

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Filip Lj. Andrić

**ODREĐIVANJE PODEONIH KOEFICIJENATA I
SOLVATOHROMNIH PARAMETARA MALIH
ORGANSKIH MOLEKULA PRIMENOM
TANKOSLOJNE HROMATOGRAFIJE I
HEMOMETRIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Filip Lj. Andrić

**DETERMINATION OF PARTITION COEFFICIENTS
AND SOLVATOCHROMIC PARAMETERS OF
SMALL ORGANIC MOLECULES BY THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY AND CHEMOMETRICS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

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 Dragana Đorđević

naučni savetnik
Centar za hemiju, IHTM, Beograd

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, te korisnim sugestijama i beskrajnom strpljenju.

Zahvaljujem se prof. dr Živoslavu Tešiću na ukazanom poverenju tokom niza godina zajedničkog rada i dr Dragani Đorđević na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama pri završnoj izradi rada.

Svojoj porodici i prijateljima

Every human being is a collection of selves. We never stay as one person as we go on our journeys to the grave.

William Boyd, Any Human Heart

Our lives and our choices, each encounter, suggest a new potential direction. Our lives are not our own. From womb to tomb we are bound to others, past and present, and by each crime and every kindness, we birth our future.

David Mitchell, Cloud Atlas

Određivanje podeonih koeficijenata i solvatohromnih parametara malih organskih molekula primenom tankoslojne hromatografije i hemometrije

Cilj ove disertacije bio je razvoj metoda tankoslojne hromatografije za određivanje podeonih koeficijenata, pre svega oktanol-voda ($\log K_{OW}$), zemljište-voda ($\log K_{OC}$), vazduh-voda ($\log K_{AW}$) i solvatohromnih (A , B i S) parametara malih organskih molekula na osnovu kojih se, primenom pristupa lineranih odnosa energije solvatacije (LSER), mogu dalje proceniti: stepen aporpcije u gastrointestinalnom traktu (% Abs), raspodela u sistemu krv-koža ($\log P_{skin}$), voda-koža ($\log K_P$, $\log K_{SC}$) i krv-moždana-barijera ($\log BBB$).

Za određivanje datih parametara izvorne metode su vremenski zahtevne, podrazumevaju veliku količinu analita i imaju ograničeni radni opseg. Zbog toga su u velikoj meri zamenjene različitim hromatografskim tehnikama, pre svega visoko-efikasnom tečnom hromatografijom (HPLC). Međutim, tankoslojna hromatografija ima niz prednosti nad HPLC metodom. To je jednostavna, brza, jeftina metoda, koja koristi male količine analita i reagenasa. Do sada nije sistematski ispitivana njena primena u određivanju pomenutih parametara.

U okviru ove disertacije primenjeni su različiti reverezno-fazni i normalno-fazni hromatografski sistemi na skupu od 70 organskih jedinjenja malih molekulskih masa, u kombinaciji sa različitim kalibracionim tehnikama: univarijantna regresija (OLS), regresija glavnih komponenta (PCR), regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS). Pri tome je izvršena selekcija hromatografskih sistema i definisanje radnih opsega za svaki od proučavanih particionih koeficijenata te, tipova organskih jedinjenja na koja se dati izbor hromatografskih uslova može primeniti. Razvijeni postupci su okarakterisani parametrima preciznosti, tačnosti, prediktivne moći i ostalim parametarima validacije modela.

Ključne reči: Particioni koeficijent zemljište-voda ($\log K_{OC}$), particioni koeficijent oktanol-voda ($\log K_{OW}$), particioni koeficijent vazduh-voda ($\log K_{AW}$), Abraham-ovi solvatohrmni parametri, tankoslojna hromatografija, univarijantna regresija, regresija glavnih komponenata (PCR), regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS)

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Determination of partition coefficients and solvatochromic parameters of small organic molecules by thin-layer chromatography and chemometrics

The aim of this thesis was the development of thin-layer chromatographic methods for the determination of partition coefficients, primarily octanol-water ($\log K_{ow}$), soil-water ($\log K_{oc}$), air-to-water ($\log K_{aw}$) and Abraham's solvatochromic parameters of small organic molecules which can be further used to estimate: the gastrointestinal tract absorption (%Abs), the blood to skin distribution ($\log P_{skin}$), water - skin ($\log K_p$, $\log K_{sc}$) and the blood to brain partition ($\log BBB$).

Original methods used to determine the aforementioned parameters are time consuming, involve a large amount of the analyte and have limited working range. Therefore, they are, to a large extent, replaced by various chromatographic techniques, especially high-performance liquid chromatography. However, thin-layer chromatography has a number of advantages over HPLC method. It is simple, fast, inexpensive method that uses small amounts of analytes and reagents. So far its application in the determination of the parameters mentioned above has not been systematically studied.

In the scope of this dissertation, several reversed-phase and normal-phase chromatographic systems were applied on a set of 70 organic compounds of low molecular weight in order to determine the partitioning as well as solvatochromic parameters, in combination with a variety of calibration methods: univariate regression (OLS), principal component regression (PCR), partial least squares regression (PLS). For each of the studied partitioning coefficients careful selection and definition of chromatographic systems, operating conditions, working ranges and the types of organic compounds on which the developed method could be applied have been done.

The developed methods were further characterized by the parameters of precision, accuracy, predictive power, and other parameters of the model validation.

Key words: Soil-water partition coefficient ($\log K_{OC}$), octanol-water partition coefficient ($\log K_{OW}$), air-water partition coefficient ($\log K_{AW}$), Abraham's solvatochromic parameters, thin-layer chromatography, univariate regression, principal component regression (PCR), partial least squares regression (PLS)

Scientific field: Chemistry

Field of academic expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Opšti hromatografski pojmovi	3
2.2. Particioni procesi u životnoj sredini	7
2.2.1. Sorpcija u sistemu zemljište-voda	7
2.2.2. Normirane vrednosti podeonih koeficijenata (K_{oc})	9
2.2.3. Procena K_{oc} parametra – hromatografske i QSPR tehnike	10
2.2.4. Particija u sistemu vazduh-voda	12
2.3. Particioni procesi u biološkim sistemima	
2.3.1. Lipofilnost	14
2.3.2. Određivanje lipofilnosti – direktne, hromatografske i QSPR tehnike	14
2.3.3. Ostali podeoni koeficijenti od značaja u biološkim sistemima	17
2.4. Linearni odnosi energije solvatacije	19
2.4.1. Kamlet-Taftove solvatohromne skale – spektroskopski definisani parametri rastvarača	20
2.4.2. Abrahamovi solvatohromni parametri – termodinamički pristup	23
2.4.3. Interpretacija LSER parametara	26
2.4.4. Odeđivanje Abrahamovih solvatohromnih parametara	28
2.4.5. Primena LSER pristupa u određivanju particionih koeficijenata	29
2.5. Hemometrijski pristup modelovanju particionih procesa	
2.5.1. Osnovne tehnike modelovanja	31
2.5.1.1. Univarijantna regresija metodom najmanjih kvadrata	31
2.5.1.2. Višestruka linearna regresija	32
2.5.1.3. Regresija glavnih komponenata	33
2.5.1.4. Regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata	34
2.5.2. Tehnike validacije i parametri kvaliteta kalibracionih modela	36

3. Naši radovi	
3.1. Određivanje lipofilnosti	41
3.1.1. <i>Modeli zasnovani na direktno merenim retencionim parametrima (R_M vrednostima)</i>	43
3.1.2. <i>Modeli zasnovani na hromatografskim deskriptorima (R_M^0, b i C_0)</i>	46
3.2. Određivanje zemljište-voda particionog koeficijenta ($\log K_{OC}$)	54
3.2.1. <i>Modeli zasnovani na direktnim retencionim parametrima za skup fenolnih jedinjenja</i>	57
3.2.2. <i>Kalibracioni modeli zasnovani na TLC deskriptorima za skup fenolnih jedinjenja</i>	59
3.2.3. <i>Određivanje $\log K_{OC}$ vrednosti fenolnih jedinjenja</i>	60
3.2.4. <i>Proširenje metodologije – generalizacija kalibracionih modela</i>	62
3.2.5. <i>Kalibracioni postupci direktno primenjeni na retencionim parametrima</i>	64
3.2.6. <i>Modeli zasnovani na hromatografski izvedenim deskriptorima</i>	66
3.2.7. <i>Procena $\log K_{OC}$ vrednosti</i>	67
3.3. Određivanje vazduh-voda particionog koeficijenta ($\log K_{AW}$)	72
3.4. Određivanje Abrahamovih solvatohromnih parametara	78
3.4.1. <i>LSEER modeli hromatografskih sistema</i>	78
3.4.2. <i>Odabir hromatografskih sistema za određivanje A, B i S parametara</i>	86
3.4.3. <i>Određivanje A, B i S parametara</i>	89
4. Eksperimentalni deo	
4.1. Reagensi	96
4.2. Hromatografski eksperimenti	97
4.2.1. <i>Tankoslojna hromatografija</i>	97
4.2.2. <i>Visoko-efikasna tečna hromatografija</i>	98
4.3. Kalibracija i multivarijantna statistička analiza	98
5. Zaključak	99
6. Literatura	102
7. Prilog	107

1. UVOD

Particioni koeficijenti poput zemljište-voda (K_{OC}) ili vazduh-voda (K_{AW}) u velikoj meri određuju sudbinu jedinjenja u životnoj sredini. Jedinjenja koja jako interaguju sa organskim materijama zemljišta mogu biti nedostupna biodegradabilnim procesima koji se dešavaju u vodenoj fazi. Sa druge strane, dobro poznati parametar lipofilnosti, $\log K_{OW}$ (oktanol-voda particioni koeficijent) je od velike važnosti pri proučavanju farmakokinetike i farmakodinamike mnogih lekova. Neretko postoji direktna veza među različitim eksperimentalno određenim parametrima biološke aktivnosti i lipofilnosti. Osim toga čitav niz podeonih koeficijenata kao što su: aporpcija u gastrointestinalnom traktu (% Abs), raspodela u sistemu krv-koža (P_{skin}), voda-koža (K_p , K_{sc}) i krv-moždana-barijera (BBB) su od naročitog značaja u studijama apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije supstanci, koje predstavljaju neophodan korak u razvoju lekova, različitih hemikalija za poljoprivrednu upotrebu i sl. Stoga je od izrazitog značaja razvijanje novih metoda za njihovo brzo, jednostavno, precizno i tačno određivanje. Do sada su ovi parametri određivani particionim tehnikama, zahtevnim kako u pogledu utrošenog vremena, tako i u pogledu količina organskih rastvarača, odnosno ispitivanih analita i korišćene opreme. Hromatografske tehnike, kao znatno jednostavnije, potiskuju izvorne metode.

Tankoslojna hromatografija je u izvesnoj meri našla primenu u određivanju parametra lipofilnosti, međutim za određivanje ostalih particionih koeficijenata kao i solvatohromnih parametara nema literaturnih podataka.

S obzirom da dati parametri određuju sudbinu jedinjenja, kako u životnoj sredini tako i u biološkom okruženju, to je unapređivanje i razvoj novih postupaka za njihovo merenje i predviđanje od izuzetnog značaja, naročito za jedinjenja od ekološke i farmakološke važnosti.

Cilj ove disertacije obuhvata razvijanje metoda tankoslojne hromatografije za određivanje podeonih koeficijenata pre svega zemljište-voda, vazduh-voda i solvatohromnih parametara (A , B i S) malih organskih molekula. Izvorne metode koje su se do skora koristile za određivanje datih parametara su pre svega vremenski zahtevne, podrazumevaju veliku količinu analita i imaju limitarni opseg vrednosti particionih

koeficijenta na koje se mogu primeniti. Zbog toga su u velikoj meri zamenjene različitim hromatografskim tehnikama, pre svega visoko-efikasnom tečnom hromatografijom. Tankoslojna hromatografija ima niz prednosti: jednostavna, brza, jeftina metoda, koja koristi male količine analita i reagenasa. Glavni nedostaci klasične tankoslojne hromatografske tehnike su nekontrolisani, neuniformni protok mobilne faze i uvek prisutan fazni gradijent mobilna-stacionarna faza čak i kod upotrebe monokomponentnih mobilnih faza.

Cilj istraživanja je jasna selekcija hromatografskih sistema, odnosno definisanje radnih uslova i opsega particionih koeficijenta i solvatohromnih parametara te, tipova organskih jedinjenja na koja se dati izbor hromatografskih uslova može primeniti, karakterizacija preciznosti, tačnosti i ostalih parametara validacije metode.

S obzirom da solvatohromni parametri pružaju jasnu sliku o tipu interakcija koje je dati analit u mogućnosti da ostvari u datoj sredini, kako specifičnih (dipolarne interakcije, vodonično vezivanje davanjem, odnosno primanjem protona) tako i nespificiranih (hidrofobnih, polarizabilnih, disperzionih), to se kao posredna informacija dobija i izvesna slika o interakcijama zastupljenim u različitim hromatografskim sistemima. Pored toga, solvatohromni parametri se mogu upotrebiti za predviđanje niza gore pomenutih particionih koeficijenta, pre svega: zemljište-voda (K_{OC}), aporpcije u gastrointestinalnom traktu (% Abs), raspodele u sistemu krv-koža (P_{skin}), voda-koža (K_p , K_{sc}) i krv-moždana-barijera (BBB).

2. OPŠTI DEO

2.1. Opšti hromatografski pojmovi

U plejadi savremenih, veoma sofisticiranih analitičkih tehnika moderna hromatografija zauzima nezamenljivo mesto prilikom analize, prečišćavanja i proučavanja različitih supstanci i njihovih smeša. Može se reći da su sve hromatografske metode zasnovane na jednostavnom principu koji počiva na razlikama u raspodeli analita između dve faze: stacionarne i mobilne. Otuda se mogu razlikovati tri najvažnija elementa svakog hromatografskog sistema: *stacionarna faza*, *mobilna faza* i *analit* koji podleže ravnotežnoj raspodeli između faza, a koja se u toku procesa razdvajanja, odnosno migracije analita kroz hromatografski sistem, stalno narušava i iznova uspostavlja.

Prema agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze hromatografske tehnike se mogu podeliti na gasnu (gasno-čvrstu i gasno-tečnu) hromatografiju i tečnu (tečno-tečnu i tečno-čvrstu) hromatografiju. Najčešće korišćeni modalitet u slučaju tečne hromatografije je zapravo tečno-čvrsta kod koje je stacionarna faza čvrstog agregatnog stanja, dok je mobilna faza tečna. Često se zbog toga pojam tečne hromatografije poistovećuje sa tečno-čvrstom hromatografskom tehnikom.

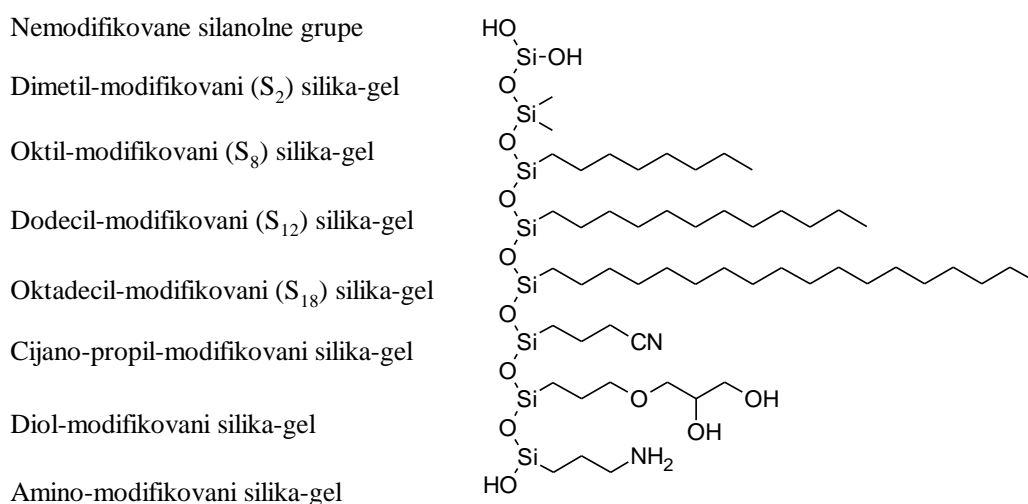
Prema načinu izvođenja hromatografija može biti kolonska, kada je stacionarna faza "spakovana" u vidu stuba, odnosno kolone ili planarna kada je sorbent najčešće nanet u vidu tankog sloja (sa izuzetkom hromatografije na hartiji) na staklenu, plastičnu ili aluminijumsku podlogu.

Planarna hromatografija se može izvoditi u hroizontalnom, uzlaznom, odnosno silaznom modu i slično, dok je najčešće primenjivana tehnika u kolonskoj hromatografiji tehnika eluiranja, pri čemu se mobilna faza konstantno propušta kroz sloj stacionarne faze, a komponente smeše se "spiraju" (eluiraju) sa stuba adsorbensa, sve dok ne napuste hromatografski sistem.

Prema dominantnom mehanizmu razdvajanja razlikuju se, pre svega: adsorpciona, podeona (particiona), jonoizmenjivačka, gel-ekskluziona i afinitetna

hromatografija. Koji mehanizam će biti zastupljen u najvećoj meri, zavisi od izbora stacionarne faze, mobilne faze, njenog sastava, ali i samog analita koji pod datim uslovima može postojati u svom neutralnom odnosno jonizovanom obliku.

Kao stacionarne faze najveću upotrebu nalaze različite vrste silika-gela, aluminijum-oksida, celuloze ili poliamida. Pored toga razvijen je čitav niz hemijski modifikovanih silika-gelova kod kojih vrsta i stepen pokrivenosti površine određenim funkcionalnim grupama određuje širok spektar polarnosti [1, 2]. Šematski prikaz funkcionalnih grupa prikazan je na **Slici 1**.



Slika 1. Prikaz funkcionalnih grupa koje se nalaze na površini nekih hemijski modifikovanih silika-gelova

Tako su dimetil- (C_2), okt- (C_8), dodecil- (C_{12}) i oktadecil- (C_{18}) modifikovani sorbenti izrazito nepolarni, tzv. hidrofobni. Njihova hidrofobnost zavisi kako od dužine ugljovodoničnog lanca, tako i od stepena pokrivenosti silika-gela funkcionalnim grupama. Sa druge strane, najčešće korišćeni hidrofилni sorbenti su cijano- (CN) i aminopropil- (NH_2) modifikovani silika-gelovi. Ove stacionarne faze ostvaruju, preko svojih polarnih funkcionalnih grupa, specifične interakcije sa analitom, dok pod određenim uslovima, dolaze do izražaja i hidrofobne interakcije sa nepolarnim propil-lancima. Uslovi pod kojima je polarnost mobilne faze manja od polarnosti stacionarne faze nazivaju se normalno-fazni (NP), dok je u obratnom slučaju reč o tzv. reverzno-faznim uslovima (RP). Hromatografski sistemi sastavljeni od ugljovodonično modifikovanih silika-gelova u kombinaciji sa polarnim rastvaračima kao što su smeše

organskih rastvarača mešljivih sa vodom i vode, mogu se nazvati tipično reverzno-faznim. Suprotno, izrazito polarni sorbenti poput silika-gela ili aluminijum-oksida u kombinaciji sa nepolarnim organskim rastvaračima predstavljaju tipične normalno-fazne hromatografske sisteme.

Hidrofilni sorbenti se, zahvaljujući prirodi funkcionalnih grupa na svojoj površini, mogu koristiti kako u reverzno- tako i u normalno-faznim uslovima u zavisnosti od sastava mobilne faze [3, 4].

Retencija u tečnoj hromatografiji je veoma složen proces određen nizom specifičnih i nespecifičnih interakcija koje uključuju vodonično vezivanje, van der Waals-ove, Londonove, dipol-dipol i elektrostatičke interakcije [5]. Interakcije su zastupljene između molekula analita i mobilne faze, analita i stacionarne faze, samih molekula mobilne faze, a kod hemijski modifikovanih sorbenata dolazi do interakcija i među funkcionalnim grupama na površini stacionarne faze.

Postojii više teorija kojima se može objasniti kompleksan mehanizam retencije u tipičnim reverzno-faznim uslovima, od kojih su solvofobna teorija i particioni model u najširoj upotrebi. Prema solvofobnoj teoriji [6, 7], zadržavanje je najvećim delom favorizovano promenama slobodne energije neophodne za smeštanje molekula analita u mobilnu fazu. Pri tome se razlikuju entalpijski doprinosi, usled narušavanja strukture raskidanjem vodoničnih veza između molekula mobilne faze, i formiranja novih veza sa molekulima analita i negativan entropijski doprinos usled povećanja uređenosti mobilne faze kako bi se obezbidilo mesto za smeštanje molekula analita. Prema drugoj teoriji (particionom modelu) [8-10] stacionarna faza ima značajnu ulogu u retencionom mehanizmu.

Pored izbora stacionarne faze vrlo važan faktor koji utiče na retenciju analita je i sastav mobilne faze. Ovde treba istaći dva parametra: elucionu moć i ukupnu polarnost mobilne faze. Eluciona moć rastvarača – mobilne faze, predstavlja sposobnost datog rastvarača da stupi u interakciju sa stacionarnom fazom i samim tim potisne molekule analita iz hromatografskog sistema. Eluciona moć u velikoj meri zavisi od vrste sorbenta. Sa druge strane, ukupna polarnost rastvarača je određena i selektivnošću rastvarača da stupi u različite interakcije: dipolarne, proton-donorske, odnosno proton-akceptorske.

Postoji nekoliko načina da se rangiraju rastvarači prema selektivnosti od kojih je najviše u upotrebi Snyder-ov pristup [11]. Za svaki rastvarač je izražen udeo dipolarnih (χ_n), proton-donorskih (χ_d), odnosno proton-akceptorskih (χ_e) svojstava u ukupnoj polarnosti. Rastvarači su klasifikovani prema pomenutoj metodi u osam grupa, a oni koji pripadaju istoj grupi pokazuju slično ponašanje.

Retencija u hromatografskim sistemima se može izraziti na različite načine. U kolonskoj hromatografiji najčešće se koriste: retenciono vreme t_R , korigovano retenciono vreme t_R' i faktor kapaciteta k koji predstavlja odnos koncentracija analita u stacionarnoj i mobilnoj fazi, a koji stoji u vezi sa retencionim vremenom preko sledeće jednačine:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

gde je t_0 tzv. mrtvo vreme sistema, odnosno vreme potrebno analitu koji ne interaguje sa stacionarnom fazom, da izađe iz sistema.

U slučaju tankoslojne hromatografije najčešće se koristi tzv. faktor zadržavanja ili retardacioni faktor, R_F , koji predstavlja odnos pređenog puta analita od polazne mrlje do težišta hromatografske zone i puta rastvarača od polazne mrlje do fronta rastvarača. R_F može uzeti vrednosti između 0 i 1. Analit za koji R_F vrednost iznosi 0 se potpuno zadržava pod datim hromatografskim uslovima, dok u suprotnom slučaju ($R_F = 1$) neselektivno putuje sa frontom rastvarača.

$$R_F = \frac{a}{f} \quad (2)$$

gde je a – pređeni put supstance, a f – pređeni put rastvarača.

Pored R_F vrednosti često se definiše i veličina analogna logaritmu faktora kapaciteta u kolonskoj hromatografiji, tzv. R_M vrednost. Ona je sa retardacionim faktorom povezana sledećom jednačinom:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (3)$$

2.2. Particioni procesi u životnoj sredini (zemljište-voda i vazduh-voda particioni procesi)

2.2.1. Sorpcija u sistemu zemljište-voda

Zemljište je kompleksan sistem sastavljen od mineralnih i organskih komponenti različite teksture i hemijskog sastava nastao u interakciji raznovrsnih uslova i procesa u atmosferi, litosferi, hidrosferi i biosferi. Takođe, zemljište predstavlja svojevrsan spoj tečne, čvrste, tečne i gasovite faze, mineralnih i organskih komponenti, ali i živih organizama [12, 13]. Glavne mineralne komponente zemljišta su šljunak, pesak i glina. Glina sa svojim jonizmenjivačkim svojstvima, promenljive sorpcione moći predstavlja najaktivniju komponentu zemljišta. Po hemijskom sastavu mogu se izdvojiti tri tipa: kristalne alumo-silikatne, amorfne i seskvioksidne gline. Pored organskih komponenti, glina je glavni faktor pri sorpciji organskih jedinjenja.

Pod sorpcijom jedinjenja u zemljištu podrazumeva se vezivanje jedinjenja sa menirealnim, odnosno organskim komponentama zemljišta, pod dejstvom različitih interakcija, čiji doprinos ukupnoj raspodeli među fazama može biti entalpijski, odnosno entropijski. Među interakcijama koje naročito doprinose entalpijskom faktoru treba izdvojiti van der Waals-ove interakcije, elektrostatičke interakcije uključujući jonoizmenjivačke procese i izmene liganada. Hidrofobne interakcije, koje su u manjem stepenu određene polarizabilnim i slabim London-ovim privlačenjima, uglavnom su entropijski određene. Kako je sudbina neke supstance u zemljištu značajno određena sorpcionim procesom koji na različitim nivoima utiče na isparavanje, fotolizu, hidrolizu, dostupnost biljkama i mikroorganizmima pa samim tim i biorazgradnju [14], jasna je potreba da se sam proces sorpcije bolje definiše. Kako je već pomenuto, zbog složenosti samog zemljišta, ali i strukturnih karakteristika datog jedinjenja, izuzetno je teško izdvojiti pojedinačne mehanizme. Većina organskih jedinjenja se istovremeno sorbuje kako na organskim tako i na mineralnim komponentama zemljišta, ali zastupljenost jednog odnosno drugog procesa zavisi i od tipa zemljišta i od same supstance. Sa porastom broja i raznovrsnosti funkcionalnih grupa sorbenda raste i složenost particionih mehanizama. No, ipak se u izvesnoj meri mogu izdvojiti opšti zaključci. Tako se može primetiti da je uticaj mineralnih komponenti zanemarljiv ukoliko njihov udeo ne prelazi 40%, i da dolazi do porasta sorpcije neutralnih organskih molekula sa porastom udela

organske faze u zemljištu [15]. Takođe, slabe kiseline se uglavnom sorbuju u svom neutralnom obliku pri nižim pH vrednostima zemljišta, dok se slabe baze i katjoni organskih molekula sorbuju na negativno naelektrisanim aktivnim centrima zemljišta [16].

Stepen sorpcije definišu vrednosti podeonih koeficijenata, koji se određuju na osnovu odgovarajućih adsorpcionih izoterma. Pri tome se podeoni koeficijent, K_d , definiše kao odnos koncentracija datog jedinjenja u čvrstoj fazi – zemljištu, C_s (mg/kg), i vodi C_w (mg/l):

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \quad (4)$$

Pomenuti proces može biti linearan, u slučaju niskih koncentracija analita ($< 10^{-5}$ moldm⁻³) ili nelinearan, u slučaju većih koncentracija. Važno je istaći da izrazito lipofilna jedinjenja pokazuju odstupanja od linearnosti i pri nižim koncentracijama. U slučaju nelinearnosti najčešće se koristi tzv. Freundlich-ova adsorpciona izoterma, jedn. (5). Pri tome parametar N uglavnom ima vrednosti 0,77 - 0,95, a u retkim slučajevima može biti veći od jedinice.

$$K_f = \frac{C_s}{C_w^N} \quad (5)$$

U pojedinim slučajevima, naročito kada je dominantna sorpcija na mineralnim komponentama, pogodnije su Langmuir-ova, odnosno Brumnauer-Emmett-Teller-ova (BET) izoterma [17].

Eksperimentalno određivanje podeonih koeficijenata zasniva se na uspostavljanju ravnotežne raspodele datog analita između dve faze, vode i zemljišta i određivanju koncentracije istog u jednoj ili obe faze. Pri tome se mogu koristiti neprotočni i protočni sistemi [18-20]. U prvom slučaju mešanjem tačnih količina obeju faza i analita u izolovanom sistemu omogućava se brže uspostavljanje ravnotežne raspodele analita. Nakon odvajanja faza određuju se koncentracije analita u obe ili samo jednoj fazi. Protočni sistemi mogu biti kolone ispunjene zemljištem kroz koje se propušta vodeni rastvor datog analita određene koncentracije. Promena u koncentraciji analita u efulentu određuje meru sorpcije [21].

U oba slučaja različiti faktori mogu uticati na ishod eksperimenta i tačnost rezultata. Porast temperature dovodi do smanjenja sorpcije. Uticaj pH vrednosti na jedinjenja koja ne protolizuju je neznatan, dok u slučaju slabih kiselina dolazi do porasta sorpcije sa smanjenjem pH, kada preovlađuje hidrofobniji protonovani oblik. Protonovani katjoni baza se bolje sorbuju od neutralne deprotonovane vrste, tako da sniženje pH vrednosti dovodi do porasta sorpcije slabih organskih baza. Gubici usled sorpcije na zidovima, isparavanja, hemijske ili biološke degradacije dovode do značajnih grešaka. Zato se preporučuje određivanje ispitivane komponente u obe faze, kako bi se mogao odrediti potencijalni mehanizam gubitka.

2.2.2. Normirane vrednosti podeonih koeficijenata

Upotreba podeonog koeficijenta (K_d , odnosno K_f) kao strukturnog parametra jedinjenja nije moguća iz više razloga od čega najveći uticaj ima činjenica da njegova vrednost u velikoj meri zavisi kako od sastava i vrste sorbenta (zemljišta), tako i od eksperimentalnih uslova. Međutim, uočeno je da sa porastom udela organske komponente u zemljištu raste i stepen sorpcije, što je posebno izraženo u slučaju neutralnih organskih molekula. Zbog toga je uvedena nova veličina, K_{OC} , koja predstavlja koeficijent raspodele normiran na ukupan sadržaj organskog ugljenika (OC), jednačina (6), i time je uticaj sastava zemljišta znatno umanjen.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{OC} \quad (6)$$

Iako je ovaj pristup najpogodniji u slučaju neutralnih supstanci relativno izraženijih hidrofobnih karakteristika i kada je sadržaj ukupnog organskog ugljenika u zemljištu visok, on se ipak primenjuje i za jedinjenja šireg opsega hidrofobnosti i zemljišta raznovrsnijeg sastava, tim pre što dati koncept daje zadovoljavajuće rezultate u prihvatljivim granicama greške i zato što se sadržaj organskog ugljenika jednostavno određuje.

Međutim, u slučajevima kada je sadržaj mineralnih materija u zemljištu visok, a vrednost organskog ugljenika (OC vrednost) niska, ostali faktori poput ukupnog jonoizmenjivačkog kapaciteta (Cation Exchange Capacity – CEC) i pH vrednosti mogu

imati dominantan uticaj na stepen sorpcije, pa je pogodnije podeliti koeficijente (K_d i K_f) korelisati sa ukupnim katjonskim jonoizmenjivačkim kapacitetom, odnosno sadržajem gline i specifične površine. Zbog toga K_{OC} parametar pruža minimalnu procenu stepena sorpcije, koja može biti uvećana zbog dodatne sorpcije na mineralnim komponentama zemljišta.

2.2.3. Procena K_{OC} parametra - hromatografske i QSPR tehnike

Uvođenje OC kao normativnog faktora i koncepta koji favorizuje hidrofobne interakcije sa organskom komponentom zemljišta kao dominantnim sorpcionim mehanizmom, dovelo je do primene različitih metoda zasnovanih na određivanju hidrofobnosti, odnosno lipofilnosti jedinjenja u proceni K_{OC} koeficijenta. Značajno je pomenuti različite računске, odnosno tehnike koje se zasnivaju na kvantitativnom odnosu svojstava i strukture (Quantitative structure property relationships- QSPR). Date metode se oslanjaju na primenu strukturnih deskriptora kao što su indeksi konektivnosti (Molecular Connectivity Index - MCI), molekulske površine, težine, odnosno aditivnih fragmenata, te fizičko-hemijskim parametrima poput podelnog koeficijenta oktanol-voda (K_{OW}), rastvorljivosti u vodi (S) i različitih linearnih odnosa energija solvatacije (Linear Solvation Energy Relationships - LSER) u modelovanju K_{OC} podelnog koeficijenta.

Od eksperimentalnih tehnika treba, pre svega, izdvojiti različite reverzno-fazne hromatografske metode zasnovane na upotrebi komercijalno dostupnih stacionarnih faza i različitih vrsta zemljišta.

Hromatografske metode se u osnovi zasnivaju na određivanju faktora kapaciteta, k , odnosno $\log k$ vrednosti, na osnovu korigovanih retencionih vremena i njihovoj korelaciji sa $\log K_{OC}$ vrednostima, zadatog skupa kalibracionih standardnih supstanci. Tako dobijen model se potom koristi za procenu nepoznatih $\log K_{OC}$ vrednosti na osnovu izmerenih retencionih parametara pod identičnim eksperimentalnim uslovima.

Ispitivane su različite komercijalno dostupne stacionarne faze poput oktadecil-, etil-, cijanopropil-, trietilaomonijumpropil- modifikovanog silika-gela [22-25]. Pri tome je pokazano da oktadecil- pokazuje izvesna ograničenja u slučaju izrazito polarnih ili

previše hidrofobnih jedinjenja. U tom pogledu je cijanopropil-silika-gel bolji izbor, naročito kada su u pitanju polarnija jedinjenja koja podležu protolizi [25]. Koredel i koautori su u međulaboratorijskoj studiji validovali HPLC metod za procenu $\log K_{OC}$ vrednosti zasnovan upravo na upotrebi cijanopropil-modifikovanog silika-gela kao stacionarne faze i izokratskog eluiranja mobilnim fazama metanol-voda, odnosno metanol-citratni pufer $pH = 6$, $C = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ u odnosu 55:45, v/v. Pri tome je korišćeno sedam standardnih jedinjenja poznatih $\log K_{OC}$ vrednosti: *n*-fenilacetamid, nonuron, atrazin, fention, linuron, triapentol i trifluralin [26]. Metod je kasnije usvojen od strane Organizacije za evropsku saradnju i razvoj (Organization for European Cooperation and Development – OECD) kao zvanični HPLC metod za procenu $\log K_{OC}$ vrednosti [27].

Iako se upotrebom zemljišta standardizovanog sastava kao stacionarne faze obezbeđuje realnija slika particionih procesa, rezultati dobijeni na ovaj način pokazuju izvesna neslaganja sa rezultatima dobijenim na komercijalno dostupnim sorbentima [28]. Ovo je izraženije kod zemljišta sa nižim sadržajem organskog ugljenika i većim sadržajem gline.

Što se tiče QSPR pristupa on je zasnovan na upotrebi fizičko-hemijskih parametara koji mogu biti eksperimentalno određeni ili računski procenjeni i molekulskih indeksa konektivnosti. Od fizičko-hemijskih parametara najčešće se koriste oktanol-voda podeoni koeficijent ($\log K_{OW}$), rastvorljivost u vodi (*S*) i parahor (*P*).

U slučaju $\log K_{OW}$ parametra raspoloživi modeli su raznovrsni kako u pogledu strukturnih karakteristika hemijskih jedinjenja, tako i po njihovom broju. Jedan od opštijih modela predložen je od strane Gerstl-a i saradnika [29] (Jedn. 7).

$$\log K_{OC} = 0,679 \log K_{OW} + 0,663, r^2 = 0,831, n = 419 \quad (7)$$

Sabljić i saradnici [30] su u sličnom hijerarhijskom postupku razvili modele primenljive na uskospecifične strukturne podklase (I: supstituisani fenoli, anilini, nitrobenzeni, hlorovani benzonitrili; II: acetamilidi, karbamati, estri, feniluree, triazini, uracili; III: poliaromatični i halogenovani ugljovodonici). Uskospecifični modeli imaju izvesnu prednost nad opštim jer daju bolja predviđanja za ciljane jedinjenja.

Kada je reč o rastvorljivosti u vodi, S , lista raspoloživih modela ne zaostaje za pristupom zasnovanim na lipofilnosti ($\log K_{OW}$), međutim oni ipak nisu naišli na širu upotrebu, pre svega u komercijalno dostupnim programima poput KOCWIN (Epi Suite, Environmental Protection Agency).

Parahor, P , daje dobru korelaciju sa $\log K_{OC}$ vrednostima što se može objasniti time što parahor predstavlja približnu procenu molarne zapremine nekog jedinjenja. Za njegovo izračunavanje neophodne su izmerene vrednosti površinskog napona, gustine tečne i gasovite faze, molarne mase datog jedinjenja. Ovo u izvesnim slučajevima dodatno komplikuje proces, međutim, za ne tako mali broj jedinjenja postoje tablice sa eksperimentalno određenim vrednostima ali i različiti računski metodi za procenu, zasnovani na aditivnim fragmentacionim konstantama.

Glavni nedostatak gore pomenutih tehnika pre svega predstavlja eksperimentalno merenje, koje neretko zahteva značajan utrošak vremena i materijala, a koje sa sobom nosi izvesna ograničenja. Tako se metodom direktne raspodele (shaking flask) mogu pouzdano proceniti $\log K_{OW}$ vrednosti za nedisosovana jedinjenja čije se $\log K_{OW}$ vrednosti nalaze u opsegu 1 - 5 log jedinica, dok se u slučaju jedinjenja koja u značajnoj meri protolizuju podeoni kofecijent mora meriti pri različitim pH vrednostima, a tražena vrednost se dobija ekstrapolacijom na određenu pH vrednost. Značajan je uticaj i ostalih ravnotežnih procesa poput taložnih, redoks ili reakcija građenja kompleksnih jedinjenja.

2.2.4. Particija u sistemu vazduh-voda

Vazduh-voda particioni koeficijent, K_{AW} , odnosno Henry-jeva konstanta K_h , predstavlja, pored zemljište-voda podeonog koeficijenta, jedan od najznačajnijih parametara koji određuje sudbinu jedinjenja u životnoj sredini. Definiše se kao odnos ravnotežnih koncentracija date supstance u vazduhu, C_A i vodi C_W pri normalnim uslovima.

$$\log K_{AW} = \log \frac{C_A}{C_W} \quad (8)$$

Postoji nekoliko tehnika za njegovo određivanje koje podrazumevaju korišćenje dinamičkih i stacionarnih sistema. U oba slučaja neophodno je merenje koncentracije u obe faze, mada se tačnost povećava ukoliko se koncentracija prati u jednoj, a iz bilansa mase izračunava u drugoj fazi. U slučaju dinamičkih sistema, ravnoteža se stalno narušava propuštanjem vazduha u konstantnom, poznatom protoku iznad površine vode (air stripping) [31].

Fendinger i Glotfelty [32] su razvili tzv. metod vlažnih zidova za određivanje K_{AW} podeonog koeficijenta za seriju pesticida. Metod podrazumeva korišćenje stalnog protoka vazduha nakvašene površine.

Kod stacionarnih sistema, koncentracija supstance se meri u obe faze pri različitim zapreminskim odnosima vazduha i vode [33].

U slučajevima kod kojih nije moguće izvesti direktna merenja, K_{AW} se može izračunati iz rastvorljivosti S i napona pare p . Međutim, ovaj pristup nije pogodan za jedinjenja koja disosuju, asosuju, grade agregate ili imaju jako nizak napon pare.

Svi gorepomenuti pristupi imaju niz nedostataka, naročito ukoliko je podeoni koeficijent izuzetno nizak, ili je uzorak izrazito polaran ili površinski aktivan. Niske koncentracije analita u vazduhu je teško izmeriti, a u dinamičkim sistemima često se koriste veoma duga vremena protoka vazduha kako bi se postigla značajna promena koncentracije analita u vodenoj fazi. U slučaju da se koncentracija određuje u vazduhu, od posebnog je značaja odsustvo aerosolnih čestica ili vode. Na primer, ukoliko K_{AW} iznosi 10^{-6} , onda prisustvo čestica vode čak u niskim koncentracijama poput 1 ppm može udvostručiti ukupnu koncentraciju analita u vazduhu. Ovo je od posebnog značaja ukoliko je površina vazduh-voda podložna turbulentnim promenama kao u slučaju dinamičkih – protočnih sistema.

Računski postupci za predviđanje datog koeficijenta se uglavnom zasnivaju na fragmentacionim tehnikama, kao oni inkorporirani u KOAWIN programski paket.

Primena hromatografskih sistema u proceni ovog koeficijenta do sada još uvek nije ispitana.

2.3. Particioni procesi u biološkim sistemima

2.3.1. Lipofilnost

Lipofilnost predstavlja afinitet molekula ili nekog njegovog dela prema lipofilnom okruženju. Sa jedne strane, lipofilnost je rezultat hidrofobnih interakcija koje uključuju entropijske faktore za formiranje vakancije za smeštaj molekula i disperzione sile, a sa druge strane specifičnih, polarnih elektrostatičkih interakcija i formiranja vodoničnih veza. U zavisnosti od posmatranog sistema ove interakcije mogu da imaju različit ukupan doprinos vrednosti lipofilnosti [34, 35]. Ona predstavlja fizičko-hemijski parametar koji je od suštinskog značaja za biološku aktivnost neke supstance, a koji proističe iz same strukture ćelijske membrane. Kako je ćelijska membrana sačinjena od fosfolipidnog dvosloja sastavljenog od lanaca masnih kiselina orijetisanih svojim ugljovodoničnim lancima ka unutrašnjosti, a ka spoljašnjosti obeju strana membrane svojim hidrofilnim glavama, to je pasivan prolaz lipofilnim jedinjenjima kroz ćelijsku mebranu znatno olakšan [34].

2.3.2. Određivanje lipofilnosti – direktne, hromatografske i QSPR tehnike

Kako bi se standardizovao postupak za određivanje lipofilnosti Hansh i saradnici [36] su uveli podeoni koficijent za sistem oktanol-voda $\log K_{OW}$ (Jedn. 9) i razvili tzv. metod mućkanja (shake-flask) za merenje raspodele analita između ove dve faze.

$$\log K_{OW} = \log(C_O/C_W) \quad (9)$$

gde su C_O i C_W koncentracije supstance u oktanolu, odnosno vodenoj fazi.

Predloženi metod se može primeniti na jedinjenja sa vrednostima podeonog koeficijenta u rasponu od -2 do 4 log jedinice, pri čemu $\log K_{OW} > 0$ karakteriše supstance rastvorne u lipidnom sloju, dok je $\log K_{OW} < 0$ svojstvo polarnih jedinjenja rastvornih u vodi [34].

Particioni koeficijent $\log K_{OW}$ se odnosi na neutralne supstance ili jonizabilne u njihovom neutralnom obliku. Ukoliko susptanca podleže sekundarnim ravnotežnim procesima, bilo u organskom ili vodenom sloju (protoliza, građenje jonskih parova, agregacija), potrebno je koristiti distribicioni koeficijent D .

U slučaju protolitičkih procesa $\log K_{OW}$ zavisi od pH i povezan je sa $\log D$ sledećim jednačinama:

$$\log K_{OW}(\text{HA}) = \log D + \log(1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}) \quad (10)$$

$$\log K_{OW}(\text{B}) = \log D + \log(1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}) \quad (11)$$

gde HA i B odgovaraju neutralnom obliku slabe monoprotične kiseline, odnosno monoprotične baze. Za slučaj poliprotičnih kiselina i baza date jednačine postaju složenije [34].

Predloženi metod ima niz nedostataka, pre svega zahteva dosta vremena, ogromnu količinu organskih rastvarača, a u izvesnim slučajevima je veoma teško odrediti koncentraciju analita u jednoj ili obe faze. Zbog toga su razvijene različite indirektno metode, među kojima vodeće mesto imaju hromatografske tehnike.

Hromatografski pristup je jednostavan i zasnovan je na tipičnim reverzno-faznim sistemima. Obično se kao stacionarna faza koristi C18-modifikovani silika-gel koji se po strukturi može porediti sa strukturom fosfolipida u ćelijskoj membrani. Zbog svoje anizotropije nepolarne stacionarne faze mnogo bolje opisuju particiju u fosfolipidnom dvosloju u odnosu na izotropni oktanol. Metod podrazumeva hromatografisanje standardnih jedinjenja poznatih $\log K_{OW}$ vrednosti pod istim uslovima sa ispitivanim supstancama čija se lipofilnost želi odrediti [34].

Na osnovu retencionih parametara R_P standardnih jedinjenja pravi se kalibracioni model $\log K_{OW} = a + b \log R_P$ pomoću kojeg se na osnovu retencije ispitivanih jedinjenja lako može izračunati $\log K_{OW}$.

Podjednako je rasprostranjena primena kako visokoefikasne tečne hromatografije u koloni (HPLC) tako i hromatografije na tankom sloju (TLC).

U slučaju tankoslojne hromatografije, tačnije, reverzno-fazne tehnike (RP-TLC), različiti parametri retencije se mogu koristiti. Kako retencija analita linearno zavisi od udela organske komponente ϕ u mobilnoj fazi, prema jednačini 12 [37] to se dve veličine mogu izdvojiti kao parametri lipofilnosti: odsečak R_M^0 koji predstavlja R_M

vrednost svedenu na nulti sadržaj organske komponente u mobilnoj fazi (čistu vodu) i nagib b koji je povezan sa specifičnom hidrofobnom površinom jedinjenja [38].

$$R_M = R_M^0 + b\phi \quad (12)$$

Kako često postoji linearna zavisnost između nagiba i odsečka u gornjoj jednačini to se smatra da je upotreba nagiba validna alternativna mera lipofilnog karaktera [39]. Međutim, ova veza nagiba i odsečka nalazi se samo u slučaju strukturno sličnih jedinjenja, odnosno kongenernih serija.

Bieganowska i saradnici [40] su definisali novi parametar hidrofobnosti, C_0 kao odnos odsečka i nagiba iz gornje jednačine i pokazali da se u određenim slučajevima on bolje koreliše sa lipofilnošću.

Novije studije su pokazale da se bolje zavisnosti retencije od lipofilnosti dobijaju ukoliko se na retencione podatke primeni regresija glavnih komponenti (PCR) [41]

Za određivanje lipofilnosti jedinjenja primenom hromatografskih tehnika, najčešće se koristi C18-modifikovani silika-gel kao stacionarna faza. Međutim, svega 50% silanolnih grupa je hemijski modifikovano, ostatak slobodnih grupa može da stupa u interakciju sa anlitom kroz građenje vodoničnih veza ili jonsku izmenu, što za posledicu ima razvlačenje zona, te samim tim dovodi do greškom opterećene vrednosti lipofilnosti. U slučaju prisustva silanofilnih interakcija iste se mogu umanjiti dodatkom maskirajućeg agensa (trietilamin, amonijačni pufer i sl.) mobilnoj fazi. Ovo naročito važi u slučaju baznih jedinjenja. U novije vreme se proizvode bazno deaktivirane stacionarne faze prilagođene razdvajanju baznih jedinjenja [34].

Hromatografski pristup određivanju lipofilnosti ima niz prednosti u odnosu na tradicionalnu, direktnu metodu, pre svega znatno kraće trajanje eksperimenta, bolja reproduktivnost, neosetljivost na prisustvo nečistoća i degradacionih proizvoda koji se tokom hromatografskog procesa izdvajaju, širi dinamički opseg, on-line detekcija, manje količine uzoraka potrebne za analizu, kao i lakša priprema uzoraka.

Pored hromatografskih tehnika, različiti računarski programi zasnovani na QSPR modelima, mogu se koristiti za izračunavanje lipofilnosti. Pri tome se sve

računske metode mogu svrstati u dve grupe: fragmentacione i one koje uzimaju u obzir svojstva celog molekula. U prvom slučaju osnovni princip je podela molekula na fragmente ili atome i naknadnog sabiranja doprinosa pojedinih podstruktura, odnosno atoma (fragemanat) ukupnoj $\log K_{OW}$ vrednosti. Metode zasnovane na svojstvima molekula podrazumevaju korišćenje deskriptora koji opisuju ceo molekul (topološki deskriptori). Programi koji koriste nekoliko osnovnih fragmentacionih tehnika kao što su Fujita-Hansch-ova [42], Rekker-ova [43] i Hancsh-Leo-ova metoda [44] su: KLOGP, KOWWIN, CLOGP, ACD/LogP. Programi koji koriste određene karakteristike molekula su: ABSOLV, ChemProp, VolSurflogP, MlogP, AlogPS, CSlogP.

2.3.3. Ostali podeoni koeficijenti od značaja u biološkim sistemima

Podeoni procesi u biološkim sistemima su raznovrsni, a od posebnog značaja su oni koji utiču na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju supstanci iz organizma. Među njima treba izdvojiti aporpciju u gastrointestinalnom traktu (% Abs), raspodelu u sistemu krv-koža i voda-koža (K_P , K_{SC}) i krv-moždana-barijera (BBB).

Apsorpcija u gastrointestinalnom traktu se procenjuje kao stepen apsorpcije izražen u procentima, odnosno razlika između administrirane doze supstance i izlučene putem urina, žuči i fecesa u neizmenjenom obliku i obliku njihovih metabolita. Predstavlja važan faktor u razvoju lekova koji se administriraju oralno [45].

Raspodela u sistemu krv-koža izražava se kao podeoni koeficijent P_S koji predstavlja odnos koncentracija analita u koži i krvi, odnosno plazmi. U slučaju sistema voda-koža raspodela se često izražava kao koeficijent permeabilnosti K_P , odnosno koeficijent raspodele K_{SC} koji predstavlja odnos koncentracija susptance u koži, odnosno vodi. Ovi parametri su od esencijalne važnosti u farmakokinetičkim studijama, naročito za ona jedinjenja – kandidate za transdermalnu upotrebu.

Moždana barijera predstavlja jedan od najvažnijih entiteta, jer ga čini ćelijski sistem sačinjen od kapilara i endotelijalnih ćelija koji odvajaju mozak od systemske krvne cirkulacije. Zbog toga je poseban značaj posvećen analizi raspodele različitih jedinjenja u sistemu krv-moždana barijera, pre svega u cilju razvoja novih lekova koji ciljano deluju na centralni nervni sistem (neophodan pasivan i aktivan transport kroz

krv-moždanu barijeru) odnosno poseduju periferno dejstvo (ne prolaze barijeru). Raspodela se često izražava odnosom koncentracije supstance u mozgu, odnosno krvi koji je dat sledećom jednačinom $\log BBB = \log (C_{\text{mozak}}/C_{\text{krv}})$ [46]. Pored datog koeficijenta često se uzimaju u obzir stepen permeabilnosti izražen kao proizvod permeabilnost-površina (*PS*), odnosno koeficijent permeabilnosti (*PC*) [47].

2.4. Linearni odnosi energije solvatacije

Linearni odnosi energije solvatacije (LSER) zasnovani su na univerzalnijem konceptu poznatom kao linearni odnosi slobodnih energija (Linear Free Energy Relationships - LFER). Najjednostavnije rečeno, model predstavlja sumu doprinosa različitih interakcija (dipolarnih, polarizabilnih, vodoničnih veza) ukupnoj vrednosti neke fizičke veličine (retencioni parametar u hromatografskim sistemima, pomeranje apsorpcionih maksimuma u UV-VIS, IR ili NMR spektroskopiji i sl.). Ovakav pristup nije termodinamički striktno uspostavljen, ali je od neprocenjive važnosti jer pomoću parametara koji kvantitativno opisuju dominantne interakcije u datom sistemu, omogućava mapiranje istih, kako u pogledu sposobnosti okruženja da interaguje sa nekim jedinjenjima, tako i u pogledu procene parametara samog jedinjenja. Osim toga, metod omogućava mapiranje interakcija odgovornih za različite fizičko-hemijske procese (transfer između različitih faza sistema i sl.).

Najnovija, široko prihvaćena, simbolička prezentacija LSER modela predstavljena od strane Abrahama i saradnika data je jednačinom (13):

$$SP = I + eE + sS + aA + bB + vV \quad (13)$$

Pri ovome, SP predstavlja određeno svojstvo rastvorka koje se odnosi na njegovu raspodelu između dve faze (npr. $\log k$), a I konstantu koja zavisi od svojstava sistema. Karakteristike rastvorka date su velikim slovima A , B , S , E i V i odnose se redom na: polarizabilnost u višku (u odnosu na n -alkan iste molarne zapremine), dipolarnost, sposobnost za građenje vodoničnih veza pri čemu se supstanca može ponašati kao proton-donor, odnosno proton-akceptor. Koeficijenti, označeni malim slovima, predstavljaju doprinose sistema, komplementarne parametrima rastvorka. Na primer, a je proton-baznost (komplementarnu proton-kiselosti rastvorka A), odnosno koeficijent b predstavlja proton-kiselost (komplementarnu proton-baznosti rastvorka B). Dati koeficijenti se određuju merenjem SP za unapred odabrani set supstanci sa poznatim vrednostima E , S , A , B i V , te primenom višeparametarske linearno-regresione analize.

Gornja LSER jednačina se menjala tokom prethodne dve i po decenije. Iako je sada LSER pristup usmeren ka razumevanju svojstava rastvorka, na samom početku bio je definisan sa ciljem da se razumeju tipovi interakcija u čistim rastvaračima (tzv.

solvatohromni parametri rastvarača), radi boljeg tumačenja njihovog uticaja na kinetiku organskih reakcija. Kako se naglasak sa skala definisanih za rastvarače pomerao ka skalama definisanim za rastvorke bilo je potrebno uvesti novu notaciju i neke od skala redefinisati. U cilju boljeg razumevanja LSER pristupa ovde će biti prikazan kratak istorijat njegovog razvoja.

2.4.1. Kamlet-Taftove solvatohromne skale – spektroskopski definisani parametri rastvarača

Jedan od najranije primenjivanih LSER modela mogao bi da se prikaže jednačinom (14):

$$SP = I + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta \quad (14)$$

Ovde SP predstavlja neko svojstvo rastvarača (logaritam konstante brzine neke hemijske reakcije ili solvatohromno pomeranje apsorpcionih, UV-VIS, maksimuma). Parametri π , δ , α i β predstavljaju redom: mere polarnosti rastvarača, njegove polarizabilnosti, sposobnosti vodoničnog vezivanja kao proton-donora, odnosno kao proton-akceptora. Skala dipolarnosti/polarizabilnosti (tzv. π^* -skala) rastvarača bila je prva definisana od strane M. Kamlet-a, R. Taft-a i J. Aboud-a [48]. Pri tome je parametar π^* definisan kao efekat datog rastvarača na pomeranje apsorpcionog maksimuma solvatohromnog indikatora i dat je jednačinom (15):

$$\pi^* = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_1 - \nu_0} \quad (15)$$

Parametar ν predstavlja talasni broj apsorpcionog maksimuma datog solvatohromnog standarda u određenom rastvaraču. Parametri ν_0 i ν_1 predstavljaju talasne brojeve apsorpcionih maksimuma u referentnim rastvaračima, cikloheksanu i dimetilsulfoksidu, redom. Na taj način je skala dovedena u ospeg od 0 do 1. Pod datim uslovima apsorpcioni maksimumi odgovaraju $p-\pi^*$, odnosno $\pi-\pi^*$ elektronskim prelazima. Data jednačina se može napisati u nešto izmenjenom obliku, tako da više odgovara formi (14) kao:

$$\nu = \nu_0 + s\pi^* \quad (16)$$

$$SP = SP_0 + s\pi^* \quad (17)$$

Odnosno, ukoliko se odnosi na svojstva rastvorka ili određeni termodinački proces gde SP može biti rastvorljivost, koeficijent raspodele između dve faze i sl. može biti data u obliku jednačine (17).

Kamlet i Taft su veoma pažljivo odabrali solvatohromne indikatore za izgradnju π^* -skale vodeći računa da doprinosi spektralnim pomeranjima usled dipolarnih–polarizabilnih interakcija sa rastvaračem budu visoki, a da uticaji vodonočnih vezivanja budu minimalni. Drugim rečima da budu selektivna mera dipolarnosti/polarizabilnosti rastvarača. Četiri takve supstance su bile predložene od strane autora: *N,N*-dietil-3-nitrobenzen, 4-metoksi- β -stiren, 1-etil-4-nitrobenzen i 4-nitroanizol. Jasno je da data jedinjenja nemaju sposobnost da učestvuju u vodoničnom vezivanju kao proton-donori, a da su njihova proton-akceptorska svojstva veoma slabo izražena. Ovo je potvrđeno i dobrom linearnom zavisnošću u rastvaračima koji mogu donirati svoje protone poput alifatičnih alkohola, odnosno amina. Ovde je važno istaći da je za razliku od prethodnih solvatohromnih i drugih skala polarnosti rastvarača, π^* -skala zasnovana na većem broju solvatohromnih indikatora. Glavni nedostatak ovako definisane π^* skale predstavljala je nemogućnost da se potpuno odvoje doprinosi polarizabilnih od dipolarnih interakcija. Najočigledniji slučaj predstavlja sam benzen. Vrednost parametra π^* za benzen je relativno visoka $\pi^* = 0,59$ što je neočekivano za rastvarač koji se po polarnosti ne razlikuje znatno od *n*-heksana. Ovo ukazuje na to da se pomenutom skalom istovremeno, pored dipolarnosti, može meriti i polarizabilnost. Zbog toga ubrzo nakon publikovanja prvih radova vezanih za skalu dipolarnosti, Kamlet i saradnici uvode korekcionni parametar δ kojim bi se odvojeno uračunale i polarizabilne interakcije [49]. Stoga oni predlažu da u slučaju razmatranja procesa u kojima polarizabilne interakcije nisu zanemarljive (aromatični rastvarači) jednačine (18) i (19) treba pisati kao:

$$v = v_0 + s(\pi^* + d\delta) \quad (18)$$

$$SP = SP_0 + s(\pi^* + d\delta) \quad (19)$$

Očiglednost potrebe za ovakvom korekcijom autori su demonstrirali na reakciji kvaternerizacije amina, odnosno na proučavanju njene brzine u različitim rastvaračima.

Oni su pokazali da se korišćenjem samo parametra π^* različiti rastvarači nalaze na zasebnim linearnim zavisnostima (alifatični, aromatični, polihlorovani). Korišćenje korekcionog faktora dovodi sve rastvarače na jednu pravu.

Interesantno je pomenuti da je ubrzo nakon pojave π^* -skale Snyder definisao svoju P' skalu ukupne polarnosti rastvarača i njenog pratioca, trougla selektivnosti. Takođe, postoji značajan stepen korelacije između parametra ε^0 – elucione moći rastvarača, definisanog od strane Snyder-a u slučaju normalno-fazne hromatografije i π^* -skale.

Definisanje skala proton-baznosti (kiselosti) pri vodoničnom vezivanju prethodilo je definisanju π^* -skale [50]. Autori su najpre definisali skalu proton-baznosti (β) na osnovu razlike u batohromnim pomeranjima apsorpcionih maksimuma: 4-nitroanilina u odnosu na N,N-dietil-4-nitroanilin ($\Delta\Delta_{v\leftarrow\text{NH}}$), odnosno 4-nitrofenola u odnosu na 4-nitroanizol ($\Delta\Delta_{v\leftarrow\text{OH}}$). Skale su definisane kao:

$$\beta_1 = \frac{\Delta\Delta_{v\leftarrow\text{H}_2\text{N}}}{2,80} \quad (20)$$

$$\beta_2 = \frac{\Delta\Delta_{v\leftarrow\text{HO}}}{2,80 \cdot 0,825} \quad (21)$$

Skale proton-kiselosti pri vodoničnom vezivanju za rastvarače autori su definisali na osnovu nekoliko fizičko-hemijskih parametara. Ovde će biti navedeni jedino parametri koji se odnose na spektroskopska pomeranja u oblasti UV-VIS apsorpcije: relativna pomeranja apsorpcionih maksimuma Dimroth-ove betainske boje u odnosu na 4-nitroanizol i relativna pomeranja apsorpcionih maksimuma Brooker-ove merocijaninske boje u odnosu na 4-nitronalizol. Date skale se mogu predstaviti jednačinama:

$$\alpha_1 = \frac{\Delta\Delta_{v(\text{betain} - \text{nitroanizol})}}{6,24} \quad (22)$$

$$\alpha_2 = \frac{\Delta\Delta_{v(\text{merocijanin} - \text{nitroanizol})} - 0,08}{6,24 \cdot 0,1584} \quad (23)$$

Ovako definisane solvatochromne skale polarnosti rastvarača, njihove sposobnosti za vodonično vezivanje kako u pogledu proton-donorskih tako i u pogledu proton-

akceptorskih svojstava su uspostavljane veoma pažljivim odabirom solvatohromnih standarda te odgovarajućih solvatohromno zavisnih procesa. Zbog toga se može tvrditi da one zaista u velikoj, pravoj meri selektivno odslikavaju sposobnost rastvarača da interaguje na određeni način.

2.4.2. Abrahamovi solvatohromni parametri – termodinamički pristup

Ideja da se solvatohromni parametri rastvarača mogu iskoristiti kao početne procene parametara rastvoraka predstavljala je odlučujući korak u razvoju LSER metodologije i pri tome omogućila da se isti upotrebe za proučavanje niza termodinamički vođenih procesa [51, 52]. Kako bi se parametri rastvorka mogli razlikovati od istih definisanih za rastvarače, uveden je indeks 2 da označi da se radi o parametru rastvorka. Na taj način bi LSER jednačina, koja bi opisivala neki fizički parametar rastvorka, mogla biti zapisana u sledećoj formi:

$$SP = SP_0 + d\delta_2 + s\pi_2 + a\alpha_2 + b\beta_2 + vV_I \quad (24)$$

Kako su prve ovakve jednačine bile razvijane za procese particije u sistemu voda-organski rastvarač, odnosno uslove reverzno-fazne hromatografije, pojavili su se izvesni problemi. Skale definisane preko spektroskopskih merenja nisu uključivale entropijski parametar, te striktno termodinamički nisu bile uspostavljene i stoga neprimenljive u potpunosti na particione procese. Rešavanju datog problema se najpre pristupilo uvođenjem tzv. parametra unutrašnje zapremine rastvorka (V_I , intrinsec volume, Leahy volume). Sa druge strane, skale koje su uspostavljene za rastvarače, tj. jedinjenja u kondenzovanom stanju, nisu bile u svim slučajevima primenljive na ista jedinjenja u dispergovanom stanju. Ovo je bilo naročito izraženo kod rastvarača koji pokazuju veliki stepen asocijacije građenjem vodoničnih veza (alkoholi, amini). Kako bi se došlo do njihovih parametara, napravljeni su modeli korišćenjem samo onih supstanci koje ne pokazuju odstupanja. Novi modeli su potom poslužili za određivanje novih deskriptora, i dati proces je ponavljan dok modeli nisu konvergirali ka najmanjim rezidualnim vrednostima.

Paralelno sa ovim, Abraham je definisao skale vodoničnog vezivanja posmatrajući termodinamiku formiranja 1:1 asocijata između proton-kiselina i proton-

baza u rastvaračima koji nisu imali mogućnost formiranja vodoničnih veza (ugljen-tetrahlrid) [53, 54]. Ovi parametri su obezbedili dobru polaznu osnovu za dalji razvoj LSER metodologije, odnosno određivanje novih parametara rastvorka. Parametar V_I , koji je u potpunosti zadovoljavao potrebe kada je reč o raspodeli tečnost – tečnost, bio je neprimenljiv u sistemima gas – tečnost i gas – čvrsta faza. Abraham je stoga uveo novi parametar L^{16} , te meru entropijskih doprinosa i doprinosa disperzionih interakcija. Ovaj parametar je zapravo predstavljao particioni koeficijent za sistem gas– n -heksadekan. Stoga se mogao jednostavno odrediti merenjem retencije u gasno-hromatografskim uslovima koristeći heksadekan kao stacionarnu fazu. Kasnijim radovima je pokazano da se ova veličina može dobiti primenom praktično bilo koje nepolarne stacionarne faze, koristeći pakovane i kapilarne kolone, čak i u velikoj meri povratnim izračunavanjem (na osnovu unapred kalibrisanih modela različitih particionih sistema).

Abraham je takođe definisao novi parametar, tzv. molarnu refrakciju u višku R_2 , i pokazao da se ona može mnogo bolje korelisati od do tada korišćene δ skale [55]. Ovaj parametar se može lako izračunati na osnovu jednačine (25) te nema potrebe za njegovim merenjem ili procenjivanjem.

$$R_2 = MR_x - 2,83195V_x + 0,52553 \quad (25)$$

MR_x predstavlja molarnu refrakciju jedinjenja i može se lako izračunati ukoliko se poznaje vrednost indeksa prelamanja prema sledećoj jednačini:

$$MR_x = 10 \left[\frac{\eta^2 - 1}{\eta^2 + 2} \right] V_x \quad (26)$$

η je indeks prelamanja i u slučaju čvrstih uzoraka može lako biti procenjen korišćenjem ACD softvera. V_x je molarna zapremina izračunata po jednostavnoj aditivnoj šemi koju je predložio McGowan [56], data u jedinicama (cm^3/mol), a u ovom slučaju kako bi se svi parametri usaglasili sa redom veličine ostalih skala ona je podeljena sa 100. Stoga MR_x ima jedinice (cm^3/mol)/10. Na ovaj način definisana veličina R_2 predstavlja polarizabilnost date supstance u višku u odnosu na n -alkan iste McGowan-ove zapremine. Umesto veličine V_I danas se isključivo upotrebljava McGowan-ova zapremina V_x .

U najnovijoj LSER notaciji predloženoj od strane Abraham-a i saradnika, jednačina (13), ovaj parametar je zamenjen parametrom E , ali je pri tome zadržao svoje hemijsko značenje.

Može se reći da je poslednji veliki korak učinjen ka unapređenju LSER metodologije bio uvođenje skala proton-kiselosti i proton-baznosti za jedinjenja sa više funkcionalnih grupa koje mogu učestvovati u vodoničnom vezivanju [57].

Autori su iskoristili prethodno određene 1:1 α_2^H i β_2^H vrednosti kako bi generisali solvatohromne modele za raspodelu datih jedinjenja u različitim binarnim sistemima voda–organski rastvarač. Dobijeni modeli su potom iskorišćeni kako bi se ponovo izračunale bolje fitovane vrednosti α i β , koje su za data jedinjenja sa više funkcionalnih grupa bolje odslikavale mogućnost istih da stupe u formiranje vodoničnih veza. Ovakvo novoizračunate vrednosti označene su sa $\sum \alpha_2^H$, odnosno $\sum \beta_2^H$. Ovakav način uspostavljanja skala koje predstavljaju sumiranje preko svih proton-donorskih i proton-akceptorskih mesta na molekulu iako dosta indirektan, urađen je jako pažljivo kako bi se dobili hemijski smisleni podaci, a ne samo dobro fitovane vrednosti. Činjenica da se ovi parametri rastvoraka koriste veoma uspešno za modelovanje različitih termodinamičkih veličina, potpuno nevezanih za njihovo preklono, svedoči da oni zapravo opisuju stvarne interakcije u sistemu. Kratak sumarni prikaz istorijata LSER dat je u **Tabeli 1**. Abraham-ovi parametri određeni su za hiljade jedinjenja ali, na žalost, nisu sabrani na jednom mestu kao literaturno dostupna baza podataka, izuzev par članaka u kojima je data veoma široka lista istih, uključujući parametre i za monovalentne jone. Međutim, u potpunosti su raspoloživi preko komercijalno dostupnog softverskog paketa ACD Labs.

Nažalost, dati softverski paket ne prepoznaje razlike u strukturnim izomerima, te za mnoga strukturno različita jedinjenja daje iste ili veoma bliske vrednosti parametara.

Tabela 1. Sumarni prikaz istorijata LSER pristupa

Godina	Parametri	Autori	Kratak opis
Sredina 70-tih	π^* , α , β i δ	Kamlet, Taft, Abboud	Definisanje solvatohromnih parametara rastvarača
Sredina 80-tih	π_2^* , α_2 , β_2 , δ_2 i V_I	Kamlet, Taft, Abraham	Parametri rastvoraka određeni na osnovu parametara rastvarača. Koristi se Leahy-eva zapremina V_I . Primena u RPLC.
Kasne 80-te, rane 90-te	π_2^{*H} , α_2^H , β_2^H , R_2 , L^{16} , V_x	Abraham, Carr i saradnici	1:1 konstante asocijacije korišćene za uspostavljanje skala α_2 , β_2 . Uvođenje parametra R_2 umesto δ . koristi se McGowan-ova zapremina V_x , uveden parametar L^{16} za objedinjeno predstavljanje zapremine i disperzionih interakcija u GC procesima.
Rane 90-te	π_2^{*H} , $\sum \alpha_2^H$, $\sum \beta_2^H$, R_2 , L^{16} , V_x	Abraham, Carr i saradnici	Kumulativne HB skale
Kasne 90-te, rane 2000-te	A , B , S , E i V	Abraham i saradnici	Nova notacija

2.4.3. Interpretacija LSER parametara

Za proces raspodele analita između dve faze, stacionarne i mobilne reverzno-faznog hromatografskog sistema jednačina (13) bi u nešto izmenjenom obliku glasila:

$$SP = I + e'(e_s - e_m)E + s'(s_s - s_m)S + a'(a_s - a_m)A + b'(b_s - b_m)B + v'(v_s - v_m)V \quad (27)$$

pri čemu su koeficijenti dati kao:

$$e = e'(e_s - e_m) \quad (28)$$

$$s = s'(s_s - s_m) \quad (29)$$

$$a = a'(a_s - a_m) \quad (30)$$

$$b = b'(b_s - b_m) \quad (31)$$

$$v = v'(v_s - v_m) \quad (32)$$

Odavde je jasno da je svaki koeficijent Abraham-ove jednačine dat kao razlika pojedinačnih doprinosa od strane stacionarne i mobilne faze (s i m u indeksu, redom). Stoga se ovi koeficijenti moraju tumačiti kao relativni, tj. nulta vrednost istih ne mora označavati odsustvo interakcija u sistemu, već podjednaku zastupljenost datih interakcija u obe faze sistema, te njihovu kompenzaciju.

Parametar v predstavlja uticaj zapremine molekula na vrednost SP . Kako se u uslovima reverzno-fazne hromatografije kao stacionarna koristi C-18 modifikovani silika-gel, to se može očekivati da će se struktura ugljovodoničnih lanaca stacionarne faze lakše narušiti kako bi „ugostila“ molekul analita nego struktura vodenog sloja mobilne faze. Zbog toga ovaj član kvantitativno meri endrogenost procesa koja prati premeštanje molekula rastvorka iz jedne faze u drugu. Pod ovim uslovima očekuje se da je pomenuti parametar pozitivnog predznaka i da se veći molekuli više zadržavaju na nepolarnom sorbentu. Ukoliko bi se koristio sistem u kojem bi stacionarna i mobilna faza imale slične vrednosti parametra v (uslovi hromatografije na celulozi uz mobilne faze koje sadrže vodu, hromatografije hidrofilnih interakcija, te različitih reverzno-faznih hromatografskih sistema kod kojih se koriste tipični normalno-fazni rastvarači, veliki broj tipičnih normalno-faznih sistema) uticaj zapremine analita bi se mogao zanemariti.

Slično ovome mogu se razmatrati i ostali parametri LSER jednačine. Ukoliko se posmatra član koji opisuje vodonično vezivanje može se očekivati da će proton-donorske interakcije biti značajne u onim sistemima kod kojih se particija izvodi između rastvarača koji poseduju protone sposobne za građenje vodoničnih veza (voda, alkoholi, amini i sl.) i nepolarne organske faze tipa heksana i sl., te da će jedinjenja koja mogu primanjem protona graditi vodoničnu vezu biti favorizovana baš u fazi sistema koja to može da obezbedi. Stoga se kaže da su ovi parametri komplementarni, tj. za Abrahamove parametre koji definišu proton-baznost, odnosno, kiselost rastvorka, (B , A) odgovaraju parametri koji definišu proton-kiselost, odnosno, baznost sistema (b , a).

Stoga je pored same apsolutne vrednosti svakog od koeficijenata, važan i njihov predznak, koji ukazuje u kom pravcu su interakcije favorizovane.

Može se dalje reći da odsečak LSER jednačine predstavlja svojevrsan „tamni vilajet“. U okviru ove veličine smešteno je sve ono što nije obuhvaćeno drugim parametrima, na primer fazni odnos hromatografskog sistema, polarizabilnost koja nije obuhvaćena parametrima S , E i V , a koja empirijski postoji (S vrednost za cikloheksan je dogovorno uzeta za nulu, međutim to svakako nije u skladu sa stvarnim stanjem). Stoga bi se odsečak mogao interpretirati kao doprinos veličini SP , od strane analita kod kojeg su svi Abrahamovi parametri nula („nulti analit“) ili u sistemu kod kojeg su doprinosi svih članova jednaki nuli (podjednaki u obe faze) – nulti sistem.

2.4.4. Odeđivanje Abrahamovih solvatohromnih parametara

U najkraćim crtama ovde će biti prikazan Abrahamov metod određivanja parametara jedinjenja. Jasno je da se parametri V i E mogu izračunati već na osnovu same formule datog jedinjenja. Za veliki broj različitih sistema LSER jednačina (13) se može preformulisati tako da se poznate vrednosti (na levoj strani) nalaze odvojene od nepoznatih (na desnoj strani):

$$SP - eE - vV = sS + aA + bB \quad (33)$$

Kako je na ovaj način sistem od pet nepoznatih sveden na svega tri, potrebno je poznavati vrednost veličine SP u najmanje tri dovoljno različita, unapred kalibrisana sistema (sa poznatim parametrima s , a i b). Zatim se rešavanjem sistema od tri jednačine sa tri nepoznate mogu odrediti parametri A , B i S . Naravno, mnogo je bolje date parametre odrediti na osnovu većeg broja sistema, sa što većim razlikama u s , a i b , koristeći se linearnom regresijom više promenljivih. Na ovaj način, Abraham i saradnici su koristeći, mahom retencije u GC i HPLC sistemima, te određivanjem particionog koeficijenta, odnosno logaritmovane vrednosti ($\log P$) za različite sisteme vode i organskih rastvarača, odredili parametre ne samo za jednostavne, male molekule već i za složena farmakološki aktivna jedinjenja poput: lidokaina, prokaina, ibuprofena i naproksena [58], te 30 derivata tripeptida [59].

2.4.5. Primena LSER pristupa u određivanju partitionih koeficijenata

LSER metodologija nalazi široku primenu u modelovanju partitionih procesa, kako onih u životnoj sredini, tako i onih vezanih za različite biološke sisteme. Ovde će biti dat kratak sumarni pregeled LSER modela koji povezuje neke od najznačajnijih parametara vezanih za particione procese u goreopisanim sistemima.

Veza između zemljište-voda podeonog koeficijenta i Abrahamovih solvatohromnih parametara data je dvema jednačinama koje su razvili Nguyen i saradnici [60] i Pool i saradnici [61] (Jednačine 34 i 35).

$$\log K_{OC} = (0,14 \pm 0,10) + (0,15 \pm 0,15)A - (1,98 \pm 0,14)B - (0,72 \pm 0,14)S + (1,10 \pm 0,10)E + (2,28 \pm 0,14)V \quad (34)$$

$$\log K_{OC} = (0,19 \pm 0,10) - (0,23 \pm 0,10)A - (2,33 \pm 0,12)B + (0,72 \pm 0,05)E + (2,12 \pm 0,11)V \quad (35)$$

LSER model koji povezuje intestinalnu apsorpciju supstance i solvatohromne parametre razvijen je od strane Zhao-a i saradnika [45] i može se predstaviti sledećom jednačinom:

$$\text{Abs (\%)} = 92 - 21,7A - 21,1B + 2,94E + 4,10S + 10,6V \quad (36)$$

Veza između raspodele krv-koža i solvatohromnih parametara data je sledećim modelom:

$$\log P_{\text{skin}} = -0,273 - 0,248A - 0,625B + 0,739V - 0,733I_a + 0,025I_{\text{rab}} \\ n = 40, R = 0,871, S.D. = 0,27, F = 21,3 \quad (37)$$

gde se parametar I_a odnosi na podset karboksilnih kiselina za koje ima vrednost jedinice, u suprotnom slučaju nula. I_{rab} se odnosi na podatke *in vivo* studije na zečevima kada ima vrednost 1, odnosno miševima kada ima vrednost 0 [62].

Modelovanje permeabilnosti (K_p) i raspodele jedinjenja (K_{SC}) u sistemu koža-voda može se izvesti sledeće LSER relacije:

$$\log K_P = -(5,426 \pm 0,101) - (0,473 \pm 0,148)A - (3,000 \pm 0,152)B - (0,473 \pm 0,0095)S - (0,106 \pm 0,129)E + (2,296 \pm 0,137)V \quad n = 119, R = 0,832, S.D. = 0,46, F = 112 \quad (38)$$

$$\log K_{SC} = (0,341 \pm 0,093) - (0,024 \pm 0,137)A - (2,178 \pm 0,158)B - (0,206 \pm 0,096)S + (0,341 \pm 0,133)E - (2,178 \pm 0,158)V \quad n = 45, R = 0,926, S.D. = 0,46, F = 97 \quad (39)$$

Veza između produkta permeabilnost-površina kroz krv-moždanu barijeru dat je sledećim LSER modelom [47]:

$$\log PS = -(0,716 \pm 0,383) - (1,802 \pm 0,349)A - (1,603 \pm 0,401)B - (0,974 \pm 0,146)S + (1,893 \pm 0,245)V \quad n = 30, R^2 = 0,868, S.D. = 0,52, F = 41,2 \quad (40)$$

Postoji nekoliko očiglednih manjkavosti LSER pristupa i one bi mogle biti pobrojane na sledeći način. Odsečak LSER jednačina je praktično nemoguće protumačiti, jer se u njemu nalaze svi parametri sistema ili samih rastvoraka koji odstupaju od usvojenih skala, ili zavise od samog sistema. Kako su parametri koji figurišu u LSER jednačinama spektroskopskog porekla, to je njihova linearna korelacija sa termodinamičkim veličinama čisto empirijske prirode, a nije zasnovana na termodinamičkim zakonima. Značajnim nedostakom može se smatrati i odsustvo parametra kojim bi se mogao opisati oblik molekula rastvorka. LSER takođe, ne razlikuje eksplicitno entropijske i entalpijske doprinose retenciji. Kada se primenjuje na dvofazne sisteme, praktično nikakve apsolutne vrednosti se ne mogu zaključiti na osnovu LSER razmatranja. Uvek se data informacija odnosi na svojstvo jedne faze u odnosu na drugu. LSER metodologija nije najsrećniji izbor za predviđanje retencije, jer za tu svrhu nije dovoljno precizna. Nepreciznost potiče od toga što nisu sve interakcije koje se javljaju u hromatografskom sistemu obuhvaćene modelom. Takođe postoji u izvesnim slučajevima značajna kovarijansa među skalama rastvoraka. Ovo se najpre odnosi na parametre E , S , V i L^{16} , jer sa porastom zapremine molekula raste njegova polarizabilnost, odnosno veličine E i S koje zavise od iste.

Prednosti LSER pristupa leže u tome što uprkos smanjenoj preciznosti u predviđanju retencije u odnosu na druge pristupe (QSRR), on pruža najbolji uvid u fundamentalne interakcije koje kontrolišu retenciju.

2.5. Hemometrijski pristup modelovanju partitionih procesa

U ovom delu biće iznete osnovne matematičke postavke sledećih tehnika koje se koriste u kalibraciji: univarijantne kalibracije metodom najmanjih kvadrata (OLS), višestruke linearne regresije (MLR), regresija glavnih komponentata (PCR) i regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata (PLS). Takođe će biti diskutovani osnovni statistički parametri procene kvaliteta kalibracionih modela kao i neke tehnike validacije.

2.5.1. Osnovne tehnike modelovanja

2.5.1.1. Univarijantna regresija metodom najmanjih kvadrata

Linearni model kojim se povezuje jedna zavisna promenljiva sa jednom nezavisnom varijablom predstavlja se sledećom relacijom:

$$y = a + bx + e \quad (41)$$

gde su a i b regresioni koeficijenti, a je odsečak, b je nagib, dok e obuhvata rezidualne (odstupanja) usled odstupanja podataka od idealnog linearnog odnosa [64]. Osnovni zadatak prilikom konstruisanja linearnog modela je da se regresioni koeficijenti odaberu tako da rezidualne greške modela budu svedene na minimum:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (42)$$

gde je e_i greška reziduala, odnosno ostupanje eksperimentalne vrednosti y_i od predviđene \hat{y}_i . Pri tome se najčešće koristi metod najmanjih kvadrata. U ovom slučaju traži se onaj pravac (vrednost nagiba i odsečka) koji daje najmanju vrednost sume kvadrata reziduala, $S = \sum e_i^2$ [64]. Ovaj uslov je ispunjen kada su parcijalni izvodi sume reziduala po nagibu i odsečku jednaki nuli.

$$\frac{\partial S}{\partial a} = 0 \text{ i } \frac{\partial S}{\partial b} = 0 \quad (43)$$

Rešavanjem datog uslova dobijaju se vrednost nagiba prema sledećim relacijama:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \text{ i } a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (44)$$

gde je \bar{x} srednja vrednost svih vrednosti x_i , a \bar{y} srednja vrednost svih y_i vrednosti.

Greške nagiba i odsečka, kao i odgovarajući intervali pouzdanosti, proporcionalni su standardnoj grešci modela $s_{y/x}$ i dati su sledećim relacijama:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

(45)

$$L_{1,2a} = a \pm t_{(n-2)} s_a$$

(46)

$$L_{1,2b} = b \pm t_{(n-2)} s_b$$

(47)

gde je t kritična vrednost Studentove t -raspodele za određeni nivo poverenja i broj stepeni slobode [64]. Standardna greška modela predstavlja kvadratni koren sume kvadrata rezidualnih vrednosti podeljenih brojem stepeni slobode koji u slučaju linearne regresije iznosi $n - 2$, gde je n broj kalibracionih tačaka.

2.5.1.2. Višestruka linearna regresija

Linearni model kojim se povezuje više nezavisnih promenljivih sa jednom zavisnom promenljivom naziva se višestruki linearni regresioni model i prikazuje se sledećom relacijom:

$$y_n = a + b_1 x_{n1} + b_2 x_{n2} + \dots + b_m x_{nm} + e_n \quad (48)$$

gde je n broj objekata, a m broj varijabli.

Matrični prikaz gornje relacije glasi:

$$y = Xb + e \quad (49)$$

gde je \mathbf{y} vektor zavisne promenljive, \mathbf{X} matrica podataka, \mathbf{b} vektor regresionih koeficijenata, a \mathbf{e} vektor rezidualnih vrednosti.

Optimalne vrednosti regresionih koeficijenata se dobijaju za najmanju vrednost sume kvadrata reziduala, $\mathbf{e}^T \mathbf{e}$, što je postignuto kada vrednosti regresionih koeficijenata iznose:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (50)$$

Neophodno je naglasiti da se za izračunavanje vrednosti regresionih koeficijenata koristi inverzna matrica $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$. U slučaju približno kolinearnih varijabli, inverzna matrica matrice $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$ postaje nestabilna ili je nije moguće izračunati. Slično važi i kada je broj nezavisnih promenljivih veći od broja objekata ($m > n$) [64].

Korišćenje svih raspoloživih varijabli dovodi do boljeg uklapanja modela u podatke seta za kalibraciju, drugim rečima model biva pretreniran. Međutim, osnovni cilj linearnog modelovanja nije povećanje uklapanja u podatke seta za kalibraciju, već povećanje prediktivnih svojstava test seta. Da bi se smanjio broj nezavisno promenljivih potrebno je pronaći kriterijum za odbacivanje onih varijabli koje u najmanjoj meri doprinose y -vrednostima. Varijable koje nisu dostupne za sve ispitivane objekte se odbacuju. Uklanjaju se, takođe, i varijable koje imaju konstantne vrednosti za sve objekte, kao i one koje su međusobno visoko korelisane. Ukoliko su dve varijable visoko korelisane, zadržava se ona koja se bolje koreliše sa y [64].

2.5.1.3. Regresija glavnih komponenata

Regresija glavnih komponenti (PCR) predstavlja multivarijantnu metodu koja, takođe, rešava problem kolinearnosti i redukcije broja nezavisno promenljivih, pri tome regresione varijable ne predstavljaju više originalne x -vrednosti već skorove glavnih komponenata.

PCA razlaže centriranu matricu \mathbf{X} na skorove \mathbf{T} i koeficijente latentnih varijabli \mathbf{P} . Za određeni broj glavnih komponenata, koji je uglavnom manji od broja varijabli u originalnoj \mathbf{X} -matrici.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (51)$$

Kako prema MLR modelu važi $y = Xb + e$ to zamenom matrice X matricom skorova T dobija se sledeći regresioni model:

$$y = Xb + e = (TP^T)b + e_T = Tg + e_T \quad (52)$$

sa novim regresionim koeficijentom $g = P^T b$ i greškom e_T . Visokokorelisane x -varijable su na ovaj način svedene na nekoliko vektora skorova koji međusobno nisu korelisani [64]. Kompleksnost PCR regresionog modela može biti optimizovana korišćenjem određenog broja glavnih komponentata. Regresioni koeficijenti, saglasno tekstu iz prethodnih poglavlja, dati su sledećim izrazom:

$$g = (T^T T)^{-1} T^T y, \text{ pa su konačni regresioni koeficijenti } b_{PCR} = Pg$$

Optimalan broj glavnih komponentata za PCR model bira se tako da one na najbolji način predviđaju y -varijablu, pri čemu procenat objašnjene varijanse u x -vrednostima nije od primarnog značaja. Drugim rečima, traži se optimalan podset određenog broja glavnih komponentata, a ne prvih nekoliko komponentata sa najvećom varijansom, jer je vrlo često neka dalja glavna komponenta pogodna za predviđanje y -varijable. Odabir dobrog seta PCA skorova vrši se na jedan od sledeća dva načina.

- a) selekcija prvih nekoliko PCA komponentata koje obuhvataju određeni procenat ukupne varijanse podataka X (npr. 95%);
- b) selekcija PCA komponentata koje pokazuju maksimalnu korelaciju sa y .

Pri tome se prediktivna sposobnost finalnog modela proverava primenom neke od metoda unakrsne validacije [64].

2.5.1.4. Regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata

PLS je jedna od najčešće korišćenih metoda za multivarijantnu kalibraciju koja povezuje matricu X sa vektorom y ili matricom Y , tj. više zavisno promenljivih [63, 64-68].

Po svojoj strukturi PLS i PCR modeli su praktično isti; vrednosti nezavisno promenljivih (x -podaci), se prvo prevedu u set od nekoliko intermedijernih linearnih latentnih varijabli (komponentata), koje se potom koriste za regresiju (MLR) sa zavisno

promenljivom y . PCR koristi skorove glavnih komponenata (dobijenih isključivo iz matrice X) kao komponente, dok PLS koristi komponente koje su povezane sa y . Kriterijum koji se najčešće koristi u PLS za dobijanje intermedijarnih latentnih varijabli je maksimum kovarijanse između skorova i vrednosti y . Kovarijansa kombinuje veći deo varijanse u matrici X i velike vrednosti korelacionog koeficijenta sa posmatranom karakteristikom, zbog čega se PLS smatra kompromisom između PCR (maksimum varijanse u modelovanju X) i MLR (maksimum korelacije u modelovanju y) metoda. PLS i PCR su linearne metode, odnosno konačne latentne varijable koje predviđaju modelovanu karakteristiku, y , predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih varijabli, kao i u MLR. Međutim, regresioni koeficijenti u konačnim MLR, PCR i PLS modelima su različiti, kao i njihova prediktivna svojstva [64].

PLS se najčešće koristi za regresiju x -varijabli sa jednom y -varijablom na sledeći način

1. Prvo se izračunava PLS komponenta kao latentna varijabla koja pokazuje maksimum kovarijanse između skorova i modelovane karakteristike y . Ovde je potrebno naglasiti da je kriterijum „kovarijanse” zapravo kompromis između maksimalne vrednosti korelacionog koeficijenta (MLR) i maksimalne varijanse (PCA).
2. Informacije prve komponente se uklanjaju iz x -podataka, nakon čega zaostaje *matrica odstupanja* (residual matrix, X_{RES}) koja ima isti broj varijabli kao i originalna matrica, ali je unutrašnja dimenzionalnost umanjena za jedan.
3. Iz matrice odstupanja odabira se sledeća PLS komponenta, prema prvom uslovu
4. Prethodno opisani postupak se ponavlja sve dok se uočavaju poboljšanja u modelovanju y . Broj PLS komponenata određuje kompleksnost modela. Takođe, optimalan broj komponenata određuje se pomoću unakrsne validacije.

Optimalan broj PLS komponenata je uglavnom manji od optimalnog broja PCA komponenata kod PCR metode, zbog činjenice da su PLS komponente razvijene kao latentne varijable visoko korelisane sa y . Sa povećanjem broja komponenata povećava se i sličnost između PCR i PLS modela [64].

2.5.2 Tehnike validacije i parametri kvaliteta kalibracionih modela

Svaki kalibracioni model ima smisla samo ako je odgovarajući kriterijum za ocenu njegovih performansi procenjen i pirlmenjen. Jasno je da su rezidualne greške, e_i , osnova za određivanje karakteristika - performansi modela:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (53)$$

Gde y_i predstavlja eksperimentalnu, a \hat{y}_i predviđenu vrednost. Rezidualne greške koje pokazuju koliko se dobro model uklapa u već postojeće podatke nisu dovoljne, neophodna je procena performansi primenom modela na novim podacima. U zavisnosti od veličine seta podataka, postoji nekoliko načina testiranja [64, 69]:

1. Ukoliko su na raspolaganju podaci za veliki broj objekata, najbolje je podatke podeliti na tri seta: set za obuku (training set), koji sadrži približno 50% objekata, set za validaciju (validation set), sa oko 25% objekata i set za predikciju (prediction, test set), koji služi za testiranje krajnjeg modela na novim objektima.
2. U realnim uslovima, podatke je najčešće moguće podeliti na set za kalibraciju i set za predikciju. Potom se primenom pogodne tehnike unakrsne validacije (cross-validation, CV) trening set može dalje podeliti, pri čemu se datom krosvalidacionom tehnikom najpre određuje optimalna kompleksnost modela, poput optimalanog broja PLS komponenata ili varijabli za MLR analizu, a potom se dobijeni model primenjuje na test setu.
3. U slučaju manjeg broja objekata, CV metodom je moguće podeliti početne podatke na kalibracioni i test set. Svi objekti ulaze i u kalibracioni, validacioni i u set za predikciju, ali se jedan određeni objekat nikada ne koristi istovremeno i za kreiranje i za testiranje modela.
4. Kada se obrađuje jako mali broj objekata, svi podaci mogu da se koriste kao kalibracioni set, dok se CV metoda koristi za određivanje kompleksnosti modela. Zbog nedostatka test seta, predikciona moć dobijene zavisnosti je u najvećem broju slučajeva previše optimistična.

Podela objekata na set za obuku, validaciju i predikciju se, u najvećem broju slučajeva, izvodi jednostavnom metodom slučajnog uzorka.

Postoji nekoliko krosvalidacionih tehnika koje će ovde biti ukratko opisane: metoda preklapanja (venetian blinds), metoda susednih blokova (contiguous blocks), metoda slučajnog podseta (random subset), metoda izostavljanja jednog objekta (leave-one-out).

Metoda preklapanja je metoda kod koje se test set formira tako što se među podacima jedan objekat označi sa s - i svi objekti počevši od onog numerisanog kao prvi do s -tog objekta čine test set [64, 70]. Ova metoda je jednostavna i laka za primenu ukoliko postoji relativno veliki broj objekata kod kojih nije utvrđena određena pravilnost u redosledu.

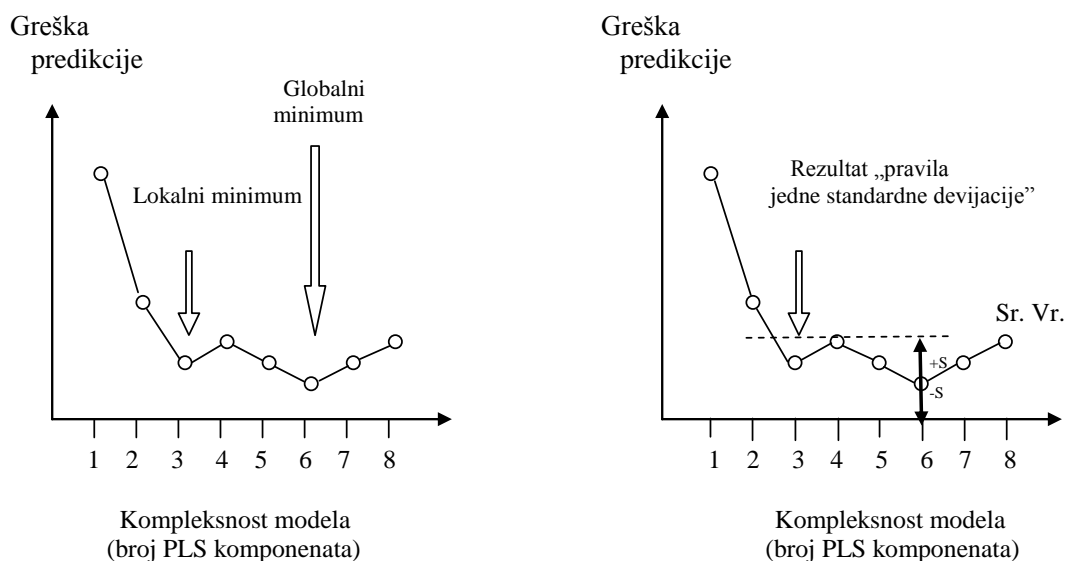
Kod metode susednih blokova svaki test set je određen odabirom susednih blokova koji sadrže n/s objekata iz seta podataka, počevši od prvog objekta u nizu. Slično prethodnoj metodi, ovaj način unakrsne validacije je jednostavan i primenljiv na set većeg broja objekata između kojih ne postoji određena pravilnost.

Kod metode slučajnog podseta određuje se s različitih test setova slučajnim odabirom n/s objekata iz seta podataka, tako da jedan određeni objekat bude samo u jednom test setu. Metoda slučajnog podseta obično daje dobre rezultate, naročito kada se selekcija podsetova ponavlja više puta. Ovom metodom se prevazilaze problemi koji se javljaju u unakrsnoj validaciji, kao što je mogućnost da se isti objekat pojavljuje u oba seta, tako se smanjenjem broja iteracija prevazilazi ovaj problem.

Kod metode izostavljanja jednog objekta svaki pojedinačni objekat u setu podataka se koristi kao test set. Ova metoda se uglavnom primenjuje kod manjeg broja objekata u setu ($n < 20$) [64].

Sa povećanjem broja nezavisno promenljivih u modelu, odnosno sa povećanjem kompleksnosti modela, greška predikcije za kalibracioni set se smanjuje. To bi značilo da se dovoljno kompleksan model može uklopiti u bilo koje podatke sa zanemarljivom devijacijom (rezidualima) između eksperimentalnih (pravih) i modelovanih (predviđenih) y -vrednosti. Ovakav model je, međutim, najverovatnije precenjen (overfitted) i često nije koristan za nove objekte. Kompleksnost modela određuje broj PLS i PCA komponenata, kao i broj varijabli, a optimalan model se određuje pomoću unakrsne validacije [64, 71, 72]. **Slika 2** prikazuje tri moguća načina određivanja optimalne kompleksnosti regresionog modela.

1. Određivanje tzv. globalnog minimuma, odnosno minimalne rezidualne greške. Ovakav model je obično prečenjen.
2. Određivanje tzv. lokalnog minimuma za dobijanje jednostavnijih modela koji nisu prečenjeni.
3. Prema “pravilu jedne standardne devijacije” pretpostavlja se da za model određene kompleksnosti postoji više vrednosti grešaka predikcije, što se postiže primenom unakrsne validacije. Srednja vrednost i standardna greška se izračunavaju za modele različite kompleksnosti i bira se najjednostavniji model čija je srednja vrednost greške predikcije jednu standardnu devijaciju iznad minimalne srednje greške predikcije. Slika 3b prikazuje ovaj postupak, pri čemu tačke na grafiku predstavljaju srednje vrednosti grešaka predikcije, dok je horizontalna linija povučena kroz tačku koja odgovara vrednosti globalnog minimuma plus jedna standardna devijacija [64].



Slika 2. Načini određivanja optimalne kompleksnosti regresionog modela.

Najjednostavniji model se bira tako da srednja greška predikcije bude ispod pomenute linije.

Kvalitet modela određen je greškom predikcije, odnosno rezidualima, $y_i - \hat{y}_i$, dobijenim za nezavisni test set, ili unakrsnom validacijom. Postoji veći broj različitih parametara koji se koriste za opisivanje raspodele grešaka, a izvode se iz reziduala.

Često korišćena veličina je tzv. *standardna greška predikcije* (standard error of prediction, *SEP*) koja se definiše na sledeći način:

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{z-1} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i - bias)^2} \quad (54)$$
$$bias = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i)$$

gde je y_i eksperimentalna vrednost, \hat{y}_i predviđena vrednost, z broj predikcija (koji u slučaju unakrsne validacije može biti veći od broja objekata), *bias*, odnosno greška predubedenja. Greška predubedenja predstavlja aritmetičku sredinu grešaka predikcije i ukoliko ne postoje sistematske greške, trebalo bi da bude bliska nuli. Primenom prethodne jednačine na kalibracioni set dobija se veličina koja se označava kao *standardna greška kalibracije* (standard error of calibration, *SEC*) [64].

Srednje kvadratno odstupanje ili srednja kvadratna greška (mean squared error, *MSE*) predstavlja srednju vrednost kvadrata grešaka:

$$MSE = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (55)$$

MSEC se odnosi na rezultate iz kalibracionog seta, *MSECV* na rezultate dobijene unakrsnom validacijom i *MSEP* na rezultate iz test seta. *MSE* i *SEP* se nalaze u sledećem odnosu:

$$SEP^2 = MSE - bias^2 \quad (56)$$

Pojmovi koji se koriste u multivarijantnoj analizi podataka su i *koren srednjeg kvadratnog odstupanja* (root mean squared error, *RMSE*) koji može biti određen za kalibraciju (*RMSEC*), unakrsnu validaciju (*RMSECV*) i predikciju (*RMSEP*). U slučaju zanemarljive vrednosti sistematske greške, *RMSEP* i *SEP* su gotovo identični, kao i *MSEP* i SEP^2 [64].

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (57)$$

U unakrsnoj validaciji često se koristi veličina označena kao *suma kvadrata odstupanja od predviđenih vrednosti* (predicted residual error sum of squares, *PRESS*), koja predstavlja sumu kvadrata grešaka:

$$PRESS = \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i)^2 = z \cdot MSE \quad (58)$$

Postupak odabira manjeg seta (m) od velikog broja varijabli (n) naziva se selekcija varijabli i koristi se prilikom konstruisanja višestrukog linearnog regresionog modela. Parametar koji se koristi kao kriterijum za odabir najboljeg MLR modela u procesu selekcije varijabli je tzv. *korigovani (podešeni) koeficijent determinacije* (adjusted coefficient of determination, R^2_{adj}) koji se može izraziti na jedan od sledeća dva načina:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{n-1}{n-m-1} (1 - R^2) \text{ i } R^2_{adj} = 1 - \frac{RSS/(n-m-1)}{TSS/(n-1)} \quad (59)$$

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \text{ i } TSS = \sum (y_i - \bar{y})^2 \quad (60)$$

gde je R^2 *koeficijent determinacije*, tj. deo varijanse koji je objašnjen modelom, RSS (residual sum of squares) je *suma kvadrata odstupanja*, TSS (total sum of squares) je *ukupna suma kvadrata odstupanja*, tj. suma kvadrata razlika aritmetičke sredine eksperimentalnih vrednosti y i svake vrednosti y pojedinačno [64].

3. NAŠI RADOVI

3.1. Određivanje lipofilnosti

U cilju razvoja TLC metode za određivanje lipofilnosti malih organskih molekula upotrebljen je skup od 59 jedinjenja poznatih $\log K_{OW}$ vrednosti, preuzetih iz EPI Suite baze podataka. Kompletna lista jedinjenja sa vrednostima $\log K_{OW}$ parametra data je u **Tabeli 3**.

Nekoliko tipičnih reverzno-faznih hromatografskih sistema (**Tabela 2**) je pri tome uzeto u obzir. Odabir organskih modifikatora je izveden prema sledećim kriterijumima: aceton je odabran zbog svojih dobrih proton-akceptorskih svojstava pri uspostavljanju vodoničnih veza, metanol kao dobar proton-donor i acetonitril kao rastvarač sa izraženim dipolarnim karakteristikama.

Tabela 2. Korišćeni hromatografski sistemi za procenu lipofilnosti na tankom sloju C-18 modifikovanog silika-gela

Oznaka	Mobilna faza
A	aceton-voda (40-90% v/v)
B	acetonitril-voda (40-90% v/v)
C	metanol-voda (40-90% v/v)

Kalibracioni modeli su dobijeni primenom OLS, PLS i PCR regresionih tehnika na retencione parametre (R_M) datih jedinjenja u određenim hromatografskim sistemima. Pored toga razmotrena je upotreba različitih hromatografskih deskriptora (R_M^0 , b , C^0).

Dobijeni modeli su dalje diskutovani u pogledu performasi, pre svega prediktivne moći, ali i jednostavnosti upotrebljenih računskih tehnika, i njihove pogodnosti, odnosno primenljivosti u odeđenom rasponu $\log K_{OW}$ vrednosti. Kao važan parametar uzeta je u obzir i zahtevnost hemometrijskih tehnika za brojem eksperimentalno određenih podataka.

Tabela 3. Literaturno preuzete vrednosti partitionog koeficijenta oktanol-voda ($\log K_{OW}$) za kalibracioni set jedinjenja

Red. broj	Naziv	$\log K_{OW}$	Red. broj	Naziv	$\log K_{OW}$
1	4-Aminofenol	0,04	32	4-Hlorefenol	2,39
2	Barbiturna kiselina	-1,47	33	Antracen	4,45
3	p-Anizidin	0,95	34	Acetofenon	1,58
4	1,2,3-Benzotriazol	1,44	35	2-Aminofenol	0,62
5	2,2'-Bihinolin	4,31	36	2,4,6-Trinitrofenol	1,33
6	Difenilamin	3,50	37	2,4,6-Trihlorfenol	3,69
7	2,2'-Dipiridil	1,50	38	2,4-Dinitrofenol	1,67
8	Anhidrid ftalne kiseline	1,60	39	4-t-Butilfenol	3,31
9	1,4-Naftohinon	1,71	40	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,16
10	2-Jodbenzoeva kiselina	2,40	41	2,6-Dimetilfenol	2,36
11	4-Hlorbenzoeva kiselina	2,65	42	Oksazepam	2,24
12	2-Nitrobenzaldehyd	1,74	43	Lorazepam	2,39
13	4-Bromanilin	2,26	44	Klonazepam	2,41
14	Fenol	1,46	45	Bromazepam	2,05
15	Benzofenon	3,18	46	Diazepam	2,82
16	3-Nitrobenzaldehyd	1,46	47	Prazepam	3,73
17	4-Aminobenzoeva kiselina	0,83	48	4-Metoksifenol	1,58
18	Ftalimid	1,15	49	Nitrazepam	2,25
19	Galna kiselina	0,70	50	Piren	4,88
20	1,4-Benzohinon	0,20	51	Benzo(a)piren	6,13
21	4-Nitrofenol	1,91	52	Fluoren	4,18
22	3-Nitrofenol	2,00	53	Acenaften	3,92
23	Benzil alkohol	1,10	54	Naftalen	3,30
24	1-Naftilamin	2,25	55	Fenantren	4,46
25	2-Naftol	2,85	56	Kirezen	5,81
26	4-Fluoroanilin	1,15	57	Dibenz(a,h)antracen	6,75
27	1-Naftol	2,85	58	Benz(a)antracen	5,76
28	4-Hidorksibenzaldehid	1,35	59	3-Nitroanlin	1,37
29	3-Hlornitrobenzen	2,46	60	Simazin	2,18
30	2,4-Dihlorfenol	3,06	61	Propazin	2,93
31	4-Metilfenol	1,94	62	Atrazin	2,61

3.1.1. Modeli zasnovani na direktno merenim retencionim parametrima (R_M vrednostima)

Nekoliko kalibracionih postupaka se može primeniti na direktno izmerenim retencionim podacima. Pri tome je najpodesnije koristiti R_M vrednosti. Analogna logaritmu faktora kapaciteta k , u visokoefikasnoj kolonskoj tečnoj hromatografiji, R_M vrednost se dobro linearno koreliše sa logaritamskim skalama različitih podeonih koeficijenata. Pored toga, logaritamska priroda R_M parametra pruža dragocenu svojstvo aditivnosti, koje ima fizičko značenje, za razliku od retardacionog faktora, R_F , što je od izrazitog značaja u multivarijantnim tehnikama modelovanja poput PCR i PLS.

Najjednostavniju formu predstavlja direktna kalibracija pomoću jednog hromatografskog sistema. U našem slučaju od interesa je bilo ispitati uticaj sastava mobilne faze na performanse dobijenih kalibracionih modela, zbog čega je variran sadržaj organskog modifikatora od 40 – 90 % v/v. Rezultati su prikazani u **Tabeli 4**. U većini slučajeva 4-hlorbenzoeva kiselina, 2-jodbenzoeva kiselina, galna kiselina i anhidrid ftalne kiseline su ispoljavali svojstva spoljašnjih vrednosti. Za prva dva jedinjenja ovo se može objasniti njihovim visokim stepenom jonizacije pod eksperimentalnim uslovima i stoga znatno nižom retencijom nego što je određeno lipofilnošću nejonizovanog oblika. U nekim slučajevima značajno poboljšanje modela je dobijeno isključivanjem 2,2'-bipiridil, odnosno 1,4-bihinolina. Za ovo nema logičnog objašnjenja.

Uočava se da kod sva tri organska modifikatora raspon opsega lipofilnosti na koji se model može primeniti varira u zavisnosti od njegovog udela. Tako se pri nižim koncentracijama (< 50% v/v) ne mogu koristiti jedinjenja lipofilnosti veće od ≈ 4 log jedinice. Slično, kod visokih udela kalibracioni opseg se pomera ka višim vrednostima lipofilnosti pa se za sadržaj organske komponente > 80% v/v ne mogu upotrebiti kalibracioni standardi lipofilnosti niže od ≈ 2 log jedinice.

Najširi opseg kalibracionih jedinjenja, u rasponu od $\approx -1,5$ do ≈ 7 log jedinica lipofilnosti, dobijen je kod udela organskog modifikatora od 60 – 75 % v/v.

Iako ne postoji statistički značajna razlika među dobijenim modelima po vrednostima statističkih parametara, ipak se može primetiti trend povećanja R^2

vrednosti, odnosno smanjenja greške i povećanja značajnosti kalibracije u gore pomenutom kocentracionom opsegu, za sva tri organska modifikatora.

Tabela 4. Kalibracioni modeli zasnovani na direktno izmerenim retencionim vrednostima. Model $R_M = a + b \log K_{OW}$. Stacionarna faza C-18 modifikovani silika-gel.

Mobilna faza		<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	<i>S.D.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>n</i>	Kalibracioni opseg [log K_{OW}]
Aceton	40%	-0,34±0,10	0,507±0,046	0,7743	0,316	120,05	<1·10 ⁻⁴	37	-1,47 – 4,45
	45%	-0,36±0,10	0,455±0,044	0,7525	0,301	106,41	<1·10 ⁻⁴	37	-1,47 – 4,45
	50%	-0,53±0,08	0,454±0,039	0,7938	0,267	134,72	<1·10 ⁻⁴	37	-1,47 – 4,45
	60%	-0,49±0,06	0,316±0,020	0,8138	0,236	240,33	<1·10 ⁻⁴	57	-1,47 – 6,75
	65%	-0,66±0,06	0,312±0,021	0,8054	0,240	227,58	<1·10 ⁻⁴	57	-1,47 – 6,75
	70%	-0,75±0,06	0,255±0,021	0,7198	0,249	141,29	<1·10 ⁻⁴	57	-1,47 – 6,75
	75%	-0,69±0,04	0,223±0,014	0,8255	0,161	260,12	<1·10 ⁻⁴	57	-1,47 – 6,75
	80%	-0,66±0,04	0,162±0,013	0,8355	0,117	152,38	<1·10 ⁻⁴	32	0,70 – 6,75
	90%	-0,27±0,01	0,761±0,039	0,9745	0,027	381,86	<1·10 ⁻⁴	12	2,18 – 6,75
Acetonitril	40%	-0,39±0,11	0,430±0,052	0,6532	0,357	67,79	<1·10 ⁻⁴	38	-1,47 – 4,45
	45%	-0,49±0,10	0,395±0,047	0,6651	0,319	71,48	<1·10 ⁻⁴	38	-1,47 – 4,45
	50%	-0,58±0,09	0,370±0,042	0,6865	0,284	78,84	<1·10 ⁻⁴	38	-1,47 – 4,45
	55%	-0,67±0,08	0,345±0,038	0,6922	0,262	80,98	<1·10 ⁻⁴	38	-1,47 – 4,45
	60%	-0,77±0,06	0,343±0,021	0,8304	0,241	274,14	<1·10 ⁻⁴	58	-1,47 – 6,75
	65%	-1,00±0,06	0,367±0,021	0,8417	0,247	297,68	<1·10 ⁻⁴	58	-1,47 – 6,75
	70%	-1,03±0,06	0,337±0,021	0,8196	0,246	254,40	<1·10 ⁻⁴	58	-1,47 – 6,75
	75%	-1,17±0,07	0,338±0,021	0,8617	0,227	255,37	<1·10 ⁻⁴	43	-1,47 – 6,75
	80%	-1,14±0,10	0,314±0,024	0,8966	0,166	164,69	<1·10 ⁻⁴	21	1,71 – 6,75
90%	-1,19±0,12	0,266±0,027	0,9083	0,132	99,06	<1·10 ⁻⁴	12	2,18 – 6,75	
Metanol	40%	-0,24±0,11	0,593±0,049	0,8289	0,323	145,30	<1·10 ⁻⁴	32	-1,47 – 4,45
	45%	-0,43±0,09	0,542±0,043	0,8357	0,284	157,72	<1·10 ⁻⁴	33	-1,47 – 4,45
	50%	-0,57±0,09	0,546±0,043	0,8358	0,286	157,80	<1·10 ⁻⁴	33	-1,47 – 4,45
	55%	-0,64±0,08	0,529±0,038	0,8646	0,247	197,92	<1·10 ⁻⁴	33	-1,47 – 4,45
	60%	-0,52±0,06	0,388±0,021	0,8666	0,244	331,34	<1·10 ⁻⁴	53	-1,47 – 6,75
	65%	-0,70±0,07	0,405±0,022	0,8668	0,255	331,87	<1·10 ⁻⁴	53	-1,47 – 6,75
	70%	-0,88±0,05	0,445±0,018	0,9208	0,210	592,78	<1·10 ⁻⁴	53	-1,47 – 6,75
	75%	-0,96±0,05	0,423±0,017	0,9259	0,192	637,00	<1·10 ⁻⁴	53	-1,47 – 6,75
	80%	-0,92±0,05	0,367±0,016	0,9381	0,165	515,70	<1·10 ⁻⁴	36	-1,47 – 6,75
	85%	-0,96±0,07	0,310±0,019	0,9121	0,190	269,83	<1·10 ⁻⁴	28	-1,47 – 6,75
90%	-1,01±0,07	0,330±0,015	0,9788	0,076	461,03	<1·10 ⁻⁴	12	2,18 – 6,75	

Kako bi se procenile performanse kalibracionih PCR i PLS modeli razmatrano je više opcija, za svaki organski modifikator zasebno kao i za sve modifikatore sumarno, u

rasponu udela organske komponente od 60-75% v/v. Statističke performanse dobijenih kalibracionih jednačina date su u **Tabeli 5**.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da u pogledu odabira računске tehnike ne postoji značajna razlika u performansama modela, iako bi se očekivalo da PLS daje bolje rezultate u odnosu na PCR. Dobijeni modeli su statistički zadovoljavajućeg kvaliteta, sa približnim kalibracionim i krosvalidacionim greškama, kao i relativno visokim korelacionim koeficijentima $R^2 > 0,8$.

Tabela 5. Statističke odlike kalibracionih modela dobijenih primenom PCR i PLS metoda

Tip modela	Hromatografski sistem	Statistički parametri
PCR	A	RMSEC = 0,617; $R^2_{Cal} = 0,8386$ RMSECV = 0,659; $R^2_{CV} = 0,8169$ $N_{Iv} = 2; n = 57$
	B	RMSEC = 0,613; $R^2_{Cal} = 0,8389$ RMSECV = 0,629; $R^2_{CV} = 0,8307$ $N_{Iv} = 1; n = 58$
	C	RMSEC = 0,546; $R^2_{Cal} = 0,8725$ RMSECV = 0,577; $R^2_{CV} = 0,8580$ $N_{Iv} = 2; n = 58$
	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,566; $R^2_{Cal} = 0,86280$ RMSECV = 0,601; $R^2_{CV} = 0,8455$ $N_{Iv} = 2; n = 58$ *RMSEC = 0,373; $R^2_{Cal} = 0,9439$ RMSECV = 0,400; $R^2_{CV} = 0,9355$ $N_{Iv} = 4; n = 53$
PLS	A	RMSEC = 0,616; $R^2_{Cal} = 0,8391$ RMSECV = 0,658; $R^2_{CV} = 0,8171$ $N_{Iv} = 2; n = 57$
	B	RMSEC = 0,613; $R^2_{Cal} = 0,8389$ RMSECV = 0,657; $R^2_{CV} = 0,8158$ $N_{Iv} = 1; n = 58$
	C	RMSEC = 0,545 ; $R^2_{Cal} = 0,8726$ RMSECV = 0,562; $R^2_{CV} = 0,8648$ $N_{Iv} = 2; n = 58$
	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,543; $R^2_{Cal} = 0,8738$ RMSECV = 0,592; $R^2_{CV} = 0,8506$ $N_{Iv} = 2; n = 58$ *RMSEC = 0,352; $R^2_{Cal} = 0,9498$ RMSECV = 0,403; $R^2_{CV} = 0,9345$ $N_{Iv} = 3; n = 53$

*Modeli značajno poboljšani nakon uklanjanja sledećih jedinjenja: anhidrid ftalne kiseline, 2-jodbenzoeva kiselina, 4-hlorbenzoeva kiselina, galna kiselina, 2-naftol

Kao i u slučaju jednostavnih kalibracija primenjenih na pojedinačnim hromatografskim sistemima metodom najmanjih kvadrata, statistički značajno poboljšanje ($R^2 > 0,90$) se dobija uklanjanjem sledećih jedinjenja iz modela: anhidrida ftalne kiseline, 2-jodbenzoeve kiseline, 4-hlorbenzoeve kiseline, galne kiseline i 2-naftola.

3.1.2. Modeli zasnovani na hromatografskim deskriptorima (R_M^0 , b i C_0)

Sledeći hromatografski deskriptori: R_M^0 , b i C_0 su korelisani sa $\log K_{OW}$ vrednostima. Dati deskriptori su određeni prema jednačini 12. Pri tome su dobijene zavisnosti zadovoljavajućeg statističkog kvaliteta (Prilog, **Tabele P2a-c**). Nakon odbacivanja spoljašnjih vrednosti dobijeni su sledeći kalibracioni modeli (**Tabela 6**). Iz priložene tabele se uočava da svi modeli pokazuju statistički značajnu linearnu zavisnost ($P < 0,01$). Iako su sva tri deskriptora često zastupljena u literaturi i koriste se kao parametri lipofilnosti [37, 38, 40] u ovom slučaju samo nekoliko parametara se može upotrebiti za njeno kvantitativno određivanje. Tako, na primer, osim u slučaju acetona kao organskog modifikatora, nagib b ne pokazuje zadovoljavajuće statističke kvalitete za kvantitativno predviđanje. Nešto bolje kalibracije su dobijene u slučaju acetona, pri čemu je hromatografski deskriptor od izbora R_M^0 . U slučaju acetonitrila i metanola nešto bolje kalibracije su dobijene korišćenjem C_0 u odnosu na R_M^0 vrednost.

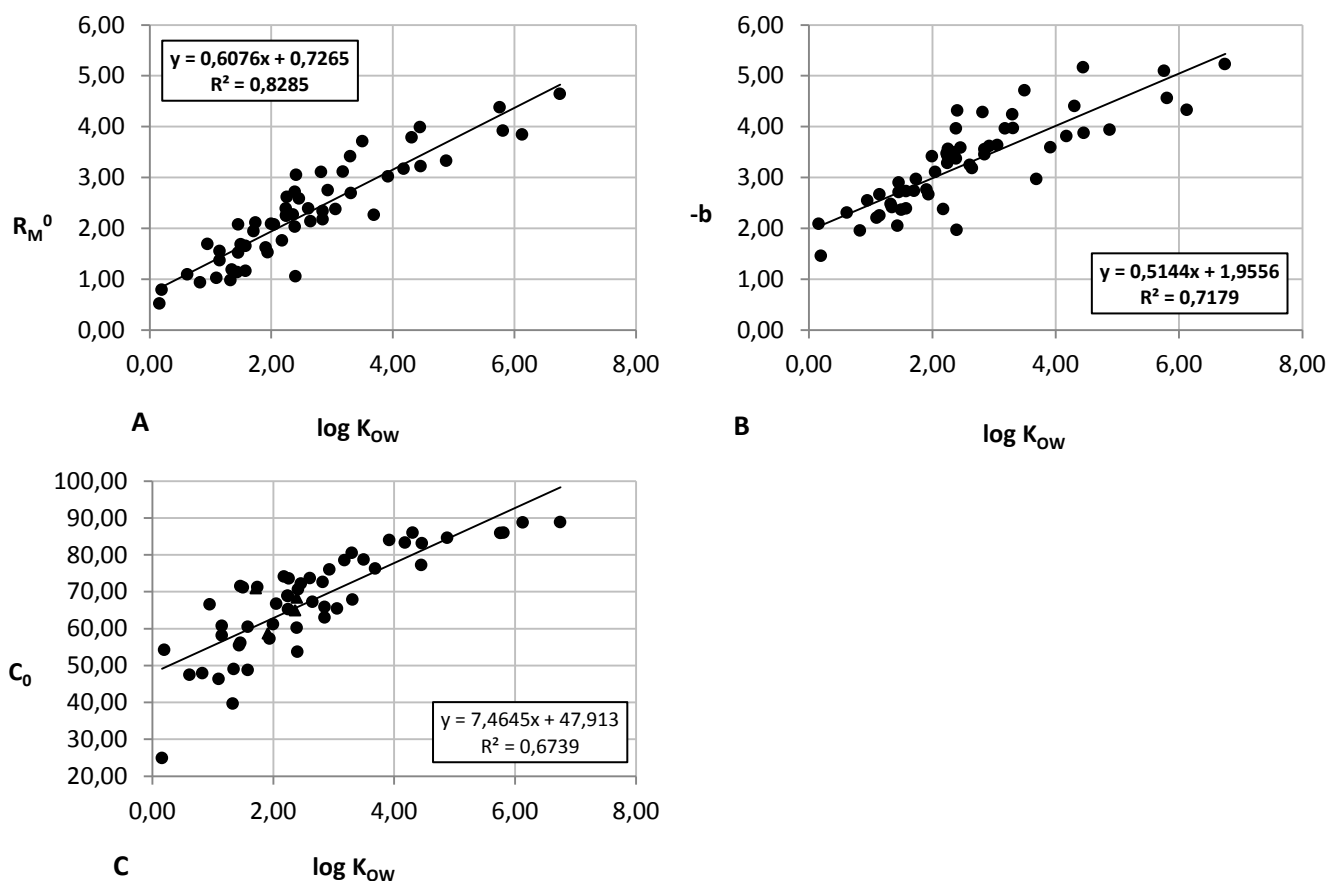
Tabela 6. Kalibracioni modeli zasnovani na hromatografskim deskriptorima.

Deskriptor = $a + b \log K_{OW}$. Stacionarna faza C-18 modifikovani silika-gel.

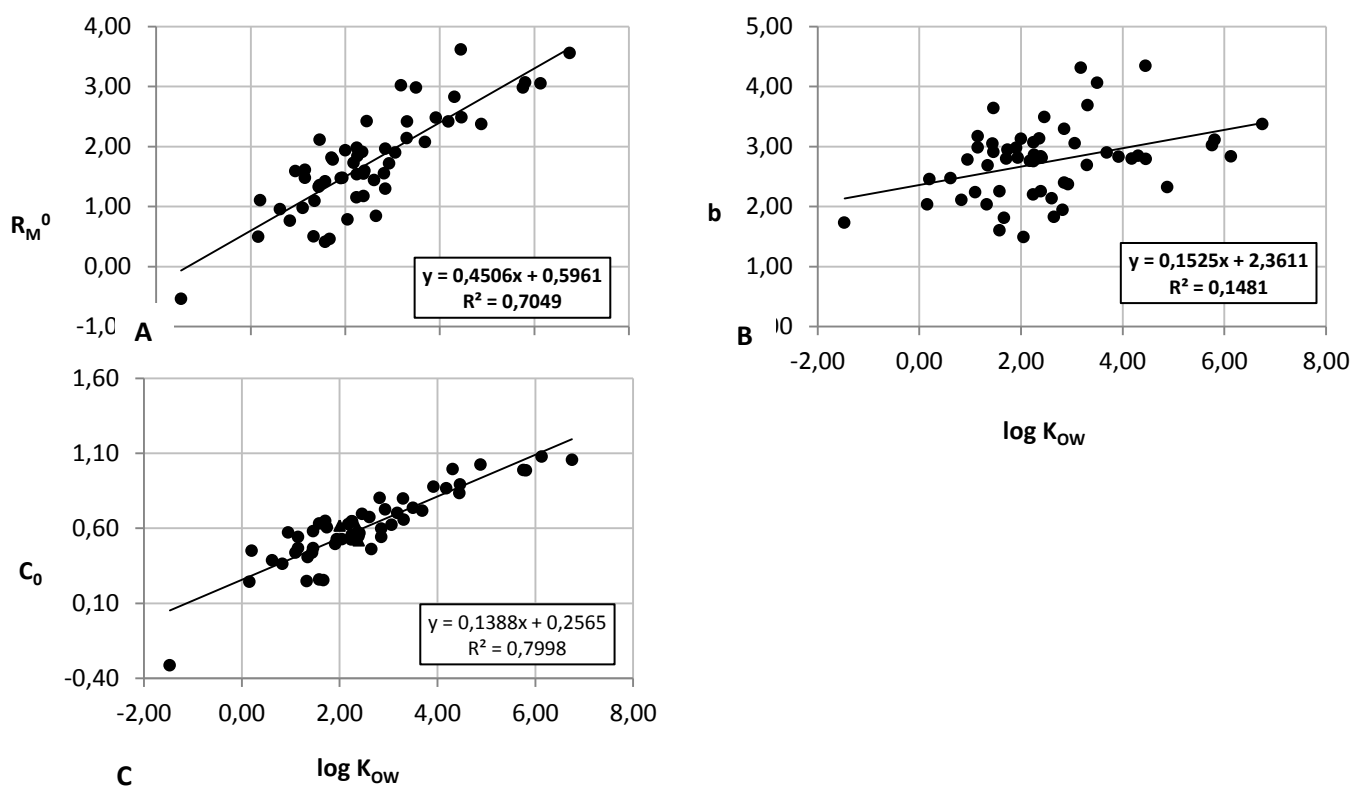
Hromatografski sistem	Deskriptor	a	b	R^2	$S.D.$	F	P	n
A	R_M^0	0,58±0,12	0,656±0,039	0,8374	0,45	278,04	<1·10 ⁻⁴	56
	b	-1,82±0,13	-0,559±0,044	0,7476	0,51	159,99	<1·10 ⁻⁴	56
	C_0	47,91±2,1	7,46±0,71	0,6739	7,66	109,51	<1·10 ⁻⁴	55
B	R_M^0	0,596±0,118	0,451±0,040	0,7049	0,45	126,58	<1·10 ⁻⁴	55
	b	-2,36±0,148	-0,153±0,050	0,1481	0,57	9,22	4·10 ⁻⁴	55
	C_0	0,256±0,028	0,139±0,010	0,7998	0,10	211,75	<1·10 ⁻⁴	55
C	R_M^0	0,857±0,152	0,538±0,052	0,6708	0,59	105,96	<1·10 ⁻⁴	54
	b	-2,36±0,17	-0,212±0,060	0,1925	0,68	12,40	9·10 ⁻⁴	54
	C_0	0,349±0,033	0,152±0,011	0,7740	0,12	181,52	<1·10 ⁻⁴	55

U slučaju metanola kao organskog modifikatora izdvaja se grupa visoko lipofilnih molekula, $\log K_{OW} > 5$, (**Slika 5**) kod koje je parametar b očigledno značajno potcenjen.

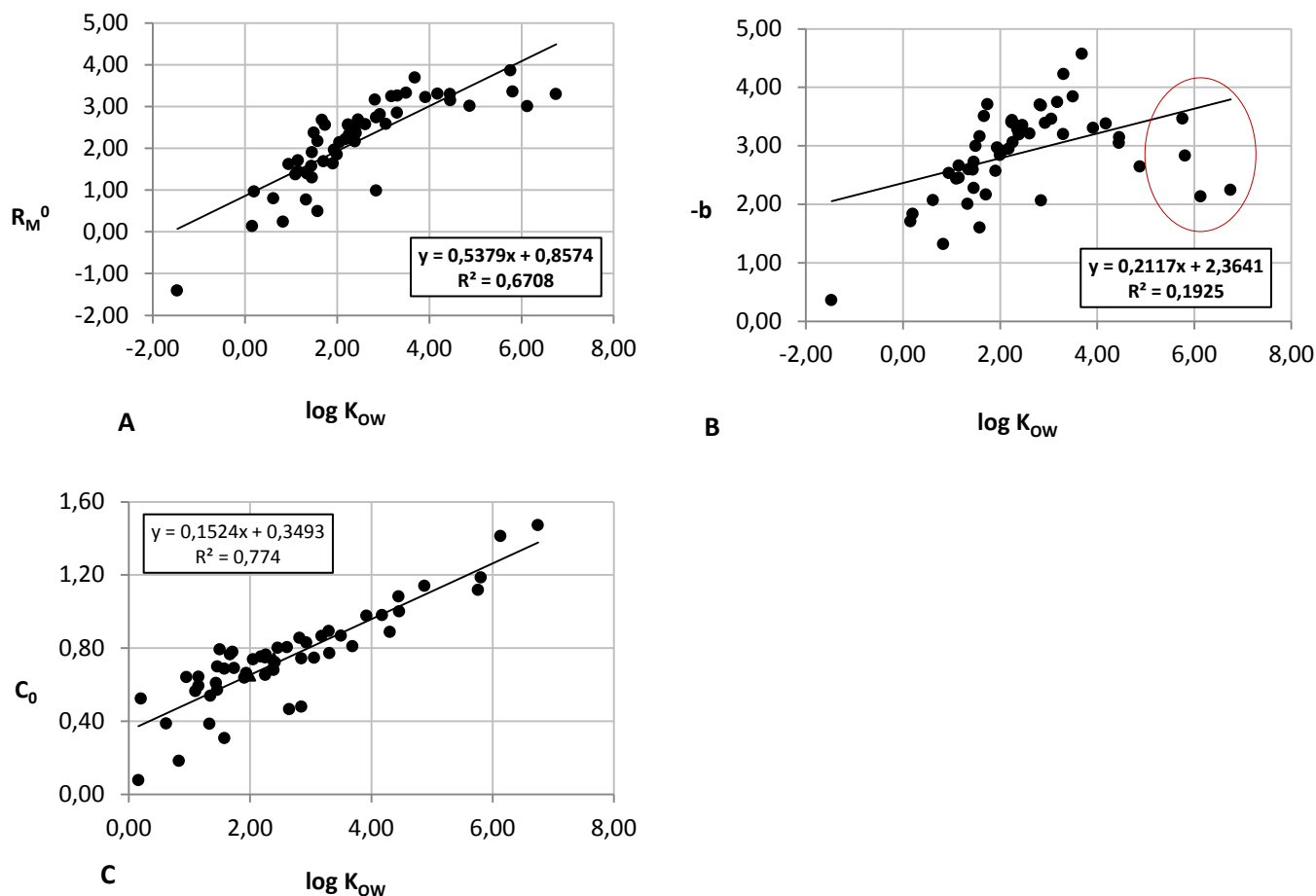
Kako to nije slučaj sa acetonom, odnosno acetonitrilom, ovo se može objasniti svojstvima metanola koja su slična vodi, odnosno njegovom visokom polarnošću, zbog čega sa porastom udela u mobilnoj fazi ne dolazi do adekvatnog smanjenja retencije ispitivanih jedinjenja, kao što je slučaj sa manje polarnim rastvaračima.



Slika 3. Kalibracioni modeli za određivanje lipofilnosti pomoću hromatografskih deskriptora (A – R_M^0 , B – b , C – C_0) za sistem aceton-voda, acetonitril-voda i metanol-voda. Stacionarna faza C18-modifikovani silika-gel.



Slika 4. Kalibracioni modeli za određivanje lipoilnosti pomoću hromatografskih deskriptora (A – R_M⁰, B – *b*, C – C₀) za sistem acetonitril-voda. Stacionarna faza C18-modifikovani silika-gel.



Slika 5. Kalibracioni modeli za određivanje lipofilnosti pomoću hromatografskih deskriptora (A – R_M^0 , B – b , C – C_0) za sistem metanol-voda. Stacionarna faza C18-modifikovani silika-gel.

Na osnovu svega iznešenog mogu se izvesti sledeći zaključci:

Direktna kalibracija predstavlja najjednostavnije rešenje, međutim performanse tako dobijenih modela, iako statistički nesignifikatno, su nešto niže od onih dobijenih primenom PLS, odnosno PCR tehnika. Ovo je u skladu sa očekivanjima, jer se u poslednjem kalibracija izvodi na osnovu većeg broja hromatografskih sistema.

U slučaju deskriptora R_M^0 i C_0 dobijaju su se modeli relativno koherentnog kvaliteta bez obzira na izbor organskog modifikatora, ali su značajno nižih performansi od linearnih modela dobijenih direktnom primenom na retencionim parametrima, bilo da je reč o jednostavnim ili PCR, odnosno PLS računskim tehnikama. Prednost primene hromatografskih deskriptora je što se pouzdano mogu proceniti za bilo koje jedinjenje,

jednostavnim odabirom pogodnog raspona udela organske komponente unutar kojeg važi linearna zavisnost. Međutim, njihova ekstrapolaciona priroda je najverovatnije razlog zašto se lošije korelišu u odnosu na gore pomenute tehnike.

U zaključku: preporučuje se primena direktne kalibracije na sistemima sa udelom organskog modifikatora u opsegu od 60 – 80% v/v, odnosno za visoko lipofilna jedinjenja > 80%, preferencijalno aceton ili acetonitril.

Uprkos činjenici da su računski zahtevne i da podrazumevaju više eksperimentalnih podataka prednost treba dati PCR ili PLS tehnikama, pre svega zato što se prisustvo loših sistema može umanjiti njihovim niskim udelima u latentnim varijablama.

Na osnovu ispitanih kalibracionih postupaka skup od 58 jedinjenja sveden je na reprezentativan skup od 14 jedinjenja (**Tabela 7**) vodeći računa da se parametri već postojećih modela značajno ne menjaju.

Tabela 7. Kalibracioni skup od 14 jedinjenja

Red. broj	Jedinjenje	$\log K_{ow}$
1	Baribiturna kiselina	-1,47
2	p-anizidin	0,95
3	2,2'-Bihinolin	4,31
4	Difenilamin	3,50
5	1,4-Naftohinon	1,71
6	Benzofenon	3,18
7	3-Nitrobenzaldehyd	1,46
8	3-Nitrofenol	2,00
9	4-Metilfenol	1,94
10	Antracen	4,45
11	2-Aminofenol	0,62
12	Acenaften	3,92
13	Hrizen	5,81
14	Dibenz(a,h)antracen	6,75

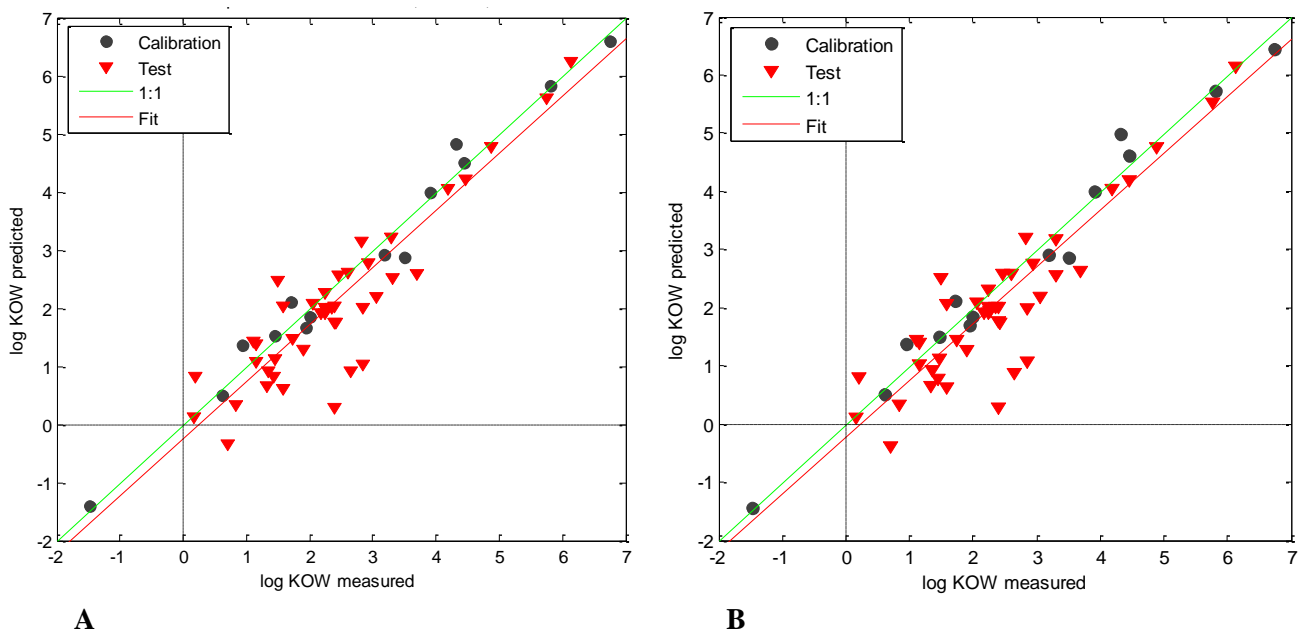
Dalje je dati skup testiran na sledeći način: napravljeni su novi kalibracioni modeli (**Tabela 8**) koristeći računске tehnike na direktno dobijenim retencionim podacima (PCR, PLS). Dobijeni modeli su zatim primenjeni na preostalom setu jedinjenja za izračunavanje $\log K_{ow}$ vrednosti (**Tabela 9**). Vrednosti su potom upoređene sa eksperimentalnim (**Slika 6**). Za potrebe izračunavanja PCR, odnosno PLS kalibracionih

modela retencioni podaci kao i $\log K_{OW}$ vrednosi su prethodno autoskalirani. Set od 14 objekata je podeljen na dva dela slučajnim odabirom i krosvalidacija je izvedena uz jednu iteraciju.

Dobijeni modeli pokazuju međusobno koherentne i odlične kalibracione, odnosno krosvalidacione performanse (S.D.cal $\approx 0,3$ i S.D.cv $\approx 0,5$ log jed., odnosno $R^2_{cal/cv} \approx 0,95$). Takođe je dobijena dobra prediktivna sposobnost u oba slučaja sa greškom od $\approx 0,7$ log jedinica i vrednošću $R^2_{pred} \approx 0,80$.

Tabela 8. Sumarna statistika kalibracionih modela dobijenih primenom PCR i PLS metoda

Tip modela	Hromatografski sistem	Statistički parametri
PCR	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,327; $R^2_{Cal} = 0,9759$
		RMSECV = 0,419; $R^2_{CV} = 0,9633$ RMSEP = 0,708; $R^2_{pred} = 0,8044$ $N_{IV} = 2$; $n_{cal} = 14$ $n_{test} = 43$
PLS	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,293; $R^2_{Cal} = 0,9807$
		RMSECV = 0,541; $R^2_{CV} = 0,9376$ RMSEP = 0,703; $R^2_{pred} = 0,8077$ $N_{IV} = 2$; $n_{cal} = 14$ $n_{test} = 43$



Slika 6. Predviđene prema izmrenim vrednostima lipofilnosti ($\log K_{OW}$) za kalibracioni i validacioni (test) set jedinjenja (A - PCR, B - PLS)

Nekoliko jedinjenja, pre svega 2-jodbenzoeva kiselina i 4-hlorbenzoeva kiselina pokazuju značajna odstupanja izračunatih od eksperimentalno određenih vrednosti.

Tabela 9. Validacioni set jedinjenja. Predviđene i eksperimentalno određene $\log K_{ow}$ vrednosti

Red. broj	Naziv	$\log K_{ow}$ eksp.	$\log K_{ow}$ predviđene (PCR)	$\log K_{ow}$ predviđene (PLS)
1	1,2,3-Benzotriazol	1,44	0,79	0,82
2	2,2'-Dipiridin	1,50	2,51	2,47
3	2-Nitrobenzaldehyd	1,74	1,45	1,48
4	4-Bromoanilin	2,26	1,95	1,98
5	Fenol	1,46	1,12	1,13
6	4-Aminobenzoeva kis.	0,83	0,33	0,34
7	Ftalimid	1,15	1,03	1,08
8	1,4-Benzohinon	0,20	0,81	0,83
9	4-Nitrofenol	1,91	1,28	1,29
10	Benzil alkohol	1,10	1,44	1,42
11	Naftilamine	2,25	2,31	2,28
12	4-Fluoroanilin	1,15	1,40	1,39
13	1-Naftol	2,85	2,00	2,00
14	4-Hidroksibenzaldehyd	1,35	0,92	0,92
15	3-Hloronitrobenzen	2,46	2,58	2,56
16	2,4-Dihlorfenol	3,06	2,19	2,19
17	4-Hlorfenol	2,39	1,78	1,77
18	Acetofenon	1,58	2,08	2,03
19	2,4,6-Trinitrofenol	1,33	0,67	0,65
20	2,4,6-Trihlorfenol	3,69	2,63	2,60
21	4-t-Butilfenol	3,31	2,56	2,52
22	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,16	0,11	0,13
23	2,6-Dimetilfenol	2,36	2,01	2,01
24	Oksazepam	2,24	2,02	2,01
25	Lorazepam	2,39	2,01	2,02
26	Klonazepam	2,41	1,74	1,75
27	Bromazepam	2,05	2,10	2,09
28	Diazepam	2,82	3,21	3,16
29	4-Metoksifenol	1,58	0,62	0,61
30	Nitrazepam	2,25	1,93	1,92
31	Piren	4,88	4,77	4,77
32	Benzo(a)piren	6,13	6,14	6,25
33	Fluoren	4,18	4,05	4,07
34	Nafthalen	3,30	3,17	3,23
35	Fenantren	4,46	4,20	4,23
36	Benz(a)antracen	5,76	5,53	5,63
37	Simazin	2,18	1,91	1,91
38	Propazin	2,93	2,75	2,77

Red. broj	Naziv	log K_{ow} eksp.	log K_{ow} predviđene (PCR)	log K_{ow} predviđene (PLS)
39	Atrazin	2,61	2,59	2,61
40	2-Jodbenzoeva kis.*	2,40	0,28	0,30
41	4-Hlorbenzoeva kis.*	2,65	0,89	0,93
42	Galna kis.	0,70	-0,39	-0,34
43	2-Naftol*	2,85	1,07	1,02

3.2. Određivanje zemljište-voda particionog koeficijenta ($\log K_{OC}$)

U cilju razvoja nove metode za određivanje podeonog koeficijenta zemljište-voda normiranog na sadržaj organskog ugljenika primenom hromatografije na tankom sloju najpre je razmatran manji skup od 25 jedinjenja, uglavnom fenola i sličnih hidroski-aromatičnih jedinjenja (**Tabela 10**).

Tabela 10. Lista standardnih jedinjenja i jedinjenja nepoznatih vrednosti zemljište-voda particionog koeficijenta ($\log K_{OC}$)

	Br.	Jedinjenje	$\log K_{OC}$	Ref.	pKa	α (pH = 6)
Standardna jedinjenja	1	Benzil alkohol	1.43	2	-	-
	2	1-Naftilamin	3.51	1	3,92	99,18
	3	Etil-4-hidroksibenzoat	2.30	1	8,90	0,13
	4	1-Naftol	2.72	4	9,34	0,05
	5	4-Nitrofenol	2.37	1	7,15	6,61
	6	4-Metilfenol	2.70	1	10,26	<0,01
	7	4-Hlorfenol	2.14	4	9,38	0,04
	8	Antracen	4.31	2	-	-
	9	Fenol	1.43	1	10,09	<0,01
	10	Acetofenon	1.6	3	-	-
	11	2,4-Dihlorfenol	2.47	3	7,85	1,39
	12	2,4,6-Trihlorfenol	2.94	3	6,42	3,66
Supstance sa nepoznatim K_{OC} vrednostima	13	2-Naftol	-	-	9,67	<0,01
	14	4-Fluoroanilin	-	-	4,70	95,23
	15	3-Hloronitrobenzen	-	-	-	-
	16	Metil-4-hidroksibenzoat	-	-	8,87	0,13
	17	3-Nitrofenol	-	-	8,28	0,52
	18	2,4,6-Trinitrofenol	-	-	0,43	100
	19	4-Hidroksibenzaldehid	-	-	-	-
	20	2,4-Dinitrofenol	-	-	4,09	98,78
	21	4-Metoksifenol	-	-	10,21	0,01
	22	2-Aminofenol	-	-	9,44	0,04
	23	4- <i>t</i> -Butilfenol	-	-	10,31	<0,01
	24	1,3,5-Trihidroksibenzen	-	-	9,40	0,04
	25	2,6-Dimetilfenol	-	-	10,59	<0,01

1. Sabljčić, A., Güsten, H., Verhaar, H., Hermens, J., 1995. QSAR modelling of soil sorption. Improvements and systematics of $\log K_{OC}$ vs. $\log K_{OW}$ correlations. *Chemosphere* 31, 4489-4514.
2. Nguyen, T.H., Goss, K.U., Ball, W.P., 2005. Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 39, 913-924.
3. Baker, J.R., Mihelcic, J.R., Luehrs, D.C., Hickey, J.P., 1997. Evaluation of estimation methods for organic carbon normalized sorption coefficients. *Water Environ. Res.* 69, 136-145.
4. Syracuse Research Cooperation. CHEMFATE database: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=381>

Od toga je za kalibraciju odabrano 12 jedinjenja sa poznatim $\log K_{OC}$ vrednostima. Ostatak od 13 jedinjenja za koje još nisu literaturno navedene vrednosti zemljište-voda podeonog koficijenta, sadržavao je 9 fenola, odnosno ukupno 11 hidroksiaromatičnih jedinjenja.

Dati skup jedinjenja je odabran pre svega zbog posebnog značaja za životnu sredinu. Naime, fenol i njegovi derivati jedni su od najčešće korišćenih supstanci, pri čemu ih Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (US EPA) svrstava među prioritetne zagađivače [74]. Kako sam fenol tako i mnoga fenolna jedinjenja ispoljavaju izraziti toksičan uticaj na alge, protozoe, ali i na mnoge beskičmenjake i kičmenjake, od čega su mnogi efekti suptilni poput smanjene plodnosti, inhibicije rasta i skraćenog životnog veka, odnosno stope preživljavanja [75].

Standardna jedinjenja su odabrana prema sledećim kriterijumima:

- Broj jedinjenja je određen prema standardnoj proceduri predloženoj od strane OECD [27] prema kojoj je najmanje 6 standardnih jedinjenja neophodno za dobru kalibraciju;
- Tip i vrsta standardnih jedinjenja zadovoljavaju sorpcioni model predložen od strane Sabljica i saradnika [30] za slučaj fenolnih jedinjenja (supstituisani fenoli, supstituisani anilini i nitrobenzeni) i prema strukturnoj sličnosti sa nepoznatim supstancama;
- Kalibracioni opseg $\log K_{OC}$ vrednosti u rasponu od 1 – 4 log jedinice;
- Da ne podležu protolizi pri datim eksperimentalnim uslovima, odnosno da postoje u svom neutralnom obliku u stepenu od najmanje 99%.

Za određivanje $\log K_{OC}$ parametara nekoliko reverzno-faznih hromatografskih sistema je uzeto u razmatranje (**Tabela 11**). Pri tome je izbor organskih rastvarača tipičan za reverzno-fazne uslove: metanol kao dobar proton-donor, aceton kao dobar proton-akceptor i acetonitril sa izraženim dipolarnim svojstvima.

Pored C18-modifikovanog silika-gela odabran je i CN-modifikovani silika-gel jer, pored hidrofobnih propil-lanaca, poseduje i specifična polarna svojstva (izrazito

dipolarne CN grupe). Zbog ovog svojstva je prema standardnoj OECD proceduri CN-modifikovani silika-gel preporučan kao stacionarna faza od izbora pri određivanju $\log K_{OC}$ parametra.

Tabela 11. Hromatografski sistemi korišćeni za određivanje particionog koeficijenta zemljište-voda na podsetu fenolnih jedinjenja.

Oznaka	Stacionarna faza	Mobilna faza
A	C18 – modifikovani silika-gel	Metanol-voda (40-70% v/v)*
B	C18 – modifikovani silika-gel	Acetonitril-voda (40-70% v/v)*
C	C18 – modifikovani silika-gel	Aceton-voda (45-75% v/v)*
D	CN – modifikovani silika-gel	Metanol-voda (30-60% v/v)*
E	CN – modifikovani silika-gel	Acetonitril-voda (30-55% v/v)*

*Pojedinačni inkrement udela organske komponente u mobilnoj fazi iznosio je 5%.

Pored datih planarnih hromatografskih sistema $\log K_{OC}$ parametar je određen prema standardnoj OECD proceduri korišćenjem HPLC sistema sa izokratskim eluiranjem: mobilna faza metanol – citratni pufer (pH = 6,00; C = 0,01 mol dm⁻³) u odnosu 30:70 v/v i stacionarna faza CN-modifikovani silika gel (videti Eksperimentalni deo).

Kao i u slučaju lipofilnosti, razmatrano je nekoliko računskih pristupa. Kalibracioni postupci na direktno izmerenim retencionim vrednostima (R_M) uključujući obe metode (OLS i PCR), kao i hromatografski izvedene deskriptore: R_M^0 , b i C_0 . Dati deskriptori su dobijeni primenom linerane zavisnosti (jednačina 12) visokih statističkih performansi i zadovoljavaju standardne kriterijume kvaliteta za planarne hromatografske sisteme, osim u slučaju antracena na CN- silika-gelu gde je, usled izuzetno jake retencije, procena gorepomenutih parametara bila znatno otežana. Slično važi i za ekstremno polarne supstance poput 2,4,6-trinitrofenola, ali usled slabe retencije. Dobijeni kalibracioni modeli diskutovani su sa posebnim osvrtom na statističke performanse u odnosu na izbor stacionarne faze, udela organskog modifikatora i primenjene računске tehnike.

3.2.1. Modeli zasnovani na direktnim retencionim parametrima za skup fenolnih jedinjenja

Direktni kalibracioni modeli u obliku: $R_M = a + b \log K_{OC}$ sumirani su u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Direktni kalibracioni modeli za podset fenolnih jedinjenja

Broj	Hromatografski sistem	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>S</i>	<i>F</i>	<i>R</i>	<i>n</i>
1	MeOH–H ₂ O 45%	-0,43±0,14	0,565±0,053	0,14	112,10	0,9702	9
2	MeOH–H ₂ O 50%	-0,46±0,13	0,506±0,051	0,13	98,17	0,9661	9
3	MeOH–H ₂ O 55%	-0,84±0,15	0,636±0,057	0,15	123,08	0,9727	9
4	MeOH–H ₂ O 60%	-0,78±0,16	0,505±0,064	0,17	61,34	0,9474	9
5	MeOH–H ₂ O 65%	-1,01±0,15	0,540±0,057	0,15	88,60	0,9627	9
6	MeOH–H ₂ O 70%	-1,01±0,12	0,481±0,047	0,12	103,33	0,9678	9
7	MeOH–H ₂ O 75%	-1,01±0,11	0,421±0,043	0,11	95,88	0,9654	9
8	MeCN–H ₂ O 40%	-0,96±0,13	0,652±0,049	0,12	177,37	0,9835	8
9	MeCN–H ₂ O 45%	-0,91±0,11	0,578±0,042	0,10	186,13	0,9843	8
10	MeCN–H ₂ O 50%	-0,88±0,11	0,500±0,043	0,11	133,18	0,9782	8
11	MeCN–H ₂ O 55%	-1,05±0,13	0,526±0,050	0,12	110,65	0,9739	8
12	MeCN–H ₂ O 60%	-1,04±0,12	0,441±0,044	0,11	98,76	0,9709	8
13	MeCN–H ₂ O 65%	-1,32±0,13	0,457±0,049	0,12	88,60	0,9678	8
14	MeCN–H ₂ O 70%	-1,24±0,12	0,414±0,045	0,11	84,12	0,9661	8
15	Acetone–H ₂ O 40%	-0,58±0,17	0,566±0,066	0,16	74,36	0,9560	9
16	Acetone–H ₂ O 45%	-0,63±0,15	0,525±0,057	0,14	84,51	0,9610	9
17	Acetone–H ₂ O 50%	-0,83±0,13	0,551±0,051	0,13	114,79	0,9708	9
18	Acetone–H ₂ O 55%	-0,674±0,091	0,384±0,035	0,085	119,77	0,9720	9
19	Acetone–H ₂ O 60%	-0,695±0,078	0,329±0,030	0,073	119,96	0,9720	9
20	Acetone–H ₂ O 65%	-0,949±0,089	0,338±0,034	0,083	97,52	0,9659	9
21	Acetone–H ₂ O 70%	-1,033±0,089	0,306±0,034	0,084	79,56	0,9587	9
22	Acetone–H ₂ O 75%	-0,883±0,098	0,267±0,038	0,092	49,97	0,9365	9
23	MeOH–H ₂ O 30%	-0,32±0,16	0,540±0,065	0,17	69,14	0,9467	10
24	MeOH–H ₂ O 35%	-0,60±0,12	0,577±0,048	0,12	142,57	0,9731	10
25	MeOH–H ₂ O 40%	-0,39±0,15	0,418±0,059	0,15	49,87	0,9283	10
26	MeOH–H ₂ O 45%	-0,86±0,10	0,623±0,041	0,10	236,62	0,9835	10
27	MeOH–H ₂ O 50%	-0,88±0,10	0,581±0,041	0,11	198,47	0,9804	10
28	MeOH–H ₂ O 55%	-0,94±0,11	0,558±0,045	0,12	153,48	0,9749	10
29	MeOH–H ₂ O 60%	-0,98±0,11	0,520±0,045	0,11	135,49	0,9717	10
30	MeCN–H ₂ O 30%	-0,43±0,12	0,472±0,047	0,12	98,86	0,9618	10
31	MeCN–H ₂ O 35%	-0,57±0,13	0,481±0,050	0,13	93,23	0,9597	10
32	MeCN–H ₂ O 40%	-0,61±0,10	0,443±0,041	0,10	117,61	0,9676	10
33	MeCN–H ₂ O 45%	-0,484±0,092	0,338±0,037	0,094	85,17	0,9561	10
34	MeCN–H ₂ O 50%	-0,668±0,086	0,236±0,034	0,088	47,66	0,9253	10
35	MeCN–H ₂ O 55%	-0,632±0,079	0,232±0,032	0,081	54,28	0,9336	10

Nekoliko jedinjenja utiče na kvalitet modela, čijim se uklanjanjem isti značajno poboljšava. To su: 1-naftilamin, 4-nitrofenol i 4-metilfenol.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se dobra koherencija u kvalitetu i performansama modela. Dobijene vrednosti R^2 se nalaze u opsegu od 0,8976 do 0,9688

na C18 modifikovanom silika-gelu sa vrednostima Fisher-ovog parametra F između 61,34 i 186,13. Slično važi i za CN-modifikovani silika-gel gde se R^2 vrednosti nalaze u opsegu od 0,9141 do 0,9673 sa vrednostima F između 85,17 i 236,62.

Iako ne postoje statistički značajne razlike u modelima dobijenim na dvema stacionarnim fazama, može se primetiti da se na CN-modifikovanom silika-gelu dobijaju nešto bolji kalibracioni modeli za pomenuti podset jedinjenja. Takođe, najbolji modeli na C18 modifikovanom silika-gelu su dobijeni primenom mobilne faze sa udelom 45% v/v metanola, 40-45% v/v acetonitrila i 55-60% v/v acetona. Na CN-modifikovanom silika-gelu mobilne faze sa sadržajem 45-50% v/v metanola i isto toliko acetonitrila daju najbolje kalibracione krive. Ove je u saglasnosti sa zahtevima OECD procedure u smislu statističkih performansi.

Tabela 13. UV-VIS apsorpcioni maksimumi na kojima su detektovana jedinjenja, retenciona vremena (t_R) i log vrednosti faktora kapaciteta ($\log k$).

Br.	Jedinjenje	λ_{\max} [nm]	t_R [min]	$\log k$
1	Benzil alkohol	264	2,266	-0,262
2	1-Naftilamin	315	5,677	0,459
3	Etil-4-hidroksibenzoat	275	3,366	0,113
4	1-Naftol	254	5,750	0,466
5	4-Nitrofenol	285	2,737	-0,061
6	4-Metilfenol	292	3,085	0,044
7	4-Hlorfenol	285	3,325	0,104
8	Antracen	360	27,460	1,249
9	Fenol	-(254)	2,665	-0,087
10	Acetofenon	280	2,840	-0,028
11	2,4-Dihlorfenol	356	4,082	0,252
12	2,4,6-Trihlorfenol	270	5,305	0,418
13	2-Naftol	272	5,551	0,446
14	4-Fluoroanilin	300	2,945	0,004
15	3-Hlornitrobenzen	340	4,790	0,356
16	Metil-4hidroksibenzoat	285	2,965	0,010
17	3-Nitrofenol	370	2,967	0,011
18	2,4,6-Trinitrofenol	270	1,833	-0,600
19	4-Hidroksibenzaldehid	300	2,487	-0,156
20	2,4-Dinitrofenol	370	1,8165	-0,620
21	4-Metoksifenol	285	2,665	-0,087
22	2-Aminofenol	285	2,4835	-0,158
23	4- <i>t</i> -Butilfenol	-(254)	5,250	0,412
24	1,3,5-Trihidroksibenzen	265	2,010	-0,429
25	2,6-Dimetilfenol	275	3,445	0,131

Na osnovu retencionih podataka utvrđenih u HPLC eksperimentu (**Tabela 13**) dobijen je sledeći kalibracioni model: $\log k = -0,915 (\pm 0,071) + 0,488 (\pm 0,028) \log K_{OC}$ ($r = 0,9884$, $S.D. = 0,073$, $F = 297,47$, $n = 9$). Iste spoljašnje vrednosti su dobijene i u ovom slučaju.

Kvalitet dobijenog modela saglasan je sa sličnim modelima koji su do sada saopšteni u literaturi. Tako su, na primer, Koerdel i saradnici [75] dobili sledeću zavisnost između $\log K_{OC}$ i $\log k$ vrednosti na osnovu hromatografisanja 50 jedinjenja na CN-modifikovanom silika-gelu i silika-gelu modifikovanom huminskim kiselinama: $\log K_{OC} = 1,5 \log k + 2,8$ ($R = 0,83$, $n = 50$) and $\log K_{OC} = 1,8 \log k + 2,3$ ($R = 0,95$, $n = 48$) redom. Gawlik i saradnici [76] su dobili kalibracije sličnog kvaliteta ($0,904 < R^2 < 0,957$) koristeći znatno manji broj standardnih jedinjenja ($n = 6$), na pet različitih kolona napravljenih od standardizovanih zemljišta (EUROSOILS 1-5) i CN-silika-gelu.

3.2.2. Kalibracioni modeli zasnovani na TLC deskriptorima za skup fenolnih jedinjenja

Slično prethodnom slučaju, tri jedinjenja pokazuju značajan negativan uticaj na kvalitet dobijenih modela: 1-naftilamin, 4-nitrofenol i 4-metilfenol i to kako u pogledu izbora TLC deskriptora tako i u većini hromatografskih sistema. Nakon odbacivanja spoljašnjih vrednosti dobijeni modeli su sumarno prikazani u **Tabeli 14**.

Za dati kalibracioni set jedinjenja najbolji modeli su dobijeni korišćenjem skorova $PC1$ i R_M^0 parametra na C18-modifikovanom silika-gelu, osim u slučaju acetonitrila kao organskog modifikatora gde je nagib b pokazao značajno bolje karakteristike. Na CN-modifikovanom silika-gelu najbolji kalibracioni modeli dobijeni su korišćenjem skorova na pravac $PC1$.

Svi modeli pokazuju dobre statističke performanse koje se mogu uporediti sa rezultatima dobijenim od strane Szabo-a i saradnika [77] dobijene HPLC metodom, a korišćenjem faktora kapaciteta ekstrapolisanog na čistu vodu k_w ($\log K_{OC} = 0,612 \log k'_w + 1,729$, $n = 21$ $r^2 = 0,911$; $\log K_{OC} = 1,548 \log k'_w + 1,203$, $n = 21$, $r^2 = 0,929$).

Tabela 14. Kalibracioni modeli zasnovani na TLC deskriptorima ($Y = a + b \log K_{OC}$).

Br.	Hromatografski sistem	Y	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	$S.D.$	F	R^2	n
1	A	R_M^0	0,01±0,19	1,02±0,07	0,19	188,48	0,9641	9
2		b	-0,014±0,002	-0,0078±0,0009	0,0024	70,24	0,9094	9
3		C_0	-41,9±3,9	-12,6±1,5	4,0	66,79	0,9052	9
4		$PC1$	2,0±0,2	-1,06±0,09	0,23	139,58	0,9522	9
5	B	R_M^0	-0,2±0,2	0,89±0,08	0,20	134,57	0,9438	10
6		b	-0,013±0,001	-0,0078±0,0005	0,0012	272,61	0,9714	10
7		C_0	-32,1±5,0	-11,3±2,0	5,1	32,35	0,8221	9
8		$PC1$	2,2±0,4	-1,1±0,2	0,41	49,93	0,8770	9
9	C	R_M^0	0,2±0,2	0,96±0,07	0,18	197,61	0,9657	9
10		b	-0,013±0,003	-0,011±0,001	0,0019	73,36	0,9245	8
11		C_0	-35,6±3,5	-13,0±1,3	3,3	95,17	0,9314	9
12		$PC1$	2,4±0,3	-1,1±0,1	0,26	111,65	0,9411	9
13	A, B i C sistemi zajedno	$PC1$	2,0±0,2	-1,08±0,09	0,24	137,75	0,9516	9
14	D	R_M^0	-0,4±0,3	0,9±0,1	0,22	40,53	0,8527	9
15		b	-0,007±0,005	-0,007±0,002	0,0034	11,35	0,6184	9
16		C_0	-18,7±6,7	-21,2±3,0	4,8	48,55	0,8740	9
17		$PC1$	2,7±0,2	-1,29±0,09	0,23	207,77	0,9629	10
18	E	R_M^0	-0,3±0,2	0,86±0,08	0,21	116,90	0,9359	10
19		b	-0,007±0,003	-0,012±0,001	0,0035	72,78	0,9010	10
20		C_0	-33,9±2,9	-6,5±1,1	3,1	34,94	0,7774	12
21		$PC1$	2,4±0,3	-1,2±0,1	0,29	105,30	0,9293	10
22	D i E sistemi zajedno	$PC1$	2,5±0,2	-1,24±0,08	0,22	218,56	0,9690	9

3.2.3. Određivanje $\log K_{OC}$ vrednosti fenolnih jedinjenja

Na osnovu dobijenih kalibracionih modela i retencionih parametara određene su $\log K_{OC}$ vrednosti za skup fenolnih jedinjenja kod kojih iscrpnom pretragom literature nisu nađene vrednosti zemljište-voda podeonog koeficijenta. Kako između dobijenih vrednosti nije utvrđena statistički značajna razlika u pogledu razlika u korišćenim mobilnim fazama i načina izračunavanja, vrednosti su usrednjene i sumirane u **Tabeli 15**. Korelacija između vrednosti dobijenih na različitim sorbentima ili primenom različitih računskih postupaka je u opsegu $0,9460 < R < 0,9823$, $n = 25$. Naravno dobro slaganje je dobijeno između vrednosti određenih standardnom HPLC procedurom i vrednosti dobijenih TLC-om sa korelacionim koeficijentom u opsegu $0,9332 < R < 0,9657$, $n = 25$.

Tabela 15. Srednje vrednosti hromatografski određenih $\log K_{OC}$ vrednosti za nepoznata i standardna jedinjenja. Poređenje sa izračunatim vrednostima korišćenjem KOCWIN softverskog paketa i LSER modela Nguyen-a i saradnika (60) i Poole-a i saradnika (61).

Br.	Jedinjenje	$\log K_{OC}$ vrednosti									
		Eksperimentalno određene					Izračunate				
		Na osnovu deskriptora (TLC)		Na osnovu direktne kalibracije (TLC)		Zasnovane na OECD proceduri (HPLC)	KOCWIN		LSER		
		C18	CN	C18	CN		MCI	Log K_{ow}	Nguyen	Poole	
Nepoznate	1	2-Naftol	2,47±0,17	2,68±0,19	2,37±0,17	2,61±0,18	2,79±0,32	3,30	2,59	2,94	2,64
	2	4-Fluoroanilin	1,57±0,18	1,87±0,19	1,83±0,17	1,99±0,18	1,88±0,22	2,05	1,54	1,34	1,51
	3	3-Hloronitrobenzen	2,88±0,17	2,84±0,19	3,04±0,18	2,89±0,19	2,60±0,30	2,56	2,50	2,23	2,48
	4	Metil-4-hidroksibenzoat	1,81±0,17	1,76±0,19	1,81±0,17	1,76±0,18	1,89±0,22	1,94	2,11	1,94	2,03
	5	3-Nitrofenol	1,98±0,17	2,04±0,19	1,96±0,16	2,11±0,17	1,90±0,22	2,46	2,42	1,99	2,24
	6	2,4,6-Trinitrofenol	1,14±0,21	-0,13±0,35	0,77±0,16	0,63±0,17	0,64±0,11	3,35	2,27	1,99	2,89
	7	4-Hidroksibenzaldehid	1,29±0,19	1,32±0,21	1,31±0,16	1,42±0,17	1,55±0,19	1,15	1,61	1,66	1,83
	8	2,4-Dinitrofenol	0,34±0,25	0,71±0,26	0,86±0,16	1,14±0,17	0,60±0,11	2,66	2,45	2,11	2,48
	9	4-Metoksifenol	1,29±0,19	1,34±0,21	1,39±0,17	1,45±0,17	1,70±0,20	2,08	2,02	1,65	1,65
	10	2-Aminofenol	1,08±0,19	1,51±0,21	1,16±0,16	1,71±0,17	1,55±0,18	1,96	1,41	1,35	1,17
	11	4- <i>t</i> -Butilfenol	2,96±0,18	2,82±0,19	2,87±0,18	2,73±0,18	2,72±0,31	3,11	2,92	2,71	2,53
	12	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,14±0,25	-0,12±0,34	0,27±0,16	0,60±0,17	0,99±0,13	2,49	1,51	1,45	0,83
	13	2,6-Dimetilfenol	2,33±0,16	2,24±0,18	2,40±0,17	2,25±0,18	2,14±0,25	2,70	2,40	2,21	2,05
Standardi	14	Benzil alkohol	1,18±0,19	1,13±0,22	1,42±0,17	1,20±0,17	1,34±0,16	1,33	1,22	1,44	1,32
	15	1-Naftilamin	2,49±0,16	2,64±0,19	2,55±0,18	2,66±0,18	2,81±0,32	3,40	1,95	2,67	2,53
	16	Etil-4-hidroksibenzoat	2,18±0,17	2,16±0,19	2,13±0,17	2,03±0,18	2,10±0,24	2,20	2,39	2,23	2,30
	17	1-Naftol	2,62±0,17	2,83±0,19	2,57±0,18	2,81±0,19	2,83±0,32	3,31	2,67	3,02	2,71
	18	4-Nitrofenol	1,79±0,17	2,06±0,19	1,81±0,17	2,04±0,18	1,75±0,21	2,46	2,36	1,85	2,18
	19	4-Metilfenol	1,93±0,17	1,85±0,19	1,90±0,17	1,88±0,18	1,96±0,23	2,47	2,16	1,98	1,87
	20	4-Hlorfenol	2,14±0,17	2,30±0,19	2,05±0,17	2,28±0,18	2,09±0,24	2,48	2,41	2,12	2,13
	21	Antracen	4,13±0,24	4,14±0,28	4,41±0,21	4,34±0,21	4,43±0,51	4,21	3,86	4,46	4,27
	22	Fenol	1,41±0,18	1,42±0,21	1,62±0,17	1,55±0,17	1,70±0,20	2,27	1,90	1,65	1,58
	23	Acetofenon	1,96±0,17	1,90±0,19	2,20±0,17	1,93±0,18	1,82±0,21	1,71	1,99	1,67	1,81
	24	2,4-Dihlorfenol	2,61±0,17	2,74±0,19	2,55±0,18	2,63±0,18	2,39±0,27	2,69	2,78	2,62	2,48
	25	2,4,6-Trihlorfenol	2,84±0,18	2,95±0,19	3,08±0,18	3,00±0,19	2,73±0,31	3,25	3,27	3,01	2,94

Korelacija između vrednosti dobijenih na različitim sorbentima ili primenom različitih računskih postupaka je u opsegu $0,9460 < R < 0,9823$, $n = 25$. Naročito dobro slaganje je dobijeno između vrednosti određenih standardnom HPLC procedurom i vrednosti dobijenih TLC-om sa korelacionim koeficijentom u opsegu $0,9332 < R < 0,9657$, $n = 25$. Dobra saglasnost postoji i sa vrednostima izračunatim primenom KOCWIN softverskog paketa, odnosno primenom dva LSER modela predložena od strane Nguyen-a i saradnika [60] i Pool-a i saradnika [61] osim u slučaju 2,4,6-trinitrofenola, 2,4-dinitrofenola i 1,3,5-trihidroksibenzena (jednačine 34 i 35).

U prva dva slučaja stepen jonizacije jedinjenja premašuje 10%. Očigledno da oba LSER modela kao i predložena TLC metodologija mogu biti primenjene na jedinjenja koja ne podležu značajnoj protolizi. 1,3,5-Trihidroksibenzen ne podleže protolitičkim procesima, međutim vrednost lipofilnosti iznosi $\log K_{OW} = 0,15$. Odavde se može zaključiti da predloženi hromatografski modeli nisu primenljivi na izuzetno polarna fenolna jedinjenja. Nakon odbacivanja datih jedinjenja korelacija sa KOCWIN izračunatim vrednostima se značajno poboljšala i to za vrednosti predviđene na osnovu indeksa konektivnosti (MCI) korelacioni koeficijent se povećao sa $0,4819 < R < 0,5951$ na $0,8356 < R < 0,9004$. Slično važi i za vrednosti procenjene na osnovu lipofilnosti ($\log K_{OW}$) gde se korelacioni koeficijent povećao sa $0,6951 < R < 0,7674$ na $0,8752 < R < 0,9071$.

3.2.4. Proširenje metodologije – generalizacija kalibracionih modela

U drugom delu istraživanja početni set od 25 jedinjenja, uglavnom supstituisanih fenola proširen je na 69 jedinjenja od toga 32 standarda sa iz literature preuzetim, esperimentalno određenim, vrednostima zemljište-voda particionog koeficijenta i 37 jedinjenja za koje $\log K_{OC}$ vrednosti još uvek nisu određene.

Cilj ove studije je razvijanje opštih modela, odnosno validacija hromatografskih metoda u pogledu: *i*) ispravnog odabira hromatografskog sistema *ii*) odabira adekvatne računске tehnike *iii*) vrste jedinjenja na koja se mogu primeniti i raspona $\log K_{OC}$ vrednosti *iv*) tačnosti i preciznosti dobijenih modela. Lista jedinjenja data je u **Tabeli 16**.

Tabela 16. Lista standardnih jedinjenja i jedinjenja sa nepoznatim $\log K_{OC}$ vrednostima

Standardna jedinjenja			Nepoznate	
Red. broj	Naziv	$\log K_{OC}$ eksp.	Red. broj	Naziv
1	<i>p</i> -Anizidin	1,93	33	Barbiturna kiselina
2	1,2,3-Benzotriazol	1,69	34	Anhidrid ftalne kiseline
3	2,2'-Bihinolin	4,02	35	1,4-Naftohinon
4	Difenilamin	2,78	36	2-Jodbenzoeva kis.
5	2,2'-Dipiridin	1,60	37	4-Hlorbenzoeva kis.
6	4-Bromanilin	1,96	38	2-Nitrobenzaldehyd
7	Fenol	1,20	39	3-Nitrobenzaldehyd
8	Benzofenon	2,63	40	Ftalimid
9	4-Aminobenzoeva kis.	1,70	41	Pirogalol
10	4-Nitrofenol	2,37	42	Galna kiselina
11	Benzil alkohol	1,10	43	1,4-Benzohinon
12	Naftilamin	3,51	44	3-Nitrofenol
13	1-Naftol	3,10	45	2-Naftol
14	2,4-Dihlorfenol	2,81	46	4-Fluoroanilin
15	4-Metilfenol	2,70	47	4-Hidroksibenzaldehyd
16	Antracen	4,31	48	3-Hlornitrobenzen
17	Acetofenon	1,80	49	4-Hlorfenol
18	2,4,6-Trihlofenol	3,03	50	2-Aminofenol
19	Piren	4,90	51	2,4,6-Trinitrofenol
20	Benzo(a)piren	5,95	52	2,4-Dinitrofenol
21	Fluoren	3,70	53	4- <i>t</i> -Butilfenol
22	Acenaften	3,59	54	1,3,5-Trihidroksibenzen
23	Naftalen	2,96	55	2,6-Dimetilfenol
24	Fenantren	4,35	56	*Oksazepam
25	Dibenz(a,h)antracen	6,22	57	*Lorazepam
26	Benz(a)antracen	5,30	58	*Klonazepam
27	Etil- <i>p</i> -hidroskibenozat	2,21	59	*Bromazepam
28	Simazin	2,10	60	*Diazepam
29	Propazine	2,40	61	4-Metoksifenol
30	Ametrin	2,59	62	*Midazolam
31	Prometrin	2,85	63	*Nitrazepam
32	Atrazin	2,24	64	*Hlordiazepoksid
			65	*Klobazam
			66	*Medazepam
			67	*Hlorazepat
			68	*Flurazepam
			69	Hzizen

*Farmakološki aktivna jedinjenja od posebnog interesa

Pored toga u listi nepoznatih jedinjenja nalazi se serija od 12 benzodiazepinskih derivata za koje nema izmerenih $\log K_{OC}$ vrednosti. S obzirom da u poslednjoj deceniji raste interesovanje kako za analitiku, tako i za proučavanje procesa kojima podležu farmakološki aktivna jedinjenja u životnoj sredini, određivanje ove fizičke veličine u datom slučaju je od posebnog značaja.

Sledeći hromatografski sistemi su uzeti u razmatranje: stacionarna faza C18-modifikovani silika-gel; mobilna faza: **A** – aceton-voda, **B** – acetonitril-voda i **C** – metanol-voda svaka u opsegu udela organske komponente od 60 – 90% v/v sa inkrementom od 5%.

3.2.5. Kalibracioni postupci direktno primenjeni na retencionim parametrima

Kao i u prethodnim slučajevima sledeći kalibracioni postupci su primenjeni na retencionim podacima standardnog seta jedinjenja: *i*) najjednostavniji oblici direktne kalibracije koji podrazumevaju korišćenje samo jednog hromatografskog sistema uz računski metod najmanjih kvadrata, *ii*) PCR i PLS na podacima više hromatografskih sistema. Dobijeni kalibracioni modeli prikazani su u **Tabelama 17 i 18**.

U svim slučajevima postoji statistički značajna linearna zavisnost. Uočava se da kvalitet kalibracionog modela raste sa porastom udela organske komponente u mobilnoj fazi. Međutim, istovremeno dolazi do smanjenja radnog opsega kalibracionih krivih. Najširi opseg od 1,10 – 6,22 log jedinice nalazi se u rasponu od 60-75% v/v organskog modifikatora. Sa njegovim povećanjem smanjuje se i broj jedinjenja za koja se može pouzdano izmeriti retencija u datom sistemu.

Na osnovu priloženih rezultata ne može se uočiti postojanje statistički značajnih razlika u odabiru različitih organskih komponenata mobilne faze. Tako se u sva tri slučaja dobijaju modeli sličnog kvaliteta, ali značajno nižeg od modela dobijenih u slučaju malog skupa fenolnih jedinjenja, što je i očekivano. Takođe, modeli su nešto lošijeg kvaliteta od kalibracija korišćenih za određivanje lipofilnosti. Ovo se može objasniti dobro definisanim i jednostavnim particionim sistemom oktanol-voda koji daje koherentne vrednosti $\log K_{OW}$ parametra, za razliku od veoma raznovrsnog sistema

zemljište-voda. Pregledom rezidualnih vrednosti nije ustanovljeno jasno prisustvo spoljašnjih vrednosti.

PLS i PCR modeli dobijeni su prema procedurama već opisanim u Opštem i Eksperimentalnom delu. Ispitivanje reziduala i uticajnih tačaka nije ukazalo na značajno prisustvo spoljašnjih vrednosti. Statističke performanse dobijenih modela se ne razlikuju u zavisnosti od odabira računске tehnike, niti od tipa hromatografskog sistema, mada se uočavaju nešto manje greške i veće kalibracione i krosvalidacione vrednosti R^2 u slučaju metanola, ali statistički nesignifikantno (na nivou značajnosti od $P = 0,05$). Odsustvo razlika u odnosu na odabir računске tehnike može se objasniti malim brojem zavisnih promenljivih u odnosu na broj objekata (kalibracionih standarda). Što je ovaj broj veći to PLS metod ima preimućstvo.

Tabela 17. Kalibracioni modeli zasnovani na direktno izmerenim retencionim vrednostima. Model $R_M = a + b \log K_{OC}$. Stacionarna faza C-18 modifikovani silika-gel.

Mobilna faza		a	b	R^2	S.D.	F	P	n	Kalibracioni opseg [log K_{OC}]
Aceton-voda	60%	-0,43±0,13	0,315±0,039	0,6828	0,285	64,56	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	65%	-0,62±0,13	0,318±0,039	0,6919	0,282	67,36	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	70%	-0,61±0,11	0,233±0,033	0,6294	0,237	50,96	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	75%	-0,65±0,07	0,224±0,023	0,7649	0,164	97,61	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	80%	-0,50±0,05	0,141±0,013	0,8728	0,075	123,57	<1·10 ⁻⁴	20	1,60-6,22
	85%	-0,60±0,04	0,131±0,011	0,8816	0,067	134,02	<1·10 ⁻⁴	20	1,60-6,22
	90%	-0,68±0,04	0,112±0,011	0,8982	0,054	105,87	<1·10 ⁻⁴	14	2,10-6,22
Acetonitril-voda	60%	-0,73±0,12	0,361±0,036	0,7716	0,260	101,37	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	65%	-1,00±0,13	0,391±0,041	0,7540	0,296	91,95	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	70%	-0,94±0,12	0,338±0,036	0,7429	0,264	86,68	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	75%	-1,18±0,12	0,372±0,037	0,8014	0,259	100,91	<1·10 ⁻⁴	27	1,10-6,22
	80%	-0,76±0,11	0,258±0,029	0,8524	0,156	80,83	<1·10 ⁻⁴	16	1,60-6,22
	85%	-0,80±0,12	0,237±0,032	0,7977	0,173	55,20	<1·10 ⁻⁴	16	1,60-6,22
	90%	-0,91±0,15	0,233±0,039	0,7220	0,210	36,36	<1·10 ⁻⁴	16	1,60-6,22
Metanol-voda	60%	-0,39±0,14	0,368±0,042	0,7154	0,308	75,40	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	65%	-0,64±0,15	0,409±0,045	0,7318	0,328	81,87	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	70%	-0,88±0,13	0,464±0,039	0,8256	0,283	142,03	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	75%	-1,07±0,11	0,474±0,034	0,8662	0,247	194,23	<1·10 ⁻⁴	32	1,10-6,22
	80%	-1,09±0,12	0,430±0,035	0,8653	0,228	147,73	<1·10 ⁻⁴	25	1,60-6,22
	85%	-1,08±0,11	0,362±0,032	0,8622	0,206	125,13	<1·10 ⁻⁴	22	1,60-6,22
	90%	-1,05±0,09	0,321±0,022	0,9488	0,108	222,16	<1·10 ⁻⁴	14	2,10-6,22

Ukoliko je više različitih hromatografskih sistema sličnog kvaliteta na raspolaganju poželjno je primeniti multivarijantnu kalibraciju na sumarnim podacima radije nego na manjim pojedinačnim grupama, jer se na taj način greška modela može umanjiti, a prediktivna moć modela povećati.

Tabela 18. Kalibracioni modeli zasnovani na primeni multivarijantnih tehnika (PCR i PLS) . Modeli su dati u formi $\log K_{OC} = f(R_{Mi})$. Stacionarna faza C-18 modifikovani silika-gel.

Tip modela	Hromatografski sistem	Statistički parametri
PCR	A	RMSEC = 0,644; $R^2_{Cal} = 0,7482$ RMSECV = 0,712; $R^2_{CV} = 0,6933$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$
	B	RMSEC = 0,464; $R^2_{Cal} = 0,8692$ RMSECV = 0,529; $R^2_{CV} = 0,8316$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$
	C	RMSEC = 0,464; $R^2_{Cal} = 0,8692$ RMSECV = 0,528; $R^2_{CV} = 0,8316$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$
	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,566; $R^2_{Cal} = 0,8799$ RMSECV = 0,532; $R^2_{CV} = 0,8289$ $N_{IV} = 4$; $n = 32$
PLS	A	RMSEC = 0,595; $R^2_{Cal} = 0,7855$ RMSECV = 0,707; $R^2_{CV} = 0,7029$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$
	B	RMSEC = 0,622; $R^2_{Cal} = 0,7655$ RMSECV = 0,657; $R^2_{CV} = 0,7388$ $N_{IV} = 1$; $n = 32$
	C	RMSEC = 0,462 ; $R^2_{Cal} = 0,8705$ RMSECV = 0,533; $R^2_{CV} = 0,8287$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$
	A, B i C zajedno	RMSEC = 0,578; $R^2_{Cal} = 0,8821$ RMSECV = 0,662; $R^2_{CV} = 0,8399$ $N_{IV} = 2$; $n = 32$

3.2.6. Modeli zasnovani na hromatografski izvedenim deskriptorima

Regresijom hromatografski izvedenih veličina (R_M^0 , b , C_0) dobijaju se kalibracije kod kojih postoji jasno prisustvo nekoliko spoljašnjih vrednosti i to: difenilamin u svim slučajevima, a u slučaju acetonitrila i metanola još i 2,2'-bihinolin i 4-aminobenzoeva kiselina. Kalibracioni modeli su nakon izbacivanja spoljašnjih vrednosti prikazani sa pratećom statistikom u **Tabeli 19**.

Na osnovu datih rezultata uočava se postojanje značajnih razlika, kako u pogledu odabira hromatografskog deskriptora, tako i u pogledu vrste hromatografskog sistema. Jedino u slučaju acetona kao organske komponente postoje statistički značajne linearne zavisnosti za sva tri parametra, od kojih se jedino R_M^0 , i u izvesnoj meri b , mogu koristiti za dalju procenu $\log K_{OC}$. U slučaju acetonitrila i metanola parametar b ne

pokazuje statistički značajan linearan odnos, dok R_M^0 daje najbolju korelaciju u slučaju acetonitrila, a C_0 u slučaju metanola kao organske komponente mobilne faze. Ukupan kvalitet ovako dobijenih kalibracija je lošiji od modela dobijenih direktnom primenom na R_M vrednostima, bilo da je reč o jednostavnoj kalibraciji na jednom hromatografskom sistemu ili PLS odnosno PCR modelovanju.

Tabela 19. Kalibracioni modeli zasnovani na hromatografskim deskriptorima.

$$\text{Deskriptor} = a + b \log K_{OC}$$

Hromatografski sistem	Deskriptor	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	<i>S.D.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
A	R_M^0	0,59±0,22	0,653±0,067	0,7635	0,490	93,60	<1·10 ⁻⁴	31
	<i>b</i>	-1,76±0,22	-0,559±0,068	0,6974	0,496	66,83	<1·10 ⁻⁴	31
	C_0	0,513±0,035	0,069±0,011	0,5833	0,078	42,00	<1·10 ⁻⁴	32
B	R_M^0	0,59±0,12	0,444±0,038	0,8373	0,269	138,96	<1·10 ⁻⁴	29
	<i>b</i>	-2,32±0,16	-0,119±0,050	0,1746	0,354	5,71	0,002	29
	C_0	0,305±0,044	0,133±0,013	0,7847	0,094	102,05	<1·10 ⁻⁴	30
C	R_M^0	1,50±0,23	0,370±0,069	0,5166	0,487	28,86	<1·10 ⁻⁴	29
	<i>b</i>	-3,180±0,249	-0,028±0,076	0,0049	0,536	0,13	0,717	29
	C_0	0,379±0,043	0,156±0,013	0,8404	0,092	142,15	<1·10 ⁻⁴	29

3.2.7. Procena $\log K_{OC}$ vrednosti

Kako korišćenje izvedenih hromatografskih parametara daje modele lošijeg i neujednačenog kvaliteta za određivanje $\log K_{OC}$ vrednosti seta nepoznatih jedinjenja oni su isključeni iz daljeg razmatranja. Odabrani su superiorniji PCR, odnosno PLS modeli za svaki organski modifikator ponaosob, odnosno sve sisteme zajedno.

Izračunate vrednosti $\log K_{OC}$ parametara za nepoznata jedinjenja i standardne supstance date su u **Tabeli 20**, zajedno sa vrednostima izračunatim primenom KOCWIN softverskog paketa (procenjenim pomoću molekulskih indeksa konektivnosti – MIC, odnosno $\log K_{OW}$ parametra).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da postoji dobra saglasnost između eksperimentalno određenih vrednosti i izračunatih. Nešto bolje korelacije su dobijene u slučaju izračunatih vrednosti na osnovu $\log K_{OW}$ parametra, u kojem slučaju se Pearson-ov korelacioni koeficijent nalazi u intervalu $0,7577 < R < 0,8405$ u odnosu na iste procenjene primenom molekulskih indeksa konektivnosti, $0,6978 < R < 0,7325$.

Tabela 20. Eksperimentalno određene i softverski predviđene vrednosti $\log K_{OC}$ za skup standardnih supstanci i nepoznatih jedinjenja.

Br.	Jedinjenje	Eksperimentalno određeno (TLC)								Izračunato (KOCWIN)	
		PCR				PLS				MIC	$\log K_{ow}$
		A	B	C	A, B i C zajedno	A	B	C	A, B i C zajedno		
1	<i>p</i> -Anizidin	2,21	2,19	1,86	1,67	2,50	2,19	1,87	1,76	1,65	1,48
2	1,2,3-Benzotriazol	1,67	1,17	1,77	1,68	1,74	1,17	1,77	1,79	1,72	1,79
3	2,2'-Bihinolin	4,56	4,65	4,04	4,26	4,65	4,65	4,02	4,05	5,76	3,74
4	Difenilamin	3,33	3,31	3,01	2,70	2,97	3,31	3,00	2,73	2,92	2,82
5	2,2'-Dipiridin	2,30	3,00	2,49	2,36	2,29	3,00	2,50	2,40	3,09	2,11
6	4-Bromanilin	2,48	2,59	2,38	2,05	2,12	2,59	2,38	2,06	2,05	2,15
7	Fenol	1,70	1,48	1,69	1,80	1,74	1,48	1,69	1,79	2,27	1,90
8	Benzofenon	3,09	3,29	2,99	2,75	2,72	3,29	2,98	2,77	3,06	2,88
9	4-Aminobenzoeva kis.	1,07	1,38	1,18	0,83	0,73	1,38	1,18	0,80	0,90	0,59
10	4-Nitrofenol	1,83	1,59	1,88	1,96	1,87	1,59	1,88	1,98	2,46	2,37
11	Benzil alkohol	1,56	1,58	1,74	2,06	1,63	1,58	1,74	2,01	1,33	1,12
12	Naftilamin	2,26	2,53	2,32	2,47	2,30	2,53	2,32	2,46	3,40	1,95
13	1-Naftol	2,38	2,01	2,36	2,54	2,41	2,01	2,36	2,57	3,31	2,67
14	2,4-Dihlorfenol	2,28	2,30	2,38	2,54	2,31	2,30	2,38	2,55	2,69	2,78
15	4-Metilfenol	2,13	1,79	1,97	2,33	2,48	1,79	1,98	2,32	2,48	2,17
16	Antracen	3,65	4,21	3,88	4,12	3,86	4,21	3,87	4,07	4,21	3,86
17	Acetofenon	1,74	2,43	2,10	2,16	1,70	2,43	2,11	2,13	1,71	1,99
18	2,4,6-Trihlofenol	2,49	2,85	2,69	2,63	2,74	2,85	2,70	2,76	3,25	3,28
19	Piren	4,21	4,44	4,39	4,40	4,30	4,44	4,38	4,43	4,74	4,24
20	Benzo(a)piren	4,88	5,15	5,89	5,71	4,94	5,15	5,95	5,96	5,77	5,32

Br.	Jedinjenje	Eksperimentalno određeno (TLC)								Izračunato (KOCWIN)	
		PCR				PLS				MIC	logK _{ow}
		A	B	C	A, B i C zajedno	A	B	C	A, B i C zajedno		
21	Fluoren	3,95	3,83	3,96	3,91	3,91	3,83	3,97	3,93	3,96	3,63
22	Acenaften	3,95	3,92	3,76	3,76	4,05	3,92	3,77	3,75	3,70	3,40
23	Naftalen	4,32	3,39	3,20	3,14	3,73	3,39	3,21	2,97	3,19	2,86
24	Fenantren	3,92	3,97	4,04	4,01	3,98	3,97	4,04	4,03	4,22	3,87
25	Dibenz(a,h)antracen	5,37	5,31	6,06	6,10	5,61	5,31	6,07	6,13	6,28	5,68
26	Benz(a)antracen	4,91	4,70	5,48	5,47	4,89	4,70	5,43	5,43	5,25	5,00
27	Etil- <i>p</i> -hidroskibenozat	1,91	1,86	2,13	2,31	1,77	1,86	2,12	2,29	2,20	2,39
28	Simazin	2,51	2,42	2,49	2,27	2,66	2,42	2,47	2,34	2,17	2,18
29	Propazin	3,03	2,97	2,94	2,87	2,79	2,97	2,92	2,77	2,54	2,34
30	Ametrin	3,14	3,14	2,74	2,77	3,21	3,14	2,75	2,73	2,63	2,36
31	Prometrin	3,66	3,44	2,90	2,94	3,75	3,44	2,93	2,89	2,82	3,51
32	Atrazin	3,10	2,70	2,92	3,02	3,24	2,70	2,88	2,93	-	-
33	Barbiturna kis.	-0,87	-1,06	-0,34	0,06	-1,02	-1,06	-0,28	0,07	-0,28	0,09
34	Anhidrid ftalne kis.	-0,91	0,58	0,94	1,31	-1,74	0,58	0,94	1,12	1,00	1,35
35	1,4-Naftohinon	2,53	2,41	2,48	2,41	2,47	2,41	2,48	2,39	2,66	2,83
36	2-Jodbenzoeva kis.	1,21	1,35	1,24	0,84	1,07	1,35	1,25	0,90	1,43	1,48
37	4-Hlorbenzoeva kis.	1,95	1,85	1,76	1,32	1,60	1,85	1,76	1,32	1,42	1,62
38	2-Nitrobenzaldehyd	2,28	2,36	2,03	1,62	1,94	2,36	2,03	1,63	1,24	1,88
39	3- Nitrobenzaldehyd	2,35	2,27	2,13	1,77	2,10	2,27	2,13	1,81	1,24	1,73
40	Ftalimid	1,59	1,50	1,89	1,70	1,35	1,50	1,89	1,74	0,15	1,10
41	Pirogalol	0,83	1,08	1,03	0,75	0,53	1,08	1,03	0,73	2,51	1,96

Br.	Jedinjenje	Eksperimentalno određeno (TLC)								Izračunato (KOCWIN)	
		PCR				PLS				MIC	logK _{ow}
		A	B	C	A, B i C zajedno	A	B	C	A, B i C zajedno		
42	Galna kis.	0,10	0,84	0,54	0,22	-0,41	0,84	0,54	0,12	1,56	1,04
43	1,4-Benzohinon	1,54	1,61	1,70	1,38	1,52	1,61	1,70	1,46	1,61	1,94
44	3-Nitrofenol	1,97	2,30	1,89	2,03	1,91	2,30	1,90	1,96	2,46	2,42
45	2-Naftol	2,16	2,21	1,28	1,12	2,13	2,21	1,30	1,06	3,30	2,59
46	4-Fluoroanilin	1,83	1,86	1,79	1,82	1,83	1,86	1,80	1,81	2,05	1,54
47	4-Hidroksibenzaldehid	1,74	1,17	1,45	1,82	1,94	1,17	1,45	1,74	1,15	1,61
48	3-Hlornitrobenzen	2,83	2,88	2,60	2,64	2,96	2,88	2,61	2,67	2,56	2,50
49	4-Hlorfenol	1,96	1,91	2,02	2,25	1,96	1,91	2,03	2,22	2,48	2,41
50	2-Aminofenol	1,51	1,18	1,19	1,31	1,68	1,18	1,18	1,24	1,96	1,41
51	2,4,6-Trinitrofenol	1,38	0,79	1,13	1,70	1,51	0,79	1,13	1,52	3,35	2,27
52	4- <i>t</i> -Butilfenol	2,41	2,63	2,49	2,71	2,57	2,63	2,49	2,72	3,11	2,92
53	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,45	0,78	0,54	0,89	0,27	0,78	0,53	0,65	2,49	1,51
54	2,6-Dimetilfenol	2,25	2,32	2,16	2,28	2,21	2,32	2,16	2,26	2,70	2,40
55	Oksazepam	2,98	1,99	2,29	2,61	3,14	1,99	2,30	2,51	2,76	1,73
56	Lorazepam	3,08	1,96	2,31	2,68	3,17	1,96	2,31	2,53	2,98	1,81
57	Klonazepam	3,20	2,09	2,13	2,28	3,23	2,09	2,13	2,13	4,06	2,45
58	Bromazepam	2,61	2,17	2,28	2,53	2,72	2,17	2,29	2,42	3,56	2,21
59	Diazepam	3,21	3,21	2,96	3,12	3,20	3,21	2,96	3,03	3,88	2,44
60	4-Metoksifenol	1,85	1,22	1,14	1,42	2,13	1,22	1,14	1,28	2,08	2,02
61	Midazolam	3,82	4,56	3,29	3,47	3,82	4,56	3,28	3,31	5,81	3,72
62	Nitrazepam	2,84	2,03	2,29	2,51	2,92	2,03	2,28	2,41	3,85	2,36

Br.	Jedinjenje	Eksperimentalno određeno (TLC)								Izračunato (KOCWIN)	
		PCR				PLS				MIC	logK _{OW}
		A	B	C	A, B i C zajedno	A	B	C	A, B i C zajedno		
63	Hloridazepoksid	2,94	3,09	3,73	4,10	2,82	3,09	3,62	3,88	5,48	2,23
64	Klobazam	2,83	2,50	2,38	2,60	2,84	2,50	2,38	2,47	2,54	2,03
65	Medazepam	4,45	5,02	4,38	4,50	4,40	5,02	4,36	4,39	4,48	3,30
66	Hlorazepat	2,80	2,62	2,69	2,84	2,65	2,62	2,70	2,75	-	-
67	Flurazepam	4,33	4,68	4,04	3,52	5,10	4,68	4,05	3,71	-	-
68	Hrizen	4,74	4,77	5,51	5,49	4,76	4,77	5,53	5,58	5,26	5,04
69	Metil-4-hidroksibenzoat	1,77	1,56	1,86	2,08	1,77	1,56	1,86	2,05	-	-

3.3. Određivanje vazduh-voda particionog koeficijenta ($\log K_{AW}$)

U pokušajima da se primene metode planarne hromatografije u cilju procene podeonog koeficijenta vazduh-voda ($\log K_{AW}$) prva ispitivanja su bila usmerena na primenu tipičnih reverzno-faznih sistema. Glavni oslonac ovakvom stavu bila je ideja da granica vazduh-voda u izvesnoj meri poseduje slične karakteristike kao i sistem voda-lipidni (hidrofobni) sloj, pre svega zbog činjenice da vazduh ima približnu vrednost dielektrične konstante kao i lipidni sloj [78]. Fischer i saradnici su, zapravo, primenom Gibbs-ove apsorpcione izoterme predložili model za određivanje podeonih koeficijenata jedinjenja koja pasivno prolaze krv-moždanu barijeru [78].

Ovaj pristup je sporadično davao dobre rezultate na malim skupovima jedinjenja, ali svaki pokušaj da se problem generalizuje rezultovao je potpunim odsustvom korelacije između retencije i $\log K_{AW}$ parametra.

Kako bi se ustanovilo kakve interakcije rukovode raspodelom analita u sistemu voda-vazduh urađena je LSER analiza na skupu od 35 jedinjenja za koje su bili poznati eksperimentalno određeni Abraham-ovi solvatohromni parametri i eksperimentalne $\log K_{AW}$ vrednosti. Poslednje su preuzete iz EPI Sute baze podataka kao eksperimentalno određene vrednosti Henry-jeve konstante K_h iz koje su, potom, izračunate logaritmovane vrednosti K_{AW} prema jednačini $\log K_{AW} = \log (101325 \times K_h / RT)$, gde je R univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK), a T temperatura (K). Faktor od 101325 je uveden radi prevođenja jedinice za pritisak iz atm u Pa. Date vrednosti sumirane su u **Tabeli 21**. Dobijen je sledeći LSER model:

$$\log K_{AW} = (1,72 \pm 0,52) - (4,38 \pm 0,32)A - (3,77 \pm 0,39)B - (2,80 \pm 0,21)S + (0,17 \pm 0,34)E - (0,31 \pm 0,57)V; R^2 = 0,9583, S.D. = 0,469, F = 114,98, P < 1 \cdot 10^{-4}, n = 31 \quad (61)$$

Statistički nesignifikantni članovi koji se odnose na polarizabilnost, odnosno formiranje vakancije i izraženi članovi vezani za proton-akceptorske, proton-donorske i dipolarne karakteristike, doduše sa negativnim predznakom, ukazuju na sličnost sa retencionim ponašanjem jedinjenja u tipičnim normalno-faznim uslovima (**Tabela 27, modeli 1-4**). Iako su ova dva procesa u osnovi različiti iz LSER jednačina proističe da bi se retencija jedinjenja u jednostavnim normalno-faznim uslovima mogla dobro korelisati sa $\log K_{AW}$ podeonim koeficijentom. Sa tim ciljem odabran je kalibracioni set

od 37 jedinjenja sa eksperimentalno određenim $\log K_{AW}$ vrednostima i test set kod kojeg su podeoni koeficijenti predviđeni primenom KOAWIN softverskog paketa. Retencija je izmerena za oba skupa jedinjenja u tipičnim normalno-faznim sistemima (1 - 4) pri čemu je kao stacionarna faza korišćen silika-gel i sledeće mobilne faze: **1.** hloroform, **2.** toluen, **3.** 1,2-dihloretan i **4.** 25% etil-acetat u heksanu. Lista standardnih i test jedinjenja sa Abraham-ovim solvatohromnim parametrima i izmerenim retencionim podacima data je u **Tabelama 21 i 22.**

Tabela 21. Lista standardnih jedinjenja sa retencionim parametrima u hromatografskim sistemima 1, 2, 3 i 4 (R_M vrednosti).

Br.	Jedinjenje	Solvatohromni parametri					$\log K_{AW}$	Hromatografski sistem			
		A	B	S	E	V		1	2	3	4
1	4-Aminofenol	0,65	0,80	1,20	1,15	0,87	-7,83	1,64	2,65	1,31	1,64
2	<i>p</i> -Anizidin	0,16	0,66	1,26	1,05	1,02	-5,56	0,86	1,64	0,36	0,60
3	Difenilamin	0,08	0,51	1,08	1,59	1,42	-3,95	-0,32	-0,51	-0,79	-0,26
4	Anhidrid ftalne kis.	0,00	0,40	2,30	1,16	0,98	-6,17	2,65	2,65	1,64	-0,06
5	Fenol	0,60	0,30	0,89	0,81	0,78	-4,86	0,73	0,34	0,23	0,12
6	1,4-Benzohinon	0,00	0,81	0,55	0,75	0,79	-1,70	0,30	0,60	-0,15	0,06
7	4-Nitrofenol	0,82	0,26	1,72	1,07	0,95	-7,77	0,95	1,33	0,58	0,44
8	3-Nitrofenol	0,79	0,23	1,57	1,05	0,95	-7,08	0,90	1,01	0,46	0,35
9	Benzil-alkohol	0,39	0,56	0,87	0,80	0,92	-4,86	0,54	1,01	0,21	0,29
10	Naftilamin	0,20	0,57	1,26	1,67	1,19	-5,34	0,30	0,60	-0,23	0,13
11	2-Naftol	0,61	0,40	1,08	1,52	1,14	-5,95	0,67	0,70	-0,02	0,13
12	1-Naftol	0,60	0,37	1,05	1,52	1,14	-5,61	0,46	0,49	0,06	0,06
13	4-Hidroksibenzaldehid	0,85	0,37	1,54	1,01	0,93	-7,68	1,15	1,95	0,88	1,17
14	3-Hlornitrobenzen	0,00	0,25	1,14	1,00	1,01	-3,25	-0,35	-0,60	-0,78	-0,33
15	2,4-Dihlorfenol	0,53	0,19	0,84	0,96	1,02	-3,75	0,10	0,20	-0,78	0,13
17	4-Hlorfenol	0,67	0,20	1,08	0,92	0,90	-4,59	0,54	0,49	0,12	0,06
18	Antracen	0,00	0,28	1,34	2,29	1,45	-2,64	-0,54	-0,90	-0,88	-0,42
19	Acetofenon	0,00	0,48	1,01	0,82	1,01	-3,37	-0,08	0,18	-0,40	-0,17
20	2,4,6-Trinitrofenol	0,46	0,42	2,66	1,43	1,30	-9,15	2,65	1,64	2,62	1,66
21	2,4,6-Trihlorfenol	0,42	0,15	0,94	1,07	1,14	-3,97	-0,10	-0,06	-0,32	0,02
22	2,4-Dinitrofenol	0,09	0,56	1,49	1,20	1,24	-5,45	0,35	0,39	0,26	0,83
23	4- <i>t</i> -Butilfenol	0,56	0,41	0,89	0,81	1,34	-4,31	0,60	0,67	0,08	-0,02
24	1-Brom-4-hlorbenzen	0,00	0,00	0,83	0,96	1,01	-1,22	2,65	2,65	0,36	
25	2,6-Dimetilfenol	0,39	0,39	0,79	0,86	1,06	-3,56	0,06	0,14	0,00	-0,13
26	Fluoren	0,00	0,25	1,06	1,59	1,36	-2,40	-0,54	-0,88	-1,14	-0,58
27	Acenaften	0,00	0,26	1,14	1,75	1,26	-2,12	-0,44	-0,81	-1,06	-0,50
28	Naftalen	0,00	0,20	0,92	1,34	1,09	-1,74	-0,53	-0,87	-1,16	-0,54
29	Fenantren	0,00	0,29	1,29	2,06	1,45	-2,76	-0,44	-0,84	-1,06	-0,53
30	3-Nitroanilin	0,30	0,53	1,65	1,13	0,99	-6,49	0,85	1,23	0,45	0,42
31	Simazin	0,33	0,95	1,20	1,55	1,48	-7,41	0,92	1,49	0,53	0,60
32	Propazin	0,30	0,97	1,14	1,47	1,76	-6,72	0,74	1,33	0,38	0,45
33	Piren	-	-	-	-	-	-3,31	-0,50	-1,07	-1,14	-0,62
34	Benzo(a)piren	-	-	-	-	-	-4,72	-0,50	-1,16	-1,14	-0,67
35	Hrizen	-	-	-	-	-	-3,67	-0,49	-1,02	-1,10	-0,65
36	Dibenz(a,h)antracen	-	-	-	-	-	-5,23	-0,49	-1,10	-1,08	-0,70
37	Benz(a) antracen	-	-	-	-	-	-3,30	-0,49	-1,02	-1,10	-0,65

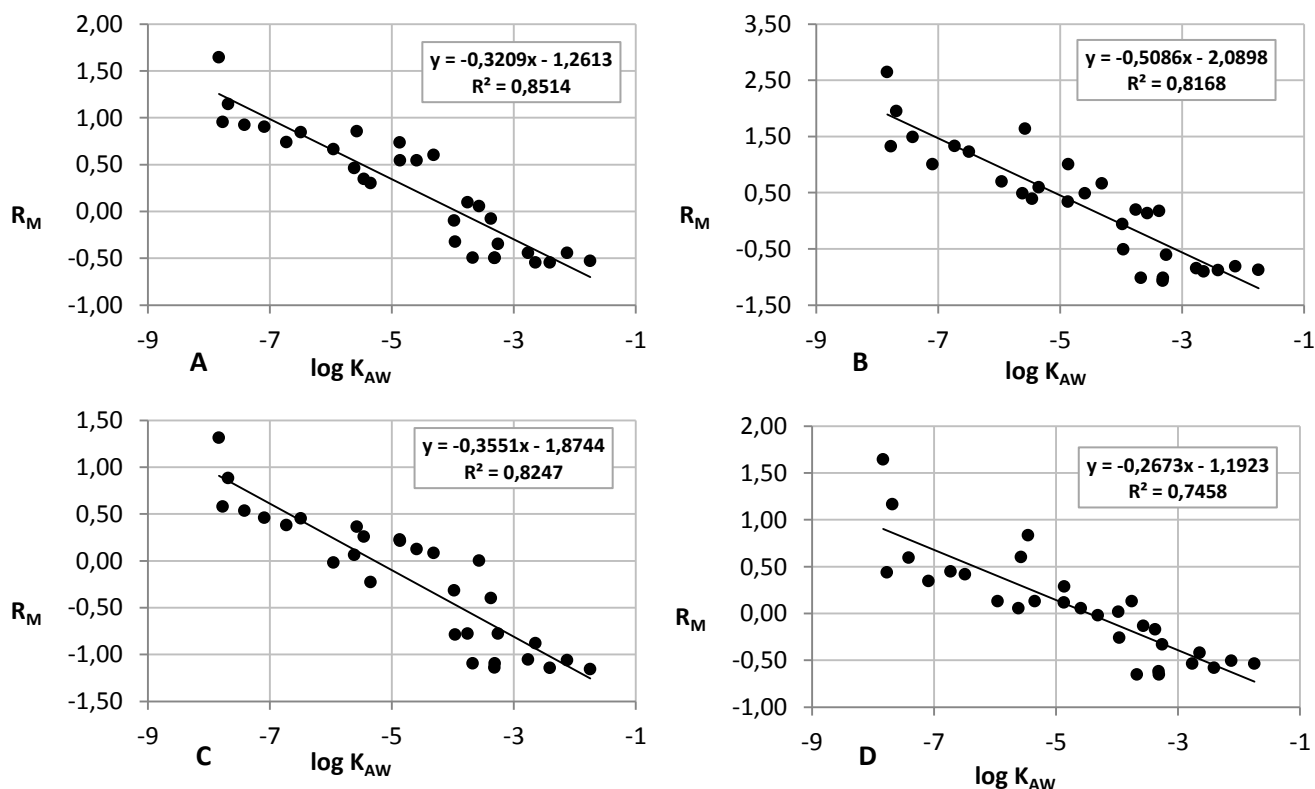
Tabela 22. Retencioni parametri u hromatografskim stemima 1, 2, 3 i 4 za skup jedinjenja sa nepoznatim vrednostima $\log K_{AW}$ parametara

Br.	Jedinjenje	Hromatografski sistem			
		1	2	3	4
1	Barbiturna kis.	1,95	2,65	1,62	1,62
2	1,2,3-Benzotriazol	1,64	2,65	1,21	0,90
3	2,2'-Bihinolin	0,73	1,01	-0,14	-0,18
4	2,2'-Dipiridin	1,33	2,65	0,81	1,15
5	2-Nitrobenzalhid	0,10	0,13	-0,46	-0,10
6	4-Bromanalin	0,37	0,60	-0,23	0,10
7	Benzofenon	0,02	0,13	-0,51	-0,20
8	3-Nitrobenzalhid	0,18	0,25	-0,36	0,24
9	4-Aminobenzoeva kis.	1,64	2,65	1,62	1,64
10	Ftalimid	0,86	1,64	0,79	0,54
11	2-Aminofenol	1,33	1,64	0,26	0,69
12	1,3,5-Trihidroksibenzen	1,64	2,65	1,61	1,66
13	Oksazepam	1,64	2,65	1,60	1,35
14	Lorazepam	1,64	2,65	1,61	1,35
15	Klonazepam	1,64	2,65	1,61	1,17
16	Bromazepam	2,65	2,65	1,11	1,03
17	Diazepam	1,01	1,64	0,78	0,76
18	Prazepam	0,95	2,65	0,51	0,51
19	4-Metoksifenol	0,73	1,01	0,32	0,29
20	Midazolam	1,20	1,93	0,91	0,66
21	Nitrazepam	1,56	2,37	1,33	0,90
22	Klobazam	1,75	2,79	1,58	0,99
23	Medazepam	-0,11	-0,02	-0,54	-0,30
24	Flurazepam	1,07	2,11	0,93	0,56
25	4-Nitrobenzalhid	0,32	0,49	-0,14	0,02
26	Etil-4-hidroksibenzoat	0,82	1,32	0,49	0,44
27	Metil-4-hidroksibenzoat	0,91	1,39	0,56	0,51

Za svaki hromatografski sistem izvedena je jednostavna kalibracija i pri tome su otklonjena sledeća jedinjenja kao spoljašnje vrednosti: anhidrid ftalne kiseline, 1,4-benzohinon, 2,4,6-trinitrofenol, 1-brom-4-hlorbenzen, dibenz(a,h)antracen i benzo(a)piren. Nakon njihovog isključivanja dobijeni su znatno kvalitetniji modeli. Linearne kalibracione zavisnosti prikazane su tabelarno i grafički **Tabela 23**, **Slika 7**.

Tabela 23. Kalibracioni modeli za određivanje podeonog koeficijenta vazduh-voda

Hrom. sistem	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	<i>S.D.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
1	-1,26±0,13	-0,321±0,025	0,8514	0,245	160,38	<1·10 ⁻⁴	30
2	-2,09±0,23	-0,509±0,046	0,8168	0,440	124,86	<1·10 ⁻⁴	30
3	-1,87±0,16	-0,355±0,031	0,8247	0,299	131,73	<1·10 ⁻⁴	30
4	-1,19±0,15	-0,267±0,029	0,7458	0,285	82,15	<1·10 ⁻⁴	30

**Slika 7.** Kalibracioni modeli za određivanje podeonog koeficijenta vazduh-voda A, B, C, D – hromatografski sistemi 1, 2, 3 i 4, redom.

Sa priloženih grafika se uočava negativna zavisnost između retencije ispitivanih jedinjenja u sva četiri hromatografska sistema i $\log K_{AW}$ parametra, što je u skladu sa pozitivnim, odnosno negativnim koeficijentima ispred *A*, *B* i *S* članova u gorepomenutim LSER jednačinama za ove procese. Svi kalibracioni modeli pokazuju zadovoljavajuće statističke parametre, sa širokim radnim opsegom od ≈ -1 do ≈ -9 jedinica, pa su dalje upotrebljeni za predviđanje vazduh-voda particionog koeficijenta za skup jedinjenja sa nepoznatim vrednostima. U nastavku su ove vrednosti upoređene

sa softverski izračunatim primenom KOAWIN programa. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 24**.

Tabela 24. Programski predviđene i hromatografski određene vrednosti vazduh-voda podeonog koeficijenta za skup jedinjenja nepoznatih vrednosti.

Br.	Jedinjenje	logK _{AW}				
		Programski predviđeno (KOAWIN)	Hromatografski određeno			
			1	2	3	4
1	Barbiturna kis.	-11,32	-10,01	-9,31	-9,85	-10,53
2	1,2,3-Benzotriazol	-5,22	-9,05	-9,31	-8,69	-7,84
3	2,2'-Bihinolin	-9,56	-6,22	-6,09	-4,88	-3,80
4	2,2'-Dipiridin	-7,54	-8,08	-9,31	-7,55	-8,75
5	2-Nitrobenzaldehyd	-5,66	-4,23	-4,36	-3,97	-4,10
6	4-Bromanalin	-4,51	-5,08	-5,28	-4,63	-4,82
7	Benzofenon	-4,10	-3,99	-4,36	-3,84	-3,71
8	3-Nitrobenzaldehyd	-5,66	-4,48	-4,60	-4,26	-5,37
9	4-Aminobenzoeva kis.	-8,81	-9,05	-9,31	-9,85	-10,61
10	Ftalimid	-6,38	-6,60	-7,33	-7,50	-6,49
11	2-Aminofenol	-8,09	-8,08	-7,34	-6,00	-7,03
12	1,3,5-Trihidroksibenzen	-12,61	-9,05	-9,32	-9,82	-10,68
13	Oksazepam	-7,65	-9,05	-9,32	-9,78	-9,52
14	Lorazepam	-7,78	-9,05	-9,32	-9,82	-9,52
15	Klonazepam	-10,54	-9,05	-9,32	-9,82	-8,82
16	Bromazepam	-11,29	-12,20	-9,32	-8,42	-8,32
17	Diazepam	-6,83	-7,08	-7,34	-7,47	-7,29
18	Prazepam	-6,81	-6,90	-9,32	-6,70	-6,39
19	4-Metoksifenol	-5,87	-6,22	-6,10	-6,17	-5,53
20	Midazolam	-8,94	-7,66	-7,90	-7,84	-6,93
21	Nitrazepam	-10,41	-8,79	-8,78	-9,04	-7,83
22	Klobazam	-7,93	-9,37	-9,59	-9,72	-8,17
23	Medazepam	-5,17	-3,60	-4,07	-3,75	-3,34
24	Flurazepam	-9,70	-7,28	-8,26	-7,90	-6,54
25	4-Nitrobenzaldehyd	-5,66	-4,92	-5,07	-4,89	-4,55
26	Etil-4-hidroksibenzoat	-6,71	-6,48	-6,71	-6,66	-6,11
27	Metil-4-hidroksibenzoat	-6,83	-6,75	-6,85	-6,85	-6,38

Iz priložene tabele uočava se da postoji dobra korelacija hromatografski određenih vrednosti sa računski predviđenim, osim u slučaju dva jedinjenja, 1,2,3-benzotriazol i 2,2'-bihinolin. Ukoliko bi se data jedinjenja uklonila iz skupa, vrednosti

Pearson-ovog korelacionog koeficijenta bi iznosile od minimalne $R = 0,7766$ za drugi hromatografski sistem do maksimalne vrednosti $R = 0,8428$ za prvi sistem.

Do sada nisu u literaturi prijavljene korelacije između hromatografskog ponašanja jedinjenja u tipičnim normalno-faznim uslovima i particionog koeficijenta vazduh-voda, zbog čega bi dalji razvoj ovog jednostavnog pristupa bio od značaja, tim pre što dati sistemi i procesi koji se u njima odvijaju nemaju zajedničke fizičke i hemijske osnove.

3.4. Određivanje Abrahamovih solvatohromnih parametara

U okviru prvog dela ispitivanja najpre je primenjena LSER metodologija za mapiranje interakcija, odnosno kalibraciju pojedinačnih hromatografskih sistema. Dobijeni LSER modeli diskutovani su u pogledu prisustva spoljašnjih vrednosti i statističkih performansi, ali pre svega dominantnih interakcija, njihove zavisnosti od vrste stacionarne faze, kao i kvalitativnog i kvantitativnog sastava mobilne faze.

U drugom delu ovog ispitivanja izvršen je odabir nekoliko hromatografskih sistema na osnovu multivarijantne analize retencionih podataka i prethodno određenih LSER jednačina. Na osnovu odabranih sistema dalje su određeni solvatohromni parametri, pre svega *A*, *B* i *S*, malih organskih molekula.

U okviru trećeg dela ove studije na osnovu literaturno dostupnih LSER modela kojima su okarakterisani različiti particioni procesi i prethodno određenih solvatohromnih parametara predviđen je niz različitih podeonih koeficijenta, odnosno njihovi logaritamski oblici. Date vrednosti su upoređene sa eksperimentalno određenim, softverski procenjenim, a vrednosti za jedinjenja kod kojih poređenje nije bilo moguće su jednostavno saopštene.

3.4.1. LSER modeli hromatografskih sistema

Pored već opisanih reverzno-faznih sistema A, B i C (**Tabela 2**) nekoliko normalno-faznih hromatografskih sistema je odabrano za LSER modelovanje prema sledećim kriterijumima:

- Da obezbeđuju maksimalan međusoban varijabilitet u pogledu zastupljenih interakcija (proton-donorska, proton-akceptroska, dipolarna, polarizabilna svojstva i sposobnost za formiranje vakancije), odnosno da obezbeđuju LSER modele koji teže ortogonalnom odnosu
- Da za minimalan broj kalibracionih jedinjenja (20 - 30) daju merljive retencione podatke.

Normalno-fazni hromatografski sistemi korišćeni za određivanje Abrahamovih solvatohromnih parametara su:

Stacionarna faza: silika-gel

Mobilna faza:

1. Hloroform (100%)
2. Toluen (100%)
3. 1,2-Dihloretan (100%)
4. 25 % v/v Etilacetat u heksanu

Hloroform je odabran kao dobar proton-donor ($P^* = 4,1$ $\chi_e = 0,25$; $\chi_d = 0,41$; $\chi_n = 0,43$), toluen zbog izraženih polarizabilnih karakteristika ($P^* = 2,4$ $\chi_e = 0,25$; $\chi_d = 0,28$; $\chi_n = 0,47$), 1,2-dihloretan zbog svojih dipolarnih svojstava ($P^* = 3,5$ $\chi_e = 0,30$; $\chi_d = 0,21$; $\chi_n = 0,49$), a etilacetat zbog dobre proton-akceptorske moći ($P^* = 4,4$ $\chi_e = 0,34$; $\chi_d = 0,23$; $\chi_n = 0,43$).

Skup od 48 standardnih supstanci (**Tabela 25**) sa poznatim, eksperimentalno određenim vrednostima A , B i S parametara je pažljivo odabran, tako da između A , B , S i E parametara ne postoji statistički značajna korelacija. Jedinjenja su hromatografisana pod gorepomenutim hromatografskim uslovima, a retencioni parametri su dati u prilogu (**Tabela P1d**).

LSER modeli su dobijeni na sledeći način: za svaki hromatografski sistem izvršena je višestruka linearna regresija na datom skupu jedinjenja koristeći R_M vrednost kao zavisnu promenljivu, odnosno A , B , S , E i V parametre kao nezavisne. Pri tome se vodilo računa da se za kalibraciju uzimaju u obzir samo ona jedinjenja koja pod datim uslovima imaju merljivu retenciju. Svaki model je pažljivo ispitan u pogledu predznaka i aposlutnih vrednosti koeficijenata i odsečaka. Poželjno je da vrednost odsečka bude što niža, a da vrednosti ostalih koeficijenata daju logičnu interpretaciju pod datim uslovima. Sledeći statistički parametri modela su uzeti u obzir: R^2 , R^2_{adj} , $S.D.$, F -vrednost, odnosno njoj pridružena statistička značajnost P , kao merilo kvaliteta linearne zavisnosti.

Tabela 25. Lista standardnih jedinjenja sa poznatim vrednostima Abrahamovih solvatohromnih parametara

Broj	Supstanca	A	B	S	E	V
1	Barbiturna kiselina	0,46	1,16	1,19	1,09	0,81
2	<i>p</i> -Anizidin	0,16	0,66	1,26	1,05	1,02
3	1,2,3-Benzotriazol	0,62	0,48	1,70	1,47	0,86
4	2,2'-Bihinolin	0,00	0,93	2,02	2,54	1,98
5	Difenilamin	0,08	0,51	1,08	1,59	1,42
6	2,2'-Dipiridin	0,00	0,81	1,33	1,38	1,24
7	Anhidrid ftalne kiselina	0,00	0,40	2,30	1,16	0,98
8	1,4-Naftohinon	0,00	0,62	1,13	1,08	1,16
9	2-Jodbenzoeva kiselina	0,74	0,46	1,27	1,31	1,19
10	4-Hlorbenzoeva kiselina	0,63	0,27	1,02	0,84	1,05
11	2-Nitrobenzalhid	0,00	0,38	1,59	1,12	1,05
12	4-Bromanilin	0,31	0,30	1,19	1,19	0,99
13	Fenol	0,60	0,30	0,89	0,81	0,78
14	Benzofenon	0,00	0,50	1,50	1,45	1,48
15	3-Nitrobenzalhid	0,00	0,48	1,49	1,10	1,05
16	4-Aminobenzoeva kiselina	0,94	0,69	1,61	1,08	1,03
17	Ftalimid	0,39	0,44	1,97	1,18	1,02
18	Pirogalol	1,35	0,62	1,35	1,17	0,89
19	Galna kiselina	1,62	0,85	1,73	1,29	1,11
20	1,4-Benzohinon	0,00	0,81	0,55	0,75	0,79
21	4-Nitrofenol	0,82	0,26	1,72	1,07	0,95
22	3-Nitrofenol	0,79	0,23	1,57	1,05	0,95
23	Benzil alkohol	0,39	0,56	0,87	0,80	0,92
24	Naftilamin	0,20	0,57	1,26	1,67	1,19
25	2-Naftol	0,61	0,40	1,08	1,52	1,14
26	4-Fluoroanilin	0,28	0,40	1,09	0,76	0,83
27	1-Naftol	0,60	0,37	1,05	1,52	1,14
28	4-Hidroksibezaldehid	0,85	0,37	1,54	1,01	0,93
29	3-Hlornitrobenzen	0,00	0,25	1,14	1,00	1,01
30	2,4-Dihlorfenol	0,53	0,19	0,84	0,96	1,02
31	4-Metilfenol	0,57	0,31	0,87	0,82	0,92
32	4-Hlorfenol	0,67	0,20	1,08	0,92	0,90
33	Antracen	0,00	0,28	1,34	2,29	1,45
34	Acetofenon	0,00	0,48	1,01	0,82	1,01
35	2-Aminofenol	0,60	0,66	1,10	1,11	0,87
36	2,4,6-Trinitrofenol	0,46	0,42	2,66	1,43	1,30
37	2,4,6-Trichlorofenol	0,42	0,15	0,94	1,07	1,14
38	2,4-Dinitrofenol	0,09	0,56	1,49	1,20	1,24
39	4-t-Butilfenol	0,56	0,41	0,89	0,81	1,34
40	1,3,5-Trihidroksibenzen	1,40	0,82	1,12	1,36	0,89
41	2,6-Dimetilfenol	0,39	0,39	0,79	0,86	1,06
42	Oksazepam	0,45	1,60	1,10	2,35	1,99
43	Lorazepam	0,45	1,63	1,28	2,51	2,11
44	Klonazepam	0,33	1,50	1,75	2,46	2,11
45	Bromazepam	0,33	1,62	1,38	2,31	1,94
46	Diazepam	0,00	1,25	1,57	2,08	2,07
47	4-Metoksifenol	0,57	0,48	1,17	0,90	0,97

Prilikom ispitivanja rezidualnih vrednosti, svako jedinjenje čija bi vrednost standardnog reziduala prevazilazila kritičnu vrednost na nivou značajnosti od $P = 0,05$ je uklanjano iz modela, a da se dato odstupanje pri tome moglo objasniti. Naročito se vodilo računa da jedinjenja koja se uklanjaju iz kalibracionog seta ne dovode do značajnih promena u koeficijentima modela, već da samo smanjuju ukupnu rezidualnu grešku i time daju preciznije procene a , b , s , e i v koeficijenata.

Lista dobijenih LSER modela data je u **Tabeli 26**.

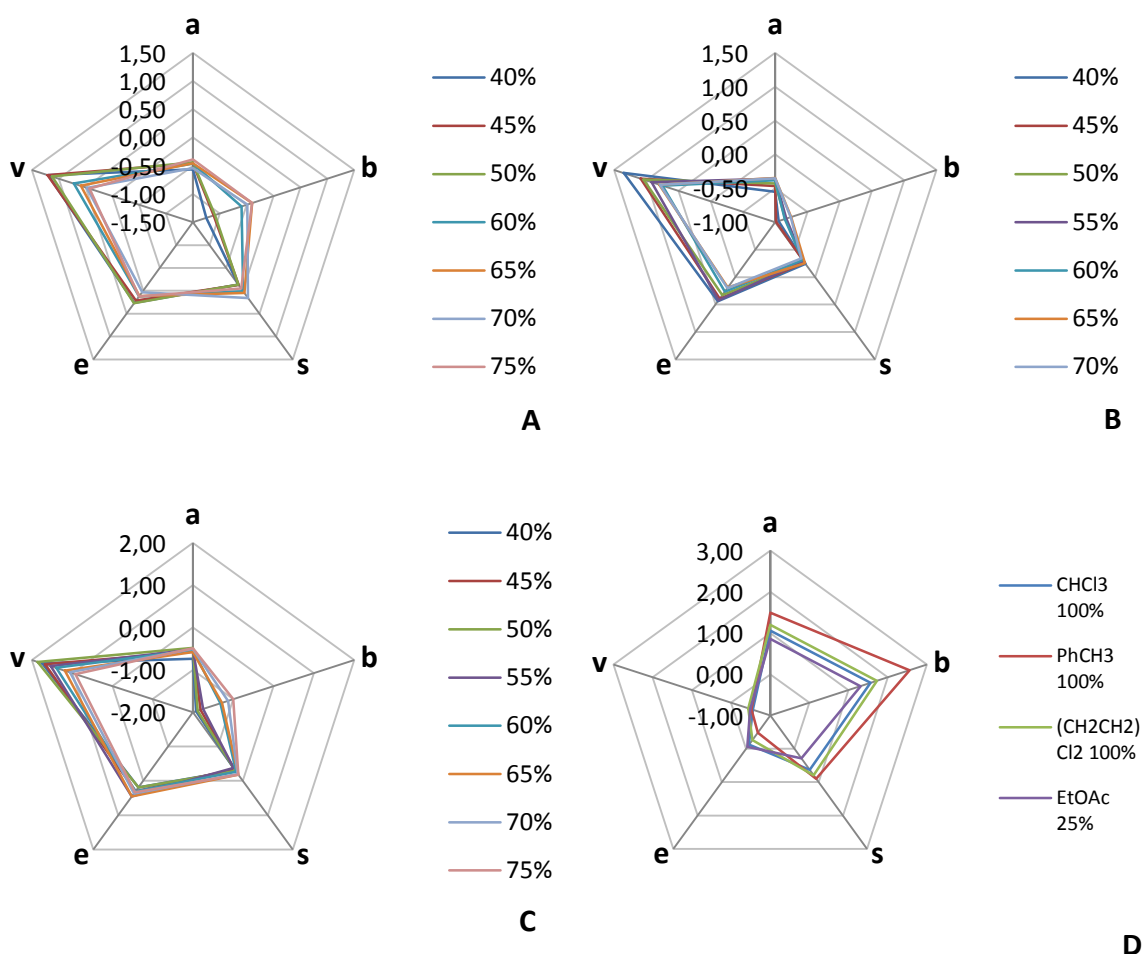
Statistički parametri dobijenih modela ukazuju na visok stepen linearne zavisnosti između retencije u datim hromatografskim sistemima i solvatomomnih parametara. Dobre vrednosti R^2_{adj} ukazuju na odsustvo precejenosti modela koje nastaje usled korišćenja većeg broja nezavisnih promenljivih u odnosu na broj kalibracionih tačaka. Vrednosti standardnih grešaka su zadovoljavajuće i znatno niže nego u slučaju kalibracionih modela korišćenih za određivanje lipofilnosti, odnosno zemljište-voda podeonog koeficijenta.

Vrednosti koeficijenata dobijenih modela pokazuju pravilnost, kako u pogledu predznaka i apsolutne vrednosti u pojedinačnim hromatografskim sistemima, tako i rastućem, odnosno opadajućem trendu sa promenama u udelima komponenata mobilne faze. Dati odnosi su zbog preglednosti prikazani grafički pomoću zvezdastog dijagrama i histograma (**Slike 8 i 9**).

Tabela 26. LSER modeli ispitivanih hromatografskih sistema sa pratećom statistikom

Model br.	Hromatografski sistem	<i>I</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>s</i>	<i>e</i>	<i>v</i>	R^2/R^2_{adj}	<i>S.D.</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
1	Silika-gel CHCl ₃ 100%	-0,65±0,15	1,058±0,087	1,56±0,12	0,631±0,108	-0,12±0,13	-0,56±0,18	0,9465 0,9376	0,188	<1·10 ⁻⁴	36
2	Silika-gel PhCH ₃ 100%	-1,00±0,19	1,495±0,122	2,56±0,15	0,897±0,115	-0,48±0,18	-0,52±0,26	0,9546 0,9472	0,240	<1·10 ⁻⁴	37
3	Silika-gel (CH ₂ CH ₂)Cl ₂ 100%	-1,40±0,20	1,199±0,123	1,73±0,15	0,793±0,141	-0,263±0,172	-0,44±0,23	0,9160 0,9028	0,242	<1·10 ⁻⁴	38
4	Silika-gel EtOAc 25%	-0,44±0,18	0,856±0,107	1,30±0,13	0,282±0,110	-0,06±0,15	-0,49±0,20	0,8700 0,8491	0,214	<1·10 ⁻⁴	37
5	RP-18 Aceton-voda 40:60 v/v	0,10±0,21	-0,56±0,073	-1,25±0,15	-0,13±0,095	0,26±0,11	1,19±0,22	0,9146 0,8999	0,159	<1·10 ⁻⁴	35
6	RP-18 Aceton-voda 45:55, v/v	-0,08±0,17	-0,455±0,060	-1,11±0,12	-0,128±0,077	0,22±0,090	1,21±0,18	0,9313 0,9190	0,129	<1·10 ⁻⁴	34
7	RP-18 Aceton-voda 50:50, v/v	-0,23±0,15	-0,441±0,053	-1,09±0,11	-0,136±0,069	0,272±0,086	1,12±0,15	0,9411 0,9313	0,116	<1·10 ⁻⁴	36
8	RP-18 Aceton-voda 55:45, v/v	-0,27±0,13	-0,452±0,054	-0,79±0,13	-0,076±0,079	0,192±0,086	1,12±0,15	0,9411 0,9313	0,145	<1·10 ⁻⁴	36
9	RP-18 Aceton-voda 60%	-0,34±0,11	-0,462±0,057	-0,59±0,09	0,012±0,072	0,130±0,090	0,72±0,14	0,8767 0,8591	0,127	<1·10 ⁻⁴	41
10	RP-18 Aceton-voda 65:35, v/v	-0,52±0,12	-0,456±0,060	-0,40±0,10	0,047±0,077	0,11±0,10	0,59±0,15	0,8438 0,8215	0,135	<1·10 ⁻⁴	41
11	RP-18 Aceton-voda 70:30, v/v	-0,51±0,13	-0,540±0,072	-0,49±0,11	0,156±0,088	0,03±0,11	0,47±0,17	0,7770 0,7433	0,154	<1·10 ⁻⁴	39
12	RP-18 Aceton-voda 75:25, v/v	-0,51±0,13	-0,540±0,072	-0,49±0,11	0,156±0,088	0,03±0,11	0,47±0,17	0,7770 0,7433	0,154	<1·10 ⁻⁴	39
13	RP-18 Acetonitril-voda 40:60, v/v	-0,44±0,22	-0,551±0,077	-0,95±0,15	-0,243±0,102	0,44±0,13	1,35±0,22	0,9171 0,9028	0,168	<1·10 ⁻⁴	35
14	RP-18 Acetonitril-voda 45:55, v/v	-0,27±0,23	-0,467±0,080	-0,99±0,16	-0,263±0,106	0,39±0,13	1,09±0,23	0,8871 0,8677	0,174	<1·10 ⁻⁴	35

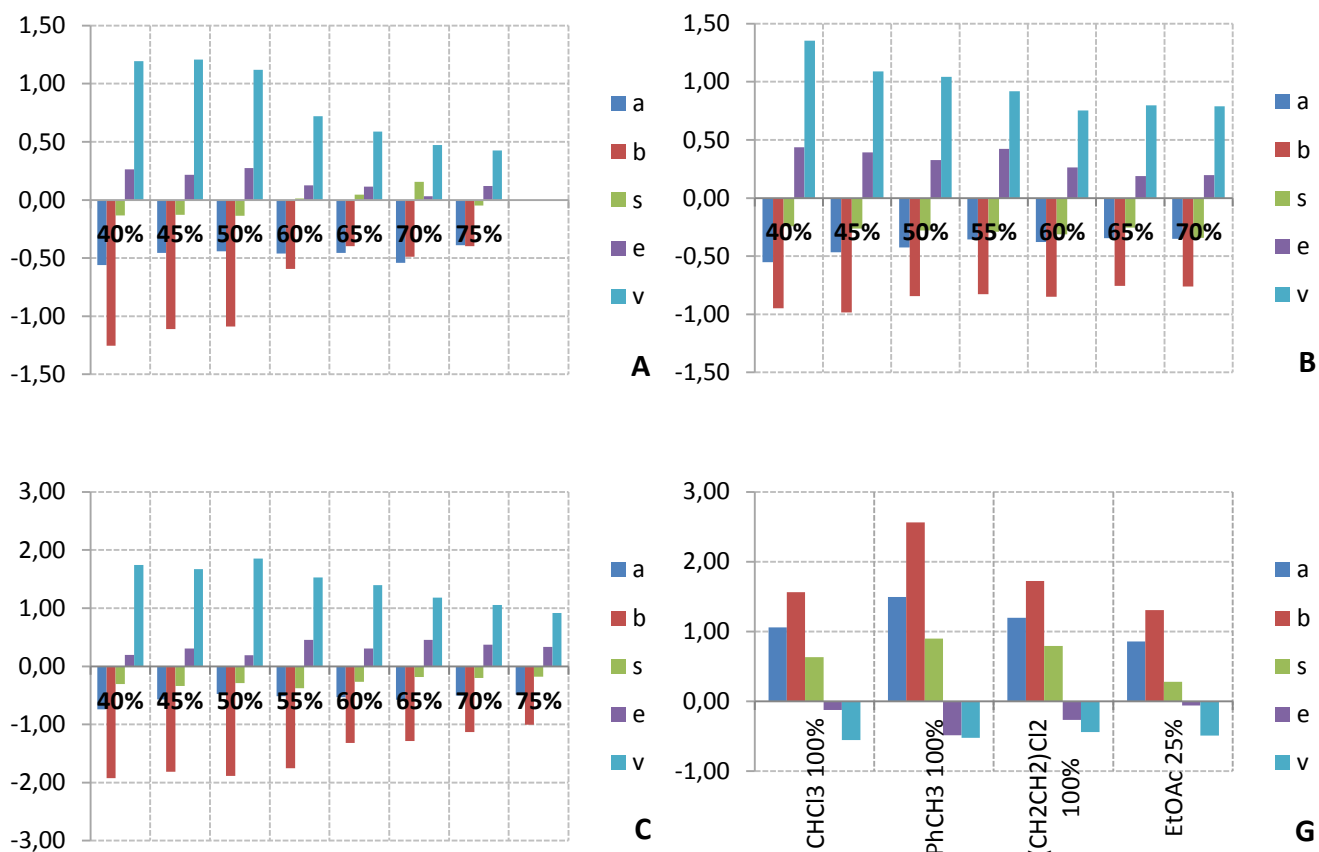
Model br.	Hromatografski sistem	<i>I</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>s</i>	<i>e</i>	<i>v</i>	<i>R</i> ² / <i>R</i> ² adj.	<i>S.D.</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
15	RP-18 Acetonitril-voda 50:50, v/v	-0,36±0,19	-0,425±0,066	-0,84±0,13	-0,279±0,087	0,327 ±0,108	1,04±0,19	0,9051 0,8888	0,144	<1·10 ⁻⁴	35
16	RP-18 Acetonitril-voda 55:45, v/v	-0,51±0,18	-0,355±0,063	-0,83±0,12	-0,292±0,084	0,423 ±0,104	0,92±0,18	0,9016 0,8846	0,138	<1·10 ⁻⁴	35
17	RP-18 Acetonitril-voda 60:40, v/v	-0,26±0,16	-0,379±0,080	-0,85±0,13	-0,312±0,088	0,26 ±0,13	0,75±0,20	0,7894 0,7601	0,184	<1·10 ⁻⁴	42
18	RP-18 Acetonitril-voda 65:35, v/v	-0,55±0,17	-0,345±0,082	-0,75±0,13	-0,254±0,091	0,19 ±0,13	0,80±0,20	0,7527 0,7184	0,191	<1·10 ⁻⁴	42
19	RP-18 Acetonitril-voda 70:30, v/v	-0,52±0,16	-0,351±0,081	-0,76±0,13	-0,342±0,090	0,20 ±0,13	0,79±0,20	0,7699 0,7380	0,188	<1·10 ⁻⁴	42
20	RP-18 Metanol-voda 40:60, v/v	0,39±0,30	-0,740±0,105	-1,92±0,18	-0,307±0,138	0,19 ±0,17	1,74±0,30	0,9333 0,9205	0,225	<1·10 ⁻⁴	32
21	RP-18 Metanol-voda 45:55 v/v	0,00±0,27	-0,570±0,094	-1,81±0,17	-0,337±0,124	0,30 ±0,15	1,67±0,27	0,9340 0,9217	0,202	<1·10 ⁻⁴	33
22	RP-18 Metanol-voda 50:50, v/v	-0,25±0,32	-0,477±0,112	-1,89±0,20	-0,290±0,148	0,189 ±0,185	1,85±0,32	0,9073 0,8901	0,241	<1·10 ⁻⁴	33
23	RP-18 Metanol-voda 55:45, v/v	-0,27±0,24	-0,514±0,083	-1,75±0,15	-0,375±0,110	0,454 ±0,137	1,53±0,24	0,9438 0,9334	0,179	<1·10 ⁻⁴	33
24	RP-18 Metanol-voda 60:40, v/v	-0,43±0,13	-0,531±0,069	-1,32±0,11	-0,265±0,085	0,31 ±0,11	1,39±0,17	0,9378 0,9287	0,152	<1·10 ⁻⁴	40
25	RP-18 Metanol-voda 65:35, v/v	-0,63±0,15	-0,574±0,081	-1,28±0,12	-0,183±0,098	0,45 ±0,13	1,18±0,19	0,9193 0,9074	0,177	<1·10 ⁻⁴	40
26	RP-18 Metanol-voda 70:30, v/v	-0,59±0,11	-0,503±0,059	-1,13±0,09	-0,203±0,072	0,37 ±0,09	1,05±0,14	0,9413 0,9326	0,130	<1·10 ⁻⁴	40
27	RP-18 Metanol-voda 75:25, v/v	-0,64±0,11	-0,488±0,057	-1,00±0,09	-0,179±0,069	0,34 ±0,09	0,92±0,14	0,9344 0,9248	0,125	<1·10 ⁻⁴	40



Slika 8. Hromatografski sistemi u (*a*, *b*, *s*, *e*, *v*) prostoru; A - C18, aceton-voda, B - C18, acetonitril-voda, C – C18, metanol-voda, D – silika-gel i tipični normalno-fazni rastvarači

Sa zvezdastih dijagrama se jasno uočava da u tipičnim reverzno-faznim uslovima (A-C) dominira, sa pozitivnim predznakom, entropijski uslovljen faktor formiranja vakancije, *v*. Potom slede proton-donorska, *b*, i proton-akceptorska svojstva, *a*, sa negativnim predznakom dok su dipolarni, *s*, i polarizabilni, *e*, uticaji zanemarljivi. Potpuno obrnut slučaj, gotovo simetrično reflektovan, se uočava u tipičnim normalno-faznim sistemima (D). Sa **Slike 9** se mogu jasnije pratiti kvantitativni odnosi u vrednostima solvatohromnih koeficijenata sa promenama u sastavu mobilne faze i vrste hromatografskog sistema. Uočava se da sa porastom sadržaja organske komponente u mobilnoj fazi dolazi do značajnog, gotovo linearnog smanjenja vrednosti parametara *v* i *b*. U prvom slučaju ovo se može objasniti narušavanjem strukture mobilne faze i olakšavanjem formiranja vakacije unutar iste za smeštaj molekula. Ovo smanjenje je

najizraženije u slučaju acetona i metanola (skoro 3 puta), dok je nešto slabije u slučaju acetonitrila. Vrednosti parametra v su najveće u slučaju metanola što se može objasniti njegovom sposobnošću da učestvuje u izgradnji vodoničnih veza i kao proton-donor, ili akceptor, odnosno vodi sličnim svojstvima.



Slika 9. Zavisnost a , b , s , e i v parametara od sastava mobilne faze i tipa hromatografskog sistema. A - C18, aceton-voda, B - C18, acetonitril-voda, C – C18, metanol-voda, D – silika-gel i tipični normalno-fazni rastvarači

Što se tiče proton-kiselosti hromatografskog sistema b , njeno smanjenje se može objasniti smanjenim udelom vode u mobilnoj fazi (negativan predznak) čiji molekuli predstavljaju glavne proton-donore u izgradnji vodoničnih veza. Ovo je uočljivije ukoliko se uporede vrednosti b u slučaju acetona, acetonitrila i metanola kao organskih modifikatora (A-C). U prvom slučaju ovaj efekat je najizraženiji, jer je aceton dobar proton-akceptor te je smanjenje parametra b skoro dvostruko. Slična situacija se može primetiti i kod metanola.

Proton-baznost hromatografskog sistema se slabo menja sa promenom udela organske komponente u datom intervalu, a isto važi i za dipolarna i polarizabilna svojstva, koja su nešto izraženija u slučaju acetonitrila kao organskog modifikatora, što se objašnjava izraženim dipolarnim efektom CN grupe.

Negativan predznak proton-baznosti, odnosno proton-kiselosti kod reverzno-faznih sistema ukazuje na to da se ove interakcije ostvaruju mahom sa mobilnom fazom (slabljenje retencije). Pozitivan predznak ovih parametara kod normalno-faznih sistema potiče od interakcija sa stacionarnom fazom, odnosno silanolnim grupama, koje se prema vrednostima parametara b i a ponašaju kao bolji proton-donori nego akceptori (**Slika 9.D**). Takođe su izraženija i dipolarna svojstva ovih sistema u odnosu na reverzno-fazne. Najveće promene u datim svojstvima se uočavaju u slučaju 25% v/v EtOAc u heksanu kao mobilne faze, zbog njegovog afiniteta prema adsorpcionim mestima, dok su najmanja smanjenja svih koeficijenata (najveće vrednosti) dobijene u slučaju toluena kao monokomponentne mobilne faze. Parametar v je statistički nesignifikantan i ne podleže promenama bez obzira na vrstu mobilne faze, što ukazuje pre svega na dominantan adsorpcioni mehanizam.

Dobijeni modeli kako za reverzno-fazne tako i za normalno-fazne TLC uslove su u saglasnosti sa sličnim LSER modelima koji važe za različite HPLC sisteme [79, 80].

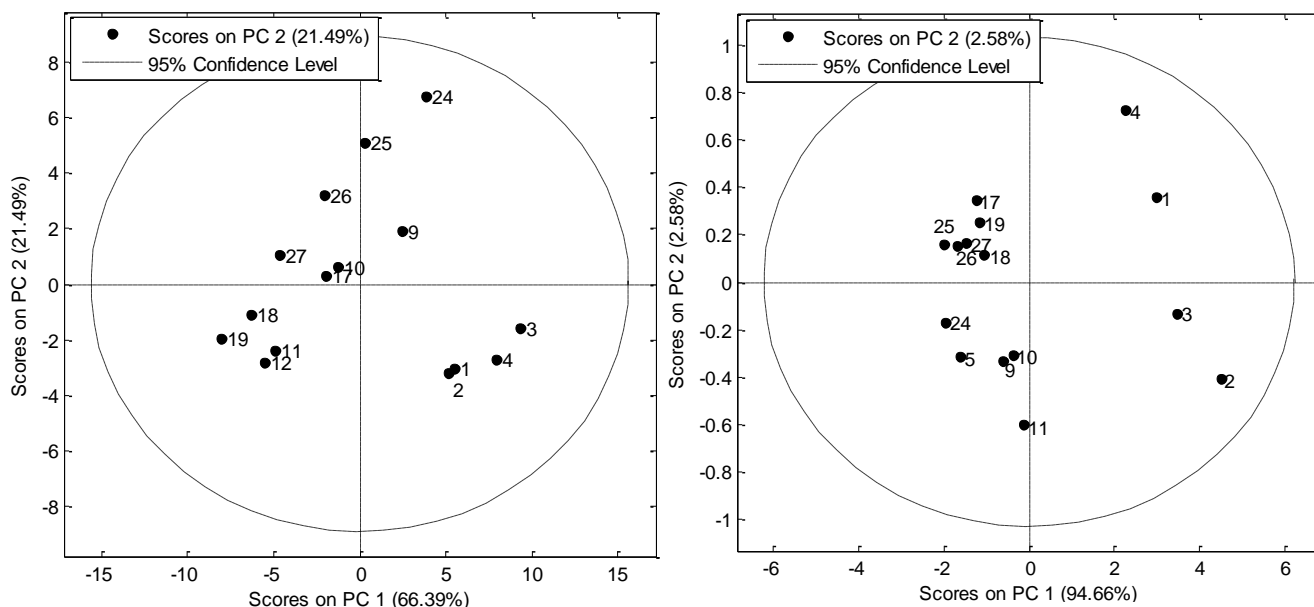
3.4.2. Odabir hromatografskih sistema za određivanje A , B i S parametara

Kao što je već rečeno u Opštem delu, pristupi za određivanje solvatohromnih parametara su izuzetno raznovrsni, kako po izboru eksperimentalnih tehnika tako i po odabiru računskih postupaka. U našem slučaju nekoliko računskih tehnika je uzeto u razmatranje.

Za razvoj metodologije korišćen je skup jedinjenja prikazanih u **Tabeli 25** i nešto manji skup hromatografskih sistema: 1-4, 9-12, 17-19 i 24-27 (**Tabela 26**).

Kako bi se uočile sličnosti, odnosno razlike među hromatografskim sistemima i evidentiralo eventualno prisustvo spoljašnjih vrednosti kako među samim sistemima, tako i među ispitivanim supstancama, urađena je multivarijantna analiza hromatografskih podataka.

Retencioni podaci su podvrgnuti analizi glavnih komponenta, odnosno hijerarhijskoj klusterskoj analizi. Rezultati su prikazani na **Slikama 10 i 11**.

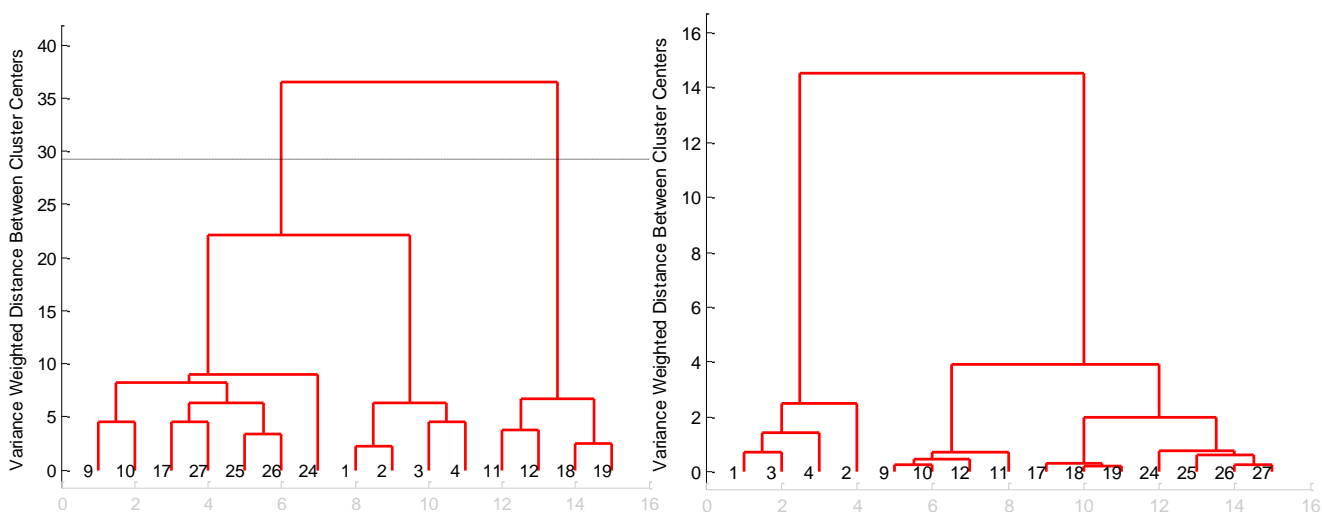


Slika 10. Projekcije skorova hromatografskih sistema za prve dve glavne komponente; **A** – na osnovu retencionih podataka, **B** – na osnovu a , b , s , e i v parametara

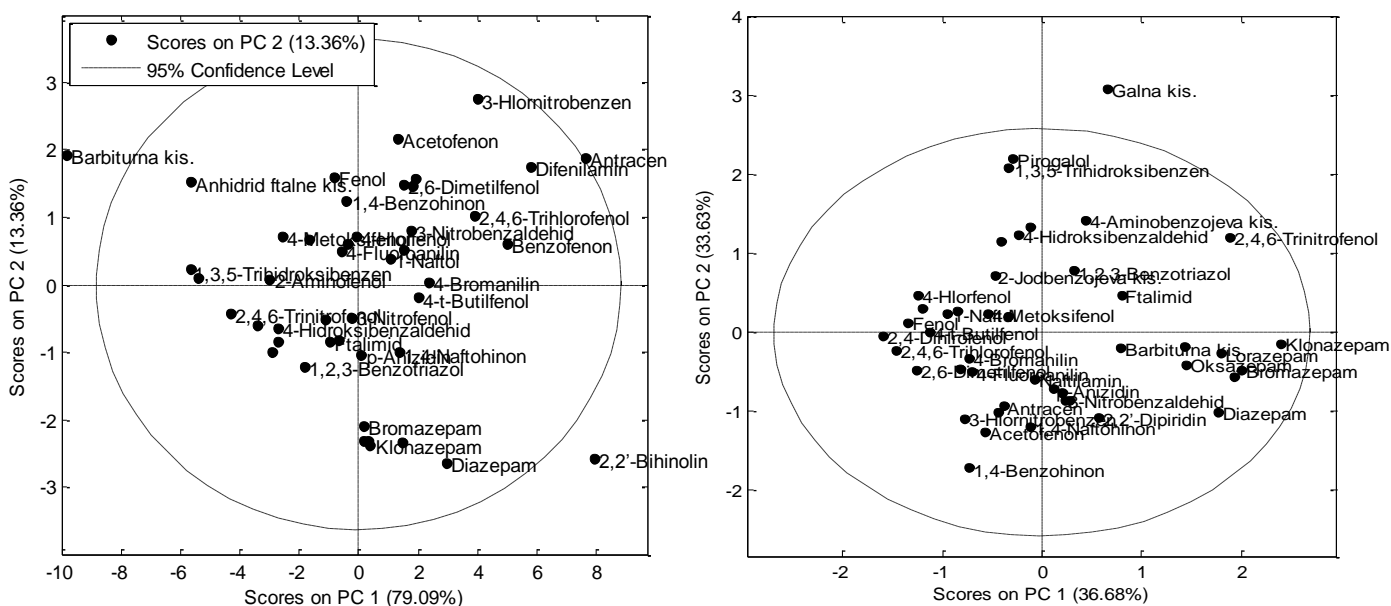
Na osnovu grafika skorova $PC1$ prema $PC2$ na osnovu retencionih podataka, ali i na osnovu a , b , s , e i v parametara izdvajaju se jasno duž $PC1$ ose dve grupe hromatografskih sistema, reverzno-fazni (9-24) i normalno-fazni (1-4). Isto grupisanje potvrđeno je i hijerarhijskom klusterskom analizom (**Slika 11**). Razmatrajući klasifikaciju na osnovu solvatohromnih parametara mogu se uočiti tri grupe hromatografskih sistema: I grupa koja pokazuje dominantne negativne vrednosti parametra b (17 – 27), II grupa koja ima nulte vrednosti parametra s (9-12) III grupa (1-4) koja pokazuje visoke pozitivne vrednosti parametara a , b i s .

Klasifikacija izvedena na osnovu retencionih podataka daje nešto drugačije grupisanje: I - (1-4), II – (11-19) i III – (9-27).

Za potrebe razvoja metode kombinovane su obe klasifikacije i u oba slučaja za dalji rad su odabrani oni sistemi koji su međusobno najudaljeniji. Na osnovu toga predložena je sledeća kombinacija hromatografskih sistema: 1, 11, 17 i 25.



Slika 11. Hijerarhijska klasterijska analiza hromatografskih sistema na osnovu: **A** – retencionih podataka, **B** – a , b , s , e i v parametara



Slika 12. Grafik skorova prve dve glavne komponente za raspored jedinjenja na osnovu **A** – retencionih podataka, **B** – A , B i S parametara.

Da bi se mapirao raspored supstanci u multivarijantnom prostoru urađena je PCA analiza na matrici retencionih podataka i A , B i S parametara.

Dobijeni rezultati prikazani su kao uzajamne projekcije skorova prve dve glavne komponente (**Slika 12**). Na grafiku se uočava prisustvo spoljašnjih vrednosti, mada objekti nisu izdvojeni u dovoljnoj meri da bi bili eliminisani iz daljeg razmatranja.

3.4.3. Određivanje A , B i S parametara

Za potrebe razvoja metodologije određivanja A , B i S parametara korišćen je set jedinjenja za koje postoje eksperimentalno određene vrednosti parametara A , B i S (**Tabela 25**). Ovo je urađeno sa ciljem kasnijeg poređenja izračunatih sa eksperimentalnim vrednostima i određivanja preciznosti, odnosno tačnosti primenjenog postupka.

U cilju određivanja A , B i S parametara korišćen je sledeći računski pristup. Za odabrane hromatografske sisteme (1, 11, 17 i 25) uzeti su već definisani LSER modeli za predviđanje retencije (R_M vrednosti). Primenom Solvera – dodatka za Microsoft Excel, pronađena je kombinacija A , B i S parametara takva da je za dati set jedinjenja i skup hromatografskih sistema ukupna rezidualna greška predviđenih R_M vrednosti minimalna. Pri tome je odabran i tzv. uslovljavajući skup jedinjenja uz postavljena dodatna ograničenja:

- (1) Vrednosti A , B i S parametara moraju biti pozitivne
- (2) Greške reziduala za svaki solvatohromni parametar unutar uslovljavajućeg skupa moraju biti minimalne
- (3) Uslovljavajući skup jedinjenja je odabran selekcijom jedinjenja čiji su A , B , S vektori što je moguće više udaljeni

Za formiranje uslovljavajućeg skupa jedinjenja korišćeni su grafici skorova (**Slika 12**). Odabrana su jedinjenja sa što udaljenijih tačaka sva četiri kvadranta grafika. Dati set jedinjenja prikazan je u **Tabeli 27**.

Kako Solver korisiti samo jedan parametar za minimizaciju to je definisana sledeća optimizaciona funkcija odgovora, odnosno ukupna suma reziduala koja zadovoljava uslove (2) i (3).

$$SR = \sum_{j=1}^h \sum_{i=1}^n (R_{M_{ij}} - \hat{R}_{M_{ij}})^2 + \sum_{i=1}^f (A_i - \hat{A}_i)^2 + \sum_{i=1}^f (B_i - \hat{B}_i)^2 + \sum_{i=1}^f (S_i - \hat{S}_i)^2 \quad (62)$$

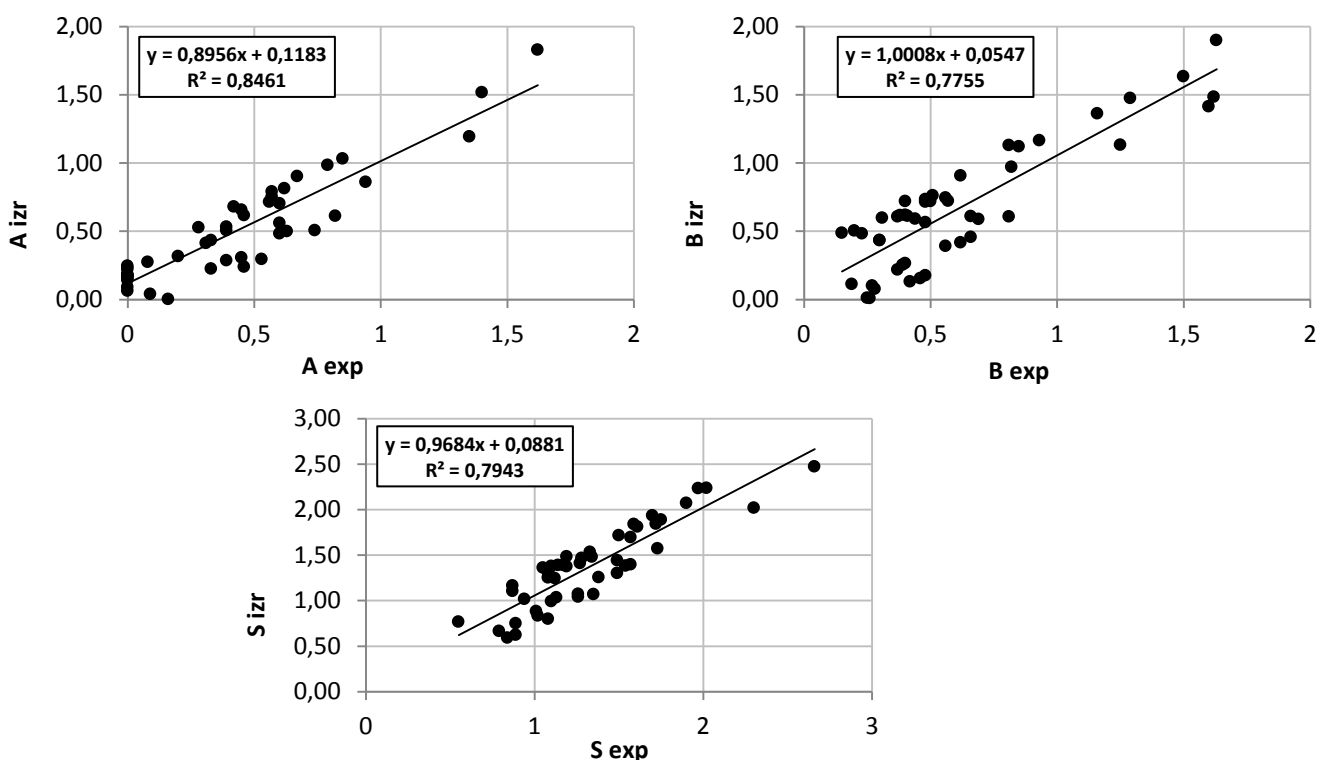
gde su: $\hat{R}_{M_{ij}}$ predviđene retencije za svako i -to jedinjenje u j -tom hromatografskom sistemu dok su $\hat{A}_i, \hat{B}_i, \hat{S}_i$ Solverom optimizovane vrednosti solvatohromnih parametara A , B i S .

Tabela 27. Uslovljavajući skup jedinjenja

Br.	Supstanca	Br.	Supstanca
1	Difenilamin	10	Acetofenon
2	Anhidrid ftalne kiseline	11	2,4,6-Trichlorofenol
3	Fenol	12	4-t-Butilfenol
4	Benzofenon	13	2,6-Dimetilfenol
5	Galna kiselina	14	Oksazepam
6	1,4-Benzohinon	15	Klonazepam
7	4-Hidroksibezaldehid	16	Bromazepam
8	3-Hlornitrobenzen	17	4-Metoksifenol
9	Antracen		

Pri tome je odabran je GRG nelinearni algoritam za rešavanje problema sa iterativnim ograničenjem od $1 \cdot 10^{-4}$. Nakon pokretanja Solvera dobijene su nove vrednosti za postojeći set podataka (**Tabela 28**).

Saglasnost između eksperimentalnih i izračunatih vrednosti prikazana je grafički (**Slika 13**).



Slika 13. Poređenje izračunatih sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za solvatochromne parametre A, B i S.

Tabela 28. Izračunate vrednosti parametara *A*, *B* i *S*

Broj	Supstanca	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>S</i>
1	Barbiturna kiselina	0,62	1,36	1,38
2	<i>p</i> -Anizidin	0,00	0,46	1,07
3	1,2,3-Benzotriazol	0,82	0,73	1,93
4	2,2'-Bihinolin	0,18	1,17	2,24
5	Difenilamin	0,28	0,76	1,31
6	2,2'-Dipiridn	0,16	0,61	1,53
7	Anhidrid ftalne kiseline	0,17	0,62	2,02
8	1,4-Naftohinon	0,22	0,91	1,04
9	2-Jodbenzoeva kiselina	0,51	0,16	1,41
10	4-Hlorbenzoeva kiselina	0,50	0,10	0,83
11	2-Nitrobenzaldehyd	0,18	0,62	1,84
12	4-Bromanilin	0,41	0,44	1,49
13	Fenol	0,70	0,44	0,75
14	Benzofenon	0,17	0,72	1,72
15	3-Nitrobenzaldehyd	0,23	0,18	1,30
16	4-Aminobenzoeva kiselina	0,86	0,59	1,81
17	Ftalimid	0,51	0,59	2,24
18	Pirogalol	1,19	0,42	1,07
19	Galna kiselina	1,83	1,12	1,57
20	1,4-Benzohinon	0,25	1,13	0,77
21	4-Nitrofenol	0,61	0,01	1,84
22	3-Nitrofenol	0,99	0,48	1,69
23	Benzil alkohol	0,53	0,75	1,17
24	Naftilamin	0,32	0,72	1,04
25	2-Naftol	0,51	0,26	0,80
26	4-Fluoroanilin	0,53	0,72	1,36
27	1-Naftol	0,48	0,22	1,36
28	4-Hidroksibezaldehyd	1,03	0,61	1,38
29	3-Hlornitrobenzen	0,18	0,01	1,39
30	2,4-Dihlorfenol	0,30	0,11	0,59
31	4-Metilfenol	0,79	0,60	1,10
32	4-Hlorfenol	0,90	0,50	1,25
33	Antracen	0,16	0,08	1,48
34	Acetofenon	0,07	0,56	0,89
35	2-Aminofenol	0,56	0,61	1,38
36	2,4,6-Trinitrofenol	0,24	0,13	2,47
37	2,4,6-Trihlorofenol	0,68	0,49	1,02
38	2,4-Dinitrofenol	0,04	0,39	1,44
39	4-t-Butilfenol	0,72	0,61	0,62
40	1,3,5-Trihidroksibenzen	1,52	0,97	1,24
41	2,6-Dimetilfenol	0,29	0,25	0,67
42	Oksazepam	0,31	1,41	0,99
43	Lorazepam	0,66	1,90	1,47
44	Klonazepam	0,43	1,64	1,89
45	Bromazepam	0,23	1,48	1,26
46	Diazepam	0,09	1,13	1,40
47	4-Metoksifenol	0,75	0,72	1,39

Sa **Slike 13** se uočava relativno dobro slaganje između eksperimentalnih i izračunatih vrednosti za A , B i S parametre sa ujednačenom raspodelom rezidualnih vrednosti i standardnim rezidualnim greškama $S_A = 0,17$, $S_B = 0,22$ i $S_S = 0,20$.

U nastavku ispitivanja gore opisana metodologija proširena je na veći skup jedinjenja ($n = 69$), od toga su za dodatnih 11 jedinjenja bile poznate eskeperimentalno određene vrednosti solvatohromnih parametara. Prethodnih 47 jedinjenja poslužili su kao tzv. uslovljavajući skup.

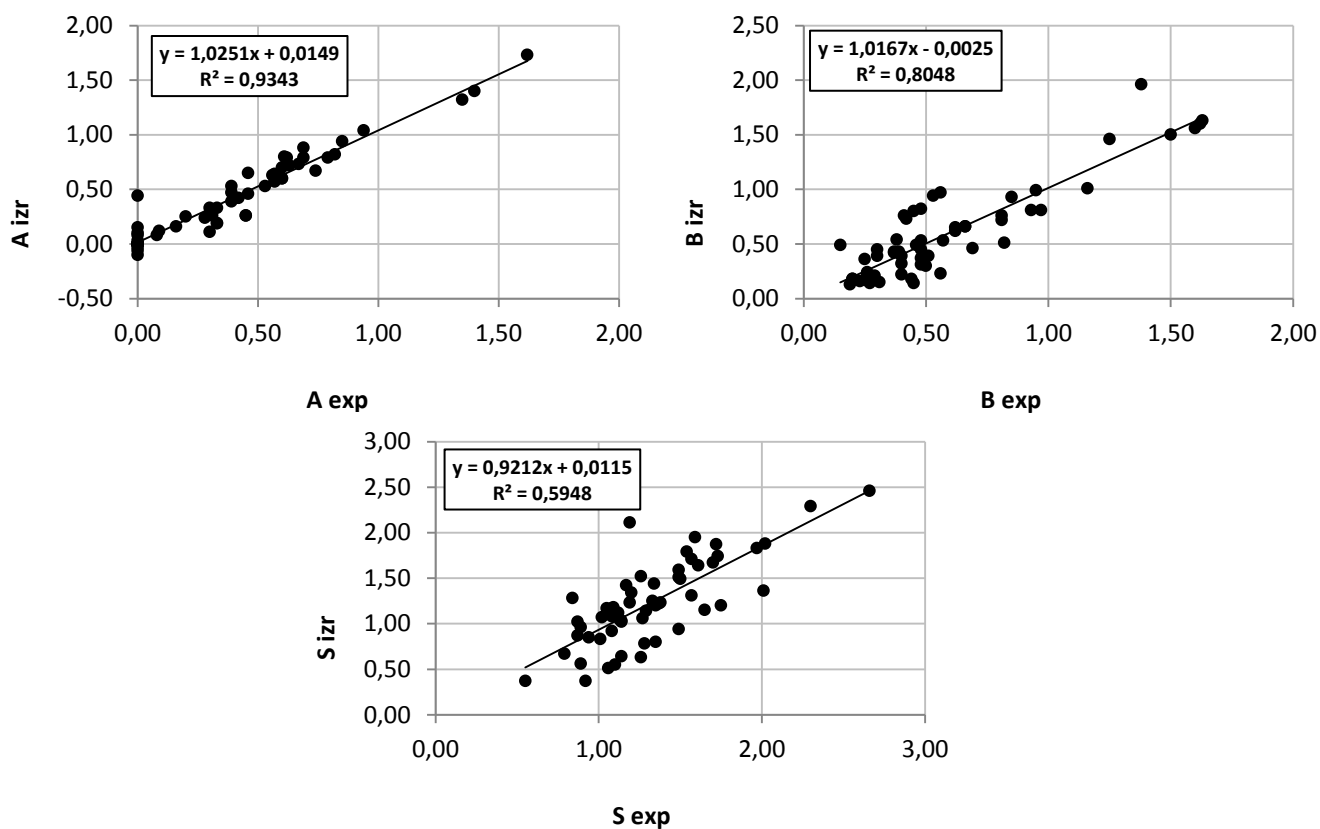
Dobijene vrednosti A , B i S parametara za jedinjenja sa nepoznatim vrednostima prikazane su u **Tabeli 29**. Poređenje eksperimentalnih i izračunatih vrednosti prikazano je grafički (**Slika 14**).

Tabela 29. Određene vrednosti solvatohromnih parametara za set nepoznatih jedinjenja

Br.	Jedinjenje	A	B	S
1	Nitrazepam	0,57	1,02	1,62
2	Hlordiazepoksid	0,32	0,76	1,15
3	Klobazam	0,00	1,52	1,94
4	Medazepam	0,03	0,73	1,25
5	Hlorazepat	0,90	1,45	2,28
6	Flurazepam	0,00	1,49	1,96
7	Piren	0,07	0,09	1,52
8	Benzo(a)piren	0,00	0,29	1,72
9	Hrizen	0,03	0,26	1,80
10	Dibenz(a,h)antracen	0,07	0,35	2,24
11	Benz(a)antracen	0,00	0,60	1,01

Na osnovu određenih solvatohromnih parametara i jednačina 34-40 izračunati su podeoni koficijenti za ceo set od 69 jedinjenja. Rezultati su prikazani u **Tabeli 30**.

U slučaju zemljište-voda podeonog koeficijenta izračunate $\log K_{OC}$ vrednosti korišćenjem modela predloženih od strane Nguyen-a i Pool-a, jednačine (34) i (35) upoređene su sa eksperimentalnim vrednostima (**Tabela 16**). Pri tome je dobijena dobra saglasnost, vrednosti R^2 od 0, 8643 i 0,8762 za oba slučaja redom. Za preostale parametre usled nedostatka eksperimentalnih vrednosti nije bilo moguće izvršiti poređenje - date su samo procenjene vrednosti



Slika 14. Poređenje izračunatih sa esperimentalno dobijenim vrednostima solvatohromnih parametara *A*, *B* i *S* za prošireni set jedinjenja.

Tabela 30. Izračunati podeoni koeficijenti u sistemima: zemljište voda (1), gastrointestinalni trakt (2), voda-koža i krv-koža (3) i krv-moždana barijera (4).

Br.	Jedinjenje	Podeoni sistem						
		1		2		3		4
		$\log K_{OC}$ Nguyen	$\log K_{OC}$ Pool	Abs (%)	$\text{Log}P_{\text{skin}}$	$\log K_P$	$\log K_{SC}$	$\log PS$
1	Barbiturna kis.	-0,36	0,17	79,60	-0,42	-12,02	-3,73	-3,69
2	p-Anizidin	1,74	1,44	91,03	0,03	-3,34	-3,13	-0,75
3	1,2,3-Benzotriazole	1,93	2,11	88,04	-0,02	-7,91	-2,11	-2,63
4	2,2'-Bihinolin	4,88	4,60	113,97	0,69	-7,61	-5,13	-0,04
5	Difenilamine	3,33	3,08	13,45	0,79	-2,44	-3,68	1,03
6	2,2'-Dipiridin	2,26	2,19	98,98	0,19	-5,93	-3,69	-0,79
7	Anhidrid ftalne kis.	1,03	2,03	102,70	0,18	-10,45	-2,79	-1,90
8	1,4-Naftohinon	2,33	2,22	101,27	0,21	-4,78	-3,27	-0,42
9	2-Jodbenzoeva kis.	2,75	2,42	88,55	-0,60	-4,76	-3,08	-1,49
10	4-Hlorbenzoeva kis.	2,59	2,58	91,43	-0,49	-4,04	-2,19	-1,28
11	2-Nitrobenzaldehyd	1,24	1,93	101,87	0,16	-9,10	-3,15	-1,50
12	4-Bromanalin	2,09	2,18	97,13	0,15	-5,50	-2,52	-1,13
13	Fenol	1,56	1,21	82,55	-0,13	-3,13	-2,19	-1,60
14	Benzofenon	3,36	3,62	111,36	0,63	-5,24	-3,38	0,15
15	3-Nitrobenzaldehyd	1,54	1,92	97,76	0,13	-7,43	-3,06	-1,40
16	4-Aminobenzoeva kis..	1,71	1,82	79,79	-0,79	-7,91	-2,91	-2,97
17	Ftalimid	2,23	2,72	99,29	0,25	-7,75	-2,24	-1,70
18	Pirogalol	1,43	1,06	67,14	-0,35	-6,86	-2,92	-3,62
19	Galna kis.	1,25	0,90	56,98	-0,46	-9,97	-4,06	-4,92
20	1,4-Benzohinone	1,16	0,74	89,12	-0,16	-2,85	-2,81	-0,80
21	4-Nitrofenol	1,76	2,21	89,01	0,08	-8,43	-2,30	-2,60
22	3-Nitrofenol	2,32	2,40	89,70	0,13	-5,52	-2,01	-1,87
23	Benzil alkohol	2,00	2,05	91,63	0,13	-4,29	-2,11	-1,30
24	Naftilamine	2,47	2,55	98,90	0,21	-6,89	-3,18	-1,25
25	2-Naftol	3,04	2,77	89,61	0,17	-4,95	-2,60	-1,64
26	4-Fluoroanilin	1,65	1,95	97,66	0,15	-5,07	-1,94	-1,07
27	1-Naftol	2,81	2,58	91,84	0,16	-5,15	-2,81	-1,44
28	4-Hidroksibenzaldehyde	1,41	1,70	81,93	-0,09	-8,71	-2,66	-3,08
29	3-Hlornitrobenzene	2,13	2,10	92,60	0,14	-4,48	-2,54	-1,17
30	2,4-Dihlorfenol	2,44	2,63	96,35	0,27	-5,00	-2,11	-1,20
31	4-Metilfenol	2,28	2,23	92,05	0,17	-3,36	-1,90	-1,10
32	4-Hlorofenol	2,20	2,18	88,90	0,10	-4,58	-1,93	-1,67
33	Antracene	4,20	4,26	117,76	0,70	-4,78	-2,88	0,49
34	Acetofenon	1,84	1,84	97,20	0,18	-3,61	-2,75	-0,47
35	2-Aminofenol	1,30	1,10	79,70	-0,21	-6,16	-2,89	-2,45
36	2,4,6-Trinitrofenol	1,55	2,12	89,34	0,07	-11,85	-4,11	-3,00
37	2,4,6-Trihlorfenol	2,40	2,14	91,54	0,16	-3,72	-3,03	-0,92
38	2,4-Dinitrofenol	1,29	1,38	91,38	0,00	-7,94	-4,37	-1,62
39	4-t-Butilfenol	1,96	1,68	82,54	0,09	-4,67	-4,17	-1,47
40	1,3,5-Trihidroksibenzene	1,90	1,44	68,57	-0,28	-6,11	-2,57	-3,46
41	2,6-Dimetilfenol	2,12	1,87	90,72	0,12	-2,92	-2,70	-0,82
42	Oksazepam	3,69	2,32	85,31	0,16	-3,61	-6,75	-0,45
43	Lorazepam	3,82	2,52	86,38	0,21	-4,64	-7,17	-0,56
44	Klonazepam	3,73	2,82	91,77	0,30	-6,22	-6,96	-0,64

Br.	Jedinjenje	Podeoni sistem						
		1		2	3		4	
		log K_{OC} Nguyen	log K_{OC} Pool	Abs (%)	Log P_{skin}	log K_P	log K_{SC}	log PS
45	Bromazepam	3,10	2,21	87,86	0,12	-7,03	-6,85	-1,14
46	Diazepam	2,99	2,63	96,47	0,32	-8,56	-6,91	-0,86
47	4-Metoksifenol	1,64	1,86	88,30	0,06	-6,52	-2,61	-2,00
48	Midazolam	3,09	2,16	88,51	0,17	-7,92	-8,31	-0,90
49	Fluoren	4,34	3,86	111,06	0,62	-0,53	-2,53	1,08
50	Acenaften	3,78	3,42	108,64	0,51	-1,53	-2,51	0,67
51	Naftalen	3,39	2,99	106,00	0,42	-0,48	-2,06	0,69
52	Fenantren	4,41	4,22	114,50	0,67	-3,44	-2,84	0,59
53	4-Nitrobenzaldehyd	1,42	1,28	92,99	-0,01	-5,16	-3,55	-0,96
54	3-Nitroanilin	1,07	0,95	88,66	-0,16	-6,71	-3,69	-1,67
55	Etil-4-hidroksibenzoat	1,95	1,46	77,34	-0,03	-4,27	-4,06	-1,79
56	Metil-4-hidroksibenzoat	2,69	2,71	89,22	0,26	-4,65	-2,39	-1,57
57	Simazin	2,34	2,06	89,92	0,12	-6,78	-4,79	-1,40
58	Propazin	3,48	3,02	95,44	0,44	-4,07	-4,97	-0,27
59	Nitrazepam	4,00	3,48	92,97	0,41	-7,21	-5,80	-1,20
60	Hlordiazepoksid	4,96	4,36	103,44	0,78	-3,63	-5,63	0,48
61	Klobazam	3,11	2,82	97,63	0,35	-9,63	-7,23	-1,01
62	Medazepam	4,60	4,23	109,31	0,78	-4,14	-5,34	0,74
63	Hlorazepat	3,16	2,79	80,66	0,19	-11,41	-7,21	-2,82
64	Flurazepam	4,78	4,43	105,96	0,94	-7,87	-8,87	0,47
65	Piren	5,35	5,20	120,51	0,82	-4,67	-2,73	0,53
66	Benzo(a)piren	6,43	6,05	125,26	0,99	-5,41	-3,77	0,84
67	Hrizene	5,47	5,39	121,59	0,90	-5,95	-3,64	0,51
68	Dibenz(a,h)antracen	6,62	6,48	126,98	1,11	-7,55	-4,49	0,57
69	Benz(a)antracen	5,36	4,61	112,75	0,70	-3,22	-4,22	0,79

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Reagensi

Kompletna lista ispitivanih jedinjenja data je u **Tabeli 31**. Sve supstance su bile analitičkog stepena čistoće i prikupljene iz različitih izvora. Rastvarači upotrebljeni u hromatografskim eksperimentima: aceton, acetonitril i metanol su bili HPLC čistoće nabavljeni od Fluka-e, (Germany), dok su hloroform, toluen, 1,2-dihloretan i etil-acetat bili analitičke čistoće.

Tabela 31. Lista ispitivanih jedinjenja

Red. broj	Naziv	Red. broj	Naziv
1	Barbiturna kis.	36	2-Aminofenol
2	p-Anizidin	37	2,4,6-Trinitrofenol
3	1,2,3-Benzotriazole	38	2,4,6-Trihlorfenol
4	2,2'-Bihinolin	39	2,4-Dinitrofenol
5	Difenilamine	40	4-t-Butilfenol
6	2,2'-Dipiridin	41	1,3,5-Trihidroksibenzene
7	Anhidrid ftalne kis.	42	2,6-Dimetilfenol
8	1,4-Naftohinon	43	Oksazepam
9	2-Jodbenzoeva kis.	44	Lorazepam
10	4-Hlorbenzoeva kis.	45	Klonazepam
11	2-Nitrobenzaldehyd	46	Bromazepam
12	4-Bromanalin	47	Diazepam
13	Fenol	48	4-Metoksifenol
14	Benzofenon	49	Midazolam
15	3-Nitrobenzaldehyd	50	Fluoren
16	4-Aminobenzoeva kis.	51	Acenaften
17	Ftalimid	52	Naftalen
18	Pirogalol	53	Fenantren
19	Galna kis.	54	4-Nitrobenzaldehyd
20	1,4-Benzohinone	55	3-Nitroanilin
21	4-Nitrofenol	56	Etil-4-hidroksibenzoat
22	3-Nitrofenol	57	Metil-4-hidroksibenzoat
23	Benzil alkohol	58	Simazin
24	Naftilamine	59	Propazin
25	2-Naftol	60	Nitrazepam
26	4-Fluoroanilin	61	Hlordiazepoksid
27	1-Naftol	62	Klobazam
28	4-Hidroksibenzaldehyd	63	Medazepam
29	3-Hlornitrobenzen	64	Hlorazepat

Red. broj	Naziv	Red. broj	Naziv
30	2,4-Dihlorofenol	65	Flurazepam
31	4-Metilfenol	66	Piren
32	4-Hlorofenol	67	Benzo(a)piren
33	Antracene	68	Hrizene
34	Acetofenon	69	Dibenz(a,h)antracen
35	2-Aminofenol		

4.2. Hromatografski eksperimenti

4.2.1. Tankoslojna hromatografija

Kompletan pregled korišćenih hromatografskih sistema dat je u **Tabeli 32**.

Tabela 32. Lista korišćenih hromatografskih sistema

Broj	Stacionarna faza	Mobilna faza
1	C18-modifikovani silika-gel	Metanol-voda (40-85% v/v)
2		Acetonitril-voda (40-85% v/v)
3		Aceton-voda (45-85% v/v)
4	CN-modifikovani silika-gel	Metanol-voda (30-60% v/v)
5		Acetonitril-voda (30-55% v/v)
6	Silika-gel	Hloroform
7		Toluen
8		1,2-dihloretran
9		25% v/v etil-acetat u heksanu

Sva hromatografska određivanja izvedena su tehnikom horizontalnog razvijanja u horizontalnoj kadi dimenzija 10×10 cm, Camag (Mutenz, Švajcarska). Pri tome su korišćene komercijalno dostupne ploče silika-gela i C18-modifikovanog silika-gela (Merck, art. br. 5559), odnosno CN-modifikovanog silika-gela (Merck, art. br. 16464), dimenzija 10×10 cm. Ispitivane supstance rastvarane su u acetonu u koncentraciji $\approx 0,01$ mol/dm³. Na rastojanju od 5 mm od ivica ploče nanošeno je po 0,25 μ l sveže pripremljenih rastvora ispitivanih supstanci. Pre razvijanja ploče su sušene na vazduhu 15 min i neposredno pre razvijanja izlagane parama rastvarača 15 min. Pređeni put rastvarača je iznosio $\approx 4,5$ cm. Detekcija hromatografskih zona izvedena je pod UV svetlošću talasne dužine $\lambda = 254$ nm. Sva ispitivanja izvedena su na sobnoj temperaturi (22 ± 2 C).

4.2.2. Visoko-efikasna tečna hromatografija

Za izvođenje hromatografskih eksperimenata korišćen je HPLC Waters 1525 uređaj sa dve pumpe, opremljen sa Alltech, Select™ degazerom i UV-VIS detektorom (2487) sa mogućnošću simultanog snimanja na dve talasne dužine. Kao stacionarna faza upotrebljena je kolona CN-modifikovanog silika-gela (Waters Spherisorb S10 CN, 4,6 × 150 mm analitička kolona, ser. br. 0103141281K03). Eluiranje je izvođeno u izokratskom modu sa smešom metanola i citratnog pufera $C = 0,01 \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH} = 6$ u odnosu 30 : 70, v/v. Protok mobilne faze je održavan konstantnim na 1 ml/min. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem u mobilnoj fazi pri koncentraciji od $C = 1 \text{ mmol/dm}^3$, uz dodatak $0,42 \text{ mmol/dm}^3$ KBr kao markera mrtvog vremena, koji je detektovan na zasebnoj talasnoj dužini od 220 nm. Po 10 μl alikvota prethodno sveže pripremljenih rastvora supstanci je injektovano. Detekcija je izvedena u dvojnog modu na talasnim dužinama maksimuma apsorpcije svake od ispitivanih supstanci.

4.3. Kalibracija i multivarijantna statistička analiza

Univarijantna kalibracija metodom najmanjih kvadrata urađena je primenom statističkog paketa Data Analysis u okviru Microsoft Office Excel-a (2010). Optimizacija i određivanje solvatohromnih A , B i S parametara ispitivanih jedinjenja izvedeno je primenom Solver-a, dodatka za optimizaciju u okviru Microsoft Office Excel (2010) programa.

Metode PCA, hijerarhijska klasterka analiza (HCA), PCR i PLS izvedene su korišćenjem PLS Toolbox statističkog paketa (Eigenvectors Inc. v. 7.0.3) u okviru MATLAB verzije 7.12.0 (R2011a) (MathWorks INC, Natick, MA, USA).

Za PCA i PCR korišćen je Singular Value Decomposition (SVD) algoritam. HCA je izvedena primenom aglomerativne metode uz korišćenje Ward-ovog modela za određivanje rastojanja između klastera i euklidovske razdaljine za merenje udaljenosti između objekata. Kod PLS regresije primenjen je SIMPLS algoritam. Svi podaci su prethodno autoskalirani. U slučaju PCR i PLS korišćena je krosvalidaciona tehnika slučajnih podsetova u odnosu sa veličinom podsetova $n/5$ i jednom iteracijom.

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitana mogućnost primene serije hromatografskih postupaka u kombinaciji sa različitim računskim tehnikama za određivanje sledećih particionih koeficijenata: oktanol-voda ($\log K_{OW}$), zemljište-voda normiran na sadržaj organskog ugljenika ($\log K_{OC}$), vazduh-voda ($\log K_{AW}$) i Abrahamovih solvatohromnih parametara. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

U slučaju hromatografske procene oktanol-voda particionog koeficijenta direktna kalibracija koja koristi najoptimalniji hromatografski sistem je najjednostavnije rešenje. Hromatografski sistemi sa C18-modifikovanim silika-gelom kao stacionarnom fazom i mobilnom fazom koja sadrži udeo organskog modifikatora u opsegu od 60 – 80% v/v daju najbolje rezultate. Za jedinjenja kod kojih je lipofilnost veća od 2 log jedinice preporučuje se upotreba sistema sa većim udelom organskog modifikatora (> 80% v/v). Ukoliko postoji mogućnost primene složenijih računskih tehnika, preporučuje se upotreba PCR ili PLS tehnika, jer se dobijaju kalibracioni modeli sa boljom prediktivnom moći. Korišćenje hromatografski izvedenih parametara R_M^0 i C_0 daje lošije rezultate, a parametar b se često ne može uopšte koristiti. Od 58 jedinjenja odabran je optimalan – reprezentativan kalibracioni skup od 14 jedinjenja sa rasponom $\log K_{OW}$ vrednosti od -1,47 do 6,75 koji se može preporučiti za hromatografsko određivanje lipofilnosti.

U slučaju zemljište-voda particionog koeficijenta ($\log K_{OC}$), slično kao i kod procene oktanol-voda particionog koeficijenta, najjednostavnije rešenje predstavlja korišćenje direktne kalibracije koja se oslanja na najoptimalniji hromatografski sistem. Kalibracioni modeli dobijeni u ovom slučaju su nešto lošiji od modela u slučaju $\log K_{OW}$. Ovo se može objasniti jasno definisanim sistemom oktanol-voda u poređenju sa znatno kompleksnijim sistemom zemljište-voda, kod kojeg čak i vrednosti normirane na sadržaj organskog ugljenika značajno variraju u zavisnosti od vrste i sastava zemljišta. Preporučuje se korišćenje C18-modifikovanog silika-gela u kombinaciji sa bilo kojim od razmatranih organskih modifikatora (metanol, aceton ili acetonitril). Najširi radni opseg od 1,10 do 6,22 log jedinice je dobijen u rasponu udela organskog modifikatora od 60 - 75% v/v.

Postignuta je dobra saglasnost između hromatografski određenih i softverski izračunatih vrednosti sa korelacijom od $0,7577 < R < 0,8405$ u slučaju modela zasnovanih na lipofilnosti i $0,6978 < R < 0,7325$ u slučaju modela zasnovanih na upotrebi molekulskih indeksa konektivnosti.

U slučaju procene vazduh-voda podeonog koficijenta pokazano je prisustvo statistički značajne negativne linearne zavisnosti između $\log K_{AW}$ i retencije u normalno-faznim hromatografskim uslovima. Svi kalibracioni modeli pokazuju zadovoljavajuće statističke parametre, sa širokim radnim opsegom od ≈ -1 do ≈ -9 log jedinica. Na osnovu datih modela izračunate su $\log K_{AW}$ vrednosti za set jedinjenja sa nepoznatim vrednostima ovih parametara i upoređene sa softverski predviđenim. Dobijena je izuzetno dobra saglasnost, $R = 0,8428$.

Do sada u literaturi nije opisana korelacija između hromatografskog ponašanja jedinjenja u tipičnim normalno-faznim uslovima i particionog koeficijenata vazduh-voda, zbog čega bi dalji razvoj ovog jednostavnog pristupa bio od značaja, tim pre što dati sistemi i procesi koji se u njima odvijaju nemaju zajedničke fizičke i hemijske osnove.

Primenom LSER metodologije uspešno su mapirane interakcije prisutne u reverzno-faznim i normalno-faznim sistemima. Utvrđeno je da u oba slučaja najznačajniji uticaj imaju proton-donorska i proton-akceptorska svojstva hromatografskog sistema, koja u slučaju reverzno-faznih sistema imaju negativan predznak (ukazuju na dominantnu interakciju sa mobilnom fazom) dok pozitivan predznak u drugom slučaju ukazuje na značajnu interakciju sa stacionarnom fazom. Kako je član za formiranje vakancije statistički značajn i pozitivnog predznaka u slučaju reverzno-faznih sistema, to ukazuje na dominantan particioni mehanizam i značajan uticaj hidrofobnih interakcija. Kod normalno-faznih sistema ovaj parametar nije od značaja što se može objasniti dominantnim adsorpcionim mehanizmom.

Za određivanje solvatohromnih A , B i S parametara primenjena je metoda minimizacije reziduala pomoću Solvera, programskog dodatka za Microsoft Excel. Dobijene vrednosti pokazuju dobru saglasnost sa eksperimentalno određenim, a razvijena metodologija primenjena je na izračunavanje ovih veličina za set jedinjenja sa nepoznatim A , B i S vrednostima.

Primenom LSER modela preuzetih iz literature i izračunatih A , B i S parametara procenjene su vrednosti za sledeće podeone koficijente: raspodela u sistemu zemljište-voda ($\log K_{OC}$), aporpcija u gastrointestinalnom traktu (% Abs), raspodela u sistemu krv-koža (P_{skin}), voda-koža (K_P , K_{SC}) i krv-moždana-barijera (BBB). Zbog nedostatka eksperimentalnih podataka jedino su vrednosti K_{OC} upoređene sa eksperimentalno određenim. Dobijena je veoma dobra saglasnost.

6. LITERATURA

1. J.J. Kirkland, *Journal of Chromatography A*, 1060 (2004) 9-21.
2. H.A. Claessens, M.A. Van Straten, *Journal of Chromatography A*, 1060 (2004) 23–41.
3. D. Milojković-Opsenica, *Hemijski pregled*, 41 (2000) 38-43.
4. S. Šegan, F. Andrić, A. Radoičić, D. Opsenica, B. Šolaja, M. Zlatović, D. Milojković-Opsenica, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 2659–2667.
5. A. Vailaya, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28 (2005) 965-1054.
6. B. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *Journal of Chromatography*, 125 (1976) 129-156.
7. A. Vailaya, C. Horvath, *Journal of Physical Chemistry B*, 101 (1997) 5875-5888.
8. P.W. Carr, L.C. Tan, J.H.J. Park, *Journal of Chromatography A*, 724 (1996) 1-12.
9. J.H. Park, Y.K. Lee, Y.C. Weon, L.C. Tan, J. Li, L. Li, J.F. Evans, P.W. Carr, *Journal of Chromatography A*, 767 (1997) 1-10.
10. R. P. J. Ranatunga, P.W. Carr, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 5679-5692.
11. L.R. Snyder, *Journal of Chromatography A*, 92 (1974) 223–230.
12. Encyclopedia of soil science XXIV Edited by W. Chesworth, Dordrecht, Netherlands, Springer (2008).
13. P.W. Birkeland, *Soils and Geomorphology* 3rd edition, New York, Oxford University Press (1999).
14. E. Guthrie-Nichols, A. Grasham, C. Kazunga, R. Sangaiah, A. Gold, J. Bortiatynski, M. Salloum, P. Hatcher, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1) (2003) 40-49
15. R.E. Green, S.W. Karickhoff, Sorption estimates for modeling. In *Pesticides in the Soil Environment*, Madison, WI, Soil Science Society of America, (1990) 79-101.
16. R.T. Podoll, K.C. Irwin, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7 (1988) 405-415.

17. W.J. Weber Jr., P.M. McGinley, L. Katd, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (1992) 1955-1962.
18. Standard test method for determining a sorption constant (K_{OC}) for an organic chemical in soil and sediments. E47.04. In Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, (1993) 11 (05) 731-737.
19. Standard test method for 24-h batch-type measurement of containment sorption by soils and sediment. D 4646-87. In Annual Book of Standards, Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, (2001) 11 (04) 120-123.
20. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France (1993).
21. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 312: Leaching in Soil Columns, Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France, (2004).
22. Y. He, L. Wang, S. Wang, S. Han, Y. Zhao, Z. Zhang, G. Zou, *Chemosphere*, 30 (1995) 117-125.
23. P.D. Vowles, R.F.C. Mantoura, *Chemosphere*, 16 (1987) 109-116.
24. G. Szabo, S.L. Prosser, R.A. Bulman, *Chemosphere*, 21 (1990) 495-505.
25. W. Koerdel, J. Stutte, G. Kuthoff, *Chemosphere*, 27 (1993) 2341-2352.
26. W. Koerdel, J. Stutte, G. Kuthoff, *Chemosphere*, 30 (1995) 1373-1384.
27. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, Test No. 121: Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{oc}) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), (2004) Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France.
28. J.M. Bermudez-Saldana, L. Escuder-Gilabert, M. J. Medina-Hernandez, R.M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 122-126.
29. Z. Gerstl, *Journal of Contaminant Hydrology*, 6 (1990) 357-375.
30. A. Sabljčić, H. Gusten, H. Verhaar, J. Hermans, *Chemosphere*, 31 (1995) 4489-4514.
31. D. Mackay, W.Y. Shiu, R.P. Sutherland, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (1979) 333-337.

32. N.J. Fendinger, D.E. Glotfelty, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (1988) 1289-1293.
33. J.M. Gossett, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (1987) 202-208.
34. S. Šegan, Korelacija strukture i retencije steroidnih tetraoksana primenom tankoslojne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd (2013).
35. S.K. Poole, C.F. Poole, *Journal of Chromatography B*, 797 (2003) 3-19.
36. C. Hansch, T. Fujita, *Journal of American Chemical Society*, 86 (1964) 1616-1626.
37. E. Soczewinski, G. Matysik, *Journal of Chromatography*, 32 (1968), 458-471.
38. F. Murakami, *Journal of Chromatography*, 178 (1979) 393-399.
39. T. Cserhati, *Journal of Liquid Chromatography*, 16 (1993) 1805-1817.
40. M. L. Bieganovska, A. Doraczynska, A. Petruczynska, *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 8(2) (1995) 122-128.
41. C. Sarbu, K. Kuhajda, S. Kevresan, *Journal of Chromatography A*, 917 (2001) 361-366.
42. T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, *Journal of American Chemical Society*, 86 (1964) 5175-5180.
43. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, *Pharmacochemistry Library*, Vol. 1, Elsevier, New York, (1977).
44. C. Hansch, A.J. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in chemistry and Biology*, John Wiley, New York, (1979).
45. Y.H. Zhao, J.Le, M.H. Abraham, A. Hersey, P.J. Eddershaw, C.N. Luscombe, D. Boutina, G. Beck, B.Sherborne, Ian Cooper, and James A. Platt, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (6) (2001) 749-784.
46. R. Narayanan, S.B. Gunturi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (2005) 3017-3028.
47. M. H. Abraham, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39 (2004) 235-240.
48. M. J. Kamlet, J. L. Aboud, R.W. Taft, *Journal of the American Chemical Society*, 99 (1977) 6027-6038.
49. M.J. Kamlet, T.N. Hall, J. Boykin, R.W.Taft, *Journal of Organic Chemistry*, 44 (1979) 2599-2604.

50. R.W. Taft, M.J. Kamlet, *Journal of the American Chemical Society*, 98 (1976) 2886-2894.
51. P.C. Sadek, P.W. Carr, R.M. Doherty, M.J. Kamlet, R.W. Taft, M.H. Abraham, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2971-2978.
52. M.J. Kamlet, R.M. Doherty, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, *Chemtech*, 16 (1986) 566.
53. M.H. Abraham, P.L. Grellier, D.V. Prior, P.P. Duce, J.J. Morris, P. J. Taylor, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1989) 699-711.
54. M.H. Abraham, P. Grellier, D.V. Prior, J.J. Morris, P.J. Taylor, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1990) 521-529.
55. M. H. Abraham, G. C. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuley, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1990) 1451-1460.
56. M.H. Abraham, J.C. McGowan, *Chromatographia*, 23 (1987) 243-246.
57. M.H. Abraham, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 6 (12) (1993) 660-684.
58. A.M. Zismos, M.H. Abraham, M.C. Barker, K.J. Box, K.Y. Tam, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (2002) 470-477.
59. M. Plass, K. Valko, M.H. Abraham, *Journal of Chromatography A*, 803 (1998) 51-60.
60. T.H. Nguyen, K. Goss, P.W. Ball, *Environmental Science and Technology*, 39 (2005) 913-924.
61. S.K. Poole, C.F J. Poole, *Chromatography A*, 845 (1999) 381-400.
62. M. H. Abraham, A. Ibrahim, *International Journal of Pharmaceutics*, 329 (2007) 129-134.
63. J.Đ. Trifković, Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, Doktorska disertacija, Beograd (2013).
64. E.H.M.A. Rabtti, M.M. Natić, D.M. Milojković-Opsenica, J.Đ. Trifković, I.M. Vučković, V.E. Vajs, Ž.Lj. Tešić, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23 (2012) 522-530.

65. S. Šegan, J. Trifković, T. Verbić, D. Opsenica, M. Zlatović, J. Burnett, B. Šolaja, D. Milojković-Opsenica, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 (2013) 231-239.
66. G. Ermondi, G. Caron, *Journal of Chromatography A*, 1252 (2012) 84-89.
67. L.I. Nord, D. Fransson, S.P. Jacobsson, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44 (1998) 257-269.
68. J. Li, J. Sun, Z. He, *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 174-179.
69. K. Varmuza, P. Filzmoser, Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, (2009).
70. R.N. Feudale, H. Tan, S.D. Brown, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 63 (2002) 129-138.
71. M. Otto, Chemometrics. Statistics and computer application in analytical chemistry, Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, (1999).
72. R. G. Brereton, Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, (2003).
73. Electronic Code of Federal Regulations, Appendix A to Part 423, (2010).
74. H. Babich, D.L. Davis, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1 (1981) 90-109.
75. W. Koerdel, J. Stutte, G. Kotthoff, *Science of the Total Environment*, 162, (1995) 119-125.
76. B.M. Gawlik, A. Kettrup, H. Muntau, *Chemosphere*, 41 (2000) 1337-1347.
77. G. Szabo, J. Guzzi, W. Kordel, A. Zsolnay, V. Major, P. Keresztes, *Chemosphere*, 39 (1999) 431-442.
78. H. Fischer, R. Gottschlich, A. Seelig, *The Journal of Membrane Biology*, 165 (1998) 201-211.
79. H. C. Tülp, K. Uwegoss, R. Schwarzenbach, K. Fenner, *Environmental Science and Technology*, 42, (2008) 2034-2040.
80. A. M. Zissimos, M. H. Abraham, M. C. Barker, K. J. Boxb and K. Y. Tam, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (2002) 470-477.

7. PRILOG

Sadržaj

Tabela P1a. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza aceton-voda

Tabela P1b. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza acetonitril-voda

Tabela P1c. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza metanol-voda

Tabela P1d. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za NP sistem; stac. faza silika-gel

Tabela P2a. Hromatografski deskriptori R_M^0 , b , C_0 , sa pratećom statistikom (C-18, aceton-voda)

Tabela P2b. Hromatografski deskriptori R_M^0 , b , C_0 , sa pratećom statistikom (C-18, acetonitril-voda)

Tabela P2c. Hromatografski deskriptori R_M^0 , b , C_0 , sa pratećom statistikom (C-18, metanol-voda)

Tabela P1a. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza aceton-voda

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-1,64	-1,63	-1,96	-1,46	-1,33	-1,47	-1,63	-1,34	-1,61	-1,67	-
3	p-Anizidin	0,81	0,56	0,29	0,22	0,12	0,04	-0,08	-0,11	-0,35	-0,48	-
4	1,2,3-Benzotriazol	0,35	0,20	0,04	-0,02	-0,06	-0,17	-0,26	-0,32	-0,53	-0,67	-
5	2,2'-Bihinolin	-	-	-	-	1,17	1,01	0,58	0,49	0,18	0,04	-0,11
6	Difenilamin	1,95	1,63	1,16	1,15	0,86	0,56	0,45	0,15	-0,02	-0,26	-
7	2,2'-Dipiridin	0,81	0,65	0,40	0,35	0,28	0,11	0,04	-0,11	-0,21	-0,32	-0,41
8	Anhidrid ftalne kis.	-0,70	-0,72	-0,82	-0,90	-1,00	-1,02	-1,22	-1,34	-1,43	-1,52	-
9	1,4-Naftohinon	-	-	-	-	0,33	0,18	-0,04	-0,12	-0,24	-0,35	-0,53
10	2-Jodbenzoeva kis.	0,32	0,00	0,27	-0,06	-0,16	-0,29	-0,29	-0,45	-0,45	-0,64	-
11	4-Hlorbenzoeva kis.	0,81	0,72	0,56	0,49	0,22	-0,02	-0,08	-0,29	-0,35	-0,58	-
12	2-Nitrobenzalhid	0,90	0,80	0,58	0,49	0,38	0,17	0,08	-0,17	-0,23	-0,43	-
13	4-Bromanilin	1,23	1,06	0,75	0,67	0,48	0,27	0,16	-0,11	-0,19	-0,39	-
14	Fenol	0,46	0,32	0,18	0,00	-0,11	-0,32	-0,44	-0,39	-	-	-
15	Benzofenon	1,46	1,32	1,16	1,01	0,76	0,48	0,38	0,08	-0,02	-0,28	-
16	3-Nitrobenzalhid	0,90	0,80	0,53	0,49	0,38	0,19	0,10	-0,13	-0,23	-0,43	-
17	4-Aminobenzoeva kis.	0,10	0,04	-0,08	-0,10	-0,18	-0,27	-0,38	-0,56	-0,63	-0,81	-
18	Ftalimid	0,49	0,38	0,15	0,12	0,04	-0,09	-0,16	-0,36	-0,40	-0,58	-
19	Pirogalol	-0,10	-0,12	-0,21	-0,24	-0,29	-0,36	-0,43	-0,61	-0,60	-0,85	-
20	Galna kis.	-0,46	-0,48	-0,50	-0,54	-0,59	-0,68	-0,76	-0,91	-0,78	-1,04	-
21	1,4-Benzohinon	0,18	0,12	0,02	0,00	-0,04	-0,11	-0,16	-0,32	-0,37	-0,53	-
22	4-Nitrofenol	0,51	0,40	0,30	0,08	-0,04	-0,27	-0,37	-0,34	-	-	-
23	3-Nitrofenol	0,71	0,60	0,43	0,15	0,02	-0,19	-0,39	-0,35	-	-	-
24	Benzil alkohol	0,14	0,00	-0,06	-0,15	-0,25	-0,50	-0,67	-0,50	-	-	-
25	Naftilamin	0,88	0,73	0,54	0,32	0,15	-0,08	-0,22	-0,21	-	-	-

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
26	2-Naftol	0,82	0,67	0,44	0,23	0,11	-0,19	-0,30	-0,27	-	-	-
27	4-Fluoroanilin	0,45	0,40	0,26	0,04	-0,04	-0,23	-0,39	-0,36	-	-	-
28	1-Naftol	0,88	0,81	0,63	0,32	0,19	-0,08	-0,22	-0,19	-	-	-
29	4-Hidroksibenzaldehid	0,16	0,19	0,04	-0,19	-0,23	-0,50	-0,67	-0,44	-	-	-
30	3-Hlornitrobenzen	1,11	1,01	0,90	0,56	0,40	0,19	0,02	0,00	-	-	-
31	2,4-Dihlorfenol	0,99	0,86	0,43	0,32	0,17	-0,08	-0,20	-0,20	-	-	-
32	4-Metilfenol	0,46	0,36	0,24	0,04	-0,08	-0,32	-0,49	-0,27	-	-	-
33	4-Hlorfenol	0,70	0,50	0,38	0,19	-0,02	-0,23	-0,44	-0,36	-	-	-
34	Antracene	1,92	1,65	1,63	1,02	0,75	0,56	0,32	0,27	-	-	-
35	Acetofenon	0,52	0,45	0,34	0,15	-0,02	-0,15	-0,30	-0,35	-	-	-
36	2-Aminofenol	0,14	0,14	-0,02	-0,22	-0,29	-0,48	-0,65	-0,48	-	-	-
37	2,4,6-Trinitrofenol	-0,08	-0,10	-0,16	-0,36	-0,45	-0,75	-1,00	-0,65	-	-	-
38	2,4,6-Trihlorfenol	1,14	0,91	0,86	0,50	0,32	0,49	0,19	0,02	-0,14	-0,21	-0,39
39	2,4-Dinitrofenol	-0,20	-0,22	-0,26	-0,36	-0,45	-0,68	-0,72	-0,48	-	-	-
40	4-t-Butilfenol	1,14	1,01	0,71	0,41	0,20	0,04	-0,12	-0,12	-	-	-
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	-0,43	-0,30	-0,52	-0,60	-0,72	-0,80	-1,14	-0,94	-	-	-
43	2,6-Dimetilfenol	0,89	0,73	0,52	0,32	0,16	-0,04	-0,24	-0,24	-	-	-
44	Oksazepam	-	-	-	0,49	0,32	0,22	-0,27	-0,10	-0,37	-	-
45	Lorazepam	-	-	-	0,54	0,35	0,22	-0,32	-0,12	-0,46	-	-
46	Klonazepam	-	-	-	0,69	0,46	0,31	-0,19	-0,06	-0,41	-	-
47	Bromazepam	-	-	-	0,37	0,21	0,14	-0,29	-0,18	-0,40	-	-
48	Diazepam	-	-	-	0,57	0,57	0,39	0,06	0,04	-0,16	-0,30	-1,14
49	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4-Metoksifenol	0,18	0,18	0,00	-0,22	-0,24	-0,43	-0,72	-0,43	-	-	-
51	Midazolam	-	-	-	-	0,83	0,63	0,25	0,22	0,07	-0,04	-0,07
52	Nitrazepam	-	-	-	-	0,33	0,14	-0,19	-0,10	-0,37	-	-

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
53	Hlordiazepoksid	-	-	-	-	0,46	0,26	-0,09	-0,09	-0,27	-	-
54	Kllobazam	-	-	-	-	0,35	0,18	-0,19	-0,12	-0,33	-	-
55	Medazepam	-	-	-	-	1,17	0,90	0,56	0,44	0,24	0,12	0,02
56	Hlorazepate	-	-	-	-	0,44	0,28	-0,04	-0,10	-0,29	-0,40	-0,53
57	Flurazepam	-	-	-	-	1,03	1,15	0,90	0,73	0,61	0,60	0,53
58	Piren	-	-	-	-	1,01	0,81	0,46	0,39	0,11	0,00	-0,16
59	Benzo(a)piren	-	-	-	-	1,33	1,01	0,71	0,60	0,34	0,17	0,00
60	Fluoren	-	-	-	-	0,95	0,70	0,41	0,30	0,09	-0,04	-0,22
61	Acenaften	-	-	-	-	0,90	0,73	0,39	0,32	0,09	0,00	-0,18
62	Naftalen	-	-	-	-	1,15	0,54	0,23	0,18	-0,03	-0,12	-0,30
63	Fenantren	-	-	-	-	0,90	0,81	0,39	0,30	0,05	-0,04	-0,22
64	Hrizen	-	-	-	-	1,23	1,07	0,55	0,49	0,21	0,06	-0,11
65	Dibenz(a,h)antracen	-	-	-	-	1,46	1,46	0,79	0,73	0,41	0,19	0,00
66	Benz(a)antracen	-	-	-	-	1,33	1,23	0,64	0,54	0,21	0,04	-0,11
67	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Etil-4-hidroksibenzoat	0,63	0,56	0,39	0,19	0,04	-0,19	-0,35	-0,36	-	-	-
70	Metil-4-hidroksibenzoat	0,52	0,40	0,29	0,08	-0,08	-0,27	-0,44	-0,39	-	-	-
71	Simazin	-	-	-	-	0,32	0,24	0,10	-0,02	-0,18	-0,26	-0,36
72	Propazin	-	-	-	-	0,60	0,49	0,12	-0,02	-0,19	-0,30	-0,45
73	Ametrin	-	-	-	-	0,54	0,44	0,10	0,06	-0,21	-0,30	-0,43
74	Prometrin	-	-	-	-	0,73	0,60	0,18	0,18	-0,15	-0,23	-0,41
75	Atrazin	-	-	-	-	0,46	0,35	-0,02	0,02	-0,27	-0,35	-0,50

Tabela P1b. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza aceton-voda

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-1,23	-1,33	-1,45	-1,47	-1,31	-1,93	-1,92	-1,66	-	-	-
3	p-Anizidin	0,49	0,30	0,22	-0,05	0,02	-0,23	-0,33	-0,54	-	-	-
4	1,2,3-Benzotriazole	0,14	-0,08	-0,24	-0,32	-0,41	-0,75	-0,83	-0,92	-	-	-
5	2,2'-Bihinolin	-	-	-	-	1,14	1,01	0,80	0,65	0,52	0,40	0,32
6	Difenilamin	1,46	1,15	0,89	0,61	0,58	0,29	0,18	-0,02	-	-	-
7	2,2'-Dipiridin	0,81	0,54	0,48	0,31	0,32	0,18	0,11	0,06	0,04	-0,04	-0,04
8	Anhidrid ftalne kise.	-0,67	-0,81	-0,80	-0,86	-0,79	-0,91	-1,12	-1,09	-	-	-
9	1,4-Naftohinon	0,90	0,54	0,38	0,17	0,05	-0,08	-0,20	-0,27	-0,41	-0,53	-0,61
10	2-Jodbenzoeva kis.	-0,18	-0,32	-0,35	-0,47	-0,41	-0,61	-0,71	-0,57	-	-	-
11	4-Hlorbenzoeva kis.	0,18	-0,06	-0,04	-0,22	-0,23	-0,36	-0,43	-0,51	-	-	-
12	2-Nitrobenzaldehyd	0,67	0,41	0,29	0,07	0,10	-0,11	-0,29	-0,43	-	-	-
13	4-Bromanilin	0,73	0,52	0,40	0,18	0,18	0,00	-0,15	-0,33	-	-	-
14	Fenol	0,14	0,00	-0,08	-0,19	-0,33	-0,54	-0,67	-0,90	-	-	-
15	Benzofenon	1,33	1,01	0,76	0,61	0,55	0,32	0,15	-0,44	-	-	-
16	3-Nitrobenzaldehyd	0,63	0,41	0,26	0,07	0,06	-0,15	-0,33	-0,83	-	-	-
17	4-Aminobenzoeva kis.	-0,06	-0,18	-0,31	-0,49	-0,46	-0,64	-0,60	-0,88	-	-	-
18	Ftalimid	0,22	0,02	-0,16	-0,33	-0,32	-0,48	-0,71	-1,03	-	-	-
19	Pirogalol	-0,14	-0,26	-0,38	-0,47	-0,52	-0,71	-0,88	-0,98	-	-	-
20	Galna kis.	-0,60	-0,70	-0,72	-0,70	-0,71	-0,75	-0,98	-0,98	-	-	-
21	1,4-Benzohinon	0,14	-0,02	-0,16	-0,29	-0,29	-0,50	-0,57	-0,79	-	-	-
22	4-Nitrofenol	0,26	0,12	-0,02	-0,10	-0,33	-0,54	-0,53	-0,80	-	-	-
23	3-Nitrofenol	0,60	0,65	0,38	0,22	0,00	-0,16	-0,22	-0,39	-	-	-
24	Benzil alkohol	0,02	-0,04	-0,10	-0,20	-0,29	-0,59	-0,54	-0,73	-	-	-
25	Naftilamin	0,81	0,54	0,44	0,29	0,14	-0,08	-0,12	-0,31	-	-	-
26	2-Naftol	0,70	0,44	0,26	0,16	0,02	-0,24	-0,30	-	-	-	-

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
27	4-Fluoroanilin	0,39	0,30	0,09	0,00	-0,14	-0,43	-0,44	-	-	-	-
28	1-Naftol	0,26	0,22	0,22	-0,08	-0,04	-0,38	-0,38	-	-	-	-
29	4-Hidroksibenzaldehid	0,02	-0,12	-0,26	-0,37	-0,54	-0,67	-0,77	-	-	-	-
30	3-Hlornitrobenzen	1,01	0,89	0,67	0,50	0,29	0,10	0,04	-	-	-	-
31	2,4-Dihlorfenol	0,60	0,65	0,38	0,22	0,00	-0,16	-0,22	-0,35	-	-	-
32	4-Metilfenol	0,35	0,20	0,10	-0,04	-0,24	-0,44	-0,43	-	-	-	-
33	4-Hlorfenol	0,39	0,26	0,18	0,02	-0,18	-0,39	-0,38	-	-	-	-
34	Antracen	1,95	1,63	1,33	1,32	0,94	0,73	0,65	-	-	-	-
35	Acetofenon	0,49	0,43	0,35	0,18	0,00	-0,10	-0,10	-	-	-	-
36	2-Aminofenol	-0,08	-0,10	-0,26	-0,41	-0,54	-0,72	-0,72	-	-	-	-
37	2,4,6-Trinitrofenol	-0,29	-0,43	-0,54	-0,54	-0,81	-0,86	-0,86	-	-	-	-
38	2,4,6-Trihlorfenol	0,99	0,80	0,67	0,39	0,32	0,10	-0,02	-0,16	-0,22	-0,35	-0,45
39	2,4-Dinitrofenol	-0,36	-0,32	-0,39	-0,45	-0,63	-0,80	-0,80	-	-	-	-
40	4-t-Butilfenol	0,99	0,72	0,54	0,38	0,22	-0,02	-0,12	-	-	-	-
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	-0,40	-0,43	-0,46	-0,53	-0,73	-0,81	-1,00	-	-	-	-
43	2,6-Dimetilfenol	0,68	0,48	0,35	0,16	0,08	-0,20	-0,24	-	-	-	-
44	Oksazepam	-	-	-	-	-0,16	-0,30	-0,36	-0,52	-0,60	-	-
45	Lorazepam	-	-	-	-	-0,16	-0,30	-0,40	-0,55	-0,60	-	-
46	Klonazepam	-	-	-	-	-0,11	-0,26	-0,32	-0,54	-0,67	-	-
47	Bromazepam	-	-	-	-	-0,09	-0,18	-0,29	-0,40	-0,35	-	-
48	Diazepam	-	-	-	-	0,45	0,28	0,18	0,02	-0,02	-0,08	-0,15
49	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4-Metoksifenol	-0,29	-0,27	-0,39	-0,43	-0,54	-0,64	-0,73	-	-	-	-
51	Midazolam	-	-	-	-	1,07	0,90	0,85	0,65	0,67	0,65	0,68
52	Nitrazepam	-	-	-	-	-0,13	-0,26	-0,38	-0,56	-0,67	-	-
53	Hlordiazepoksid	-	-	-	-	0,32	0,26	0,16	0,04	0,08	-	-

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
54	Kllobazam	-	-	-	-	0,09	-0,02	-0,16	-0,33	-0,41	-	-
55	Medazepam	-	-	-	-	1,33	1,15	1,00	0,72	0,70	0,59	0,61
56	Hlorazepate	-	-	-	-	0,13	0,04	-0,10	-0,16	-0,22	-0,29	-0,90
57	Flurazepam	-	-	-	-	1,01	1,15	0,85	0,62	0,60	0,72	0,58
58	Piren	-	-	-	-	1,02	0,81	0,82	0,61	0,46	0,29	0,40
59	Benzo(a)piren	-	-	-	-	1,34	1,15	1,16	0,91	0,81	0,59	0,50
60	Fluoren	-	-	-	-	0,74	0,60	0,45	0,31	0,18	0,04	-0,09
61	Acenaften	-	-	-	-	0,78	0,63	0,50	0,35	0,22	0,08	-0,08
62	Naftalen	-	-	-	-	0,55	0,39	0,23	0,11	-0,02	-0,16	-0,25
63	Fenantrene	-	-	-	-	0,82	0,67	0,50	0,40	0,26	0,12	-0,04
64	Hrizen	-	-	-	-	1,15	1,07	0,91	0,70	0,60	0,40	0,25
65	Dibenz(a,h)antracen	-	-	-	-	1,47	1,64	0,82	1,15	0,90	0,65	0,53
66	Benz(a)antracen	-	-	-	-	1,15	1,01	0,87	0,74	0,57	0,43	0,23
67	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Etil-4-hidroksibenzoat	0,39	0,30	0,09	0,00	-0,14	-0,43	-0,44	-	-	-	-
70	Metil-4-hidroksibenzoat	0,20	0,08	-0,06	-0,18	-0,33	-0,52	-0,59	-	-	-	-
71	Simazin	-	-	-	-	0,03	-0,10	-0,15	-0,33	-0,41	-0,63	-0,81
72	Propazin	-	-	-	-	0,29	0,20	0,08	-0,10	-0,18	-0,33	-0,38
73	Ametrin	-	-	-	-	0,40	0,26	0,15	0,01	-0,10	-0,20	-0,32
74	Prometrin	-	-	-	-	0,55	0,39	0,29	0,12	0,02	-0,14	-0,23
75	Atrazin	-	-	-	-	0,16	0,06	-0,04	-0,20	-0,30	-0,38	-0,45

Tabela P1c. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za sistem: stac. faza C18-modifikovani silika gel, mob. faza metanol-voda

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-1,30	-1,46	-1,92	-1,67	-1,63	-1,65	-1,95	-1,46	-1,64	-1,64	-
3	p-Anizidin	0,66	0,44	0,35	0,24	0,12	-0,09	-0,18	-0,28	-0,37	-0,52	-
4	1,2,3-Benzotriazole	0,66	0,35	0,26	0,11	-0,02	-0,15	-0,26	-0,35	-0,46	-0,60	-
5	2,2'-Bihinolin	-	-	-	-	1,64	1,95	1,33	1,07	0,81	-0,02	-0,11
6	Difenilamin	1,92	1,46	1,30	1,26	1,06	0,82	0,67	0,41	0,30	0,02	-
7	2,2'-Dipiridin	1,30	1,02	0,82	0,70	0,53	0,36	0,22	0,10	0,02	-0,14	-0,27
8	Anhidrid ftalne kise.	-0,98	-0,69	-0,87	-0,845	-0,71	-0,82	-0,81	-0,90	-0,90	-1,15	-
9	1,4-Naftohinon	-	-	-	-	0,37	0,32	0,17	0,06	-0,10	-0,16	-0,23
10	2-Jodbenzoeva kis.	-0,45	-0,42	-0,45	-0,48	-0,50	-0,56	-0,67	-0,67	-0,81	-0,95	-
11	4-Hlorbenzoeva kis.	0,04	0,06	-0,04	-0,15	-0,16	-0,23	-0,30	-0,39	-0,44	-0,54	-
12	2-Nitrobenzaldehyd	1,44	0,92	0,48	0,32	0,20	0,04	-0,06	-0,20	-0,30	-0,49	-
13	4-Bromanilin	1,20	0,88	0,82	0,58	0,50	0,32	0,18	0,03	-0,08	-0,26	-
14	Fenol	0,41	0,25	0,14	0,06	-0,08	-0,18	-0,32	-0,39	-	-	-
15	Benzofenon	1,61	1,44	1,61	1,18	1,06	0,78	0,67	0,39	0,26	-0,02	-
16	3-Nitrobenzaldehyd	0,91	0,62	0,48	0,36	0,29	0,11	0,02	-0,14	-0,24	-0,44	-
17	4-Aminobenzojeva kis.	-0,37	-0,43	-0,40	-0,43	-0,48	-0,56	-0,63	-0,73	-0,81	-1,01	-
18	Ftalimid	0,73	0,43	0,45	0,18	0,08	-0,08	-0,14	-0,30	-0,37	-0,54	-
19	Pirogalol	-0,24	-0,19	-0,32	-0,48	-0,53	-0,61	-0,70	-0,81	-0,83	-1,01	-
20	Galna kis.	-1,10	-0,93	-0,98	-1,10	-1,14	-1,16	-1,15	-1,15	-1,23	-1,46	-
21	1,4-Benzohinon	0,29	0,10	0,04	-0,07	-0,16	-0,27	-0,30	-0,44	-0,46	-0,60	-
22	4-Nitrofenol	0,68	0,45	0,29	0,26	0,08	-0,10	-0,16	-0,30	-0,37	-	-
23	3-Nitrofenol	0,76	0,51	0,41	0,30	0,18	-0,06	-0,14	-0,26	-	-	-
24	Benzil alkohol	0,44	0,32	0,08	0,06	-0,18	-0,22	-0,33	-0,39	-	-	-
25	Naftilamin	1,33	0,95	0,82	0,67	0,46	0,26	0,16	-0,02	-0,10	-	-

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
26	2-Naftol	0,14	0,02	-0,04	-0,10	-0,20	-0,29	-0,59	-0,54	-	-	-
27	4-Fluoroanilin	0,50	0,37	0,17	0,14	-0,08	-0,14	-0,31	-0,32	-	-	-
28	1-Naftol	1,34	1,02	0,87	0,73	0,48	0,30	0,16	0,02	-	-	-
29	4-Hidroksibenzaldehid	0,37	0,23	0,06	-0,02	-0,16	-0,32	-0,41	-0,54	-	-	-
30	3-Hlornitrobenzen	1,34	1,16	0,99	0,86	0,72	0,44	0,33	0,18	-	-	-
31	2,4-Dihlorfenol	1,35	1,09	0,88	0,81	0,52	0,29	0,20	0,02	0,00	-	-
32	4-Metilfenol	0,82	0,56	0,52	0,35	0,16	-0,02	-0,12	-0,22	-	-	-
33	4-Hlorfenol	0,82	0,68	0,79	0,39	0,20	0,02	-0,10	-0,18	-	-	-
34	Antracen	1,97	1,97	1,62	1,96	1,32	1,46	1,12	0,90	-	-	-
35	Acetofenon	1,03	0,69	0,52	0,41	0,23	0,10	-0,04	-0,14	-	-	-
36	2-Aminofenol	0,00	-0,14	-0,26	-0,32	-0,49	-0,56	-0,63	-0,73	-	-	-
37	2,4,6-Trinitrofenol	-0,02	-0,17	-0,23	-0,32	-0,41	-0,54	-0,64	-0,73	-	-	-
38	2,4,6-Trihlorfenol	2,37	1,35	1,12	1,15	1,00	0,60	0,49	0,26	0,18	-0,26	-0,34
39	2,4-Dinitrofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	4-t-Butilfenol	1,63	1,32	1,12	0,90	0,72	0,49	0,32	0,12	-	-	-
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	-0,53	-0,65	-0,71	-0,80	-0,88	-1,07	-0,99	-1,15	-	-	-
43	2,6-Dimetilfenol	1,14	0,80	0,64	0,43	0,43	0,14	0,10	-0,12	-	-	-
44	Oksazepam	-	-	-	-	0,54	0,33	0,14	0,02	-0,16	-	-
45	Lorazepam	-	-	-	-	0,51	0,27	0,18	-0,02	-0,18	-	-
46	Klonazepam	-	-	-	-	0,42	0,21	0,09	-0,12	-0,24	-	-
47	Bromazepam	-	-	-	-	0,39	0,26	0,09	-0,02	-0,20	-	-
48	Diazepam	-	-	-	-	0,90	0,81	0,57	0,39	0,18	0,00	-0,15
49	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4-Metoksifenol	-	-0,29	-0,27	-0,39	-0,43	-0,54	-0,64	-0,73	-	-	-
51	Midazolam	-	-	-	-	1,33	1,15	0,90	0,60	0,39	0,16	0,04

Br.	Jedinjenje	Udeo organske komponente u mobilnoj fazi (% v/v)										
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
52	Nitrazepam	-	-	-	-	0,49	0,35	0,17	-0,02	-0,18	-	-
53	Hlordiazepoksid	-	-	-	-	0,81	0,73	1,30	0,35	0,14	-	-
54	Kllobazam	-	-	-	-	0,54	0,39	0,21	0,04	-0,14	-	-
55	Medazepam	-	-	-	-	1,64	1,64	1,46	1,15	0,81	0,56	0,40
56	Hlorazepate	-	-	-	-	0,77	0,63	0,41	0,24	0,06	-0,14	-0,29
57	Flurazepam	-	-	-	-	1,15	1,07	1,01	0,95	0,67	0,65	0,50
58	Piren	-	-	-	-	1,35	1,25	1,33	1,07	0,86	0,65	0,68
59	Benzo(a)piren	-	-	-	-	1,48	1,48	1,65	1,95	1,33	1,14	0,82
60	Fluoren	-	-	-	-	1,17	1,09	1,02	0,90	0,60	0,40	0,19
61	Acenaften	-	-	-	-	1,17	1,09	0,96	0,81	0,57	0,38	0,23
62	Naftalen	-	-	-	-	0,92	0,76	0,61	0,52	0,26	0,14	-0,04
63	Fenantrene	-	-	-	-	1,17	1,03	1,08	0,90	0,63	0,43	0,25
64	Hrizen	-	-	-	-	1,40	1,35	1,65	1,64	1,15	0,80	0,61
65	Dibenz(a,h)antracen	-	-	-	-	1,66	1,66	1,95	1,95	1,95	1,22	0,91
66	Benz(a)antracen	-	-	-	-	1,48	1,48	1,95	1,46	1,07	0,80	0,61
67	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Etil-4-hidroksibenzoat	-	0,90	0,66	0,52	0,32	0,14	0,04	-0,14	-	-	-
70	Metil-4-hidroksibenzoat	-	0,61	0,41	0,30	0,16	-0,06	-0,12	-0,30	-	-	-
71	Simazin	-	-	-	-	0,42	0,25	0,27	0,00	-0,16	-0,28	-0,46
72	Propazin	-	-	-	-	0,72	0,57	0,61	0,24	0,06	-0,10	-0,23
73	Ametrin	-	-	-	-	0,83	0,63	0,40	0,30	0,10	-0,04	-0,19
74	Prometrin	-	-	-	-	0,98	0,76	0,47	0,44	0,22	0,04	-0,11
75	Atrazin	-	-	-	-	0,57	0,42	0,61	0,14	-0,06	-0,20	-0,29

Tabela P1d. Retencioni podaci dati u obliku R_M vrednosti za NP sistem; stac. faza silika-gel

Br.	Jedinjenje	Mobilna faza			
		Hloroform	Toluen	1,2-dihloretan	25% Et-acetat u heksanu
1	4-Aminofenol	1,64	2,65	1,31	1,64
2	Barbiturna kis.	1,95	2,65	1,62	1,62
3	<i>p</i> -Anizidin	0,86	1,64	0,36	0,60
4	1,2,3-Benzotriazole	1,64	2,65	1,21	0,90
5	2,2'-Bihinolin	0,73	1,01	-0,14	-0,18
6	Difenilamin	-0,32	-0,51	-0,79	-0,26
7	2,2'-Dipiridin	1,33	2,65	0,81	1,15
8	Anhidrid ftalne kis.	2,65	2,65	1,64	-0,06
9	1,4-Naftohinon	1,95	0,48	-0,32	1,15
10	2-Jodbenzoeva kis.	1,64	2,65	2,63	0,81
11	4-Hlorbenzoeva kis.	1,33	2,65	1,23	0,10
12	2-Nitrobenzaldehyd	0,10	0,13	-0,46	-0,10
13	4-Bromanilin	0,37	0,60	-0,23	0,10
14	Fenol	0,73	-	0,23	0,12
15	Benzofenon	0,02	0,13	-0,51	-0,20
16	3-Nitrobenzaldehyd	0,18	0,25	-0,36	0,24
17	4-Aminobenzojeva kis.	1,64	2,65	1,62	1,64
18	Ftalimid	0,86	1,64	0,79	0,54
19	Pirogalol	1,95	2,65	1,33	1,01
20	Galna kis.	2,65	2,65	1,64	1,33
21	1,4-Benzohinon	0,30	0,60	-0,15	0,06
22	4-Nitrofenol	0,95	1,33	0,58	0,44
23	3-Nitrofenol	0,90	1,01	0,46	0,35
24	Benzil alkohol	0,54	1,01	0,21	0,29
25	Naftilamin	0,30	0,60	-0,23	0,13

Br.	Jedinjenje	Mobilna faza			
		Hloroform	Toluen	1,2-dihloretan	25% Et-acetat u heksanu
26	2-Naftol	0,67	0,70	-0,02	0,13
27	4-Fluoroanilin	1,60	0,67	-0,41	0,25
28	1-Naftol	0,46	0,49	0,06	0,06
29	4-Hidroksibenzaldehid	1,15	1,95	0,88	1,17
30	3-Hloronitrobenzen	-0,35	-0,60	-0,78	-0,33
31	2,4-Dihlorfenol	0,10	0,20	-0,78	0,13
32	4-Metilfenol	-	-	-	-
33	4-Hlorfenol	0,54	0,49	0,12	0,06
34	Antracen	-0,54	-0,90	-0,88	-0,42
35	Acetofenon	-0,08	0,18	-0,40	-0,17
36	2-Aminofenol	1,33	1,64	0,26	0,69
37	2,4,6-Trinitrofenol	2,65	1,64	2,62	1,66
38	2,4,6-Trihlorfenol	-0,10	-0,06	-0,32	0,02
39	2,4-Dinitrofenol	0,35	0,39	0,26	0,83
40	4-t-Butilfenol	0,60	0,67	0,08	-0,02
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	2,65	2,65	0,36	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	1,64	2,65	1,61	1,66
43	2,6-Dimetilfenol	0,06	0,14	0,00	-0,13
44	Oksazepam	1,64	2,65	1,60	1,35
45	Lorazepam	1,64	2,65	1,61	1,35
46	Klonazepam	1,64	2,65	1,61	1,17
47	Bromazepam	2,65	2,65	1,11	1,03
48	Diazepam	1,01	1,64	0,78	0,76
49	Prazepam	0,95	2,65	0,51	0,51
50	4-Metoksifenol	0,73	1,01	0,32	0,29
51	Midazolam	1,20	1,93	0,91	0,66

Br.	Jedinjenje	Mobilna faza			
		Hloroform	Toluen	1,2-dihloretan	25% Et-acetat u heksanu
52	Nitrazepam	1,56	2,37	1,33	0,90
53	Hlordiazepoksid	0,55	1,02	0,22	0,18
54	Kllobazam	1,75	2,79	1,58	0,99
55	Medazepam	-0,11	-0,02	-0,54	-0,30
56	Hlorazepate	2,41	3,70	2,32	1,61
57	Flurazepam	1,07	2,11	0,93	0,56
58	Piren	-0,50	-1,07	-1,14	-0,62
59	Benzo(a)piren	-0,50	-1,16	-1,14	-0,67
60	Fluoren	-0,54	-0,88	-1,14	-0,58
61	Acenaften	-0,44	-0,81	-1,06	-0,50
62	Naftalen	-0,53	-0,87	-1,16	-0,54
63	Fenantrene	-0,44	-0,84	-1,06	-0,53
64	Hrizen	-0,49	-1,02	-1,10	-0,65
65	Dibenz(a,h)antracen	-0,49	-1,10	-1,08	-0,70
66	Benz(a)antracen	-0,49	-1,02	-1,10	-0,65
67	4-Nitrobenzaldehyd	0,14	0,23	-0,32	0,10
68	3-Nitroaniline	0,85	1,23	0,45	0,42
69	Etil-4-hidroksibenzoat	0,82	1,32	0,49	0,44
70	Metil-4-hidroksibenzoat	0,91	1,39	0,56	0,51
71	Simazin	0,92	1,49	0,53	0,60
72	Propazin	0,74	1,33	0,38	0,45
73	Ametrin	-	-	-	-
74	Prometrin	-	-	-	-
75	Atrazin	-	-	-	-

Tabela P2a. Hromatografski deskriptori: R_M^0 , b , C_0 sa pratećom statistikom (C-18, aceton-voda)

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-1,75±0,27	0,28±0,42	0,053	0,19	0,45	0,52	10	623,78	40-85
3	<i>p</i> -Anizidin	1,69±0,12	-2,54±0,18	0,961	0,08	197,47	0,00	10	66,51	40-85
4	1,2,3-Benzotriazole	1,13±0,07	-2,05±0,12	0,975	0,05	310,26	0,00	10	55,43	40-85
5	2,2'-Bihinolin	3,78±0,23	-4,40±0,31	0,976	0,08	204,90	0,00	7	85,93	60-90
6	Difenilamin	3,71±0,13	-4,71±0,21	0,985	0,09	516,99	0,00	10	78,67	40-85
7	2,2'-Dipiridin	1,68±0,06	-2,36±0,09	0,987	0,05	661,16	0,00	11	71,13	40-90
8	Anhidrid ftalne kis.	0,14±0,06	-1,93±0,10	0,979	0,05	376,31	0,00	10	7,16	40-85
9	1,4-Naftohinon	1,94±0,10	-2,73±0,14	0,988	0,04	403,58	0,00	7	70,98	60-90
10	2-Jodbenzoeva kis.	1,06±0,15	-1,97±0,23	0,902	0,10	73,46	0,00	10	53,65	40-85
11	4-Hlorbenzoeva kis.	2,14±0,08	-3,18±0,13	0,987	0,06	611,63	0,00	10	67,17	40-85
12	2-Nitrobenzaldehyd	2,11±0,05	-2,97±0,09	0,993	0,04	1210,73	0,00	10	71,18	40-85
13	4-Bromanilin	2,61±0,07	-3,56±0,11	0,992	0,05	1031,79	0,00	10	73,54	40-85
14	Fenol	1,52±0,12	-2,71±0,20	0,967	0,07	175,39	0,00	8	56,13	40-75
15	Benzofenon	3,11±0,08	-3,96±0,12	0,993	0,05	1132,34	0,00	10	78,51	40-85
16	3-Nitrobenzaldehyd	2,07±0,07	-2,90±0,10	0,990	0,05	771,68	0,00	10	71,46	40-85
17	4-Aminobenzoeva kis.	0,94±0,08	-1,96±0,12	0,971	0,05	267,79	0,00	10	47,89	40-85
18	Ftalimid	1,37±0,06	-2,25±0,10	0,985	0,04	526,39	0,00	10	60,66	40-85
20	Pirogalol	0,58±0,09	-1,54±0,15	0,932	0,07	110,39	0,00	10	37,91	40-85
21	Galna kis.	0,09±0,10	-1,22±0,15	0,890	0,07	64,69	0,00	10	7,34	40-85
22	1,4-Benzohinon	0,79±0,07	-1,45±0,11	0,960	0,05	191,42	0,00	10	54,15	40-85
23	4-Nitrofenol	1,62±0,13	-2,76±0,22	0,963	0,07	155,07	0,00	8	58,73	40-75
24	3-Nitrofenol	2,09±0,14	-3,42±0,24	0,971	0,08	202,63	0,00	8	61,09	40-75
25	Benzil alkohol	1,02±0,17	-2,21±0,29	0,909	0,09	59,71	0,00	8	46,26	40-75
26	Naftilamin	2,24±0,13	-3,44±0,22	0,977	0,07	253,12	0,00	8	65,23	40-75
27	2-Naftol	2,17±0,15	-3,45±0,26	0,967	0,09	173,20	0,00	8	62,95	40-75

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
28	4-Fluoroanilin	1,55±0,12	-2,66±0,20	0,968	0,06	184,42	0,00	8	58,11	40-75
29	1-Naftol	2,33±0,17	-3,55±0,28	0,963	0,09	157,59	0,00	8	65,77	40-75
30	4-Hidroksibenzaldehid	1,18±0,23	-2,42±0,39	0,867	0,13	39,17	0,00	8	49,01	40-75
31	3-Hlornitrobenzen	2,58±0,14	-3,58±0,24	0,973	0,08	217,82	0,00	8	72,16	40-75
32	2,4-Dihlorfenol	2,37±0,20	-3,63±0,34	0,951	0,11	117,07	0,00	8	65,35	40-75
33	4-Metilfenol	1,53±0,21	-2,66±0,35	0,905	0,11	56,99	0,00	8	57,26	40-75
34	4-Hlorfenol	2,03±0,15	-3,37±0,25	0,968	0,08	184,33	0,00	8	60,18	40-75
35	Antracen	3,98±0,26	-5,16±0,44	0,958	0,14	138,07	0,00	8	77,18	40-75
36	Acetofenon	1,65±0,08	-2,73±0,14	0,985	0,04	405,43	0,00	8	60,46	40-75
37	2-Aminofenol	1,09±0,18	-2,31±0,31	0,904	0,10	56,77	0,00	8	47,43	40-75
38	2,4,6-Trinitrofenol	0,98±0,28	-2,47±0,48	0,817	0,15	26,80	0,00	8	39,57	40-75
39	2,4,6-Trihlorfenol	2,26±0,14	-2,97±0,22	0,957	0,10	176,53	0,00	10	76,22	40-85
40	2,4-Dinitrofenol	0,38±0,21	-1,38±0,36	0,715	0,12	15,08	0,01	8	27,12	40-75
41	4-t-Butilfenol	2,69±0,19	-3,97±0,33	0,961	0,11	148,85	0,00	8	67,82	40-75
42	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,52±0,20	-2,09±0,35	0,857	0,11	35,82	0,00	8	24,85	40-75
44	2,6-Dimetilfenol	2,27±0,11	-3,49±0,18	0,984	0,06	372,86	0,00	8	65,00	40-75
45	Oksazepam	2,39±0,44	-3,47±0,65	0,876	0,14	28,32	0,01	6	68,88	55-80
46	Lorazepam	2,71±0,50	-3,96±0,73	0,880	0,15	29,42	0,01	6	68,44	55-80
47	Klonazepam	3,05±0,43	-4,32±0,63	0,921	0,13	46,73	0,00	6	70,61	55-80
48	Bromazepam	2,07±0,37	-3,10±0,54	0,893	0,11	33,31	0,00	6	66,68	55-80
49	Diazepam	3,11±0,50	-4,28±0,68	0,867	0,22	39,23	0,00	8	72,55	55-90
50	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	4-Metoksifenol	1,16±0,24	-2,38±0,40	0,853	0,13	34,79	0,00	8	48,68	40-75
52	Midazolam	2,55±0,32	-3,04±0,42	0,912	0,11	51,80	0,00	7	83,88	60-90
53	Nitrazepam	2,26±0,49	-3,28±0,70	0,881	0,11	22,18	0,02	5	68,79	55-80
54	Hlordiazepoksid	2,59±0,43	-3,62±0,61	0,920	0,10	34,68	0,01	5	71,51	55-80

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
55	Kllobazam	2,29±0,50	-3,31±0,70	0,880	0,11	22,04	0,02	5	69,32	55-80
56	Medazepam	3,34±0,27	-3,79±0,35	0,959	0,09	117,00	0,00	7	88,00	60-90
57	Hlorazepate	2,33±0,18	-3,22±0,24	0,973	0,06	180,98	0,00	7	72,22	60-90
58	Flurazepam	2,35±0,25	-2,08±0,33	0,887	0,09	39,09	0,00	7	113,12	60-90
59	Piren	3,33±0,20	-3,93±0,26	0,979	0,07	227,66	0,00	7	84,52	60-90
60	Benzo(a)piren	3,84±0,19	-4,33±0,26	0,983	0,07	287,76	0,00	7	88,74	60-90
61	Fluoren	3,17±0,16	-3,81±0,22	0,984	0,06	305,89	0,00	7	83,22	60-90
62	Acenaften	3,02±0,19	-3,59±0,26	0,975	0,07	195,31	0,00	7	83,96	60-90
63	Naftalen	3,41±0,51	-4,24±0,67	0,889	0,18	39,95	0,00	7	80,52	60-90
64	Fenantren	3,22±0,24	-3,87±0,32	0,967	0,08	148,67	0,00	7	83,08	60-90
65	Hrizen	3,92±0,31	-4,56±0,41	0,96	0,11	123,79	0,00	7	85,98	60-90
66	Dibenz(a,h)antracen	4,64±0,39	-5,23±0,52	0,95	0,14	102,19	0,00	7	88,80	60-90
67	Benz(a)antracen	4,38±0,35	-5,10±0,46	0,96	0,12	121,70	0,00	7	85,90	60-90
68	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	Etil-4-hidroksibenzoat	1,94±0,11	-3,17±0,18	0,98	0,06	307,65	0,00	8	61,08	40-75
71	Metil-4-hidroksibenzoat	1,71±0,12	-2,96±0,21	0,97	0,07	200,82	0,00	8	57,95	40-75
72	Simazin	1,76±0,06	-2,37±0,08	0,99	0,02	902,56	0,00	7	74,08	60-90
73	Propazin	2,75±0,21	-3,61±0,28	0,97	0,07	172,60	0,00	7	76,00	60-90
74	Ametrin	2,55±0,19	-3,37±0,25	0,97	0,07	175,97	0,00	7	75,86	60-90
75	Prometrin	3,04±0,25	-3,88±0,33	0,96	0,09	135,67	0,00	7	78,35	60-90
76	Atrazin	2,39±0,23	-3,24±0,31	0,96	0,08	110,02	0,00	7	73,62	60-90

Tabela P2b. Hromatografski deskriptori: R_M^0 , b , C_0 sa pratećom statistikom (C-18, acetonitril-voda)

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-0,54±0,33	-1,73±0,57	0,605	0,18	9,21	0,02	8	-31,51	40-75
3	p-Anizidin	1,58±0,12	-2,78±0,20	0,969	0,07	186,37	0,00	8	56,98	40-75
4	1,2,3-Benzotriazole	1,32±0,11	-3,05±0,19	0,976	0,06	244,77	0,00	8	43,49	40-75
5	2,2'-Bihinolin	2,82±0,11	-2,84±0,15	0,986	0,04	359,76	0,00	7	99,32	60-90
6	Difenilamin	2,98±0,15	-4,06±0,25	0,977	0,08	253,55	0,00	8	73,32	40-75
7	2,2'-Dipiridin	1,27±0,10	-1,57±0,16	0,918	0,08	100,10	0,00	11	81,10	40-90
8	Anhidrid ftalne kis.	-0,22±0,13	-1,14±0,23	0,809	0,07	25,46	0,00	8	-19,66	40-75
9	1,4-Naftohinon	1,81±0,12	-2,79±0,18	0,964	0,09	243,05	0,00	11	64,78	40-90
10	2-Jodbenzoeva kis.	0,28±0,14	-1,28±0,24	0,827	0,08	28,66	0,00	8	22,12	40-75
11	4-Hlorbenzoeva kis.	0,84±0,09	-1,82±0,16	0,956	0,05	129,46	0,00	8	46,00	40-75
12	2-Nitrobenzaldehyd	1,78±0,11	-2,94±0,19	0,975	0,06	237,12	0,00	8	60,49	40-75
13	4-Bromanilin	1,84±0,09	-2,86±0,15	0,984	0,05	359,17	0,00	8	64,22	40-75
14	Fenol	1,35±0,10	-2,91±0,17	0,980	0,05	301,68	0,00	8	46,47	40-75
15	Benzofenon	3,01±0,25	-4,31±0,43	0,944	0,14	100,85	0,00	8	69,95	40-75
16	3-Nitrobenzaldehyd	2,10±0,22	-3,63±0,38	0,938	0,12	90,34	0,00	8	57,92	40-75
17	4-Aminobenzoeva kis.	0,76±0,12	-2,11±0,21	0,943	0,07	99,20	0,00	8	36,02	40-75
18	Ftalimid	1,47±0,16	-3,17±0,28	0,955	0,09	128,01	0,00	8	46,51	40-75
19	Pirogalol	0,83±0,07	-2,38±0,12	0,985	0,04	390,92	0,00	8	34,82	40-75
20	Galna kis.	-0,21±0,13	-0,98±0,22	0,765	0,07	19,55	0,00	8	-21,01	40-75
21	1,4-Benzohinon	1,10±0,09	-2,45±0,15	0,978	0,05	263,51	0,00	8	44,81	40-75
22	4-Nitrofenol	1,47±0,11	-2,97±0,18	0,979	0,06	274,48	0,00	8	49,31	40-75
23	3-Nitrofenol	1,93±0,13	-3,12±0,22	0,971	0,07	197,58	0,00	8	61,84	40-75
24	Benzil alkohol	0,97±0,13	-2,23±0,22	0,944	0,07	101,55	0,00	8	43,65	40-75
25	Naftilamin	1,98±0,09	-3,06±0,15	0,987	0,05	439,27	0,00	8	64,50	40-75
26	2-Naftol	1,96±0,12	-3,29±0,21	0,981	0,05	253,94	0,00	7	59,48	40-70

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
27	4-Fluoroanilin	1,61±0,12	-2,98±0,22	0,974	0,06	188,90	0,00	7	53,94	40-70
28	1-Naftol	1,29±0,21	-2,39±0,37	0,894	0,10	42,27	0,00	7	53,91	40-70
29	4-Hidroksibenzaldehid	1,09±0,03	-2,68±0,06	0,997	0,02	1907,24	0,00	7	40,59	40-70
30	3-Hlornitrobenzen	2,42±0,10	-3,49±0,17	0,988	0,05	403,53	0,00	7	69,31	40-70
31	2,4-Dihlorfenol	1,89±0,14	-3,05±0,23	0,966	0,08	171,21	0,00	8	62,14	40-75
32	4-Metilfenol	1,47±0,12	-2,81±0,21	0,974	0,05	185,57	0,00	7	52,43	40-70
33	4-Hlorfenol	1,54±0,12	-2,83±0,22	0,970	0,06	162,91	0,00	7	54,48	40-70
34	Antracen	3,61±0,19	-4,34±0,34	0,970	0,09	160,32	0,00	7	83,21	40-70
35	Acetofenon	1,42±0,12	-2,25±0,21	0,960	0,05	119,30	0,00	7	62,89	40-70
36	2-Aminofenol	0,95±0,11	-2,47±0,20	0,968	0,05	152,43	0,00	7	38,54	40-70
37	2,4,6-Trinitrofenol	0,50±0,14	-2,03±0,25	0,931	0,07	67,13	0,00	7	24,53	40-70
38	2,4,6-Trihlorfenol	2,07±0,09	-2,89±0,13	0,982	0,07	501,35	0,00	11	71,49	40-90
39	2,4-Dinitrofenol	0,46±0,16	-1,81±0,29	0,888	0,08	39,59	0,00	7	25,28	40-70
40	4-t-Butilfenol	2,41±0,09	-3,68±0,16	0,991	0,04	547,42	0,00	7	65,55	40-70
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,49±0,15	-2,03±0,26	0,923	0,07	59,84	0,00	7	24,22	40-70
43	2,6-Dimetilfenol	1,90±0,10	-3,13±0,18	0,984	0,05	312,87	0,00	7	60,90	40-70
44	Oksazepam	1,15±0,12	-2,20±0,16	0,983	0,03	178,79	0,00	5	52,24	60-80
45	Lorazepam	1,17±0,12	-2,25±0,17	0,983	0,03	174,72	0,00	5	52,02	60-80
46	Klonazepam	1,59±0,18	-2,81±0,26	0,975	0,04	115,45	0,00	5	56,56	60-80
47	Bromazepam	0,78±0,26	-1,49±0,36	0,848	0,06	16,69	0,03	5	52,58	60-80
48	Diazepam	1,55±0,14	-1,94±0,19	0,956	0,05	109,12	0,00	7	79,97	60-90
49	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4-Metoksifenol	0,41±0,08	-1,60±0,15	0,960	0,04	121,03	0,00	7	25,56	40-70
51	Midazolam	1,77±0,24	-1,33±0,32	0,775	0,08	17,20	0,01	7	133,90	60-90
52	Nitrazepam	1,53±0,09	-2,75±0,12	0,994	0,02	508,38	0,00	5	55,55	60-80
53	Hlordiazepoksid	1,14±0,21	-1,39±0,29	0,883	0,05	22,75	0,02	5	82,23	60-80

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
54	Kllobazam	1,68±0,10	-2,64±0,15	0,991	0,02	314,37	0,00	5	63,65	60-80
55	Medazepam	2,78±0,27	-2,54±0,36	0,907	0,10	48,89	0,00	7	109,33	60-90
56	Hlorazepat	1,85±0,49	-2,76±0,64	0,786	0,17	18,39	0,01	7	67,24	60-90
57	Flurazepam	2,05±0,38	-1,68±0,51	0,688	0,13	11,05	0,02	7	122,01	60-90
58	Piren	2,37±0,26	-2,32±0,34	0,903	0,09	46,64	0,00	7	102,20	60-90
59	Benzo(a)piren	3,04±0,16	-2,83±0,21	0,972	0,06	176,75	0,00	7	107,59	60-90
60	Fluoren	2,41±0,02	-2,79±0,02	1,000	0,01	13531,49	0,00	7	86,38	60-90
61	Acenaften	2,47±0,02	-2,82±0,02	1,000	0,01	16163,23	0,00	7	87,57	60-90
62	Naftalen	2,14±0,06	-2,69±0,09	0,995	0,02	995,38	0,00	7	79,51	60-90
63	Fenantren	2,48±0,04	-2,79±0,06	0,998	0,01	2464,25	0,00	7	88,95	60-90
64	Hrizen	3,06±0,10	-3,11±0,13	0,99	0,03	588,38	0,00	7	98,43	60-90
65	Dibenz(a,h)antracen	3,55±0,63	-3,37±0,83	0,77	0,22	16,60	0,01	7	105,41	60-90
66	Benz(a)antracen	2,98±0,06	-3,02±0,08	1,00	0,02	1514,08	0,00	7	98,68	60-90
67	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	3-Nitroanilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Etil-p-hidroksibenzoat	1,61±0,12	-2,98±0,22	0,97	0,06	188,90	0,00	7	53,94	40-70
70	Metil-p-hidroksibenzoat	1,30±0,05	-2,73±0,09	0,99	0,03	832,95	0,00	7	47,70	40-70
71	Simazin	1,72±0,15	-2,76±0,19	0,98	0,05	200,49	0,00	7	62,50	60-90
72	Propazin	1,71±0,08	-2,37±0,11	0,99	0,03	443,71	0,00	7	72,42	60-90
73	Ametrin	1,80±0,04	-2,36±0,05	1,00	0,01	2241,78	0,00	7	76,24	60-90
74	Prometrin	2,12±0,06	-2,63±0,07	1,00	0,02	1276,63	0,00	7	80,48	60-90
75	Atrazin	1,43±0,08	-2,13±0,11	0,99	0,03	391,57	0,00	7	67,29	60-90

Tabela P2c. Hromatografski deskriptori: R_M^0 , b , C_0 sa pratećom statistikom (C-18, metanol -voda)

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
1	4-Aminofenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Barbiturna kis.	-1,41±0,29	-0,36±0,45	0,073	0,20	0,63	0,45	10	-397,41	40-85
3	p-Anizidin	1,62±0,06	-2,53±0,09	0,991	0,04	856,61	0,00	10	63,99	40-85
4	1,2,3-Benzotriazole	1,57±0,08	-2,59±0,13	0,980	0,06	401,95	0,00	10	60,65	40-85
5	2,2'-Bihinolin	6,16±0,76	-6,95±1,00	0,906	0,26	48,13	0,00	7	88,72	60-90
6	Difenilamin	3,32±0,12	-3,84±0,18	0,982	0,08	437,78	0,00	10	86,54	40-85
7	2,2'-Dipiridin	2,37±0,08	-2,99±0,12	0,986	0,06	626,59	0,00	11	79,12	40-90
8	Anhidrid ftalne kis.	-0,62±0,18	-0,39±0,27	0,202	0,12	2,02	0,19	10	-160,73	40-85
9	1,4-Naftohinon	1,68±0,10	-2,16±0,13	0,982	0,03	278,55	0,00	7	77,83	60-90
10	2-Jodbenzoeva kis.	0,09±0,10	-1,09±0,15	0,865	0,07	51,28	0,00	10	7,93	40-85
11	4-Hlorbenzoeva kis.	0,62±0,04	-1,34±0,06	0,983	0,03	470,43	0,00	10	46,34	40-85
12	2-Nitrobenzaldehyd	2,55±0,26	-3,71±0,41	0,912	0,19	82,41	0,00	10	68,85	40-85
13	4-Bromanilin	2,33±0,08	-3,06±0,12	0,988	0,05	668,50	0,00	10	76,14	40-85
14	Fenol	1,29±0,04	-2,27±0,06	0,996	0,02	1410,69	0,00	8	56,95	40-75
15	Benzofenon	3,24±0,16	-3,75±0,25	0,965	0,11	221,54	0,00	10	86,49	40-85
16	3-Nitrobenzaldehyd	1,90±0,08	-2,72±0,12	0,985	0,05	537,08	0,00	10	69,78	40-85
17	4-Aminobenzoeva kis.	0,24±0,10	-1,32±0,16	0,891	0,07	65,20	0,00	10	18,14	40-85
18	Ftalimid	1,71±0,09	-2,66±0,14	0,979	0,06	378,54	0,00	10	64,18	40-85
19	Pirogalol	0,53±0,06	-1,77±0,10	0,976	0,04	321,56	0,00	10	30,13	40-85
20	Galna kis.	-0,66±0,13	-0,77±0,20	0,654	0,09	15,13	0,00	10	-86,27	40-85
21	1,4-Benzohinon	0,96±0,05	-1,83±0,08	0,985	0,04	534,15	0,00	10	52,19	40-85
22	4-Nitrofenol	1,63±0,08	-2,57±0,13	0,983	0,05	408,03	0,00	9	63,61	40-80
23	3-Nitrofenol	1,85±0,08	-2,84±0,13	0,987	0,04	447,90	0,00	8	65,03	40-75
24	Benzil alkohol	1,37±0,11	-2,43±0,19	0,965	0,06	163,95	0,00	8	56,37	40-75
25	Naftilamin	2,24±0,13	-3,44±0,22	0,977	0,07	253,12	0,00	8	65,23	40-75
26	2-Naftol	0,98±0,13	-2,06±0,22	0,937	0,07	89,93	0,00	8	47,79	40-75

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
27	4-Fluoroanilin	1,45±0,09	-2,45±0,16	0,976	0,05	243,63	0,00	8	59,18	40-75
28	1-Naftol	2,73±0,10	-3,68±0,16	0,988	0,05	509,54	0,00	8	74,18	40-75
29	4-Hidroksibenzaldehid	1,39±0,04	-2,60±0,07	0,996	0,02	1506,06	0,00	8	53,66	40-75
30	3-Hlornitrobenzen	2,68±0,06	-3,35±0,11	0,993	0,04	913,92	0,00	8	79,93	40-75
31	2,4-Dihlorfenol	2,58±0,12	-3,46±0,19	0,978	0,08	317,61	0,00	9	74,59	40-80
32	4-Metilfenol	1,96±0,09	-2,97±0,15	0,984	0,05	378,94	0,00	8	66,13	40-75
33	4-Hlorfenol	2,16±0,19	-3,19±0,33	0,941	0,11	95,27	0,00	8	67,79	40-75
34	Antracen	3,29±0,34	-3,05±0,57	0,825	0,19	28,30	0,00	8	108,10	40-75
35	Acetofenon	2,17±0,13	-3,16±0,22	0,971	0,07	200,79	0,00	8	68,59	40-75
36	2-Aminofenol	0,80±0,05	-2,07±0,09	0,989	0,03	523,19	0,00	8	38,53	40-75
37	2,4,6-Trinitrofenol	0,77±0,03	-2,00±0,06	0,995	0,02	1141,25	0,00	8	38,36	40-75
38	2,4,6-Trihlorfenol	3,69±0,29	-4,57±0,43	0,925	0,23	111,16	0,00	11	80,75	40-90
39	2,4-Dinitrofenol	2,68±0,12	-3,50±0,20	0,977	0,08	300,61	0,00	9	76,39	40-80
40	4-t-Butilfenol	3,26±0,07	-4,22±0,12	0,996	0,04	1347,87	0,00	8	77,13	40-75
41	1-Bromo-4-hlorbenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,3,5-Trihidroksibenzen	0,13±0,09	-1,70±0,16	0,951	0,05	116,42	0,00	8	7,66	40-75
43	2,6-Dimetilfenol	2,33±0,15	-3,28±0,26	0,964	0,08	162,88	0,00	8	71,03	40-75
44	Oksazepam	2,56±0,12	-3,41±0,17	0,993	0,03	405,74	0,00	5	75,15	60-80
45	Lorazepam	2,49±0,17	-3,34±0,25	0,984	0,04	180,76	0,00	5	74,62	60-80
46	Klonazepam	2,36±0,12	-3,27±0,17	0,992	0,03	350,41	0,00	5	72,19	60-80
47	Bromazepam	2,14±0,08	-2,91±0,11	0,996	0,02	687,52	0,00	5	73,59	60-80
48	Diazepam	3,16±0,10	-3,70±0,13	0,994	0,03	817,79	0,00	7	85,41	60-90
49	Prazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4-Metoksifenol	0,49±0,09	-1,60±0,15	0,960	0,04	121,03	0,00	7	30,56	45-75
51	Midazolam	4,06±0,14	-4,55±0,18	0,992	0,05	627,76	0,00	7	89,35	60-90
52	Nitrazepam	2,54±0,06	-3,39±0,08	0,998	0,01	1790,89	0,00	5	74,76	60-80
53	Hlordiazepoksid	3,11±1,83	-3,49±2,60	0,374	0,41	1,79	0,27	5	89,10	60-80

Red. broj	Jedinjenje	R_M^0	b	R^2	$S.D.$	F	P	n	C_0	Opseg udela org. modif. (%)
54	Kllobazam	2,61±0,03	-3,43±0,05	0,999	0,01	4813,11	0,00	5	76,11	60-80
55	Medazepam	4,59±0,30	-4,66±0,40	0,964	0,11	135,77	0,00	7	98,49	60-90
56	Hlorazepat	2,97±0,05	-3,64±0,07	0,998	0,02	2916,15	0,00	7	81,58	60-90
57	Flurazepam	2,52±0,18	-2,22±0,24	0,945	0,06	85,91	0,00	7	113,56	60-90
58	Piren	3,01±0,30	-2,64±0,39	0,899	0,10	44,71	0,00	7	113,92	60-90
59	Benzo(a)piren	3,01±0,87	-2,13±1,15	0,406	0,31	3,41	0,12	7	141,08	60-90
60	Fluoren	3,30±0,26	-3,37±0,35	0,950	0,09	94,78	0,00	7	97,76	60-90
61	Acenaften	3,22±0,15	-3,30±0,20	0,981	0,05	260,33	0,00	7	97,56	60-90
62	Naftalen	2,85±0,10	-3,19±0,13	0,992	0,03	619,51	0,00	7	89,16	60-90
63	Fenantren	3,14±0,29	-3,14±0,38	0,931	0,10	67,46	0,00	7	99,96	60-90
64	Hrizen	3,35±0,81	-2,83±1,07	0,58	0,28	7,01	0,05	7	118,45	60-90
65	Dibenz(a,h)antracen	3,30±1,02	-2,24±1,35	0,35	0,36	2,75	0,16	7	147,12	60-90
66	Benz(a)antracen	3,86±0,85	-3,46±1,13	0,65	0,30	9,42	0,03	7	111,62	60-90
67	4-Nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Etil-p-hidroksibenzoat	2,38±0,09	-3,39±0,14	0,99	0,04	568,40	0,00	7	70,28	45-75
70	Metil-p-hidroksibenzoat	1,93±0,08	-2,98±0,13	0,99	0,03	539,15	0,00	7	64,84	45-75
71	Simazin	2,21±0,17	-2,94±0,22	0,97	0,06	172,31	0,00	7	75,15	60-90
72	Propazin	2,81±0,25	-3,39±0,33	0,96	0,09	108,58	0,00	7	82,85	60-90
73	Ametrin	2,81±0,10	-3,36±0,14	0,99	0,04	606,36	0,00	7	83,60	60-90
74	Prometrin	3,05±0,16	-3,54±0,21	0,98	0,06	289,96	0,00	7	86,24	60-90
75	Atrazin	2,57±0,40	-3,21±0,53	0,88	0,14	36,79	0,00	7	80,24	60-90

BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Mr Filip Andrić rođen je 17. decembra 1979. godine u Požegi, Srbija. Osnovnu i srednju školu završio je u Požegi. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1998. godine, a diplomirao 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Poslediplomske studije pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisao je 2005. godine. Magistarsku tezu pod naslovom “Mapiranje interakcija ostvarenih u uslovima reverzno-fazne tečne hromatografije primenom dizajna smeše i Snyder-ovog koncepta polarnosti i selektivnosti rastvarača” odbranio je 28. januara 2009. godine.

Od 24.12.2005. godine zaposlen je kao istraživač-pripravnik na projektu prof. Živoslava Tešića (br. 142062), te kao saradnik u nastavi na Katedri za analitičku hemiju od 19.5.2008. U novembru 2009. godine izabran je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Analitička hemija na Katedri za analitičku hemiju. U tom zvanju se i sada nalazi.

U toku svog nastavnog rada mr Filip Andrić je bilo angažovana u izvođenju vežbi u okviru nastave iz Analitičke hemije 1, te Obrade rezultata merenja i hemometrije za studente osnovnih, master i doktorskih studija na različitim studijskim programima. U nekoliko navrata kandidate je pohađao seminare stručnog usavršavanja u Finskoj u trajanju od dve nedelje i u Japanu u trajanju od šest meseci.

1. Poglavlja u knjigama i pregledni članci:

- 1.1. Dušanka Milojković-Opsenica, **Filip Andrić**, High Performance Thin-Layer Chromatography, In: Green Chromatographic Techniques, Inamuddin and Mohammad Luqman (Editors), Springer, (2013) 81-101.
- 1.2. Dušanka Milojković-Opsenica, Petar Ristivojević, **Filip Andrić**, Jelena Trifković, Planar chromatographic systems in pattern recognition and fingerprint analysis, Review, *Chromatographia*, (2013).

2. Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

- 2.1. Khalil Salem Shweshein, **Filip Andrić**, Aleksandra Radoičić, Matija Zlatar, Maja Gruden-Pavlović, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica (2013). Lipophilicity assessment of ruthenium(II)-arene complexes by the means of reversed-phase thin-layer chromatography and DFT calculations. *The Scientific World Journal* (In press).
- 2.2. P. Ristivojević, **F. Lj. Andrić**, J. Đ. Trifković, Irena Vovk, Lj. Ž. Stanisavljević, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Pattern Recognition Methods and Multivariate Image Analysis in HPTLC Fingerprinting of Propolis Extracts, *J. Chemom.* (In press)
- 2.3. J. Kečkeš, J. Trifković, **F. Andrić**, M. Jovetić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica (2013). Amino acids profile of Serbian unifloral honeys, *J. Sci. Food Agric.*, 93 (13), 3368–3376.
- 2.4. K.B. Lazarević, **F. Andrić**, J. Trifković, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters, *Food Chem.*, 132, 2060-2064.
- 2.5. **F.Lj. Andrić**, J.Đ. Trifković, A.D. Radoičić, S.B. Šegan, Ž.Lj. Tešić, D.M. Milojković-Opsenica (2010). 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, 299-305.

3. Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

- 3.1. S. Šegan, **F. Andrić**, A. Radoičić, D. Opsenica, B. Šolaja, M. Zlatović, *D. M. Milojković-Opsenica* (2011). Correlation between structure, retention and activity of cholic acid derived *cis-trans* isomeric bis-steroidal tetraoxanes, *J. Sep. Sci.*, 34(19), 2659-2667.
- 3.2. J.Đ. Trifković, **F.Lj. Andrić**, P. Ristivojević, D. Andrić, Ž.Lj. Tešić, *D.M. Milojković-Opsenica* (2010). Structure-retention relationship study of arylpiperazines by linear multivariate modeling, *J. Sep. Sci.*, 33, 2619-2628.

4. Radovi u međunarodnim časopisima (M23):

- 4.1. Kristina B. Lazarević Jelena Đ. Trifković, **Filip Lj. Andrić**, Živoslav Lj. Tešić, Ivan B. Anđelković, Dejan I. Radović, Nebojša M. Nedić, Dušanka M. Milojković-Opsenica (2013). Quality parameters and pattern recognition methods as a tool in tracing the regional origin of multifloral honey. *J. Serb. Che. Soc.* 78 (0) 1–20
- 4.2. J. Vlajković, **F. Andrić**, P. Ristivojević, A. Radoičić, Ž. Tešić, *D. Milojković-Opsenica* (2013). Development and validation of a TLC method for the analysis of synthetic food-stuff dyes, *J. Liq. Chromatogr. & Related Technol.*, 36, 2476-2488.
- 4.3. K.S.A.M. Shweshein, A. Radoičić, **F. Andrić**, Ž.Lj. Tešić, *D.M. Milojković-Opsenica* (2012). Hydrophilic interaction planar chromatography of geometrical isomers of selected Co(III) complexes, *J. Liq. Chromatogr. & Related Technol.*, 35, 1289-1297.
- 4.4. **F.Lj. Andrić**, J.Đ. Trifković, Ž.Lj. Tešić, *D.M. Milojković-Opsenica* (2008). An Approximate Linear Solvation Energy Relationships Model Based on Snyder's Selectivity Parameters. Chromatographic Behavior of Some 1-Aralkyl-4 Arylpiperazines, *Chromatographia*, 68(5/6), 453-458.

5. Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

- 5.1. **Filip Andrić**, Jelena Trifković, Aleksandra Radoičić, Jelena Kečkeš, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica, Characterisation of Serbian monofloral honey according to their amino-acid composition, *5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Prague, Czech Republic, November 1st-4th, 2011., Book of abstracts, p. 157. **ISBN 978-80-7080-795-8.**
- 5.2. K. B. Lazarević, J. Đ. Trifković, **F. Lj. Andrić**, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Characterization of serbian monofloral honey according to their physico-chemical parameters, *Conferentia Chemometrica*, September 2011, Sümeg, Hungary, Book of Abstracts P25. **ISBN 978-963-9970-15-1**
- 5.3. K. B. Lazarević, J. Đ. Trifković, **F. Lj. Andrić**, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Physico-chemical parameters in tracing regional differences of Serbian polyfloral honey, *Conferentia Chemometrica*, September 2011, Sümeg, Hungary, Book of Abstracts P40. **ISBN 978-963-9970-15-1**
- 5.4. **Andrić F.**, Ristivojević, P., Milojković Opsenica D., Tešić Ž., TLC determination of Abrahams Solvatochromic parameters for small organic molecules, *International Symposium for High-performance Thin-Layer Chromatography*, Basel, Switzerland, July 6-8, 2011., Book of abstracts p.85.
- 5.5. **Andrić F.**, Ristivojevic, P., Šolaja B., Milojkovic Opsenica D., Terzić N., Opsenica D., determination of lipophilicity of some newly synthesized potential antimalarials by the means of reversed-phase thin-layer chromatography. *International Symposium for High-performance Thin-Layer Chromatography*, Basel, Switzerland, July 6-8, 2011., Book of abstracts p.86.
- 5.6. **F. Andrić**, P. Ristivojević, J. Trifković, Ž. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Determination of the soil-water, octanol-water, and air-water partition coefficients for the twelve benzodiazepines by the means of the reversed-phase thin-layer chromatography, *The XXXIVst Symposium, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds*, Katowice - Szczyrk, Polland, June 8-10, 2011., Book of abstracts, p.

- 5.7. Lazarević B. Kristina, Trifković Jelena, **Andrić Filip**, Tešić Živoslav, Milojković-Opsenica Dušanka, Classification of Serbian honey according to their sugar profiles and physico-chemical characteristics, *1st FCUB ERA Workshop Food Safety and Health Effects of Food*, Belgrade, Serbia, January 31-February 1, 2011., Book of abstracts, p.20.
- 5.8. **Filip Andrić**, Jelena Vljaković, Jelena Trifković, Živoslav Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Determination of nine water-soluble food dyes by the means of reversed-phase planar chromatography, *2nd Workshop Specific methods for food safety and quality - Preevent to physical chemistry*, Belgrade, Serbia, September 21, 2010., Book of abstracts, p.
- 5.9. **Filip Andrić**, Jelena Vjaković, Jelena Trifković, Živoslav Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Determination of nine water-soluble food dyes by the means of reversed-phase planar chromatography, *2nd Workshop Specific methods for food safety and quality – Pre event to physical chemistry 2010*, Belgrade, Serbia, September 21, 2010., Book of abstracts, p.
- 5.10. Khalil Salem A. M. Shweshein, Petar Ristivojević, Aleksandra Radoičić, **Filip Andrić**, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković-Opsenica, Hydrophilic Interaction Planar Chromatography of Geometrical Isomers of Some Co(III) Complexes, *The XXXIVth SYMPOSIUM, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds*, Katowice - Szczyrk, May 24-27, 2010., Book of Abstracts, p.4.
- 5.11. J. Đ. Trifković, P. M. Ristivojević, **F. Lj. Andrić**, D. Andrić, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Relationship Between Structure and Thin-layer Chromatographic Lipophilicity Parameter of Some Arylpiperazines, *EUROANALYSIS 2009-European Conference on Analytical Chemistry, "The Impact of Analytical Chemistry on Quality of Life"*, September 2009., Innsbruck, Austria, Book of abstracts P121-B1.
- 5.12. I. Holclajtner-Antunović, U.B. Mioč, H. Zihnija, M. Pavlović, Lj. Damjanović, **F. Andrić** and M. Stojanović, Chemical characterization of byzantine pottery from Ras by Inductively Coupled Plasma Emission and Mass Spectrometry, *Science Meets Archaeology and Art History – Balkan Symposium on*

Archaeometry, Ohrid, Republic of Macedonia, September 18 –20, 2008., Book of abstracts, p.

- 5.13. J. Trifković, **F. Andrić**, M. Natić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Determination of hydrophobic parameters for some arylpiperazines by RP-TLC and PCA, *The XXXIst Symposium, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds*, Katowice - Szczyrk, Poland June 4-6, **2007**, Book of abstracts, p.40. **ISBN 978-83-925714-0-7**

6. Radovi saopšteneni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64):

- 6.1. Mirjana Stanković, Jelena Trifković, **Filip Andrić**, Nebojša Nedić, Ivo Slav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica, Determination of polyphenolic compounds in bee pollen from Serbia by UPLC-LTQ-orbitrap MS-MS, *50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Belgrade, Serbia, June 2012., Book of Abstracts P16. **ISBN 978-86-7132-048-1**
- 6.2. **Filip Lj. Andrić**, Petar M. Ristivojević, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Određivanje vazduh-vodaparticionih koeficijenata malih organskih molekula reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom, *49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Kragujevac, 13-14. maj 2011., AH-01, p.13. **ISBN 978-86-7132-042-9**
- 6.3. Marija Nikolić, Jelena Trifković, **Filip Lj. Andrić**, Aleksandra Radoičić, Dragan Vučović, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Planarna hromatografija hidrofilnih interakcija nekih anestetika, *48. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Novi Sad, 17-18. april 2010., AH-01, p.13. **ISBN 978-86-7132-042-9**
- 6.4. Aleksandra D. Radoičić, Jelena Đ. Trifković, **Filip Lj. Andrić**, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Planarna hromatografija hidrofilnih interakcija nekih amino-kiselina, *47. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Beograd, 21. mart 2009., AH-11, p.21. **ISBN 978-86-7132-031-2**

- 6.5. **Filip Lj. Andrić**, A. Radoičić, D.M. Milojković-Opsenica, Ž. Lj. Tešić, Određivanje partitionog koeficijenta zemljište-voda za neke mono- i polisupstituisane fenole primenom reversno-fazne tankoslojne hromatografije, 5. *Simpozijum hemija i zaštita životne sredine*, 27-30. maj 2008. A-17P, p. 58. **ISBN 978-86-7132-037-5**
- 6.6. **Filip Lj. Andrić**, Luka Novković, Jelena Trifković, Dušanka M. Milojković-Opsenica, LSER model hromatografskog ponašanja nekih 1-aralkil-4-arilpiperazina, 46. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Beograd, 21. februar 2008., AH 07, p.19. **ISBN 978-86-7132-035-1**
- 6.7. **Filip Lj. Andrić**, Jelena Đ. Trifković, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Živoslav Lj. Tešić, Optimizacija razdvajanja derivata nekih 1-arilpiperazina na tankom sloju silika-gela, 44. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Beograd, 06-07. februar, 2006., AH-P04, p.21. **ISBN 86-7132-027-8**

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Филип Андрић

број уписа 196

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

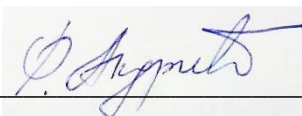
Одређивање подеоних коефицијената и солватохромних параметара малих

органичних молекула применом танкослојне хроматографије и хеометрије

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

Потпис докторанда

У Београду, 8. јануар 2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Филип Андрић

Број уписа 196

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Одређивање подеоних коефицијената и солватохромних параметара
малих органских молекула применом танкослојне хроматографије и
хеометрије

Ментор др Душанка Милојковић Опсеница

Потписани Филип Андрић

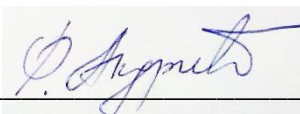
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 8. јануар 2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Одређивање подеоних коефицијената и солватохромних параметара малих

органичних молекула применом танкослојне хроматографије и хеометрије

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 8. јануар 2014.

