

Универзитет у Крагујевцу
Природно-математички факултет



Мр Мирјана Р. Цвијовић, дипломирани физикохемичар

*Исцртавање реакција хидролизе и комплексирања у
растворима алуминијум(III)-јона и неких флуорохинолона
методом електросреј-шандем масене спектрометрије*

Докторска дисертација

Крагујевац 2013.

Сваки човек је понекад ентузијаста. Код некої ентузијазам траје пола саћа, код некої месец дана. Успешни су они који су ентузијастии целої живоїа, јер шакав ентузијазам је по старим Грцима Божији дар.

*МОЈИМ РОДИТЕЉИМА и мојим пријатељима Лазаревићима
За сво сирљњење и оћромну подршку у шоку израде дисертације*

Велику захвалност дујем професорима: Др Предрају Ђурђевићу, Др Срећку Трифуновићу, Др Милени Јеликић Сћанков, Др Раћомиру Јелићу. Др Предрају Ђурђевићу се захваљујем за свесрдну помоћ у изради дисертације. Захвалност дујем Др Весни Килибарди, Др Тањи Васиљевић, Др Пиетру Тралдију, Др Тањи Анђелковић у чијим лабораторијама су узорци припремани и снимани. Захвалност дујем и асистентима Андрији Ђирићу, Ивану Јаковљевићу и доценту Др Љубинки Јоксовић за помоћ при изради дисертације.

Захвалност дујем Милоју Лазаревићу, за техничку обраду овој документа.

Индексациона страница докторске дисертације

I. Аутор

Име и презиме: Мирјана Р. Цвијовић

Датум и место рођења: 10. 06.1 970. Ужице

Садашње запослење: Ваљаоница бакра а.д. Севојно

II. Докторска дисертација

Наслов: Испитивање реакција хидролизе и комплексирања у растворима $Al(III)$ -јона и некох флуорохинолона методом електросперей-тандем масене спектрометрије

Број страница: 194

Број слика: 131 Број табела: 30 Број схема: 5 Број слика прилога: 6 Број табела прилога: 24

Број библиографских података: 161

Установа и место где је рад израђен: VMA–Београд; CNR–Падова; ПМФ -Крагујевац

Научна област (УДК): Неорганска хемија, 54. Ментор: професор др Предраг Ђурђевић

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 28. 12. 2011. године

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Одлука Наставно-научног већа ПМФ-а у Крагујевцу бр. 1050/XII-1 од 28. 12. 2011. године

– Одлука Стручног већа за Природно математичке науке, Универзитета у Крагујевцу бр.

234/4, од 9. 5. 2012. године.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: (Одлука бр. 1051/10 од 6. 7. 2011. године)

1. Др Предраг Ђурђевић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, ужа научна област аналитичка и неорганска хемија, ментор
2. Др Срећко Трифуновић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, ужа научна област неорганска хемија, члан
3. Др Милена Јеликић Станков, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду, ужа научна област хемија, члан

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: (Одлука бр. 510/XV-1 од 26.6. 2013. године)

1. Др Предраг Ђурђевић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, ужа научна област аналитичка и неорганска хемија, ментор
2. Др Срећко Трифуновић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, ужа научна област неорганска хемија, члан
3. Др Милена Јеликић Станков, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду, ужа научна област хемија, члан
4. Др Ратомир Јелић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област фармацеутска хемија, члан

Датум одбране дисертације: . . 2013. године

СПИСАК ОЗНАКА И СИМБОЛА

HQ^0	флуорохинолон, неутрални облик
$Q^- = L^-$	анјонски облик хинолона
$H_2Q^\pm = LH_2^+$	диполарни јон
$HQ^+ = LH^+$	катјонски облик хинолона
+HV	потенцијал капиларе
$k_{11}, k_{12}, k_{21}, k_{22}$	микорконстанте
K_1 и K_2	макроконстанте дисоцијације флуорохинолона
E^{\ominus}/V (Al^{3+}/Al)	редокс потенцијал
E_c	јачина електричног поља у простору око врха капиларе
V_c	потенцијал
r_c	спољни радијус капиларе
d	удаљеност између електрода
E_p	потенцијална енергија
V	разлика потенцијала (напон)
z	наелектрисање јона
E_k	кинетичка енергија
m	маса јона
v	брзина јона
L	дужина путање, дужине прелета јона у цеви
t	врема прелета јона
k	константа пропорционалности зависна од карактеристика инструмента
Φ	основни потенцијал
λ, σ и γ	тежински фактори
r_0	бројчана константна
Φ_0	примењено електрично поље (комбинација RF и DC)
ν	примењена фреквенца у херцима
E_{coll}	колизиона енергија
m_{p^+}	прекурсор (родитељ) јон
m_{d^+}	продукт (ћерка) јон
m_n	један или више неутралних врста (неутрални губитак)
AB^+	јон који се судара са неутралним врстама M и раскида везу
$h\nu$	фотон
M	неутрални молекул
m/z	однос масе и наелектрисања
$M^{+\bullet}$	радикал јон
A	хетеро атом
X	водоник или халогени елемент
V	запремина додате базе
F_c	функција циља
z_r	жељена (мерена, експериментално добијена) вредност излаза
Y_r	вредност излаза (output) r-тог излазног неурона добијена помоћу ANN рачунски
X	матрица-вектор улазних варијабли
Y	матрица-вектор излазних варијабли
W_{ih}	матрица тежинских коефицијената у гранама између улазног и скривеног слоја

w_{ho}	матрица тежинских коефицијената у гранама између скривеног слоја и излаза
α_j	укупан улаз у неурон j у скривеном слоју
x_i	i -та улазна варијабла
w_{ij}	тежински коефицијент везе између неурона i и j
N_i	број улазних неурона
N_h	број неурона у скривеном слоју
$g(x)$	трансфер функција
r_j	r -ти излаз из неуронске мреже
P	број улазно/излазних парова за обучавање
δ_r	вектор грешке излазних неурона
$y_{calc r}$	вредности излаза израчунате преко ANN
$y_{r means}$	мерене вредности (вредности добијене експериментално)
h	ознака за скривени слој
q	индекс који означава неки од неурона скривеног слоја
m	број излазних неурона
δ_q	вектор грешке скривених неурона
$x_q(h)$	излаз сваког скривеног неурона q
$w_{ij}(t)$	тежински коефицијент у итерацији t између неурона i и j
$w_{ij}(t+1)$	тежински коефицијент у итерацији $t+1$ између неурона i и j
η	брзина учења (брзина конвергенције ка глобалном минимуму)
δ_j	грешка процесног елемента j
x_i	вредност output-а процесног елемента i
μ	момент, који помаже мрежи да превазиђе локални минимум
$w_{ij}(t-1)$	тежински фактор две итерације
RES-MS	релативни интензитети јона у ESI MS спектрима
i_{ALL} и i_{ALL2}	интензитети свих јона који потичу од ALL и ALL ₂ јона
i_L	интензитет лиганда у свим врстама
REQIL	молски удели компонената на основу потенциометрије
β	константа стабилности комплекса
Z	средњи протонски број
RF	напон на прстенастој електроди
\Rightarrow	стрелица за премештање електронског пара
\rightarrow	једнострука стрелица за пренос појединачних електрона
API	јонизација при атмферском притиску
CID	сударом индукована дисоцијација
CAD	сударом активирана дисоцијација
ECD	дисоцијација заробљавањем електрона
ETD	електрон трансфер дисоцијација
NETD	дисоцијација негативним електронским преносом
MALDI	јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом (отпаравањем) из матрикса
Nd: YAG	неодијум - итријум алуминијум гарант
ESI	електроспреј јонизација
TOF	време прелета (time of flight)
TLF	време кашњења фокусирања (time-lag focusing)

MS/MS	тандем масена спектрометрија (масена спектрометрија/масена спектрометрија)
MS ⁿ	ознака за масену спектрометрију n-тог степена
ESI Q MS	електроспреј квадрупол масени спектрометар
LC/MSD	течно масена спектрометрија
Cipro	ципрофлоксацин
Moxi	моксифлоксацин
Flero	флероксацин
AAN	вештачка неуронска мрежа (Artificial Neural Network)
MSEE	средња квадратна грешка (mean summed squared error)
SIM	мониторинг селектованог јона (selected ion monitoring)
SIR	снимање селектованог јона (selected ion recording)
TIC	укупна јонска струја, сума интензитета свих детектованих јона, (Total Ion Current)
ECM	енергија центра масе
Pattern	Схема (шаблон) маса пикова у спектру, која је последица изотопске расподеле елемената према релативној природној изотопској заступљености елемената
Parent ion	јон који у реакцији, CID-ом, једномолекуларним разлагањем или променом укупног наелектрисања даје продукт јоне; по својој природи сврстава се у прекурсор јоне
Charge state	реципрочна вредност $\Delta m/z$ издвојеног јона у изотопској расподели јона у envelop-и.
Phenylum ion	јон на m/z 77 који настаје у масеним спектрима једињења са фенил групом
Isotopic envelope	изотопска овојница која обухвата више пикова тј изотопска дистрибуција, експериментално добијених пикова, где је први пик моноизотопски пик, а пик у средини envelope одговара пику са "average" масом
Plume	брз, експлозиван фазни прелаз из чврстог у гасно стање проузрокован дејством ласерског зрака на подлогу у MALDI MS

СПИСАК СЛИКА И СХЕМА

Слика 1. Пут јона у масеном спектрометру	23
Слика 2. Основни делови масеног спектрометра	24
Слика 3. Принцип ESI MS спектрометрије	25
Слика 4. Механизам електроспреја	27
Слика 5. ESI MS спектар воденог раствора Na, K, Rb, и Cs	29
Слика 6. Схематски приказ MALDI TOF инструмент	30
Слика 7. Аблација кристала и формирање агрегата састављених од матрице и анализита	34
Слика 8. Путања јона у трапу и заробљавање јона	34
Слика 9. Путања јона у TOF анализатору	35
Слика 10. Путања јона у квадруполу	35
Слика 11. Принцип тандем (MS/MS) спектрометрије	37
Слика 12. Изглед масеног спектра	39
Слика 13. Општа структура хинолона	43
Слика 14. Нумерација атома у хинолонском прстену	44
Слика 15. Структурна формула флероксацина	46
Слика 16. Структурна формула моксифлоксацина	47
Слика 17. Структурна формула ципрофлоксацина	48
Слика 18. ESI MS спектри, раствора AlCl_3 концентрације $5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, pH=4,20, разичити напони на конусу а) 10 V, б) 50 V и с) 100 V	65
Слика 19. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,814	66
Слика 20. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=3,594	66
Слика 21. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=3,192	67
Слика 22. ESI MS спектар $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,35	67
Слика 23. ESI MS спектар $5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,23	68
Слика 24. ESI MS спектар $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,18	68
Слика 25. ESI MS спектар раствора AlCl_3 , $C_{\text{Al}^{3+}}=5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $C_{\text{Cl}^-}=150 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, pH=4,05	69
Слика 26. ESI MS спектар $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=3,30, након 30 дана	69
Слика 27. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=2:1$, pH=4,16, tube lens 15 V	70
Слика 28. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=2:1$, pH=4,16, tube lens-20 V	71
Слика 29. ESI MS спектар флероксацина, молекулски јон m/z 370, pH=4,26, позитиван мод	72
Слика 30. ESI MS спектар раствора флероксацина, 368 m/z , pH=4,26, негативни мод	72
Слика 31. MS/MS јона 368, $E_{\text{coll}}=20\%$	73
Слика 32. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$, pH=4,03, позитивни мод	74
Слика 33. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$, pH=4,03, негативни мод	74
Слика 34. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$, pH=5,29 позитивни мод	75
Слика 35. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$, pH=5,29, негативни мод	75
Слика 36. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$ pH=6,20 позитивни мод	76
Слика 37. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:3$, pH=6,20 негативни мод	76
Слика 38. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:1,5$, pH=3,50 позитивни мод	77
Слика 39. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:1,5$, pH=4,14 позитивни мод	77
Слика 40. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=1:1,5$, pH=5,64 позитивни мод	78
Слика 41. ESI MS спектар раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=2:1$ pH=3,05, позитивни мод	78
Слика 42. Gauss-ов приказ спектра раствора $C_{\text{Al}^+}:C_{\text{Flero}}=2:1$, pH=3,05	79

Слика 43. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 2:1$, $pH=4,06$, позитивни мод	79
Слика 44. Gauss-ов приказ спектра раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 2:1$, $pH=4,06$	80
Слика 45. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 2:1$, $pH=5,06$, позитивни мод	81
Слика 46. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:1$, $pH=5,02$, позитивни мод	81
Слика 47. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:3$, $pH=5,04$, позитивни мод	82
Слика 48. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:2$, $pH=5,03$, позитивни мод	82
Слика 49. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 2:1$, $pH=4,96$, позитивни мод	83
Слика 50. Модел синапси у људском мозгу и структура вештачког неурона	84
Слика 51. Структура неуронске мреже са три улаза и пет излаза	86
Слика 52. Дијаграм грешки учења и грешки тестирања за комплекс m/z 719	87
Слика 53. Дијаграм грешки учења и грешки тестирања за комплекс m/z 763	87
Слика 54. Дијаграм рачунских и експерименталних вредности после 4000 циклуса учења за комплекс m/z 719.....	88
Слика 55. Дијаграм рачунских и експерименталних вредности после 2100 циклуса учења за комплекс m/z 763	88
Слика 56. Zoom scan јона 255, $\Delta=0,3$, (255,06, 255,36, 255,71)	89
Слика 57. Zoom scan јона 382, $\Delta=0,5$ (382,13, 382,64, 383,11)	90
Слика 58. Zoom scan јона 763, $\Delta=1$, (763,30, 764,29, 765,28)	90
Слика 59. Zoom scan јона 360, $\Delta=0,5$, (360,14, 360,65, 361,15)	91
Слика 60. Изотопски pattern протонованог јона флероксацина m/z 370 и јона комплекса m/z 382	91
Слика 61. Zoom scan јона 215, $\Delta=0,5$, (215,47, 216,00, 216,47)	92
Слика 62. Zoom scan јона 719, $\Delta=1,0$ (719,33, 720,30, 721,30).....	92
Слика 63. MS/MS спектар parent јона 255, $E_{coll} = 25\%$	93
Слика 64. MS/MS спектар parent јона 255, $E_{coll} = 30\%$	94
Слика 65. MS/MS/MS спектар јона 255, $E_{coll} = 25\%$, јона 246, $E_{coll} = 30\%$	94
Слика 66. MS/MS спектар parent јона 429,90, $E_{coll} = 78\%$	95
Слика 67. MS/MS parent јона 215,50, $E_{coll} = 55\%$	95
Слика 68. MS/MS јона 763, $E_{coll} = 30\%$	96
Слика 69. MS/MS parent јона 763, $E_{coll} = 35\%$	96
Слика 70. MS/MS спектар parent јона 382, $E_{coll} = 30\%$	96
Слика 71. maLDI спектар подлоге	97
Слика 72. maLDI спектар флероксацина у смеси вода:метанол =30:70, $pH=4,90$	98
Слика 73. maLDI спектри: а) флероксацин у смеси вода: метанол, $pH=4,90$ и б) флероксацин у води	98
Слика 74. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:3$, $pH=3,85$	99
Слика 75. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:3$, $pH=4,50$	100
Слика 76. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Flero} = 1:3$, $pH=5,42$, димер	100
Слика 77. ESI и MS/MS спектри моксифлоксацина	101
Слика 78. ESI MS спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:3$, $pH=5,60$, $C_{Al} = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$	102
Слика 79. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:1$, $pH=4,40$	103
Слика 80. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:1$, $pH=5,90$	104
Слика 81. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:3$, $pH=5,10$	104
Слика 82. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:3$, $pH=5,10$	105
Слика 83. maLDI спектар раствора $C_{Al^+}:C_{Moxi} = 1:3$, $pH=5,59$	105
Слика 84. MS/MS спектар јона 332, $E_{coll} = 40\%$	106

Слика 85. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, $pH=5,26$	106
Слика 86. Zoom scan јона 1056	107
Слика 87. Zoom scan јона 231	107
Слика 88. MS/MS спектар parent јона 346, $E_{coll}=35,0\%$	108
Слика 89. MS/MS спектар parent јона 687, $E_{coll}=30,0\%$	108
Слика 90. MS/MS спектар parent јона 687, $E_{coll}=35,0\%$	109
Слика 91. MS/MS спектар parent јона 687, $E_{coll}=40,0\%$	109
Слика 92. MS/MS спектар parent јона 716, $E_{coll}=35,0\%$	110
Слика 93. MS/MS спектар parent јона 993, $E_{coll}=30,0\%$	110
Слика 94. MS/MS спектар parent јона 1057, $E_{coll}=35,0\%$	111
Слика 95. MS/MS/MS спектар parent јона 687 $E_{coll}=30,0\%$	111
Слика 96. MS/MS спектар parent јона 688, $E_{coll}=40,0\%$	112
Слика 97. MS/MS/MS спектар 688 јона $E_{coll}=40,0\%$; јона 660 $E_{coll}=80,0\%$	112
Слика 98. MS/MS/MS спектар 688 јона $E_{coll}=40,0\%$; јона 660 $E_{coll}=100,0\%$	113
Слика 99. MS/MS спектар parent јона 700, $E_{coll}=30,0\%$	113
Слика 100. MS/MS/MS спектар 700 јона $E_{coll}=30,0\%$ и јона 630, $E_{coll}=45\%$	114
Слика 101. maLDI спектари раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, различито pH	115
Слика 102. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, $pH=5,10$, различите концентрације компонената	115
Слика 103. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, $pH=4,10$, димер	116
Слика 104. SIM мод за доказ циљаног јона m/z 96 и јона m/z 132	119
Слика 105. Изотопски pattern јона m/z 132, SIM мод	120
Слика 106. Изотопски pattern јона m/z 132, добијен коришћењем softwera Xcalibur	120
Слика 107. ^{27}Al NMR спектри раствора $AlCl_3$, на различитим pH , $C_{Al}=50mmol/dm^3$	123
Слика 108. Титрационе криве раствора $AlCl_3$, добијене на основу две различите титрационе процедуре	124
Слика 109. Изотопски pattern флероксацина	127
Слика 110. Могућа структура комплекса типа AlL_2 у систему Al-флероксацин.	128
Слика 111. Изотопски pattern јонске врсте AlL_2 , m/z 763	130
Слика 112. Хистограм релативних интензитета јона различитих m/z вредности vs концентрациони односи Al (III)јон-флероксацин	135
Слика 113. 3D површ релативне заступљености комплекса m/z 719 у функцији од pH и концентрације	135
Слика 114. 3D површ релативне заступљености комплекса m/z 763 у функцији од pH и концентрације	136
Слика 115. Изотопски pattern моксифлоксацина	137
Слика 116. Могућа структура комплекса типа AlL_2 у систему Al-моксифлоксацин	138
Слика 117. Изотопски pattern јонске врсте AlL_2 , m/z 827	139
Слика 118. Изотопски envelope у систему алуминијум моксифлоксацин	140
Слика 119. Изотопски pattern ципрофлоксацина	141
Слика 120. Могућа структура комплекса AlL_2 у систему Al-ципрофлоксацин	142
Слика 121. Изотопски pattern јонске врсте AlL_2 , m/z 687	142
Слика 122. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:3$	145
Слика 123. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:1,5$	146
Слика 124. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 2:1$	146
Слика 125. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, концентрација компонената $10^{-5} mol/dm^3$	147

Слика 126. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, концентрација компонената 10^{-4} mol/dm^3	147
Слика 127. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Moxi} = 1:3$, концентрација компонената 10^{-5} mol/dm^3	148
Слика 128. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Moxi} = 1:3$, концентрација компонената 10^{-4} mol/dm^3	148
Слика 129. Дистрибуциони дијаграм за моксифлоксацин	149
Слика 130. Дистрибуциони дијаграм за ципрофлоксацин	149
Слика 131. Дистрибуциони дијаграм за флероксацин	150
Схема 1: Реакциона путања у MALDI MS	31
Схема 2: Равнотеже у раствору флуорохинолона	125
Схема 3: Фрагментациона путања (m/z 255) Al-флероксацин комплекса у MS^2 и MS^3 експерименту	131
Схема 4: Фрагментациона путања (m/z 763) Al-флероксацин комплекса у MS^2 експерименту	132
Схема 5: Фрагментациони путања (m/z 687) Al-ципрофлоксацин комплекса у MS^2 и MS^3 експерименту	143

СПИСАК СЛИКА ПРИЛОГА

Слика 1 П: ESI MS спектри $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ AlCl}_3$ раствор, $pH=3,594$; 50 V; утицај мобилне фазе	162
Слика 2 П: TIC хроматограм AlCl_3 раствора	163
Слика 3 П: ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1,3:1$, $pH=4,88$, позитивни мод централна тачка.....	163
Слика 4 П: ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1,3:1$, $pH=4,88$, негативан мод, централна тачка.....	164
Слика 5 П: MALDI спектри: а) комплекс где је метал у великом вишку $C_{Al}:C_{Flero} = 10 :1$, б) спектар подлоге	164
Слика 6 П: MALDI спектар $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, $pH = 5,10$	164

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1: Јони одабраних класа анализата, формирану примарном и секундарном јонизацијом.....	32
Табела 2: Природни изотопи, њихова заступљеност и масе	43
Табела 3: Растворљивост флуорохинолона	44
Табела 4: рК вредности флуорохинолона	45
Табела 5: Енергија јонизације, коефицијент електронегативности и редокс потенцијал алуминијума	49
Табела 6: Најзаступљеније хемијске врсте у раствору AlCl_3 , ESI MS; позитиван мод	54
Табела 7: MS подаци за Al(III)-јон-понцирин комплексе типа $[\text{Al(III)}(\text{флавоноид} -\text{H})_2]^+$	55
Табела 8: Инструментални параметри у ESI извору при испитивању хидролизе	61
Табела 9: Инструментални параметри у ESI извору при испитивању комплексирања	61
Табела 10: Инструментални параметри при снимању MALDI спектра	61
Табела 11: Састави раствора при изучавању хидролизе	73
Табела 12. Састави раствора и рН вредности за ESI MS спектре.....	99
Табела 13: Састави раствора Al(III)-јона и флероксацина за различите рН вредности.....	99
Табела 14: Састави раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина за различите рН вредности ..	103
Табела 15: Састави раствора Al (III)-јона и ципрофлоксацина за различите рН вредности	114

Табела 16: Идентификоване врсте у основном спектру, раствор моксифлоксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,60$	117
Табела 17: Идентификоване врсте у растворима AlCl_3 , концентрације $0,1-1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,20$	118
Табела 18: Подаци из базе података за хидролитичке комплексе алуминијума	124
Табела 19: Идентификоване врсте у раствору флероксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,26$, позитиван мод	126
Табела 20: Идентификоване врсте у раствору флероксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,26$, негативан мод	127
Табела 21: Идентификоване врсте у растворима Al(III) -јона и флероксацина, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, ESI MS спектрометријом	129
Табела 22: Идентификоване врсте у растворима Al(III) -јона и флероксацина, $C_{\text{Al}}:C_{\text{Flero}}=1:3$, концентрација 10^{-4} mol/dm^3 , $\text{pH} 3,85-5,50$, maLDI спектрометријом	130
Табела 23: Поређење релативних интензитета AlI и AlI_2 комплекса добитених ESI MS и потенциометријским мерењима.....	134
Табела 24: Идентификоване врсте у основном спектру, раствор моксифлоксацина $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,60$	137
Табела 25: Идентификоване врсте у растворима Al(III) -јона и моксифлоксацина, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, ESI MS спектрометријом	138
Табела 26: Идентификоване врсте у растворима Al(III) -јона и моксифлоксацина, $C_{\text{Al}}:C_{\text{Мокси}}$ од 1:1 до 1:3, концентрације 10^{-4} mol/dm^3 , maLDI спектрометријом.....	139
Табела 27: Идентификоване врсте у раствору ципрофлоксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,60$	141
Табела 28: Идентификоване врсте у раствору Al(III) -јона и ципрофлоксацина, ESI MS спектрометријом	142
Табела 29: Идентификоване врсте у растворима Al(III) -јона и ципрофлоксацина, $C_{\text{Al}}:C_{\text{Cipro}}=1:3$, концентрације 10^{-4} mol/dm^3 , maLDI спектрометријом	144
Табела 30: Константе стабилности коришћене у прорачуну специјације (преузете из литературе)	145

СПИСАК ТАБЕЛА ПРИЛОГА

Табела 1П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{cipro}}=1:3$, $\text{pH}=4,99$, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ у смеси вода и метанол	165
Табела 2П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{cipro}}=1:3$, $C_{\text{Al}}=10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=5,26$	165
Табела 3П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{flero}}=2:1$, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,26$	166
Табела 4П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{flero}}=2:1$, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=5,06$	166
Табела 5П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{flero}}=1:1$, $C_{\text{Al}}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=5,06$	166
Табела 6П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,027 \text{ mM}$, $\text{pH}=3,192$, 50V	167
Табела 7П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,027 \text{ mM}$, $\text{pH}=3,594$, 50V	168
Табела 8П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,027 \text{ mM}$, $\text{pH}=3,594$, 50V	169
Табела 9П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,1 \text{ mM}$, $\text{pH}=4,35$, 50V	170
Табела 10П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,5 \text{ mM}$, $\text{pH}=4,203$, 50V	172
Табела 11П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=1,0 \text{ mM}$, $\text{pH}=4,184$, 50V	172
Табела 12П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{\text{Al}}=0,027 \text{ mM}$, $\text{pH}=4,814$, 50V	173

Табела 13П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $50V$	174
Табела 14П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,192$, $10V$	175
Табела 15П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,192$, $100V$	176
Табела 16П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $10V$	177
Табела 17П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $100V$	178
Табела 18П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 4,814$, $100V$	179
Табела 19П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 4,814$, $10V$	180
Табела 20П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=1,0mM$, $pH= 4,184$, $50V$	181
Табела 21П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,5mM$, $pH= 4,203$, $100V$	182
Табела 22П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,1mM$, $pH= 4,35$, $10V$	183
Табела 23П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=0,1mM$, $pH= 4,35$, $100V$	184
Табела 24П. Хидролиза алуминијум(III)-јона, $C_{Al}=1,0 mM$, $pH= 4,184$, $10V$	185

САДРЖАЈ

Списак ознака и симбола	
Списак слика и схема	
Списак табела	
ИЗВОД	17
SUMMARY	19
УВОД	21
1. ОПШТИ ДЕО	23
1.1. Масена спектрометрија	23
1.1.1. Основни делови инструмента	23
1.1.2. Типови јонизације	26
1.1.3. Настајање наелектрисаних капљица на врху капиларе у ESI извору	27
1.1.4. Смањење наелектрисаних капљица насталих електроспрејом	27
1.1.5. Гасно фазне реакције	28
1.1.6. Утицај интерференција на интензитет сигнала	28
1.1.7. Параметри у ESI битни за анализу	29
1.1.8. Извор јонизације – MALDI	29
1.1.9. Анализатори у масеној спектрометрији	32
1.1.9.1. Јон трап анализатор	33
1.1.9.2. TOF анализатор	34
1.1.9.3. Квадрупол анализатор	35
1.1.10. Детектори у масеној спектрометрији	36
1.1.10.1. Детектори у MALDI TOF масеној спектрометрији	36
1.1.11. Тандем масена спектрометрија	37
1.1.11.1. Фрагментација у тандем масеној спектрометрији	38
1.1.12. Масени спектар	39
1.1.13. Конституенти масеног спектра	39
1.1.14. Интерпретација масених спектра	40
1.1.14.1. Типични јони	40
1.1.14.2. Присуство молекулског јона	41
1.1.14.3. Типични неутрални „губици“	41
1.1.14.4. Интерпретација масеног спектра непознатог једињења	41
1.1.14.5. Одређивање наелектрисања	42
1.1.15. Изотопна супституција у масеној спектрометрији	42
1.2. Хинолони	43
1.2.1. Флуоровани хинолони	44
1.2.1.1. Физичко-хемијске особине флуорохинолона	45
1.2.2. Флероксацин–опште особине	46
1.2.3. Моксифлоксацин–опште особине	47
1.2.4. Ципрофлоксацин–опште особине	47
1.3. Алуминијум	48
1.3.1. Физичка и хемијска својства алуминијума(III)-јона	49
1.3.2. Типичне реакције алуминијум(III)-јона: хидролиза и комплексирање	49
1.3.3. Токсичне особине алуминијума	51
1.4. Литературни преглед	53

1.4.1. Изучавање хидролизе Al(III)-јона ESI MS техником	53
1.4.2. Изучавање комплексирања флуорохинолона, хинолона, флавоноида са Al(III)-јоном ESI MS техником	54
1.4.3. Изучавање комплексирања флуорохинолона, флавоноида и других једињења са металним јонима MALDI техником	56
2. ЦИЉ И ЗАДАТАК РАДА	58
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	59
3.1. Реагенси и раствори	59
3.1.1. Реагенси	59
3.1.2. Основни раствори	59
3.1.3. Радни раствори	60
3.2. Инструменти	60
3.3 Експериментални поступак	62
3.4. Експериментални резултати	64
3.4.1. ESI MS спектри хидролитичких врста Al(III)-јона	64
3.4.2. Параметри који утичу на ESI MS спектре при изучавању хидролизе	64
3.4.3. ESI MS спектри раствора Al(III)-јона и флуорохинолона	70
3.4.4. Утицај инструменталних параметара при снимању ESI MS спектра	70
3.4.5. Утицај експерименталних услова при снимању ESI MS спектра	71
3.4.6. ESI MS спектри флероксацина у позитивном и негативном моду	72
3.4.7. ESI MS спектри раствора Al(III)-јона и флероксацина позитивни и негативни мод	73
3.4.7.1. Основне карактеристике спектралних линија-Gauss-ова расподела	80
3.4.8. Примена неуронских мрежа на комплексирање алуминијума и флуорохинолона	83
3.4.9. Zoom Scan јона у систему алуминијум флероксацин	88
3.4.10. Тандем масена спектрометрија	92
3.4.11. MS/MS експеримент јона у раствору флероксацина и Al(III)-јона	95
3.4.12. maLDI спектри	97
3.4.13. maLDI спектри подлоге и флероксацина	97
3.4.14. maLDI спектри комплекса Al(III)-јона и флероксацина	99
3.4.15. ESI MS спектри раствора моксифлоксацина	101
3.4.16. ESI MS спектри раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина	102
3.4.17. maLDI спектри раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина	103
3.4.18. ESI MS спектри раствора ципрофлоксацина	106
3.4.19. ESI MS спектри раствора Al(III)-јона и ципрофлоксацина	106
3.4.20. Zoom scan јона у систему алуминијум-ципрофлоксацин	107
3.4.21. Тандем масена спектрометрија јона у раствору Al(III)-јона и ципрофлоксацина (10^{-5} mol/dm ³)	108
3.4.22. MS/MS/MS експеримент јона у раствору Al(III)-јона и ципрофлоксацина ...	111
3.4.23. Тандем масена спектрометрија јона у раствору Al(III)-јона и ципрофлоксацина, (10^{-4} mol/dm ³)	112
3.4.24. maLDI спектри Al(III)-јона и ципрофлоксацина	114
4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	117
4.1. Проучавање хидролизе Al(III)-јона масеном спектрометријом	117
4.2. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и флуорохинолона масеном спектрометријом	125

4.2.1. Систем алуминијум-флероксацин	126
4.2.1.1. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и флероксацина ESI MS спектрометријом	127
4.2.1.2. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и флероксацина mALDI спектрометријом	129
4.2.1.3. Квантитативна специјација у растворима Al(III)-јона и флероксацина	133
4.2.1.4. Примена модела вештачких неуронских мрежа на проучавање комплексирања Al(III)-јона и флероксацина	135
4.2.2. Систем алуминијум-моксифлоксацин	136
4.2.2.1. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и моксифлоксацина ESI MS спектрометријом	137
4.2.2.2. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и моксифлоксацина mALDI спектрометријом.....	139
4.2.3. Систем алуминијум-ципрофлоксацин	141
4.2.3.1. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и ципрофлоксацина ESI MS спектрометријом.....	141
4.2.3.2. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и ципрофлоксацина mALDI спектрометријом	144
4.3. Дистрибуциони дијаграми	144
5. ЗАКЉУЧАК	151
6. РЕФЕРЕНЦЕ	154
7. ПРИЛОГ	162
8. БИОГРАФИЈА	186
9. СПИСАК РАДОВА	187
10. РАДОВИ ПРОИСТЕКЛИ ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	193

ИЗВОД

Предмет ове дисертације је проучавање реакција хидролизе алуминијум(III)-јона и реакција комплексирања алуминијум(III)-јона и флуорохинолона (HQ) (флероксацина, ципрофлоксацина и моксифлоксацина). У оквиру дисертације одређена је специјација у растворима алуминијум(III)-јона и растворима алуминијум(III)-јона и флуорохинолона (HQ) са циљем бољег разумевања фармако и токсикокинетике флуорохинолонских антибиотика у присуству лекова на бази алуминијума (антациди, вакцине, дијализатни раствори). Проучавања су вршена електроспреј масеном спектрометријом, (ESI MS), тандем масеном спектрометријом (MS/MS) и масеном спектрометријом, где је јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из матрикса (MALDI MS).

Проучавањем наведених система, поменути експерименталним техникама и компјутерском обрадом података, коришћењем програма Hyss 2006 и модела вештачких неуронских мрежа (AAN) добијени су следећи резултати:

При проучавању хидролизе алуминијума врсте идентификоване у растворима алуминијум(III)-јона, концентрације 0,03 до 5,0 mmol/dm³, су врсте са наелектрисањем +1, +2 и +3, формиране у опсегу рН од 3-6. Мономерне и димерне врсте су доминантне до рН 3,8. ESI MS спектри указују на формирање малих полимерних врста (Al₃-Al₅) на рН 4,8. Са повећањем рН и концентрације алуминијум(III)-јона идентификују се средњи полимери (Al₆-Al₁₀). Даљим повећањем рН и концентрације алуминијум(III)-јона настају виши полимери (Al₁₁-Al₁₃). Виши полимери су привремене врсте које постоје релативно кратко време након припреме раствора. На рН око 6,4 почиње формирање талоба. Резултати добијени ESI масеном спектрометријом су у сагласности са резултатима добијеним ²⁷Al NMR спектроскопијом и потенциометријом.

Изглед масених спектра зависи од инструменталних параметара као што су брзина протока мобилне фазе, температура јонског извора, напон на капилари и конусу. Највише утицаја на изглед масеног спектра има напон на конусу. При напону на конусу до 50 V добијено је најбоље слагање врста идентификованих потенциометријски и врста добијених масеном спектрометријом. Изучавани су и утицаји експерименталних услова на хидролитичке процесе: рН раствора, старење раствора, утицај мобилне фазе, утицај концентрације алуминијум(III)-јона, утицај контра јона. Са старењем раствора број врста у спектру се знатно смањује. Идентификује се само неколико сигнала у спектру који потичу од врста: [Al(OH)₂]⁺, [Al₆(OH)₁₃]⁵⁺, [Al₄(OH)₉]³⁺ и [Al₅(OH)₁₂]³⁺.

ESI MS спектри Al(III)-јона и HQ раствора су снимани у позитивном моду у опсегу од *m/z* 50 до 2000. Сем калибрације инструмент је фино подешен раствором једне компоненте (лиганда), са циљем оптимизације инструменталних параметара. У ESI MS спектрима као доминантне врсте за концентрационе односе (метал: лиганд) од 2:1 до 1:3, у рН опсегу од 3,0 до 6,0 идентификоване су мононуклеарне врсте: AlL²⁺, AlL₂⁺ и AlL₃⁰. Доминантне врсте ESI MS спектрометријом идентификоване у растворима Al(III)-јона и флероксацина су на следећим *m/z*: 193,52; 255,20; 719,62; 763,23; у растворима Al(III)-јона и моксифлоксацина на *m/z* 216,81; 414,22; 827,31; 1266,88; у растворима Al(III)-јона и ципрофлоксацина на *m/z* 249,05; 687,75; 1040,33; 1056,15. Мешовити протоновани и хидроксо комплекси су идентификовани и при нижим и при вишим рН вредностима, али полимерне врсте нису нађене у ESI MS спектрима.

Тандем масена спектрометрија, MSⁿ је коришћена да би се добио увид у структуру Al(III)-јон-HQ комплекса, тј. да би се утврдила највероватнија везивна места алуминијума у комплексима. У MSⁿ експериментима су на parent јоне примењиване високе колизионе енергије (80-100% од максималног rf voltage) што указује да су комплекси Al(III)-јон-флуорохинолони веома стабилни. На стабилност ових комплекса указује и чињеница да у току фрагментације региструју само губици малих неутралних молекула, нема кидања везе алуминијум-лиганд.

На основу m/z спектра су идентификоване врсте која су потврда моноклеарних врста идентификованих у ESI MS спектрима, што указује да ове врсте заиста постоје у раствору и да нису последица гасно-фазних реакција. У m/z спектрима идентификоване су и полимерне врсте, означене као $[2Al^{3+}+5L^{-}]^{+}$. Ове врсте највероватније потичу од димерног језгра Al_2L_2 , које се формира у раствору, а кластери са више депротонисаних лиганда се формирају у гасној фази. Врста означена као $[2Al^{3+}+5L^{-}]^{+}$ се идентификује у систему флероксацина и Al(III)-јона на m/z 1894,77, у систему моксифлоксацина и Al(III)-јона на m/z 2054,36 и у систему ципрофлоксацина и Al(III)-јона, на m/z 1703,88.

У m/z спектрима се идентификује и AlL_3 врста, која је најчешће адукт са јоном натријума или калијума.

Квантитативном специјацијом дошло се до закључка да је заступљеност молских удела комплексних врста, у систему Al(III)-јон-флероксацин, i_{763}/i_{719} слична као код слободних лиганда i_{370}/i_{326} . Релативни интензитети за најзаступљеније врсте AlL^{2+} и AlL_2^{+} добијени на основу ESI MS спектра са променом рН и релативни интензитети добијени на основу потенциометријских мерења су у прилично доброј сагласности. Разилажења која постоје између ових података су последица ESI пертурбација у раствору. Идентификација ових пертурбација је веома важна јер се на основу њих процењује колико ESI MS спектри реално одсликавају стање равнотеже у раствору.

SUMMARY (Abstract)

This dissertation comprises investigation of hydrolysis aluminum(III)-ion and aluminum(III)-ion and fluoroquinolones (FQLs) family members (floxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin) complexation reactions. Within present study it is determined speciation in solutions of aluminum(III)-ion and in solutions of aluminum(III)-ions and fluoroquinolones (FQLs) in aim to better understand pharmacotherapy and toxicokinetics of fluoroquinolones antibiotics in the presence of aluminum-based drugs (antacids, vaccines, solutions for dialysis). So the solutions were investigated by electrospray mass spectrometry (ESI MS), tandem mass spectrometry (MS/MS) and mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI MS).

Investigation of these systems, using the above mentioned experimental techniques and computer processing data by using Hyss 2006 software and artificial neural network (AAN) model gave the following results:

The hydrolysis of aluminum(III)-ion have been investigated in the solutions of concentration level 0,03 to 5,0 mmol/dm³, in the pH range 3 to 6. The species with electric charge +1, +2 and +3, formed in this conditions. Monomeric and dimeric species were dominant until the pH value of 3,8. ESI MS spectra indicate the formation of small polymeric species (Al₃-Al₅) at pH 4,8 value. With the increase pH and concentrations values of aluminum(III)-ion, it was identified intermediate polymers (Al₆-Al₁₀). With further increase in pH and the concentration of aluminum(III)-ion, higher polymers (Al₁₁-Al₁₃) were generated. Higher polymers are species that are relatively short period of time existing. At a pH of about 6,4 the sludge formed. The results obtained by ESI MS spectra are in good agreement with the results obtained by ²⁷Al NMR spectroscopy and by potentiometry.

The mass spectra generally depend on the instrumental parameters such as: flow rate of mobile phase, ion source temperature, capillary voltage and cone voltage. The most influence on the appearance of the mass spectrum is the cone voltage. If the cone voltage is 50 V it obtained the best agreement between the potentiometric species and species obtained by mass spectrometry. The effects of experimental conditions on hydrolytic processes were also studied: influence of pH changes, aging solution, the influence of mobile phase, the influence of the aluminum(III)-ion concentration, the influence of counter ions. With increasing age the number of species in the solution spectrum is significantly reduced. Only a few signals derived from species [Al(OH)₂]⁺, [Al₆(OH)₁₃]⁵⁺, [Al₄(OH)₉]³⁺ and [Al₅(OH)₁₂]³ were identify in the spectrum.

ESI MS spectra of Al(III)-ion and (FQLs) solutions were recorded in the positive mode in the range of 50 to 2000 *m/z*. Except calibration of instrument, it was tuned with solution of one component to optimize the instrumental parameters. In the pH range 3,0 to 6,0 and metal to ligand concentration ratio 2:1 to 1:3 were identified mononuclear species: AlL²⁺, AlL₂⁺ и AlL₃⁰, by ESI MS spectrometry. These species identified (by ESI MS spectrometry) in Al(III)-ion and floxacin solutions at *m/z*: 193,52; 255,20; 719,62; 763,23; in Al(III)-ion and moxifloxacin solutions at *m/z* 216,81; 414,22; 827,31; 1266,88; in Al(III)-ion and ciprofloxacin solutions at *m/z* 249,05; 687,75; 1040,33; 1056,15. Protonated and mixed hydroxo complexes were identified at all pH values, but the polymeric species are not found in the ESI MS spectra.

Tandem mass spectrometry, MSⁿ was used to gain insight into the structure of Al(III) ion-(FQLs) complexes, i.e. to determine the most probable binding sites of aluminum complexes. In the MSⁿ experiments high collision energies (80-100 % of the maximum rf voltage) are applied to the parent ions. High collision energies indicates that the complexes of Al(III)-ion-fluoroquinolones are very stable. The stability of these complexes indicates that during the fragmentation register only loss of small neutral molecules.

MALDI measurements without the matrix confirmed the existence of mononuclear complexes found by ESI MS. This fact indicates that these species are really formed in the solution but not the result of gas phase reactions. Polymer species, designated as [2Al³⁺+5L⁻]⁺ were identified

in the MALDI spectra. These species probably descended from Al_2L_2 dimeric core, which is formed in solution and then the clusters are formed in the gas phase. The species identifies as $[2Al^{3+}+5L^-]^+$ in the system fleroxacin and $Al(III)$ -ion appear at m/z 1894,77, in the system of moxifloxacin and $Al(III)$ -ion at m/z 2054,36 and the in system of ciprofloxacin and $Al(III)$ -ion at m/z 1703,88. ALL_3 species also identify in the MALDI spectrum, which is usually sodium or potassium adduct ion.

The mole fractions of complex species in the system $Al(III)$ ion- fleroxacin, i_{763}/i_{719} is similar to that of the free ligand i_{370}/i_{326} . Their presence was concluded by quantitative speciation. Relative intensities for the most abundant species of ALL^{2+} and ALL_2^+ obtained by ESI MS with the change of pH and relative intensities obtained from the potentiometric measurements are in fairly good agreement. The differences between these data are the result of ESI perturbations in the solution. Identification of these perturbations is very important because based on them estimate how ESI MS spectra reflect the real state of equilibrium in solution.

УВОД

Хинолони су синтетички антибиотици широког спектра дејства. Према антибактеријском спектру дејства хинолони се деле у четири генерације (I; II; III; IV и генерацију у развоју). Амфотерна су једињења која граде соли и са киселинама и са базама. У воденим растворима, у зависности од рН вредности могу постојати као катјони, анјони, диполарни јони и неутрални молекули. Хинолони су врло слабо растворни у води, а лако се растварају у киселинама и базама. Увођењем атома флуора у основно језгро хинолона настају флуорохинолони.

Флуоровани хинолони (НQ) су једињења која у структури садрже осим нафтиридиноског и хинолонског прстена и атом флуора у позицији 6, а често и пиперазински прстен у позицији 7 хинолон-3 карбоксилног језгра. Најефикаснији супституент јесте пиперазинил чијим увођењем се повећава активност ових једињења против грам-позитивних и грам-негативних бактерија.

Флуорохинолони су антибиотици широког спектра дејства уведени осамдесетих година прошлог века да би се превазишао проблем резистенције многих бактерија на дотада примењиване антибиотике. Најчешће коришћени флуорохинолони су: ципрофлоксацин, моксифлоксацин, флероксацин, левофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, пефлоксацин. Примењују се код уринарних, бубрежних, респираторних инфекција, инфекција меких ткива, костију и у гинекологији [1]. Ови антибиотици инхибирају ензиме микробног нуклеуса (једра) топоизомеразу II и топоизомеразу IV (ДНК гиразу), ензиме који производе негативни супернамотај ДНК. Замена карбоксилне групе неком другом киселом групом доводи до смањења антибактеријске активности. Изражене комплексирајуће особине флуорохинолона чине их инкомпатибилним са антацидима и препаратима који садрже минерале са двовалентним или тровалентним металима. Стехиометрија формираних комплекса зависи од више фактора као што су: концентрација хелатног агенса и металног јона, валенца (наелектрисање) металног јона и рН вредности раствора.

Алуминијум као тровалентни катјон спада у тврде Lewis-ове киселине и као такав показује велики афинитет за везивање са тврдим базама као што су хидроксида, флуориди. Алуминијум (III)-јон је веома подложен хидролизи због великог афинитета ка негативно наелектрисаном кисеонику [2]. У зависности од услова хидролизе гради велики број хидролитичких комплекса од којих су најважнији мононуклеарни комплекси при ниским укупним концентрацијама алуминијума: $[Al(OH)]^{2+}$, $[Al(OH)_2]^+$ и $Al(OH)_3^0$, односно полинуклеарни при вишим концентрацијама алуминијума. Најважнији полинуклеарни хидролитички комплекси су: $[Al_2(OH)_2]^{4+}$, $[Al_3(OH)_4]^{5+}$ и $[Al_{13}O_4(OH)_{24}]^{7+}$.

Алуминијум је нерастворан је у опсегу рН 6,0-8,0. При рН вредностима мањим од 6,0 и већим од 8,0, као и у присуству неорганских и органских лиганата, растворљивост алуминијума расте. Алуминијум не учествује у физиолошким процесима у организму. Међутим, велика примена овог метала у производњи и чувању хране, третману пијаће воде, у козметичким препаратима, велика заступљеност овог елемента у земљиној кори и појава киселих киша које га ослобађају из земљишта и уносе у ланац исхране, чине га веома штетним.

У нормалним околностима када се мале количине алуминијум уносе храном и лековима, бубрежни механизам је довољан да уклони сав унети алуминијум. Међутим у стањима када је поремећена функција бубрега или код пацијената на терапији лековима на бази алуминијума, нарочито оних са бубрежном инсуфицијенцијом (дијализатни раствори) или чиром на желудцу (антациди), болестима при којима се подразумева примање високих доза овог метала у дужем периоду или примање вакцина може доћи до накупљања Al(III)-јона у организму [3]. Токсично дејство Al(III)-јона се тумачи чињеницом да Al(III)-јон ступа у интеракције са многим биомолекулима, а посебно са протеинима (албумин и трансферин) и полипептидима. Токсично дејство алуминијума је „ублажено“ чињеницом да је већина његових једињења слабо растворна. Код здравих људи ретко се јавља акутна токсичност орално унетим алуминијумом.

При комплексирању Al(III)-јона са флуорохинолонима смањује се биорасположивост алуминијума, а самим тим и његова токсичност.

Литературни преглед указује да нема радова који обухватају изучавање комплексирања алуминијума и флуорохинолона масеном спектрометријом, али постоје радови у којима је публикована фрагментација флуорохинолона као и интеракције двовалентних метала са норфлоксацином и левоксацином.

Значај изучавања комплексирања алуминијум(III)-јона и флуорохинолона је велики, пре свега за разумевање фундаменталних биолошких процеса на нивоу ћелије. Ова дисертација треба да разјасни питања природе и стабилности комплекса који се граде у растворима алуминијум(III)-јона и флуорохинолона, њихову концентрациону расподелу у условима блиским физиолошким. Један од циљева ове дисертације јесте и разјашњавање начина везивања алуминијум(III)-јона за молекуле флуорохинолона.

Да би се реализовали постављени циљеви примењена је масена спектрометрија и то ESI MS (за одређивање специјације у растворима алуминијума и растворима алуминијума и флуорохинолона), MALDI MS (за изучавање полимеризације у растворима алуминијума и флуорохинолона, као и за потврду специјације у овим растворима идентификовану применом ESI MS технике), тандем масена спектрометрија за одређивање путева фрагментације и потенцијалне структуре молекула. Масена спектрометрија има предности у односу на остале технике, јер њеним коришћењем се детектују формиране комплексне врсте присутне у микроконцентрацијама, баш као што могу настати у људском организму. Одређивање специјације у растворима је извршено недвосмисленом асигнацијом сигнала у MS спектрима на основу односа масе и наелектрисања, изотопске дистрибуције и расподеле наелектрисања.

Примењен је концепт вештачких неуронских мрежа (ANN) за анализу података добијених експериментално из ESI MS спектра. Добијено је добро слагање теоријских прорачуна и експерименталних података.

1. ОПШТИ ДЕО

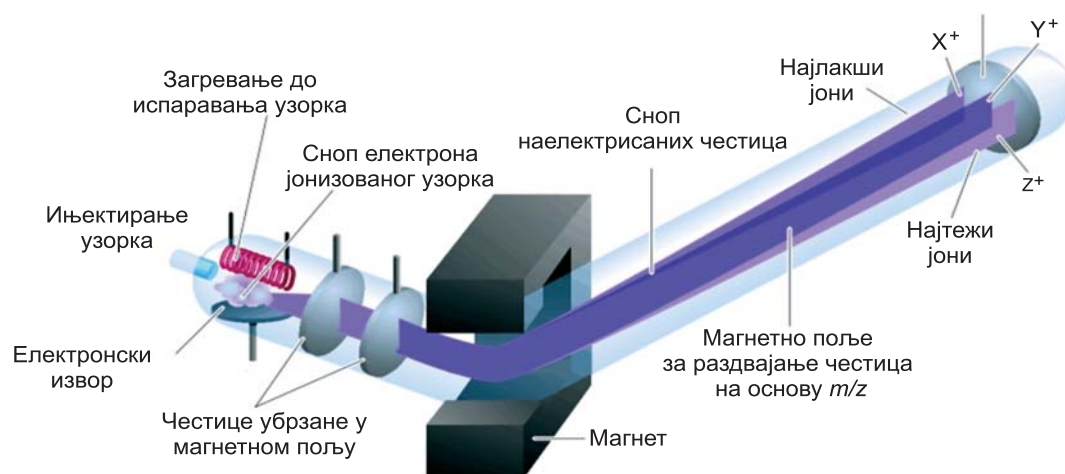
1.1. Масена спектрометрија

Масена спектрометрија је техника која се често примењује како за рутинске тако и у истраживачке сврхе. Најважнија примена ове технике је за тачно одређивање молекулске масе узорка [4]. Користи се у фармацији, изучавању нових лекова, проучавању метаболизма лекова, фармакокинетици, клиничком дијагностификовању присутности дрога, стероида у људском организму, анализи хемоглобина, квалитета воде и хране, за проучавање понашања јона у вакууму, анализи протеина, пептида, полимера, масе јона [5].

Масена спектрометрија се примењује у изучавању комплексних врста у раствору. Једина је техника која даје експерименталну потврду броја и идентификацију врста у раствору (специјациона анализа). Инфрацрвена и раманска спектроскопија дају податке о функционалним групама везаним за комплексе. NMR даје податке о координацији комплекса, (да ли је алуминијум(III)-јон 4- или 6- координован) као и податке о координационим стањима окружења анализираног атома-језгра [4, 6].

У овој дисертацији масена спектрометрија је коришћена за одређивање специјације у растворима алуминијум хлорида и растворима алуминијума и флуорохинолона и детекцију места (структурних јединица) унутар молекула, на којима је највећа вероватноћа да дође до фрагментације и одређивање потенцијалне структуре молекула.

Масена спектрометрија се заснива на томе да се анализирани узорак (органиско или неорганиско једињење) преводи у стање јонизованог гаса (термалном методом, применом електричног поља или бомбардовањем убрзаним е-, јонима или фотонима при чему настаје сноп једнаких енергија), различитог односа масе и наелектрисања. Кретањем наелектрисаних честица тј. јона у електричном или магнетном пољу полазни сноп јона се разлаже на основу разлике количника масе и наелектрисања јона m/z (Слика 1). Формирани јони могу бити једноструко јонизовани атоми, кластери, молекули или њихови фрагменти. Настали јони се проводе кроз анализатор, који раздваја јоне у простору и/или времену. Из анализатора, јони иду на детектор где формирају електрични сигнал који се региструје на рачунару. Квалитативна и квантитативна анализа врше се на основу вредности m/z и релативне заступљености врста [4].



Слика 1. Пут јона у масеном спектрометру

1.1.1. Основни делови масеног спектрометра

Да би једињење било анализирано у масеном спектрометру мора бити наелектрисано [7]. Међутим, већина органских молекула је неутрална па их је потребно јонизовати у извору.

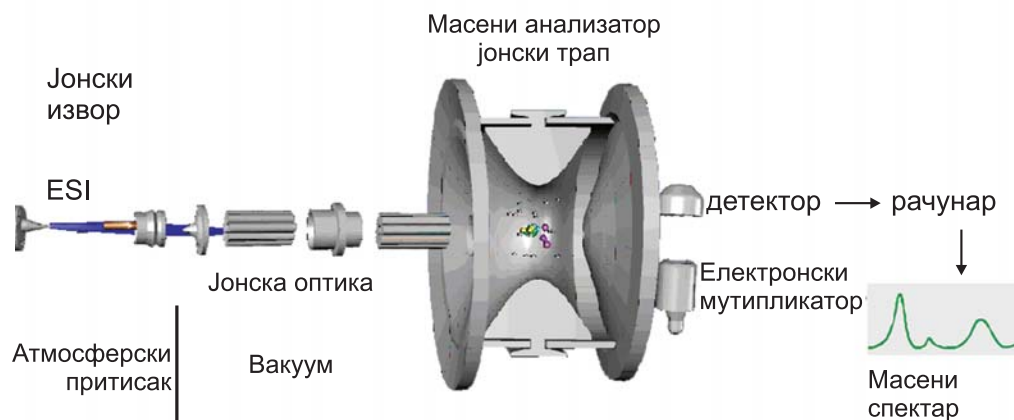
Основни део масеног спектрометра је јонизациони извор који обезбеђује наелектрисане честице тј. јоне, убрзава их и шаље у следећи део који обезбеђује наелектрисане честице, јоне, анализатор. Анализатор врши селекцију, тј. раздвајање јона у зависности од њиховог односа масе и наелектрисања m/z . Раздвојени јони се детектују и сигнал се бележи у бази података ради даље анализе.

Важан део спектрометра је систем за одражавање ниског притиска 10^{-2} – 10^{-5} Pa тј. систем за високи вакуум. Високи вакуум обезбеђује минималну вероватноћу молекуске реакције јона тј. омогућава јонима да са једног краја инструмента дођу на други крај, а да не дође до судара тих јона са другим молекулима и до њихове неутрализације, расејања, или реакције фрагментације.

Основне функције масеног спектрометра су: јонизација репрезентативног дела молекула из узорка, раздвајање јона према њиховој маси или према односу масе и наелектрисања m/z и мерење релативне заступљености [7] (принос јона у % на одређеној маси, тј. на m/z).

Масени спектрометар се састоји од следећих делова (Слика 2):

1. систем за увођење узорка (inlet)
2. јонски извор – производи јонски сноп из испитиваног узорка
3. јонска оптика – спроводи јоне до масеног анализатора
4. масени анализатор – разлаже јоне према њиховом односу маса и наелектрисања
5. вакуум систем – обезбеђује високи вакуум;
6. детекциони систем – детектује разложене јоне и мери њихов интензитет (електронски мултипликатори)
7. рачунар – за аквизицију и обраду података



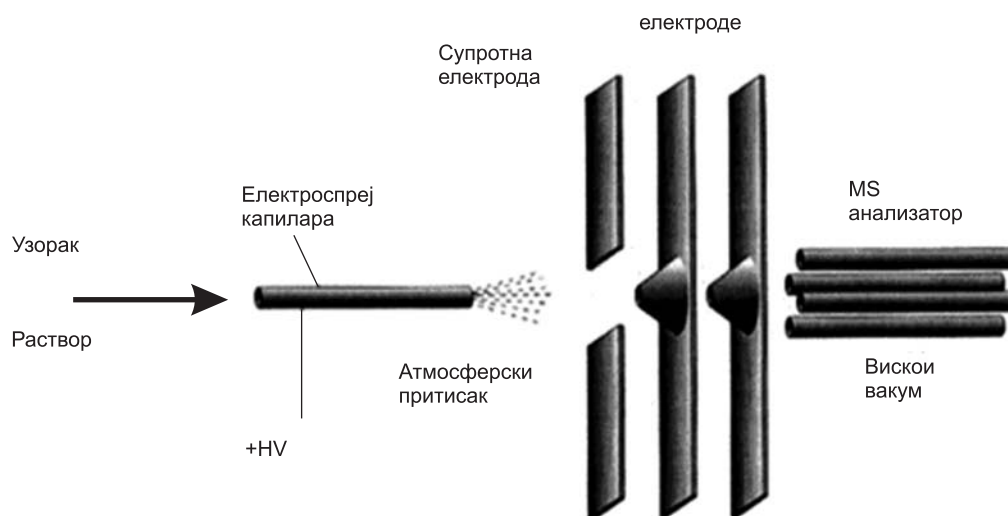
Слика 2. Основни делови масеног спектрометра

Извор јонизације (Јонизатор): Основна намена јонског извора је да произведе јоне из атома или молекула узорка, формира и убрза јонски сноп ка масеном анализатору. Процес јонизације подразумева довођење енергије молекулу, при чему се избацује један или више електрона. При том може доћи и до фрагментације молекула у два или више фрагмената. Фрагментација је често пожељна, јер појава фрагмената у спектру указује на то од којих је компонента састављен испитивани молекул. Дешифровањем појединих фрагмената може се добити структура молекула. Најчешће се молекул фрагментира на различите начине, док један део остане цео и у спектру даје сигнал с највећом вредности масе. Тај јон се зове молекулски јон и он показује масу молекула (молекуску масу). Постоји више начина јонизације, који се разликују по количини енергије која се предаје молекулу. У зависности од начина јонизације неутралне честице, развијени су различити типови јонских извора.

ESI извор се примењује за анализу узорка из раствора. Растварач мора бити [4] поларни, лако испарљив. Узорак се најчешће припрема у одговарајућој концентрацији у смеси воде и органског растварача метанола, ацетонитрила или изопропанола. Одговарајућа количина сирћетне киселине често се додаје да поспеше процес протоновања молекула анализата за снимање у позитивном моду јонизације. За снимање у негативном моду јонизације додаје се амонијачни раствор или испарљиви амини да поспеше депротоновање молекула анализата. Раствор може бити и елуент из течно хроматографске колоне [8]. Избор позитивног или негативног мода снимања (ESI+ или ESI-) условљен је основним наелектрисањем врсте у раствору са циљем добијања најбољих резултата. Раствор се ињектује у област високог позитивног или негативног потенцијала. Највећи део растварача мора бити уклоњен без губитка узорка. Ако се растварач не уклони, онда испарава и „обара“ вакуум инструмента што доводи до повећања притиска и гашења инструмента. Постоји неколико начина раздвајања носећег растварача и испитиваног раствора. Један од бољих начина је примена ESI MS технике.

Раствор пролази кроз челичну капилару (кратке дужине) до краја на коме се примењује високи позитиван или негативан електрични потенцијал (HV), обично 3-5 kV. Када раствор стигне до краја капиларе, јако електрично поље проузрокује тренутно испаравање (небулизацију) у млаз спреја веома малих наелектрисаних капи раствора у пари растварача.

Јони се формирају на атмосферском притиску (API) и пролазе кроз конус у средњи вакуум регион, а одатле кроз мали отвор (апертуру) у област високог вакуума, [7, 9] масеног анализатора (Слика 3).



Слика 3. Принцип ESI MS спектрометрије

Основне карактеристике ESI-MS спектрометрије у изучавању метал-лиганд равнотежа су:

- Примена за одређивање стехиометрије новосинтетисаних комплекса
- Број идентификованих врста одговара броју пикова
- Стехиометрија присутних врста се може директно одредити из m/z вредности (изотопски однос, MS спектри високе резолуције)
- Релативна концентрација врста је пропорционална интензитету пикова

Ако из MS спектра не добије довољно информација за идентификацију врста, примењују се снимање спектра високе резолуције MS/MS спектра и анализа изотопских шема пикова која даје потпуну идентификацију присутних врста.

1.1.2. Типови јонизације

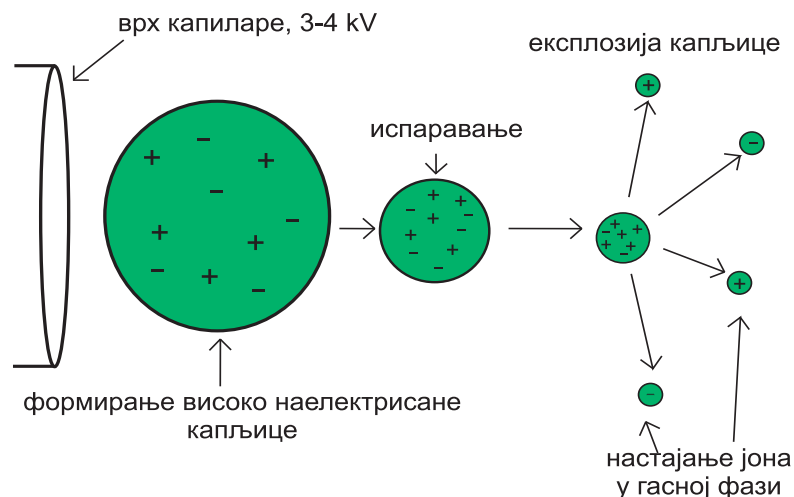
Масени анализатор „ради“ само са наелектрисаним врстама, тј. јонима који настају из атома или молекула, ређе из радикала, zwitter јона или кластера [10]. Задатак јонског извора је да изведе одлучујући корак превођења неутралних молекула или атома у наелектрисане честице. Постоји велики број јонзационих метода којима се ово остварује за разне врсте анализата [4].

Већина техника јонизације побуђује неутралне молекуле анализата који при том остају без електрона и долази до стварања катјон радикала $M^+ \cdot$. Друге технике укључују стварање јона MH^+ који настаје реакцијом између јона и неутралног молекула. Јони се загревају десорпцијом и десолватацијом и преводе у гасну фазу. Избор јонског извора зависи од природе узорка као и од врсте информација које треба добити. Оно о чему треба водити рачуна при избору јонског извора је енергија јонизације анализата, јер она контролише количину фрагментисаних јона. Најчешће јонизационе технике су:

- електронска јонизација (EI)
- хемијска јонизација (CI)
- десорпција пољем (FD)
- бомбардовање брзим атомима (FAB)
- електроспреј јонизација (ESI)
- јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом (отпаривањем) из матрикса енг. (matrix assisted laser desorption /ionisation-MALDI)

Електронска јонизација (EI) користи сноп брзих електрона, којима се бомбардују молекули у гасној фази. Електронски сноп се производи помоћу филамента (катоде) загрејаног до високе температуре провођењем струје кроз њега. Електрони који се избију са филамента, убрзавају се према позитивно наелектрисаној аноди. Варирањем потенцијала између катоде и аноде, варира се и енергија електрона, а тиме и учинак фрагментације. Обично се користе енергије од 70 eV. Електронска јонизација обично јако фрагментира молекуле анализата.

Електроспреј јонизација (ESI; Electro Spray Ionization) [11, 12] јонизује аналит у облику раствора. Као растварач, обично се користи нека супстанца која је испарљивија од анализата. Узорак растворен у поларном, испарљивом растварачу у струји азота се распршује кроз челичну капилару на коју се при атмосферском притиску примењује јако електрично поље под чијим утицајем долази до одвајања позитивног и негативног наелектрисуња у раствору. Када је капилара прикључена на позитиван крај извора напона, позитивно наелектрисани јони путују према катоди и акумулирају се на површини течности. При критичној јачини поља настаје тзв. Тејлоров конус у коме се континуално производе капљице „обогаћене“ позитивно наелектрисаним јонима које под утицајем градијента потенцијала и притиска путују према анализатору масеног спектрометра. Мењањем поларитета могуће је произвести негативно наелектрисане капљице. Будући да се електроспрејом континуално производи струја, како би се избегла акумулација наелектрисуња на капилари и супротној електроди одвија се редокс процес. Значај електроспреја и њен велики допринос развоју модерне масене спектрометрије је што је то благи начин јонизације који омогућава пренос јона из раствора у гасну фазу. Јединствено својство електроспреја је и у настајању вишеструко наелектрисаних јона. Овај тип јонизације омогућава детекцију супстанци великих молекулских маса, поред малих молекула. Процес електроспреја може се поделити у три фазе: а) настајање капљица, б) смањење капљица ц) настајање јона у гасној фази (Слика 4).



Слика 4. Механизам електроспреја

1.1.3. Настајање наелектрисаних капљица на врху капиларе у ESI извору

Напон од 2-3 kV примењује се на металну капилару, спољног пречника 0,2 mm, унутрашњег пречника 0,1 mm, удаљености 1-3 cm од веће, планарне „супротне“ електроде [7]. Јачина електричног поља E_c у простору око врха капиларе при одређеном потенцијалу V_c може се представити једначином:

$$E_c = \frac{2 \cdot V_c}{r_c \cdot \ln(4 \cdot d / r_c)} \quad (1)$$

где је :

r_c спољни радијус капиларе и
 d удаљеност између електрода.

Другим речима, електроспреј је специјална врста електролитичке ћелије у којој се транспорт дела наелектрисања не одвија кроз раствор већ кроз гасну фазу, најпре преко наелектрисаних капљица, а онда преко јона у гасној фази.

1.1.4. Смањење наелектрисаних капљица насталих електроспрејом

Почетна величина наелектрисаних капљица насталих електроспрејом зависи од неколико параметара од којих су брзина протока раствора и својства растварача најбитнији [8]. При брзини протока од 5 dm³/min и укупној концентрацији електролита не већој од 10⁻³ mol/dm³ постижу се најбољи услови за висок принос јона у гасној фази. Тако настају капљице малог пречника па се могу сматрати монодисперзним (Слика 4). Како растварач при грејању испарава, смањује се величина капљица, али наелектрисање остаје константно. Долази до несиметричног дељења капљице, односно капљица „претка“ емитује неколико мањих капљица, слично процесу који се одвија на врху Тејлоровог конуса. Високи напон (1-4 kV) доводи до стварања Тејлоровог конуса који је „обогашен“ позитивним или негативним јонима на врху. Спреј наелектрисаних капљица се избацује из Тејлоровог конуса под утицајем електричног поља. Капљице се сакупљају испаравањем, уз помоћ топле „струје“ гаса азота, пролазећи фронт јонизационог извора. Настале капљице су приближно монодисперзне, а њихов радијус износи око једне десетине радијуса капљице „претка“. Таквим несиметричним цепањем, у новије време названим распадом млаза (jet fission), настају две врсте капљица, велике, које у себи носе нежељене спарене јоне електролита и мале, из којих настају јони у гасној фази.

1.1.5. Гасно фазне реакције

Финални продукти формирања јона у ESI комори јесу и јони у гасној фази, који пре доласка до анализатора и детектора, могу учествовати у различитим реакцијама и тиме мењати свој број или хемијски састав на често непредвидљив начин. Обим гасно фазних реакција зависи од напона на конусу ESI извора [13] при чему су гасне реакције мање заступљене при нижим вредностима овог напона (cone voltage). Ове реакције у одређеној мери могу довести до модификације дистрибуције присутних врста у самом анализатору, у односу на услове који претходе ињектирању раствора.

Гасно фазне реакције се могу предвидети са мање сигурности него пертурбације у раствору, с обзиром да се понашање датих врста у гасној фази може потпуно разликовати од оног у течној фази. Када се растварач удаљава у гасно фазном процесу, може се догодити да се поједина врста иначе стабилна у раствору, услед недостатка солватације дестабилише у гасну фазу (или обрнуто). Постоје случајеви за које не важи претпоставка да уколико одређена врста захтева високу енергију фрагментације у MS/MS експерименту, егзистира у раствору као стабилна (то јест, не сматра се да је накнадно формирана у гасној фази).

Механизам гасно-фазних реакција ни до данас није у потпуности разјашњен, али су два модела којима се објашњава настајање јона у гасној фази најприхватљивија:

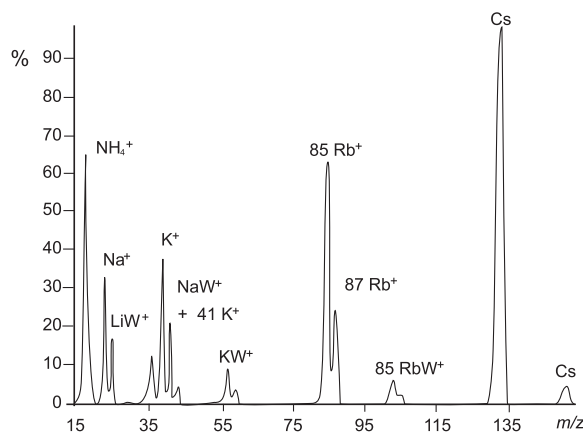
1. модел остатка наелектрисања (Dole, 1968.): према моделу остатка [14, 15] наелектрисања ствара се изузетно мала капљица, радијуса приближно 1 nm, која садржи само један јон. Испаравањем последњег молекула растварача настаје јон у гасној фази. Данас се сматра да велики молекули, масе преко 3300 Da, настају тим процесом.

2. модел испаравања јона (Iribarne и Thomson, 1976.): према овом моделу, из капљица радијуса приближно 8 nm, са вишком од приближно 70 елементарних наелектрисања, долази [6, 8] до испаравања јона пре него што капљица достигне Рејлијеву границу и започне дељење. Сматра се да мали јони у гасној фази претежно настају овим механизмом.

Неки аутори примењују анализу интензитета пикова при смањивању концентрације метала, на истој рН вредности и при истом односу метал/лиганд [13, 15]. У случају гасно фазних реакција, очекује се да интензитети пикова буду у корелацији са концентрацијом метала и у складу са познатим подацима о равнотежи. Овај приступ изискује претходно познавање равнотежних односа у раствору који се испитује. Брзина гасно фазних реакција се повећава са порастом Т и ове се реакције дешавају у близини „угрејаног“ улаза у капилару.

1.1.6. Утицај интерференција на интензитет сигнала

Раствор који је подвргнут електроспреју уз аналит садржи и производе електрохемијских реакција, нечистоће које могу потицати из различитих извора (растварачи обично садрже око 10^{-5} mol/dm³ Na⁺), често и електролит који се додаје узорку како би се побољшала десорпција одређене врсте [8, 16]. Киселина се додаје за повећање приноса јона M+H⁺, а базе за повећање приноса јона M-H⁺. Присутност електролита у великим количинама као и присутност површински активних супстанци може „маскирати“ сигнал аналита, што је један од главних недостатака електроспреја као начина јонизације у масеној спектрометрији. Мали и стабилни јони алкалних метала (Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺) преводе се у гасну фазу без промена. На Слици 5. приказан је ESI MS спектар воденог раствора натријумовог, калијумовог, рубидијумовог и цезијумовог хлорида. Осим сигнала једноструко наелектрисаних јона алкалних метала може се уочити и сигнал при 18 m/z, који потиче од онечишћења, јона NH₄⁺. Такође се могу уочити сигнали слабијег интензитета који одговарају хидратисаним јонима алкалних метала [M+H₂O]⁺.



Слика 5. ESI MS спектар воденог раствора Na, K, Rb, и Cs

1.1.7. Параметри у ESI битни за анализу

За ESI испитивање узорак се раствара у поларом испарљивом растварачу и пумпа кроз уску, челичну капилару [4]. На врх капиларе се примењује напон [8]. Капилара је смештена у јонизационом извору. Јако електрично поље тера узорак да изађе на врх диспергујући се у аеросол високо наелектрисаних капљица. Захваљујући испаравању растварача његова количина се смањује. Стога се густина неравнотежног наелектрисања повећава на површини капљице. Одбојне силе међу наелектрисањима расту проузрокујући низ експлозија све док јони анализата испаравају из капљице. У току процеса јонизације у ESI извору одигравају се неке од реакција у спољној сфери у току испаравања, које могу да промене почетно наелектрисање солватисаних врста. Код ESI технике вишеструко наелектрисани јони могу се добити нарочито у воденим растворима, јер вода има високу поларност (диелектрична константа 78,54). Овај параметар стабилише високо наелектрисање у раствору. Четири различита напона су битна да би се све врсте детектовале:

- капиларни напон (3,5-4 kV), (capillary voltage)
- мањи напон на конусу (sample cone voltage) (40-70 V),
- екстракциони напон на конусу (5 V) (extraction cone voltage) и
- напон оптике (200 V) (RF lens voltage).

Капиларни и екстракциони напон имају врло мали утицај на спектре. Шум се углавном повећава при високим напонима, а најмањи сигнали ишчезавају када су напони врло ниски. Параметар који има највећи ефекат је „sample cone voltage“. Овај напон много утиче на изглед спектра; чак базни сигнал може ишчезнути, а нови ће се појавити и расти када се овај параметар мења. При вишим вредностима напона, број сигнала се повећава, а неки од сигнала достижу 100 % интензитет. Снижавањем напона смањује се вредност укупне јонске струје (total ion current) на врло низак ниво. Подешавањем напона оптике (RF lens voltage) одабира се број врста [8].

1.1.8. Извор јонизације MALDI

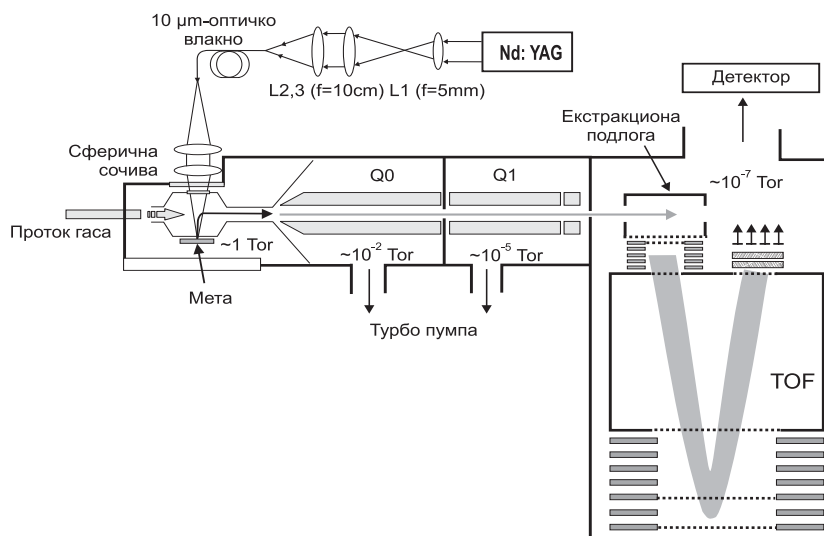
MALDI је техника која директно јонизује и преводи јоне анализата из течне фазе у гасну. Ова техника се доста користи за термолабилне, неиспариве, велике органске молекуле као што су протеини, пептиди, синтетички и природни полимери, олигонуклеотиди, олигосахариди, лекови [16, 17]. MALDI техника се заснива на бомбардовању узорка ласерским снопом тако да снап изазива и јонизацију и десорпцију (отпаривање, прелази из течности у гас) молекула узорка без хемијске деградације (Слика 7). Узорак се прво припреми тако што се меша са основом (матриksom) и та смеша се стављају на мету, подлогу (plate). Матрикс служи као „растварач“ за молекуле анализата [18]. Матрикс је најчешће нека органска компонента која

има особину да јако апсорбује (UV) зрачење на таласној дужини ласера. Избор матрикса зависи од молекула који се анализира. Матрикс са узорком се остави док растварач испари. Најчешће коришћена метода је метода осушене капи (dried droplet) где се на тако припремљен узорак примени снажан ласерски пулс у трајању 3 до 5 ns. [11, 18, 19]. Енергију ласера апсорбују молекули основе и трансформишу енергију ласера у ексцитациону вибрациону енергију узорка што изазива избацивање јона анализата и матрикса са површине на коју је нанета ова смеша. Овакав трансфер енергије је ефикасан а молекули анализата нису изложени директној јонизацији при којој може доћи до њихове декомпозиције. У првој фази ласер десорбује високо енергетске честице из матрикса (што је олакшано применом вакуума и електричног поља), а у другој фази ласер јонизује анализат протоновањем или катјонизацијом и депротоновањем. MALDI јонизација је веома блага јонизациона техника чији типични масени спектар садржи: молекулски јон, мало вишеструко наелектрисаних јона, неколико фрагмената Дешава се да се фрагменти уопште не појаве па се овакав спектар може релативно лако интерпретирати. Ретко се јављају вишеструко наелектрисани јони.

Основни делови MALDI TOF инструмента (Слика 6) су:

- Извор јонизације – ласер
- Подлога – где се наноси узорак са одговарајућим матриксом
- Анализатор – где се раздвајају јонизовани молекули на основу односа m/z , што се постиже мерењем времена прелета јона (TOF анализатор)
- Детектори – линеарни или рефлексни.

Детектори су повезани са рефлекторима, уређајима за повећање резолуције. Рефлектори се састоји од више електрода већег потенцијала, истог поларитета и напона убрзања. Ако су електроде укључене снима се рефлексном методом, а ако су искључене линеарном методом детекције.



Слика 6. Схематски приказ MALDI TOF инструмента

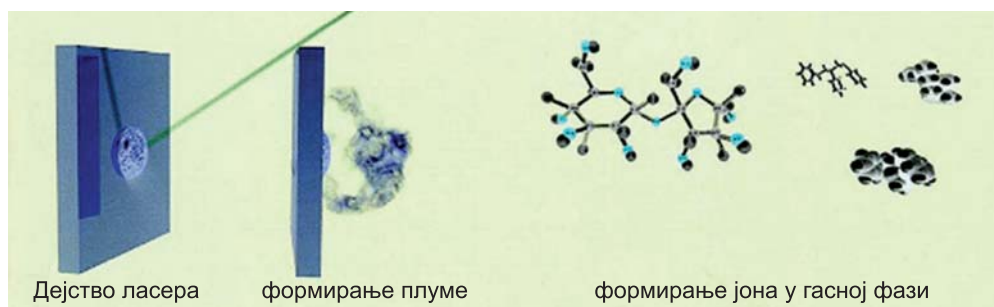
Механизам MALDI се може сажети у три фазе:

- **Формирање „чврстог раствора“:** Битно је обезбедити да матрикс буде у вишку чиме се омогућава да молекули анализата буду међусобно потпуно изоловани. Овако се формира хомогени „чврсти раствор“ чиме се обезбеђује стабилна десорпција анализата. Евентуална нехомогеност нанете смеше изазвала би велико варирање резултата (варијације у интензитету и резолуцији пикова, тачности израчунатих маса) [17, 20].
- **Ексцитација матрикса:** Ласерски зрак се фокусира на површину матрикс-аналит чврстог раствора. Када је фреквенција ласера као фреквенција хромофоре матрикса

долази до брзе екситације, појаве вибрација што води до локализованог распадања чврстог раствора (Слика 7). Кластери емитовани са површине састоје се од молекула анализата окружени матриксом и јонима соли [21, 22]. Молекули матрикса испаравају из кластера и остављају слободни анализат у гасној фази.

- **Јонизација анализата:** Фотоекситирани молекули матрикса се стабилишу кроз трансфер протона. Везивање катјона за анализат је послешено овим процесом. На овај начин се формирају карактеристични јони анализата $[M+X]^+$ ($X=H, Na, K$). Ова јонизациона реакција се одвија у десорбованом матрикс-аналиту изнад површине. Јони се затим екстрахују у масени спектрометар за анализу.

При снимању у позитивном моду код MALDI технике присутни су радикалски катјони, [23] протонирани псеудо-молекулски јони и катјони псеудо-молекулских јона у облику адуката металног јона.



Слика 7. Аблација кристала и формирање агрегата састављених од матрице и анализата

Формирање јона у ESI извору води преко микро капљица, док формирање јона код MALDI технике преко аблације материјала изазване дејством ласера (најчешће CO₂ ласера за IR област или UV ласера) и формирања „plume“ [18, 22, 23].

MALDI plume је веома брз чак експлозиван фазни прелаз из чврстог у гасно стање. „Plume“ процес доприноси фрагментацији.

Механизам формирања јона код MALDI технике састоји се из примарне и секундарне јонизације. Примарном јонизацијом добија се прва генерација јона из неутралних молекула узорка. Ови јони су најчешће врсте настале из матрикса (тзв. јонизациони корак). Секундарном јонизацијом настају јони који нису директни продукти примарне јонизације. Најчешће су то јони анализата.

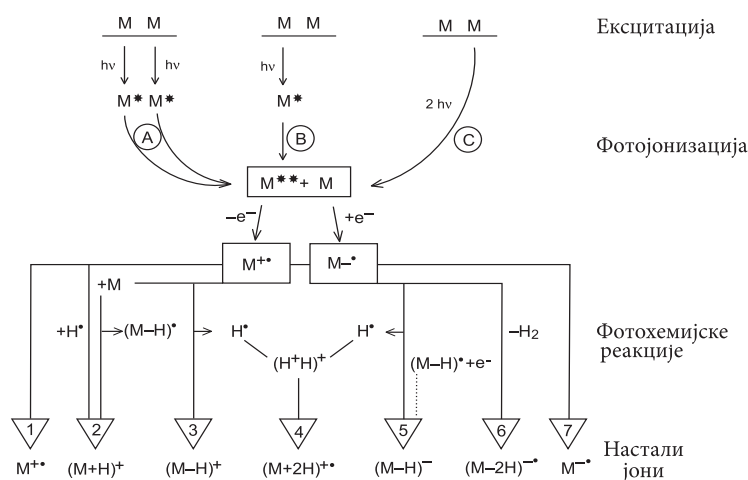


Схема 1. Реакциона путања у MALDI MS предложена од стране Karas-a i Hilenkamp-a

Ова реакциона путања обухвата: фотоекситациону путању (A) формирање енергетских резерви, „energy pooling“, (B) (секвенцијалну двофотонску екситацију) [24], (C) (симултану

двофотонску екситацију), што све води до високо ексцитираних интермедијера из којих се ослобађају електрони у првом кораку јонизације. „Energy pooling“ је појава у којој се електронска екситациона енергија два суседна молекула прерасподељује, што се дешава кроз елементарни корак екситације .

У фази секундарне јонизације осим појединачних молекула избацују се и кластери и агрегати матрикса (нарочито карактеристично када се користе IR ласери).

У реакцији фотојонизације између фотоелектрона и неутралних молекула настају високо реактивни радикал молекулских јони $[M^{\bullet}]$. Ови јони реагују са депротонаним, молекулским јонима $[M-H]^{-}$, реакцијама преноса водоника. Запажају се и реакције вишеструке адиције водоника $[M+2H]^{++}$ и $[M+3H]^{+}$ које се на сличан начин могу објаснити. Код ESI MS технике постоје солватисани вишеструко наелектрисани јони, а код MALDI MS вишеструко наелектрисани агрегати.

У фази примарне јонизације радикали фотојонизованог матрикса су кључни јони у односу на остале MALDI јоне што је приказано на Схеми 1.

У Табели 1 су сумирани најважнији јонски производи који потичу од различитих класа анализата добијених разлитим путевима јонизације [24].

Табела 1: Јони одабраних класа анализата, формирану примарном и секундарном јонизацијом					
Класа анализата	Десорпција претходно формирану јона	Гасно-фазни трансфер протона	Гасно-фазна катјонизација, анјонска адиција	Трансфер електрона	Елиминација наелектрисања
Пептиди, протеини	Изотопски обележен A^{+}	$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+C)^{+}$		$(A+C(II)-H)^{+}$
Металопротеини	$(A+C)^{+}$	$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+C)^{+}$		$(A+C(II)-H)^{+}$
Јонофоре, метал комплекс лиганди	$(A+C)^{+}$	$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+C)^{+}$		$(A+C(II)-H)^{+}$
Олигонуклеотиди		$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+Na/K)^{+}$		
Олигосахариди		$(A-H)^{-}$	$(A+C)^{+}$ $(A+Na/K)^{+}$		$(A+C-nH)^{-}$
Поларни полимери		$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+Na)^{+}$ $(A+K)^{+}$ $(A+C)^{+}$		$(A+C(II)-H)^{+}$
Неполарни полимери			$(A+C)^{+}$ $(A+Ag)^{+}$		$(A+C(II)-H)^{+}$
Фулерени, деривати фулерена		$(A+H)^{+}$ $(A-H)^{-}$	$(A+C)^{+}$	A^{++} A^{+-}	
Једињења са ниским јониз. потенцијалом (Фероцени, металоцикли)			$(A+X)^{-}$	A^{+-} A^{--}	
Јако кисели анализати (сулфонат Боје)	$(A-H)^{-}$	$(A-H)^{-}$			

где је А-аналит, С-метал катјон (понекад специфициран као Na, K, Ag...), X је контра јон

1.1.9 Анализатори у масеној спектрометрији

Масени анализатор је основни део масеног спектрометра, помоћу кога се остварује примарна функција масене анализе—раздвајање јона (насталих неком од јонизационих техника) по њиховој маси и/или наелектрисању из јонизованог узорка и омогућава мерење

њихове релативне заступљености (обилности). Масени анализатор након раздвајања јона масе m од јона блиске масе $m+\Delta m$ фокусира издвојени сноп јона

Постоји више начина за раздвајање јона па се стога анализатори деле на континуалне и пулсне [23]. Континуални пропуштају само једну врсту јона тј. јоне одређеног m/z који долазе до детектора. Код таквих анализатора је потребно мењати јачину магнетног поља да би сви јони били детектовани. Такви анализатори су квадруполни, магнетни сектори. Магнетни сектори се састоје од магнета између чијих полова пролазе јони под дејством Lorenz-ове силе наелектрисање у кретању. Квадруполни се састоје од четири ваљкасте паралелне електроде између којих се пропуштају јони. Пулсни са друге стране детектују цео спектар из једног пулса јона. Такви анализатори су јон трап анализатор, TOF анализатор са јон циклотронском резонанцом. Јон трап анализатор је кутијица са неколико електрода са наизменичним и једносмерним напоном којима се контролишу јони. TOF анализатор убрзава јоне из јонизатора помоћу хомогеног електричног поља. Анализатор са јон циклотронском резонанцом (Fourier Transform Mass Spectrometry) је техника анализе јона по масама. Овај анализатор садржи велики магнет у коме је низ електрода помоћу којих се контролише положај јона.

1.1.9.1 Јон трап анализатор

Јон трап је уређај који ограничава и чува у добро дефинисаној области простора јоне од интереса који ће се анализирати. Сем што се широко примењује као масени анализатор овај уређај се користи и као масени спектрометар захваљујући ниској цени коштања и ултра високим перформансама [25, 26].

Јон трап анализатори се класификују у четири групе:

1. Тродимензиони (3D) квадруполни и јон трап уређаји високог поља (high field order)
2. Линеарни јон трап
3. Јон –циклотрон резонантни FT MS уређај
4. Орбитрап

Овде ће бити описан принцип рада тродимензионог (3D) квадруполног јон трапа, тзв. Paulov-ог трапа. Инструмент са овим анализатором је брз и има високу резолуцију (моћ раздвајања). Тродимензиони (3D) квадруполни јон трап (QIT) функционише тако да се раздвајање јона по масама постиже чувањем јона у простору заробљавања (trapping space), управљањем њиховим кретањем у времену а не у простору [5]. Принцип овог јон трапа је чување јона у уређају који је састоје од три електроде: прстенаста и две тањирасте електроде.

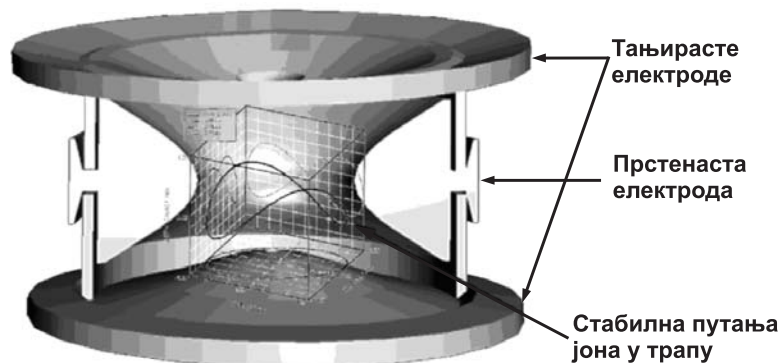
Јони се стабилишу у трапу применом RF напона на прстенасту электроду. Да би се постигла максимална ефикасност, јони се морају усмерити ка центру где је поље заробљавања (trapping) најближе идеалном и најмање изобличено, што обезбеђује максималну резолуцију и осетљивост. Ово се постиже увођењем гаса за пригушење у трап (99,98 % хелијум) који смањује сударе ињектованих јона, пригушујући њихове осцилације док се не стабилизују и ограничава их на центар трапа.

Повећањем RF напона или применом додатног напона на тањирасте електроде или комбиновањем оба могуће је: дестабилизovati јоне и прогресивно их избацити из трапа, чувајући при том само један јон одређене m/z вредности у трапу и онда га избацити са циљем анализирања или чувања само једног јона у трапу и његовим фрагментисањем индукованим вибрацијама и посматрати настале фрагменте (принцип MS/MS). С обзиром да се све дешава на истом месту, али у различито време овај поступак се зове MS/MS „у времену“ при чему ако се последња операција понавља неколико пута да би се прогресивно фрагментисали јони то је MSⁿ. Тродимензионо поље се формира применом потенцијала

$$\Phi = U - V \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (2)$$

на прстенасту электроду и одржавањем тањирастих електрода на основном потенцијалу. U и V су амплитуде DC и RF потенцијала респективно, а ω је ангуларна фреквенца.

На слици 8. је приказана конструкција јон трапа са три електроде једном прстенастом и две тањирасте.



Слика 8. Путања јона у трапу и заробљавање јона

1.1.9.2 TOF анализатор

ТОФ анализатор је један од најједноставнијих уређаја за анализу маса. Овај анализатор је доста брз, али има мању моћ раздвајања од електричног или масеног сектора (мању од 500). Предности ТОФ-а су: висок трансмисиони ефекат, неограничен опсег m/z , ниска граница детекције и велика брзина скенирања [27].

Принцип рада овог анализатора заснива на раздвајању јона (формираних у извору) на основу различитог времена (t) потребног да различити јони пређу познато растојање до детектора након убрзања у електричном пољу.

На почетку процеса сви јони имају исту енергију и њихове брзине су пропорционалне односу m/z . У извору ТОФ инструмента сви јони настају истовремено брзом експлозијом са филамента. Овај метод се зове пулсна јонизација. Потом се убрзавају изван јонског извора коришћењем електричног потенцијала од 2–2,5 kV. Са становишта физике потенцијална енергија сваког јона који напушта извор је пропорционална zV (наелектрисању јона). Кроз цев прелета (евакуисана цев без присуства електричног поља) дужине око 100 cm, путују јони и сва енергија се у току кретања јона претвара у кинетичку енергију.

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2 \quad (3)$$

Масивнији јони путују спорије. Потенцијална енергија сваког јона који напушта јонски извор мора бити једнака кинетичкој енергији којом стиже до детектора тако да је:

$$zV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (4)$$

Брзина јона у току путовања кроз цев је једнака дужини цеви подељеној временом које је потребно да јон пређе ово растојање тако да је:

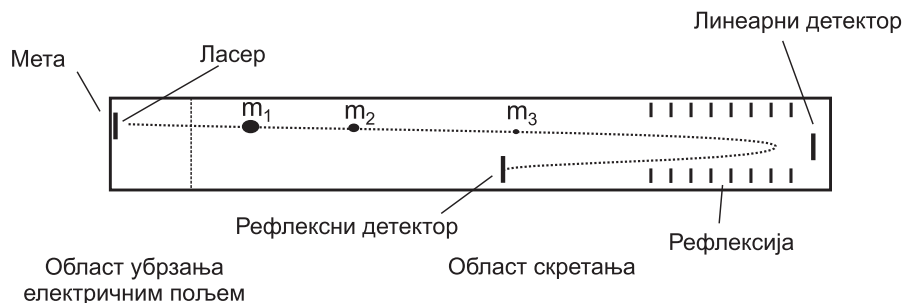
$$zV = \frac{1}{2}m\left(\frac{L}{t}\right)^2 \quad (5)$$

Решавањем једначине (5) по m/z добија се основана једначина ТОФ масене спектрометрије

$$t = \frac{L}{\sqrt{2V}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (6)$$

У једначини (6) L је одређено дизајном инструмента, а V се одржава константним тако да је $L/(2V)^{1/2}$ константа. Следи да је m/z пропорционално квадратном корену времена путовања (прелета) t јона кроз цев.

Масени спектар се добија акумулацијом излазног сигнала са детектора као функција времена, а затим се та вредност конвертује у m/z вредност. Јони који се разликују по времену прелета за најмање 1 ns могу се детектовати. Када се најспорији јони детектују (највишег m/z) следећи сет јона се формира и убрзава електричним пољем изван извора ка детектору. Опсег m/z који ће бити подвргнути аквизицији мора се пажљиво бирати јер јони са већим m/z од задатог опсега могу наставити да се крећу ка детектору иако је пулс нових јона формиран и убрзан [6, 11].



Слика 9. Путања јона у TOF анализатору

Тандем TOF/TOF је спектрометар где се истовремено користе два TOF инструмента. TOF/TOF може да ради у MS моду када бележи цео спектар (full spectrum) детектујући све јоне или у тандем MS/MS моду када детектује само јоне преостале након редукције првобитног броја јона. Први TOF MS (обично је цев за прелет јона на чијим се крајевима врши одабир јона по времену) изолује прекурсор јоне на основу филтера брзина. Други TOF MS (обухвата „пост“ акцелератор, цев за прелет јона, јонско огледало (ion mirror) и јон-детектор који анализира фрагментне јоне.

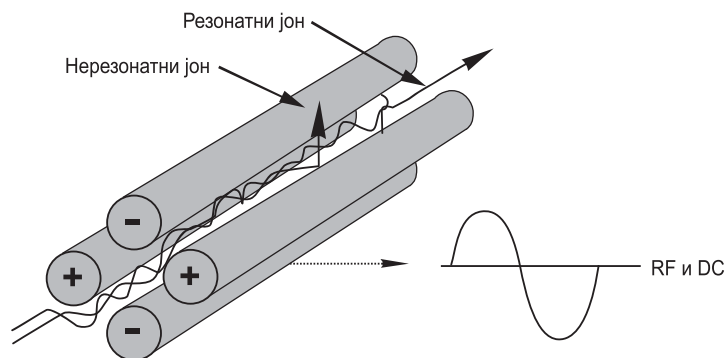
1.1.9.3 Квадрупол анализатор

Квадруполни анализатор је најчешће коришћени анализатор, због погодних димензија, велике брзине снимања спектра, високе ефикасности трансмисије (број јона који стигне до детектора), добре линеарности, умереног вакуума ($p \approx 10^{-4}$ mbar) и ниске цене [25].

Квадруполни анализатор се састоји од два пара међусобно паралелних електрода (Слика 10). Две су на позитивном електричном потенцијалу истог интензитета, а две су на негативном електричном потенцијалу истог интензитета. Хиперболичног су или цилиндричног облика, усмерене дуж z осе. Монтиране су у квадратну конфигурацију. На електроде се доводи електрично поље које је комбинација RF и DC напона, дефинисано једначином:

$$\Phi_0 = U + V \cdot \cos(\Omega \cdot t) \quad (7)$$

где је Φ – електрично поље, U – једносмерни потенцијал, V – амплитуда наизменичног потенцијала, Ω – фреквенција наизменичног потенцијала, t – време [6, 10].



Слика 10. Путања јона у квадруполу

Док пролазе кроз анализатор, јони се филтрирају електричним пољем на основу m/z вредности, тако да само поједини бивају пропуштени, јер имају стабилну путању, док су остали разелектрисани на електродама. Вредност m/z јона који ће проћи кроз анализатор, зависи од U , V и Ω вредности. Радио-фреквентни потенцијал одбија или преноси јоне на основу m/z вредности, фокусирајући их наизменично у различитим равнима. За време прве половине радиофреквентног циклуса, горња и доња електрода су позитивно, а лева и десна негативно наелектрисане. Овакав распоред наелектрисања потискује позитивне јоне у хоризонталну раван. У другој половини циклуса поларизованост је обрнута, па се јони фокусирају у вертикалној равни. Електрично поље квадруполног анализатора наставља да се мења на исти начин па настаје тродимензионални талас кретања јона. Да би стигли на колектор, амплитуда дуж две осе треба да буде таква, да онемогући привлачење јона од стране електроде. Одабиром одговарајућег RF потенцијала, анализатор ће пропуштати јоне већег m/z односа до детектора, а јони мањег m/z односа биће привучени ка електродама. Једносмерни напон, такође има утицаја на кретање јона. Утицај је већи на „теже“ јоне, јер се спорије рефокусирају под дејством радио-фреквентног поља, него „лаки“ јони. Због тога се они полако усмеравају даље од центра квадруполоа, а при крају анализатора привлаче их електроде [25].

1.1.10. Детектори у масеној спектрометрији

Када се јонске врсте раздвоје у масеном анализатору потребно их је квалитативно и квантитативно одредити. Детекција се најчешће изводи електричним путем, тако што се мери релативна заступљеност (укупна јонска струја). Када су вредности релативних заступљености (relative abundance) ниске, тј. јонске струје мале јачине (10^{-9} – 10^{-6} А), користе се разни једносмерни електрични појачавачи (DC-појачивачи), фотомултипликатори, електрон мултипликатори и динамички кондезатори (вибрациони – цевасти електрометри) [4].

Принцип рада електрон мултипликатора заснива се на употреби више узастопних „Фарадејевих шоља“, динода са растућим потенцијалом. Јонски сноп из масеног анализатора пада на электроду мултипликатора и избија електроне, обично један до два електрона по јону. Они бивају убрзани на путу ка следећој „Фарадејевој шољи“ која има виши потенцијал него предходна, па се емитује још већи број електрона и тако редом 8 до 20 пута. На тај начин улазни сигнал се појачава се 10 до 12 пута због чега има високу осетљивост. Највећа осетљивост постиже се при напону од око 3000 V, али овако висок напон скраћује век трајања детектора. Код фотомултипликатора јони излазе из масеног анализатора, преводе се у фотоне и као такви детектују. Овај уређај има мању осетљивост, али знатно дужи век трајања. Снимање масеног спектра изводи се променом једносмерне и наизменичне компоненте напона, при чему је њихов однос константан.

1.1.10.1. Детектори у MALDI TOF масеној спектрометрији

Детекција убрзаних јона (трећи ступањ MALDI TOF масене спектрометрије) се може извршити коришћењем линеарне и рефлексивне методе. На крају цеви за прелет јона је код већине MALDI TOF инструмената смештен уређај за повећање резолуције, тзв. рефлектор [20]. Овај уређај се састоји од серије електрода, које имају нешто већи потенцијал и исти поларитет као напон убрзавања. Рефлектор је повезан са додатним детектором, постављеним насупрот обичног детектора. Када су електроде искључене спектар се снима линеарном методом, а када су укључене рефлексивном методом. Јони који имају одређени однос m/z и брзину лета продиру у поље рефлектора у различитом опсегу. Брзи јони продиру дубље у поље, па је самим тим за њих потребно дуже време за рефлексивну. Истовремено, дуже време лета повећава резолуцију. Са друге стране, код линеарне методе детекције фрагменти молекула који се распадају након зоне убрзавања и даље се крећу приближно истом брзином као и почетни (нераспаднути) молекули и доводе до настајања сигнала дефинисаних истим временом прелета, истовремено проузрокују и благо ширење пика. Ово својство линеарне методе је нарочито важно за детекцију молекула великих моларних маса.

Обе методе детекције имају својих предности и недостатака, па их треба користити у зависности од жељених информација. Линеарна метода детекције показује већу осетљивост за веће молекуле, док је код рефлексионе методе резолуција већа. Зато се линеарна метода користи приликом одређивања расподеле моларних маса полимера, нарочито када је $M > 10000 \text{ g/mol}$ [17]. Са друге стране, рефлексиона метода се углавном користи приликом одређивања тачне моларне масе индивидуалних ланаца полимера, што је неопходно приликом идентификације крајњих група и детекције споредних производа.

1.1.11. Тандем масена спектрометрија (Масена спектрометрија/масена спектрометрија или MS/MS спектрометрија)

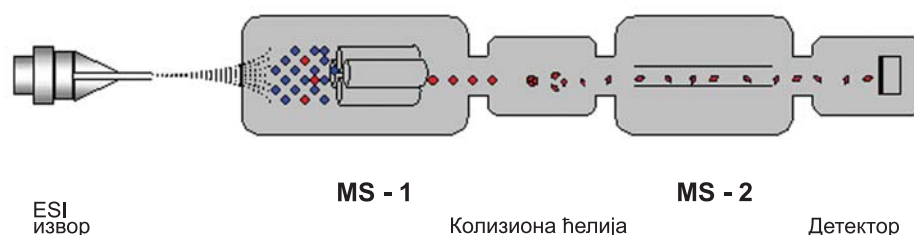
Основна конфигурација инструмента [28, 29] за MS/MS експерименте је комбинација два масена анализатора са реакционим простором између њих (слика 11). Велики број конфигурација може бити употребљен за MS спектрометрију, а основни концепт укључује мерење m/z јона пре и после реакције у масеном спектрометру. Реакција подразумева промену у маси и може бити приказана на следећи начин:



где је m_p^+ прекурсор (родитељ) јон, m_d^+ је продукт (ћерка) јон а m_n представља један или више неутралних врста (неутрални губитак). Са становишта маса важи:

$$m_p = m_d + m_n \quad (9)$$

У основи MS/MS експеримента је селекција прекурсора јона у првој фази анализе, и анализа маса продуката јона у другој фази анализе (енгл. product ion scan). Фрагментација прекурсора јона зависи од активационе енергије реакције. Енергија за савлађивање ове баријере потиче од вишка енергије акумулиране у прекурсор јону у току јонизације. Метастабилни јон који у току јонизације добија довољно унутрашње енергије за фрагментацију и опстаје довољно дуго до екстракције из јонског извора, може дисосовати спонтано у току „лета“ (путовања) од јонског извора до детектора. Двоструко фокусирајући сектор инструмента може се користити да детектује метастабилне јоне. MS/MS има аналитичку примену у комбинацији са благим (soft) јонизационим техникама где би без MS/MS добили само информацију о „недирнутом“ (целовитом) молекулу и не би се могла посматрати фрагментација.



Слика 11. Принцип тандем (MS/MS) спектрометрије

Информације добијене карактеристичним путевима фрагментације су важне и сударом индукована дисоцијација (CID) је идеално решење. Први корак у CID-у је актуелни судар између јона који се брзо крећу и непокретних неутралних мета, што резултује повећањем унутрашње енергије јона. Други спорнији корак обухвата спонтану фрагментацију [30] ексцитираног јона при чему се добија продукт јон и неутрални фрагменти. Постоје два режима за CID: нискоенергетски (примењују се десетине електрон волти-eV) и високо енергетски (примењују се хиљаде електрон волти). У пракси ниско енергетски CID се изводи тако што се сноп убрзаних електрона усмерава да пређе запремину запоседнуту молекулима гаса или атомима као метом. У MS/MS инструментима масени анализатори су раздвојени у простору, као код tripl quada (QqQ). Простор који „затвара“ ову запремину зове

се колизиона ћелија. У колизионој ћелији се дешава велики број судара чији је допринос (процент фрагментисаних јона који долазе до детектора) веома висок. Нискоенергетски CID спектри су веома осетљиви на мале промене у колизионој енергији, промене притиска колизионог гаса и масу неутралне мете. Поред продукт јон скан мода већина MS/MS инструмената ради и у другим скан модовима. Примена различитих модова је корисна не само за тумачење фрагментационе схеме одређеног једињења, већ и за скрининг серија структурно повезаних једињења у комплексном узорку. У продукт јон скан моду први масени анализатор селекује одређене прекурсор јоне, док се продукт јони добијени CID-ом анализирају у другом масеном анализатору. У прекурсор јон скан моду овај процес је виртуелно „реверзан“.

1.1.11.1. Фрагментација у тандем масеној спектрометрији

Фрагментација јона у гасној фази је основ тандем масене спектрометрије између различитих фаза масено спектрометријске анализе [30, 31]. Постоји много метода које се користе за фрагментацију јона и тако се добијају различите информације о структури и саставу молекула.

Фрагментација у извору (распад јона у самом извору за јонизацију)

Често се дешава да је процес јонизације јак да оставља продукт јоне са довољном унутрашњом енергијом да се фрагментују у масеном спектрометру. Ако продукт јони постоје у неравнотежном стању умерено дуго пре него што започне процес дисоцијације овај процес се зове метастабилна фрагментација [32]. Nozzle-skimmer фрагментација (фрагментација која се дешава у области између испуста, отвора (nozzle) и прскалице (skimmer) се односи на циљану индуковану фрагментацију у извору повећањем потенцијала на скимеру ESI инструмента.

Мада фрагментација у извору омогућава фрагментациону анализу то технички није тандем масена спектрометрија све док се метастабилни јони анализирају масеном спектрометријом или се одабирају пре аутодисоцијације. Други корак анализе се изводи на резултујућим фрагментима. Фрагментација у извору се често користи као додатак тандем масеној спектрометрији са фрагментацијом ван извора која омогућава два корака фрагментације у псеудо MS³ експериментима.

Фрагментација ван извора се најчешће користи у тандем масено спектрометријским експериментима. Енергија се такође може додати јонима који су већ вибрационо ексцитирани кроз сударе ван извора са неутралним атомима или молекулима, апсорцијом зрачења или трансфером или заробљавањем електрона вишеструко наелектрисаним јоном. Сударом индукована дисоцијација (CID) која се другачије зове и сударом активирани дисоцијација (CAD) подразумева сударе јона са неутралним атомом или молекулом у гасној фази и следећем кораку дисоцијацију јона [33, 34].

На пример ако размотримо

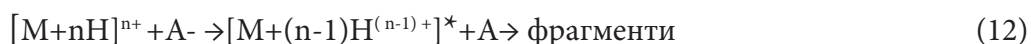


где је AB⁺ јон који се судара са неутралним врстама M и касније раскида везу.

Ово се детаљније описује колизионом теоријом. Ако се електрон придружи вишеструко наелектрисаном позитивном јону, ослобађа се Кулонова енергија. „Придруживање” слободног електрона се зове ECD–дисоцијација заробљавањем електрона [35, 36] и приказује се једначином:



За вишеструко протноване молекуле M присаједињавање електрона кроз једначином реакције зове се електрон трансфер дисоцијација-ETD и приказује се једначином:



Оваква фрагментација се такође дешава са депротонаним врстама у којима је електрон који се преноси са дате врсте на катјонски реагенс у току дисоцијације са негативним електронским преносом -NETD:



Енергија неопходна за дисоцијацију може се обезбедити апсорпцијом фотона што резултује фотодисоцијацијом и представља се једначином:

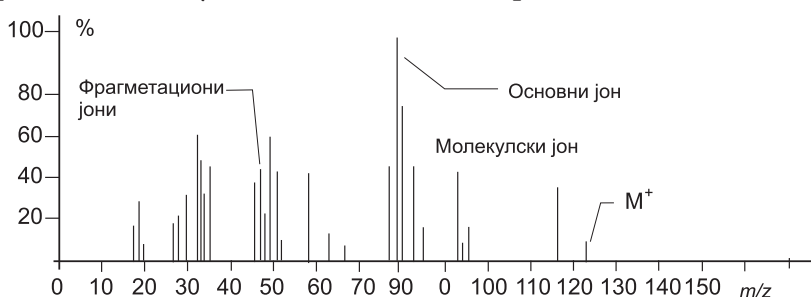


где је $h\nu$ фотон абсорбован од стране јона [37-39].

1.1.12. Масени сџектџар

Масени спектар је аналитички приказ резултата [38] масено-спектрометријског мерења, који представља функционалну зависност интензитета појединих јона од количника масе и наелектрисања m/z (Слика 12). Добија се у графичком облику на одговарајућем регистратору, који се затим нормализацијом (прерачунавањем релативних интензитета свих пикова у односу на најинтензивнији пик) преводи у спектар у линијском облику.

- Апсциса: m/z
- Ордината: релативна заступљеност (abundance), релативан интензитет



Слика 12. Изглед масеног спектра

1.1.13. Констиџуенџи масеноџ сџектџара

При судару молекула узорка с електронским снопом у јонском извору спектрометра долази до јонизације и фрагментације молекула [39]. Стварају се врсте јона различитог карактера и интензитета, који се одражавају у сложенем масеном спектру. Први корак у прикупљању информација из масеног спектра представља класификацију јона који одговарају појединим линијама (пиковима) у спектру. На масеном спектру (Слика 12) су означени :

1. Основни јон, јон са највећим интензитетом у спектру,
2. Метастабилни јон (M^+), јон који се налази на нецелобројним вредностима маса,
3. Вишеструко наелектрисани јони,
4. Преуређени јони,
5. Фрагментациони јони (M^+ , M^{++} , F^+),
6. Изотопски јони,
7. Негативни јони
8. Јони настали у јонско-молекулским реакцијама

Основни јон је увек најинтензивнији јон у спектру без обзира на то, да ли је он молекулски или фрагментациони јон, његов се интензитет процењује на 100%. Остали јони се у спектру обрачунавају у односу на основни јон.

Молекулски јон M^+ је јон чија је маса једнака молекулској маси једињења [3]. Молекулски јони, или јони основног молекула, настају откидањем једног електрона из молекула узорка, односно, формира се елиминацијом једног електрона из неутралног молекула, спаривањем електрона из молекула са једним електроном велике енергије.



Значај молекулског јона који се налази на маси m/z и која одговара молекулској маси једињења је у томе што он најтачније и најпоузданије одређује молекулску масу испитиваног молекула.

Различите групе органских једињења имају различити релативни интензитет молекулског јона. Тако у спектрима алкохола, амина, карбонских киселина молекулски јон (M^+) је слабог интензитета (5-25%) у неким случајевима може и да изостане.

За разлику од ових, код ароматичних једињења молекулски јон (M^+) је један од најинтензивнијих ако не и најинтензивнији, односно основни јон.

Ако једињење садржи елемент са више природних изотопа онда су они садржани у јонима $M^+ + 1$, $M^+ + 2$, $M^+ + 3$, у зависности од природе и броја природних изотопа.

Интензитет молекулског јона, односно релативна обилност молекулског јона у односу на фрагментационе јоне у масеном спектру може се повећати смањивањем енергије електрона до близу вредности потенцијала јонизације молекула, при стандардним условима снимања.

1.1.14. Интерпретација масених спектра

Стандардна процедура интерпретације спектра обухвата [3] прикупљање следећих информација: молекулску масу, елементарни састав, број прстенова и двоструких веза (незасићеност), „подструктуре“, корелацију између „подструктуре“ и фрагментације, итд. Претпостављени могући молекул упоређује се са подацима из базе података (Mc Lafferty база садржи 220,000 различитих једињења), [41]. При интерпретацији масених спектра основне информације се добијају на основу вредности m/z . Вредност m/z мора бити прецизно измерена ($\pm 0,5$ масених јединица). Да би се проверила поузданост одређивања m/z треба прво снимити интерни стандард (перфлуороалкана, $C_n F_{2n+2}$). Већина пикова су целобрајне масе, међутим вишеструко наелектрисани јони јављају се у виду масе чија је вредност разломак. Базична информација за идентификацију једињења је молекулска формула, број елемената конституената. Када су у спектру присутни изотопи, изотоп најниже масе је увек најзаступљенији у спектру за сваки елемент.

Бројне јонизационе технике дају радикал катјоне или радикал ањоне, протонване или депротонване молекуле и различите адукте. Ови јони дају фрагменте са парним бројем електрона (попуњене љуске) или са непарним бројем електрона (непопуњене љуске).

1.1.14.1. Типични јони

Неки јони су типични за одређене структуре. На пример једињења која садрже угљоводоничне ланце дају серије јона са међусобном разликом од 14 Da ($-CH_2$). Маса на којима се они појављују зависе од група које су са њима везане. Потпуно засићени угљоводонични јони јављају се на масама 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99 Da .

Молекули са бензенским језгром често дају фенилијум јон на m/z 77, којима се придружују фрагменти који одговарају губитку ацетилена на m/z 51. Ако је за алкил ланац везано језгро бензена, добијају се јони на m/z 91, који су комбинација бензилијум и тропилијум структуре, која даје фрагмент на m/z 65 при губитку ацетилена.

1.1.14.2. Присуство молекулској јона

Код електронског судара молекулски јони су слабо видљиви у случају линераних засићених угљоводоника. Гранање обично проузрокује ишчезавање пика молекулског јона. Међутим, код незасићених, нарочито код оних са ароматичним прстеном, пик молекулског јона је интензивнији.

Присуство електронегативних хетероатома (кисеоника, флуора) спречава појаву молекулског јона. Интензитет зависи од група које су присутне. Стога алифатични естри дају слаб или одсуство молекулског јона, док ароматични дају интензиван пик молекулског јона. Употребом благе јонизационе технике (ESI) у позитивном моду (M-H)⁺ се најчешће детектује код засићених једињења и (M+H)⁺ у случају незасићених једињења или једињења која садрже хетероатоме. Међутим халогена једињења или једињења која садрже sp³ кисеоник често спречавају могућност посматрања молекулског јона. Стога је тешко формирати молекулски јон или псевдомолекулски јон ацетала или ортоестара.

1.1.14.3. Типични неутрални „губици“

Губитак водониковог атома код електронског судара се дешава код алдехида, у случају хетероцикла који садрже кисеоник или азот [10, 39] или када је више водоникових атома везано за α угљеник, за азот или атом кисеоника.

Губитак молекула водоника се посматра код сваке јонске врсте (позитивне или негативне, валентне–непопуњене или попуњене љуске) и сваки пут доприноси коњугацији или ароматичности. То је заједничко за циклична једињења.

Губитак од 15 Da типичан је за метил групу и засићени прстен. MS спектар циклохексана са M_r=84 Da, показује фрагмент на m/z 69 са релативним интензитетом 25 %. Овај јон је присутан и у ESI спектру тетралина.

Губитак од 16 Da одговара губитку метана или N оксида или сулфоксида што указује на губитак кисеоника.

Фрагментација чији је резултат губитак воде се „види“ као губитак од 18 Da. Ово је честа појава када је хидроксилна група присутна и за различите врсте јона. Молекули који садрже карбонилну групу обично не губе воду, изузев из њихових коњугованих киселина. У случају неароматских прстенова губитак од 18 Da одговара обично (H₂+CH₄).

Губитак од 19 или 20 Da је типичан за флуор чија је атомска маса 19 Da. У случају узастопних губитака, вода и водоник могу дати губитак од 20 Da. Неки неутрални губици су карактеристични за нарочите структуре и показују велику аналитичку корист. На пример естри масних киселина губе 3 C атома до карбоксиметила и атоме водоника специфичним преуређивањем. Губитак од 44 Da је типичан за неутрални молекул CO₂.

1.1.14.4. Интерпретација масеног спектра неизнатој једињења обухвата:

1. Претраживање библиотеке спектра [6]
2. Прикупљање података о хемијској историји узорка
3. Могућност идентификације M⁺• (позитивно наелектрисан молекулски јон) или проверавања да ли је присутан у спектру
4. Проверавање да ли се номинална молекуларна маса јавља на параној или непарној m/z вредности Узимање у обзир правила азота
5. Одређивање када је то могуће, елементарног састава за јоне коришћењем интензитета изотопског пика
 - Одређивање номиналне масе јона
 - Нормализовање интензитета пикова
 - Потрага за A+2 pattern-ом елемената (осим O)

- Коришћење $X+1$ интензитета пика за одређивање броја и врсте $A+1$ елемената.
 - Израчунавање броја O атома из $X+2$ интензитета пика ($X, X+1$, су пикови са m/z вредношћу већом или мањом од пикова у спектру са одређеним бројем јединица).
 - Процењивање масе преосталих A елемената
6. Анализирање на шта општи изглед спектра указује
 7. Потрага за серијама јона мањих маса (може их бити више од једне)
 8. Ређање првих „губитка“ од $M^{+\bullet}$ и покушај да се прикаже њихова схема
 9. Проналажење интензитета непарних-електрон јона у спектру
 10. „Сабирање” свих ових информација и претпостављање структуре. Израчунавање укупног броја прстенова и двоструких веза у $M^{+\bullet}$ опште формуле $C_xH_yN_zO_n$, где X може бити водоник или халогенени елемент или комбинација оба:

Укупан број прстенова и двоструких веза $x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$, где сеједна половина односи на паран број електрона.

1.1.14.5. Одређивање наелектрисања

Постоји више начина да се одреди наелектрисање које одговара пик у спектру, па према томе и маса. Први начин је на основу изотопских пикова [6, 40, 41]. За скуп изотопских пикова разлика у масама од 1 а.м.у одговара једноструко наелектрисаном јону. Разлика од 0,5 а.м.у одговара двоструко наелектрисаном јону. На овај начин наелектрисање се може одредити ако је присутан само један пик или скуп изотопских пикова. У спектрима често се појаве адуктни јони H^+ , Na^+ или NH_4^+ на основу чега се може одредити наелектрисање. Натријумов адукт једноструко наелектрисане честице биће на плус 22 а.м.у даље од MH^+ пика. Ако је јон двоструко наелектрисан адукт јавиће се на +11 а.м.у од MH^+ пика. Следећи начин одређивања је на основу претпостављеног наелектрисања.

У ESI извору формирање димера и тримера компликује интерпретацију спектра. То се обично отклања смањивањем концентracије анализата или променом јонизујућих параметара (напона). Ако је претпостављено наелектрисање +1 додаје се протон вредности m/z посматраног јона и дели се са један. Ако тако израчунато m/z даје сигнал у спектру на тој m/z вредности претпоставка о +1 наелектрисању је тачна. Ако израчунато m/z не даје у спектру дату m/z вредност треба претпоставити другачије наелектрисање. За узастопна наелектрисања треба израчунати m/z и видети да ли постоје сигнали при тим m/z . Ако имамо једињења масе 1000 и 2000 вишеструко наелектрисана стања ће се разликовати за ова два једињења. За једињење 2000 појавиће се пикови на 2001 ($z=1$), 1001 ($z=2$), 667 ($z=3$) и 501 ($z=4$) уз претпоставку да m није било наелектрисано. За једињење масе 1000 појавиће се пикови 1001 ($z=1$), 501 ($z=2$) 334 ($z=3$) и 251 ($z=4$).

1.1.15. Изотопна супституција у масеној спектрометрији

Присуство елемената са више стабилних природних изотопа има за последицу појаву јона на маси m/z $M^+ + 1$, $M^+ + 2$, $M^+ + 3$, $M^+ + 4$, што зависи од врсте и количине присутног изотопа [3].

Многи елементи садрже два или више природних изотопа (Табела 2) .Тако, бром садржи два изотопа Br^{79} и Br^{81} и даје два молекулска јона $M^+ - Br^{79}$ и $M^+ - Br^{81}$ чији су интензитети приближно у односу 49,5: 50,5. Код спектра метана је молекулски јон састављен из два јона и то јона m/z 16 који потиче од $C^{12}H_4^+$ и јон m/z 17 који потиче од $C^{13}H_4^+$ који је мањег интензитета и јони који се налазе на m/z 18, који су занемарљиво мали, а потичу од $C^{13}H_3H_2^+$ и $C^{12}H_4H_2^+$.

Табела 2. Природни изотопи, њихова заступљеност и масе [4]			
Изотоп	Егзактна маса	Процент заступљености	Хемијска маса
1H	1,00782510	99,9852%	1,00794
2H (D)	2,01410222	0,0148%	
12C	12,0(0)	98,892%	12,01100
13C	13,0033544	1,108%	
14N	14,00307439	99,635%	14,00674
15N	15,0001077	0,365%	
16O	15,99491502	99,759%	15,99940
17O	16,9991329	0,037%	
18O	17,99916002	0,204%	
26Al	25,986892		
27Al	26,98153863	100%	26,98154
35Cl	34,96885268	75,78%	35,45279
37Cl	36,96590259	24,22%	
19F	18,99840322	100%	18,99840

У интерпретацији масених спектра користе се подаци о међусобним интензитетима сигнала и релативној заступљености да би се лакше дешифровао изотопски pattern [29, 41]. Анализа изотопског pattern-а уз анализу m/z је основ идентификације у масеној спектрометрији.

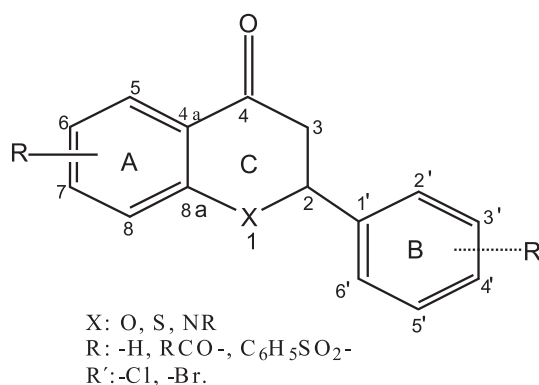
1.2. Хинолони

Хинолони су синтетички антибиотици широког спектра дејства. Произашли су из налидиксинска киселине. Хинолонима припадају и деривати нафтиридина, пиридопиримидина и хинолина, који садрже додатне атоме азота у једном или другом спојеном прстену [42, 43]. Краћи назив 4-хинолони је усвојен као генеричко име за све антибактеријске агенсе ове групе једињења.

Сви 4-хинолони су деривати 1,4-дихидро-4-оксо-пиридин-3-карбонске киселине. Увођењем супституената у положаје 1-, 2-, 5-, 7 и 8 настају различите структуре хинолона.

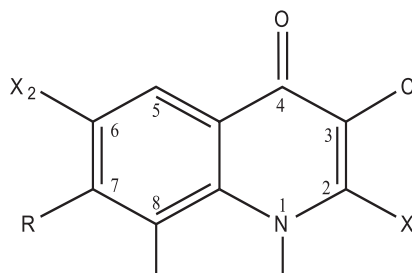
Као протон акцептор ових једињења појављује се секундарна аминок група из пиперазинског, пиролидинског, пиперидинског прстена која може да прими протон и пређе у амонијум групу. Протон донор је карбоксилна група везана за хинолонско језгро. Општа структура хинолона приказана је на Слици 13.

Према антибактеријском спектру дејства хинолони се деле у различите генерације (I, II; III; IV и генерација у развоју).



Слика 13. Општа структура хинолона

Увођењем атома флуора у основно језгро настају флуорохинолони. Атом флуора везан је за централни прстен а типичне позиције су С6 и С7 (Слика 14) .



Слика 14. Нумерација атома у хинолонском прстену

Растворљивост молекула хинолона у телесним течностима утиче на њихову биорасположивост као и на њихову апсорпцију, дистрибуцију и елиминацију. Сви имају висок степен расподеле што указује на њихову добру дифузију у ткива, органе и телесне течности.

1.2.1. Флуоровани хинолони

Флуорохинолони су класа антимицробних агенаса који су уведени осамдесетих година да би се превазишао проблем резистенције многих бактерија на досада примењиване антибиотике. Флуорохинолони прве групе су активни против многих грам позитивних и грам негативних бакерија али су опет донекле ограничени појавом резистенције. Друга генерација флуорохинолона има шири спектар дејства и овде није присутан проблем резистентности.

Флуорохинолони су хетероцикличне аминокиселине. Ова једињења су диполарни (zwitter) јони и различите су растворљивости у зависности од рН. Слабо се растварају у води. Лако се растварају у киселинама и базама [45, 58]. Раствори у базама су стабилни до рН = 12. При вишим рН вредностима долази до хидролизе и разлагања молекула флуорохинолона. Већина ових једињења се раствара у хлороформу и метиленхлориду. Растворљивост у етанолу, метанолу, ацетону и етру је мала. Захваљујући присуству ароматичних делокализованих пи електрона и електронегативних хетеро атома, посматрани флуорохинолони су високо поларизабилни и стога подложни мноштву специфичних интеракција са поларним растварачем: протоновање, специфична солватација итд. С обзиром да су ови молекули конформацијски флексибилни, то утиче на њихову реактивност и солватацију. У Табели 3. су приказани подаци о растворљивости флуорохинолона који су коришћени као лиганди од интереса у овој дисертацији (флероксацин, моксифлоксан и ципрофлоксацин).

Табела 3. Растворљивост флуорохинолона (mg/cm ³) на 25°C			
Растварач	Моксифлоксацин	Ципрофлоксацин	Флероксацин
Вода	24	35	0,450
Метанол			0,300
Етанол	2,5		0,100
Пропиленгликол			0,150
Диетилетар			<0,001
Ацетон	0,072		0,500
Хлороформ			4
n-хексан			<0,001
Глацијална CH ₃ COOH			300
Ацетонитрил	0,27		
Дихлорометан	0,068		
N,N- диметилформаид	7,6		

Растворљивост ципрофлокстацина у етанолу и 2-пропроланолу је за 2 до 3 реда нижа него његова растворљивост у води а у случају моксифлоксаина за један ред величине је нижа. И

ципрофлоксацин×НСl и моксифлоксацин×НСl показују исти тренд растворљивости у датим растварачима. Ово је последица чињенице да су сличне структуре оба флуорохинолона и показују високу растворљивост у води најмање за један ред величине већу него у другим растварачима. Ова чињеница је последица присуства хидрохлорне групе која у води постаји (Cl⁻) водећи до формирања јонских врста и повећавајући растворљивост цiproфлорксацина у води. Растворљивост цiproфлорксацина показује већу температурску зависност него растворљивост моxифлорксацина.

Флуорохинолони су мали молекули молекулске масе између 300 и 500 Da. Показују афинитет ка хелатирању са металним јонима као што су: Cu, Pb, Zn и Mg [43, 46, 47]. Флуорохинолони су осетљиви на светлост. При дуготрајном чувању, да не би изгубили активност, морају бити заштићена од светлости.

Примењују се у третману уринарних, респираторних инфекција, у терапији мешовитих инфекција костију, меких ткива, у гинекологији. Неки се користе и као хемиотерапеутици [42].

Флуорохинолони друге генерације (ципрофлорксацин, флероксацин ломефлорксацин, норфлорксацин, грепафлорксацин, офлорксацин) имају побољшну активност (око 1000 пута већу) према аеробним грам-негативним бактеријама, а показују активност и према аеробним грам-позитивним бактеријама.

Флуорохинолони четврте генерације (моxифлорксацин, тровафлорксацин) имају значајну активност према анаеробним бактеријама, а задржавају активност и према аеробним грам-негативним бактеријама.

Клиничка испитивања су показала да истовремена примена флуорохинолона [42, 43] и антацида на бази алуминијума води до смањене биолошке доступности антибиотика и до 40 %. Присуство флуорохинолона може утицати на апсорпцију алуминијума преко формирања Al(III)-јон- HQ комплекса који могу бити стабилни толико да доведу до смањења концентрације слободних Al(III)-јона.

1.2.1.1. Физичко-хемијске особине флуорохинолона

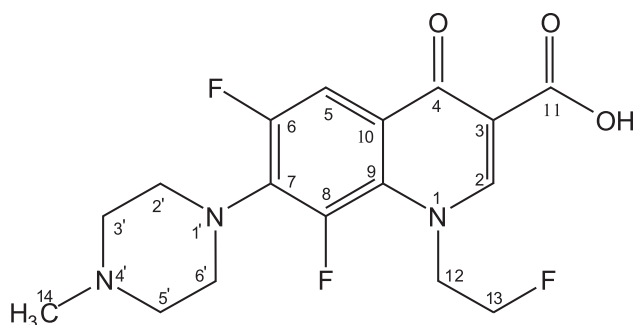
Физичко-хемијске особине као што су константе дисоцијације, растворљивост, партициони коефицијенти значајне су за разумевање адсорпције, транспорта, метаболизма и екскреције ових молекула. Макроконстанте дисоцијације показују алкалитет самих молекула као целине, док микорконстанте описују способност везивања појединих функционалних група [48, 49, 50, 51].

Људски организам је састављан од 70–75 % воде. Како је просечна молекулска маса лека 400 g/mol, доза од 400 mg даје концентрацију од 2×10^{-5} mol/dm³ лека у организму. Дакле, у организму су присутни као разблажени раствори. Кисело-базне особине лека директно утичу на апсорпцију, екскрецију и компатибилност са другим лековима. Типичне вредности макро (pK_i) и микро константи (pK_{ij}) дисоцијације испитиваних флуорохинолона дате су у Табели 4.

Табела 4: pK вредности флуорохинолона							
Флуорохинолон	pK_1	pK_2	pK_{22}	pK_{11}	pK_{21}	pK_{12}	pI
Цiproфлорксацин	6,11	8,50	6,19	7,04	8,72	6,19	7,46
Флероксацин	5,50	8,00					6,86
Моксифлорксацин	6,25	9,29	7,46	6,29	8,08	9,25	7,77

1.2.2. Флероксацин–опште особине

Флероксацин (6,8-дифлуоро-1-(2-флуороетил)-1,4-дихидро-7-(4'-метил-1'-пиперазинил)-4-оксо-3-хинолин карбоксилна киселина) припада II генерацији флуорохинолона. Има три атома флуора: два су директно везана за хинолонски прстен, а један је у бочном низу (Слика 15).



Слика 15. Структурна формула флероксацина

Општа формула флероксацина је $C_{17}H_{18}F_3N_3O_3$. Релативна молекулска маса је 369,34 g/mol.

Први пут је описан раних 80-тих година, а синтетисан је у лабораторији Hoffmann-La Roche и Kuorin 1985. године. Флероксацин је бео, нехигроскопан, кристални прашак без укуса и мириса. Врло је осетљив на светлост и сва испитивања се морају вршити заштићено од светлости. Више од 99,5 % честица има пречник већи од 50 μm . Партициони коефицијент флероксацина је 1,08 (октанол/вода).

Флероксацин је слабо хидросолубилан и умерено липосолубилан [45, 51]. Испитивање растворљивости флероксацина у различитим растварачима показују да се флероксацин најбоље раствара у неполарним растварачима (хлороформ), киселинама и базама. У растворима јаким база флероксацин је нестабилан и брзо подлеже хидролизи и разлагању при рН вредностима изнад 10. Од поларних растварача најбоље га растварају они који могу са њим да награде водоничну везу и који се понашају као акцептори протона (диметилсулфоксид). Пошто је по хемијском саставу хетероциклична аминокиселина у воденим растворима, може постојати у облику протонизованог катјона, диполарног јона, неутралног молекула и анјона. Константе дисоцијације флероксацина у воденом раствору на 298 K и при јонској јачини 0,1 mol/dm³ износе $pK_1 = 6,97$, $pK_2 = 8,21$. Прва константа дисоцијације се односи на дисоцијацију протона карбоксилне групе катјона флероксацина, а друга на дисоцијацију протона са протонизованог азота пиперазинског прстена. Физичкохемијска и фармакокинетичка својства флероксацина при другим експерименталним условима показују друге вредности константи дисоцијације $pK_1 = 5,5$, $pK_2 = 8,0$.

Електронски апсорпциони спектар флероксацина има два максимума: први на 280 nm који потиче од апсорпције делокализованог π -електронског система хинолонског језгра. Други максимум се налази на 320 nm и потиче од апсорпције пиперазинског супституента [51, 52, 53].

Флероксацин показује природну флуоресценцију. У воденом раствору, ексцитациони максимум се налази на 280 nm, а емисиони на 450 nm.

Гради хелатне комплексе са металним јонима прелазних метала као што су бакар, олово, цинк и магнезијум. Наведени комплекси су мање хидросолубилни и због тога имају мању антибактеријску активност.

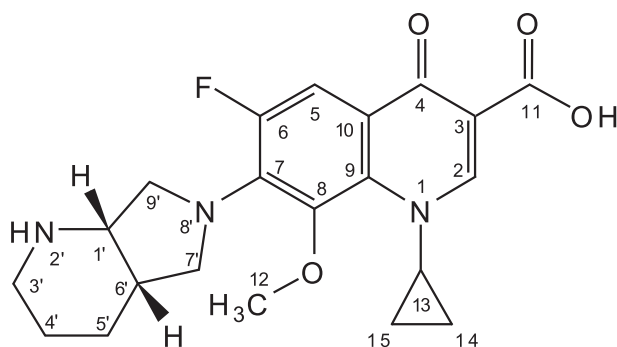
Није запажено разлагање флероксацина ни после месец дана на 65 °C, било у сувој атмосфери било при 85 % релативној влажности. Нема хиралних центара и синтезом се не добијају оптички изомери.

1.2.3. Моксифлоксацин–опште особине

Моксифлоксацин је новија, IV генерација антибиотика која делује против широког спектра патогена, укључујући и *Streptococcus pneumoniae*, резистентну на многе друге антибиотике. Заштићени назив регистрованог препарата моксифлоксацина је „Avelox“.

Моксифлоксацин (1-циклопропил-7 [(s,s)-2',8'-диазабицикло [4,3,0]нон-8'-ил]-6-флуоро-8-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолин карбоксилна киселина) је кристална супстанца светло жуте боје, горког укуса [51, 54]. Општа формула моксифлоксацина је $C_{21}H_{24}FN_3O_4$. Релативна молекулска маса 401,43 (Слика 16).

Моксифлоксацин хидрохлорид нема дефинисану тачку топљења, али на температурама изнад 250 °С долази до његове разградње. Специфична ротација раствора моксифлоксацина концентрације 10 mg/cm³ у 50 % ацетонитрилу је $[\alpha]^{20} = -131^{\circ}$.



Слика 16. Структурна формула моксифлоксацина

Инфрацрвени спектар моксифлоксацина показује карактеристичне траке на следећим таласним бројевима (cm⁻¹): 3528–3470, 3068–2830, 2796–2083, 1709–1623 и 1515–1352. Најизраженије траке су у области 1515–1352 cm⁻¹. Потичу од истежућих вибрација C=C ароматичног језгра и савијајућих вибрација N–H, C–H и C–N–C прстена. Такође су изражене и истежуће вибрације C=O карбонилне групе у области 1709–1623 cm⁻¹ [59].

Електронски апсорпциони спектар моксифлоксацина је врло сличан спектру осталих флуорованих хинолона тј. има два максимума: први максимум је на 294 nm и потиче од апсорпције делокализованог π електронског система хинолонског језгра. Други максимум се налази на 330 nm и потиче од апсорпције пиперидинског и пиролидинског супституента.

Моксифлоксацин има 2 pK_a вредности. Прва pK₁ износи 6,25 и потиче од дисоцијације протона карбоксилне групе, а друга pK₂ износи 9,29 и потиче од дисоцијације протона са азота на C7 супституенту [55].

Моксифлоксацин је чист S,S-енантиомер са два асиметрична центра. Одговарајућа стереохемијска конфигурација је осигурана полазним материјалом S,S-пироло-пиперидином, па није потребна стерео-селективна синтеза нити сепарација рацемата.

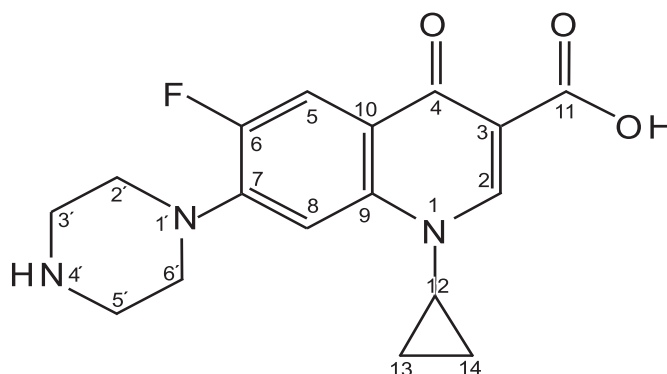
1.2.4. Ципрофлоксацин–опште особине

Ципрофлоксацин је синтетички хемотерапеутски антибиотик флуорохинолонског типа комерцијално познат под називом „Ciprinol“. Припада II генерацији флуорохинолонских антибиотика [56, 57, 58, 60].

Ципрофлоксацин: 1,4-дихидро-1-циклопропил-6-флуоро-4-оксо-7-(1-пиперазинил)-3-хинолон карбоксилна киселина има општу формулу: $C_{17}H_{18}FN_3O_3$. Релативна молекулска маса: 331,34 (Слика 17).

Хинолони имају два типа прстенова у структури, нафтиридински са азотним атомомом у положају 1 и 8, језгро са само једним азотом у положају 1 које се зове уствари хинолонски прстен (језгро). Они садрже кето кисеоник у C-4 положају и карбоксилни ланац у C-3

положају. Моксифлоксацин и ципрофлоксацин садрже пиперазилску групу у С-7 положају. Присуство карбоксилне и аминок групе има утицај на кисело базна својства ових лекова чини да на својства ових лекова утицај имају физичкохемијска својства растварача [64].



Слика 17. Структурна формула ципрофлоксацина

Електронски апсорпциони спектар ципрофоксацина има два максимума: први на 275 nm који потиче од апсорпције делокализованог π -електронског система хинолонског језгра. Други максимум се налази на 330 nm. На нижим таласним дужинама налази се симетрична трака јаког интензитета, док се на вишим таласним дужинама налази асиметрична трака знатно мањег интензитета.

Инфрацрвени спектар ципрофлоксацина показује карактеристичне траке на следећим таласним бројевима (cm^{-1}): 3442–2701, 1731–1518, 1468–1194 и 761–561. Најизраженије траке су у области 2701–1731 cm^{-1} и оне потичу од N-H асиметричних истезања и C=O истежућих вибрација карбонилне групе. Карактеристичне су и јаке траке на 1264 cm^{-1} које потичу од CH савијања у равни, као и на 1194 cm^{-1} од CH савијања и CH увијања и C-O истезања [59, 62].

NMR спектри ципрофлоксацина ^1H и ^{13}C карактеришу се мултиплетима и померајима карактеристичних сигнала. У ^1H спектрима ципрофлоксацин х НСI карактеристични су помераји Н-2 (9,14s), Н-5 (8,14d), Н-8 (7,71d) уз супституенте циклопропил групе (CH₂ 1,26-1,52 m, CH 3,89 m) и пиперазинску групу (Н-3' 3,53 m, Н-2' 3,75 m) [61, 62, 63].

У ^{13}C спектрима карактеристични је група хемијских помераја испод 60 ppm, који одговарају супституентима везаним за језгро хинолона, а помераји изнад 100 ppm одговарају С атомима који чине само језгро. За сигнале изнад 110 ppm карактеристична су преклапања сигнала која потичу од C3, C5 и C8 угљеникових атома. ^{13}C помераји ципрофлораксацина [62] у DCI (147,5, 109,5, 167,2, 168,1, 113,(113,2) 150,1 (155,2), 145,1 (145,4), 104,5, 138,8, 119,2.

1.3. Алуминијум

Према распрострањености у земљиној кори [65] (масени удео 8 %) алуминијум је трећи елемент, одмах после кисеоника и силицијума. Уобичајени опсег алуминијума у земљишту креће се од 1-30 %. У природи се не налази у елементарном стању, већ је у облику руда. Најважнија руда алуминијума је боксит. Велике количине алуминијума се налазе у облику минерала на бази алумино-силикатних комплекса као што су: глине и фелдспат. Анхидровани алуминијум-оксид (Al₂O₃) се јавља у природи као корунд. Различито обојени корунд служи као драго камење. Ако је корунд онечишћен траговима кобалта обојен је модро и зове се сафир; онечишћен траговима хрома обојен је црвено и зове се рубин. Зелено обојени корунд назива се смарагдом, љубичасти аметистом и жути топазом.

1.3.1. Физичко-хемијске особине алуминијума

Алуминијум је мек, попут сребра бео метал [65]. Спада у групу лаких метала (густина $2,79 \text{ g/cm}^3$). Дobar је проводник електричне струје и топлотне енергије. Његове физичке особине еластичност, лака топовост, могућност лаке обраде ваљањем, сечењем и извлачењем учиниле су да се алуминијум доста користи у индустрији. Постојан је на корозију, рефлектор је светлости, не ствара магнетно поље. Пошто је чист алуминијум превише мек, даље се прерађује у облику легура (најчешће се легира са Mg, Ti, Si, Ni...). Легуре алуминијума имају знатно боља механичка својства од чистог алуминијума. Најпознатије легуре су: дуралуминијум, силумин, мангалијум.

Алуминијум се налази у III а групи Периодног система елемената са редним бројем 13. Атомска маса алуминијума је 27,0. Има мали атомски радијус који омогућава стабилност његових једињења. Ковалентни радијус алуминијума је 0,125 nm, а јонски радијус је 0,045 nm. Оксидациона стања +3, +1 (веома ретко). У основном стању атом алуминијума има конфигурацију $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^1$. Конфигурација задњег нивоа се може представити схематски:



Неке од карактеристика овог елемента [65] дате су у Табели 5.

Табела 5: Енергија јонизације, коефицијент електронегативности и редокс потенцијал алуминијума					
Симбол елемента	Енергија јонизације [eV]			Коефицијент електронегативности	Редокс потенцијал $E^\ominus/V(\text{Al}^{3+}/\text{Al})$
	I	II	III		
Al	5,98	19,0	28,44	1,5	-1,66

Вредност редокс потенцијала указује да алуминијум релативно лако прелази из елементарног стања у 3^+ јон. Стабилно тровалентно стање Al(III)-јона се објашњава великом енергијом хидратације (4180 kJ/mol). Енергија хидратације је функција наелектрисања и величине јона. Са малим јонским радијусом (0,045 nm) и великим наелектрисањем Al(III)-јон има велики јонски потенцијал и у воденим растворима лако хидролизује у одсуству других лиганата. С обзиром да коефицијент електронегативности има малу вредност, не могу се очекивати једињења са негативним степеном оксидације.

У воденим растворима алуминијум се најчешће налази у стању +3. Са овим оксидационим бројем гради велики број једињења јонског и ковалентног карактера. Најчешћа координација алуминијума је 4 и 6. Координацији 4 одговара хибридизација sp^3 са тетраедарском структуром, док координацији 6 одговара sp^3d^2 хибридизација са октаедарском структуром.

Алуминијум је „најтврђи“ метални јон (међу 3^+ јонима). Формира комплексе повећане стабилности са лигандима са тврдим донорским групама. Најефективнији лиганди су они који садрже јако базне, негативно наелектрисане кисеоничне атоме: фенолати, карбоксилати, фосфати, алкоксиди и атом азота који су геометријски тако распоређени унутар молекула лиганда да се формирају петочлани или шесточлани металоцикли [67, 68, 69].

1.3.2. Типичне реакције алуминијум(III)-јона: хидролиза и комплексирање

Хидролиза алуминијум(III)-јона

Хидролиза је реакција разлагања воде у присуству јона или неутралних молекула. Када су у питању јони, разлажу се молекули воде координовани за дати јон. Хидролиза јона заједно са неутрализацијом и дисоцијацијом спада у протолитичке реакције [66, 70]. Постоје два типа хидролизе: самохидролиза (self) хидролиза која се јавља у изразито киселим растворима

и одвија се сама по себи (када хидратисани катјон алуминијума елиминише протон без додатка икаквих реагенаса) и принудна (forced) хидролиза, где се одвајање протона са хидратисаног катјона врши додатком регенаса који реагују са њим (прима протон). Услови хидролизе (тј. састав раствора и брзина којом се врсте комбинују, старење, температура, рН средине, природа анјона основног електролита, врста јонске средине) [66] одређују природу и квалитет прелазних полимерних врста, колоидних честица или формиране аморфне чврсте фазе. Главни проблем у изучавању хидролизе проистиче из чињенице да је то веома спор процес, при чему изгледа да ови системи никада не достижу праву равнотежу.

Као високо наелектрисан мали катјон Al(III)-јон лако хидролизује у воденим растворима у одсуству комплексирајућих лиганата. У растворима киселијим од рН~4 Al(III)-јон остаје нехидролизован.

Са порастом рН раствора Al(III)-јон хидролизује и даје различите мононуклеарне и полинуклеарне хидролитичке комплексе. У киселим срединама рН<3, алуминијум постоји у облику $Al(H_2O)_6^{3+}$ јона [66]. Са порастом рН (рН>4), дешава се брзо и реверзибилно депротоновање солватисаног молекула воде што доводи до формирања следећих врста: $[Al(OH)(H_2O)_5]^{2+}$, $[Al(OH)_2(H_2O)_4]^+$, $[Al(OH)_3(H_2O)_3]$ и $[Al(OH)_4(H_2O)_2]^-$, при ниским укупним концентрацијама алуминијума ($C_{Al} < 1 \text{ mmol/dm}^3$). Мале полинуклеарне врсте формирају се спорије и то су: $[Al_2(OH)_2(H_2O)_8]^{4+}$, $[Al_3(OH)_4(H_2O)_{10}]^{5+}$, а још много спорије стварају се велики полимерни јони $[Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$. Полинуклеарне врсте се формирају, ако је концентрација Al(III)-јона довољно висока (C_{Al} веће од 10 mmol/dm^3).

Неутрални раствори дају талог $Al(OH)_3$, који се поново раствара при повећању рН (рН>6), што за последицу има формирање $Al(OH)_4^-$. Ако у раствору нема других лиганата који су способни да задрже Al(III)-јон у раствору, равнотеже растварања за $Al(OH)_3$ и растворне хидроксо комплексе Al(III)-јона, морају се узети у разматрање са циљем да се опише стање Al(III)-јона у раствору.

Комплексирање алуминијум(III)-јона

Везивање хидроксидног и других лиганата за алуминијум јон одређено је термодинамичким и кинетичким факторима. Са термодинамичке тачке гледишта, однос високог наелектрисања према радијусу алуминијумовог јона предвиђа његову већу склоност ка електростатичком, него ковалентном везивању. Стога алуминијум формира стабилне комплексе са лигандима који садрже негативно наелектрисане органске функционалне групе, нарочито јако базичне кисеоничне атоме. И величина прстена може утицати на стабилност комплекса када су N атоми геометријски тако распоређени да се формирају петочлани или шесточлани металоцикли (EDTA, DTPA) [69, 71, 73]. Кинетички Al(III)-јон се разматра као лабилан метални јон са релативно брзом изменом воде и лиганда. Хидратисан алуминијумов јон је „најтврђи“ од свих тровалентних металних јона и има ефективни јонски радијус $0,50 \text{ \AA}$. Зато што је Al(III)-јон веома „тврђ“ метални јон, он има велики афинитет ка „тврђим“ анјонима. Међу „најтврђим“ донорима је кисеонични јон који се налази у полимерним Al(III) врстама; обично је координован са два или више Al(III)-јона. Мада су OH^- и F^- изоелектрични, OH^- има много већи афинитет за Al(III)-јон због делимично ковалентне природе Al-O координационе везе и због чињенице да је веза између Al^{3+} и F^- скоро потпуно јонска. Al(III)-јон формира најстабилније комплексе са мултидентантним лигандима са негативним кисеоничним донором, а афинитет ових лиганата ка Al(III)-јону се повећава са базношћу лигандних донорских група [67, 68, 69]. Монодентантни негативни кисеонични донори који се често налазе у мултидентантним лигандима, ефикасни су за Al(III)-јоне.

Константе протоновања ових донора указују да њихов афинитет за Al(III)-јоном варира са базношћу која се у воденим растворима мери константом протоновања. Стога се базност доносних атома лиганда мора узети у разматрање при изучавању равнотежа Al(III)-лиганд у воденим растворима.

Донорске групе могу бити комбиноване на различите начине међусобно, као и са другим органским групама да би дале бидентантне или полидентантне лиганде различите базности. Афинитет ових донора за Al(III)-јон одговара константама протоновања.[74] За мултидентантне лиганде са више од две донорске групе, веома су важни и други фактори, као што је промена конформације лиганда. Код мултидентантних лиганда са негативним кисеоничним доносима, афинитет расте са бројем доносних група и са базношћу доносних група. Координациони број је шест, код већине ових комплекса. Групе са најизраженијом базношћу, као што су алифатични и ароматични хидроксилни доноси генерално су протонване при ниским рН, чак и са присутним Al(III)-јоном, а много су доступније за везивање и ефективније на вишим рН. Донори мање базности, као што је карбоксилатни анјон су, у општем случају, доступнији при нижим рН, али их Al(III)-јон везује слабије.

Са аспекта склоности лиганда ка грађењу хелатних прстенова, различите величине са различитим металним јонима, с обзиром да је геометрија хелатног прстена таква да се петочлани хелатни прстенови граде са већим металним јонима, док се шесточлани хелатни прстенови граде са малим металним јонима. Примери хелатних прстенова који се граде по овом принципу могу се наћи у структурама цитратних комплекса. Тридентантне координације цитрата са металним јоном могу довести до формирања два шесточлана хелатна прстена или једног петочланог и једног шесточланог прстена у зависности од радијуса металног јона [70, 71].

Амини не везују Al(III)-јон јако, изузев као део мултидентатног лигандног система као што је нитрилотриацетат NTA и EDTA. Азотне базе DNA и RNA не везују Al(III)-јон. Флуориди везују Al(III)-јон јако и на нивоу од 1 ppm, у коме се додају у закишељену пијаћу воду (појављују се као AlF_2^+ и неутрални AlF_3).

Од значајнијих лиганда у билошким системима треба споменути десфериоксамин (DFO) који је ефикасан комплексирајући агенс за Al(III)-јон. Може се користити као хелатирајући агенс у третирању прекорачења концентрације алуминијума и гвожђа у људском организму.

Цитрат је молекула мале масе који се најјаче веже за алуминијум. Због његове улоге у метаболизму алуминијума, цитрат је лиганд чије су интеракције са алуминијумом највише изучаване. Цитрат углавном постоји у облику трикарбоксилног анјона на $pH > 6$ и 0,1 mM у крвној плазми. Пошто цитрат може да хелатира трагове алуминијума у храни не препоручује се унос цитрата заједно са антацидима на бази алуминијума. Цитрат такође ослобађа Al(III)-јон и из нерастворног $Al(OH)_3$ и из $AlPO_4$.

Од представника молекула велике молекулске масе који се често јавља као лиганд у комплексирању са Al(III)-јоном треба споменути трансферин. Трансферин је главни протеин плазме који учествује у везивању алуминијума.

Од физиолошке важности такође је комплексирање алуминијума са фосфатним лигандима. Ови лиганди имају високу константу стабилности, али су ипак мање проучавани, него комплекси алуминијума са цитратом

1.3.3. Токсичне особине алуминијума

Токсично дејство Al(III)-јона објашњава се чињеницом да овај јон ступа у интеракције са многим биомолекулима, посебно са протеинима и полипептидима. Токсично дејство алуминијума се ублажава чињеницом да је већина његових једињења слабо растворна.

Најчешће манифестације токсичности алуминијума су: неуротоксичност (Alchajmepo-ова болест, амиотрофична латерална склероза), скелетна токсичност (остеомалација, патолошке фрактуре), хематотоксичност (анемије: хипохромна, нормохромна) [72, 73, 75-77].

Код здравих људи (упркос широкој изложености једињењима алуминијума преко хране, пијаће воде и антацида) ретко се јавља акутна токсичност орално унетим алуминијумом [74]. До повећања концентрације алуминијума код уремијских пацијената долази као последица уношења велике дозе орално примљеног алуминијума (овим пацијентима се дају фосфат-везујући гелови на бази алуминијума чија је улога да регулишу ниво серумског фосфата) или парентрално датог алуминијума (парентерални алуминијума потиче од присуства Al(III)-јона у дијализујућем флуиду).

Ефекти експозиције људског организма алуминијума могу се поделити на локалне ефекте (на месту уласка алуминијума у организам) и системске. Локални ефекти су углавном локализовани у гастроинтестиналном тракту и плућном ткиву. Алуминијум делујући локално у гастроинтестиналном тракту смањује апсорпцију гвожђа, фосфора, флуорида, калцијума и повећава апсорпцију калцијума. Такође алуминијум смањује мотилитет дигестивног тракта, па се веома често као компликација код примене лекова који садрже у себи знатне количине алуминијума (најчешће антацида) јавља опстипација. Везивање фосфата у гастроинтестиналном тракту може довести до смањења садржаја фосфата и остеоомалације.

Најпознатија манифестација локалног дејства алуминијума на плућно ткиво је плућна фиброза, позната као Shavers-ова болест. И појава астме код радника запослених у производњи алуминијума сврстава се у локалне ефекте експозиције алуминијумом и његовим једињењима (флуоридима, сулфатима и др).

Системски ефекти алуминијума се испољавају углавном у ткивима у којима долази до његовог накупљања. Проучавање системских ефеката алуминијума веома је компликовано јер су ретки случајеви у којима се могу *in vivo* проучавати изоловани ефекти алуминијума. Углавном се системски ефекти алуминијума сусрећу код пацијената на дијализи (који су изложени алуминијуму из дијализатних раствора) или код пацијената на дуготрајној парентералној исхрани (због присуства цревних обољења пацијенти добијају сваког дана неколико mg алуминијума који је присутан као контаминант у интравенозно датом протеинском хидролизату). Остали извори парентерално датог алуминијума су албумински раствори који могу бити контаминирани алуминијумом у току чувања или код пацијената са екстензивним опекотинама. Алуминијум је присутан у бројним растворима који се примењују за опекотине и може изазвати скидање коже и повећање укупне концентрације овог елемента у организму). При експозицији алуминијуму, долази до промена на централном и периферном нервном систему, миокарду, костима, паратиреоидној жлезди.

Најчешћа манифестација неуротоксичности је Alchajmer-ова болест. Alchajmer-ова болест је облик сенилне деменције која се карактерише тиме да региони у мозгу постају хаотично дезорганизовани. Сматра се да за развој Alchajmer-ова болести посебан значај има појава амилоида у церебралном кортексу. Појава амилоида доводи до поремећаја у функцији крвно-моздане баријере која постаје пропустљивија. због чега долази до накупљања у мозданом ткиву алуминијума, гвожђа и других метала који истискују цинк из металоензимских комплекса.

Скелетна токсичност се манифестује као бол у костима, миопатија и патолошке фрактуре. Коштане промене које настају као последица дејства алуминијума доводе до смањене продукције коштане масе и утиче на продужено време минерализације костију.

1.4. Литературни преглед

1.4.1. Изучавање хидролизе Al(III)-јона ESI MS техником

Алуминијум(III)-јон лако подлеже хидролизи у воденим растворима [78, 79, 80]. Најобухватнију ESI MS студију о хидролизи алуминијума публиковала је Sarapola са сарадницама. Они су пронашли више различитих анјонских и катјонских Al(III)-комплекса од мономера до полимера (Al_{30}) у хлоридном, сулфатном и мешовитом хлоридно-сулфатном медијуму. Ефекат анјона на специјација је такође изучаван. Применом ESI MS–TOF технике, пронашли су три различита рН опсега у којима се специјација алуминијума разликује међусобно. На рН око 3 доминантни облици су димери $[Al_2O(OH)_2Cl(H_2O)_{0,3}]^+$ и тримери $[Al_3O(OH)_4Cl_2(H_2O)_{0,3}]^+$ док на рН око 5 доминантни су већи полимери са Al_{13} језгром. Наелектрисање ових комплекса је у опсегу од -2 до +3, а разилажење са +7 Kegginovim полимерима је објашњено присуством терминалних хлоро атома. На неутралном рН формирање колоида и талог прузрокује губитка свих сигнала из спектра. Највећи алуминијумов катјон који је индефикована Sarapola са сарадницима, је Al_{30} кластер $[Al_{30}O_{35}(OH)_{17}]^{3+}$. У новијим радовима, резултати добијени ESI MS TOF техником су поново експериментално проверени помоћу тандем масене спектрометрије на трипл-квадрупол инструменту. Добити су катјонски сигнали. Сигнали мономерних комплекса $[Al(OH)_2]^+$ и $[Al(OH)_2(H_2O)_n]^+$ ($n=1,2,3$) доминирају целом облашћу скенирања спектра. При вишим колизоним енергијама две хидроксо групе формирају мостне оксо лиганде, губитком једног молекула воде. Хлоро лиганди нису били присутни као „мостни“ јони, јер се и на ниским колизоним енергијама елиминишу као HCl. Нађено је да су чак и мали димерни и тримерни комплекси у стању да „заробе“ аква лиганде. Фрагментни јони се померају ка вишим m/z вредностима у спектрима.

Urabe и сарадници [80, 81] су изучавали специјацију у $AlCl_3$ растворима јер је уочено да су неки Sarapol-ини резултати изучавања хидролизе били контрадикторни. Urabe и сарадници су за проучавање хидролитичких комплекса у растворима алуминијум хлорида користили ESI Q MS, ESI Q MS/MS и ESI TOF MS технике. Хидролизу нису катализовали додавањем базе, односно проучавана је без рН подешавања, у концентрационом опсегу алуминијума од 0,02 до 100 mmol/dm³. Нађене алуминијумске врсте у раствору углавном су позитивно наелектрисани мономерни алуминијумски хидроксида са неколико молекула воде. Поред мономера идентификовани су и неки полимери (Al_2 , Al_3 , Al_4 , Al_5) са +1 наелектрисањем. У позитивном моду није идентификовано комплексирање са хлоридним јоном. Urabe и сарадници, су у делимично неутралним $AlCl_3$ растворима ($C_{Al}=1$ mmol/dm³, $Z=1,5$) идентификовали троструко и двоструко наелектрисан тридекамер Al_{13}^{2+} при m/z 279-309 и m/z 409+9n ($n=0-7$) респективно. Тридекамерне врсте се разликују по броју молекула воде у кластеру. При снимању у позитивном моду идентификовали су мономерне врсте, димере, тримере, тетрамере и један пентамер (Табела 6). Резултати снимања у негативном моду су дали много већи број сигнала у спектру и много већи број анјонских врста је идентификован: мономери, димери, тримери и тетрамери. Евидентно је добро слагање резултата добијеним ESI Q MS техником и термодинамичких прорачуна које су извршили Botero и сарадници [82].

Доступни литературни подаци указују да су главни проблеми који се јавља у ESI MS проучавању хидролизе алуминијума манифестују као разлика између равнотежног стања у раствору и врста присутних у ESI извору (гасно фазане реакције). Генерално, класичне методе (потенциометрија, NMR спектроскопија) идентификују знатно мање врста него ESI MS указујући да је већина врста идентификованих у MS пре карактеристика гасно фазних реакција него ли реалног стања у раствору.

Оптимално подешавање MS инструмента треба обавити тако да се постигне максимално слагање између спектроскопских и потенциометријских резултата. Утврђено је [81] да примена ESI Q MS техника боље одражава стање у растворима јона алуминијума него ли примена ESI TOF MS технике.

Табела 6. Најзаступљеније хемијске врсте у раствору AlCl_3 , позитиван мод		
Тип	m/z из спектра	Идентификоване врсте
Мономер	79	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$
	97	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$
	115	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_3]^+$
	133	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$
Димер	157	$[\text{Al}_2\text{H}_7\text{O}_6]^+$
	175	$[\text{Al}_2\text{H}_9\text{O}_7]^+$
Тример	217	$[\text{Al}_3\text{H}_8\text{O}_8]^+$
	235	$[\text{Al}_3\text{H}_{10}\text{O}_9]^+$
Тетрамер	277	$[\text{Al}_4\text{H}_9\text{O}_{10}]^+$
	295	$[\text{Al}_4\text{H}_{11}\text{O}_{11}]^+$
Пентамер	337	$[\text{Al}_5\text{H}_{10}\text{O}_{12}]^+$

Urabe [81] је наставио истраживања хидролизе у AlCl_3 растворима. Дошао је до закључка да само у раствору ове соли се формира алуминијум тридекамер (Al_{13}) и потврдио његово постојање коришћењем неколико техника. Коришћењем ESI MS детектовани су двовалентни и тровалентни јони. С обзиром да ESI MS појединачно региструје сваку врсту алуминијума у раствору на основу њеног m/z за очекивати је да ова техника даје додатне информације из хемије раствора алуминијумовог јона. Извршили су детаљно испитивање алуминијумових врста коришћењем потенциометрије и ^{27}Al NMR спектроскопије и поређење ових резултата са резултатима масеноспектрометријских испитивања.

Zhao и сарданици [83] су се детаљно бавили изучавањем хидролизе у веома разблаженим растворима алуминијума масеном спектрометријом. Констатовали су да се хидролитичке врсте могу поделити у четири групе: на $\text{pH}=4,8$ мономерне и димерне алуминијумске врсте хидролизују и полимеризују градећи мале полимерне алуминијумске врсте (Al_3 - Al_5). Мале полимерне алуминијумске врсте полимеризују у средње полимерне врсте (Al_6 - Al_{10} врсте) на pH 5,0. На сличан начин мале и средње полимерне врсте алуминијума стварају агрегате великих полимерних врста (Al_{11} - Al_{21}). На pH изнад 5,8 метастабилне средње и велике полимерне „врсте“ се распадају на мале врсте алуминијума и тако се агрегати разграђују на димерне врсте. Са порастом pH до 6,4 већина алуминијумових врста гради $\text{Al}(\text{OH})_3$ аморфне талоге.

1.4.2. Изучавање комплекса флуорохинолона, хинолона, флаваноида са $\text{Al}(\text{III})$ -јоном ESI MS техником

Мали број радова постоји везаних за изучавања комплексирања метала са хинолонима ESI-MS спектрометријом, а нема публикованих радова из области комплексирања $\text{Al}(\text{III})$ -јона са флуорохинолонима ESI MS спектрометријом.

Agostino и сарадници су изучавали флуорохинолонске антибиотике: норфлоксацин, еноксацин, ципрофлоксацин и оксофлоксацин ESI MS техником [84]. Приказане су врсте које

настају при дисоцијацији ових антибиотика као и фрагментационе путање карактеристичне за ове флуорохинолоне. Код норфлоксацина на 150 V прво се губи CO_2 из карбоксилне киселине, а потом $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ из пиперазилне групе и C_2H_4 из етил групе на N1. Приказана је и алтернативна путања код норфлоксацина на 150 V по којој се на почетку губи C_2H_4 из етил групе на N1, а потом $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ из пиперазилне групе и H_2O из карбоксилне групе. На овај начин је извршена идентификација фрагмената испитиваних флуорохинолона што је корисно при структурним разњаашњенима метаболита.

Zhang и сарадници [85] су изучавали комплексирање Al(III)-јона и флавоноида ESI MS спектрометријом. У свом раду су показали утицај растварача на заступљеност комплекса Al(III)-рутин, као и других флавоноида у раствору. Константовали су да испитивани раствор не сме имати велику јонску јачину (основни електролит) и да се мора додати органски растварач пре почетка ESI MS анализе. Молекули растварача се уклањају или везују за метал у процесу јонизације. Као најбољи растварач се показао метанол. Структурну карактеризацију и диференцијацију изомера дигликозида урадили су применом тандем масене спектрометрије (MS/MS). Захваљујући дешифрованој фрагментационој путањи разјашњени су путеви гликолизе, врсте сахара и тип везе између C-2 и C-3 атома. Алуминијум гради комплексе са флавоноидима за различите концентрационе односе Al(III)-јона и лиганда: 2:1, 1:1, 1:2. Најзаступљенији комплекси су 1:2 типа $[\text{Al(III)-јон (флавоноид-H)}_2]^+$ где је Al(III)-јон чврсто везан са флавоноидима. Начин фрагментације за овај систем је дат у Табели 7.

Везивање је преко 4-кето и суседних хидроксилних група 5-, 7-ОН или обе групе.

Табела 7. MS подаци за Al(III)-јон-понцирин комплексе типа $[\text{Al(III)-(флавоноид-H)}_2]^+$				
Флавоноид	Путања	Фрагмент	Неутрални губитак	Релативна заступљеност
Понцирин	1213-1067	947	120	11
		921	146	20
		905	162	47
		759	308	100
		597	407	19

V. Di Marco и сарадници [86] су ESI MS применили за изучавање равнотежа у растворима Al(III)-јона и лиганда: 3-хидрокси- 4- пиридин карбоксилна киселина (3H4P) и 4-хидрокси- 3- пиридин карбоксилна киселина (4H3P). Поређењем ових резултата са резултатима класичних метода за испитивање равнотежа у растворима добили су добро слагање упркос појави пертурбација и гасно-фазних реакција карактеристичних за ESI MS. На основу тога су дошли до закључка да се ESI MS може користити за изучавање равнотежа у растворима: за идентификовање формираних врста и њиховог стехиометријског састава, али и за одређивање квантитативног састава врста у раствору [13] (са циљем да се израчунају концентрације различитих комплекса формираних у раствору и њихових константи стабилности).

Ross и Riley су користили „брзо атомско бомбардовање“ (FAB MS) за изучавање комплексирања Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Bi^{3+} и Fe^{3+} са ломефлоксацином [87]. Изучавали су концентрационе односе ломефлоксацин: метал од 3:1 до 2:1. Урађена је специјациона анализа у овим растворима. ESI MS као техника значајна у квалитативним одређивањима примењена је и на изучавање полимеризација самог лиганда и дала слагање резултата са (FAB MS) техником. ESI MS указује на присуство врста високе нуклеарности тј. тримера и тетрамера који не могу бити детектовани другим техникама. Ако се упореде потенциометријски и

спектрофотометријски подаци види се да они указују на модел базиран на мононоклеарним и динуклеарним врстама. Док резултати ESI MS испитивања на истим системима указују да су димерне врсте много више заступљене него мономерне.

Alvaerez и сарадници [88] су изучавали реакције комплексирања метала (Ni^+ , Cu^+ , Co^+) и хинолонских антибиотика (еноксацин, оксолинска киселина, флумеквин, пиромидинска киселина и налидинска киселина) ESI и LDI техником. За ове процесе комплексирања карактеристична је елиминација CO уз формирање цикличних структура које се стабилишу водоничним везама. CAD pattern-и Ni^+ комплекса су информативнији од фрагментационих pattern-а протонисаних хинолона. Такође су изучаване гасно фазне јон молекулске реакције између хинолона и ласер десорбованих монопозитивних јона прелазних метала. У другој фази експеримената испитиване су серије метанолских раствора антибиотика и соли јона прелазних метала и лиганда електроспреј јонизацијом уз коришћење јон трапа као анализатора. Губитак водоника је врло карактеристичан у току CAD експеримената прелазних метала у гасној фази. Пошто је коришћен јон трап у коме је увек мало воде присутно потврђено је везивање воде за никал и бакар. Формирање комплекса између хинолона и јона прелазних метала је ефектно када антибиотик изгуби кисели протон из карбоксилне киселине и формира се ковалентна веза са металним јоном. Код Cu комплексе са помрнутим хинолонима регистрован је губитак CO_2 , CO или HF. Поређењем експеримената LDI и ESI констатовано је да су сигнали металних комплекса формирани у електроспреју за један ред величине већи од сигнала добијених у случају када се користи LDI техника. LDI спектри садрже неколико пикова који одговарају фрагментним јонима из родитељских комплекса. Ово није карактеристично за ESI MS спектре који се карактеришу нетакнутим родитељским комплексима. Уочена је различита природа металних комплекса насталих LDI и ESI техником која се објашњава чињеницом да монопозитивни метални јони имају различиту електронску конфигурацију у односу на двоструко наелектрисане јоне који су присутни у току ESI процеса.

1.4.3. Изучавање комплекса метала и флуорохинолона, флавоноида и других једињења MALDI техником

У литератури не постоје подаци који се односе на карактеризацију равнотежа које се успостављају у растворима флуорохинолона и алуминијум(III)-јона MALDI техником. Приличан број радова је објављен са резултатима примене MALDI технике у анализи флуорохинолона. Иако се ради о малим молекулима MALDI се показао врло корисним у овим испитивањима: за одређивање концентрације ових антибиотика у метаболитима, за одређивање најфикаснијих концентрација ових лекова при лечењу гонореје, пнеумоније и сличних инфекција [42]. Пошто у литератури нема радова у којима су изучавани комплекси алуминијум(III)-јона MALDI техником приказни су комплекси других метала са одговјућим лигандима изучавани MALDI техником.

Ruttink и сарадници су публиковали резултате изучавања гасно фазних реакција које се јављају при примени MALDI технике у изучавању комплекса Cu^+ и Cu^{2+} , као и за изучавање тернарних комплекса (смеша CuCl_2 и FeCl_3). За ову смешу су након снимања основног спектра урађени и TOF/TOF експерименти за поузданију анализу кластера [21].

March и сарадници су изучавали флавоноиде ESI MS спектрометријом и MALDI MS спектрометријом [89]. Јони детектовани у масеним спектрима у серији од девет протонисаних флавоноида анализарни су електроспреј јонизацијом у комбинацији са квадрупол/TOF анализатором (ESI-Q-TOF), и MALDI јонизацијом у комбинацији са

квадруполе јон трапом (MALDI QIT) као и тандем масеном спектрометријом или TOF тандем масеном спектрометријом (MALDI TOF ReTOF). Испитивана једињења су: 3,6-, 3,2' и 3,3'-дихидроксифлавон, апигенин (5,7,4'-трихидроксифлавон), лутеолин (5,7,3',4'-тетрахидроксифлавон), апигенин-7-О-глузид хесперидин (5,7,3' -трихидрокси-4' -метоксифлаванон), даидзен (7,4' -дихидрохисофлавон), и рутин (кверцитин-3-О-рутинозид) где је кверцитин 3,5,7,3', 4' -пентахидроксифлавон. За примену MALDI технике на испитивање интеракција метала и флавоноида пример су испитивања натријума са рутином (цитрусним флавоноидом). Енергије центара масе (ЕСМ) у ESI QTOF и MALDI QIT су биле (1-4 eV) а њихови продукт јони у масеним спектрима су виртуелно идентични. У MALDI TOF ReTOF инструменту, опсег центра маса енергије је од 126-309 eV од рутина са натријумом до протонваних дихидроксифлавона, респективно. Захваљујући високим енергијама центара масе доступним на MALDI TOF ReTOF инструменту, добијене су корисне структурне информације. Али са повећањем прекурсорског односа маса/наелектрисање, продукт јон у масеном спектру постаје упрошћен те су тако ограничени и структурни подаци. У овом раду електронска екситација протонваних врста (или адуката са натријумом) гликозида даје објашњење за продукте јона добијене овом техником. Масени спектри негликозидних флавоноида проучавани MALDI TOF ReTOF на високим енергијама центара масе и не показује компетитивну фрагментацију, која се уочава за ниске енергије (1-4 eV) центара масе. Идентификација продукт јона у опсегу m/z 100-160 је отежана као последица слабе резолуције масе при којој су ови јони посматрани није било могуће једнозначно одређивање хемијског састава. Са порастом масе јона прекурсора, уз истовремену редукцију ЕСМ до 261 eV, масени спектри јона продуката изучавани MALDI TOF ReTOF постају доста једноставнији показујући два или три доминантна продукт јона. За протонвани хесперидин, два главна продукт јона су радикалске врсте настале попречним цепањем (cleavage) молекула. За протонвани лутеолин, два главна продукт јона одговарају врстама са протонваним апигенином. Ови резултати су неочекивани јер нема једноставне заједничке фрагментације за протонвани лутеолин и апигенин.

Brindel и сарадници су MALDI TOF [90] техником изучавали комплексе рутенијума (и то цис и транс изомере) са олигонуклеотидима. MALDI TOF анализа је показала да се и цис и транс комплекси координују са олигонуклеотидима. Адукти настали у овим реакцијама су слабо везани са DMSO, Cl и H₂O лигандима. Ови лиганди се лако губе у процесу десорпције/јонизације. На основу ових истраживања аутори су закључили да је MALDI TOF веома корисна за детекцију металних адукта са олигонуклеотидима и за изучавање изомера рутенијума у циљу боље примене у терапеутске сврхе, упркос чињеници да су олигонуклеотиди у високо наелектрисаним стањима.

Petković и сарадници су публиковали резултате примене флавоноида (кверцетина и рутина) као најефикаснијих матрица у примени MALDI спектрометрије на изучавање неорганских комплекса платине и паладијума. Када се ови флавоноиди примене као матрице, тада неоргански комплекси платине и паладијума остају непромењени и идентификују се у спектрима као адукти Na⁺ и K⁺. Ове матрице су веома погодне при изучавању аминокиселина и фосфолипида [91, 92].

2. ЦИЉ И ЗАДАТАК РАДА

Истраживања која су предмет наведене докторске дисертације треба да омогуће утврђивање поуздане специјације алуминијум(III)-јона у присуству флуорохинолона: флероксацина, ципрофлоксацина и моксифлоксацина. На основу тако утврђене специјације треба размотрити утицај флуорохинолона на биодистрибуцију алуминијума и његову токсикокинетичку у хуманом организму при паралелној терапији флуорохинолонским антибиотицима и лековима на бази алуминијума (антацидима, вакцинама, парентералним нутриенсима итд). Осим тога подаци масене спектрометрије треба да укажу на структуру доминантног комплекса у раствору као и на јачину везе алуминијум- O_2 у комплексима.

Комплексирање алуминијума са флуорохинолонским антибиотицима испитивано је техникама ESI MS, ESI MSⁿ и MALDI спектрометрије при чему је примењена MALDI техника без подлоге. Уз MALDI јонизацију коришћен је TOF анализатор. Уз ESI јонизацију коришћени су анализатори: квадрупол и јон трап.

Резултати хидролизе алуминијума су поново испитивани ESI MS спектрометријом због чињенице да су у литератури постојала два контрадикторна модела (модел Sarapol-e и модел Urabe-a) који дају различите специјације у растворима алуминијума у истим рН интервалима.

Очекивани резултати ове дисертације могу се сумирати у неколико тачака:

- 1) Састав и структура хидролитичких комплекса алуминијума који се формирају у раствору
- 2) Утицај различитих експерименталних фактора (старење, температура, јонска јачина) на састав хидролитичких комплекса алуминијума
- 3) Утврђивање оптималних експерименталних и инструменталних параметара за изучавање комплексирања алуминијума са наведеним флуорохинолонима
- 4) Утврђивање састава комплекса у раствору и састава фрагментационих продуката
- 5) Утицај услова ESI јонизације на појаву пертурбација у извору и њихов утицај на равнотеже у раствору
- 6) Одређивање полимерних врста које се формирају при комплексирању применом MALDI технике
- 7) Специјациона анализа у растворима алуминијума иу растворима флуорохинолона и алуминијума урађена је компјутерском симулацијом, коришћењем програма Hyss 2006 и Neuro 2013 softwera заснованог на моделу вештачких неуронских мрежа.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Раствори и реактиви

3.1.1. Реагенси

- Алуминијумова жица, Al-wire, 99,99 %, (Merck)
- Трифлуоросирћейна киселина, TFA, $C_2HF_3O_2$, р.а., ампула, чистоће >99 % (Fluka)
- Триетиламин, TEA, $C_6H_{15}N$, р.а. (чистоће >99,5 %) (Merck)
- Хлороводонична киселина, Suprapure HCl, 30 %, (Merck)
- Најтријум-хидроксид, NaOH, р.а., у гранулама, (Merck)
- Флероксацин, $C_{17}H_{18}F_3N_3O_3$, 99,9 % (Riedel–de Haen), Sigma–Aldrich
- Моксифлоксацин хидрохлорид, $C_{21}H_{24}FN_3O_4 \cdot xHCl$; 99,9 %; (Bayer Pharma AG)
- Ципрофлоксацин хидрохлорид, $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot xHCl$; 99,9 % (Bayer Leverkusen)
- Сирћейна киселина, CH_3COOH , 99,8 % (Lachema)
- Метанол, CH_3OH , HPLC граде чистоће, Baker (Bio-Analyzed Reagent)
- Пуфери: рН 4.00 (фталат), рН 7.00 (фосфат), рН 9.00 (борат); чистоћа пуфера у складу са NIST стандардима, (J. T. Baker)
- Milli Q вода, (Millipore USA)

За ESI MS снимања коришћен је компримовани азот (N_2) чистоће 99,99 %, Messer, и компримовани хелијум (He) као колизионни гас, чистоће 99,9999 % Messer.

3.1.2. Основни раствори

Алуминијум-хлорид ($0,1 \text{ mol/dm}^3$):

Основни раствор алуминијума је припремљен од Al траке која је исецкана на ситне комадиће. Измерено је $0,53974 \text{ g}$ траке, а затим је додато 5 cm^3 „Suprapure HCl“ и $1-2 \text{ cm}^3$ редестиловане воде. Раствор је лагано загреван на пешчаном купатилу неколико сати до потпуног растварања. Узорак је допуњен до црте редестилованом водом. Концентрација алуминијума у овом раствору је проверена гравиметријском методом талужењем са амонијум хидроксидом [25]. Талог је жарен на 1200°C и мерен као алуминијум (III)-оксид. Одређена концентрација алуминијума је $C_{Al} = 0,1020 \text{ mol/dm}^3$. Истовремено је садржај алуминијума у овом раствору проверен и ICP-OES техником ($C_{Al} = 0,100 \text{ mol/dm}^3$). Добијено је добро слагање ове две методе.

Концентрација додате хлороводоничне киселине одређена је потенциометријском титрацијом стандардним раствором натријум-хидроксида, применом Гранове методе и износила је $C = 0,152 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$.

Флероксацин ($0,812 \text{ mmol/dm}^3$):

Одмеравањем $0,0150 \text{ g}$ флероксацина р.а. и допуњавањем редестилованом водом до 50 cm^3 направљен је раствор концентрације $0,812 \text{ mmol/dm}^3$. Да би се флероксацин потпуно растворио неопходно је овај узорак ставити на ултразвучно купатило 20-так минута.

Моксифлоксацин (3 mmol/dm^3):

Одмеравањем $0,0654 \text{ g}$ моксифлоксацин хидрохлорида р.а. и допуњавањем редестилованом водом до 50 cm^3 направљен је раствор концентрације 3 mmol/dm^3 .

Ципрофлоксацин (2 mmol/dm^3):

Одмеравањем $0,03678 \text{ g}$ ципрофлоксацин хидрохлорида р.а. и допуњавањем редестилованом водом до 50 cm^3 направљен је раствор концентрације 2 mmol/dm^3

Раствор трифлуоросирћетне киселине, ТЕА (0,1 mmol/dm³):

Пипетирањем 386 μ l чисте киселине и допуњавањем редестилованом водом до 50 cm³ направљен је раствор концентрације 0,1 mmol/dm³.

Раствор триетиламина, ТЕА (0,1 mmol/dm³):

За припремање полазног раствора триетиламина коришћен је ТЕА. Пипетирањем 699,5 cm³ чисте базе ТЕА и допуњавањем редестилованом водом до 50 cm³ направљен је раствор концентрације 0,1 mmol/dm³.

pH свих раствора је подешен додатком стандардних раствора TFA или ТЕА. pH-метар је калибрисан са J. T. Baker pH 4,00, 7,00 и 9,00 пуферима.

3.1.3. Радни раствори

Раствори лиганата су припремани, најпре у смеси растварача вода/метанол = v/v 50:50, 30:70. Присуство 50 %, 70 % метанола у растварачу имало је за циљ да олакша десолватациони процес у електроспреју и обезбеди бољи јонски принос. У току експеримената је констатовано да су и спектри раствора у дејонизованој води одговарајућег квалитета те су надаље узорци припремани у дејонизованој води.

Раствори алуминијум(III)-хлорида и одговарајућег флуорохинолонског лиганда су припремани у различитим концентрационим односима: од 0,5:1 до 3:1. Вредности pH раствора подешаване су од 3,0 до 7,0 додатком раствора 0,01-0,1 M TFA или 0,01-0,1 M ТЕА. Концентрације лиганата и алуминијума су биле реда величине 10⁻⁵ до 10⁻⁴ mol/dm³. Тачне вредности концентрација алуминијума и лиганата у анализираним растворима и pH вредности су наведене у табелама у овом поглављу Експериментални резултати. Раствори комплекса остављени су да стоје један дан пре почетка снимања од мешања компоненти, како би било довољно времена за хемијску реакцију. Након овог периода поново је проверена pH вредност раствора. Мерење pH вршено је на сваких сат времена док нису добијена стабилна читавања са грешком \pm 0,02 pH јединице. У почетку је као проточни растварач коришћена смеша растварача вода/метанол у запреминском односу 30:70 са протоком 0,3 cm³/min, а затим само вода. Сви припремљени раствори су чувани на хладном (+ 4 °C) и без присуства светла, јер су лиганди подложни фотодеградацији.

Узорци раствора су филтрирани од механичких нечистоћа (кроз μ m стаклени филтер), како би се избегла адсорпција анализата на површини филтра или десорпција нечистоћа са површине филтарских пора у испитивани раствор (нарочито површински адсорбованог NH₃ из атмосфере и Na⁺ из материјала филтра). При испитиваним концентрацијама анализата, реда величине 10⁻⁵ mol/dm³, интерференце са филтером могу значајно да промене равнотежне услове у посматраном систему.

После завршеног рада са једним раствором или једном врстом лиганда, обавезно је вршено испирање ESI MS инструмента у трајању од 5–20 минута, метанолом или смешом метанол/вода, до стабилизације инструмента, то јест до потпуног губитка сигнала који потичу од претходно испитиваног анализата или других нечистоћа.

3.2. Инструментии

1) Масени спектрометри

Масени спектри раствора AlCl₃ (при испитивању хидролизе алуминијума), су снимани на LC/MCD масеном спектрометру, Waters 2695-2996 са Micromass ZQ 2000 single quadrupol анализатором и MassLynx 4,0 softver-ом. Спектри су снимљени у позитивном моду. Најпре су одређени најоптималнији инструментални параметари. Услови снимања су дати у Табели 8:

Табела 8. Инструментални параметри у ESI извору при испитивању хидролизе	
Параметар, јединица	Вредност
Напон на капилари, kV	3,5
Температура извора, °C	125
Десолвациона температура, °C	200
Брзина протока десолвационог гаса, L/h	450
Напон на конусу, kV	50
Напон екстрактора, V	3
Потенцијал јонске оптике (R.f.lens), V	5
Брзина протока гаса на конусу, L/h	50
Опсег маса, <i>m/z</i>	40-1000
Резолуција	2000

За снимање масених спектра раствора лиганда (HQ) и раствора алуминијума и лиганда коришћен је масени спектрометар Thermo Finnigan LCQ^{Deca} Thermo Quest (USA) са квадрупол јон трап анализатором. Оперативни систем на инструменту је Finningan Xcalibur. Услови снимања су дати у Табели 9:

Табела 9. Инструментални параметри у ESI извору при испитивању комплексирања	
Параметар, јединица	Вредност
Напон „спреја“, kV	4,7
Температура капиларе, °C	220
Брзина протока десолвационог гаса, arb јединице	74
Напон на капилари, kV	6
Потенцијал јонске оптике (Tube lens offset), V	15
Подешене вредности API извора	Директно увођење узорка
Проток, $\mu\text{l}/\text{min}$	10
Динамички опсег, <i>m/z</i>	50-1200
Мобилна фаза	у једној серији 50:50 метанол /вода; у осталим без мобилне фазе

MALDI MS спектри су снимљени на Bruker Ultraflex extreme TOF/TOF инструменту са Nd Yag, неодимијум-итријум алуминијум гарнет ласером. Оперативни систем је Bruker Daltonics flexuAnalysis, version 2,0. Спектри су снимљени у рефлексионом позитивном моду. Инструментални услови су дати у Табели 10. Запремина од 0,5 μL ових раствора је стављена на (sample plate) челичну подлогу. Након што се узорак осушио на ваздуху подлога је стављена у инструмент где је узорак изложен ласерском зрачењу.

Табела 10. Инструментални параметри при снимању MALDI спектра	
Параметри, јединица	Вредности
IS1, kV	25,0
IS2, kV	22,3
Сочива, kV	7,70
Рефлектор 1, kV	26,45
Рефлектор 2, kV	13,45
Пулсна јонска екстракција, ns	80,0

2) рН-метри

За подешавање рН коришћен је Mettler Toledo DL 50 титратор са комбинованом стакленом електродом. Калибрација је вршена са J.T. Baker рН=4,00, 7,00 и 9,00 пуферима. Очитавања су вршена са прецизношћу од $\pm 0,001$ рН јединице. Сва мерења су вршена уз стално мешање магнетном мешалицом при додатку киселине или базе.

3.3. Експериментални њосиуѡак

Прелиминарно испитивање сваког од система је започињано анализом чистог раствора лиганда $C=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, у циљу утврђивања општих јонизационих карактеристика једињења, присуства поједних јонских врста у ESI MS спектру, равномерности одзива сигнала итд. Прво снимање је вршено при подразумеваним вредностима параметара инструмента (default factory tuning), у поларитету ESI извора који је одабран према природи испитиваног лиганда. Негативни мод (ESI⁻) је адекватнији за кисела једињења подложна депротонизацији, а позитивни мод извора (ESI⁺) за базна једињења изражене нуклефилности. Затим је у датом моду, одабран сигнал m/z молекулског јона $[M+H]^+$, или $[M-H]^-$, тј. јона одређеног као карактеристичног за даља испитивања (тзв. мониторинг јон).

Коришћењем Hamilton шприца $V=500 \mu\text{L}$, $id=3,26 \text{ mm}$, одржаван је у flow injection режиму проток од $10 \mu\text{L}/\text{min}$. Вршене су пробе и са мањим и већим протоцима.

У наредној фази су вршена подешавања инструмента тј. оптимизација радних услова инструмента (manual tuning): брзина протока sheath-aux гаса (N_2), температура и напон капиларе, tube lens offset, температура вапоризатора, док су подешавања јонске оптике вршена аутоматском оптимизационим по процедури Tune Plus ver. 1,3 Thermo Finnigan Xcalibur software-а [93]. Оптимизацијом је постигнута стабилност одзива, као и појачање релативног интензитета сигнала одабраног мониторинг јона, а низ вредности оптимизованих параметара је и даље коришћено у раду са датим раствором (LCQ Tune Instrumental Method). Аутоматска варијација параметара у току снимања није примењивана. Како на изглед спектра највећи утицај има напон на фрагментатору и проток растварача ове су величине даље вариране у наведеним опсезима док није добијена максимална резолуција спектра.

Пре снимања ESI MS спектра дефинисан је опсег скенирања (scan range) од m/z 50 до 800. Затим је опсег снимања проширен до m/z 1000. Опсег скенирања је биран тако да са сигурношћу обухвати молекулски јон, као и адуктне јоне веће масе који су евентуално присутни у испитиваном раствору. Изабрано је време аквизиције (acquire time): Scans 20, као и Scan Time-Number of Microscans: 3. Сви спектри су добијени и приказани у нормализованом моду (Y-axis normalization mode), који даје најјачи m/z сигнал приказан са 100 % релативног интензитета.

Калибрација инструмента је урађена према екстерном стандарду. Масена прецизност је подешена на 2 децимале. За „baseline noise“ толеранција је била 10 %. Снимања узорака вршена су на класичан начин MS експеримента и у високој резолуцији MS/MS експерименти, као и у Zoom scan моду.

Снимање ESI MS спектра супротног поларитета: После добијеног спектра у ESI⁺ моду, под одговарајућим оптимизованим условима, и за остале испитиване лиганде вршено је снимање MS спектра у ESI⁻ моду. При томе су коришћени претходно подешени параметри апарата, али са супротним поларитетима капиларе и јонске оптике. Накнадна оптимизација најчешће није вршена, осим подешавања основних параметара, у оним случајевима када је спектар садржао препознатљиве сигнале анализата. Констатовано је да спектри снимљени у негативном моду имају много већи шум, да су много мање репрезентативни од спектра снимљених у позитивном моду.

Снимање ESI MS/MS спектра: Снимани су и ESI MS/MS и ESI MS/MS/MS (MS^3) спектри у циљу добијања информација о структури посматраног почетног parent (родитељског) јона, за који је биран првенствено молекулски јон, а у одређеним случајевима испитивани су и други parent јони, односно сигнали из примарног ESI MS спектра. MS/MS спектри су снимани у позитивном моду ESI извора који (више одговара лиганду и нагађеним комплексима), такође у „flow injection“ режиму са протоком $5-20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Затим је биран

молекулски јон за MS/MS фрагментацију, са isolation width: $\pm 1,0 m/z$. Вредност колизионе енергије је повећавана на 30–70 % све док се није добила уочљива фрагментација на мањим вредностима m/z , а да се parent јон још увек уочава у спектру. На крају подешавања, колизиона енергија E_{coll} је обично износила 50–60 % зависно од лиганда (LCQ програм изражава E_{coll} у релативним јединицама, %). Као колизиони гас у масеном анализатору је коришћен хелијум (He).

При снимању узорака најпре су снимани TIC хроматограми сваког раствора. TIC хроматограми репрезентују суму интензитета у читавом опсегу маса детектованих у свакој тачки у току анализе. Регион хроматографског пика је одређен временском X-осом (time) у минутима и релативним интензитетом сигнала (relative abundance)-Y оса. Време трајања анализе било је 40 секунди при чему је од значаја било да хроматографски пик буде потпуно обухваћен временом анализе.

Код снимања TIC –хроматограма одабран је Full Scan mode у опсегу m/z 50– m/z 1000, уместо SIM мода (Single Ion Monitoring), јер SIM метод у претходним испитивањима није показао уочљиве предности у погледу осетљивости и стабилности сигнала. SIM мод омогућава јонима, са специфичном вредношћу m/z , да пређу до анализатора док се остали јони одбацују. SIM омогућава повећање сензитивности за детектовање ниских концентрација једињења у узорцима. У SIM mod-у се одабира неколико јона (нпр. три) која су заступљена и карактеристична за структуру једињења [93]. Ако је концентрација једињења врло ниска при детекцији у Full scan-у на квадропол масеном спектрометру, SIM мод може спустити детекциони лимит и до 1000 пута. У овом моду су снимљени одређени „циљани“ јони.

Zoom scan мод: Пошто у ESI спектрима могу бити присутни и вишеструко наелектрисани јони било је важно одредити да ли је дати јон +3,+2 или +1 наелектрисан тако да постоји разлика $\Delta=0,3$; $\Delta=0,5$; $\Delta=1$ у спектру између блиских линија у односу на централну масу. За јоне за које је наелектрисање било очигледно Zoom scan је био потврда наелектрисања.

На овај начин је олакшана интерпретација добијених спектара. Примењивани су исти ESI услови и при снимању раствора лиганда, да би се сачувао што приближнији релативни однос интензитета сигнала и омогућило касније поређење.

3.4. Експериментални резултати

3.4.1. ESI MS спектри хидролитичких врста алуминијум (III)-јона

Алуминијум(III)-јон је веома подложен хидролизи због великог афинитета ка негативно наелектрисаном кисеонику. Степен хидролизе, „састав“ и стабилност хидролитичких врста формираних у раствору зависе од много фактора: природе и концентрације јонског медијума, рН раствора, природе и концентрације базе која се користи да поспешу хидролизу, времена старења и присуства других супстанци које могу интераговати са алуминијум (III)-јоном и/или молекулима воде [94].

За изучавање хидролизе Al(III)-јона припремани су раствори концентрација у опсегу $2,7 \times 10^{-5}$ до 5×10^{-3} mol/dm³. Испитивани рН интервал је био од 3–6. Састави и рН вредности испитиваних раствора дати су у Табели 11. Раствори су били бистри и стабилни до рН 5,00 два дана (није било замућења ни таложења). На вишим рН вредностима, раствори остају бистри 2-3 h након додатка базе, а затим се развија замућење.

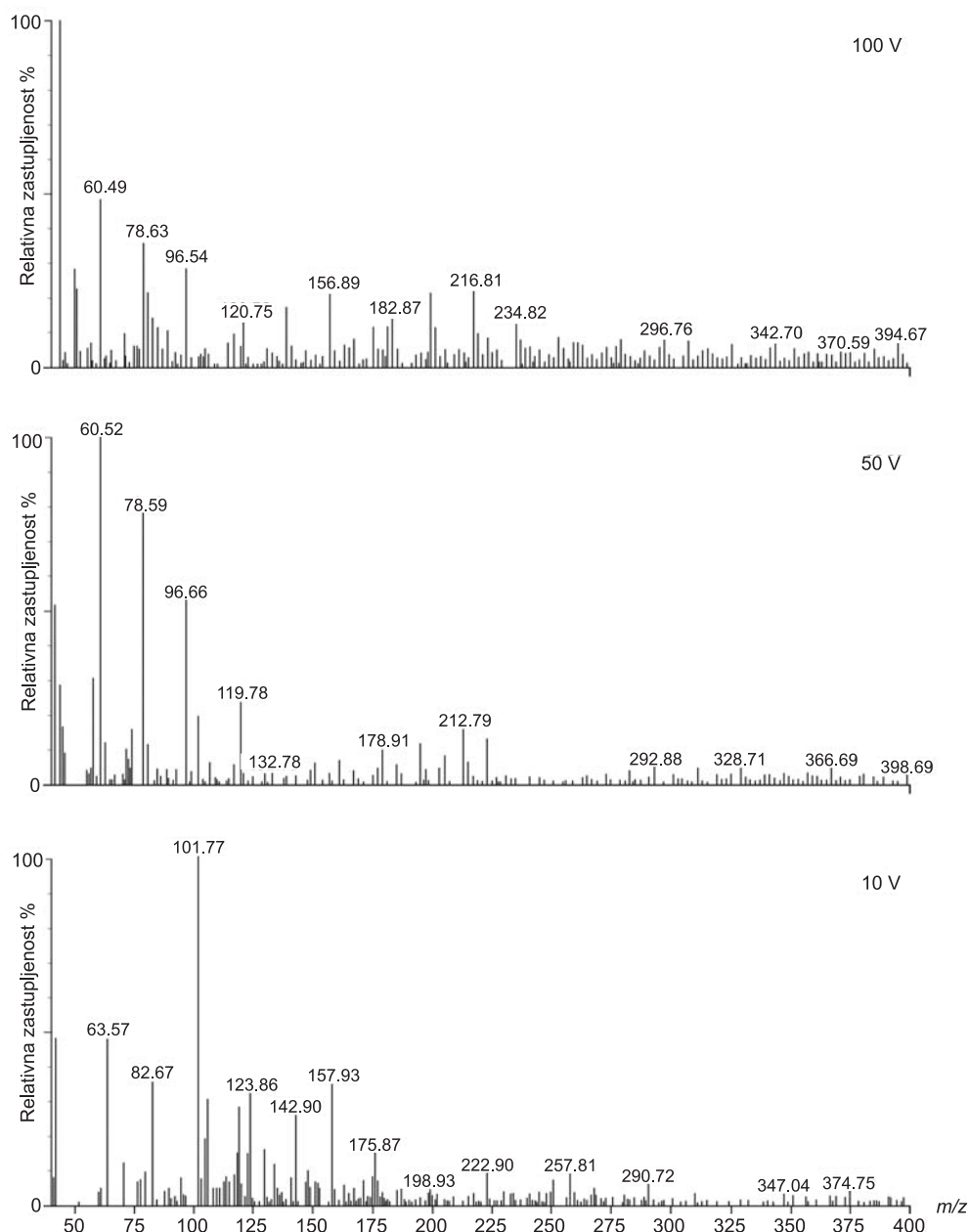
№ узорка	рН	Концентрација Al [mol/dm ³]
1.	3,192	
2.	3,594	$2,7 \times 10^{-5}$
3.	4,814	
4.	4,350	1×10^{-4}
5.	4,203	$0,5 \times 10^{-4}$
6.	4,184	1×10^{-3}
7.	4,050	5×10^{-3} , ($C_{Cl} = 150 \times 10^{-3}$)

Резултати масене спектрометрије зависе од инструменталних параметара. Услови снимања (Т у јонском извору, напон на конусу, напон на капилари, брзина протока мобилне фазе) су варирано док нису добијени репродуктивни спектри. Од инструменталних параметара најјачи утицај на спектре има напон на конусу те је посебно изучаван утицај овог параметра на спектре.

3.4.2. Параметри који утичу на ESI MS спектри хидролизе

Ефекти различитих напона на конусу

На квалитет масених спектра утичу напони на капилари (needle elektro spray voltage), напон оптике (rf lens), напон на конусу и екстракциони напон на конусу. На основу литературних података, [81, 94] „битни“ напони су подешени у следећим опсезима: напон на капилари 2-4, 5 kV, напон на конусу 0-200 V и напон оптике (rf lens) 0-20 V. На сличан начин извршено је варирање ових напона за раствор AlCl₃. Након оптимизације инструмента за даље експерименте су прихваћене вредности напона на капилари од 3,5 kV, напона оптике (rf lens) од 5 V. На квалитет спектра значајније утиче напон на конусу у односу на остале напоне. Стога су и експерименти приказани у овој тези вршени тако да су коришћени параметри добијени финим подешавањем инструмента (тјунирање), а вариран је напон на конусу. Репрезентативни спектри су приказани на Слици 18.



Слика 18. ESI MS спектри $5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ раствора AlCl_3 , pH = 4,20, разичити напони на конусу а) 10 V, б) 50 V и с) 100 V

На Слици 18. су приказани спектри раствора исте концентрације и истог рН, снимљени при различитим напонима на конусу. Најинтензивнији сигнали су у области од m/z 50 до m/z 230. У области од m/z 230 до m/z 400 су сигнали који су доста нижег интензитета.

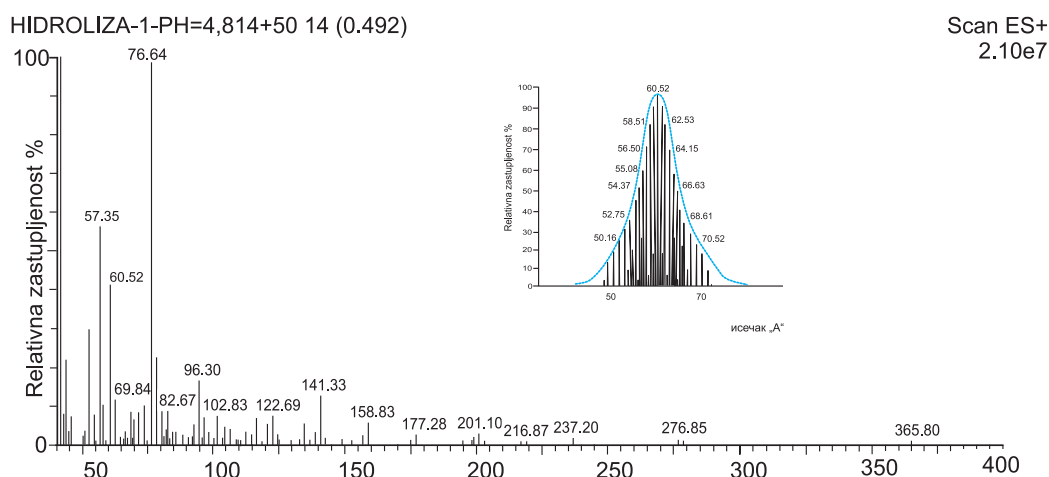
Најоптималнији је напон од 50 V јер је при овом напону најчистија базна линија, сигнали интензитета < 5% могу се лако детектовати, нема преклапања сигнала. Спектри на 10 V и 100 V показују већи позадински шум. На 100 V област виших интензитета се помера до m/z 240. Повећање напона на конусу доводи до повећања броја сигнала у спектру јер повећање енергије пренете молекулу проузрокује фрагментацију. Промена напона на конусу је метода која се често користи са циљем фрагментације на основу које се добијају структурне информације о испитиваним врстама [94]. На 10 V сем шума и перклапање сигнала је израженије. Стога су сви остали узорци снимани на напону од 50 V. Велики утицај је уочен на интензитет сигнала на m/z 60,50. При напону на конусу од 50 V релативни интензитет овог сигнала је 100 %.

Ефекти различитих рН вредности

Од експерименталних услова испитивани су: утицај различитих рН вредности за фиксну концентрацију алуминијума, утицај различитих концентрација алуминијума на стварање хидролитичких врста, ефекат старења раствора, утицај мобилне фазе.

Сходно чињеници да на разноврсност хидролитичких врста утиче рН средине, у овом одељку су приказани резултати испитивања утицаја рН на хидролизу алуминијума.

Серија ESI MS спектра је снимљена за концентрацију алуминијума $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ при оптимизованим инструменталним условима, на различитим рН вредностима (3,192; 3,594; 4,814). Репрезентативни спектри су приказани на сликама 19, 20, 21.

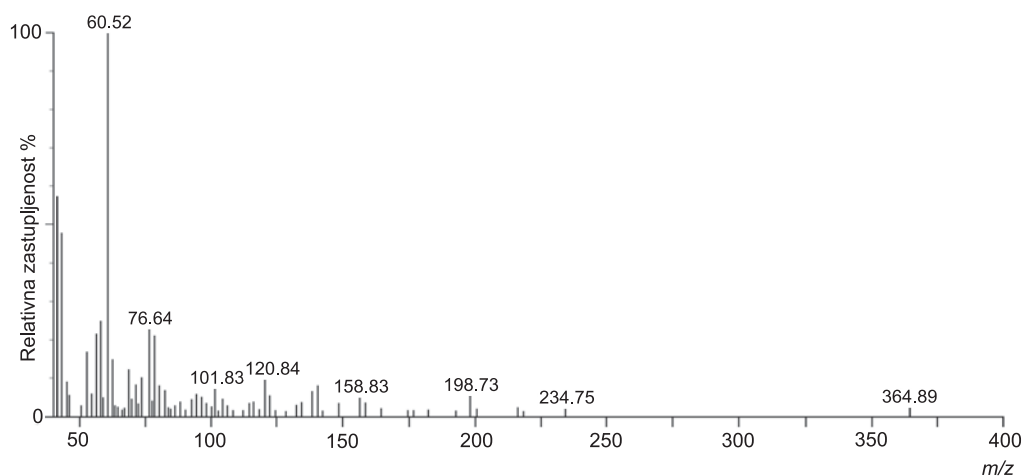


Слика 19. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , рН=4,814

На Слици 19. је приказан спектар у коме је уочљива неправилна дистрибуције сигнала по интензитетима. Интензивнији сигнали су у области m/z 60-140, док су у области већој од m/z 140 груписани сигнали нижег интензитета, што не значи да су то сигнали који репрезентују хемијски мање битне врсте.

Као најобилнији издвајају се сигнали на m/z 57,35 (релативни интензитет 60 %), m/z 60,53 (релативни интензитет 40 %), m/z 76,64 (релативни интензитет 100 %), m/z 96,30 (релативни интензитет 20 %). Сигнали нижег интензитета су: m/z 276,85; и m/z 365,80 и највероватније потичу од полинуклеарних врста.

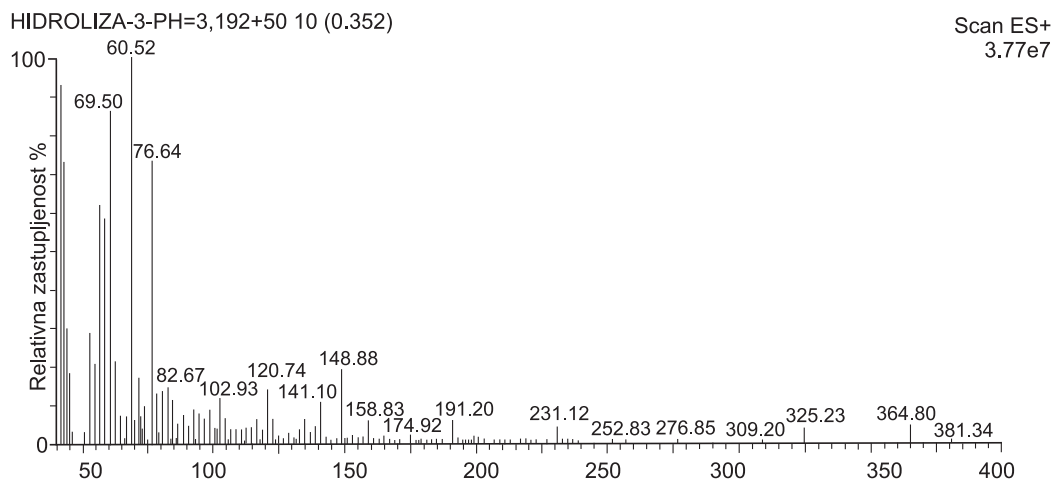
У овом спектру се уочава правилна Gauss-ова расподела [96, 97] у однос на јон m/z 60,52.



Слика 20. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , рН=3,594

И при нижим рН (Слика 20) се запажа да је расподела сигнала правилна Gauss-ова у односу сигнале: m/z 60,52 и m/z 76,64. Најинтензивни сигнали су у области m/z 50–140.

Највиши релативни интензитет (100 %) има сигнал на m/z 60,52. Поређењем овог спектра са спектром раствора при вишој рН вредности (Слика 19.) уочава се пораст интензитета сигнала на m/z 364,80, а смањује се релативни интензитет сигнала m/z 76,64. Са аспекта утицаја рН вредности на формирање хидролитичких врста овај спектар се може сматрати репрезентативним.

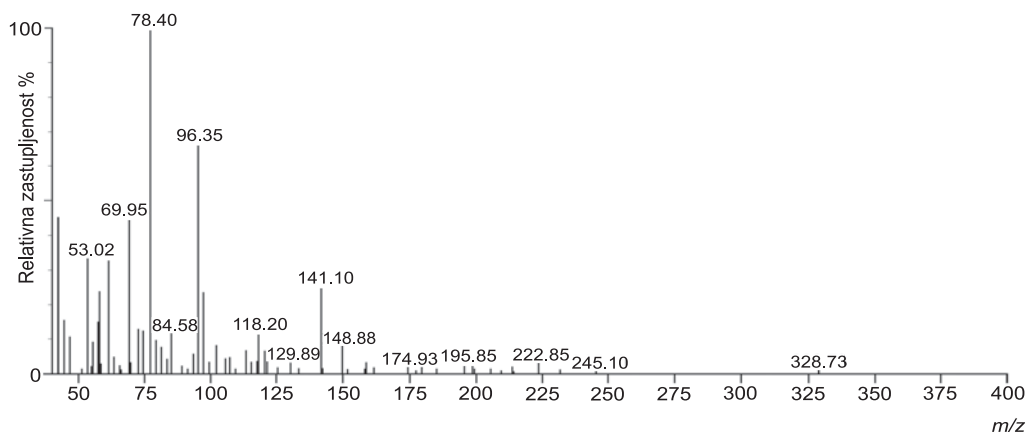


Слика 21. ESI MS спектар $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , рН=3,192

На Слици 21. је приказан спектар при најнижој рН вредности у овој серији раствора. Најобилнији сигнал је m/z 69,50 (релативни интензитет 88 %). Интензитети осталих сигнала су још увек високи m/z 76,74 (релативни интензитет 78 %), m/z 60,52 (релативни интензитет је 100 %). Релативни интензитети сигнала m/z 364,80, m/z 120,74 и m/z 76,74 расту у односу на растворе виших рН вредности.

Ефекат различитих концентрација алуминијума

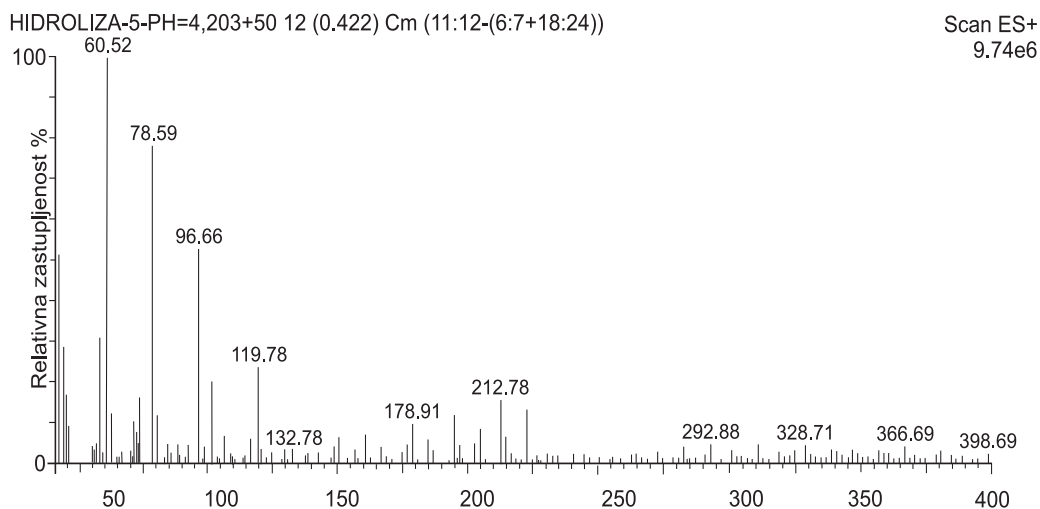
Ефекат различитих концентрација Al(III) -јона на хидролизу испитиван је на рН = 4,20, за концентрације Al(III) -јона у опсегу $0,1-1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$. Репрезентативни спектри су на Сликама 22, 23, 24.



Слика 22. ESI MS спектар $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , рН=4,35

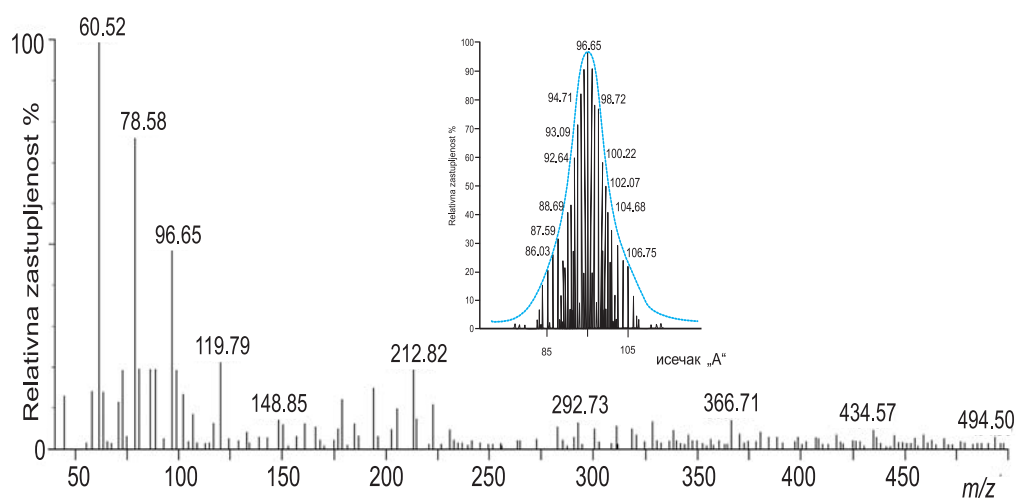
При концентрацији Al(III) -јона $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ (Слици 22) највећи број сигнала је смештен у области од m/z 50-150. Сигнали у области од 150-330 су доста нижег интензитета. Најинтензивнији је сигнал на m/z 78,40. Молекулски јон на 96,35 m/z је релативног интензитета 70 %. Пошто је сигнал на m/z 132,86 тешко видљив у основном спектру коришћен је SIM мод за потврду овог „циљаног“ јона. (Слика 104 у Дискусији) Када су хлоридни

јони координовани за Al(III)-јон, хлор изотопна дистрибуција се може користити за идентификацију ових врста (на основу % обилности изотопа и међусобног односа релативних интензитета).



Слика 23. ESI MS спектар $5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,23

При већој концентрацији алуминијума, Слика 23, најобилнији су сигнали на m/z 60,52; 78,59 и 96,66. Сигнаlima m/z 78,59, 96,66 опада релативни интензитет у односу на спектре при нижим концентрацијама алуминијума. Релативни интензитет сигнала на m/z 212,79 расте. У овом спектру се јављају и нови сигнали на m/z 366,69; 398,69 који вероватно потичу од полинуклеарних врста.

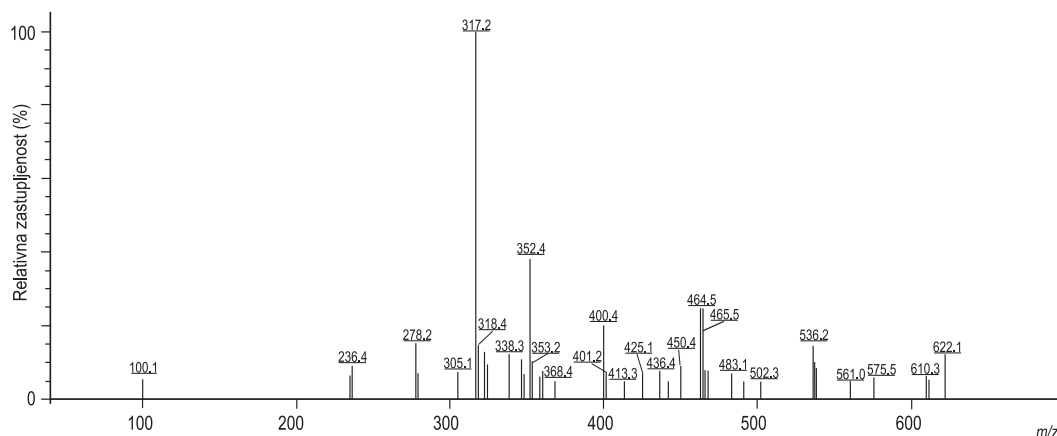


Слика 24. ESI MS спектар $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, раствора AlCl_3 , pH=4,18

Спектар (на Слици 24) и претходни (на Слици 23) су врло слични, с тим што се под условима где је виша концентрација алуминијума, јављају и нови сигнали на m/z 434,57 и 494,50. У серији спектара где је изучаван ефекат промене концентрације AlCl_3 овај спектар се може сматрати репрезентативним.

Испитивани су и спектри раствора у којима је укупна концентрација алуминијум јона била $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ на pH 4,05 са повишеном концентрацијом хлоридног јона (укупна концентрација хлорида= $150 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

У овом спектру се уочава правилна Gauss-ова расподела [96-98] у однос на јон m/z 96,65



Слика 25. ESI MS спектар $C_{Al^{3+}}=5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $C_{Cl^-}=150 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, раствора $AlCl_3$, $pH=4,05$

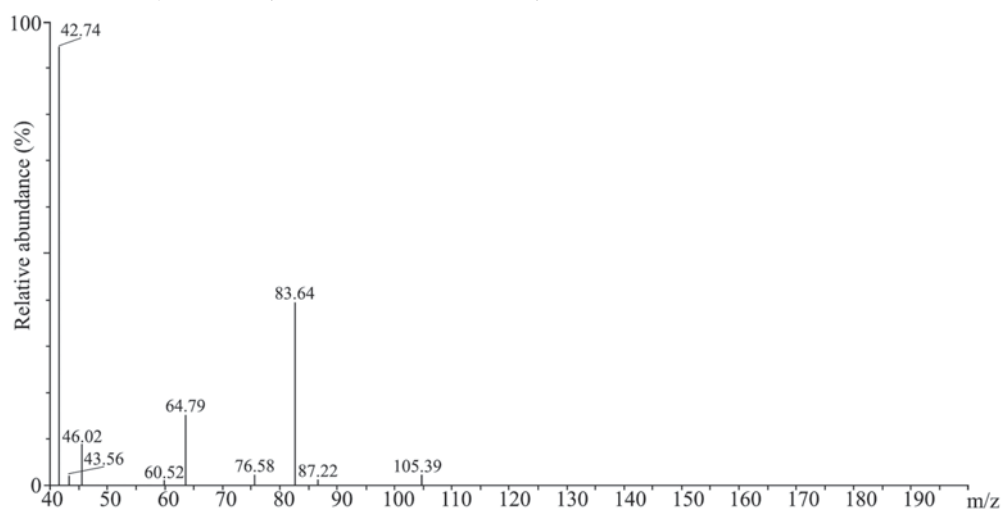
У спектру на Слици 25. интензитетска дистрибуција је правилна, а највиши сигнали су смештени на вишим m/z вредностима. Повишена концентрација хлоридног јона доводи до померања сигнала ка вишим вредностима у области од m/z 300 до 600.

До m/z 300 сигнали ређи. На спектру се уочава Gauss-ова расподела у односу на јоне m/z 352,4 и 464,5. Највишег интензитета је сигнал на m/z 317,2 (100 %). Знатног интензитета су и сигнали на m/z 352,4; 464,5; 536,2; 622,1. Утицај повишене концентрације хлоридног јона помера сигнале ка вишим m/z , јер највероватније проузрокује формирање полинуклеарних хлоридних врста. У киселим растворима алуминијум је веома хидролизован и не веже се лако са хлоридним јоном, па су врло ретки негативно наелектрисани јони. Сходно литератури [80] ефекат контра јона (хлоридног) се може уочити при снимању спектра у негативном моду

Ефекат старења раствора

Кинетички ефекти водених раствора алуминијума се традиционално изучавају потенциометријом и NMR спектрометријом. Сем у изучавању брзих реакција где се формирају врсте са мањим бројем алуминијумових језгра масена спектрометрија је врло примењива и у изучавању споријих реакција полимеризације [94].

Како на хидролизу утиче и старење раствора и овај ефекат је изучаван, тако што су припремљени раствори старили 4 сата, 7, 15 и 30 дана. У току периода старења ових раствора проверавано је pH повремено и констатовано је да су вредности стабилне до 0,01 pH јединице. Добијени резултати приказани су на Слици 26.



Слика 26. ESI MS спектар $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, раствора $AlCl_3$, $pH=3,30$, након 30 дана

Спектар на Слици 26. има много мање сигнала у односу на све до сада приказане спектре, што је последица старења раствора (30 дана). Сви сигнали су сконцентрисани у области од m/z 40-110. Само неколико сигнала у спектру на: m/z 83,64; 64,79; 76,79 су вишег интензитета. У спектару исте концентрације снимљеном одмах по припреми као доминантни сигнали уочавају се сигнали m/z 78,40, 96,35. Спектар на Слици 26. карактерише пад интензитета следећих сигнала m/z 46,02 опада до 10 % у односу на исти сигнал у спектру на Слици 22. (снимљеном одмах по припреми, чији релативни интензитет износи 40 %). Интензитет сигнала на m/z 60,52 опада са старењем раствора до 3 %. Сигнал на m/z 42,74 је са релативним интензитетом 100 %.

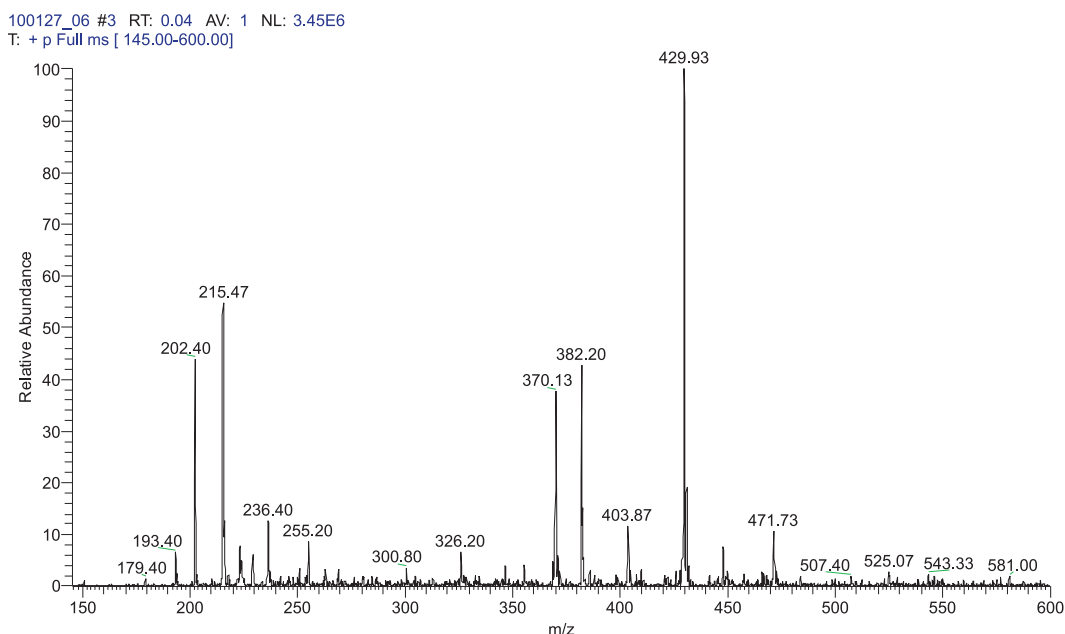
Изучавани су утицаји мобилне фазе па су у том циљу снимани спектри са и без протока мобилне фазе (спектри дати у Прилогу). У зависности од тога да ли се као мобилна фаза користи ацетонитрил или метанол сигнали у спектру се знатно разликују (Слика 1П, Прилог).

3.4.3. ESI MS спектри раствора Al(III) јона и флуорохинолона

При снимању ESI MS спектра коришћени су следећи модови снимања: Full scan mod (TIC), SIM mod, MSⁿ и Zoom Scan mod. За доказивање циљаног јона коришћен је SIM (single monitoring ion) мод. MSⁿ је мод снимања у више корака са циљем испитивања структуре јона. Zoom Scan је мод високе резолуције, где се цео опсег скенира да би се разрешио изотопски pattern [6] који се користи за одређивање наелектрисања или за одређивање јонизационог стања испитиваног једињења. Прелиминарно испитивање је указало да позитиван мод даје сигнификантније спектре, за разлику од негативног мода који даје спектре са више шума.

3.4.4. Утицај инструменталних параметара при снимању ESI MS спектра

ESI MS спектри су зависни од инструменталних параметара извора и јонске оптике који се примењују у току снимања, напона спреја, температуре капиларе, напона капиларе, потенцијала јонске оптике (tube lens offset) и напона конуса. Њиховом изменом се могу добити битно другачији резултати за дати систем. На Сликама 27 и 28 приказани су ESI MS спектри снимљени при различитим RF lens напонима.

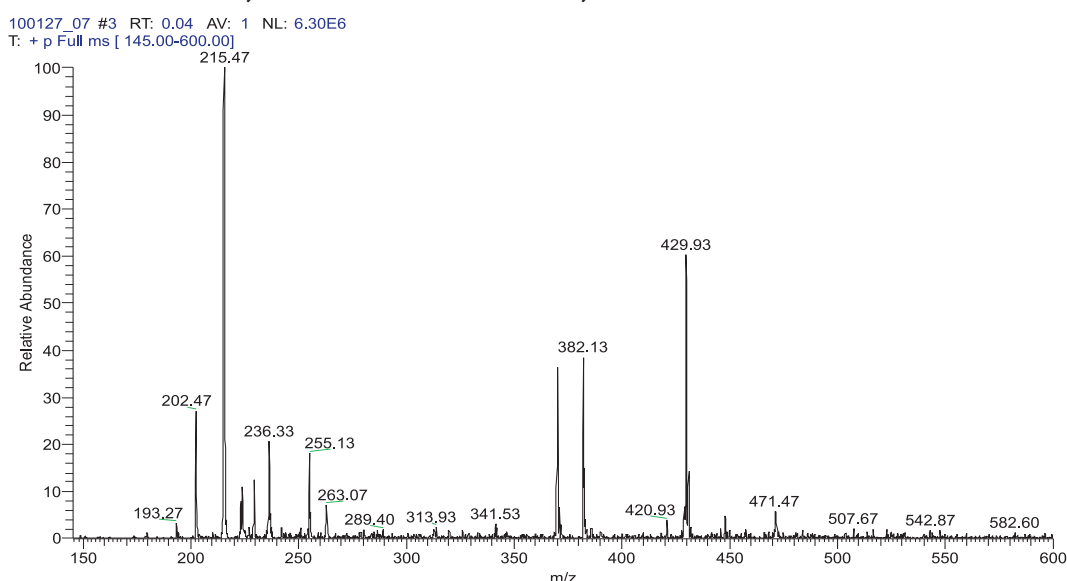


Слика 27. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Floro}=2:1$, pH=4,16,

(N° 1, табела 12), rf tube lens 15 V

Састав и рН вредност раствора, чији је ESI MS спектар приказан на Слици 27 дат је у Табели 12. (раствор 1). Напон оптике је подешен на 15 V, проток гаса који потпомаже формирање и десолватацију капљица 74, брзина протока раствора 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, ињектирана запремина 69 μL . У спектрима на Сликама 27 и 28 су осим различитих напона оптике (tube lens voltage), различити протоци десолватационог гаса и брзине протока раствора у односу на све остале спектре. Констатовано је да брзина протока раствора мање утиче на изглед спектра од осталих инструменталних параметара.

Интезитети сигнала у спектру на Слици 27 показују правилну Gauss-ову расподелу. (за јоне m/z 202,40, 370,13, 382,20 и 429,90). Карактеристична је изотопска дистрибуција за јоне m/z 382,13 и 215,47. Под овим условима у спектру се запажа доста шума. Сигнали највишег интензитета се идентификују у интервалу од m/z 190 до m/z 500. При условима када је напон оптике 15 V релативни интензитет јона m/z 215,47 износи 58 %, јона 429,90 износи 100 %, јона 255,20 износи 12 %, јона 202,40 износи 44 %, јона 236,40 износи 12 %.



Слика 28. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Floro}=2:1$, рН=4,16, (N° 1, табела 12), tube lens=20 V

Спектар на Слици 28 је снимљен при другим инструменталним условима у односу на претходни са циљем испитивања утицаја различитих напона на оптици (tube lens voltage). Састав раствора и рН вредност раствора су исти као и у спектра на Слици 27. Напон оптике је у овом случају износио -20 V. (Остали параметри су били исти као при снимању претходног спектра: проток гаса који потпомаже формирање и десолватацију капљица 74, брзина протока раствора $10 \mu\text{L}/\text{min}$, ињектирана запремина 69 μL). Највећи утицај промене вредности напона оптике (tube lens) се запажа на јоне m/z 215,47, 429,93, 255,13. У случају када је напон оптике подешен на -20 V релативни интензитет јона m/z 215,47 износи 100 %, јона 429,93 износи 63 %, јона 255,13 износи 20%, јона 202,47 износи 28 %, јона 236,33 износи 24 %. У односу на претходни спектар интензитети неких сигнала расту, а интензитети других сигнала опадају.

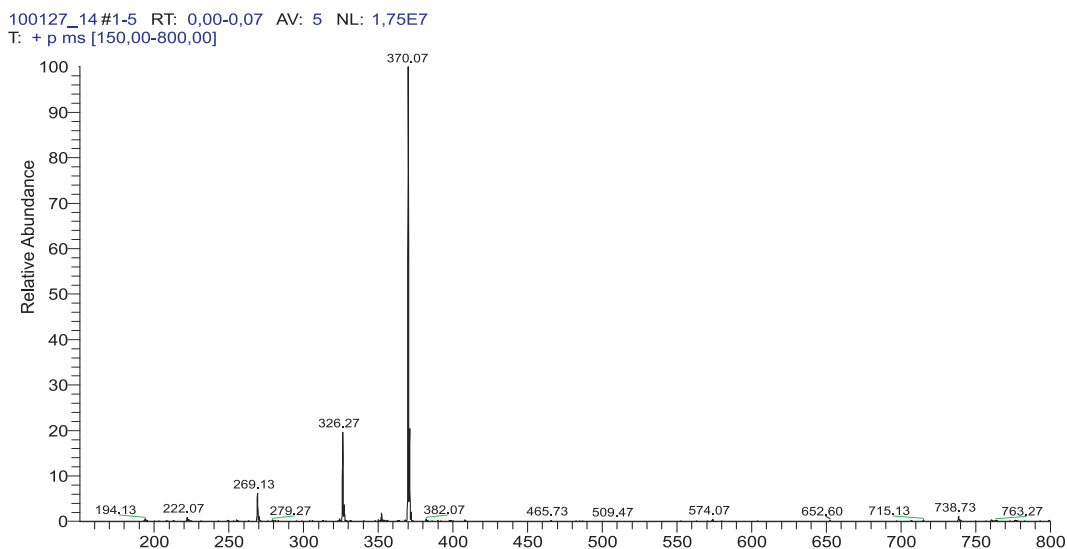
3.4.5. Утицај експерименталних услова при снимању ESI MS спектра

Реакције комплексирања зависе од: концентрације метала, лиганда, концентрационог односа метала и лиганда, рН вредности у раствору. У циљу снимања ESI MS спектра раствора алуминијум(III)-јона и флуорохинолонских лиганда припремљено је неколико серија раствора чији су састави и рН вредности дати у Табели 12. Прелиминарна испитивања су показала да лиганди и комплекси лиганда са алуминијумом који поседују базе

функционалне групе, лакше подлежу протоновању у киселој средини и фаворизују стварање позитивних јона, тако да су спектри лиганда и комплекса лиганда са алуминијумом најпре снимани у позитивном моду. Једна серија узорака је снимљена и у негативном моду. Пре снимања комплекса снимљени су спектри самог лиганда у позитивном и негативном моду.

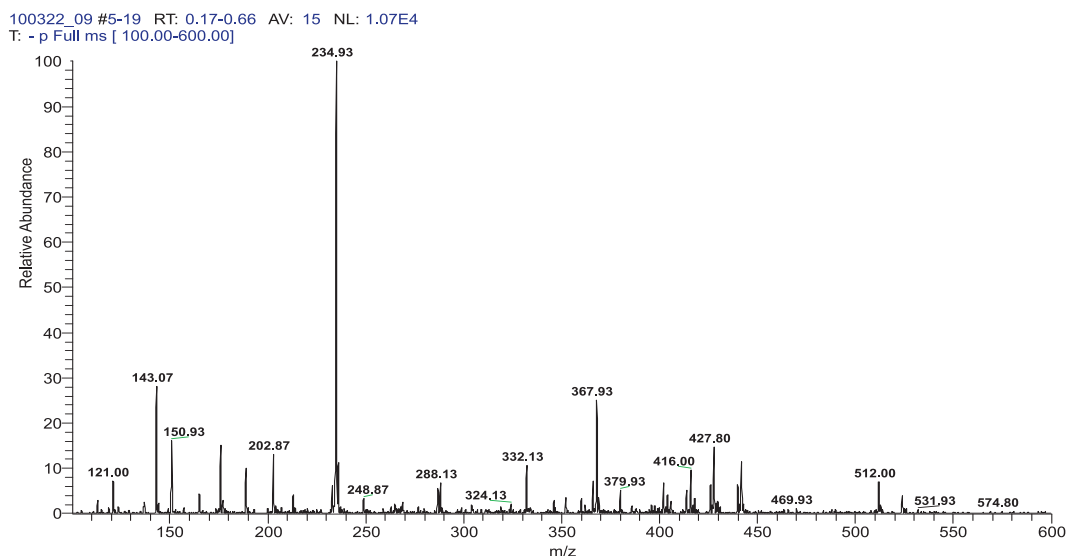
3.4.6. ESI MS спектри флероксацина у позитивном и негативном моду

У спектру на Слици 29 приказан је спектар раствора флероксацина, концентрације $C_1=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,26$.



Слика 29. ESI MS спектар флероксацина, молекулски јон m/z 370, $\text{pH}=4,26$, позитиван мод

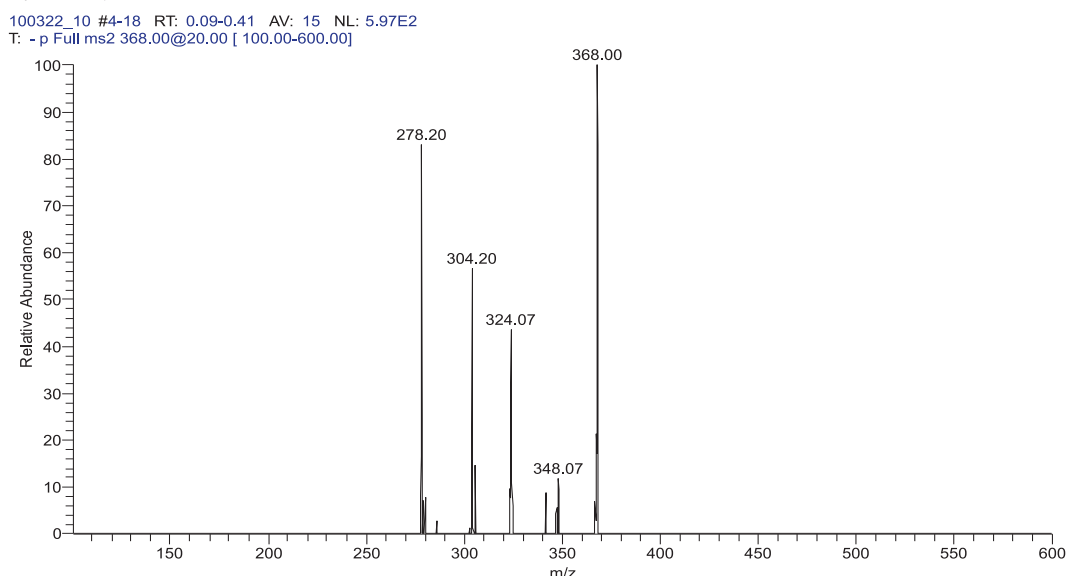
Као најинтензивнији сигнал (релативни интензитет 100 %) уочава се сигнал на m/z 370,07, који потиче од протонованог молекулског јона, док је m/z 326,27 релативног интензитета 24 %. Остали сигнали имају мале интензитете (релативних интензитета <15 %). Оптимизација радних услова инструмента (ESI извора и јонске оптике) је извршена према молекулском јону m/z 370,07 који је одабран као мониторинг јон. Идентификоване врсте приказане су у Табели 12 у Дискусији.



Слика 30. ESI MS спектар флероксацина, молекулски јон m/z 368, $\text{pH}=4,26$, негативни мод

У спектру на Слици 30 приказан је спектар раствора исте концентрације и pH вредности, снимљен у негативном моду. Уочава се базни пик флероксацина на m/z 367,93 који потиче од

депротонованог молекулског јона (релативни интензитет 28 %), док је m/z 234,93 релативног интензитета 100 %, чија је разлика у маси 133 у односу на молекулски јон. Остале јонске врсте значајнијег интензитета су: m/z 143,07; 150,93; 202,87 и 427,80. Мониторинг јон у овом случају је молекулски јон m/z 368,0.



Слика 31. MS/MS јона 368,00 $E_{\text{coll}}=20\%$

Ако се примени колизиона енергија од 20 % (Слика 31) још увек је врло интензиван молекулски јон 368,00 (релативни интензитет 100 %). Иако је ниска колизиона енергија, ипак је дошло до фрагментације молекулског јона флероксацина. Главни продукт јони из MS² експеримента су: m/z 278,20; 304,20; 324,07; 348,07.

3.4.7. ESI спектри раствора алуминијума и флероксацина јозијивни и нејозијивни мод

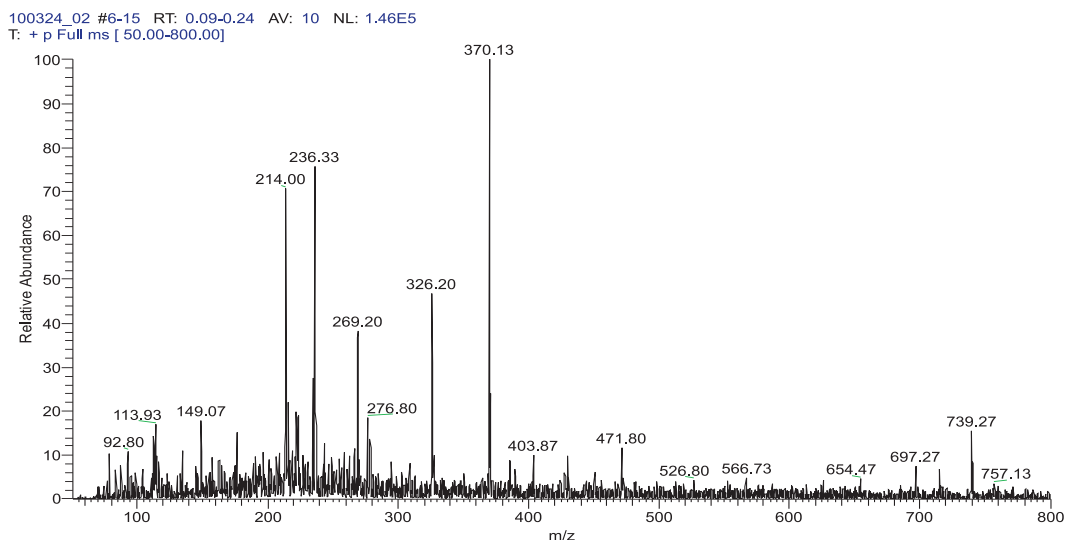
За изучавање комплексирања алуминијума и флероксацина ESI MS припремани су раствори различитих концентрација, концентрационих односа и различитих рН вредности, чији су састави дати у Табели 12. Ове серије узорака су снимљене при следећим инструменталним условима: напон оптике 15 V, проток гаса који потпомаже формирање и десолватацију капљица 19, проток раствора 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, ињектирана запремина 30 μL .

Табела 12. Састави и рН вредности раствора за ESI MS спектре				
№ узорка	рН	Концентрација Al [mol/dm^3]	Концентрација лиганда [mol/dm^3]	Концентрациони однос Al:L
1.	4,16	$5,4 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	2:1
2.	4,03			
3.	5,29	$2,7 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-5}$	1:3
4.	6,20			
5.	3,50			
6.	4,14	$2,7 \times 10^{-5}$	$4,05 \times 10^{-5}$	1:1,5
7.	5,64			
8.	3,05			
9.	4,06	$5,4 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	2:1
10.	5,06			
11.	5,02	$2,7 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	1:1
12.	5,03	$2,7 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	1:2
13.	5,04	$2,7 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-5}$	1:3
14.	4,96	$5,4 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	2:1

1. Спектри раствора алуминијума и флероксацина, 1:3 концентрациони однос, позитивни и негативни мод

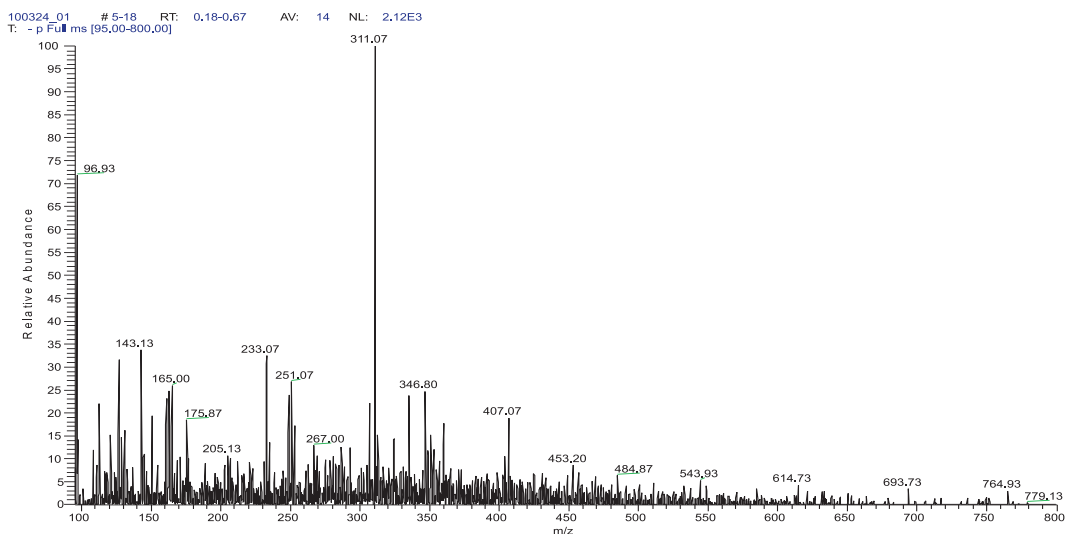
У Табели 12 дати су састави и рН вредности (4,03, 5,29, 6,20) раствора за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$. Ови спектри приказани су на Сликама 32-37. За растворе флероксацина и алуминијума извршено је снимање ESI MS спектра под истим условима, тј. примењени су исти оптимизовани параметри као и при снимању раствора самог флероксацина.

Иако ESI спада у „благ“ јонизационе технике са малим степеном деградације анализата, ипак се запажа одређен степен фрагментација и у примарним ESI MS спектрима.



Слика 32. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$ (N° 2, табела 12), позитивни мод

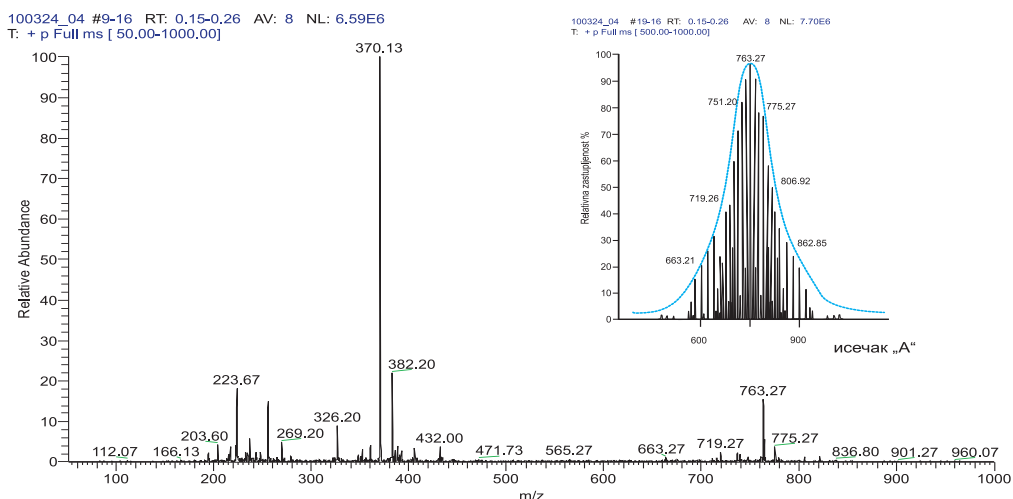
На Слици 32 приказан је спектар раствора у коме је рН=4,03. Спектар се може поделити на две области: прва област m/z од 90 до m/z 400 са вишим интензитетима сигнала и друга област за веће од m/z 400 коју карактеришу сигнали знатно нижег интензитета. У спектру се запажају „нови“ сигнали знатног интензитета: m/z 214,00, 236,33, 276,80, 697,27, 739,27, што највероватније указује на формирање нових комплексних јона позитивног наелектрисања. Неки од „нових“ сигнала нису приметни за исти концентрациони однос и више вредности рН, јер у овом случају се поред комплексирања дешава и хидролиза алуминијума с обзиром да рН=4,03 погодује и хидролитичким реакцијама. Овај спектар је недовољно репрезентативан, јер га карактерише веома изражен шум, као и преклапања сигнала, највероватније последица појаве хидролитичких сигнала.



Слика 33. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$, рН=4,03, негативни мод

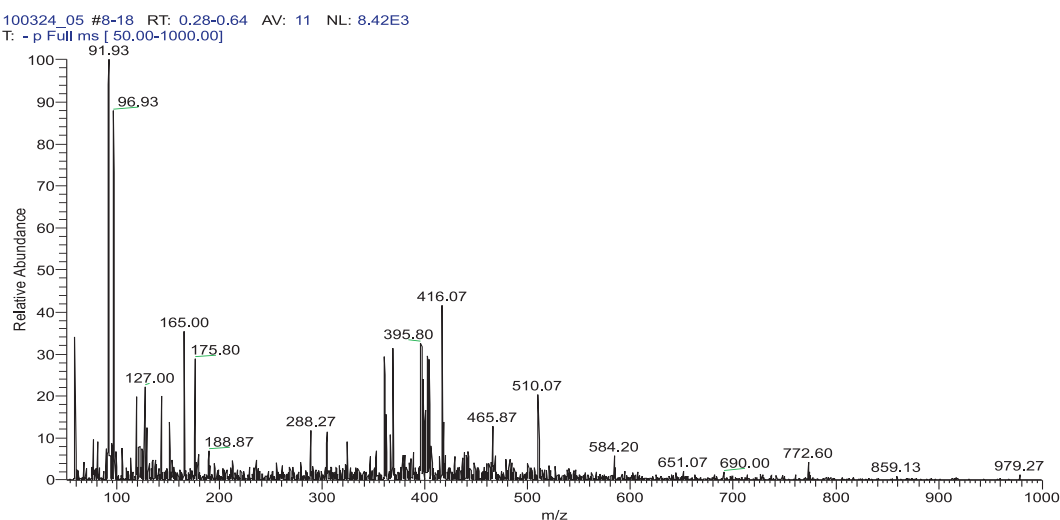
На Слици 33 приказан је спектар истог раствора као на претходној само снимљен у негативном моду (напон на капилари=-15 V, tube lens offset=-5). У Xcalibur програму је креирана и оптимизована нова инструментална метода за рад у негативном моду. У спектру је присутно много више шума него у истом снимљеном у позитивном моду. Сигнале знатног интензитета, у овом спектру су: m/z 143,13; 233,13; 311,07; 346,80; 407,07. Спектар се карактерише великим присуством шума и преклапањем сигнала што отежава идентификацију врста присутних у раствору.

Сигнали у овом спектру који се уочавају као нови и највероватније припадају хидролитичким врстама су: најинтензивнији сигнал на m/z 96,93 (релативног интензитета 72 %), 311,07 (релативни интензитет 100%), 346,80 (релативног интензитета 28 %), 286,93 (релативног интензитета 16 %), 251,07 (релативни интензитета 26 %).



Слика 34. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$ (N°3, табела 12), позитивни мод

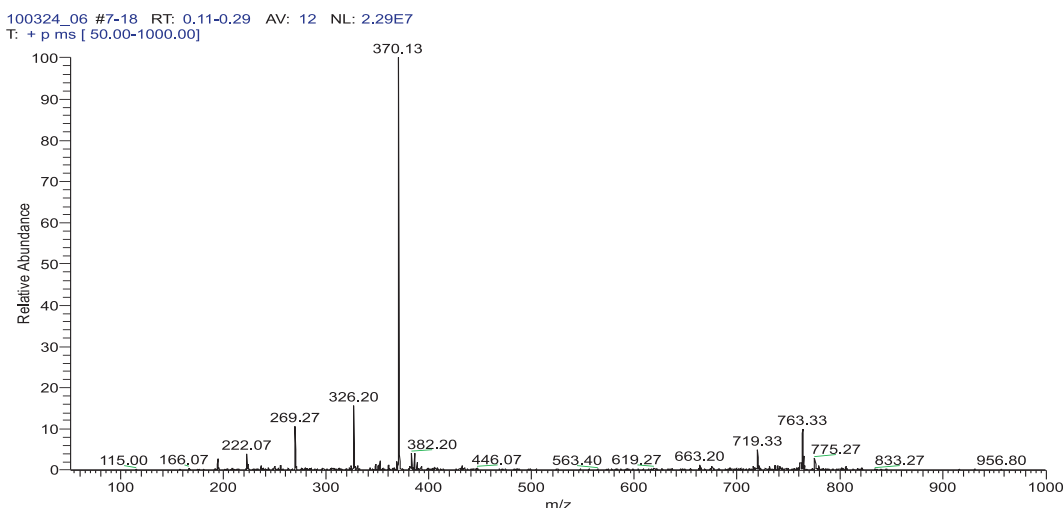
Спектар на Слици 34 карактерише „чиста“ базна линија, јасни сигнали. Интензитетска расподела је правилна Gauss-ова расподела. У исечку „А“ на Слици 34 приказана је Gauss-ова расподела у односу на јон 763,27. На сличан начин се може илустровати Gauss-ова расподела у односу на остале јоне у изучаваним спектрима. Највероватније је комплексирање доминантно при овим условима, рН=5,29, лиганд у вишку. Сигнал на m/z 763,27 расте (релативног интензитет 20 %). Сигнал на m/z 719,27 је ниског релативног интензитета 6 %. Сигнал 382,20 је са релативног интензитетом 24 %. Сигнал на m/z 223,67, са релативним интензитетом 20 %. Сигнал 203,60 је релативног интензитета 6 %. Овај спектар се може сматрати репрезентативним за овај концентрациони однос.



Слика 35. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$, рН=5,29, негативни мод

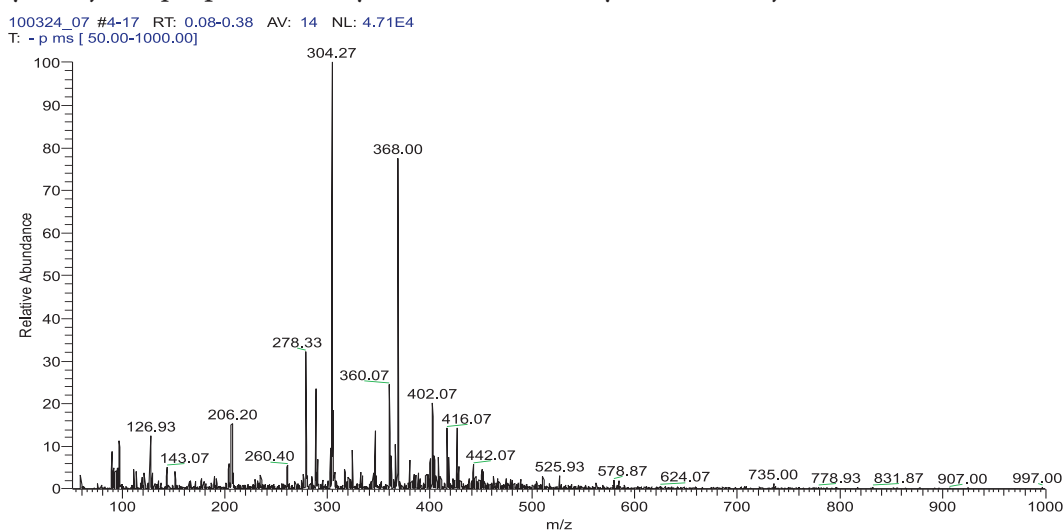
На Слици 35 приказан је спектар истог раствора само снимљен у негативном моду. Спектар је снимљен у опсегу m/z 50-1000. Сигнали вишег интензитета су у области до m/z 500. Ову област карактерише велики шум и преклапање сигнала. Сигнали вишег интензитета су : 91,93; 96,93; 165,00; 395,80; 416,07 510,07, 772,60. У области $m/z > 500$ запажа се мање шума и сигнали нижег интензитета.

Сигнали уочени у спектру на Слици 32 на рН 4,03 овде нису уочљиви (а највероватније припадају хидролитичким врстама) што је највероватније последица чињеце да при овом рН доминира комплексирање у односу на хидролизу.



Слика 36. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1:3$ (N°4, табела 12), позитивни мод

При истом концентрационом односу, а са повећањем рН=6,20 добија се спектар на Слици 36. Вредност рН=6,20 мање погодује комплексирању тако да су релативни интензитети сигнала који највероватније указују на формирање комплексних јона снижени. Јону m/z 763,27 се релативни интензитет са 20 % смањује на 12 %. Јон m/z 719,33 показује незнатан пораст интензитета. Јон m/z 382,20 показује велики пад релативног интензитета на 5 %. Сигнали слободног лиганда m/z 326,20 и 269,27 показују пораст у интензитету што указује да на овом рН заостаје све више неизреагованог лиганда (релативни интензитет молекуског јона флероксацина у позитивном моду m/z 370,13 је 100 %).



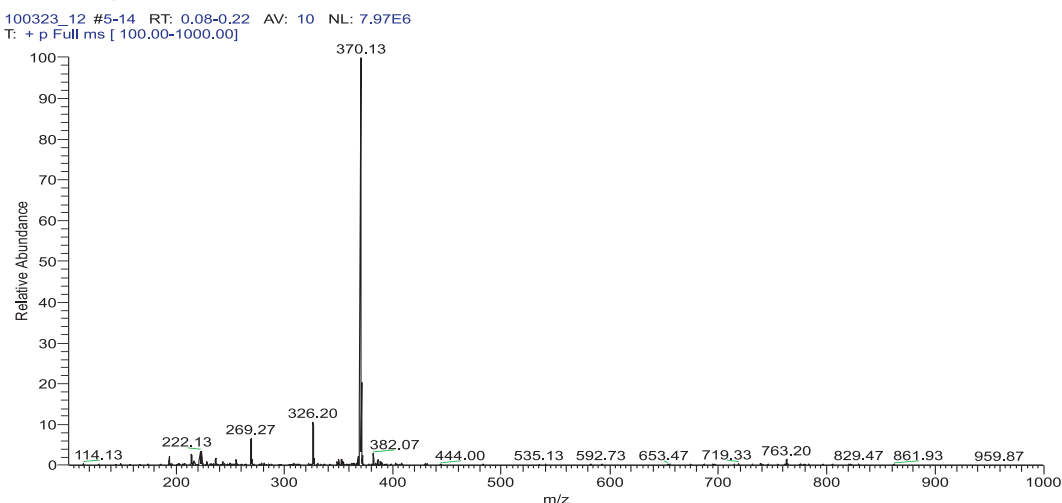
Слика 37. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1:3$, рН=6,20, негативни мод

На Слици 37 приказан је спектар истог раствора као на претходној рН=6,20, снимљен у негативном моду, у опсегу m/z 50-1000. У спектру је присутно више шума и спектралног

преклапања него у истом снимљеном у позитивном моду. Сигнали знатног интензитета су: 304,27 (релативни интензитет 100 %), потиче од слободног лиганда, молекулски јон флероксацина у негативном моду 368,00 (рел.интензитета 78 %); 278,33 (релативног интензитета 35 %); такође потиче од слободног лиганда. Ови сигнали указују да на овом рН заостаје више неизреагованог лиганда, што је у потпуности у складу са закључком када је исти раствор снимљен у позитивном моду.

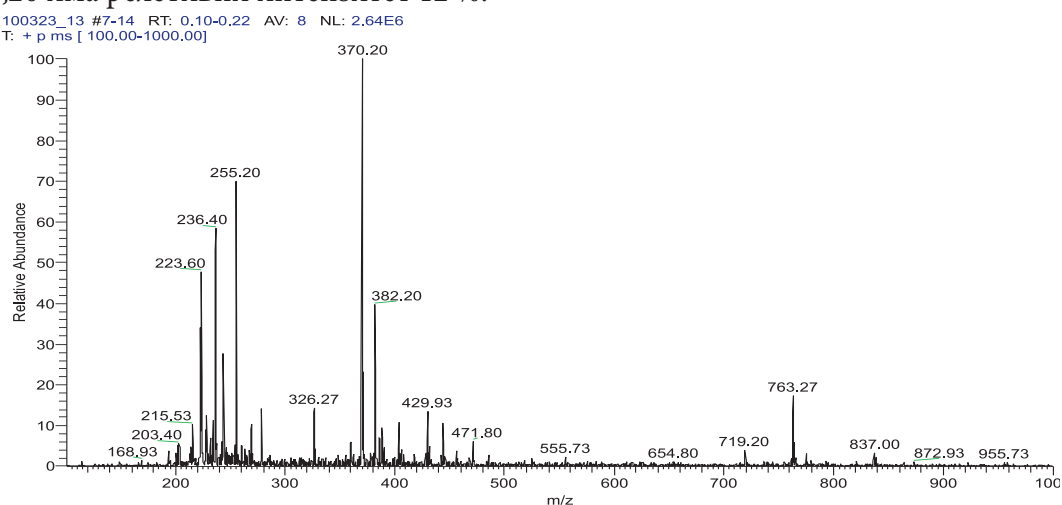
2. Спектри раствора алуминијума и флероксацина, $C_{Al}:C_{Flero}=1:1,5$ концентracиони однос

Спектри концентracионог односа $C_{Al}:C_{Flero}=1:1,5$, за различите рН вредности (3,50, 4,14, 5,64), чији су састави дати у Табели 12, приказани су на сликама 38-40. И у овој серији спектара, која је снимљена при благој јонизацији у ESI извору, јавља се и у основним MS¹ спектрима приметна фрагментација. Добијени ESI MS спектри испитиваних комплекса добро одсликавају њихову молекулску структуру и могу се корелисати са њиховим карактеристикама, што је основни предуслов за коришћење ESI MS технике за потребе ових експеримената.



Слика 38. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:1,5$ (N°5, табела 12), позитивни мод

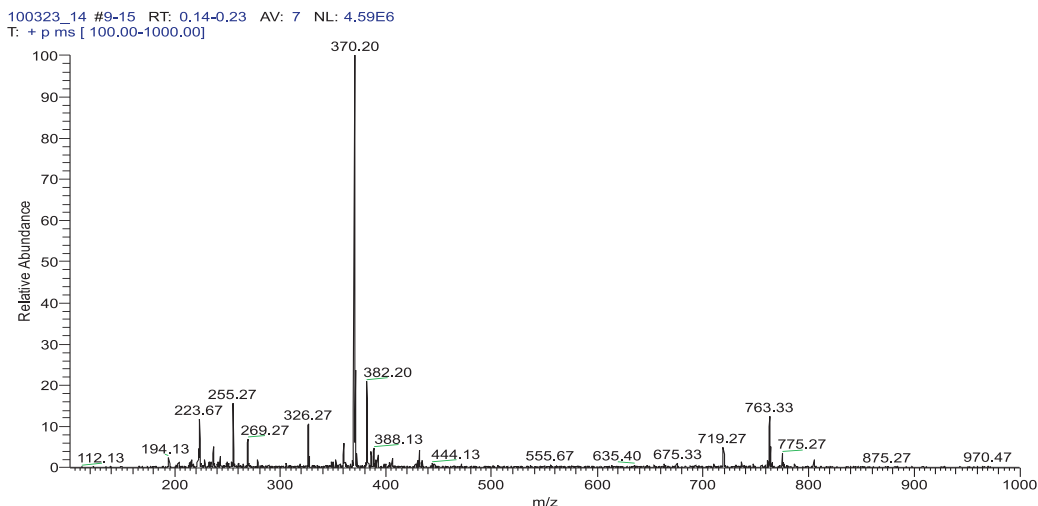
Спектар на Сlici 38. има мало сигнала, што највероватније значи да је комплексирање мало изражено, при рН = 3,50. Релативни интензитети сигнала, који највероватније указују на комплексирање су ниски. Базна линија је чиста, без шума. Сигнали 763,27 и 719,33 су релативних интензитета $m/z < 5$ %. Двоструко наелектрисани јони 382,20; 222,13 су релативног интензитета 6 %. Интензитет протонованог молекулског јона 370,13 је 100 %, а јон 326,20 има релативни интензитет 12 %.



Слика 39. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:1,5$ (N°6, табела 12), позитивни мод

Спектар на Слици 39 се односи на раствор истог концетрационог односа и више рН вредности (рН = 4,14) и карактерише се израженим преклапањем сигнала. До су 450 m/z су сигнали виших релативних интензитета, са доста шума. При m/z већим од 500 једини већи сигнали су од јона 763,27 и 719,20.

Под овим концентрационим и рН условима је изражено комплексирање при чему су релативни интензитети формираних сигнала доста виши. Уочавају се и нови сигнали у односу на претходни спектар. Један од нових сигнала је на m/z 255,20. Интензивнији сигнали су и 236,40 и 223,60. Сигнал на m/z 763,27 је са релативним интензитетом већим од 20 %, сигнал 382,20 је са релативним интензитетом 45 %.

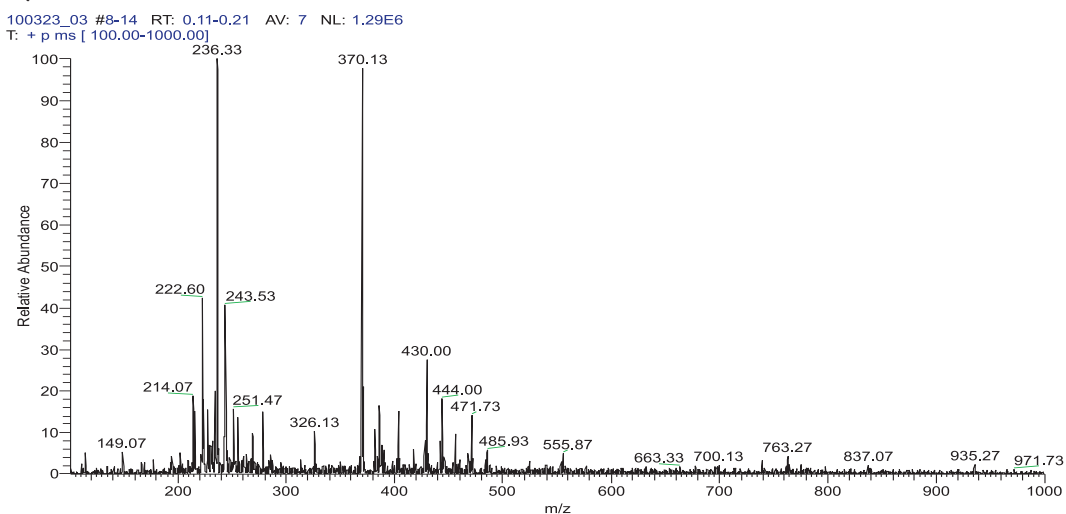


Слика 40. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1:1,5$ (N°7, табела 12), позитивни мод

При истом концетрационом односу а при рН = 5,64 интензитети „главних“ сигнала почињу да опадају (Слика 40). Сигнал на m/z 763,27 је релативног интензитета мањег од 20 %, сигнал 382,20 је релативног интензитета 25 %. Сигнал јона 255,27 је релативног интензитета 20 %. При овој рН вредности комплексирање је интензивније него ли при рН вредностима 3,50 и истом концентрационом односу. Из дате серије овај спектар се може сматрати репрезентативним, јер се у овом спектру уочавају сигнали без много шума и преклапања.

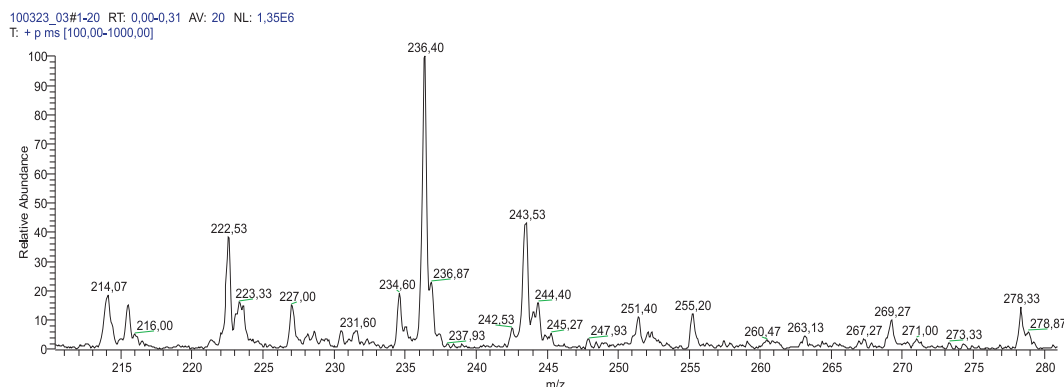
3. Спектри раствора где је метал у вишку, а различите рН вредности

Спектри за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Flero} = 2:1$ за различите рН вредности (3,05, 4,06, 5,06) су приказани на Сликама 41-43. За ову серију је карактеристична појава већег броја сигнала у области од m/z 190 до 250.



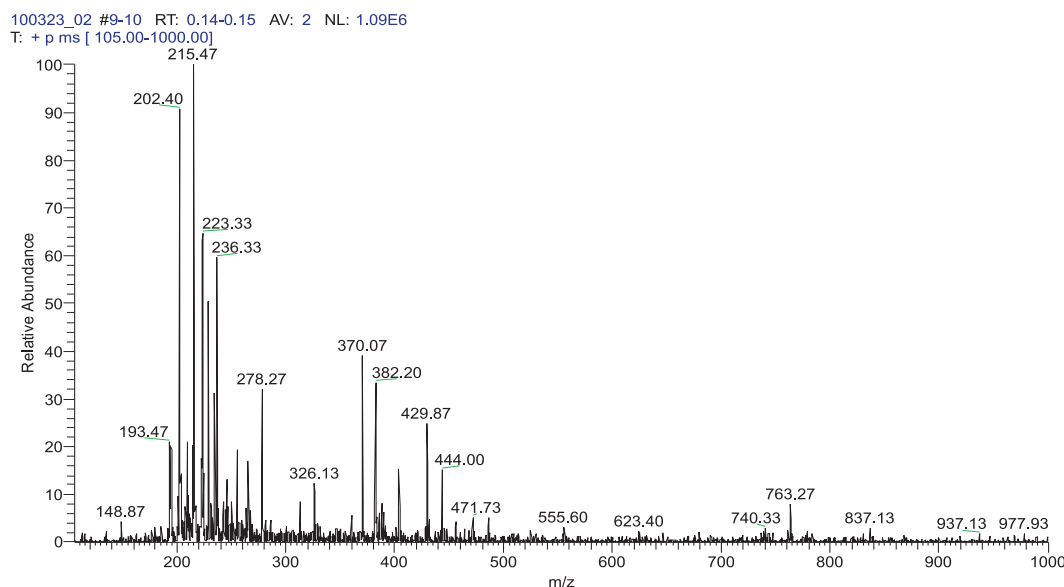
Слика 41. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 2:1$ (N° 8, табела 12), позитивни мод

Спектар на Слици 41 је снимљен у опсегу од m/z 100 до 1000. У спектру се запажају две области: m/z до 500 са сигналама виших интензитета, већим преклапањем и област већом од m/z 500 са сигналама нижег интензитета. Запажа се јачи шум у овом спектру. Сигнал на m/z 763,27 је релативног интензитета 7 %. Молекулски јон флероксацина је мањи од 100 %. Сигнал на m/z 382,20 је релативног интензитета 18 %. У поређењу са спектрима где је лиганд у вишку, спектри где је метал у вишку су са много више сигнала што највероватније потиче од хидролитичких процеса који су у овом случају конкурентни процесима комплексирања.



Слика 42. Gauss-ов приказ спектра раствора $C_{Al}:C_{Flero}=2:1$, $pH=3,05$

На Слици 42 је приказан интервал од m/z . 200 до 280 На овом приказу се види да је расподела интензитета сигнала правилна, која се не уочава лако у основном спектру на Слици 41, због много шума у том спектру.



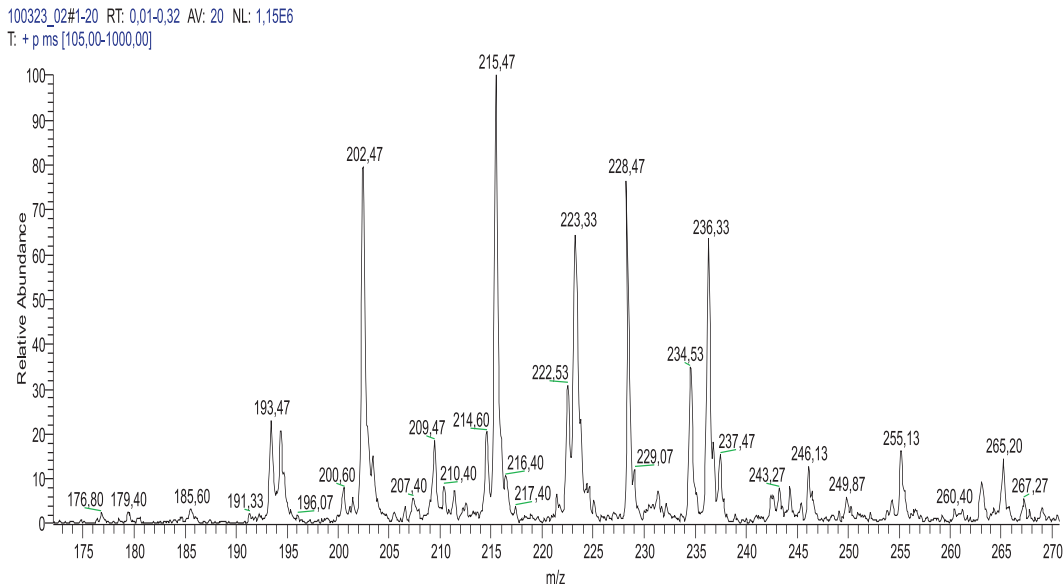
Слика 43. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=2:1$ (N° 9, табела 12), позитивни мод.

При истом концентрационом одосу алуминијума и флероксацина а са повећањем pH за једну јединицу добија се спектар на Слици 43. Спектар карактерише доста шума, највероватније последица фаворизованих хидролитичких процеса под овим експерименталним условима. Релативни интензитет јона 763,27 расте до 12 %, док релативни интензитет молекулског јона лиганда на m/z 370,07 опада на 40 %. Сигналу 382,20 расте релативни интензитет до 35 %. Релативни интензитет „новог“ сигнала на m/z 215,47 је 100 %. У овом спектру су интензивни и сигнали: 193,47; 202,40, док су једва приметни у растворима када је лиганд у вишку (последица комплексирања).

3.4.7.1. Основне карактеристике спектралних линија Gauss-ова расподела

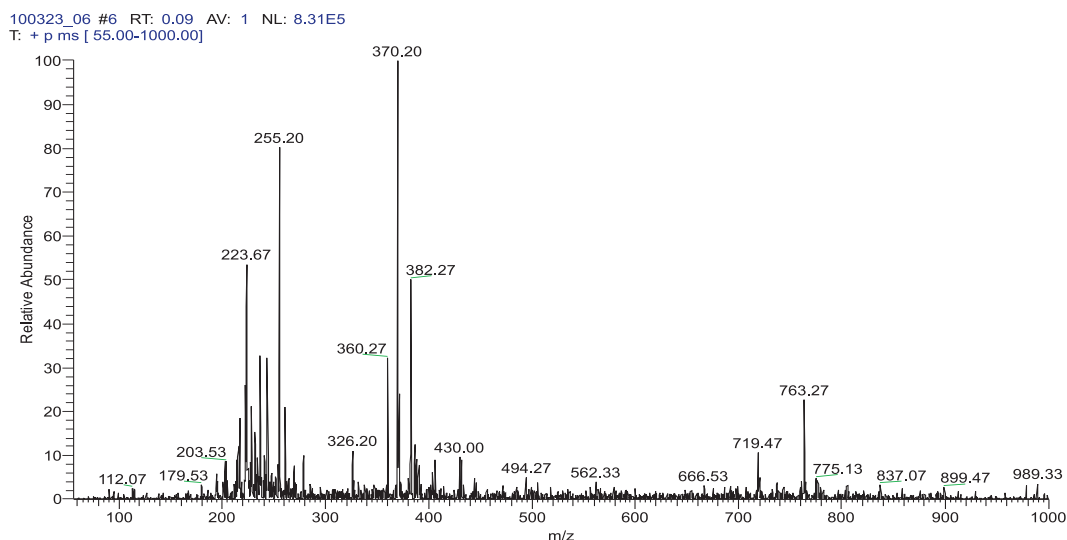
Основна карактеристика профила линије је његова полуширина на половини висине максималног интензитета $\Delta\lambda/2$ тј. ширина спектралне линије је у складу са нормалном расподелом. Најзначајније особине спектралних линија јесу интензитет линије и облик профила линије. Спектрална линија увек има одређен профил тј. некакву расподелу интензитета зрачења у одређеном интервалу фреквенција [96, 97, 98]. Профил не мора обавезно бити симетричан. Облик профила и ширина снимљене спектралне линије зависе од врсте атома емитера, физичких услова присутних у извору, као и од карактеристика спектралног уређаја. При анализи спектралних линија значајне су и друге карактеристике профила, као што су: форма крила линије, асиметрија профила или померај спектралне линије. Померај представља растојање за које је максимум испитиване спектралне линије померен у односу на максимум линије коју би емитовали изоловани и непокретни атоми. Све ове карактеристике профила линије говоре о посебним физичким условима у којима се налазе емитери приликом емисије фотона. Ти посебни физички услови су последица истовременог присуства интензивног термичког кретања честица извора и интеракције међу њима.

Механизми који доводе до ширења спектралних линија, које емитују неутрални атоми или јони из извора, могу се поделити у три групе: природно ширење, које је последица коначности средњег времена живота атома у побуђеном стању Doppler-ово ширење, које се јавља услед кретања атома-емитера у односу на оптички систем помоћу којег се зрачење посматра ширење услед притиска, узроковано интеракцијом атома-емитера са околним неутралним и наелектрисаним честицама (пертурберима). Наведени механизми делују истовремено, али је њихов утицај различит и зависи од услова који владају у извору. Осим поменутих механизма ширења постоји и додатно инструментално ширење спектралних линија које уноси сам спектрални уређај.



Слика 44. Gauss-ов приказ спектра раствора $C_{Al}:C_{Floro}=2:1$, $pH=4,06$

На Слици 44 је приказан интервал од m/z 170 до 270. На овом приказу се види да је расподела интензитета сигнала Gauss-ова, која се не уочава у основном спектру на Слици 43 због много шума у овој области. Полуширине линија на слици су у складу са нормалном расподелом. Профил линија у интервалу од m/z 190 до 250 је симетричан. Већину линија карактерише појава крила што је највероватније последица недовољне резолуције инструмента

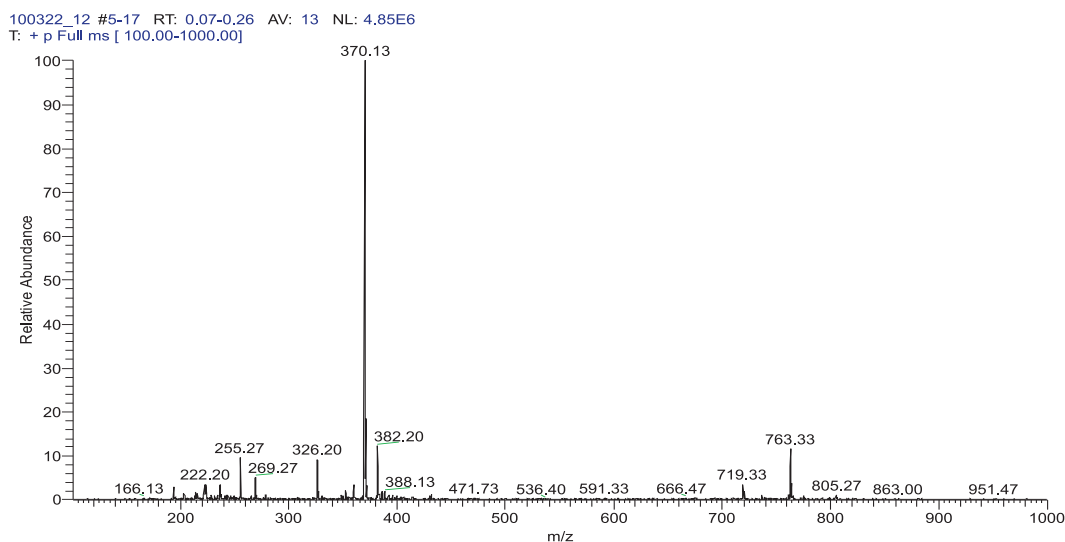


Слика 45. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=2:1$ (N°10, табела 12), позитивни мод.

Повећањем рН само једну јединицу ($pH = 5,06$) добија се за спектар на Слици 45 кога карактерише доста шума у целом опсегу m/z . Интензитетска расподела сигнала је правилна, Gauss-ова. Релативни интензитет јона на m/z 763,27 расте и износи 24 %, а јон 719,47 је релативни интензитет 12%. Релативни интензитет молекулског јона 370,20 расте до 100%. Општи изглед овог спектра све више се ближи спектрима који настају када су лиганди у раствор додати у вишку. Сигнал јона на m/z 382,27 расте до 50 %. У знатном проценту су заступљени јони 255,20 и 223,67 (више од 50 %). Из ове серије, где је метал у вишку, а хидролитички процеси конкурентски са процесима комплексирања, спектар на Слици 45, се може сматрати репрезентативним.

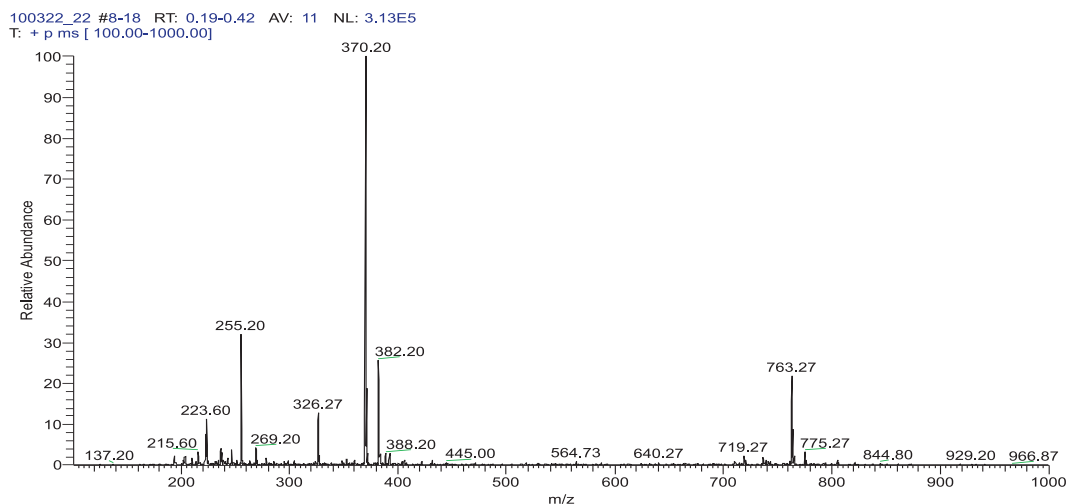
4. Спектри раствора где је истиа рН вредност, а различити концентрациони односи

На основу резултата снимљених спектра где је мењана рН вредност, при константним концентрациони односима закључено је да је рН вредност 5,0 оптимална. Стога у овом пасусу су резултати снимања серије спектра где је рН подешено на 5,00, а мењан је међусобни однос метала и лиганда како би се добили најоптималнији спектри. Појединачне концентрације су биле реда 10^{-5} mol/dm^3 , као у људском организму. Инструментални услови снимања су исти као и у претходним серијама спектра. Спектри ове серије су приказани на Сликама 46-50. Мало шума у спектрима је карактеристично за целу серију.



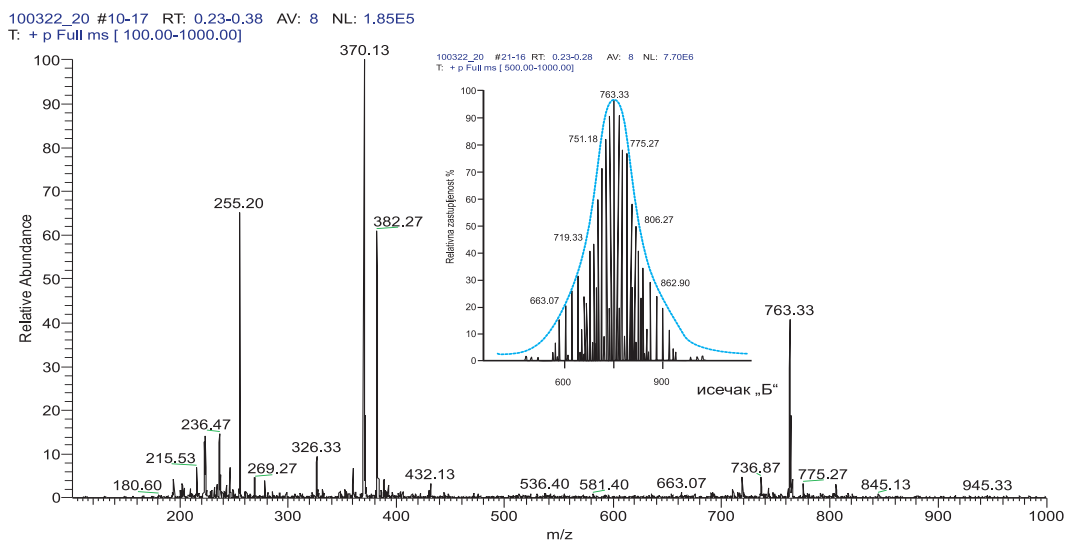
Слика 46. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:1$ (N° 11, табела 12), позитивни мод

При концентрационом односу $C_{Al}:C_{Flero}=1:1$, (Слика 46) уочава се правилна Gauss-ова расподела по интензитетима. Релативни интензитет сигнала на m/z 763,27 је 18 %, а јона 719,33 релативни интензитет је 6 %. Релативни интензитет молекулског јона лиганда m/z 370,07 је 100 %. Сигнал на m/z 382,20 има релативни интензитет 12 %. Релативни интензитет сигнала на m/z 222,20 је 5 %. Релативни интензитети сигнала у овом спектру су прилично ниски што указује да при овом концентрационом односу највероватније долази до комплексирања метала и лиганда, али је принос формираних врста низак у поређењу са интензитетом молекулског јона лиганда, 370,13.



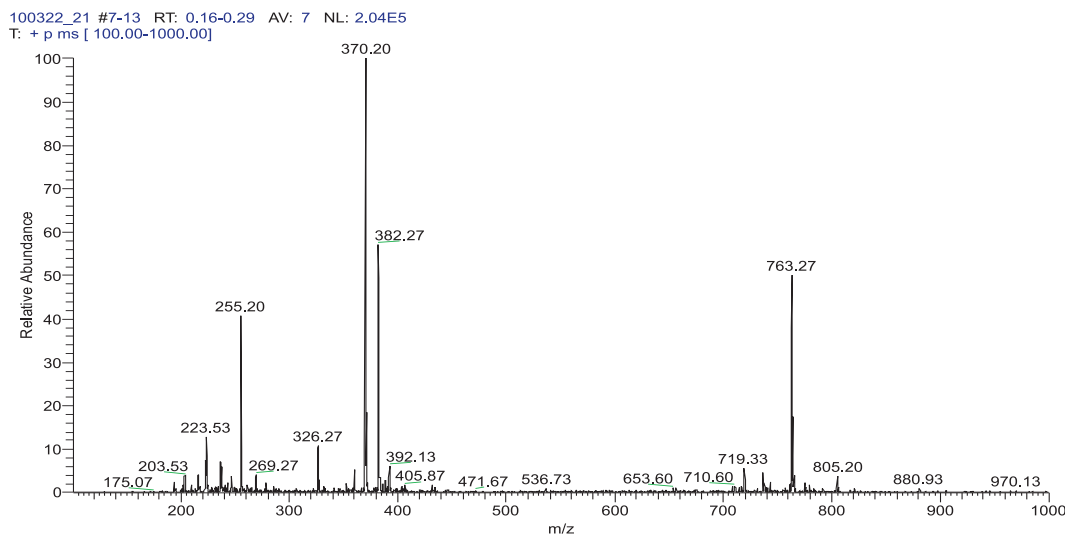
Слика 47. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=2:1$, $pH=4,96$ (N° 14, табела 12) позитивни мод

При двоструко већој концентрацији метала у односу на концентрацију лиганда у раствору, (Слика 47) уочава се да су релативни интензитети сигнала, који указују да највероватније долази до комплексирања, већи него у претходном спектру. Релативни интензитет сигнала на m/z 763,27 достиже вредност од 25 %. Релативни интензитет сигнала протонованог лиганда m/z 370,07 је 100 %. Релативни интензитет сигнала на 382,20 расте до 27 %. Релативни интензитет сигнала на m/z 223,60 је 12 %. Овај спектар указује да ако је метал у вишку мали пораст pH преко 4,96 доводи до појаве шума и преклапања сигнала у знатној мери, јер хидролиза постаје све интензивнија. Из два различита експеримента, за две врло блиске pH вредности, исти концентрациони однос ($C_{Al}:C_{Flero}=2:1$) добија се добра поновљивост сигнала, једино се међусобно разликују по шуму и преклапању сигнала (Слика 43 спектар $pH = 5,06$)



Слика 48. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:2$ (N° 13, табела 12), позитивни мод

Када је у раствору је лиганд присутан у двоструко већој концентрацији од метала запажа се мало више шума него на осталим спектрима из ове серије (Слика 48). У овим условима релативни интензитети следећих сигнала расту: m/z 763,27 расте до 45%, 382,27 расте до 64 %, а релативни интензитет сигнала 255,20 износи 68 %. Релативни интензитет протонованог лиганда m/z 370,07 је 100 %, док сигнал лиганда m/z на 326,33 опада на 10 %. У исечку „Б“ на Слици 48 приказана је пртавилна Gauss-ова расподела у односу на јон m/z 763,33.



Слика 49. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$ (N° 13, табела 12), позитивни мод

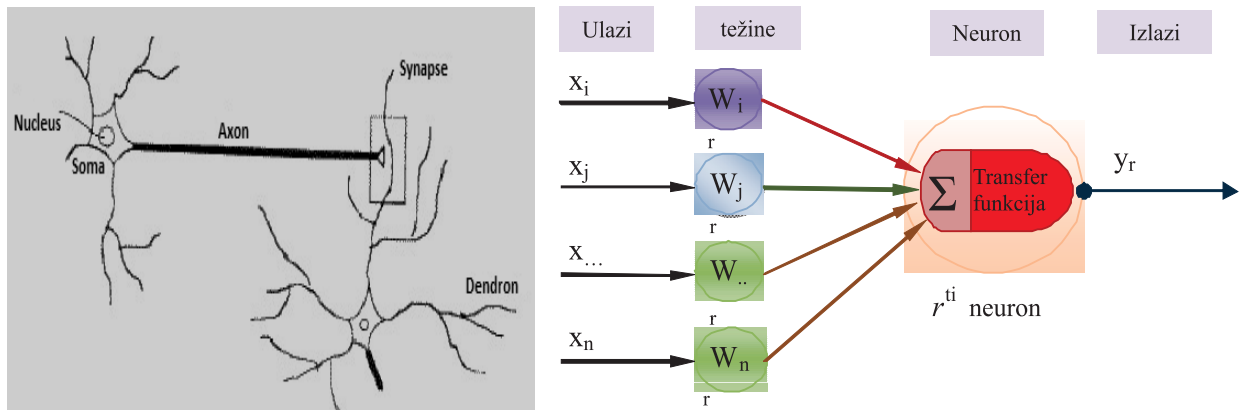
При троструко већој концентрацији лиганда од метала, а истом рН (Слика 49) релативни интензитет јона m/z 763,27 расте до 56 %, док сигнал на 719,33 достиже вредност релативног интензитета од 8 %. Сигнал на m/z 382,20 има релативни интензитет 58 %. Релативни интензитет сигнала на m/z 255,20 опада до 42 %. Релативни интензитети сигнала слободног лиганда m/z 370,13 и 326,27 остају исти као у претходном спектру.

Овај спектар указује на добру репродуктивност спектара, јер из два различита експеримента, а за две блиске рН вредности (рН=5,00 и рН=5,29 за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Flero} = 1:3$, добија се добра поновљивост сигнала (Слика 34 спектар при рН = 5,29) с том разликом што су код спектра на рН=5,29 релативни интензитети сигнала који највероватније потичу од комплексних врста знатно нижи. При испитивању прве серије раствора са порастом рН за лиганд у три пута већој концентрацији у односу на алуминијумов јон интензитети комплексних врста опадају.

Ако се као критеријум квалитета спектра узме интензитет сигнала који указује на формирање одређене комплексне врсте и одсуство шума у спектру онда се из I серије репрезентативним спектром сматра спектар за концентрациони однос метала и лиганда 1:3, рН = 5,29, за концентрациони однос 1:1,5 и рН = 4,14 (II серија), а из III серије спектар за концентрациони однос 2:1 и рН=5,06.

3.4.8. Примена неуронских мрежа на комплексирање алуминијума и флуорохинолона

Неуронска мрежа је упрошћени математички модел аналоган биолошким неуронским мрежама (Слика 50). Сваки неурон је специјализована ћелија способна да пренесе електрохемијски сигнал. Ћелија се састоји од тела (some) које има језгро (nukleus) у центру, разгранату улазну структуру (dendrons) и излазну грану (аксон). Аксон једне ћелије повезан је са дендроном друге ћелије. Синапсе су функционални међумембрански контакти аксона једног неурона и дендрона другог неурона. Један од најпознатијих истраживача у домену неуронских система Donald Hebb поставио је постулат да се учење састоји у мењању (фином подешавању-тјунирању) јачине синаптичких веза.



Слика 50. Модел синапси у људском мозгу и структура вештачког неурона

Неурон прима улазне сигнале по аналогији са електрохемијским сигналом и даје output-е који одговарају output-има биолошких неурона. У вештачком неурону (процесни елемент) сигнали се могу мењати као што се мењају синапсе у биолошким системима. Неурони (чворови) су међусобно повезани тежинским везама (везама са тежинским коефицијентима). Неурони (процесни елементи) су груписани по нивоима [99]. Вештачка неуронска мрежа (Artificial Neural Network/ANN) има један УЛАЗНИ слој, један ИЗЛАЗНИ слој и један или више скривених слојева (hidden layers). Број мрежних структура је веома велики, јер примена ове технике вештачке интелигенције прожима сва поља научног истраживања и има огромну примену у пракси. Све мреже (неуронске структуре) могу се категорисати у две класе: Feed-forward и Feed-back мреже. Feed-forward мреже (мреже са простирањем унапред) омогућавају кретање сигнала у једном правцу од input-а до output-а. За сваку од ових група разликујемо мреже које уче под надзором (надгледано учење) и мреже које уче без надгледања. За мреже које уче са надгледањем ИЗЛАЗИ су познати па се разлика између жељених и израчунатих вредности користи за корекцију тежинских фактора неуронских мрежа. Важно питање које се односи на овај тип учења је проблем конвергенције грешака – минимизирање разлике између добијених и жељених вредности излазних варијабли [99]. Циљ је да се подесе тежински фактори на вредности за које ће грешке бити минималне. У ту сврху најбољи метод је метод најмањих квадрата. Ова група мрежа укључује следеће класе неуронских мрежа класификоване по критеријуму Feed-forward и Feed-back.

Типови мрежа са надгледањем:

1. Feed-forward networks: Backpropagation (BP), Backpercolation (Perc), Perceptron, Cauchy Machine (CM), General Regression, Neural Network (GRNN)
2. Feed-back networks: Fuzzy Congitive Map (FCM), Mean Field Annealing (MFT), Real-time recurrent learning (RTRL), Backpropagation through time (BPTT), Recurrent Cascade Correlation (RCC):

Један од најбољих алгоритама учења за неуронске мреже је BackPropagation (Метод учења са простирањем уназад). Полазећи од слоја output-а, разлике (грешке) између жељеног (z_r) и актуелног output-а (y_r) се рачунају са циљем да побољшају тежинске факторе у претходном нивоу.

Сложеност мреже одређена је бројем нивоа и бројем неурона. Тежински фактори (тежине у гранама–коефицијенти у гранама) се подешавају кроз процес учења (learning) на бази примера (скуп емпиријских, мерених парова улаз/излаз) и процес тестирања (testing). Први изазов када се дизајнира неуронска мрежа је одређивање одговарајуће архитектуре, нарочито број слојева и број скривених неурона. Ако је овај број сувише мали онда ANN нема довољно степени слободе за представљање података (underfitting). Ако је сувише велики дешава се overfitting.

У софтверу, који је коришћен за анализу у овом раду, а који је базиран на теорему Колотогоров-а користе се мреже са једним скривеним слојем. Основни параметри у структури такве мреже (Слика 50) су: X - матрица-вектор улазних варијабли; Y - излазни вектор (који репрезентује површ функције реаговања–излазне или моделиране функције); w_{ih} - матрица тежинских коефицијената у гранама између улазног и скривеног слоја; w_{ho} - матрица тежинских коефицијената у гранама између скривеног слоја и излаза [100].

Учење се изводи у итеративним циклусима. Сваки циклус садржи две фазе: корак напред и корак назад. Корак напред обухвата прорачун вредности излаза мреже $usalc$ за дате улазе. Почиње се од првог слоја који не извршава никакво процесирање вредности

Улаза (x_1, x_2, x_3 и x_4) већ само повезује неуроне из првог слоја са свим неуронима у скривеном слоју. Један неурон са вредношћу 1 се додаје (bias) у улаз и скривене слојеве. Тежински коефицијенти се иницијализирају случајно у интервалу (-0,5-0,5).

Укупни улаз α_j у неурон j у скривеном слоју је тежинска сума свих улаза x_i ,

$$\alpha_j = \sum_{i=0}^{N_i} x_i \cdot w_{ij}, \quad j = 1, 2, \dots, N_h \quad (15)$$

где је w_{ij} тежински коефицијент везе између неурона i и j , N_i је број улазних неурона, а N_h је број неурона у скривеном слоју. Излази из процесног елемента j у скривеном слоју се добијају користећи одговарајућу трансфер функцију $g(x)$. У софтверу који је коришћен у анализи употребљена је биполарна сигмоидна трансфер функција, дефинисана једначином (16). У складу са претходним излаз неурона j у скривеном слоју биће:

$$x_j = g(\alpha_j) = \frac{1 - e^{-\alpha_j}}{1 + e^{-\alpha_j}} \quad (16)$$

Коначно, имамо output из процесног елемента p који је излаз из неуронске мреже:

$$x_j = g(\alpha_j) = \frac{1 - e^{-\alpha_j}}{1 + e^{-\alpha_j}} \quad (17)$$

Потом се рачуна MSEE (Mean Summed Squared Error) излазног вектора на бази разлике мерених вредности и вредности добијених моделом:

$$E_r = \frac{1}{P} \sum_{t=1}^P \frac{1}{2} (y_{rt}^{meas} - y_{rt}^{calc})^2 \quad (18)$$

где је $t = 1, 2, \dots, P$, а P је број улазно / излазних парова за обучавање.

Са циљем да изведемо корекцију треба да одредимо вектор грешке успешно за сваки ниво и све неуроне. Према детаљним описима датим у референци [101, 102], грешка у излазном слоју ће бити:

$$\delta_r = y_r^{calc} \cdot (1 - y_r^{calc}) \cdot (y_r^{meas} - y_r^{calc}) \quad (19)$$

где је δ_r вектор грешке излазних неурона, y_r^{calc} су вредности излаза израчунате преко ANN и y_r^{means} су мерене вредности (вредности добијене експериментално).

Извод сложене функције даје грешке у скривеном слоју (у даљем тексту h је ознака за скривени слој):

$$\delta_q^{(h)} = x_q^{(h)} \cdot (1 - x_q^{(h)}) \cdot \sum_{r=1}^m \delta_r \cdot w_{qr}(t) \quad (20)$$

где q индекс означава неки од неурона скривеног слоја, m је број излазних неурона, δ_q је вектор грешке скривених неурона, $x_q^{(h)}$ је излаз сваког скривеног неурона, δ_r је вектор

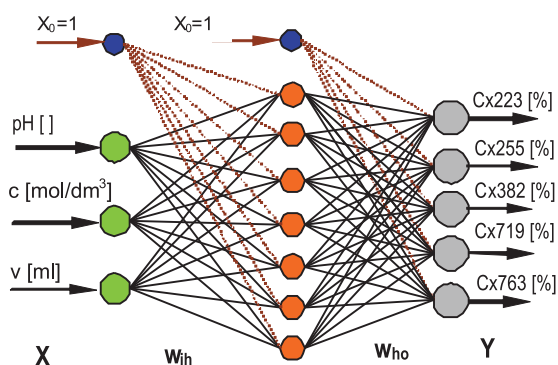
грешке излазног слоја и $w_{qr}(t)$ тежински вектор излазног слоја који се узима из претходне итерације у складу са (102).

Корекција тежинских фактора се изводи из ширења грешке из output-а у ниво input-а. Корекција тежинских фактора w_{ij} за процесне елементе i и j између два слоја у итерацији $t+1$ се приказује на следећи начин:

$$w_{ij}(t+1) = w_{ij}(t) + \eta \cdot (1 - \mu) \cdot \delta_j \cdot x_i + \eta \cdot \mu \cdot (w_{ij}(t) - w_{ij}(t-1)) \quad (21)$$

где је $w_{ij}(t)$ тежина пре модификације, а $w_{ij}(t+1)$ је тежина после модификације. η је брзина учења (брзина конвергенције између датог решења и глобалног минимума). δ_j је грешка за процесни елемент j , а x_i је вредност output-а процесног елемента i , μ је момент који помаже мрежи да превазиђе локални минимум и $w_{ij}(t-1)$ је тежински фактор две итерације пре и текуће итерације. На брзину конвергенције не може се знатно утицати повећањем брзине учења η , јер то води до изостављања минимума грешака и осцилација система. У овом софтверу препоручено је да стартна вредност брзине учења η има вредност 0,8 док је момент μ константа и има вредност 0,9. Сви input-и и output-и су нормализовани у интервалу (-1,1) линеарним скалирањем. Процес тежинских корекција се изводи у серији sukcesивних циклуса учења. Процес увежбавања може бити завршен било којим од критеријума: укупно време учења, укупан број циклуса учења или критеријума који дефинишу грешку учења итд. На крају процеса учења знање неуронске мреже се енкодира у тежинске коефицијенте. ВР алгоритам и метод учења су базирани на примени софтвера за моделирање неуронских мрежа Неуро 2013.

На основу резултата за процес формирања комплекса између алуминијума и флороксацина у физиолошким условима, за моделирање је употребљена мрежа са 3 улаза и 5 излаза, (слика 51).



Слика 51. Структура неуронске мреже са три улаза и пет излаза

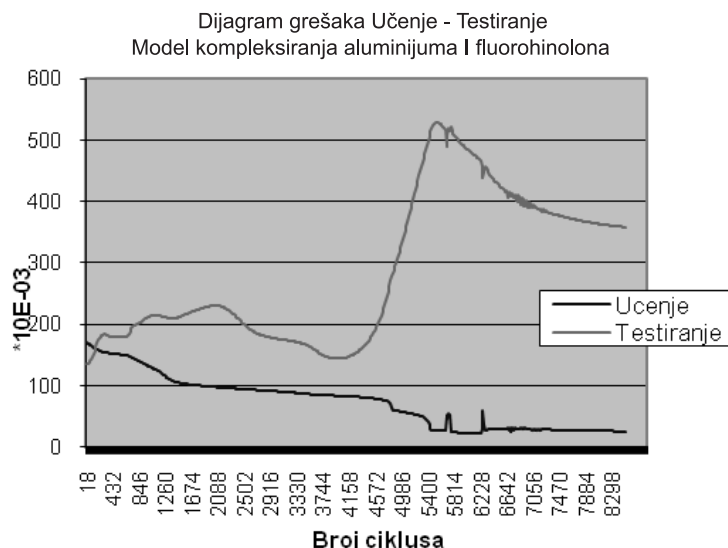
Као улазни фактори коришћени су:

- pH [] – pH вредност
- c [mol/dm³] – концентрација
- v [ml] – запремина додате базе ТЕА

Излазни фактори су награђени комплекси:

- Комплекс 223 [%] – релативна заступљеност комплекса m/z 223 у раствору
- Комплекс 255 [%] – релативна заступљеност комплекса m/z 255 у раствору
- Комплекс 382 [%] – релативна заступљеност комплекса m/z 382 у раствору
- Комплекс 719 [%] – релативна заступљеност комплекса m/z 719 у раствору
- Комплекс 763 [%] – релативна заступљеност комплекса m/z 763 у раствору

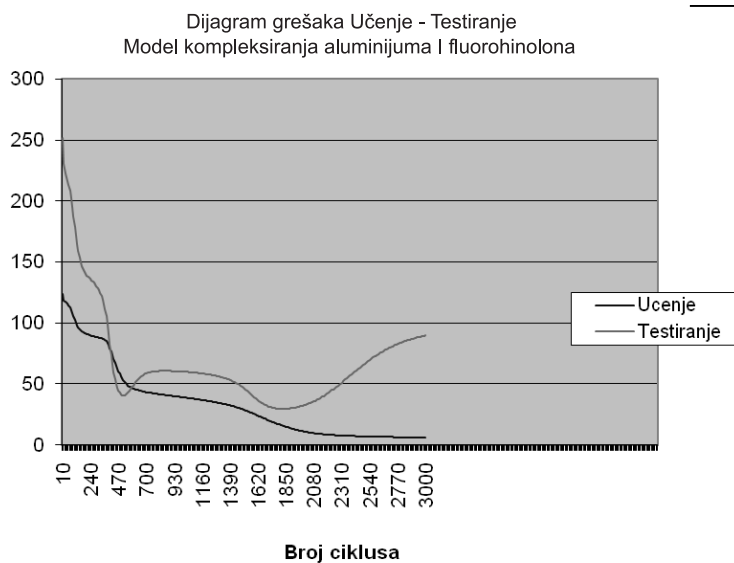
Коришћењем модела ANN са датим улизима и излазима најпре су за све комплексе и различите експерименталне услове (запремина додате базе) обучаване а затим тестиране мреже и најповољнији резултати ових процеса приказани на Сликама 52 и 53.



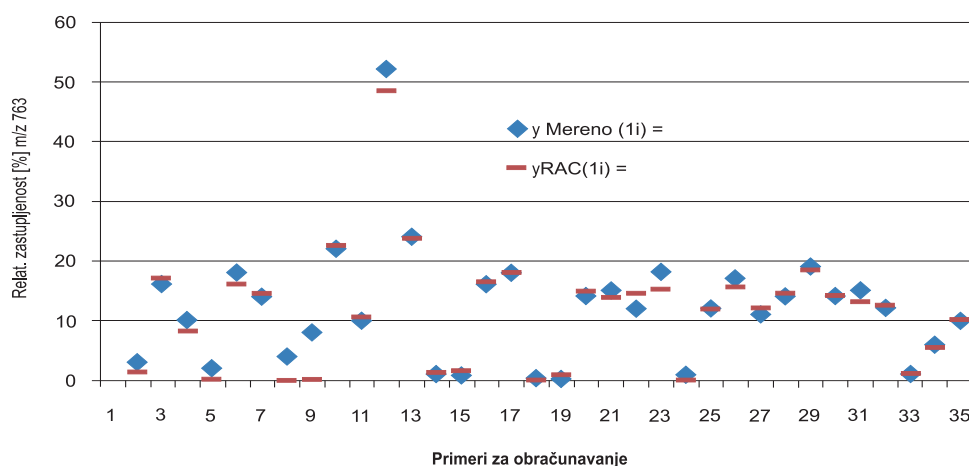
Слика. 52. Дијаграм грешки учења и грешки тестирања за комплекс m/z 719

Слике 52 и 53 дају приказ дијаграма грешака за процес обучавања (за Learning DataSet) и процес тестирања (за Testing Dataset) мреже. На основу дијаграма за m/z 719 се види да процес учења конвергира (грешке учења су све мање), али после око 4000 циклуса грешка тестирања почиње нагло да расте. У теорији ANN ово је граница за коју се препоручује прекид учења да би се избегао overlearning. Другим речима икао је могуће постићи још бољу тачност у процесу учења, укупни ефекат (над оба скупа) је бољи ако се са учењем престане у зони у којој грешка тестирања почиње да расте. Ово је битно за практичну примену ANN мрежа.

Ако је број примера за обучавање већи онда се добијају мање грешке обучавања/ учења, а грешка тестирања почиње да расте много касније, дакле у суми имамо тачнији систем који показује добре перформансе и за нове примере (мерења) која нису учествовала у обучавању мреже. Слична је ситуација код дијаграма за m/z 763 стим што је овај циклус тестиран за 2100 и 3000 циклуса. Учено је да је боље да се прекид врши после 2100 циклуса.



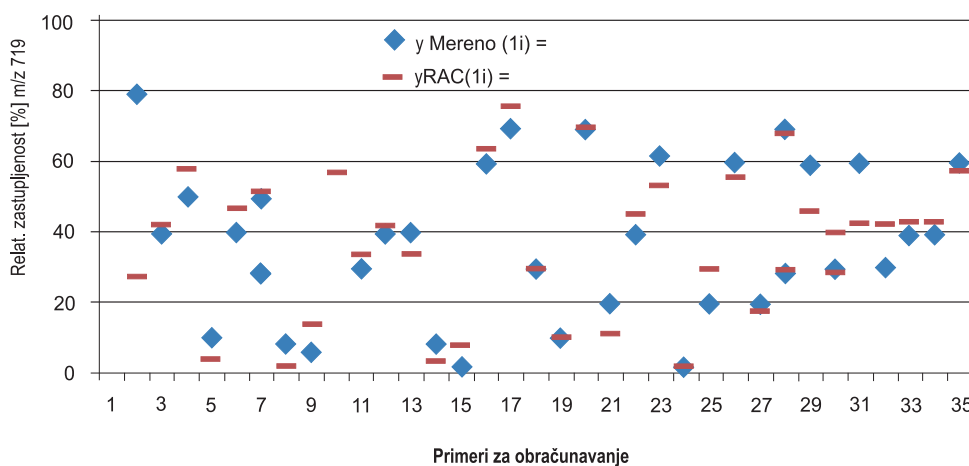
Слика. 53. Дијаграм грешки учења и грешки тестирања за комплекс m/z 763



Слика 54. Дијаграм рачунских и експерименталних вредности после 4000 циклуса учења за комплекс m/z 719

На следећим дијаграмима (Слика 54 и 55) дат је приказ релативног учешћа комплекса m/z 719 и m/z 763 добијен мерењем на основу података ESI MS технике (плави маркери) и ANN моделом (црвени маркери). За комплекс m/z 763 после 3000, односно 2100 циклуса учења. За комплекс m/z 719 после 4000, односно 8500 циклуса учења. Формирани су и дијаграми грешака после 3000 и 2100 за m/z 763 односно дијаграми грешака за m/z 719 после 4000 и 8500 циклуса обучавања. На дијаграму грешака за комплекс m/z 719 уочава се да после 5000 циклуса учења, овај процес иако генерално конвергира поприма и дозу нестабилности. Програм током процеса учења бележи сва стања грешака и на крају меморише најбоље стање (минимум грешке учења), што је у овом случају 6300 циклуса.

Када се користи 4000 циклуса за учење мреже види се да постоји доста добро слагање за већину мерених тачака са експериментално добијеним, а одступања која се јављају су углавном задовољавајућа изузев за примере обучавања у 2, 10 и 12 мерењу.



Слика 55. Дијаграм рачунских и експерименталних вредности после 2100 циклуса учења за комплекс m/z 763

Са дијаграма 54 и 55 види се да постоји прихватљиво одступање неких тачака добијених прорачуном ANN моделом у односу на експериментално добијене резултате добијене ESI MS технике.

3.4.9. Zoom Scan јона у сисџему алуминијум флероксацин

Zoom scan је тип скенирања који даје резултате веће резолуције. Овај мод се користи за одређивање наелектрисања посматраног пика (charge state). Све до 10 односа m/z јони могу бити одређени у Zoom scan моду. Ако су изотопски пикови раздвојени за 0,33 јединице јон има наелектрисање +/- 3.

Zoom scan је scan високе резолуције, full range, намењен да дешифрије изотопски „envelope“ [103] који се често користи за одређивање пептида и одређивање јонизационог стања органометала.

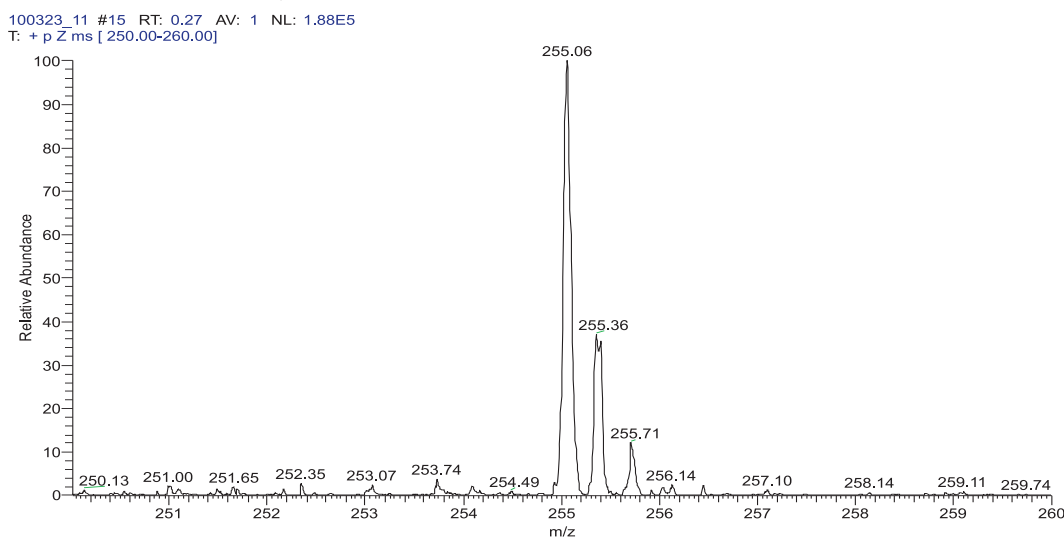
Zoom scan мод омогућава да раздвојимо изотопске врсте вишеструко наелектрисаних јона добијених у електроспреј масеним спектрима. Дешифровање изотопског кластера открива једну четвртину m/z разлике између угљеничних изотопа, чија разлика у маси износи 1 далтон, а потиче од разлике $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Стога наелектрисање овог јона износи +4.

Спектри високе резолуције (Zoom scan) ако су са на пример двоструко и четвороструко наелектрисани кластери имају такве изотопске pattern-е у спектрима који се добро слажу са израчунавом изотопском дистрибуцијом. Добра калибрација инструмента се захтева да би се избегао charge space ефекат. Такође је важно одржавати стабилном укупну јонску струју и без флукуација. Ово је један од разлога зашто се фаворизује микроспреј у односу на ESI јер је добро познато да микро спреј даје континуалан и стабилан спреј. Zoom scan спектри са резолуцијом између 6 000 и 8 000 се користе за идентификацију различитих charge state али не и за спаривање (усаглашавање пикова). Посматрани помераји у Zoom scan су често 0, 3; 0,2; 1,0 Da.

Charge state пептидног јона се обрачунава из m/z разлике између његових изотопских пикова. На пример: ако је m/z разлика између изотопских пикова 0,25 и ако је разлика у маси 1 a.m.u следи да је charge state + 4 [104, 105].

Ако се користе анализатори мање резолуције као што је јон трап у поређењу са анализаторима високе резолуције као што је орбитрап то чини одређивање charge state много тежим. Ово се дешава зато што изотопски пикови улазе једни у друге када се користе анализатори мање резолуције, тј. недовољно су раздвојени пикови. Највећа предност познавања charge state у масеном спектру је када покушавамо да анализирамо пептиде и сходно чињеници да пептиди захваљујући њиховим основним аминокрају и тежњи основне аминокиселине да више стабилизаује позитивно наелектрисање него друге сличне молекуле као што су полимери. Када користимо ESI ово значи да су јони пептида најзаступљенији у +2 и +3 charge state, док су полимери и други слични молекули обично у +1 charge state.

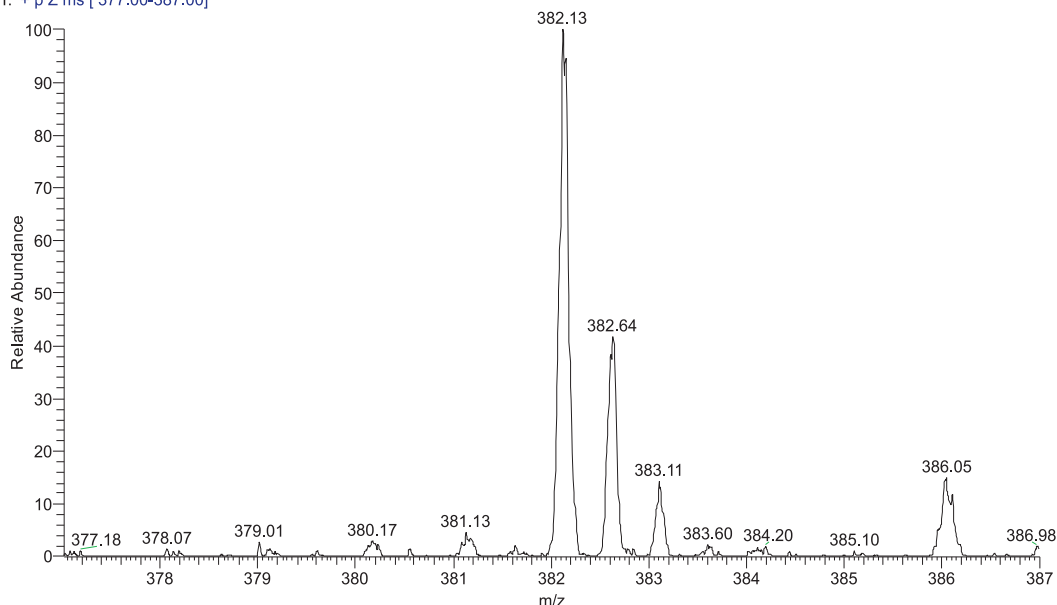
Zoom scan модом је потврђено и наелектрисање двоструко наелектрисаних јона комплекса: 223,60, 382,20, једноструко наелектрисаних јона комплекса 763,27 и једноструко наелектрисаног лигандног јона 326,27.



Слика 56. Zoom scan јона 255, $\Delta=0,3$, (255,06, 255,36, 255,71)

Применом zoom scan moda на јон 255 (Слика 56) уочава се разлика између пикова од 0,3 јединице, из чега следи да је овај јон троструко наелектрисан.

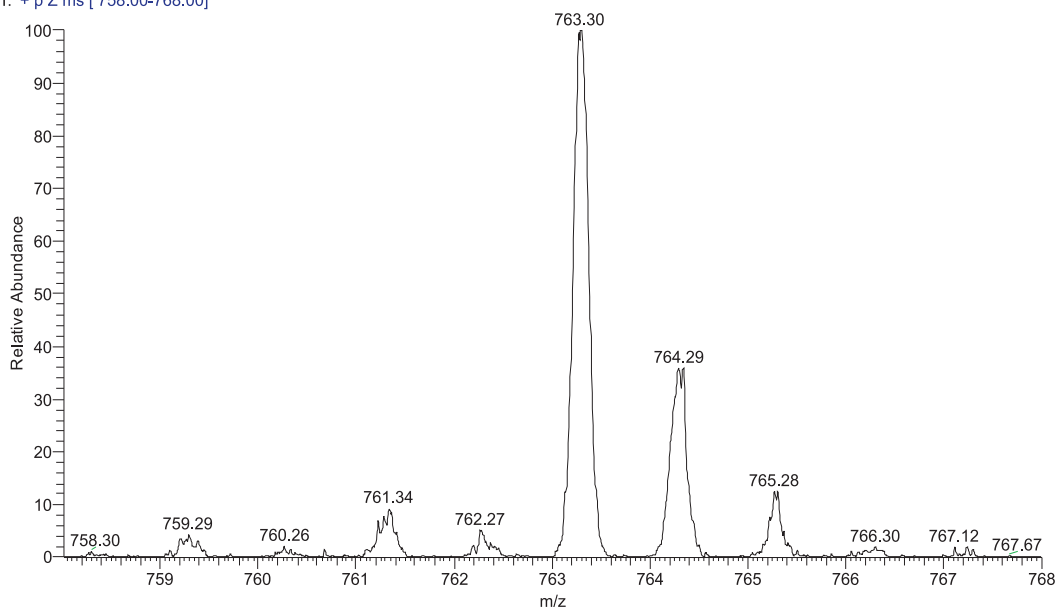
100322_16RAW #9 RT: 0.14 AV: 1 NL: 5.00E5
T: + p Z ms [377.00-387.00]



Слика 57. Zoom scan јона 382, $\Delta=0,5$ (382,13, 382,64, 382,11)

Применом zoom scan moda на јон 382 (Слика 57) уочава се разлика од 0,5 јединица, што је потврда двоструког наелектрисуња овог јона.

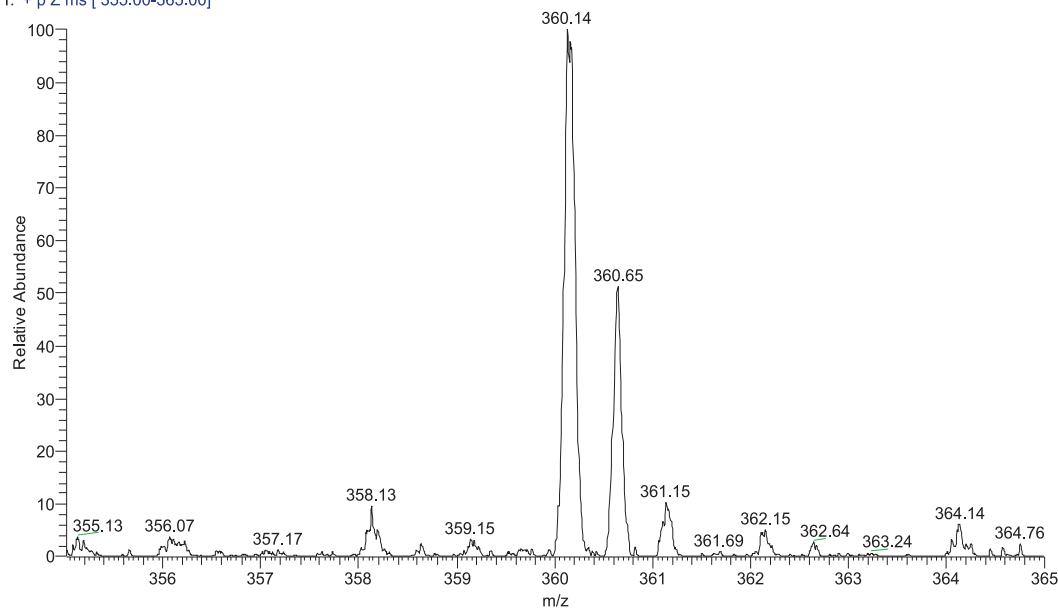
100322_17RAW #6-14 RT: 0.10-0.24 AV: 9 NL: 1.19E5
T: + p Z ms [758.00-768.00]



Слика 58. Zoom scan јона 763, $\Delta=1$, (763,30, 764,29, 765,28)

Применом zoom scan moda на јон 763 (Слика 58) уочава се разлика између пикова од 1 јединице, из чега следи да је овај јон једноструко наелектрисан.

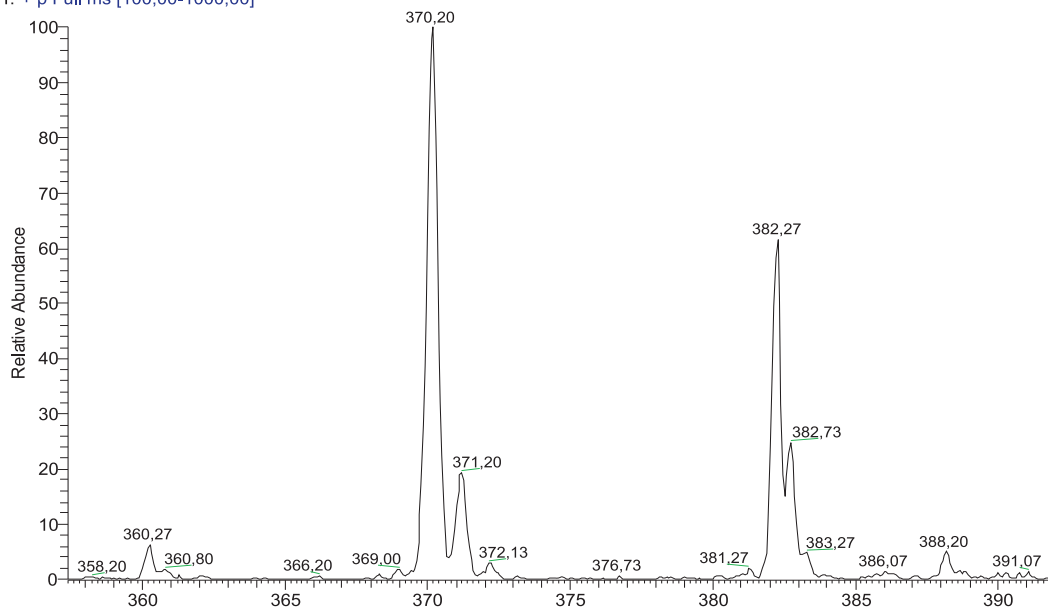
100322_19 #7-12 RT: 0.10-0.18 AV: 6 NL: 1.56E5
T: + p Z ms [355.00-365.00]



Слика 59. Zoom scan јона 360, $\Delta=0,5$, (360,14, 360,65, 361,15)

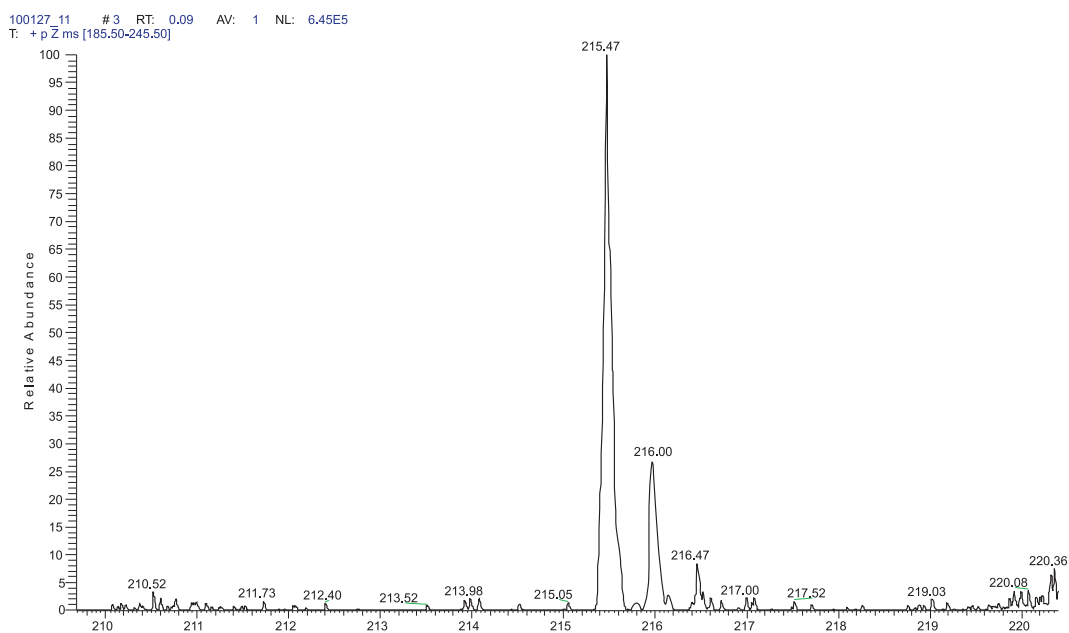
Применом zoom scan мода на јон 360 (Слика 59) уочава се разлика између пикова од 0,5 јединица, из чега следи да је то двоструко наелектрисани јон.

100322_20 #2-20 RT: 0.04-0.45 AV: 19 NL: 1,76E5
T: + p Full ms [100,00-1000,00]



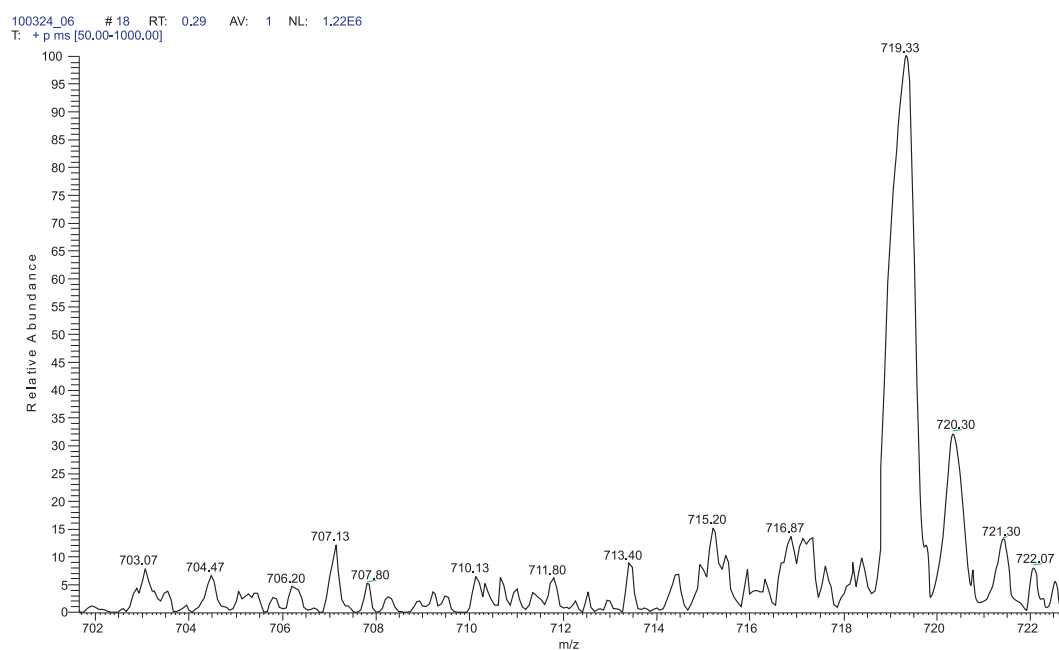
Слика 60. Изотопски pattern протонаног јона флероксацина m/z 370 и јона комплекса m/z 382

На слици 60 су приказани истовремено јон самог лиганда (протоновани флероксацин m/z 370) и јон награђеног комплекса између алуминијума и флероксацина m/z 382. Занимљиво је уочити да је наелектрисање првог јона износи +1, што се закључује на основу разлика између узастопних пикова у patternу која износи 1, а наелектрисање другог јона m/z 382 је +2, јер разлика између узастопних пикова у pattern-у износи 0,5.



Слика 61. Zoom scan јона 215, $\Delta=0,5$, (215,47, 216,00, 216,47)

Применом zoom scan мода на јон 215 (Слика 61) уочава се разлика између пикова од 0,5 јединица, из чега следи да је то двоструко наелектрисани јон.



Слика 62. Zoom scan јона 719, $\Delta=1$, (719,33, 720,30, 721,30)

Применом zoom scan мода на јон 719 (Слика 62) уочава се разлика између пикова од 1 јединице, из чега следи да је овај јон једноструко наелектрисан.

3.4.10. Тандем масена спектрометрија

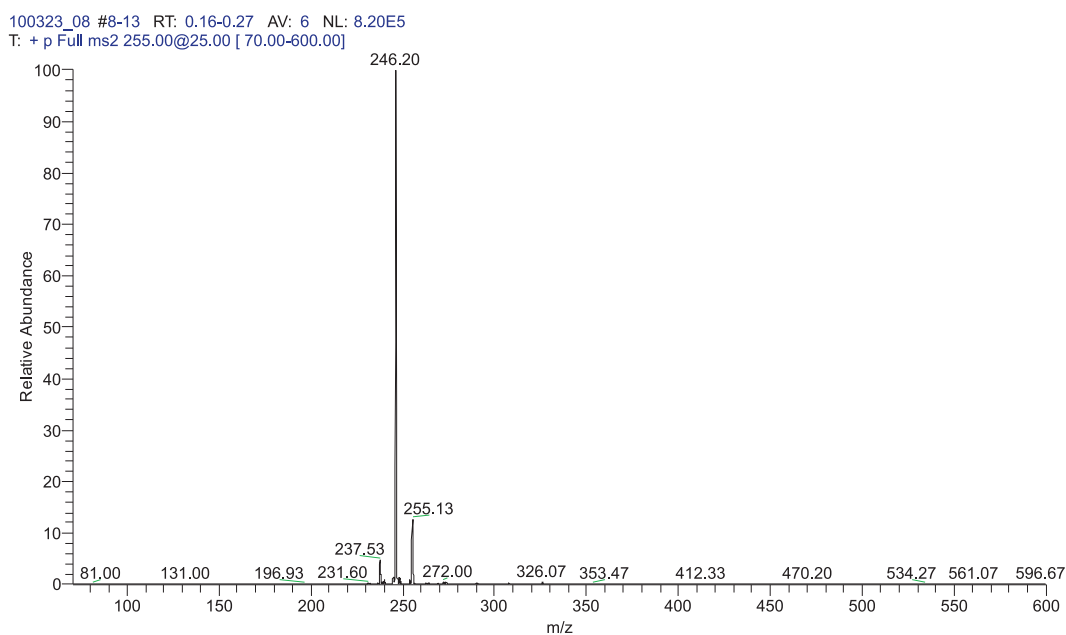
Снимање MS/MS спектра је процедура за испитивање појединачних јона у раствору (смеси). Јон од интереса се изолује на основу његове карактеристичне m/z вредности и након активације тог јона сударом (применом CID, сударом изазвана дисоцијација), долази до његове дисоцијације и настајања продукт јона. Ова дисоцијације се дешава у присуству

колизионог гаса хелијума (He), применом одговарјућег rf напона при скенирању MS^n . Резултујући продукт јони, настали од parent јона, се испитују у другом кораку мерења. Применом тандем масене спектрометрије се елиминише или максимално редукује сигнал који потиче од других компонената или инструмент background-а (хемијског шума) [30].

Тандем масена, MS^n је коришћена у овој тези да би се добио увид у могућу структуру Al(III)-јон -HQ комплекса, тј. да би се утврдила највероватнија везивна места алуминијума у комплексима. Стога су одабрани јони који дају сигнале на карактеристичним m/z уведени у јон трап и подвргнути сударима са колизионим гасом при различитим енергијама судара. За parent јон је биран првенствено молекулски јон, а у одређеним случајевима испитивани су и други parent јони, тј. сигнали из примарног ESI MS спектра. MS/MS спектри су снимани у позитивном моду ESI извора (више одговара киселој средини), у flow injection режиму са протоком $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Затим су бирани молекулски јони за MS/MS/MS фрагментацију, са isolation width: $m/z \pm 1,0$. Вредност колизионе енергије је повећавана од 30–80 % све док се не добије уочљива фрагментација при датим вредностима m/z , а да се parent јон још увек види у спектру. LCQ програм изражава E_{coll} у релативним јединицама, процентима (%).

На крају MS/MS експеримената, колизиона енергија E_{coll} је обично износила 50–60 % зависно од лиганда везаног са алуминијумом.

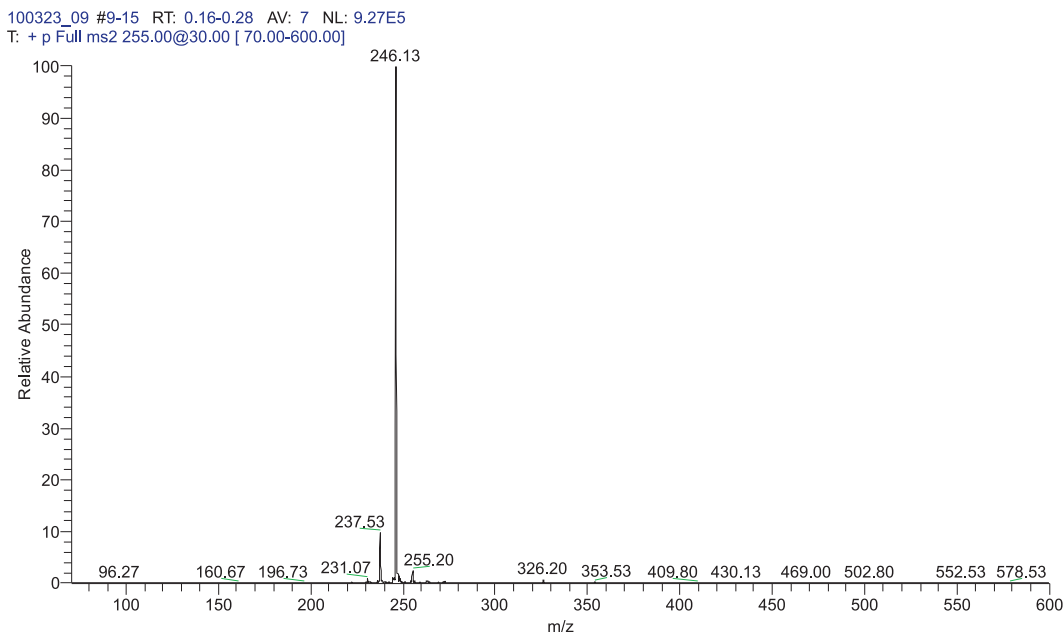
3.4.11. MS/MS експеримент јона у раствору флероксацина и Al(III)-јона



Слика 63. MS/MS спектар parent јона 255, $E_{\text{coll}}=25\%$

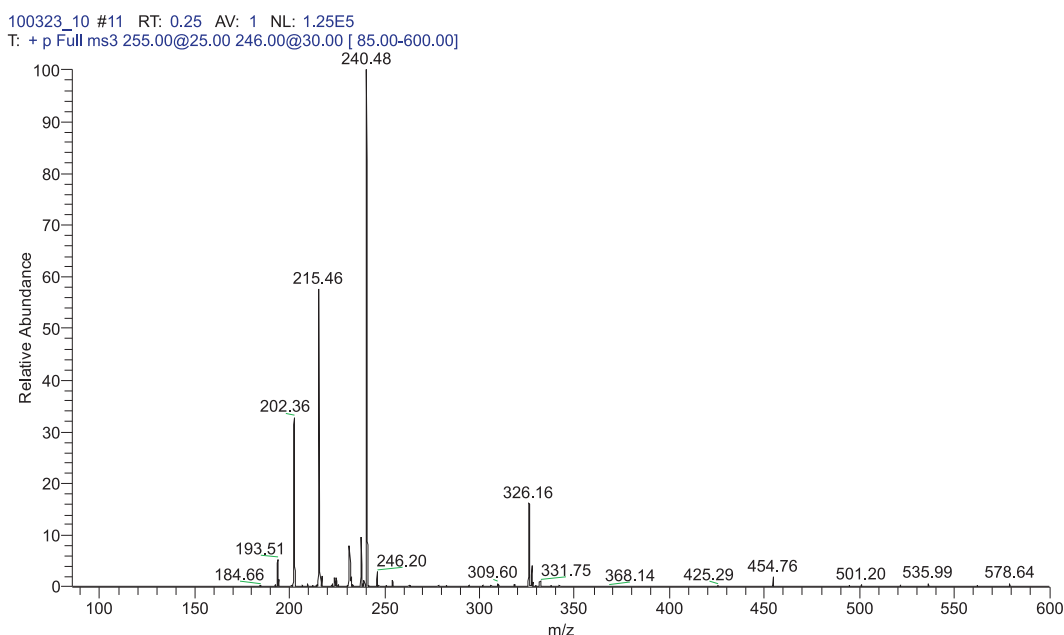
Спектар на Слици 63 је спектар parent јона 255 који је одабран из основног спектра раствора алуминијума и флероксацина, концентрације компонената $10^{-5} \text{mol}/\text{dm}^3$, концентратионог односа $C_{\text{Al}}:C_{\text{flero}}=2:1$, $\text{pH}=5,06$.

Овај јон је троструко наелектрисан, што је доказано Zoom scanом, слика 63. Накнадно примењени повећани rf напони, на parent јон 255 су 25% од максималне вредности. Најзначајнији продукт јони су: 246,20 (релативног интензитета 100 %), 237,53 (релативног интензитета 7 %), и 231,60 (релативног интензитета 4 %). У спектру је још увек присутан parent јон са релативним интензитетом 15 %, из чега следи да је примењена енергија била оптимална: изазвала је фрагментацију parent јона, али га није потпуно разбила.



Слика 64. MS/MS спектар parent јона 255, $E_{coll}=30\%$

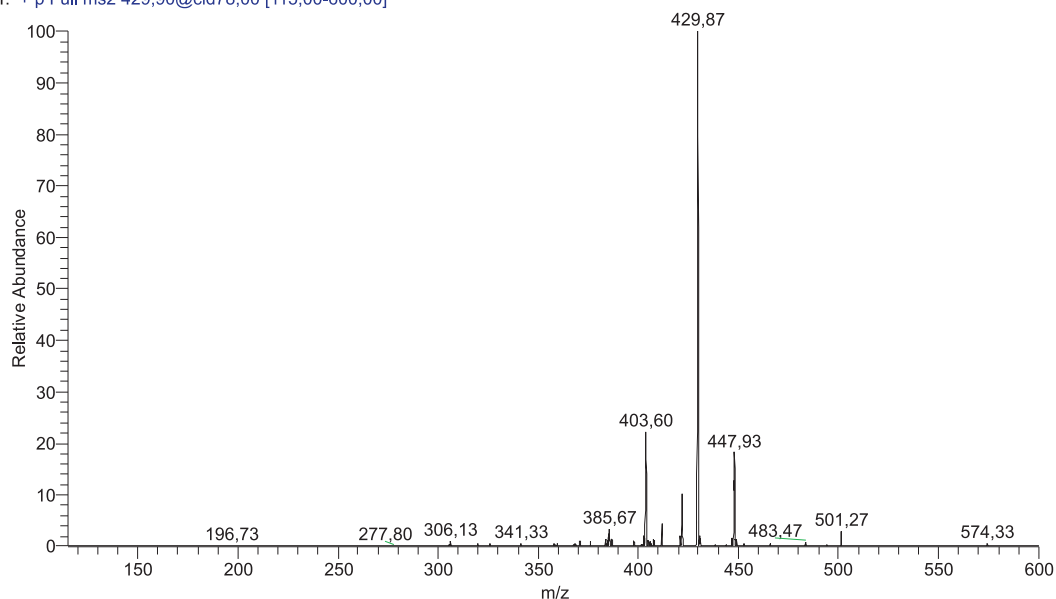
При повећању колизионе енергије на 30 % смањује се релативни интензитет parent јона 255 на 4 %, Слика 64. Релативни интензитет јона 246,13 остаје исти (100 %), а релативни интензитет јона 237,53 расте до 11 % и 231,60 (релативни интензитет 3 %). Са повећањем колизионе енергије за 5 % нема нових фрагмената, већ само релативни интензитети претходно добијених јона расту.



Слика 65. MS/MS/MS спектар јона 255, $E_{coll}=25\%$, јона 246, $E_{coll}=30\%$

Након што је јон 255 фрагментисан, даље је требало проузроковати фрагментацију највећег продукт јона 246 у MS^3 експерименту, Слика 65. Сада је 246 јон постао parent јон, једини јон преостали у јон трапу, на кога је примењена колизиона енергија од 30 %. Под овим условима parent јон је још увек присутан у спектру са релативним интензитетом 4%. Његови продукт јони су: 240,48 (релативног интензитета 100 %), јони 215,46 (релативног интензитета 60 %), 202,36 (релативног интензитета 34 %), и 193,51 (релативног интензитета 8 %).

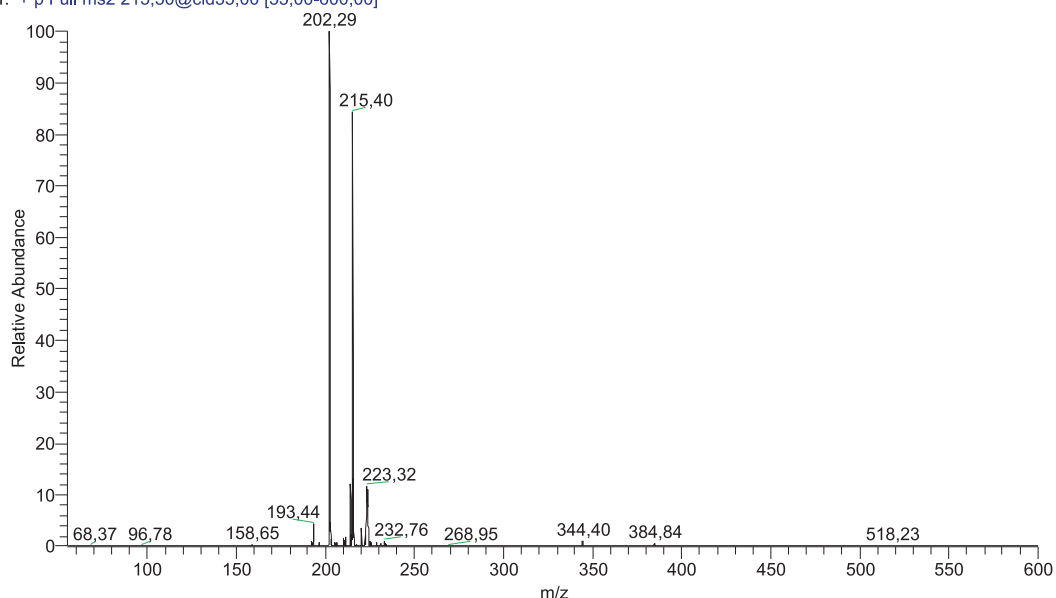
100127_09 #1-5 RT: 0,01-0,05 AV: 5 NL: 2,89E5
T: + p Full ms2 429,90@cid78,00 [115,00-600,00]



Слика 66. MS/MS спектар parent јона 429,90, $E_{coll}=78\%$

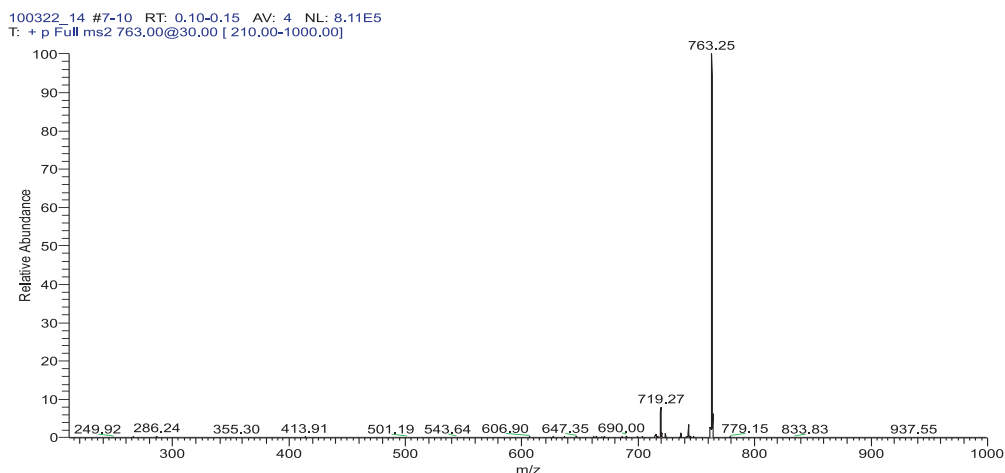
Спектар на Слици 66. је спектар parent јона 429,90 који је одабран из основног спектра раствора алуминијума и флероксацина, концентрације компонената 10^{-5}mol/dm^3 , концентрационог односа $C_{Al}:C_{flero}=2:1$, $pH=4,26$, tube lens offset=15 V. Приказан је интервал од m/z 150–600. Примењена је велика колизиона енергија од 78 % на parent јон. Међутим ова комплексна врста је толико стабилна да је и поред високе колизионе енергије parent јон са релативним интензитетом 100 %. Настали продукт јони су: 403,60 (релативног интензитета 28 %) и јони нижег интензитета 385,67 и 341,33.

100127_10 #1-5 RT: 0,01-0,05 AV: 5 NL: 5,62E5
T: + p Full ms2 215,50@cid55,00 [55,00-600,00]



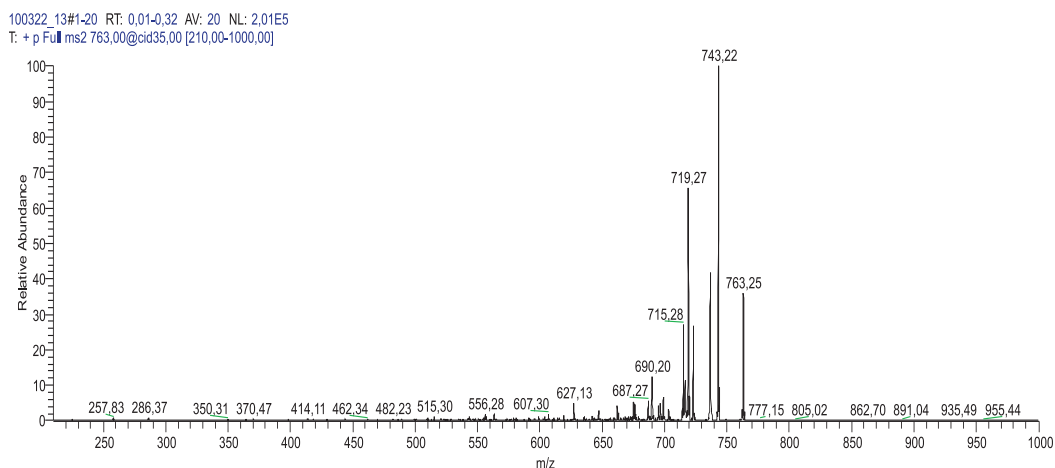
Слика 67. MS/MS parent јона 215,50, $E_{coll}=55\%$

Спектар на Слици 67 је спектар parent јона 215,50. И у овом случају је примењена велика колизиона енергија од 55 %, а parent јон је само делимично фрагметисан (релативног интензитета 88 %). Настали продукт јони су: 202,29 (релативног интензитета 100 %), 193,44 (релативног интензитета 6 %).



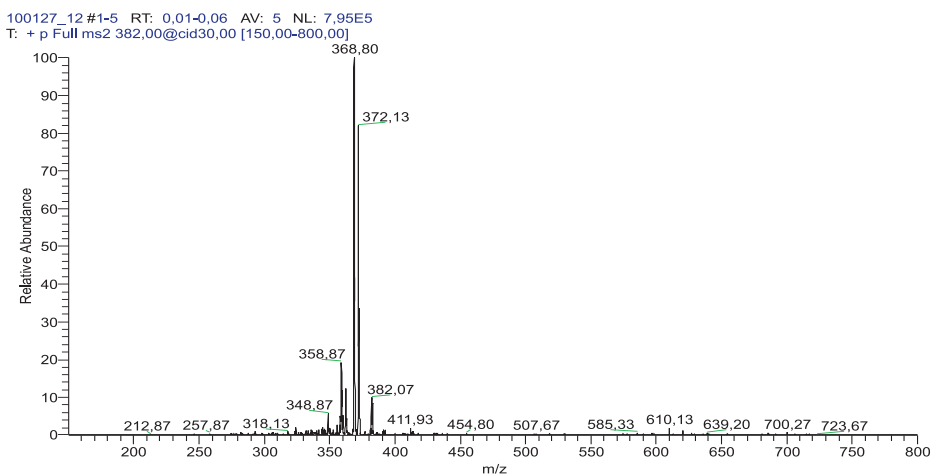
Слика 68. MS/MS јона 763, $E_{coll}=30\%$

Parent јон m/z 763,00 је одабран из основног раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1:1$, $pH=5,0$. При колизиој енергији од 30 % parent јон је још увек нефрагментисан (релативног интензитета 100 %). Настаје само један продукт јон 719,27 (релативног интензитета 10 %), (Слика 68).



Слика 69. MS/MS parent јона 763, $E_{coll}=35\%$

На исти јон је примењена већа колизиона енергија од 35 % (Слика 69.) и сада је parent јон фрагментисан. Релативни интензитет parent јона m/z 763 износи 38 %. Настали продукт јони су: 743,22 (релативни интензитет 100 %), 719,27 (релативни интензитет 70 %) и јони 690,20, 687,27 нижег интензитета.



Слика 70. MS/MS спектар parent јона 382, $E_{coll}=30\%$

При колизионој енергији од 30 % parent јон 382 се фрагментује (Слика 70.) и још увек постоји у спектру (релативног интензитета 12 %). Настали продукт јони у MS/MS експерименту су: 372,13 (релативног интензитета 84 %), 368,80 (релативног интензитета 100 %), 358,87 (релативног интензитета 20 %) и 348,87 (релативног интензитета 8 %).

3.4.12. maLDI спектри

Ласер десорпциона јонизација (LDI) подразумева стварање гасних јона у току интеракције фотона из ласера са чврстим или течним узорком. Карактеристика LDI процеса је настајање великог броја јона за сваки ласер хитац (shot) [106]. LDI се примењује само на једињења која имају масу испод 1000 Da и на мале поларне молекуле.

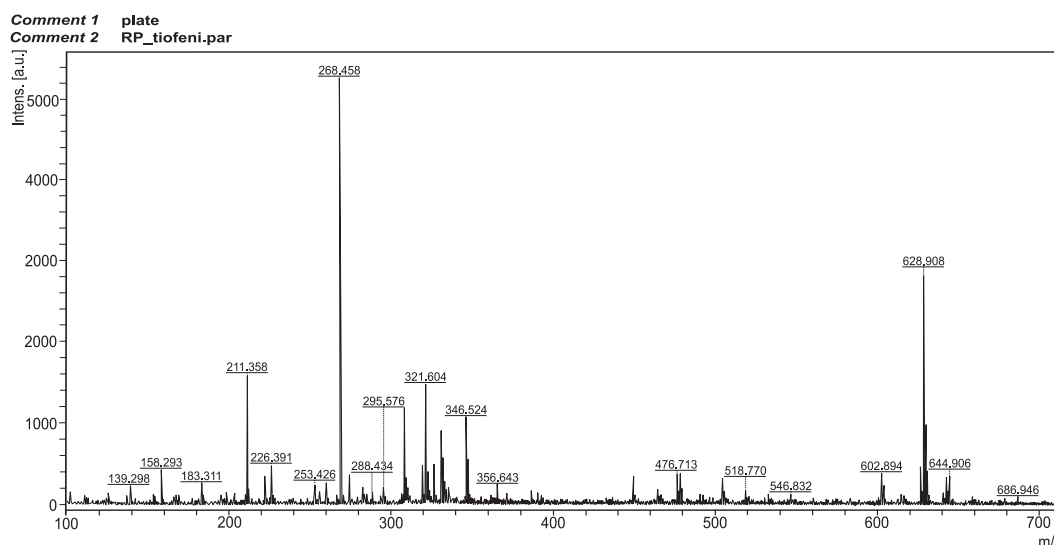
LDI спектри много зависе од примењеног ласера и од присуства нечистоћа. Коректан LDI спектар једињења зависи од услова који су примењени да би се формирали јони анализата. Кључни допринос у LDI експериментима је посматрање десорпционе ефикасности молекула (нпр. аминокиселина и пептида) који апсорбују ласерски зрак више од оних једињења без хромофора. Сви они настају по једноставној шеми формирања протонисаних или депротонисаних квазимолекуларних јона удружених са неколико фрагментних јона насталих губитком малих стабилних молекула као што су CO₂ или мравља киселина. Формирају се из високо интензитетских (позитивних) радикал молекулских јона или водоничних адуката као што су [M+2H]⁺, [M+3H]⁺ или депротоване врсте ([M-H]⁺) као и појава фотоадуката који настају од хемијских једињења која превазилазе масу матрикс молекула [18, 24, 107].

Циљ примене maLDI спектрометрије је био да се специјација у растворима алуминијума и флуорохинолона употпуни. Наиме како ESI MS спектрометријом није могуће детектовати продукте полимеризације примењена је maLDI спектрометрија да би се из тих спектра идентификовале полимерне (димерне врсте) које се могу формирати у реакцијама комплексирања алуминијума и лиганда.

Извршена оптимизација инструменталних параметара на MALDI TOF спектрометру, а потом је снимљена сама подлога и сваки лиганд појединачно. Након тога су снимани раствори свих лиганда са алуминијумом под истим условима

3.4.13. maLDI спектри подлоге и флероксацина

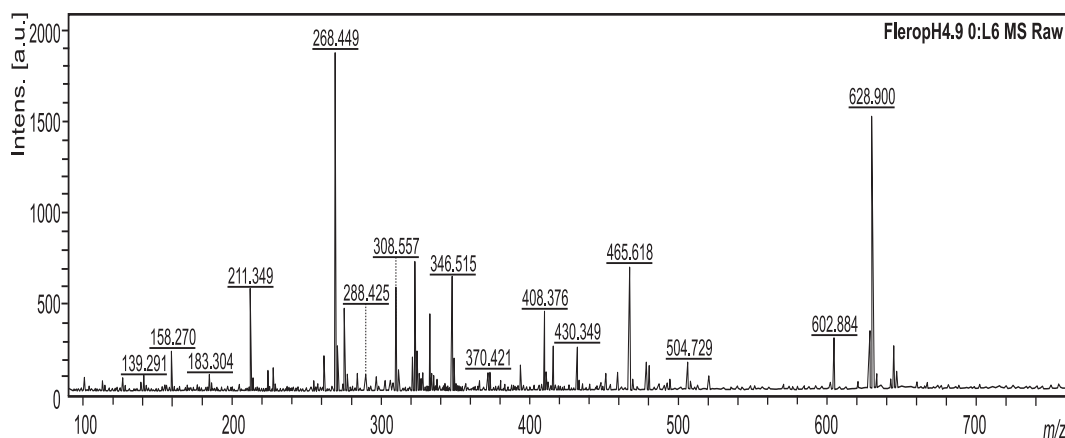
Чиста подлога од челика је стављена у инструмент и снимљен је њен спектар да би се овако елиминисале могуће недоумице при интерпретацији спектра комплекса алуминијума и лиганда.



Слика 71: maLDI спектар подлоге

У maLDI спектру подлоге (Слика 71) се уочавају два јака сигнала на m/z 268,45 и 628,90. Спектар чисте подлоге садржи кластер јоне који настају при излагању челичне подлоге дејству ласера у MALDI TOF инструменту.

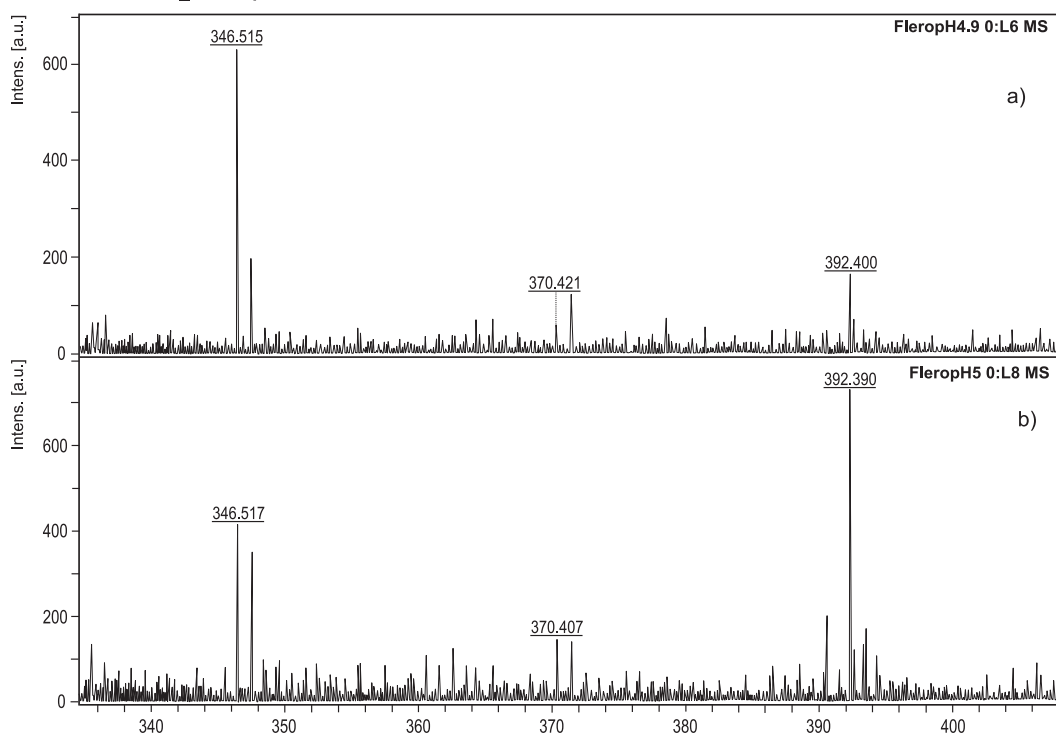
Comment 1 10-4M_H2O
Comment 2 RP_tiofeni.par



Слика 72. maLDI спектар флероксацина у смеши вода:метанол=30:70, рН=4,90

У спектру флероксацина (Слика 72) запажа се сигнал који потиче од протонованог лиганда 370,41, нижег интензитета у односу на остале сигнале. Остали сигнали (268,45 и 628,90) потичу од подлоге. Највиша је релативна заступљеност јона подлоге m/z 268,44 (интензитет 2000 а. у.).

Comment 1 10-4M_H2O
Comment 2 PR_tiofeni.par



Слика 73. maLDI спектри: а) флероксацин у смеши вода:метанол, рН=4,90 и б) спектар флероксацин у води

На Сlici 73 приказани су зумирани делови спектара а) флероксацина у смеши вода:метанол 30:70 и б) флероксацина у води у интервалу m/z 340 до 430. У спектрима

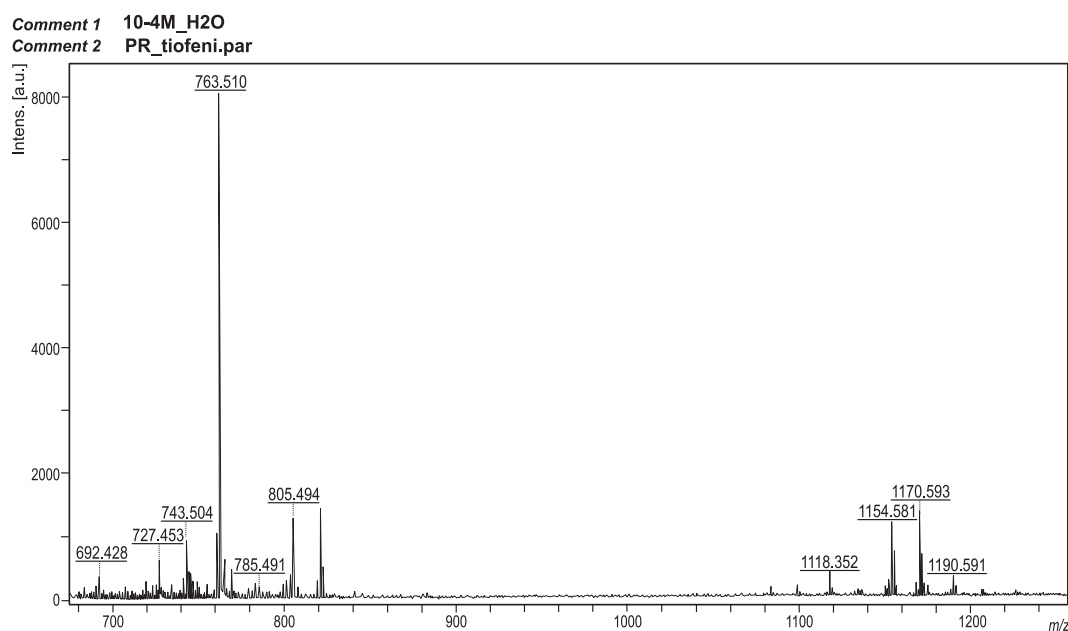
флероксацина раствореног у води и флероксацина раствореног у смеси вода метанол констатује се мања разлика у интензитету појединих сигнала, а не јављају се нови сигнали. Овај резултат је у складу са очекивањима да утицај растварача нема битнијег значаја у maLDI спектрима.

3.4.14. maLDI спектри комплекса Al(III)-јона и флероксацина

За изучавање комплексирања алуминијума и флероксацина maLDI спектрометријом припремљени су раствори различитих концентрација, концентрационих односа метала и лиганда и различитих рН вредности. Састави и рН вредности одабраних (приказаних) спектра дати су у Табели 13. Осим раствора где су концентрације метала и лиганда биле реда величине 10^{-5} mol/dm^3 снимљени су и раствори где су концентрације метала и лиганда биле 10^{-4} mol/dm^3 .

Број узорка	рН	Концентрација Al [mol/dm^3]	Концентрација флероксацина [mol/dm^3]
1.	3,85		
2.	4,50	$2,7 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$
3.	5,42		

Спектри су снимљени у позитивном рефлексном моду.

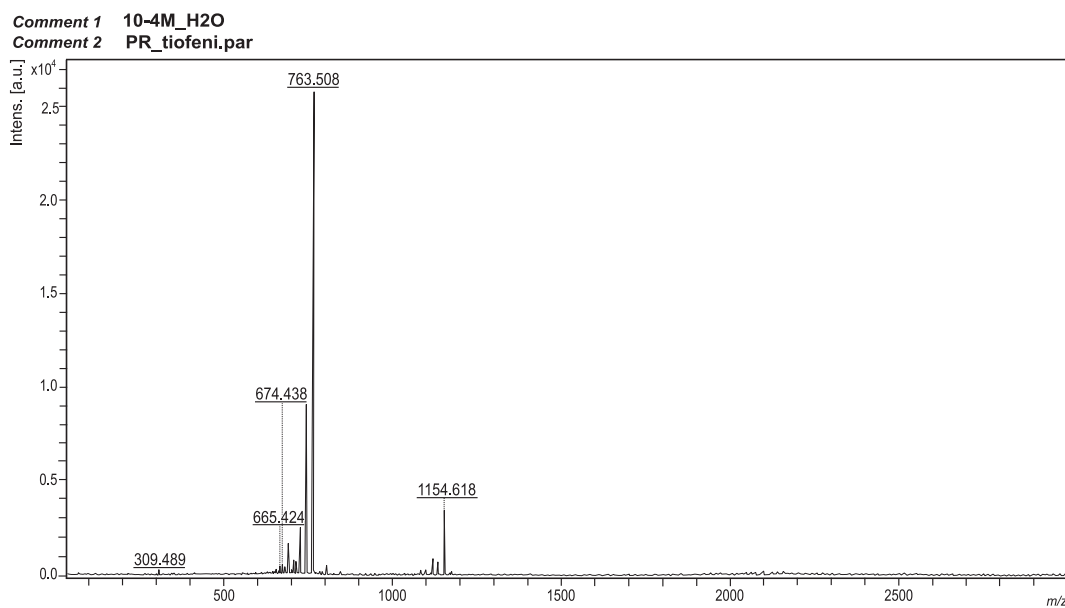


Слика 74. maLDI спектар раствора $C_{\text{Al}}:C_{\text{Flco}}=1:3$, рН=3,85

Спектар на Слици 74 је снимљен у опсегу од m/z 700 до 1200 да би се избегао утицај сигнала од подлоге чији су сигнали уочљиви до m/z 650. У спектру се уочавају две карактеристичне групе сигнала и то у области око 700 и у области m/z 1100. Најинтезивнији сигнал из прве групе је на 763,51 а из друге серије на m/z 1170,59.

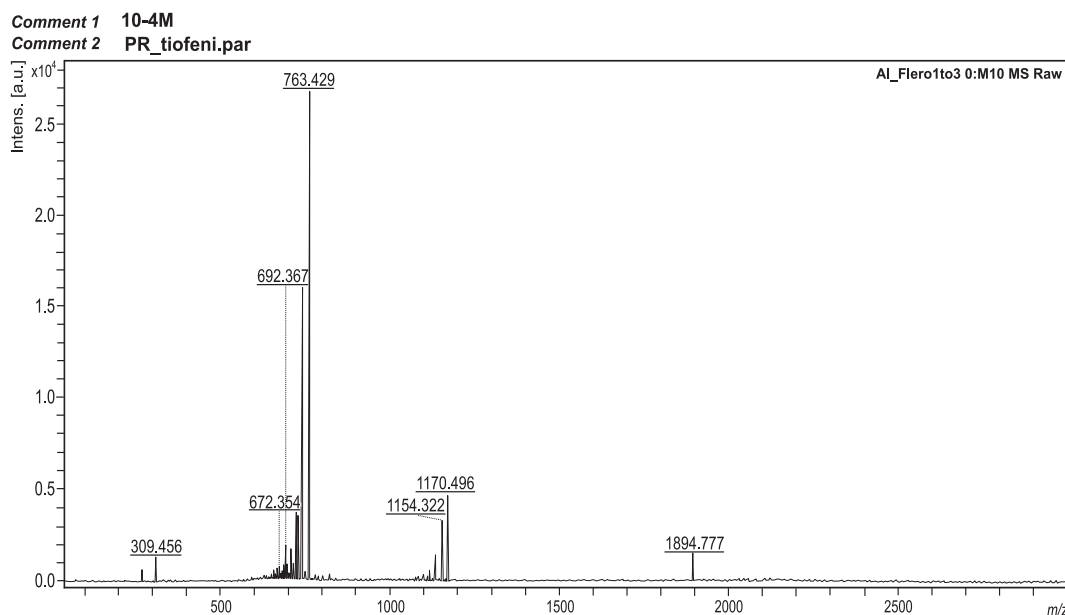
LDI спектри се карактеришу сигналима нетакнутих молекулских јона, фрагментиним јонима насталим губитком малих неутралних молекула H_2O , NH_3 и HCOOH из протонисаних врста које су обично ниског интензитета.

Пикови квазимолекуларног јона се удружују са сателит пиковима на већим масама који потичу од молекула матрикса. Из молекулске масе добијају се важни подаци за карактеризацију молекула. Сваки пик карактерише envelope изотопске дистрибуције. Зато је важна резолуција да би се могли раздвојити појединачно пикови. Оштри пикови рефлектују изотопску дистрибуцију родитељског јона (ширина пика 10 Da) и ови спектри често показују допринос малих неутралних губитака нарочито ако зрачење није у потпуности контролисано и ако је блиско детекционом лимиту. TOF/TOF масеном спектрометријом флуорохинолона и алуминијума добијају се envelope изотопске дистрибуције анализата који су значајни за структурно тумачењевих насталих комплекса.



Слика 75. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1:3$, pH=4,50

Спектар на Слици 75 је снимљен у опсегу од m/z 300 до 3000. У спектру снимљеном при истом концентрационом односу, али pH вишем се уочавају две карактеристичне групе сигнала и то у области око 700 и у области око m/z 1100. Сигнал на m/z 763,50 има највиши интензитет. Сигнал на 1154,61 представља по интензитету значајну врсту у овом систему.

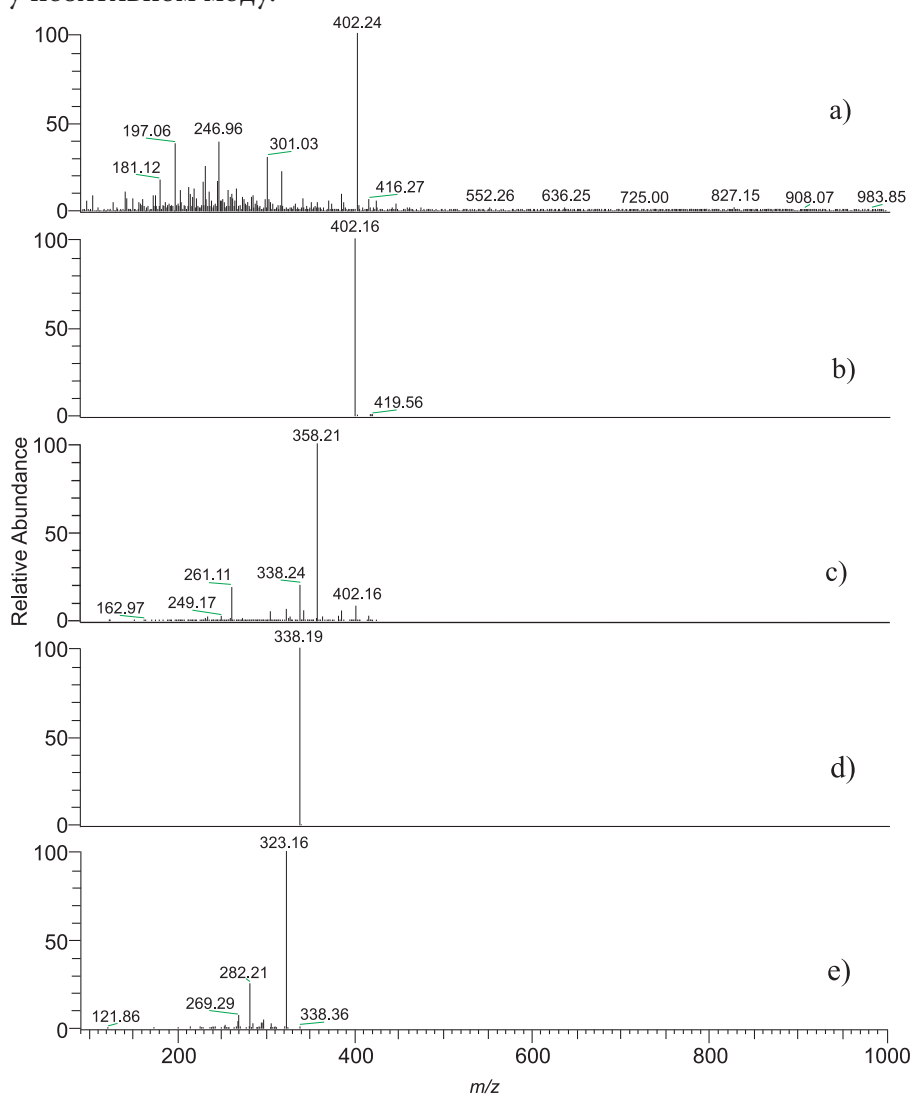


Слика 76. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero} = 1:3$, pH=5,42, димер

Спектар на Слици 76 је снимљен у опсегу од m/z 600 до 2000 и још вишој рН вредности у односу на претходне спектре. На овом спектру запажају се 3 интензивнија изотопска кластера. Сигнал на m/z 1894,77 је из најниже групе сигнала. Као и на претходним рН тако и при овој рН вредности најинтензивнији је сигнал на m/z 763,20. Интензитет овог сигнала је врло висок па је и са аспекта заступљености значајан. Сигнал на m/z 1170,50 је окружен сигнаlima који највероватније потичу од метастабилних јона.

3.4.15. ESI MS и MS/MS спектри раствора моксифлоксацина

Оптимизација радних услова ESI извора и јонске оптике је извршена према молекулском јону моксифлоксацина m/z 402, који је одабран као мониторинг јон. Снимање је извршено у позитивном моду.



Слика 77. ESI и MS/MS спектри моксифлоксацина

- a) MS спектар моксифлоксацина;
- б) MS² јон m/z 402,0, CID=0;
- ц) MS² јон m/z 402,0, CID=40;
- д) MS⁴ јона m/z 402,0, CID=40; m/z 358,0, CID=40; m/z 338,0, CID=40;
- е) MS⁴ јона m/z 402, CID=40; m/z 358,0, CID=40; m/z 338,0, CID=40;

Иако је ESI блага јонизациона техника ипак се у примарном MS¹ спектру, на Слици 77 а) примећује фрагментација (губитак CO₂, губитак C₆H₁₃N). У овом спектру најинтензивнији (релативног интензитета 100 %) је сигнал m/z моксифлоксацина на 402,24 који потиче

од протонованог молекулског јона. Остале јонске врсте имају мали интензитет сигнала (релативног интензитет <15 %).

б) Ово је спектар MS² јона m/z 402,16, с тим што је колизиона енергија CID=0

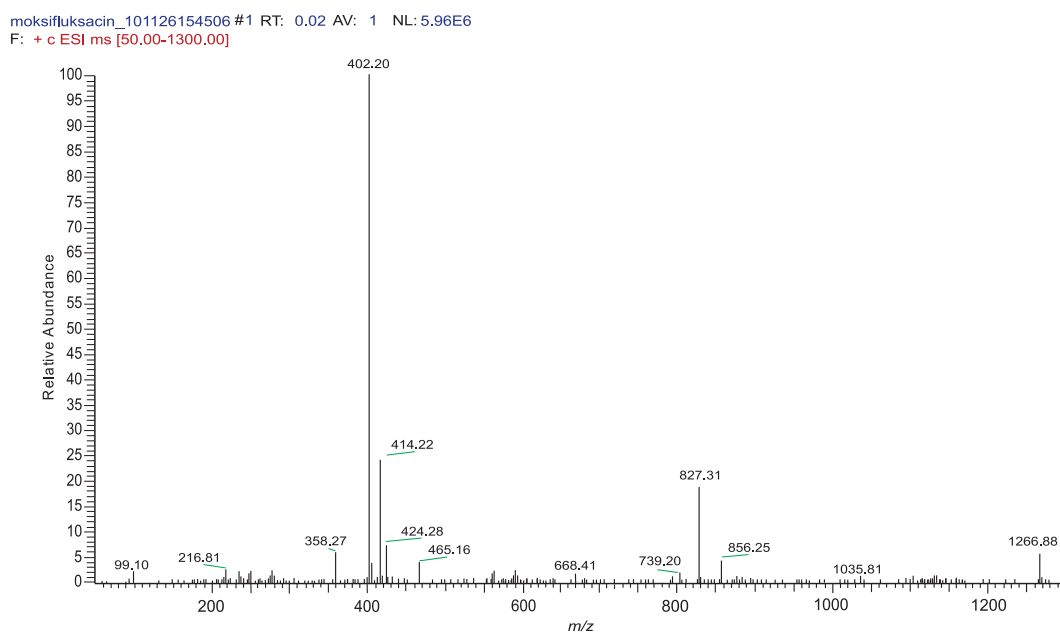
ц) Спектар MS² parent јона m/z 402,16, уз примену CID=40 % се фрагментише (декарбоксилацијом) дајући тако потомак јон m/z 338,24, а даљим губитком HF настаје јон 338,24 и остали мање заступљени јони. У овом спектру је још увек присутан јон 402,16 ниског релативног интензитета, из чега следи да је примењена CID адекватна

д) Спектар MS⁴ јона m/z 402,0, CID = 40; m/z 358,0, CID =40; m/z 338,0, CID =0; има само један сигнал и то од јона 338,19 чији је релативног интензитета 100%

е) Спектар MS⁴ јона 402,16 CID =40; m/z 358,0, CID =40; m/z 338,0, CID =40; се фрагментише дајући тако потомак јон m/z 323,16 (релативног интензитета 100 %) и остале мање заступљене јоне: 282,21 (релативног интензитета 30 %) и јона 269,29. У овом спектру је још увек присутан јон 338,36 ниског релативног интензитета, из чега следи да је примењена CID адекватна.

3.4.16. ESI MS спектри раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина

За изучавање комплексирања алуминијума и моксифлоксацина ESI MS техником припремани су раствори различитих концентрација, концентрационих односа и раствори различитих рН вредности. Овде је приказан само најрепрезентативнији спектар, снимљен у позитивном моду и на основу оптимизације инструмента за протоновани јон моксифлоксацина m/z 402,30.



Слика 78. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, $pH=5,60$, $C_{Al}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

ESI MS спектар на Слици 78 је снимљен у опсегу од m/z 50 до 1300. Расподела интензитета је правилна, Gauss-ова у односу на сигнале 402,20, 827,31, 1266,88. Базна линија је чиста без много шума. Сигнал на m/z 827,31 је релативни интензитет 24 %. Сигнали на m/z 414,22, је релативни интензитет 28 % и 424,28 је релативног интензитета 10 %. Сигнал 216,81 је са релативним интензитетом 4 %. Сигнал на 1266,88 је релативно интензитета 6 %, али хемијски није мање битан од осталих. У спектру је најинтензивнији сигнал од слободног лиганда на 402,20 (релативног интензитета 100%). Сигнал на m/z 358,27 је знатно нижи (релативни интензитет 8 %). Овај спектар се може сматрати репрезентативним за овај концентрациони однос и ову рН вредност.

3.4.17. maLDI спектри раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина

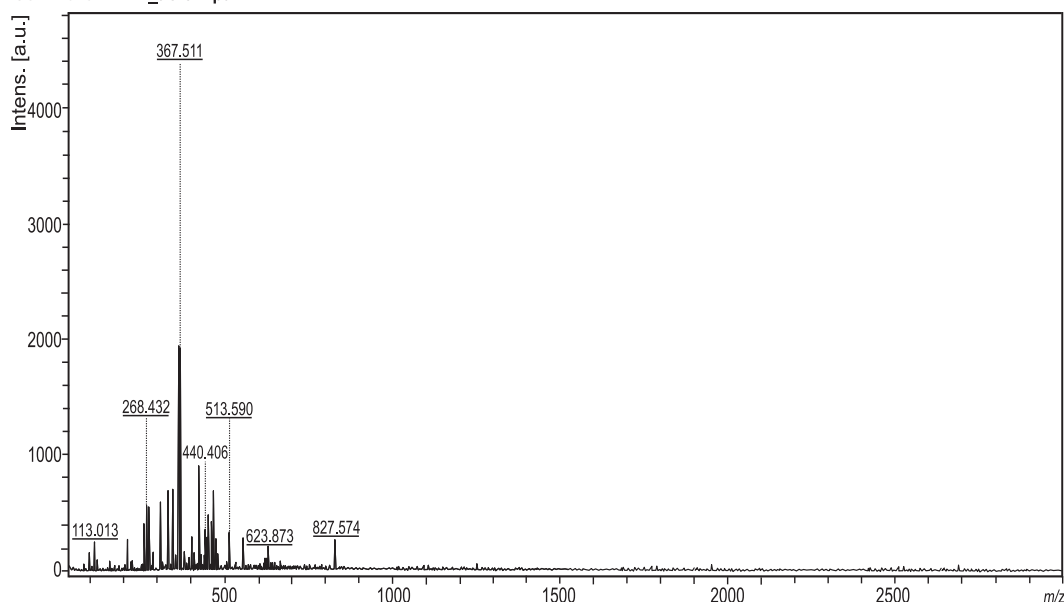
Најпре су снимљени maLDI спектри самог моксифлоксацина, исте концентracије и рН вредности као у растворима алуминијума и моксифлоксацина.

За изучавање комплексирања алуминијума и моксифлоксацина maLDI MS техником припремани су раствори различитих концентрационих односа и различитих рН вредности. Састави и рН вредности одабраних спектра су у Табели 14 а остали спектри су дати у Прилогу ове тезе.

Табела 14. Састави и рН вредности раствора Al(III)-јона и моксифлоксацина				
Број узорка	рН	Конц. однос	Концентрација Al [mol/dm ³]	Конц. моксифлоксацина [mol/dm ³]
1	4,40	1:1	2,7x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻⁴
2	5,90	1:1		
3	5,10	1:3		
4	5,90	1:3		

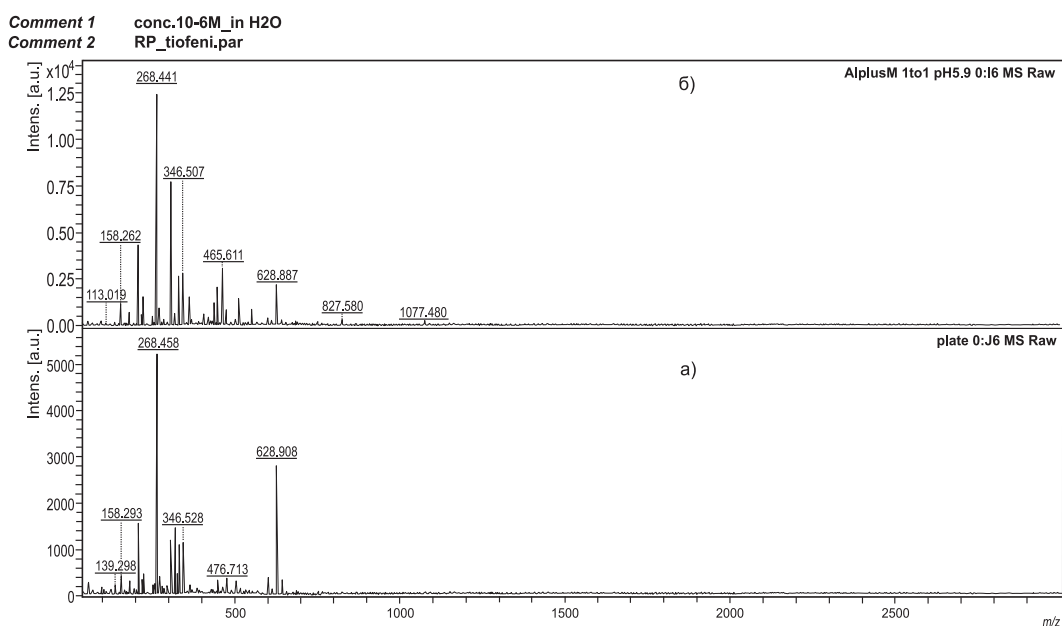
Comment 1 10-4M_H2O

Comment 2 RP_tiofeni.par



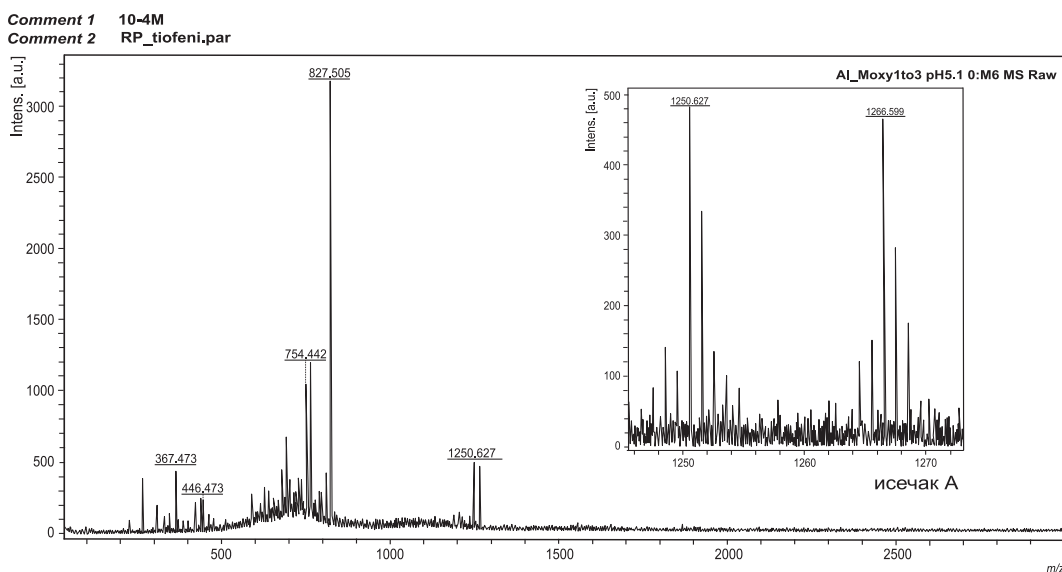
Слика 79. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:1$, рН=4,40

Спектр на Слици 79 се односи на концентracиони однос алуминијума и моксифлоксацина 1:1 и рН 4,40. Издвајају две групе сигнала. Осим сигнала од подлоге до m/z 600, уочавају се и нижи сигнали у другој групи од m/z 700 до 900 који највероватније припадају комплексним врстама. Ови су јони ниске релативне заступљености, јер ови експериментални услови не погодују комплексирању. Уочава се и сигнал на m/z 827,50, који се при свим концентracионим односима и свим рН вредностима јавља.



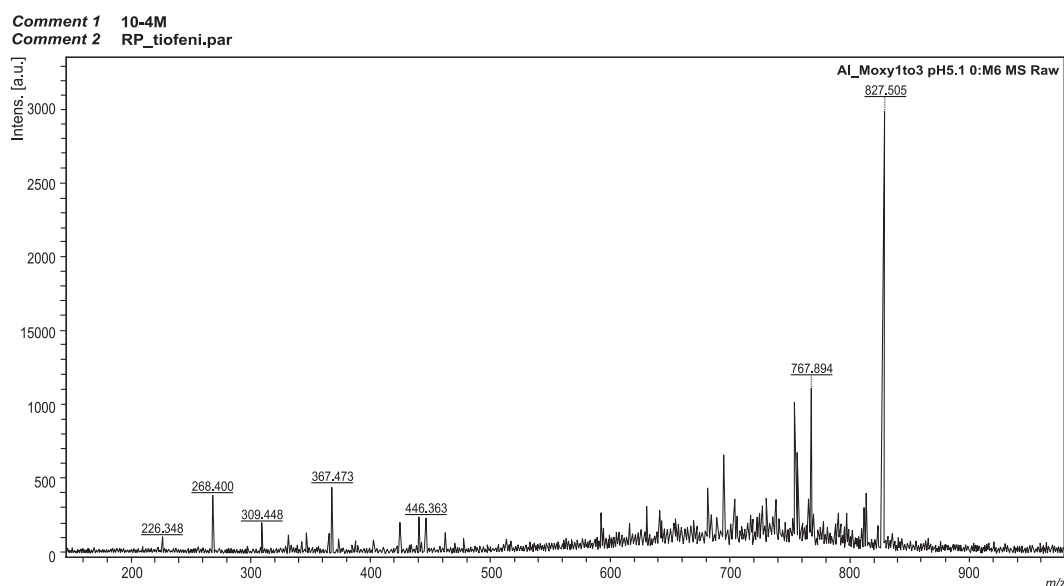
Слика 80. *ma*LDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:1$, $pH=5,90$, према спектру подлоге

При истом концентрационом односу а са порастом pH за једну јединицу добија се спектар на Слици 80. Слика приказује два спектра: а) спектар који потиче од подлоге и б) спектар који потиче од раствора алуминијума и моксифлоксацина. Када се „одбије“ утицај подлоге остају пикови (465,61, 827,58, 1077,45, нижег интензитета). На спектру који потиче од подлоге сви сигнали су сконцентрисани до m/z 630, док у спектру раствора алуминијума и моксифлоксацина сигнали се појављују до m/z 1100.



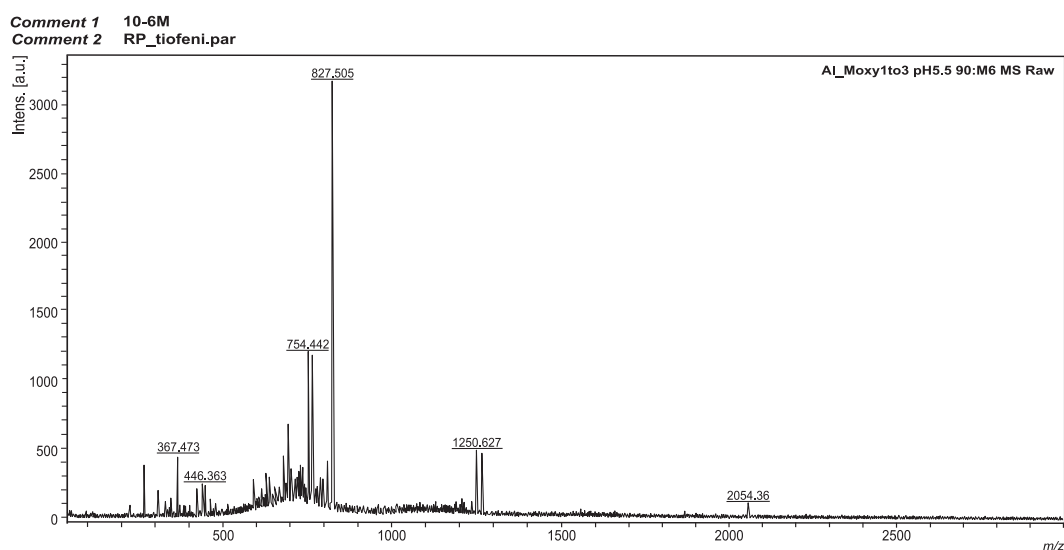
Слика 81. *ma*LDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, $pH=5,10$

Спектар на Слици 81 се односи на раствор концентратионог односа алуминијума и моксифлоксацина = 1:3 и $pH = 5,10$. Снимљен је у опсегу од m/z 300 до 2800. Сигнал на m/z 827,50 има овом случају релативни интензитет 100 %. Овај сигнал се уочава у претходним спектрима али је много мањег интензитета. Испред овог сигнала налази се више нижих сигнала који потичу од метастабилних јона и са аспекта релативне заступљености представљају минорне врсте. Сигнал на m/z 1250,62 у овим условима је трећи по својој релативној заступљености. Сигнал на m/z 1266,59 се не види у овом спектру па је зато зумирана област на исечку „А“.



Слика 82. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, pH=5,10

На Слици 82 приказан је спектар концентрационог односа 1:3, истог рН са циљем боље анализе подручја до m/z . 900 У спектру се издвајају три групе сигнала. Осим сигнала од подлоге до m/z 500, уочавају се и сигнали у другој групи од m/z 600 до 750 који потичу највероватније од метастабилних јона и то су минорне врсте (ниска релативна заступљеност). У трећој групи сигнала на овом спектру највишег интензитета је сигнал на m/z 827,50.



Слика 83. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, pH=5,90.

Спектар на Слици 83 се односи на раствор истог концентрационог односа 1:3 као и спектар на Слици 81 с тим што је рН вредност виша. Пораст рН доводи до појаве новог сигнала на 2054,36.

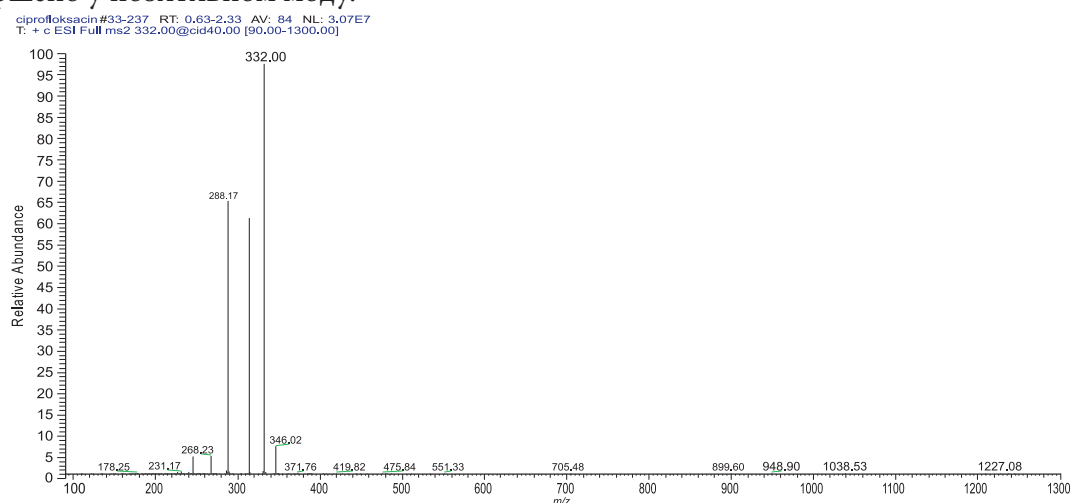
Сигнал на m/z 1250,62 је други по интензитету у овом спектру.

На m/z 827,50 у овом maLDI спектру је сигнал највеће релативне заступљености, што није случај при концентрационо односу алуминијума и моксифлоксацина=1:1, истом рН (Слика 80).

Сигнал на m/z 2054,36 је доста нижег интензитета. Овај спектар се може сматрати најрепрезентативнијим међу свим maLDI спектрима алуминијума и моксифлоксацина.

3.4.18. ESI MS спектри раствора ципрофлоксацина

Оптимизација радних услова ESI извора и јонске оптике је извршена према молекулском јону ципрофлоксацина m/z 332, који је одабран као мониторинг јон. Снимање је извршено у позитивном моду.

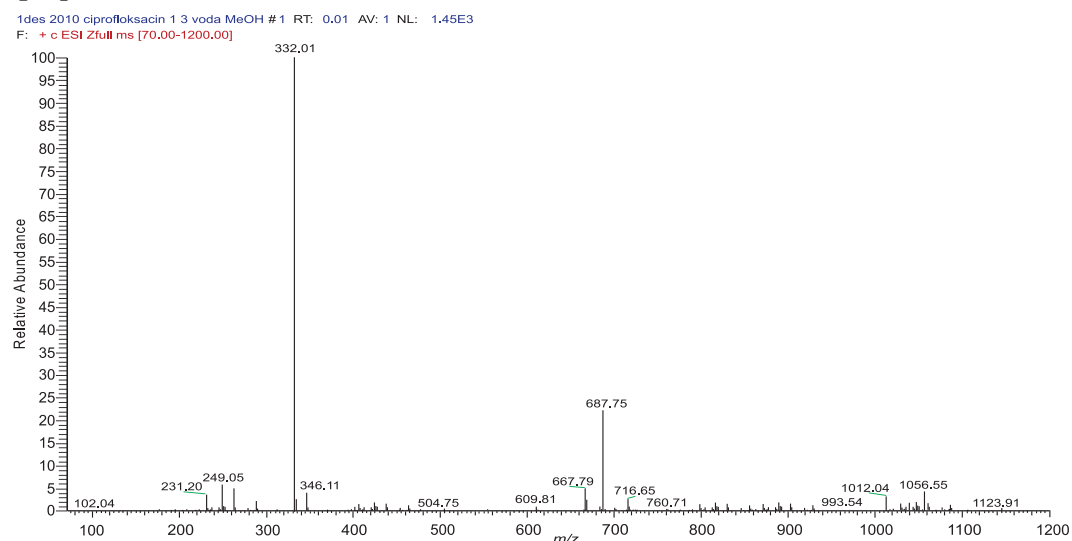


Слика 84. MS/MS спектар јона 332, $E_{coll}=40\%$

ESI је блага јонизациона техника, али се и у примарном MS¹ спектру примећује блага фрагментација. Спектар на Сlici 84 је MS/MS спектар где је на parent јон 332 примењена колизиона енергија од 40 %. При овој колизионој енергији је дошло до фрагментације parent јона, али је овај јон још увек високог интензитета, што указује да је колизиона енергија требало да буде још већа. Настали продукт јони су: m/z 288,17; 268,23; 231,17.

3.4.19. ESI MS спектри раствора и Al(III)-јона ципрофлоксацина

За изучавање комплексирања алуминијума и ципрофлоксацина ESI MS техником припремани су раствори различитих концентрационих односа метала и лиганда, различитих концентрација компонента (реда величине 10^{-5} mol/dm³ и реда величине 10^{-4} mol/dm³) и различитих рН вредности. Снимани су и спектри раствора где је вода растварач и раствора где је смеша воде и метанола коришћена као растварач и констатовано је да нема већих разлика у ESI MS спектрима у овим растварачима. Приказан је само најрепрезентативнији спектар, снимљен у позитивном моду и на основу оптимизације инструмента за протонвани јон ципрофлоксацина m/z 332,01.



Слика 85: ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Cipro}=1:3$, рН=5,26

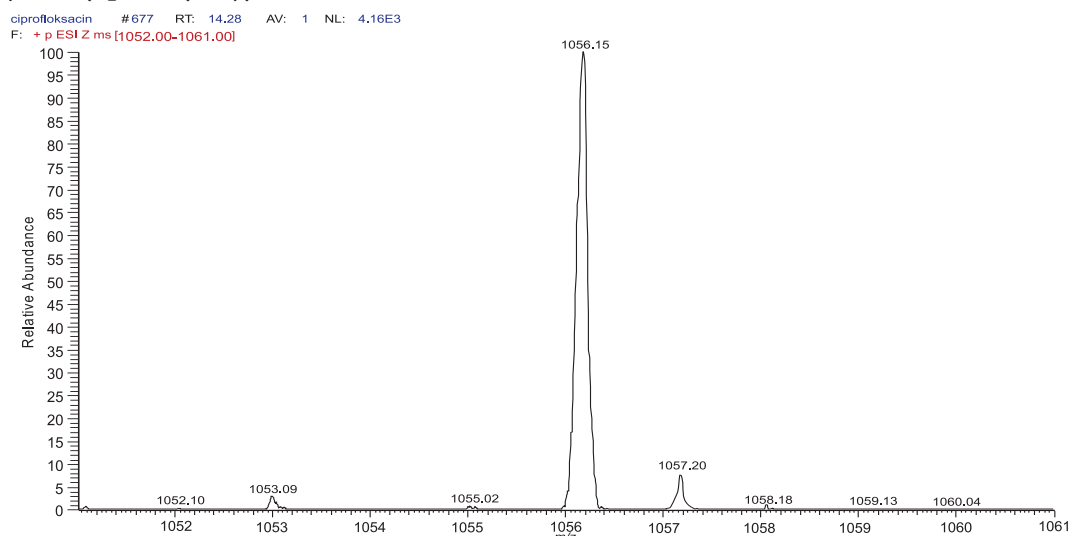
Спектар приказан на Слици 85 је снимљен у опсегу од m/z 70 до 1200 и може се сматрати репрезентативним за овај концентрациони однос и ову рН вредност. Ово је спектар раствора где је концентрација алуминијума $C_{Al}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, а ципрофлоксацина три пута већа у односу на концентрацију алуминијума (растварач смеша воде и метанола).

Прва група сигнала највероватније потиче од слободног лиганда: 332,01 (релативни интезитет 100 %) и 231,20 (релативни интезитет 4 %).

Другу групу сигнала представљају сигнали на: m/z 249,05 (релативни интезитет 8 %), 667,79 и 687,75 (релативни интезитет 24 %). Трећу групу сигнала представљају сигнали на: m/z 1040,33 (релативни интезитет 4 %), 1057,15 (релативни интезитет 6 %).

3.4.20. Zoom scan јона у систему алуминијум-ципрофлоксацин

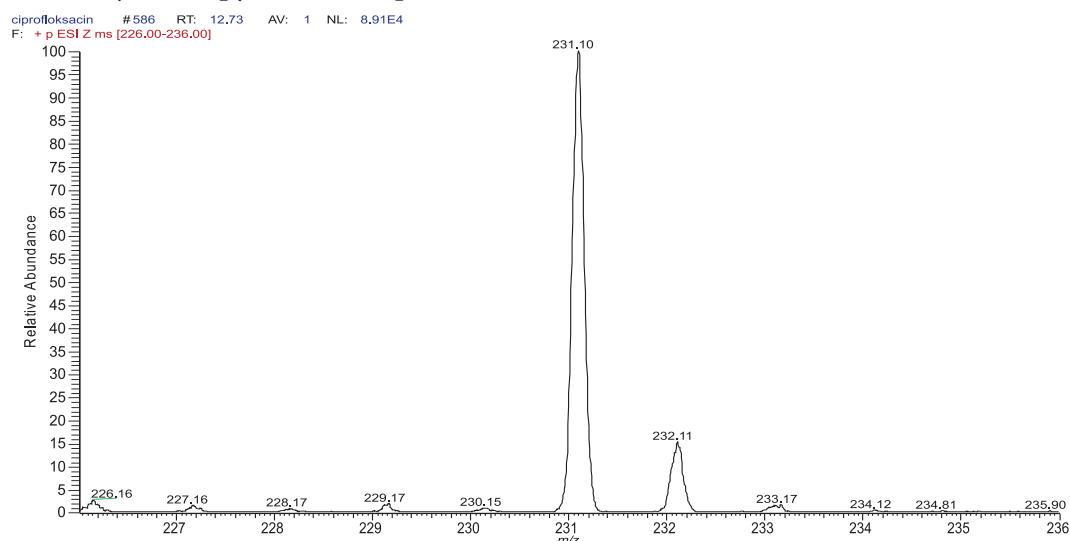
Zoom scan мод је коришћен са циљем провере наелектрисања појединих врста. Zoom scan даје већу резолуцију од осталих модова.



Слика 86. Zoom scan јона 1056

Јон 1056 (Слика 86) је изабран из MS^1 спектра раствора алуминијума и ципрофлоксацина приказаног на Слици 85. Интервал снимања је од m/z 1052-1061.

Изотопски пикови јона 1056 су међусобно одвојени за $\Delta=1,0$ јединицу, из чега следи да је јон m/z 1056 једноструко наелектрисан.

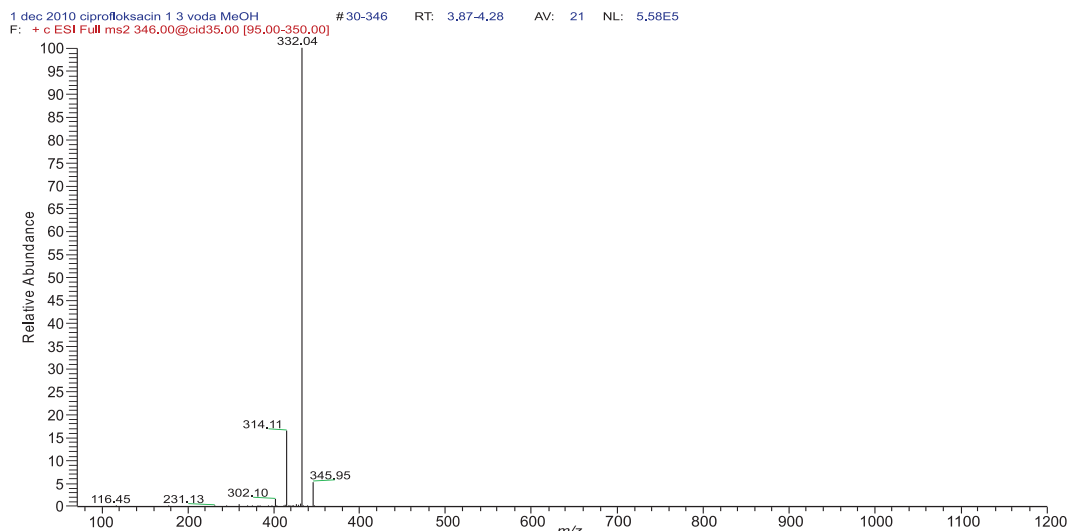


Слика 87. Zoom scan јона 231

Јон 231 (Слика 84) је изабран из основног MS¹ спектра раствора ципрофлоксацина и алуминијума (Слика 81). Јон је једноструко наелектрисан, јер разлика „суседних” пикова износи $\Delta=1,0$

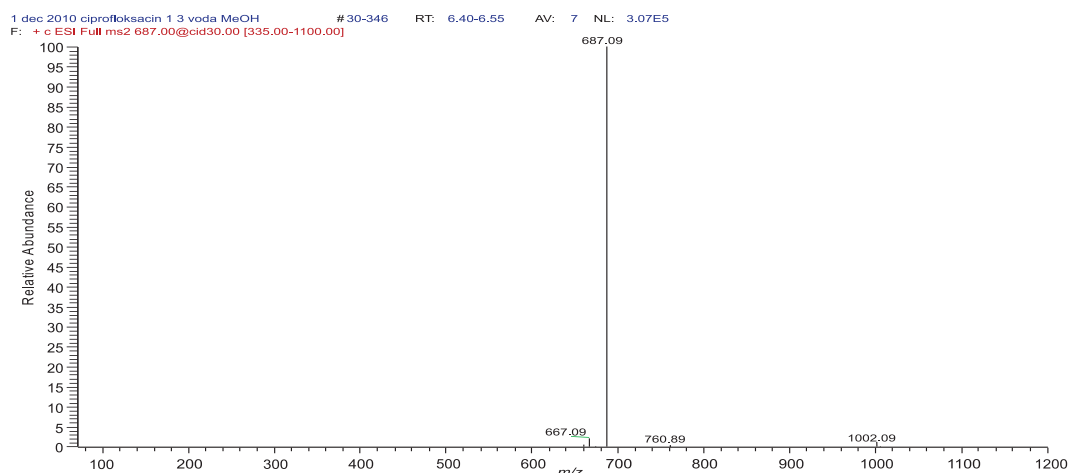
3.4.21. Тандем масена спектрометрија јона у раствору Al(III)-јона и ципрофлоксацина (10^{-5} mol/dm³)

За тандем масену спектрометрију одабрани су parent јони из спектра раствора ципрофлоксацина и алуминијума, где су као растварачи коришћени вода и смеша воде и метанола. Концентрације компоненти биле су реда величине 10^{-4} и 10^{-5} mol/dm³, концентрациони однос ципрофлоксацина и алуминијума 3:1, рН=4,99-5,26.



Слика 88. MS/MS спектар parent јона 346, $E_{\text{coll}}=35,0$ %

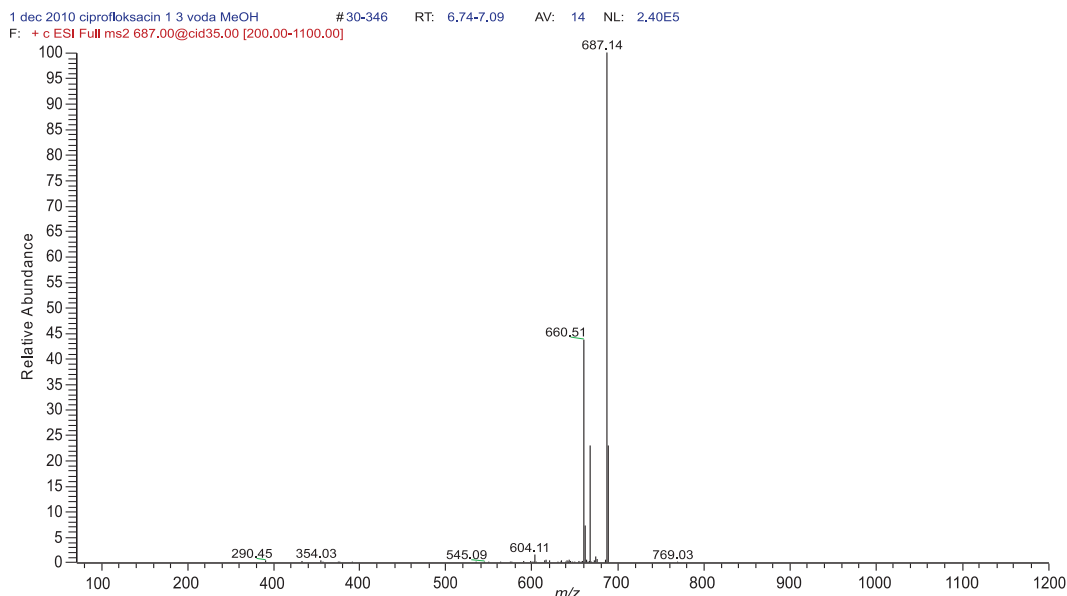
Спектар на Слици 88 је спектар parent јона 346 који је одабран из основног спектра раствора ципрофлоксацина и алуминијума, концентрације компонента 10^{-5} mol/dm³, концентрационог односа 3:1, рН=5,26 (Слика 85). На parent јон 346,00 је примењена колизиона енергија од 35 % и као продукт јони су добијени 332,04, (најинтензивнији је у спектру); 314,11 (релативни интензитет 18 %) и 302,10 (релативни интензитет 4 %). У овом спектру је још увек видљив родитељски јон 346,00 чији релативни интензитет износи 7 %, што указује да је добро одабрана вредност колизионе енергије (дошло је до адекватне фрагментације, а родитељски јон још постоји у спектру).



Слика 89. MS/MS спектар parent јона 687 (AlL₂vrsta), $E_{\text{coll}}=30,0$ %

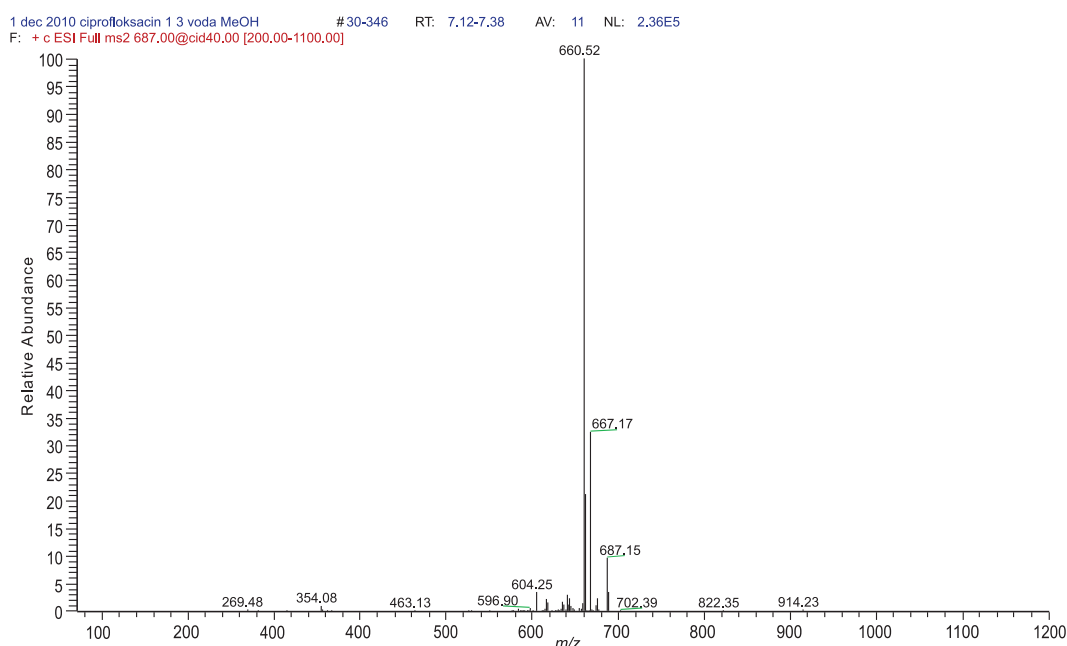
Спектар на Слици 89 је спектар parent јона 687,00 који је одабран из основног спектра раствора ципрофлоксацина и алуминијума, Слика 85. Снимљен у интервалу од m/z 335-1100. На parent јон 687,00 је примењена колизиона енергија од 30 %.

Ова енергија није била довољна да изазове фрагментацију јона 687,00 па је релативни интензитет овог јона још увек 100 %. Настао је један минорни фрагмент на m/z 667,09 врло ниског интензитета.



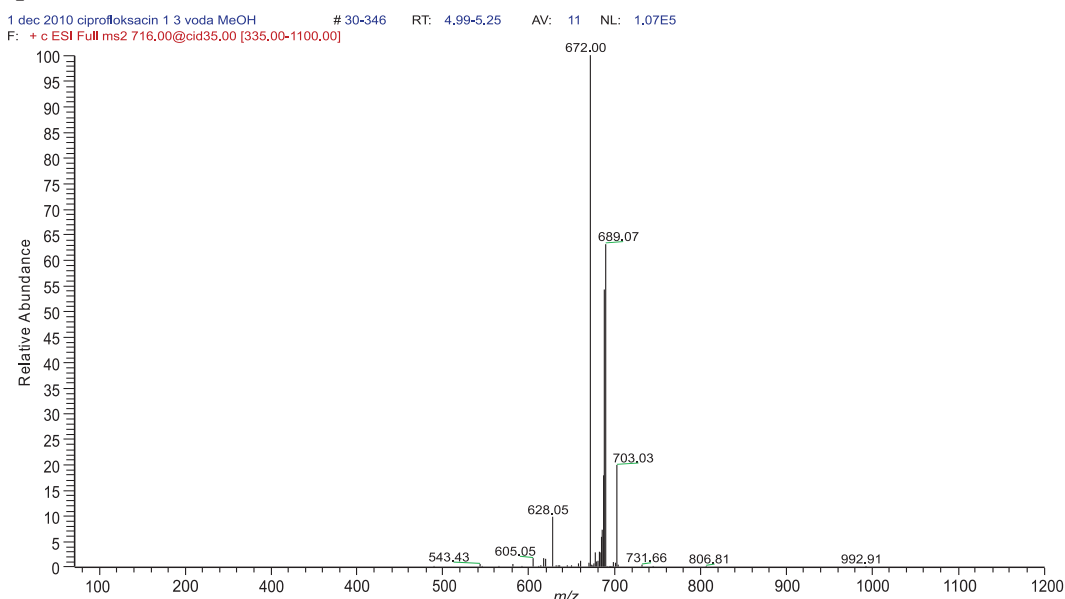
Слика 90. MS/MS спектар 687 јона, $E_{coll}=35,0$ %

Применом колизионе енергије од 35 % (Слика 90) запажа се да је интензивнија фрагментација parent јона и као продукт јони настају: 660,51 (релативни интензитет 45 %), 667,09 (релативни интензитет 24 %) и 604,11 врло ниског интензитета. Још увек је присутан parent јон 687,00 са релативни интензитет 100 %, што указује да је највероватније настала комплексна врста у којој су метал и лиганди чврсто везани и да колизиона енергија од 35 % не може раскинути везу између њих.



Слика 91. MS/MS спектар parent јона 687, $E_{coll}=40,0$ %

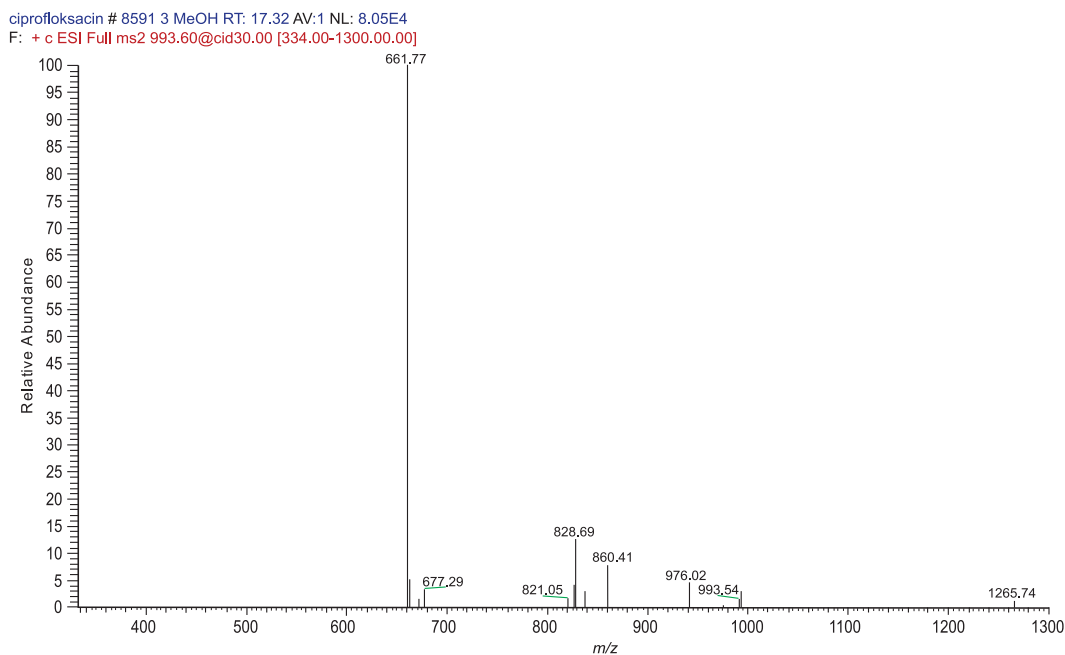
Применом више колизионе енергије од 40,0 % фрагментација постаје интензивнија (Слика 91). Присутан је parent јон 687,00 са интензитетом 12 %, што указује да је примењена енергија оптимална. Најважнији продукт јони су 660,52 (релативни интензитет 100 %), 667,17 (релативни интензитет 36 %) и 604,25 нижег интензитета.



Слика 92. MS/MS спектар parent јона 716, Ecoll=35,0 %

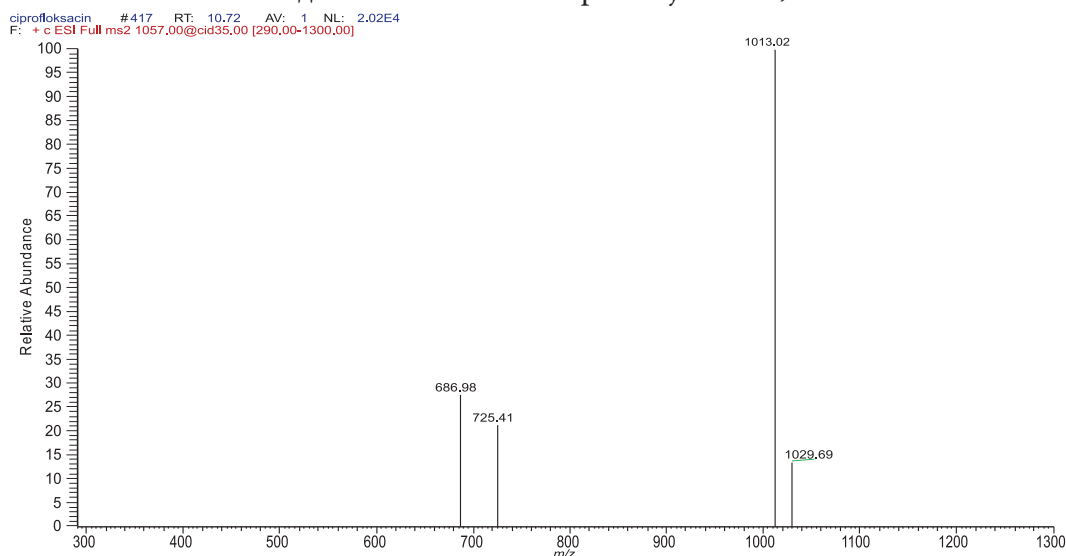
Спектар на Слици 88 је спектар parent јона 716,65 који је одабран из основног спектра (Слика 92) раствора ципрофлоксацина и алуминијума, концентрационог односа $C_{Al} : C_{cipro} = 1:3$, рН=5,26. Снимљен у интервалу од 335–1100. На parent јон 716,00 је примењена колизиона енергија од 35 %.

У овом спектру се запажа да parent јон више не постоји, што указује да је колизиона енергија требала бити нижа. Најзначајнији продукт јони су: 703,03 (релативни интензитет 22 %), 689,07 (релативни интензитета 67 %), 672,00 (релативни интензитета 100 %), 628,05 (релативни интензитет 12 %) и 605,05 врло ниског интензитета.



Слика 93. MS/MS спектар parent јона 993, Ecoll=30,0 %

Из основног спектра (Слика 85) је одабран и јон 993,54 и применом колизионе енергије од 30 % су добијени продукт јони 976,02, 860,41, 828,69, 821,05, 677,29 и јон 661,77 са релативним интензитетом од 100 %. Интензитет parent јона 993,54 износи 4 %.

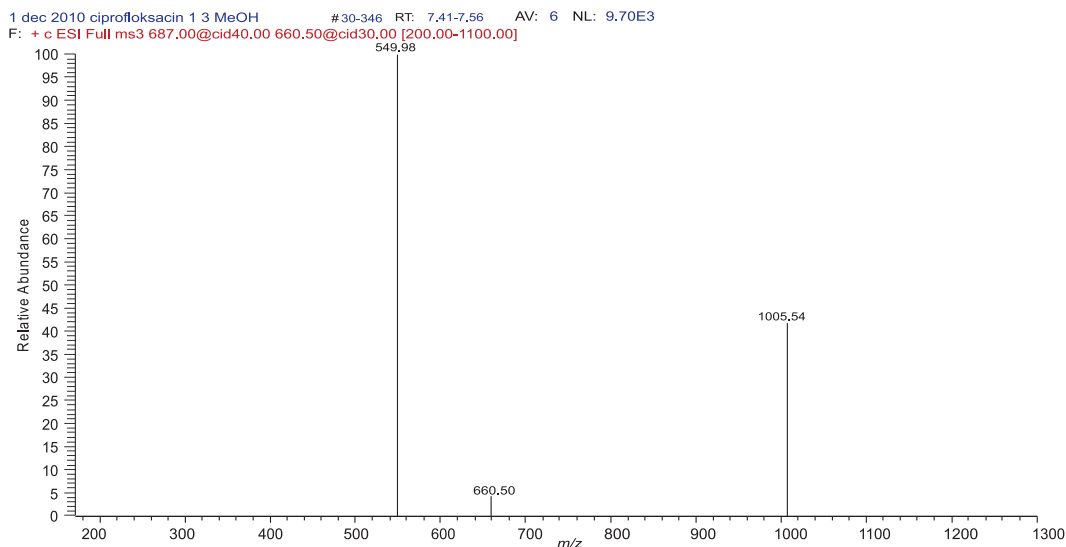


Слика 94. MS/MS спектар parent јона 1056.55 (врста Al_3K), $E_{coll}=35,0\%$

Из основног спектра (Слика 85). одабран је и јон 1056.55, примењена је колизиона енергија од 35 % и добијен спектар на Слици 94. Фрагментацијом овог јона се добијају следећи продукт јони: 1013,02 (релативни интензитет 100 %), 725,41 (релативни интензитет 24%) и јон 686,98 (релативни интензитет 30 %). Parent јона нема у овом спектру што указује да је примењена колизиона енергија превисока.

3.4.22. MS/MS/MS експеримент јона у раствору $Al(III)$ -јона и ципрофлоксацина

У јонском трапу потпуна фрагментација се постиже тек у MS^3 експерименту, за разлику од квадрупола, где је довољан и MS^2 експеримент за детекцију свих фрагмената.



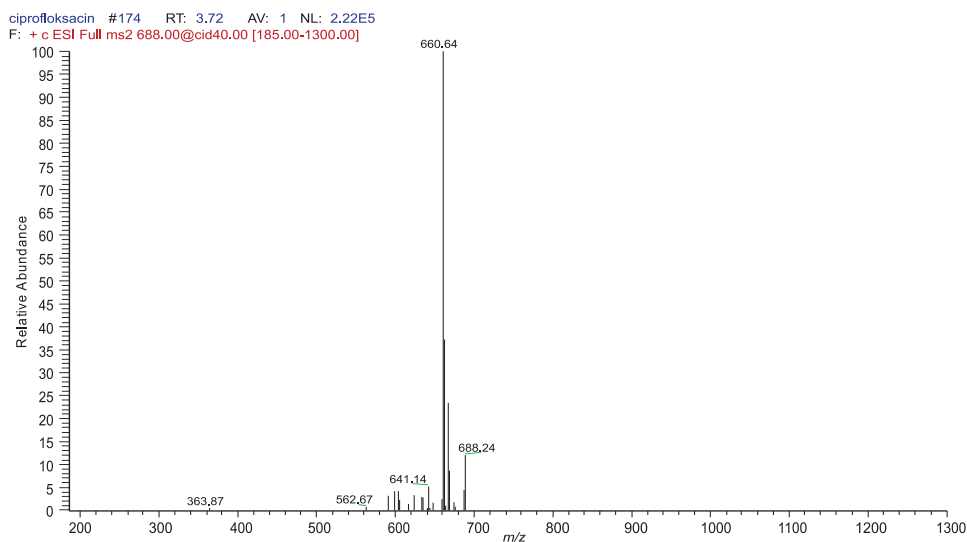
Слика 95. MS/MS/MS спектар parent јона 687 $E_{coll}=30,0\%$

Спектар на Слици 95 је спектар parent јона 687,00, одабран из основног спектра (Слика 85) раствора ципрофлоксацина и алуминијума, концентрације компонената 10^{-5} mol/dm^3 , конц. односа 3:1, $pH=5,26$. Снимљен у интервалу од m/z 200-1200. На parent јон 687,00 је примењена колизиона енергија од 30%.

Најзначајнији продукт јони су: 549,98 са релативним интензитетом од 100 % и јон на m/z 1005,54 настао као последица присаједињавања parent јона са неком врстом у раствору. Присаједињавање је ређа појава у односу на фрагментацију parent јона при примени одређене колизионе енергије.

3.4.23. Тандем масена спектрометрија јона у раствору Al(III)-јона и ципрофлоксацина, концентрација компонената 10^{-4} mol/dm^3

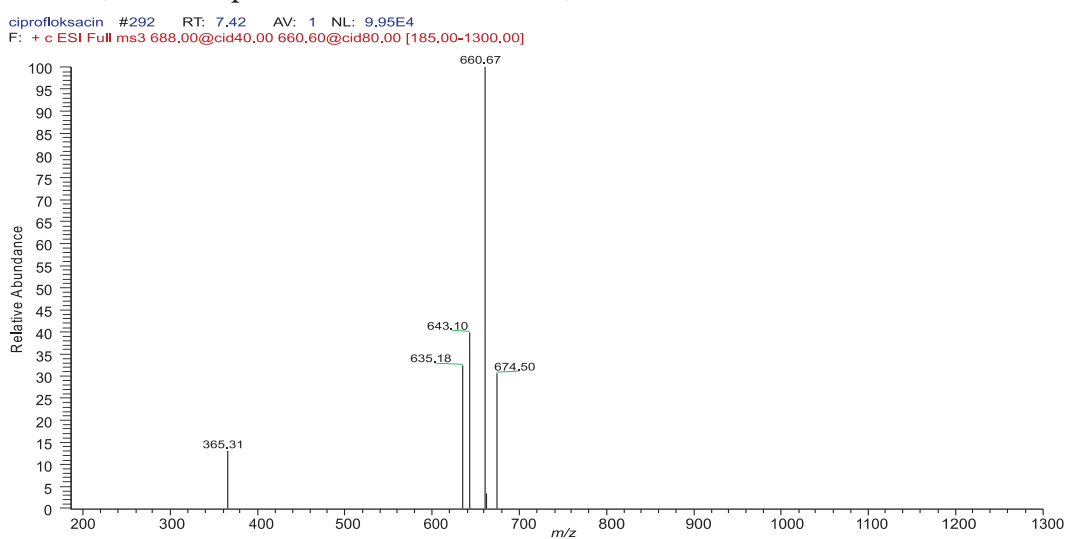
Изузетно тешко се у MS/MS експерименту разбијају parent јони из спектра раствора где су концентрације полазних компонената 10^{-4} mol/dm^3 . Потребна је велика колизиона енергија, а у неким случајевима неки јони се не могу потпуно разбити што указује да су формиран комплексни врло стабилни при вишим концентрацијама лиганда и метала.



Слика 96. MS/MS спектар parent јона 688, $E_{\text{coll}}=40,0\%$

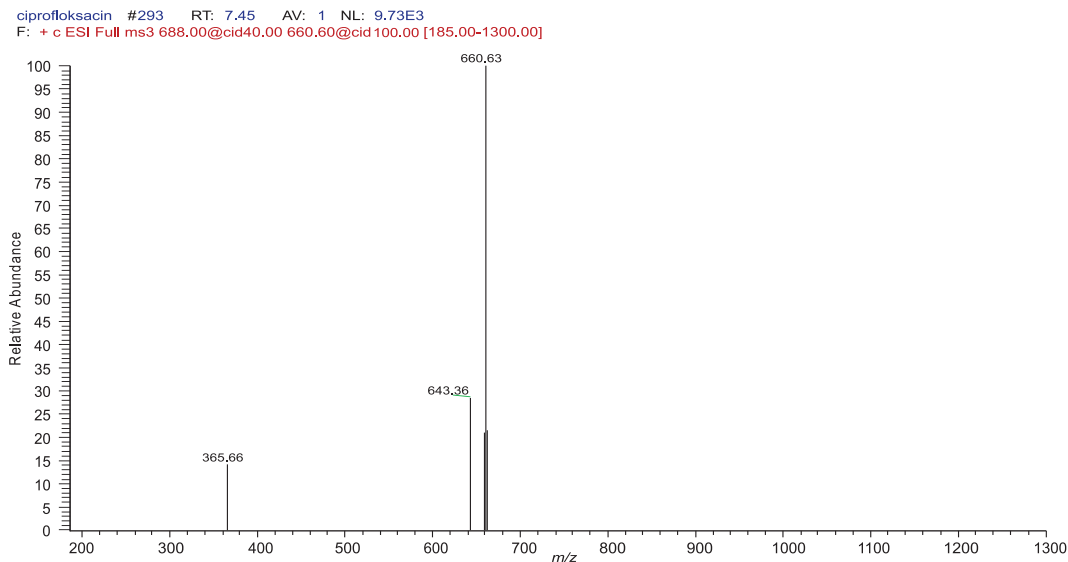
Спектар на Слици 96 је спектар parent јона 688 који је одабран из основног спектра раствора ципрофлоксацина и алуминијума, концентрације компонената 10^{-4} mol/dm^3 , концентрационог односа 3:1, $\text{pH}=4,99$. Снимљен у интервалу од m/z 185-1300. На parent јон 688,00 је примењена колизиона енергија од 40 %. У спектру је још увек присутан parent јон са релативним интензитетом 14 %. Када је концентрација компонената десет пута нижа овај јон у спектру више не постоји.

Најзначајнији продукт јони су: 660,64 (релативни интензитет 100 %), 641,14 (релативни интензитет 7 %), 562,67 (релативни интензитет 4%).



Слика 97. MS/MS/MS спектар 688 јона $E_{\text{coll}}=40,0\%$ и јона 660 $E_{\text{coll}}=80,0\%$

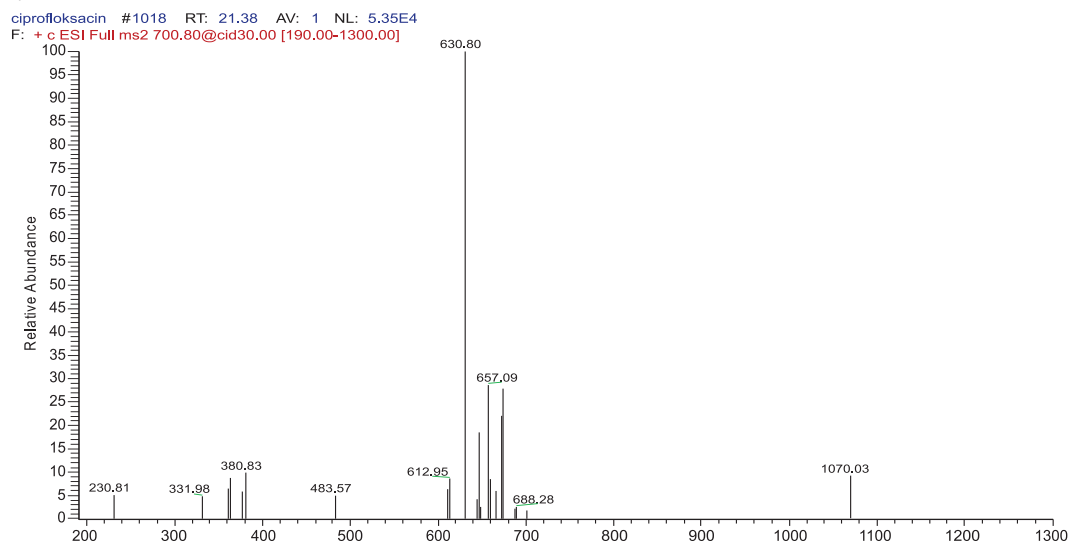
За даљу фрагментацију изабран је као parent јон 660 (Слика 97) на кога је примењена енергија од 80,0 %. Дошло је до фрагментације овог јона, али још увек јон 660 постоји у спектру са релативним интензитетом 100 %, из чега следи да је енергија примењена у MS³ експерименту недовољна да би фрагментисала насталу комплексну врсту. Продукт јони настали у MS³ експерименту су: 643,10 (релативни интензитет 42 %), 635,18 (релативни интензитет 35 %) и 365,31 (релативни интензитет 15 %).



Слика 98. MS/MS/MS спектар 688 јона $E_{coll}=40,0\%$; јона 660 $E_{coll}=100,0\%$

На Слици 98 је приказан MS³ спектар јона 688 јона фрагментисаног са колизионом енергијом 40,0 % и јона 660 са колизионом енергијом 100,0 %.

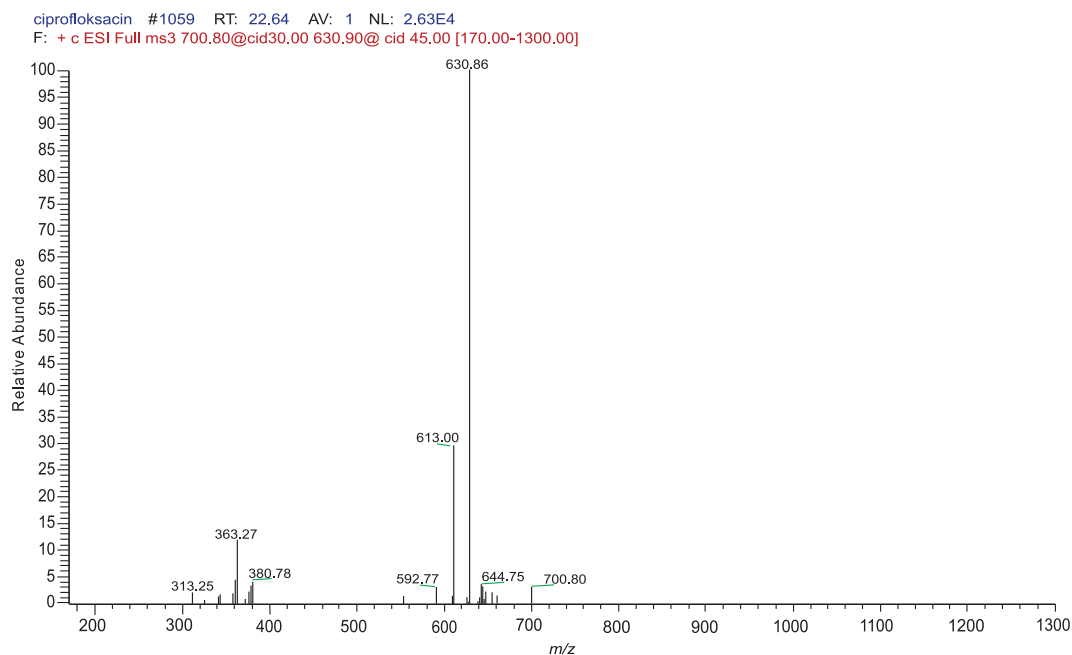
Пошто је у претходном случају на јон 660 примењена енергија од 80 %, била недовољна да фрагментисе овај јон, у MS³ експерименту примењена је већа колизиона енергија. Међутим јон 660 је још увек са релативним интензитетом од 100 %. Ово указује да је дата комплексна врста (у када су концентрације компоненти реда величине 10^{-4} mol/dm³) врло стабилна и да је тешко прекинути везу метал-лиганд. Настали продукт јони при енергији 100 % су: 643,10 (релативни интензитет 32 %) и 365, 31 (релативни интензитет 15 %).



Слика 99. MS/MS спектар 700,80 јона, $E_{coll}=30,0\%$

Из основног спектра одабран је као parent јон на m/z 700,80 и фрагментисан је колизионом енергијом од 30 %. (Слика 99). Добијен је велики број продукт јона, а parent јон је са релативним интензитетом 3 %. Међу продукт јонима је и јон 688,28, (релативни

интензитет 4 %), 657,09 (релативни интензитет 32 %), 630,80 (релативни интензитет 100 %), 612,95 (релативни интензитет 10 %) и низ фрагмената у области од m/z 330 до 480, што је дато у табели у Прилогу.



Слика 100. MS/MS/MS спектар јона m/z 700,80 јона $E_{coll}=30,0$ %, јона 630,90, $E_{coll}=45$ %

У претходном MS² експерименту као продукт јон настао је јон 630,90. У MS³ експерименту (Слика 100) на јон 630,90 примењена колизиона енергија од 45 %. Међутим ни то није била довољна енергија да се јон 630,90 фрагментише (још увек са релативни интензитетом од 100 %). Ово указује да је дата комплексна врста (када су концентрације компоненти реда величине 10^{-4} mol/dm³) врло стабилна и да је тешко прекинути везу метал-лиганд. Остали продукт јони су: 613,00 (релативни интензитет 32 %), 592,77 (релативни интензитет 5 %) и јони нижег интензитета 363,27 и 380,78.

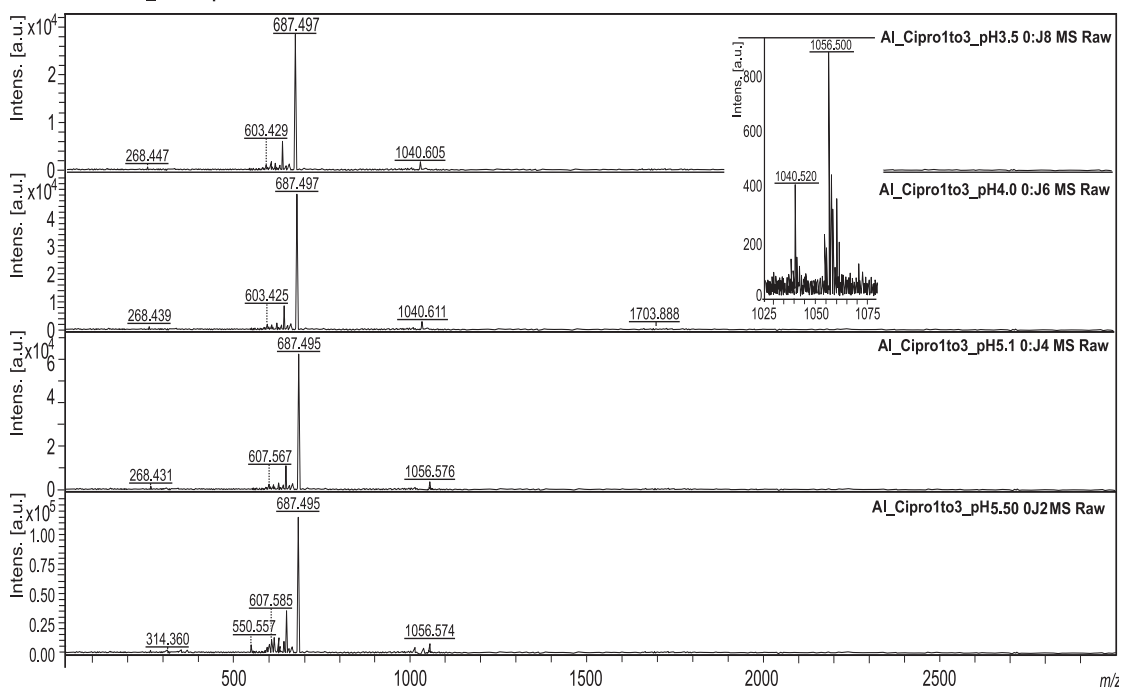
3.4.24. maLDI спектри Al(III)-јона и ципрофлоксацина

Најпре су снимљени спектри самог ципрофлоксацина исте концентracије и рН вредности као у растворима метала и ципрофлоксацина.

За изучавање комплексирања алуминијума и ципрофлоксацина maLDI MS техником припремани су раствори различитих концентрационих односа и раствори различитих рН вредности. У Табели 15. су приказани раствори за концентрациони однос 1:3 и различите рН вредности. Приказани су најрепрезентативнији спектри у овом поглављу, а остали су дати у Прилогу.

Број узорка	рН	Концентрациони однос	Концентрација Al(III)-јона [mol/dm ³]	Концентрација ципрофлоксацина [mol/dm ³]
1	3,50	1:3	2,7x10 ⁻⁴	8,1x10 ⁻⁴
2	4,10	1:3		
3	5,10	1:3		
4	6,10	1:3		

Comment 1 10-4M
Comment 2 RP_tiofeni.par

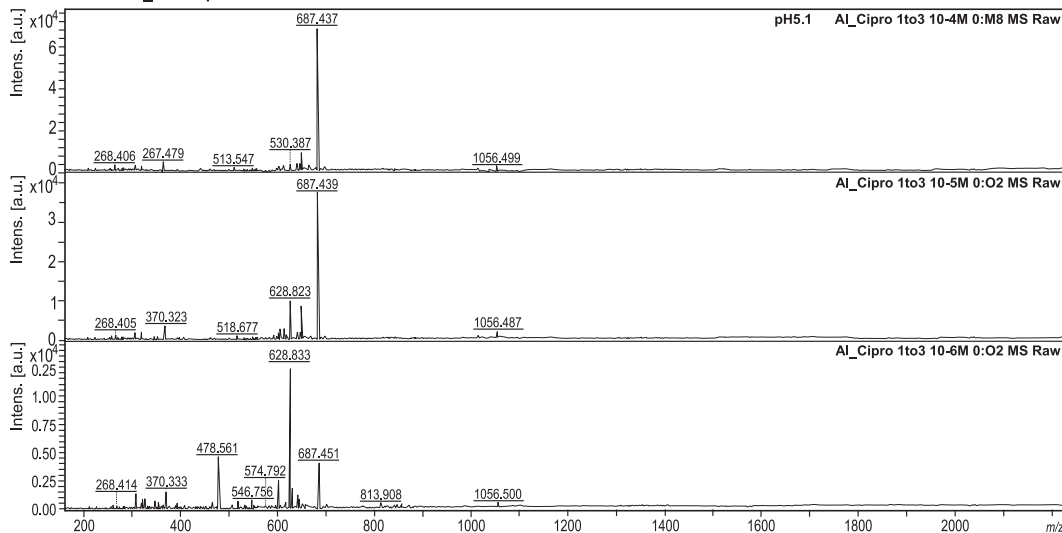


Слика 101. maLDI спектри раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, различито рН

Сигнал на m/z 687,49 се јавља на свим рН вредностима и највишег је интензитета. На рН 3,50–5,50 јавља се сигнал на m/z 1040,61. На рН 4,0 јавља се и сигнал на m/z 1703,88 који је нижег интензитета. На рН=5,10 до 5,50 јавља се сигнал на m/z 1056,57, а сигнал 1703,88 више није видљив (Слика 101).

Исечак на слици Б представља зумирану област m/z 1025 до 1075 и показује да јон на m/z 1040,52 постоји на свим рН вредностиама само је нижег интензитета.

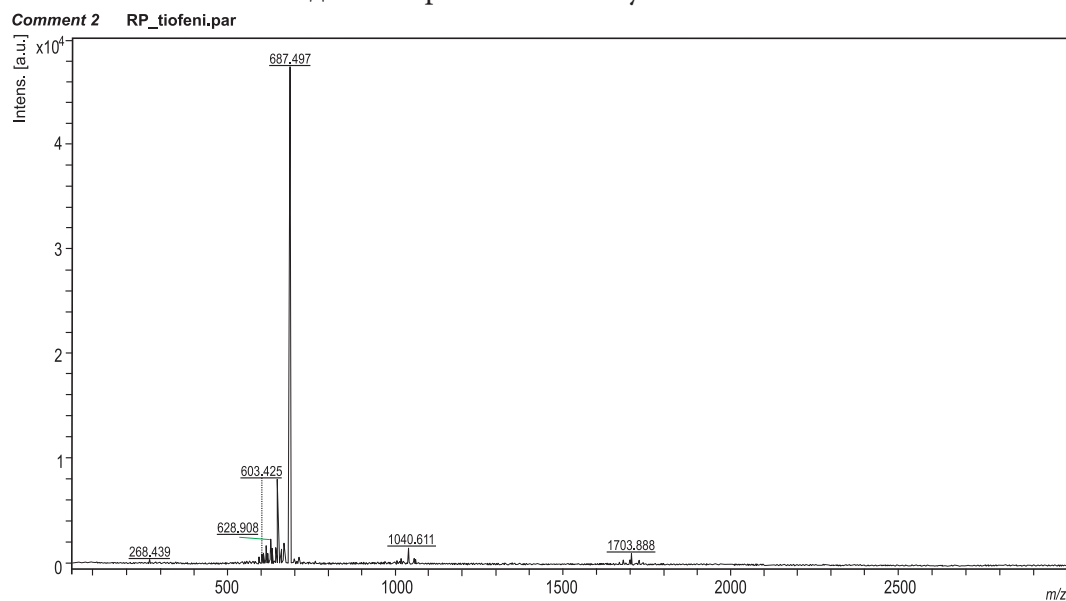
Comment 1 10-4M
Comment 2 RP_tiofeni.par



Слика 102. maLDI спектар раствора $C_{Al}:C_{Cipro} = 1:3$, рН=5,10, различите концентрације компонената

На Слици 102 приказани су maLDI спектри ципрофлоксацина и алуминијума чије се концентрације компонената међусобно разликују за по 10 пута. Запажа се да при концентрацији компоненте 10^{-6} mol/dm^3 релативни интензитети врста 687,44 ($0,5 \times 10^4$ а.у.) и 1050,50 ($0,10 \times 10^4$ а.у.), што је знатно ниже од ових врста формираних при концентрацијама

компоненти 10^{-5} и 10^{-4} mol/dm³. Више концентрације воде до формирања комплексних врста са јачим везама метал-лиганд и веће релативне заступљености.



Слика 103. maLDI спектри раствора $C_{Al}:C_{Cipro}=1:3$, pH=4,10, димер

На Слици 103 је приказан maLDI спектар на коме се запажа један интензиван кластер, са центром масе на m/z 687,49. Пошто овај сигнал постоји и у ESI спектру сматра се да је његова појава у maLDI спектрима егзактна потврда његовог постојања у раствору ципрофлоксацина и алуминијума. Сигнали на m/z 1040,81 и 1703,88 су нижег релативног интензитета.

4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

Проучавање равнотежа у растворима Al(III)-јона и флуорохинолона је отежано услед појаве хидролизе Al(III)-јона. Хидролиза знатно отежава карактеризацију појединих врста насталих у току комплексирања. Стога је хидролиза алуминијума проучавана у истим експерименталним условима као и реакције комплексирања. У оквиру ове дисертације извршена су испитивања хидролизе Al(III)-јона применом ESI MS спектрометрије, као и параметара који утичу на хидролизу алуминијума. Испитивање су спроведена са циљем да се нађе што реалнији модел процеса хидролизе, јер се по литератури срећу два контрадикторна модела [81, 113, 108-110]. У том циљу су варирани инструментални параметри код ESI MS технике и услови експеримента да би се што боље процениле реалне врсте у хидролизованом раствору.

Затим је испитивано комплексирања у системима Al(III)-јон-флероксацин, Al(III)-јон-моксифлоксацин и Al(III)-јон-ципрофлорксацин ESI MS спектрометријом, у циљу специјационе анализе. Фрагментациони производи су одређени тандем масеном спектрометријом (испитивање интеракције алуминијума са HQ лигандима). Реакције полимеризације при комплексирању алуминијума и флуорохинолонских лиганда су изучаване mLDI спектрометријом. Проучавани су и утицаји услова јонизације на пертурбације равнотежа у раствору. Пертурбације у растворима су равнотежни помераји у капљицама и јављају се услед промена рН вредности, концентрације, температуре, промене јонске јачине у капљицама у току испаравања. Пертурбације се могу јавити осим у раствору, на граници течно-гас и у гасној фази. У литератури постоје подаци да се варирањем инструменталних параметара могу оптимизовати пертурбације.[12, 111] Стога се експериментални услови морају тако изабрати да процеси небулизације и десолватације не поремете равнотежне услове. Добијени масени спектри су тумачени на основу m/z вредности и изотопских pattern-а.

4.1. Проучавање хидролизе Al(III)-јона масеном спектрометријом

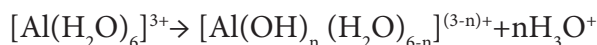
За изучавање хидролизе $AlCl_3$ масеном спектрометријом припремљена је серија раствори у опсегу рН 3,0-5,0 различитих концентрација алуминијумовог јона. Добијени спектри су приказани у Експерименталном делу Сликe 18-26.

Табела 16: Идентификоване врсте у раствору $AlCl_3$, концентрације $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, при различитим рН вредностима: 3,192; 3,594; 4,814

Из спектра m/z	Теоријски m/z	Идентификоване врсте	рН	Значај
57,35	57,02	$[Al(H_2O)_6]^{3+}$	3,594–4,814	
60,52	60,98	$[Al(OH)_2]^+$	3,192–4,814	
69,84	69,97	$[Al_2(OH)_2Cl]^{2+}$	3,192–4,814	хлоро врсте
78,58	78,95	$[Al(OH)Cl]^+$	3,192–4,814	хлоро врсте
96,65	96,91	$[AlCl_2]^+$	3,192–4,814	
102,93	102,95	$[Al_2O_2(OH)]^+$	3,594	
120,78	120,96	$[Al_2O_2(OH)(H_2O)]^+$	3,192–4,814	
122,69	122,98	$[Al_2(OH)_3(H_2O)]^+$	3,192–4,814	
132,86	132,88	$[AlCl_3 + H^+]^+$	3,192–4,814	молекулски пик
156,83	156,94	$[Al_2(OH)_4Cl]^+$	3,192–4,814	хлоро врсте
174,83	174,99	$[Al_2H_9O_7]^+$	3,192–3,594	
216,81	216,87	$Al_3O_2(OH)_2Cl_2$	3,594–4,814	Олигомер хлоро врсте
234,88	234,97	$[Al_3O_4(H_2O)_5]^+$	3,594	
(251,99)	252,89	$[Al_3(OH)_6Cl_2]^+$	3,192–4,814	Полинуклеарне хлоро врсте
252,83	276,85	$[Al_4O_3(OH)_3Cl_2]^+$	3,594–4,814	Полинуклеарне хлоро врсте
276,80	366,82	$[Al_4(OH)_7Cl_4]^+$	3,594–4,814	Полинуклеарне хлоро врсте
(364,87)				
366,85				

У Табели 16 су приказане идентификоване врсте формиране у растворима у којима су

вариране рН вредности (3,192; 3,594; 4,814) за фиксну концентрацију алуминијума $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. Идентификоване су мономерне врсте: m/z 57,35 асигнирана као $[\text{Al}(\text{OH})_2]^{3+}$, m/z 60,52 асигнирана као дихидрокси комплексна $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ врста. Осим мономера идентификоване су и мање полимерне врсте: димери, тримери, тетрамери (Al_2 , Al_3 и Al_4). Пошто је Al^{3+} аква јон присутан у свим растворима, до формирања мононуклеарних Al-OH врста може доћи у гасној фази, процесом редукције наелектрисања у току дехидратације:



Идентификоване су и хлоро врсте: m/z 78,58; асигнирана као $[\text{Al}(\text{OH})\text{Cl}]^+$; m/z 96,65 асигнирана као $[\text{AlCl}_2]^+$ и полинуклеарне хлоро врсте: за m/z 276,80 означена као $[\text{Al}_4\text{O}_3(\text{OH})_3\text{Cl}_2]^+$; 364,87 означена као $[\text{Al}_4(\text{OH})_7\text{Cl}_4]^+$, чија је заступљеност знатно нижа.

Преовладавају једноструко наелектрисане врсте. Врло интензивни сигнали су у области m/z 60–100. Потичу од мононуклеарних хидрокси комплекса, $[\text{Al}(\text{OH})]^{2+}$ и $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$. Ови комплекси су карактеристични за хидролизоване растворе алуминијума ниских концентрација. Формирају се брзо и реверзибилно.

На рН 3,594 доминантна је дихидрокси врста $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ m/z 60,52.

На рН 3,192 најзаступљенија је хлоро врста $[\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]^{2+}$ m/z 69,84.

Са порастом рН расте однос OH/Al , што доводи појаве полимеризације. До рН 4,8 мономерне и димерне врсте алуминијума хидролизую у мање полимерне врсте (Al_3 - Al_5).

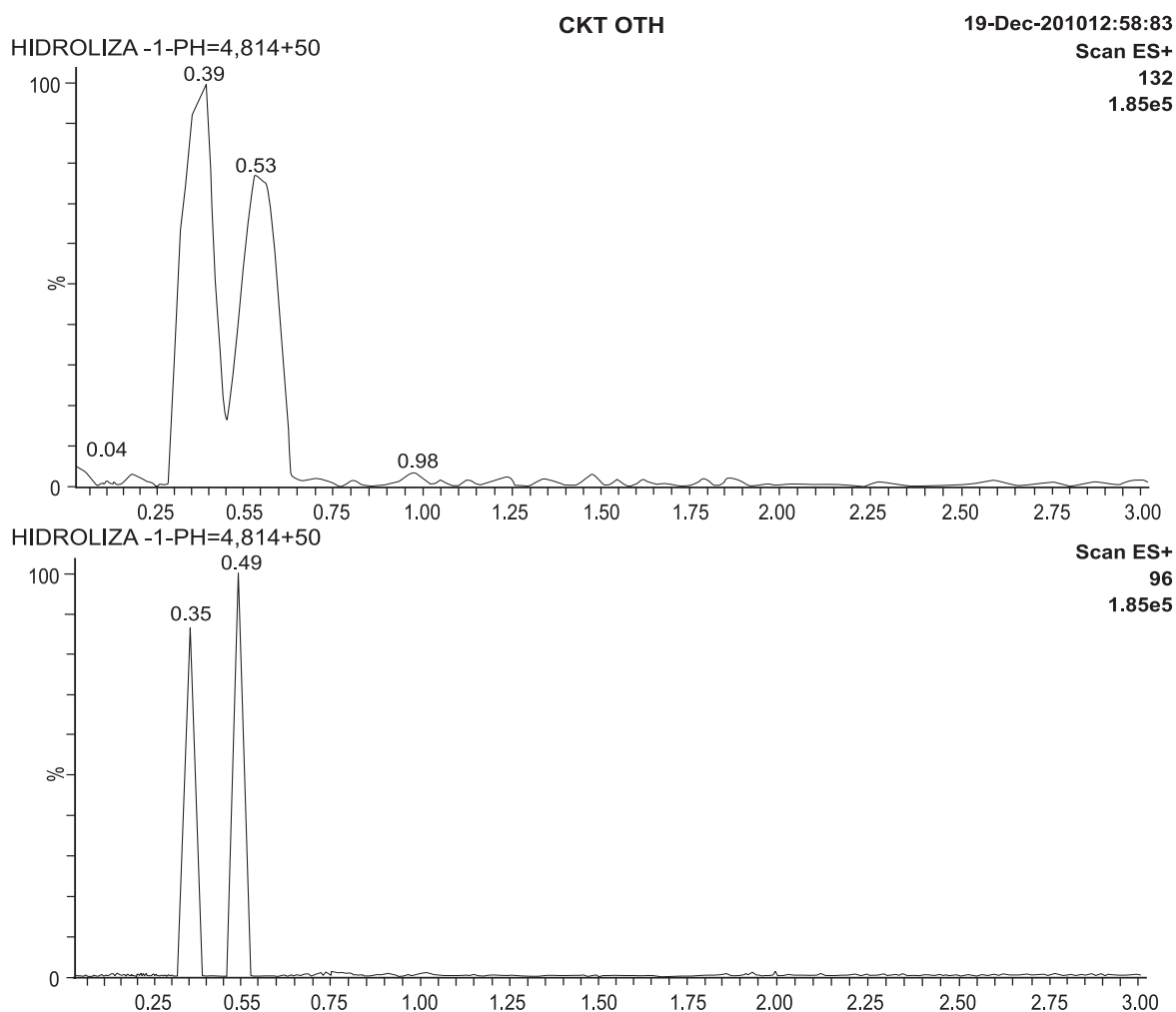
Табела 17: Идентификоване врсте у растворима алуминијума, где су концентрације $0,1-1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ AlCl}_3$, на рН=4,20			
Из спектра m/z	Теоријски m/z	Врсте	Концентрације раствора (mol/dm^3)
60,52	60,98	$[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
69,97	69,97	$[\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]^{2+}$	$1 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$
78,59	78,95	$[\text{Al}(\text{OH})\text{Cl}]^+, [\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
96,65	97,00	$[\text{AlCl}_2]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
132,78	132,88	$[\text{AlCl}_3 + \text{H}^+]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
174,83	174,99	$[\text{Al}_2\text{H}_9\text{O}_7]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
192,47	192,92	$[\text{Al}_7\text{O}_9(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	1×10^{-4}
196,13	195,89	$[\text{Al}_8\text{O}_{11}]^{2+}$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
212,79	212,88	$[\text{Al}_{13}\text{O}_{18}]^{3+}$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
246,89	246,87	$[\text{Al}_5\text{O}_7]^+$	5×10^{-4}
252,83	252,89	$[\text{Al}_3(\text{OH})_6\text{Cl}_2]^+$	5×10^{-4}
328,83	328,83	$[\text{Al}_{13}\text{O}_{18}(\text{OH})]^{2+}$	5×10^{-4}
330,70	330,89	$[\text{Al}_{11}\text{O}_{11}(\text{OH})_9(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	$1 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$
366,71	366,82	$[\text{Al}_4(\text{OH})_7\text{Cl}_4]^+$	$5 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$
494,52	492,73	$[\text{Al}_7\text{O}_6(\text{OH})_5\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$	$5 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$

Следећа серија испитиваних узорака је припремљена за фиксну рН вредност 4,20, а концентрација алуминијума је варирана од $0,1-1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$. Идентификоване врсте су приказане у Табели 17. У серији где се повећава концентрација AlCl_3 уочавају се средњи полимери (Al_6 - Al_{10}) и већи полимери (Al_{11} - Al_{13}). Под овим условима идентификовани су и тридекамери, Al_{13}^{3+} на m/z 212,8, а Al_{13}^{2+} на око m/z 328,3 што је у складу са резултатима које је Sagarola публиковала [95, 112, 113] Al_{13}^{3+} садржи молекуле воде. Сигнал на m/z 328,83 указује на двовалентну врсту Al_{13}^{2+} и потиче од делимично неутрализованог раствора AlCl_3 .

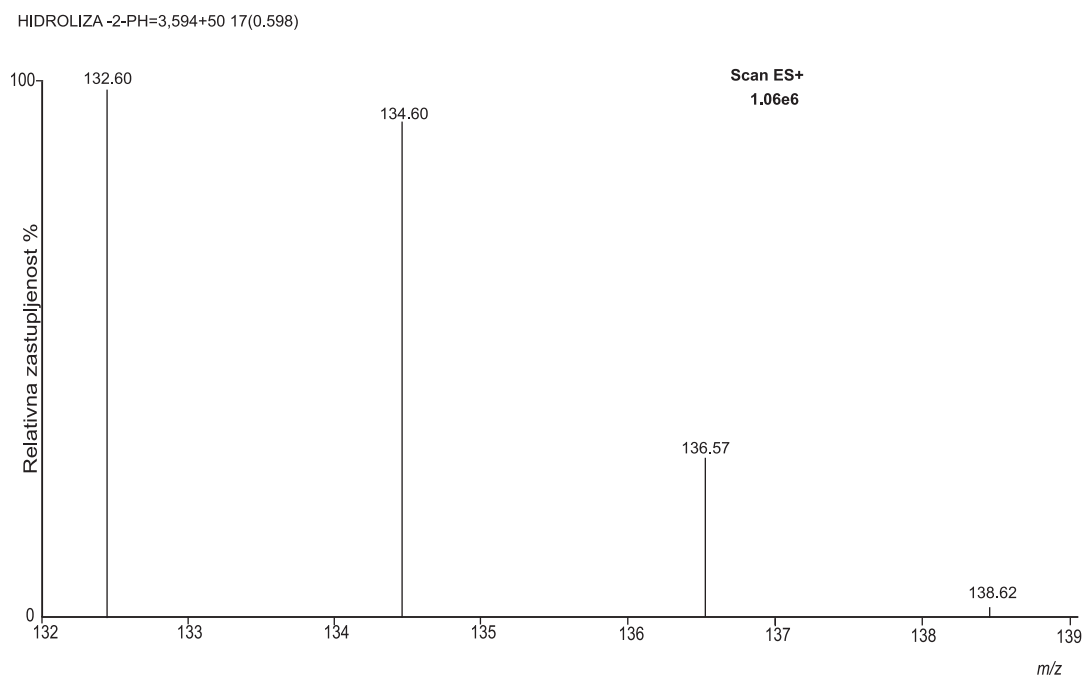
При концентрацији $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ присутна је врста $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ на m/z 78,59. Молекулски јон се асигнира као $[\text{AlCl}_2]^+$ на m/z 96,65. Ова врста као и $[\text{AlCl}_3+\text{H}^+]^+$ на m/z 132,86 нису карактеристичне за раствор и највероватније се формирају у току процеса небулизације. Пошто су ове врсте ниског интензитета у „основном“ спектру, снимљеном у Full scan моду, коришћен је SIM мод за доказ циљаног јона (Слика 104). Када су хлоридни јони координовани за алуминијум, онда се хлор изотопна дистрибуција може користити за идентификацију тих врста, што је приказано на Слици 106.

Термодинамичка равнотежа укључује сложене смеше комплекса који имају различит број терминалних OH^- и Cl^- лиганда. Замена једног или више молекула H_2O или OH^- групе резултује у идентичним m/z вредностима, али различитим дистрибуционим pattern-има. Неправилна (измењена) хлоро изотопска дистрибуција (^{35}Cl и ^{37}Cl) се запажа [114]. Изотопски pattern се мења сходно количини хлорида. Облик изотопског pattern-а указује да ли је сигнал део серије врста у којима су координовани молекули воде или је производ хидроксид хлоридне конкуренције. Серија врста у којима су координовани молекули воде показује симетричну дистрибуцију (облика звона).

ТИС хроматограми хидролитичких раствора дати су у Прилогу ове тезе.



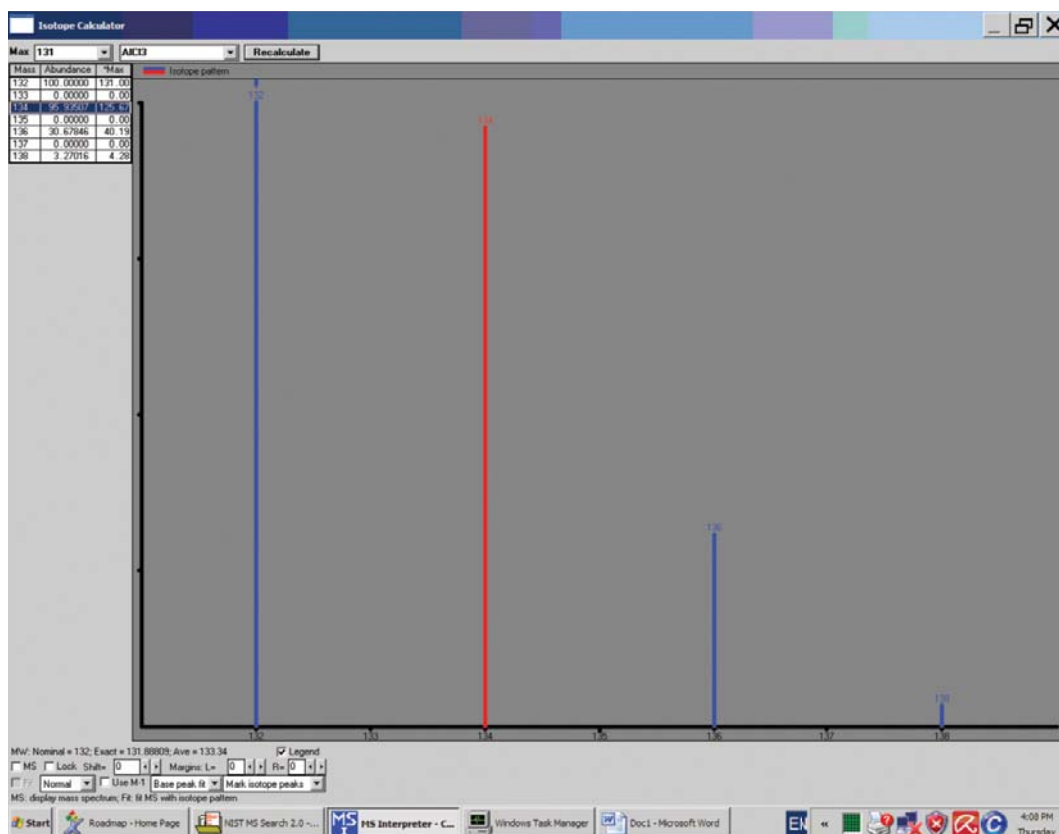
Слика 104. SIM мод за доказ циљаног јона m/z 96 и јона m/z 132



Слика 105. Изотопски pattern јона m/z 132, SIM мод

За јон m/z 132,60 јона детектован је изотопски pattern у спектру (Слика 105)

Исти pattern се и теоријски може потврдити коришћењем изотопског калкулатора у softweru „Xcalibur“ (Слика 106).



Слика 106. Изотопски pattern јона m/z 132, добијен коришћењем softwera Xcalibur

Присуство атома хлора доводи до појаве $M+2$ пика у спектру. Присуство два атома хлора доводи до појаве $M+4$ пика. Молекулски јон пика $M+$ и $M+2$ може садржати атоме

хлора с тим што атоми хлора могу бити у облику изотопа ^{35}Cl и ^{37}Cl . Линије у спектру у области молекулског јона у случају алуминијум хлорида јављају се на различитим m/z вредностима 132, 134, 136, 138, (Слика 105) јер су могуће различите комбинације изотопа хлора. Алуминијум има један изотоп релативне заступљености 100 % чија је маса 27. Могуће комбинације у AlCl_3 једињењу чији изотопски pattern тумачимо су:

$$27 + 35 + 35 + 35 = 132$$

$$27 + 35 + 35 + 37 = 134$$

$$27 + 35 + 37 + 37 = 136$$

$$27 + 37 + 37 + 37 = 138$$

Висине пикова хлора су у међусобном односу 3:1 што значи да хлор садржи три пута више ^{35}Cl изотопа него ^{37}Cl изотопа. Ово указује да три пута има више молекула који садрже лакши изотоп него тежи изотоп хлора. У овом случају у области молекулског јона постоје четири линије (M , $M+2$, $M+4$, $M+6$) са размаком од m/z 2 и једињење садржи три атома хлора који стоје у међусобном односу 1:6:9.

При концентрацији $5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ најзаступљеније су олигомерне врсте на m/z 60,52; 78,59. Полимерна врста m/z 212,79 је асигнирана као $[\text{Al}_{13}\text{O}_{18}]^{3+}$. Полимерне врсте са језгрима од Al_8 до Al_{13} су вишеструко наелектрисане +2,+3. При концентрацији 5×10^{-4} и $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ идентификује се полинуклеарна хлоро врста на m/z 366,71. Хлоро комплекси могу да формирају метастабилне јонске парове од позитивно наелектрисаних врста Al-OH и хлоридног анјона у току ESI небулизације.

При концентрацији алуминијума $10 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ у спектру доминирају врсте: m/z 60,52 асигнирана као $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ и врста m/z 78,58 асигнирана као хлоро врста $[\text{Al}(\text{OH})\text{Cl}]^+$. Врста на m/z 494,50 је полинуклеарна хлоро врста асигнирана као $[\text{Al}_7\text{O}_6(\text{OH})_5\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$. Полимерне врсте се јављају као хидратисане или хлоро врсте [115].

Са старењем раствора број врста у спектру се знатно смањује [116]. На спектру раствора $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ AlCl}_3$ на $\text{pH}=3,30$, након месец дана старења (Слика 26) види се само неколико врста у спектру које потичу од: $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$, $[\text{Al}_6(\text{OH})_{13}]^{5+}$ и $[\text{Al}_4(\text{OH})_9]^{3+}$. Различите хидролитичке шеме се срећу у литератури код изучавања старења раствора алуминијума. Најинтензивнији пик је пик аква јона алуминијума, јер се ради о релативно ниском pH . Остале интензивније врсте припадају тетрамеру и хексамеру и индиција су да и при средње киселим вредностима pH долази до полимеризације у знатној мери.

Испитивани су и ефекти контра јона (хлоридног) те су снимљени спектри раствора у којима је укупна концентрација алуминијум јона $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH}=4,05$ са повишеном концентрацијом хлоридног јона (укупни хлорид= $150 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$), Слика 25. Утицај контра јона у киселим растворима није много уочљив јер је алуминијум јако хидролизован. Утицај контра јона се испитује у негативном моду.

Цео процес испитивања хидролизе ESI MS спектрометријом се састоји од две фазе. У првој фази лакше наелектрисане честице стижу у детектор. У другој фази настају теже честице, већи полимери настали у форми кластера од олигомера с натријумом и хлоридним јоном или молекулима воде. Пренос кластера у гасну фазу је неефикасан тако да се уочавају сигнали ниског интензитета у спектру. Већина комплекса садржи хлоридни јон или као координовани јон или као јонски пар [117]. Једноструко наелектрисане врсте на вишим pH вредностима ($>4,8$) су преовладавајуће. Најинтензивнији сигнали у целом pH опсегу могу се приписати Al_2 – Al_6 језгрима.

Главни проблем при интерпретацији ESI MS спектра је појава је пертурбација. Три врсте пертурбација се могу јавити у ESI извору: у раствору, на граници фаза течност-гас и у

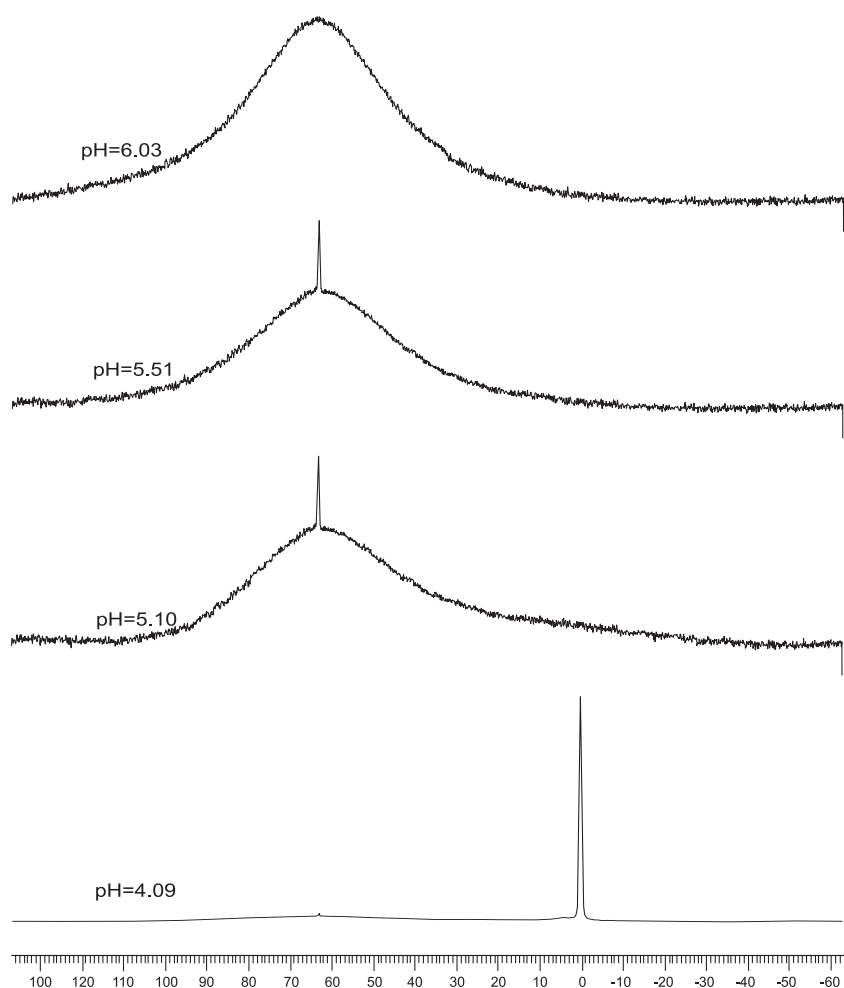
гасној фази [111]. Ове пертурбације могу бити повезане са формирањем хидролитичких полимера у капљици, различитом ефикасношћу преноса из капљице у гасну фазу за различите комплексе (у зависности од односа њиховог радијуса и површинске активности) и парцијално термалног разлагања полимера.

Пертурбације у раствору се дешавају у капљици [12, 119] у току њеног испаравања. Испаравање капљице мења концентрацију растворене врсте и сходно томе проузрокује равнотежне помераје у зависности од рН, концентрације, Т и промена јонске јачине. Пертурбације на граници течно-гас зависе од радијуса капљица и површинске активности јона. Ови параметри утичу на ефикасност којом се различите врсте претварају из капљица у гасну фазу и тако мењају њихову концентрацију. Пертурбације у гасној фази су реакције фрагментације или друге термално проузроковане реакције које се дешавају после трансфера јона у гасну фазу и пре њихове детекције.

Формирање полимерних хидролитичких комплекса може бити последица пертурбација у капљицама када се раствор Al(III)-јона распршује електроспрејом. Било да су полимерне хидролитичке врсте резултат праве равнотеже у раствору или пертурбација у ESI MS извору, могу се проценити поређењем резултата добијених различитим методама и финим подешавањем инструменталних параметара. Коришћени су ниски напони, а анализатор је био квадруполни у експериментима при проучавању хидролизе ESI MS спектрометријом.

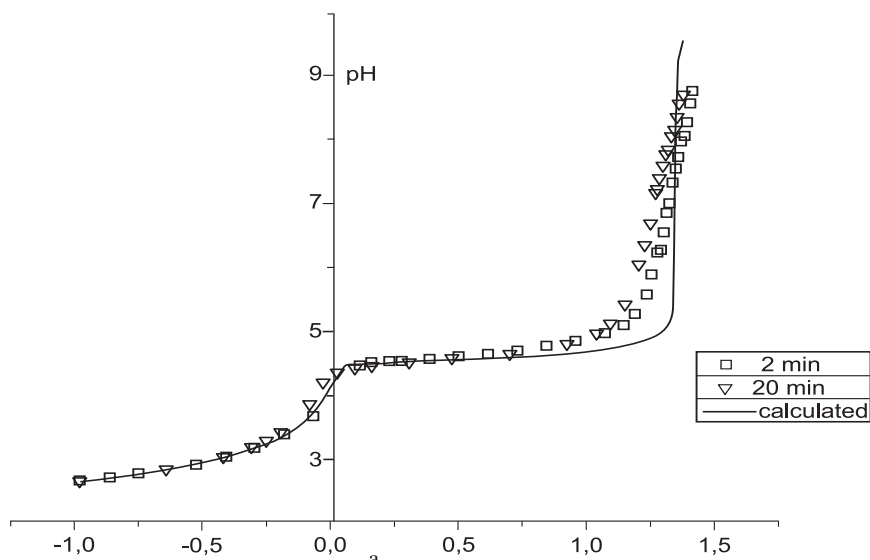
У ESI MS извору сигнал алуминијум хлорида се детектује на m/z 132,78. Овај сигнал ишчезава из раствора на рН вишим од 4,5. Резултат је у складу са резултатима ^{27}Al NMR спектроскопије. ^{27}Al NMR спектри су прикази на Слици 107. Сигнал аква алуминијум јона је на 0 ppm. Мали пик на 0,34 ppm се уочава у рН опсегу од 3 до 5 и приписује се моно хидролизованом врстама $\text{Al}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ формираним у првој фази хидролизе, док се широки пик нижег интензитета јавља на 4,5 ppm, за рН > 4,0 и приписује се врстама мале молекулске масе $\text{Al}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_8^{4+}$ и $\text{Al}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_9^{5+}$. Сходно литературним подацима [120-125] могуће је наћи мономере до 9 ppm. У овим експериментима нису нађени сигнали за однос S/N већи од 3, где је S/N однос сигнала и шума (signal to noise). Виши хидролитички полимери дају веома широке пикове, у области од 10 до 40 ppm при вишим рН вредностима. Тридекамери или полимерне врсте које садрже Al_{13} , $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ идентификоване су на 62,5 ppm. Овај полимер почиње да се јавља на рН око 4,0 и максималан интензитет достиже на рН=5,5. Са порастом рН овај сигнал нестаје и на рН 6,0 нема евидентног NMR сигнала који би указао на формирање лакших полимера. После краћег периода старења уочава се замућење и флокулација.

Међутим, ESI MS указује на формирање Al_3 – Al_8 полимера у овом рН опсегу. То говори да се Keggin-ови полимери [126-130] прво трансформишу у лакше полимере пре таложења. Тридекамер садржи тетраедарски алуминијум окружен са 12 октаедарских алуминијума, где су сви везани преко кисеоника. Тетраедарски алуминијум има јасан оштар пик на 62,5 ppm у односу на мономерни $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Других 12 алуминијума у тридекамеру као и доста аморфних полимерних врста алуминијума даје веома широк пик на око 40 ppm.



Слика 107. ^{27}Al NMR спектри раствора AlCl_3 на различитим рН вредностима, $C_{\text{Al}}=50 \text{ mmol/dm}^3$

Хидролитичке врсте су одређене и потенциометријским титрацијама. Потенциометријске титрације су изведене по две различите процедуре додавања базе. У једном титрационом низу нове порције базе су додаване након 2 минута по стабилизацији потенцијала, брзином од $0,05 \text{ cm}^3/\text{s}$, док је за други титрациони низ база додавана након 20 минута од стабилизације потенцијала, истом брзином [131-136]. Остали титрациони нивои су изведени тако да је за одређене вредности рН додавана база све док читавања потенцијала нису постала стабилна за дужи временски период, уз релативну стандардну девијацију до 3 %. Титрационе криве показују хистерезис у области у којој се титрациони параметар „а“ креће у интервалу између 1,0 и 1,5 (Слика 108). Пуна линија симулира титрацију чији су подаци за логоритам константи стабилности ($\log \beta$) хидролитичких врста приказани у Табели 18. Све до близу вредности 0,2 титрационог параметра раствори остају бистри у дужем временском периоду. Титрационе криве добијене под различитим кинетичким условима поклапају се по вредности „а“ до близу 0,2. При вишим вредностима титрационог параметра „а“, релативно брз додаток базе не даје видљиве промене у раствору и потенцијал остаје стабилан. Међутим, ако се ти раствори оставе сат или више без додатка базе потенцијал постаје нестабилан (релативна стандардна девијација читавања потенцијала већа од 5 %) са благим замућењем раствора. Даље повећање титрационог параметра води до стварања микро-колоидних талоба и када је параметар „а“ око 1 долази до појаве сталног таложена. Широки опсег титрационих кривих обухвата плато и „скок“ рН вредности (Слика 108) што одговара метастабилном стању са главним „скоком“ који указује на формирање растворног $\text{Al}(\text{OH})_3$.



Слика 108. Титрационе криве раствора AlCl_3 добијене на основу две различите титрационе процедуре

Ове врсте касније формирају презасићене растворе и када број центара нуклеуса достигне критичну вредност почиње кондензација формирањем полимера и таложењем. При фитовању ових калибрационих кривих са низом комплекса узетих из базе података (Табела 18.) добија се одличан резултат фитовања за Z (однос хидроксида и алуминијума) до близу 1. При вишим вредностима Z (средњи протонски број) израчунате криве се приближавају експериментално добијеним са спорим додатком базе. Разлике између ESI MS и потенциометријске специјације се уочавају за врсте које се детектују у ESI MS са различитим бројем киселих протона тј. различитим наелектрисањем. Подаци из литературе [111, 137-140] указују на кључну улогу радијуса капљице при одређивању релативног интензитета ESI MS. Радијус може утицати директно на ефективност којом се јони преносе у гасну фазу. Пертурбације у раствору се повећавају са повећањем капљице. С обзиром да прелаз јона у гасну фазу касни, реакције у капљицама се више пута дешавају. У исто време већа вредност радијуса повећава гасно фазну концентрацију површински активних комплекса и смањује површински неактивне комплексе. Поређењем резултата ESI MS, NMR и потенциометријских мерења закључује се да се најбоље слагање [112, 121, 132] добија код хидролитичких врста мале молекулске масе, што је последица чињенице да густина и вискозност у растворима полимеризованог алуминијума расту, што за последицу има пораст површинског напрезања капљице. Зато су више енергије потребне за одвајање врста више молекулске масе из капљице.

Табела 18: Подаци из базе података за хидролитичке комплексе алуминијума	
Врста	$\log \beta$
AlH^{-1}	-5,5
AlH^{-2}	-11,3
$\text{AlH}^{-2}(\text{aq})$	-16,3
AlH^{-3}	-26,96
AlH^{-4}	-43,1
Al_2H^{-5}	-7,7
Al_2H^{-2}	-13,9
Al_3H^{-4}	-63,0
$\text{Al}_3\text{H}^{-11}$	-60,7
$\text{Al}_6\text{H}^{-15}$	-93,0
$\text{Al}_8\text{H}^{-22}$	-106,1
$\text{Al}_{13}\text{H}^{-22}$	-10,3
$\text{AlH}_3(\text{s})$	

Резултати испитивања хидролизе, који су приказани у Табелама 16 и 17 су у складу са литературним подацима [110-112]. Ови резултати указују да је добро слагање са моделом из литературе који су дали Urabe и сарадници [80, 81] примењујући масену спектрометрију на изучавање разблажених алуминијум-хлоридних раствора и нашли су мономере, полимерне позитивно наелектрисане врсте. Други модели који су добијени применом масене спектрометрије на проучавање хидролизе алуминијума (Sagarola и сарадници [112, 113]) указују на врсте које нису у складу са врстама које су нашли Urabe и сарадници. Sagarola [79] је нашла димере, тримере, полимере са наелектрисањима од -2 до $+3$. Резултати приказани у овој тези показују највећу заступљеност хидролитичких врста при $\text{pH}=4,0$, мономерних и димерних врста, док су тримери и терамери заступљени у нешто мањем проценту.

4.2. Проучавање комплексирања масеном спектрометријом

Предмет испитивања ове дисертације је биодистрибуције HQ у присуству лекова на бази алуминијума (антациди, вакцине, дијализатни раствори) у људском организму. Алуминијум се лако везује са HQ *in vitro* као и *in vivo*. Захваљујући чињеници да постоје различити облици флуорохинолона (катјонски, zwitter-јонски, неутрални, анјонски) при различитим pH вредностима разни облици комплекса могу настати.

Анјонски облик испитиваних флуорохинолона (флероксацина, ципрофлоксацина, моксифлоксацина) означава се са Q^- , диполни јон са HQ^\pm , а катјонски са H_2Q^+ . Равнотеже у воденим растворима флуорохинолона се представљају схематски (Схема 2).

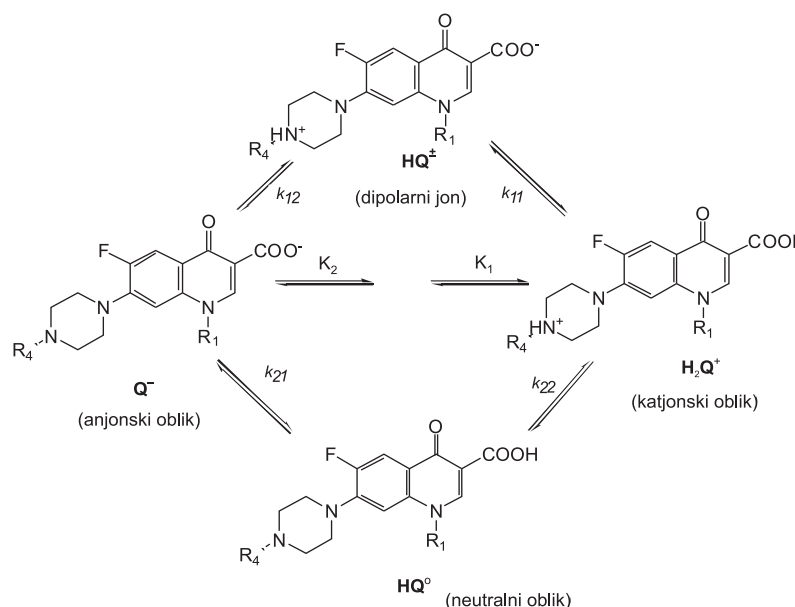
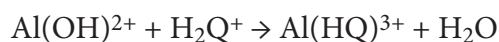


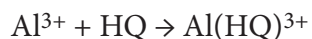
Схема 2: Равнотеже у воденим растворима флуорохинолона

где су k_{11} , k_{12} , k_{21} , k_{22} микорконстанте, а K_1 и K_2 макорконстанте [48, 49] дисоцијације флуорованих хинолона, чије су вредности приказане у Табели 4. Код свих хинолона киселе особине амонијум групе мање су изражене него киселе особине карбоксилне групе. То је последица стабилизације $-\text{COO}^-$ групе $+R$ ефектом.

Анализа експерименталних података показује да на нижим pH вредностима доминантни комплекс у Al(III) -хинолонским растворима је протонвана врста Al(HQ)^{3+} . Узимајући у обзир pH интервал у коме се он формира, може се претпоставити да се његово настајање одвија према реакцији:



Изоелектрична тачка флуорохинолона је на рН око 7,5 тако да на рН вредностима нижим од 5 флуорохинолони егзистирају у катјонској форми. Реактивна алуминијумова врста на рН између 3,0 и 3,6 је монохидроксо комплекс $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ тако да је горња реакција много вероватнија од оне у којој аква-алуминијум реагује са неутралним флуорохинолоном:



Са порастом рН, $\text{Al}(\text{HQ})$ комплекс почиње да хидролизује до $\text{Al}(\text{Q})$ комплекса који са наредним повећањем рН подлеже даљем сукцесивном депротонавању. У $\text{Al}(\text{Q})$ комплексу 3-карбоксилна и 4-карбонилна група су укључене у координацију као последица високог афинитета алуминијума према кисеонику.

У сврху реализације постављених циљева снимано је више серија раствора у којима су вариране рН вредности и концентрациони односи алуминијума и флуорохинолона масено-спектрометријским техникама. Карактеристике комплекса метал лиганд и специјација зависе од рН, [141] јер комплекси мењају своје стање протонавања и наелектрисања са променом рН (показују или кисела или базна својства).

Одређивање специјације у растворима извршено је недвосмисленом асигнацијом сигнала у ESI MS спектрима на основу односа масе и наелектрисања, изотопске дистрибуције и расподеле наелектрисања. Тандем масена спектрометрија (MS/MS спектри) омогућила је одређивање структуре формираних комплекса преко фрагментационих путања. MALDI спектрометрија је омогућила разматрање полимеризације (детектовани димерни комплекси).

4.2.1. Систем алуминијум-флероксацин

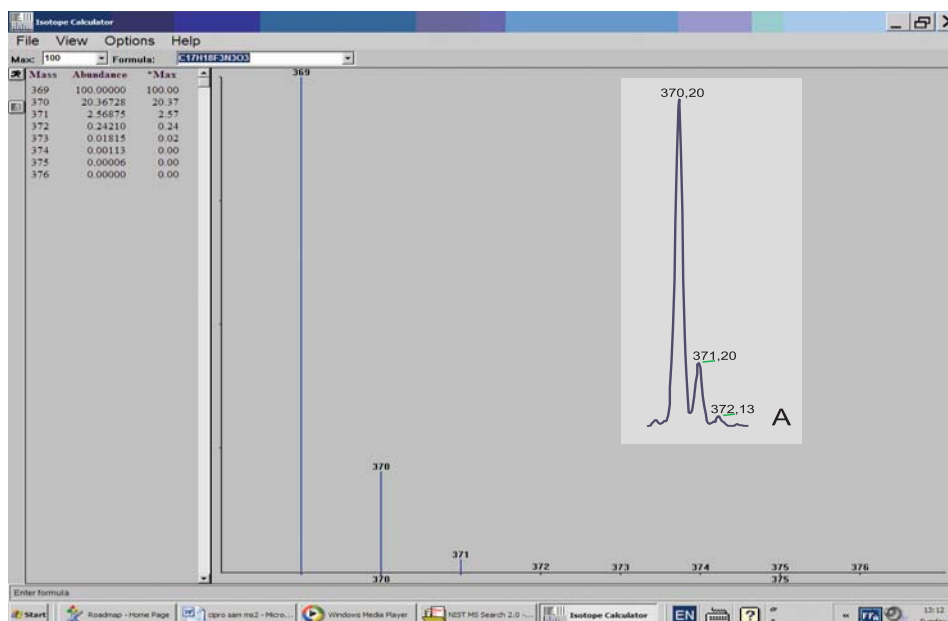
Најпре су снимљени и анализирани ESI MS спектри раствора: флероксацина у позитивном и негативном моду, након тога раствора алуминијума и флероксацина. Затим је примењена MALDI спектрометрија и коначно тандем масена спектрометрија са циљем дешифровања путева фрагментације.

У Табели 19. су приказане врсте идентификоване у раствору флероксацина снимљеног у позитивном моду.

Молекулска формула флероксацина је $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, а $M_r=369,34$

Табела 19. Идентификоване врсте у раствору флероксацина, $C_L = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, рН=4,26, позитиван мод		
m/z из спектра	m/z теоријски	Идентификовани јони
370,07	370,20	$[\text{L} + 2\text{H}^+]^+$
326,27	326,30	$[\text{L} + 2\text{H}^+ - \text{CO}_2]^+$
269,13	269,28	$[\text{L} + 2\text{H}^+ - \text{C}_3\text{H}_{11}\text{N}_2]^+$

Протонавањем флероксацина настаје молекулски јон на m/z 370,07. Друге две врсте веће заступљености настају: декарбоксилацијом (врста на m/z 326,27) и губитком пиперазил групе (врста на m/z 269,13).



Слика 109. Изотопски pattern флероксацина

На Слици 109 приказан је изотопски pattern молекула флероксацина, добијен коришћењем softwera Xcalibur. На исечку „А“ приказан је изотопски pattern протонваног флероксацина, експериментално добијен. Оба изотопска pattern-а су у доброј сагласности као и релативне заступљености јона који чине област молекулског јона (370, 371, 372 и 373).

У Табели 20 су приказане врсте идентификоване у раствору флероксацина снимљеног у негативном моду.

Табела 20. Идентификоване врсте у раствору флероксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ pH=4,26, негативан мод		
m/z из спектра	m/z теоријски	Идентификовани јони
368,00	368,09	$[L]^-$
348,07	348,12	$[L-HF]^-$
324,07	324,19	$[L-CO_2]^-$
304,20	304,29	$[L-CO_2-HF]^-$
278,20	278,10	$[L-CO_2-HF-C_2H_5]^-$

У негативном моду се детектује више врста, него у позитивном. Молекулски јон је на m/z 368,00. Врста на m/z 348,12 настаје губитком флуороводоника. Остале врсте (324,07, 304,20) настају губитком угљен-диоксида или губитком и флуороводоника и угљен-диоксида, док врста на m/z 278,20 у току фрагментације губи још и етин.

4.2.1.1. Проучавање комлексација алуминијума и флероксацина ESI MS селективном методом

Идентификација јонских врста које потичу од најинтензивнијих сигнала урађена је на основу њихових m/z вредности и изотопских pattern-а. Zoom scanom је потврђено charge state сваког јона посебно. Најзаступљенији јони су једноструко, двоструко или троструко наелектрисани.

И у основним спектрима се детектује фрагментација, иако су спектри снимани при ниским напонима на конусу. Фрагментација и анализа продукт јона врло су важни за идентификацију јона у спектру. У Табели 21 су приказане најзаступљеније врсте из спектра. Најчешћи је губитак CO_2 , губитак HF [88]. Губитак CO_2 је врло карактеристичан у фрагментационим путањама базираним на подацима из ESI MS и MALDI металних комплекса са малим молекулима. Губитци H_2O се не региструју, већ напротив имамо везивање

молекула H_2O са датим јонима што је у потпуности у складу са литературним подацима при проучавању сродних система. [88, 143, 147]. Ово је последица присуства малих количина воде у јон трапу које је тешко уклонити. Губитак CO_2 проузрокује цепање везе између $Al(III)$ -јона и карбоксилног кисеоника из лиганда. Губитак CO_2 из координованог молекула флероксацина је иреверзибилан процес, док је губитак молекула H_2O реверзибилан процес под одређеним експерименталним условима.

Експериментални резултати показују да се у испитиваним растворима и ESI MS и MALDI MS техником идентификују бинарни комплекси у молском односу алуминијум :ципрофлоксацин од 2:1 до 3:1, алуминијум: моксифлоксацин од 2:1 до 3:1, алуминијум: флероксацин од 2:1 до 3:1, што је у складу са литературним подацима добијеним на сродним системима [144, 146, 149]. Проучавањем интеракција између норфлоксацина и јона Al , Mg и Ca нађено је да норфлоксацин и алуминијум формирају бинарне комплексе у молском односу алуминијум: норфлоксацин од 2:1 до 3:1.

И резултати Riley и Ross [61], који су проучавали комплексирање јона Al , Mg и Fe са ломефлоксацином FAB MS техником су у складу са резултатима добијеним у овој дисертацији. Ови аутори су нашли да се комплекси формирају при молском односу лиганд:метал од 2:1 и 3:1.

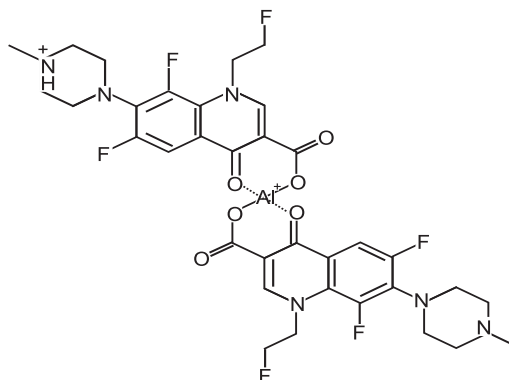
Комплекси цiproфлоксацина [56, 60], са јонима Ca , Co , Ni , Cu , Zn , Al и Fe су проучавани у раствору потенциометријским и спектроскопским техникама при чему су нађени различити протонисани комплекси. Јони гвожђа и алуминијума формирају комплексе при молском односу лиганд:метал од 3:1. Интеракције норфлоксацина са дивалентним и тривалентним катјонима су испитиване потенциометријским титрацијама [144].

Порастом рН са 2,5 на 4,5 појава нових пикова указује на стварање нових комплекса, хидролитичких. Додатак $Al(III)$ -јона у раствор флуорохинолона индукује велике промене у MS спектрима. Сигнал слободног лиганда још увек је присутан. Јављају се нови сигнали како се рН и концентрација $Al(III)$ -јона повећавају.

Комплексирање је најочљивије на спектрима када је лиганд у вишку или ако је метал у вишку и то за рН=4,96. Доминати комплекс је m/z 763, коме одговара структура AlL_2^+ . Сличне структуре је и комплекс m/z 719.

Међусобни однос релативне заступљености (релативни интензитет) i_{763}/i_{719} је сличан односу i_{370}/i_{326} , што указује на сличне константе комплексирања за L и $L-CO_2$ врсте [111, 119].

Бинарни комплекс детектован на m/z 763 је врста доминантна у растворима у широком опсегу рН и за широк концентрациони опсег $C_{Al}:C_{Flero}$. Врста AlL_2 настаје координацијом једног металног јона са два јона лиганда, Слика 110.



Слика 110. Могућа структура комплекса типа AlL_2 у систему Al -флероксацин

У масеним спектрима се детектује као најзаступљенија врста. С обзиром на зависност интензитета сигнала од рН овај комплекс се формира у раствору највероватније према следећој реакцији: $AlL_2^+ + L^- = AlL_2^+$. Врста на m/z 719,27 такође настаје координацијом једног металног јона са два јона лиганда и губитком CO_2 молекула. Врста на m/z 382,20 је двоструко наелектрисани

јон где је један метални јон координован са два лиганда, а врста на m/z 255,20 настаје везивањем два лиганда за један метални јон и троструко је наелектрисана.

Врсте на m/z (255,20 и 382,27) показују у Zoom scan-у разлике $\Delta=0,3$ и $\Delta=0,5$ респективно, из чега следи да им је наелектрисање +3 и +2, (Слике 52 и 53) у Експерименталном делу.

Ове врсте се могу представити као $[Al(HL)L]^{2+}$ и $[Al(HL)]^{3+}$. Са порастом рН вредности врста $[Al(HL)]^{3+}$ реагује са депротониваним обликом лиганда градећи $[Al(HL)L]^{2+}$ Протонивани комплекс је нађен и потенциометријски у растворима алуминијума и флероксацина, из чега следи да ова врста заиста постоји у раствору.

Врста на m/z 203,60 настаје везивањем једног лиганда за метални јон, три молекула воде и губитком једног CO_2 молекула.

Табела 21. Идентификоване врсте у растворима Al(III)-јона и флероксацина, $C_{Al}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, ESI MS спектрометријом

m/z теоријски	m/z експериментално	Идентификовани јони	Врсте у равнотежи које највероватније дају ESI-MS јоне	ZOOM scan
193,56	193,52	$[Al^{3+} + L + 2H_2O - CO_2]^{2+}$	AlL^{2+}	
202,67	203,53	$[Al^{3+} + L + 3H_2O - CO_2]^{2+}$	AlL^{2+}	
255,20	255,20	$[Al^{3+} + 2L + 2H^+]^{3+}$	AlL_2^{3+}	наелектрисање +3
326,10	326,27	$[L + 2H^+ - CO_2]^+$	Слободан лиганд	наелектрисање +1
370,32	370,20	$[L + 2H^+]^+$	Слободан лиганд	
382,30	382,27	$[Al^{3+} + 2L + H^+]^{2+}$	AlL^{2+}	наелектрисање +2
719,62	719,33	$[Al^{3+} + 2L - CO_2]^+$	AlL_2^+	
763,23	763,27	$[Al^{3+} + 2L]^+$	AlL_2^+	наелектрисање +1

На Слици 33 је спектар раствора концентрационог односа $C_{Al}:C_{Flero}=1:3$, рН= 4,03, снимљен у негативном моду где се идентификују хидролитичке врсте m/z 311,07 $[Al_4H_8O_{10}Cl]^-$ тетрамерна хидролитичка врста и 346,80 $[Al_4H_{12}O_{12}Cl]^-$ тетрамерна врста, 286,93 $[Al_3H_{11}O_{10}Cl]^-$ тримерна хидролитичка врста и 251,07 која потиче од $[Al_3(OH)_{10}]^-$ врсте.

Ове врсте су карактеристичне и за остале спектре снимљене у негативном моду, што указује да паралелно са комплексирањем при ови експерименталним условима се дешава и хидролиза.

4.2.1.2. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и флероксацина таLDI сикхрометријом

Сви таLDI спектри су снимљени на подлози без коришћења матрице како би се избегле могуће интерференце алита са матрицом. Генерално говорећи таLDI спектри су врло једнозначни и једноставни за тумачење. Изузев периодичне појаве метастабилних јона сви остали јони су јони који указују на формирање комплексних врста. Ови спектри дају податак колико има % које врсте на основу њихових релативних интензитета (заступљености).

Прва група врста која се идентификују при нижим m/z у таLDI спектрима је идентична, са онима добијеним у ESI MS спектрима (m/z 763,50). То је егзактна потврда постојања тих комплексних врста у испитиваним растворима. Другу групу врста чине врсте за m/z преко 1000, полинуклеарне комплексне врсте, којима су „пришли“ јони Na^+ и K^+ . Врста на 1170,59 је адуктни јон који се формира између K^+ јона и AlL_3 комплекса. Врста на 1154,61 је адуктни јон који се формира између Na^+ јона и AlL_3 комплекса. Врста на m/z 1894,77 је највероватније кластер који потиче од два Al(III)-јона и пет депротониваних лиганда, што је у складу са резултатима публикованим од стране V. Di Marco и сардника, али применом ESI јонизације [111]. Појава ове врсте у таLDI спектру се објашњава формирањем кластера дејством ласера на подлогу са узорком. Са аспекта координационе хемије мало је вероватно да се два алуминијума вежу са 5 лиганда. Ова врста највероватније настаје тако што димено језгро Al_2L_2 формира у раствору, а кластери са више депротониваних лиганда настају у гасној фази

Сходно „кластер“ моделу предложеном од стране Караса и сарданика [17, 18] кластери садрже јоне произведене у чврстом стању. При испаравању из кластера се ослобађају јони. Протоноване врсте се лако стварају ласерским зрачењем.

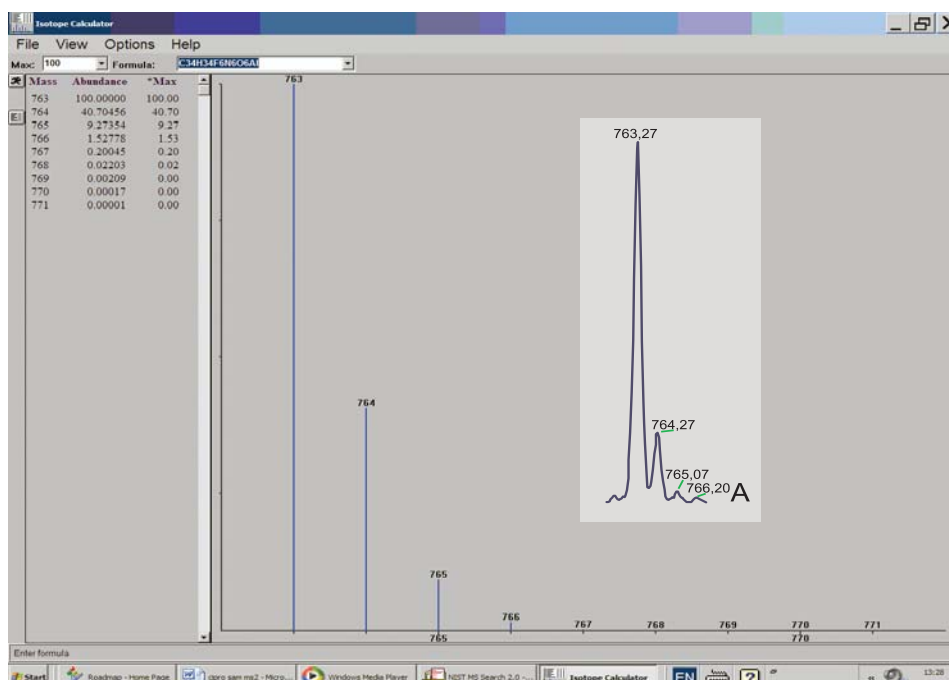
У Табели 22 приказане су најобилније врсте идентификоване у maLDI спектрима, при различитим концентрацијама и рН вредностима.

Табела 22: Идентификоване врсте у растворима Al(III)-јона и флероксацина = 1:3, концентрација 10^{-4} mol/dm^3 , рН 3,85–5,50, maLDI спектрометријом

maLDI m/z из спектра 1:3, рН=3,85	maLDI m/z из спектра 1:3, рН =4,50	maLDI m/z из спектра 1:3, рН =5,50	врсте	maLDI- флероксацин, 30:70 метанол: вода	подлога
					268,458 врло јак
			Слободни лиганд	370,421	365,643
					686,94
763,232	763,501	763,508	AlL_2^+		
1154,610	1154,620	1154,618	AlL_3Na^+		
1170,593	1170,582	1170,582	AlL_3K^+		
1190,591			н.и.		
1894,777			Al_2L_5		

н.и. - није идентификовано

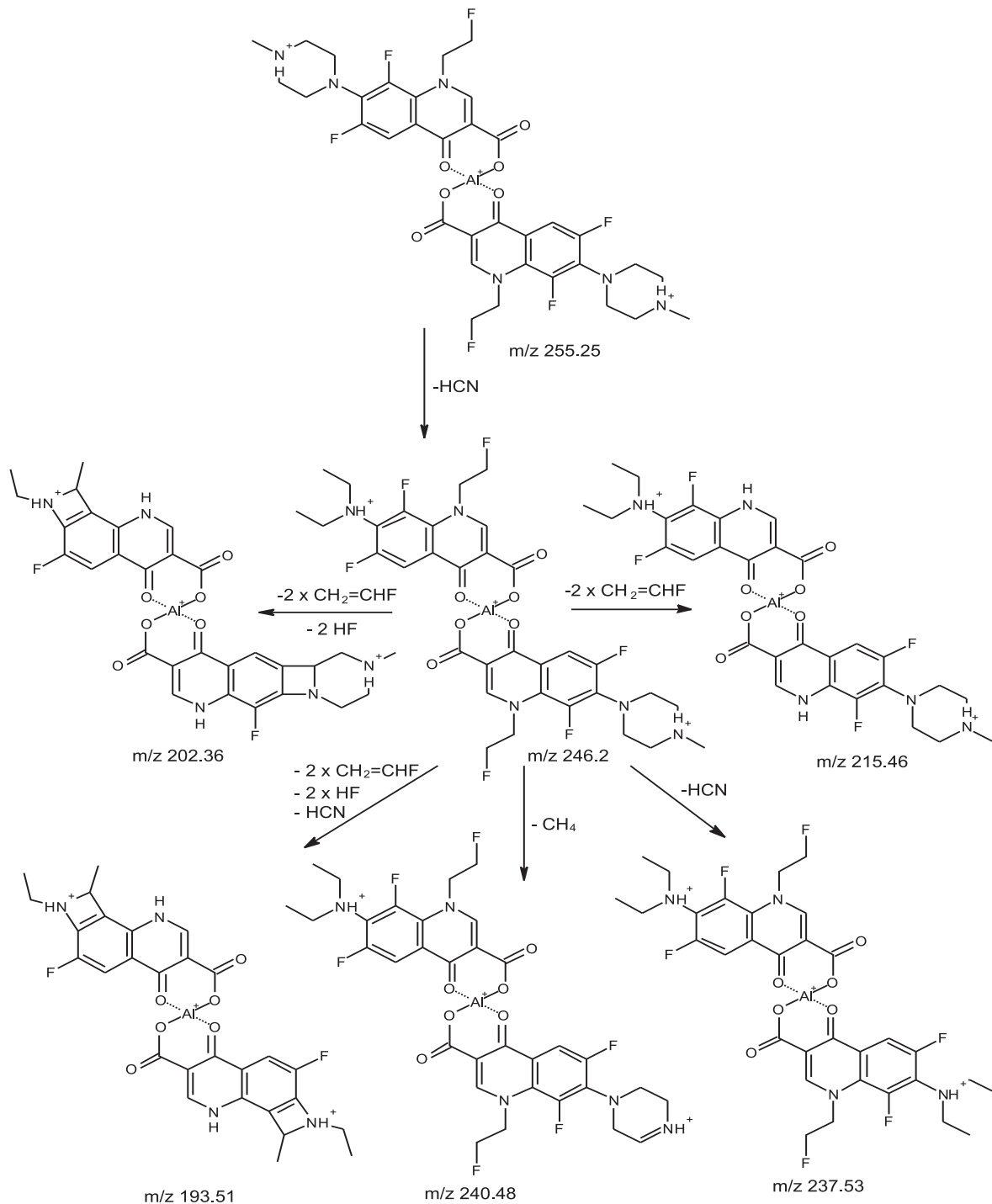
Коришћењем softwera Xcalibur добијен је изотопски pattern флероксацина и неких врста формираних у растворима алуминијума и флероксацина, што је значајно за идентификацију врста. Линије у области молекулског јона се јављају на различитим вредностима m/z (за лиганд 370, 371, 372, 373) за комплекс (763, 764, 765, 766). Карактеристично је да се код лиганда и комплекса јавља M+1 пик који потиче од C атома. Ови пикови се међусобно разликују за по 1 m/z јединицу и јављају се надесно од молекулског пика. M+1 пик може потицати од 13 C изотопа или од 12 C изотопа [4] чија је релативна заступљеност 98 % па је међусобни однос ових изотопа 2:98. Остали атоми који улазе у састав атома лиганда или комплекса су изотопи ниске релативне заступљености или стабилни изотопи.



Слика 111. Изотопски pattern јонске врсте AlL_2^+ (m/z 763)

На Слици 111 приказан је изотопски pattern комплекса AlL_2^+ , добијен коришћењем softwera Xcalibur. На исечку „A“ приказан је изотопски pattern комплекса AlL_2^+ , експериментално добијен. Оба изотопска pattern-а су у доброј сагласности као и релативне заступљености јона који чине област молекулског јона (763, 764, 765 и 766).

На Схеми 3 и 4 су приказане фрагментационе путање добијена на основу MS/MS и MS³/MS³ експеримента.



Схеми 3: Фрагментациона путања јона $255 \text{ m/z } Al(LH)_3^+$ из MS² и MS³ експеримента

У првој фази, након примене више колизионе енергије [147-153], на јон 255, 25 (комплекс у коме је један алуминијум везан са два молекула флероксацина) губи се цијановодонична киселина и тако настаје продукт јон на m/z 246,20. Из продукт јона m/z

246,0 у MS² експерименту настају продукт јони m/z 202,36 и то губитком 2 молекула CH₂=CHF (етилен-флуорида) и 2 молекула флуороводоничне киселине HF и продукт јон на m/z 215,46, губитком 2 молекула CH₂=CHF (етилен-флуорида).

У MS³ експерименту из јона m/z 246,20 настају продукт јони: m/z 237,53 губитком цијановодоничне киселине, продукт јон на m/z 240,48 губитком метана (CH₄) и јон на m/z 193,51 који настаје губитком 2 молекула CH₂=CHF (етилен-флуорида), 2 молекула флуороводоничне киселине и једног молекула цијановодоничне киселине HCN.

При губитку малих молекула структура комплекса остаје сачувана, тј. у току MS² и MS³ експеримента нема кидања Al-L веза. Стога се фрагментациона схема може тумачити уз претпоставку да Al(III)-јон остаје хелатиран са оба лиганда.

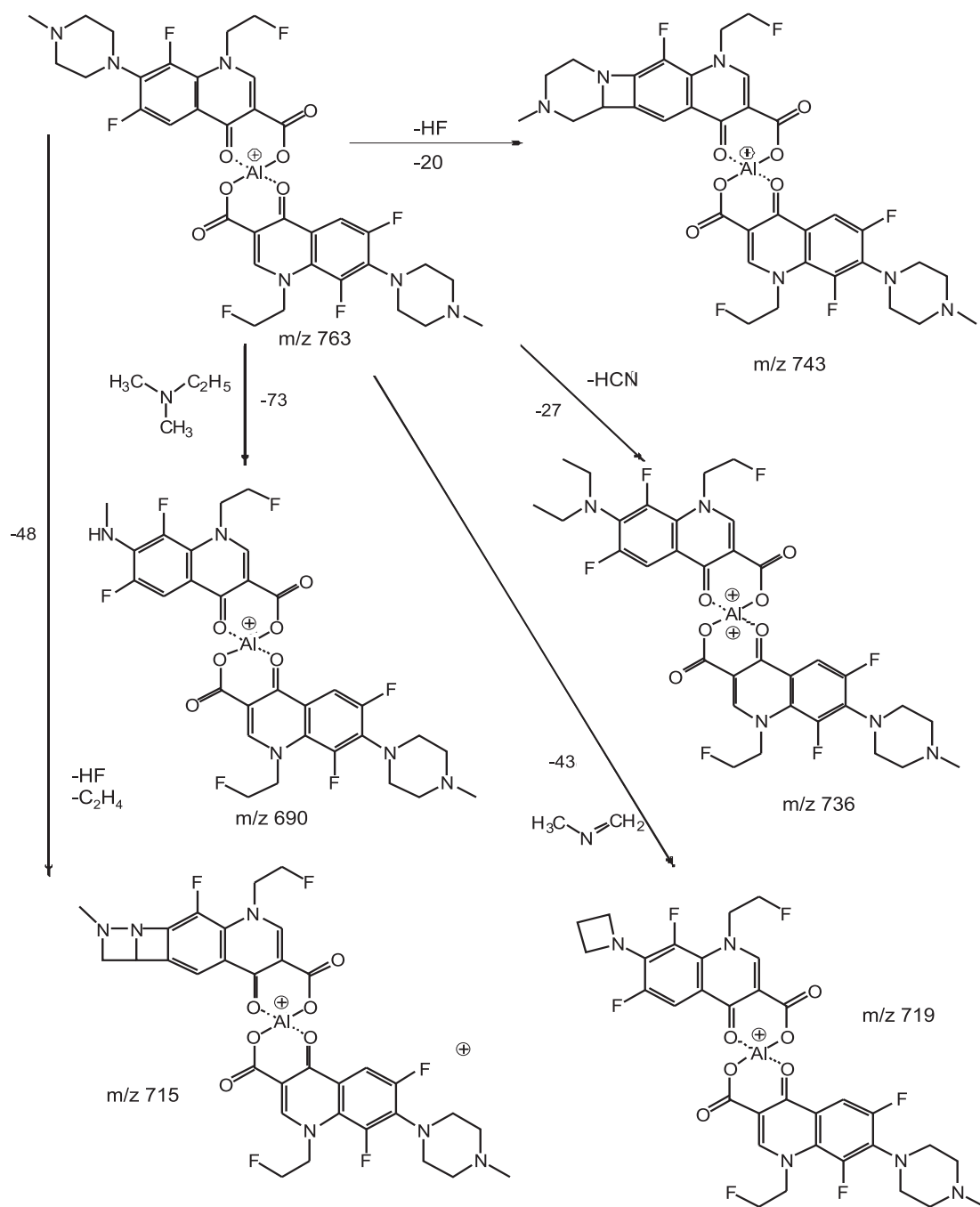


Схема 4: Фрагментациони путања јона m/z 763, врста AlL₂⁺

Применом колизионе Е од 35 % од максималне вредности rf напона на parent јон (m/z 763) долази до фрагментације. Од комплекса у коме је један алуминијум везан са два депротонувана молекула флороксаина у MS^2 експерименту настају следећи продукт јони: губитком флуороводоничне киселине (HF) настаје продукт јон на m/z , 743 губитком цијановодоничне киселине (HCN) настаје продукт јон m/z 736, губитком 2 -азопрена (C_2H_5N) настаје продукт јон на m/z 719, губитком етил диметил-амина ($C_4H_{11}N$) настаје продукт јон на m/z 690 и губитком флуороводоничне киселине (HF) и етена (C_2H_4) настаје продукт јон на m/z 715. И у овом случају се ради о стабилној врсти, јер није дошло до раскидања везе алуминијума са лигандима.

Gauss-ова расподела спектралних линија

На спектрима (Слике 42, 44) дати су Gauss-ови прикази ESI MS спектра где се уочава правилна расподела облика звона у интервалу m/z 220-250, односно у интервалу m/z 190-240. Профили спектралних линија (полуширине на половини висине максималног интензитета) су симетрични у већини спектра. Код датих спектралних линија и друге карактеристике профила линије су анализирани: форма крила линије, појава асиметрије профила и померај спектралне линије. Мањи помераји линија (који се запажају су последица чињенице да максимуми испитиваних спектралних линија померају највероватније због различитих услова (pH, концентрација) у сниманим растворима у односу на максимум линије коју би емитовали изоловани и непокретни атоми или јони. Појава крила спектралних линија је последица чињенице да је као анализатор у свим експериментима коришћен јон трап па многе од линија нису у потпуности раздвојене. Уочава се и присуство веома комплексних профила спектралних линија који се састоје из више компоненти које се међусобно преклапају [96, 98].

Што се тиче Gauss-ове расподеле у односу на дати јон, приказане на Сликама 34, 48, у поглављу које илуструје комплексирање у Al(III)-јон-HQ растворима, издвојен је јон m/z 763,27; односно 763,33 којим се илуструје и симетрична расподела интензитета облика звона и померај спектралне линије узрокован чињеницом да дати јон није изолован, већ у различитим окружењима у раствору. На Сликама 19 и 23 којима се илуструју хидролиза у растворима Al(III)-јона приказана је Gauss-ова расподела интензитета у односу на јоне m/z 60,52, односно 96,65 облика звона. На сличан начин се може илустровати Gauss-ова расподела у односу на остале јоне у овим спектрима.

4.2.1.3. Квантитативна селекција у растворима алуминијум(III)-јона и флороксаина

Већина сигнала у ESI MS спектрима је зависни од концентрације и pH вредности. Изучаване су варијације спектра са променом pH вредности за Al/L однос, обрачуном релативних интензитета сигнала слободног лиганда, Al:L=1:1 и Al:L=1:2 и награђених комплекса. У ту сврху је израчунат интензитет јона сваког пика у спектру [118, 119]. Нађена је сума свих интензитета јона у датом спектру и извршено је дељење јона који се односе на исти тип комплекса сумом свих јона. Релативни интензитет је обележен са R_{ES-MS} и дефинише се једначинама 22 и 23.

$$R_{ES-MS1} = \frac{i_{193} + i_{202} + i_{215} + i_{326}}{i_{193} + i_{202} + i_{215} + i_{255} + i_{326} + i_{360} + i_{382} + i_{404} + i_{719} + i_{763}} \quad (22)$$

$$R_{ES-MS2} = \frac{i_{255} + i_{360} + i_{382} + i_{404} + i_{719} + i_{763}}{i_{193} + i_{202} + i_{215} + i_{255} + i_{326} + i_{360} + i_{382} + i_{404} + i_{719} + i_{763}} \quad (23)$$

При чему је R дефинисано једначином [24]:

$$R_{ES-MS1} = \frac{\sum i_{AL}}{\sum i_L} \quad (24)$$

$$R_{ES-MS2} = \frac{\sum i_{ALL_2}}{\sum i_L} \quad (25)$$

где су: i_L -интензитет лиганда у свим врстама

i_{ALL} и i_{ALL_2} -интензитети свих јона који потичу од ALL и ALL₂ јона, респективно

Важно је истаћи да су релативни интензитети комплексних врста i_{763}/i_{719} слични као код слободних лиганда i_{370}/i_{326} , што указује на сличне константе комплексирања за L и [L-CO₂] врсте што је у складу са литературним подацима [111, 119]. Бинарни bis-комплекс детектован на *m/z* 763 је доминантна врста у раствору за релативно широк опсег рН и релативно широк концентрациони опсег C_{Al}:C_{flero}. Имајући у виду рН зависност од интензитета сигнала, највероватније је да се овај комплекс формира у раствору ступњевито по реакцији: ALL²⁺+L⁻=ALL₂⁺

Истовремено је са рачунањем релативних интензитета добијених на основу ESI MS спектара са променом рН, исти обрачун је спроведен за податке добијене потенциометријским мерењима. Подаци за прорачуне расподеле су узети из литературно публикованих података [154-157]. У Табели 23 се са R_{EQUIL} обележава сума свих молских удела формираних комплекса на датом рН/укупна концентрација алуминијума.

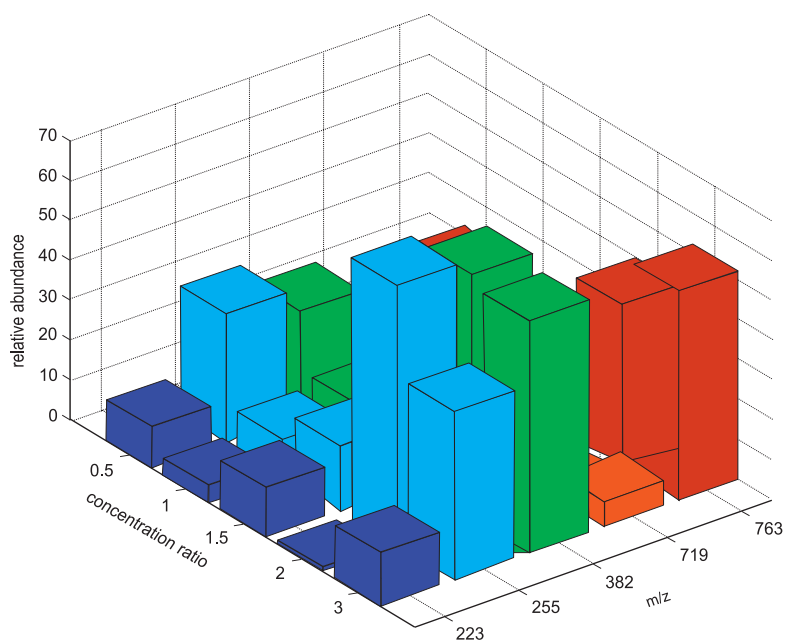
Подаци потенциометрије и ESI MS су корелисани Nyss 2006. програмом, приказани су у Табели 29. Сходно литератури [119] у идеалним условима R_{EQUIL}=R_{ESI-MS}. Разлике које се јављају су последица ESI пертурбација у раствору (разлика у саставу растварача и јонске јачине) Пертурбације се могу десити осим у раствору, на граници фаза течно-гас и у гасној фази. Пертурбације у раствору су последица равнотежног помераја у капљици и утицаја рН, концентрације, T, јонске јачине које се дешавају док капљице испаравају [12]. Пертурбације које се дешавају на граници фаза течно-гас су последица ефикасности којом различите врсте прелазе из капљице у гасну фазу. Пертурбације у гасној фази су последица фрагментације или других реакција које се дешавају након преласка јона у гасну фазу, а пре њихове детекције унутар или у близини улазне капиларе. Идентификација пертурбација је од великог значаја да би се што реалније тумачили резултати ESI MS специјације [111]. Расподела различитих комплекса у раствору је приказана на дистрибуционим дијаграмима. Генерално говорећи постоји слагање података добијених масеном спектрометријом и потенциометријом што указује да већина комплекса детектованих у ESI MS спектрима добро одсликава равнотежно стање у растворима Al(III)-јона и флуорохинолона.

Разлике које се јављају између ESI MS и потенциометријске специјације су за оне врсте које се у ESI MS спектрима детектују са различитим бројем киселих протона, тј. различитим наелектрисањима (charge state). Са порастом рН и за CAl:C flero=1:3, код ALL врсте ове вредности се све више међусобно приближавају. За врсту ALL₂ приближно је исто разликање ових вредности за оба концентрациона односа (Табела 23). Ова чињеница је у потпуној сагласности са литературним подацима на другим системима Al(III)-јон-лиганд изучаваним ESI MS спектрометријом и објашњава се чињеницом да се различитом ефикасношћу јони различитих наелектрисања преносе из раствора у гасну фазу [111].

Табела 23. Поређење релативних молских удела ALL и ALL₂ комплекса добијених ESI MS и потенциометријским (равнотежним) мерењима

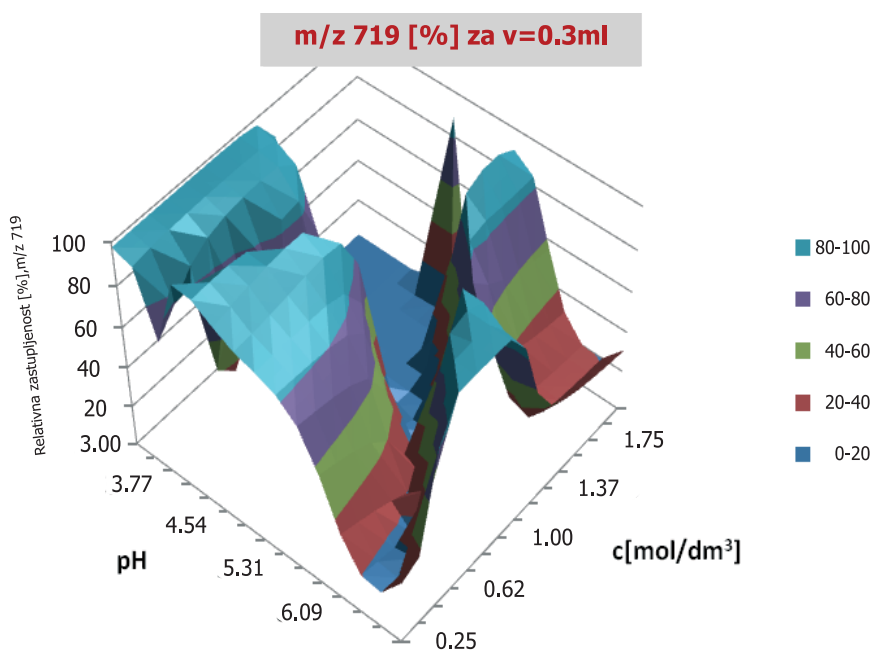
[Al(III)]-јон (mol/dm ³)	[флероксацин] (mol/dm ³)	pH	R _{EQUIL1} врсте ALL	R _{ES-MS1} врсте ALL	R _{EQUIL2} врсте ALL ₂	R _{ES-MS2} врсте ALL ₂
2,7×10 ⁻⁵	8,1×10 ⁻⁵	4,03	0,768	0,491	0,402	0,420
		5,29	0,320	0,304	0,697	0,805
		6,20	0,254	0,243	0,616	0,774
2,7×10 ⁻⁵	4,05×10 ⁻⁵	3,50	0,748	0,324	0,207	0,385
		4,14	0,551	0,214	0,782	0,837
		5,64	0,478	0,196	0,320	0,532

4.2.1.4. Примена модела вештаичких неуронских мрежа на истраживање комплексирања $Al(III)$ -јона и флороксацина



Слика 112. Хистограм релативних интензитета (заступљености) јона различитих m/z вредности vs концентрационим односима $Al(III)$ -јон-флороксацин

На Слици 112 је приказана графичка расподела најобилнијих комплексних врста у функцији од концентрационих односа. Релативна заступљеност врста m/z 223 и 719 је најнижа. Врсте m/z 255 и 763 су са највишом релативном заступљеношћу за све концентрационе односе, а посебно за концентрационе односе $C_{Al}:C_{flero}=1:2$ и $C_{Al}:C_{flero}=1:3$. Врста m/z 382 има више релативне заступљености за концентрационе односе $C_{Al}:C_{flero}=1:2$ и $C_{Al}:C_{flero}=1:3$. Затим је коришћењем концепта AAN појединачно анализирана релативна заступљеност за најобилније комплексе типа AlL_2 (m/z 719 и 763), што је графички представљено 3D површима.

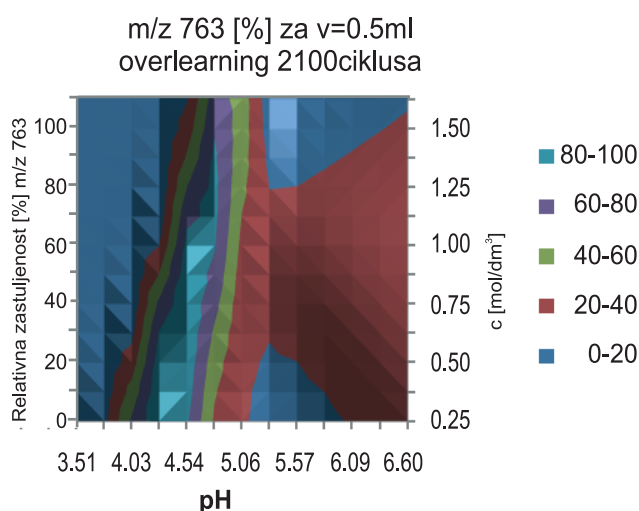


Слика 113. 3D површ релативне заступљености комплекса m/z 719 у функцији од pH и концентрационих односа

Како релативна заступљеност врста у раствору зависи од рН раствора и концентрационог односа метал - лиганд, рН раствора алуминијум(III)-јон-флероксацин је пажљиво додатком базе ТЕА. На основу модела неуронских вештачких мрежа израчунате су 3D површи реаговања (response surface) излазних величина на помену вредности улазних величина.

Response surface показује за m/z 719 врсту типа AlL_2 максимална заступљеност у рН интервал 3,77 до 4,80 и концентрационој области до 0,30 до 1,10, као и за рН интервал од 5,5 до 6,10 и концентрациони однос 1,10 до 1,37. При налажању оптималног рН интервала за формирање врсте AlL_2 треба узети у обзир да је по хемијском саставу флероксацин хетероциклична аминокиселина која у воденим растворима, може постојати у облику протонизованог катјона, диполарног јона, неутралног молекула и анјона. Релативна заступљеност ових облика флероксацина у раствору је зависна од рН раствора. Стога се у разматрање мора узети дисоцијациона константа у датом растварачу. Константе дисоцијације флероксацина у воденом раствору на 298 К и при јонској јачини $0,1 \text{ mol/dm}^3$ износе $pK_1=6,97$, $pK_2=8,21$. Прва константа дисоцијације се односи на дисоцијацију протона карбоксилне групе катјона флероксацина, а друга на дисоцијацију протона са протонизованог азота пиперазинског прстена.

На депротонивана места може се лако узети метални јон и очекивало би се да се то дешава у базној средини где је флероксацин депротониван да се ради о раствору самог флероксацина. Међутим 3D површ показује да се максимална заступљеност ове врсте детектује у киселој средини. То се објашњава чињеницом да у присуству металног јона алуминијума у киселим растворима овај јон проузрокује депротонивање карбоксилне групе (уз додаток базе у одређеним порцијама у овом случају по 0,3ml на 30 sec). И на тим местима, на депротониваној карбоксилној групи се сада дешава везивања Al^{3+} јона и 2 депротонивана јона флероксацина тако да настаје врста AlL_2^+



Слика 114. 3D површ релативне заступљености комплекса m/z 763 у функцији од рН и концентрационих односа

На 3D површи се уочава да је подручје максималне заступљености комплекса m/z 763 за рН 4,20-4,95 и концетрационе односе од 0,25-1,25 .

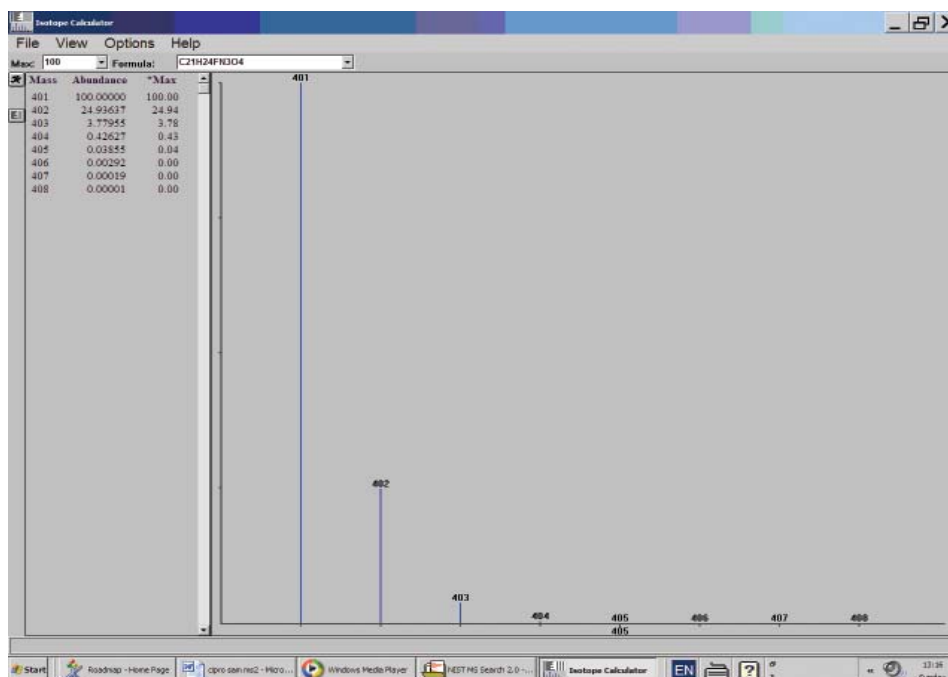
4.2.2. Систем алуминијум-моксифлоксацин

Прво су снимљени и анализирани ESI MS спектри раствора моксифлоксацина, а затим раствора алуминијума и моксифлоксацина. У Табели 24. су приказане идентификоване врсте у спектру самог моксифлоксацина. Примењена је тандем масена спектрометрија са циљем дешифровања путева фрагментације и коначно $mALDI$ спектрометрија.

Табела 24. Идентификоване врсте у основном спектру MS ¹ , раствор моксифлоксацина, C _i =2,7x10 ⁻⁵ mol/dm ³ , pH=4,60		
<i>m/z</i> из спектра	<i>m/z</i> теоријски	Идентификовани јони у ESI MS извору
261,40	261,09	[L ⁻ -C ₆ H ₁₃ N-CO ₂ +2H ⁺] ⁺
338,02	338,30	[L ⁻ -CO ₂ -HF+2H ⁺] ⁺
358,53	358,20	[L ⁻ -CO ₂ +2H ⁺] ⁺
402,33	402,21	[L ⁺ +2H ⁺] ⁺

Молекулски јон моксифлоксацина се идентификује на *m/z* 402,33. Врста на 358,53 настаје декарбоксилацијом лиганда, што је у складу са литературним подацима. Међутим врста на *m/z* 384,40 која се у литератури помиње [147, 158, 159], а настаје губитком воде је мање вероватна јер у извору воде има у вишку и најчешће се јавља присаједињавање воде. Овај сигнал се у нашим експериментима не региструје. Врста на *m/z* 338,02 настаје губитком CO₂ и HF.

MS² спектри прекурсор јона 402,00 (протонованог моксифлоксацина) указују да лиганд прво губи CO₂ из 3-карбоксилне групе. Даљим повећањем колизионе енергије до 45 % од максималне *rf* вредности долази до губитка HF из хинолонског језгра. Продукт јон 338,02 је даље одабран за фрагментацију у MS³ експерименту. Његови продукт јони су 282,04 и 323,32. Следи да је моксифлоксацин „отпоран“ на фрагментацију (хинолонско језгро је тешко „разбити“), јер се запажа само губитак супституената.



Слика 115. Изотопски pattern моксифлоксацина

На Слици 115 приказан је изотопски pattern молекула моксифлоксацина, добијен коришћењем softwera Xcalibur. Изотопски pattern протонованог моксифлоксацина, експериментално добијен је у доброј сагласности са теоретски изарачунатим као и релативне заступљености јона. Област молекулског јона чине: 401, 402, 403 и 404, M+1 јони.

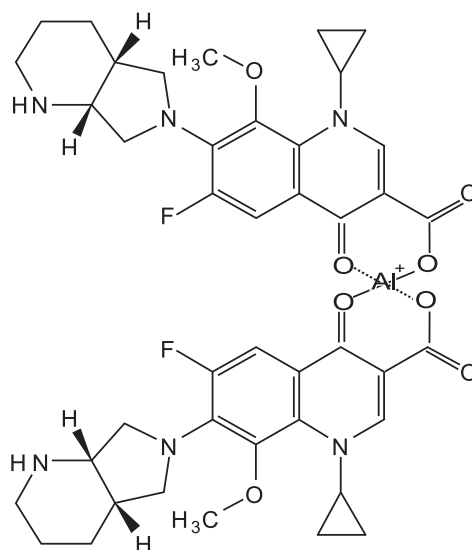
4.2.2.1. Проучавање комплексирања Al(III)-јона и моксифлоксацина ESI MS сикхроматографијом

Моксифлоксацин се у структури разликује од флероксацина по присуству „велике“ групе у позицији-7 хинолонског језгра. Сем псеудо-молекулског јона моксифлоксацина и неколико фрагментацијом насталих сигнала слободног (некомплексираниог) моксифлоксацина у

ESI MS спектрима се идентификују следеће комплексне врсте AlL_2^+ , AlL_2^+ и AlL_3^0 . Остали релативно слаби сигнали се асигнирају као фрагментациони производи настали губитком CO_2 , HF и ређе губитком CO [88, 158,159]. Структура молекула је сачувана у гасној фази. Губитак CO потиче (у складу са литературом од карбонилне групе једног од везаних лиганда у комплекс и указују да се лакше раскида веза са металним јоном, него са друга два лиганда. Губитци H_2O се не региструју, већ се региструје присаједињавање молекула H_2O са датим јонима што је у потпуности у складу са литературним подацима [147,153]. То је последица присуства малих количина воде у јон трапу које је тешко уклонити. У врстама AlL_2^+ , AlL_2^+ вода је чврсто везана за алуминијум и пораст рН вредности води до појаве хидроксо врста.

Потенциометрија не разликује врсте у којима је координована вода депротонвана од врста у којима је лиганд депротонван. Предност масене спектрометрије је у томе што разликује ове врсте [13].

Врста на m/z 827,31 настаје координацијом једног металног јона са два јона лиганда.

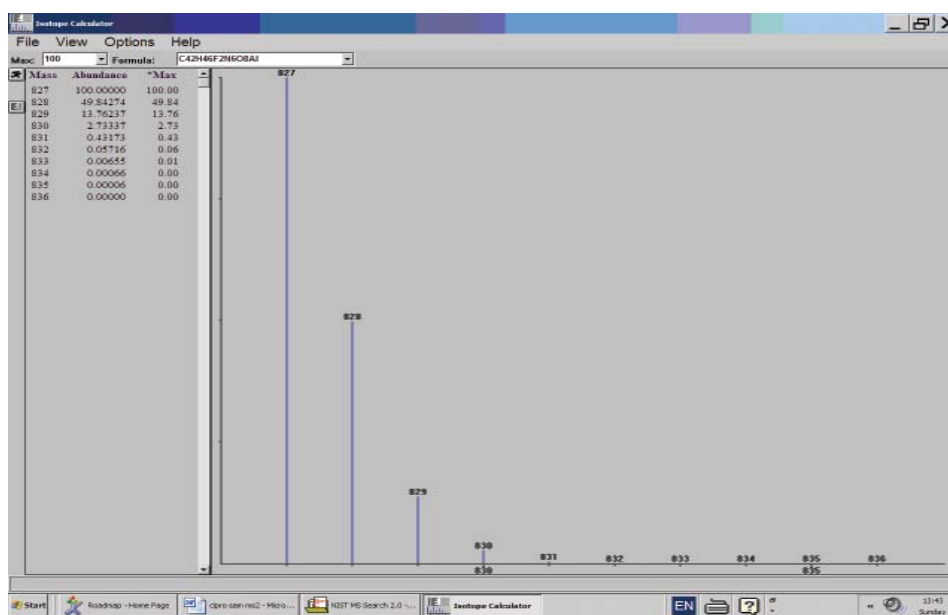


Слика 116. Могућа структура комплекса AlL_2 у систему Al -моксифлоксацин

Врсте на m/z 414,22 и 424,28 настају координацијом једног металног јона са два јона лиганда од којих је један у облику L^- а други LH . Врста на m/z 216,81 настаје координацијом једног металног јона и једног лиганда. Врста на m/z 1266,88 настаје координацијом три лиганда са металним јоном и K^+ јоном. Уочавају се и врсте које припадају слободном лиганду на m/z 402,20 и 358,27 настала декарбоксилацијом протонваног лиганда (Табела 25).

Табела 25. Идентификоване. врсте у растворима $Al(III)$ -јона и моксифлоксацина, $C_{Al} = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, ESI MS спектрометријом

m/z теоријски	m/z експериментално	Идентификовани јони	Врсте у равнотежи које највероватније дају ESI-MS јоне
216,58	216,81	$[Al^{3+} + L^- + 3H_2O - CO - HF]^{2+}$	AlL_2^+
358,43	358,27	$[L^- + 2H^+ - CO_2]^+$	Слободни L
402,20	402,20	$[L^- + 2H^+]^+$	Слободни L
414,43	414,22	$[Al^{3+} + 2L^- + H^+]^{2+}$	AlL_2^{2+}
423,80	424,28	$[Al^{3+} + 2L^- + H_2O + H^+]^{2+}$	AlL_2^{2+}
827,32	827,31	$[Al^{3+} + 2L^-]^+$	AlL_2^+
1266,45	1266,88	$[Al^{3+} + 3L^- + K^+]^+$	AlL_3K^+


 Слика 117. Изотопски pattern јонске врсте All_2^+ на m/z 827

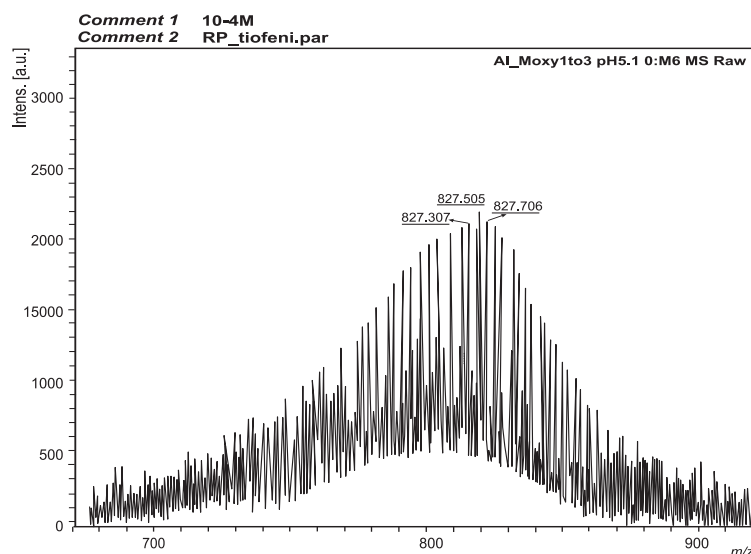
На Слици 117 приказан је изотопски pattern комплекса All_2^+ , добијен коришћењем softwera Xcalibur. Изотопски pattern комплекса All_2^+ , експериментално добијен, је у доброј сагласности са теоретски израчунатим. Област молекулског јона чине 827, 828, 829 и 830 јони.

4.2.2.2. Проучавање комлексирања алуминијум (III)-јона и моксифлоксацина маLDI спектрометријом

Врсте из маLDI спектра потврђују специјацију добијену на основу ESI MS спектра [153]. У маLDI спектрима се уочавају следећи јони: 827,505 који репрезентује врсту All_2 насталу координацијом једног јона метала са два јона депротонаног лиганда. При нижим вредностима m/z у овом спектру запажа се више врста које потичу од метастабилних јона. Врста на m/z 1250,62 је адуктна All_3 врста са Na^+ јоном, врста на m/z 1266,45 је адуктна All_3 врсту са K^+ јоном. Врста на m/z 2054,36 би се могла приписати $[Al_2L_5]^+$, међутим како се ова врста не детектује у раствору, њена појава се објашњава формирањем кластер јона дејством ласера. [21, 22, 111]. Са аспекта координационе хемије мало је вероватно да се два алуминијума вежу са 5 лиганата. Највероватније је да ова врста потиче од димерног језгра Al_2L_2 , које се формира у раствору, а кластер са више депротонаних лиганда се формира у гасној фази, тј. у plume створеном ласерским зраком.

Табела 26. Идентификоване. врсте у растворима Al(III)-јона и моксифлоксацина, од 1:1 до 1:3, концентрација 10^{-4} mol/dm^3 , маLDI спектрометријом

maLDI m/z из спектра 1:1, pH=4,40	maLDI m/z из спектра 1:1, pH =5,90	maLDI m/z из спектра 1:3, pH =5,10	Врсте	моксифл- оксацин	подлога
					268,458 јак пик
					365,643
402,447	402,408		Слободни лиганд		686,94
827,574	827,517	827,505	All_2^+		
1250,627	1250,627	1250,627	All_3Na^+		
1266,599	1266,599	1266,599	All_3K^+		
2054,366			$Al_2L_5^+$		



Слика 118. Изотопски envelope у систему алуминијум моксифлоксацин

maLDI спектри дају исте врсте као и ESI MS спектри, што је потврда да те врсте заиста постоје у раствору.

Јони у maLDI спектрима настају по једноставној схеми формирања протонованих или депротонованих квазимолекуларних јона удружених са неколико фрагментних јона насталих губитком малих стабилних молекула [18, 88] као што је CO_2 . Јони се формирају се из високо интензитетских радикал молекулских јона или водоничних адуката као што су $[\text{M}+2\text{H}]^+$, $[\text{M}+3\text{H}]^+$ или депротоване врсте $[\text{M}-\text{H}]^-$.

И молекулски и фрагментациони карактерише изотопски envelope [160]. Из молекулске масе и међусобних растојања пикова у изотопски envelope добијају се важни подаци за карактеризацију молекула. Пик на m/z 827,505 карактерише изотопски envelope анализата (Слика 118), који је значајан за структурно тумачње насталог комплекса у систему алуминијум-моксифлоксацина типа AlL_2^+ . Зато је важна резолуција инструмента да би се могли довољно раздвојити пикови у изотопски envelope. TOF/TOF масеном спектрометријом флуорохинолона и алуминијума добијају се добро раздвојени пикови.

Мада стимулисана фрагментација није коришћена, уочава се ограничена метастабилна фрагментација молекулског јона (дешава се након што јони напусте област акцелерације-убрзања).

maLDI TOF MS састоји се из три ступња: први ступањ представља превођење молекула анализата у гасну фазу и њихову јонизацију, други ступањ представља раздвајање јонизованих молекула на основу односа масе и наелектрисања (m/z) и на крају трећи ступањ је детекција јона.

Предност maLDI TOF масене спектрометрије над другим методама карактеризације испитиваних молекула лежи у чињеници да се овом методом мери однос масе и наелектрисања јона чиме је олакшано испитивање појединачних молекула. Из тог разлога су резултати добијени карактеризацијом једнозначни.

Изотопски envelope служи за:

- једнозначну интерпретацију јер нема интерференције између јона,
- за потврђивање структуре познатог и одређивање могуће структуре непознатог хетероатома
- за процену броја C атома у непознатом молекулу на основу интензитета $A+1$ јона
- за експериментално одређивање charge state јона, базирано на односу $\Delta m/z$ између јона у envelope.

Charge state је реципрочна вредност $\Delta m/z$ издвојеног јона у изотопском envelope.

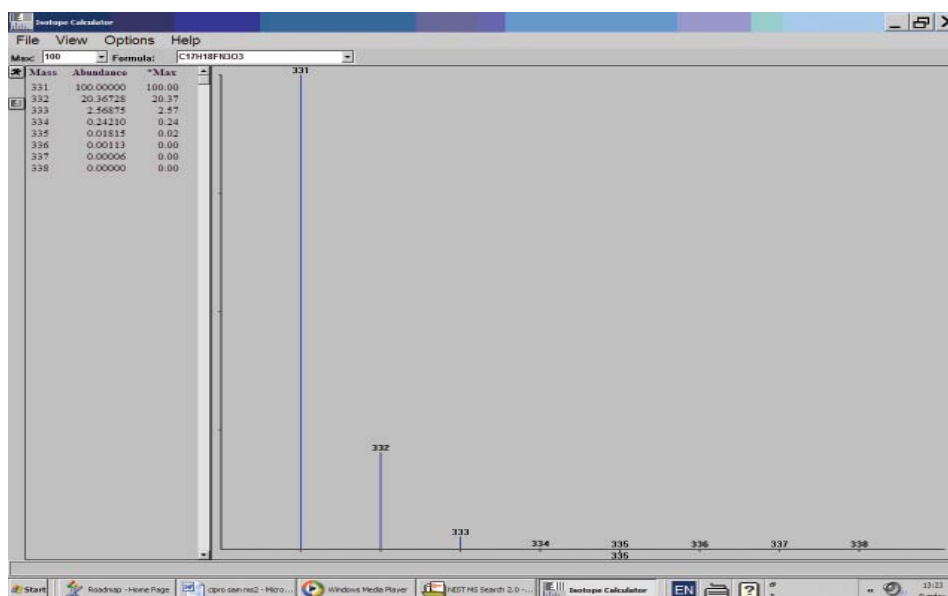
$$\text{Charge state} = 1/\Delta m/z$$

4.2.3. Систем алуминијум(III)-јон цiproфлорксацин

Снимљени су и анализирани ESI MS спектри раствора цiproфлорксацина и раствора алуминијума и цiproфлорксацина са циљем одређивања специјације. Тандем масена спектрометрија је примењена са циљем дешифровања путева фрагментације. *m*LDI спектрометрија је коришћења ради детектовања полимера. У Табели 27 су приказане идентификоване врсте у раствору цiproфлорксацина.

Табела 27. Идентификоване врсте у раствору цiproфлорксацина, $C_L=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, pH=4,60		
<i>m/z</i> теоријски	<i>m/z</i> из спектра	Идентификовани јони у ESI MS извору
332,10	332,04	$[L+2H]^+$
288,25	288,17	$[L-CO_2+2H]^+$
268,62	268,23	$[L-CO_2-HF+2H]^+$
245,45	245,50	$[L-C_2H_5N-CO_2+2H]^+$

Врста на 332,04 је молекулски јон цiproфлорксацина настао протоновањем овог лиганда. Врсте (245,50, 288,17) су у складу са литературно публикованим подацима [152, 161]. Настају губитком молекула угљен-диоксида и 2-азопрена. Нису идентификоване врсте на *m/z* 314, 249, 231, 205 који се у литератури помињу. Врста на *m/z* 268,23 настаје још и губитком флуороводоника.



Слика 119. Изотопски pattern цiproфлорксацина

На Слици 119. приказан је изотопски pattern молекула цiproфлорксацина, добијен коришћењем softwera Xcalibur. Изотопски pattern протонованог цiproфлорксацина, експериментално добијен, је у доброј сагласности са теоретски изарачунати као и релативне заступљености јона. Област молекулског јона чине 331, 332, 333 и 334 врсте.

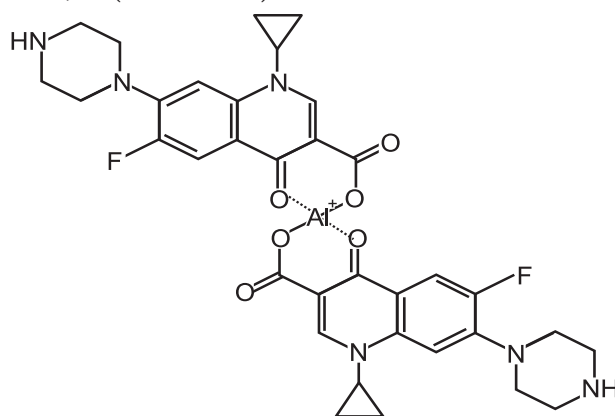
4.2.3.1. Проучавање комплексирања алуминијума(III)-јона и цiproфлорксацина ESI MS спектрометријом

ESI MS спектри цiproфлорксацина и алуминијума су слични спектрима претходних система. Сем сигнала слободног цiproфлорксацина који је протонован, у спектрима се уочавају сигнали комплекса AlL_n ($n=1,2,3$). Доминантни комплекси су бинарни бис и трис комплекси, који могу бити протоновани, депротонирани.

Табела 28. Идентификоване врсте у растворима Al(III)-јона и ципрофлоксацина, $C_{Al}=2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. ESI MS спектрометријом

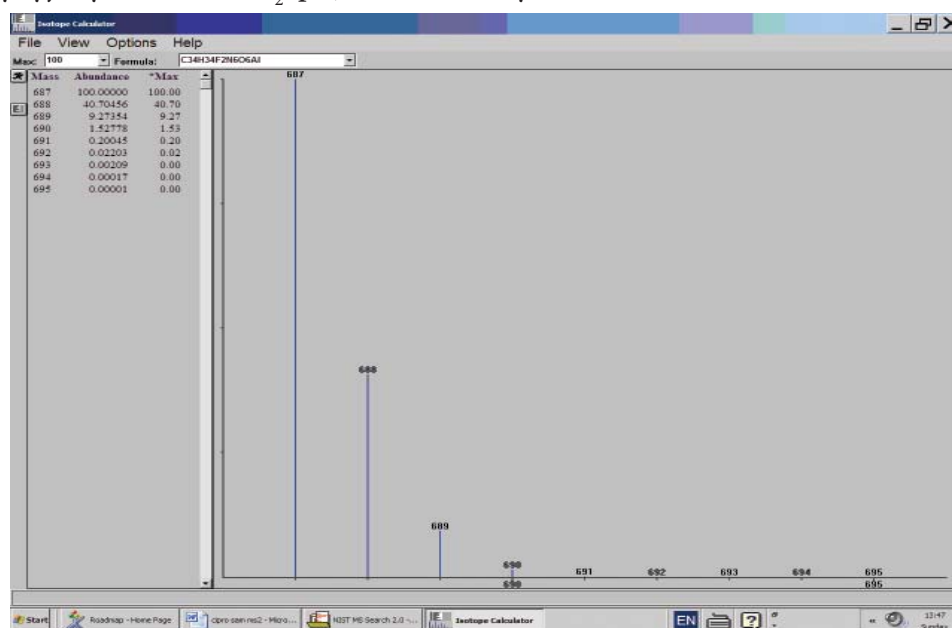
<i>m/z</i> теоријски	<i>m/z</i> експериментално	Идентификовани јони	Врсте у равнотежи које највероватније дају ESI MS јоне
231,32	231,20	$[L^- + 2H^+ - C_3H_4 - C_2H_5N - H_2O]^+$	Слободни лиганд
249,30	249,05	$[Al^{3+} + L^- - 2CO_2 - 2HF + H_2O]^{2+}$	AlL_2^{2+}
332,14	332,01	$[L^- + 2H^+]^+$	Слободни лиганд
334,11	334,12	$[Al^{3+} + 2L^- + H^+ - HF]^{2+}$	AlL_2^{2+}
667,23	667,79	$[Al^{3+} + 2L^- - HF]^+$	AlL_2^+
687,23	687,75	$[Al^{3+} + 2L^-]^+$	AlL_2^+
1040,34	1040,33	$[Al^{3+} + 3L^3 + Na^+]^+$	AlL_3Na^+
1056,52	1056,15	$[Al^{3+} + 3L^3 + K^+]^+$	AlL_3K^+

Прва група врста потиче од слободног лиганда: 332,01 и 231,20. Другу групу врста чине AlL_2 врсте: 249,05, 667,79 и 687,75 (Слика 119).



Слика 120. Могућа структура комплекса AlL_2 у систему Al-ципрофлоксацин

Трећа група су AlL_3 адуктне врсте са Na^+ и K^+ јоном. Врста на *m/z* 1040,33 је адукт са Na^+ јоном, а врста на *m/z* 1056,15 је врста којој је пришао јон K^+ . Фрагментација није много јака и укључује губитак HF, CO_2 , ређе долази до губитка етил-амина.



Слика 121. Изотопски pattern јонске врсте AlL_2 на 687 *m/z*

На Слици 121 приказан је изотопски pattern комплекса AlL_2^+ , добијен коришћењем softwera Xcalibur. Изотопски pattern комплекса AlL_2^+ , експериментално добијен је у доброј сагласности са теоретски израчунатим. Област молекулског јона чине 687, 688, 689 и 690.

На Схеми 5 је приказана фрагментациона путања добијена на основу MS/MS и MS/ MS / MS експеримента у систему Al- ципрофлоксацин.

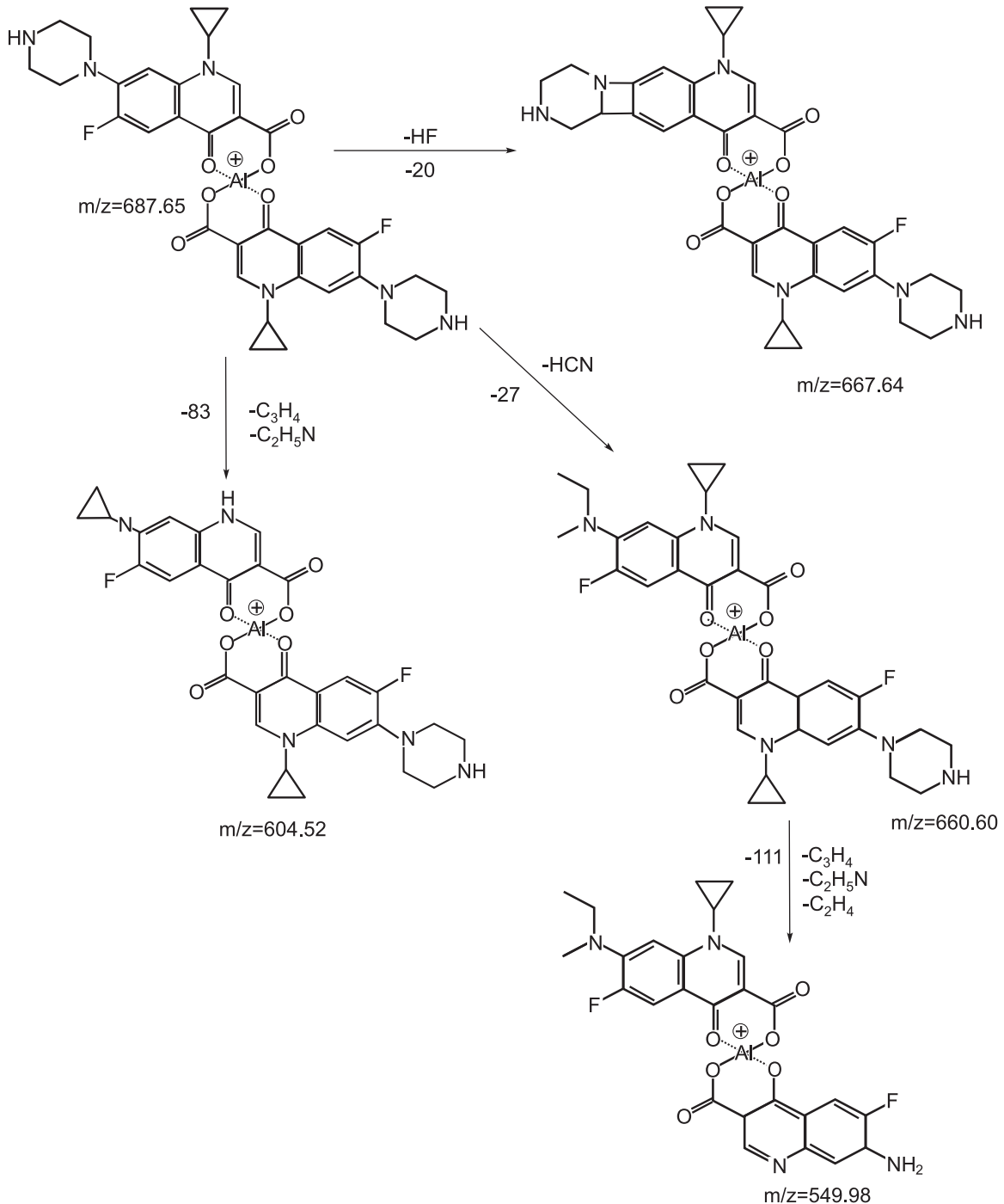


Схема 5: Фрагментациона путања Al-ципрофлоксацин комплекса из MS² и MS³ експеримента

MS² експеримент јона 687 тек при 40 % од максималне ексцитационе енергије показује да прекурсор јон губи HF, HCN или циклопропен $C_3H_4 + C_2H_5N$ молекуле. У MS³ експерименту из јона 660 губитком C_3H_4 ; C_2H_5N и C_2H_4 настаје врста на m/z 549,98.

У првој фази од комплекса у коме је један алуминијум везан са два молекула ципрофлоксацина губи се флуороводонична киселина HF и то тако што F одлази са оксохинолонског прстена, а водоник из пиперазинске групе [152, 161]. Тако настаје потамак на m/z 667,64. Губитком циклопропена (C_3H_4) и 2-азопротена (C_2H_5N) од полазног молекула настаје фрагмент на m/z 604,52. Трећи потамак који настаје од полазног молекула губитком цијановодоничне киселине (HCN) је продукт јон на m/z 660,60. У MS³ експерименту из овог продукт јона губитком циклопропена (C_3H_4), 2-азопротена (C_2H_5N) и етена (C_2H_4), настаје продукт јон на m/z 549,98.

Тандем масена спектрометрија указује да су потребне врло високе колизионе енергије за фрагментацију ових комплекса (нарочито када су концентрације полазних компоненти 10^{-4} mol/dm³, E_{coll} су 80 до 100% од максималне вредности RF voltage) из чега следи да је висока стабилност ових комплекса. То узрокује веома ниску концентрацију слободног алуминијума. Стога, реакције комплексирања *in vivo* између алуминијум јона и флуорохинолона одвија се као серија реакција лигандне измене. На стварање комплекса утичу кинетички ефекти, гастрична стања, компетиција са другим лигандима и металним јонима и системски кинетички транспорт флуорохинолона. Најважније компетитивне врсте у плазми су лиганди мале молекулске масе, протеини и јон калцијума.

4.2.3.2. Проучавање комплексирања алуминијума(III)-јона и ципрофлоксацина *ms*LDI спектрометријом

Већина врста из *ms*LDI спектра су нађене и у ESI MS спектрима. Из овога следи да идентификоване врсте потичу из раствора, а не из гасне фазе. Најзаступљеније врсте су приказане у Табели 29.

Табела 29. Идентификоване врсте у растворима Al(III)-јона и ципрофлоксацина = 1:3, концентрација 10^{-4} mol/dm ³ , <i>ms</i> LDI спектрометријом					
m/z <i>ms</i> LDI из спектра 1:3, pH=3,5	m/z <i>ms</i> LDI из спектра 1:3, pH =4,00	m/z <i>ms</i> LDI из спектра 1:3, pH =5,10	m/z <i>ms</i> LDI из спектра 1:3, pH =6,10	врсте	Plate (подлога)
					268,458 јак пик
687,498	687,497	687,495	687,495	AlL ₂ ⁺	686,946
	1016,609	1016,597	1016,603	н.и.	
1040,605	1040,611	1040,62		AlL ₃ Na ⁺	
		1056,576	1056,574	AlL ₃ K ⁺	
1703,900	1703,888			Al ₂ L ₅ ⁺	

н.и. - није идентификовано

Врста на m/z 1703,88 би се могла приписати Al₂L₅⁺, међутим како се ова врста не детектује у раствору, појава ове врсте у LDI спектру се објашњава најпре формирањем димерног језгра Al₂L₂ у раствору, а затим настаје кластер Al₂L₅⁺ као последица гасно-фазних реакција.

Врста AlL₃ на m/z 1040,61 је последица формирања адукта са Na⁺, а врста на 1056,34 је последица формирања адукта са K⁺ јоном.

Врста на m/z 1016,60 је врста настала координацијом три лиганда за алуминијум. Врста на m/z 687,45 настаје координацијом два депротонувана лиганда за алуминијум.

4.3. Дисперзиони дијаграми

На основу дисперзионих дијаграма израчунатих програмом Huys 2006 за дати коцентрациони однос метала и лиганда ESI MS спектри се много лакше интерпретирају.

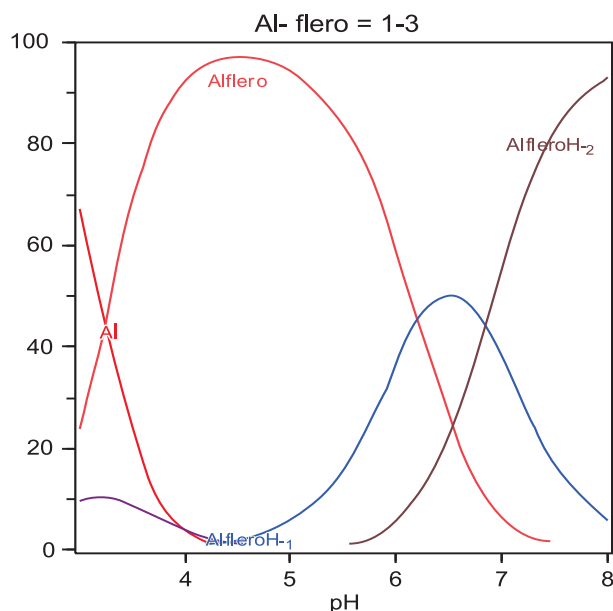
Дисперзиони дијаграми за различите концентрационе односе Al(III)-јона и флуорохинолона су израчунати на основу вредности константи стабилности комплекса

Al(III) јона и флуорохинолна приказаних у табели 30. Константе стабилности су преузете из литературе [154-157].

Табела 30. Константе стабилности које су коришћене у прорачуну специјације. Константе су преузете из литературних података.					
Врсте	-logβ	Врсте	-logβ	Врсте	-logβ
H ₂ (Moxi) ⁰	15,67	H ₂ (Flero)	13,73	H ₂ (Cipro)	14,71
H(Moxi)	9,32	H(Flero)	8,06	H(Cipro)	8,54
Al(HMoxi) ³⁺	16,59	Al(HFlero)	14,02	Al(HCipro)	16,27
Al(Moxi) ²⁺	11,66	Al(Flero)	11,14	Al(H ₂ Cipro)	18,87
Al(H ₋₁ Moxi)	5,28	Al(H ₋₁ Flero)	5,2	Al(HCipro) ₂	23,73
Al(H ₋₂ Moxi)	-2,92	Al(H ₋₂ Flero)	-1,61	Al(H ₂ Cipro) ₂	29,33
		AlFlero(HFlero)	24,87	Al(Cipro) ₃	19,56
				Al(HCipro) ₃	27,78
				Al(H ₂ Cipro) ₃	35,8
				Al(H ₃ Cipro) ₃	43,26
				Al(Cipro)	11,21
				Al(Cipro) ₂	15,92
				Al(H ₋₁ Cipro)	4,96

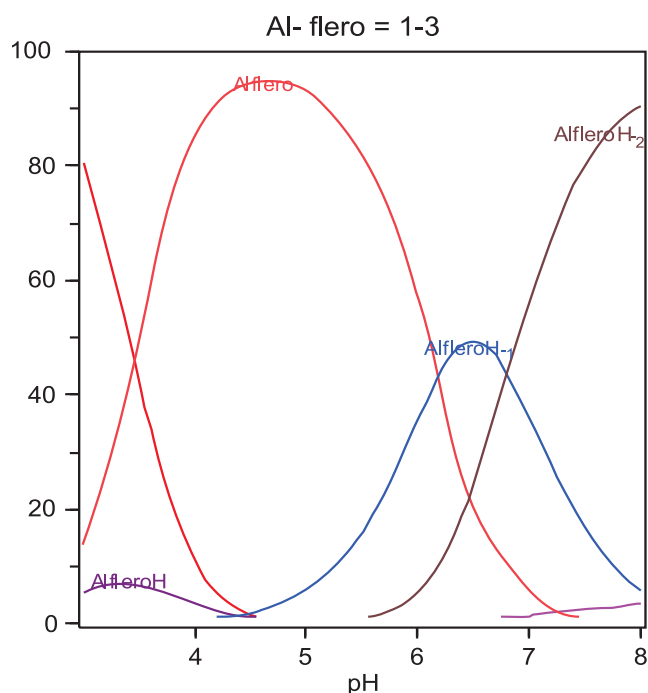
На основу вредности константи стабилности комплекса Al(III)-јона и флероксацина израчунати су дистрибуциони дијаграми алуминијума и флероксацин за различите концентрационе односе .

Анализом дистрибуционих дијаграма види се да су комплекси Al(Flero) и Al(H₋₁Flero) присутни при свим концентрационим односима метал:лиганд.



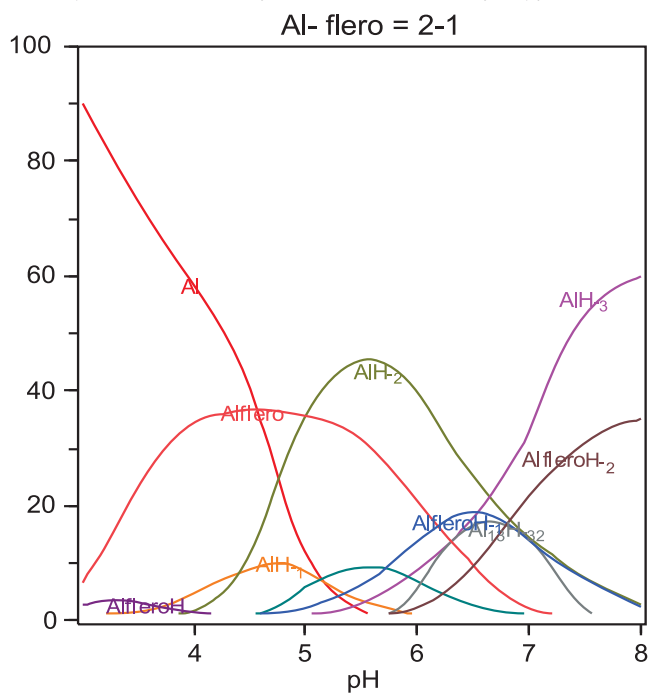
Слика 122. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:3$

За концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:3$ најзаступљенија врста је типа Al(Flero). Комплекс Al(Flero) настаје у области рН од 3-7 са максималном концентрацијом на рН 4,5. Комплекс Al(H₋₁Flero) се јавља у области рН од 5-8 са максималном концентрацијом на рН 6,5 8 (Слика 122). Комплекс Al(H₋₂Flero) се јавља у рН интервалу од рН 6 до 10, са максимумом на рН 8. Дистрибуциони дијаграми одсликавају равнотежно стање у раствору.



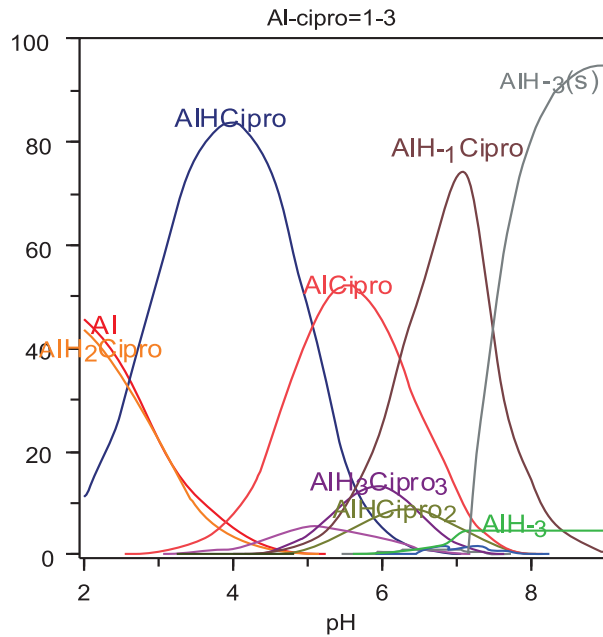
Слика 123. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:1,5$

За концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 1:1,5$ у раствору је врло слична ситуација по основу наглађених врста у функцији од рН, као у претходном случају (Слика 123).



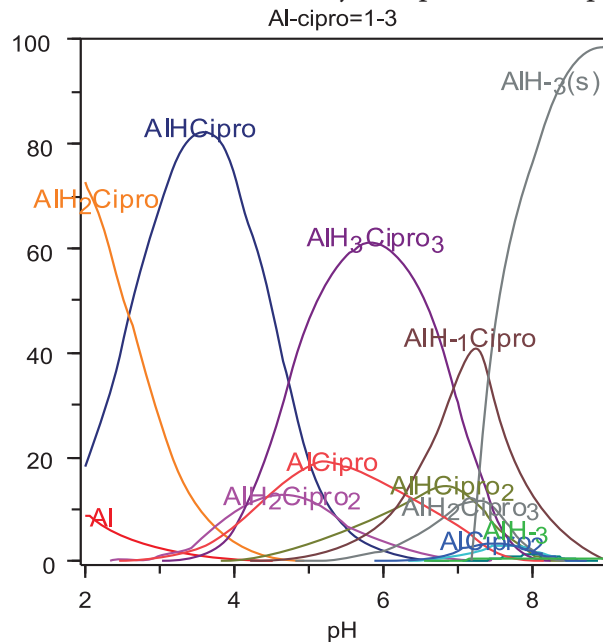
Слика 124. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 2:1$

За концентрациони однос $C_{Al}:C_{flero} = 2:1$, где је метал у вишку, заступљене су и чисто хидролитичке и комплексне и мешовите врсте. У области рН 5,5-6,5 доминантан је хидролитички комплекс типа AlH_2 . Al-флерио је доминатна врста у области рН 4,0-5,5. При рН већим од 7 доминантна је хидролитичка врста AlH_3 .



Слика 125. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{cipro} = 1:3$, концентрација компонента 10^{-5} mol/dm^3

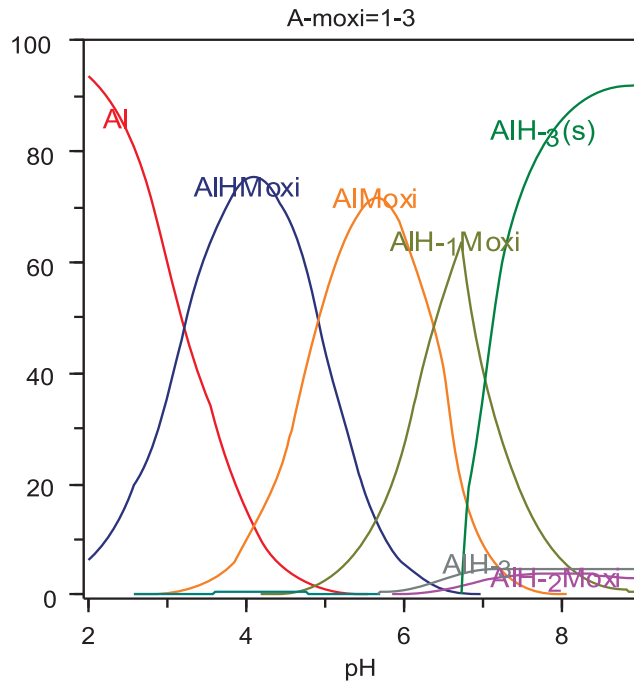
Са Сlike 125 се уочава да је за концентрациони однос $C_{Al}:C_{cipro} = 2,7 \times 10^{-5}:8,1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ доминантна врста $AlHL$, у систему алуминијум ципрофлоксацин максимална у интервалу рН 3 до 5. У области од рН 5 до 7 доминантна врста је AlL . При рН већим од 7 доминантна врста је $AlH_{-1}L$. При рН већим од 8 доминантна је хидролитичка врста је $AlH_{-3}(s)$.



Слика 126. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{cipro} = 1:3$, концентрација компонента 10^{-4} mol/dm^3

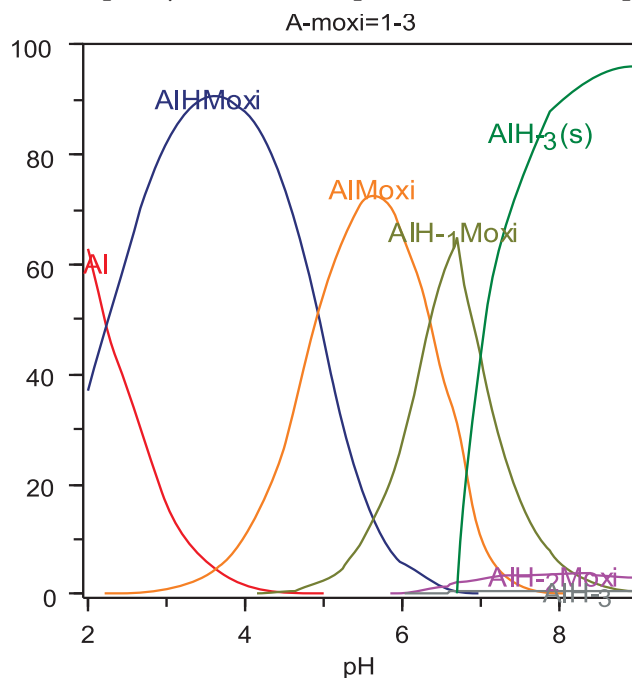
Пошто су у овом случају концентрације компонента 10 пута више у односу на претходну а концентрациони однос исти, уочава се формирање већег броја врста. У области рН 2-6 настаје врста $AlHL$, са максимумом на рН 3,8. У области рН 4-7 настаје врста AlH_3L_3 , са максимумом на рН 6.

Ове врсте има знатно више него у случају када су концентрације реда величине 10^{-5} mol/dm^3 . Заступљеност врсте $AlH_{-1}L$ знатно је нижа у овом случају. Настају нове врсте AlH_2L_2 и $AlHL_2$.



Слика 127. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, концентрација компонента 10^{-5} mol/dm^3

Дистрибуциони дијаграм на Слици 127. одсликава равнотежно стање у раствору алуминијума и моксифлоксацина за концентрациони однос $C_{Al}:C_{moxi} = 2,7 \times 10^{-5}:8,1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. За овај концентрациони однос у области рН 3-5 најзаступљенија врста је типа AlHL. У области рН 5-6 доминантна врста је ALL. Изнад рН 7 долази до стварања $Al(OH)_3(s)$.

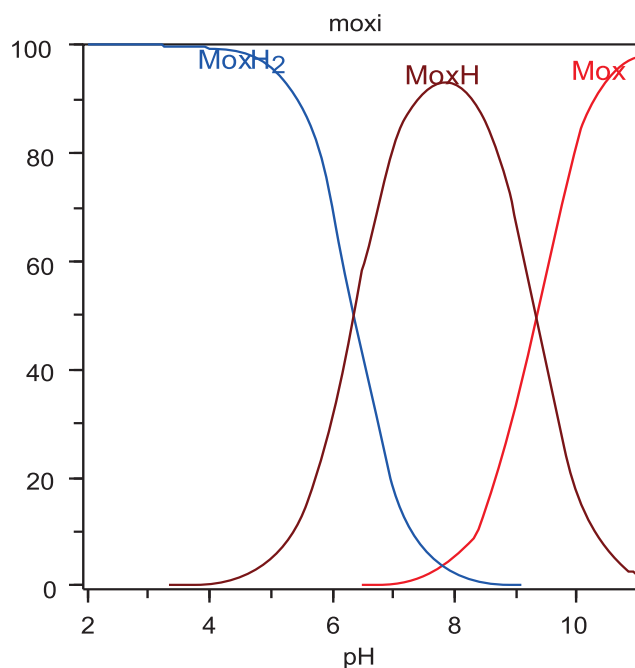


Слика 128. Дистрибуциони дијаграм за концентрациони однос $C_{Al}:C_{Moxi}=1:3$, концентрација компонента 10^{-4} mol/dm^3

У овом случају, Слика 128 су концентрације компонента 10 пута више а концентрациони однос исти ($2,7 \times 10^{-4}:8,1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$) као у претходном примеру и уочава се слична расподела врста по рН. У области рН 3-5 доминантна врста је AlHL. Процент заступљености износи 90 % што је знатно више него у случају када су концентрације реда

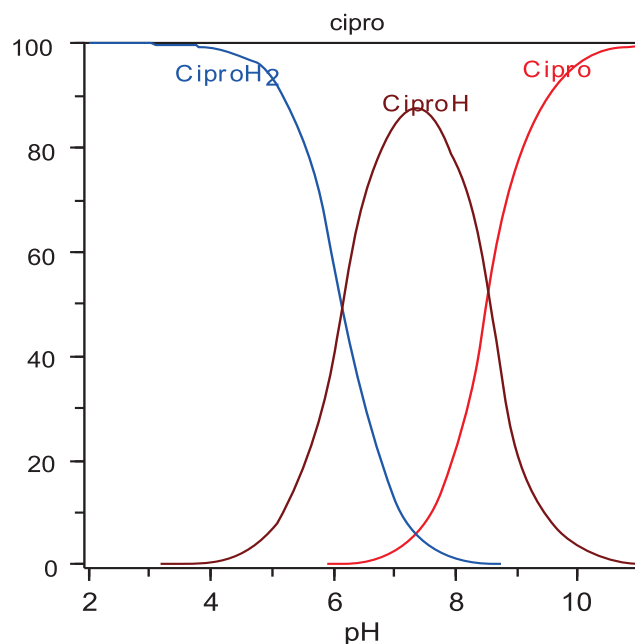
величине 10^{-5} mol/dm^3 (када заступљеност износи 70 %). У области рН 5-6 доминантна врста је AlL . Изнад рН 7 доминира таложење алуминијума AlH_3 .

На дијаграмима који следе приказана је дистрибуција самих лиганата добијена применом програма Hyss 2006, а на основу литературних података [154-157] датих у Табели 30.



Слика 129. Дистрибуциони дијаграм за моксифлоксацин

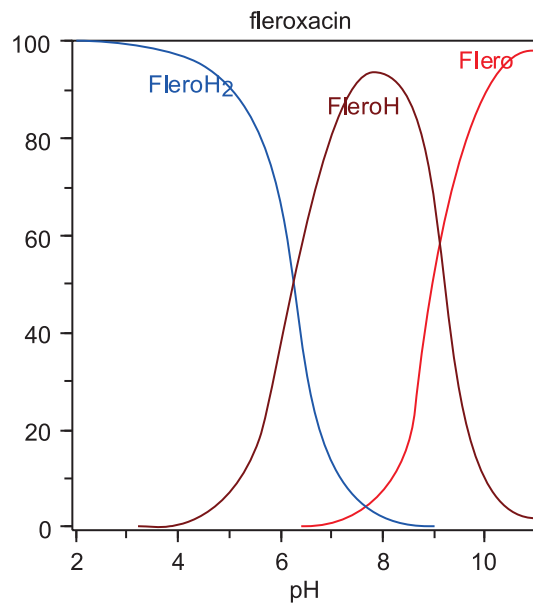
Дистрибуциони дијаграм моксифлоксацина (Слика 129) израчунат је на основу константи протоновања анјона моксифлоксатина у области рН од 3-12. У воденим растворима моксифлоксацин се реагује као амфотерна аминокиселина са изоелектричном тачком $\text{pI}=7,4$. На основу дистрибуционог дијаграма следи да моксифлоксацин постоји у катјонском облику при рН нижим од 8. При рН вишим од 8 је у анјонском облику.



Слика 130. Дистрибуциони дијаграм за ципрофлоксацин

Дистрибуциони дијаграм ципрофлоксацина израчунат је на основу константи протоновања анјона ципрофлоксацина у области рН од 3-12 (Слика 130). На основу

дистрибуционог дијаграма следи да ципрофлоксацин постоји у катјонском облику при рН вредностима нижим од 8. При рН вишим од 8 је у анјонском. На рН 7,4 је у zwitter јонском облику.



Слика 131. Дистрибуциони дијаграм за флероксацин

Из дистрибуционог дијаграма (Слика 131) следи да флероксацин постоји у катјонском облику при рН вредностима нижим од 8. При рН вишим од 8 је у анјонском. На рН 6,9 је у zwitter јонском облику.

5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове дисертације испитане су хидролитичке равнотеже и специјација у растворима алуминијум(III)-јона применом ESI MS спектрометрије и равнотеже и специјација у растворима алуминијум(III)-јона и флуорохинолона (HQ) применом ESI MS спектрометрије, *ms*LDI MS и тандем масене спектрометрије. Сходно добијеним експерименталним резултатима урађена је недвосмислена асигнација на основу односа масе и наелектрисања, изотопских *pattern*-а и расподеле наелектрисања.

Циљ свих ових испитивања био је да се проучи утицај одабраних HQ: флероксацина, моксифлоксацина и ципрофлоксацина на биодистрибуцију алуминијум(III)-јона у људском организму, као и међусобне интеракције флуорохинолонских антибиотика и лекова на бази алуминијума (антацида, вакцина, дијализатних течности).

Детаљним разматрањем добијених експерименталних резултата, њиховом математичком обрадом, коришћењем модела вештачких неуронских мрежа (ANN) и поређењем са литературним резултатима дошло се до следећих закључака:

1. При проучавању хидролизе у растворима алуминијум(III)-јона, концентрације 0,03 до 5,0 mmol/dm³, идентификована су врсте са наелектрисањем +1, +2 и +3, формиране у опсегу рН од 3-6. Мономерне и димерне врсте су доминантне до рН 3,8 вредности. ESI MS спектри указују на формирање малих полимерних врста (Al₃-Al₅) на рН 4,8. Са повећањем рН и концентрације алуминијум(III)-јона идентификују се средњи полимери (Al₆-Al₁₀). Даљим повећањем рН и концентрације алуминијум(III)-јона настају виши полимери (Al₁₁-Al₁₃). Виши полимери су привремене врсте које постоје релативно кратко време након припреме раствора. На рН око 6,4 почиње формирање талоба, што указује да се Keggin-ови полимери прво трансформишу у мање полимере, а затим почиње таложење. Идентификоване полимерне врсте садрже координоване јоне хлора и молекуле воде. Идентификоване врсте у овим експериментима су у складу са описаним врстама у литератури од стране Urabe и сарадника [81].
2. Ефекти хидролизе алуминијум(III)-јона, „идентитет“ и стабилност хидролитичких врста формираних у раствору зависе од експерименталних фактора: природе и концентрације јонског медијума, рН раствора, природе и концентрације базе која се користи да поспешу хидролизу, времена старења и присуства других супстанци (контра јона) које могу интераговати са алуминијум(III)-јоном и/или молекулима воде, концентрације алуминијум(III)-јона. Са старењем раствора број врста у спектру се знатно смањује. Идентификује се само неколико сигнала у спектру који потичу од врста: [Al(OH)₂]⁺, [Al₆(OH)₁₃]⁵⁺, [Al₄(OH)₉]³⁺ и [Al₅(OH)₁₂]³⁺. Старење раствора на рН до 6 у трајању од 7, 15 и 30 дана није дало полимере веће од Al₁₃.
3. Ефекти хидролизе алуминијум(III)-јона, проучавани ESI MS спектрометријом, зависе од инструменталних параметара: брзина протока растварача, температура јонског извора и напон на конусу и на капилари. При тјунирању сви ови параметри су подешавани. Највећи утицај је имао напон на конусу. Најбоље слагање резултата ESI MS са резултатима потенциометрије и ²⁷Al NMR спектроскопијом се добија при напону на конусу до 50V.
4. Врсте које се идентификују на *m/z* 132,86 [AlCl₃+H⁺]⁺ и *m/z* 96,65 [AlCl₂]⁺ нису карактеристичне за раствор, највероватније настају у току процеса небулизације у ESI извору.
5. При проучавању комплексирања у растворима алуминијум(III)-јона и одабраним HQ (флероксацин, моксифлоксацин и ципрофлоксацин) идентификоване су ESI MS

спектрима за концентрационе односе (метал: лиганд) од 2:1 до 1:3 и у рН опсегу од 3,0 до 6,0 мононуклеарне врсте: AlL_2^+ , AlL_2^+ и AlL_3^0 . Мешовити протонувани и хидроксо комплекси су идентификовани и при нижим и при вишим рН вредностима, али полимерне врсте нису нађене у ESI MS спектрима. Идентификоване врсте у ESI MS спектрима су у сагласности са врстама индефикованих у maLDI MS и литературно публикованим резултатима на сличним системима [91, 111].

6. Квантитативном специјацијом дошло се до закључка да је заступљеност молских удела комплексних врста i763/i719 слична као код слободних лиганда i370/i326 што указује на сличне константе комплексирања за L и [L-CO₂], што је у складу са литературним подацима. Истовремено са рачунањем релативних интензитета добијених на основу ESI MS спектра са променом рН, исти обрачун је спроведен за податке добијене потенциометријским мерењима. Сходно литератури у идеалним условима $R_{EQUI} = R_{ESI-MS}$. Разлике које се јављају су последица ESI пертурбација у раствору. Пертурбације у раствору су последица равнотежног помераја у капљици и утицаја рН, концентрације, T, јонске јачине које се дешавају док капљице испаравају. Идентификација пертурбација је од великог значаја да би се што реалније тумачили резултати ESI MS специјације. У овом случају је прилично добро слагање података добијених масеном спектрометријом и потенциометријом што указује да већина комплекса детектованих у ESI MS спектрима добро одсликава равнотежно стање у растворима Al(III)-јона и флуорохинолона.
7. Спектралне линије које илуструју комплексирање алуминијум(III)-јона и HQ и хидролизу алуминијум(III)-јона карактерише правилна Gauss-ова расподела. Профили линија (полуширина спектралних линија на половини висине максималног интензитета) су у већини спектра симетрични. Појава крила спектралних линија је последица чињенице да је као анализатор у свим експериментима коришћен јон трап па многе од линија нису могле бити у потпуности раздвојене. Појава помераја максимума спектралних линија (нпр. m/z 763,27 односно 763,33) је последица чињенице да се ови јони налазе у различитом окружењима у раствору, тј. нису посматрани максимуми изолованих или непокретних атома (јона).
8. 3D добијене на основу примене модела неуронских мрежа јасно показују при којим условима експеримента (концентрационе интервале, интервале рН и запремину додате базе) при којима је релативна заступљеност врсте типа AlL_2 максимална. Дијаграми учења и тестирања мрежа су у доброј сагласности са експерименталним подацима из чега следи да је овај математички softwer моћно оруђе за индификацију скривених релација између промењљивих као и предикцију и тумачење резултата експеримента.
9. На основу maLDI спектра су идентификоване врсте која су потврда мононуклеарних врста идентификованих у ESI MS спектрима, што указује да ове врсте заиста постоје у раствору и да нису последица гасно-фазних реакција. У maLDI спектрима идентификоване су и полимерне врсте, означене као $[2Al^{3+}+5L^-]^+$. Ове врсте највероватније потичу од димерног језгра Al_2L_2 , које се формира у раствору, а кластери са више депротонуваних лиганда се формирају у гасној фази, тј. у plume створеном ласерским зраком. Врста означена као $[2Al^{3+}+5L^-]^+$ се идентификује у систему флероксацина и Al(III)-јона на m/z 1894,77, у систему моксифлоксацина и Al(III)-јона на m/z 2054,36 и у систему ципрофлоксацина и Al(III)-јона, на m/z 1703,88. У maLDI спектрима се индеификује и AlL_3 врста, која је најчешће адукт са јоном натријума или калијума.
10. Резултати тандем масене спектрометрије, MS^n су послужили, након дешифровања фрагментационих pattern-а, за разјашњење структуре комплекса формираних између Al(III)-јона и HQ и места везивања.

11. У MSⁿ експериментима су на parent јоне примењиване високе колизионе енергије што указује да су комплекси Al(III)-јон-флуорохинолони веома стабилни. На стабилност ових комплекса указује и чињеница да у току фрагментације региструју само губици малих неутралних молекула, тј нема кидања везе алуминијум-лиганд. На фрагментационим pattern-има за врсту типа AlL₂ уочава се да Al(III)-јон остаје везан са оба лиганда упркос високим примењеним колизионим енергијама које се крећу и до 80, па и 100 % од максималног rf voltage нарочито када су концентрације компонената у растворима биле реда величине 10⁻⁴ mol/dm³.
12. Постепено формирање Al(III)-флуорохинолонских комплекса и њихова релативно велика заступљеност у поређењу са слободним лигандом, указује да је значајан удео лиганда везан за јон метала, преко карбонилне и карбоксилне групе.
- 13 Резултати ових експеримената су значајни за се расветљавање процеса у гастроинтестиналном тракту када се HQ антибиотици дозирају заједно са лековима на бази алуминијума(антацида, вакцина, дијализатних течности).
- 14 Формирање комплекса између Al(III)-јона и HQ може за последицу имати мању биорасположивост HQ, због смањења интестиналне пропустљивости пошто наелектрисани HQ-метал комплекси тешко продиру кроз интестиналну мукозну мембрану. Са друге стране неутрални комплекси могу продрети кроз мембрану и повећати токсичност алуминијума при дисоцијацији комплекса у крвотоку.

6. РЕФЕРЕНЦЕ

- 1) A. R. Roland, D. E. Low, Fluoroquinolone Antibiotics, Birkhauser Verlag Basel, (2003).
- 2) H. Zhao, H. Liu, J. Qu, J. Colloid Interface Sci. 330, 105, "Effect of pH on the Aluminum Salts Hydrolysis During Coagulation Process: Formation and Decomposition of Polymeric Aluminum Species" (2009)
- 3) G. Berthon, Coord. Chem. Rev. 228,2, 319, Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity (2002)
- 4) J. H. Gross, Mass Spectrometry, A Textbook, Springer, (2004)
- 5) W. L. Budde, Analytical Mass Spectrometry, ACS and Oxford University Press, Washington, D. C. and Oxford, (2001)
- 6) R. M. Smith, Understanding Mass Spectra: A Basic Approach–2nd ed. Wiley Interscience, New Jersey, (2004)
- 7) E. Alison Ashcroft, "An Introduction to Mass Spectrometry", The University of Leeds (2010)
- 8) N. Gali: "Elektrospršenje – jonizacija u masenoj spektrometriji", Kem. Ind. 53 (3) 117, (2004)
- 9) S. J. Gaskell, J. Mass Spectrom. 32, 677, „Electrospray: Principles and Practice“, (1997)
- 10) E. de Hoffmann, V. Stroobant, J. Charette, "Mass Spectrometry Principles and Applications", John Wiley&Sons Ltd, Chichester, (2007)
- 11) R. Cole, "Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications", Wiley Publication, (2010).
- 12) S. Crotti, R. Seraglia, P. Traldi, Eur. J. Mass Spectrom. 17, 85, "Review: Some Thoughts on Electrospray Ionization Mechanisms" (2011)
- 13) V. B. Di Marco, G. G. Bombi, P. Traldi, "Electrospray Mass Spectrometry (ESI-MS) in the Study of Metal-Ligand Solution Equilibria", Mass Spectrom. Review 25, 347, (2006)
- 14) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, Gas Phase Macroions. J. Chem. Phys. 49, 2240, (1968)
- 15) A. Matsumoto, T. Fukumoto, H. Adachi, H. Watarai "Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Metal Complexes. Gas Phase Formation of a Binuclear Copper(II) 5-Br PADAP Complex". Anal. Chim. Acta 390,193, (1999)
- 16) M. C. McMaster LC&MS, A Practical User's Guide, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, (2005)
- 17) F. Hiltenkap, J. P. Katalić, MALDI MS, A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, Co.KGaA, Weinheim, (2007).
- 18) M. Karas, U. Bahr, Mass Spectrometry Reviews, 10, 335, „Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry“, (1991)
- 19) W. Henderson, J. S. McIndoe, Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds: Tools–Techniques–Tips, John Wiley & Sons, (2005)
- 20) J. Vuković, S. Jovanović, M. D. Lechner, Hem. Ind. 61(6) 333 „Karakterizacija Alifatskih Hiper Razgranatih Poliestara MALDI-TOF Masenom Spektrometrijom“, (2007)
- 21) P. J. A. Ruttink, J. K. Terlouw, T. M. Luider, P. C. Burgers, J. Mass. Spectrom. 46, 223, "Structure and Dissociation Characteristics of Metal Chloride Anion Clusters Containing Redox-Active Metal Ions Studied by Laser Desorption and Electrospray Ionization Mass Spectrometry and AB Initio Calculations", (2011)
- 22) L. Molin, R. Seraglia, F. R. Dani, G. Moneti, P. Traldi; Rapid Commun. Mass Spectrom. 25,3091, "The Double Nature of 1,5-Diaminonaphthalene as Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Matrix: Some Experimental Evidence of the Protonation and Reduction Mechanisms" (2011)

- 23) P. Traldi, R. Flamini, *Mass Spectrometry In Grape And Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. Publication, (2010)
- 24) R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrometry Reviews* 17;337 by John Wiley and Sons, "Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry", (1998)
- 25) C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons Inc. Publication, New Jersey, (2007)
- 26) D. J. Douglas, A. J. Frank, D. Mao „Linear Ion Traps in Mass Spectrometry“. *Mass Spectrom. Reviews* 24,1, (2005)
- 27) M. B. Christopher, D. C. Duckworth, D. H. Smith, *Inorganic Mass Spectrometry, Fundamentals and Applications*, Vol 23 National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, by Marcel Dekker Inc. (K. L. Sutton, K. L. Ackley, J. A. Caruso) *Elemental Speciation By Inorganic Mass Spectrometry*, 373, *Inorganic TOF MS*, 447, (2000)
- 28) Mc Lafferty FW(ed) *Tandem Mass Spectrometry*: John Wiley Sons, (1983)
- 29) Base Peak-Glossary of Terms in Mass Spectrometry, publ. by Wiley, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/ms/news/glossary.html>, (2011)
- 30) J. C. Lindon, G. E. Tranter, J. L. Holmes, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, vol (1-3), Academic Press (2000); WMA Niessen, Hyphen Mass Spec Consultancy, Leiden, The Netherland, 1404, "Mass Spectrometry, MS-MS and MSⁿ",(1999)
- 31) E. de Hoffman, *J. Mass Spectrometry*, Vol 31, 129, "Tandem Mass Spectrometry: A Primer" (1996)
- 32) J. C. Lindon, G. E. Tranter, J. L. Holmes, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, vol (1-3), Academic Press (2000); H-F Grutzmacher, *Mass Spectrometry, Fragmentation in Mass Spectrometry*, 637, Universitat Bielefeld, Germany, (1999)
- 33) J. M. Wells, S.A. McLuckey „Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins“. *Meth. Enzymol.* 402, 148, (2005)
- 34) H. J. Cooper, K. Hakansson, A. G. Marshall, „The Role of Electron Capture Dissociation in Biomolecular Analysis“, *Mass Spectrom. Rev.* 24, 201, (2005)
- 35) IUPAC gold book definition of metastable ion (in mass spectrometry)
- 36) IUPAC gold book definition of transient (chemical) species
- 37) L. Sleno, D. A. Volmer, „Ion Activation Methods for Tandem Mass Spectrometry“. *J. Mass Spectrom.* 39 ,10,1091, (2004)
- 38) K.K. Murray, *J. Chromatogr. A* 1217, 3922, *Glossary of Terms for Separations Coupled to Mass Spectrometry*, (2010)
- 39) A. Mallet, S.Down, *Dictionary of Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons,Chicester, (2009)
- 40) F. W. McLafferty, F. Tureček, *Interpretation of Mass Spectra*, University of Science Books, Sausalito, California, (1992)
- 41) N.C. Contino, E. E. Pierson, D. Z. Keifer, M. F. Jarrold, "Charge Detection Mass Spectrometry with Resolved Charge States", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 ,101, (2013)
- 42) V. T. Andriole, *The Quinolones*, 3rd edition, Academic Press, London, (2000)
- 43) L. J. Ming, "Structure and Function of Metalloantibiotics", *Med. Res. Rev.* 6,697, (2003)
- 44) Y. Kawai, K Matsubayashi, H. Hakusui, "Interaction of Quinolones with Metal Cations in Aqueous Solution", *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1425, (1996)
- 45) D. L. Ross, C. M. Riley, „Aqueous Solubilities of Some Various Substituted Quinolone Antimicrobials“, *Intern.J. Pharm.* 63, 237, (1990)
- 46) S. Lecomte, M. H. Barton, M. T. Chenon, C. Coupry, N. J. Moreau, „Effect of Magnesium Complexation by Fluoroquinolones on Their Antibacterial Properties“, *Animicrob. Agents Chemother.* 38, 2810, (1994)

- 47) G. Palu, S. Valisena, G. Ciarrocchi, B. Gatto, M. Palumbo, „Quinolone Binding to DNA is Mediated by Magnesium Ions“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9671, (1992).
- 48) J. H. Borrell, M. T. Montero, „Calculating Microspecies Concentration of Zwitterion Amphoteric Compounds: Ciprofloxacin as Example“, J. Chem. Educ. 74, 11, 1311, (1997)
- 49) K. T. Novak, B. Noszal, I. Hermecz, G. Kereszturi, B. Podanyi, G. Szasz, „Protonation Equilibria of Quinolone Antibacterials“, J. Pharm. Sci. 79, 11, 1023, (1990)
- 50) Z. Qiang, C. Adams, „Potentiometric Determination of Acid Dissociation Constants (pKa) for Human and Veterinary Antibiotics“, Waters Research, 38, 2874, (2004)
- 51) H. R. Park, T. H. Kim, K. M. Bark, „Physicochemical properties of Quinolone Antibiotics in Various Environments“, Eur. J. Med. Chem. 37, 443, (2002).
- 52) P. T. Đurđević, M. J. Stankov, D. Stankov „Fluorescence Reaction and Complexation Equilibria Between Norfloxacin and Aluminium(III)-Ion in Chloride Medium“, Anal. Chim. Acta 300, 253, (1995)
- 53) G. Popović, L.J. Milovanović, V. Kapetanović, „Study of Acido-Base Equilibria of Fleroxacin“, J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 859, (1998)
- 54) Moxifloksacine Bayer, AG, Business, GROUP Pharma, Marketing Authorization Application, Data on File, November (2000)
- 55) M. H. Langlois, M. Montagut, J. P. Dubost, J. Grellet, M. C. Saux, „Protonation Equilibrium and Lipophilicity of Moxifloxacin“, J. Pharm. Biomed. Anal. 37, 389, (2005)
- 56) D. A. Allemandi, F. Alovero, R. H. Manzo, „Formulation of a Neutral Solution of Ciprofloxacin upon Complexation with Aluminum“, Il Farmaco 54, 758, (1999)
- 57) P. G. Higgins, A. C. Fluit, F.-J. Schmitz, “Fluoroquinolones: Structure and Target Sites”, Current Drug Targets, 4, 181, (2003)
- 58) M. J. P. Melo, F. R. Varanda, R. Dohrn, I. M. Marrucho, “Solubility of Ciprofloxacin and Moxifloxacin in Different Solvents: The Effect of the HCl Group”, 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Enpromer, 14th–18th August, Brasil, 1-5
- 59) Y. Wang, K. Yu, S. Wang, „Vibrational Spectra Study on Quinolones Antibiotics“, Spectrochim. Acta Part A, 65, 159, (2006)
- 60) P.T. Đurđević, M. J. Stankov, J. Odović, „Study of Solution Equilibria Iron(III) Ion and Ciprofloxacin in Pure Nitrate Ionic Medium and Micellar Medium“, Polyhedron 19, 1085, (2000)
- 61) C. M. Riley, D. L. Ross, D. Vander Velde, F. Takusagawa, “Characterization of the Complexation of Fluoroquinolone Antimicrobials with Metal Ions by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy”, J. Pharm. Biomed. Anal. 11, 49, (1993)
- 62) A. K. Chattah, Y. G. Linck, G. A. Monti, P. R. Levstein, S. R. Breda, R. H. Manzo, M. E. Olivera, “NMR and IR Characterization of the Aluminum Complexes of Norfloxacin and Ciprofloxacin Fluoroquinolones”, Magnetic Res. Chem. 45, 850, (2007)
- 63) M. Sakai, A. Hara, S. Anjo, M. Nakamura, “Comparison of the Complexation of Fluoroquinolone Antimicrobials with Metal Ions by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy”, J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 1057, (1999)
- 64) T.J. Yoshikawa, S. Rajagopalan, Antibiotic Therapy for Geriatric Patients; T.J. Marrie and S. Fryters, “Quinolones”, 167, Taylor & Francis Group, (2006)
- 65) I. Filipović, S. Lipanović, Opća i anorganska kemija, I i II dio, Školska knjiga, Zagreb, (1985)
- 66) J.M. Elders, PHD thesis, The University of Leeds, “NMR Studies of the Polymeric Cations Produced by the Hydrolysis of Aqueous Aluminium (III) Salt Solutions” (1986)
- 67) G. Berthon (Ed.), Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids. Bioinorganic Chemistry. Vols. I and II. Marcell Dekker, N.Y. (1995)

- 68) A. Martell, R. D. Hancock, R. M. Smith, R. J. Motekaitis. *Coord. Chem. Rev.* 149, 311, "Coordination of Al (III) in the Environment and in Biological Systems" (1996)
- 69) A. E. Martell, R. J. Motekaitis, R. M. Smith. *Polyhedron*, 9, 171 "Aluminium complexes of hydroxyaliphatic and hydroxyaromatic ligands in aqueous systems—some problems and solutions" (1990)
- 70) R. J. P. Williams, *Coord. Chem. Rev.* 149, 1, "Aluminium and Biological Systems: An Introduction" (1966)
- 71) T. Kiss, T. Jakusch, M. Kilyen, E. Kiss, A. Lakatos, *Polyhedron*, 19, 2389, "Solution Speciation of Bioactive Al(III) and VO(IV) Complexes" (2000)
- 72) Aluminum Compounds, Review of Toxicological Literature, Integrated Laboratory Systems, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina (2000).
- 73) S. Dayde, D. Champmartin, P. Rubini, G. Berthon. *Inorg. Chim. Acta*, 339, 513, "Aluminium Speciation Studies in Biological Fluids. Part 8. A Quantitative Investigation of Al(III)–Amino Acid Complex Equilibria and Assessment of Their Potential Implications for Aluminium Metabolism and Toxicity" (2002)
- 74) F. J. C. Rossotti, H. Rossotti. *The Determination of Stability Constants*, McGraw Hill Inc. New York, 58, (1961)
- 75) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 19th Edition, Merck & Co. New Jersey, (2003)
- 76) P. Bulat. „Uticaj metala na metabolizam glutationa u eritrocitima pri profesionalnom ekspoziciji“, *Doktorska disertacija*, Medicinski fakultet Beograd, (1994)
- 77) S. Dayde, V. Brumas, D. Champmartin, P. Rubini, G. Berthon. *J. Inorg. Biochem.* 97,1, 104, Aluminum Speciation Studies in Biological Fluids: Part 9. A Quantitative Investigation of Aluminum(III)–Glutamate Complex Equilibria and Their Potential Implications for Aluminum Metabolism and Toxicity (2003)
- 78) P. L. Hayden, A. J. Rubin, In *Aqueous Environmental Chemistry of Metals*, 317. ed. A. J. Rubin, Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, (1976), *Chemistry of Metals*, 317. ed. A. J. Rubin, Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, (1976)
- 79) A. Sarpola, *The Hydrolysis of Aluminum, a Mass Spectrometric Study*, PhD Thesis, University of Oulu, Finland, *Acta Univ. Oul. C* 279, 1, (2007)
- 80) T. Urabe, T. Tsugoshi, M. Tanaka, *J. Mol. Liq.* 143, 70, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry Investigation of the Blocking Effect of Sulfate on the Formation of Aluminum Tridecamer", (2008)
- 81) T. Urabe, M. Tanaka, S. Kumakura, T. Tsugoshi, *J. Mass. Spectrom.* 42, 591, "Study on chemical speciation in aluminum chloride solution by ESI-Q-MS" (2007)
- 82) J. Y. Bottero, J. M. Cases, F. Fiessinger, J. E. Poirier, *J. Phys. Chem.* 84, 2933, "Studies of Hydrolyzed Aluminum Chloride Solutions. 1. Nature of Aluminum Species and Composition of Aqueous Solutions" (1980)
- 83) H. Zhao, H. Liu, J. Qu, *J. Coll. Intef. Sci.* 330, 105, "Effect of pH on the aluminium salt hydrolysis during coagulation process: Formation and decomposition of polymeric aluminum species" (2009)
- 84) P. A. D'Agostino, J. R. Hancock, L. R. Provost, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1038, "Electrospray Mass Spectrometric Characterization of Fluoroquinolone Antibiotics: Norfloxacin, Enoxacin, Ciprofloxacin and Ofloxacin", (1995)
- 85) J. Zhang, J. Wang, J. S. Brodbelt, *J. Mass Spectrom.* 40, 350, "Characterization of Flavonoids by Aluminium Complexation and Collisionally Activated Dissociation", (2005)
- 86) V. B. Di Marco, G. G. Bombi, M. Tubaro, P. Traldi, "Electrospray Mass Spectrometry in the Studies of Aluminium(III)-ligand Solution Equilibria", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2039, (2003)

- 87) D. L. Ross, C. M. Riley, Intern. J. Pharm. 87, 203, "Physicochemical Properties of Fluoroquinolone Antimicrobials III. Complexation of Lomefloxacin with Various Metal Ions and the Effect of Metal Ion Complexation on Aqueous Solubility" (1992)
- 88) E. J. Alvarez, V. H. Vartanian, J. S. Brodbelt, Anal. Chem. 69, 1147, "Metal Complexation Reaction of Quinolone Antibiotics in Quadrupole Ion Trap", (1997)
- 89) R. E. March, H. Li, O. Belgacem, D. Papanstasion, Internat. J. Mass Spectrom. 262, 51, "High Energy and Low Energy Collision Induced Dissociation of Protonated Flavonoids Generated by MALDI and by ESI", (2007)
- 90) M. Brindell, S.K.C. Elmorth, G. Stochel, Journ. Inorg. Biochem. 98, 1367, "Mechanism of Information of the Reaction of Cis and Trans $[RuCl_2(DMSO)_4]$ with d(T2GGT2) derived from MALDI TOF and HPLC studies", (2004)
- 91) M. Petković, A. Vujačić, J. Schiller, Ž. Bugarčić, J. Savić, V. Vasić, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23:1467, "Application of Flavonoids-Quercetin and Rutin-as New Matrices for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometric Analysis of Pt(II) and Pd(II) Complexes", (2009)
- 92) M. Petković, B. Petrović, J. Savić, Ž.D. Bugarčić, J. Dimitrić-Marković, T. Momić, V. Vasić, Internat. J. Mass Spectrom. 290, 39, "Flavonoids as Matrices for MALDI-TOF Mass Spectrometric Analysis of Transition Metal Complexes" (2010)
- 93) Xcalibur version 2.0.7, Thermo Scientific, (2008)
- 94) C. F. Baes, R. E. Mesmer; The Hydrolysis of Cations, John Wiley & Sons, New York, (1976)
- 95) A. Sarpola, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela, R. S. Laitinen, J. Mass Spectrom. 39, 423, "Identification of the hydrolysis products of $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ by electrospray ionization mass spectrometry" (2004)
- 96) M. Ćirišan, Određivanje Štarkovih parametara spektralnih linija Xe II u plazmi impulsnog luka, Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, (2006)
- 97) J. K. Patel, C. B. Read, [Handbook of the Normal Distribution](#), New York: Dekker, (1982)
- 98) M. Dimitrijević, Analiza Štarkovih linija argona, Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Fizički fakultet (1976)
- 99) <http://www.mathworks.com/product/neural-network/>
- 100) M. Milivojević, S. Stopić, B. Friedrich, B. Stojanović, D. Drndarević, "Computer Modeling of High Pressure Leaching Process of Nickel Laterite by Design of Experiments and Neural Networks", Inter. J. Min. Matall. Mater. 19, 7, 584, (2012)
- 101) D. Drndarević, "Modelovanje i optimizacija procesa metalurgije praha pomoću neuronskih mreža", Doktorski rad, Mašinski fakultet, Beograd, (1996)
- 102) M. Milivojević, D. Drndarević, S. Stopić, V. Simić, B. Stojanović, Modeling stell annealing process based on BP Neural Network, 3-ći. SED 2010, Uzice, (2010)
- 103) Veysey, K. Harrata, Finnigan LCQ Advantage-Training Manual, Iowa State University (2006)
- 104) [www.lamondlab.com/.../MassSpectrometry/charge state...](http://www.lamondlab.com/.../MassSpectrometry/charge%20state...)
- 105) Y.-H. Tseng, C. Uetrecht, A. J. R. Heck, W.-P. Peng, Anal. Chem. 83 (6), 1960, "Interpreting the Charge State Assignment in Electrospray Mass Spectra of Bioparticles" (2011)
- 106) M. Rainer, M. N. Qureshi, G. K. Bonn, Anal. Bioanal. Chem. 400, 2281, "Matrix Free and Material Enhanced Laser Desorption/Ionization mass Spectrometry for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds", (2011)
- 107) J. W. Morgan, J. M. Hettick, D. H. Russell, "Peptide Sequencing by MALDI 193-nm Photodissociation TOF MS", Meth. Enzymol. 402, 186, (2005)
- 108) V.A. Nazarenko, V.P. Antonovich, E.M. Nevskaya, "Gidroliz Ionov Metallov v Razbavlennykh Rastvorakh", Atomizdat, Moscow, (1979)

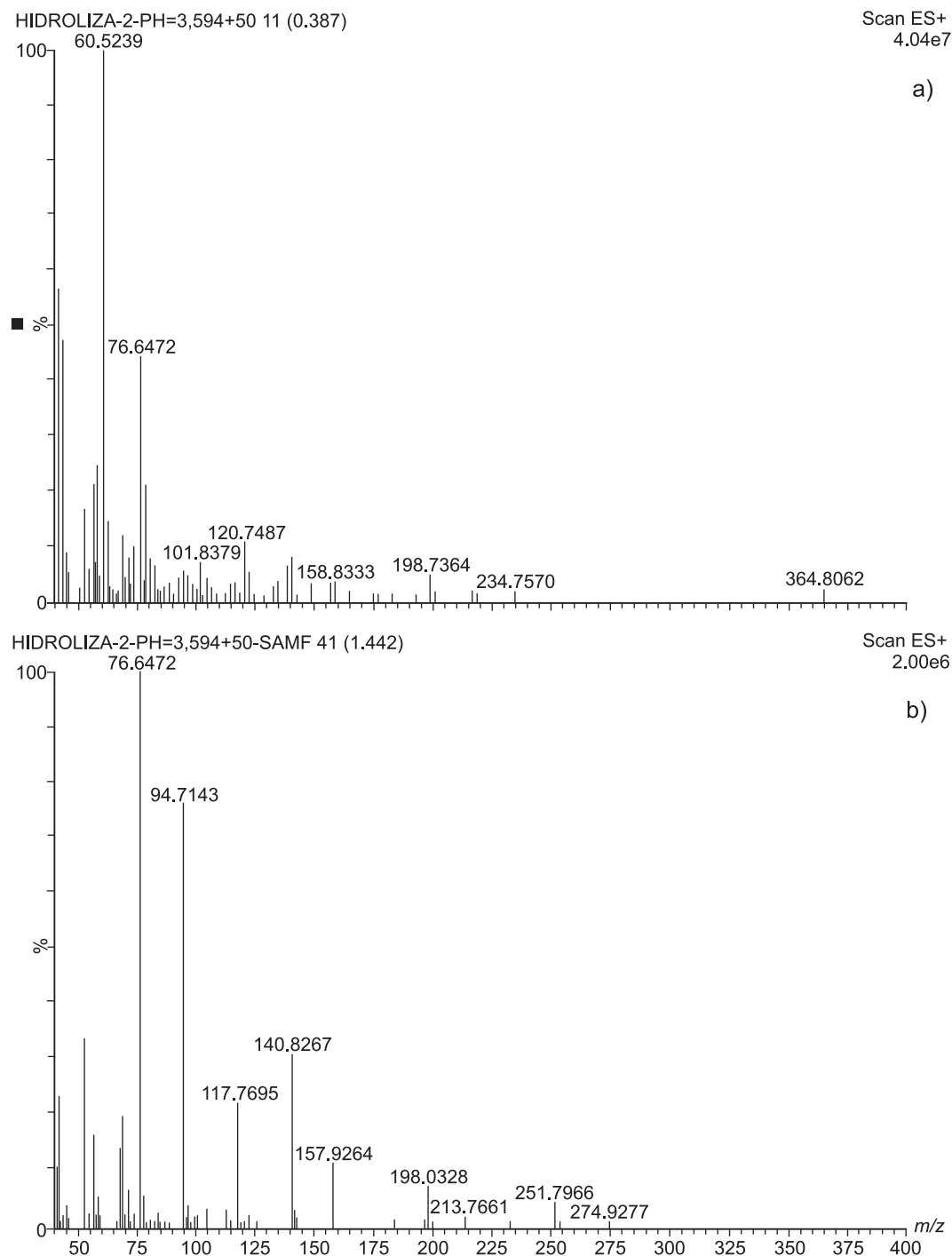
- 109) P. L. Hayden, A. J. Rubin, "Systematic Investigation of the Hydrolysis and Precipitation of Aluminum (III)-ion", In *Aqueous Environmental Chemistry of Metals*, Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, (1974)
- 110) C. Orvig, "The Aqueous Coordination Chemistry of Aluminum", In *Coordination Chemistry of Aluminum*, 85, Ed. G. H. Robinson, VCH Publishers, New York, (1993)
- 111) V. B. Di Marco, L. Ravenue, A. Dean, P. Traldi, "Perturbations Produced by Electrospray Ionization Mass Spectrometry in Speciation of Aluminium (III) 1,6 dimethyl -4-hydroxy-3-pyridinecarboxylate Aqueous Solutions", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24,868, (2010)
- 112) A. Sarpola, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela, R. S. Laitinen, J. Rämö, *J. Mass. Spectrom.* 39, 1209, "Identification and Fragmentation of Hydrolyzed Aluminum Species by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry" (2004)
- 113) A. Sarpola, H. Hellman, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela, J. Rämö, J. Saukkoriipi, *Polyhedron*, 26, 2851, "Hydrolysis products of water treatment chemical aluminium sulfate octadecahydrate by electrospray ionization mass spectrometry", (2007)
- 114) <http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/mplus2>
- 115) P. M. Bertsch, D. R. Parker, "Aqueous Polynuclear Aluminum Species", In *The Environmental Chemistry of Aluminum*, 117, ed. G. Sposito, CRC Press, Inc. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, (1996)
- 116) G. Fu, L. F. Nazar, A. D. Bain, *Chem. Mater.* 3, 602, Aging processes of alumina sol-gels: Characterization of New Aluminum Polyoxycations by Aluminum-²⁷NMR spectroscopy (1991)
- 117) W. H. Casey, J. R. Rustad, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 35, 21, "Reaction dynamics, molecular clusters, and aqueous geochemistry". (2007)
- 118) D. K. Nordstrom, H. M. May, "Aqueous Equilibrium Data for Mononuclear Aluminum Species", In *The Environmental Chemistry of Aluminum*, 39. ed: G. Sposito, CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, FL. (1996)
- 119) V. B. Di Marco, G. G. Bombi, S. Zambon, P. Traldi, *J. Mass Spectrom.* 44, 120, "Metal-Ligand Solution Equilibria Studied by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry –Effect on Instrumental Parameters", (2009)
- 120) J. W. Akitt, J. M. Elders, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 10, (1986)
- 121) J. W. Akitt, J. M. Elders, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* 1347, Multinuclear magnetic resonance studies of the hydrolysis of aluminium(III). Part 8. Base hydrolysis monitored at very high magnetic field (1988)
- 122) J. W. Akitt, A. Farthing, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 1606, "Aluminium-27 nuclear magnetic resonance studies of the hydrolysis of aluminium(III). Part 5. Slow hydrolysis using aluminium metal" (1981)
- 123) J. W. Akitt, *Progr. Nucl. Magn. Res. Spectrosc.* 21, 1, (1989)
- 124) J. W. Akitt, N. N. Greenwood, B. L. Khandelwal, G. D. Lester, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1972, 604, ²⁷Al nuclear magnetic resonance studies of the hydrolysis and polymerisation of the hexa-aquo-aluminium(III) cation (1972)
- 125) J. A. Tossell, *J. Magn. Reson.* 135, 203, The Effects of Hydrolysis and Oligomerization upon the NMR Shieldings of Be⁺² and Al⁺³ Species in Aqueous Solution (1998)
- 126) J. F. Keggin, *Proc. R. Soc. Lond.* 144, 75. "Structure and formula of 12-phosphotungstic acid" (1934)
- 127) J. F. Keggin, *Nature*, 131, 908, "Structure of the molecule of 12-phosphotungstic acid" (1933)
- 128) S. Bi, C. Wang, Q. Cao, C. Zhang, *Coord. Chem. Rev.* 248, 441, Studies on the mechanism of hydrolysis and polymerization of aluminum salts in aqueous solution: correlations between the "Core-links" model and "Cage-like" Keggin-Al₁₃ model (2004)

- 129) B. Shi, G. Li, D. Wang, H. Tang, *Sep. Purif. Technol.* 54, 88, Separation of Al₁₃ from polyaluminum chloride by sulfate precipitation and nitrate metathesis. (2007)
- 130) J.Y Bottero, M. Axelos, D. Tchoubar, J. M Cases, J. J. Fripiat, F. Fiessinger, *J. Colloid Inter. Science*, 117, 47, Mechanism of formation of aluminum trihydroxide from keggin Al₁₃ polymers, (1987)
- 131) D. J. Wesolowski, D. A. Palmer, *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 2947, Aluminum speciation and equilibria in aqueous solution: V. Gibbsite solubility at 50°C and pH 3–9 in 0.1 molal NaCl solutions (a general model for aluminum speciation; analytical methods) (1994)
- 132) D. A. Palmer, D. J. Wesolowski, *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 2929, Aluminum speciation and equilibria in aqueous solution: III. Potentiometric determination of the first hydrolysis constant of aluminum(III) in sodium chloride solutions to 125°C (1993)
- 133) W. Stumm, J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, (1981)
- 134) R. C. Turner, *Can. J. Chem.* 54, 1910, A second species of polynuclear hydroxyaluminum cation, its formation and some of its properties, (1976)
- 135) P. L. Brown, R. N. Sylva, G. E. Batley, J. Ellis, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1967, The hydrolysis of metal ions. Part 8. Aluminium (III), (1985)
- 136) P. L. Hayden, A. J. Rubin, In *Aqueous-Environmental Chemistry of Metals*; Rubin, A. J. ed.; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, 317(1976)
- 137) L.-O Öhman, S. Sjöberg, *Coord. Chem. Rev.* 149, 33, “The experimental determination of thermodynamic properties for aqueous aluminium complexes”(1996)
- 138) N. B. Milić, Ž. D. Bugarčić, P. T. Djurdjević, *Canad. J.Chem.* 69, 28, Hydrolysis of aluminum(III) ion in sodium nitrate medium (1991)
- 139) P. Cañizares, F. Martínez, C. Jiménez, J. Lobato, M. A. Rodrigo *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 8749, Comparison of the Aluminum Speciation in Chemical and Electrochemical Dosing Processes, (2006)
- 140) W. O. Parker, R. Millini, I. Kiricsi, *Inorg. Chem.* 36, 571, Metal Substitution in Keggin-Type Tridecameric Aluminum–Oxo–Hydroxy Clusters (1997)
- 141) V. B. Di Marco, G. G. Bombi, M. Ranaldo, P. Traldi, “Metal-ligand Solution Equilibria Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Correlation between Ion Intensity and Acid-base Equilibria in Solution”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21,3825,(2007) G. Johansson, *Acta Chem. Scand.* 14, 771, The Crystal structure of some basic aluminum salts (1960)
- 142) V. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschappat, C. Grivet, E. Bourgoigne, L. A. Leuthold, *J. Mass Spectrom.* 39, “Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer for the Analysis of Small Molecules and Macromolecules”, (2004)
- 143) B. Urbaniak, Y. Mrestani, Z. J. Kokot, R. H. Neubert, “Investigation of Interaction of Fluoroquinolones with Aluminum, Iron and Magnesium Using Capillary Zone Electrophoresis”, *Chromatographia* 65, 489, (2007)
- 144) S. C. Wallis, B. G. Charles, L. R. Gahan, L. J. Filippich, M. G. Bredhauer, P. A. Duckworth, “Interaction of Norfloxacin with Divalent and Trivalent Pharmaceutical Cations. In vitro Complexation and in vivo Pharmacokinetic Studies in the Dog”, *J. Pharm. Sci.* 85, 803, (2000)
- 145) Z. F. Chen, R. G. Xiong, J. L. Zuo, Z. Guo, X. G. You, H. K. Fun, “X-ray Crystal Structure of Mg²⁺ and Ca²⁺ Dimers of the Antibacterial Drug Norfloxacin”, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 4013, (2000)
- 146) I. Turel, “The Interactions of Metal Ions with Quinolone Antibacterial Agents”, *Coord. Chem. Rev.* 232, 27, (2002)
- 147) P. Neta, B. Godugu, Y. Liang, Y. Smanso, X. Zang, S. E. Stein, “Electrospray Tandem Quadrupole Fragmentation of Quinolone Drugs and Related Ions. On the Reversibility of Water Loss from Protonated Molecules”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 3271, (2010)

- 148) A Serafin, A Stanczak The Complexes of Metal Ions with Fluoroquinolones, *Russ. J. Coord. Chem.* 35: 81-95. (2009)
- 149) P. T. Đurđević, Lj. Joksović, R. Jelić, A. Đurđević M. J. Stankov, *Chem. Pharm. Bull.* 55,1689, "Solution Equilibria between Aluminium(III) ion and Some Fluoroquinolone Family Members (2007)
- 150) B. Urbaniak, Z. J. Kokot, *Analytica Chimica Acta* 647, 54, "Analysis of the Significantly Influence the Stability of Fluoroquinolone–Metal Complexes,(2009)
- 151) P. T. Đurđević, M. J. Stankov, „Study of Solution Equilibria Between Aluminum(III)-ion and Ofloxacin“, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 501, (1999)
- 152) P. Calza, C. Medana, F. Carbone, V. Giancotti, C. Baiocchi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1533, Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage mass spectrometry, (2008)
- 153) T. LeRiche, J. Osterodot, D. A. Volner, *Rapd Commun. Mass Spectrom.* 15:6 08-614, "An Experimental Comparison of Electrospray Ion Trap and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Post –Source Decay Mass Spectra for the Characterization of Small Drug Molecules“, (2001)
- 153) K. Vishwanathan, M. G. Bartlett, J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30,961 „Determination of Moxifloxacin in Human Plasma by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry“, (2002)
- 154) L. Pettit, J. K. Powell, *Stability Constant Database and Mini-SCDatabase, Version 5.8, IUPAC and Academic Software, Otley, UK, (2003)*
- 155) R. M. Smith, A. E. Martell, R. J. Motekaitis, *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 8.0. for Windows U.S. National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, (2004)*
- 156) D. J. Leggett (ed), *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*
- 157) *SC-database (IUPAC stability constants database) IUPAC and Academic Software, Leeds, UK, (2004)*
- 158) K. Vishwanathan, M. G. Bartlett, J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30,961 „Determination of Moxifloxacin in Human Plasma by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry“, (2002)
- 159) M. F. Tuutunji, H. M. Ibrahim, M. H. Khabbas, L. T. Tutunji, *J. Chromatogr. B*, 877, 1689, Simultaneous determination of bisoprolol and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry (2009)
- 160) R.K. Boyd, C. Basic, R.A. Bethem, *Trace Quantitative Analysis By Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons, New York, New York, April 2008.
- 161) E. M. Golet, A. C. Alder, A. Hartmann, T. A. Ternes, W. Giger, *Anal.Chem.*73, 3632, Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection (2001)

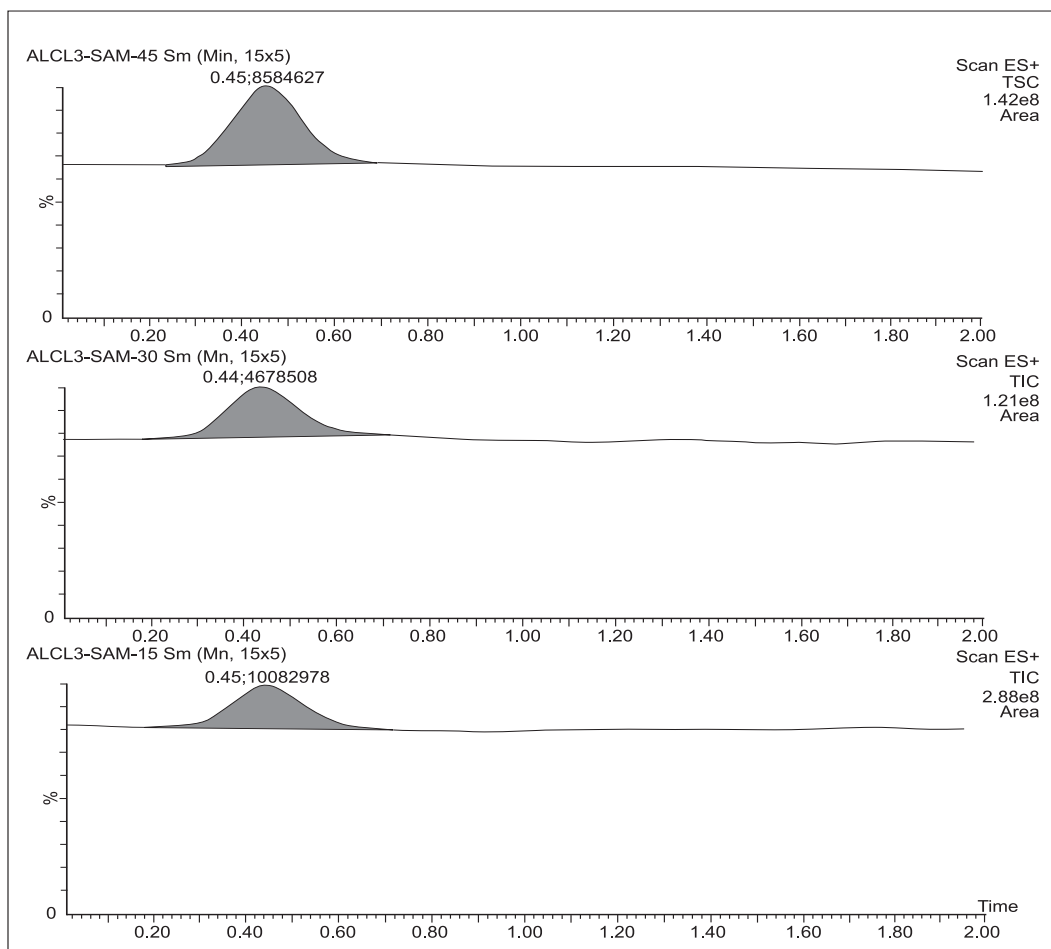
7. ПРИЛОГ

Снимљени су ESI MS спектри са различитом мобилном фазом: ацетонитрилу и метанолу.



Слика 1П: ESI MS спектри $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ AlCl}_3$ раствор, pH=3,594, 50 V

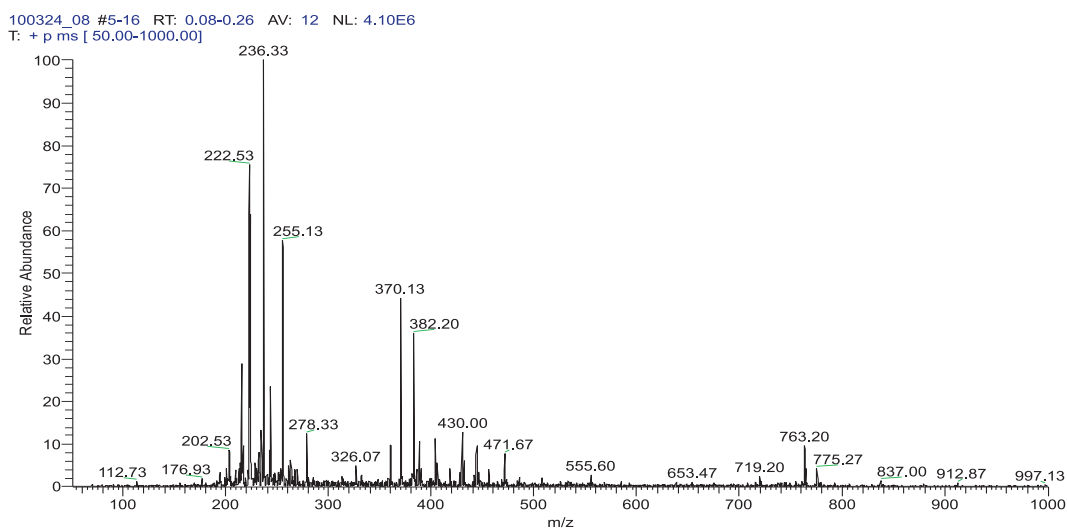
Са Сlike 1П се уочава да спектар на а) снимљен са ацетонитрилом има много већи број линија неголи б) спектар исте концентрације истог рН снимљен са метанолом.



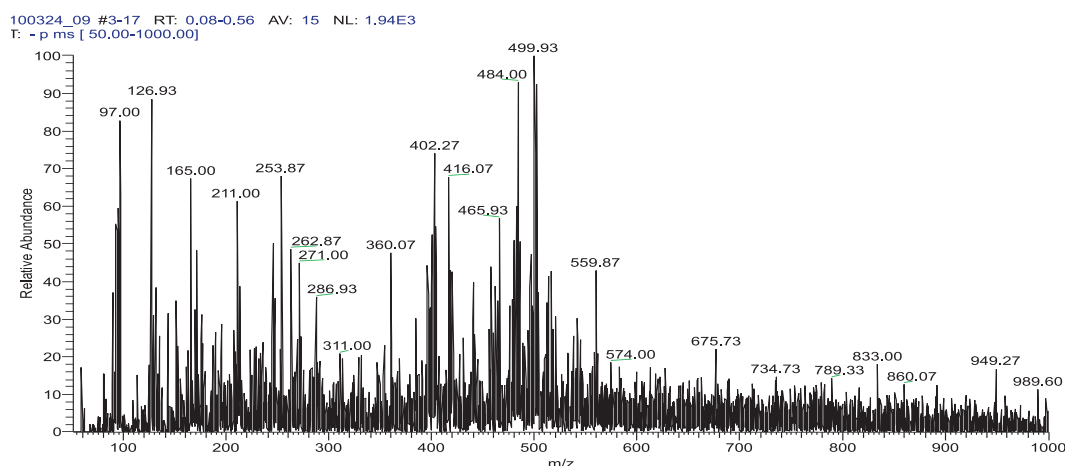
Слика 2 П: ТИС хроматограм AlCl_3 раствора чији су ESI MS спектри дати у поглављу Експериментални део.

На Слици 2П уочава се да површине испод пикова у приказаним хроматограмима расту са порастом напона на конусу.

ESI MS СПЕКТРИ



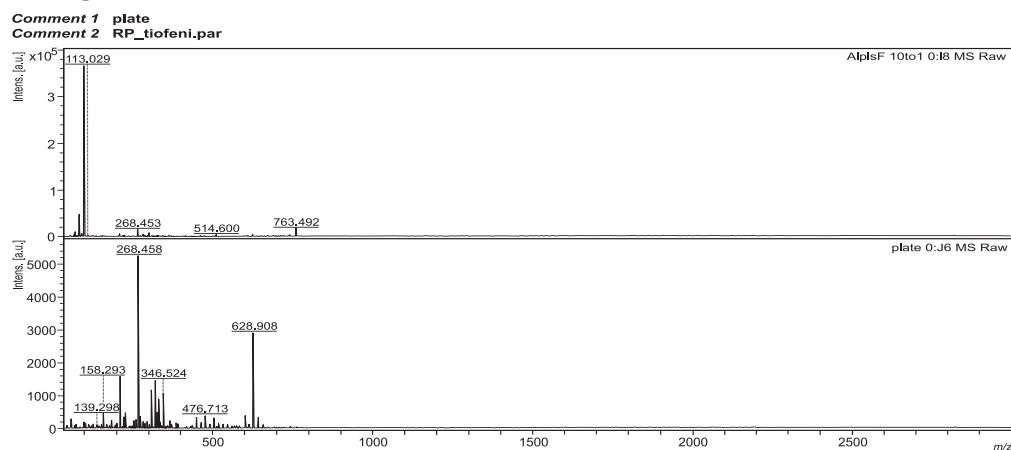
Слика 3П. ESI MS спектар раствора $\text{C}_{\text{Al}}:\text{C}_{\text{Floro}}=1,3:1$, $\text{pH}=4,88$, +esi, централна тачка



Слика 4П. ESI MS спектар раствора $C_{Al}:C_{Flero}=1,3:1$, $pH=4,88$, -esi mod, централна тачка.

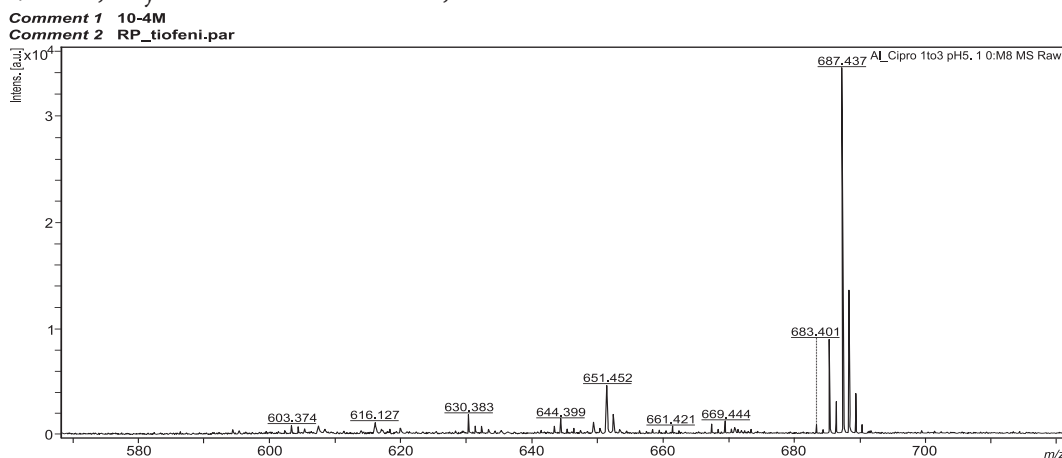
На Слици 4П је спектар раствора концентрационог односа $C_{Al}:C_{Flero}=1:1,3$, $pH=4,88$, снимљен у негативнома моду идентификују се хидролитичке врсте: $311,07 [Al_4H_8O_{10}Cl]^-$ тетрамерна хидролитичка врста, $286,93 [Al_3H_{11}O_{10}Cl]^-$ тримерна, $262,87$ потиче од $[Al_2O_2H_2Cl_5]^-$ врсте.

MALDI СПЕКТРИ



Слика 5П: MALDI спектри: а) комплекс где је метал у великом вишку 10 Al:1flero б) спектар подлоге

Када је метал у великом вишку у односу на лиганд формира се само једна значајна врста m/z 763, чији интензитет износи $0,2 \times 10^5$ а. у.



Слика 6П: MALDI спектар 1Al:3cipro, $pH=5,10$

На Слици 6П уочава се да је најзатупљенија врста AlL_2 на m/z 687.

Табела 1.П. Тандем масена спектрометрија раствора
 $C_{Al}:C_{cipro} = 1:3$, $pH=4.99$, $C_{Al^{3+}} = 2.7 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ у смеси вода и метанол

CID (eV)	MS (abundance %)	MS ² (abundance %)	Разлика MS-MS ²	MS ³ (abundance %)	Разлика MS ² -MS ³	врсте
40	688,00	660,14 (100%) 641,14 562,67 363,87	28=CO или C ₂ H ₄ 47↑=19 126↑=79 (78) C ₆ H ₆ 325↑=199	660,86(100%) 643,14↑=17,72	17 =OH	AlL ₂ ⁺
80	688,00	660,60 (100%)	27,4 ≈CO или C ₂ H ₄	674,50↑=14 660,67(100%)↓17=OH 643,10↑=8 635,18↑=270 365,31	17,5↓7,92 25,42 295,3	AlL ₂ ⁺
100	688,00	660,60 (100%)	27,4 ≈CO или C ₂ H ₄	660,63 643,36=17,27 356,66 =303,94	28=CO или C ₂ H ₄ 44,64=CO ₂ 332,34	AlL ₂ ⁺
30→45 за MS ³ опсег 190-1300	700,00	688,28 657,09 630,80 (100) 612,95 483,57 380,83 331,98 230,81	12↑=31 43↑=27 70 88↑=18=H ₂ O 217↑=129 320↑=103 369↑=49 470↑=101	630,86(100%) 613,00↑=17,86=H ₂ O 592,77↑=21 380,78↑=212 363,27↑=17=OH 313,25↑=50	17,8=H ₂ O 38,13 250,12 267,63 317,65	
30	993,00	976,02 860,41 828,69 821,05 677,29 661,77	17=OH 133 165 172 316 332	636,76 348,29 332,04 287,04		AlL ₃ ⁺
35	1057,22	1029,69 1013,02(100%) 725,41 686,98	28=CO ₂ ↑16,7 44=CO ₂ 332 370↑38			AlL ₃ ⁺

Табела 2П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{Al}:C_{cipro} = 1:3$,
 концентрација $C_{Al^{3+}} = 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $pH = 5,26$

CID (eV)	MS (%) (abundance)	MS ² (abundance %)	Разлика MS-MS ²	MS ³ (abundance %)	Разлика MS ² -MS ³	pH/ species
35	346,00	332,04 314,11 302,10	14↑18= H ₂ O 32↑12 44=CO ₂			AlL ₂ ²⁺
30	687,00	667,09	20			AlL ₂ ⁺
35	687,00	660,51 604,11	27↑56 83			AlL ₂ ⁺
40	687,00	667,17 660,52 (100%) 604,25	20 27 83↑56	549,98 (100%)	110,52	AlL ₂ ⁺
35	716,00	703,03 689,07 672,00 628,05 605,05	13 27 44=CO ₂ 88 111↑23			

Табела 3П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{Al}:C_{flero}=2:1$, $pH=4.26$,
 $C_{Al^{3+}} = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

CID (eV)	MS (abundance %)	MS2 (abundance %)	Разлика MS-MS ²	MS ³ (abundance %)	Разлика MS ² -MS ³
55	215,50	202,29 193,44	13,21 22,06↓9		
30	382,00	372,13 368,80 358,87 348,87	10,13 13,2 23,13 33,13		
78	429,90	422 403,60 397,80 385,67	26,0↓ 18=H ₂ O 32,1 44,23		

Табела 4П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{Al}:C_{flero}=2:1$, $pH=5,06$,
 $C_{Al^{3+}} = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

CID (eV)	MS (%) (abundance)	MS2 (abundance %)	Разлика MS-MS ²	MS ³ (abundance %) 100323-10	Разлика MS ² -MS ³
30	255.20	246,20 (100%) 237,53	9 17,7=H ₂ O	240,48 (100%) 237,61 215,46 202,36 193,51 184,66	5,65 8,59 30,74 43,84 52,69 61,54
30	430.00	421,87 412,00 404,00	8,13 18=H ₂ O 26,0		

Табела 5П: Тандем масена спектрометрија раствора $C_{Al}:C_{flero}=1:1$, $pH = 5,06$, $C_{Al^{3+}} = 2,7 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

CID (eV)	MS (abundance %)	MS2 (abundance %)	Разлика MS-MS ²	MS ³ (abundance %)	Разлика MS ² -MS ³	pH /врсте
35	763,02 (100)	743,22 (100) 736,70 719,27 715,28 690,13 687,40 675,36 627,20	19,78 26,3 43,73=CO ₂ 47,72 72,87 75,6 87,64 135,8			
45	763,25 (100)					

ESI MS спектри хидролизе алуминијум(III)-јона

Табела 6 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,192$, $50V$

HIDROLIZA-3PH=3,192+50 10 (0.352)					No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.1933	4.05e6	10.74	0.81	70:	142.8993	7.05e5	1.87	0.14
2:	41.6177	3.51e7	92.87	6.98	71:	144.7777	4.36e5	1.16	0.09
3:	42.7831	2.76e7	73.07	5.49	72:	146.9151	5.68e5	1.51	0.11
4:	43.8190	1.3e7	30.02	2.26	73:	148.9230	7.29e6	19.32	1.45
5:	44.8549	6.94e6	18.39	1.38	74:	149.9594	6.00e5	1.59	0.12
6:	45.9556	1.22e6	3.24	0.24	75:	150.9310	5.67e5	1.50	0.11
7:	50.5526	1.20e6	3.18	0.24	76:	152.8741	8.69e5	2.30	0.17
8:	52.6246	1.09e7	28.82	2.17	77:	155.0116	6.54e5	1.73	0.13
9:	54.6965	7.87e6	20.85	1.57	78:	156.9548	7.11e5	1.88	0.14
10:	56.5742	2.33e7	61.73	4.64	79:	158.8333	1.70e6	4.50	0.34
11:	58.3872	2.20e7	58.38	4.39	80:	160.8413	5.28e5	1.40	0.11
12:	60.5239	3.25e7	21.58	6.47	81:	162.9788	5.36e5	1.42	0.11
13:	62.5312	8.14e6	7.52	1.62	82:	164.7277	8.40e5	2.23	0.17
14:	64.6032	2.84e6	1.52	0.56	83:	166.8653	5.35e5	1.42	0.11
15:	66.0925	5.74e5	7.29	0.11	84:	168.9381	3.98e5	1.05	0.08
16:	66.7400	2.84e6	99.99	0.55	85:	170.8167	4.81e5	1.27	0.10
17:	68.6178	5.74e5	6.08	7.51	86:	174.8328	9.01e5	2.39	0.18
18:	69.9129	2.75e6	17.25	0.46	87:	176.9057	4.07e5	1.08	0.08
19:	71.5964	3.77e7	17.33	1.30	88:	177.9421	3.78e5	1.00	0.08
20:	72.1792	2.29e6	7.33	0.55	89:	178.9786	5.13e5	1.36	0.10
21:	72.4382	2.17e6	5.76	0.43	90:	180.9867	4.01e5	1.06	0.08
22:	72.7620	15.0e6	3.96	0.30	91:	182.8653	4.68e5	1.24	0.09
23:	72.8915	2.17e6	2.02	0.15	92:	184.7439	5.44e5	1.44	0.11
24:	73.6685	1.50e6	9.89	0.74	93:	187.0111	4.98e5	1.32	0.10
25:	74.8989	7.63e5	1.15	0.09	94:	190.8331	1.29e6	3.40	0.26
26:	76.6472	3.73e6	73.34	5.51	95:	192.8413	6.18e5	1.64	0.12
27:	78.4604	4.98e6	13.21	0.99	96:	194.7848	4.00e5	1.06	0.08
28:	79.1727	1.15e6	3.05	0.23	97:	195.8213	4.08e5	1.08	0.08
29:	80.5373	5.21e6	13.79	1.04	98:	196.9873	4.29e5	1.14	0.09
30:	82.6694	5.56e6	14.73	1.11	99:	198.0238	4.58e5	1.21	0.09
31:	83.7703	5.48e5	1.45	0.11	100:	198.9956	8.03e5	2.13	0.16
32:	84.4179	4.33e6	11.47	0.86	101:	200.7447	6.63e5	1.76	0.13
33:	85.8425	5.67e5	1.50	0.11	102:	203.0121	5.19e5	1.37	0.10
34:	86.4253	1.97e6	5.21	0.39	103:	206.8343	4.96e5	1.31	0.10
35:	88.6271	2.85e6	7.55	0.57	104:	208.9721	4.38e5	1.16	0.09
36:	90.6346	1.82e6	4.83	0.36	105:	210.9804	3.97e5	1.05	0.08
37:	92.6421	3.41e6	9.03	0.68	106:	212.9239	3.95e5	1.05	0.08
38:	93.2896	4.88e5	1.29	0.10	107:	216.8110	4.88e5	1.29	0.10
39:	94.7143	2.98e6	7.91	0.59	108:	218.9489	5.40e5	1.43	0.11
40:	96.6571	2.53e6	6.69	0.50	109:	220.8277	3.81e5	1.01	0.08
41:	98.6647	3.38e6	8.95	0.67	110:	222.8361	4.07e5	1.08	0.08
42:	100.6722	1.62e6	4.30	0.32	111:	226.9176	3.94e5	1.04	0.08
43:	101.5141	1.24e6	3.29	0.25	112:	230.8697	8.28e5	2.19	0.16
44:	101.7084	1.53e6	4.06	0.31	113:	232.8133	5.26e5	1.39	0.10
45:	102.6151	5.36e6	14.21	1.07	114:	234.8865	5.12e5	1.36	0.10
46:	104.6874	2.60e6	6.90	0.52	115:	236.8302	4.21e5	1.12	0.08
47:	105.7884	4.24e5	1.12	0.08	116:	238.9034	3.80e5	1.01	0.08
48:	106.7598	1.48e6	3.93	0.30	117:	251.9910	4.52e5	1.20	0.09
49:	108.7027	1.48e6	3.92	0.29	118:	257.1095	4.01e5	1.06	0.08
50:	110.9046	1.48e6	3.93	0.30	119:	276.8067	4.46e5	1.18	0.09
51:	112.1998	3.82e5	1.01	0.08	120:	308.7518	3.81e5	1.01	0.08
52:	112.6532	1.64e6	4.36	0.33	121:	324.6927	7.31e5	1.94	0.15
53:	114.6609	1.64e6	4.34	0.33	122:	364.8710	1.82e6	4.83	0.36
54:	116.6685	2.48e6	6.56	0.49	123:	380.8135	4.20e5	1.11	0.08
55:	117.8343	4.36e5	1.16	0.09					
56:	118.8058	1.40e6	3.71	0.28					
57:	120.7487	5.36e6	14.20	1.07					
59:	122.7565	2.43e6	6.44	0.48					
59:	123.7927	3.97e5	1.05	0.08					
60:	124.8290	8.87e5	2.35	0.18					
61:	126.7720	5.26e5	1.39	0.10					
62:	128.7797	1.12e6	2.98	0.22					
63:	130.7875	6.50e5	1.72	0.13					
64:	131.6943	4.22e5	1.12	0.08					
65:	132.7953	1.41e6	3.74	0.28					
66:	134.8031	2.46e6	6.52	0.49					
67:	136.8757	1.16e6	3.07	0.23					
68:	138.7540	1.71e6	4.52	0.34					
69:	140.8267	4.15e6	11.00	0.83					

Табела 7 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $50V$

HIDROLIZA-2-PH=3,594+50 11 (0.387)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.193	31.48e6	3.66	0.49	40:	218.7546	5.32e5	1.32	0.18
2:	41.6427	2.29e7	56.67	7.66	41:	234.7570	6.95e5	1.72	0.23
3:	43.4305	1.90e7	47.08	6.36	42:	364.8062	7.87e5	1.95	0.26
4:	45.1787	3.56e6	8.82	1.19					
5:	45.5671	2.17e6	5.37	0.73					
6:	45.7614	1.85e6	4.57	0.62					
7:	50.5526	1.01e6	2.51	0.34					
8:	52.5598	6.73e6	16.65	2.25					
9:	54.5670	2.30e6	5.69	0.77					
10:	56.5742	8.51e6	21.07	2.85					
11:	57.3512	2.91 e6	7.20	0.97					
12:	57.8692	9.91 e6	24.53	3.31					
13:	58.7757	1.88e6	4.66	0.63					
14:	60.5239	4.04e7	100.00	13.51					
15:	62.5312	5.86e6	14.50	1.96					
16:	62.9844	1.09e6	2.70	0.37					
17:	64.6032	8.61e5	2.13	0.29					
18:	66.0925	5.52e5	1.37	0.18					
19:	66.8695	7.37e5	1.83	0.25					
20:	68.7473	4.81 e6	11.92	1.61					
21:	69.8481	1.75e6	4.32	0.58					
22:	71.5964	3.17e6	7.85	1.06					
23:	71.9850	1.32e6	3.27	0.44					
24:	72.3087	1.28e6	3.16	0.43					
25:	73.6685	3.99e6	9.88	1.34					
26:	76.6472	1.78e7	44.09	5.96					
27:	78.1366	1.54e6	3.80	0.51					
28:	78.5899	8.41 e6	20.81	2.81					
29:	80.5976	3.11e6	7.69	1.04					
30:	82.6694	2.60e6	6.43	0.87					
31:	83.8998	8.96e5	2.22	0.30					
32:	84.7416	7.47e5	1.85	0.25					
33:	86.3606	1.03e6	2.56	0.35					
34:	88.6271	1.35e6	3.35	0.45					
35:	90.4403	5.06e5	1.25	0.17					
36:	92.7716	1.70e6	4.20	0.57					
37:	94.7143	2.23e6	5.51	0.75					
38:	96.5924	1.88e6	4.66	0.63					
39:	98.5999	1.25e6	3.09	0.42					
40:	100.5427	8.56e5	2.12	0.29					
41:	101.8379	2.85e6	7.05	0.95					
42:	102.9389	4.14e5	1.03	0.14					
43:	104.7522	1.74e6	4.30	0.58					
44:	106.6303	9.77e5	2.42	0.33					
45:	108.8322	5.09e5	1.26	0.17					
46:	112.5884	5.51e5	1.36	0.18					
47:	114.7256	1.28e6	3.16	0.43					
48:	116.6685	1.36e6	3.38	0.46					
49:	118.6762	6.14e5	1.52	0.21					
50:	120.7487	4.31e6	10.66	1.44					
51:	122.6917	2.11e6	5.21	0.70					
52:	124.6994	4.94e5	1.22	0.17					
53:	128.9093	4.15e5	1.03	0.14					
54:	132.8601	1.10e6	2.71	0.37					
55:	134.8031	1.43e6	3.54	0.48					
56:	138.7540	2.59e6	6.42	0.87					
57:	140.8267	3.18e6	7.86	1.06					
58:	142.8345	4.27e5	1.06	0.14					
59:	148.8583	1.26e6	3.12	0.42					
60:	156.8901	1.32e6	3.26	0.44					
61:	158.8333	1.37e6	3.40	0.46					
62:	164.7277	7.08e5	1.75	0.24					
63:	174.7680	5.32e5	1.32	0.18					
64:	176.9705	4.86e5	1.20	0.16					
65:	182.7357	5.12e5	1.27	0.17					
66:	192.7766	4.35e5	1.08	0.15					
67:	198.7364	1.87e6	4.62	0.62					
68:	200.8094	6.48e5	1.60	0.22					
69:	216.6815	7.16e5	1.77	0.24					

Табела 8 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027\text{mM}$, $pH=3,594$, $50V$

HIDROLIZA-2-PH=3,594+50 11 (0.387)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.1933	3.69e6	10.81	1.38	70:	148.9878	7.59e5	2.22	0.28
2:	41.5529	3.41e7	100.00	12.73	71:	150.6719	4.11e5	1.20	0.15
3:	42.8478	2.78e6	8.16	1.04	72:	156.8901	6.36e5	1.86	0.24
4:	43.5600	9.10e6	26.66	3.39	73:	158.8980	1.11e6	3.25	0.41
5:	44.5960	7.32e5	2.15	0.27	74:	160.8413	4.18e5	1.23	0.16
6:	44.9844	2.96e6	8.66	1.10	75:	164.7925	4.13e5	1.21	0.15
7:	45.8261	1.42e6	4.17	0.53	76:	176.9057	3.98e5	1.17	0.15
8:	50.2289	4.50e5	1.32	0.17	77:	194.8495	3.72e5	1.09	0.14
9:	50.6174	8.62e5	2.53	0.32	78:	198.8012	1.12e6	3.28	0.42
10:	52.6246	6.04e6	17.71	2.25	79:	200.8094	1.51e6	4.43	0.56
11:	54.6317	2.69e6	7.87	1.00	80:	203.0121	3.75e5	1.10	0.14
12:	56.5095	1.97e7	57.87	7.37	81:	216.9406	4.53e5	1.33	0.17
13:	57.8692	3.84e6	11.25	1.43	82:	218.9489	6.27e5	1.84	0.23
14:	58.8404	5.09e5	1.49	0.19	83:	276.8716	3.61e5	1.06	0.13
15:	60.5239	1.69e7	49.49	6.30	84:	364.8710	8.01e5	2.35	0.30
16:	62.5312	8.49e6	24.87	3.17	85:	380.8783	4.20e5	1.23	0.16
17:	64.7975	7.69e5	2.25	0.29					
18:	65.7687	4.38e5	1.28	0.16					
19:	65.8982	5.47e5	1.60	0.20					
20:	66.2220	6.77e5	1.99	0.25					
21:	66.7400	1.19e6	3.48	0.44					
22:	67.5170	4.66e5	1.36	0.17					
23:	67.9703	1.21e6	3.55	0.45					
24:	68.2941	1.47e6	4.32	0.55					
25:	68.8768	7.15e5	2.10	0.27					
26:	69.0711	4.86e5	1.43	0.18					
27:	69.6539	2.89e6	8.46	1.08					
28:	70.9489	6.13e5	1.80	0.23					
29:	71.7907	3.47e6	10.17	1.29					
30:	73.6685	3.58e6	10.49	1.33					
31:	76.5825	1.55e7	45.36	5.77					
32:	78.5251	6.60e6	19.35	2.46					
33:	80.5325	2.94e6	8.62	1.10					
34:	81.2448	9.84e5	2.89	0.37					
35:	81.5038	4.01e5	1.17	0.15					
36:	82.6694	3.65e6	10.71	1.36					
37:	83.6408	4.67e5	1.37	0.17					
38:	84.4179	1.48e6	4.35	0.55					
39:	85.6482	4.73e5	1.39	0.18					
40:	86.4901	5.52e5	1.62	0.21					
41:	86.8786	3.52e5	1.03	0.13					
42:	88.1738	3.74e5	1.10	0.14					
43:	88.6271	1.72e6	5.04	0.64					
44:	90.7641	1.19e6	3.48	0.44					
45:	92.7068	1.79e6	5.24	0.67					
46:	94.7143	1.80e6	5.29	0.67					
47:	96.5924	1.34e6	3.93	0.50					
48:	98.4704	1.43e6	4.19	0.55					
49:	98.9237	4.56e5	1.34	0.17					
50:	100.6075	8.72e5	2.56	0.33					
51:	101.8379	2.26e6	6.61	0.84					
52:	104.6874	1.62e6	4.75	0.60					
53:	105.3998	3.94e5	1.16	0.15					
54:	106.6303	1.64e6	4.82	0.61					
55:	109.4798	5.20e5	1.52	0.19					
56:	110.5160	7.79e5	2.28	0.29					
57:	112.6532	1.23e6	3.59	0.46					
58:	114.7256	9.27e5	2.72	0.35					
59:	116.6685	2.99e6	8.76	1.12					
60:	118.8058	5.96e5	1.75	0.22					
61:	120.7487	2.78e6	8.16	1.04					
62:	122.565	3.24e6	9.51	1.21					
63:	124.1813	3.88e5	1.14	0.14					
64:	124.6347	6.76e5	1.98	0.25					
65:	132.9249	4.99e5	1.46	0.19					
66:	134.7384	1.30e6	3.82	0.49					
67:	138.8188	1.34e6	3.92	0.50					
68:	140.7619	3.59e6	10.53	1.34					
69:	142.8993	3.94e5	1.15	0.15					

Табела 9 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,1mM$, $pH= 4,35$, $50V$

HIDROLIZA-6-PH=4,35+50 13 (0.457)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.2580	6.89e5	7.02	0.76	70:	166.8005	1.06e5	1.08	0.12
2:	41.5529	4.42e6	45.02	4.86	71:	175.0271	2.32e5	2.36	0.25
3:	42.7831	4.31e5	4.39	0.47	72:	176.5818	1.28e5	1.30	0.14
4:	42.9773	8.39e5	8.54	0.92	73:	178.6547	2.06e5	2.10	0.23
5:	43.4953	3.99e5	4.06	0.44	74:	184.6143	1.62e5	1.65	0.18
6:	43.8838	1.50e6	15.30	1.65	75:	194.8495	3.39e5	3.45	0.37
7:	44.9197	3.12e5	3.18	0.34	76:	198.0238	3.37e5	3.43	0.37
8:	45.6966	1.06e6	10.75	1.16	77:	199.0603	1.82e5	1.86	0.20
9:	50.5526	1.36e5	1.38	0.15	78:	204.8260	1.87e5	1.91	0.21
10:	52.5598	3.27e6	33.27	3.60	79:	208.8425	9.98e4	1.02	0.11
11:	54.1138	2.56e5	2.61	0.28	80:	212.7944	2.34e5	2.38	0.26
12:	54.5670	7.92e5	8.07	0.87	81:	214.1548	1.16e5	1.18	0.13
13:	56.5095	1.47e6	15.01	1.62	82:	214.9971	1.04e5	1.06	0.11
14:	57.4807	2.32e6	23.68	2.56	83:	222.7713	3.76e5	3.83	0.41
15:	58.7109	1.21e5	1.23	0.13	84:	230.9993	1.46e5	1.49	0.16
16:	58.9052	3.10e5	3.16	0.34	85:	244.7993	1.09e5	1.11	0.12
17:	60.5239	3.21e6	32.72	3.54	86:	328.7104	1.26e5	1.28	0.14
18:	62.4664	4.85e5	4.94	0.53					
19:	62.9197	1.20e5	1.22	0.13					
20:	64.8622	2.31 e5	2.36	0.25					
21:	65.5097	1.04e5	1.06	0.11					
22:	66.3515	1.20e5	1.22	0.13					
23:	68.6178	4.33e6	44.16	4.77					
24:	70.0424	3.43e5	3.50	0.38					
25:	71.0137	1.16e5	1.18	0.13					
26:	71.2727	2.71e5	2.76	0.30					
27:	71.9202	1.27e6	12.93	1.40					
28:	72.8915	1.44e5	1.47	0.16					
29:	73.0210	3.42e5	3.48	0.38					
30:	73.6038	1.21e6	12.32	1.33					
31:	74.8341	1.21e5	1.23	0.13					
32:	76.5825	9.82e6	100.00	10.81					
33:	78.5899	3.26e6	33.24	3.59					
34:	80.5325	7.70e5	7.84	0.85					
35:	82.6694	4.39e5	4.48	0.48					
36:	83.0580	1.65e5	1.68	0.18					
37:	84.4826	1.15e6	11.76	1.27					
38:	85.7130	1.48e5	1.51	0.16					
39:	86.8139	1.12e5	1.14	0.12					
40:	88.3680	2.23e5	2.27	0.25					
41:	88.8861	1.72e5	1.76	0.19					
42:	90.5050	1.34e5	1.36	0.15					
43:	92.6421	5.84e5	5.95	0.64					
44:	94.7143	6.54e6	66.67	7.20					
45:	96.5276	2.33e6	23.70	2.56					
46:	98.5999	3.39e5	3.45	0.37					
47:	98.9237	1.74e5	1.78	0.19					
48:	101.7084	8.13e5	8.28	0.89					
49:	104.8169	4.59e5	4.68	0.51					
50:	106.5655	4.61e5	4.69	0.51					
51:	108.7674	1.49e5	1.51	0.16					
52:	112.7179	6.81e5	6.94	0.75					
53:	114.5961	3.47e5	3.53	0.38					
54:	116.7333	3.99e5	4.07	0.44					
55:	117.8343	1.22e6	12.39	1.34					
56:	119.7125	6.89e5	7.02	0.76					
57:	120.8783	3.97e5	4.04	0.44					
58:	124.7642	1.95e5	1.99	0.21					
59:	129.7513	3.21e5	3.27	0.35					
60:	132.7306	1.51e5	1.54	0.17					
61:	140.8267	2.47e6	25.16	2.72					
62:	142.0573	1.84e5	1.88	0.20					
63:	142.7698	1.90e5	1.94	0.21					
64:	148.5992	2.86e5	2.91	0.31					
65:	148.9230	8.21e5	8.36	0.90					
66:	150.8662	1.44e5	1.47	0.16					
67:	156.7605	1.98e5	2.01	0.22					
68:	157.9912	3.57e5	3.64	0.39					
69:	160.7765	2.03e5	2.07	0.22					

Табела 10 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,5mM$, $pH=4,203$ 50V

HIDROLIZA-5-PH=4,203+50 12 (0.422)										Scan ES+				
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.3228	7.57e5	6.27	0.36	70:	116.7333	7.82e5	6.48	0.37	139:	280.8240	1.23e5	1.02	0.
2:	41.5529	1.03e7	85.01	4.90	71:	117.8991	1.01e6	8.37	0.48	140:	282.4439	1.41e5	1.17	0.
3:	42.8478	1.22e6	10.13	0.58	72:	119.7772	2.79e6	23.07	1.33	141:	282.7679	3.75e5	3.11	0.
4:	43.1068	1.24e6	10.25	0.59	73:	120.7487	1.04e6	8.65	0.50	142:	284.2582	1.34e5	1.11	0.
5:	43.6248	3.05e6	25.28	1.46	74:	122.1088	1.57e5	1.30	0.07	143:	285.1006	1.27e5	1.05	0.
6:	44.3370	6.69e5	5.54	0.32	75:	122.8212	1.37e5	1.14	0.07	144:	290.7379	2.84e5	2.35	0.
7:	44.5960	2.17e6	17.98	1.04	76:	124.7642	4.97e5	4.12	0.24	145:	292.8762	4.83e5	4.00	0.
8:	45.2434	2.99e5	2.47	0.14	77:	128.7150	1.71e5	1.41	0.08	146:	294.4313	1.46e5	1.21	0.
9:	45.6319	1.74e6	14.40	0.83	78:	129.8160	5.74e5	4.75	0.27	147:	300.7167	4.07e5	3.37	0.
10:	50.8764	1.39e5	1.15	0.07	79:	132.7953	4.67e5	3.86	0.22	148:	302.7255	2.14e5	1.77	0.
11:	52.5598	3.54e6	29.35	1.69	80:	134.7384	2.32e5	1.93	0.11	149:	304.7342	1.21e5	1.00	0.
12:	53.7253	1.32e5	1.09	0.06	81:	137.8473	1.47e5	1.22	0.07	150:	310.7606	4.59e5	3.80	0.
13:	54.6317	1.07e6	8.89	0.51	82:	138.7540	4.39e5	3.64	0.21	151:	318.7310	3.36e5	2.78	0.
14:	55.0850	3.54e5	2.93	0.17	83:	140.8267	2.20e6	18.26	1.05	152:	320.6750	2.48e5	2.05	0.
15:	55.9267	3.80e5	3.15	0.18	84:	141.9926	2.14e5	1.77	0.10	153:	322.8782	1.82e5	1.50	0.
16:	56.3800	1.22e6	10.09	0.58	85:	142.8345	3.80e5	3.14	0.18	154:	324.6927	3.08e5	2.55	0.
17:	56.5742	1.11e6	9.17	0.53	86:	147.7572	2.04e5	1.69	0.10	155:	328.7104	4.85e5	4.01	0.
18:	56.8980	1.53e6	12.63	0.73	87:	148.8583	2.02e6	16.71	0.96	156:	330.6544	2.97e5	2.46	0.
19:	57.5454	4.71e6	39.01	2.25	88:	150.6719	5.65e5	4.68	0.27	157:	332.7281	1.25e5	1.03	0.
20:	59.0347	4.56e5	3.78	0.22	89:	154.0400	1.54e5	1.28	0.07	158:	334.6722	1.71e5	1.42	0.
21:	59.2289	2.31e5	1.91	0.11	90:	154.9469	1.24e5	1.03	0.06	159:	336.6811	1.95e5	1.62	0.
22:	60.5239	1.21e7	100.00	5.77	91:	156.8253	3.26e5	2.70	0.16	160:	338.7548	2.69e5	2.22	0.
23:	62.4664	1.58e6	13.12	0.76	92:	157.9264	4.92e5	4.07	0.23	161:	340.5692	2.73e5	2.26	0.
24:	64.5385	3.78e5	3.13	0.18	93:	159.0924	1.26e5	1.04	0.06	162:	342.9022	2.03e5	1.68	0.
25:	65.5097	2.19e5	1.82	0.10	94:	160.7765	8.37e5	6.93	0.40	163:	346.6608	2.19e5	1.82	0.
26:	66.5458	2.44e5	2.02	0.12	95:	162.8493	1.60e5	1.33	0.08	164:	348.7345	1.52e5	1.25	0.
27:	66.9343	1.33e5	1.10	0.06	96:	166.9301	4.04e5	3.34	0.19	165:	350.5490	1.75e5	1.45	0.
28:	68.6178	4.16e6	34.45	1.99	97:	168.7438	2.59e5	2.15	0.12	166:	352.8172	1.80e5	1.49	0.
29:	70.0424	4.96e5	4.11	0.24	98:	171.0110	1.67e5	1.38	0.08	167:	354.6965	1.26e5	1.04	0.
30:	70.1719	3.20e5	2.65	0.15	99:	173.0191	1.26e5	1.05	0.06	168:	356.7055	2.53e5	2.10	0.
31:	71.2079	1.57e6	13.00	0.75	100:	174.8976	4.23e5	3.50	0.20	169:	358.7145	2.44e5	2.02	0.
32:	71.5317	6.64e5	5.50	0.32	101:	176.9705	4.14e5	3.43	0.20	170:	360.9179	1.29e5	1.07	0.
33:	71.7259	2.14e5	1.77	0.10	102:	178.9138	1.09e6	9.06	0.52	171:	364.6111	81.28e5	1.06	0.
34:	72.3087	1.35e6	11.19	0.65	103:	180.7924	1.71e5	1.41	0.08	172:	366.8152	4.93e5	4.08	0.
35:	73.0210	1.08e6	8.97	0.52	104:	184.8086	7.15e5	5.92	0.34	173:	370.5092	2.36e5	1.96	0.
36:	73.2800	3.24e5	2.68	0.15	105:	186.8168	4.56e5	3.78	0.22	174:	378.6100	1.89e5	1.57	0.
37:	73.4095	2.80e5	2.32	0.13	106:	190.7684	1.26e5	1.05	0.06	175:	380.6190	3.55e5	2.94	0.
38:	73.7980	1.65e6	13.65	0.79	107:	192.7118	1.21e5	1.00	0.06	176:	382.7577	1.45e5	1.20	0.
39:	76.5825	1.12e7	92.95	5.36	108:	194.8495	1.39e6	11.47	0.66	177:	384.7020	2.26e5	1.87	0.
40:	78.5899	9.59e6	79.41	4.58	109:	196.9225	4.69e5	3.88	0.22	178:	388.7849	2.06e5	1.70	0.
41:	80.5325	1.67e6	13.87	0.80	110:	198.0238	5.49e5	4.55	0.26	179:	392.6086	1.40e5	1.16	0.
42:	82.2809	3.97e5	3.29	0.19	111:	198.9956	1.33e5	1.10	0.06	180:	398.5710	2.31e5	1.91	0.
43:	82.9932	2.26e5	1.87	0.11	112:	202.8177	3.54e5	2.93	0.17	181:	402.7188	1.89e5	1.57	0.
44:	83.5113	2.26e5	1.87	0.11	113:	204.8908	1.01e6	8.36	0.48	182:	404.5983	1.21e5	1.00	0.
45:	84.6769	1.23e6	10.22	0.59	114:	206.8343	1.42e5	1.18	0.07	183:	406.6722	1.80e5	1.49	0.
46:	85.9073	5.35e5	4.43	0.26	115:	208.9721	1.34e5	1.11	0.06	184:	408.5517	2.11e5	1.75	0.
47:	88.5623	1.10e6	9.12	0.53	116:	212.7944	1.70e6	14.10	0.81	185:	412.6348	2.18e5	1.81	0.
48:	89.0804	2.64e5	2.19	0.13	117:	214.8027	7.31e5	6.05	0.35	186:	414.7087	1.49e5	1.23	0.
49:	89.3394	1.52e5	1.26	0.07	118:	216.8758	1.87e5	1.55	0.09	187:	416.6530	314e5	2.60	0.
50:	90.5698	3.28e5	2.72	0.16	119:	220.8277	1.57e5	1.30	0.07	188:	418.6622	1.48e5	1.23	0.
51:	91.4764	2.09e5	1.73	0.10	120:	222.8361	1.36e6	11.28	0.65	189:	420.6713	1.86e5	1.54	0.
52:	92.5773	1.10e6	9.07	0.52	121:	223.2896	1.93e5	1.60	0.09	190:	426.8932	1.96e5	1.62	0.
53:	93.2249	2.06e5	1.71	0.10	122:	226.5937	2.35e5	1.94	0.11	191:	430.6523	1.86e5	1.54	0.
54:	94.7143	6.00e6	49.65	2.86	123:	230.6753	316e5	2.61	0.15	192:	434.6059	4.10e5	3.39	0.
55:	96.6571	6.68e6	55.34	3.19	124:	232.6837	2.73e5	2.26	0.13	193:	436.4206	2.00e5	1.66	0.
56:	98.7294	5.51 e5	4.56	0.26	125:	234.6274	2.24e5	1.86	0.11	194:	438.4298	1.62e5	1.35	0.
57:	101.7084	2.52e6	20.84	1.20	126:	240.9119	2.19e5	1.81	0.10	195:	442.4482	1.59e5	1.32	0.
58:	104.3636	1.95e5	1.62	0.09	127:	244.7345	2.89e5	2.39	0.14	196:	444.5870	2.09e5	1.73	0.
59:	104.8169	5.56e5	4.60	0.27	128:	248.5571	1.58e5	1.31	0.08	197:	446.5962	1.27e5	1.05	0.
60:	106.6303	1.01e6	8.36	0.48	129:	2503248	1.56e5	1.29	0.07	198:	448.3462	2.43e5	2.01	0.
61:	108.8969	4.30e5	3.56	0.21	130:	252.833	1.60e5	1.32	0.08	199:	450.6146	1.34e5	1.11	0.
62:	109.3503	2.25e5	1.87	0.11	131:	253.8699	1.24e5	1.03	0.06	200:	452.6239	1.38e5	1.14	0.
63:	109.6093	1.59e5	1.32	0.08	132:	254.7122	1.43e5	1.18	0.07	201:	454.6979	2.20e5	1.83	0.
64:	110.6455	2.92e5	2.42	0.14	133:	257.0447	1.21e5	1.00	0.06	202:	458.6516	2.20e5	1.83	0.
65:	111.6170	1.24e5	1.02	0.06	134:	263.0704	2.12e5	1.76	0.10	203:	460.6608	1.60e5	1.32	0.
66:	112.7827	5.67e5	4.70	0.27	135:	264.8199	1.50e5	1.24	0.07	204:	462.6700	1.35e5	1.12	0.
67:	113.7542	1.50e5	1.24	0.07	136:	266.7636	1.70e5	1.41	0.08	205:	468.6978	1.24e5	1.02	0.
68:	114.4666	5.77e5	4.78	0.28	137:	272.7247	3.10e5	2.57	0.15	206:	470.7070	1.53e5	1.26	0.
69:	115.6323	1.43e5	1.18	0.07	138:	274.7981	1.78e5	1.47	0.08	207:	476.6052	1.65e5	1.37	0.

Табела 11 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=1,0$ mM, pH= 4,184 50V

HIDROLIZA-7-PH=4,184+5012 (0.422)															Scan ES+
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	
1:	40.2580	3.74e5	2.08	0.15	70:	160.8413	1.07e6	5.94	0.43	139:	396.5619	31.5e5	1.75	0.	
2:	41.6177	9.15e6	50.74	3.69	71:	166.8005	8.90e5	4.94	0.36	140:	398.6358	4.67e5	2.59	0.	
3:	42.6536	3.10e5	1.72	0.13	72:	168.8086	4.49e5	2.49	0.18	141:	402.6540	2.51e5	1.39	0.	
4:	42.8478	7.52e5	4.17	0.30	73:	170.8167	1.89e5	1.05	0.08	142:	406.6074	5.39e5	2.99	0.	
5:	43.1068	1.05e6	5.84	0.42	74:	174.8328	4.65e5	2.58	0.19	143:	408.6165	3.93e5	2.18	0.	
6:	43.8190	2.59e6	14.36	1.04	75:	176.9057	9.60e5	5.33	0.39	144:	410.8849	2.41 e5	1.34	0.	
7:	44.3370	4.81e5	2.67	0.19	76:	178.8490	2.09e6	11.61	0.84	145:	412.6348	1.92e5	1.06	0.	
8:	44.7255	1.70e6	9.41	0.68	77:	184.8086	1.24e6	6.91	0.50	146:	416.5234	5.49e5	3.05	0.	
9:	45.8261	4.95e5	2.74	0.20	78:	186.7520	6.49e5	3.60	0.26	147:	418.5974	2.83e5	1.57	0.	
10:	52.5598	2.51e6	13.94	1.01	79:	194.8495	2.51e6	13.91	1.01	148:	420.7361	2.10e5	1.17	0.	
11:	54.3080	4.41e5	2.45	0.18	80:	196.7930	5.85e5	3.25	0.24	149:	424.6248	3.94e5	2.19	0.	
12:	54.9555	5.94e5	3.30	0.24	81:	197.9591	3.89e5	2.16	0.16	150:	426.6340	4.90e5	2.72	0.	
13:	56.3800	5.57e5	3.09	0.22	82:	202.8177	8.46e5	4.69	0.34	151:	428.5135	2.30e5	1.27	0.	
14:	57.3512	1.81e6	10.04	0.73	83:	204.8260	1.55e6	8.60	0.63	152:	434.6059	7.87e5	4.36	0.	
15:	57.8692	6.50e5	3.60	0.26	84:	212.7944	3.03e6	16.82	1.22	153:	436.2262	1.99e5	1.10	0.	
16:	58.6462	3.86e5	2.14	0.16	85:	214.8027	1.09e6	6.02	0.44	154:	436.5502	4.31e5	2.39	0.	
17:	58.9052	3.46e5	1.92	0.14	86:	220.7629	1.86e5	1.03	0.08	155:	438.3650	2.81e5	1.56	0.	
18:	59.0347	2.81e5	1.56	0.11	87:	222.8361	1.81e6	10.05	0.73	156:	442.3834	2.05e5	1.14	0.	
19:	60.5239	1.80e7	100.00	7.27	88:	230.8697	8.33e5	4.62	0.34	157:	444.5222	4.09e5	2.27	0.	
20:	62.5312	2.64e6	14.64	1.06	89:	232.8133	3.17e5	1.76	0.13	158:	448.4110	2.92e5	1.62	0.	
21:	64.4737	3.45e5	1.91	0.14	90:	234.5626	2.21 e5	1.22	0.09	159:	450.5498	2.45e5	1.36	0.	
22:	68.6178	2.53e6	14.05	1.02	91:	236.9597	3.02e5	1.68	0.12	160:	452.6887	2.34e5	1.30	0.	
23:	70.6251	2.26e6	12.54	0.91	92:	237.3485	1.92e5	1.07	0.08	161:	454.7627	3.12e5	1.73	0.	
24:	71.0784	8.44e5	4.68	0.34	93:	240.7823	2.59e5	1.44	0.10	162:	456.6423	2.42e5	1.34	0.	
25:	71.4669	2.73e5	1.51	0.11	94:	244.7993	4.04e5	2.24	0.16	163:	458.5219	4.61e5	2.56	0.	
26:	72.5677	3.21e6	17.78	1.29	95:	254.7770	3.48e5	1.93	0.14	164:	460.5312	2.02e5	1.12	0.	
27:	73.9923	5.12e5	2.84	0.21	96:	256.4616	2.91e5	1.61	0.12	165:	462.4756	1.95e5	1.08	0.	
28:	76.6472	9.36e6	51.92	3.78	97:	262.8112	2.36e5	1.31	0.10	166:	466.4941	2.40e5	1.33	0.	
29:	78.5899	1.47e7	81.69	5.94	98:	264.7551	4.29e5	2.38	0.17	167:	468.5033	3.43e5	1.90	0.	
30:	80.5973	1.17e6	6.49	0.47	99:	272.7895	4.83e5	2.68	0.19	168:	470.6422	2.13e5	1.18	0.	
31:	82.4104	2.46e5	1.36	0.10	100:	282.7679	8.62e5	4.78	0.35	169:	474.6607	1.89e5	1.05	0.	
32:	83.1875	2.96e5	1.64	0.12	101:	284.8414	3.74e5	2.08	0.15	170:	476.5404	3.47e5	1.92	0.	
33:	84.4179	3.03e5	1.68	0.12	102:	286.7205	1.96e5	1.09	0.08	171:	478.7441	2.85e5	1.58	0.	
34:	85.3245	1.93e5	1.07	0.08	103:	290.8027	5.11e5	2.83	0.21	172:	484.5127	2.09e5	1.16	0.	
35:	86.0368	3.67e5	2.03	0.15	104:	292.6818	1.07e6	5.92	0.43	173:	490.4757	2.12e5	1.17	0.	
36:	87.5910	4.23e5	2.35	0.17	105:	294.7553	2.01e5	1.11	0.08	174:	494.2998	2.00e5	1.11	0.	
37:	88.6918	1.26e6	6.97	0.51	106:	300.7167	8.74e5	4.85	0.35	175:	494.6239"	3.99e5	2.21	0.	
38:	92.6421	6.64e5	3.68	0.27	107:	302.7255	3.19e5	1.77	0.13	176:	496.4388	2.91 e5	1.62	0.	
39:	93.0954	2.01e5	1.12	0.08	108:	308.6870	2.78e5	1.54	0.11	177:	498.5777	2.39e5	1.33	0.	
40:	94.7143	449e6	24.89	1.81	109:	310.7606	9.09e5	5.04	0.37	178:	504.6057	2.99e5	1.66	0.	
41:	96.6571	8.49e6	47.10	3.43	110:	318.7310	8.65e5	4.80	0.35	179:	508.4298	2.57e5	1.42	0.	
42:	98.7294	3.56e5	1.98	0.14	111:	320.8694	5.25e5	2.91	0.21	180:	514.3282	3.30e5	1.83	0.	
43:	100.0246	1.87e5	1.04	0.08	112:	324.4983	2.99e5	1.66	0.12	181:	516.3375	2.67e5	1.48	0.	
44:	101.7732	2.44e6	13.56	0.99	113:	328.7104	9.01e5	5.00	0.36	182:	518.5413	3.07e5	1.70	0.	
45:	104.6874	7.01 e5	3.89	0.28	114:	330.6544	3.71e5	2.06	0.15	183:	522.1063	2.11e5	1.17	0.	
46:	106.7598	1.61e6	8.92	0.65	115:	332.5985	3.46e5	1.92	0.14	184:	522.4951	5.84e5	3.24	0.	
47:	108.7674	1.85e5	1.02	0.07	116:	336.8107	2.87e5	1.59	0.12	185:	524.6989	2.56e5	1.42	0.	
48:	110.3865	2.39e5	1.33	0.10	117:	338.6900	7.15e5	3.97	0.29	186:	526.3194	2.19e5	1.21	0.	
49:	113.6894	3.74e5	2.07	0.15	118:	340.5692	3.87e5	2.15	0.16	187:	528.5232	2.00e5	1.11	0.	
50:	114.9199	4.86e5	2.70	0.20	119:	340.8932	1.98e5	1.10	0.08	188:	532.5419	5.40e5	3.00	0.	
51:	116.7333	1.33e6	7.36	0.54	120:	342.5133	3.60e5	2.00	0.15	189:	534.4216	314e5	1.74	0.	
52:	117.7695	8.48e5	4.71	0.34	121:	346.7256	6.31 e5	3.50	0.25	190:	536.5606	2.70e5	1.50	0.	
53:	118.2229	2.83e5	1.57	0.11	122:	348.6697	3.66e5	2.03	0.15	191:	538.8292	1.89e5	1.05	0.	
54:	119.7772	4.14e6	22.95	1.67	123:	350.7435	2.62e5	1.45	0.11	192:	542.5238	3.31e5	1.84	0.	
55:	120.8783	6.08e5	3.37	0.25	124:	352.6228	2.00e5	1.11	0.08	193:	546.5425	2.20e5	1.22	0.	
56:	123.0155	2.35e5	1.31	0.09	125:	356.6407	4.12e5	2.29	0.17	194:	592.4992	1.91e5	1.06	0.	
57:	124.7642	5.77e5	3.20	0.23	126:	358.8441	2.14e5	1.19	0.09	195:	594.3142	2.05e5	1.14	0.	
58:	129.7513	4.90e5	2.72	0.20	127:	360.7883	2.68e5	1.49	0.11	196:	600.4072	2.34e5	1.30	0.	
59:	132.7953	7.98e5	4.43	0.32	128:	364.7414	1.98e5	1.10	0.08	197:	602.5463	2.81 e5	1.56	0.	
60:	134.9327	1.99e5	1.10	0.08	128	366.7504	8.01e5	4.44	0.32	198:	610.4542	2.99e5	1.66	0.	
61:	138.8188	5.82e5	3.23	0.24	130:	37075740	6.12e5	3.40	0.25	199:	620.3069	2.48e5	1.37	0.	
62:	140.8267	1.98e6	10.97	0.80	131:	370.9628	2.49e5	1.38	0.10	200:	630.4188	2.23e5	1.24	0.	
63:	142.8345	7.28e5	4.04	0.29	132:	372.5830	2.05e5	1.14	0.08	201:	674.9502	1.97e5	1.09	0.	
64:	148.8583	1.83e6	10.15	0.74	133:	374.6568	2.85e5	1.58	0.12	202:	689.3402	1.83e5	1.01	0.	
65:	150.8014	9.52e5	5.28	0.38	134:	378.6748	3.00e6	1.66	0.12	203:	718.5092	2.12e5	1.18	0.	
66:	152.8741	2.88e5	1.60	0.12	135:	380.6190	6.00e5	3.33	0.24						
67:	153.9105	1.85e5	1.03	0.07	136:	384.5724	3.27e5	1.82	0.13						
68:	156.8253	6.26e5	3.47	0.25	137:	388.7849	3.49e5	1.94	0.14						
69:	157.8616	4.04e5	2.24	0.16	138:	390.5347	2.01e5	1.12	0.08						

Табела 12 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 4,814$, $50V$

HIDROLIZA-1-PH=4,814+50-SAMF 13

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.1286	2.56e5	3.70	0.39	70:	119.0001	9.25e4	1.34	0.14
2:	40.3228	5.06e5	7.31	0.76	71:	119.7772	1.89e5	2.73	0.29
3:	41.4235	4.53e6	65.57	6.86	72:	120.6840	3.62e5	5.24	0.55
4:	41.9414	1.24e6	17.99	1.88	73:	122.5622	1.32e5	1.91	0.20
5:	42.1356	8.97e5	12.97	1.36	74:	129.8160	2.41e5	3.48	0.36
6:	42.6536	3.41 e5	4.94	0.52	75:	131.9534	8.11e4	1.17	0.12
7:	42.8478	8.04e5	11.62	1.22	76:	132.7953	8.60e4	1.24	0.13
8:	43.4953	2.18e6	31.58	3.30	77:	134.8679	1.08e5	1.56	0.16
9:	44.9197	2.31e5	3.34	0.35	78:	138.9484	8.32e4	1.20	0.13
10:	45.1787	4.75e5	6.87	0.72	79:	140.8914	1.67e6	24.19	2.53
11:	45.5671	1.32e6	19.02	1.99	80:	141.9278	1.34e5	1.93	0.20
12:	46.6678	7.43e4	1.07	0.11	81:	148.8583	3.72e5	5.38	0.56
13:	50.4879	1.62e5	2.34	0.24	82:	157.9264	2.43e5	3.51	0.37
14:	52.6246	2.21e6	32.00	3.35	83:	198.1534	2.22e5	3.22	0.34
15:	54.5670	6.14e5	8.88	0.93	84:	199.3195	7.23e4	1.05	0.11
16:	55.0850	1.21e5	1.75	0.18	85:	251.8614	1.06e5	1.54	0.16
17:	56.4447	1.12e6	16.26	1.70					
18:	57.6102	3.16e6	45.67	4.78					
19:	58.0634	5.69e5	8.22	0.86					
20:	59.0994	9.26e4	1.34	0.14					
21:	59.1642	1.24e5	1.80	0.19					
22:	59.9412	2.26e5	3.27	0.34					
23:	60.7182	2.73e5	3.94	0.41					
24:	64.4737	1.49e5	2.15	0.23					
25:	66.0925	1.96e5	2.83	0.30					
26:	67.1285	7.33e4	1.06	0.11					
27:	68.6178	5.92e6	85.66	8.96					
28:	69.9776	2.39e5	3.45	0.36					
29:	70.1719	1.65e5	2.39	0.25					
30:	71.6612	1.18e6	17.13	1.79					
31:	73.1505	4.29e5	6.20	0.65					
32:	73.6685	1.70e6	24.59	2.57					
33:	74.8989	1.07e5	1.54	0.16					
34:	76.6472	6.91 e6	100.00	10.46					
35:	77.8776	4.60e5	6.66	0.70					
36:	78.7841	2.62e5	3.78	0.40					
37:	79.1079	7.21e4	1.04	0.11					
38:	79.5612	1.48e5	2.14	0.22					
39:	79.6907	7.10e4	1.03	0.11					
40:	80.6620	6.05e5	8.75	0.92					
41:	82.4752	2.73e5	3.95	0.41					
42:	83.3818	1.86e5	2.69	0.28					
43:	84.2236	3.90e5	5.64	0.59					
44:	84.5474	1.01e6	14.66	1.53					
45:	85.0007	4.49e5	6.50	0.68					
46:	85.4540	1.34e5	1.94	0.20					
47:	86.0368	8.68e4	1.26	0.13					
48:	88.8861	1.54e5	2.23	0.23					
49:	92.5773	5.55e5	8.03	0.84					
50:	94.7143	4.12e6	59.52	6.23					
51:	96.5276	5.21 e5	7.53	0.79					
52:	98.1466	2.21 e5	3.20	0.34					
53:	98.7294	1.12e5	1.62	0.17					
54:	98.9237	8.09e4	1.17	0.12					
55:	101.3846	1.18e5	1.71	0.18					
56:	101.9027	1.11e6	16.00	1.67					
57:	102.9389	1.01e5	1.47	0.15					
58:	104.8817	3.68e5	5.32	0.56					
59:	106.1122	8.33e4	1.20	0.13					
60:	106.9541	9.07e4	1.31	0.14					
61:	108.7674	1.53e5	2.21	0.23					
62:	110.9046	9.85e4	1.42	0.15					
63:	112.4589	3.41e5	4.93	0.52					
64:	112.9122	7.60e4	1.10	0.12					
65:	113.7542	7.49e4	1.08	0.11					
66:	114.6609	1.53e5	2.21	0.23					
67:	116.7981	2.40e5	3.47	0.36					
68:	117.7048	6.77e5	9.79	1.02					
69:	118.0934	1.62e5	2.35	0.25					

Табела 13 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $50V$

HIDROLIZA-2-PH=3,594+50-SAMF 30 (1.055)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.0638	1.54e4	1.33	0.16	70:	159.0924	2.99e4	2.58	0.30
2:	40.5818	3.97e4	3.43	0.40	71:	166.8653	2.48e4	2.14	0.25
3:	40.6465	5.29e4	4.56	0.54	72:	170.2984	1.22e4	1.05	0.12
4:	40.9702	1.41e5	12.20	1.44	73:	195.8860	1.27e4	1.10	0.13
5:	41.6177	3.06e5	26.39	3.11	74:	197.9591	7.59e4	6.55	0.77
6:	41.8767	1.28e5	11.06	1.30	75:	199.2547	2.47e4	2.13	0.25
7:	42.2004	2.72e4	2.35	0.28	76:	204.6964	1.54e4	1.32	0.16
8:	43.1068	1.68e4	1.45	0.17	77:	213.7661	1.20e4	1.04	0.12
9:	44.3370	1.47e4	1.27	0.15	78:	251.8614	2.29e4	1.97	0.23
10:	45.6319	1.47e4	1.27	0.15	79:	260.2196	1.53e4	1.32	0.16
11:	50.2936	1.52e4	1.31	0.15	80:	273.5022	1.66e4	1.43	0.17
12:	51.5886	1.23e4	1.06	0.12	81:	320.1566	1.41e4	1.22	0.14
13:	52.5598	3.88e5	33.49	3.95	82:	335.9682	1.23e4	1.06	0.13
14:	54.0490	3.80e4	3.28	0.39	83:	342.9022	1.17e4	1.01	0.12
15:	54.5670	1.84e4	1.59	0.19					
16:	55.1497	3.79e4	3.27	0.39					
17:	55.3440	1.60e4	1.38	0.16					
18:	56.1210	3.51e4	3.02	0.36					
19:	56.4447	2.83e4	2.44	0.29					
20:	56.8980	5.39e4	4.65	0.55					
21:	57.6102	2.07e4	1.79	0.21					
22:	64.9917	2.04e4	1.76	0.21					
23:	68.1646	3.62e4	3.12	0.37					
24:	68.3588	1.42e5	12.20	1.44					
25:	68.6826	3.68e5	31.70	3.74					
26:	70.3014	1.32e4	1.14	0.13					
27:	70.8194	1.44e4	1.24	0.15					
28:	71.0137	3.61e4	3.11	0.37					
29:	71.4669	7.44e4	6.42	0.76					
30:	71.8554	1.35e4	1.16	0.14					
31:	73.3448	4.35e4	3.75	0.44					
32:	73.6685	1.08e5	9.33	1.10					
33:	74.0571	2.62e4	2.26	0.27					
34:	74.8989	1.86e4	1.60	0.19					
35:	76.6472	1.16e6	100.00	11.79					
36:	78.1366	8.78e4	7.57	0.89					
37:	78.9784	1.84e4	1.59	0.19					
38:	80.7268	8.24e4	7.10	0.84					
39:	81.1153	2.39e4	2.06	0.24					
40:	82.1514	3.48e4	3.00	0.35					
41:	82.7990	2.23e4	1.92	0.23					
42:	90.3108	3.26e4	2.81	0.33					
43:	94.7143	7.89e5	68.06	8.03					
44:	96.0095	7.10e4	6.13	0.72					
45:	96.3333	2.39e4	2.06	0.24					
46:	97.4990	3.59e4	3.09	0.36					
47:	99.8303	1.98e4	1.70	0.20					
48:	104.6226	5.42e4	4.67	0.55					
49:	105.5941	1.88e4	1.62	0.19					
50:	107.1484	1.69e4	1.46	0.17					
51:	108.5084	3.00e4	2.59	0.30					
52:	109.2855	1.17e4	1.01	0.12					
53:	111.3579	3.64e4	3.14	0.37					
54:	112.9122	3.66e4	3.16	0.37					
55:	113.9485	1.75e4	1.51	0.18					
56:	117.7048	3.76e5	32.43	3.82					
57:	118.1581	7.03e4	6.06	0.71					
58:	119.0648	2.21 e4	1.91	0.22					
59:	119.8420	1.42e4	1.22	0.14					
60:	120.7487	2.58e4	2.23	0.26					
61:	127.8730	1.19e4	1.02	0.12					
62:	140.8267	7.19e5	61.96	7.31					
63:	141.8630	1.96e4	1.69	0.20					
64:	142.1221	6.73e4	5.81	0.68					
65:	143.3527	1.44e4	1.24	0.15					
66:	149.2469	1.70e4	1.46	0.17					
67:	152.9389	2.18e4	1.88	0.22					
68:	157.9264	1.37e5	11.82	1.39					
69:	158.8980	1.32e4	1.14	0.13					

Табела 14 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,192$, $10V$

HIDROLIZA-3-PH=3,192+ 9 (0.316)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.3875	7.78e6	22.48	2.41	70:	144.6481	3.60e5	1.04	0.11
2:	40.7113	9.36e6	27.04	2.90	71:	146.8503	4.50e5	1.30	0.14
3:	41.0350	9.07e6	26.20	2.81	72:	150.8662	4.44e5	1.28	0.14
4:	41.4882	1.62e7	46.82	5.02	73:	151.9673	3.98e5	1.15	0.12
5:	45.3082	8.18e6	23.64	2.53	74:	153.1980	3.59e5	1.04	0.11
6:	46.0204	3.46e7	99.99	10.72	75:	156.8253	5.07e5	1.46	0.16
7:	46.7973	9.48e6	27.39	2.94	76:	161.9424	9.49e6	27.40	2.94
8:	47.9628	7.69e5	2.22	0.24	77:	163.0436	10.00e5	2.89	0.31
9:	48.8692	7.32e5	2.12	0.23	78:	163.9504	9.36e5	2.70	0.29
10:	51.5886	7.78e5	2.25	0.24	79:	170.9462	7.34e5	2.12	0.23
11:	54.2433	1.87e6	5.40	0.58	80:	174.8976	8.18e5	2.36	0.25
12:	55.5382	1.69e7	48.85	5.24	81:	176.9057	9.11e5	2.63	0.28
13:	56.8332	2.72e6	7.85	0.84	82:	179.8855	4.03e5	1.16	0.12
14:	58.1929	1.91e6	5.51	0.59	83:	184.8734	3.60e5	1.04	0.11
15:	59.2937	4.06e6	11.73	1.26	84:	188.8897	2.06e6	5.95	0.64
16:	59.8764	2.88e6	8.32	0.89	85:	189.9262	4.16e5	1.20	0.13
17:	60.4592	1.01e7	29.09	3.12	86:	190.7684	3.62e5	1.04	0.11
18:	63.1787	1.42e6	4.09	0.44	87:	192.7118	4.58e5	1.32	0.14
19:	64.1500	1.77e6	5.10	0.55	88:	194.9143	6.72e5	1.94	0.21
20:	64.5385	4.12e6	11.90	1.28	89:	198.0238	5.62e5	1.62	0.17
21:	67.2580	9.88e5	2.85	0.31	90:	202.6881	4.51e5	1.30	0.14
22:	68.5531	1.22e7	35.10	3.76	91:	203.9190	4.76e5	1.38	0.15
23:	69.9129	7.85e5	2.27	0.24	92:	205.9273	7.16e5	2.07	0.22
24:	72.2440	6.17e5	1.78	0.19	93:	206.8343	9.37e5	2.71	0.29
25:	73.6685	4.75e6	13.73	1.47	94:	213.9605	5.70e6	16.46	1.76
26:	74.8341	4.56e5	1.32	0.14	95:	215.1266	5.89e5	1.70	0.18
27:	75.5464	4.23e5	1.22	0.13	96:	216.0336	3.57e5	1.03	0.11
28:	76.3235	9.78e5	2.82	0.30	97:	216.9406	5.20e5	1.50	0.16
29:	77.1653	3.56e5	1.03	0.11	98:	220.8277	4.51e5	1.30	0.14
30:	78.0071	9.83e5	2.84	0.30	99:	222.9009	2.58e6	7.45	0.80
31:	78.5251	1.92e6	5.55	0.60	100:	226.9824	4.36e5	1.26	0.13
32:	82.6694	1.06e6	3.07	0.33	101:	230.9993	1.77e6	5.10	0.55
33:	85.7130	1.13e6	3.27	0.35	102:	232.8781	3.52e5	1.02	0.11
34:	86.3606	3.47e5	1.00	0.11	103:	235.9231	6.77e5	1.96	0.21
35:	87.9147	6.23e5	1.80	0.19	104:	248.8163	4.73e5	1.36	0.15
36:	89.7927	1.45e6	4.18	0.45	105:	251.8614	5.06e5	1.46	0.16
37:	90.1812	4.65e5	1.34	0.14	106:	258.9237	3.95e5	1.14	0.12
38:	90.8936	5.11e5	1.48	0.16	107:	260.8027	4.91e5	1.42	0.15
39:	92.3830	6.64e5	1.92	0.21	108:	266.6341	3.74e5	1.08	0.12
40:	94.8438	7.97e5	2.30	0.25	109:	268.0595	8.39e5	2.42	0.26
41:	96.6571	7.47e6	21.58	2.31	110:	284.5822	3.91e5	1.13	0.12
42:	98.6647	3.28e6	9.46	1.01	111:	288.8588	6.77e5	1.96	0.21
43:	101.9027	5.53e6	15.98	1.71	112:	306.9374	3.70e5	1.07	0.11
44:	102.8741	1.16e6	3.36	0.36					
45:	103.7807	8.11e5	2.34	0.25					
46:	105.7236	8.37e5	2.42	0.26					
47:	106.7598	8.06e5	2.33	0.25					
48:	107.6665	1.28e6	3.71	0.40					
49:	108.2493	4.61e5	1.33	0.14					
50:	112.7827	8.49e5	2.45	0.26					
51:	113.6246	4.05e5	1.17	0.13					
52:	114.7904	4.75e5	1.37	0.15					
53:	116.2152	3.98e5	1.15	0.12					
54:	116.5390	5.86e5	1.69	0.18					
55:	117.6400	3.92e5	1.13	0.12					
56:	118.7410	2.67e6	7.71	0.83					
57:	120.6840	1.94e6	5.61	0.60					
58:	121.7850	3.97e5	1.15	0.12					
59:	124.8290	9.92e5	2.86	0.31					
60:	126.6424	3.87e5	1.12	0.12					
61:	128.7797	5.40e5	1.56	0.17					
62:	130.0103	5.42e5	1.57	0.17					
63:	131.7590	6.1 e5	1.88	0.20					
64:	133.4430	3.87e5	1.12	0.12					
65:	134.9327	8.18e5	2.36	0.25					
66:	135.8394	4.757e5	1.32	0.14					
67:	138.8836	6.68e5	1.93	0.21					
68:	140.9562	2.66e6	7.69	0.82					
69:	143.0936	3.75e5	1.08	0.12					

Табела 15 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,192$, $100V$

HIDROLIZA-3-PH=3,192+100 9 (0.316)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.8407	5.38e6	47.50	2.61	70:	110.5808	6.76e5	5.97	0.33	140:	224.8445	2.46e5	2.18	0.
2:	41.7472	5.19e6	45.85	2.52	71:	111.0341	2.42e5	2.14	0.12	141:	227.0472	2.18e5	1.92	0.
3:	43.5600	8.84e6	78.06	4.30	72:	112.5884	1.89e6	16.67	0.92	142:	228.8613	2.15e5	1.90	0.
4:	45.0492	4.81 e6	42.47	2.34	73:	114.6609	2.04e6	18.04	0.99	143:	230.6753	3.23e5	2.85	0.
5:	45.6966	2.07e6	18.24	1.00	74:	116.6685	9.39e5	8.29	0.46	144:	232.8133	1.53e5	1.35	0.
6:	45.8261	1.63e6	14.39	0.79	75:	118.7410	6.26e5	5.53	0.30	145:	235.0809	1.18e5	1.04	0.
7:	46.7326	1.66e5	1.46	0.08	76:	120.7487	1.58e6	13.94	0.77	146:	236.7654	2.94e5	2.59	0.
8:	47.7038	1.72e5	1.52	0.08	77:	122.7565	5.79e5	5.11	0.28	147:	238.8386	2.92e5	2.57	0.
9:	48.9987	7.05e5	6.22	0.34	78:	124.7642	4.97e5	4.39	0.24	148:	240.3288	1.43e5	1.26	0.
10:	49.7757	1.13e7	100.00	5.50	79:	126.7072	3.94e5	3.48	0.19	149:	240.6527	2.81e5	2.48	0.
11:	50.6821	7.00e6	61.84	3.40	80:	127.8082	2.53e5	2.23	0.12	150:	242.5316	1.30e5	1.15	0.
12:	51.7828	1.36e5	1.20	0.07	81:	128.7797	1.92e5	1.69	0.09	151:	242.7908	2.95e5	2.61	0.
13:	52.4951	1.34e6	11.80	0.65	82:	129.8160	1.74e5	1.53	0.08	152:	244.7993	1.73e5	1.53	0.
14:	53.4663	1.20e5	1.06	0.06	83:	130.7228	2.61e5	2.31	0.13	153:	246.8077	1.61e5	1.42	0.
15:	54.3080	1.10e6	9.70	0.53	84:	131.5647	1.20e5	1.06	0.06	154:	248.3627	2.35e5	2.08	0.
16:	54.6965	2.18e6	19.28	1.06	85:	132.3420	1.51e5	1.34	0.07	155:	252.8333	1.78e5	1.57	0.
17:	55.2145	5.68e5	5.02	0.28	86:	132.7953	3.80e5	3.35	0.18	156:	254.8418	2.36e5	2.08	0.
18:	56.5095	9.41e6	83.10	4.57	87:	134.2202	1.95e5	1.72	0.09	157:	256.7856	2.06e5	1.82	0.
19:	58.5167	1.08e7	95.69	5.27	88:	134.7384	5.40e5	4.77	0.26	158:	258.7941	1.81e5	1.59	0.
20:	60.5239	4.71e6	41.56	2.29	89:	136.8110	1.35e6	11.93	0.66	159:	260.6731	2.37e5	2.09	0.
21:	62.5959	3.36e6	29.63	1.63	90:	137.8473	1.17e5	1.03	0.06	160:	262.6817	1.59e5	1.40	0.
22:	64.6032	2.69e6	23.77	1.31	91:	138.8836	5.39e5	4.76	0.26	161:	264.9494	1.26e5	1.11	0.
23:	66.8048	8.41e5	7.43	0.41	92:	139.8551	2.29e5	2.02	0.11	162:	268.7722	2.07e5	1.83	0.
24:	68.0998	3.67e5	3.24	0.18	93:	140.8267	4.89e5	4.32	0.24	163:	270.6512	1.88e5	1.66	0.
25:	68.6178	1.26e6	11.14	0.61	94:	142.8345	4.73e5	4.18	0.23	164:	272.9839	2.20e5	1.95	0.
26:	69.8481	3.13e5	2.77	0.15	95:	144.8424	2.19e5	1.93	0.11	165:	274.6685	1.95e5	1.72	0.
27:	70.1071	2.14e5	1.89	0.10	96:	146.7208	2.24e5	1.98	0.11	166:	276.7419	1.48e5	1.31	0.
28:	71.5317	1.06e6	9.34	0.51	97:	148.9230	1.82e5	1.60	0.09	167:	278.6210	1.59e5	1.41	0.
29:	71.9850	4.51e5	3.98	0.22	98:	149.8298	1.47e5	1.30	0.07	168:	280.6944	1.35e5	1.19	0.
30:	72.2440	2.03e5	1.79	0.10	99:	150.9310	2.37e5	2.09	0.12	169:	282.7679	2.19e5	1.93	0.
31:	72.7620	2.33e5	2.06	0.11	100:	151.9026	1.26e5	1.12	0.06	170:	284.7766	1.59e5	1.40	0.
32:	73.0210	4.15e5	3.67	0.20	101:	152.9389	5.01e5	4.43	0.24	171:	286.8501	2.41e5	2.13	0.
33:	73.2800	5.46e5	4.82	0.27	102:	154.8821	1.68e5	1.48	0.08	172:	288.6644	1.19e5	1.05	0.
34:	73.7333	1.86e5	1.64	0.09	103:	156.6957	2.96e5	2.61	0.14	173:	292.6818	2.32e5	2.05	0.
35:	74.3808	1.41e6	12.46	0.69	104:	158.8333	1.03e6	9.13	0.50	174:	294.6905	1.48e5	1.31	0.
36:	74.8341	4.81 e5	4.25	0.23	105:	160.8413	1.40e5	1.23	0.07	175:	296.8288	1.67e5	1.47	0.
37:	76.5825	1.50e6	13.28	0.73	106:	162.9140	2.21e5	1.95	0.11	176:	298.2544	1.49e5	1.32	0.
38:	78.5899	1.37e6	12.07	0.66	107:	164.9221	2.09e5	1.85	0.10	177:	298.6432	3.32e5	2.93	0.
39:	79.1727	2.21e5	1.95	0.11	108:	166.8653	1.78e5	1.57	0.09	178:	300.7815	2.21e5	1.95	0.
40:	80.5973	2.30e6	20.28	1.12	109:	167.8369	1.89e5	1.67	0.09	179:	302.7255	1.52e5	1.34	0.
41:	82.5399	1.56e6	13.78	0.76	110:	169.9098	1.72e5	1.52	0.08	180:	305.0582	1.85e5	1.64	0.
42:	83.1875	3.24e5	2.86	0.16	111:	172.7599	2.56e5	2.26	0.12	181:	306.6134	1.21e5	1.07	0.
43:	83.7056	1.39e5	1.23	0.07	112:	174.8328	8.49e5	7.50	0.41	182:	308.5573	1.80e5	1.59	0.
44:	83.8998	2.93e5	2.59	0.14	113:	175.2862	1.34e5	1.18	0.07	183:	310.8902	1.24e5	1.09	0.
45:	84.2884	7.08e5	6.25	0.34	114:	176.7761	3.13e5	2.76	0.15	184:	314.7133	1.83e5	1.61	0.
46:	84.8712	3.18e5	2.81	0.15	115:	178.7195	4.70e5	4.15	0.23	185:	316.7221	1.80e5	1.59	0.
47:	85.1302	2.28e5	2.01	0.11	116:	180.8571	6.16e5	5.44	0.30	186:	318.6662	1.78e5	1.58	0.
48:	85.2597	2.55e5	2.26	0.12	117:	182.8653	3.13e5	2.76	0.15	187:	322.7486	1.36e5	1.20	0.
49:	86.4253	2.54e5	2.25	0.12	118:	184.9382	3.28e5	2.90	0.16	188:	326.8959	1.14e5	1.00	0.
50:	88.5623	7.17e5	6.34	0.35	119:	186.8168	1.87e5	1.65	0.09	189:	330.3304	1.15e5	1.02	0.
51:	90.6993	1.11e6	9.80	0.54	120:	188.9545	2.11e5	1.87	0.10	190:	332.7929	1.26e5	1.11	0.
52:	92.5773	3.84e5	3.39	0.19	121:	190.8331	8.62e5	7.62	0.42	191:	335.0610	1.69e5	1.49	0.
53:	93.4839	1.54e5	1.36	0.07	122:	192.8413	4.31e5	3.81	0.21	192:	336.6162	1.65e5	1.46	0.
54:	94.1315	1.83e5	1.61	0.09	123:	194.7848	4.03e5	3.56	0.20	193:	345.0407	1.21e5	1.07	0.
55:	94.4553	2.71e5	2.39	0.13	124:	195.8213	1.24e5	1.10	0.06	194:	346.8552	1.73e5	1.53	0.
56:	94.7791	4.75e5	4.19	0.23	125:	196.8578	3.36e5	2.96	0.16	195:	350.6139	1.19e5	1.05	0.
57:	96.1390	3.30e5	2.91	0.16	126:	198.8012	5.11e5	4.52	0.25	196:	352.8820	1.55e5	1.37	0.
58:	96.5924	2.26e6	19.96	1.10	127:	200.7447	2.68e5	2.36	0.13	197:	354.9558	1.79e5	1.58	0.
59:	98.6647	1.32e6	11.69	0.64	128:	202.8825	3.32e5	2.93	0.16	198:	364.9358	9.35e5	8.26	0.
60:	100.3484	2.14e5	1.89	0.10	129:	204.8260	3.06e5	2.70	0.15	199:	366.8152.	1.20e5	1.06	0.
61:	101.1903	1.28e5	1.13	0.06	130:	206.8990	1.17e5	1.03	0.06	200:	370.2499	1.47e5	1.30	0.
62:	102.8093	5.20e5	4.59	0.25	131:	207.7412	1.21e5	1.07	0.06	201:	372.8422	1.36e5	1.20	0.
63:	104.7522	6.90e5	6.09	0.34	132:	208.7130	3.25e5	2.87	0.16	202:	374.3976	1.16e5	1.02	0.
64:	105.2055	1.89e5	1.67	0.09	133:	210.8508	2.08e5	1.84	0.10	203:	376.7306	1.74e5	1.54	0.
65:	105.9826	1.75e5	1.54	0.08	134:	212.9239	1.77e5	1.56	0.09	204:	378.6748	1.28e5	1.13	0.
66:	106.7598	5.33e5	4.71	0.26	135:	214.8027	2.53e5	2.23	0.12	205:	380.8135	2.42e5	2.13	0.
67:	107.6017	2.50e5	2.21	0.12	136:	216.7462	2.38e5	2.11	0.12	206:	382.8225	1.45e5	1.28	0.
68:	108.7674	3.33e6	2.94	0.16	137:	218.8842	2.71e5	2.39	0.13	207:	390.5995	1.62e5	1.43	0.
69:	109.8684	1.49e5	1.31	0.07	138:	220.8925	2.42e5	2.13	0.12					
					139:	222.7713	1.58e5	1.39	0.					

Табела 16 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027\text{mM}$, $pH=3,594$, $10V$

HIDROLIZA-2-PH=3,594+10 11 (0.387)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.2580	9.07e6	18.41	3.48
2:	41.3587	4.92e7	100.00	18.90
3:	46.5383	1.43e7	28.96	5.48
4:	47.8980	5.85e5	1.19	0.22
5:	48.6102	6.12e5	1.24	0.23
6:	51.4591	1.03e6	2.09	0.40
7:	54.5023	6.04e6	12.27	2.32
8:	54.8260	1.79e6	3.63	0.69
9:	55.0850	1.90e6	3.86	0.73
10:	55.7325	7.16e6	14.53	2.75
11:	56.1857	3.00e6	6.09	1.15
12:	56.7037	2.52e6	5.13	0.97
13:	58.3872	2.11e6	4.28	0.81
14:	59.2937	3.51e6	7.13	1.35
15:	60.3944	1.93e7	39.17	7.40
16:	62.5312	6.04e5	1.23	0.23
17:	63.5024	2.21 e6	4.49	0.85
18:	64.4090	1.59e6	3.23	0.61
19:	67.1933	8.78e5	1.78	0.34
20:	68.6178	4.13e6	8.39	1.59
21:	68.9416	1.86e6	3.78	0.71
22:	73.6038	1.40e6	2.84	0.54
23:	74.2513	7.95e5	1.61	0.31
24:	75.2226	5.22e5	1.06	0.20
25:	75.8054	1.75e6	3.55	0.67
26:	77.3595	7.93e5	1.61	0.30
27:	78.5251	1.47e6	2.98	0.56
28:	82.6047	2.01 e6	4.07	0.77
29:	85.4540	1.08e6	2.20	0.42
30:	89.4689	5.75e5	1.17	0.22
31:	89.6632	7.67e5	1.56	0.29
32:	90.6346	1.62e6	3.30	0.62
33:	94.5201	6.27e5	1.27	0.24
34:	96.6571	8.45e6	17.16	3.24
35:	98.6647	4.68e6	9.51	1.80
36:	101.8379	8.29e6	16.84	3.18
37:	103.2627	7.30e5	1.48	0.28
38:	105.7236	9.37e5	1.90	0.36
39:	106.6303	7.06e5	1.43	0.27
40:	108.3141	1.23e6	2.50	0.47
41:	108.7674	5.25e5	1.07	0.20
42:	112.7179	3.55e6	7.21	1.36
43:	114.6609	7.05e5	1.43	0.27
44:	115.8266	5.15e5	1.05	0.20
45:	116.6685	5.50e5	1.12	0.21
46:	118.8058	2.10e6	4.27	0.81
47:	120.6192	7.77e5	1.58	0.30
48:	124.7642	5.74e5	1.17	0.22
49:	126.7072	5.25e5	1.07	0.20
50:	128.7150	7.69e5	1.56	0.30
51:	131.7590	5.07e5	1.03	0.19
52:	134.8679	6.30e5	1.28	0.24
53:	138.9484	6.82e5	1.39	0.26
54:	140.8914	6.44e5	1.31	0.25
55:	150.9310	1.07e6	2.17	0.41
56:	162.0072	1.56e6	3.17	0.60
57:	162.9788	5.70e5	1.16	0.22
58:	174.8976	6.65e5	1.35	0.26
59:	176.8409	6.52e5	1.32	0.25
60:	188.8250	7.80e5	1.58	0.30
61:	213.9605	6.04e6	12.27	2.32
62:	215.0618	5.96e5	1.21	0.23
63:	223.0305	5.44e5	1.10	0.21
64:	230.9993	6.37e5	1.29	0.24
65:	288.7940	5.47e5	1.11	0.21

Табела 17 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 3,594$, $100V$

HIDROLIZA-2-PH=3,594+100 11 (0.352)					Scan ES+									
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.7760	3.98e6	37.15	2.76	70:	114.9847	2.79e5	2.60	0.19	139:	298.7727	1.17e5	1.10	0.
2:	41.2292	1.84e6	17.18	1.28	71:	115.1790	1.45e5	1.35	0.10	140:	300.5871	2.03e5	1.90	0.
3:	41.4235	6.99e5	6.53	0.49	72:	116.7333	3.93e5	3.67	0.27	141:	302.7903	1.79e5	1.67	0.
4:	41.8119	2.23e6	20.87	1.55	73:	118.8705	2.60e5	2.43	0.18	142:	304.6694	1.77e5	1.65	0.
5:	43.5600	1.06e7	98.96	7.36	74:	120.6840	2.86e6	26.73	1.99	143:	306.6134	1.10e5	1.03	0.
6:	44.9844	3.70e6	34.59	2.57	75:	122.7565	8.52e5	7.96	0.59	144:	308.8814	1.11e5	1.04	0.
7:	45.4377	8.33e5	7.78	0.58	76:	124.7642	3.74e5	3.50	0.26	145:	314.6486	1.15e5	1.07	0.
8:	45.7614	1.66e6	15.52	1.15	77:	126.7072	1.66e5	1.55	0.12	146:	318.7310	1.58e5	1.47	0.
9:	46.7973	2.03e5	1.90	0.14	78:	127.8082	1.26e5	1.18	0.09	147:	320.5454	1.14e5	1.07	0.
10:	48.3512	1.17e5	1.09	0.08	79:	132.8601	2.93e5	2.73	0.20	148:	322.6190	1.24e5	1.16	0.
11:	49.3224	3.52e6	32.89	2.45	80:	134.6736	1.82e5	1.70	0.13	149:	324.8223	1.44e5	1.34	0.
12:	49.5167	5.63e6	52.54	3.91	81:	136.8110	1.39e5	1.29	0.10	150:	344.7815	1.71e5	1.60	0.
13:	49.9699	1.78e6	16.61	1.24	82:	138.7540	1.08e6	10.08	0.75	151:	358.7145	1.09e5	1.02	0.
14:	50.5526	6.87e6	64.13	4.77	83:	140.8267	3.67e5	3.42	0.25	152:	360.7883	1.68e5	1.57	0.
15:	51.7828	2.15e5	2.01	0.15	84:	142.7050	2.54e5	2.38	0.18	153:	364.8710	3.91e5	3.65	0.
16:	52.3656	2.70e5	2.52	0.19	85:	144.9720	1.73e5	1.62	0.12	154:	366.7504	1.44e5	1.35	0.
17:	52.6893	9.09e5	8.49	0.63	86:	146.8503	1.40e5	1.31	0.10	155:	378.5452	1.36e5	1.27	0.
18:	53.5310	1.24e5	1.16	0.09	87:	148.9230	1.24e5	1.16	0.09	156:	380.8783	1.52e5	1.42	0.
19:	53.6605	2.51e5	2.35	0.17	88:	150.8014	1.77e5	1.65	0.12	157:	386.6462	1.07e5	1.00	0.
20:	53.9843	4.75e5	4.43	0.33	89:	152.8741	1.47e5	1.37	0.10	158:	496.4388	1.22e5	1.14	0.
21:	54.3728	5.07e5	4.73	0.35	90:	156.8253	4.02e5	3.75	0.28					
22:	54.9555	1.19e6	11.10	0.83	91:	158.8333	2.87e5	2.68	0.20					
23:	55.4087	2.64e5	2.47	0.18	92:	160.9060	1.21e5	1.13	0.08					
24:	55.9267	9.70e5	9.06	0.67	93:	164.9221	1.60e5	1.50	0.11					
25:	56.5095	3.59e6	33.56	2.50	94:	166.8005	1.61e5	1.51	0.11					
26:	58.5167	3.06e6	28.57	2.13	95:	174.8328	2.25e5	2.10	0.16					
27:	60.5239	1.07e7	100.00	7.44	96:	176.8409	1.54e5	1.43	0.11					
28:	62.5312	4.02e6	37.59	2.80	97:	178.8490	1.45e5	1.35	0.10					
29:	64.2147	5.65e5	5.28	0.39	98:	180.7924	5.70e5	5.33	0.40					
30:	64.6032	1.74e6	16.21	1.21	99:	182.2175	1.29e5	1.20	0.09					
31:	66.4810	1.24e5	1.16	0.09	100:	182.6062	3.27e5	3.06	0.23					
32:	67.2580	2.55e5	2.38	0.18	101:	184.8734	4.03e5	3.76	0.28					
33:	68.2941	1.99e5	1.86	0.14	102:	186.6872	1.96e5	1.83	0.14					
34:	68.8768	1.50e5	1.40	0.10	103:	190.7036	1.99e5	1.86	0.14					
35:	69.4596	6.00e5	5.61	0.42	104:	192.9709	1.44e5	1.35	0.10					
36:	70.3014	1.22e5	1.14	0.09	105:	196.8578	2.38e5	2.22	0.17					
37:	71.1432	1.79e5	1.67	0.12	106:	197.1817	1.17e5	1.09	0.08					
38:	71.7259	1.84e5	1.72	0.13	107:	198.8012	3.22e5	3.01	0.22					
39:	71.9850	3.53e5	3.30	0.25	108:	200.7447	2.71e5	2.53	0.19					
40:	72.6972	2.54e5	2.38	0.18	109:	202.8825	2.04e5	1.90	0.14					
41:	72.9563	3.90e5	3.64	0.27	110:	208.7130	2.05e5	1.91	0.14					
42:	73.6038	2.57e5	2.40	0.18	111:	211.0452	2.00e5	1.87	0.14					
43:	74.1218	8.74e5	8.17	0.61	112:	214.8675	1.19e5	1.11	0.08					
44:	74.9636	1.85e5	1.72	0.13	113:	216.8110	1.99e5	1.86	0.14					
45:	76.5825	1.04e6	9.71	0.72	114:	218.8842	1.61e5	1.50	0.11					
46:	78.5899	1.92e6	17.95	1.34	115:	220.7629	1.33e5	1.24	0.09					
47:	80.5325	9.39e5	8.77	0.65	116:	222.7713	1.90e5	1.77	0.13					
48:	82.0867	1.57e5	1.47	0.11	117:	224.7149	1.30e5	1.21	0.09					
49:	82.2162	1.90e5	1.78	0.13	118:	234.8865	1.32e5	1.23	0.09					
50:	82.7342	4.58e5	4.28	0.32	119:	238.7738	3.65e5	3.41	0.25					
51:	83.8998	1.71e5	1.60	0.12	120:	240.6527	4.51e5	4.21	0.31					
52:	85.3892	1.51e5	1.41	0.11	121:	242.8556	2.42e5	2.26	0.17					
53:	88.5623	6.29e5	5.87	0.44	122:	244.8640	2.60e5	2.43	0.18					
54:	88.9509	1.66e5	1.55	0.12	123:	248.6867	1.15e5	1.07	0.08					
55:	90.5698	8.96e5	8.37	0.62	124:	256.9152	1.59e5	1.49	0.11					
56:	92.6421	3.37e5	3.14	0.23	125:	258.6646	2.44e5	2.28	0.17					
57:	94.7791	2.33e5	2.18	0.16	126:	260.8027	1.88e5	1.75	0.13					
58:	96.5276	8.22e5	7.68	0.57	127:	262.9409	2.29e5	2.13	0.16					
59:	97.1104	1.29e5	1.21	0.09	128:	266.5693	1.32e5	1.24	0.09					
60:	98.4704	3.39e5	3.16	0.24	129:	268.7722	1.79e5	1.67	0.12					
61:	100.0246	1.18e5	1.11	0.08	130:	270.5217	1.66e5	1.55	0.12					
62:	102.6798	2.97e5	2.78	0.21	131:	272.8543	1.23e5	1.15	0.09					
63:	104.6226	5.40e5	5.04	0.38	132:	274.8629	1.65e5	1.54	0.11					
64:	104.8817	2.41e5	2.25	0.17	133:	276.7419	1.80e5	1.68	0.12					
65:	106.6950	2.96e5	2.76	0.21	134:	278.7506	1.43e5	1.34	0.10					
66:	108.6379	1.15e5	1.08	0.08	135:	280.7592	1.38e5	1.29	0.10					
67:	110.7751	1.88e5	1.75	0.13	136:	282.8327	1.08e5	1.01	0.08					
68:	112.6532	9.04e5	8.45	0.63	137:	284.7766	1.35e5	1.26	0.09					
69:	114.5961	8.62e5	8.05	0.60	138:	296.6344	2.37e5	2.22	0.16					

Табела 18 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 4,814$, $100V$

HIDROLIZA-1-PH=4,814+100 10 (0.352)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.7760	2.80e6	33.20	2.85	70:	119.0648	1.25e5	1.48	0.13
2:	41.7472	1.81e6	21.50	1.85	71:	120.7487	1.12e6	13.31	1.14
3:	42.9126	8.09e5	9.58	0.82	72:	122.6917	1.20e6	14.26	1.22
4:	43.2363	1.90e6	22.49	1.93	73:	124.6347	1.06e5	1.26	0.11
5:	43.6895	4.41 e6	52.28	4.49	74:	130.2694	1.04e5	1.24	0.11
6:	44.2075	2.37e6	28.12	2.41	75:	132.7306	1.68e5	1.98	0.17
7:	44.5312	1.62e6	19.15	1.64	76:	132.9896	8.75e4	1.04	0.09
8:	44.7255	9.37e5	11.10	0.95	77:	134.8031	1.32e5	1.57	0.13
9:	45.5024	2.94e6	34.81	2.99	78:	138.7540	4.25e5	5.04	0.43
10:	46.8621	1.49e5	1.76	0.15	79:	140.8267	3.17e5	3.75	0.32
11:	47.5743	1.06e5	1.26	0.11	80:	142.8993	1.03e5	1.22	0.10
12:	48.2217	1.07e5	1.27	0.11	81:	146.8503	1.01e5	1.19	0.10
13:	49.7109	8.44e6	100.00	8.59	82:	155.0764	8.68e4	1.03	0.09
14:	50.1642	2.25e6	26.67	2.29	83:	156.7605	1.92e5	2.27	0.19
15:	50.6821	4.80e6	56.85	4.88	84:	158.7685	2.58e5	3.06	0.26
16:	52.1066	5.06e5	6.00	0.52	85:	174.8976	1.20e5	1.42	0.12
17:	52.7541	1.47e5	1.74	0.15	86:	176.8409	1.42e5	1.69	0.14
18:	53.5310	3.30e5	3.91	0.34	87:	180.7924	2.93e5	3.47	0.30
19:	54.3728	2.83e5	3.35	0.29	88:	182.8005	2.70e5	3.20	0.27
20:	5.5.0850	2.60e5	3.09	0.26	89:	190.7036	1.15e5	1.36	0.12
21:	56.5095	5.61e6	66.49	5.71	90:	198.8660	1.66e5	1.96	0.17
22:	58.5167	6.63e5	7.86	0.67	91:	208.7778	1.15e5	1.36	0.12
23:	60.5239	5.67e6	67.12	5.76	92:	218.7546	1.36e5	1.61	0.14
24:	62.5312	3.32e6	39.35	3.38	93:	234.7570	9.79e4	1.16	0.10
25:	63.6320	1.72e5	2.04	0.17	94:	236.7654	2.04e5	2.42	0.21
26:	63.8262	3.43e5	4.06	0.35	95:	238.7738	2.79e5	3.31	0.28
27:	64.1500	5.39e5	6.38	0.55	96:	240.7175	3.10e5	3.67	0.32
28:	64.6680	1.08e6	12.75	1.09	97:	242.7260	2.16e5	2.56	0.22
29:	65.7687	1.22e5	1.44	0.12	98:	243.1147	9.03e4	1.07	0.09
30:	66.2868	1.21e5	1.44	0.12	99:	244.7993	1.09e5	1.29	0.11
31:	66.7400	8.46e4	1.00	0.09	100:	256.5264	1.05e5	1.25	0.11
32:	67.5170	3.34e5	3.95	0.34	101:	258.7941	9.89e4	1.17	0.10
33:	68.6178	2.52e5	2.98	0.26	102:	260.8675	1.16e5	1.37	0.12
34:	68.8768	9.97e4	1.18	0.10	103:	269.1610	1.24e5	1.46	0.13
35:	69.7186	1.46e5	1.72	0.15	104:	272.5951	1.43e5	1.70	0.15
36:	70.9489	1.28e5	1.52	0.13	105:	278.7506	1.03e5	1.22	0.11
37:	71.7259	1.78e5	2.11	0.18	106:	280.6944	8.59e4	1.02	0.09
38:	72.6325	1.46e5	1.73	0.15	107:	289.0532	1.03e5	1.22	0.10
39:	73.2153	1.45e5	1.72	0.15	108:	296.7640	2.70e5	3.20	0.28
40:	73.7333	5.91 e5	7.00	0.60	109:	298.5784	1.07e5	1.27	0.11
41:	74.7046	2.43e5	2.88	0.25	110:	318.6013	1.35e5	1.60	0.14
42:	76.5177	3.52e5	4.17	0.36	111:	364.8062	3.00e5	3.55	0.30
43:	77.4890	1.00e5	1.19	0.10					
44:	78.5899	1.40e6	16.55	1.42					
45:	79.9497	1.30e5	1.53	0.13					
46:	80.0792	2.21 e5	2.62	0.22					
47:	80.5325	5.49e5	6.51	0.56					
48:	82.4104	1.42e5	1.68	0.14					
49:	82.7342	2.99e5	3.54	0.30					
50:	84.6769	1.02e5	1.21	0.10					
51:	88.4328	2.15e5	2.55	0.22					
52:	90.6993	4.06e5	4.81	0.41					
53:	91.2821	9.38e4	1.11	0.10					
54:	92.4478	1.19e5	1.42	0.12					
55:	94.1963	1.53e5	1.82	0.16					
56:	94.9734	1.32e5	1.57	0.13					
57:	96.2686	2.84e5	3.36	0.29					
58:	96.5924	7.14e5	8.45	0.73					
59:	98.5351	2.47e5	2.93	0.25					
60:	101.0608	8.45e4	1.00	0.09					
61:	102.4855	1.32e5	1.57	0.13					
62:	104.1693	1.13e5	1.34	0.11					
63:	104.9465	1.04e5	1.23	0.11					
64:	106.6303	1.91e5	2.26	0.19					
65:	109.8036	9.22e4	1.09	0.09					
66:	112.5237	1.14e6	13.51	1.16					
67:	114.6609	5.03e5	5.96	0.51					
68:	116.7333	4.65e5	5.50	0.47					
69:	118.7410	2.96e5	3.51	0.30					

Табела 19 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,027mM$, $pH= 4,814$, $10V$

HIDROLIZA-1-PH=4,814+10 8 (0,281)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.2580	1.33e7	34.12	5.45	70:	214.0253	4.76e6	12.24	1.96
2:	40.8407	3.89e7	100.00	15.99	71:	215.1266	4.28e5	1.10	0.18
3:	41.6824	1.62e7	41.71	6.67	72:	230.9345	6.58e5	1.69	0.27
4:	42.8478	4.86e5	1.25	0.20	73:	235.9879	1.15e6	2.95	0.47
5:	46.5383	1.91e7	49.00	7.83	74:	236.4415	4.31e5	1.11	0.18
6:	47.8980	8.65e5	2.22	0.36	75:	251.9262	5.16e5	1.33	0.21
7:	48.6750	6.31e5	1.62	0.26					
8:	51.0706	6.11e5	1.57	0.25					
9:	51.6533	8.08e5	2.08	0.33					
10:	54.3080	2.36e6	6.07	0.97					
11:	54.5670	3.37e6	8.66	1.38					
12:	54.8907	5.18e6	13.32	2.13					
13:	55.7972	6.69e6	17.21	2.75					
14:	56.6390	4.62e6	11.88	1.90					
15:	58.3224	2.32e6	5.98	0.96					
16:	59.2937	3.36e6	8.64	1.38					
17:	59.5527	3.74e6	9.62	1.54					
18:	60.3944	8.65e6	22.25	3.56					
19:	63.5024	1.67e6	4.28	0.68					
20:	64.2147	1.12e6	2.87	0.46					
21:	64.7327	6.11e5	1.57	0.25					
22:	67.0638	4.66e5	1.20	0.19					
23:	67.3228	4.49e5	1.16	0.18					
24:	68.4883	2.90e6	7.45	1.19					
25:	73.7333	1.49e6	3.82	0.61					
26:	76.5825	1.74e6	4.49	0.72					
27:	77.6185	8.49e5	2.18	0.35					
28:	77.8776	4.64e5	1.19	0.19					
29:	79.1079	5.16e5	1.33	0.21					
30:	82.6047	3.97e6	10.21	1.63					
31:	84.9359	1.33e6	3.43	0.55					
32:	85.1949	3.94e5	1.01	0.16					
33:	85.7778	1.39e6	3.59	0.57					
34:	89.4689	4.08e5	1.05	0.17					
35:	90.3108	8.54e5	2.20	0.35					
36:	90.6993	5.50e5	1.41	0.23					
37:	90.9583	4.50e5	1.16	0.18					
38:	94.7143	8.54e5	2.20	0.35					
39:	95.2324	4.27e5	1.10	0.18					
40:	96.7219	1.56e6	4.00	0.64					
41:	98.7294	5.86e6	15.06	2.41					
2:	100.6075	1.07e6	2.75	0.44					
43:	101.8379	6.12e6	15.73	2.52					
44:	103.1331	4.25e5	1.09	0.17					
45:	105.8531	7.36e5	1.89	0.30					
46:	106.8245	4.80e5	1.23	0.20					
47:	107.7312	7.60e5	1.95	0.31					
48:	112.7179	3.73e6	9.59	1.53					
49:	114.7904	8.08e5	2.08	0.33					
50:	115.8914	4.53e5	1.17	0.19					
51:	116.6685	5.42e5	1.39	0.22					
52:	118.6762	2.60e6	6.70	1.07					
53:	120.8783	1.70e6	4.37	0.70					
54:	124.8290	4.40e5	1.13	0.18					
55:	126.8367	4.01e5	1.03	0.16					
56:	128.7797	7.70e5	1.98	0.32					
57:	130.1399	4.27e5	1.10	0.18					
58:	131.9534	4.62e5	1.19	0.19					
59:	132.9896	4.46e5	1.15	0.18					
60:	134.9975	6.47e5	1.66	0.27					
61:	138.8188	8.06e5	2.07	0.33					
62:	142.8993	7.34e5	1.89	0.30					
63:	146.9151	4.44e5	1.14	0.18					
64:	155.8537	4.74e5	1.22	0.19					
65:	160.8413	4.62e5	1.19	0.19					
66:	162.9140	4.33e5	1.11	0.18					
67:	163.8209	6.32e5	1.63	0.26					
68:	172.9543	4.12e5	1.06	0.17					
69:	176.8409	1.13e6	2.90	0.46					

Табела 20 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=1,0mM$, $pH= 4,184$, $50V$

HIDROLIZA-7-PH=4,184+100 11 (0.387)										Scan ES+				
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	40.0638	6.68e5	5.55	0.38	70:	171.0110	1.30e5	1.08	0.07	139:	312.6397	5.86e5	4.87	0.
2:	41.5529	1.20e7	100.00	6.81	71:	171.8531	1.77e5	1.47	0.10	140:	314.7133	4.40e5	3.66	0.
3:	43.4953	5.24e6	43.57	2.97	72:	174.8328	1.05e6	8.73	0.59	141:	316.7221	4.55e5	3.78	0.
4:	45.8261	1.37e5	1.14	0.08	73:	176.4522	1.77e5	1.47	0.10	142:	318.8606	3.20e5	2.66	0.
5:	49.5814	4.35e6	36.15	2.46	74:	176.8409	5.56e5	4.62	0.31	143:	320.8046	2.30e5	1.91	0.
6:	50.6174	4.52e6	37.59	2.56	75:	178.8490	3.35e5	2.79	0.19	144:	322.6838	3.07e5	2.55	0.
7:	52.1066	3.70e5	3.08	0.21	76:	179.8207	2.40e5	1.99	0.14	145:	324.7575	3.20e5	2.66	0.
8:	53.7900	1.48e5	1.23	0.08	77:	180.7924	1.60e6	13.25	0.90	146:	328.6456	2.68e5	2.23	0.
9:	54.8260	3.20e5	2.66	0.18	78:	182.8005	1.32e6	10.98	0.75	147:	330.7192	2.77e5	2.30	0.
10:	56.1210	2.91e5	2.42	0.16	79:	184.8734	2.80e5	2.33	0.16	148:	332.5985	4.74e5	3.93	0.
11:	56.8332	1.64e5	1.37	0.09	80:	186.8168	1.25e5	1.04	0.07	149:	334.3481	2.33e5	1.94	0.
12:	58.3872	5.47e5	4.54	0.31	81:	190.8331	1.40e5	1.16	0.08	150:	336.8107	2.16e5	1.80	0.
13:	58.9699	2.09e5	1.74	0.12	82:	192.7766	4.39e5	3.65	0.25	151:	338.7548	2.65e5	2.20	0.
14:	60.5239	3.28e6	27.28	1.86	83:	194.8495	2.40e5	2.00	0.14	152:	340.7636	4.61 e5	3.83	0.
15:	62.2722	1.20e5	1.00	0.07	84:	197.7647	1.47e5	1.22	0.08	153:	342.6429	6.00e5	4.99	0.
16:	62.5312	2.30e5	1.91	0.13	85:	198.8012	2.22e6	18.45	1.26	154:	344.7167	1.37e5	1.14	0.
17:	63.5024	2.20e5	1.82	0.12	86:	199.8377	1.40e5	1.17	0.08	155:	346.5960	2.96e5	2.46	0.
18:	64.2795	1.85e5	1.53	0.10	87:	200.8094	1.11e6	9.23	0.63	156:	348.6049	2.32e5	1.85	0.
19:	65.1212	2.32e5	1.93	0.13	88:	202.8177	2.45e5	2.03	0.14	157:	350.6786	5.48e5	4.56	0.
20:	68.7473	2.68e5	2.23	0.15	89:	204.8908	5.59e5	4.65	0.32	158:	352.5580	1.62e5	1.34	0.
21:	70.1719	7.45e5	6.19	0.42	90:	208.7778	2.74e5	2.28	0.15	159:	354.7614	1.49e5	1.24	0.
22:	70.5604	1.63e6	13.54	0.92	91:	210.8508	3.79e5	3.15	0.21	160:	356.6407	3.45e5	2.87	0.
23:	72.6325	4.85e5	4.03	0.27	92:	212.7944	1.81e5	1.51	0.10	161:	358.7793	2.80e5	2.32	0.
24:	73.7980	3.74e5	3.11	0.21	93:	216.8110	2.77e6	23.01	1.57	162:	360.7234	3.45e5	2.86	0.
25:	74.5751	2.17e5	1.80	0.12	94:	218.6898	9.20e5	7.64	0.52	163:	362.6676	1.73e5	1.43	0.
26:	75.5464	2.57e5	2.13	0.15	95:	220.8925	1.52e5	1.26	0.09	164:	364.7414	2.21e5	1.83	0.
27:	76.3882	3.10e5	2.58	0.18	96:	222.7713	6.46e5	5.37	0.37	165:	366.6208	3.07e5	2.55	0.
28:	76.7120	1.21e5	1.01	0.07	97:	224.7149	2.30e5	1.91	0.13	166:	368.7594	2.91 e5	2.42	0.
29:	77.1005	3.10e5	2.58	0.18	98:	226.7233	3.57e5	2.96	0.20	167:	370.8332	1.39e5	1.16	0.
30:	78.5899	1.97e6	16.36	1.11	99:	228.6669	1.98e5	1.65	0.11	168:	372.7126	1.56e5	1.29	0.
31:	80.5325	8.53e5	7.09	0.48	100:	234.7570	1.56e6	13.00	0.88	169:	374.5920	7.00e5	5.81	0.
32:	80.8563	2.76e5	2.30	0.16	101:	236.8302	7.48e5	6.22	0.42	170:	376.6010	4.05e5	3.37	0.
33:	82.4752	3.67e5	3.05	0.21	102:	238.6443	3.60e5	2.99	0.20	171:	378.7397	2.82e5	2.35	0.
34:	82.7990	1.25e5	1.04	0.07	103:	240.7823	4.46e5	3.70	0.25	172:	380.5543	3.79e5	3.15	0.
35:	84.5474	3.03e5	2.52	0.17	104:	242.7260	6.39e5	5.31	0.36	173:	382.6281	1.90e5	1.58	0.
36:	86.4901	3.66e5	3.04	0.21	105:	244.7345	2.78e5	2.31	0.16	174:	384.7020	6.27e5	5.21	0.
37:	88.5623	6.47e5	5.37	0.37	106:	246.8725	1.42e5	1.18	0.08	175:	386.5814	3.24e5	2.69	0.
38:	90.7641	3.47e5	2.88	0.20	107:	248.8163	2.07e5	1.72	0.12	176:	388.6552	3.07e5	2.55	0.
39:	96.6571	9.99e5	8.30	0.56	108:	252.7037	8.52e5	7.08	0.48	177:	392.6734	2.31 e5	1.92	0.
40:	101.7084	3.16e5	2.62	0.18	109:	254.7770	7.08e5	5.88	0.40	178:	394.6825	7.08e5	5.88	0.
41:	102.5503	3.33e5	2.77	0.19	110:	256.9152	2.23e5	1.85	0.13	179:	396.6916	2.46e5	2.04	0.
42:	102.9389	1.28e5	1.07	0.07	111:	258.5998	4.19e5	3.48	0.24	180:	398.7655	1.40e5	1.17	0.
43:	103.5217	1.69e5	1.41	0.10	112:	260.6731	5.89e5	4.89	0.33	181:	400.5153	2.12e5	1.76	0.
44:	104.6874	5.42e5	4.51	0.31	113:	262.8112	5.29e5	4.39	0.30	182:	402.5892	2.80e5	2.33	0.
45:	109.0265	1.21e5	1.00	0.07	114:	264.8846	1.68e5	1.40	0.10	183:	404.5983	2.05e5	1.70	0.
46:	114.4666	3.35e5	2.78	0.19	115:	266.7636	2.10e5	1.74	0.12	184:	406.5426	2.07e5	1.72	0.
47:	114.9199	1.67e5	1.38	0.09	116:	268.6426	1.64e5	1.37	0.09	185:	408.6165	3.36e5	2.79	0.
48:	115.0494	1.22e5	1.01	0.07	117:	270.7809	3.95e5	3.28	0.22	186:	410.3016	1.52e5	1.26	0.
49:	116.6685	4.04e5	3.36	0.23	118:	272.8543	2.71e5	2.25	0.15	187:	410.6256	3.15e5	2.62	0.
50:	119.5182	2.13e5	1.77	0.12	119:	274.7981	1.51e5	1.25	0.09	188:	412.6348	3.59e5	2.98	0.
51:	120.6192	1.30e6	10.84	0.74	120:	276.7419	5.34e5	4.44	0.30	189:	414.5791	1.27e5	1.06	0.
52:	122.6269	3.15e5	2.62	0.18	121:	278.7506	7.01e5	5.82	0.40	190:	416.6530	1.94e5	1.61	0.
53:	124.6994	1.26e5	1.05	0.07	122:	280.7592	3.39e5	2.82	0.19	191:	418.3381	1.92e5	1.60	0.
54:	127.5492	1.59e5	1.32	0.09	123:	282.7031	1.34e5	1.11	0.08	192:	420.6065	3.60e5	2.99	0.
55:	130.7228	3.10e5	2.58	0.18	124:	284.7766	2.50e5	2.08	0.14	193:	421.0602	1.46e5	1.22	0.
56:	132.7306	2.24e5	1.86	0.13	125:	286.7853	2.83e5	2.35	0.16	194:	422.4861	2.00e5	1.66	0.
57:	134.8031	1.69e5	1.41	0.10	126:	288.7940	3.33e5	2.76	0.19	195:	424.9489	1.77e5	1.47	0.
58:	138.8188	1.29e6	10.75	0.73	127:	290.6731	2.41e5	2.00	0.14	196:	426.5692	4.60e5	3.82	0.
59:	140.8267	3.55e5	2.95	0.20	128:	292.7466	3.05e5	2.54	0.17	197:	428.6431	2.99e5	2.48	0.
60:	146.9799	4.39e5	3.65	0.25	129:	294.6905	6.03e5	5.01	0.34	198:	428.9672	1.49e5	1.24	0.
61:	148.7287	2.02e5	1.68	0.11	130:	295.0793	1.55e5	1.28	0.09	199:	430.7819	4.09e5	3.40	0.
62:	150.8662	4.40e5	3.65	0.25	131:	296.6992	9.68e5	8.04	0.55	200:	432.5967	1.74e5	1.44	0.
63:	153.9105	1.44e5	1.19	0.08	132:	298.6432	5.17e5	4.29	0.29	201:	434.6059	2.67e5	2.22	0.
64:	156.8253	1.45e6	12.01	0.82	133:	300.7167	2.59e5	2.15	0.15	202:	436.4206	3.21 e5	2.66	0.
65:	158.8333	2.44e5	2.03	0.14	134:	302.2719	1.24e5	1.03	0.07	203:	438.5594	2.94e5	2.45	0.
66:	160.9708	1.83e5	1.52	0.10	135:	304.6694	2.38e5	1.98	0.13	204:	440.6982	2.01 e5	1.67	0.
67:	162.7845	6.51e5	5.41	0.37	136:	306.6782	6.58e5	5.47	0.37	205:	442.5778	1.70e5	1.42	0.
68:	164.7925	6.20e5	5.15	0.35	137:	308.8814	1.96e5	1.63	0.11	206:	444.2629	1.30e5	1.08	0.
69:	166.8005	4.49e5	3.73	0.25	138:	310.6310	2.71e5	2.25	0.15	207:	444.6518	5.69e5	4.73	0.

Табела 21П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,5mM$, $pH= 4,203$, $100V$

HIDROLIZA-5-PH=4,203+100 13 (0,457)					No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	70:	180.8571	5.38e5	3.20	0.42
1:	40.0638	1.20e6	7.16	0.93	71:	182.9300	6.99e5	4.16	0.54
2:	41.5529	1.68e7	100.00	13.03	72:	184.9382	2.90e5	1.72	0.22
3:	43.4953	4.68e6	27.81	3.62	73:	194.8495	1.91e5	1.13	0.15
4:	44.8549	3.26e5	1.94	0.25	74:	197.8295	2.90e5	1.73	0.22
5:	46.5383	1.70e5	1.01	0.13	75:	198.8660	9.62e5	5.72	0.74
6:	49.2577	2.13e6	12.64	1.65	76:	200.8094	5.21e5	3.10	0.40
7:	49.3872	3.06e6	18.21	2.37	77:	202.7529	1.70e5	1.01	0.13
8:	49.7757	4.88e6	29.04	3.78	78:	205.0203	2.50e5	1.49	0.19
9:	50.5526	4.85e6	28.85	3.76	79:	208.8425	1.81e5	1.07	0.14
10:	50.8116	2.84e6	16.87	2.20	80:	210.9156	2.51e5	1.49	0.19
11:	51.7828	3.71e5	2.21	0.29	81:	216.8110	1.20e6	7.13	0.93
12:	54.1138	2.29e5	1.36	0.18	82:	218.6898	4.82e5	2.87	0.37
13:	55.1497	4.09e5	2.43	0.32	83:	222.7713	3.97e5	2.36	0.31
14:	56.3800	7.33e5	4.36	0.57	84:	226.7881	2.47e5	1.47	0.19
15:	57.0275	2.31e5	1.37	0.18	85:	234.8217	5.50e5	3.27	0.43
16:	58.7109	2.58e5	1.53	0.20	86:	236.7654	3.61e5	2.15	0.28
17:	60.5239	2.41e6	14.35	1.87	87:	238.9034	2.98e5	1.77	0.23
18:	62.0779	1.69e5	1.00	0.13	88:	240.7175	3.09e5	1.84	0.24
19:	64.2147	4.59e5	2.73	0.36	89:	242.5964	2.21e5	1.31	0.17
20:	64.9270	3.66e5	2.18	0.28	90:	244.7345	2.02e5	1.20	0.16
21:	66.8048	2.68e5	1.59	0.21	91:	248.7514	2.02e5	1.20	0.16
22:	68.4236	1.80e5	1.07	0.14	92:	252.7685	3.92e5	2.33	0.30
23:	70.6899	5.37e5	3.19	0.42	93:	254.7122	2.51e5	1.49	0.19
24:	71.0784	2.59e5	1.54	0.20	94:	258.9885	2.41e5	1.43	0.19
25:	73.1505	1.79e5	1.06	0.14	95:	260.7379	2.73e5	1.62	0.21
26:	73.3448	3.11e5	1.85	0.24	96:	262.8112	2.68e5	1.59	0.21
27:	74.1866	3.17e5	1.88	0.25	97:	266.6341	1.97e5	1.17	0.15
28:	74.7694	4.67e5	2.77	0.36	98:	270.7809	1.79e5	1.06	0.14
29:	76.7767	7.17e5	4.26	0.56	99:	274.7981	1.70e5	1.01	0.13
30:	78.5899	1.60e6	9.53	1.24	100:	276.6771	2.61e5	1.55	0.20
31:	79.0431	2.39e5	1.42	0.19	101:	278.8154	4.13e5	2.46	0.32
32:	80.0145	2.97e5	1.76	0.23	102:	280.5648	1.98e5	1.18	0.15
33:	80.5325	9.13e5	5.43	0.71	103:	282.5735	2.10e5	1.25	0.16
34:	82.1514	2.55e5	1.52	0.20	104:	290.7379	1.89e5	1.13	0.15
35:	82.6047	5.49e5	3.26	0.42	105:	294.8849	2.69e5	1.60	0.21
36:	84.6769	5.23e5	3.11	0.41	106:	296.7640	3.98e5	2.37	0.31
37:	86.5548	2.81e5	1.67	0.22	107:	306.7430	3.81 e5	2.26	0.29
38:	88.8213	4.73e5	2.81	0.37	108:	312.6397	2.31e5	1.37	0.18
39:	90.7641	4.49e5	2.67	0.35	109:	314.5837	2.16e5	1.28	0.17
40:	94.6496	2.90e5	1.72	0.22	110:	324.6927	2.36e5	1.40	0.18
41:	96.5924	1.27e6	7.54	0.98	111:	328.7752	1.95e5	1.16	0.15
42:	98.5351	3.08e5	1.83	0.24	112:	342.7726	2.28e5	1.35	0.18
43:	101.7732	2.11e5	1.25	0.16	113:	350.6786	2.28e5	1.36	0.18
44:	102.7446	1.87e5	1.11	0.14	114:	360.6587	2.41 e5	1.43	0.19
45:	103.8455	2.07e5	1.23	0.16	115:	364.6118	2.30e5	1.37	0.18
46:	104.6226	3.16e5	1.88	0.24	116:	372.7126	1.70e5	1.01	0.13
47:	106.1122	1.85e5	1.10	0.14	117:	374.6568	2.00e5	1.19	0.15
48:	112.6532	5.24e5	3.11	0.41	118:	380.5543	1.99e5	1.18	0.15
49:	114.0780	1.86e5	1.11	0.14	119:	384.6371	2.43e5	1.44	0.19
50:	114.5961	3.17e5	1.88	0.25	120:	394.6825	2.52e5	1.50	0.20
51:	116.6685	3.27e5	1.94	0.25	121:	396.7564	1.90e5	1.13	0.15
52:	116.9924	1.71e5	1.01	0.13	122:	426.5044	2.07e5	1.23	0.16
53:	119.6477	3.45e5	2.05	0.27	123:	438.6242	1.85e5	1.10	0.14
54:	120.7487	7.71e5	4.58	0.60	124:	444.6518	2.46e5	1.46	0.19
55:	122.7565	2.33e5	1.38	0.18	125:	482.5034	2.14e5	1.27	0.17
6:	130.6580	2.10e5	1.25	0.16					
57:	132.8601	1.87e5	1.11	0.14					
58:	138.7540	8.93e5	5.31	0.69					
59:	140.8914	2.67e5	1.59	0.21					
60:	150.8014	1.84e5	1.09	0.14					
61:	156.9548	1.07e6	6.35	0.83					
62:	158.7037	2.43e5	1.45	0.19					
63:	162.8493	3.31e5	1.97	0.26					
64:	164.7925	3.06e5	1.82	0.24					
65:	166.8005	4.57e5	2.72	0.35					
66:	174.8328	4.39e5	2.61	0.34					
67:	176.8409	3.04e5	1.81	0.24					
68:	178.7842	1.84e5	1.09	0.14					
69:	179.9502	2.31e5	1.38	0.18					

Табела 22 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,1mM$, $pH= 4,35$, $10V$

HIDROLIZA-6-PH=4,35+10 12 (0.422)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	58.6462	1.23e8	100.00	74.66
2:	59.9412	1.93e6	1.57	1.18
3:	63.6320	3.64e6	2.97	2.22
4:	68.6826	1.31e6	1.07	0.80
5:	79.5612	2.32e6	1.89	1.41
6:	82.5399	1.38e6	1.12	0.84
7:	101.8379	1.86e6	1.52	1.13
8:	213.8957	1.59e6	1.30	0.97
9:	230.9345	2.33e6	1.90	1.42

Табела 23 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=0,1mM$, $pH= 4,35$, $100V$

HIDROLIZA-6-PH=4,35+100 11 (0.387)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	41.5529	1.71e7	100.00	33.80
2:	42.6536	1.81e5	1.06	0.36
3:	43.1068	8.90e5	5.20	1.76
4:	43.8190	7.42e5	4.34	1.47
5:	49.6462	5.49e6	32.07	10.84
6:	50.6821	4.12e6	24.09	8.14
7:	51.9771	2.35e5	1.37	0.46
8:	55.7972	1.95e5	1.14	0.38
9:	55.9915	2.62e5	1.53	0.52
10:	56.6390	3.18e5	1.86	0.63
11:	60.2649	2.46e5	1.44	0.49
12:	60.5239	5.59e5	3.27	1.11
13:	64.7327	2.94e5	1.72	0.58
14:	66.6105	2.01e5	1.17	0.40
15:	73.2800	2.13e5	1.25	0.42
16:	73.7333	4.82e5	2.82	0.95
17:	74.7046	3.85e5	2.25	0.76
18:	76.4530	2.29e5	1.34	0.45
19:	77.0358	2.80e5	1.64	0.55
20:	78.6546	4.55e5	2.66	0.90
21:	82.5399	1.98e5	1.16	0.39
22:	90.7641	2.86e5	1.67	0.57
23:	112.5237	3.13e5	1.83	0.62
24:	214.0253	3.24e5	1.89	0.64

Табела 24 П. Хидролиза алуминијум(III)-јона $C_{Al}=1,0 \text{ mM}$, $pH= 4,184$, $10V$

HIDROLIZA-7-PH=4,184+10 11 (0.387)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	41.6177	1.92e6	1.72	1.09
2:	58.5814	1.12e8	100.00	63.47
3:	59.9412	1.79e6	1.60	1.01
4:	63.5672	2.44e6	2.19	1.39
5:	82.6694	1.43e6	1.28	0.81
6:	101.8379	1.72e6	1.54	0.98
7:	118.8705	1.22e6	1.09	0.69
8:	123.7279	1.35e6	1.20	0.76
9:	157.8616	1.40e6	1.25	0.80
10:	214.0253	1.60e6	1.43	0.91
11:	230.9993	1.86e6	1.66	1.05

8. БИОГРАФИЈА

Мирјана Цвијовић је рођена 10. 06. 1970. године у Ужицу, где је завршила основну школу и гимназију. На Факултету за физичку хемију у Београду дипломирала је 1996. године са просечном оценом 8,00 и стекла звање дипломирани физико-хемикар. Магистрирала је из области неорганске хемије на ПМФ-у у Крагујевцу 2006. године када је одбранила тезу под називом „Спектроскопска испитивања равнотежа у растворима алуминијум(III)-јона и L-хистидина“. 2008. године уписала је докторске студије на ПМФ-у у Крагујевцу. Просечна оцена на постдипломским студијама је 9,50. На Универзитету у Дебрецину (Мађарска), Технолошки факултет, на Одсеку за неорганску хемију, усавршавала се код професора I. Banyai у току 2003. године. 2008. године усавршавала се на Техничком факултету – Одсек за неорганску и индустријску хемију „Gh. Asachi“, Iasi (Румунија), код професора I. Cretescu и у Институту „Petro Poni“ у Iasi. 2010. и 2011. године усавршавала се у Италији код професора P. Traldiја у Научно-истраживачком институту „CNR“ у Падови.

На „International Exhibition of Inventions, Research and Technological Transfer 2008“ године добила је златну медаљу за свој рад. У току 2006. била стипендиста Vena Carlsberg из Данске из области Еколошких испитивања.

Запослена је у Ваљаоници бакра Севојно у хемијској лабораторији од 1996. године.

Активно познаје енглески језика-положен испит ESOL.

Рад на РС: Windows Office, Курс за РС сервисера, Gaussian, Xcalibur.

Члан: DFH, SHD, FECS, КОМИМ, Комисија за стандарде –КС026.

Завршила више школа Масене спектрометрије у организацији Универзитета Пјер Марија Кири – Париз и ПМФ–Ниш, јула 2009. године до 2012 и Школа масене на ТМФ – Београд 2010. Положила је више екстерних курсева: QMC1-техике за побољшање квалитета, са акцентом на статистичку обраду податаке, обука за мерну несигурност, SMQ обуке за провериваче, положила је испит за саветнике за хемикалије. Водила послове акредитације лабораторије и била координатор израде студије процене опасности од хемијског удеса. Познаје већи број инструменталних техника.

9. СПИСАК РАДОВА

9.1 Списак радова и саопштења Мирјане Цвијовић

M22 – *Раг у истакнутом међународном часопису*

1. П. Ђурђевић, Р. Јелић, Љ. Јоксовић, М. Цвијовић, „Potentiometric and Multinuclear Magnetic Resonance Study of the Solution Equilibria Between Aluminium(III) Ion and L-Aspartic Acid“, *Monatshefte fur Chemie*, 137 (6), 717-735 (2006), ISSN: 0026-9247
2. М. Цвијовић, В. Килибарда, М. Ј. Станков, И. Лазаревић, И. Јаковљевић, Љ. Јоксовић, П. Ђурђевић „ESI-MS Study of Speciation in Hydrolyzed Aluminium Chloride solutions“, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol 23, N° 6, 1087-1097, (2012), ISSN 0103-5053,
3. A. Dean, M. G. Ferlin, M. Цвијовић, П. Ђурђевић, F. Dotto, D. Badocco, P. Pastore, A. Venzo, V. Di Marco, „Evaluation of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic Acid and of Other 3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic Acid Derivatives for Possible Application in Iron and Aluminium Chelation Therapy“, *Polyhedron*, october, (2013), In Press

M23 – *Раг у међународном часопису*

4. М. Цвијовић, V. Di Marco, P. Traldi, M. J. Stankov, P. Đurđević „Mass Spectrometric Study of Speciation in Aluminium–Fluoroquinolone Solutions“, *European Journal of Mass Spectrometry*, Vol 18, N°3, 313-322 (2012), ISSN 1469-0667, doi:10.1255/1183
5. П. Ђурђевић, М. Цвијовић, В. Павелкић, J. Zakrzewska, „Spectrophotometric and ²⁷Al NMR Characterization of Aluminum (III) Complexes with L-Histidine“, *Spectroscopy Letters*, 38, 617-634 (2005), ISSN: 0038-7010
6. П. Ђурђевић, М. Цвијовић, J. Zakrzewska, „Aluminium(III) Complexes of S-Histidine: Synthesis, Characterization, Potentiometric and Spectroscopic Study of Solution Equilibria“, *Journal of Coordination Chemistry*, 58 (17) 1615-1629 (2005), ISSN: 0095-8972.
7. П. Ђурђевић, Р. Јелић, Д. Џајевић, М. Цвијовић, „Solution Equilibria between Aluminium (III) ion and L-Histidine or L-Tyrosine“, *Metal Based Drugs*, 8 (5), 235-248 (2002), ISSN 0793-0291
8. М. Цвијовић, Д. Голобочанин, С. Трифуновић, Н. Миљевић, „Alum-treated Drinking Water in Western Serbia“, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 10 (3) 649-656 (2009), ISSN: 1311-5065.
9. Н. Миљевић, М. Марковић, Д. Тодоровић, М. Цвијовић, М. Орлић, Д. Веселиновић, Д. Голобочанин, „Uranium Content From Bomb Craters“, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2 (3), 642-648 (2001), ISSN: 1311-5065.
10. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, С. Цветковић, I. Cretescu, „A Case Study of Industrial Water Polluted with Chromium (VI) and its Impact to River Recipient in Western Serbia“, *Environmental Engineering and Management Journal*, 9 (1) 45-49 (2010), ISSN: 1582-9596

M41 – *Пошавље у монографији националној значаја (7)*

1. М. Орлић, М. Цвијовић, М. Марковић, Р. Биочанин, Н. Миљевић, Д. Тодоровић, Д. Веселиновић, Д. Голобочанин, „Uranium Content in Soil After Bombing Fry“, *Environmental Recovery of Yugoslavia*, Monograph, edited by Dragoljub P. Antić and Jasmina Lj. Vujić, VINČA Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, 311-318 (2002), ISBN 86-7306-054-0.

M51 – *Раг у водећем националном часопису (2)*

1. Н. Миљевић, М. Марковић, Д. Тодоровић, М. Цвијовић, М. Орлић, Д. Веселиновић, Д. Голобочанин, „Uranium Content in the Soil of the Federal Republic of Yugoslavia after NATO Intervention“, *Archive of Oncology*, 9 (4) 245-249 (2001), ISSN: 0354-7310

М33 – Рад саопштен на скупу међународног значаја штампан у целости (1)

1. В. Бојовић, М. Цвијовић, Д. Веселиновић, Р. Биочанин, Н. Миљевић, „The Determination of Uranium Amounts on Some Areas Bombing by NATO Aviation“, Fifth International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 27-29. September 2000, Belgrade, 526-528, ISBN: 86-82475-03-0.
2. М. Цвијовић, В. Павелкић, Н. Миљевић, Д. Станисављевић, П. Ђурђевић, „Spectrophotometric Study of Solution Equilibria Between Al^{3+} Ion and L-Histidine“, Physical Chemistry 2004, 21-23. September 2004, Belgrade, 805-807, ISBN: 86-82457-14-9.
3. М. Цвијовић, М. Кићановић, Д. Веселиновић, П. Ђурђевић, „Thermal Analysis of Aluminium–Histidine Complex“, Physical Chemistry 2004, 21-23. September 2004, Belgrade, 796-798, ISBN: 86-82457-14-9.
4. М. Цвијовић, З. Трмчић, М. Милаковић, „Influence of the Thermomechanical Treatment on Dispersion of Pb in Brass CuZn39Pb3 Products and the Ways of Chemical Determination of Pb After That Treatment“, 4th Balkan Conference on Metallurgy-Scientific Achievements and Perspectives of Metals Industry in South-East Europe, September 27-29. 2006, Zlatibor, 585-588, ISBN: 86 904393-4-X.
5. М. Цвијовић, М. Бокоров, М. Ђурић, „SEM-EDX Identification of Implements in The Copper Tube Production and ICP-OES Analysis“, 3rd International Symposium Light Metals and Composite Materials, 12-14. September 2008, Belgrade, 143-149.
6. М. Цвијовић, Д. Веселиновић, Д. Тодоровић, З. Босиљчић, З. Трмчић, Р. Биочанин, „Садржај урана у земљишту са бомбардованих локалитета одређиван ICP/OES спектрометријом и односа $^{236}U/^{238}U$ γ -спектрометријом“, IV Југословенски симпозијум са међународним учешћем, Хемија и заштита животне средине, 23-26. Септембар 2001, Зрењанин, 490-492, ЦИП у публикацији Народне библиотеке Србије, каталогизација 504.05/06(048), ID 93949452.
7. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић-Станков, Т. Анђелковић, Љ. Свилар, Ј. С. Tabet, „Electrospray Mass Spectrometry of Aluminium Fleroxacin Complexes“, Physical Chemistry 2010, 21-24. September 2010, Belgrade, 10th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry 81-83, ISBN: 978-86-82475-170.
8. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, В. Килибарда, Д. Стојшић, М. Јеликић-Станков, „Electrospray Mass Spectrometric Investigation of Aluminium Hydrolysis in Chloride Medium“, Physical Chemistry 2010, 21-24. September 2010, Belgrade, 10th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry 515-517, ISBN: 978-86-82475-170.
9. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Р. Traldi, Б. Настасијевић, Ј. Звездановић, „Maldi Tof of Aluminium Fluoroquinolone Complexes“, Physical Chemistry 2012, 24-28 September 2012, Belgrade, 11th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 692-694, ISBN: 978-86-82475-27-9.

М63 – Рад саопштен на скупу националног значаја штампан у целини (0.5)

1. З. Трмчић, М. Цвијовић, Ђ. Тимотијевић, Ђ. Абази, „Шема међулабораторијског испитивања легуре бакра ММ-Сu 9/07“, 13. Саветовање комитета за међулабораторијска испитивања материјала, Септембар 2007, Тара, 8-15.
2. П. Ђурђевић, М. Цвијовић, А. Лабан, „Електроспреј-јонизациона масена спектрометрија комплекса алуминијум(III) јона и L-Хистидина“, 43. Саветовање СХД, 24-25. Јануар 2005, Београд, Књига радова, 145-148, ISBN: 86-7132-023-5; Кратки изводи радова, 25, ISBN: 86-7132-021-9
3. М. Цвијовић, С. Трифуновић, Н. Миљевић, П. Ђурђевић, Н. Беговић, „Експериментално и теоријско проучавање синтетисаних молекулских врста у систему алуминијум-хистидин“, XLV Саветовање СХД, 25-26. јануар 2007, Нови Сад, Књига радова, 166-169, ISBN: 978-86-7132-032-0; Кратки изводи радова, 85, ISBN: 978-86-7132-031-3.

4. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Бокоров „Развој методе за анализу пукотина у CuZn28 шипци“, 47. Саветовање СХД, 21. Март 2009, Београд, Књига радова, 112-115, ISBN: 978-86-7132-039-9; Кратки изводи радова, 52, ISBN: 978-86-7132-038-2.
5. М. Цвијовић, М. Милојевић, В. Драгутиновић, Н. Милосављевић, „Појава пукотина и ломова у месинганим откивцима“, XVI Саветовање КОММ, 22-24. Септембра 2010, Ужице, 54-61, ISBN: 978-86-911831-2-7.
6. М. Цвијовић, З. Трмчић, З. Босиљчић, „Примена ICP/OES и IR спектроскопије за анализу хемијских параметара воде реке Лужнице“, XI Саветовање о међулабораторијским испитивањима материјала, Унија хемијских друштава Југославије, КОММ, 14-16. Септембар 2005, Чачак, 53-55.
7. С. Јовановић, Р. Ђитић, М. Цвијовић, „Утицај примеса на повишење температуре рекристализације бакра“, XI Саветовање о међулабораторијским испитивањима материјала, Унија хемијских друштава Југославије, КОММ, 14-16. Септембар 2005, Чачак, 31-34.
8. М. Цвијовић, З. Трмчић, Д. Бацотић, М. Милаковић, „Аналитичке методе за одређивање олова у CuZn39Pb3 производима и утицај дисперзије олова на анализу олова ових производа“, XII саветовање комитета за међулабораторијска испитивања материјала, Септембар 2006, Јагодина, 61-63.

М34 – Раг саопшћен на скују међународној значаја шћамјан у изводу (0.5)

1. Д. Веселиновић, М. Цвијовић, М. Миловановић, Р. Биочанин, Н. Миљевић, „Determination of Uranium in Soil by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry“, Second International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries on Chemical Sciences for Sustainable Development, Book of Abstract, Vol. I, 6-9. June 2000, Halkidiki, Greece, 125.
2. Д. Голобочанин, М. Цвијовић, М. Марковић, Р. Биочанин, Н. Миљевић, М. Орлић, Д. Тодоровић, Д. Веселиновић, „Uranium Content from Bomb Craters“, First International Conference on Environmental Recovery of Yugoslavia, 27-30. September 2001, Belgrade, 109, ISSN: 1450-5525.
3. П. Ђурђевић, Д. Веселиновић, М. Цвијовић, Н. Миљевић, „The Toxicity of Aluminium“, Fifth International Conference of Balkan Environmental Association on Transboundary Pollution“, 7-10. November 2002, Belgrade, 6, ISSN: 13311-5065.
4. М. Цвијовић, Ј. Zakrzewska, П. Ђурђевић, „Investigation of Solution Equilibria Between Al(III)-ion and L-Histidine by ^{27}Al , ^{13}C and ^1H NMR Spectroscopy“, 28th International Conference on Solution Chemistry, 23-28. August 2003, Debrecen, Hungary, 190.
5. М. Цвијовић, З. Томић, М. Митровић, П. Ђурђевић, „Powder X-Ray and Scanning Electron Microscopy Study of Aluminium-Histidine Complex“, II International Symposium Light Metals and Composite Materials, 19-20. May 2004, Belgrade, 113-114, ISBN: 86-904393-1-5.
6. М. Цвијовић, Ј. Zakrzewska, З. Недић, П. Ђурђевић, „Spectroscopic Study of Equilibria Between Aluminium (III)-Ion and L-Histidine in Aqueous Solutions“, 9th International Conference on Solution Chemistry, 21-25. August 2005, Portorož, Slovenija, 176, ISBN: 961-6286-63-3.
7. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, З. Томић, „The Synthesis of Aluminium(III)-Ion and Histidine Complexes“, First South-East European Congress of Chemical Engineering, 25-28. September 2005, Belgrade, 208, ISBN: 86-905111-0-5.
8. М. Цвијовић, Н. Миљевић, С. Трифуновић, „Water Pollution with Different State of Chromium Form in the Process of Surface Refuge“, International Conference Management and Sustainable Marine Development, (B.E.N.A.) 15-18. May 2008, Mamaia, Romania, 20.

9. М. Цвијовић, З. Недић, П. Ђурђевић, Н. Беговић, „Spectroscopic Characterisation of Al (NH₂)HisCl₂ complexes“, 19th IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry, 13-18. July 2008, Santiago de Compostela, Spain, 84.
10. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Д. Веселиновић, Ј. Zakrzewska, „The Complexes Aluminium and Histidine and its Role in the Toxicity of Aluminium“, II Regional Symposium Chemistry and the Environment, 18-22. June 2003, Kruševac, 89-90, ISBN: 86-7132-015-4.
11. М. Цвијовић, „Chemical Painting of Copper and Brass Products Used for Interior Decorations“, International Exhibition of Inventions, Research and Technological Transfer, 14-24. May 2008, Iasi, Romania, 749, ISBN: 978-973-730-491-9.
12. М. Цвијовић, Н. Миљевић, С. Трифуновић, „Aluminium in Drinking Water Technology and its Intake in Human Body that Cause Different Kind of Intoxicity“, International Conference on Quality of Life and Environment in the Frame of E. U. Sustainability, 15-17. November 2007, Belgrade, 14-15, (B.E.N.A.), ISBN: 978-86-82121-46-6, CIP-katalogizacija u publikaciji Narodne biblioteke Srbije, Cobsis. sr-id. 144741388.
13. М. Цвијовић, З. Недић, З. Томић, П. Ђурђевић, „Synthesis and Characterization of Al Histidine Complexes“, Forth International Conference of the Chem. Soc. of the South-Eastern European Countr. on Chem. Sciences in Changing Times: Visions, Challenges and Solution, 18-21. July 2004, Belgrade, Book of Abstract, Vol. I, 185, ISBN: 86-7132018-9.
14. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, С. Цветковић, I. Cretescu, „Case Study of Industrial Water Polluted with Chromium VI and its Impact to River Recipient in Western Serbia“, Fifth International Conferences of Environmental Engineering and Management, 15-19. Septembar 2009, Book of Abstract, 47, Tulcea, Delta Danube, Romania, ISBN 978-973-7645-66.
15. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић Станков, Р. Traldi „Maldi Mass Spectrometry Of Aluminium-Fluoroquinolone Complexes“, Euroanalysis 11-15. September 2011. Belgrade , Book of Abstract, 144, MS04
16. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић Станков Р. Traldi „Tandem Mass Spectrometry Of Aluminum – Fluroquinolone Complexes“, Euroanalysis 11-15. September, Belgrade 2011, Book of Abstract, 145, MS05
17. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Р. Traldi, Maldi Mass Spectrometry Of Aluminium Fluoroquinolone Complexes, 31st IMMS 2013, Palermo, Italy, 153-154, 2013, ISBN 978-88-907388-2-1

МБ4 – Рад саопиштен на скупу националној значаја шtamпан у изводу (0.2)

1. М. Цвијовић, Б. Мајкић, З. Босиљчић, Д. Веселиновић, З. Трмчић, „Одређивање концентрације урана у земљишту после НАТО агресије на Југославију“, V Саветовање металурга Југославије, 24-25. Мај 2001, Нови Сад, 168, СИМЈ.
2. М. Цвијовић, З. Трмчић, Н. Лазић, В. Инђић, „Резултати испитивања легуре алуминијума AlCu₄MgMn добијени рендгенско-флуоросцентном спектрометријом, Хемијско бојење бакра и месинга са циљем примене у грађевинарству и за ентеријер“, VIII Саветовање о међулабораторјским испитивањима материјала, 4-6. Октобар 2002, Младеновац, 27-28.
- 3 М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Д. Веселиновић, „Комплекси Al-хистидин и њихова улога у повећању токсичности алуминијума“, VI Саветовање металурга Србије и Црне Горе, 12-13. Јун 2003, Аранђеловац, 61, ISBN: 86-904393-0-7.
4. М. Цвијовић, Ј. Zakrzewska, П. Ђурђевић, Д. Веселиновић, „The Investigation of Interaction Between Al(III) ion and L-Histidine in Water Solution by ²⁷Al and ¹³C NMR spectroscopy“, XLII Саветовање СХД, 22-23. Јануар 2004, Нови Сад, 249, ISBN: 86-7132-016-217.
5. М. Цвијовић, З. Трмчић, Б. Мајкић, „Квалитет воде реке Лужнице са аспекта анализе хемијских параметара и њихов утицај на живи свет ове реке“, Конференција о

- коришћењу и заштити вода, Вода 2004, 8-11. Јун 2004, Борско језеро, 135-136, ISBN: 86-904241-1-3.
6. М. Цвијовић, З. Босиљчић, З. Трмчић, „Утицај отпадних вода из прехранбене индустрије на квалитет воде реципијената“, Воде Србије –наслеђе и перспективе, 23-24. Септембар 2004, Сомбор, абстр.0345.
 7. М. Цвијовић, З. Трмчић, З. Босиљчић, „Утицај отпадних вода из текстилне индустрије на реку Моравицу“, 34-та конференција о актуелним проблемима коришћења и заштите вода, Вода 2005, 7-10. Јун 2005, Копаоник, 407-408, ISBN 86-904241-2-1.
 8. М. Цвијовић, В. Инђић, Н. Лазић, З. Трмчић, „Хемијско бојење бакра и месинга са циљем примене у грађевинарству и за ентеријер“, Симпозијум деформација и структура метала и легура са међународним учешћем, 26-27. Јун 2002, Београд, 197-198
 9. М. Цвијовић, З. Трмчић, С. Јовановић, Ј. Јанковић, М. Милојевић, „Утицај концентрације Fe и P као примеса на хомогеност структуре легуре CuZn30 и одређивање мерне несигурности концентрације P“, 13. саветовање комитета за међулабораторијска испитивања материјала, Септембар 2007, Тара, 52.
 10. М. Цвијовић, С. Цветковић, М. Милаковић, М. Бокоров, „Појава укључака у производњи бакарних цеви“, XV саветовање КОММ, 30.9.-2.10. 2009, Врњачка Бања, 73-74, ISBN 978-86-911831-1-0.

9.2. Списак радова проистеклих из докторске дисертације

Научни радови:

- 1 М. Цвијовић, В. Килибарда, М. Ј. Станков, И. Лазаревић, И. Јаковљевић, Љ. Јоксовић П. Ђурђевић „ESI-MS Study of Speciation in Hydrolyzed Aluminium Chloride solutions“, Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol 23, N° 6, 1087-1097, (2012), ISSN 0103-5053,
2. М. Цвијовић, V. Di Marco, P. Traldi, M.J. Станков, П. Ђурђевић „Mass Spectrometric Study of Speciation in Aluminium–Fluoroquinolone Solutions, „European Journal of Mass Spectrometry“ Vol. 18, N°3, 313-322 (2012), ISSN 1469-0667, doi:10.1255/1183
3. A. Dean, M. G. Ferlin, M. Цвијовић, П. Ђурђевић, F. Dotto, D. Badocco, P. Pastore, A. Venzo and V. Di Marco, Evaluation of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic Acid and Other 3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic Acid Derivatives for Possible Application in Iron and Aluminium Chelation Therapy, Polyhedron, october, (2013), In Press

Саопштења:

- 1 М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић-Станков, Т. Анђелковић, Љ. Свилар, Ј. С. Tabet, „Electrospray Mass Spectrometry of Aluminium Fleroxacin Complexes“, Physical Chemistry 2010, 21-24. September 2010, Belgrade, 10th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry 81-83, ISBN: 978-86-82475-170.
2. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, В. Килибарда, Д. Стојшић, М. Јеликић-Станков, „Electrospray Mass Spectrometric Investigation of Aluminium Hydrolysis in Chloride Medium“, Physical Chemistry 2010, 21-24. September 2010, Belgrade, 10th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 515-517, ISBN: 978-86-82475-170.
3. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић Станков, P. Traldi „Maldi Mass Spectrometry Of Aluminium–Fluoroquinolone Complexes“, Euroanalysis 11-15. Септембар 2011. Belgrade, Book of Abstract, 144, MS04
4. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, М. Јеликић Станков P.Traldi „Tandem Mass Spectrometry Of Aluminum–Fluroquinolone Complexes“, Euroanalysis 11-15. September, Belgrade 2011, Book of Abstract, 145, MS05

5. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Р. Traldi, Б. Настасијевић, Ј. Звездановић, „Maldi Tof of Aluminium Fluoroquinolone Complexes“, Physical Chemistry 2012, 24-28 Septembar 2012, Belgrade, 11th International Conferences on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 692-694, ISBN: 978-86-82475-27-9.
6. М. Цвијовић, П. Ђурђевић, Р. Traldi, „Maldi Mass Spectrometry of Aluminium Fluoroquinolone Complexes“, 31st IMMS 2013, Palermo, Italy 153-154, 2013, ISBN 978-88-907388-2-1

10. РАДОВИ ПРОИСТЕКЛИ ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

