni koeficijent

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Ispitivane supstance

Strukture proučavanih jedinjenja prikazane su na Slikama 4, 8, 12, 15, 16, 18 i 39. Svi ispitivani kompleksi su sintetisani saglasno postupcima opisanim u literaturi<sup>92,93,95,98,134,135</sup>, dok su sva ostala ispitivana jedinjenja komercijalno dostupna.

### 4.2. Tankoslojna hromatografija

Hromatografska ispitivanja herbicida i fenolnih jedinjenja su izvedena na komercijalno dostupnom CN-modifikovanom silika-gelu (Merck, Germany; Art. 16464), laboratorijski pripremanim silika-gel pločama (Merck, Germany; Kieselguhr H Typ 60) i laboratorijski pripremanom sloju poliakrilonitrilnog sorbenta (PANS). Ploče silika-gela, debljine sloja od 0,25 mm, su pripremane nanošenjem vodene suspenzije (30 g/60 mL) Merck-ovog Kieselguhr-a H Typ 60 i naknadnim aktiviranjem na 105 °C tokom jednog sata. Priprema PANS-a od komercijalno dostupnih poliakrilonitrilnih vlakana, kao i način njegovog nanošenja na hromatografske ploče saglasni su postupcima opisanim u literaturi<sup>136</sup>. Deo hromatografskih eksperimenata koji se odnosio na modelovanje zemljište-voda podeonih koeficijenata je izveden korišćenjem komercijalno dostupnog oktadecil- i cijanopropil-modifikovanog silika-gela (Merck, Germany; Art. 5559 i 16464, redom). Takođe, hromatografsko ponašanje metalnih kompleksa u uslovima NP, RP i HILIC hromatografije je razmatrano upotrebom komercijalno dostupnog CN-modifikovanog silika-gela (Merck, Art.16464.)

U cilju ispitivanja hromatografskog ponašanja herbicida, na tanak sloj sorbenta nanošeno je po 0,5 $\mu$ L hloroformskih rastvora triazina, odnosno acetonskih rastvora fenoksi-kiselina. Standardni rastvori ispitivanih kompleksa približne koncentracije oko 2 g L<sup>-1</sup> su pripremani u hloroformu ( $\beta$ -diketonatni kompleksi) ili acetonu (ostali analizirani kompleksi) i kao sveži rastvori nanošeni na hromatografske ploče u količini od 0,5 $\mu$ L, dok su fenolna jedinjenja rastvarana u etanolu i količini od po 0,2  $\mu$ L nanošena na sorbent.

Ekperimenti zasnovani na modelovanju zemljište voda podeonih koeficijenata izvedeni su nanošenjem oko 0,2 – 0,3  $\mu\text{L}$  sveže pripremljenog rastvora ispitivanih supstanci u acetonu, približne koncentracije 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ , dok su u okviru hromatografije hidrofilnih interakcija pripremani vodeni rastvori ispitivanih neutralnih mešovutih Co(III) kompleksa približne koncentracije oko 2 g  $\text{L}^{-1}$  i na ploče je nanošeno po 1  $\mu\text{L}$  sveže pripremljenih rastvora.

Svi upotrebljeni rastvarači (Tabele 3, 5, 12, 17 i 20) bili su analitičkog stepena čistoće. Osim u slučaju herbicida kod kojih je razvijanje vršeno u vertikalnoj kadi, u svim ostalim slučajevima hromatogrami su razvijani u horizontalnoj HPTLC kadi (CAMAG, Mutenz, Švajcarska). Sva ispitivanja su izvedena na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Pre razvijanja ploče su tokom 15 min u hromatografskoj kadi zasićene parama rastvarača koji će biti korišćen za razvijanje.

Detekcija ispitivanih herbicida kao i svih ostalih jedinjenja odvajanih na slojevima sa fluorescentnim indikatorom vršena je pod UV-lampom na 254 nm. Utvrđivanje položaja hromatografskih zona ispitivanih fenolnih jedinjenja na PANS-u i silika-gelu je vršeno prskanjem pločica 0,05% rastvorom fluoresceina u etanolu, a potom detekcijom pod UV-lampom na 356 nm. U slučaju ispitivanih kompleksa, nakon razvijanja hromatograma detekcija je vršena vizuelno zahvaljujući njihovoj prirodnoj obojenosti.

#### 4.3. HPLC

HPLC ekperimenti su izvedeni u skladu sa važećom OECD procedurom<sup>119</sup>, koristeći Waters 1525 HPLC sistem sa dualnom pumpom, Alltech Select™ degazerom i dualnim  $\lambda$  2487 UV-VIS detektorom. Cijanopropil-kolona (Waters Spherisorb S10 CN,  $4,6 \times 150$  mm analitička kolona, Ser. br 0103141281K03) korišćena je kao stacionarna faza. Izokratsko eluiranje je vršeno sa smešom metanola (HPLC čistoće, Merck) i citratnog pufera,  $C = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$ , pH = 6 u odnosu 30:70, v/v. Brzina protoka je održavana na 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Sva ispitivanja su izvedena na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Uzorci su pripremljeni rastvaranjem čiste supstance u mobilnoj fazi, u koncentraciji od 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Retencioni faktori, utvrđeni su za svako jedinjenje kao srednja vrednost tri ponovljena merenja, izračunavani su prema sledećoj jednačini:



$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (13)$$

#### 4.4. *In silico* procena $\log K_{OC}$ vrednosti

Korišćena su četiri najčešće upotrebljavana računski pristupa za procenu  $\log K_{OC}$  vrednosti. Dva su LSER modeli, jedan razvijen od strane Nguyen-a i saradnika<sup>121</sup> i drugi autora Poole i Poole<sup>120</sup> i dati su jednačinama 14 i 15, redom:

$$\log K_{OC} = (0,14 \pm 0,10) + (0,15 \pm 0,15)A - (1,98 \pm 0,14)B - (0,72 \pm 0,14)S + (1,10 \pm 0,10)E + (2,28 \pm 0,14)V \quad R^2 = 0,98, \text{ S.D.} = 0,18, N = 356 \text{ merenja} \quad (14)$$

$$\log K_{OC} = (0,19 \pm 0,10) - (0,23 \pm 0,10)A - (2,33 \pm 0,12)B + (0,72 \pm 0,05)E + (2,12 \pm 0,11)V \quad R^2 = 0,954, \text{ S.D.} = 0,249, F = 585, n = 119 \quad (15)$$

Druga dva pristupa su implementirana u KOCWIN softver koji je deo javno dostupne baze podataka (EPI Suite, v. 4.1, U.S. EPA). Prvi se zasniva na prvom izvodu molekulskih indeksa konektivnosti (MCI), dok drugi koristi oktanol-voda particione koeficijente ( $\log K_{OW}$ ). Obe metode koriste primarni (nekorigovani) model za nepolarna jedinjenja (jednačine 16 i 17), dok je za procenu  $\log K_{OC}$  polarnih jedinjenja potrebno uvesti korekzione faktore (jednačine 18 i 19).

$$\log K_{OC} = 0.5213 \text{ MCI} + 0,60, n = 69, r^2 = 0,967, \text{ S.D.} = 0,247 \quad (16)$$

$$\log K_{OC} = 0.5213 \text{ MCI} + 0,60 + \Sigma P_f N \quad (17)$$

$$\log K_{OC} = 0.8679 \log K_{OW} - 0.0004, n = 68, r^2 = 0.877, \text{ S.D.} = 0.478 \quad (18)$$

$$\log K_{OC} = 0,55313 \log K_{OW} + 0.9251 + \Sigma P_f N \quad (19)$$

gde je  $\Sigma P_f N$  suma proizvoda svih faktora koji se primenjuju za korekciju koeficijenata ( $P_f$ ) pomnoženih brojem ( $N$ ) faktora koji se računaju za strukturu.

#### 4.5. Modelovanje i analiza podataka

Linearno modelovanje (regresija glavnih komponenti (Principal Component Regression – PCR) i regresija metodom najmanjih kvadrata (Partial Least Squares regression - PLS)), kao i hijerarijska klasterijska analiza (Hierarchical Cluster Analysis – HCA) i analiza glavnih komponenta (Principal Component Analysis– PCA) je izvedeno primenom statističkog paketa PLS Toolbox (v. 7.02) za MATLAB (R2011).

Pre PCA, HCA, PCR i PLS podaci su standardizovani. Broj glavnih komponentata u PCA je odabran na osnovu izgleda grafika zavisnost i broja komponentata od varijanse PCA skorova. Za PCR i PLS modele primenjena je dvostruka unakrsna validacija (CV)<sup>122</sup>. Ceo set podataka je podeljen u četiri nezavisna trening i test seta, a svaki trening set je dalje podeljen u pet kalibracionih i validacionih setova. Na taj način se svako jedinjenje koristi kao deo kalibracionog, validacionog, i test seta, ali nikad u isto vreme. Optimalna složenost modela je određena na osnovu performansi modela dobijenih unutrašnjom CV, to jest, broja latentnih varijabli koje daju modele sa najmanjom vrednošću korena srednjeg kvadratne greške kros-validacije ( $RMSE_{CV}$ ).

Jednostavna jednovarijantna i multivarijantna linearna regresija su izvedene korišćenjem programa Microsoft Excel 2010.

Poređenje i rangiranje hromatografskih i kompjuterskih pristupa izvršeno je primenom metode suma razlika (Sum of Ranking Differences - SRD)<sup>137,138</sup>.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ispitana su adsorpciona svojstva cijano-modifikovanog silika-gela i mogućnosti njegove primene kao sorbenta u planarnoj, odnosno tankoslojnoj hromatografiji. Pretpostavka da će ovaj sorbent, zahvaljujući prisustvu različitih površinskih aktivnih centara (cijano-grupa i propil-nizova unetih modifikacijom, kao i nemodifikovanih silanolnih grupa), moći da ostvaruje različite vrste specifičnih interakcija sa odvajanim supstancama proverena je odvajanjem triazinskih herbicida, derivata fenoksikarboksilnih kiselina, različitih derivata fenola, kao i mešovitih ( $\beta$ -diketonato) i ( $\beta$ -ketoiminato) kompleksa prelaznih metala. U cilju rasvetljavanja mehanizama navedenih razdvajanja, u velikom broju slučajeva iste supstance su hromatografisane uporedo na cijano-modifikovanom silika-gelu, koji kao polarne sorpcione centre ima cijano-grupe i silanolne grupe, nemodifikovanom silika-gelu koji ima samo silanolne grupe na svojoj površini, i poliakilonitrilnom sorbentu čiji su specifični sorpcioni centri cijano-grupe. Sva ova ispitivanja su pokazala da je cijano-modifikovani silika-gel umereno polaran sorbent jedinstvenih karakteristika uslovljenih prisustvom i hidrofилnih i hidrofobnih površinskih aktivnih centara. Potvrđeno je da se, zahvaljujući tome, ovaj sorbent može koristiti za razdvajanje različitih klasa supstanci kako u normalno-tako i u reverzno-faznoj hromatografiji.

U ostvarivanje interakcija koje određuju retenciono ponašanje analiziranih supstanci na cijano-modifikovanom silika-gelu pri normalno-faznim uslovima uključene su i cijano- i silanolne grupe. Koje interakcije će biti dominantne zavisi od prirode odvajanih supstanci, ali i od sastava upotrebljene mobilne faze.

Prilikom odvajanja  $\beta$ -diketonato kompleksa, utvrđeno je da oni pokazuju specifično ponašanje na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela pri normalno-faznim uslovima, gde je pretpostavljeno da su odvajanja zasnovana na dva mehanizma: - Primenom manje polarnih rastvarača, dominantne su donorsko-akceptorske interakcije CN-grupa sorbenta i  $\pi$ -elektronskih sistema odvajanih kompleksa. Takvo ponašanje je analogno ponašanju ispitivanih kompleksa na poliakilonitrilnom sorbentu i praktično pokazuje da su cijano-grupe primarni sorpcioni centri u odvajanju navedenih supstanci.

- Korišćenje polarnijih rastvarača rezultovalo je promenom retencionog mehanizma. Povećanje polarnosti rastvarača je prouzrokovalo retenciono ponašanje analogno onom uočenom na tankom sloju nemodifikovanog silika-gela, odnosno ukazalo na dominaciju interakcija ispitivanih kompleksa sa nemodifikovanim silanolnim grupama sorbenta.

Takođe je pokazano da se, zahvaljujući prisustvu nepolarnih propil-grupa unetih modifikacijom, cijano-modifikovani silika-gel može uspešno primeniti kao sorbent u reverzno-faznoj hromatografiji za odvajanje raznih supstanci na osnovu nespecifičnih hidrofobnih interakcija (disperzionih i indukcionih sila) njihovih nepolarnih delova i alkil-grupa sorbenta.

Ispitivanje uticaja sastava mobilne faze od čiste vode do čistog organskog rastvarača (metanola) na hromatografsko ponašanje serije neutralnih Co(III)-kompleksa pokazalo je da se cijano-modifikovani silika-gel može upotrebiti i kao sorbent u planarnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija. Uočeno specifično pojačanje retencije ispitivanih kompleksa sa porastom broja aromatičnih prstenova u molekulu kompleksa (prilikom supstitucija *acac* liganada *bzac* i *dibzac* ligandima) pri NP uslovima objašnjeno je pre svega donorsko-akceptorskim interakcijama između CN-grupa sorbentai  $\pi$ -elektronskih sistema liganada.

U cilju ispitivanja mogućnosti primene cijano-modifikovanog silika-gela za različita hromatografska razdvajanja, u okviru reverzno-faznih uslova ispitana je primenljivost ovog sorbenta za modelovanje zemljište-voda podeonih koeficijenata normiranih na sadržaj organskog ugljenika ( $\log K_{OC}$ ) kao jednog od ključnih parametara koji određuju sudbinu organskih jedinjenja u životnoj sredini.

Modelovanje  $\log K_{OC}$  na osnovu TLC retencionih parametara primenom jednostavnog jednovarijantnog kalibracionog modela, regresije glavnih komponenti i regresije metodom delimičnih-najmanjih kvadrata rezultovalo je statistički dobro uspostavljenim odnosima sa dobrim prediktivnim performansama (greška predikcije ne prelazi vredost od 0,6 log jedinica).

Poređenje TLC modela sa zvanično preporučenim HPLC pristupom, kao i najčešće korišćenim *in silico* pristupom procene, pokazalo je da su najbolji pristupi, koji su rezultirali najboljim procenama  $\log K_{OC}$  vrednosti, TLC metode koje uključuju CN-silika-gel kao stacionarnu i sadržaj metanola 40 i 50%, v/v, kao mobilnu fazu. Kao najbliže prosečnoj aritmetičkoj sredini, ove metode imaju najmanje greške i mogu

zameniti sve ostale, uključujući i zvanično preporučene HPLC metode, kao i *in silico* pristup. Glavne prednosti ovih postupaka u odnosu na HPLC su znatno smanjeni troškovi analize, mogućnost istovremene analize velikog broja uzoraka, kao i značajno manja potrošnja reagenasa i rastvarača, što ih čini prihvatljivim sa stanovišta zelene hemije. Metode su jednostavne za izvođenje i primenljive na male organske molekule koji imaju  $\log K_{OC}$  vrednosti u opsegu od 1 - 6 log jedinica.

Analiza linearnih odnosa solvatacione energije pokazala je da je povećana polarnost CN-modifikovanih slojeva u odnosu na oktadecil-modifikovani silika-gel, u kombinaciji sa smešama voda-metanol, ključna za bolje modelovanje  $\log K_{OC}$  parametara.

**6. LITERATURA**

1. Lawrence H. Keith, Liz U. Gron, and Jenifer L. Young, Green Analytical Methodologies, *Chem. Rev.* 2007, 107, 2695-2708.
2. D. Milojković-Opsenica, Sorbenti u hromatografiji na tankom sloju, *Hemijski pregled*, 41 (2000) 38-43.
3. P. E. Wall, Thin-layer Chromatography, A modern Practical Approach, Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry: Cambridge (UK), 2005.
4. Colin F. Poole, The Essence of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
5. R.S. Shreedhara Murthy, L.J. Crane and C.E. Bronnimann, *J. Chromatogr.*, 542 (1991) 205-220.
6. S. Gocan, Stationary phases in thin-layer chromatography, in: Modern Thin-Layer Chromatography, Nelu Grinberg (Ed.), *Chromatogr. Sci.*, Vol. 52, Dekker, New York, 1990.
7. Jain, R. and Sherma, J. 2006. Planar Chromatography in Clinical Chemistry. Encyclopedia of Analytical Chemistry.
8. P. Salo, Thin-Layer Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection: From Preparative-Layer to Miniaturized Ultra-Thin-Layer Technique, Academic Dissertation, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, 2007.
9. V.D. Krasikov, Contemporary planar chromatography, *Journal of Analytical Chemistry*, 58 (2003) 8, 706-719.
10. D. Milojković-Opsenica, P. Ristivojević, F. Andrić, J. Trifković, Planar Chromatographic Systems in Pattern Recognition and Fingerprint Analysis, *Chromatographia* 76 (2013), 1239–1247.
11. J. Sherma, Basic TLC Tehniques, Materials, and Apparatus, Hendbook of Thin-Layer Chromatography, Chapter 01, 2003.
12. G.E.Morlock, W. Schwack, The Contribution of Planar Chromatography to Food Analysis, *J. Planar Chromatogr.*, 20 (2007) 6, 399–406
13. P.K. Zarzycki, K.M. Kulhanek, R. Smith, M.A. Bartoszuk, H. Lamparczyk, Planar Chromatography Versus Column Chromatography: A Performance Comparison, *LCGC North America*, 23 (2005) 3 286-300.

14. P. Salo, Thin-Layer Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection: From Preparative-Layer to Miniaturized Ultra-Thin-Layer Technique, Academic Dissertation, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, 2007.
15. J. Sherma, Biennial Review of Planar Chromatography: 2009-2011, *J. AOAC Int.* 95, (2012) 992-1009.
16. J. Trifković, Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, Doktorski rad, Hemijski fakultet, Beograd, 2013.
17. S.D. Rogers, J.G. Dorsey, Chromatographic silanol activity test procedures: the quest for a universal test, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 57-65.
18. C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplal, Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Test and their Importance for Evaluating these Supports. Part I, *Chromatographia* 53 (2001) 113-131.
19. V.R. Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography (fourth edition) John Wiley & Sons, 2004.
20. C.F. Poole and S.K. Poole, Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991.
21. H.E. Hauck, M. Mack and W. Jost, Sorbents and precoated layers in thin-layer chromatography, *Chromatogr. Sci.*, 55 (1991) 87-111.
22. S. Gocan, Stationary Phases for Thin-Layer Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, 40 (2002)1-12.
23. Fred Rabel, Joseph Sherma, Stationary Phases for Modern Thin-Layer Chromatography, LCGC North America, 30 (2012) 6, pp 458 4/2
24. J.J.Pesek, M.T. Matyska, Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 952 (2002) 1-11.
25. Sandie Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Wiley, 1992, UK
26. H.E. Hauck, M. Mack and W. Jost in J. Sherma and B. Fried (Eds.), Handbook of Thin-Layer chromatography (Chromatographic Science Series, Vol. 55), Marcel Dekker, NY, 1991

27. W. Zapala, M. Waksmundzka-Hajnos, Retention process in reversed phase TLC systems with polar bonded stationary phases, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 566-574
28. K. Kaczmarek, W. Prus, T. Kowalska, Adsorption/partition model of liquid chromatography for chemically bonded stationary phases of the aliphatic cyano, reversed-phase C8 and reversed-phase C18 types, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 57-64
29. A. Hussain, R.J. Hurtubise, H. F. Silver, Solvent composition effects with a cyano and a silica gel stationary phase in normal-phase liquid chromatography of alkylphenols and naphthols, *J. Chromatogr.*, 252 (1982) 21-32
30. P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821
31. T. Kowalska, K. Kaczmarek and W. Prus, Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography, *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Chapter 02, 2003.
32. J.M. Miller, *Chromatography – Concepts and contrasts*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.
33. M. Waksmundzka-Hajos and A. Petruczynik, Retention behaviour of some phenols and anilines on cyano-, diol-, and silica precoated HPLC plates, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 22(1), 51-75 (1999).
34. W. Jost, H.E. Hauck and W. Fischer, Cyano-modified pre-coated plates — a medium polar modification for high performance thin-layer chromatography, *Chromatographia* 21 (1986) 375-378.
35. A. Pyka and M. Dolowy, Separation of Selected Bile Acid by TLC. VI. Separation on Cyano- and Diol-Modified Silica Layers, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 28, (2005) 1383-1392.
36. H.E. Hauck and W. Jost, Application of Hydrophilic modified silica gels in TLC, *Amer. Lab.*, 17 (1990) 42-48.
37. R. E. Majors, New Chromatography Columns and Accessories at the 2004 Pittcon Conference, Part I, *LCGC*, 17 (4), 200-215 (2004).



38. D.H. Marchand, K.Croes, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VII. Cyanopropyl columns, *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 57-64.
39. Y. Wang, J. Yang, X. Lu, G. Wang Xu, Determination of selectivity of HPLC systems by correspondence factor analysis, *Chinese Chemical Letters*, 18 (2007) 565-568
40. K. Okusa, H. Tanaka, M. Ohira, Development of a new cyano-bonded column for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 143-149.
41. D.S. Seibert, C.F. Poole, Retention properties of a cyanopropylsiloxane-bonded silica-based sorbent for solid-phase extraction, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 226-230
42. J.E. O’Gara, B.A. Alden, C.A. Gendreau, P.C. Iraneta, T.H. Walter, Dependence of cyano bonded phase hydrolytic stability on ligand structure and solution pH, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 245-251.
43. W.T. Cooper and P.L. Smith, Retention mechanisms in cyanopropyl normal bonded phase high-performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr.*, 355 (1986) 57-74.
44. P.L. Smith and W.T. Cooper, Retention and selectivity in amino, cyano and diol normal bonded phase high-performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr.*, 410 (1987) 249-265.
45. J. Li, D. A. Whitman, Characterization and selectivity optimization on diol, amino, and cyano normal phase columns based on linear solvation energy relationships, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 141-154.
46. M.C. Pietrogrande, F. Dondi, G. Blo, P.A. Borea and C. Bigli, Retention Behavior of Benzodiazepines in Normal-Phase HPLC. Silica, Cyano, and Amino Phases Comparison, *J. Liq. Chromatogr.*, 11(6) (1988) 1313-1333.
47. J.H. Park, J.J. Chae, T.H. Nah and M.D. Jang, Characterization of some silica-based reversed-phase liquid chromatographic columns based on linear solvation energy relationships, *J. Chromatogr. A*, 664 (1994) 149-158.
48. C.F. Poole, N.C. Dias, Practitioner’s guide to method development in thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 123-142.

49. K.Croes, A.Steffens, D.H. Marchand, L.R. Snyder, Relevance of  $\pi$ - $\pi$  and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1098 (2005) 123-130.
50. R. Guo, Xinmiao, J. Qing Zhang and A. Kettrup, Prediction of Soil Adsorption Coefficients from Retention Parameters on Three Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns, *Anal. Chem.* 74 (2002) 655-660.
51. Z. Ali and C. F. Poole, Insights into the retention mechanism of neutral organic compounds on polar chemically bonded stationary phases in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1052 (2004) 199-204.
52. C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model III. Polar stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 1110 (2006) 200-213.
53. E.L. Weiser, A.W. Salotto, S.M. Flach and L.R. Snyder, Basis of retention in normal-phase high-performance liquid chromatography with cyano-propyl columns, *J. Chromatogr.*, 303 (1984) 1-12.
54. M. Lübke, J. Quéré, D. Barron, Normal-phase high-performance liquid chromatography of volatile compounds Selectivity and mobile phase effects on polar bonded silica, *J Chromatogr. A*, 690 (1995) 41-54.
55. M. Waksmundzka-Hajnos, A. Petruczynik, A. Hawryl, Comparison of chromatographic properties of cyanopropyl-, diol- and aminopropyl- polar-bonded stationary phases by the retention of model compounds in normal-phase liquid chromatography systems, *J. Chromatogr. A*, 919 (2001) 39-50.
56. J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
57. M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (eds), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Chromatographic Science Series, Vol 99, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008.
58. L. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma (eds), *Thin layer chromatography in Drug Analysis*, Chromatographic Science Series, Vol 106, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2014.

59. J. Sherma, Planar Chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4895-4910.
60. J. Sherma, Biennial review of planar chromatography: 2011-2013, *Cent. Eur. J. Chem.* 12(4) (2014) 427-452.
61. Milojković-Opsenica, H. Majstorović, A.Radoičić, Ž.Tešić, 3-Cyanopropylsiloxane-bonded silica gel: Characteristics and applications in thin-layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.* 28 (2015) 2, 106-114
62. H. Zhong, Z. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic silica columns. V. Study of the electrochromatographic behaviors of polar compounds on monolithic silica having surface bound cyano functionalities, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2023-2030.
63. H. Zhong, Z. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic silica columns. IV. Electrochromatographic characterization of polar bonded monolithic stationary phases having surface-bound cyano functionalities, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2031-2037.
64. P. Oleszczuk, S. Baran, Application of solid-phase extraction to determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge extracts, *J. Hazard. Mater.* 113 (2004) 237-245.
65. M. Gfrerer, E. Lankmayr, Microwave-assisted saponification for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from pumpkin seed oils, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1230-1236.
66. A. Petruczynik, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Michniowski, T. Plech, T. Tuzimski, M. L. Hajnos, M. Gadzikowska, G. Jozwiak, Thin-Layer Chromatography of Alkaloids on Cyanopropyl Bonded Stationary Phases. Part I, *J. Chromatogr. Science* 45 (7), (2007) 447-454.
67. H. Kalasz, A. Hunyadi, and M. Bathori, Novel Results of Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 28 (2005) 2489-2497.
68. H. Xu, S. H. Issaq, T. G. McCloud, and H. J. Issaq, The separation of a penicillium fungal extract by thin layer chromatography and hplc: a comparative study, *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 24(5) (2001) 625-633.

69. M. A. Hawryl, A. Hawryl and E. Soczewinski, Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropyl-bonded polar stationary phase for separation of phenolic compounds from the flowers of *Sambucus nigra* L., *J. Planar Chromatogr.* 15 (2002) 4-10.
70. 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, *J. Planar Chromatogr.* 22 (2009) 249-253.
71. P. Jandera, Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1421-1437.
72. S. Šegan, F. Andrić, A. Radoičić, D. Opsenica, B. Šolaja, M. Zlatović, D. Milojković-Opsenica, Correlation between structure, retention and activity of cholic acid derived *cis-trans* isomeric bis-steroidal tetraoxanes, *J. Sep. Sci.*, 34(19) (2011) 2659-2667.
73. F. Lj. Andrić, J. Đ. Trifković, A. D. Radoičić, S. B. Šegan, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Determination of the soil-water partition coefficient ( $\log K_{OC}$ ) of some mono- and poly-substituted phenols by reversed-phase thin-layer chromatography, *Chemosphere* 81 (2010) 299-305.
74. D. Dabić, M. Natić, Z. Džambaski, R. Marković, D. Milojković-Opsenica, Ž. Tešić, Quantitative structure-retention relationship of new N-substituted 2-alkylidene-4-oxothiazolidines, *J. Sep. Sci.*, 34(18) (2011) 2397-2404.
75. S.B. Šegan, D.M. Opsenica, B.A. Šolaja, D.M. Milojković-Opsenica, Planar Chromatography of Cholic Acid-Derived *cis-trans* Isomeric bis-Steroidal Tetraoxanes, *J. Planar Chromatogr.*, 22 (2009) 3, 175-181.
76. D.M. Milojković-Opsenica, I.S. Veljković, L.B. Pfendt, G.V. Popović and Ž.Lj. Tešić, chromatographic behaviour of some 1,4-benzodiazepines on thin-layer of different sorbents, 2<sup>nd</sup> International Conference of the chemical Societies of the South-Easter Europea countries, Halkidiki, Greece, June 6-9, 2000, Book of abstracts Vol. II, PO604.

77. A. Delle Site, Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 30 (2001) 187–439.
78. K. Fodor-Csorba in: Handbook of Thin-Layer Chromatography, J. Sherma and B. Fried (eds.), Dekker, NY (1996).
79. Perisic-Janjic, Nada U.; Jevric, Lidija R.; Boncic-Caricic, Gordana A.; Jovanovic, Bratislav Z. Study of the lipophilicity and retention behavior of some s-triazine derivatives on aminoplast and cellulose, *J. Planar Chromatogr. -Modern TLC* (2001), 14(4), 277-282.
80. Chmil, V. D. Thin-layer chromatography of s-triazine derivatives, *Zhurnal Analiticheskoi Khimii* (1987), 42(11), 2048-53.
81. Jandera, P. Svoboda, L., Kubat, J., Schvantner, J., Churacek, J. Separation of phenoxyacid herbicides using liquid column chromatography on chemically bonded phases, *J. Chromatogr.*, 292 (1984) 71
82. H. Roseboom, H.A. Herbold and C.J. Berkhoff, Determination of phenoxy carboxylic acid pesticides by gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 249 (1982) 323–331
83. Lidija Jevrić, Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara u hromatografiji na obrnutim fazama novosintetisanih derivata s-triazina DOKTORSKA DISERTACIJA 2009, Univerzitet i Novom Sadu, Prirodo-matematički fakultet, Departman za hemiju
84. P. Dufek, V. Pacakova and E. Tesarova, Separation and behaviour of s-triazine derivatives on a NH<sub>2</sub>-chemically bonded stationary phase by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 191 (1980) 115-120.
85. Gamez, P. and Reedijk, J. (2006), 1,3,5-Triazine-Based Synthons in Supramolecular Chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006: 29–42. doi: 10.1002/ejic.200500672
86. Negussie Megersaa and Jan Åke Jansson, Trace enrichment and sample preparation of alkylthio-s-triazine herbicides in environmental waters using a supported liquid membrane technique in combination with high-performance liquid chromatography, *Analyst*, February 1998, Vol. 123 (225–231)

87. Homer M. LeBaron, Janis E. McFarland and Orvin C. Burnside, *The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*, Elsevier, First edition 2008
88. Nigussie Lemma, *Sample preparation methods for quantitative extraction of triazine and its metabolites in sediment samples of awassa and zaway lakes*, MSc. Graduate project, 2007, ADDIS ABABA UNIVERSITY OFFICE OF THE RESEARCH AND GRADUATE PROGRAMS, DEPARTEMENT OF CHEMISTRY
89. P. Dufek, V.Pacakova, *Comparasion of the high-performance liquid chromatographic behaviour of s-triazine derivates on various stacionary phases*, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 341-349.
90. K. Peter, C. Vollhardt, Neil E. Schore, *Organska hemija*, Hajdigraf, Beograd.
91. B. Tarasiuk, *Syntheses, structures and properties of halogenanilides derivatives of trichlorophenoxyacetic acids*, ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA, LUBLIN – POLONIA, VOL. LXV, 14 SECTIO AA 2010
92. Ž.Lj. Tešić, T.J. Janjić, R.M. Tošić and M.B.Ćelap, *Effect of electronegativity of donor atoms on  $R_F$  values of tris( $\beta$ -diketonato) complexes of cobalt(III), chromium(III) and ruthenium(III) by thin-layer chromatography on silica gel*, *Chromatographia*, 37 (1993) 599-602.
93. Ž.Lj. Tešić, T.J. Janjić and M.B. Ćelap, *Effect of the substituents of  $\beta$ -diketonato ligands on  $R_F$  values of tris(chelate) transition metal complexes obtained by normal- and reversed-phase thin-layer chromatography on unmodified silica gel*, *J. Chromatogr.*, 585 (1991) 359-363.
94. R.M. Baošić and Ž.Lj. Tešić, *The effect of  $\beta$ -ketoiminato ligand substituents of copper(II) and nickel(II) complexes on  $R_F$  values obtained by thin-layer chromatography on silica gel*, *J. Serb. Chem. Soc.*, 60 (10) (1995) 903-908.
95. G. Vučković, N. Juranić and M.B. Ćelap, *New synthesis and thin-layer chromatography of tris-(alkylxanthato)cobalt(III) complexes*, *J. Chromatogr.*, 361 (1986) 217-221.
96. Ž.Lj. Tešić, T.J. Janjić and M.B. Ćelap, *Thin-layer chromatography on silica gel of a homologous series of bis(alkylxanthato)nickel(II) complexes*, *J. Chromatogr.*, 628 (1993) 148-152.

97. Ž.Lj. Tešić, R.M. Baošić and D.M. Milojković-Opsenica, Thin-layer chromatography of mixed tris- $\beta$ -diketonato metal complexes on polyacrylonitrile sorbent, *J. Chromatogr. A*, 847 (1999) 303-307.
98. T.J. Janjić, D.M. Milojković, Ž.LJ. Tešić, and M.B. Čelap, Thin-layer chromatography on polyacrylonitrile. III. Investigation of the separation mechanisms for tris( $\beta$ -diketonato) complexes of transition metals, *J. Planar Chromatogr.* 3 (1990) 495–499.
99. T.J. Janjić, D.M. Milojković, G.N. Vučković and M.B. Čelap, Thin-layer chromatography on polyacrylonitrile. IV. Investigation of the separation mechanisms for tris(alkylxanthato) cobalt(III) complexes, *J. Chromatogr.*, 596 (1992) 91-94
100. R.M. Baošić D.M. Milojković-Opsenica and Ž.Lj. Tešić, The effect of the substituents of  $\beta$ -ketoiminato ligand of copper(II) and nickel(II) complexes on their retention on thin layers of polyacrylonitrile, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, 16 (2003) 412–416.
101. M.M. Natić, R.M. Baošić, D.M. Milojković-Opsenica, Ž.Lj. Tešić, Estimation of the Hydrophobicity of Tris- $\beta$ -diketonato Complexes from Reversed-Phase Thin-Layer Chromatographic Data, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC*, 18 (2005) 344–348.
102. F. Schabron and R.J. Hurtubise, Separation of alkylphenols by normal-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1911.
103. K. Callmer, L-E. Edholm and B.E.F. Smith, Study of retention behaviour of alkylphenols in straight- and reversed-phase liquid chromatography and application to the analysis of complex phenolic mixtures in conjunction with gas chromatography, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 45-62.
104. W. Jost and H.E. Hauck, High-performance thin-layer chromatographic pre-coated plates with amino modification and some applications, *J. Chromatogr.* 261 (1983) 235–244.
105. S.Ilić, M. Natić, D.Dabić, D. Milojković-Opsenica and Ž. Tešić, 2D TLC Separation of Phenols by Use of RP-18 silica plates with aqueous and non-

- aqueous mobile phases, *J. Planar Chromatogr. -Modern TLC*, 24 (2011) 2, 93-98.
106. T.Galaon, A. Medvedovici and V.David, Hydrphobicity Parameter (log  $K_{ow}$ ) estimation for some phenolic copounds of pharmaceutical Interest from retention studies with mobile phase composition in reversed phase liquid chromatography, *Separation Science and Technology*, 43: 147-163, 2008
  107. T. Braumann, G. Weber, L. H. Grimme, Quantitative structure-activity relationships for herbicides. Reversed-phase liquid chromatographic retention parameter, log  $k_w$ , versus liquid-liquid partition coefficient as a model of the hydrophobicity of phenylureas, s-triazines and phenoxy-carbonic acid derivatives, *J. Chromatogr.* 261 (1983), 329-43
  108. L.S. Bark and J.T. Graham, Studies in the relationship between molecular structure and chromatographic behaviour: Part VI. The behaviour of some alkyl etc. phenols chromatographed by reversed-phased thin-layer partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 23 (1966) 417-427.
  109. T. Hanai and J. Hubert, Dependence of the retention of phenols upon van der waals volume,  $\pi$ -energy and hydrogen-bonding effects, *J. Chromatogr.*, 302 (1984) 89.
  110. G. Schüürmann, R. Ebert, R. Kühne, Prediction of the sorption of organic compounds into soil organic matter from molecular structure, *Environ. Sci.Technol.* 40 (22) (2006) 7005–7011.
  111. W. Meylan, P.H. Howard, R.S. Boethling, Molecular topology / fragment contribution method for predicting soil sorption coefficients, *Environ. Sci.Technol.* 26 (1992) 1560–1567.
  112. T.H. Nguyen, K. Goss, P.W. Ball, Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments, *Environ. Sci.Technol.* 39 (2005) 913–924
  113. T. Cserhádi, *Multivariate Methods in Chromatography: A Practical Guide*, Chichester, England, John Wiley & Sons Ltd., 2008, pp. 219–220.
  114. R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography*, Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 1997, pp. 56–57.



115. U. Normder, Analysis of reversed-phase liquid chromatographic separations using the data-reduction methods PCR and PLS, *Anal. Chim. Acta.* 259 (1992) 105–108.
116. W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff, HPLC-screening method to determine the adsorption coefficient in soil-comparison of immobilized humic acid and clay mineral phases for cyanopropyl columns, *Sci. Total Environ.* 162 (1995) 119–125.
117. B. M. Gawlik, A. Kettrup, H. Muntau, Estimation of soil adsorption coefficients of organic compounds by HPLC screening using the second generation of the European reference soil set, *Chemosphere.* 41 (2000) 1337–1347.
118. G. Szabo, J. Gucci, W. Kordel, A. Zsolnay, V. Major, P. Keresztes, Comparison of different HPLC stationary phases for determination of soil-water distribution coefficient, *Koc*, values of organic chemicals in RP-HPLC system, *Chemosphere.* 39 (3) (1999) 431–442.
119. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Estimation of the Adsorption Coefficient (*Koc*) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Test 121, (2001).
120. S. K. Poole, C. F. Poole, Chromatographic models for the sorption of neutral organic compounds by soil from water and air, *J. Chromatogr. A.* 845 (1999) 381–400
121. T. H. Nguyen, K. Goss, P. W. Ball, Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 913–924.
122. K. Heberger, K. Kolar-Hunek, Sum of ranking differences for method discrimination and its validation: comparison of ranks with random numbers, *J. Chemom.* 25 (2011) 151–158.
123. C. West, M. A. Khalikova, E. Lesellier, K. Héberger, Sum of ranking differences to rank stationary phases used in packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1409 (28) (2015) 241–250.

124. F. Andrić, K. Héberger, Chromatographic and computational assessment of lipophilicity using sum of ranking differences and generalized pair-correlation, *J. Chromatogr. A* 1380 (6) (2015) 130–138.
125. F. Andrić, K. Héberger, Towards better understanding of lipophilicity: Assessment of in silico and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 183–191.
126. D. Bajusz, A. Rácz, K. Héberger, Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations, *J. Cheminf.* 7 (1, 8) (2015) 20.
127. A. Rácz, N. Papp, E. Balogh, M. Fodor, K. Héberger, Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods, *Anal. Methods.* 7 (10) (2015) 4216–4224.
128. A. Rácz, D. Bajusz, K. Héberger, Consistency 726 of QSAR models: Correct split of training and test sets, ranking of models and performance parameters, *SAR QSAR Environ. Res.* 26 (7-9) (2015) 683–700.
129. H.C. Tülp, K. Goss, R.P. Schwarzenbach, K. Fenner, Experimental determination of LSER parameters for a set of 76 diverse pesticides and pharmaceuticals, *J. Environ. Sci. Technol.* 42 (6) (2008) 2034–2040.
130. M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements, *J. Chromatogr. A* 1037 (1–2) (2004) 29–47.
131. T. Janjić, G. Vučković, and M.B. Čelap, *J. Serb. Chem. Soc.* 60 (1995) 487–499.
132. Gaica, S.B.; Opsenica, D.M.; Šolaja, B.A.; Tešić, Ž.Lj.; Milojković-Opsenica, D.M., The effect of the structure of mixed tetraoxanes on their chromatographic behavior on different adsorbents, *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC* 17 (2004) 342-349.
133. H.J. Majstorović, Ž.Lj. Tešić, and D.M. Milojković-Opsenica, Interpretation of the mechanisms of chromatographic separation on CN-silica. Part I: TLC of metal complexes, *J. Planar Chromatogr.* 15 (2002) 341–344.

134. T.J. Sabo, S.R. Grgurić-Šipka, S.R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 9 (2002) 1661–1717.
135. T.J. Sabo, S.R. Grgurić-Šipka, Ž.Lj. Tešić, S.R. Trifunović, *J. Serb. Chem. Soc.* 63 (1998) 195–199.
136. T.J. Janjić, D.M. Milojković, Ž.J. Arbutina, Ž.Lj. Tešić, M.B. Čelap, Thin-layer chromatography on polyacrylonitrile: I. Effect of the *cis-trans* configuration of cobalt(III) complexes on their  $R_F$  values, *J. Chromatogr.*, 481 (1989) 465-470
137. John H. Kalivas, K. Héberger, E. Andries, Sum of ranking differences (SRD) to ensemble multivariate calibration model merits for tuning parameter selection and comparing calibration methods, *Anal. Chim. Acta.* 869, (2015), 21–33.
138. K. Heberger, Sum of ranking differences compares methods fairly, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 101–109.
139. Alessandro Delle Site, Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 30, (2001), 187-438
140. Lyman, Warren J, Rosenblatt, David Hirsch and Reehl, William F Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. American Chemical Society, Washington, DC, 1990.
141. Briggs, G. G. Theoretical and Experimental Relationships between Soil Adsorption, Octanol-Water Partition-Coefficients, Water Solubilities, Bioconcentration Factors, and the Parachor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1981), 29, 1050-1059.
142. B. Von Oepen, W. Kördel, W. Klein, G. Schüürmann, Predictive QSPR models for estimating soil sorption coefficients: potential and limitations based on dominating processes, *Sci. Total Environ.* 109/110 (1991) 343–354.
143. J. Jover, R. Bosque, J. Sales, Neural Network Based QSPR Study for Predicting pKa of Phenols in Different Solvents, *QSAR Comb. Sci.* 26(3) (2007) 385–397.
144. R.C. Weast (Ed.), Handbook of Chemistry and Physics. 69th ed., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1988-1989, pp. D-160.

145. E.P. Serjeant, B. Dempsey, *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23, Pergamon Press, Inc., New York, 1979.
146. M. Boyce, E. Spickett, Separation and quantification of preservatives using ion Pair HPLC and CZE, *J. Chem. Educ.* 77 (6) (2000) 740–742.
147. D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics 88th Edition 2007-2008*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2007, pp. 8-47.
148. J. Sangster, Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds, *J. Phys. Chem.* 18 (1989) 1111-1230.
149. D.D. Perrin, The effect of temperature on pK values of organic bases, *Aust. J. Chem.* 17 (1964) 484-488.
150. D.D. Perrin, *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution*. IUPAC Chem Data Set, Butterworth, London, 1965.
151. G. Kortum, W. Vogel, K. Andrussov, *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, International Union of Pure and Applied Chemistry, Butterworth, London, 1961.
152. C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual - World Compendium*, 11th ed., British Crop Protection Council, Surrey, England, 1997.
153. C.D.S. Tomlin, *The e-Pesticide Manual*, 13th Edition Version 3.1, British Crop Protection Council, Surrey, UK, 2004.
154. D. Bhattacharyya, C.E. Hamrin Jr., R.P. Northey, Oxidation of Hazardous Organics in a Two-Phase Fluorocarbon-Water System, *Haz. Waste Haz. Mater.* 3 (1986) 405-429.
155. S. Budavari, *The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Rahway, Merck and Co., Inc., New York, 1989, pp. 1170.
156. S.H. Hilal, L.A. Carreira, S.W. Karickhoff, Estimation of chemical reactivity parameters and physical properties of organic molecules using SPARC, in: P. Politzer, J.S. Murray, *Quantitative Treatments of Solute/Solvent Interactions: Theoretical and Computational Chemistry Vol. 1*, Elsevier, New York, 1994, pp. 291-353.

157. J. Barrett, W. Franklin Smith, I.E. Davidson, An examination of acid-base equilibria of 1,4-benzodiazepines by spectrophotometry, *J. Pharm. Pharmacol.* 25 (1973) 387-393.
158. S.A. Kaplan, K. Alexander, M.L. Jack, C.V. Puglisi, J.A.F. de Silva, T.L. Lee, R.E. Weinfeld, Pharmacokinetic profiles of clonazepam in dog and humans and of flunitrazepam in dog. *J. Pharm. Sci.* 63 (1974) 527-532.
159. D.L. Sorby, E.M. Plein, J.D. Benmaman, Adsorption of phenothiazine derivatives by solid adsorbents, *J. Pharm. Sci.* 58 (1966) 785-794.
160. E. Van der Kleijn, Protein binding and lipophilic nature of ataractics of the meprobamate- and diazepam-group, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 179 (1969) 225-250.
161. E. Souri, A.D. Farahani, R. Ahmadkhaniha, M. Amini, A stability indicating HPLC method for the determination of clobazam and its basic degradation product characterization, *DARU, J. Pharm. Sci.* 22 (2014) 49.
162. G.F. le Pettit, Medazepam pKa determined by spectrophotometric and solubility methods, *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 1094-1095.

## 7. PRILOG

### Cijano-modifikovani silika-gel kao sorbent u planarnoj hromatografiji

Doktorska disertacija

- Tabela P1.**  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih herbicida na PANS-u
- Tabela P2.**  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih herbicida na cijano-modifikovanom silika-gelu
- Tabela P3.**  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih herbicida na silika-gelu
- Tabela P4.** Lista standardnih jedinjenja i jedinjenja sa nepoznatim  $\log K_{OC}$  vrednostima
- Tabela P5.** Retencioni faktori kalibracionog seta jedinjenja i nepoznatih jedinjenja dati kao  $R_M$  i  $\log-k$  vrednosti dobijenih TLC i HPLC eksperimentima
- Tabela P6.** Jednostavni jednovarijantni kalibracioni model baziran na TLC eksperimentima
- Tabela P7.** Hromatografski određene i kompjuterski izračunate  $\log K_{OC}$  vrednosti
- Tabela P8.** LSER regresioni koeficijenti TLC sistema

Tabela P1. hR<sub>F</sub>-vrednosti ispitivanih herbicida na PANS-u

Red. br.	Rastvarač* Herbicid														
		1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
1	Simazin	49	89	94	79	74	97	76	70	0	0	0	0	0	0
2	Propazin	71	92	97	87	86	91	88	82	0	0	0	0	0	0
3	Prometrin	79	68	91	87	84	79	89	83	35	38	29	49	24	36
4	Ametrin	78	92	89	77	72	83	79	89	46	46	39	57	47	40
5	Atrazin	78	92	91	88	84	91	80	90	0	0	0	0	0	0
6	2,4-D	29	84	92	78	35	80	78	89	0	14	0	56	0	0
7	MCPA	46	91	93	91	71	81	80	84	0	25	0	54	0	0
8	2,4-DP	69	94	97	92	86	85	84	90	0	37	0	51	0	0
9	MCPP	87	97	97	95	82	95	86	91	0	52	0	50	0	0

\* Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanje herbicida dat je u Tabelama 3 i 17.

Tabela P2. hR<sub>F</sub>-vrednosti ispitivanih herbicida na cijano-modifikovanom silika-gelu

Red. br.	Rastvarač* Herbicid	1							2						
		1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
1	Simazin	0	75	94	54	53	45	67	74	20	16	31	22	0	0
2	Propazin	18	88	96	67	68	58	71	71	13	10	8	11	0	0
3	Prometrin	47	94	88	69	72	70	72	65	14	11	8	15	9	11
4	Ametrin	51	89	83	66	67	61	70	68	12	17	10	21	12	11
5	Atrazin	26	86	91	60	64	59	74	71	19	9	13	15	0	0
6	2,4-D	19	69	94	54	42	44	65	74	56	8	10	15	15	13
7	MCPA	21	81	96	63	48	50	68	79	51	11	0	15	12	12
8	2,4-DP	39	72	90	57	54	53	71	76	49	11	10	12	10	10
9	MCPD	33	84	96	71	59	56	74	80	47	9	12	11	7	9

\* Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanje herbicida dat je u Tabelama 3 i 17.



Tabela P3. hR<sub>F</sub>-vrednosti ispitivanih herbicida na silika-gelu

Red. br.	Rastvarač* Herbicid	Rastvarač*							Herbicid						
		1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
1	Simazin	0	8	83	38	42	23	50	88	0	0	0	0	0	0
2	Propazin	0	10	89	54	63	42	59	85	0	0	0	0	0	0
3	Prometrin	6	20	88	59	66	48	59	83	21	13	9	19	14	13
4	Ametrin	12	25	84	52	62	42	58	86	30	23	17	31	23	23
5	Atrazin	7	16	89	52	60	38	58	91	45	34	29	43	38	32
6	2,4-D	0	20	70	42	26	31	37	88	96	72	78	88	78	91
7	MCPA	0	16	68	45	35	18	32	92	95	82	78	88	84	97
8	2,4-DP	0	13	77	57	33	19	30	98	92	84	79	91	88	97
9	MCPD	0	13	74	62	42	36	31	98	94	84	76	89	68	97

\* Sastav hromatografskih rastvarača upotrebljenih za odvajanje herbicida dat je u Tabelama 3 i 17.

**Tabela P4.** Lista standardnih jedinjenja praćena listom  $\log K_{OC}$  vrednosti direktno merenih tokom sorpcionih eksperimenata sa zemljištem i preporučena od strane U.S. EPA i lista jedinjenja sa nepoznatim  $\log K_{OC}$  vrednostima; Molarna masa  $M$ ; Abrahamovi solvatohromni parametri ( $A$  – sposobnost formiranja vodoničnih veza proton-donorskog tipa,  $B$  – sposobnost formiranja vodoničnih veza proton akceptorskog tipa,  $S$  – dipolarnost/polarizabilnost,  $E$  – molarna refraktivnost,  $V$  – McGovan-ova molekularna zapremina); Kiselinska konstanta  $pK_a$ ; Stepen jonizacije  $\alpha$  na  $pH = 6$

Red. br.	Jedinjenje	$\log K_{OC}$	Ref	$M$ (g/mol)	Solvatohromni parametri					$pK_a^b$	Ref	$\alpha$ (%) <sup>b</sup> $pH = 6$
					$A$	$B$	$S$	$E$	$V$			
<i>Standardna jedinjenja</i>												
1	Fenol	1,90	[110,139]	94,12	0,60	0,30	0,89	0,81	0,775	9,99	[143]	0,01
2	<b>4-Nitrofenol</b>	2,37	[110]	139,12	0,82	0,26	1,72	1,07	0,949	7,18	[143]	<b>6,20</b>
3	Benzil alkohol	1,10	[111,140]	109,14	0,39	0,56	0,87	0,80	0,916	-	-	-
4	1-Naftilamin	3,51	[110]	143,20	0,20	0,57	1,26	1,67	1,185	3,92 <sup>a</sup>	[144]	99,2 <sup>a</sup>
5	1-Naftol	3,10	[110]	144,18	0,60	0,37	1,05	1,52	1,144	9,34	[145]	0,05
6	2,4-Dihlorofenol	2,81	[110]	163,00	0,53	0,19	0,84	0,96	1,020	7,65	[143]	2,19
7	Antracen	4,31	[110,139]	178,24	0,00	0,28	1,34	2,29	1,454	-	-	-
8	Acetofenon	1,80	[111,140]	120,16	0,00	0,48	1,01	0,82	1,014	-	-	-
9	<b>2,4,6-Trihlorofenol</b>	3,03	[110,139]	197,45	0,42	0,15	0,94	1,07	1,142	6,42	[143]	<b>27,55</b>
10	Etil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	2,21	[110]	166,19	0,69	0,45	1,35	0,86	1,272	8,50	[146]	0,32
11	<i>p</i> -Anizidin	1,93	[112,141]	123,17	0,16	0,66	1,26	1,05	1,016	5,36 <sup>a</sup>	[147]	81,36
12	1,2,3-Benzotriazol	1,69	[110]	119,14	0,62	0,48	1,70	1,47	0,864	8,37	[145]	0,42
13	Difenilamin	2,78	[110]	169,24	0,08	0,51	1,08	1,59	1,424	0,78 <sup>a</sup>	[148]	>99,9 <sup>a</sup>
14	2,2'-Dipiridin	1,60	[110]	156,20	0,00	0,81	1,33	1,38	1,242	4,33 <sup>a</sup>	[149]	>97,91 <sup>a</sup>
15	4-Bromoanilin	1,96	[110]	172,03	0,31	0,30	1,19	1,19	0,991	3,86 <sup>a</sup>	[150]	>99,2 <sup>a</sup>
16	Benzofenon	2,63	[110]	182,23	0,00	0,50	1,50	1,45	1,481	-	-	-
17	<b>4-Aminobenzojeva kiselina</b>	1,70	[142]	137,15	0,94	0,69	1,61	1,08	1,032	2,38	[151]	<b>99,98</b>
18	Piren	4,90	[110,139]	202,26	0,00	0,25	1,52	2,60	1,585	-	-	-
19	Benzo[ <i>a</i> ]piren	5,95	[111]	252,32	0,00	0,31	1,84	3,32	1,954	-	-	-
20	Fluoren	3,70	[110,139]	166,23	0,00	0,25	1,06	1,59	1,357	-	-	-
21	Acenaften	3,59	[110,139]	154,22	0,00	0,26	1,14	1,75	1,259	-	-	-
22	Naftalen	2,96	[110,139]	128,18	0,00	0,20	0,92	1,34	1,085	-	-	-
23	Fenantren	4,35	[110,139]	178,24	0,00	0,29	1,29	2,06	1,454	-	-	-

Red. br.	Jedinjenje	logK <sub>OC</sub>	Ref	M (g/mol)	Solvatohromni parametri					pK <sub>a</sub> <sup>b</sup>	Ref	α (%) <sup>b</sup> pH = 6
					A	B	S	E	V			
24	Dibenz[ <i>a,h</i> ]antracen	6,22	[139]	278,36	0,00	0,35	1,99	3,43	2,192	-	-	-
25	Benz[ <i>a</i> ]antracen	5,30	[139]	228,30	0,00	0,29	1,66	2,71	1,823	-	-	-
26	Simazin	2,10	[139]	201,69	0,33	0,95	1,20	1,55	1,479	1,62 <sup>a</sup>	[152]	>99,9 <sup>a</sup>
27	Propazin	2,40	[139]	229,75	0,30	0,97	1,14	1,47	1,761	1,85 <sup>a</sup>	[152]	>99,9 <sup>a</sup>
28	Ametrin	2,59	[139]	227,38	0,26	1,07	1,27	1,50	1,802	4,10 <sup>a</sup>	[153]	>98,8 <sup>a</sup>
29	Prometrin	2,85	[139]	241,41	0,26	1,10	1,26	1,51	1,940	4,05 <sup>a</sup>	[153]	>98,9 <sup>a</sup>
<i>Jedinjenja sa nepoznatim logK<sub>OC</sub> vrednostima</i>												
30	3-Nitrofenol	-		139,12	0,79	0,23	1,57	1,05	0,949	8,36	[143]	0,43
31	2-Naftol	-		144,18	0,61	0,40	1,08	1,52	1,144	9,67	[154]	0,02
32	4-Hidroksibenzaldehid	-		122,13	0,85	0,37	1,54	1,01	0,932	7,61	[145]	2,40
33	2-Aminofenol	-		109,14	0,60	0,66	1,10	1,11	0,875	9,44 (-OH)	[143]	0,00
34	4- <i>t</i> -Butilfenol	-		150,24	0,56	0,41	0,89	0,81	1,339	10,31	[143]	0,00
35	2,6-Dimetilfenol	-		122,18	0,39	0,39	0,79	0,86	1,057	10,59	[143]	0,00
36	4-Metoksifenol	-		124,15	0,57	0,48	1,17	0,90	0,975	10,27	[143]	0,01
37	Metil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	-		152,16	0,69	0,45	1,37	0,90	1,131	8,47	[146]	0,34
38	2-Nitrobenzaldehyd	-		151,13	0,00	0,38	1,59	1,12	1,047	-	-	-
39	3-Nitrobenzaldehyd	-		151,13	0,00	0,48	1,49	1,10	1,047	-	-	-
40	Ftalimid	-		147,14	0,39	0,44	1,97	1,18	1,021	8,3	[155]	0,50
41	Oksazepam	-		286,73	0,45	1,60	1,10	2,35	1,992	10,9 (-OH)	[156]	0,00
42	Lorazepam	-		321,18	0,45	1,63	1,28	2,51	2,114	11,5 (-OH)	[157]	0,00
43	Klonazepam	-		315,73	0,33	1,50	1,75	2,46	2,107	10,5 (-OH)	[158]	0,00
44	Bromazepam	-		316,17	0,33	1,62	1,38	2,31	1,940	11,0 (-OH)	[159]	0,00
45	Diazepam	-		284,76	0,00	1,25	1,57	2,08	2,074	3,40 <sup>a</sup>	[160]	99,75 <sup>a</sup>
46	Nitrazepam	-		281,29	0,47	1,10	2,17	2,21	1,985	10,8	[157]	0,00
47	Hlordiazepoksid	-		299,78	0,13	0,94	1,65	1,95	2,174	4,80 <sup>a</sup>	[160]	94,06 <sup>a</sup>
48	Klobazam	-		300,76	0,00	1,47	2,49	2,29	2,133	6,65 <sup>a</sup>	[161]	18,30 <sup>a</sup>
49	Medazepam	-		270,78	0,00	0,67	1,40	1,92	2,058	6,20 <sup>a</sup>	[162]	38,69 <sup>a</sup>
50	Hrizen	-		228,30	0,00	0,29	1,66	2,71	1,823	-	-	-

<sup>a</sup>Stepen disocijacije se odnosi na pozitivno naelektrisane (protonovane) forme; <sup>b</sup>Jedinjenja obeležena podebljanim slovima su prisutna kao negativno naelektrisane forme (joni) pri proučavanju hromatografskim uslovima

**Tabela P5.** Retencioni faktori kalibracionog seta jedinjenja i nepoznatih jedinjenja dati kao  $R_M$  i  $\log k$  vrednosti dobijenih TLC i HPLC eksperimentima

Jed. br.	HPLC $\log k$	TLC																			
		RP18 MeOH					RP18 ACN					CN MeOH					CN ACN				
		40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	40%	45%	50%	55%	60%	
1	-0,040	0,580	0,267	0,057	-0,175	-0,367	0,475	0,261	-0,276	-0,690	-0,738	0,010	-0,285	-0,409	-0,479	-0,076	-0,192	-0,318	-0,460	-0,558	
2	-0,064	0,706	0,395	0,184	-0,059	-0,267	0,513	0,232	-0,187	-0,632	-0,738	0,337	0,005	-0,181	-0,302	0,044	-0,042	-0,220	-0,344	-0,460	
3	-0,265	0,629	0,329	0,064	-0,161	-0,324	0,347	0,109	-0,295	-0,632	-0,660	-0,151	-0,402	-0,494	-0,592	-0,180	-0,233	-0,369	-0,486	-0,586	
4	0,487	1,252	0,868	0,533	0,199	-0,064	0,916	0,617	0,204	-0,131	-0,285	0,564	0,179	0,034	-0,130	0,268	0,233	0,057	-0,114	-0,202	
5	0,443	1,444	1,007	0,589	0,240	-0,040	0,916	0,591	0,152	-0,235	-0,389	0,623	0,192	-0,034	-0,183	0,220	0,199	-0,038	-0,172	-0,291	
6	0,248	1,358	1,183	0,710	0,323	0,017	0,876	0,644	0,169	-0,196	-0,345	0,536	0,146	-0,097	-0,285	0,325	0,172	-0,064	-0,192	-0,313	
7	0,664	1,688	1,721	1,612	1,092	0,641	1,555	1,466	0,973	0,602	0,322	1,284	0,822	0,490	0,143	0,654	0,548	0,396	0,239	-0,019	
8	0,187	0,979	0,725	0,363	0,088	-0,150	0,668	0,457	0,107	-0,238	-0,361	0,125	-0,105	-0,299	-0,418	0,108	0,003	-0,180	-0,337	-0,436	
9	0,382	1,521	1,130	0,777	0,458	0,209	0,985	0,703	0,384	0,062	-0,137	0,649	0,252	0,009	-0,233	0,440	0,333	0,092	-0,076	-0,306	
10	0,219	1,127	0,809	0,388	0,088	-0,174	0,596	0,314	-0,043	-0,457	-0,606	0,187	-0,099	-0,327	-0,467	0,025	-0,003	-0,213	-0,359	-0,521	
11	-0,431	0,575	0,348	0,113	-0,161	-0,324	0,418	0,239	0,020	-0,398	-0,490	0,406	0,265	0,145	0,016	0,318	0,219	0,097	-0,088	-0,205	
12	-0,390	0,502	0,239	-0,009	-0,244	-0,446	0,194	-0,017	-0,368	-0,845	-1,038	-0,138	-0,339	-0,481	-0,518	-0,207	-0,261	-0,362	-0,529	-0,558	
13	0,317	1,521	1,227	0,929	0,538	0,199	1,474	1,098	0,640	0,183	-0,053	0,987	0,543	0,161	0,000	0,673	0,645	0,303	0,120	-0,142	
14	0,366	1,179	0,823	0,444	0,182	-0,034	0,679	0,526	0,287	0,016	-0,027	0,051	-0,153	-0,338	-0,402	0,083	0,035	-0,095	-0,185	-0,306	
15	0,228	1,127	0,789	0,528	0,138	-0,115	0,805	0,555	0,215	-0,183	-0,341	0,382	0,077	-0,148	-0,216	0,193	0,126	-0,019	-0,133	-0,320	
16	0,624	1,730	1,310	0,692	0,501	0,177	1,344	1,007	0,597	0,163	-0,060	0,665	0,208	-0,081	-0,213	0,053	0,032	-0,100	-0,275	-0,438	
17	-0,341	-0,309	-0,419	-0,579	-0,586	-0,763	-0,251	-0,329	-0,634	-1,028	-1,071	-0,245	-0,462	-0,570	-0,597	0,199	0,086	-0,198	-0,331	-0,502	
18	0,787	2,035	1,721	1,693	1,225	0,790	1,736	1,371	1,129	0,741	0,455	1,549	0,872	0,490	0,243	0,910	0,815	0,499	0,294	0,058	
19	0,909	2,035	2,026	1,693	2,024	1,241	2,041	1,522	1,398	1,028	0,764	1,648	1,245	0,807	0,446	1,048	0,956	0,625	0,452	0,135	
20	0,815	1,730	1,541	1,168	0,958	0,562	1,555	1,273	0,861	0,461	0,185	1,206	0,580	0,250	0,035	0,651	0,604	0,241	0,146	-0,077	
21	0,716	2,035	2,026	1,113	0,787	0,387	1,736	1,178	0,823	0,368	0,140	1,126	0,516	0,224	0,006	0,625	0,479	0,213	0,127	-0,116	
22	0,514	2,035	2,026	1,040	0,611	0,309	1,242	1,074	0,668	0,249	0,020	1,086	0,468	0,207	-0,009	0,558	0,462	0,197	0,106	-0,126	

Tabela P5. Nastavak

Jed. br.	HPLC logk	TLC																			
		RP18 MeOH					RP18 ACN					CN MeOH					CN ACN				
		40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	40%	45%	50%	55%	60%	
23	1,026	2,035	2,026	1,512	1,036	0,635	1,736	1,350	0,983	0,546	0,464	1,319	0,733	0,356	0,082	0,767	0,614	0,265	0,205	-0,064	
24	1,198	2,035	2,026	1,524	1,383	0,940	2,041	1,522	1,297	1,091	0,826	1,601	1,253	0,768	0,417	1,053	0,922	0,567	0,436	0,168	
25	0,967	2,035	2,026	1,693	1,457	1,041	2,041	1,702	1,297	0,897	0,527	1,493	1,201	0,670	0,327	0,998	0,829	0,448	0,359	0,142	
26	0,084	1,421	1,007	0,518	0,171	-0,067	0,742	0,427	0,124	-0,147	-0,296	0,214	-0,086	-0,254	-0,418	0,089	-0,093	-0,173	-0,280	-0,357	
27	0,277	2,035	1,412	0,868	0,429	0,129	1,145	0,788	0,380	0,062	-0,100	0,454	0,027	-0,135	-0,387	0,543	0,393	-0,013	-0,063	-0,236	
28	0,380	1,733	1,419	1,033	0,473	0,208	1,029	0,585	0,375	0,094	-0,085	0,406	0,101	-0,166	-0,383	0,169	0,140	0,051	-0,053	-0,110	
29	0,461	1,733	1,548	1,175	0,638	0,307	1,341	0,746	0,543	0,190	0,034	0,538	0,177	-0,127	-0,337	0,224	0,172	0,076	0,003	-0,078	
30	0,038	0,830	0,540	0,290	-0,113	-0,237	0,612	0,049	-0,190	-0,490	-0,768	0,240	-0,027	-0,278	-0,427	-0,122	-0,172	-0,340	-0,403	-0,492	
31	0,426	1,424	0,950	0,593	0,120	-0,081	0,880	0,243	0,043	-0,285	-0,529	0,430	0,101	-0,176	-0,341	-0,036	-0,033	-0,200	-0,294	-0,373	
32	-0,134	0,476	0,146	-0,027	-0,415	-0,455	0,288	-0,179	-0,439	-0,834	-1,037	-0,073	-0,330	-0,501	-0,568	-0,278	-0,339	-0,494	-0,572	-0,625	
33	-0,147	0,255	0,024	-0,119	-0,456	-0,546	0,243	-0,141	-0,391	-0,654	-0,965	0,063	-0,085	-0,223	-0,296	-0,020	-0,096	-0,141	-0,253	-0,377	
34	0,383	1,733	1,356	0,850	0,349	0,087	1,061	0,489	0,269	-0,104	-0,306	0,402	0,024	-0,292	-0,490	0,527	0,230	-0,004	-0,208	-0,104	
35	0,117	1,083	0,811	0,566	0,113	-0,078	0,851	0,352	0,154	-0,197	-0,430	0,215	-0,043	-0,317	-0,439	0,341	0,162	-0,029	-0,157	-0,291	
36	-0,123	0,555	0,203	0,068	-0,364	-0,425	0,364	-0,061	-0,287	-0,593	-0,957	-0,066	-0,294	-0,406	-0,503	-0,089	-0,252	-0,319	-0,412	-0,605	
37	0,214	0,913	0,526	0,258	-0,190	-0,297	0,467	-0,012	-0,200	-0,533	-0,811	0,040	-0,224	-0,467	-0,512	-0,102	-0,238	-0,336	-0,439	-0,595	
38	0,098	1,051	0,453	0,201	-0,196	-0,320	0,726	0,250	0,082	-0,244	-0,521	0,095	-0,111	-0,357	-0,387	0,115	-0,070	-0,147	-0,256	-0,312	
39	0,064	0,874	0,540	0,290	-0,113	-0,250	0,709	0,220	0,069	-0,244	-0,546	0,185	-0,037	-0,285	-0,348	0,102	-0,089	-0,157	-0,277	-0,326	
40	-0,006	0,633	0,332	0,104	-0,301	-0,373	0,320	-0,104	-0,245	-0,579	-0,831	-0,047	-0,238	-0,475	-0,578	-0,135	-0,350	-0,366	-0,483	-0,576	
41	0,470	1,553	1,164	0,690	0,196	-0,054	0,680	0,157	-0,040	-0,345	-0,564	0,243	-0,046	-0,331	-0,477	0,062	-0,238	-0,272	-0,384	-0,549	
42	0,590	1,553	1,235	0,665	0,173	-0,124	0,709	0,185	-0,027	-0,320	-0,573	0,303	-0,027	-0,313	-0,473	0,115	-0,185	-0,224	-0,347	-0,513	
43	0,445	1,553	1,056	0,593	0,097	-0,109	0,802	0,263	0,037	-0,264	-0,582	0,480	0,231	-0,130	-0,311	0,246	-0,083	-0,112	-0,243	-0,392	
44	0,362	1,424	0,959	0,562	0,081	-0,109	0,592	0,160	0,037	-0,214	-0,333	0,112	-0,147	-0,387	-0,469	0,030	-0,238	-0,258	-0,333	-0,496	
45	0,721	1,733	1,318	1,013	0,553	0,260	1,258	0,729	0,502	0,190	0,037	0,534	0,245	-0,118	-0,296	0,388	0,036	0,022	-0,138	-0,229	
46	0,405	1,424	1,046	0,640	0,120	-0,109	0,795	0,243	0,005	-0,299	-0,546	0,476	0,217	-0,095	-0,264	0,217	-0,127	-0,131	-0,305	-0,377	

**Tabela P 5.** Nastavak

Jed. br.	HPLC logk	TLC																			
		RP18 MeOH					RP18 ACN					CN MeOH					CNACN				
		40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	80%	40%	50%	60%	70%	40%	45%	50%	55%	60%	
47	0,522	1,553	1,101	0,690	0,113	-0,094	0,775	0,220	-0,018	-0,299	-0,555	0,476	0,197	-0,095	-0,275	0,204	-0,039	-0,141	-0,298	-0,355	
48	0,627	1,733	1,266	0,717	0,183	-0,048	1,019	0,430	0,183	-0,107	-0,322	0,480	0,221	-0,102	-0,293	0,303	-0,020	-0,051	-0,236	-0,291	
49	1,076	2,068	2,038	2,033	1,314	0,847	2,037	1,488	1,417	0,951	0,727	1,719	1,136	0,795	0,440	1,135	0,760	0,490	0,316	0,144	
50	0,742	2,068	2,038	2,033	1,724	1,204	2,037	1,570	1,316	0,842	0,610	2,024	1,547	0,697	0,232	1,305	0,931	0,595	0,443	0,236	

**Tabela P6.** Jednostavni jednovarijantni kalibracioni model (metod najmanjeg kvadrata) baziran na individualnim TLC eksperimentima;  
Modeli su dati u formi  $\log K_{OC} = a + bR_M$ ; statistički zadovoljavajući modeli su označeni podebljanim slovima.

Hromatografski sistem	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>RMSE</i> <sub>Cal</sub>	<i>RMSE</i> <sub>PRED</sub>	<i>R</i> <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	<i>R</i> <sup>2</sup> <sub>Pred</sub>	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
RP-18 MeOH_40	0,74±0,52	1,61±0,34	0,916	0,974	0,5163	0,4538	29	28,81	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 MeOH_50	1,12±0,36	1,62±0,27	0,795	0,864	0,6354	0,5699	29	47,06	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 MeOH_60	1,47±0,24	1,97±0,25	0,659	0,718	0,7494	0,7033	29	80,74	<1·10 <sup>-5</sup>
<b>RP-18 MeOH_70</b>	<b>2,00±0,14</b>	<b>2,11±0,19</b>	<b>0,500</b>	<b>0,527</b>	<b>0,8557</b>	<b>0,8397</b>	<b>29</b>	<b>160,17</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
<b>RP-18 MeOH_80</b>	<b>2,57±0,12</b>	<b>2,60±0,25</b>	<b>0,516</b>	<b>0,557</b>	<b>0,8465</b>	<b>0,8210</b>	<b>29</b>	<b>148,90</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
RP-18 ACN_40	0,87±0,29	2,00±0,24	0,629	0,710	0,7721	0,7094	29	91,45	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 ACN_50	1,28±0,25	2,26±0,28	0,642	0,687	0,7625	0,7282	29	86,66	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 ACN_60	2,08±0,16	2,24±0,25	0,589	0,637	0,8001	0,7664	29	108,07	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 ACN_70	2,92±0,13	2,19±0,25	0,597	0,641	0,7948	0,7635	29	104,61	<1·10 <sup>-5</sup>
RP-18 ACN_80	3,33±0,15	2,40±0,30	0,642	0,680	0,7624	0,7333	29	86,64	<1·10 <sup>-5</sup>
<b>CN-MeOH_40</b>	<b>1,55±0,16</b>	<b>2,21±0,19</b>	<b>0,471</b>	<b>0,506</b>	<b>0,8722</b>	<b>0,8522</b>	<b>29</b>	<b>184,31</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
<b>CN-MeOH_50</b>	<b>2,27±0,10</b>	<b>2,67±0,19</b>	<b>0,403</b>	<b>0,441</b>	<b>0,9062</b>	<b>0,8878</b>	<b>29</b>	<b>260,93</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
<b>CN-MeOH_60</b>	<b>2,94±0,10</b>	<b>3,36±0,26</b>	<b>0,439</b>	<b>0,474</b>	<b>0,8892</b>	<b>0,8706</b>	<b>29</b>	<b>216,65</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
<b>CN-MeOH_70</b>	<b>3,69±0,13</b>	<b>4,13±0,40</b>	<b>0,531</b>	<b>0,556</b>	<b>0,8373</b>	<b>0,8220</b>	<b>29</b>	<b>138,92</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
CN-ACN_40	1,75±0,18	3,33±0,35	0,568	0,614	0,8142	0,7831	29	118,34	<1·10 <sup>-5</sup>
CN-ACN_45	2,00±0,16	3,50±0,36	0,557	0,598	0,8214	0,7938	29	124,17	<1·10 <sup>-5</sup>
<b>CN-ACN_50</b>	<b>2,72±0,12</b>	<b>4,43±0,44</b>	<b>0,537</b>	<b>0,568</b>	<b>0,8340</b>	<b>0,8140</b>	<b>29</b>	<b>135,68</b>	<b>&lt;1·10<sup>-5</sup></b>
CN-ACN_55	3,29±0,13	4,39±0,46	0,562	0,600	0,8182	0,7926	29	121,53	<1·10 <sup>-5</sup>
CN-ACN_60	4,26±0,20	5,37±0,63	0,615	0,643	0,7819	0,7618	29	96,81	<1·10 <sup>-5</sup>

Tabela P7. Hromatografski određene i kompjuterski izračunate logK<sub>OC</sub> vrednosti

Br.	Jedinjenje	TLC									HPLC	LSER		EPI Suite	
		PCR	PLS	RP18/ MeOH 70% v/v	RP18/ MeOH 80% v/v	CN/ MeOH 40% v/v	CN/ MeOH 50% v/v	CN/ MeOH 6 % v/v	CN/ MeOH 70% v/v	CN/ ACN 50% v/v		Poole	Nguyen	MCI	KOW
<i>Standardna jedinjenja</i>															
1	Fenol	1,41	1,47	1,63	1,62	1,57	1,50	1,57	1,71	1,31	1,49	1,65	1,58	2,27	1,90
2	4-Nitrofenol	1,94	2,07	1,88	1,88	2,30	2,28	2,33	2,44	1,75	1,40	1,85	2,18	2,46	2,37
3	BenzilAlkohol	1,17	1,20	1,66	1,73	1,22	1,19	1,28	1,24	1,08	0,66	1,44	1,32	1,33	1,12
4	1-Naftilamin	2,83	2,83	2,42	2,41	2,80	2,74	3,06	3,15	2,98	3,41	2,67	2,53	3,40	1,95
5	1-Naftol	2,63	2,64	2,51	2,47	2,93	2,78	2,83	2,94	2,55	3,25	3,02	2,71	3,31	2,67
6	2,4-Dihlorofenol	2,56	2,56	2,68	2,62	2,74	2,66	2,61	2,51	2,44	2,54	2,62	2,48	2,69	2,78
7	Antraceni	4,38	4,42	4,31	4,24	4,39	4,46	4,59	4,28	4,48	4,06	4,46	4,27	4,21	3,86
8	Acetofenon	1,97	1,96	2,19	2,18	1,83	1,99	1,94	1,96	1,92	2,31	1,67	1,81	1,71	1,99
9	2,4,6-Trihlorofenol	2,97	2,96	2,97	3,12	2,99	2,94	2,97	2,73	3,13	3,02	3,01	2,94	3,25	3,28
10	Etil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	1,77	1,79	2,19	2,12	1,97	2,00	1,84	1,76	1,78	2,43	2,23	2,30	2,20	2,39
11	<i>p</i> -Anizidin	2,87	2,96	1,66	1,73	2,45	2,97	3,43	3,76	3,15	0,06	1,42	1,52	1,65	1,48
12	1,2,3-Benzotriazol	1,13	1,21	1,49	1,41	1,25	1,36	1,32	1,55	1,12	0,21	1,65	1,82	1,72	1,79
13	Difenilamin	3,80	3,76	3,14	3,09	3,73	3,72	3,48	3,69	4,07	2,79	3,35	3,14	2,92	2,82
14	2,2'-Dipiridin	2,16	2,06	2,39	2,49	1,67	1,86	1,80	2,03	2,30	2,97	1,93	1,93	3,09	2,11
15	4-Bromoanilin	2,50	2,49	2,29	2,27	2,40	2,47	2,44	2,80	2,64	2,46	2,30	2,38	2,05	2,15
16	Benzofenon	2,51	2,50	3,06	3,04	3,02	2,82	2,67	2,81	2,28	3,91	3,04	3,21	3,06	2,88
17	4-Aminobenzojeva kiselina	1,40	1,46	0,77	0,59	1,01	1,03	1,02	1,22	1,84	0,39	1,29	1,33	0,90	0,59
18	Piren	4,81	4,83	4,59	4,63	4,97	4,59	4,59	4,70	4,93	4,51	5,02	4,84	4,74	4,24
19	Benzo[ <i>a</i> ]piren	5,57	5,73	6,28	5,81	5,19	5,59	5,66	5,54	5,50	4,95	6,31	6,00	5,77	5,32
20	Fluoren	4,00	4,00	4,02	4,04	4,22	3,81	3,78	3,83	3,79	4,61	3,72	3,63	3,96	3,63
21	Acenaften	3,77	3,69	3,66	3,58	4,04	3,64	3,69	3,72	3,67	4,25	3,60	3,51	3,70	3,40
22	Naftalen	3,60	3,51	3,29	3,38	3,95	3,52	3,64	3,65	3,60	3,51	3,03	2,99	3,19	2,86
23	Fenantren	4,23	4,20	4,19	4,23	4,47	4,22	4,14	4,03	3,90	5,38	4,21	4,08	4,22	3,87
24	Dibenz[ <i>a,h</i> ]antraceni	5,42	5,47	4,92	5,02	5,09	5,61	5,53	5,41	5,24	6,01	6,79	6,49	6,28	5,68
25	Benz[ <i>a</i> ]antraceni	5,16	5,23	5,08	5,29	4,85	5,47	5,19	5,04	4,71	5,16	5,51	5,33	5,25	5,00



Tabela P7. nastavak

Br.	Jedinjenje	TLC									HPLC	LSER		EPI Suite	
		PCR	PLS	RP18/ MeOH 70% v/v	RP18/ MeOH 80% v/v	CN/ MeOH 40% v/v	CN/ MeOH 50% v/v	CN/ MeOH 6 % v/v	CN/ MeOH 70% v/v	CN/ ACN 50% v/v		Poole	Nguyen	MCI	KOW
26	Simazin	2,01	1,95	2,36	2,40	2,03	2,04	2,09	1,96	1,95	1,94	2,52	2,15	2,17	2,18
27	Propazin	2,78	2,61	2,91	2,91	2,56	2,34	2,49	2,09	2,67	2,64	3,07	2,65	2,54	2,34
28	Ametrin	2,65	2,53	3,00	3,12	2,45	2,54	2,38	2,11	2,95	3,02	2,90	2,54	2,63	2,36
29	Prometrin	2,89	2,77	3,35	3,37	2,74	2,74	2,51	2,30	3,06	3,31	3,18	2,77	2,82	3,51
<i>Jedinjenja sa nepoznatim logK<sub>OC</sub> vrednostima</i>															
30	3-Nitrofenol	2,33	2,43	1,76	1,96	2,08	2,19	2,01	1,93	1,22	1,77	1,99	2,24	2,46	2,42
31	2-Naftol	2,81	2,82	2,26	2,36	2,50	2,54	2,35	2,28	1,84	3,19	2,94	2,64	3,30	2,59
32	4-Hidroksibenzaldehid	1,58	1,69	1,13	1,39	1,39	1,38	1,26	1,34	0,53	1,14	1,66	1,83	1,15	1,61
33	2-Aminofenol	2,56	2,66	1,04	1,15	1,69	2,04	2,19	2,47	2,10	1,10	1,35	1,17	1,96	1,41
34	4- <i>t</i> -Butilfenol	3,30	3,13	2,74	2,80	2,44	2,33	1,96	1,66	2,71	3,03	2,71	2,53	3,11	2,92
35	2,6-Dimetilfenol	3,09	3,00	2,24	2,37	2,03	2,15	1,88	1,88	2,60	2,06	2,21	2,05	2,70	2,40
36	4-Metoksifenol	1,99	2,04	1,23	1,47	1,41	1,48	1,57	1,61	1,31	1,18	1,65	1,65	2,08	2,02
37	Metil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	2,01	2,03	1,60	1,80	1,64	1,67	1,37	1,57	1,23	2,41	1,94	2,03	1,94	2,11
38	2-Nitrobenzaldehyd	2,69	2,61	1,59	1,74	1,76	1,97	1,74	2,09	2,07	1,99	1,86	2,33	1,24	1,88
39	3-Nitrobenzaldehyd	2,77	2,75	1,76	1,92	1,96	2,17	1,98	2,25	2,03	1,86	1,71	2,08	1,24	1,73
40	Ftalimid	1,85	1,90	1,37	1,60	1,45	1,63	1,34	1,30	1,10	1,61	1,54	2,09	0,15	1,10
41	Oksazepam	2,36	2,35	2,42	2,43	2,09	2,14	1,83	1,72	1,52	3,35	3,37	2,27	2,76	1,73
42	Lorazepam	2,48	2,43	2,37	2,25	2,22	2,19	1,89	1,74	1,73	3,79	3,64	2,58	2,98	1,81
43	Klonazepam	2,99	2,98	2,21	2,29	2,61	2,88	2,50	2,41	2,23	3,26	3,47	2,86	4,06	2,45

Tabela P7. nastavak

Br.	Jedinjenje	TLC									HPLC	LSER		EPI Suite	
		PCR	PLS	RP18/ MeOH 70% v/v	RP18/ MeOH 80% v/v	CN/ MeOH 40% v/v	CN/ MeOH 50% v/v	CN/ MeOH 60% v/v	CN/ MeOH 70% v/v	CN/ ACN 50% v/v		Poole	Nguyen	MCI	KOW
44	Bromazepam	2,37	2,30	2,17	2,29	1,80	1,87	1,64	1,75	1,58	2,95	2,95	2,12	3,56	2,21
45	Diazepam	3,57	3,48	3,17	3,25	2,73	2,92	2,55	2,47	2,82	4,26	3,55	3,17	3,88	2,44
46	Nitrazepam	2,98	3,01	2,26	2,29	2,61	2,85	2,62	2,60	2,14	3,11	3,43	3,32	3,85	2,36
47	Hlordiazepoksid	2,99	3,00	2,24	2,33	2,61	2,79	2,62	2,56	2,10	3,54	4,21	3,98	5,48	2,23
48	Klobazam	3,20	3,13	2,39	2,45	2,61	2,85	2,60	2,48	2,50	3,92	2,82	2,93	2,54	2,03
49	Medazepam	6,33	6,37	4,78	4,78	5,35	5,30	5,62	5,51	4,89	5,56	4,61	4,37	4,48	3,30
50	Hrizen	6,66	6,79	5,64	5,71	6,02	6,39	5,29	4,65	5,36	4,34	5,51	5,33	5,26	5,04

**Tabela P8.** LSER regresioni koeficijenti TLC sistema predstavljeni kao vrednost  $\pm$  standardna devijacija;  $I$  - odsečak,  $a$  – vodonične veze donorskog tipa,  $b$  - vodonične veze akceptorskog tipa,  $s$  - dipolarnost/polarizabilnost,  $e$  - molarna refraktivnost,  $v$  - sposobnost za formiranje praznog prostora; Stacionarne faze oktadecil (RP18)-modifikovani silika-gel i cijano (CN)-modifikovani silika-gel; Mobilne faze: smeše metanola (MeOH) i acetonitrila (ACN) sa vodom u različitim odnosima (v/v); Statistički parametri:  $R^2$  – kvadrati koeficijenta determinacije,  $S.D.$  – standardna greška modela,  $F$  – Fisher's statistika,  $P$  – značajnost  $F$ ,  $n$  – broj kalibracionih tačaka (jedinjenja)

Br.	Hrom. sistem	$I$	$a$	$b$	$s$	$e$	$v$	$R^2$	$S.D.$	$F$	$P$	$n$
1	MeOH 40%	0,72 $\pm$ 0,19	-0,50 $\pm$ 0,15	-0,660 $\pm$ 0,13	-0,52 $\pm$ 0,12	0,030 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,20	0,8314	0,248	43,39	6,36 $\cdot$ 10 <sup>-16</sup>	50
2	MeOH 50%	0,47 $\pm$ 0,18	-0,52 $\pm$ 0,15	-0,876 $\pm$ 0,13	-0,59 $\pm$ 0,14	0,161 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,19	0,8671	0,241	57,40	3,60 $\cdot$ 10 <sup>-18</sup>	50
3	MeOH 60%	0,04 $\pm$ 0,15	-0,40 $\pm$ 0,12	-0,942 $\pm$ 0,10	-0,461 $\pm$ 0,094	0,181 $\pm$ 0,085	1,21 $\pm$ 0,16	0,8934	0,200	73,75	2,92 $\cdot$ 10 <sup>-20</sup>	50
4	MeOH 70%	-0,26 $\pm$ 0,14	-0,37 $\pm$ 0,11	-1,00 $\pm$ 0,09	-0,417 $\pm$ 0,084	0,352 $\pm$ 0,076	0,94 $\pm$ 0,14	0,9159	0,178	95,84	1,64 $\cdot$ 10 <sup>-22</sup>	50
5	MeOH 80%	-0,41 $\pm$ 0,10	-0,32 $\pm$ 0,08	-0,81 $\pm$ 0,07	-0,307 $\pm$ 0,064	0,245 $\pm$ 0,057	0,77 $\pm$ 0,11	0,9220	0,135	104,09	3,12 $\cdot$ 10 <sup>-23</sup>	50
6	ACN 40%	0,49 $\pm$ 0,13	-0,57 $\pm$ 0,10	-1,00 $\pm$ 0,09	-0,352 $\pm$ 0,079	0,156 $\pm$ 0,072	1,05 $\pm$ 0,13	0,9185	0,168	99,20	8,24 $\cdot$ 10 <sup>-23</sup>	50
7	ACN 50%	0,49 $\pm$ 0,14	-0,67 $\pm$ 0,11	-0,93 $\pm$ 0,09	-0,409 $\pm$ 0,084	0,226 $\pm$ 0,075	0,75 $\pm$ 0,14	0,9032	0,177	82,13	3,54 $\cdot$ 10 <sup>-21</sup>	50
8	ACN 60%	0,01 $\pm$ 0,12	-0,67 $\pm$ 0,09	-0,875 $\pm$ 0,08	-0,318 $\pm$ 0,073	0,193 $\pm$ 0,066	0,81 $\pm$ 0,12	0,9230	0,154	105,41	2,42 $\cdot$ 10 <sup>-23</sup>	50
9	ACN 70%	-0,40 $\pm$ 0,11	-0,665 $\pm$ 0,09	-0,789 $\pm$ 0,07	-0,313 $\pm$ 0,066	0,198 $\pm$ 0,060	0,80 $\pm$ 0,11	0,9331	0,140	122,83	1,08 $\cdot$ 10 <sup>-24</sup>	50
10	ACN 80%	-0,50 $\pm$ 0,13	-0,68 $\pm$ 0,10	-0,725 $\pm$ 0,09	-0,347 $\pm$ 0,079	0,177 $\pm$ 0,071	0,75 $\pm$ 0,13	0,8986	0,167	77,95	9,90 $\cdot$ 10 <sup>-21</sup>	50
11	MeOH 40%	-0,01 $\pm$ 0,15	-0,35 $\pm$ 0,12	-1,02 $\pm$ 0,10	-0,298 $\pm$ 0,090	0,349 $\pm$ 0,081	0,80 $\pm$ 0,15	0,8957	0,191	75,56	1,82 $\cdot$ 10 <sup>-20</sup>	50
12	MeOH 50%	-0,39 $\pm$ 0,12	-0,30 $\pm$ 0,10	-0,820 $\pm$ 0,08	-0,138 $\pm$ 0,075	0,313 $\pm$ 0,067	0,62 $\pm$ 0,13	0,8983	0,158	77,74	1,04 $\cdot$ 10 <sup>-20</sup>	50
13	MeOH 60%	-0,40 $\pm$ 0,11	-0,273 $\pm$ 0,09	-0,632 $\pm$ 0,07	-0,142 $\pm$ 0,068	0,262 $\pm$ 0,061	0,41 $\pm$ 0,11	0,8648	0,143	56,28	5,23 $\cdot$ 10 <sup>-18</sup>	50
14	MeOH 70%	-0,406 $\pm$ 0,094	-0,271 $\pm$ 0,08	-0,452 $\pm$ 0,06	-0,081 $\pm$ 0,058	0,227 $\pm$ 0,052	0,19 $\pm$ 0,10	0,8351	0,123	44,56	3,92 $\cdot$ 10 <sup>-16</sup>	50
15	ACN 40%	-0,038 $\pm$ 0,14	-0,28 $\pm$ 0,11	-0,661 $\pm$ 0,09	-0,222 $\pm$ 0,084	0,160 $\pm$ 0,076	0,62 $\pm$ 0,14	0,8037	0,178	36,03	1,71 $\cdot$ 10 <sup>-14</sup>	50
16	ACN 45%	0,040 $\pm$ 0,13	-0,26 $\pm$ 0,10	-0,710 $\pm$ 0,09	-0,269 $\pm$ 0,077	0,192 $\pm$ 0,070	0,49 $\pm$ 0,13	0,8218	0,164	40,58	2,13 $\cdot$ 10 <sup>-15</sup>	50
17	ACN 50%	-0,143 $\pm$ 0,093	-0,296 $\pm$ 0,07	-0,448 $\pm$ 0,06	-0,166 $\pm$ 0,057	0,160 $\pm$ 0,052	0,327 $\pm$ 0,10	0,8338	0,121	44,15	4,64 $\cdot$ 10 <sup>-16</sup>	50
18	ACN 55%	-0,242 $\pm$ 0,089	-0,279 $\pm$ 0,07	-0,431 $\pm$ 0,06	-0,188 $\pm$ 0,055	0,168 $\pm$ 0,049	0,306 $\pm$ 0,10	0,8375	0,116	45,35	2,85 $\cdot$ 10 <sup>-16</sup>	50
19	ACN 60%	-0,409 $\pm$ 0,088	-0,260 $\pm$ 0,07	-0,371 $\pm$ 0,06	-0,116 $\pm$ 0,054	0,066 $\pm$ 0,049	0,340 $\pm$ 0,089	0,7761	0,115	30,50	2,95 $\cdot$ 10 <sup>-13</sup>	50

## 8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Mr Helena Majstorović rođena je 7. februara 1973. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Pančevu. Na studijsku grupu Diplomirani hemičar Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala se školske 1991/92. godine. Diplomirala je 1997. godine na smeru Analitička hemija sa prosečnom ocenom 8,25 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Poslediplomske studije smera Analitička hemija upisala je školske 1997/98. godine. Maja 2003. godine na katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu odbranila je magistarski rad pod nazivom "Proučavanje mehanizama hromatografskog odvajanja supstanci na tankom sloju cijano-modifikovanog silika-gela". Odlukom Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta u Beogradu jula 2010. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik.

Helena Majstorović zaposlena je u PSS Institut Tamiš u zvanju rukovodioca laboratorije - saradnika za hemijska ispitivanja gde se aktivno bavi problemima kontrole kvaliteta i razvoja novih analitičkih metoda za ispitivanje, pre svega različitih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda i kvaliteta zemljišta.

### 1. Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1.1. F. Andrić, S. Šegan, A. Dramićanin, **H. Majstorović**, D. Milojković-Opsenica, Linear modeling of the soil-water partition coefficient normalized to organic carbon content by reversed-phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A* (2016) [doi:10.1016/j.chroma.2016.06.063](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.063)

### 2. Radovi u međunarodnim časopisima (M23):

2.1. **H. J. Majstorović**, Ž. Lj. Tešić, and D. M. Milojković-Opsenica, Interpretation of the Mechanisms of Chromatographic Separation on CN-Silica. Part I: TLC of Metal Complexes, *J. Planar Chromatogr.* **15** (2002) 341-344.

2.2. **H. J. Majstorović**, D. Ratkov-Žebeljan, Ž. Lj. Tešić, and D. M. Milojković-Opsenica, Interpretation of the Mechanisms of Chromatographic Separation on CN-Silica. Part II: TLC of Some Phenols, *J. Planar Chromatogr.* **17** (2004) 9-13.

2.3. D. Milojković-Opsenica, **H. Majstorović**, A.Radoičić, Ž.Tešić, 3-Cyanopropylsiloxane-bonded silica gel: Characteristics and applications in thin-layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.* **28** (2015) 2, 106-114

**3. Radovi saopštene na skupu međunarodnog značaja štampani u celini ili u obliku proširenog izvoda (M33):**

3.1. **H. J. Majstorović**, Ž.Lj. Tešić, and D.M. Milojković-Opsenica, Interpretation of the Mechanisms of Chromatographic Separation on CN-Silica. Part I: TLC of Metal Complexes, *Planar Chromatography 2002*, Heviz, Hungary, May 2002., Proceedings of the International Symposium on Planar Separations p.323-329.

3.2. **H. J. Majstorović**, D. Ratkov-Žebeljan, Ž.Lj. Tešić, D.M. Milojković-Opsenica, Interpretation of the Mechanisms of Chromatographic Separation on CN-Silica. Part II: TLC of Some Phenols, *Planar Chromatography 2003*, Budapest, Hungary, June 2003., Proceedings of the International Symposium on Planar Separations p.297-303.

**4. Radovi saopštene na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):**

4.1. **H.J. Majstorović**, Ž.Lj. Tešić, Z.D. Milićević, M.B. Aleksić and D.M. Milojković-Opsenica, Thin-Layer Chromatography of some herbicides, 2<sup>nd</sup> International Conference of the chemical Societies of the South-eastern European countries, Halkidiki, Greece, June 6-9, 2000, Book of abstracts Volume II, PO607.

**5. Radovi saopštene na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64):**

5.1. **H.J. Majstorović**, Ž.Lj. Tešić, D.M. Milojković-Opsenica, Hromatografija nekih klasa Co (III)-kompleksa na tankom sloju CN-modifikovanog silika-gela, *XL Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Novi Sad, 2001, Izvodi radova: AH-10p.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Хелена Ј. Мајсторовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 250/2

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Цијано-модификовани силика-гел као сорбент у планарној хроматографији

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

Потпис аутора

У Београду, 14.07.2016.

Хелена Мајсторовић

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

Име и презиме аутора Хелена Ј. Мајсторовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 250/2

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Цијано-модификовани силика-гел као сорбент у планарној хроматографији

Ментор др. Душанка Милојковић-Опсеница

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 14.07.2016.

Хелена Мајсторовић

## Изјава о коришћењу

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

Цијано-модификовани силика-гел као сорбент у планарној хроматографији

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 14.07.2016.

Лелена Мусићковић