



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**мр Иван Т. ЛАЗАРЕВИЋ**

**ПРОУЧАВАЊЕ БИНАРНИХ РАВНОТЕЖА У  
РАСТВОРИМА ГАДОЛИНИЈУМ(III) И АЛУМИНИЈУМ(III)  
ЈОНА У ПРИСУСТВУ ФЛУОРОХИНОЛОНА  
ОФЛОКСАЦИНА И МОКСИФЛОКСАЦИНА**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2012**



## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

### ***I. Аутор***

Име и презиме: Иван Т. Лазаревић.

Датум и место рођења: 11.06.1969. Крушевац.

Садашње запослење: В.П. 6910 Крушевац (Центар за усавршавање кадрова АБХО Војске Србије).

### ***II. Докторска дисертација***

Наслов: „Проучавање бинарних равнотежа у растворима гадолинијум(III) и алуминијум(III) јона у присуству флуорохинолона офлоксацина и моксифлоксацина”

Број страница: 243.

Број слика: 108 у тексту и 18 у прилогу; Број табела: 60 у тексту и 28 у прилогу; Број шема: 4.

Број библиографских података: 126.

Установа и место где је рад израђен: Природно математички факултет, Крагујевац;

Центар за усавршавање кадрова АБХО Војске Србије, Крушевац.

Научна област (УДК): Неорганска хемија. УДК број 546.

Ментор: др Предраг Ђурђевић, редовни професор.

### ***III. Оцена и одбрана***

Датум пријаве теме: 20.01.2010. године.

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

-Одлука ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу бр. 160/VII-1 од 24.02.2010.

-Одлука Стручног већа за Природно математичке науке Универзитета у Крагујевцу број 616/10 од 14.04.2010.године.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

-Одлука ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу бр.100/VII-1 од 03.02.2010.

1. Др Предраг Ђурђевић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, н.о. аналитичка и неорганска хемија;
2. Др Милена Јеликић Станков, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду, н.о. анал. хемија;
3. Др Ратомир Јелић, доцент Медицинског факултета у Крагујевцу, н.о.неорганска хемија;

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

-Одлука ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу бр.350/V-2 од 09.05.2012.

1. Др Предраг Ђурђевић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, н.о. аналитичка и неорганска хемија;
2. Др Милена Јеликић Станков, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду, н.о. хемија у фармацији;
3. Др Живадин Бугарчић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, н.о. неорганска хемија;

Датум одбране дисертације: \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2012. године.



*Докторску дисертацију посвећујем породици,  
супрузи Сањи и деци Тијани и Немањи.*

*Покојном оцу Томиславу у знак сећања ...  
Људи постоје док их се други сећају ...*



*Ова дисертација је плод доприноса многих људи који су посредно или непосредно учествовали у њеном обликовању и изради.*

*Рађена је у Институту за Хемијске науке Природно-математичког факултета у Крагујевцу и Центру за усавршавање кадрова АБХ службе Војске Србије, под руководством др Предрага Ђурђевића, редовног професора. Техничка дорада рукописа дисертације рађена је и током мог боравка у мировној мисији УН-а UNIFIL у Либану.*

*Захваљујем се др Предрагу Ђурђевићу, редовном професору, који је предложио тему дисертације, руководио њеном израдом и указао ми помоћ током израде и писања.*

*Др Милени Јеликић-Станков, редовном професору Фармацеутског факултета у Београду, др Живадину Бугарчићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу и др Ратомиру Јелићу, ванредном професору Медицинског факултета у Крагујевцу, захваљујем на корисним саветима и сугестијама током израде и прегледа рукописа докторске дисертације.*

*Захваљујем се др Љубинки Јоксовић, доценту, Андрији Ђурићу, дипл. хем. и Ивану Јаковљевићу, дипл. хем., на несебичној помоћи током израде дисертације у свим фазама, и многима који су (не)посредно испољили позитивни утицај на мене током израде дисертације.*

*Посебну захвалност дугујем породици, супрузи Сањи и деци Тијани и Немањи на подршци и разумевању, који су ми све потешкоће преобразили у чар и лепоту, чаробним прахом своје посебности ...*





## СПИСАК ОЗНАКА

### *Концентрације:*

- S - концентрација комплексних врста.
- X - слободна концентрација компоненте.
- T - укупна концентрација компоненте.

### *Индекси:*

- i - општи индекс за компоненте.
- j - општи индекс за комплексне врсте.
- m - специфични индекс за компоненту.
- p - индекс за број јона метала.
- q - индекс за број водоничних или хидроксидних јона.
- r - индекс за број лиганата.

### *Суперскрипти:*

- s - означава израчунату концентрацију.
- r - означава реалну количину.
- o - означава стару вредност у итерацији.
- n - означава нову вредност у итерацији.

### *Параметри:*

- $\beta$  - кумулативна константа стабилности комплексних врста.
- k - матрица која дефинише компоненте и њихову разноврсност у комплексним врстама.

### *Симболи:*

- MRI - магнетна резонанца.
- MRA - магнетна ангиографија.
- NMR - нуклеарно-магнетна резонанција.
- CT - компјутерска томографија.
- M - метални јон.
- L - лиганд.
- H - водонични јон.
- FQ - флуорохинолон(и).
- oflo - офлоксацин.
- moxi - моксифлоксацин.
- cipro - ципрофлоксацин.
- gati - гатифлоксацин.
- enox - еноксацин.
- enro - енроксацин
- lome - ломефлоксацин.
- nor - норфлоксацин.
- enro - енроксацин.
- levo - левофлоксацин.
- spar - спарфлоксацин.
- UV - ултра-љубичаста област.
- $\varepsilon$  - моларна апсорптивност.
- $K_d$  - константа дисоцијације слабе киселине ( $pK_d = -\log K_d$ ).
- EMS - електромоторна сила.
- E - потенцијал стаклене електроде.
- $E_0$  - стандардни потенцијал стаклене електроде.
- $E_j$  - дифузиони потенцијал.
- Q - Nernstov фактор ( $=59,16 \text{ mV}$ , на  $25^\circ\text{C}$ ).
- R - универзална гасна константа ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).
- F - Faradejeva константа ( $9,649 \text{ C mol}^{-1}$ ).

$V_o$	- почетна запремина раствора.
$V_b$	- запремина додате базе.
$V_e$	- запремина базе потребна за неутрализацију киселине.
$C_H$ или $N$	- стехиометријска концентрација јона водоника.
$C_{OH}$	- стехиометријска концентрација хидроксидних јона.
$f_H$	- коефицијент активитета водоничних јона.
$a_H$	- активитет водоничних јона.
$K_W$	- јонски производ воде.
$A$	- апсорбанција раствора.
$\lambda$	- таласна дужина (nm).
$C$	- концентрација компоненте која апсорбује.
$b$	- дебљина апсорпционог слоја (cm).
$\epsilon_k$	- моларни апсорпциони коефицијент комплекса.
$C_M$	- стехиометријска концентрација јона метала.
$C_L$	- стехиометријска концентрација лиганда.
$[OH]_v$	- концентрација $[OH]^-$ -јона везаних у хидролитички комплекс.
$[OH]_{uk}$	- укупна концентрација $[OH]^-$ -јона у раствору.
$H_0$	- укупна концентрација $[H]^+$ -јона у раствору.
$M_0$	- укупна концентрација јона метала у раствору.
$L_0$	- укупна концентрација лиганда у раствору.
$[M]$ или $m$	- равнотежна концентрација јона метала.
$[L]$ или $a$	- равнотежна концентрација лиганда.
$[H]$ или $h$	- равнотежна константа јона водоника.
$Z_H$	- средњи протонски број.
$\bar{n}$	- средњи лигандни број.
$M$	- јон метала.
$M_p(OH)_q$	- хидролитички комплекс.
$H_N L$	- протоновани лиганд.
$N$	- број протона у протонованом лиганду.
$K_N^H$	- појединачна константа протоновања.
$\beta_n^H$	- кумулативна константа протоновања.
$M_p H_q L_r$	- мешовито-протоновани комплекс.
$\beta_{p,q,r}$	- константа стабилности мешовито-протонованог комплекса.
$K_N$	- појединачна константа стабилности комплекса.
$C_{p,q}$	- равнотежна константа комплекса.
$M_p(OH)_q L_r$	- мешовито-хидролитички комплекс.
$\beta_{p,q,r}^*$	- константа стабилности мешовито-хидролитичког комплекса.
$Z_M^e, Z_H^e$ и $n_e$	- експериментално добијене вредности средњег хидроксидног, протонског и лигандног броја.
$Z_M^c, Z_H^c$ и $n_c$	- израчунате вредности средњег хидроксидног, протонског и лигандног броја.
mM	- концентрација раствора у $10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ .
$j$	- константа јонске средине.
$T$	- апсолутна температура.
ZTT	- завршна тачка титрације.
$\Delta G$	- промена <i>Gibbsove</i> енергије.
EJ	- енергија јонизације.
LMM	- лиганди мале масе.

LVM	- лиганди велике масе.
Ej	- енергија јонизације.
PMI	- плазма мобилизациони индекс.
$K_a$	- термодинамичка константа дисоцијације.
$K_{a,d}$	- релативна константа дисоцијације.
$a^\ominus(X)$	- стандардна активност.
$K_{a,m}$	- концентрациона константа равнотеже.
$k_1, k_2 \dots k_n$	- кумулативне константе дисоцијације.
$\beta_i^0$	- кумулативне термодинамичке константе стабилности.
$\Delta H_i^0$	- промена стандардне енталпије $i$ -те реакције.
$\beta_m^H$	- кумулативне константе протоновања.
$Q^-$	- анјонски облик хинолона.
$HQ^\pm$	- диполарни јон.
$H_2Q^+$	- катјонски јон.
$k_{11}, k_{12}, k_{21}, k_{22}$	- микроконстанте дисоцијације.
$K_1, K_2$	- макроконстанте дисоцијације.
$\log P$	- логаритам партиционог коефицијента.
$\pi$	- хидрофобна константа.
UV-VIS	- ултраљубичаста и видљива спектроскопија.
IR	- инфрацрвена спектроскопија.
NMR	- нуклеарно магнетно резонантна спектроскопија.
MS	- масена спектрометрија.
DMSO	- диметилсулфоксид.
MIK	- минимална инхибиторна концентрација.
$\alpha_i$	- алфа вредности.
$c_T$	- укупна аналитичка концентрација слабе киселине.
$\alpha_0$	- молска фракција.
$\alpha_M$	- фракција слободног јона метала.
AAS	- атомска апсорпциона спектрометрија.
GCMS	- гасна хроматографија масена спектрометрија.
LCMS	- течна хроматографија масена спектрометрија.
ICP	- индуктивно куплована плазма.
HySS	- Hyperquad Simulation and Speciation.
ECCLES	- Evaluation of Constituent Concentrations in Large Equilibrium Systems.
HYDRA	- Hydrochemical Equilibrium Constant Database.
MEDUSA	- Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms.
JESS	- Joint Expert Speciation System.
GFR	- гломеруларна филтрација.
ICP-MS	- индуковано куплована плазма-масена спектрометрија.
GFAAS	- графитна AAS.
$e^0$	- равнотежни потенцијал.
F	- Фарадејева константа.
RE	- референтна електрода.
SE	- стаклена електрода.
$M^+$	- молекулски јон.
$m^*$	- метастабилни јон.
CI	- Chemical ionization.

EI	- Electron Impact.
ESI	- Electrospray ionization.
FAB	- Fast atom bombardment.
LIMS	- Laser ionization.
MALDI	- Matrix-assisted laser desorption ionization.
PD	- Plasma-desorption ionization.
RIMS	- Resonance ionization.
SIMS	- Secondary ionization.
TIMS	- Thermal ionization.
CID	- Collision induced dissociation.
DOS	- Disk operation system.
OS	- оперативни систем.
LFER	- Linear Free Energy Relationship.
SIT	- Specific Interaction Theory.

## СПИСАК СЛИКА И ШЕМА

Број и назив слике	Стр.
Слика 1. Основне структуре језгара хинолона ( <i>a</i> -4-оксо-1,4-дихидрохинолонско језгро; <i>b</i> -8-аза-4-хинолини; <i>c</i> -6,8-диаза-4-хинолини; <i>d</i> -2-аза-4-хинолини;)	17
Слика 2. Општа структура хинолона (лево) и флавона (десно)	19
Слика 3. Прстен С-Хинолин-4(1H)-он	19
Слика 4. Прстен С-потпуно ароматични дериват хинолина	20
Слика 5. Хемијска структура неких хинолона друге генерације	21
Слика 6. Хемијска структура неких хинолона треће генерације	21
Слика 7. Хемијска структура неких хинолона четврте генерације	21
Слика 8. UV/VIS спектар норфлоксацина на различитим рН вредностима	27
Слика 9. IR спектар ципрофлоксацина	28
Слика 10. IR спектар (А) офлоксацина и (Б) левофлоксацина	28
Слика 11. IR спектар (А) норфлоксацина и (Б) ципрофлоксацина	28
Слика 12. <sup>1</sup> H NMR спектар норфлоксацина у D <sub>2</sub> O	31
Слика 13. <sup>13</sup> C NMR спектар норфлоксацина у DMSO	31
Слика 14. <sup>13</sup> C NMR спектар ципрофлоксацина	31
Слика 15. <sup>13</sup> C NMR спектар норфлоксацина	32
Слика 16. Масени спектар ципрофлоксацина	33
Слика 17. Масени спектар лемефлоксацина	33
Слика 18. Структура офлоксацина (неутрални облик молекула у раствору)	34
Слика 19. Синтеза офлоксацина	34
Слика 20. Микроскопска јонизација офлоксацина (HQ <sup>0</sup> - неутрални облик; H <sub>2</sub> Q <sup>+</sup> - катјонски облик; HQ <sup>-</sup> - анјонски облик; HQ <sup>±</sup> - диполарни ("zwitter") облик;)	35
Слика 21. Растворљивост офлоксацина на различитим рН вредностима на собној температури	36
Слика 22. Шема фрагментације офлоксацина	37
Слика 23. IR спектар офлоксацина	38
Слика 24. UV VIS спектар офлоксацина у киселој и базној воденој средини	38
Слика 25. Абсорпциони максимум (λ <sub>max</sub> )/таласна дужина максимума за офлоксацин	39
Слика 26. Дифракција X-зрацима за офлоксацин	39
Слика 27. Метаболички производи офлоксацина	40
Слика 28. Криве експерименталних неведених титрација за неке флуорохинолоне (Офлоксацин концентрације 2.8×10 <sup>-2</sup> mol/dm <sup>3</sup> , третиран са 0.1 mol/dm <sup>3</sup> HClO <sub>4</sub> )	40
Слика 29. Хемијска структура моксифлоксацина	41
Слика 30. Прва фаза синтезе моксифлоксацина	41
Слика 31. Друга фаза синтезе моксифлоксацина	41
Слика 32. UV VIS спектар моксифлоксацина у метанолу	42
Слика 33. IR спектар моксифлоксацина снимљен KBr техником	43
Слика 34. <sup>1</sup> H-NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником Fourije-ове трансформације	44
Слика 35. <sup>13</sup> C-NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником Fourije-ове трансформације	44
Слика 36. Масени спектар моксифлоксацина	45
Слика 37. Активирање програма-почетна страница и отварање фајла базе у раду	58
Слика 38. Маска програма за подешавање и унос података посматраног система	59

<b>Слика 39.</b> Маска за промену услова (концентрација) посматраног модела	59
<b>Слика 40.</b> Маска за додавање метала и лиганда у посматрани систем за симулацију	60
<b>Слика 41.</b> Маска за прорачун концентрација метала, лиганда и комплекса	60
<b>Слика 42.</b> Маска за приказ дистрибуционих дијаграма у посматраном систему	61
<b>Слика 43.</b> Раздвајање протеина плазме електрофорезом на $pH=8.8$	67
<b>Слика 44.</b> NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database	73
<b>Слика 45.</b> График функције $A=f(C_L C_M)$	95
<b>Слика 46.</b> График функције $\log(A_x/(A_0-A_x))=f(C_L)$	97
<b>Слика 47.</b> Масени спектрометар (основни делови)	98
<b>Слика 48.</b> Шематски приказ извора електроспреј јонзације (ESI)	103
<b>Слика 49.</b> Апаратура за извођење потенциометријских титрација	111
<b>Слика 50.</b> Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS спектрофотометар	112
<b>Слика 51.</b> Оптичка шема апсорционог спектрофотометра	112
<b>Слика 52.</b> Активирање програма-почетна страница након покретања UV WinLab-a	113
<b>Слика 53.</b> Маска програма за подешавање параметра мерења	113
<b>Слика 54.</b> Маска програма за подешавање почетне и крајње таласне дужине	114
<b>Слика 55.</b> Маска програма за дефинисање броја узорака и назива	114
<b>Слика 56.</b> Маска програма која даје изглед UV VIS спектра (на слици је спектар моксифлоксаина)	115
<b>Слика 57.</b> LC MS Agilent 1100	116
<b>Слика 58.</b> Протоновање анјона офлоксаина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$	117
<b>Слика 59.</b> Апсорциони спектри офлоксаина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ на различитим вредностима $pH$	118
<b>Слика 60.</b> Протоновање анјона моксифлоксаина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$	119
<b>Слика 61.</b> Апсорциони спектри моксифлоксаина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ на различитим вредностима $pH$	119
<b>Слика 62.</b> Хидролиза $Gd^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$	120
<b>Слика 63.</b> Комплексирање $Al^{3+}$ -офлоксаин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . за концентрационе односе $[Al^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1.1:3$ и $1:5$ као зависност $pH$ од титрационог параметра $a$	121
<b>Слика 64.</b> Комплексирање $Al^{3+}$ -офлоксаин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . за концентрационе односе $[Al^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1.1:3$ и $1:5$ као зависност средњег лигандног броја од негативног логаритма концентрације офлоксаина	122
<b>Слика 65.</b> Комплексирање $Gd^{3+}$ -офлоксаин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ средини. на температури од $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . за концентрационе односе $[Gd^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1.1:2.1:2.5.1:3$ и $1:5$ као зависност $pH$ од титрационог параметра $a$	123
<b>Слика 66.</b> Комплексирање $Gd^{3+}$ -офлоксаин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ средини. на температури од $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . за концентрационе односе $[Gd^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1.1:2.1:2.5.1:3$ и $1:5$ као зависност средњег лигандног броја $\bar{n}$ од негативног логаритма концентрације офлоксаина	123
<b>Слика 67.</b> Комплексирање $Gd^{3+}$ -моксифлоксаин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини. на температури од $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . за концентрационе односе $[Gd^{3+}]_0:[tox]_0=1:1.1:2.1:3$ и $1:5$ као зависност $pH$ од титрационог параметра $a$ ( $tox$ -моксифлоксаин)	125

<b>Слика 68.</b> UV-VIS спектри раствора $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим рН вредностима за концентрациони однос $Gd^{3+}$ -тохи=1:1 ( $[Gd^{3+}] = 0.033 \text{ mmol/dm}^3$ , $[тохи] = 0.035 \text{ mmol/dm}^3$ )	126
<b>Слика 69.</b> UV-VIS спектри раствора $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим рН вредностима за концентрациони однос $Gd^{3+}$ -тохи=1:2 ( $[Gd^{3+}] = 0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ , $[тохи] = 0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )	126
<b>Слика 70.</b> UV-VIS спектри раствора $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим рН вредностима за концентрациони однос $Gd^{3+}$ -тохи=1:3 ( $[Gd^{3+}] = 0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ , $[тохи] = 0.0508 \text{ mmol/dm}^3$ )	127
<b>Слика 71.</b> UV-VIS спектри раствора $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим рН вредностима за концентрациони однос $Gd^{3+}$ -тохи=2:1 ( $[Gd^{3+}] = 0.0715 \text{ mmol/dm}^3$ , $[тохи] = 0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )	127
<b>Слика 72.</b> ESI MS спектар $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ $Gd^{3+}$ јона на рН 6.070	129
<b>Слика 73.</b> ESI MS спектар $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ офлоксацина на рН 7	130
<b>Слика 74.</b> ESI MS спектар $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ $Gd^{3+}$ јона + $3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ офло на рН 5.51 (70V)	130
<b>Слика 75.</b> Дистрибуциони дијаграм офлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	143
<b>Слика 76.</b> Дистрибуциони дијаграм моксифлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	144
<b>Слика 77.</b> Дистрибуциони дијаграм хидролитичких комплекса $Gd^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	145
<b>Слика 78.</b> Дистрибуциони дијаграми комплекса $Gd^{3+}$ -јона и офлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ NaCl средини на $(298.0 \pm 0.5)K$ при различитим концентрационим односима	147
<b>Слика 79.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{Hoflo})]^{3+}$ у раствору	148
<b>Слика 80.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{Hoflo})_2]^{3+}$ у раствору	148
<b>Слика 81.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{oflo})]^{2+}$ у раствору	149
<b>Слика 82.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{OH})\text{oflo}]^+$ у раствору	149
<b>Слика 83.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{oflo})_2]^+$ у раствору	150
<b>Слика 84.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{OH})_2(\text{oflo})_2]^-$ у раствору	150
<b>Слика 85.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{Hoflo})\text{oflo}]^{2+}$ у раствору	151
<b>Слика 86.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{Hoflo})_3]^{3+}$ у раствору	151
<b>Слика 87.</b> Могућа структура комплекса $[Gd(\text{Hoflo})_2\text{oflo}]^{2+}$ у раствору	152
<b>Слика 88.</b> Могућа структура комплекса $[Gd\text{OH}(\text{oflo})_2]$ у раствору	153
<b>Слика 89.</b> Дистрибуциони дијаграми комплекса $Gd^{3+}$ -јона и моксифлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини на $(298.0 \pm 0.5)K$ за концентрациони однос M:L=1:5	153
<b>Слика 90.</b> Могућа структура $[Gd(\text{Hтохи})_3]^{3+}$ комплекса у раствору	155
<b>Слика 91.</b> Израчунати спектри $Gd$ -тохи комплекса	155
<b>Слика 92.</b> Доминантни комплекси $Al^{3+}$ јона у хуманој крвној плазми	160
<b>Слика 93.</b> Расподела комплекса $Al(\text{OH})\text{PO}_4$ у присуству неких флуорохинолона	160
<b>Слика 94.</b> Расподела комплекса $Al(\text{OH})\text{Cit}$ у присуству неких флуорохинолона	161
<b>Слика 95.</b> Расподела комплекса $Al(\text{OH})_3$ у присуству неких флуорохинолона	161
<b>Слика 96.</b> Расподела комплекса $Al\text{PO}_4$ у присуству неких флуорохинолона	161
<b>Слика 97.</b> Расподела комплекса $Al^{3+}$ у офлоксацину	162

Слика 98. Расподела комплекса $Al^{3+}$ у моксифлоксацину	162
Слика 99. Криве РМI вредности система $Al^{3+}$ -FQ	162
Слика 100. Доминантни комплекси $Gd^{3+}$ јона у крвној плазми на рН 7.4 при различитим концентрацијама $Gd^{3+}$ -јона	165
Слика 101. Расподела комплекса $GdAspCit$ без и у присуству неких флуорохинолона	167
Слика 102. Расподела комплекса $GdH_2Cit$ без и у присуству неких флуорохинолона	167
Слика 103. Расподела комплекса $GdCitLac$ без и у присуству неких флуорохинолона	167
Слика 104. Расподела комплекса $GdH_2HisCit$ без и у присуству неких флуорохинолона	168
Слика 105. Расподела комплекса $GdHSA$ без и у присуству неких флуорохинолона	168
Слика 106. Расподела комплекса $GdLeuCit$ без и у присуству неких флуорохинолона	168
Слика 107. Расподела комплекса $GdCit$ без и у присуству неких флуорохинолона	168
Слика 108. Криве РМI вредности система $Gd^{3+}$ -FQ	169

## СПИСАК СЛИКА ПРИЛОГА

Број и назив слике	Стр.
Слика 29П ESI MS спектар $10.0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 1.530	231
Слика 30П ESI MS спектар $1.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 2.450	231
Слика 31П ESI MS спектар $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 2.781	232
Слика 32П ESI MS спектар $0.1 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 3.447	232
Слика 33П ESI MS спектар $0.1 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 5.497	233
Слика 34П ESI MS спектар $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 6.043	233
Слика 35П ESI MS спектар $0.1 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 6.414	234
Слика 36П ESI MS спектар $0.025 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 6.654	234
Слика 37П ESI MS спектар $0.025 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 6.995	235
Слика 38П ESI MS спектар $0.025 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , рН 7.551	235
Слика 39П ESI MS спектар $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 1.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 4.552	236
Слика 40П ESI MS спектар $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 4.662	236
Слика 41П ESI MS спектар $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 1.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 5.911	237
Слика 42П ESI MS спектар $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 2.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 6.440	237
Слика 43П ESI MS спектар $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 5.11 (70V)	238
Слика 44П ESI MS спектар $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 4.88 (70V)	238
Слика 45П ESI MS спектар $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 4.73 (30V)	239
Слика 46П ESI MS спектар $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , рН 4.37 (30V)	239
<b>Број и назив шеме</b>	<b>Стр.</b>
Шема 1. Утицај структуре на дејство хинолона	22
Шема 2. Равнотеже у раствору флуорохинолона	23
Шема 3. Опита шема приказа специјације метала у раствору	51
Шема 4. Шема фрагментације офлоксацина	142



## СПИСАК ТАБЕЛА

<b>Број и назив табеле</b>	<b>Стр.</b>
<b>Табела 1.</b> <i>Најзначајнији представници хинолона различитих генерација</i>	18
<b>Табела 2.</b> <i>pK вредности неких хинолона</i>	24
<b>Табела 3.</b> <i>Солубилизациони потенцијал воде за органске функционалне групе присутне у моно-и полифункционалним молекулама</i>	25
<b>Табела 4.</b> <i>Хидрофилно-липофилне <math>\pi</math> вредности органских фрагмената</i>	26
<b>Табела 5.</b> <i>Апсорпциони UV максимуми (<math>\lambda_{max}</math>) и изобестичке тачке (<math>\lambda_{iso}</math>) водених раствора хинолона</i>	27
<b>Табела 6.</b> <i>Траке флуорованих хинолона у IR спектру</i>	29
<b>Табела 7.</b> <i><math>^1H</math> NMR помераји флуорованих хинолона</i>	30
<b>Табела 8.</b> <i><math>^{13}C</math> NMR помераји флуорованих хинолона у DCl</i>	32
<b>Табела 9.</b> <i>Табеларни приказ фрагментације неких молекула флуорохинолона</i>	33
<b>Табела 10.</b> <i>Растворљивост офлоксацина у различитим растварачима на 250°C</i>	36
<b>Табела 11.</b> <i>Експериментални подаци растворљивости (mg/ml) за офлоксацин и односи дозе и растворљивости за таблете офлоксацин различите јачине на 37±0.5°C</i>	36
<b>Табела 12.</b> <i>Максимуми у UV спектру моксифлоксацина у различитим растварачима</i>	42
<b>Табела 13.</b> <i>Растворљивост моксифлоксацина у различитим растварачима</i>	43
<b>Табела 14.</b> <i>Референтне вредности концентрације (mol/dm<sup>3</sup>) за јоне мале молекулске масе у плазми</i>	69
<b>Табела 15.</b> <i>Укупне концентрације лиганада и металних јона који се користе као компјутерска база података у хуманој крвној плазми (mol/dm<sup>3</sup>)</i>	70
<b>Табела 16.</b> <i>% дистрибуције металних јона Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> међу лигандима мале молек. масе у хуманој плазми пронађеним компјутерском симулацијом</i>	74
<b>Табела 17.</b> <i>Поређење концентрација метала добијених компјутерском симулацијом са укупном концентрацијом процењеном на основу експерименталних разматрања</i>	75
<b>Табела 18.</b> <i>Концентрације слободних лиганада у плазми добијених симулацијом на вредности pH=7.4</i>	75
<b>Табела 19.</b> <i>Константе стабилности главних Gd<sup>3+</sup>-комплекса у хуманим интерстицијумским флуидима</i>	81
<b>Табела 20.</b> <i>Најважнија хемијска својства алуминијума</i>	83
<b>Табела 21.</b> <i>Хидролитички комплекси Al<sup>3+</sup>-јона</i>	84
<b>Табела 22.</b> <i>Константе стабилности Al<sup>3+</sup>-комплекса са неким органским лигандима на 298.0 K у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини. L- лиганд (анјон киселине)</i>	86
<b>Табела 23.</b> <i>Нормални нивои концентрација алуминијума у биолошким узорцима</i>	87
<b>Табела 24.</b> <i>Литературни преглед комплексирања Al<sup>3+</sup> јона са ципрофлоксацином, еноксацином, ломефлоксацином и енроксацином</i>	89
<b>Табела 25.</b> <i>Литературни преглед комплексирања Al<sup>3+</sup> јона са левофлоксацином, офлоксацином, норфлоксацином и спарфлоксацином</i>	90
<b>Табела 26.</b> <i>Преглед потенциометријских титрација протоновања офлоксацин анјона у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини на (298.0±0.5)K</i>	117
<b>Табела 27.</b> <i>Вредности концентрације офлоксацина и pH вредности припремљених раствора за спектрофотометријска мерења у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини на (298.0±0.5)K</i>	118
<b>Табела 28.</b> <i>Преглед потенциометријских титрација протоновања анјона моксифлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини на (298.0±0.5)K</i>	119

<b>Табела 29.</b> Преглед потенциометријских титрација хидролизе $Gd^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	120
<b>Табела 30.</b> Преглед потенциометријских титрација комплексирања $Al^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	121
<b>Табела 31.</b> Преглед потенциометријских титрација комплексирања $Gd^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	122
<b>Табела 32.</b> Преглед потенциометријских титрација комплексирања $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	124
<b>Табела 33.</b> Услови снимања ESI MS спектра на LC MS Agilent 1100	128
<b>Табела 34.</b> Услови проучавања хидролизе $Gd^{3+}$ јона	128
<b>Табела 35.</b> Услови проучавања комплексирања $Gd^{3+}$ јона и офлоксацина	129
<b>Табела 36.</b> Укупне концентрације лигананда и металних јона за компјутерски модел хумане крвне плазме у $HuSS$	131
<b>Табела 37.</b> Комплекси $Al^{3+}$ јона унети у базу у $HuSS$	132
<b>Табела 38.</b> Комплекси $Gd^{3+}$ јона унети у базу у $HuSS$	133
<b>Табела 39.</b> Константе протоновања офлоксацин анјона у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$ на основу потенциометријских мерења	135
<b>Табела 40.</b> Константе протоновања моксифлоксацин анјона у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$ на основу потенциометријских и спектрофотометријских мерења	136
<b>Табела 41.</b> Константе стабилности хидролитичких комплекса $Al^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	136
<b>Табела 42.</b> Константе стабилности хидролитичких комплекса $Gd^{3+}$ -јона у воденим растворима на $(298.0 \pm 0.5)K$ у различитим јонским медијумима $K_{sp} = [Gd^{3+}]x[H^+]^3$	137
<b>Табела 43.</b> Константе стабилности комплекса $Al^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	138
<b>Табела 44.</b> Константе стабилности $Al^{3+}$ -моксифлоксацин комплекса у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	138
<b>Табела 45.</b> Константе стабилности комплекса $Gd^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$ за различите концентрационе односе и када су укључене све титрације у обрачун	139
<b>Табела 46.</b> Константе стабилности $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ јонској средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	140
<b>Табела 47.</b> Коначно прихваћен модел комплекса за константе стабилности $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	140
<b>Табела 48.</b> Збирни приказ комплекса и константи стабилности $Al^{3+}$ и $Gd^{3+}$ јона са офлоксацином и моксифлоксацином у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ и $\text{NaCl}$ средини на $(298.0 \pm 0.5)K$	141
<b>Табела 49.</b> Табеларни приказ масених спектра хидролизе $Gd^{3+}$ јона ( $c=0.025 \text{ mmol}$ ) на различитим $pH$ вредностима	141
<b>Табела 50.</b> Табеларни приказ идентификованих врста у ESI-MS спектрима при комплексирању $Gd^{3+}$ јона и офлоксацина ( $L\text{-oflo}^-$ ; $LH^0\text{-Hoflo}$ ; $LH_2^+\text{-H}_2\text{oflo}^+$ )	142
<b>Табела 51.</b> Поређење резултата модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у $HuSS$ -у и ECCLES-у	156
<b>Табела 52.</b> Поређење резултата слободних концентрација лигананда добијеним компјутерском симулацијом на $pH=7.4$ у $HuSS$ -у и ECCLES-у	158
<b>Табела 53.</b> Поређење резултата укупне концентрације јона метала модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у $HuSS$ -у и ECCLES-у	159

<b>Табела 54.</b> Доминантни комплекси $Al^{3+}$ у хуманој крвној плазми израчунати програмом <i>HuSS</i> (без присуства трансферина)	160
<b>Табела 55.</b> Поређење дистрибуције алуминијума компјутерског модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у <i>HuSS</i> -у и <i>ECCLES</i> -у	163
<b>Табела 56.</b> Доминантни комплекси $Gd^{3+}$ у серуму на рН 7.4 израчунати програмом <i>HuSS</i> при минималној концентрацији $Gd^{3+}$ -јона	163
<b>Табела 57.</b> Доминантни комплекси $Gd^{3+}$ у серуму на рН 7.4 израчунати програмом <i>HuSS</i> при различитим концентрацијама $Gd^{3+}$ -јона	164
<b>Табела 58.</b> Дистрибуција комплекса $Gd^{3+}$ јона (%)	166
<b>Табела 59.</b> Дистрибуција растворних комплекса $Gd^{3+}$ јона (%)	166
<b>Табела 60.</b> Утицај неких флуорохинолона на доминантне комплексе $Gd^{3+}$ јона у крвној плазми на рН 7.4 израчунати програмом <i>HuSS</i>	167

## СПИСАК ТАБЕЛА ПРИЛОГА

Број и назив табеле	Стр.
<b>Табела 1П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.00 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина са 0.093 mmol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	184
<b>Табела 2П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 2.003 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина са 0.093 mmol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	184
<b>Табела 3П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 2.000 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина + 3.225 mmol/dm <sup>3</sup> HCl са 0.093 mmol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	185
<b>Табела 4П</b> Апсорпциони спектри офлоксацина у UV-VIS области. $C_{offo}=2.50 \times 10^{-5}$ mol/dm <sup>3</sup> у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини на 298 K	186
<b>Табела 5П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 0.5 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	187
<b>Табела 6П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	189
<b>Табела 7П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1.5 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	191
<b>Табела 8П</b> Апсорпциони спектри моксифлоксацина у UV-VIS области. $C_{moxi}=5.35 \times 10^{-5}$ mol/dm <sup>3</sup> у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини на 298 K	194
<b>Табела 9П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 0.99 mmol/dm <sup>3</sup> $Gd^{3+}$ са 0.1983 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	195
<b>Табела 10П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 2.53 mmol/dm <sup>3</sup> $Gd^{3+}$ са 0.1983 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	196
<b>Табела 11П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 4.95 mmol/dm <sup>3</sup> $Gd^{3+}$ са 0.1983 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	197
<b>Табела 12П</b> Потенциометријска титрација 25.0 ml 0.498 mmol/dm <sup>3</sup> $Al^{3+}$ -јона + 2.49 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина + 0.047 mmol/dm <sup>3</sup> HCl са 0.091 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	197
<b>Табела 13П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.995 mmol/dm <sup>3</sup> $Al^{3+}$ -јона + 2.478 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина + 0.093 mmol/dm <sup>3</sup> HCl са 0.0907 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	198
<b>Табела 14П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.99 mmol/dm <sup>3</sup> $Al^{3+}$ -јона + 2.453 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина + 0.186 mmol/dm <sup>3</sup> HCl са 0.0907 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	199
<b>Табела 15П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm <sup>3</sup> $Gd^{3+}$ и 1.0 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	201

<b>Табела 16П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> и 2.0 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	203
<b>Табела 17П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> и 2.5 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	205
<b>Табела 18П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> и 3.0 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	208
<b>Табела 19П</b> Потенциометријска титрација 20 ml 0.6 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> и 3.0 mmol/dm <sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	210
<b>Табела 20П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.07 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1983 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl средини	212
<b>Табела 21П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.10 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> + 1.07 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	214
<b>Табела 22П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.55 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> + 1.07 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	215
<b>Табела 23П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.80 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> + 2.40 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	217
<b>Табела 24П</b> Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.50 mmol/dm <sup>3</sup> Gd <sup>3+</sup> + 2.5 mmol/dm <sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm <sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm <sup>3</sup> LiCl	220
<b>Табела 25П</b> UV-VIS спектри раствора Gd(III)-моксифлоксацина на различитим рН вредностима за концентрациони однос Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацин=1:1 ([Gd <sup>3+</sup> ]=0.033 mmol/dm <sup>3</sup> , [моxi]=0.035 mmol/dm <sup>3</sup> )	223
<b>Табела 26П</b> UV-VIS спектри раствора Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за концентрациони однос Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацин=1:2 ([Gd <sup>3+</sup> ]=0.0165 mmol/dm <sup>3</sup> , [моxi]=0.0349 mmol/dm <sup>3</sup> )	225
<b>Табела 27П</b> UV-VIS спектри раствора Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за концентрациони однос Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацин=1:3 ([Gd <sup>3+</sup> ]=0.0165 mmol/dm <sup>3</sup> , [моxi]=0.0508 mmol/dm <sup>3</sup> )	227
<b>Табела 28П</b> UV-VIS спектри раствора Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за концентрациони однос Gd <sup>3+</sup> -моксифлоксацин=2:1 ([Gd <sup>3+</sup> ]=0.0715 mmol/dm <sup>3</sup> , [моxi]=0.0349 mmol/dm <sup>3</sup> )	229

---

**САДРЖАЈ****СПИСАК СЛИКА И ШЕМА****СПИСАК ТАБЕЛА**

<b>ИЗВОД</b>	1
<b>SUMMARY</b>	3
<b>УВОД</b>	5
<b>1. ОПШТИ ДЕО</b>	7
1.1. Формирање комплексних једињења у растворима	7
1.1.1. Протолитичке равнотеже у растворима	7
1.1.2. Равнотеже комплексирања	12
1.2. Опште особине флуорохинолона, флуорохинолони као лиганди	17
1.2.1. Опште о хинолонима	17
1.2.2. Структура и номенклатура хинолона	19
1.2.2.1. Утицај хемијске структуре на дејство хинолона	22
1.2.3. Киселинско-базне особине хинолона	22
1.2.4. Растворљивост	24
1.2.5. Спектроскопске особине хинолона	26
1.2.5.1. UV-VIS спектри	26
1.2.5.2. IR спектри	27
1.2.5.3. NMR спектри	29
1.2.5.4. Масени спектри	32
1.2.6. Офлоксацин као лиганд	34
1.2.7. Моксифлоксацин као лиганд	40
1.3. Компјутерска симулација специјације у раствору	47
1.3.1. Молска фракција (алфа вредности)	47
1.3.1.1. Молска фракција (алфа вредности) слабе киселине, НА	47
1.3.1.2. Молска фракција (алфа вредности) полифункционалних киселина и база	48
1.3.1.3. Фракциона дистрибуција комплексних једињења (алфа једначине)	49
1.3.2. Специјација јона метала	50
1.3.3. Методе за опис специјације у биолошким системима	54

---

1.3.4. Компјутерски програми за симулације специјација у растворима	55
1.3.4.1. HYSS	55
1.3.4.2. ECCLES	62
1.3.4.3. MINTQA2	63
1.3.4.4. BEST/SPE	63
1.3.4.5. MEDUSA	64
1.3.4.6. MINEQL+	64
1.3.4.7. JESS	65
1.4. Хумана плазма као средина у којој се формирају комплекси	67
1.4.1. Крвна плазма	67
1.4.2. База података крвне плазме-компјутерски модел крве плазме	69
1.5. Физиолошка специјација јона метала у плазми	71
1.5.1. Модели симулације равнотежа метал-јон у биофлуидима (Maу-ов компјутерски модел хумане крвне плазме)	71
1.5.2. Плазма мобилизациони индекс (PMI)	78
1.6. Особине Gd <sup>3+</sup> -јона у воденим растворима	79
1.7. Особине Al <sup>3+</sup> -јона у воденим растворима	83
1.8. Литературни преглед комплексирања Al <sup>3+</sup> и Gd <sup>3+</sup> -јона са флуорохинолонима и литературни модели специјације Al <sup>3+</sup> и Gd <sup>3+</sup> -јона у хуманој крвној плазми	89
1.8.1. Литературни преглед комплексирања Al <sup>3+</sup> и Gd <sup>3+</sup> -јона са флуорохинолонима	89
1.8.2. Литературни модели специјације Al <sup>3+</sup> и Gd <sup>3+</sup> -јона у хуманој крвној плазми	90
1.9. Методе за одређивање састава и константи стабилности комплекса	91
1.9.1. Потенциометријске методе	91
1.9.1.1. Потенциометријско одређивање завршне тачке титрације (ZTT)	92
1.9.2. Спектрофотометријске методе	94
1.9.3. Масена спектрометрија	97
1.9.3.1. Електроспреј масена спектрометрија (ESI MS)	103
<b>2. ЦИЉ, ЗАДАТАК И МЕТОДЕ</b>	107
2.1. Циљ истраживања	107
2.2. Задатак рада	107

---

---

2.3. Примењене методе истраживања	107
<b>3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО</b>	<b>109</b>
3.1. Реагенси и методе анализе	109
3.2. Инструменти и процедура	110
3.2.1. Апаратура за извођење потенциометријских титрација	110
3.2.1.1. Процедура рада на рН-метру	111
3.2.2. UV-VIS спектрофотометар	112
3.2.2.1. Процедура рада на UV-VIS спектрофотометру	112
3.2.3. Масени спектрометар	115
3.2.3.1. Процедура рада на масеном спектрометру	115
3.3. Експериментални резултати	116
3.3.1. Протоновање офлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	117
3.3.2. Протоновање моксифлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	118
3.3.3. Хидролиза $\text{Al}^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	120
3.3.4. Хидролиза $\text{Gd}^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	120
3.3.5. Комплексирање $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	121
3.3.6. Комплексирање $\text{Al}^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	122
3.3.7. Комплексирање $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ NaCl средини	122
3.3.8. Комплексирање $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини	124
3.3.9. Масеноспектрометријско проучавање хидролизе $\text{Gd}^{3+}$ јона и комплексирања $\text{Gd}^{3+}$ и офлоксацина	128
3.3.10. Рачунарско моделирање хумане крвне плазме компјутерским програмом HySS	131
<b>4. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА МЕРЕЊА</b>	<b>135</b>
4.1. Константе протоновања офлоксацин анјона	135
4.2. Константе протоновања моксифлоксацин анјона	135
4.3. Хидролитички комплекси $\text{Al}^{3+}$ -јона	136
4.4. Хидролитички комплекси $\text{Gd}^{3+}$ -јона	136
4.5. Комплекси $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин система	137
4.6. Комплекси $\text{Al}^{3+}$ -моксифлоксацин система	138

---

---

4.7. Комплекси $Gd^{3+}$ -офлоксацин система	138
4.8. Комплекси $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система	139
4.9. ESI MS спектри хидролизе $Gd^{3+}$ јона и комплекси $Gd^{3+}$ и офлоксацина	141
<b>5. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА</b>	143
5.1. Протоновање офлоксацин анјона	143
5.2. Протоновање моксифлоксацин анјона	144
5.3. Хидролиза $Gd^{3+}$ -јона	145
5.4. Комплекси $Gd^{3+}$ -офлоксацин система	146
5.5. Комплекси $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система	153
5.6. Физиолошки модел хумане крвне плазме у компјутерском програму HySS	156
5.7. Биодистрибуција $Al^{3+}$ јона у физиолошким условима	159
5.8. Биодистрибуција $Gd^{3+}$ јона у физиолошким условима	163
<b>6. ЗАКЉУЧАК</b>	171
<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	175
<b>ПРИЛОГ</b>	183
Потенциометријске титрације протоновања анјона офлоксацина	184
Апсорпциони спектри протоновања анјона офлоксацина	186
Потенциометријске титрације протоновања анјона моксифлоксацина	187
Апсорпциони спектри протоновања анјона моксифлоксацина	194
Потенциометријске титрације хидролизе $Gd^{3+}$ -јона	195
Потенциометријске титрације комплексирања система $Al^{3+}$ -офлоксацин	197
Потенциометријске титрације комплексирања система $Gd^{3+}$ -офлоксацин	201
Потенциометријске титрације комплексирања система $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин	212
Апсорпциони спектри комплексирања система $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин	223
Масени спектри хидролизе $Gd^{3+}$ јона	231
Масени спектри комплексирања $Gd^{3+}$ јона и офлоксацина	236
<b>БИОГРАФИЈА</b>	241
<b>РАДОВИ ПРОИСТЕКЛИ ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ</b>	243

---



## ИЗВОД

Предмет ове дисертације је карактеризација прототропних и равнотежа комплексирања јона  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$  и офлоксацина и  $\text{Gd}^{3+}$  и оксифлоксацина.

Проучавања су вршена потенциометријским и спектрофотометријским методама у  $0,1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  и  $\text{NaCl}$  средини, на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ .

Проучавање хидролизе  $\text{Gd}^{3+}$  јона и комплексирања  $\text{Gd}^{3+}$  и офлоксацина, вршено је и ESI MS методом.

Биодистрибуција  $\text{Gd}^{3+}$  и  $\text{Al}^{3+}$  јона у физиолошким условима, проучавана је компјутерском симулацијом, програмом HySS.

Проучавањем ових система, наведеним експерименталним техникама и компјутерском симулацијом, добијени су следећи резултати:

- Офлоксацин се може протонovati на две функционалне групе (на карбоксилној и терцијарној amino групи у пиперизинском супституенту) и има две константе протоновања  $\log\beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд):  $\text{Hoflo}$ ,  $\log\beta_{1,1}=8.212 \pm 0.003$ ;  $\text{H}_2\text{oflo}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=14.240 \pm 0.006$ ;
- Оксифлоксацин се може протонovati на две функционалне групе (на карбоксилној групи и на азоту са C7 супституента) и има две константе протоновања  $\log\beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд):  $\text{Hmoxi}$ ,  $\log\beta_{1,1}=9.0 \pm 0,020$ ;  $\text{H}_2\text{moxi}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=15.57 \pm 0.050$ .
- Састав и константе стабилности хидролитичких комплекса који се формирају хидролизом  $\text{Al}^{3+}$ -јона, узети су из литературних извора.
- Потенциометријском методом и ESI MS методом, потврђено је постојање хидролитичких комплекса  $\log\beta_{p,q}$  (p-метал, q-H):  $\text{GdOH}^{2+}$  ( $-\log\beta_{1,-1}=7,96 \pm 0,01$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  ( $\log K_{sp1,-3}=17,90 \pm 0,1$ ).
- Реакције комплексирања  $\text{Al}^{3+}$ -јона и офлоксацина указују на формирање протонваних, обичних, мешовито хидролитичких и полинуклеарно-мешовито хидролитичких комплекса са следећим константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, r-лиганд):  $[\text{Al}(\text{Hoflo})]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=15.93 \pm 0.03$ );  $[\text{Al}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=14.84 \pm 0.07$ );  $[\text{Al}\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=10.20 \pm 0.04$ );  $[\text{Al}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=4.21 \pm 0.05$ );  $[\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{oflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{2,-2,1}=6.4 \pm 0.10$ ).
- Комплексирање у систему  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин указује да се формирају протонвани, обични, мешовито хидролитички и полинуклеарно-мешовито хидролитички комплекси са следећим константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, r-лиганд):  $[\text{GdHoflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=13.31 \pm 0.02$ );  $[\text{Gdoflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=6.00 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=-1.01 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=26.04 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,1,2}=18.14 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=11.00 \pm 0.09$ );  $\text{Gd}(\text{OH})(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-1,2}=3.34 \pm 0.04$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_2(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-2,2}=-6.46 \pm 0.08$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_3]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,3,3}=37.65 \pm 0.06$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=30.71 \pm 0.06$ ).
- Комплексирање у систему  $\text{Gd}^{3+}$ -оксифлоксацин указује на формирање комплекса са следећим константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, r-лиганд):  $[\text{GdHmoxi}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=14.78 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=29.75 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_3]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,3,3}=43.98 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2\text{moxi}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=35.08 \pm 0.01$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})\text{moxi}_2]^+$  ( $\log\beta_{1,1,3}=27.56 \pm 0.03$ );  $\text{Gd}(\text{moxi})_3$  ( $\log\beta_{1,0,3}=19.20 \pm 0.05$ ).
- Компјутерским програмом HySS проучаван је модел хумане крвне плазме. Модел је укључио 8 јона метала ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) и 43 лиганата (26 аминокиселина, 7 неорганских лиганата, 8 карбоксилних киселина и 2 протеина) са укупно 5941 комплекса. Константе стабилности комплекса узете су из JESS-ове, NIST-ове и IUPAC-ове базе константи стабилности, а у случају да се одговарајуће вредности нису могле наћи у базама, коришћени су литературни извори. За добијање поузданих резултата узете су вредности константи стабилности блиске физиолошким условима ( $T=310 \text{ K}$  и  $I=0.15 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ ). Пошто те вредности нису

увек биле расположиве на основу термодинамичких података ( $\Delta H$  и  $\Delta S$ ) и применом SIT и LFER теорије извршена је корекција константи стабилности на физиолошке услове.

- $Al^{3+}$  јон је 81-89% везан у нормалном серуму за протеин трансферин. Преостали део од 11-19% стоји на располагању за формирање комплекса са осталим лигандима плазме. Проучавањем биодистрибуције  $Al^{3+}$ -јона компјутерском симулацијом, установљено је да су у хуманој крвној плазми доминантни комплекси  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  (процент дистрибуције око 90%) и  $[AlCit(OH)]^-$  (процент дистрибуције од 6-13% у зависности од рН), док су комплекси  $Al(OH)_3$ ,  $Al(PO_4)$ ,  $[Al(OH)_4]^-$  и  $[AlCit_2(OH)_2]^{5-}$  испод 2%. Најдоминантнији комплекс  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  приказује приближно идентичну концентрацију у присуству флуорохинолона ципрофлоксацина, флероксацина, ломефлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина и спарфлоксацина, док у исто време показује мању концентрацију у присуству моксифлоксацина него у присуству офлоксацина. Комплекс  $[AlCit(OH)]^-$  има мању концентрацију у хуманој крвној плазми (ниже од 10%) у односу на фосфатни комплекс, па и у присуству неких флуорохинолона. Уопштено се може закључити да је у присуству офлоксацина већа концентрација доминантних комплекса него у присуству моксифлоксацина, што значи да моксифлоксацин испољава већи утицај на биодистрибуцију  $Al^{3+}$  јона него офлоксацин. Резултати доминантних комплекса  $Al^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми (не узимајући у обзир везивање за трансферин), указују на релативно добро слагање резултата са литературним моделима, по врсти доминантних комплекса и проценту њихове расподеле.
- Проучавањем биодистрибуције  $Gd^{3+}$ -јона компјутерском симулацијом, установљено је да су доминантне нерастворне врсте. Међу њима, првенствено се формира  $GdPO_4(s)$  због своје велике стабилности, док се комплекс  $Gd_2(CO_3)_3(s)$  појављује даљим повећањем концентрације  $Gd^{3+}$ -јона. Међу растворним врстама  $Gd^{3+}$ -јона, доминантни комплекси су  $[GdHSA]^{16-}$ ,  $[GdOxa]^+$  и тернерни комплекси са цитратима као примарним лигандима. При ниским концентрацијама  $Gd^{3+}$ -јона ( $10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ ) доминирају растворне врсте, док повећањем концентрације ( $10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  и вишим) долази до формирања доминантних нерастворних (таложних) комплекса.
- Моксифлоксацин као биолиганд у хуманој крвној плазми значајније мобилише јоне  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  од офлоксацина.

## SUMMARY (Abstract)

The subject of this dissertation is characterization of the prototropic and complexation equilibria in solutions of  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  and ofloxacin and  $\text{Gd}^{3+}$  ion and moxifloxacin.

Investigations were performed using potentiometric and spectrophotometric methods in  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl and NaCl ionic medium, at  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ .

The hydrolysis of  $\text{Gd}^{3+}$  ions and complexation of  $\text{Gd}^{3+}$  and ofloxacin were studied using ESI MS method also.

Bio-distribution of  $\text{Gd}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions under physiological conditions, were investigated by computer simulations, using HySS software.

Investigation of these systems using the above mentioned experimental techniques and computer simulation, gave the following results:

- Ofloxacin can be protonated on two functional groups (on carboxylate and tertiary amino group at piperazine substituent), with two protonation constants  $\log\beta_{q,r}$  (q-proton, r-ligand): Hoflo,  $\log\beta_{1,1}=8.212 \pm 0.003$ ;  $\text{H}_2\text{oflo}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=14.240 \pm 0.006$  respectively;
- Moxifloxacin can be protonated on two functional groups (on carboxylate group and on nitrogen at C7 substituent), with two protonation constants  $\log\beta_{q,r}$  (q-proton, r-ligand): Hmoxi,  $\log\beta_{1,1}=9.30 \pm 0.020$ ;  $\text{H}_2\text{moxi}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=15.57 \pm 0.050$  respectively;
- Composition and stability constants of hydrolytic complexes formed by hydrolysis of  $\text{Al}^{3+}$  ions have been taken from literature sources.
- Potentiometric and ESI MS methods, confirmed the existence of hydrolytic complexes  $\log\beta_{p,q}$  (p-metal, q-H):  $\text{GdOH}^{2+}$  ( $-\log\beta_{1,-1}=7.96 \pm 0.01$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  ( $\log K_{sp1,-3}=17.90 \pm 0.1$ ).
- Reactions of  $\text{Al}^{3+}$  ions and ofloxacin complexation indicate formation of protonated, simple, mixed hydrolytic and polynuclear-mixed hydrolytic complexes with the following stability constants  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-metal, q-proton, q-ligands):  $[\text{Al}(\text{Hoflo})]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=15.93 \pm 0.03$ );  $[\text{Al}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=14.84 \pm 0.07$ );  $[\text{Al}\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=10.20 \pm 0.04$ );  $[\text{Al}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=4.21 \pm 0.05$ );  $[\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{oflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{2,-2,1}=6.4 \pm 0.10$ ).
- Complexation in the system of  $\text{Gd}^{3+}$ -ofloxacin indicates formation of protonated, simple, mixed hydrolytic and polynuclear-mixed hydrolytic complexes with the following stability constants  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-metal, q-proton, q-ligands):  $[\text{GdHoflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=13.31 \pm 0.02$ );  $[\text{Gdoflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=6.00 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=-1.01 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=26.04 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,1,2}=18.14 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=11.00 \pm 0.09$ );  $\text{Gd}(\text{OH})(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-1,2}=3.34 \pm 0.04$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_2(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-2,2}=-6.46 \pm 0.08$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_3]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,3,3}=37.65 \pm 0.06$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=30.71 \pm 0.06$ ).
- Complexation in the system  $\text{Gd}^{3+}$ -moxifloxacin indicates formation of the complexes with the following stability constants  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-metal, q-proton, q-ligands):  $[\text{GdHmoxi}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=14.78 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=29.75 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_3]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,3,3}=43.98 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2\text{moxi}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=35.08 \pm 0.01$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})\text{moxi}]^+$  ( $\log\beta_{1,1,3}=27.56 \pm 0.03$ );  $\text{Gd}(\text{moxi})_3$  ( $\log\beta_{1,0,3}=19.20 \pm 0.05$ ).
- Using HySS software the model of human blood plasma was investigated. The model have included 8 metal ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) and 43 ligands (26 amino acids, 7 inorganic ligands, 8 carboxyl acids and 2 proteins) with total number of 5941 complexes. Stability constants of complexes have been taken from JESS, NIST and IUPAC database of stability constants, but in the case of some data missing in databases, literature sources have been used. To obtain reliable results, values of the stability constants under physiological conditions have been used ( $T=310 \text{ K}$  and  $I=0.15 \text{ mol/dm}^3$  NaCl). In case that some values not being available, on the basis of thermodynamic data

( $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) and using SIT and LFER theory, correction of the stability constants on the physiological conditions was performed.

- $Al^{3+}$ -ion is 81-89% bounded in normal plasma for protein transferrin. The remaining part 11-19% is available for forming the complexes with other plasma ligands. By investigating bio-distribution of  $Al^{3+}$  ions, using computer simulation it was found that in the human blood plasma the most dominant complexes are  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  (percentage of distribution around 90%) and  $[AlCit(OH)]^-$  (percentage of distribution 6-13% depending of pH value), while complexes  $Al(OH)_3$ ,  $Al(PO_4)$ ,  $[Al(OH)_4]^-$  and  $[AlCit_2(OH)_2]^{5-}$  are below 2%. The most dominant complex  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  presents similar concentration in presence of fluoroquinolones ciprofloxacin, fleroxacin, lomefloxacin, norfloxacin, ofloxacin and sparfloxacin, while at the same time it shows less concentration in presence of moxifloxacin than ofloxacin. Complex  $[AlCit(OH)]^-$  has less concentration in human blood plasma (lower than 10%) then phosphate complex, even in the presence of some fluoroquinolones. Generally, it can be concluded that in the presence of ofloxacin percentage of the most dominant complexes  $Al^{3+}$ -ion is higher than in the presence of moxifloxacin, indicating that moxifloxacin shows higher influence on  $Al^{3+}$  biodistribution than ofloxacin. Results of the most dominant complexes of aluminum in human blood plasma without presence of transferrin, indicate the relatively good agreement of results with literature models, by the composition of the most dominant complexes and percentage of their distribution.
- Investigation of  $Gd^{3+}$ -ions bio-distribution by computer simulation shows the presence of the solid species as dominant. Among them, the firstly formed is  $GdPO_4(s)$  due to greater stability, while complex  $Gd_2(CO_3)_3(s)$  appears afterwards. Among soluble species of the  $Gd^{3+}$  ions, dominant species are complexes  $[GdHSA]^{16-}$ ,  $[GdOxa]^+$  and ternary complexes with citrate as primary ligands. At the low  $Gd^{3+}$ -ions concentrations ( $10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup>) soluble species are dominant, while increasing concentration ( $10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup> and further increasing) causes the formation of nonsoluble dominant complexes (precipitates).
- As a bioligand moxifloxacin in the human blood plasma shows more significant mobilization potential then ofloxacin for  $Al^{3+}$  and  $Gd^{3+}$  ions.

## УВОД

У мноштву разноврсних биолошких процеса, метални јони имају важну улогу. Сви метални јони који су присутни у организму човека (заједно са неметалима) могу се посматрати као *главни елементи* и *елементи у траговима*.

*Главни елементи* су седам есенцијалних елемената: калцијум, магнезијум, натријум, калијум, фосфор, сумпор и хлор. *Елементи у траговима* се могу разматрати као: есенцијални (гвожђе, јод, бакар, цинк, манган, кобалт, молибден, селен, хром и флуор), вероватно есенцијални (никал, калај, ванадијум и силицијум), неесенцијални (*алуминијум*, бор, германијум, кадмијум, арсен, олово и жива) и егзогено унети (*гадолинијум*, ...). Минерални елементи су у људском организму заступљени у тачно одређеним количинама и односима, а њихово дејство у ћелијама, поред присутне количине, зависи и од међусобне равнотеже.<sup>1-4</sup>

Алуминијум(III) (у даљем тексту  $Al^{3+}$ ) је један од најраспрострањенијих елемената у земљиној кори са широким спектром примене. Међутим без обзира на то, до сада није потпуно позната његова физиолошка улога у људском и анималном организму. За људски организам јон  $Al^{3+}$  је токсичан, било да учествује у патогенези неких болести или да испољава директну дозно-зависну токсичност.  $Al^{3+}$ -јон је веома токсичан за сва ткива у организму, а посебно за мозгано. Токсичност  $Al^{3+}$ -јона је обично умањена због сиромашне интестиналне апсорпције и ефикасне реналне екскреције. Повећана концентрација  $Al^{3+}$ -јона у мозгу сматра се ризичним фактором настанка *Alchajmer*-ове болести која у мозгу оболелих узрокује абнормални облик протеина, плакова и фибрила (нарочито делова мозга задужених за памћење). Међутим, у неким случајевима као што је дијализа, количине  $Al^{3+}$ -јона у храни, лековима и води могу представљати извор озбиљне опасности. Постојање знања о токсичности  $Al^{3+}$ -јона је условило да се појача интересовање о његовом понашању у хуманом крвном серуму. Као мали тровалентни катјон,  $Al^{3+}$  се класификује као тврда *Lewis*-ова киселина која показује афинитет за везивање са тврдим базама (хидроксида, флуориди, ...). У нормалном хуманом крвном серуму као основни лиганди за везивање са  $Al^{3+}$ -јоном појављују се хидроксида, фосфати, трансферин и цитрати. Због лабилности тако насталих комплекса и њиховог присуства у веома малим концентрацијама, њихове дистрибуције се не могу експериментално одредити, али коришћењем компјутерских модела ове дистрибуције се могу израчунати.<sup>5</sup>

Хелати гадолинијум(III)-јона (у даљем тексту  $Gd^{3+}$ ) су један од најчешћих контрастних агенаса магнетне резонанце (MRI), компјутерске томографије (CT) и магнетне резонантне ангиографије (MRA) због одличних магнетних својстава гадолинијума. Магнетна резонанца је моћна метода клиничке дијагностике која омогућава дијагностификовање болести на основу разлике у протонским NMR резонанцама нормалног и абнормалног ткива у присуству парамагнетичких тзв. контраст агенаса.  $Gd^{3+}$  је погодан за примену у NMR спектроскопији због великог броја неспарених електрона који креирају дугачка електрон-спин релаксациона времена. Док је сам  $Gd^{3+}$  веома токсичан,  $Gd^{3+}$  хелатни контрастни агенси садрже елемент у високо стабилним комплексима са линеарним макроцикличним полиаминокарбоксилним киселинама као лигандима. Уопштено, ови комплекси показују добру толеранцију код људи и поседују кратко време елиминације. Клиничку примену као контрастни агенси у NMR спектроскопији налазе неколико комплекса  $Gd^{3+}$  јонског и неутралног карактера (*Omniscan-GE Healthcare, Magnevist-Bayer Healthcare, OptiMARK-Mallinckrodt, ProHance-Bracco, MultiHance-Bracco, ...*). Они су екстрацелуларни и имају способност брзог дифундовања у интерстицијалне просторе.<sup>6,7</sup>

Интересантну групу биолиганада чине флуоровани хинолони, који у својој структури садрже карбонилну и карбоксилну групу у вициналном положају. Стога су ове супстанце потенцијално добри хелатори јона метала. Флуоровани хинолони су

антибактеријска средства која се користе код уринарних и бубрежних инфекција, а новије генерације и код респираторних инфекција. Хинолони су синтетички антибиотици који садрже више стотина активних једињења од којих је више десетина регистровано као фармацеутски препарати. Велику пажњу међу њима, привлаче офлоксацин и моксифлоксацин, хинолонски антибиотици треће и четврте генерације који показују значајну активност према анаеробним бактеријама.<sup>8-11</sup> Скорашња истраживања указују на важну улогу јона метала у механизму деловања ових антибиотика, првенствено у смислу смањења њихове активности у присуству јона метала због формирања делимично растворних комплекса или значајног утицаја у механизму њиховог деловања (нарочито магнезијума). Јони метала могу утицати на биорасположивост хинолона променом њихове растворљивости и липофилности, а настали комплекси могу поседовати нове биолошке карактеристике у смислу измене минималних инхибиторних концентрација и антибактеријског спектра дејства. Интеракција контрастних хелата и флуорохинолона је могућа код пацијената који су на антибактеријској терапији, при чему хинолонски хелати  $Gd^{3+}$ -јона могу бити кандидати за контрастне агенсе.

Циљ истраживања докторске дисертације је проучавање специјације  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона под утицајем флуорохинолона офлоксацина и моксифлоксацина у хуманој крвној плазми. Добијени резултати могу бити значајни не само за боље познавање хемијских особина комплекса који се граде између лиганата типа флуорованих хинолона и наведених металних јона, већ и за боље познавање токсичних ефеката  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у терапеутској примени. Специјација и биодистрибуција  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у хуманој плазми, како указују литературни подаци изучавана је углавном у присуству лиганата који су нормално присутни у плазми при физиолошким условима.

Литературни преглед података који се односе на област докторске дисертације указује на потребу за проучавањем специјације  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  у биофлуидима, због веома малог броја литературно приступачних података. Флуоровани хинолони могу градити различита комплексана једињења са  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јонима, при чему до изражаја долазе два ефекта. При паралелној терапији, метаболизам ових јона може се променити у смислу њиховог транспорта у циркулацију или у другом случају флуоровани хинолони могу мобилисати наведене јоне из ткивних депоа при чему зависно од наелектрисања комплекса може доћи до њиховог транспорта у циркулацију или елиминације.

Утицај терапеутски унетих лиганата на специјацију проучаван је у малом броју случајева углавном са лигандима тетрациклинског типа тако да се истраживања која су предмет ове докторске дисертације надовезују на резултате добијене приликом проучавања утицај тетрациклина на специјацију  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми. Специјациони модели развијени из оваквих проучавања, требали би пружити допринос у фармакокинетичким студијама хинолона у присуству  $Gd^{3+}$  контрастних агенаса и проучавању токсичних ефеката при паралелној примени хелата  $Gd^{3+}$ -јона и флуорохинолона.

У циљу провере предвиђених хипотеза, примењене су методе потенцијометријских мерења комплексирања у воденим растворима, UV-VIS спектрофотометријска мерења комплексирања, масеноспектрометријска мерења хидролизе и комплексирања и компјутерске симулације применом компјутерског програма HySS.

# 1. ОПШТИ ДЕО

## 1.1. Формирање комплексних једињења у растворима

### 1.1.1. Протолитичке равнотеже у растворима

Протолитичке реакције су хемијске реакције које у растворима доводе до преноса протона између учесника у реакцији, при чему протон са једне хемијске јединке прелази на другу. Хемијске јединке које могу да размењују протоне зову се *протолити*. Све протолитичке реакције могу се поделити на реакције *дисоцијације*, *неутрализације* и *хидролизе*.<sup>11</sup>

Један пар честица је протон-донор и представља пар коњугована киселина-коњугована база. Други пар честица је такође коњуговани киселинско-базни пар и представља акцептор протона. У општем случају, реакције протолитичке могу се представити у следећем облику:



$B_1H$ - $B_1^-$  представља коњугован пар киселина-база који је донор протона а  $B_2$ - $B_2H^+$  коњуговани пар база-катјонска киселина који је акцептор протона. Спонтано одигравање реакције (1) одређује промена *Gibbs*-ове енергије ове реакције у условима притиска и температуре различитим од стандардних. Да би се израчунала промена *Gibbs*-ове енергије реакције (1) потребно је дефинисати релативну јачину киселинско-базног пара, будући да од односа ових величина зависи померање горње равнотеже у леву или у десну страну. Апсолутна јачина киселине одређена је константом равнотеже реакције:



$$K_a = \frac{a(H^+) \times a(B^-)}{a(BH)} \quad (3)$$

Величина  $K_a$  представља термодинамичку константу дисоцијације киселине  $BH$  и мерило је апсолутне јачине ове киселине. Међутим, константа  $K_a$  не може се експериментално одредити нити теоријски израчунати, јер апсолутне активности честица  $H^+$ ,  $B^-$  и  $BH$  не могу да се одреде. У циљу поређења релативне јачине киселина можемо посматрати одвијање реакције дисоцијације у хомогеној средини која се карактерише релативном диелектричном пропустљивошћу већом од оне у вакууму и за коју се претпоставља да се уношењем честица  $H^+$ ,  $B^-$  и  $BH$  не мења. Конвенционално се као таква средина узима вода, па се релативне јачине киселина и база израчунавају у односу на киселинско-базни пар  $H_3O^+/H_2O$ .<sup>12-14</sup>

Реакцију дисоцијације киселине  $BH$  у води можемо представити једначином:



Константа равнотеже ове реакције представљена је једначином:

$$K_{a,d} = \frac{a(H_3O^+) \times a(B^-)}{a(BH) \times a(H_2O)} \quad (5)$$

Ако десну страну једначине (5) помножимо и поделимо величином  $a(H^+)$ , добијамо једначину:

$$K_{a,d} = K_a \times K_d(H_3O^+), \quad (6)$$

при чему је  $K_d(H_3O^+)$ , константа равнотеже реакције дисоцијације хидронијум јона у води:



Из једначине (6) види се да је константа  $K_{a,d}$  пропорционална константи  $K_a$ , тј. да представља мерило јачине киселине под претпоставком да је  $K_d(H_3O^+)$  константа на свим температурним вредностима. Стога се конвенционално узима да је:

$$K_d(H_3O^+) = 1, \quad (8)$$

на стандардном притиску ( $p^\ominus = 101,325 \text{ kPa}$ ) и свим температурама.

Из једначина (6) и (8) следи да је:

$$K_{a,d} = K_a, \quad (9)$$

па је према томе релативна константа дисоцијације  $K_{a,d}$  мера јачине киселинско базног пара  $BH / B^-$  у односу на киселинско базни пар  $H_3O^+ / H_2O$ . Величину  $K_{a,d}$  је тешко експериментално одредити будући да апсолутне вредности активности појединих честица не могу да се мере. Стога се у једначини (6) користе релативне активности, тако да она постаје:

$$K_{a,d} = \frac{a_r(H_3O^+) \times a_r(B^-)}{a_r(BH)}, \quad (10)$$

где је:

$$a_r(X) = \frac{a(X)}{a^\ominus(X)}. \quad (11)$$

Стандардна активност  $a^\ominus(X)$ , дефинисана је једначином:

$$a^\ominus(X) = \gamma^\ominus(X) \times m^\ominus(X). \quad (12)$$

Конвенционално се узима да је:



$$a^{\ominus}(H_3O^+) = 1. \quad (13)$$

Како се стандардна активност воде не мења много приликом промене температуре и концентрације раствора, може се узети за довољно разблажене растворе да је стандардна активност воде једнака јединици.

Однос  $\frac{a^{\ominus}(B^-)}{a^{\ominus}(BH)}$  за разблажене растворе, по дефиницији тежи јединици, па је константа дисоцијације киселине:

$$K_a = \frac{a(H_3O^+) \times a(B^-)}{a(BH)}. \quad (14)$$

Узимајући у обзир дефиницију активности,

$$a(X) = \gamma(X) \times m(X), \quad (15)$$

једначина (14) се може написати на следећи начин:

$$K_a = \frac{\gamma_{H_3O^+} \times \gamma_{B^-}}{\gamma_{BH}} \times \frac{m_{H_3O^+} \times m_{B^-}}{m_{BH}}. \quad (16)$$

Како је  $BH$  неутрална честица, из *Debye-Huckel*-ове теорије следи да је  $\gamma_{BH}$  приближно једнако јединици, а производ  $\gamma_{H_3O^+} \times \gamma_{B^-}$  једнак  $\gamma_{\pm}^2$ , тако да једначина (16) прелази у:

$$K_a = \gamma_{\pm}^2 \times K_{a,m}, \quad (17)$$

где је  $K_{a,m}$  концентрациона константа равнотеже, и дата је изразом:

$$K_{a,m} = \frac{m(H_3O^+) \times m(B^-)}{m(BH)}. \quad (18)$$

Уколико је позната зависност средњег јонског коефицијента активности  $\gamma_{\pm}^2$  киселине од јонске јачине раствора, мерењем концентрационе константе дисоцијације киселине може се одредити термодинамичка константа дисоцијације  $K_a$ .<sup>12,15</sup>

У случају полипротичне слабе киселине  $H_nB$ , дисоцијација се одиграва у више степена и може се представити поједностављеном шемом:



Величине  $k_1, k_2 \dots k_n$  су кумулативне константе дисоцијације. Наелектрисања честица су изостављена ради једноставности.<sup>14</sup>

Осим кумулативних, дефинишу се и сукцесивне константе дисоцијације према следећој шеми:



Кумулативне и сукцесивне константе дисоцијације повезане су релацијом:

$$\begin{aligned}
 k_1 &= K_1 \\
 k_2 &= K_1 \times K_2 \\
 &\dots \\
 &\dots \\
 k_n &= K_1 \times K_2 \times \dots \times K_n .
 \end{aligned} \tag{21}$$

Парцијалне моларне фракције појединих честица у раствору дефинишу се релацијом:

$$f_{n-i} = \frac{[H_{n-i} B]}{\sum_{i=0}^n [H_{n-i} B]} = \frac{[H_{n-i} B]}{C_{H_n B}}, (i = 0, \dots, n). \tag{22}$$

У складу са законом о балансу маса добија се:

$$[H_{n-i} B] = k_i [H_n B] \times [H]^{-i}. \tag{23}$$

Заменом једначине (23) у једначину (22) добија се:

$$f_{n-i} = \frac{k_i [H_n B] \times [H]^{-i}}{1 + \sum_{i=1}^n k_i \times [H]^{-i}}. \tag{24}$$

Општа једначина дисоцијације полипротичне слабе киселине може се написати у облику:



Једначина (25) је изведена под претпоставком да је концентрација различитих јонских форми сразмерна њиховим парцијалним молским уделима. Величина  $\bar{n}$  је Bjerrum-ова функција формирања која се дефинише једначином:

$$\bar{n} = \sum_{i=0}^{n-1} (n-i) \times f_{n-i} = \frac{k_1 \times [H]^{-1} + 2k_2 \times [H]^{-2} + \dots + nk_n \times [H]^{-n}}{1 + k_1 \times [H]^{-1} + k_2 \times [H]^{-2} + \dots + k_n \times [H]^{-n}}. \quad (26)$$

Спонтано одигравање реакције дисоцијације, одређено је променом *Gibbs*-ове енергије реакције.

Када су услови одигравања дисоцијације различити од стандардних, спонтаност тока дисоцијације одређује *Gibbs*-ова реакциона изотерма. За реакцију (19) *Gibbs*-ова реакциона изотерма износи:

$$\Delta G = \Delta G^\ominus + R \times T \times \ln \left( \frac{\prod_{i=0}^n [H_{n-i}B] \times [H]^{n-n}}{[H_nB]_0} \right), \quad (27)$$

где је  $[H_nB]_0$  општа концентрација киселине

$$[H_nB]_0 = \sum_{i=0}^n [H_{n-i}B]. \quad (28)$$

Концентрације различитих јонизованих облика слабе киселине могу се изразити преко парцијалних молских удела:

$$[H_{n-1}B] = f_{n-1} \times [H_nB]_0. \quad (29)$$

Узимајући у обзир једначине (28) и (29), добија се израз за *Gibbs*-ову реакциону изотерму:

$$\Delta G = -R \times T \times \ln \left( \frac{\prod_{i=0}^{n-1} k_i^{f_{n-i}} \times [H]^{n-n}}{\prod_{i=0}^n f_{n-i}} \right). \quad (30)$$

Математичком трансформацијом ове једначине долази се до коначног израза за *Gibbs*-ову енергију:

$$\Delta G = -R \times T \times \ln \left( 1 + \sum_{i=1}^n k_i \times [H]^{-i} \right). \quad (31)$$

Ако кумулативне константе изразимо преко сукцесивних, добија се следећи израз:

$$\Delta G = R \times T \times \ln \left( \frac{[H]^n}{K_1 \times K_2 \times \dots \times K_n} \right) - R \times T \times \ln \left( 1 + \frac{[H]}{K_1} + \frac{[H]^2}{K_1 \times K_2} + \dots + \frac{[H]^n}{K_1 \times K_2 \times \dots \times K_n} \right). \quad (32)$$

Као што се види, на датој температури и притиску, промену *Gibbs*-ове енергије реакције дисоцијације одређује рН средине и сукцесивне константе дисоцијације слабе киселине.

У случају једнобазне киселине једначина (32) прелази у једначину:

$$\Delta G = R \times T \times \ln\left(\frac{[H]}{K_1}\right) - R \times T \times \ln\left(1 + \frac{[H]}{K_1}\right). \quad (33)$$

У јако киселим срединама када је  $\frac{[H]}{K_1} \gg 1$ , тако да једначина (33) даје  $\Delta G = 0$ , што значи да је дисоцијација потпуно сузбијена.<sup>12</sup>

### 1.1.2. Равнотеже комплексирања

Метални комплекс (координационо једињење), настаје реакцијом металног јона са молекулима или јонима који на неком од својих атома садрже слободан електронски пар. Метални јон у комплексу назива се централним јоном, а молекули или јони који се вежу са металним јоном у комплекс називају се лигандима (од латинске речи *ligare*-везати). Везивањем металног јона и лиганда у комплекс, настаје поларна ковалентна веза у којој оба електрона даје лиганд, док их метални јон прима. Тако је лиганд довор електронског пара (*Lewis*-ова база), а централни метални јон акцептор електронског пара (*Lewis*-ова киселина). Оваква врсте везе се често назива и координативно ковалентном везом. Реакција између металног јона М и лиганда L може се приказати једначином:



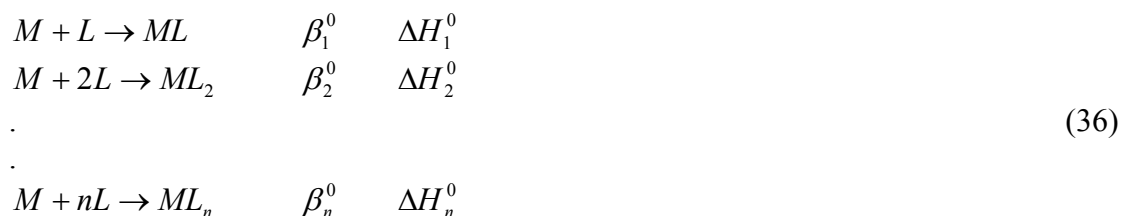
Пошто у растворима постоје само хидратисани метални јони, реакција грађења комплекса, представља заправо замену молекула растварача из солватисаног омотача металног јона другим молекулима или јонима (лигандима):



Преостале аква-групе могу се сукцесивно заменити другим лигандима све док не настане комплекс  $ML_n$ . Уз претпоставку да лиганд гради само једну везу, тј. заузима само једно координационо место, број  $n$  представља максималан број лиганда везаних за метални јон и назива се координациони број (КБ) металног јона. Он зависи од особина металног јона и лиганда и најчешће износи 6 или 4, ређе 2 или 8, а врло ретко 3, 5, 7 или други. Комплекс  $ML_n$  назива се мононуклеарним комплексом јер садржи само један метални јон, а комплекси у којима је више од једног металног јона, полинуклеарни комплекси ( $M_mL_n$ ). Комплекси у којима је укључено више врста лиганда или металних јона називају се мешовити комплекси. Неки једноставни лиганди (амонијак, халогениди, цијанид, тиоцијанат ...) везују се на једно координационо место и зато се називају монодентатни, док лиганди који садрже две или више везујућих електрон-донорских атома могу деловати као два или више монодентатних лиганда па се називају би (три) (тетра) ... дентатним или уопштено полидентатним лигандима. Кад се њиховим везивањем формирају комплекси прстенасте структуре настају хелатни комплекси који се карактеришу великом

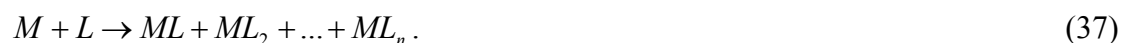
стабилношћу и тиме да се приликом везивања полиидентатних лиганата за металне јоне, број везаних лиганата смањује, повећањем полиидентатног карактера лиганда.<sup>13</sup>

Реакције комплексирања обухватају измену молекула воде координованих за централни метални јон  $M$  и лиганда  $L$ . У случају формирања комплекса који у молекулу садрже један метал говоримо о мононуклеарним комплексима, а уколико молекула комплекса садржи више атома метала, о полинуклеарним комплексима. Термодинамички опис поступног формирања комплекса може се сматрати комплетним уколико је познат следећи скуп података:



где су  $\beta_i^0$  кумулативне термодинамичке константе стабилности, а  $\Delta H_i^0$  је промена стандардне енталпије  $i$ -те реакције обрачунато по  $mol$ -у метала.

Спонтаност одигравања реакције комплексирања одређује промена *Gibbs*-ове енергије скупа реакција (36). Тај скуп реакција поједностављено се може написати у следећем облику:



Ако се комплекси  $ML_i$  формирају у концентрацијама које су сразмерне њиховим парцијалним молским уделима, онда реакцију комплексирања можемо написати у облику:



где је парцијални молски удео појединих комплекса дат изразом:

$$f_i = \frac{[ML_i]}{C_n} = \frac{[ML_n]}{\sum_{i=0}^n [ML_i]}. \quad (39)$$

Узимајући у обзир да је:

$$\beta_i = \frac{[ML_i]}{[M] \times [L]^i}, \quad (40)$$

добија се:

$$f_i = \frac{\beta_i [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_i [L]^i}. \quad (41)$$

При  $i = 0$ ,  $\beta_0 = 1$ , а  $f_i = f_0$  и представља молски удео некомплексираниог метала.

Према дефиницији парцијалног молског удела добија се:

$$\sum_{i=1}^n f_i = 1 \quad (42)$$

Да би коректно представили баланс масе у односу на лиганд, општу једначину комплексирања пишемо у облику:

$$M + f_1 + 2f_2 + \dots + nf_n L = f_0 M + f_1 ML + f_2 ML_2 + \dots + f_n ML_n \quad (43)$$

или

$$M + \bar{n} L = \left( \sum_{i=1}^n f_i \right) ML_i \quad (44)$$

где је  $\bar{n}$  -*Bjerrum*-ова функција формирања комплекса:

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^n i f_i \quad (45)$$

Ако се реакција комплексирања одвија у стандардним условима, онда је промена стандардне *Gibbs*-ове енергије представљена изразом:

$$\Delta G^\ominus = -R \times T \sum_{i=1}^n f_i \ln \beta_i \quad (46)$$

Ако се реакција комплексирања не одвија у стандардним условима, онда је промена *Gibbs*-ове енергије дата *Gibbs*-овом реакционом изотермом:

$$\Delta G = -R \times T \times \ln \prod_{i=1}^n \beta_i^{f_i} + R \times T \times \ln \frac{\prod_{i=0}^n [ML_i]^{f_i}}{[ML]^n} \quad (47)$$

Увођењем *Froneaus*-ове функције:

$$\Delta G = -R \times T \times \ln \Phi_M, \quad (48)$$

следи да је *Bjerrum*-ова функција формирања комплекса<sup>12</sup>:

$$\bar{n} = -\frac{1}{R \times T} \times \frac{\partial(\Delta G)}{\partial(\ln L)} \quad (49)$$

Средњи лигандни број  $\bar{n}$ , може се израчунати у комплексометријској титрацији јона метала и лиганда на следећи начин.

Нека је реакција комплексирања представљена једначином:



Укупна концентрација водоничног јона у раствору  $H_T$ , биће:

$$H_T = [HL] + 2[H_2L] + \dots + m[H_mL] + [H^+] - [OH^-] \quad (51)$$

Ако су кумулативне константе протоновања  $\beta_m^H$ , добија се:

$$H_T = \beta_1^H \times [H] \times [L] + 2\beta_2^H \times [H]^2 \times [L] + \dots + m\beta_m^H \times [H]^m \times [L] + [H^+] - [OH^-] \quad (52)$$

$$H_T = [L] \times [\beta_1^H \times [H] + 2\beta_2^H \times [H]^2 + \dots + m\beta_m^H \times [H]^m] + [H^+] - K_w / [H] \quad (53)$$

$$H_T = [L] \times P(H) + [H^+] - \frac{K_w}{[H^+]} \quad (54)$$

Из ове једначине добија се израз за равнотежну концентрацију лиганда:

$$[L] = \frac{H_T - [H^+] + K_w / [H^+]}{P(H)}. \quad (55)$$

Укупна концентрација лиганда у раствору је:

$$L_T = [L] + [ML] + [ML_2] + \dots + [ML_n] + \sum_{i=1}^m [H_iL], \quad (56)$$

односно:

$$L_T = [L] + \bar{n} \times M_T + \beta_1^H \times [H] \times [L] + \dots + \beta_m^H \times [H]^m \times [L] \quad (57)$$

$$L_T = [L] \times (1 + \beta_1^H \times [H] + \beta_2^H \times [H]^2 + \dots + \beta_m^H \times [H]^m) + \bar{n} \times M_T \quad (58)$$

$$L_T = [L] \times Q(H) + \bar{n} \times M_T. \quad (59)$$

Одавде је функција формирања:

$$\bar{n} = \frac{L_T - [L] \times Q(H)}{M_T} \quad (60)$$

Уводећи израз за  $[L]$ , добија се:

$$\bar{n} = \frac{L_T - C_H / \bar{n}_H}{M_T} \quad (61)$$

где је:

$$C_H = H_T - [H^+] + \frac{K_W}{[H^+]}. \quad (62)$$

Из једначине (61) може се израчунати  $\bar{n}$ , ако је позната укупна концентрација метала  $M_T$ , лиганда  $L_T$  и водоничног јона  $H_T$ , а измерена равнотежна концентрација водоничног јона,  $[H^+]$ ,

$$[H^+] = 10^{-pH}. \quad (63)$$

Константе стабилности комплекса  $ML$  и  $ML_2$  могу се одредити на основу функционалне зависности  $\bar{n} = f(\beta_i, m, h, l)$ , где су  $m, h, l$  равнотежне концентрације метала, водоничног јона и лиганда.

Како је:

$$\bar{n} = \frac{\beta_1 \times l + 2\beta_2 \times l^2}{1 + \beta_1 \times l + \beta_2 \times l^2}, \quad (64)$$

добива се:

$$\bar{n} + \beta_1 \times l \times (\bar{n} - 1) + \beta_2 \times l^2 \times (\bar{n} - 2) = 0, \quad (65)$$

одакле се применом регресионе анализе израчунавају  $\beta_1$  и  $\beta_2$ .

Ако се формира  $N$ -комплекс, онда је:

$$\sum_{m=0}^N (\bar{n} - m) \times \beta_m \times l^m = 0, \quad (66)$$

одакле се  $\beta_m$  израчунава применом мултидимензионе регресије.

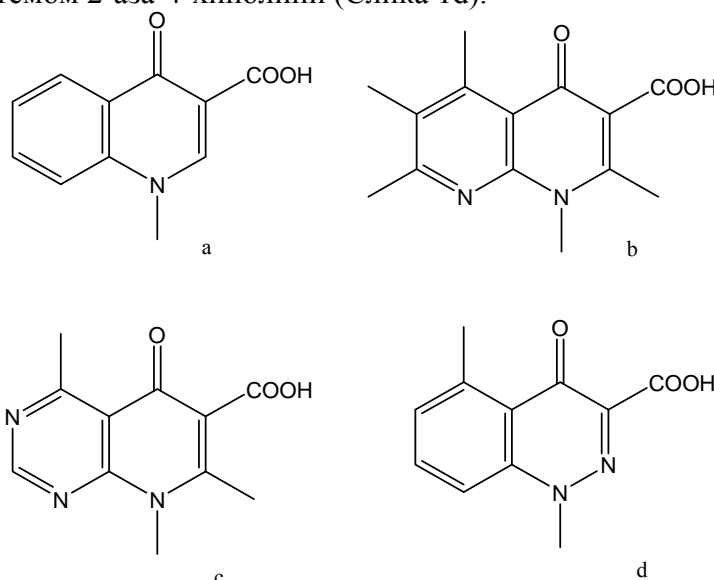


## 1.2. Опште особине флуорохинолона, флуорохинолони као лиганди

### 1.2.1. Опште о хинолонима

Историја хинолона почела је 1962. године када је идентификована налидиксинска киселина (као споредни производ у синтези хлороквина). Велики напредак је учињен увођењем атома флуора (F) у основно језгро. Почетком 1980-тих година синтетисан је норфлоксацин, хинолон са атомом флуора на положају C-6 и пиперзинским супституентом на положају C-7, који је имао значајно побољшану антибактеријску активност у односу на до тада синтетисане хинолоне.<sup>20</sup>

Иако читава група ових антибиотика носи назив 4-хинолони, структурно нису сви припадници ове групе деривати хинолона. Наиме, овој групи припадају и деривати нафтиридина, пиридопиримидина и цинолина, који садрже додатне атоме азота у једном или другом спојеном прстену. Заједничко за сва ова једињења је да имају 4-оксо-1,4-дихидрохинолонско језгро (Слика 1a). Краћи израз 4-хинолони је предложен као генеричко име за све антибактеријске агенске ове групе једињења. Оваква номенклатура даје тачан опис веза у пиридинском прстену. Тако су деривати нафтиридина означени као 8-аза-4-хинолини (Слика 1b), једињења са пиридопиримидинским прстеном 6,8-диаза-4-хинолини (Слика 1c), а једињења са цинолинским системом 2-аза-4-хинолини (Слика 1d).<sup>16</sup>



**Слика 1.** Основне структуре језгара хинолона (a-4-оксо-1,4-дихидрохинолонско језгро; b-8-аза-4-хинолини; c-6,8-диаза-4-хинолини; d-2-аза-4-хинолини;)

Хемијске модификације основне структуре одвијале су се у два главна правца. Први начин је базиран на модификацијама 6-флуоро, 7-пиперазинил хинолона и обухвата супституцију угљеника на положају 8 атомом азота и друге модификације бочног ланца, што је довело до настајања друге генерације флуорохинолона (нпр. 1-циклопропил и 1,8-цикло једињења). Даље супституције на 6-флуоро-7-пиперазинил молекулима, довеле су до даљег развоја флуорохинолона друге генерације са побољшаном активношћу и фармакокинетичким особинама. Даља 7-азабицикло модификација довела је до синтезе моксифлоксацина, флуорохинолона четврте генерације, са значајно побољшаном антибактеријском активношћу. Моксифлоксацин и гатифлоксацин имају и додатни 8-метокси бочни ланац.<sup>17</sup>

Код другог начина модификације задржано је нафтиридинско језгро. Овим начином модификације настали су еноксацин и тозуфлоксацин (флуорохинолони друге генерације). Даљим увођењем 7-азабицикло модификације, настали су флуорохинолони

треће генерације (тровафлоксацин), који су имали проширен антибактеријски спектар дејства.

Хинолони припадају групи синтетичких антибиотика широког спектра дејства, који се примењују као фармацеутски препарати у свакодневној клиничкој пракси. Хинолони се према антибактеријском спектру дејства сврставају у различите генерације (Табела 1).

**Табела 1. Најзначајнији представници хинолона различитих генерација**<sup>12,18</sup>

Генерација	Представници	Комерцијални препарат	Индикације
<b>ПРВА</b> генерација	Циноксацин	Cinoxacin®	<i>Неkomplиковане инфекције уринарног тракта</i>
	Флумекин	Flubactin®	
	Налидиксинска киселина	NegGam®, Wintomylon®	
	Оксолонска киселина	-	
	Пиромидинска киселина	-	
	Пипемидинска киселина	Dolcol®	
<b>ДРУГА</b> генерација	Ципрофлоксацин	Ciprobay®, Cipro®,	<i>Компликоване инфекције уринарног тракта, простатитис, полно-преносиве болести</i>
	Еноксацин	Ciproxin®	
	Флероксацин	Enroxil®, Penetrex®	
	Ломефлоксацин	Megalone®	
	Надифлоксацин	Maxaquin®	
	Норфлоксацин	Lexinor®, Noroxin®, Quinabic®, Janacin®	
	Офлоксацин	Floxin®, Oxaldin®, Tarivid®	
Пефлоксацин	-		
	Руфлоксацин	Uroflox®	
<b>ТРЕЋА</b> генерација	Балофлоксацин	-	<i>Пнеумонија у болничким условима</i>
	Грепафлоксацин	Raxar®	
	Левифлоксацин	Cravit®, Levaquin®	
	Пазуфлоксацин мезилат	-	
	Спарфлоксацин	Zagam®	
	Темафлоксацин	Omniflox®	
	Тозуфлоксацин	-	
<b>ЧЕТВРТА</b> генерација	Клинафлоксацин	-	<i>Интра- абдоминалне инфекције</i>
	Гемифлоксацин	Factive®	
	Моксифлоксацин	Avelox®	
	Гатифлоксацин	Tequin®, Zymar®	
	Ситафлоксацин	-	
	Тровафлоксацин	Trovan®	
<b>У РАЗВОЈУ</b>	Ецинофлоксацин	-	-
	Прулифлоксацин	-	

**Прва генерација хинолона** најчешће је коришћена за третман инфекција уринарног тракта.

**Друга генерација хинолона** поседује повећану активност против Грам-негативних патогена (*pneumokoka*) а лимитиран потенцијал против Грам-позитивних патогена (*stafilokoka*). Користе се у индикованим инфекцијама уринарног тракта, гонореје, инфекција изазваних хламидијом, инфекција простате, инфекција коже и меког ткива, колере и салмонеле, легионарске болести...

**Трећа генерација хинолона** поседује балансирани широки спектар активности и повећани потенцијал против пнеумокока. Делују против гираза и топоизомераза IV, а употребљавају се за индиковане инфекције респираторног тракта. Фармакокинетички профил (полуживот) омогућава једнодневно дозирање.

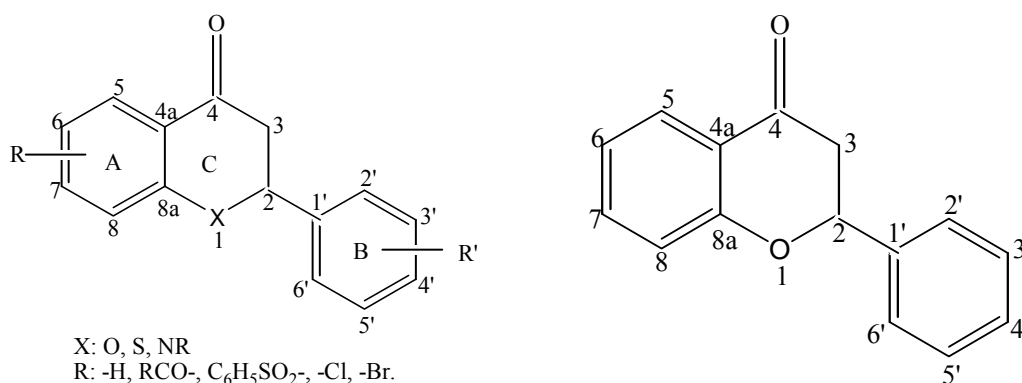
**Четврта генерација хинолона** поседује повећану активност против Грам-позитивних патогена, а повољна фармакокинетика омогућава једнодневно дозирање и потпуно елиминисање хепато-билиарном екскрецијом. Употребљавају се за индиковане инфекције респираторног тракта.<sup>19</sup>

**Генерација хинолона у развоју**, поседује изразито повећану активност против Грам-позитивних бактерија, уздржану активност против ципрофлоксацин резистентних пнеумокока, високу активност против атипичних патогена узročника инфекција респираторног тракта и уздржану активност наспрам Грам-негативних патогена. 30% се ренално елиминишу.

Скоро сви клинички коришћени хинолони, садрже атом флуора у С-6 положају хинолона, нафтиридина или бензоксазинског прстена. Због присуства атома флуора у молекулу, ови антибактеријски агенси се описују као флуорирани хинолони или флуорохинолони. Појава треће генерације хинолона антибактеријских флуорохинолона заснованих на налидиксинској киселини у раним осамдесетим, дала је нови импулс и правац синтетисању ефикаснијих представника са знатно ширим спектром дејства. Од тада, као резултат ових напора десетине представника у овој класи је синтетизовано и уведено у терапијске сврхе у ветеринарској и хуманој медицинској пракси за велики број клиничких индикација. Фармацеутска истраживања флуорохинолона су условила проширење њихове примене, од првобитне примене у третирању индигованих уринарних инфекција до примене у третману системских инфекција.

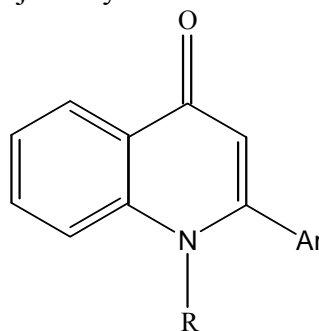
### 1.2.2. Структура и номенклатура хинолона

Хинолони су аналози флавона и тиофлавона који се карактеришу кондензованим бензеновим (А) и хетероцикличним (С) прстеном. Код природних хинолона у положају 2 хетероцикличног прстена (С), налази се фенил група. Флаволи у положају 1 имају везани кисеоник (X=O), тиофлаволи везани сумпор (X=S), а хинолони имају везану аминок групу (X=NR; R=H, ацетил и сулфонил).



**Слика 2.** Општа структура хинолона (лево) и флавона (десно)

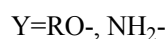
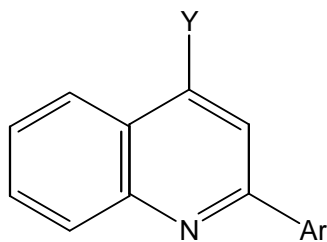
Хинолони и флаволи су широко распрострањени у биљкама а могу се различитим методама и лабораторијски синтетизовати. Међутим, тиофлаволи се могу синтетизовати само у лабораторијским условима.



R: H, R-, CH<sub>3</sub>O-, PhSO<sub>2</sub>-

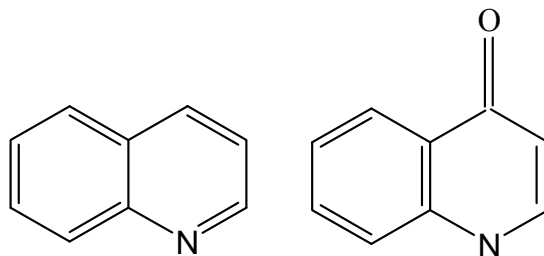
**Слика 3.** Прстен С-Хинолин-4(1H)-он

Хетероциклични С прстен хинолона (Слика 2), садржи неколико реактивних места (1, 3 и 4) и дозвољава различите степене незасићења у прстену (Слика 3 и Слика 4).



**Слика 4.** Прстен С-потпуно ароматични дериват хинолина

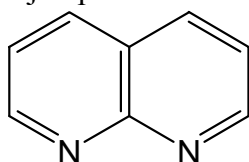
Прстен А хинолона (Слика 2) ( $R=Cl, Br$ ) може такође бити модификован нуклеофилном супституцијом у положајима 6- и 8-. Хемијска структура хинолона друге, треће и четврте генерације изводи се углавном из основног прстена хинолина и хинолона:



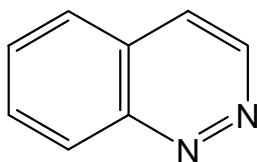
Хинол**И**Н

Хинол**О**Н

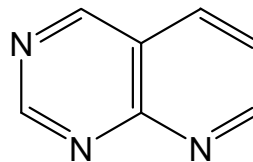
Хинолони прве генерације садрже и нафтиридинско, цинолинско и пиридо-пиримидинско језгро.



Нафтиридин



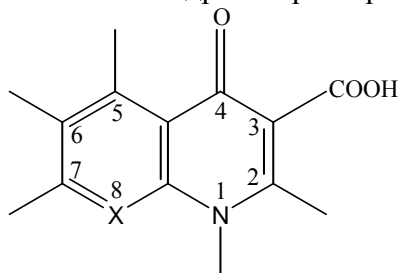
Цинолин



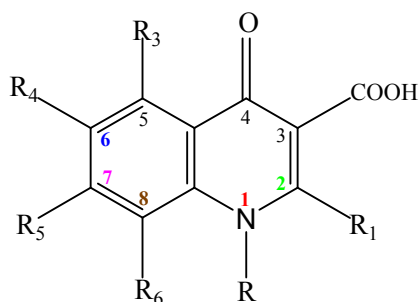
Пиридо-пиримидин

Ова језгра више се не користе код хинолона новијих генерација осим нафтиридинског језгра који се јавља код тозуфлоксацина (трећа генерација), гемифлоксацина и тровафлоксацина (четврта генерација).

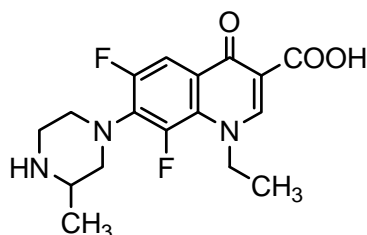
У свом молекулу сви 4-хинолони садрже карактеристичну групу:



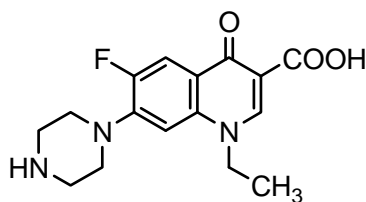
па се дакле могу сматрати дериватима 1-супституисане 1,4-дихидро-4-оксо-пиридин-3-карбонске киселине. Увођењем различитих супституената у основно хинолонско језгро добијају се различите хинолонске структуре па је за описивање положаја супституената хинолона новијих генерација ради усаглашавања извршено обележавање на основу следећег:



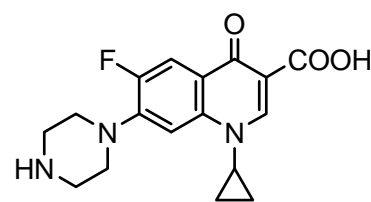
Увођењем супституената у положаје 1-,2-,6-,7- и 8- настају различите структуре хинолона:



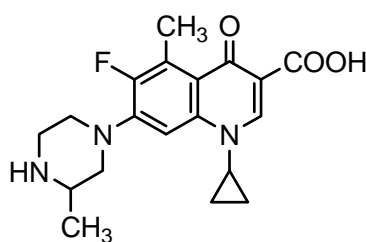
Lomefloxacin



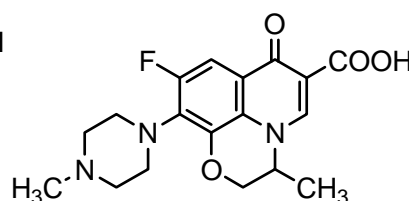
Norfloxacin



Ciprofloxacin

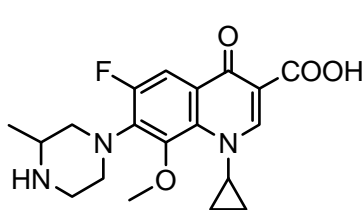


Grepafloxacin

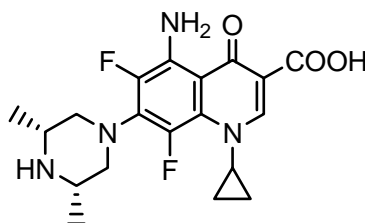


Ofloxacin

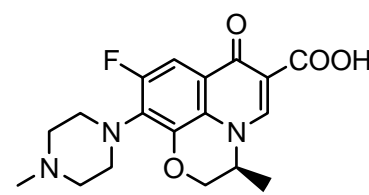
Слика 5. Хемијска структура неких хинолона друге генерације



Gatifloxacin

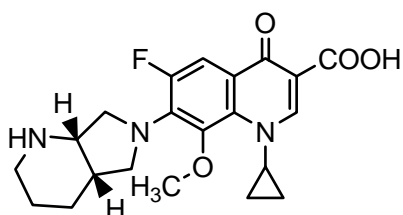


Sparfloxacin

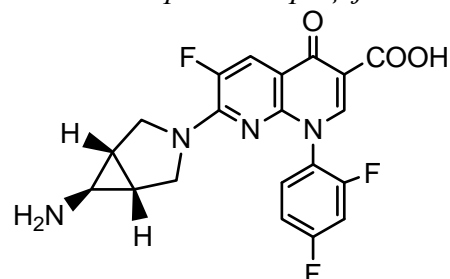


Levofloxacin

Слика 6. Хемијска структура неких хинолона треће генерације



Moksifloxacin

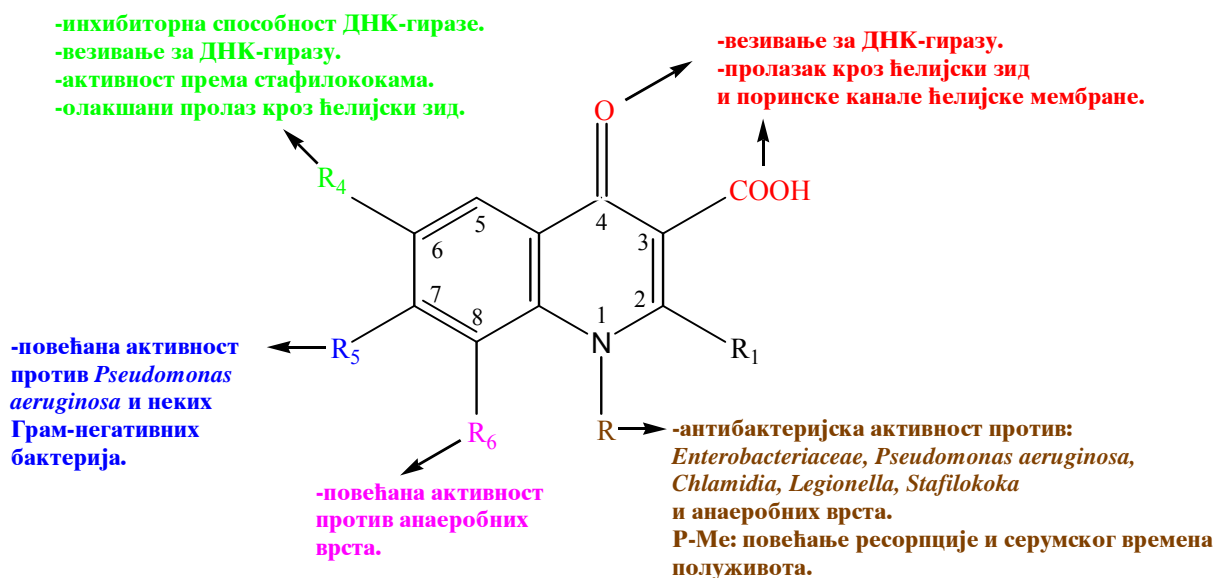


Trovafloxacin

Слика 7. Хемијска структура неких хинолона четврте генерације

### 1.2.2.1. Утицај хемијске структуре на дејство хинолона

Корелација фармаколошког дејства хинолона са природом супституената у различитим положајима (1-,3-,4-,6-,7- и 8-) може се приказати уопштено на шеми 1.



Ако су положаји 1 и 8 спојени оксазинским прстеном повећава се активност против грам-позитивних и анаеробних врста.

Шема 1. Утицај структуре на дејство хинолона<sup>21</sup>

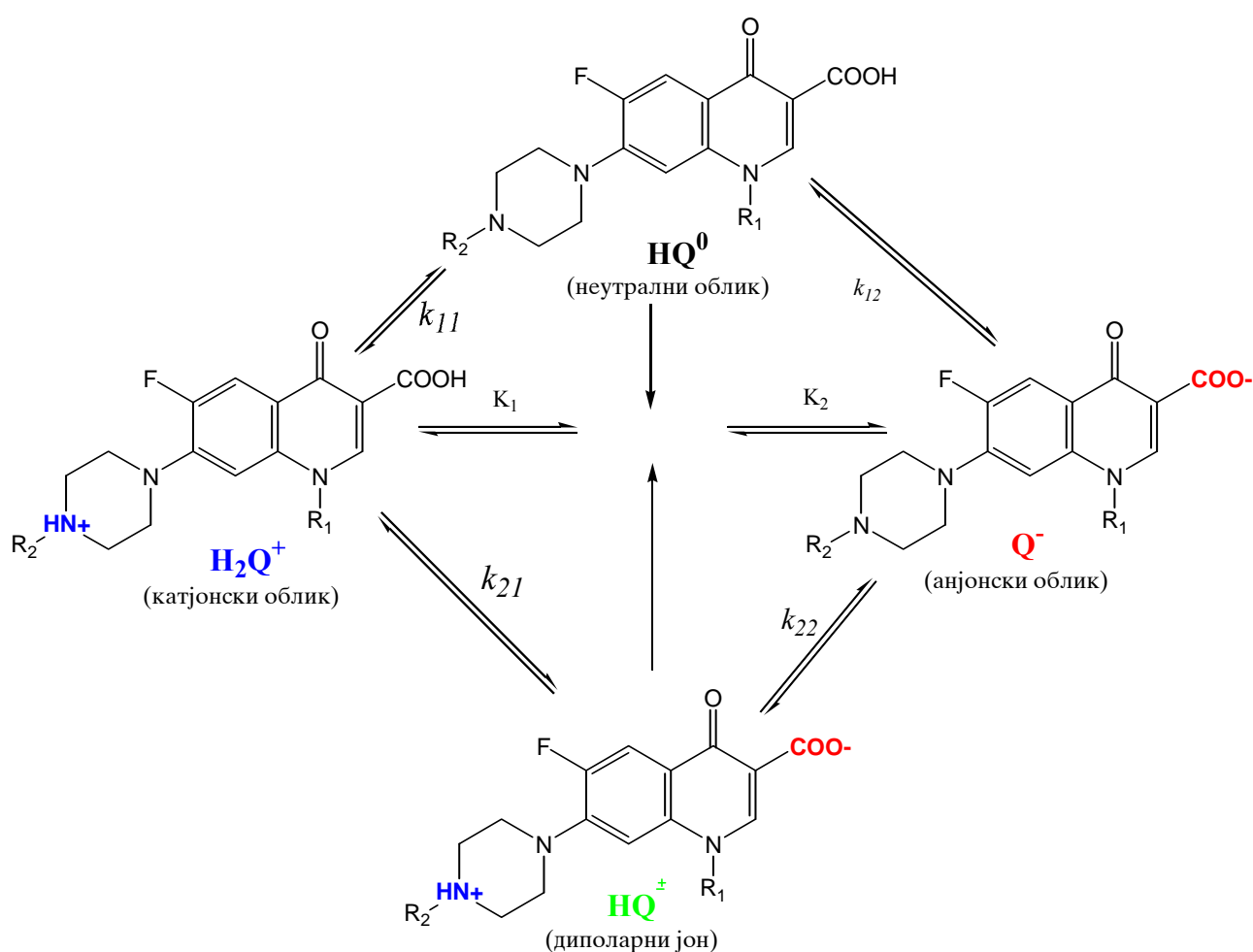
Познавање структуре хинолона је од велике важности за разумевање поступака и процеса синтезе хинолона, као и начина њиховог дејства и биолошке активности. Структурно зависна активност флуорохинолона је предмет интензивног проучавања. Најважније структурне особине неопходне и значајне за антибактеријску активност нових хинолона, укључују карбоксилну групу у положају 3- хинолона-нуклеуса и алкил или арил групу у положају 1-. Поред тога, заједничко присуство два типа супституената, атом флуора у положају 6- и хетероцикличног азота у положају 7- је важно за биолошку активност. Хетероциклични азот се најчешће налази у пиперазинском или пиролидинском супституенту. Ако су ови супституенти заједно присутни, то одређује обим бактеријског спектра и ефикасност бактерицидне активности. Атом флуора у положају 6- обезбеђује значајно повећање антибактеријске активности за многе хинолоне, вероватно повећањем целуларне пенетрације и инхибиције активности ензима. Модификација положаја С-7 у молекулу хинолона је интензивно изучавана. Студије су показале да промене супституента у положају -7, имају велики утицај на потенцијал, спектар активности, растворљивост и фармакокинектику хинолона. Супституисани или несупституисани хетероцикли у положајима 5- и 6- као што су пиролидинил, пиролил, тиоморфонил, морфонил и пиперазинил у положају С-7, дају хинолоне са добром антибактеријском активношћу.

### 1.2.3. Киселинско-базне особине хинолона

Тело човека је састављано од око 70–75% воде. Како је просечна молекулска маса лека 400 g/mol, доза од 400 mg даје концентрацију од  $2 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Када разматрамо понашање оваквог раствора у организму, сусрећемо се са разблаженим раствором. За разблажене растворе *Brönsted-Lowry*-јева киселинско-базна теорија је најприкладнија за

објашњење и предвиђање киселинско-базних особина. Ово је важно пошто киселинско-базне особине лека директно утичу на апсорпцију, екскрецију и компатибилност са другим лековима. Према *Brönsted-Lowry*-јевој теорији киселина је било која супстанца која може да отпусти протон ( $H^+$ ), а база је било која супстанца која може да прими протон. Када киселина преда протон бази она прелази у своју коњуговану базу, слично када база прими протон она прелази у своју коњуговану киселину. Молекули могу садржавати више функционалних група, па тако могу на пример поседовати и киселе и базне особине. То су амфотерни молекули. Хинолони II, III и IV генерације су слабе органске хетероцикличне оксо киселине. Као протон акцептор појављује се секундарна амино група из пиперазинског, пиролидинског, пиперидинског прстена који може да прими протон и пређе у амонијум групу. Протон донор је карбоксилна група везана за хинолонско језгро.

Ако анјонски облик хинолона означимо са  $Q^-$ , диполни јон са  $HQ^\pm$ , а катјонски са  $H_2Q^+$ , онда се равнотеже у воденом раствору хинолона могу представити следећим хемијским једначинама и одговарајућим изразима за константе равнотеже:



Шема 2. Равнотеже у раствору флуорохинолона

где су  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$  микроконстанте, а  $K_1$  и  $K_2$  макроконстанте дисоцијације флуорованих хинолона. Код свих хинолона киселе особине амонијум групе мање су изражене него киселе особине карбоксилне групе. То је последица стабилизације  $-COO^-$  групе  $+R$  ефектом хинолонског језгра као и успостављања водоничне везе између карбоксилног водоника и суседног карбонилног кисеоника у положају 4.

Табела 2.  $pK$  вредности неких хинолона

Хинолон	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_1$	$pK_a$ спек.	$pK_{22}$	$pK_{11}$	$pK_{21}$	$pK_{12}$	$pI$
4-оксо-хинолон	2.23	11.28							
Ципрофлоксацин	6.11	8.50			6.19	7.04	8.72	6.19	7.3
Норфлоксацин	0.74	8.26	7.39	7.26	7.2	6.3	7.6	8.5	7.36
Офлоксацин	0.90	7.88	7.19	7.18					7.12
Нал. киселина	0.95	6.36	6.41	6.33					
Еноксацин	0.71	6.71	7.47	7.53					
Флумекин	6.50		6.50	6.51					
Оксалинска кис.	6.61		6.61	6.72					
Флероксацин	5.5	8.0							6.75
Пефлоксацин	6.32	7.47			6.7	6.1	7.1	7.7	6.89
Оламуфлоксацин	6.71	9.45			8.10	6.73	8.06	9.43	8.08
Грепафлоксацин	7.12	8.78			8.27	7.15	7.64	8.75	7.95
Амифлоксацин	5.42	7.57			5.8	5.7	7.2	7.3	6.50
Ломефлоксацин	5.49	8.78			6.0	5.7	8.3	8.6	7.14
Моксифлоксацин	6.25	9.29			7.46	6.29	8.08	9.25	7.77

#### 1.2.4. Растворљивост

Растворљивост молекула хинолона у телесним течностима утиче на њихову биорасположивост као и на њихову апсорпцију, дистрибуцију и елиминацију. Код растварања у води треба имати у виду формирање водоничне везе између присутних функционалних група и воде, као и могућност јонизације функционалних група. Свака функционална група способна да образује водоничну везу, доприноси повећању растворљивости молекула у води. Функционалне групе које повећавају растворљивост називају се хидрофилним, а оне које смањују растворљивост су хидрофобне. Хинолони се врло слабо растварају у води. Лако се растварају у киселинама и базама. Раствори у базама су стабилни до  $pH=12$ , при вишим  $pH$  вредностима долази до хидролизе и разлагања молекула хинолона. Већина хинолона раствара се у хлороформу и метиленхлориду. Растворљивост у етанолу, метанолу, ацетону и етру је мала.

Растворљивост молекула лекова у води уопште, умногоме утиче на начин њихове употребе, апсорпције, дистрибуције и елиминације. Постоје два кључна концепта приликом разматрања растворљивости молекула у води (или мастима). Један је везивање водоника који утиче на формирање потенцијала функционалних група које су присутне у молекулима и јонизација функционалних група.

Свака функционална група способна да буде донор или акцептор везе са водоником ће допринети укупној растворљивости једињења. Такве функционалне групе ће повећати хидрофилну природу молекула. Обрнуто, функционалне групе које не формирају водоничну везу неће повећати хидрофилност, већ ће утицати на хидрофобност молекула. Водонична веза представља специјални случај везе дипол-дипол. Генерално је правило да што више водоничних веза постоји, већа је растворљивост молекула у води. Свака функционална група молекула поседује одговарајући број потенцијалних места водоничне везе ( $R-OH=3$ ,  $R-NH_2=3$ ,  $R-NH-R'=2$ ,  $R-NR'R''=1\dots$ ). Међутим, то не узима у обзир могућност интрамолекуларних водоничних веза које се могу формирати и које смањују растворљивост у води (повећавајући растворљивост у мастима).

Важну улогу у одређивању растворљивости у води имају јон-дипол везе. Овај тип везе настаје са органским солима. Соли настале од јаких киселина и база добро дисосују, а соли настале од слабих база и киселина слабо дисосују, па су самим тим и



слабо растворљиве. То најбоље и објашњава слабу растворљивост хинолона у води. Међутим, приликом сагледавања утицаја јонизованих молекула на растворљивост у води морају се у обзир узети и интрамолекулска јонска везивања.

Лемке (*Lemke*) је развио емпиријски приступ предвиђања растворљивости једињења у води на основу солубилизационог потенцијала угљеника неколико органских функционалних група. Ако солубилизациони потенцијал функционалних група превазилази укупан број присутних атома угљеника, молекула се сматра растворним у води. У супротном, нерастворан је. Функционалне групе које интерагују било кроз интрамолекуларна водонична везивања или интеракције типа јон-јон ће смањити солубилизациони потенцијал сваке групе. Тешко је квантитативно одредити колико ће се таквих интеракција десити кроз растворљивост у води, али препознавање ових интеракција ће омогућити објашњење аномалија.

У табели 3 је приказан солубилизациони потенцијал воде за неколико функционалних група заједничких за више лекова. Обзиром да већина молекула лекова садржи више од једне функционалне групе, Лемке (*Lemke*) је предвидео и солубилизациони потенцијал воде и за полифункционалне молекуле.

**Табела 3.** Солубилизациони потенцијал воде за органске функционалне групе присутне у моно-и полифункционалним молекулама<sup>22</sup>

Функционална група	Монофункционални молекул	Полифункционални молекул
Алкохол	5-6 угљеника	3-4 угљеника
Фенол	6-7 угљеника	3-4 угљеника
Етар	4-5 угљеника	2 угљеника
Алдехид	4-5 угљеника	2 угљеника
Кетон	5-6 угљеника	2 угљеника
Амин	6-7 угљеника	3 угљеника
Карбоксилна киселина	5-6 угљеника	3 угљеника
Естер	6 угљеника	3 угљеника
Амид	6 угљеника	2-3 угљеника
Уреа, карбонат, карбамат		2 угљеника

Према овом методу, ради предвиђања растворљивости у води потребно је утврдити колико укупно функционалних група доприноси растворљивости у води и узети у обзир да свако наелектрисање на молекулу доприноси солубилизационом потенцијалу од 20-30 угљеника. На бази ових информација и прорачуна утврђује се проценат (не)растворљивости молекула у води.

Осим емпиријског, постоји и аналитички приступ предвиђања растворљивости једињења у води који се заснива на израчунавању логаритма партиционог коефицијента ( $\log P$ ) молекула. Овај приступ је развијен на основу методе апроксимације који су развили Катес (*Cates*) и Лемке (*Lemke*), а заснива се на поставци да је у молекулу једињења присутна сума хидрофилних и хидрофобних особина сваке функционалне групе. Партициони коефицијент  $P$ , представља однос концентрација лека (хинолона) у октанолу и води. Октанол је узет ради сличности амфифилне природе липида пошто има поларну групу (примарни алкохол) и дугачак -СН- ланац или „реп“, као што масне киселине чине део липидне мембране. Пошто је  $P$  логаритамски завистан од слободне енергије, уопштено се изражава као  $\log P$ , и представља збир хидрофобних и хидрофилних карактеристика органских молекулских група које чине структуру молекула. Због тога је  $\log P$  мера солубилизационих карактеристика целокупног молекула. Због тога што свака органска функционална група унутар молекула доприноси укупној хидрофобној (и)или хидрофилној природи молекула,

хидрофобна/хидрофилна вредност (хидрофобна константа  $\pi$ ) може се придодати свакој функционалној групи. Ову релацију дефинише математички једначина:

$$\log P = \sum \pi(\text{fragmenti}). \quad (67)$$

Приликом израчунавања  $\log P$  из хидрофобних субституентних константи, збир се обично односи на  $\log P_{calc}$  или  $C \log P$ , ради разликовања од експериментално одређених вредности ( $\log P_{meas}$  или  $M \log P$ ). Радовима Лемкеа (*Lemke*) и Катеса (*Cates*), формирана је табела  $\pi$  вредности (табела 4).

**Табела 4.** Хидрофилно-липофилне  $\pi$  вредности органских фрагмената<sup>22</sup>

Фрагменти	$\pi$ вредност
C (алифатични)	+0.5
Фенил	+2.0
Cl	+0.5
O <sub>2</sub> NO	+0.2
IMNB	+0.65
S	0.0
O=C-O (карбоксил)	-0.7
O=C-N (амид, имид)	-0.7
O (хидроксил, фенол, етер)	-1.0
N (амин)	-1.0
O <sub>2</sub> N (алифатични)	-0.85
O <sub>2</sub> N (ароматични)	-0.28

Коришћењем вредности из табеле, могуће је извршити процену растворљивости многих органских једињења у води. Подаци добијени компјутерским прорачунима и прорачунима на основу података из табеле 4 поседују генерална слагања у погледу (не)растворљивости у води. Предвиђање растворљивости у води представља пут разумевања понашања молекула у раствору, посебно када се бавимо разликама између молекула и њиховом фармакокинетиком. Јонизационо стање молекула не утиче само на растворљивост у води, већ и на способност проласка кроз мембране и способност апсорпције. Везивање за серум протеине и количина слободног лека за везивање за рацепторе је умногоме зависна од јонизационог стања и хидрофилно/хидрофобне природе молекула.<sup>22</sup>

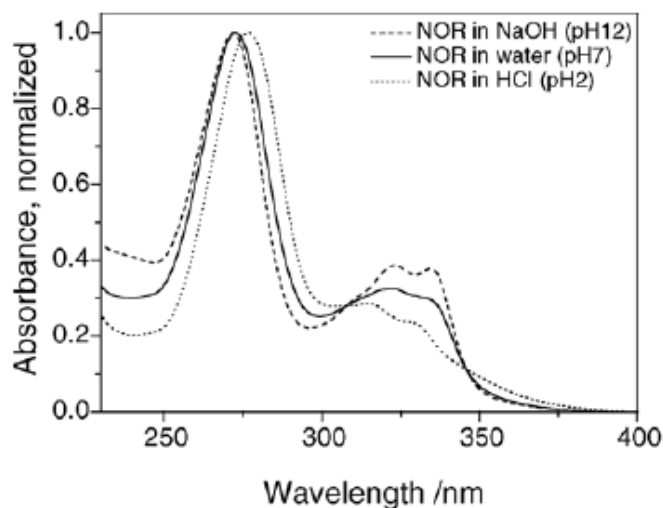
## 1.2.5. Спектроскопске особине хинолона

### 1.2.5.1. UV-VIS спектри

Ултраљубичаста и видљива (UV-VIS) спектроскопија обухвата проучавање апсорпције електромагнетног зрачења у области од 200-800 nm. У поређењу са другим методама (IR, NMR и MS) UV/VIS спектроскопија нема велику примену за структурна одређивања, јер мали број органских једињења апсорбује у овој области таласних дужина. Веома је корисна метода за идентификацију делова молекула који апсорбују у овој области, такозваних хромофора. У ултраљубичастој области (од 200–400 nm) већина 4-хинолона, даје две траке. На нижим таласним дужинама налази се симетрична трака јаког интензитета, док се на вишим таласним дужинама налази асиметрична трака знатно мањег интензитета. Ова трака је сложена и има два блиска максимума. Положај максимума обе траке зависи од рН вредности раствора. Приликом повећања рН,

максимум траке на вишим енергијама помера се батохромно и при томе му интензитет расте. Максимуми нискоенергетске траке, при повећању рН, померају се хипсохромно, а интензитет им опада. На спектрима свих хинолона карактеристична је појава изобестичке тачке. Изобестичка тачка код хинолона друге генерације лежи у области таласних дужина од 290–310 nm.

Високоенергетска трака потиче од апсорпције делокализованог  $\pi$ -електронског система хинолонског језгра, док нискоенергетска трака, потиче од апсорпције пиперазинског супституента и  $\pi$ -електрона карбонила и пиридинског прстена. Према томе оба система трака могу се приписати  $\pi \rightarrow \pi^*$  и  $n \rightarrow \pi^*$  прелазима унутар хинолонског молекула.



Слика 8. UV/VIS спектар норфлоксацина на различитим рН вредностима<sup>23</sup>

Табела 5. Апсорпциони UV максимуми ( $\lambda_{max}$ ) и изобестичке тачке ( $\lambda_{iso}$ ) водених раствора хинолона

Хинолон	$\lambda_{max}$ (nm)		$\lambda_{iso}$ (nm)	
Налидиксинска киселина	258	332	328	-
Флумекин	248	330	327	-
Оксолинска киселина	260	337	286	-
Офлоксацин	287	332	330	356
Норфлоксацин	272	323	317	345
Еноксацин	263	335	295	355

### 1.2.5.2. IR спектри

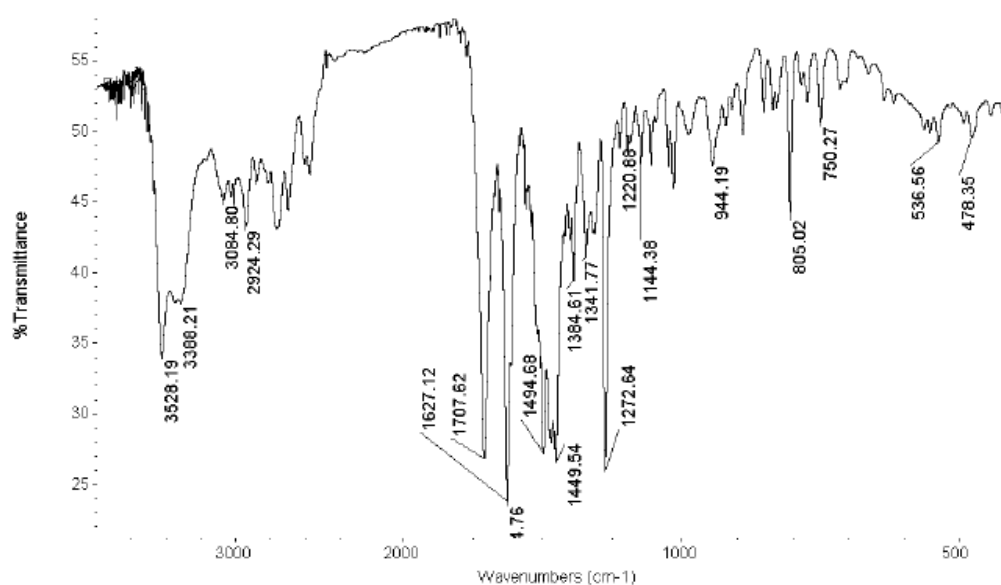
У IR спектру флуорованих хинолона учева се веома јака трака у области од 1730 – 1705  $\text{cm}^{-1}$  која одговара истежајућим вибрацијама карбонилне групе ( $\nu_{C=O}$  у  $-\text{COOH}$  групи). Повећање таласног броја ове вибрације може се повезати са образовањем димерне структуре и/или учествовањем карбоксилне групе у сложеним коњугованим системима. Друга веома јака трака која се налази у области од 1644–1618  $\text{cm}^{-1}$  одговара истежајућим вибрацијама карбонилне групе ( $\nu_{C=O}$ ) у положају 4.

Средња или јака трака у IR спектру флуорованих хинолона на 810–800  $\text{cm}^{-1}$  одговара савијајућим вибрацијама ( $\delta_{C-H}$ ) карактеристичним за алкене опште формуле  $R_1R_2=CHR_3$ .

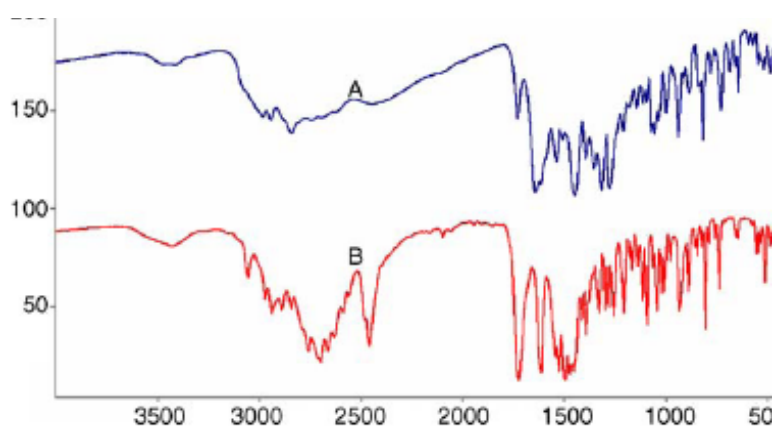
На присуство атома водоника везаних за двоструку везу у ароматичном језгру указује група трака слабог интензитета ( $\nu_{C-H}$ ) у области од 3100–3000  $\text{cm}^{-1}$ .

Група средњих и јаких трака на  $2805\text{--}2690\text{ cm}^{-1}$  одговара  $\nu_{\text{C-H}}$  истезајућим вибрацијама метил групе у близини терцијарног алифатичног атома азота у пиперазинској групи.

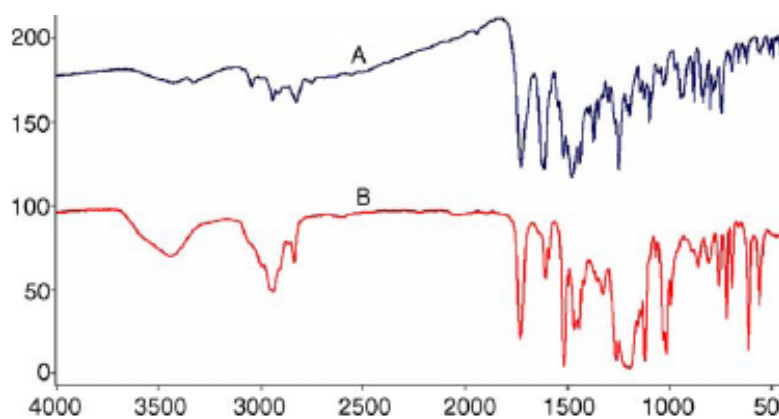
Трака  $\nu_{\text{C-F}}$  ароматичног језгра јавља се у области од  $1270\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ . Ове траке су јаког или средњег интензитета, и обично се не могу уочити јер се преклапају са вибрацијама  $\nu_{\text{C=C}}$  трака.



Слика 9. IR спектар ципрофлоксацина<sup>24</sup>



Слика 10. IR спектар (A) офлоксацина и (B) левофлоксацина<sup>25</sup>



Слика 11. IR спектар (A) норфлоксацина и (B) ципрофлоксацина<sup>25</sup>

Табела 6. Траке флуорованих хинолона у IR спектру<sup>25</sup>

FQ						Асигнација
nor	cipro	lome	gati	oflo	levo	
3328 всл	3442 сл	3428 сл	3423 всл	3426 всл	3465 сл	O-H истезање
3046 сл		3056 сл	3083 с	3041 сл	3039 сл	
		2967 с	2983 всл	2971 сл		C-H истезање у CH <sub>3</sub> и CH <sub>2</sub> групи
2942 сл	2938 с	2936 с	2943 сл	2930 сл		
	2838 сл	2888 с	2840 сл	2864 сл		
		2843 с		2788 с		
2759 j	2701 j	2664 j	2633 j	2588 с	2458 j	N-H асиметрично истезање
1729 j	1731 j	1725 j	1729 с	1715 j	1711 j	C=O истезање
1621	1610 сл	1618 j	1642 j	1620 вj	1620 вj	C=C и C=N истезање
	1592 сл	1548 j	1541 с	1549 j	1547 j	
1521 с	1518 j	1527 j		1523 j	1527 j	
		1497 j				CH <sub>2</sub> деформације
1478 вj	1468 с	1470 j		1468 вj	1471 вj	
1444 с	1444 с	1413 с	1447 вj	1401 с	1401 с	CH <sub>2</sub> савијање
1374 с		1389 с	1393 с	1375 с		
1345 сл		1332 с	1352 с	1352 с		
1300 сл	1328 сл	1296 с	1317 j	1289 с	1292 с	Мешовите вибрације
		1282 с				
1251 j	1264 j	1258 с	1276 j	1242 с	1246 с	C-H савијање у равни
1203 сл	1194 j	1171 сл	1213 сл	1199 с	1200 сл	C-H савијање + C-H увијање и C-O истезање
	1120 j	1115 с	1145 всл	1141 j	1158 сл	
1098 сл	1067 сл	1094 с			1095 сл	Бензенски прстен + пиридински прстен
1031 всл	1033 j	1044 с	1061 сл	1053 j	1051 j	
	1018 j	1014 сл		1006 с		
	997 с	977 сл	998 сл	975 с	977 с	C-H савијање
941 сл		929 с	939 с	955 с	955 с	
887 сл		890 сл	888 сл	878 сл	876 сл	
841 сл	864 с	850 всл	823 с			
808 сл	811 сл	810 с		801 с	801 с	C-N истезање + C-H савијање
749 с	761 с	739 с	732 сл	742 сл	739 сл	
	727 с			707 сл	705 сл	
	697 с	650 сл	651 сл	665 сл	655 сл	C-F истезање
	612 j					
	561 с	513 с	512 сл			Деформације прстена
				412 с	411 с	Кривљење C-H у прстену пиридина

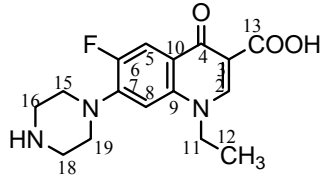
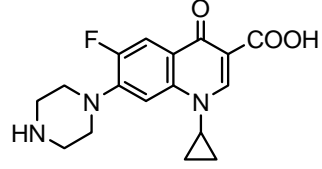
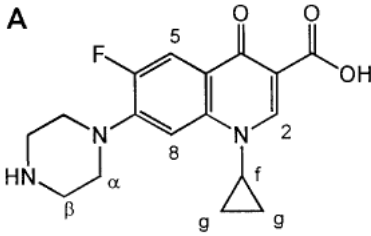
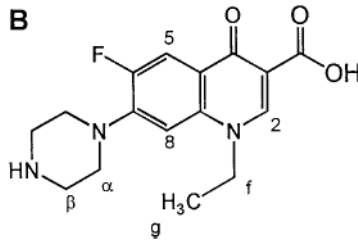
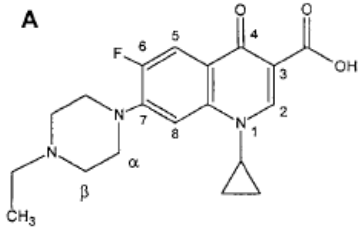
всл – веома слаба, сл – слаба, с – средња, j – јака, вj – веома јака

Ширење трака на 3500 и 1620 cm<sup>-1</sup> указује на присуство водоничне везе. С обзиром да ширење није велико, може се сматрати да водонична веза карбонилни кисеоник-карбоксилни кисеоник, није јака.

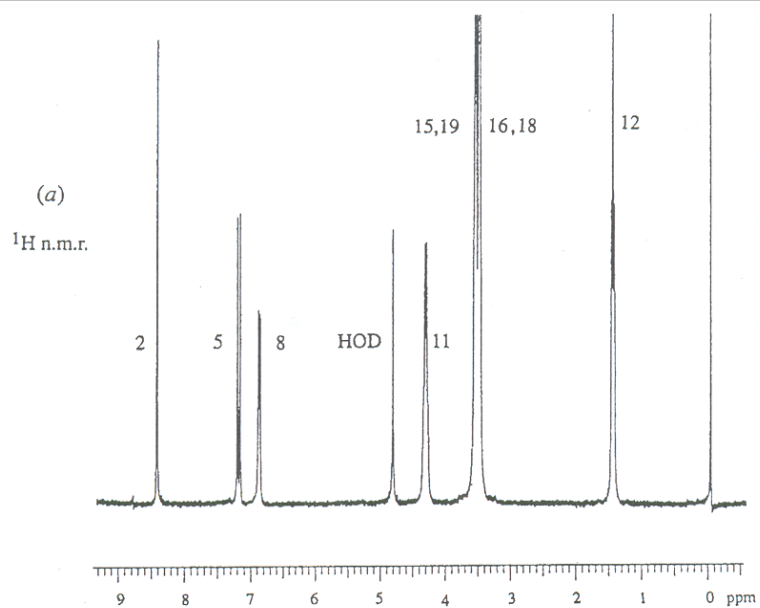
### 1.2.5.3. NMR спектри

<sup>1</sup>H NMR спектри флуорохинолона показују карактеристичне линије мултиплетне структуре, које припадају бензеноидном систему, карбоксилном водонику и присутним супституентима. Хемијско померање у <sup>1</sup>H NMR спектру на око 9 ppm потиче од протона –CH (C2) групе која се налази у пиридинском прстену, на око 8 ppm (два дублета) од хинолонског језгра, (C5) између 7 и 7.5 ppm су протони који припадају (C8) угљениковом атому, као и друга хемијска померања у зависности од присутних супституената.

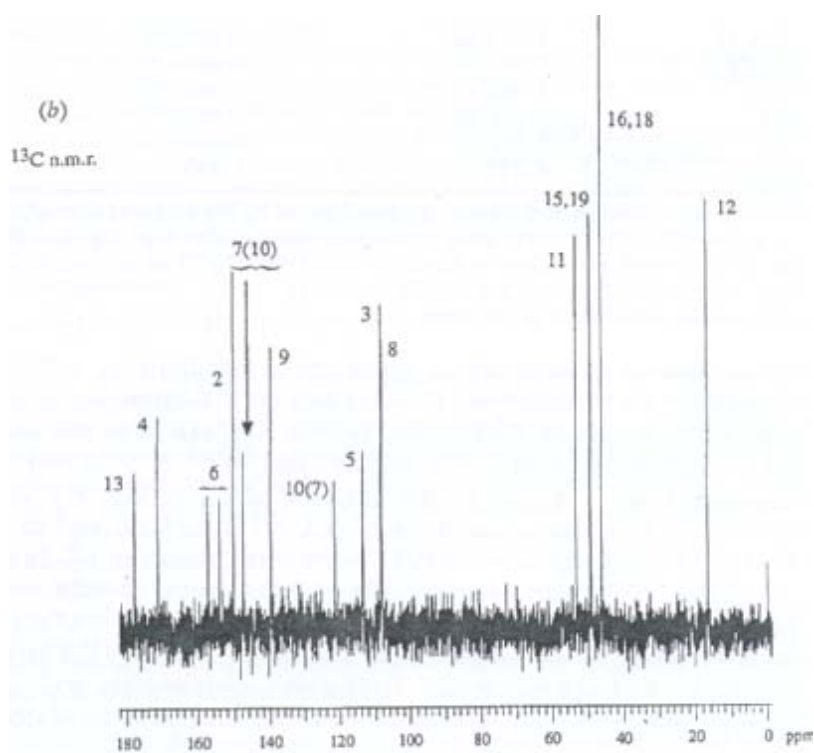
Табела 7.  $^1\text{H}$  NMR помераји флуорованих хинолона

FQ	H-2	H-5	H-8	супституент
 Nor	9.34 s	8.15 d	7.37 d	етил група ( $\text{CH}_3$ 1,65, $\text{CH}_2$ 4,85). пиперазинска група ( $\text{CH}_2$ (15.19) 3.86. $\text{CH}_2$ (16.18) 3.58)
 cipro	9.14 s	8.14 d	7.71d	циклопропил група ( $\text{CH}_2$ 1.26 – 1.52 m. CH 3.89 m). пиперазинска група (H-3' 3.53 m. H-2' 3.75 m)
 A cipro	8.89	8.05	7.34	циклопропил група ( $\text{CH}_2$ 1.27 – 1.47. CH 3.65). пиперазинска група (H- $\alpha$ 3.79. H- $\beta$ 3.48) 3.65
 B nor	8.64	8.10	6.82	етил група ( $\text{CH}_3$ 1.34. $\text{CH}_2$ 4.27). пиперазинска група (H- $\alpha$ 3.84. H- $\beta$ 3.31)
 A engo	8.65 s	7.91 d	7.56 d	циклопропил група ( $\text{CH}_2$ 1.18 – 1.33 m. CH 3.83 m). етил група ( $\text{CH}_2$ 2.40 q. $\text{CH}_3$ 1.06 t). пиперазинска група (H- $\alpha$ 3.28 m. H- $\beta$ 2.57 m)

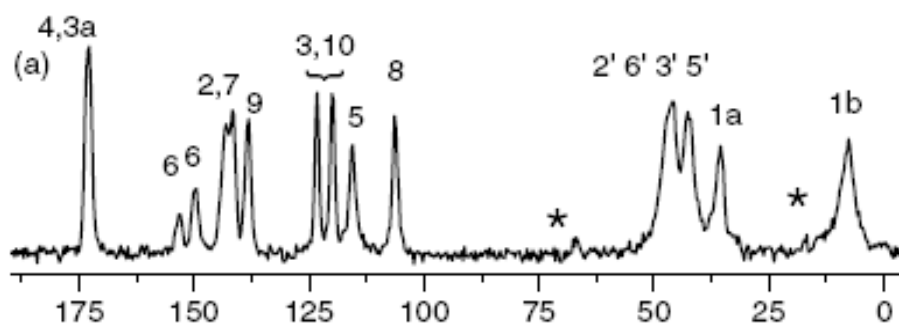
У  $^{13}\text{C}$  NMR спектру флуоро хинолона уочава се пет група хемијских помераја, две испод 60 ppm и три изнад 100 ppm. Хемијски помераји испод 60 ppm одговарају супституентима који су везани за језгро хинолона, док помераји изнад 100 ppm одговарају угљениковим атомима који чине само језгро. Често није могуће тачно одредити који помераји одговарају којим угљениковим атомима, јер долази до преклапања сигнала. Тако у области око 170 ppm долази до преклапања сигнала који потичу од угљеника из карбоксилне групе са сигналом угљеника из прстена за који је везан карбонилни кисеоник. Такође и на око 110 ppm долази до преклапања сигнала који потичу од C3, C5 и C8 угљеникових атома.



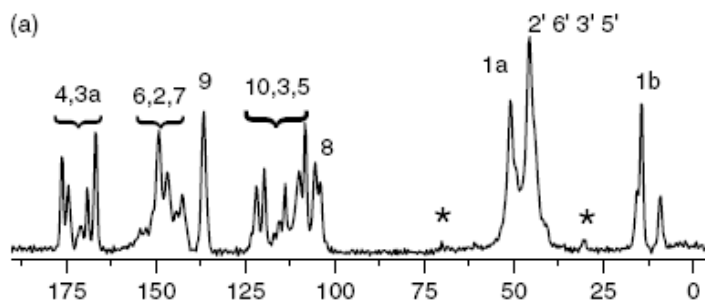
Слика 12.  $^1\text{H}$  NMR спектар норфлоксацина у  $\text{D}_2\text{O}$ <sup>26</sup>



Слика 13.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар норфлоксацина у  $\text{DMSO}$ <sup>27</sup>



Слика 14.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар ципрофлоксацина<sup>28</sup>

Слика 15.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар норфлоксацина<sup>28</sup>Табела 8.  $^{13}\text{C}$  NMR помераји флуорованих хинолона у DCI

FQ	C2	C3	C3a	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Супституент
 nor	150.1	109.0	177.8	171.7	113.4	154.0	147.5	108.2	139.7	121.5	етил група (CH <sub>3</sub> 16.58. CH <sub>2</sub> 53.09). пиперазинска група (CH <sub>2</sub> 46.15. 49.22)
 cipro	147.5	109.5	167.2	168	113.2 113	155.2 150.1	145.4 145.1	104.5	138.8	119	циклопропил група (1a. 6.7. 1b. 36.7). пиперазинска група (2'. 6'. 44.6. 3'5'. 41.6)
 nor	147.7	106	168.8	175.3	111.3 110.8	155.7 150.7	145.2 145	105.7	137.2	119.1 119	етил група (1a 50.7. 1b 14.2). пиперазинска група (2'. 6'. 46.8. 3'5'. 43.6)

#### 1.2.5.4. Масени спектри

У циљу одређивања појединачних карактеристика молекула, масени спектрометар их преводи у јоне који се крећу под утицајем променљивог спољашњег електричног и магнетног поља.

Три основне функције масеног спектрометра су:

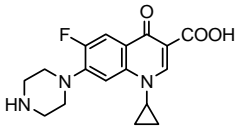
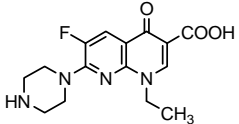
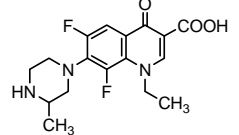
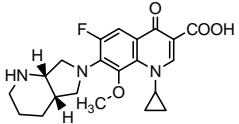
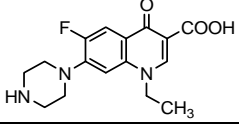
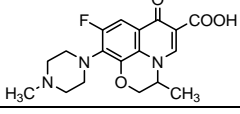
1. Мала количина једињења се јонизује, обично до катјонског облика губљењем једног електрона,
2. Јони се одвајају и сортирају се према њиховој маси и наелектрисању, и
3. Одвојени јони се детектују и добија се масени спектар.

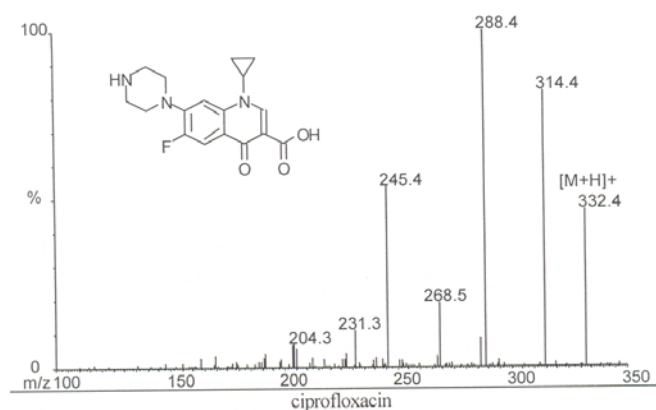
Како су настали јони веома реактивни и кратког живота, њихово формирање мора се изводити у вакууму. Притисак при којем се стварају јони је од  $10^{-5}$  -  $10^{-8}$  тора. Молекули се бомбардују електронима при чему избијају један електрон из молекула стварајући молекулски јон. Неки од ових јона се разбијају у мање катјонске и неутралне фрагменте. Када се на јонски зрак делује јаким магнетним пољем долази до његовог скретања, па на овај начин долази до одвајања наелектрисаних фрагмената.

Масени спектри нам помажу код одређивања молекулског јона, као и фрагмената који су из њега настали. На основу масеног спектра може се закључити о ком хинолону се ради.<sup>29-55</sup>

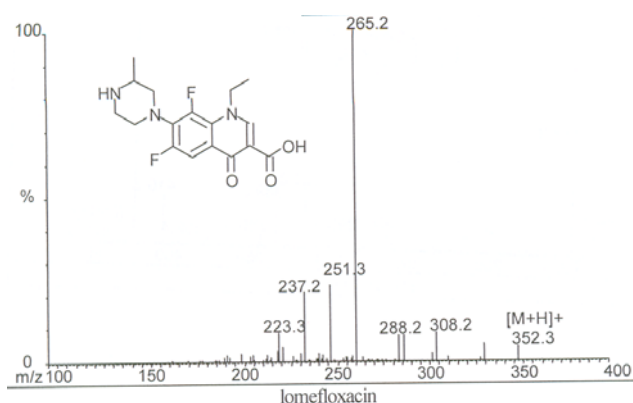


**Табела 9.** Табеларни приказ фрагментације неких молекула флуорохинолона

		FQ		
cipro 331.3		332.5 [M+H] <sup>+</sup>	288.4	[M-CO <sub>2</sub> +2H] <sup>+</sup> или [M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N] <sup>+</sup>
			245.5	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			314.4	
			268.5	[M-CO <sub>2</sub> -HF+H] <sup>+</sup> или [M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-HF] <sup>+</sup>
enox 320.3		321.5 [M+H] <sup>+</sup>	303.4	[M-HF+H] <sup>+</sup>
			234.4	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			206.3	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-CO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> +3H] <sup>+</sup> или [M-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>
lome 351.3		352.5 [M+H] <sup>+</sup>	265.2	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			251.3	[M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			237.2	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N-CO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> +3H] <sup>+</sup>
moxi 401.4		402.6 [M+H] <sup>+</sup>	358.5	[M-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			384.5	[M-HF+H] <sup>+</sup>
			261.4	[M-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
nor 319.3		320.5 [M+H] <sup>+</sup>	276.4	[M-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			302.4	[M-HF+H] <sup>+</sup>
			233.4	[M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
oflo 361.4		362.5 [M+H] <sup>+</sup>	261.4	[M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>
			318.5	[M-CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>



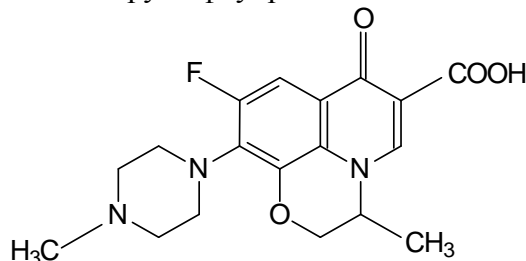
**Слика 16.** Масени спектар ципрофлоксацина



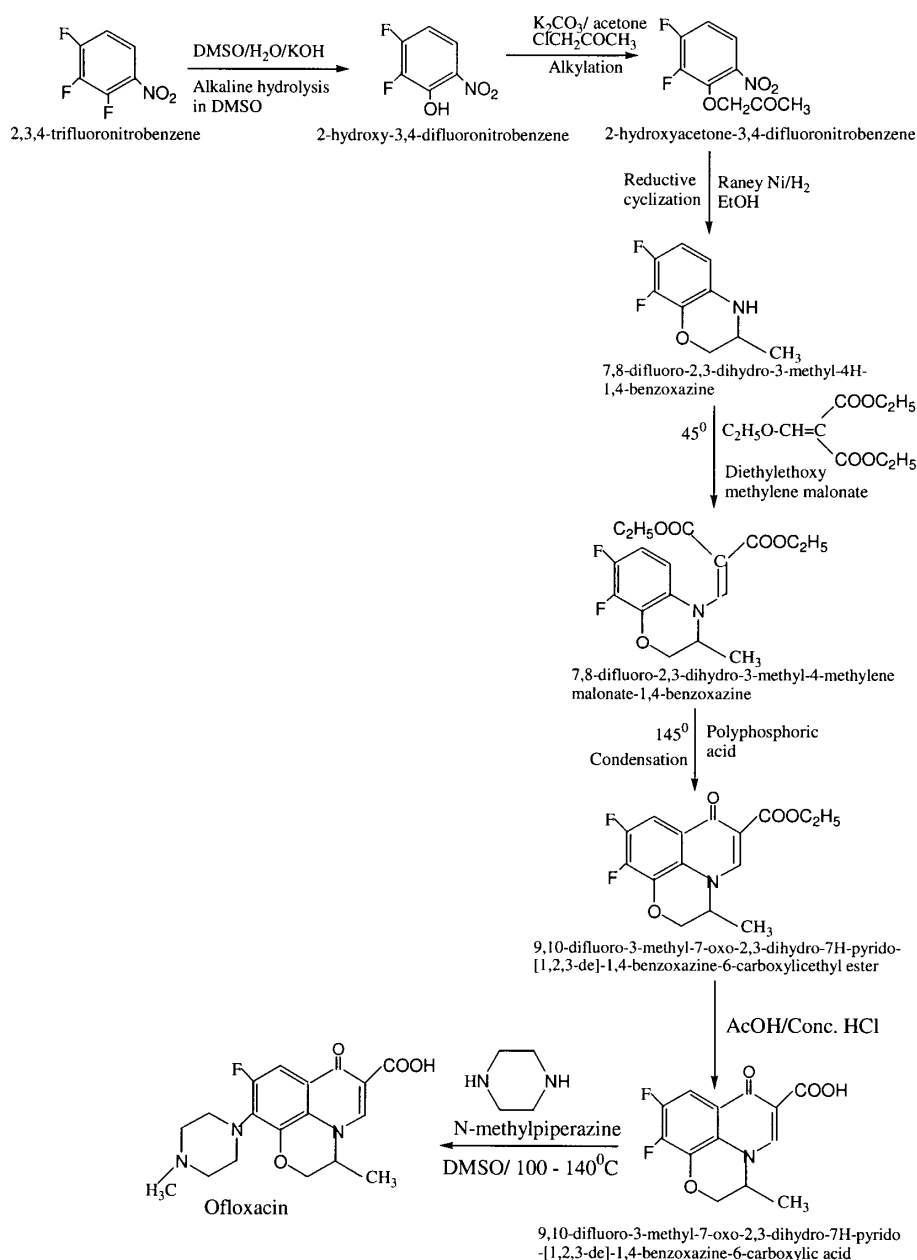
**Слика 17.** Масени спектар ломефлоксацина

### 1.2.6. Офлоксацин као лиганд

Офлоксацин (9-флуоро-3-метил-10-(4-метил-1пиперазинил)-7-оксо-2,3-дихидро-7Н-пиридо-(1,2,3-де) 1,4-бензоксазин-6-карбоциклична киселина),  $M_r(C_{18}H_{20}FN_3O_4) = 361,4 \text{ g/mol}$  (C-59.83%; H-5.58%; F-5.26%; N-11.63%; N-11.63%; O-17.71%) (Merc Index, 1997), је синтетички антибиотик широког спектра дејства који је типичан представник друге генерације антибиотика из групе флуорованих хинолона.



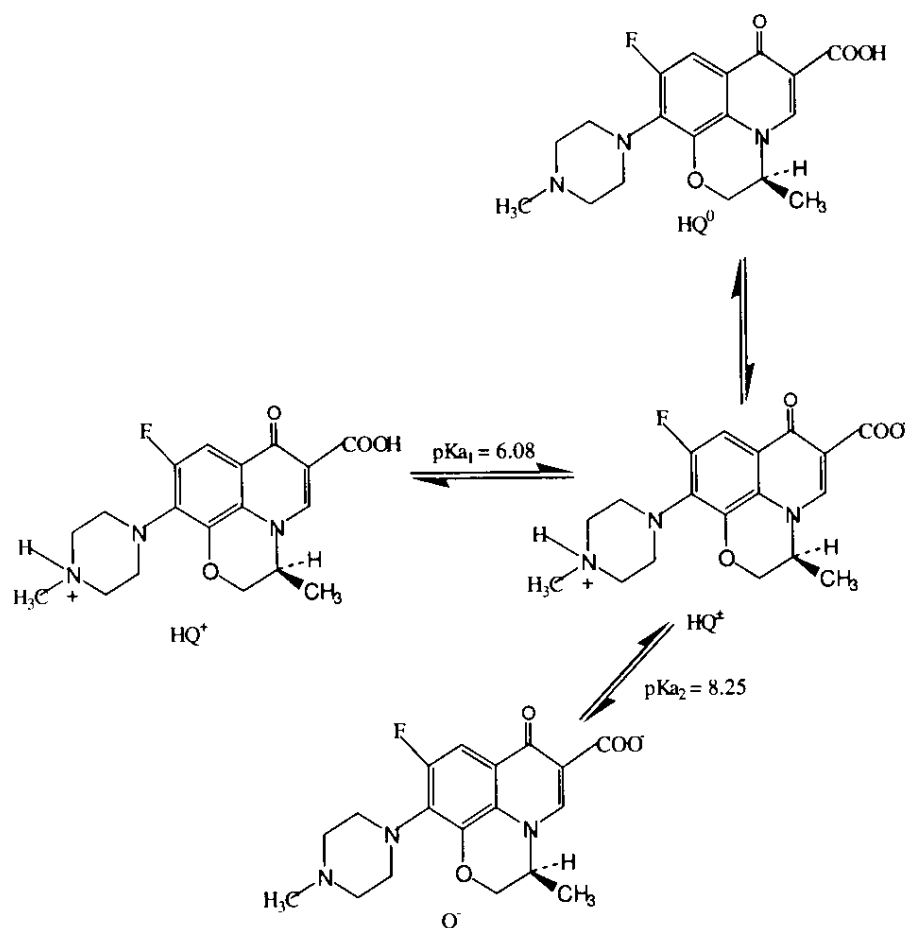
Слика 18. Структура офлоксацина (неутрални облик молекула у раствору)



Слика 19. Синтеза офлоксацина<sup>57</sup>

Синтеза офлоксацина приказана је на слици 19 (страница 34). Први корак у синтези је алкална хидролиза стартног материјала калијум хидроксидом уз присуство диметилсулфоксида (DMSO) који обезбеђује селективну хидроксилизацију атома халогена суседног нитро групе. Други корак синтезе је алкализација 2-хидрокси-3,4-дифлуоронитробензена хлороацетоном у присуству ацетона у алкалном медијуму. Настали продукт подлеже редуктивној циклизацији са *Raney* никлом у присуству водоника. Настали међупроизводи потом подлежу процесу циклоацилације и кондензације загревањем на 145°C у полифосфорној киселини. Уклањањем карбоксилне етил групе и финалном кондензацијом са N-метилпиперидином добија се офлоксацин (*Mitscher, 2005*). Беле је боје, чистоће од 98-100%.

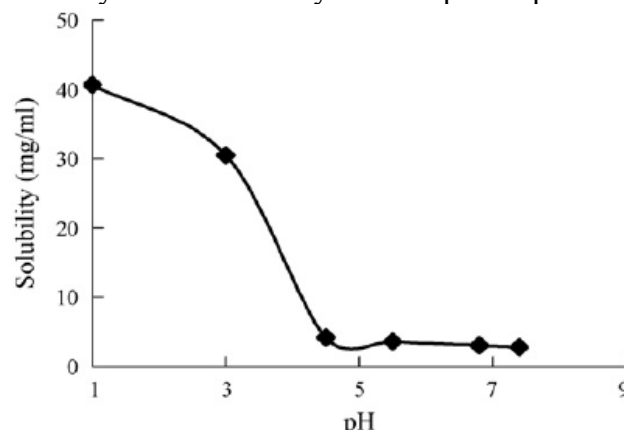
Левовофлоксацин је S-(-) облик офлоксацина, активнији од њега од 8-125 пута у зависности од типа бактерија. Користи се за третман уринарног тракта, простате, коже и инфекција уринарног и респираторног тракта, као и сексуално преносивих болести. Користи се као антибактеријско средство у третману инфекција узрокованих широким опсегом грам-позитивних и грам-негативних бактерија као и инфекција узрокованих Хламидијом.



**Слика 20.** Микроскопска јонизација офлоксацина ( $HQ^0$ -неутрални облик;  $H_2Q^+$ -катјонски облик;  $Q^-$ -анјонски облик;  $HQ^+$ -диполарни ("zwitter") облик;)<sup>57</sup>

Офлоксацин постоји у облику бледо-жућкастог или јарко-жућкастог кристалног пудера са горким укусом. Потребно га је складиштити на 4°C на тамном месту ради минимизације фотолитички индуковане деградације. Топи се на температури од 270-273°C. Офлоксацин је слабо растворљив у води (на 293 K <од 2 mmol/dm<sup>3</sup>) али се у базама и киселинама добро раствара при чему је стабилан до pH=12, а при вишим вредностима хидролизује и разлаже се. Растворан је у глацијалној сирћетној киселини, умерено растворан у метилен хлориду, дихлорметану, метанолу, етанолу или ацетону.

Растворљивост офлоксацина у различитим медијима на собној температури приказана је на слици 21. Може се уочити да је растворљивост офлоксацина рН зависна, и да је знатно већа у киселим него у базним растворима.



Слика 21. Растворљивост офлоксацина на различитим рН вредностима на собној температури

Табела 10. Растворљивост офлоксацина у различитим растварачима на 250°C

Растварач	Растворљивост
Вода	Добро растворан
0,1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	Нерастворан
Метилен хлорид	Незнатно растворан
PBS (рН 5,6)	Умерено растворан
PBS (рН 7,4)	Нерастворан
Етанол	Незнатно растворан
Метанол	Умерено растворан
Хлороформ	Незнатно растворан
Етил ацетат	Незнатно растворан
DCM	Незнатно растворан
Етар	Нерастворан

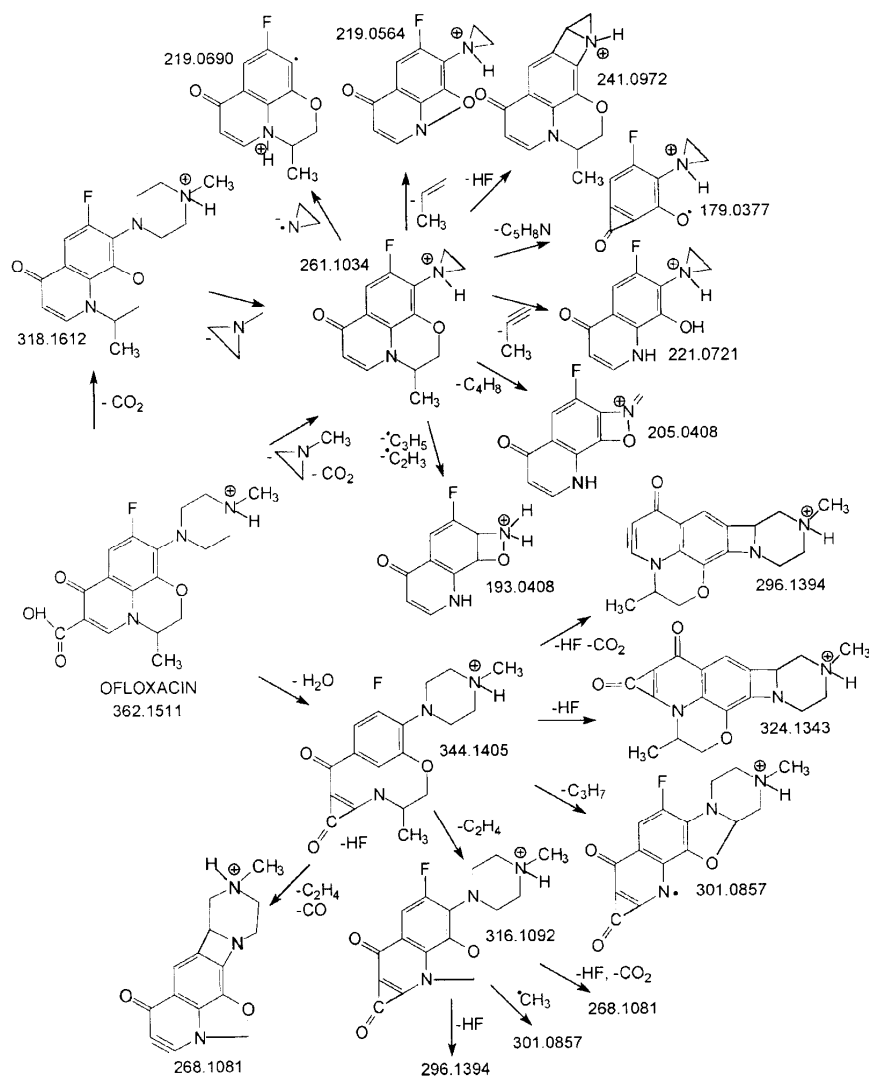
Табела 11. Експериментални подаци растворљивости (mg/ml) за офлоксацин и односи дозе и растворљивости за таблете офлоксацин различите јачине на 37±0.5°C

рН	рН по додавању офлоксацина	Израчуната растворљивост (mg/ml)	Односи дозе и растворљивости таблета (mg)		
			200	300	400
1.2	1.94	37.09	5.3	8.09	10.81
Вода	7.15	2.66	75.19	112.81	150.38
4.5	5.2	14.62	13.69	20.53	27.38
5.05	6	16.49	30.82	46.22	61.63
6	6.32	5.04	39.68	59.52	79.37
6.8	6.8	4.57	43.76	65.64	87.53
7.2	7.15	2.85	70.18	105.26	140.35
7.5	7.3	2.8	71.43	107.14	142.86
8.2	7.87	3.64	54.95	82.42	109.9
9.2	8.85	4.32	46.3	69.44	92.6

Партициони коефицијент офлоксацина за систем октанол/вода је -0.48. рН профил растворљивости показује да су константе дисоцијације и изоелектричне тачке  $pK_1 = 6.03$ ,  $pK_2 = 8.21$  и  $pI = 7.12$ .  $pK_1$  и  $pK_2$  су константе дисоцијације катјонског тј.

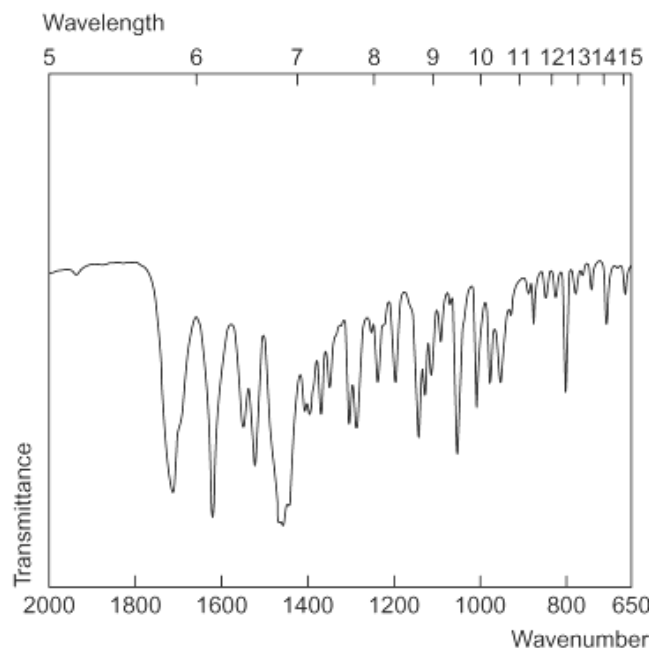
анјонског облика офлоксацина при чему се  $pK_1$  односи на дисоцијацију карбоксилне групе а  $pK_2$  на дисоцијацију пиперазинске амонијум групе из молекула офлоксацина. Изоелектрична тачка ( $pI=7.12$ ) се налази у слабо алкалној области, што значи да се у плазми налази у нејонизованом облику или у облику диполарног ("zwitter") јона. Киселе особине амонијум групе су мање изражене него киселе особине карбоксилне групе што је последица стабилизације  $-COO^-$  групе  $+R$  ефектом хинолонског језгра и успостављања водоничне везе између карбоксилног водоника и суседног карбонилног кисеоника у положају 4-

Офлоксацин је слаба органска хетероциклична оксо киселина која се у воденом раствору зависно од рН раствора може јавити у облику неутралног молекула, катјона, анјона, или диполарног ("zwitter") јона. Као и сви хинолони друге и треће генерације офлоксацин се понаша као амфипротична супстанца. Као протон акцептор појављује се секундарна amino група из пиперазинског прстена, која може да прими протон и пређе у амонијум групу. Протон донор је карбоксилна група из хинолонског језгра. Доминантна врста је диполарни јон и неутрални облик молекула. Однос диполарног јона у односу на неутрални облик на физиолошкој вредности рН је 146. Компаративно високе вредности константи се могу приписати ефекту киселинског слабљења везаног водоника у 6-карбоксилној групи суседног карбонилној групи. Вредности мање од  $pK_1$  се односе на катјонски облик ( $N_4$  из пиперазинил групе), веће од  $pK_2$  на анјонски облик, а вредности између њих на диполарни облик. Шема фрагментације офлоксацина приказана је на слици 22.

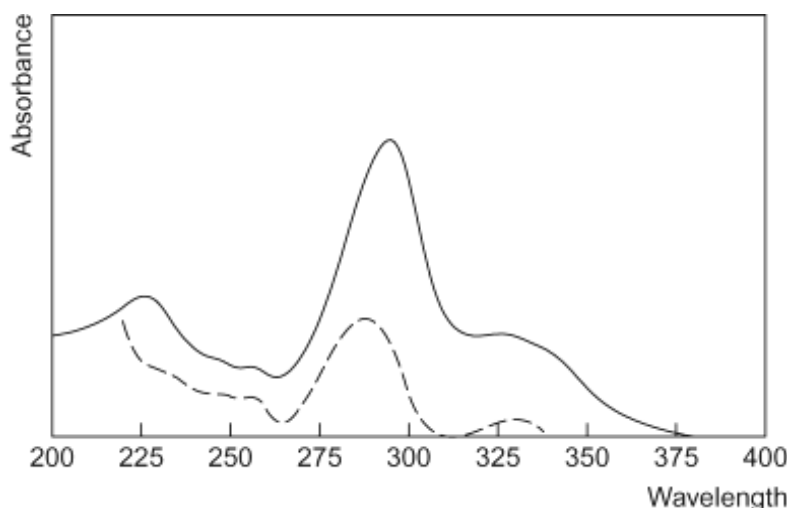


Слика 22. Шема фрагментације офлоксацина<sup>58</sup>

Ифрацрвени спектар офлоксацина снимљен КВг техником у опсегу таласних дужина од  $2000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  приказан је на слици 23. Најистакнутији пикови су на  $1459$ ,  $1621$ ,  $1715$  и  $1086\text{ cm}^{-1}$ . Уопштено хидроксилна група карбоксилне киселине била би у опсегу од  $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ . Пик на  $1715\text{ cm}^{-1}$  потиче од карбонилне групе карбоксилне киселине, на  $1621\text{ cm}^{-1}$  потиче вероватно од истењања карбонила на положају 4 или истењања  $\text{C}=\text{C}$  везе на  $\text{C-2}$  и  $\text{C-3}$ . Остали пикови на  $1400\text{ cm}^{-1}$  потичу од вибрација  $\text{N}_4$  у пиперазинил групи, на  $1530\text{ cm}^{-1}$  потиче од истењања  $\text{C}=\text{O}$  и на  $1055\text{ cm}^{-1}$  потиче од истењања  $\text{C-O-C}$  етарске групе.

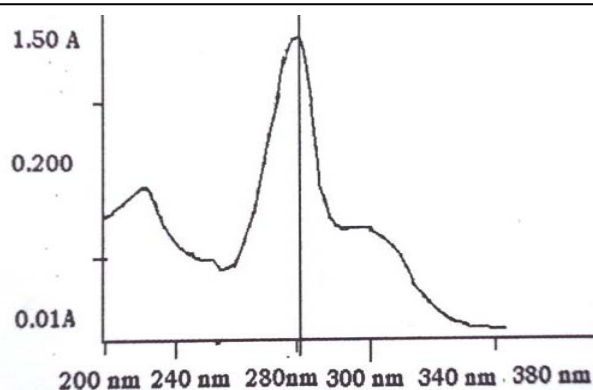


Слика 23. IR спектар офлоксацина



Слика 24. UV VIS спектар офлоксацина у киселој и базној воденој средини

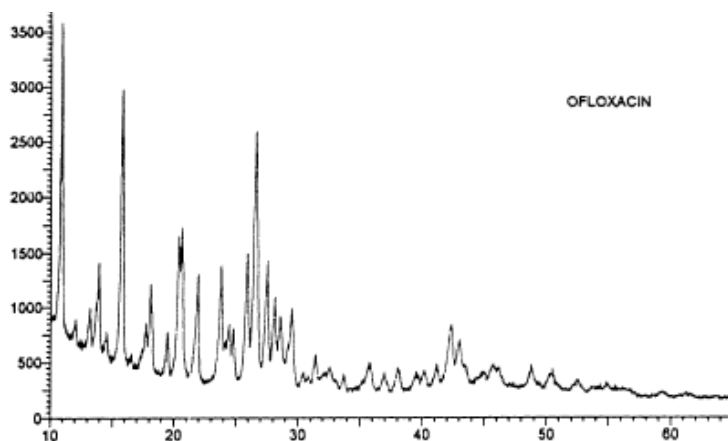
UV VIS спектар офлоксацина у воденом раствору ( $5 \times 10^{-5}\text{ mol/dm}^3$ ) показује два пика (јак пик на  $287\text{ nm}$  и слаб пик на  $332\text{ nm}$ ). Јак пик потиче од хромофоре  $\text{N-1}$  положаја карбоксилне групе, док слабији пик потиче од хромофоре азота пиперизинил групе. Спектар се мења када офлоксацин формира комплексе са катјонима метала, посебно са двовалентним катјонима, условљавајући црвени померај јаког апсорпционог пика на  $285\text{ nm}$  и плавог помераја слабије израженог пика на  $330\text{ nm}$ . На слици 24 је приказан UV спектар офлоксацина у киселој воденој ( $225$ ,  $226$ ,  $256$  и  $326\text{ nm}$ ) и базној воденој ( $288$  и  $332\text{ nm}$ ) средини.



Слика 25. Абсорпциони максимум ( $\lambda_{max}$ )/ таласна дужина максимума за офлоксацин

Угао оптичке ротације офлоксацина је у опсегу од  $-0.10^\circ$  до  $+0.10^\circ$ . Због тога што офлоксацин има асиметрични атом угљеника, комерцијално се налази као рацемат.

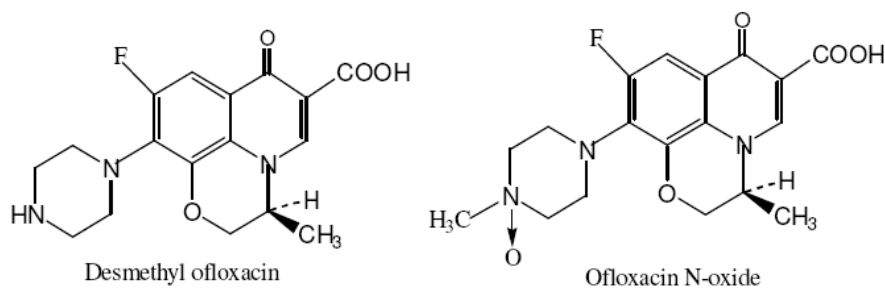
Офлоксацин карактерише добар фармакинетички профил. Офлоксацин показује снажну инхибиторну активност против многих бактерија као и организама резистентним на пеницилине, цефалоспорине и аминогликозиде. Брзо се и добро апсорбује у гастроинтестиналном тракту. Концентрација од  $3.5-5.3 \mu\text{g/ml}$  се постиже у периоду од 1-2 часа по употреби у дози од 400 mg перорално, што условљава инхибицију више од 95% грам-негативних бактерија. Концентрација у урину и бешици, након 1-3 часа износи  $100 \mu\text{g/mL}$ . Храна не утиче на апсорпцију офлоксацина. Време полумелиминације је између 5 и 7 часова и у потпуности се елиминира у непромењеној форми преко бубрега 80% у року од 24 часа. Полувреме елиминације је значајно повећано код пацијената са поремећеном реналном функцијом (око 20% за 24 часа). Ово указује да клиренс офлоксацина зависи од односа гломеруларне филтрације, што условљава да се мора водити рачуна код примене високих доза офлоксацина код пацијената са бубрежном дисфункцијом.



Слика 26. Дифракција X-зрацима за офлоксацин

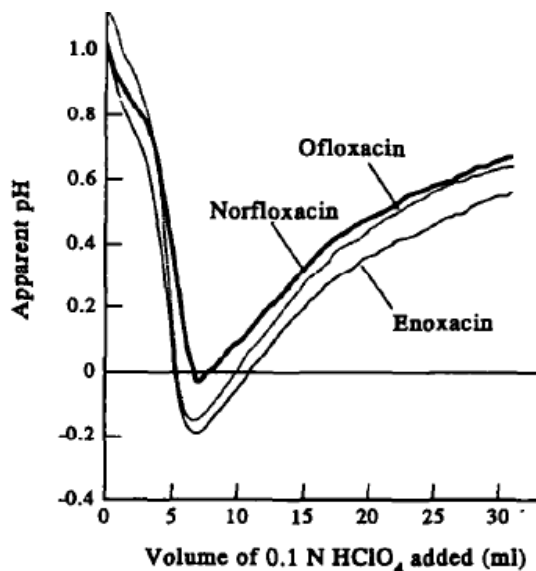
Како се офлоксацин везује око 25% за албумин серума, то је и разлог његове релативно високе концентрације у плазми (од  $3-4 \mu\text{g/mL}$ ) што омогућава његово лако продирање у већину ткива. У цереброспиналној течности постиже релативно високе концентрације, знатно изнад минималних инхибиторних концентрација (МИК) за многе патогене. Приликом истовремене примене са антацидима на бази алуминијума и магнезијума долази до смањења његове биорасположивости услед формирања различитих комплекса где се офлоксацин понаша као биденатни лиганд, где донорске групе могу бити атоми кисеоника карбонилне и карбоксилне групе.

Уопштено, постоји проблем као последица комплексирања и хелатних интеракција флуорохинолона са извесним бројем терапеутских агенаса који укључују антациде, метоклопромиде, ... и металне катјоне. Ове интеракције условљавају смањивање апсорпције хинолона, а самим тиме и биорасположивост и антибактеријску активност. У том смислу постоји разлика између офлоксацина и осталих флуорохинолона. Ефекат поливалентних катјона приликом оралне апсорпције офлоксацина је мањи него са осталим флуорохинолонима. Офлоксацин се метаболизује у веома мањој количини у поређењу са осталим хинолонима. Између 65-80% примењеног офлоксацина оралним путем се екскретује непромењен преко бубрега за време од 48 часа од дозирања. Од 4-8% од дозе офлоксацина се екскретује преко фецеса, што индикује мали степен жучне екскреције. Неки метаболички продукти офлоксацина приказани су на слици 27.



Слика 27. Метаболички продукти офлоксацина

Одређивање офлоксацина могуће је вршити методама неводених титрација, спектрофотометријски, колориметријски, спектрофлуорориметријски, атомском апсорпционом спектроскопијом, течном хроматографијом (HPLC), хемилуминисценцијом, микробиолошким методама и капиларном електрофлорезом.<sup>11,58</sup>

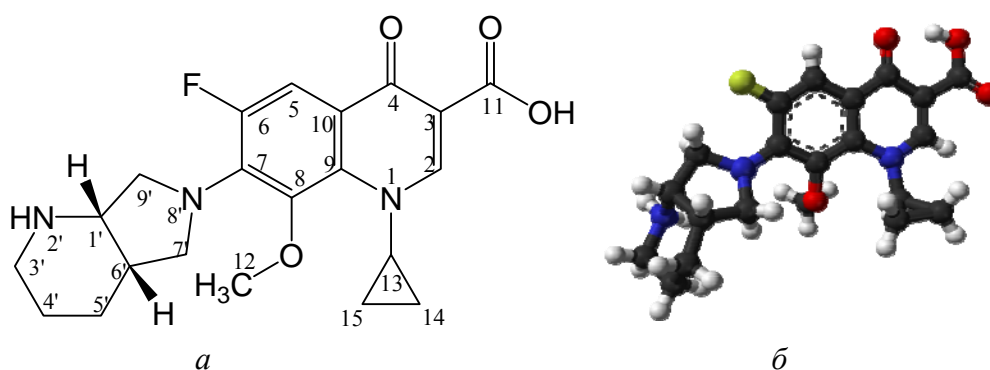


Слика 28. Криве експерименталних неводених титрација за неке флуорохинолоне (Офлоксацин концентрације  $2.8 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ , третиран са  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HClO}_4$ )

### 1.2.7. Моксифлоксацин као лиганд

Моксифлоксацин је синтетички широко спектрални антибиотик из четврте генерације флуорованих хинолона. Молекулска формула му је  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_4 \text{ HCl}$  (хидрохлорид) и  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_4$  (база), а његова хемијска структура је следећа:

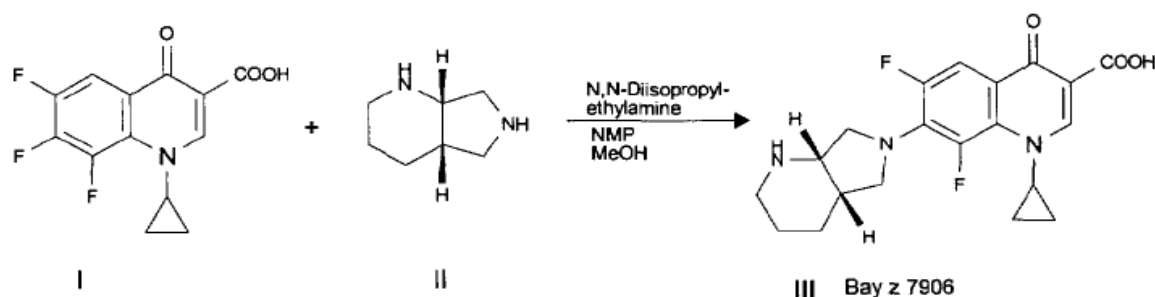




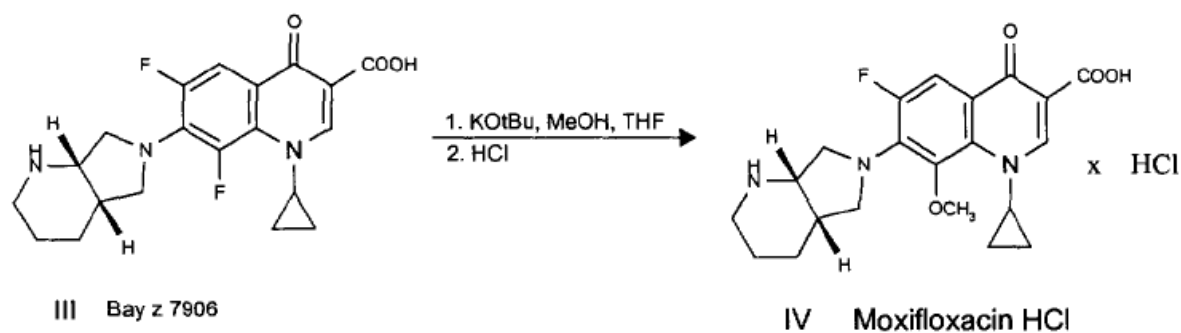
Слика 29. Хемијска структура моксифлоксацина

Моксифлоксацин хидрохлорид је 8-метоксифлуорохинолон четврте генерације. Хемијски назив му је 1-циклопропил-7-((C,C)-2,8'-диазабицикло (4,3,0)-нон-8'-ил)-6-флуоро-8-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолин карбоксилна киселина. Састоји се од бицикличног ароматичног језгра са атомом флуора на положају C-6, метокси групом на положају C-8, N-1 циклопропил групе и азобицикличне групе на положају C-7. То је слабо жућкаста или жута супстанца, горког укуса са релативном молекулском масом од 437.90 g/mol (хидрохлорид) и 401.44 g/mol (база).

Синтеза моксифлоксацин хидрохлорида одвија се у две фазе: У првој фази реагују трифлуорохинолонска киселина и S,S-пиролопиперидин. Реакција се одвија у присуству терцијарног амина N,N-диизопропилетиламина да би се неутралисала киселина која настаје у току реакције. Као систем растварача користи се смеша N-метил-2-пиролидинона и метанола. Смеша се рефлуктује три сата на температури од 70°C. После хлађења суспензија се филтрира, испира са метанолом и суши у вакууму. Као производ ове реакције добија се (*Bay z 7906*) који је интермедијер у синтези моксифлоксацина.



Слика 30. Прва фаза синтезе моксифлоксацина



Слика 31. Друга фаза синтезе моксифлоксацина

У другој фази *Bay z 7906* се преводи у моксифлоксацин хидрохлорид заменом атома флуора метокси групом у положају 8. Ово се постиже реакцијом *Bay z 7906* и

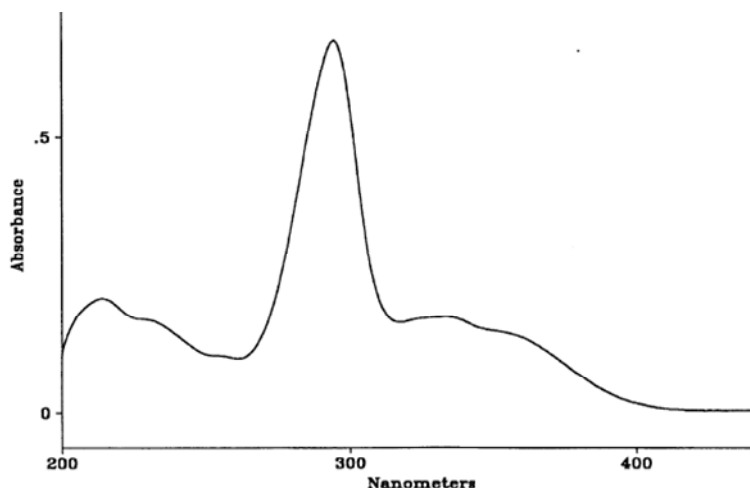
калијум-терц-бутоксида у присуству тетраhydroфурана метанола. Смеша се рефлуктује 2.5 сата на 70°C. После хлађења раствор се пребацује у други суд који садржи разблажену хлороводоничну киселину. Раствор се хлади и меша све док се не заврши таложење. Талог се издваја и испира водом и етанолом.

Уколико се моксифлоксацин хидрохлорид користи за израду инфузионих раствора онда постоји још један степен пречишћавања: талог добијен у другом степену се раствори у прочишћеној води и рефлуктује.

У процесу синтезе моксифлоксацина јављају се супстанце које не могу никаквим поступцима пречишћавања да буду одстрањене из готовог производа. Нечистоће у готовом производу могу се поделити у неколико категорија: споредни производи и прекурсори синтезе, деградациони производи и хирални изомери. Потребно је напоменути да је само (S,S) изомер физиолошки активан, па се присуство других изомера може разматрати као онечишћење.

Моксифлоксацин хидрохлорид је кристална супстанца светло жуте боје, горког укуса. Хигроскопан је и може да веже до једног мола воде, што зависи од температуре и релативне влажности. На повишеним температурама може да изгуби везану воду. Моксифлоксацин хидрохлорид нема јасно изражену тачку топљења, али на температурама изнад 250°C долази до његове разградње. Специфична ротација раствора моксифлоксацина концентрације 10 mg/mL у 50% ацетонитрилу је  $[\alpha]_D^{25} -131^\circ$ .

UV спектар моксифлоксацина је врло сличан спектру осталих флуорованих хинолона тј. има два максимума: први максимум је на 294 nm и потиче од апсорпције делокализованог  $\pi$  електронског система хинолонског језгра. Други максимум се налази на 330 nm и потиче од апсорпције пиперидинског супституента и  $\pi$  електрона карбонила и пиперидинског прстена. Специфичан коефицијент апсорпције  $A_m$  је 1122, а моларни апсорпциони коефицијент  $\epsilon$  је 49126 (када је спектар снимљен у метанолу и за апсорпциони максимум на 294 nm). UV спектар моксифлоксацина у метанолу је приказан на слици 32.

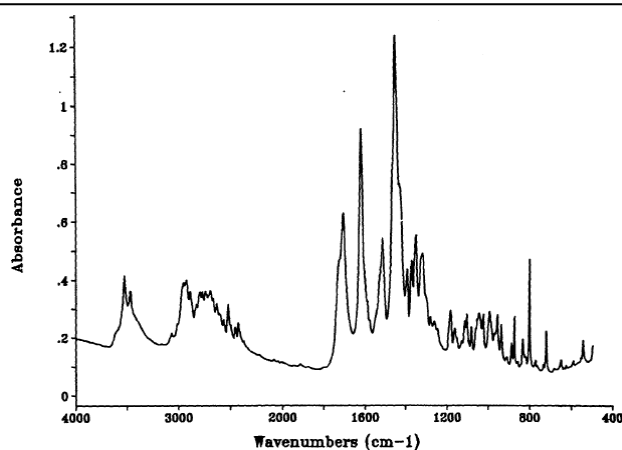


Слика 32. UV VIS спектар моксифлоксацина у метанолу

Изглед и карактеристике спектра моксифлоксацина јако зависе од рН вредности растварача. У табели 12 су приказани положаји најизраженијих максимума у спектру за различите раствараче.

Табела 12. Максимуми у UV спектру моксифлоксацина у различитим растварачима

Растварач	0,1 mol/dm <sup>3</sup> HCl	Пуфер рН 7	0,1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH
Максимум 1	295 nm	288 nm	291 nm
Максимум 2	327 nm	338 nm	339 nm



Слика 33. IR спектар моксифлоксацина снимљен KBr техником

IR спектар моксифлоксацина показује карактеристичне траке на следећим таласним бројевима ( $\text{cm}^{-1}$ ): од 3528–3470, од 3068–2830, од 2796–2083, од 1709–1623 и од 1515–1352. Најизраженије траке су у области од 1515–1352  $\text{cm}^{-1}$  и оне потичу од истежућих вибрација C=C ароматичног језгра и савијајућих вибрација Н–Н, С–Н и С–Н–С прстена. Такође су изражене и истежуће вибрације C=O карбонилне групе у области од 1709–1623  $\text{cm}^{-1}$ . IR спектар моксифлоксацина снимљен KBr техником, приказан је на слици 33. Растворљивост моксифлоксацин HCl у води износи 24 mg/mL. Растворљивост се смањује у присуству хлоридних јона. Испитивања растворљивости на различитим pH вредностима на 25°C су показала да нема промене растворљивости у опсегу pH од 3–5 и она износи 27 mg/mL. На pH=1 (0,1 mol/dm<sup>3</sup> HCl) растворљивост опада на 4.7 mg/mL због присуства хлоридних јона. Са повећањем pH вредности растворљивост незнатно расте, да би на pH=7 била 38 mg/mL.

Табела 13. Растворљивост моксифлоксацина у различитим растварачима

Растварач	Растворљивост (mg/mL) на 25°C
Вода	24
Вода + 0,1 mol/dm <sup>3</sup> NaCl	5.1
Вода + 0,5 mol/dm <sup>3</sup> NaCl	0.85
Вода + 1,0 mol/dm <sup>3</sup> NaCl	0.40
Вода + 2,0 mol/dm <sup>3</sup> NaCl	0.18
0,1 mol/dm <sup>3</sup> HCl	4.7
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=3	27
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=4	27
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=5	27
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=6	29
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=7	38
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=8	45
0,15 mol/dm <sup>3</sup> фосфатни пуфер pH=9	46
0,1 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	67
Метанол	26
N,N-диметилформамид	7.6
Етанол	2.5
Пропанол-2	0.24
Ацетонитрил	0.27
Ацетон	0.072
Етил ацетат	0.00085
n-Хептан	< 0.0001

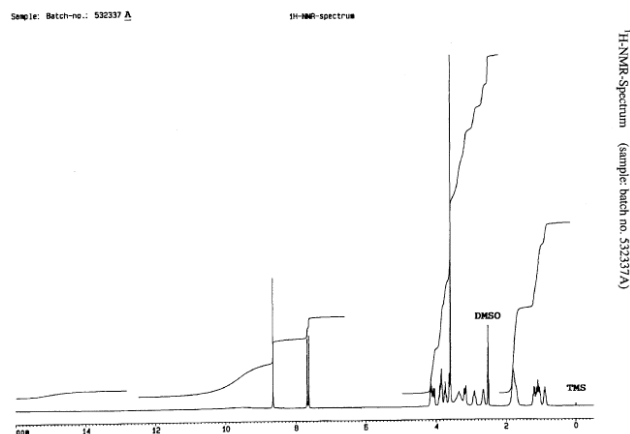
Пошто је моксифлоксацин у облику хидрохлорида, рН вредност воденог раствора моксифлоксацина концентрације 10 mg/ml износи 4.4.

Моксифлоксацин има две  $pK_a$  вредности. Прва  $pK_{a1}$  износи 6.38 и потиче од карбоксилне групе, а друга  $pK_{a2}$  износи 9.53 и потиче од азота у С7 супституенту. Ове константе одређене су потенциометријски коришћењем раствора у води концентрације 1 mg/mL.

Партициони коефицијент моксифлоксацина је  $\log P_{o/w} = -1.87$  за октанол/воду и  $\log P_{o/w} = -0.61$  за октанол/пуфер.

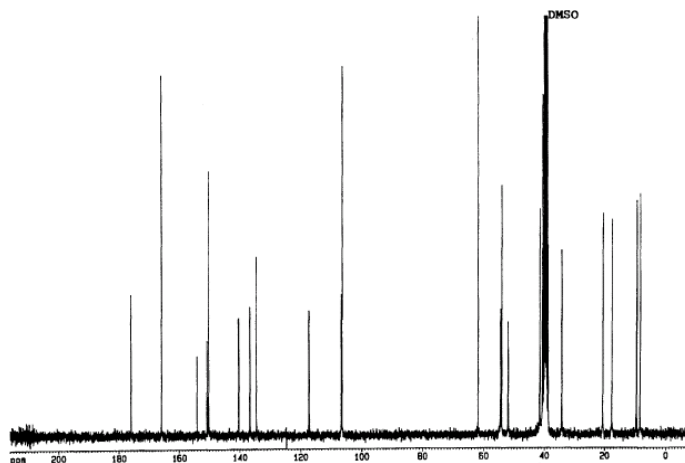
Моксифлоксацин је чист S,S-енантиомер са два стереогена центра. Одговарајућа стереохемијска конфигурација је осигурана полазним материјалом S,S-пироло-пиперидином, па није потребна стерео-селективна синтеза нити сепарација рацемата.

$^1H$ -NMR спектар моксифлоксацина снимљен је техником *Fourije*-ове трансформације на радној фреквенцији од 300.135 MHz. Као растварач коришћен је диметилсулфоксид, а као интерни стандард тетраметилсилан. Спектрална ширина је била 20.07 ppm, а дигитална резолуција 0.368 Hz/Pt.



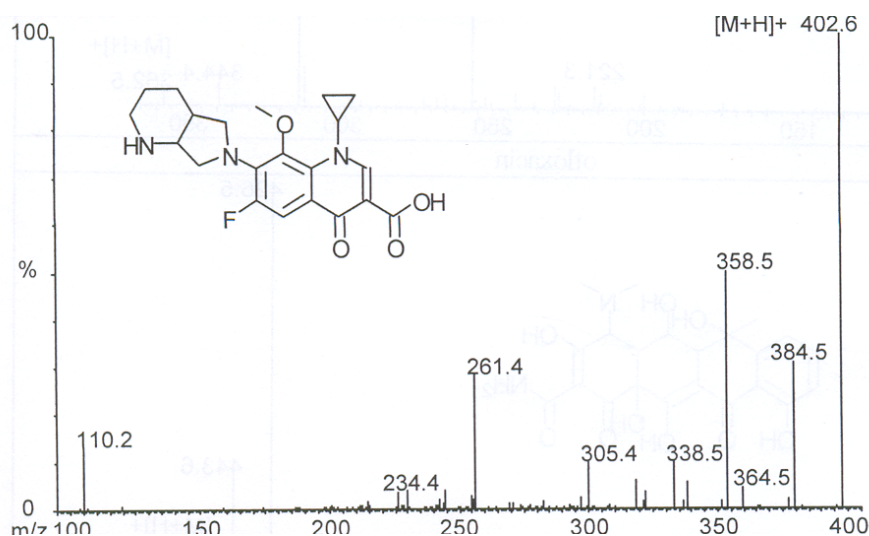
Слика 34.  $^1H$ -NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником *Fourije*-ове трансформације

$^{13}C$ -NMR спектар моксифлоксацина снимљен је техником *Fourije*-ове трансформације на радној фреквенцији од 75.48 MHz. Као растварач коришћен је диметилсулфоксид, а као интерни стандард тетраметилсилан. Спектрална ширина је била 301.1 ppm, а дигитална резолуција 0.694 Hz/Pt. Брзина аквизиције је била 1.442 s, а дужина пулса 7.4 ms,  $90^\circ$  угао пулса. Број слободно индукованих распада био је 3200.



Слика 35.  $^{13}C$ -NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником *Fourije*-ове трансформације

Пик молекулског јона моксифлоксацина (слика 36) се налази на  $402.6 [M+H]^+$  а карактеристични фрагментни јони на  $358.5 [M-CO_2+H]^+$ ,  $384.5 [M-HF+H]^+$  и  $261.4 [M-C_6H_{13}N-CO_2+H]^+$ .



Слика 36. Масени спектар моксифлоксацина

**Фармаколошке особине:** Моксифлоксацин се добро апсорбује после оралне примене. Његова апсолутна биорасположивост (око 90%) је већа него код ципрофлоксацина и упоредива је са оним за новије флуорохинолоне. Максимална концентрација моксифлоксацина у плазми (око  $4.5 \mu\text{g/mL}$ ) се достиже од 1-3 сата после оралне дозе у стационарном стању (при препорученом режиму дозирања од 400 mg једном дневно). На биорасположивост моксифлоксацина не утиче храна. Концентрације моксифлоксацина у плазми су пропорционалне дози до 800 mg.

**Дистрибуција:** Моксифлоксацин је приближно 50% везан за серумске протеине. Запремина дистрибуције се креће од  $1.7\text{-}2.7 \text{ dm}^3/\text{kg}$ . Моксифлоксацин је добро дистрибуиран у организму, при чему су концентрације у ткивима често веће од концентрација у плазми. Моксифлоксацин је детектован у саливи, назалном и бронхијалном секрету, мукози синуса, субкутаном ткиву и скелетним мишићима након оралне примене, дозе од 400 mg.

**Метаболизам:** Моксифлоксацин се метаболише глукуронидном и сулфатном коњугацијом. Ензимски систем цитохрома P-450 не учествује у метаболизму моксифлоксацина и на њега моксифлоксацин не утиче. Сулфатни метаболит (M1) чини приближно 38% оралне дозе и елиминише се примарно фецесом. Приближно 14% оралне дозе се претвара у глукуронид (M2), који се екскретује примарно урином. Максималне концентрације у плазми глукуронида су око 40% од оних за моксифлоксацин, док су те концентрације за сулфат мање од 10% од оних за моксифлоксацин.

**Елиминација:** Приближно 45% оралне или интравенске дозе моксифлоксацина се излучује у непромењеном облику (око 20% урином и 25% фецесом). Готово цела (96%) орална доза се елиминише или у непромењеном облику или у облику познатих метаболита. Полу-живот елиминације моксифлоксацина је приближно 12 часова. Стационарно стање се постиже након највише 3 дана при препорученом режиму дозирања. Брзина елиминације моксифлоксацина из ткива је паралелна брзини елиминације из плазме.

**Дозирање:** Уобичајено дозирање моксифлоксацина је 400 mg орално свака 24 часа. Трајање терапије зависи од типа инфекције. Доза треба да се узме најмање 4 сата пре или 8 сати након антацида који садрже алуминијум или магнезијум, металне катјоне као што су гвожђе, мултивитаминске препарате који садрже цинк, пуфроване

---

таблете за жвакање диданозина и педијатријске прашкове за оралне растворе. Моксифлоксацин се може узимати са или без хране. Моксифлоксацин је регистрован у Републици Србији у облику таблета од 400 mg и у облику инфузије од 400 mg моксифлоксацина у 100 mL. Заштићени назив регистрованог комерцијалног фармацеутског препарата је *Avelox*.<sup>12,20,59,60</sup>

### 1.3. Компјутерска симулација специјације у раствору

#### 1.3.1. Молска фракција (алфа вредности)<sup>61</sup>

Састав раствора може се изразити графиком зависности релативних концентрација двеју компонената (нпр. метала и лиганда) у функцији рН вредности. Релативне концентрације ових компонената називају се *алфа вредности*, и означавају се са  $\alpha_i$ . Алфа вредности су корисне у приказивању промена у концентрацијама различитих врста који се дешавају у титрацији једноставне слабе киселине, али се могу такође израчунати и за полифункционалне киселине и базе.

##### 1.3.1.1. Молска фракција (алфа вредности) слабе киселине, $\text{HA}$ <sup>61</sup>

Ако са  $c_T$ , означимо укупну аналитичку концентрацију слабе киселине, може се написати да је

$$c_T = c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}. \quad (68)$$

Фракција укупне концентрације недисосоване киселине износи

$$\alpha_0 = \frac{[\text{HA}]}{c_T}, \quad (69)$$

а фракција дисосоване

$$\alpha_1 = \frac{[\text{A}^-]}{c_T}. \quad (70)$$

Збир алфа вредности

$$\alpha_0 + \alpha_1 = 1. \quad (71)$$

Алфа вредност зависи једино од  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  и  $K_a$ , и независна је од  $c_T$ . Да би се добио израз за  $\alpha_0$ , израз за константу дисоцијације се може представити као

$$[\text{A}^-] = \frac{K_a [\text{HA}]}{[\text{H}_3\text{O}^+]}. \quad (72)$$

Заменом и преуређивањем ових једначина, добије се вредност за молску фракцију

$$\alpha_0 = \frac{[\text{HA}]}{c_T} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{O}^+] + K_a}. \quad (73)$$

Преуређивањем израза за константу дисоцијације и заменом у једначину за молску фракцију  $\alpha_0$ , добија се вредност фракције дисосоване киселине,

$$\alpha_1 = \frac{[A^-]}{c_T} = \frac{K_a}{K_a + [H_3O^+]}. \quad (74)$$

Из једначина за  $\alpha_0$  и  $\alpha_1$ , може се уочити идентичност имениоца.

### 1.3.1.2. Молска фракција (алфа вредности) полифункционалних киселина и база<sup>61</sup>

Ако са  $c_T$ , означимо збир моларних концентрација полипротичне киселине у раствору, алфа вредност за слободну киселину се може приказати као

$$\alpha_0 = \frac{[H_2M]}{c_T}, \quad (75)$$

где је

$$c_T = [H_2M] + [HM^-] + [M^{2-}]. \quad (76)$$

Алфа вредности за  $HM^-$  и  $M^{2-}$  се могу приказати сличним једначинама,

$$\alpha_1 = \frac{[HM^-]}{c_T} \quad (77)$$

и

$$\alpha_2 = \frac{[M^{2-}]}{c_T}. \quad (78)$$

Имајући у виду да је збир алфа вредности једнака јединици, следи да је

$$\alpha_0 + \alpha_1 + \alpha_2 = 1. \quad (79)$$

Алфа вредност система полипротичне киселине се може изразити и преко  $[H_3O^+]$ ,  $K_{a1}$  и  $K_{a2}$ . Оваквим изражавањем се добија:

$$\alpha_0 = \frac{[H_3O^+]^2}{[H_3O^+]^2 + K_{a1} \times [H_3O^+] + K_{a1} \times K_{a2}}, \quad (80)$$

$$\alpha_1 = \frac{K_{a1} \times [H_3O^+]}{[H_3O^+]^2 + K_{a1} \times [H_3O^+] + K_{a1} \times K_{a2}} \quad (81)$$

и

$$\alpha_2 = \frac{K_{a1} \times K_{a2}}{[H_3O^+]^2 + K_{a1} \times [H_3O^+] + K_{a1} \times K_{a2}}. \quad (82)$$



И у овом случају именилац је идентичан полином, као и то да је фракциона количина сваке врсте фиксна на свакој вредности рН, и независна од укупне концентрације. Уопштено за слабу киселину,  $H_nA$ , именилац у свим изразима за алфа вредности се може изразити у облику

$$[H_3O^+]^n + K_{a1} \times [H_3O^+]^{n-1} + K_{a1} \times K_{a2} \times [H_3O^+]^{n-2} + \dots + K_{a1} \times K_{a2} \times \dots \times K_{an}. \quad (83)$$

Бројилац за  $\alpha_0$  је први члан у имениоцу, за  $\alpha_1$  други и тако редом. Ако са  $D$  означимо именилац, онда изразе за алфа вредности можемо написати као

$$\alpha_0 = [H_3O^+]^n / D, \quad (84)$$

и

$$\alpha_1 = K_{a1} \times [H_3O^+]^{(n-1)} / D. \quad (85)$$

Алфа вредности за поли-функционалне базе се могу извести аналогично, са једначинама које се могу написати у зависности константи дисоцијације базе и концентрације  $[OH^-]$ .

### 1.3.1.3. Фракциона дистрибуција комплексних једињења (алфа једначине)<sup>61</sup>

Фракција врсте се може дефинисати као концентрациони однос врсте и укупне концентрације. За М-Л системе,  $C_M$  је укупна (аналитичка) концентрација централног металног јона и може се представити једначином

$$C_M = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots + [ML_n]. \quad (86)$$

Једначина (86) представља збир свих форми за које се претпоставља да су присутне тј. тзв. материјални или баланс масе.

Фракција у форми „слободног“ аква јона је

$$\alpha_0 = [M] / C_M = (1 + [M] + [ML] + [ML_2] + \dots + [ML_n])^{-1}. \quad (87)$$

У односу на  $[L]$ , може се написати да је

$$\alpha_0 = (1 + K_1 \times [L] + K_1 \times K_2 \times [L]^2 + \dots + K_1 \times K_2 \times \dots \times K_n \times [L]^n)^{-1}. \quad (88)$$

Преко вредности  $\alpha_0$ , могу се изразити и остале присутне алфа фракције

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= [ML] / C_M = \alpha_0 \times K_1 \times [L], \\ \alpha_2 &= [ML_2] / C_M = \alpha_0 \times K_1 \times K_2 \times [L]^2, \\ &\dots, \\ \alpha_n &= [ML_n] / C_M = \alpha_0 \times \beta_n \times [L]^n, \end{aligned} \quad (89)$$

где је  $n$ -максимални број лигананда.

Важно значење ових једначина је у томе да у системима где су равнотежне константе познате, одређивање концентрација не-комплексираних лиганата или протона у равнотежи биће довољна информација да би се одредила дистрибуција метала међу свим могућим облицима. То је основа многих равнотежних дијаграма који се могу користити.

Фракција слободног јона метала ( $\alpha_M$ ) зависи од константе стабилности комплекса ( $\beta$ ), односно кумулативних константи формирања

$$\alpha_M = \frac{1}{1 + \beta_1 \times [L] + \beta_2 \times [L]^2 K + \beta_n \times [L]^n} \quad (90)$$

Лигандни број или степен формирања  $\bar{n}$ , представља средњи број везаних лиганата по металном јону. Веза између алфа фракција и лигандног броја може се приказати на следећи начин:

$$\bar{n} = \frac{C_L - L}{C_M} = \alpha_1 + 2\alpha_2 + \dots + n\alpha_n \quad (91)$$

### 1.3.2. Специјација јона метала

Специјација описује концентрацију и садржај сваке хемијске врсте у више-компонентним системима, укључујући све присутне јоне и не-дисосоване молекуле. Хемијска специјација метала (било да је есенцијалан или токсичан) је значајна због хемијске форме у којој се метал уноси у организам, што најчешће одређује апсорпционе и транспортне особине метала у организму (а и тиме његову биолошку и физиолошку активност). Значајно је у неким случајевима и како је неки есенцијални или токсични метал апсорбован због праћења његове трансформације због могућих реакција измене лиганата са потенцијално присутним биомолекулама у биофлуидима или ткиву. Најконцизнија дефиниција хемијске специјације је: *састав, концентрација и оксидационо стање сваке од хемијских форми метала које су присутне у узорку*.

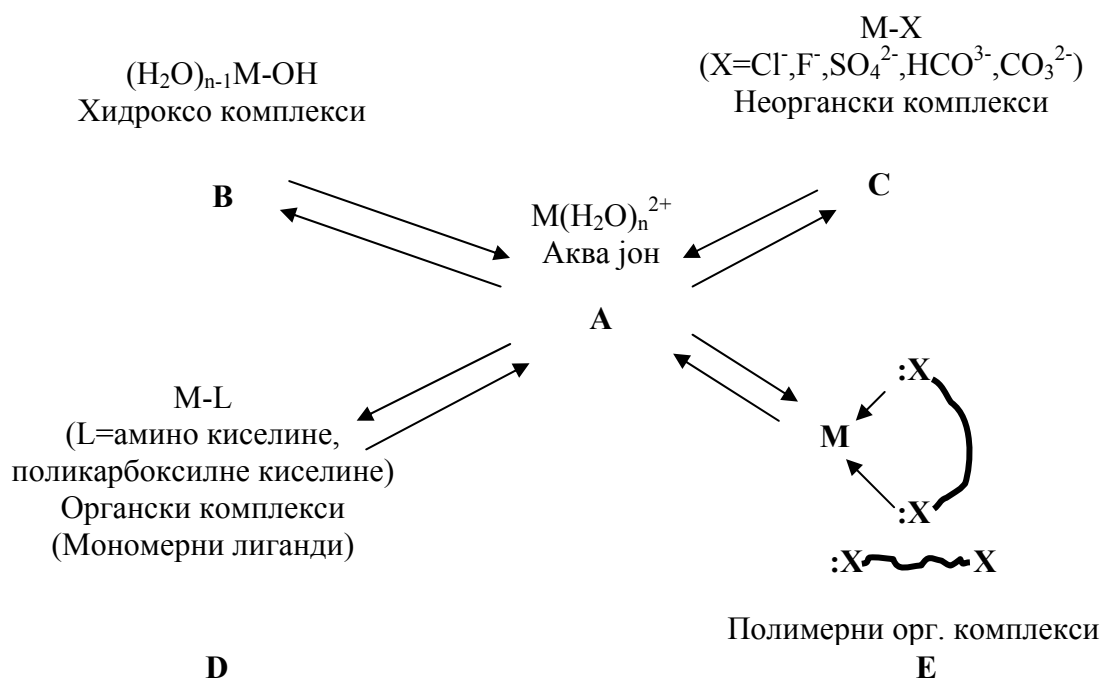
Специјацијом се одређују биодистрибуције, екскреције и токсичности сваког елемента. У динамичким системима (нпр. крвна плазма), често је тешко, ако не и немогуће одредити специјацију било ког елемента. Зато се користе компјутери који омогућавају екстраполацију из једноставних система до више комплексних биолошких флуида. Познавање хемијске специјације може помоћи у објашњавању постојећих клиничких податка, како би се они користили у дизајнирању нових и ефикаснијих клиничких препарата. Специјација је важна због тога што често контролише особине хемијских система. Понашање многих биолошких, еколошких и индустријских процеса зависи од концентрације индивидуалних врста. Ове концентрације настају из термодинамичких равнотежа и кинетика компетитивних реакција. Специјација јона метала у раствору се може представити уопштено као на шеми 3 (страница 51). Специјација јона метала је од интереса и за геохемијска и токсиколошка подручја изучавања. Приликом разматрања интеракција метала у траговима у живим организмима, могу се идентификовати три велика подручја интереса: специјација у екстерном окружењу, металне интеракције са биолошком мембраном која одваја организам из свог окружења, и подела метала унутар организма са пратећим биолошким ефектима.<sup>62,63</sup>

Термодинамички аспект специјације укључује одређивање стехиометрија (састава) и константи стабилности свих комплекса који се формирају са ендогено и егзогено везаним молекулама биолошких флуида или ткива. На тај начин се мора

дефинисати хемијска форма метала која постоји или се формира у посматраном систему (хемијском, еколошком или биолошком). У овом контексту се користи и дефинисан је појам хемијске специјације у литератури. Међутим, приликом хемијске специјације не сме се занемарити и кинетика формирања комплекса. Опсег везивања метала са лигандима мале молекулске масе (ЛМММ) је увек већи него везивања за велике протеине или остале биополимере. То значи да се засићење или осиромашење потенцијалних места везивања лиганата за метал дешава узастопно, тј., ЛМММ ће се узети за метал прво и такође ће изгубити или проследити метал ка следећем месту везивања где се исти процеси на местима везивања са молекулима велике молекулске масе дешавају истовремено, али пуно спорије. Мора се имати на уму да живи системи због своје сталне метаболичке везе са својим окружењем никада не постижу праву термодинамичку равнотежу. Опште је познато да метални јони имају велики број важних улога у биолошким системима. Метални јони који се разматрају као есенцијални су калцијум, магнезијум, манган, гвожђе, кобалт, бакар и цинк. Биолошки системи су свакодневно изложени дејству загађивача који садрже металне јоне олова ( $Pb^{2+}$ ), живе ( $Hg^{2+}$ ) и кадмијума ( $Cd^{2+}$ ).

У хуманој крвној плазми као и у осталим биолошким флуидима, присутни метални јони се могу класификовати у четири посебне фракције:

- они који су инкорпорирани у металопротеине (неизменљиви, нпр. бакар везан са церулоплазмином);
- они који су релативно слабо везани са протеинима и који су у лабилној равнотежи са сличним јонима у растворима (нпр. бакар везан са серумским албуминима);
- они који су комплексирани са бројним ЛМММ, укључујући анјоне аминокиселине, карбоксилате, карбонате, фосфате, салицилате и аскорбате;
- и слободни метални јони или везани за воду као аква јони.



Шема 3. Општа шема приказа специјације метала у раствору

Прва фракција није од интереса у моделовању специјација осим ако метални јон није део равнотежа које се разматрају због ослобађања из протеина хемијском деградацијом. Аква јон је комплекс мале моларне масе, али због свог значаја се третира као посебна форма металног јона. Он мора бити присутан у свим воденим равнотежним

системима и често се односи на слободни (не-комплексирани) јон чак и кад је он комплексирани растварачем.

Последње три фракције се могу посматрати као мултикомпонентни системи у којима су индивидуалне комплексне врсте у компетитивној равнотежи са слободним металним јонима. Иако биолошки системи никада не достижу праву равнотежу, они често постижу стабилно стање. Осим тога, да би постигли високу ефикасност измене енергије, већина биолошких система функционише близу реверзибилних равнотежа. Претпоставка постојања равнотеже је често оправдана. Фракције комплекса металних јона мале молекуларне масе, иако мале у поређењу са протеин-метал фракцијама, су од великог значаја и играју важну улогу у многим виталним физиолошким и биохемијском процесима. На пример, комплекси мале молекуларне масе, сматра се да су укључени: као интермедијери кад су метални јони део или су уклоњени из извесних металоензима или протеина носача, у трансферу неких металних јона кроз мембране, у одржавању есенцијалних метала у раствору и преуређивању потенцијала извесних редокс парова. Следи да је стицање детаљнијих знања о равнотежним дистрибуцијама металних јона између лиганда мале молекуларне масе јако пожељно.

Укупна концентрација јона  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  у крвној плазми је између  $10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ , и она је за слободне јоне испод границе детекције већине аналитичких метода. Поред тога, проблеми са експерименталном проценом равнотежних концентрација су изражени и присуством великог броја потенцијалних лиганда и чињеницом да узорци имају хемијске интеракције са системом. Симулација равнотежа метални јон-лиганд употребом компјутера представља тренутно најбољи метод процене равнотежних концентрација укључених комплекса у посматраном систему.

Моделовање специјација у крвној плазми пионирски је отпочео Перин (*Perrin*) серијом радова. Перинови (*Perrin*) најранији модели били су ограничени на металне јоне  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  са изабраним аминокиселинама (16 у почетку а накнадно 22) као лигандима. У каснијем периоду, развио је системе у којима је укључио протеине (албумин и глобулин) и металне јоне  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . У свим случајевима, главни део бакра (од 80-98%) је координиран са хистидином и цистином. Насупрот томе, цинк формира комплексе у широком опсегу аминокиселина. Резултати у вези протеин-металних комплекса нису били задовољавајући. На пример, концентрација бакар-албумин комплекса је била незнатна и дистрибуција калцијума између албумина и глобулина се значајно разликовала од експерименталних резултата постигнутих директним мерењима. У исто време Силен (*Sillen*), Морел (*Morel*), Мартел (*Martell*) и остали, проучавали су специјације на природним водама и урину. Први модели су били ограничени на један или два метална јона са ограниченим бројем лиганда. Развојем брзих компјутера са већим меморијама омогућено је да ови модели могу бити проширени и за мултикомпонентне системе. У моделу хумане крвне плазме који су развили Меј (*May*) и сарадници, 7 металних јона и 40 лиганда су разматрани истовремено. Овај модел укључује око 5000 комплекса са немогућношћу задовољавајућег укључивања лабилних протеин-метал равнотежа у модел.<sup>64</sup>

Суштински процес у развоју било ког модела специјације је дефинисање серије хемијских равнотежа које представљају разматрани систем. Приликом дефинисања равнотежа свих укључених хемијских врста, потребно је укључити и вредности равнотежних константи. Ово је уједно и једна од најтежих препрека у процесу моделовања специјација, јер прецизне константе равнотежа нису увек и расположиве. У ствари, у неким случајевима, све могуће равнотеже нису ни идентификоване. У општем случају процес развоја неког модела специјације се може представити као:

$$S_j = \beta_j \prod_i x_j^{k(i,j)}, \quad (92)$$

где је  $S_j$ -концентрација врста,  $\beta_j$ -равнотежна константа,  $x_i$ -концентрација слободне компоненте и  $k(i,j)$  стехиометријски коефицијенат компоненте.

Серије равнотежа, заједно са укупном или слободном концентрацијом компонената чини компјутерски модел или базу података система. Од ових података, серије истовремених једначина баланса масе могу се подесити за укупну концентрацију компоненте као збир свих индивидуалних концентрација врста:

$$T_i = X_i + \sum_j S_j k(i, j). \quad (93)$$

Једначине баланса масе могу се решити итерацијама слободних концентрација компоненти. За ту сврху, постоје многи компјутерски програми који су у могућности да то ураде (нпр. компјутерски програм ECCLES).<sup>64</sup>

У динамичком мултикомпонентном систему као што је крвна плазма, укупна концентрација металног јона је знатно мања од укупне концентрације протеина, а концентрација слободних металних јона је веома мања од концентрације комплекса метал-протеин. То значи да концентрација јона метала остаје константна. Међутим, ако се егзогено унет метални јон користи у високим концентрацијама (нпр. гадолинијум или галијум) капацитет везивања са протеином може се повећати. У том случају, концентрација слободног металног јона неће остати константна. Такође, прихватање метала од протеина је често споро, и тако више него термодинамички очекивана концентрација слободног металног јона може постојати пре него се успостави равнотежа. Поред тог проблема, пуферовање концентрације слободног метала протеином, може се користити да би се упростили прорачуни симулација. За време прорачуна, концентрација слободног металног јона је фиксна у односу на укупну концентрацију, али се води рачуна да укупна концентрација не прелази познате нивое у крвној плазми. Због споре кинетике комплексирања протеина, постоје два екстремна услова симулација:

- један, у којем је везивање за протеин занемарено и
- други, у којем је везивање за протеин експлицитно укључено у прорачуне.

Ова два симулациона услова служе да илуструју специјацију непосредно после ињектовања и након извесног времена када се успостави равнотежа са протеинима.

Оно што се добија ново компјутерском симулацијом специјације метала у биолошким флуидима јесте:

- процена равнотежних концентрација слободних метала, лиганада и сортираних металних комплекса,
- релативна веза различитих аминокиселина са металима, са варијацијама било концентрација метала, било лиганада,
- релативна дистрибуција металних комплекса у функцији рН раствора,
- ефакти токсичних металних јона у природном балансу концентрација метал-лиганд,
- хемијске индикације избора одговарајућег детоксиканта у случају теже контаминације тешким металима,
- избор терапеутских хелатних агенаса за различите људске и животињске болести и
- потребне информације о обиму везивања метала за протеине у крви.

Ове информације су значајне хемичарима у разумевању реакција и равнотежа у живим системима. То може обезбедити поуздане индикације за медицинску превенцију и третман бројних обољења и болести.<sup>64</sup>

### 1.3.3. Методе за опис специјације у биолошким системима

У биолошким флуидима, већина јона метала је везана за протеине. У ствари, мали део њих је везан за лиганде мале молекулске масе (аминокиселине, биофосфате, карбоксилате или хидроксикарбоксилате). Слободни аква јони метала у биолошким флуидима постоје у екстремно ниским концентрацијама, па не могу имати значајну улогу у физиолошким процесима. Насупрот њима, метали везани за лиганде мале молекулске масе имају кључну улогу у биолошким процесима, као што су инестинална апсорпција, апсорпција у ћелијама, пренос у ћелијама и ренална екскреција. Разумевање ових процеса захтева прецизнија знања о пропорцијама између лиганда мале молекулске масе и протеин везаних фракција јона метала, и њихових равнотежа које одређују ове пропорције.

Специфичне експерименталне технике као што су гел филтрација, јонска хроматографија, ултрафилтрација, ултрацентрифугирање, AAS, GCMS, LCMS, ICP су у могућности да раздвоје и одреде метале који су везани за лиганде мале и велике молекулске масе. Раздвајање је веома важан аспект специјације елемената у траговима у биолошким узорцима. То подразумева купловање и примену директних техника раздвајања. Основни проблем при томе су мале (микрограмске) количине анализата. Идентификација је могућа једино ако је разматрана врста присутна у узорку и постоји аутентичан стандард за упоређивање. Са друге стране, развијени компјутерски програми који подржавају прорачуне равнотежа у вишекомпонентним системима се могу применити не само за прорачуне специјација лабораторијских раствора, већ и за симулацију у природним смешама металних јона и лиганда у биолошким системима.

Са аспекта састава елемената у траговима, биолошки флуиди, представљају уопштено хетерогене медије који садрже ћелије, протеине па чак и кристализоване честице. У студијама о саставу елемената у траговима биолошких флуида, често је неопходно да се поред одређивања укупног садржаја дефинише у којим хемијским формама се елементи у траговима појављују. Многи елементи у траговима су везани за макромолекуле (протеине, нуклеинске киселине, шећер ...) у биофлуидима. Поред ових фракција, јаким и инертном везом метални јони су везани за лиганде мале молекулске масе у биофлуидима (амино киселине, пептиди, биофосфати, аноргански јони...) који су знатно мобилнији. Не постоји општа техника за одређивање већине транзиционих јона метала у биолошким флуидима. Сваки јон метала, биолошки флуид и чак свака посебна фракција захтева примену специфичне инструменталне технике идентификације. Када је истраживана фракција квантитативно мала, примењене аналитичке технике не поседују одговарајући степен осетљивости. У таквим случајевима компјутерска симулација представља једину расположиву технику за процену пропорције везивања метала за сваку компоненту. Ради мониторинга дистрибуције метала са лигандима мале молекулске масе, број експерименталних техника је знатно ограничен због лабилности везивања ових врста. Већина сепарационих техника интерферира са овим равнотежама дајући погрешне резултате.

Убрзо по примени првих компјутерских програма који су подржавали прорачуне равнотежа у вишекомпонентним системима, већина од њих је примењена у координационој хемији, не само за прорачуне лабораторијских раствора већ и за симулације. Такви програми се у пракси данас све више користе у одређивању хемијских специјација у веома компликованим системима. Један од најшире коришћених програма за симулације је компјутерски програм ECCLES. Компјутерским програмима је неопходна богата и поуздана база података која садржи константе стабилности за све метал-лиганд интеракције које се могу десити у биолошким флуидима.

Недостатак оваквих прорачуна и модела је недоступност свих потребних података. У таквим случајевима константе стабилности бинарних и тернарних метал-

лиганд система се превасходно морају одредити, са посебном пажњом на оне који су најважнији и који се најјаче везују између себе, па се стога мора извршити добра процена. У идеалном случају, резултати прорачуна се могу потврдити извесним методама раздвајања или структурним техникама.

### 1.3.4. Компјутерски програми за симулације специјација у растворима

Прорачун концентрација врста у хемијској равнотежи је значајан због врло широке и разноврсне примене. Постоје два главна приступа. За равнотеже у гасној фази је лако извршити смањење слободне енергије система прилагођавањем парцијалних притисака реагенса, коришћењем стехиометрије базиране на експлицитним хемијским реакцијама, или не-стехиометријски приступ у коме се хемијске реакције не користе директно. Ово произилази из чињенице да постоје обухватне базе података стандардних слободних енергија структуре смеша у гасној фази, и чињенице која се односи на идеалне гасне смеше, да постоји једноставан однос између хемијског потенцијала врста, њихове стандардне слободне енергије, структуре и њиховог парцијалног притиска (или mol фракције).

За равнотежу раствора коју посматрамо као уопштenu кисело-базну равнотежу, уобичајено је да се измере равнотежне константе појединачних реакција и да се прорачунају концентрације врста решавањем једначине баланса масе. Овај приступ је први пут примењен у компјутерским програмима HALTAFALL и COMICS. У суштини, програм HALTAFALL се може користити за равнотеже типа чврсто-раствор и гасовито-раствор. Скуп података стандардне слободне енергије може бити добијен из података константи равнотеже, а који се могу употребити у конвенционалном алгоритму смањења слободне енергије. Овакви методи су употребљени у биолошким системима и вишефазним равнотежама.

Развој брзих компјутера са великим капацитетом меморија омогућио је симулације специјација сложених модела вишекoмпонентних система. За ту сврху развијен је већи број комерцијалних програма који користе приступ помоћу равнотежних константи. Поређења неких од њих су објављена 1977. године, а потом 1984. године. Де Робертис (*De Robertis*) је давао добру библиографију све до 1986. године, а још један рад о поређењу програма је издат 1988. године. Остали програми које ови аутори нису разматрали или који су касније објављени обухватају компјутерске програме: EQUIL, RAMESES, CSMC, SYSTAB, ESTA, INSOL, CHEMEQL и HYPHEN. Неки од најзначајнијих и највише коришћених компјутерских програма за специјације су HYSS, ECCLES, MINTEQA2, BEST/SPE, MEDUSA и JESS који ће надаље бити и детаљније описани.

#### 1.3.4.1. HYSS

Hyperquad Simulation and Speciation (HySS)<sup>65</sup> је компјутерски програм из групе компјутерских програма ©Protonic Software, направљен у више верзија (HySS1, HySS2, HySS2003, HySS2006, HySS2009) за Windows OS (95, 98, NT, 2000, XP) на персоналним рачунарима. Програм има две основне функције:

- симулацију потенциометријских титрационих кривих и
- израчунавање концентрација врста у раствору константне запремине са системом за приказ специјационих дијаграма.

У потенциометријској титрацији претпостављено је да је реакциони суд тако припремљен да је позната укупна количина сваког реагенса који се треба додати у реакциони суд, као и почетна запремина раствора. Концентрације реагенса су одређене вредностима почетне и крајње концентрације. Ако су ове две вредности

идентичне, концентрација реагенса биће константна. Такође, опсег рН вредности је потребно дефинисати.

У оба случаја, дефинисани хемијски модел се састоји од комплексних врста који се формирају у раствору или се у њему јављају као талог. Прорачуни се односе на равнотеже у растворима, и обухватају могућност формирања делимично растворљивих честица. Не постоје ограничења која би се односила на број презентованих реагенса или на број једињења која би се формирала. Потреба за израдом овог програма је била практична примена програма понуђених од Windows OS како би обезбедили корисницима већи степен флексибилности него што је то претходно било могуће, а односи се на унос и излаз података, а ради поједностављења употребе програма. Полазна основа им је био претходни програм HYPHEN, који се користи за равнотеже у растворима, док је новом програму као опција додат рад са равнотежом чврсто-раствор.

Структура софтвера HySS се заснива на томе, да је у суштини сваки прорачун концентрације слободних реагенса  $[A]$ ,  $[B]$  итд., одређен решавањем система једначина баланса масе:

$$T_A = [A] + \sum_i a_i \beta_i [A]^{a_i} [B]^{b_i} \dots + \sum_j p_j C_j \quad (94)$$

и

$$T_B = [B] + \sum_i a_i \beta_i [A]^{a_i} [B]^{b_i} \dots + \sum_j q_j C_j, \quad (95)$$

где су  $A$ ,  $B$  итд. реагенси;  $a$ ,  $b$ , ...,  $p$ ,  $q$ , итд. стехиометријски индекси,  $\beta$  представља (кумулативну) равнотежну константу, а количина  $C$  представља моларну концентрацију нерастворне врсте (количина чврсте компоненте подељена са запремином раствора) и користи се уколико има нерастворних врста. Приказ количине нерастворне супстанце као концентрација извршен је у програму HALTAFALL. Са сваким нерастворним, повезани су и производи растворљивости:  $K_j = [A]^{p_j} [B]^{q_j} \dots$

На почетку се претпостављало да се не формира чврста компонента и слободне концентрације су рачунате без величине  $C$  у једначини једнакости масе. Уколико би постојала могућност формирања талог, производ концентрације је поређен са одговарајућим  $K_j$ . Ако је производ већи не само да се укључује променљива  $C$ , већ се стандардној једначини додаје  $\ln K_j = p_j \ln[A] + q_j \ln[B] \dots$  и слободне концентрације се поново рачунају. Када је присутан талог, група једначина једнакости масе и једначина растворљивости су решене употребом Њутн–Рапсонове (*Newton-Raphson*) методе и то итерационим решавањем линеарних једначина.

Зато што је  $\partial T_A / \partial T_B = (\partial \ln K_j / \partial [A])[A] = p_j$ , итд., матрица коефицијената симетрична, можемо употребити бројчано стабилне Чолески (*Choleski*) факторизације раствора, било да се талог формира или не: када се чврста компонента раствори, одговарајући ред и колона ће просто бити занемарени.

Следећи проблеми се могу јавити приликом специјационих прорачуна, обзиром да је могуће да се одреди аналитичка константа  $T_A$  или слободна концентрација ( $A$ ) сваког реагенса. На пример, ниво рН може бити пре одређен него  $T_H$ . У том случају одговарајућа једначина једнакости масе је одбачена и унапред дата вредност слободне концентрације је искоришћена да би се решио преостали сет једначина. Наведени нумерички процес је кроз употребу FORTRAN-а преведен у динамички линковану библиотеку (DLB-DLL). DLL библиотеке користи програм (HySS), написан у 16-то битном Visual Basic-у 4 (VB4). DLL врши само нумеричке процесе, док код VB4 регулише улаз и излаз података, и тиме омогућава употребу Windows OS (Windows 3.xx



или Windows 95) задржавајући предност брзине добијене FORTRAN-ом за интензивније компјутерске задатке. HySS омогућава извршење припрема за прорачун и извршење прорачуна и израду специјационих дијаграма на једном месту. Не постоје ограничења која би у форми правила регулисала број реагенаса, једињења или делимично растворљивих производа који могу бити у систему. Могу се извршити три врсте прорачуна: (1) симулација титрационе криве, (2) прорачун концентрације врста у домену промена и (3) специјација за појединачне врсту услова (појединачно дата тачка).

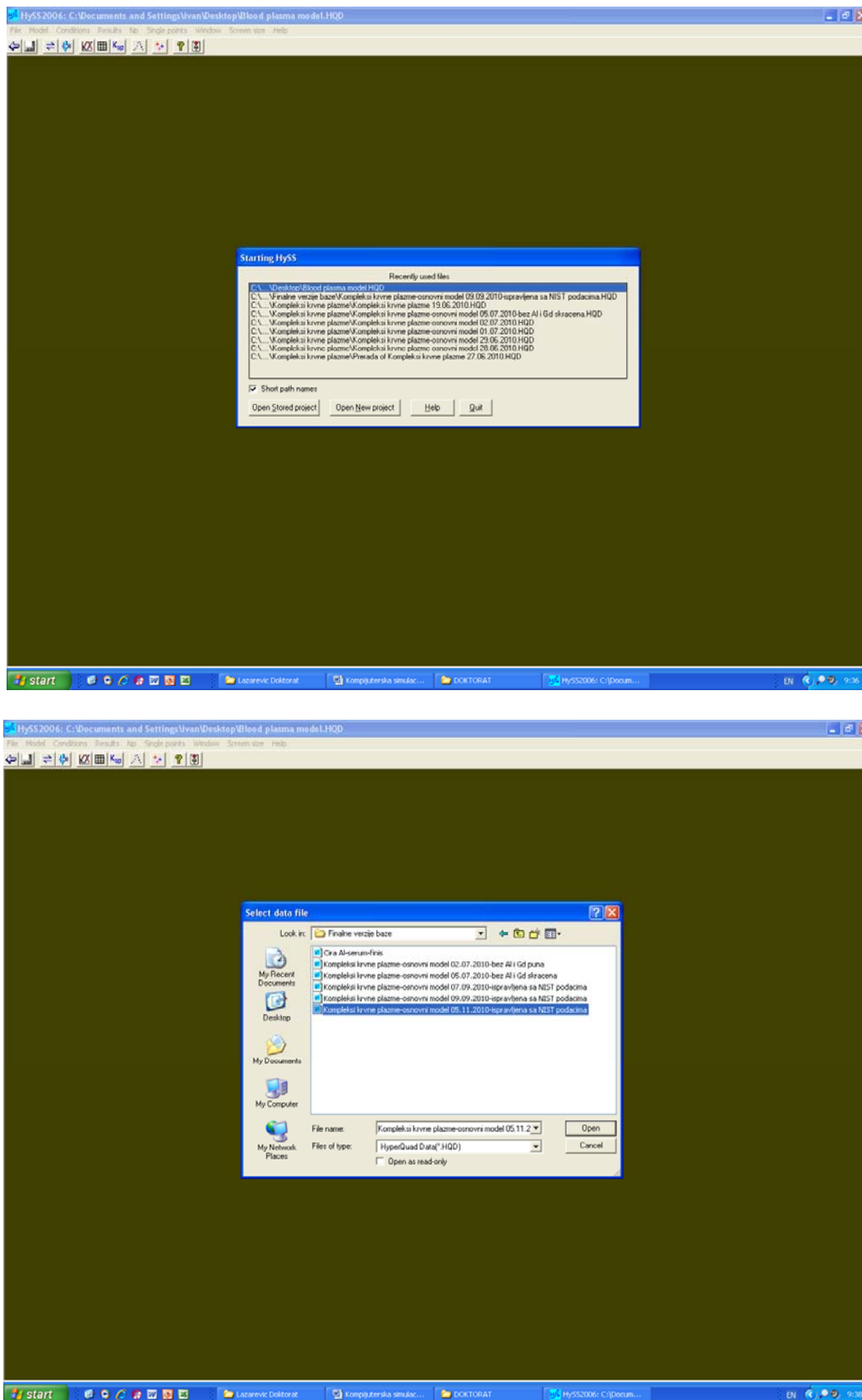
$$\begin{bmatrix} \frac{\partial T_A}{\partial [A]} [A] & \frac{\partial T_A}{\partial [B]} [B] \dots & \frac{\partial T_A}{\partial C_j} \dots \\ \frac{\partial T_B}{\partial [A]} [A] & \frac{\partial T_B}{\partial [B]} [B] \dots & \frac{\partial T_B}{\partial C_j} \dots \\ \frac{\partial \ln K_j}{\partial [A]} [A] & \frac{\partial \ln K_j}{\partial [B]} [B] \dots & \frac{\partial \ln K_j}{\partial C_j} \dots \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta [A] \\ \Delta [B] \\ \Delta C_j \\ C_j \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Delta T_A \\ \Delta T_B \\ \dots \\ \Delta \ln K_j \end{bmatrix} \quad (96)$$

Унос података се врши на екрану едитовањем двеју форми. Форма „модела“ (Model) омогућава да се унесу вредности равнотежне константе, производа растворљивости и/или стехиометријских коефицијената. Ова форма је уобичајена за сва три типа прорачуна. Употреба форме „услова“ (Conditions) варира у зависности од фактора. Уколико се изабере опција титрационе симулације, корисник уноси вредности почетне и крајње запремине и за концентрације реагенаса у бирети, али уколико је изабрана опција фиксне запремине само се ова вредност запремине уноси. Аналитичка вредност сваког реагенса се може подесити уношењем полазне количине реагенса у реакционом суду и у том случају прорачуни почетне и крајње концентрације ће бити приказани на екрану. Упоредо са наведеним, у специјационим прорачунима почетне и крајње вредности реагенса могу бити унете. На пример, дефинисање почетне и крајње рН вредности дефинисаће распон вредности у коме ће бити извршени специјациони прорачуни. За прорачуне појединачних тачака постоји посебан образац за унос било аналитичке концентрације реагенса, било вредности р (реагенс). Било који број појединачних тачака може бити унет. Сви ови подаци се чувају у фајлу и цео сет података може бити унет позивањем из фајла. Поред тога Nurequad подаци, могу бити унети.

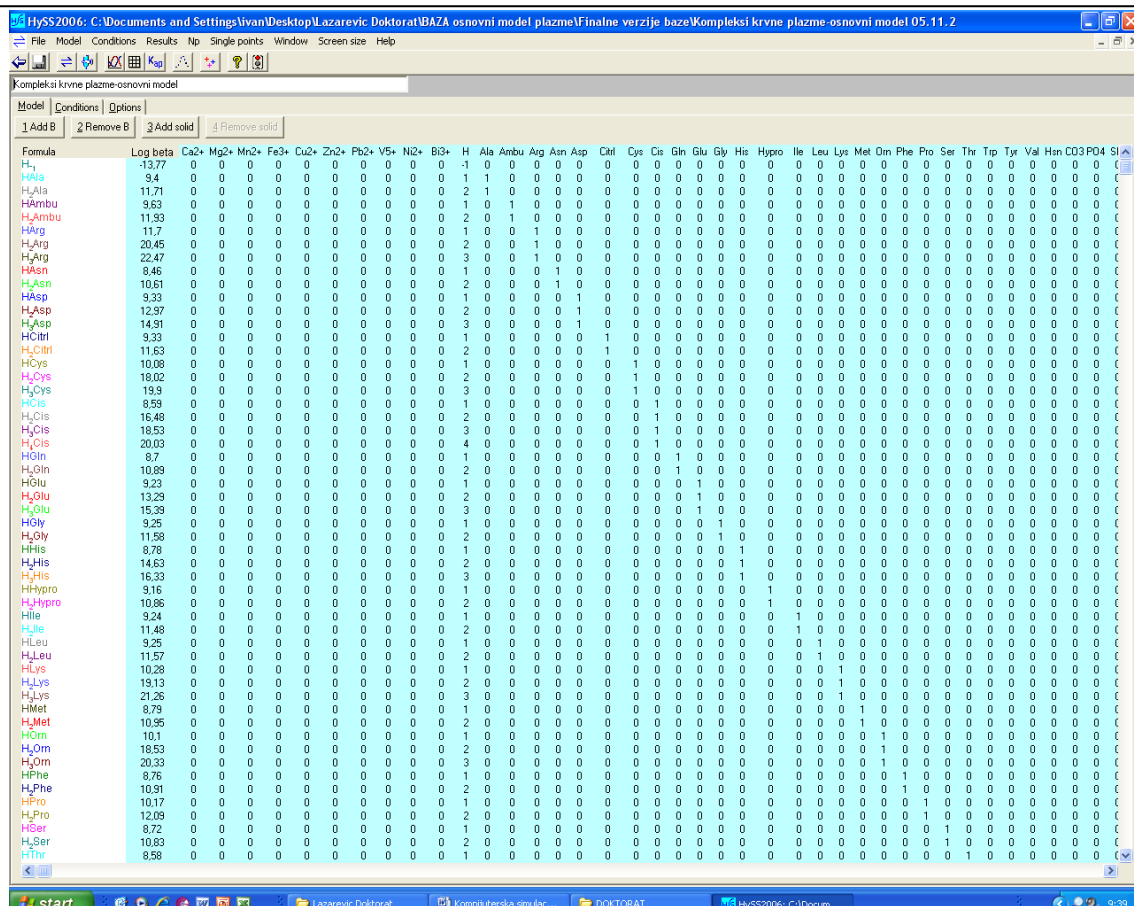
Главни прорачуни су иницирани одабиром графикана који треба да се нацрта или из табеле концентрација. Постоји 8 врста графикана која се могу приказати, а који ће бити доступан зависи од изабраног сета услова. У вези са тим, за симулацију титрације у којој су дате вредности аналитичких концентрација свих реагенаса, X-оса може приказивати вредности запремине титрационог средства, рН (уколико је јон водоника један од реагенаса) или вредност р(реагенс). Y-оса може приказивати концентрације врста, које се односе на аналитичку концентрацију једног од реагенаса или може приказати логаритам апсолутне концентрације. У другом наведеном случају, корисник може изабрати која концентрација врста ће се појавити на графу.

Графикони су нацртани у Windows Metafile формату тако да могу бити копирани у *clipbord* или сачувани у *x.WMF* фајлу. Постављањем на прикладно место хемијске формуле за приказане врсте, исте се могу повезати са одговарајућом кривом. Табеле концентрације приказују вредности слободних концентрација реагенаса и концентрације врста у форми табела одвојених табулатором које могу бити копиране у *clipbord* или сачуване у *x.TSV* фајлу. У сваком случају подаци из табеле се могу унети у најчешће употребљиве корисничке програме ради других прорачуна (као што је израчунавање кумулативне концентрације) или за израду других графикана. Број

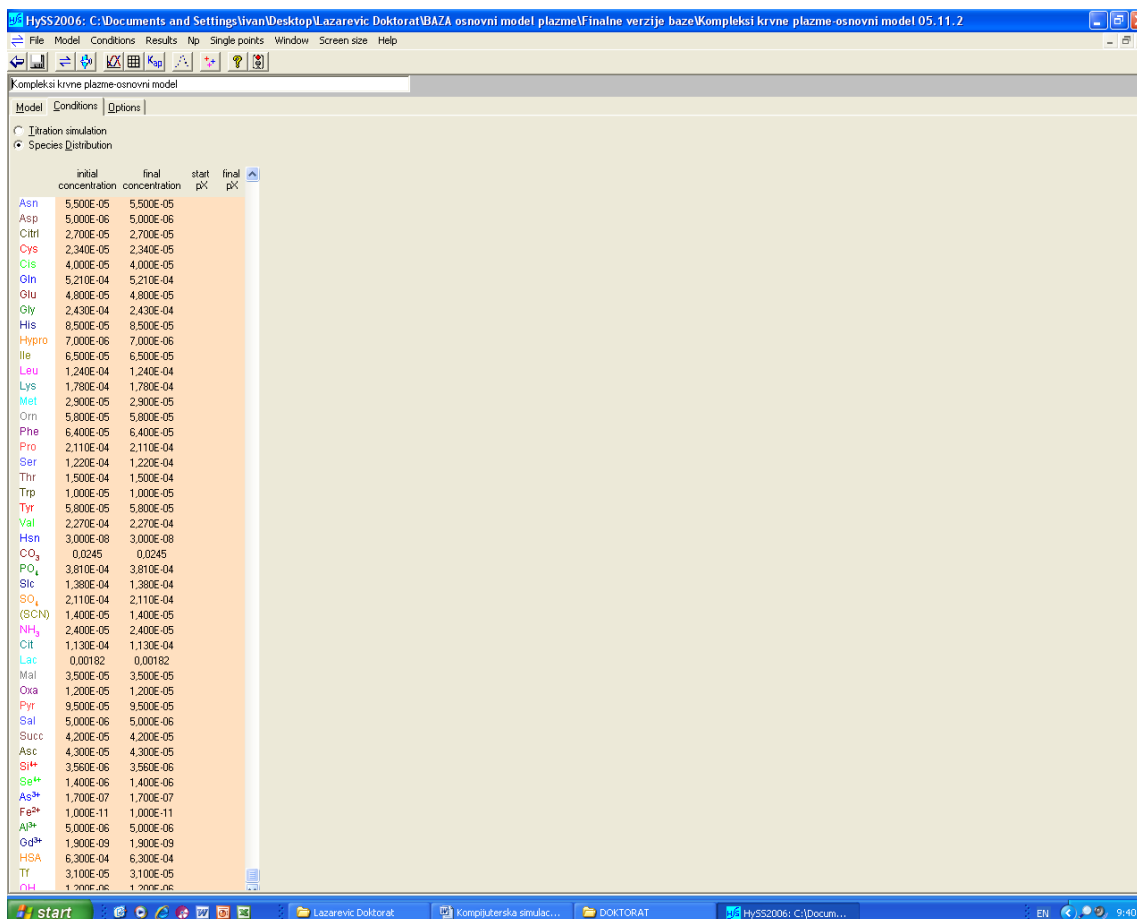
тачака у табели или на графикону се може изабрати (21, 51, 101, 201, 401 или 901), а избором најмање вредности врло брзо ће се завршити прорачунавање, а већи број тачака ће се користити код припреме графикона за штампу.



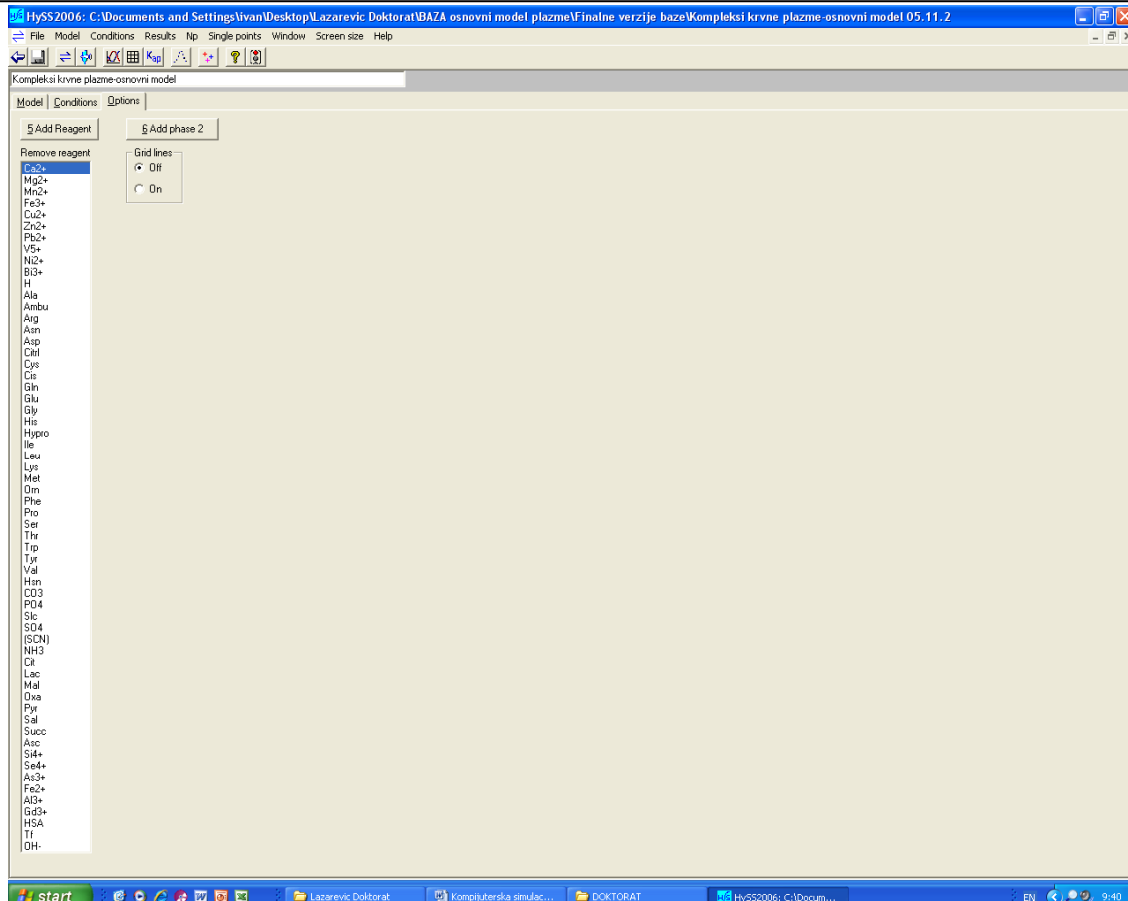
Слика 37. Активирање програма-почетна страница и отварање фајла базе у раду



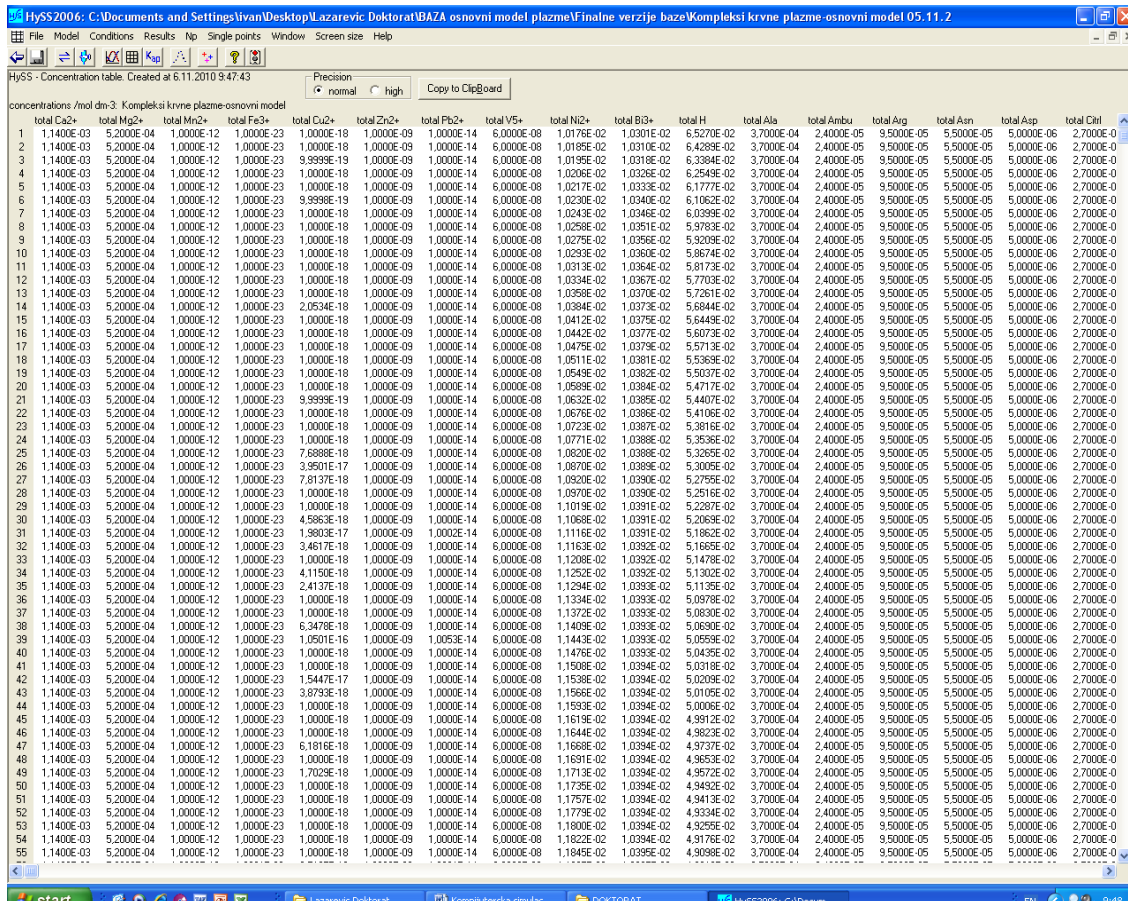
Слика 38. Маска програма за подешавање и унос података посматраног система



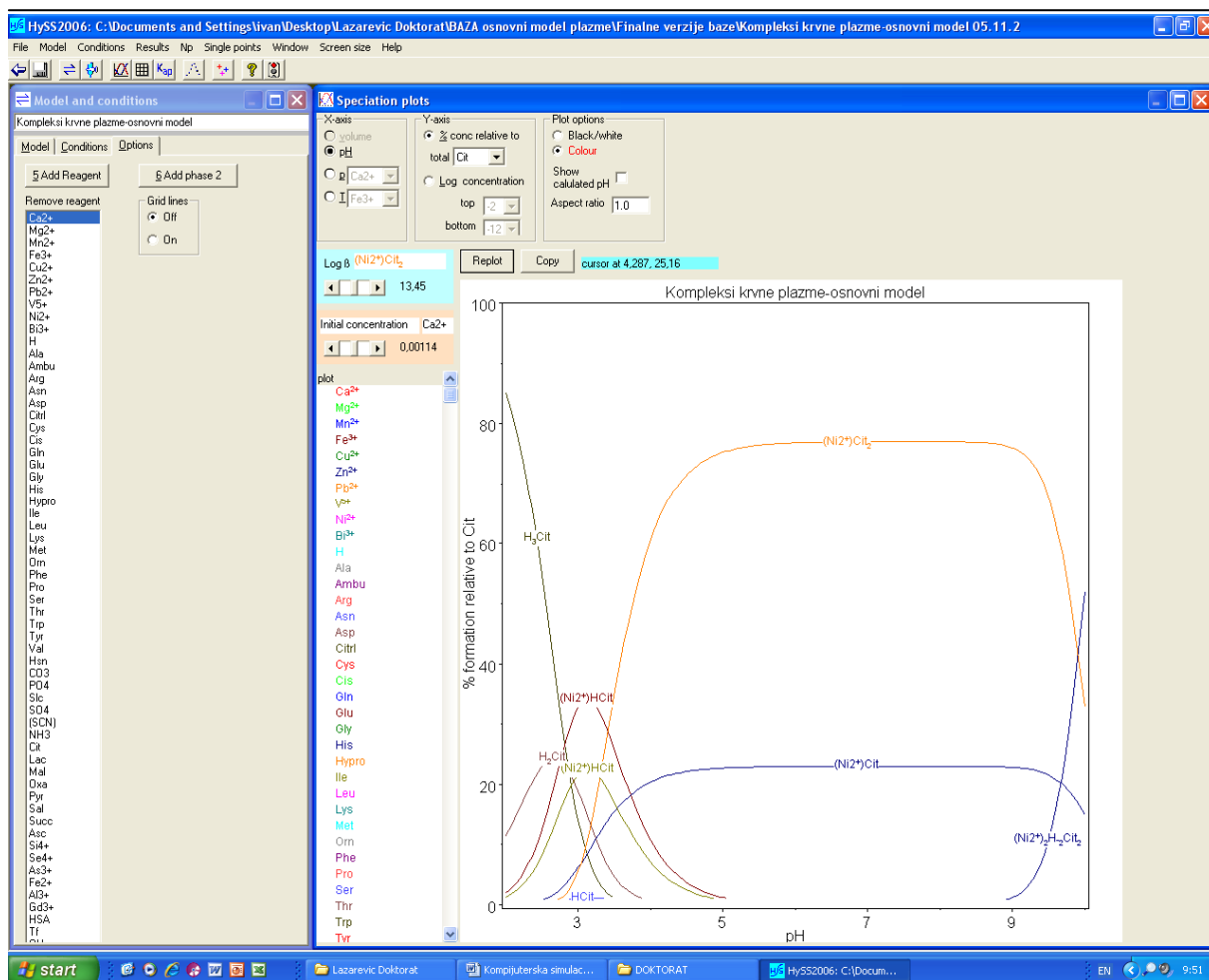
Слика 39. Маска за промену услова (концентрација) посматраног модела



Слика 40. Маска за додавање метала и лигананда у посматрани систем за симулацију



Слика 41. Маска за прорачун концентрација метала, лигананда и комплекса



Слика 42. Маска за приказ дистрибуционих дијаграма у посматраном систему

Ново у програмском софтверу HySS је потпуна флексибилност са којима се услови могу поставити за рачунање специјација и једноставним интерфејсом према осталим апликацијама Windows OS, као што су Word процесор или табеларни прорачуни (Excel), за резултате израчунавања. Такође, опција титрационих симулација може се ефикасно користити и у дидактичке сврхе.

Дијаграми које софтвер HySS производи подешени су са посебном пажњом да би се могли користити у рукописима који се припремају за публикавање. Стандардне величине дијаграма са ширинама 16,5 и 8,25 cm су прикладне за директну репродукцију у једној или две колоне странице формата A4 према препорукама Америчког хемијског друштва (*American Chemical Society*). Такође, одговарајуће написане хемијске формуле могу се написати према потреби и жељи у дијаграмима, једноставним опцијама и операцијама помоћу компјутерског миша. Дијаграми се могу памтити и као Windows Metafiles, као векторски графички фајлови омогућајући потребно подешавање величине. HySS садржи седам примера фајлова података који илуструју различите начине рада програма.

За програм HySS појам врсте означава једињење које садржи више од једног реактанта. На пример, у систему са два реактанта, базом L и протоном H, могу бити различите врсте (LH, LH<sub>2</sub>, LH<sub>3</sub>...). Хидролитичке врсте се приказују формулом MLH<sub>-1</sub>, али због начина како су равнотежне константе дефинисане, израчунате концентрације оваквих врста су идентичне као концентрације врста типа ML(OH). Појам стехиометријски коефицијенти се односи на бројеве mol реактаната у једном mol и они се у хемијским формулама пишу као коефицијенти.<sup>65</sup>

### 1.3.4.2. ECCLES

ECCLES (*Evaluation of Constituent Concentrations in Large Equilibrium Systems*)<sup>64</sup> је компјутерски програм намењен за процену концентрација компоненти у вишеккомпонентним системима. Настао је у тренутку када су постојећи програми за специјације COMICS, SCOGS, MINQUAD, LETAGRUP и HALTAFALL били неадекватни за изучавање модела који су поставили Меј (*May*) и сарадници. Служи за предвиђања и описивање *in vivo* понашања испитиваних система метал-лиганд. Најзначајнија предност овог програма је могућност прорачуна модела који садрже до 50 металних јона и око 100 лиганата истовремено, као и то што даје тачне концентрације сваког комплекса приликом смањења концентрација компонената као и релативне проценте (%) сваке компоненте. Крајњи резултат такође приказује индивидуално сваки метал или лиганд са одговарајућом концентрацијом и релативним процентом (%). Програм се заснива на трострукој процедури апроксимација која даје брзу конвергенцију, док у исто време одржава значајно мањим компјутерске захтеве него у случају употребе програма COMICS. Програм захтева константе стабилности комплекса, вредности концентрације металних јона и лиганата ради израчунавања дистрибуција компонената на датој вредности рН. Најкраћи опис програма ECCLES се заснива на једначини формирања типичног протонисаног металног комплекса  $iM + jL + kH^+ \rightarrow M_iL_jH_k$  са константом  $\beta_{i,j,k} = \frac{M[M_iL_jK_k]}{[M]^i[L]^j[H]^k}$  у којој су ради једноставности избачена наелектрисања. Систем је описан серијом једначина баланса масе за сваку компоненту. Укупна једначина баланса масе за метални јон је

$$T_m = X_m + \sum_q iC_q, \quad (97)$$

где је  $T_m$ -аналитичка концентрација јона метала,  $X_m$ -концентрација слободног-некомплексираниог металног јона,  $C_q$ -концентрација комплексне врсте  $q$ , и  $i$ -стехиометријски коефицијент металног јона у комплексима врстама  $q$ . Када се унесу захтевани подаци (почетна концентрација метала, лиганда, рН, и константе стабилности), ECCLES програм користи једначину са три модификације конвергенције преко Гаус-Њутновог (*Gauss-Newton*) процеса минимизације да би израчунао крајње дистрибуције врста у раствору.

#### Опис алгоритма компјутерског програма ECCLES

Потребно је пронаћи слободне концентрације компонената у вишеккомпонентном систему метал-лиганд који је у равнотежи. Концентрација сваке комплексне врсте се одређује по једначини (92). Решење се постиже итеративним побољшањима процењених слободних концентрација док се не задовоље једначине баланса масе за сваку компоненту по једначини (93). Постоји читав низ применљивих техника оптимизације ради уопштавања проблема, али је примењена одговарајућа процедура која је погодна за велике системе који се проучавају. Првих неколико итерација се заснивају на једначини

$$X_m^n = \frac{T_m^r X_m^o}{X_m^o + \sum_j [G_j S_j^o k(m, j)]} \quad (98)$$

где је  $G_j^i = \prod_i (T_i^r / T_i^c)^{k(i,j)} / (T_m^r / T_m^o)$  апроксимација  $G_j = \prod_i (X_i^r / X_i^c)^{k(i,j)} / (X_m^r / X_m^o)$ .

Показало се да једначина (98) може конвергирати у  $X_m^t$  обезбеђујући да су све почетне  $X_i^0 > X_i^r$ . Овај захтев је аутоматски задовољавајући у дефиницији  $G_j^i$  у којој су почетне вредности за  $X_m^0$  узете као једнаке укупним реалним концентрацијама,  $T_m^r$ . Ових неколико првих итерација брзо производе вредности које су у близини раствора. Са бројем итерација као критеријумом, ово уређивање може се применити као искључиво.

Надаље ће израз  $X_m^n = X_m^o (T_m^r / T_m^c)$  увек конвертовати  $X_m^0$  у вредност  $X_m^n$  која је мања него жељена реална концентрација. Кад би се израз који су користили Перин (*Perrin*) и Сејс (*Sayce*) у програму COMICS преписао као  $X_m^n = X_m^0 [T_m^r / (T_m^r T_m^c)]$ , именилац би био између вредности  $T_m^c$  која би пребацила и  $T_m^r$  која не би производила побољшање. По завршетку примене једначине  $X_m^n = \frac{T_m^r X_m^o}{X_m^o + \sum_j [G_j^i S_j^o k(m, j)]}$ , програм се

преусмерава у средњу фазу у којој се итерациона формула Перина (*Perrin*) и Сајса (*Sayce*),  $X_m^n = X_m^o (T_m^r / T_m^c)$  користи у потпуности а захтева знатно мање прорачуна од претходне. По достизању овог нивоа, израз  $X_m^n = X_m^0 [T_m^r / (T_m^r T_m^c)]$  се користи као резервни циклус за итерације. То побољшава стопу конвергенције у крајњим фазама.<sup>64</sup> Значења симбола коришћених у опису алгоритма ECCLES компјутерског програма описана су у списку ознака докторске дисертације.

### 1.3.4.3. MINTENQA2

У неким радовима за симулацију дистрибуције  $Gd^{3+}$  специјације у хуманом инестиналном флуиду коришћен је MINTENQA2 програм који је развијен у америчкој агенцији за заштиту природне околине. MINTENQA2 је геохемијски модел који има могућност израчунавања равнотежа водених специјација, адсорпције, гасно фазних подела, стања засићења чврстих фаза и преципитације-растварања метала. MINTENQA2 може решити широк опсег проблема хемијских равнотежа. Модел садржи екстензивну термодинамичку базу података која садржи равнотеже метал-лиганд-протон, формирање хидроксида, растворљивост, адсорпцију, коначно чврсте, могуће чврсте, искључене врсте, јонску јачину као и температурне детаље.

### 1.3.4.4. BEST/SPE

Програм BEST/SPE<sup>68</sup> публикован је 1982. године, и основни алгоритам програма се заснива на једначини баланса масе за све врсте присутне у раствору. Концентрација сваке компоненте у једначинама баланса масе могу се написати за лиганде, метале, рН, и индивидуалне константе стабилности. Програм BEST/SPE захтева уобичајене титрационе податке (почетне концентрације метала и лиганата са рН вредностима у свакој титрационој тачки у експерименту). Програм након тога користи једначине баланса масе да би направио почетне претпоставке у првом сету константи формирања, након чега врши њихову итерацију Њутн-Рапсоновом (*Newton-Raphson*) методом за решавање истовремених једначина. Процес подешавања се прекида када се уочи непостојање побољшања и кад се постигне најбоље „фитовање“ (подешавање), титрационих кривих. Најбоље подешавање је постигнуто када су квадрати разлика између измерених и компјутерских вредности рН достигли минималну вредност.

Програм SPE је дизајниран као специјациони програм један иза другог са резултатима програма BEST, и као такав представља паралелу програму ECCLES, осим екстра графичке компоненте. Програм SPE захтева једино константе стабилности и почетне концентрације метала и лиганата ради цртања комплетних специјационих дијаграма. У неким радовима, компјутерски програми BEST/SPE и ECCLES су коришћени симултано у одређивању концентрација металних комплекса присутних у хуманој крвној плазми.

#### 1.3.4.5. MEDUSA

Софтвер сачињавају три главне компоненте: HYDRA (*Hydrochemical Equilibrium Constant Database*), MEDUSA (*Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms*) и INPUT, SED и PREDOM софтверски пакети.

HYDRA је софтвер који се користи за креирање фајлова података из равнотежних константи које су доступне у електронској бази података. Она представља Windows апликацију која креира улазне фајлове за SED и PREDOM софтверске пакете. Програм користи базу података која је развијена у *Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*. MEDUSA је компјутерски програм намењен за израду равнотежних дијаграма. Она је Windows интерфејс за INPUT, SED и PREDOM софтверски пакет.

INPUT, SED и PREDOM су MS-DOS софтверски пакети који креирају хемијске равнотежне дијаграме. Овај софтверски пакет нема у себи податке о равнотежним константама, већ корисник мора унети расположиве равнотежне константе у електронску базу. INPUT барата фајловима података (креирање, едитовање, ...), застарео је и потиснут је програмом MEDUSA. SED служи за креирање дијаграма фракција (дистрибуција врста дате хемијске компоненте), логаритамских дијаграма (концентрација у логаритамској скали за све врсте у хемијском систему) и дијаграма растворљивости (укупне растворене концентрације у функцији слободних концентрација). PREDOM креира предоминантне просторне дијаграме. Улазни и излазни фајлови су plain text files. Улазни фајлови за SED и PREDOM имају имена која се завршавају на "x.DAT" и морају се писати у складу са посебним input-file форматом. Дијаграми имају имена фајлова који се завршавају са "x.PLT" и садрже графике у посебном plot-file формату. Фајл CU.DAT је улазни фајл за програм SED и фајл CU-S-O.DAT је пример за програм PREDOM. TEST.PLT је тест фајл за цртање. Остали примери улазних и фајлова за цртање могу се пронаћи у суб-директоријуму "\\EXAMPLES".

#### 1.3.4.6. MINEQL+

MINEQL+ је једноставан софтвер за моделовање система хемијских равнотежа, за израчунавање у воденим системима у температурном опсегу од 0-50°C и малим и средњим јонским јачинама (<0,5 mol). MINEQL+ је програм који користи податке па не постоји потреба његовог програмирања. То поједностављено значи да је потребно креирати систем селектовањем хемијских компоненти из понуђеног менија, претражити термодинамичку базу података и покренути израчунавања. Међутим, програм такође обезбеђује алате који омогућавају контролу реакционих података, креирање термодинамичке базе података, извршавање синтетичких титрација ... Програм се заснива на два извора моћи. Прво, његова нумеричка машина је модификована верзија оригиналног MINEQL развијеног средином 1970-тих, који је постао стандард за пуно осталих модела хемијских равнотежа. Друго, MINEQL+ користи термодинамичку базу података која садржи целокупну USEPA MINEQA2 базу података са подацима за хемијске компоненте које ЕРА не садржи, тако да су сви



прорачуни компатибилни са ЕРА спецификацијама. Софтвер ради под Windows OS (Vista/XP/98/2000/NT).

### 1.3.4.7. JESS

JESS (*Joint Expert Speciation System*)<sup>66</sup> је истраживачки софтвер који служи за моделовање хемијских специјација у комплексним воденим растворима. Програм захтева поседовање експертског знања хемије раствора и обухвата преко 250 програма, 2000 суб-рутина, око 234000 линија Фортран кода, а у термодинамичкој бази података око 72000 реакција и око 215000 константи. Примењује се под Windows OS XP. У већини JESS моделовања, специјација се прорачунава коришћењем познатих термодинамичких параметара за релевантне реакције у воденим срединама. Сви типови хемијских равнотежа могу се моделовати, укључујући протоновање, формирање комплекса, редокс, растворљивост и интеракције апсорпције. Подаци се узимају из JESS базе података, трансформишу у термодинамички сет једначина и решавају. Аутоматизација ове процедуре JESS програмом је кључна процедура доброг равнотежног моделовања. Бављење разлозима зашто су модели хемијских специјација од различитих истраживача противречни, једна је посебних прилаза програма JESS. Програм садржи неколико великих равнотежних модела са кинетичким прорачунима. Развој JESS термодинамичке базе података је у овом тренутку унапређен. Систем је превладао многе проблеме који су постојали са постојећим компилацијама равнотежних константи. Она је у потпуности интерактивна. Реакције се могу исказати у било којој форми. Било које вредности равнотежних константи, енталпије, ентропије и Гибсове (*Gibbs*) енергије могу бити придружене са реакцијом. Распон података интеракција у раствору садржи преко 100 металних јона са преко 3000 лигананда. Делови програма JESS олакшавају формирање суб-база података са разменом података између база.

Основне карактеристике термодинамичке базе података су:

- Подаци су генерално приближни начину на који су они приказани и појављују се у литератури и једино су од стране програма прилагођени ради постизања термодинамичке конзистентности. JESS база података је највећа база података која се може користити директно од стране програма за моделовање хемијских специјација.
- Обзиром да се реакције третирају на уопштен начин, JESS се односи према многим типовима хемијских интеракција на начин какав остале базе података нису у могућности. Гибсова (*Gibbs*) енергија и топлота формирања врста од елемената у њиховим стандардним стањима се због тога користи као додаток реакцијама везивања типа метал-лиганд и лиганд-протон.
- За разлику од осталих компилација равнотежних константи, формирање тернарних комплекса је представљено бинарним реакцијама. Подаци се због тога могу пронаћи директно претраживањем металног јона и укључених лиганда. JESS база података представља највећи појединачни извор тернарних равнотежних константи.
- Хемијске супстанце су индексирани по имену, молекулској формули, и често по CAS регистарском броју. Уопштено, JESS софтвер поседује много варијанти хемијских имена од оних која се налазе у алтернативним изворима.
- Свака вредност термодинамичког параметра је приказана са условима под којим су мерења вршена, (електролит, температура, јонска јачина, литературни извор, процена поузданости ...). Овакав начин JESS базу чини свеобухватном и критичком.

У већини JESS моделовања, специјација се прорачунава коришћењем познатих термодинамичких параметара за релевантне реакције у воденим срединама. Сви типови хемијских равнотежа, укључујући протоновање, формирање комплекса, редокс реакције, растворљивост и адсорпција, могу се моделовати. Варијације у релативној количини компоненти, јонској јачини, температури као и рН раствора се у потпуности

---

узимају у обзир. Профил свих присутних врста је постигнут, без обзира колико мало од сваке врсте може бити присутно. Израчунавања су због тога посебно корисна када систем није одговоран експерименталном истраживању, било због тога што је сувише компликован или је изван аналитичког опсега. Обзиром да су специјациони модели термодинамички засновани, не емпиријски, њихови резултати су увек значајни, у крајњем унутар ограничења доступних термодинамичких података.

JESS програм пружа могућност приступа кинетичким моделима равнотежа. Обзиром да кинетички феномени зависе умногоме од преовлађујућих услова и да не постоје фундаментални подаци који су еквивалентни онима за хемијску равнотежу, кинетички модели су много више лимитирани него термодинамички у погледу њихових могућности предвиђања. Ови модели могу помоћи да се идентификују кључни фактори који су познати о систему.<sup>66</sup>

## 1.4. Хумана плазма као средина у којој се формирају комплекси

### 1.4.1. Крвна плазма

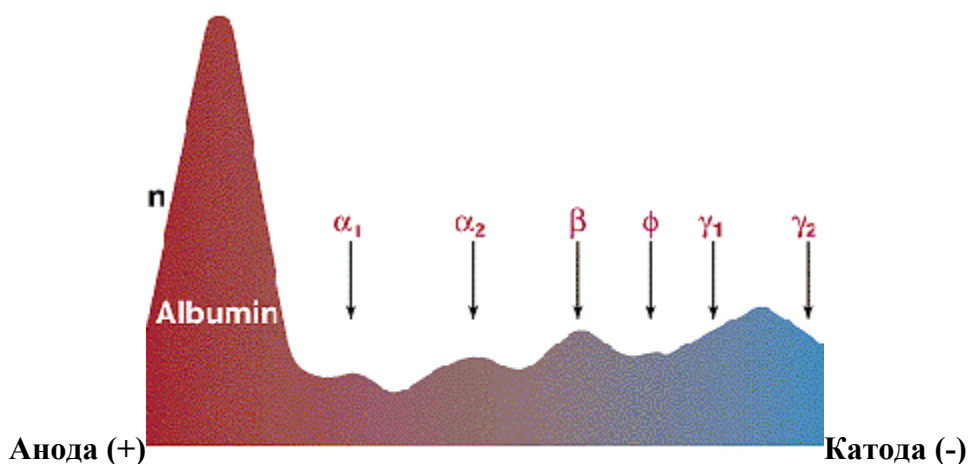
Крвна плазма је жућкаста течност која се добија након центрифугирања крвних елемената. Чини је вода, у којој су растворене соли и беланчевине. Ван ћелијска је течност која се добија када се из незгрушане крви издвоје крвне ћелије. Сама реч плазма је грчког порекла и значи *стварање*. Физичке особине плазме су: *количина, боја, специфична тежина, вискозност, осмотски притисак и рН*.

Количина плазме у организму износи око 41 cm<sup>3</sup>/kg телесне масе, што чини више од половине целокупне запремине крви (2750-3300 mL плазме у телу одраслог човека). Смањује се при повећаном знојењу, а у току трудноће може се повећати чак и до 30%.

Боја крвне плазме и серума је жућкаста и бистра. Делом, она потиче од билирубина који настаје разградњом хемоглобина, а делом од обојених супстанци каротина. При повећању билирубина у крви, боја крвне плазме је интензивно жута или жуто-мрка. Ненормално распадање еритроцита повлачи и промену боје плазме у ружичасту до црвене, због појаве хемоглобина у плазми.

Крвна плазма не садржи црвене и беле крвне ћелије (еритроците и леукоците). Садржи око 90% воде, у којој су растворене анонске соли, а највише кухињске соли (NaCl), и то око 9 g у литру плазме (0.9% односно 0.15 mol/dm<sup>3</sup>).

У крвној плазми се налази велика количина различитих беланчевина од којих су најзначајнији: албумини, глобулини и фибриноген. Беланчевинама крвне плазме је задатак пренос појединих хормона, имунолошка одбрана од микроорганизама као противтела (гама глобулин), те у згрушавању крви (фибриноген). Приближно половину укупних протеина плазме чини протеин албумин. Он је транспортни протеин за велики број различитих молекула. Слободна аминок група на N-крају важна је у транспорту „метала у траговима“ (Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>). Важан је за одржавање осмотске равнотеже, јер велико смањење његовог нивоа у крви може довести до отицања ткива ради задржавања воде. Од укупне количине глобулина 3% су α1-глобулини (важни за транспорт липида), 7% α2-глобулини (важни за транспорт гвожђа и бакра), 9% β-глобулина (важни за транспорт гвожђа и липида) и 17% γ-глобулина (важни за имуно систем). Велики број „правих“ протеина плазме су транспортни протеини. Трансферин специфично веже Fe<sup>3+</sup>, церулоплазмин специфично веже Cu<sup>2+</sup>, хаптоглобин веже димере хемоглобина који настају разградњом тетрамера након прераног распада еритроцита у циркулацији. Протеине плазме је могуће раздвојити електрофорезом.



Слика 43. Раздвајање протеина плазме електрофорезом на рН=8.8

У значајним количинама у плазми су присутни три изотопа (IgG-75%, IgA-20% IgM-5%).

У крвној плазми се налази и шећер и то око 1 грам у литри (5.5 mmol/dm<sup>3</sup>). Шећер (претежно глукоза) има важну улогу у обезбеђивању ћелија тела глукозом коју ћелије користе као извор енергије за свој рад. У крвној плазми налази се и извесна количина масти.

Глукоза, аминокиселине, липиди и неоргански јони се у плазми налазе унети из хране, уреа и мокраћна киселина долазе као продукти метаболизма, протеини имају основну улогу у заштитној функцији тела, а хормони обављају функцију молекула који се крећу између органа преко крви.

Специфична тежина плазме и серума је мања од специфичне тежине крви (1.015-1.030), а то је због тога што у крви имамо и еритроците. Специфична тежина плазме зависи од концентрације беланчевина. Може се измерити пикнометром.

Вискозност крвне плазме и серума је три пута мања од вискозности крви, и највише зависи од односа албумина и глобулина. Повећање количине глобулина повлачи и повећање вискозности плазме.

Осмотски притисак плазме је скоро исти као и код крви. Зависи од броја честица растворених у њој: катјона и анјона разних електролита, молекула органских једињења и колоидних честица.

рН плазме је од 7.2-7.6. Крвна плазма је слабо базна, а у односу на крв је слабо базне реакције јер се при издвајању плазме из ње губи одређена количина CO<sub>2</sub>. Што се тиче хемијског састава крвне плазме она садржи велики број органских и неорганских супстанци. Неорганске супстанце су вода и неорганске соли. Вода чини од 90-92% крвне плазме и њена количина је стална. Вода из плазме чини део ванћелијске воде и током живота, њен проценат у плазми се мења.

Неорганске соли чине око 0.8% крвне плазме и налазе се у виду катјона, анјона и олигоелемената. Катјони су: натријум, калијум, калцијум и магнезијум. Најважнији анјони су: хлориди, хидрогенкарбонати, фосфати и сулфати. Олигоелементи су: гвожђе, бакар, манган, кобалт, јод и др.

Органске супстанце су: беланчевине, липиди, угљенохидрати, витамини, ензими и хормони. Беланчевине су највећи чврсти састојак крвне плазме. Деле се у три групе: фибриноген, албумини и серум глобулини. Фибриноген је најзначајнија беланчевина у коагулацији крви. По хемијском саставу спада у глобулине. Ствара се искључиво у јетри. Количина у плазми је од 0.3-0.5g %. Албумини су заступљени у плазми од 3.5-5.0g %. Стварају се у јетри и улога је у одржавању осмотског притиска крви. Глобулина има у крвној плазми од 2-3 g %.

Липиди, чија количина варира у крвној плазми зависно од врсте хране и времена које је протекло од оброка до времена узимања крви за одређивање липида. Угљени хидрати су у већини у облику глукозе. Њена концентрација у крвној плазми је од 80-120 mg %, али се после оброка повећава до 200 mg % да би се за 2-3 сата вратила на нормалну.

Витамини су у крвној плазми заступљени у врло малим концентрацијама (Витамин А 0.025 mg %, Витамин Б1 0.0005 mg %, Витамин Б2 0.0008 mg %, Никотинска киселина 0.03 mg %, Витамин Б5 0.012 mg %, Витамин Б9 0.0017 mg %, Витамин Ц 0.75 mg %).

Ензими потичу од гуштераче, јетре, мишића и крвних ћелија. Најпознатији су: фосфатазе, пептидазе, амилазе и трансминазе. У крвној плазми се налазе хормони свих жлезда са унутрашњим лучењем. Њихове количине су врло мале.

Улога плазме је вишеструка. Најзначајнија је транспортна, улога у регулацији рН крви, ћелија ткива, улога у хемостазу и хомеостазу. Транспортна улога се састоји у преносу многобројних супстанци до и од појединих ткива и органа. Обрамбена улога се остварује преко гамаглобулина из којих се стварају антитела против микроорганизама.

Улога у регулацији рН крви осигурава се преко органских и неорганских састојака плазме. Улога у хемостазу остварује се преко коагулације крви. Преко крвне плазме из органа за варење доносе се различити електролити и друге материје и предају се међућелијској течности а ове ћелијама.

**Табела 14.** Референтне вредности концентрације ( $\text{mol/dm}^3$ ) за јоне мале молекулске масе у плазми

Молекул/Јон	$\text{mol/dm}^3$
Хлор ( $\text{Cl}^-$ )	$(96-106) \times 10^{-6}$
Натријум ( $\text{Na}^+$ )	$(136-146) \times 10^{-6}$
Калијум ( $\text{K}^+$ )	$(3.8-5.2) \times 10^{-6}$
Слободни калцијум ( $\text{Ca}^{2+}$ )	$(2.3-2.7) \times 10^{-6}$
Магнезијум ( $\text{Mg}^{2+}$ )	$(0.8-1.2) \times 10^{-6}$
Бикарбонат ( $\text{HCO}_3^-$ )	$(24-28) \times 10^{-6}$
Аноргански фосфати ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	$(0.6-1.6) \times 10^{-6}$
Глукоза	$(4.5-5.5) \times 10^{-6}$
Не протеински азот	$(15-30) \times 10^{-6}$
Уреа	$(3.5-7) \times 10^{-6}$
Креатинин	$(70-140) \times 10^{-6}$
Креатин	$(25-70) \times 10^{-6}$
Триглицериди	$(0.6-2.4) \times 10^{-6}$
Холестерол	$(4-6.5) \times 10^{-6}$
Лактат	$(1-1.8) \times 10^{-6}$
Пируват	$(0.05-0.2) \times 10^{-6}$
Органске киселине	$(4-6) \times 10^{-6}$
Слободне масне киселине	$(0.3-0.9) \times 10^{-6}$
Фосфолипиди	$(2-3) \times 10^{-6}$
Ацетоацетат	$(0.1-0.3) \times 10^{-6}$
Аланин	$(0.2-0.6) \times 10^{-6}$
Мокраћна киселина	$(0.1-0.4) \times 10^{-6}$

#### 1.4.2. База података крвне плазме-компјутерски модел крве плазме

Број могућих реакција хемијских равнотежа који се могу десити у хуманој крвној плазми је многобројан. Хумана крвна плазма као динамички систем (медијум) садржи изванредан број различитих металних јона и велики број лиганата мале моларне масе.

Меј (*May*) и сарадници су конструисали компјутерски модел хумане крвне плазме у покушају да израчунају концентрацију свих могућих врста у равнотежи и да објасне неколико клиничких обсервација. Овај модел покушава да симулира равнотеже комплексирања које се дешавају у крвној плазми и састоји се од 40 лиганата, 9 металних јона и око 5000 комплекса.<sup>64</sup>

За потребна израчунавања са овом великом базом података пројектован је посебан компјутерски програм ECCLES. У већини радова, ова база се користи као база у коју се додају одговарајуће константе и врсте јона који представљају предмет изучавања и симулација.

Константе се уносе из расположивих литературних података, а у случајевима где су исти системи проучавани од стране неколико аутора, резултати су критички сагледавани и селектовани. У ситуацијама кад су константе биле потенцијално важне а за њих нису постојали расположиви подаци, вредности су процењиване или употребом релација линеарне слободне енергије (LFER) или по хемијској аналогiji. Формирање комплекса мешовитих лиганата дешава се нашироко у биолошким флуидима, што се

показало као веома важно. Избор лиганада мале молекулске масе за модел који се проучавао, Меј (*May*) и сарадници (табела 15) су изабрали на основу критеријума њихове концентрације и расположивости и важности података константи формирања за комплексе метал-лиганд. Већина концентрација представљају средње вредности од неколико публикованих. Неке од концентрација лиганада (салицилат и триптофан) су умањене. Уреа, масне киселине, билирубин и фолна киселина су искључене из модела због тога што су оне готово потпуно везане за протеине. Метални јони  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  су одабрани је су најзаступљенији у хуманој крвној плазми и њихова биолошка улога је најпознатија и истражена. Проблеми који се односе на везивање протеина и метала онемогућују дефинисање недвосмисленог скупа концентрација сем у случају  $\text{Ca}^{2+}$ . Стога, у симулацији дистрибуције осталих металних јона између комплекса мале молекуларне масе, одлучено је да се покрије опсег веродостојних слободних концентрација за сваки, док се процењене средње вредности приказују у заградама. Процењене средње вредности и концентрације за слободне металне јоне приказане су у табели 15.

**Табела 15.** Укупне концентрације лиганада и металних јона који се користе као компјутерска база података у хуманој крвној плазми ( $\text{mol/dm}^3$ )<sup>64</sup>

Компонента	[ $\text{mol/dm}^3$ ]	Компонента	[ $\text{mol/dm}^3$ ]
<b>Протеини</b>		<b>Неоргански лиганди</b>	
Хумани серум албумин (HSA)	$7.2 \times 10^{-4}$	Карбонат ( $\text{CO}_3^{2-}$ )	$2.5 \times 10^{-2}$
Трансферин (Tf)	$2.5 \times 10^{-5}$	Фосфат ( $\text{PO}_4^{2-}$ )	$1.6 \times 10^{-3}$
<b>Аминокиселине</b>		Тиоцијанат ( $\text{SCN}^-$ )	$1.4 \times 10^{-5}$
Аланин (Ala)	$3.7 \times 10^{-4}$	Силикат (Sil)	$1.4 \times 10^{-4}$
Аминобутират (Ambu)	$2.4 \times 10^{-5}$	Сулфат ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	$2.1 \times 10^{-4}$
Аргинин (Arg)	$9.5 \times 10^{-5}$	Амонијак ( $\text{NH}_3^-$ )	$2.4 \times 10^{-5}$
Аспарагин (Asn)	$5.5 \times 10^{-5}$	ОН <sup>-</sup>	$1.2 \times 10^{-6}$
Аспарат (Asp)	$5.0 \times 10^{-6}$	<b>Карбоксилне киселине</b>	
Цистеин (Cys)	$2.3 \times 10^{-5}$	Цитрат (Cit)	$1.1 \times 10^{-4}$
Цистин (Cis)	$4.0 \times 10^{-5}$	Лактат (Lac)	$1.8 \times 10^{-3}$
Цитрулин (Citrl)	$2.7 \times 10^{-5}$	Малат (Mal)	$3.5 \times 10^{-5}$
Глутамин (Gln)	$4.8 \times 10^{-5}$	Оксалат (Oxa)	$1.2 \times 10^{-5}$
Глутаминат (Glu)	$5.2 \times 10^{-4}$	Пируват (Pyr)	$9.5 \times 10^{-5}$
Глицин (Gly)	$2.4 \times 10^{-4}$	Салицилат (Sal)	$5.0 \times 10^{-6}$
Хистидин (His)	$8.5 \times 10^{-5}$	Суцинат (Succ)	$4.2 \times 10^{-5}$
Хистамин (Hsn)	$1.0 \times 10^{-8}$	Аскорбат (Asc)	$4.3 \times 10^{-5}$
Хидроксипролинат (Hурго)	$7.0 \times 10^{-6}$	<b>Метални јони</b>	
Изолеуцинат (Ile)	$6.5 \times 10^{-5}$	$\text{Ca}^{2+}$	$1.43 \times 10^{-3}$
Леуцин (Leu)	$1.2 \times 10^{-4}$	$\text{Mg}^{2+}$	$6.48 \times 10^{-4}$
Лизин (Lys)	$1.8 \times 10^{-4}$	$\text{Cu}^{2+}$	$1.0 \times 10^{-18}$
Метионин (Met)	$2.9 \times 10^{-5}$	$\text{Fe}^{2+}$	$1.0 \times 10^{-11}$
Орнитин (Orn)	$5.8 \times 10^{-5}$	$\text{Fe}^{3+}$	$1.0 \times 10^{-23}$
Фенилаланин (Phe)	$6.4 \times 10^{-5}$	$\text{Pb}^{2+}$	$1.0 \times 10^{-14}$
Пролин (Pro)	$2.1 \times 10^{-4}$	$\text{Mn}^{2+}$	$1.79 \times 10^{-12}$
Серин (Ser)	$1.2 \times 10^{-4}$	$\text{Zn}^{2+}$	$1.0 \times 10^{-9}$
Треонин (Thr)	$1.5 \times 10^{-4}$	$\text{Ni}^{2+}$	$9.9 \times 10^{-8}$
Триптофосфат (Trp)	$1.0 \times 10^{-5}$	$\text{V}^{3+}$	$1.0 \times 10^{-9}$
Тирозин (Tyr)	$5.8 \times 10^{-5}$	$\text{V}^{5+}$	$6.0 \times 10^{-8}$
Валин (Val)	$2.3 \times 10^{-4}$	$\text{VO}^{2+}$	$1.0 \times 10^{-9}$
		$\text{Bi}^{3+}$	$2.0 \times 10^{-8}$

## 1.5. Физиолошка специјација јона метала у плазми

### 1.5.1. Модели симулације равнотежа метал-јон у биофлуидима (Мау-ов компјутерски модел хумане крвне плазме)

#### Калцијум ( $\text{Ca}^{2+}$ )

Концентрација  $\text{Ca}^{2+}$  јона у плазми је релативно висока ( $1.14 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) и могуће је одредити директно специфичним јон селективним електродама.

#### Бакар ( $\text{Cu}^{2+}$ )

Обзиром да је укупна концентрација бакра  $\text{Cu}^{2+}$  у крвној плазми  $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ , највећим делом чврсто везана за церулоплазмин, укупна концентрација заменљивог бакра је  $1 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ , при чему је већи проценат овог везан за хумани серум албумин. На темељу познавања константе дисоцијације бакар-албумин комплекса, мањи лимит за концентрацију слободног бакра је процењен на  $10^{-19} \text{ mol/dm}^3$ . Конзервативан горњи лимит од  $10^{-11} \text{ mol/dm}^3$  је предложен чињеницом да је концентрација слободног  $\text{Cu}^{2+}$  јона мања од детекционог лимита јон-селективних електрода ( $10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ ) у експериментима *Neumann-a* и *Sass-Kortsak-a*. У каснијим радовима, уочено је да је да су односи бакра у албумину 0,4% када је метал ултрафилтрован. Треба нагласити да су истраживања *Neumann-a* и *Sass-Kortsak-a* извршена са укупним концентрацијама које су значајно у вишку од нормалне вредности у плазми, и због тога процене засноване на њиховим резултатима су на граници да буду јако пристрасне према горњим концентрационим лимитима.

#### Гвожђе ( $\text{Fe}^{3+}$ )

Готово сви јони гвожђа  $\text{Fe}^{3+}$  су везани за трансферин. Коришћењем вредности константе везивања извештене од стране ААса (*AAsa*) и сарадника, могуће је извести закључак о концентрацији слободних  $\text{Fe}^{3+}$  јона у вредности од  $10^{-24} \text{ mol/dm}^3$ . Горњи лимит слободне концентрације  $\text{Fe}^{3+}$  јона под физиолошким околностима је  $10^{-18} \text{ mol/dm}^3$  и условљен је производом растворљивости  $\text{Fe}^{\text{III}}$  хидроксида.

#### Олово ( $\text{Pb}^{2+}$ )

Укупна концентрација олова  $\text{Pb}^{2+}$  у плазми варира значајно, али извештена вредност је  $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ . Комбиновањем са подацима Гуарда и Мураја (*Guard and Murray*), процењено је да је максимална слободна концентрације мања од  $10^{-10} \text{ mol/dm}^3$  у здравој хуманој крвној плазми. Обзиром да су многи протеини компетитивни са оловом, нормална вредност изгледа је значајно мања од тога. Интересантно је да симптоми плумбизма постају видљиви када укупна концентрација олова достигне вредност од  $3 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ .

#### Магнезијум ( $\text{Mg}^{2+}$ )

Употребом измењиве мембране Хетон (*Heaton*) је закључио да је јонизовани магнезијум  $\text{Mg}^{2+}$  просечно 79% од нефилтрираног магнезијума у серуму. Може се закључити да концентрација слободног  $\text{Mg}^{2+}$  лежи у опсегу  $5.1-5.5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ .

#### Манган ( $\text{Mn}^{2+}$ )

Из студија о везивању мангана  $\text{Mn}^{2+}$  за албумин, концентрација слободног  $\text{Mn}^{2+}$  је процењена на максималну вредност  $5 \times 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$ . Постоје различите тврдње везане за протеине за које је овај метал селективно везан. Остали радови критички се односе према укупној концентрацији у плазми на подручју контаминације. Из тих разлога резонски изгледа да се скенира концентрација слободног  $\text{Mn}^{2+}$  до крајњих лимита од  $10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  силазно.

**Цинк ( $Zn^{2+}$ )**

Иако је вредност  $4.6 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  за укупну концентрацију цинка  $Zn^{2+}$ , извештена неколико пута, по свему судећи је ова вредност погрешна, па је вредност од  $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  вероватнија. Обзиром да је од 10-20% укупног цинка везано за металопротеин  $\alpha 2$ -макроглобулин, концентрација измењивог цинка је процењена на  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ . Албумин везује велику фракцију измењивог цинка у лабилну равнотежу. Из вредности константе за комплекс цинк-албумин, изведена концентрација слободног цинка је око  $10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ . У складу са неизвесношћу ове вредности, и опсег од  $10^{-11}$ - $10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  изгледа прихватљиво. У истраживаним моделима,  $Zn^{2+}$  је углавном везан за хумани серум албумин (од 80-90%), док је од 10-20% везан за  $\alpha 2$ -макроглобулин. Преостали део (<3%) се везује за лиганде мале молекулске масе.

Избор комплекса за компјутерску симулацију је заснован делом на расположивости у литератури, из извештених или експерименталних радова индивидуалних система метал-лиганд. Обзиром да се мешовити тернарни комплекси формирају у системима који садрже металне јоне и два или више различитих лиганда, сви ови расположиви комплекси су укључени у разматрани систем. Интензивним проучавањем литературе за први посматрани модел, Меј (*May*) и сарадници су укључили у систем вредности константи формирања преко 250 мононуклеарних бинарних, лиганд протон и протонваних метал лиганд комплекса мерених под физиолошким условима, са око 400 сличних типова комплекса мерених под условима који су различити од крвне плазме, као и око 100 тернарних мешовитих комплекса. Имајући у виду да су вредности појединих константи које су публиковане биле различите, исте су критички процењиване, док су неке и изостављене. У ситуацијама где је било расположиво довољно података, узимане су средње вредности. Вршене су корекције Дебај-Хикеловом (*Debye-Huckel*) једначином за јонску јачину ( $-\lg \gamma_B = z_B^2 A I^{1/2} / (1 + \alpha B I^{1/2})$ ), где је I-јонска јачина, z-број наелектрисаних јона,  $\alpha$ -параметар величине јона и A, B-температурне константе) по аналогији са експерименталним дијаграмима јонске јачине Гергела (*Gergely*) и сарадника и Ван Хоффовом (*Van 't Hoff*) једначином ( $d \ln K / dT = \Delta_r H^0 / RT^2$ , где је K-константа равнотеже реакције,  $\Delta_r H^0$ -стандардна енталпија, R-гасна константа и T-температура) за температурне корекције (у свим ситуацијама где су постојале константе које су мерене под не-физиолошким условима). Додатних 350 мононуклеарних бинарних или протонваних комплекса за које се сматрало да су потенцијално важни за крвну плазму нису имали вредности константе. Недостајуће константе су дефинисане проценом, применом разноврсних метода. Једна од таквих је примена принципа линеарне слободне енергије (LFER), и применом хемијских аналогија.

Након почетних Мејових (*May*) радова, наредни модели за компјутерске симулације израђивани су коришћењем критичних база података као што је НИСТ-ова база критички селектованих константи стабилности металних комплекса (*NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*). НИСТ-ова база пружа вредности константи стабилности, енталпија и ентропија протона и равнотежа металних јона са лигандима у воденим растворима под дефинисаним условима јонске јачине и температуре. Подаци су критички разматрани ради прецизности и конзистентности.

Приликом формирања посматраних модела најчешћи извори грешака у равнотежним константама су:

- Употреба равнотежних константи уместо константи формирања,
- Константе формирања не изражавају бесконачна разблажења и
- Оскудан избор константи.

У погледу малобројности расположивих константи формирања за тернарне комплексе и очекиване доминантне улоге ових у молекуларним фракцијама мале масе у крвној плазми, процене су извршене за око 4000 додатних тернарних константи,



разматраних као неопходних за укључивање у модел употребом релевантних бинарних константи, статистичких и стабилизационих фактора. Процене стабилизационих фактора су базиране где је било могуће на основу експериментално одређених фактора аналогних комплекса.

The image shows two side-by-side screenshots of the NIST Standard Reference Database 46. The left screenshot displays the title page of the database, which includes the text: "NIST Standard Reference Database 46 Version 8.0 NIST CRITICALLY SELECTED STABILITY CONSTANTS OF METAL COMPLEXES". It also mentions the authors: "ARTHUR E. MARTELL\* AND ROBERT M. SMITH" and "Database software developed by: RAMUNAS J. MOTEKAITIS\*", along with the location "Gaithersburg, MD 20899 USA". The right screenshot shows the entry for "L-2-Amino-3-phenylpropanoic acid (Phenylethylamine)" with the chemical formula  $C_9H_{11}N_1O_2$  and a chemical structure. Below the structure is a table of stability constants for various metal ions (H+, Li+, Na+, K+, NH4+, Ca2+, Sr2+, Ba2+, Pb2+, Bi3+, Th4+, UO22+, Zr4+, Hf4+, Ti4+, Sn4+) at different temperatures (25, 37, 10, 40 °C) and ionic strengths (μ = 0.1, 0.15, 0.5, 1.0, 3.0, 0.0).

Слика 44. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database<sup>67</sup>

Да би се кориговале константе формирања тернарних комплекса које су експериментално измерене у другим физиолошким условима, извршена је корелација на сваком стабилизационом фактору употребом једначине

$$\Delta \log \beta_{MAB}(\text{model}) = \Delta \log \beta_{MAB}(\text{expt.}) \times \left[ \frac{\beta_{MA_2}(\text{model}) \times \beta_{MB_2}(\text{model})}{\beta_{MA_2}(\text{expt.}) \times \beta_{MB_2}(\text{expt.})} \right], \quad (99)$$

где је  $\Delta \log \beta_{MAB}(\text{model})$ -измерен стабилизациони фактор примењив на модел (нпр. физиолошки) услова,  $\Delta \log \beta_{MAB}(\text{expt.})$ -опажен фактор мерења под не-физиолошким условима  $= \Delta \log \beta_{MAB}(\text{expt.}) - \frac{1}{2} [\log \beta_{MA_2}(\text{expt.}) + \log \beta_{MB_2}(\text{expt.})] - \log 2$ ,  $\beta_{MAB}$ -константа формирања тернарног комплекса MAB, који формиран између метала M и два метала A и B,  $\beta_{MB_2}$  и  $\beta_{MA_2}$  су кумулативне константе бинарних комплекса  $MA_2$  и  $MB_2$ , квалификатор (expt.)-односи се на експерименталне константе које су одређене под нефизиолошким условима и (model) се примењује на константе формирања измерене на коригованим условима модела. Измерен стабилизациони фактор се потом користи заједно са релевантним константама бинарних комплекса (при физиолошким условима), а статистички фактори да би постигли корекцију тернарних константи.

Употребом средњих концентрација јона метала и укупних концентрација лигананда, извршена је компјутерска симулација међу скоро 5000 комплекса на три посебне вредности pH (7.2, 7.4 и 7.6) које су у опсегу средњих вредности у плазми.

**Табела 16.** % дистрибуције металних јона  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  међу лигандима мале молек. масе у хуманој плазми пронађеним компјутерском симулацијом

Комплекс	Наелектрисање	% укупног метала у фракцији		
		pH=7.2	pH=7.4	pH=7.6
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math></b>				
Протонован карбонат	+1	9	9	9
Цитрат	-1	4	4	4
Лактат	+1	3	3	3
Фосфат	-1	2	3	4
Карбонат	0	1	2	3
<b><math>\text{Cu}^{2+}</math></b>				
Цистин хистидин	-1	16	21	28
Протонован цистин хистидин	0	20	17	14
Бисхистидин	0	12	11	10
Хистидин треонин	0	9	8	7
Хистидин валин	0	5	5	5
Протонован хистидин лизин	+1	5	5	4
Аланин хистидин	0	4	4	4
Хистидин серин	0	4	4	4
Хистидин фенилаланин	0	3	3	3
Глицин хистидин	0	3	3	3
Хистидин леуцин	0	2	2	2
Глутамат хистидин	-1	2	2	2
Глутаминат хистидин	0	2	2	2
Протонован хистидин орнитин	+1	2	2	1
Хистидин пролин	0	2	1	1
Хистидин изолеуцин	0	1	1	1
Хистидин триптофан	0	1	1	1
<b><math>\text{Fe}^{3+}</math></b>				
Цитрат хидроксид	-1	99	99	99
Цитрат салицилат	-2	<1	<1	<1
Цитрат глутамат	-2	<1	<1	<1
Цитрат оксалат	-2	<1	<1	<1
<b><math>\text{Pb}^{2+}</math></b>				
Цистеин	0	76	80	82
Цитрат цистеин	-3	6	7	7
Протонован цистин	+1	8	5	3
Протонован цистин фосфат	-2	2	3	3
Протонован карбонат	+1	5	2	1
Протонован бисцистинат	-1	1	2	3
<b><math>\text{Mg}^{2+}</math></b>				
Протонован карбонат	+1	5	6	6
Цитрат	-1	5	5	4
Карбонат	0	1	2	4
Лактат	+1	2	2	2
Протонован фосфат	0	1	1	1
<b><math>\text{Mn}^{2+}</math></b>				
Протонован карбонат	+1	24	24	24
Цитрат	-1	10	10	9
Карбонат	0	1	2	4
Оксалат	0	2	2	2
Протонован фосфат	0	1	1	1
<b><math>\text{Zn}^{2+}</math></b>				
Цитрат цистин	-3	50	43	33
Бис цистеин	-2	9	19	33
Цистеин хистидин	-1	9	12	14
Цистеин	0	4	3	2
Хистидин	+1	4	3	1
Протонован бис цистеин	-1	1	1	2
Бис хистидин	0	2	1	1
Цистеин глутамин	-1	<1	1	1

Табела 16 (страница 74) показује доминантне комплексе за сваки метални јон, изражене као проценат од укупне концентрације посматраног металног јона у фракцији мале молекуларне масе у плазми. Компјутерском симулацијом одређена је концентрација металних јона у крвној плазми. Концентрације које се користе у моделу комплексирања у крвној плазми су засноване на очекиваним количинама свих индивидуалних компоненти у крвној плазми.

**Табела 17.** Поређење концентрација метала добијених компјутерском симулацијом са укупном концентрацијом процењеном на основу експерименталних разматрања

Јон	Конц. (mol/dm <sup>3</sup> )	Концентрација јона постигнута компјутерском симулацијом (mol/dm <sup>3</sup> )			Експериментална концентрација (mol/dm <sup>3</sup> )		% јона везаног за протеин
		pH=7,2	pH=7,4	pH=7,6	a	b	
Ca <sup>2+</sup>	1.14×10 <sup>-3</sup>	1.43×10 <sup>-3</sup>	1.46×10 <sup>-3</sup>	1.51×10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-4</sup>	2.45×10 <sup>-2</sup>	45
Cu <sup>2+</sup>	10 <sup>-18</sup>	6.01×10 <sup>-12</sup>	1.57×10 <sup>-11</sup>	4.14×10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-12</sup> -10 <sup>-9</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	>99
Fe <sup>3+</sup>	10 <sup>-23</sup>	4.24×10 <sup>-13</sup>	6.68×10 <sup>-13</sup>	1.06×10 <sup>-12</sup>	/	2.2×10 <sup>-5</sup>	100
Pb <sup>2+</sup>	10 <sup>-14</sup>	2.67×10 <sup>-11</sup>	5.88×10 <sup>-11</sup>	1.3×10 <sup>-10</sup>	/	5×10 <sup>-7</sup>	/
Mg <sup>2+</sup>	5.2×10 <sup>-4</sup>	6.48×10 <sup>-4</sup>	6.56×10 <sup>-4</sup>	6.67×10 <sup>-4</sup>	1.2×10 <sup>-4</sup>	9×10 <sup>-4</sup>	30
Mn <sup>2+</sup>	10 <sup>-12</sup>	1.79×10 <sup>-12</sup>	1.83×10 <sup>-12</sup>	1.89×10 <sup>-12</sup>	/	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-6</sup>	/
Zn <sup>2+</sup>	10 <sup>-9</sup>	6.91×10 <sup>-8</sup>	1.84×10 <sup>-7</sup>	5.5×10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	>95

a-концентрација комплекса (искључена концентрација слободног јона метала).

b-Укупна измењива концентрација метал-јон.

Табела 18 приказује концентрације слободних лиганада добијених компјутерском симулацијом, на средњој pH вредности хумане крвне плазме.

**Табела 18.** Концентрације слободних лиганада у плазми добијених симулацијом на вредности pH=7.4

Лиганд	Конц. (mol/dm <sup>3</sup> )	Компонента	Конц. (mol/dm <sup>3</sup> )
Аланин ( <i>Alanate</i> )	2.87×10 <sup>-6</sup>	Серин ( <i>Serinate</i> )	4.2×10 <sup>-6</sup>
Аминобутират ( <i>Aminobutyrate</i> )	3.38×10 <sup>-7</sup>	Треонин ( <i>Threoninate</i> )	6.87×10 <sup>-6</sup>
Аргинин ( <i>Arginine</i> )	3.4×10 <sup>-6</sup>	Триптофосфат ( <i>Tryptophanate</i> )	1.97×10 <sup>-7</sup>
Аспарагин ( <i>Asparaginate</i> )	2.69×10 <sup>-8</sup>	Тирозин ( <i>Tyrosinate</i> )	3.49×10 <sup>-9</sup>
Аспартат ( <i>Aspartate</i> )	7.56×10 <sup>-8</sup>	Валин ( <i>Valinate</i> )	2.66×10 <sup>-6</sup>
Цистеин ( <i>Cysteinat</i> )	5.94×10 <sup>-9</sup>	Хистамин ( <i>Histamine</i> )	1.92×10 <sup>-10</sup>
Цистин ( <i>Cystinate</i> )	4.61×10 <sup>-7</sup>	Карбонат ( <i>Carbonate</i> )	3.54×10 <sup>-5</sup>
Цитрулин ( <i>Citrullinate</i> )	1.27×10 <sup>-6</sup>	Фосфат ( <i>Phosphate</i> )	3.4×10 <sup>-8</sup>
Глутамин ( <i>Glutamate</i> )	4.74×10 <sup>-7</sup>	Тиоцијанат ( <i>Thiocyanate</i> )	1.4×10 <sup>-5</sup>
Глутаминат ( <i>Glutaminat</i> )	1.84×10 <sup>-5</sup>	Силикат ( <i>Silicate</i> )	2.67×10 <sup>-10</sup>
Глицин ( <i>Glycinate</i> )	2.47×10 <sup>-6</sup>	Сулфат ( <i>Sulphate</i> )	2.04×10 <sup>-4</sup>
Хистидин ( <i>Histidinate</i> )	2.35×10 <sup>-6</sup>	Амонијак ( <i>Ammonia</i> )	6.55×10 <sup>-7</sup>
Хидроксипролинат ( <i>Hydroxyprolinate</i> )	8.59×10 <sup>-8</sup>	Цитрат ( <i>Citrate</i> )	2.67×10 <sup>-5</sup>
Изолеуцинат ( <i>Isoleucinate</i> )	6.95×10 <sup>-7</sup>	Лактат ( <i>Lactate</i> )	1.76×10 <sup>-3</sup>
Леуцин ( <i>Leucinate</i> )	1.32×10 <sup>-6</sup>	Малат ( <i>Malate</i> )	3.11×10 <sup>-5</sup>
Лизин ( <i>Lysinate</i> )	4.88×10 <sup>-9</sup>	Оксалат ( <i>Oxalate</i> )	1.03×10 <sup>-5</sup>
Метионин ( <i>Methionate</i> )	8.56×10 <sup>-7</sup>	Пируват ( <i>Pyruvate</i> )	9.41×10 <sup>-5</sup>
Орнитин ( <i>Ornithinate</i> )	5.35×10 <sup>-9</sup>	Салицилат ( <i>Salicylate</i> )	1.2×10 <sup>-11</sup>
Фенилаланин ( <i>Phenylalanate</i> )	1.97×10 <sup>-6</sup>	Суцинат ( <i>Succinate</i> )	4.04×10 <sup>-5</sup>
Пролин ( <i>Prolinate</i> )	2.6×10 <sup>-7</sup>	Аскорбат ( <i>Ascorbate</i> )	5.36×10 <sup>-8</sup>

Ефекти pH приказани у табели 16 (страница 74) на дистрибуцију неких металних јона су значајнији од очекиваног. Пораст и смањење у степену формирања комплекса може се закључити и са повећањем вредности pH. Тернарни комплекси се формирају у већем проценту са јонима Cu<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup>. Важнији комплекси Cu<sup>2+</sup> садрже хистидин, а цитратни комплекси су међу најдоминантнијим комплексима Fe<sup>3+</sup> јона.

Бинарни комплекси су фаворизовани са јонима  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Јони  $\text{Pb}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  формирају и бинарне и тернарне комплексе као доминантне комплексе. Јон  $\text{Pb}^{2+}$  се појављује у граничним концентрацијама комплекса са цистеином и цистином. Остале аминокиселине и метионин које садрже сумпор нису компетитивне са оловом. Ово се вероватно може приписати релативно малим вредностима константи формирања  $\text{Pb}^{2+}$ -метионитних комплекса и могућности компетитивних реакција са јонима  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Тернарне цистеин-цитратне металне врсте су важне и за јоне  $\text{Pb}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , сугеришући да је један од аспекта токсичности узрокован вишком олова, може заменити цинк оловом из половине цистеина извесних ензима.

Поређење укупних концентрација комплекса мале молекулске масе са процењеним вредностима из експерименталних вредности, указују на задовољавајући ниво слагања коренсподентних вредности. То управо и указује и пружа уверење да модел није погрешан. У погледу непоузданости процена концентрација металних јона, извршено је истраживање које је укључило варирање слободне концентрације сваког металног јона у опсезима приказаним у табели 17 (страна 75) користећи примарни модел на три вредности рН као референтним. Ове концентрације представљају вредности упечатљивих опажања за све вредности рН, где је проценат дистрибуције био независтан од концентрација слободних металних јона у изабраном опсегу валидности и прецизности од 1%. Објашњење овог феномена лежи у чињеници да је формирање комплекса мале молекулске масе у плазми минимално. У ствари, слободне концентрације лиганата мале молекулске масе су уобичајено неколико пута у опсегу веће него концентрације комплекса. Према томе, концентрације слободних лиганата нису значајно кориговане променама у концентрацијама комплекса, тј. оне су концентрационо пуферисане. Веома мале укупне концентрације транзиционих јона метала, слабо везивање  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  јона, и смањење концентрација слободних јона метала њиховим везивањем за протеине су доприносиоћи фактори. Као последица концентрације сваког комплекса је готово директна пропорционалност концентрацијама слободних јона метала који су одабрани. Пошто је ово истинито за све мононуклеарне врсте, укупна концентрација сваког метала у фракцијама мале молекуларне масе је такође директно пропорционална концентрацији слободних јона метала. Стога, проценат појављивања метала у датим врстама је константан, без обзира на тачну концентрацију јона метала која постоји у равнотежи са протеинима. Због тога, грешке у концентрацијама слободних јона метала неће изменити постојећу слику. Овакав приступ заправо успешно врши тзв. бајпас грешака и потешкоћа које су присутне у симулацијама које укључују равнотеже везивања метала и протеина. Валидност примарног модела је постигнута из симулације за сваки од три посебне вредности рН, употребом горњих концентрација слободних метала из опсега њихових концентрација. На свакој посебној вредности рН, компјутерска дистрибуција је била унутар 2% од одговарајућих вредности (табела 16-страна 74).

Значај овако постављеног примарног модела, лежи у чињеници да обезбеђује постулате реакција металних јона које се могу десити у крвној плазми или чак унутар ћелија подржаних од овог медијума. На пример, неки од доминантних комплексних врста могу партиципирати у механизмима где су метални јони инкорпорирани у/или укључени из макромолекула. У складу са резултатима у табели 16 (страна 74), измена  $\text{Fe}^{3+}$  јона између молекула трансферина се дешава преко мешовитог комплекса који укључује једино цитратни лиганд, пре него дицитратни комплекс како је раније сугерисано. Ово је и потврђено касније кинетичким истраживањима измена  $\text{Fe}^{3+}$  јона између хелата и трансферина, где гвожђе дицитрат није најреактивнија врста. Слично се може закључити и да измена јона  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  између протеина у плазми укључује мешовите комплексе, где измена јона  $\text{Mn}^{2+}$  укључује бинарне комплексе.

Следећа важна примена тиче се пасивног транспорта транзиционих јона метала кроз биолошке мембране. Мора се нагласити да је значајно више знања о пасивном, од

активног транспорта. Генерално, пасивни транспорт је ограничен на електрично неутралне врсте а величина флукса је зависна од разлике у концентрацијама са обе стране мембране. Насупрот томе, наелектрисане врсте не могу проћи кроз мембране у мерљивим опсезима, због наелектрисуња и мале концентрације, па су аква јони транзиционих метала у плазми неизвесни у погледу дифузије кроз мембране. Једино неутрални комплекси транзиционих метала су изгледни у погледу липидне растворљивости, па су због тога пасивно транспортовани кроз мембране. Да би допринео разумевању и пасивног и активног процеса транспорта, компјутерски модел би могао бити принципијелно коришћен у одређивању релативних концентрација комплекса малих молекулских маса транзиционих метала, у два биолошка флуида раздвојених одговарајућом мембраном. Симулација би се такође могла користити ради индикације како промене рН вредности утичу на дистрибуцију, посебно са аспекта присуства или одсуства наелектрисуња на киселим или базним центрима комплекса. Због тога би и истраживања услова који би повећали или умањили флукс могли бити од значаја. Примери биолошких флуида који би се могли симулирати за ове намене су интерстицијумски флуид, цереброспинални флуид, гастро сокови и урин. Ови модели само чекају постојање потребних експерименталних информација о присутним металима и лигандима, са проценама њихових укупних концентрација.

Међу есенцијалним металима, гвожђе је јединствено у поседовању јединствене форме хомеостатичке контроле у људском организму. Премда су механизми хомеостазе гвожђа проучени, једино десетина од дијетално унетог гвожђа је апсорбована, и поврх тога, тело поседује минималну способност екскреције овог елемента. Из тога се може закључити тенденција организма да чува гвожђе. Насупрот томе, у половини порфирина у хемоглобину, гвожђе је уклоњено деградацијом протеина и ускладиштено за накнадну употребу. Сви доминантни комплекси гвожђа су у крвој плазми негативно наелектрисани. То омогућава спекулацију да је сметња транспорту кроз мембране резултирана негативним наелектрисуњем и немогућности тела да екскретује гвожђе.

Апсорпција гвожђа се дешава кроз инестинални тракт углавном у дуоденуму, и основни фактор који то омогућава је растворљивост. Било који фактор који претендује да повећа растворљивост гвожђа помоћу којег би се спречавало таложење хидроксида и повећање рН вредности на излазу из абдомена би унапредио апсорпцију гвожђа. Нормални пут апсорпције гвожђа може бити бајпасован комплексима мале молекулске масе. Знање о начину на који су различити комплекси настали у биофлуидима ће засигурно бити употребљено у терапији анемије и сидерозе. На сличан начин се може употребити и знање о другим транзиционим металима који су употребљени у примарном моделу компјутерске симулације.

Доста тога остаје као задатак да се унапреде детаљи модела крвне плазме:

- Прецизно одређивање свих до сада неизмерених константи формирања за важне комплексе (хидрогенкарбонатни комплекси, магнезијум и калцијум са аминокиселинама ...);
- Експериментална мерења многих константи формирања мешовитих комплекса; и
- Побољшање процена концентрација слободних металних јона у плазми, посебно магнезијума;

Обзиром да је натријум хлорид главни контрибутор јонској јачини у крвној плазми ( $0.15 \text{ mol/dm}^3$ ), постоји значајно подешавање за употребу овог електролита у одређивањима константи формирања. Такође, температура би требала бити идентична нормалној температури тела од  $37^\circ\text{C}$  ( $310\text{K}$ ). Упркос чињеници да се све може предвидети, важно је препознати да би негативни докази произашли из модела могли бити од највеће вредности. Значајна стабилност компјутерске дистрибуције металних јона међу комплексима мале молекулске масе указује да ниједан недостатак металног јона или пак његов вишак неће значајно изменити укупну дистрибуцију. Надаље, није тешко предочити да резултати могу указати да се неки комплекс или чак целокупна

фракција металног јона мале молекулске масе, може елиминисати као могући учесник у различитим физиолошким процесима који се истражују.<sup>64</sup>

### 1.5.2. Плазма мобилизациони индекс (PMI)<sup>68</sup>

Меј (*May*) и Вилијамс (*Williams*) су указали да се ефикасност хелатних агенаса у мобилизацији јона метала из лабилних комплекса метал-протеин може изразити плазма мобилизационим индексом или PMI индексом.

Формулисан на овакав начин, PMI индекс показује добру меру релативне термодинамичке способности хелатних агенаса да се везују за металне јоне у крвној плазми, показујући да концентрација јона метала у фракцијама мале молекулске масе остаје мала у поређењу са онима који су везани за протеине плазме као што су албумин и трансферин.

PMI вредности указују који јони метала у плазми су значајније мобилисани додатим лигандом (који делује као лек). PMI фактор је нарочито користан јер је независан од прецизног степена везивања метал-протеин. Међутим, PMI фактор не узима у обзир било који кинетички допринос достизања равнотеже.

PMI се дефинише као *количник укупне концентрације комплекса мале молекулске масе у хелатору (леку) и укупне концентрације комплекса мале молекулске масе у нормалној крвној плазми.*

$$PMI = \frac{\text{Ukupna koncentracija kompleksa male molekulske mase u helatoru (FQ)}}{\text{Ukupna koncentracija kompleksa male molekulske mase u krvnoj plazmi}}$$

Графички се приказује као функционална зависност логаритамске вредности концентрације хелатора или лека (у нашем случају FQ) од логаритамске вредности PMI вредности ( $-\log PMI=f(-\log FQ)$ ).

## 1.6. Особине $Gd^{3+}$ -јона у воденим растворима

У Земљиној кори концентрација гадолинијума је око 5 ppm. Као и остали лантаноиди, налази се у облику минерала монацита ( $GdPO_4$ ) и бастнезита ( $GdCO_3F$ ).

Гадолинијум је сребрнато бели метал, мек је и лако се обрађује. Јавља се у две алотропске модификације:  $\alpha$  и  $\beta$ -гадолинијум. Загревањем преко  $1262^\circ C$  *алфа* гадолинијум прелази у *бета* гадолинијум. На сувом ваздуху је релативно стабилан, а на влажном ваздуху губи сјај због настанка танког оксидног слоја. Са разблаженим минералним киселинама реагује врло бурно, али је готово инертан према јаким базама и води. Гадолинијум се састоји из смеше седам стабилних изотопа, а утврђено је постојање још деветнаест радиоактивних изотопа и три изомера. Користи се за прављење магнета, у електроници, у неутронској радиографији, а у легури са гвожђем за израду магнето-оптичких апарата за снимање.

Електронска конфигурација гадолинијума је  $[Xe] 4f^7 5d^1 6s^2$ . У својим једињењима гадолинијум се јавља у оксидационим стањима  $Gd^{2+}$  (електронске конфигурације  $f^8$ ) и  $Gd^{3+}$  (електронске конфигурације  $f^7$ ). Орбитале  $Gd^{3+}$  јона 5d, 6s и 6p су празне и оне су одговорне за грађење комплекса и њихову стабилност. Гадолинијум гради стабилна једињења са халогенидима, типа  $GdX_3$  ( $X = F, Cl, Br, I$ ), са кисеоником оксид  $Gd_2O_3$ , са сумпором сулфид  $Gd_2S_3$  а са азотом нитрид  $GdN$ . Са хлоридима гради две врсте соли:  $GdCl_3$  и  $GdCl_3 \cdot 6H_2O$  који се често користе за добијање комплекса.

Гадолинијум (атомска маса 157.25; тачка топљења  $1313^\circ C$ ; тачка кључања  $3266^\circ C$ ) припада лантанидима или ретким металима земље који чине серију од 15 метала од лантанијума (атомски број 57) до лутецијума (атомски број 71). Електронска конфигурација гадолинијума и осталих лантанида сугерише њихову класификацију у трећој групи периодног система елемената. Јонски радијус опада прогресивно са повећањем атомског броја. Пошто се јонски радијус смањује у серији лантанида, могућност формирања комплекса се повећава што је основа њиховог издвајања у колони јонске измене. Гадолинијум се може добити редукцијом својих анхидрованих флуорида или хлорида са калцијумом на температури од  $1000^\circ C$  ( $2GdCl_3 + 3Ca \rightarrow 3CaCl_2 + 2Gd$ ). Гадолинијум као и остали релативно ретки земљини метали је сребрно бео, поседује метални сјај, растељивост и еластичност. Релативно је стабилан на сувом ваздуху али у влажном ваздуху губи боју формирањем оксидног филма. Реагује са водом споро и растворан је у разблаженој киселини. Гадолинијум се јавља у тровалентном оксидационом стању и због полупопуњеног 4f нивоа  $Gd^{3+}$  је стабилан и јединствен због свог парамагнетичног момента.<sup>235</sup>

Гадолинијум се налази у својим оксидима у гадолиниту и пронађен је у неколико осталих минерала, укључујући моназит и бастназит који имају комерцијалну важност. До сада је потврђено седамнаест изотопа гадолинијума, али природни гадолинијум је смеша седам изотопа и састоји се од  $63 \times 10^{-5} \%$  темљине коре. Не постоје подаци у литератури који се односе на његову концентрацију у океанима, пијаћој води или исхрани.

Два од гадолинијумова изотопа ( $^{155}Gd$  и  $^{157}Gd$ ) имају одличне карактеристике захвата неутрона али су у природи присутни у веома ниским концентрацијама. Метал поседује суперкондуктивна својства. Мање од 1% елемента побољшавају радне карактеристике и отпор гвожђа, хрома и сличних легура на високим температурама и оксидацији. Смеша етил сулфата поседује екстремно ниске карактеристике буке. Стога, могу се користити у побољшању карактеристика појачивача високих фреквенција.

Због јако изражене тенденције парамагнетичних катјона лантанида да граде комплексе са синтетичким и природним лигандима,  $Gd$ -DTPA ( $K_s = 10^{23}$ ) и  $Gd$ -DOTA ( $K_s = 10^{28}$ ) хелати се користе као контрастни агенси у магнетној резонанци (MRI) и компјутерској томографији (СТ).  $Gd$ -DTPA хелати се препоручују као безбедни нерадиоактивни индикатори гломеруларне филтрације (GFR) који могу бити

алтернативни метод за одређивање реналног клиренса у клиничким студијама прогресивних бубрежних болести и нефротоксичности. Унешен интраперитонално,  $GdCl_3$ , показује антиинфламаторне ефекте а предложен је и као средство у лакој микроскопској хистохемији киселих и алкалних фосфатаза.

Гадолинијум као и остали ретки земљини метали се разматра као неесенцијални за биљке и животиње. Уношење елемента исхраном у људски организам није познато а трансфер преко уношења поврћа је минималан, зато што биљке уопштено не апсорбују лантаниде из земље. Само мали део ( $<0.05\%$ ) ретких земљиних метала се апсорбује у гастроинестиналном тракту. Мало се зна о његовом метаболизму. Највероватније елиминација  $Gd$  се дешава преко фекалних и уринарних путева у зависности од анјона, дозе и начина уноса. Премда су спектроскопске и термодинамичке студије показале да се  $Gd$  везује за терминални угљеник трансферина на  $pH$  7.4 и околни  $pCO_2$ , формирање невезивних карбонато комплекса на физиолошкој  $pCO_2$  искључују субстанцијалну улогу трансферина у транспорту лантанида *in vivo*. Елемент се не појављује у свом јонском облику у крви, али је највероватније присутан као колоид било хидроксида било фосфата. Насупрот природним  $Gd$  једињењима, фармакокинетичке и фармаколошке особине хелата DTPA и DOTA који се користе у магнетној резонанци су интензивније проучаване. Са кинетичког аспекта, ова високо хидрофилна једињења се понашају идентично. Као што је и очекивано од хидрофилних супстанци обим дистрибуције је мали у људском организму, док је полуживот плазма елиминације од 20-90 минута код пацова и човека понаособ. Код мишева 89% примењених  $Gd$ -DTPA и  $Gd$ -DOTA доза се избацује уринарно у току од 1 сата. У корелацији са редукованим GFR код пацијената са хроничним реналним поремећајем серумски полуживот  $Gd$ -DTPA је продужен и ренални клиренс је смањен. Искоришћење  $Gd$ -DTPA после примене дозе од  $0.1 \text{ mmol/L/kg}$  је око  $92 \pm 12\%$ , где је екстраренална елиминација мања од  $0.4\%$  што указује да је гломеруларна филтрација доминантан начин елиминације хелата.

Једини подаци који постоје о биодистрибуцији  $Gd^{3+}$  у плазми и урину са аспекта здравља су публиковани од стране Алајина и сарадника (*Allain et al.*), који су утврдили концентрацију елемента у овим биолошким флуидима мању од  $0.3 \mu\text{g/dm}^3$ . Подаци о дистрибуцији  $Gd$  у ткиву су ретки. Његово присуство у јетри и скелету је идентично нивоима присуства лантанида еуропијума и холмијума. Примена контрастних средстава  $Gd$ -DTPA и  $Gd$ -DOTA на пацовима резултира од  $0.1$ - $1\%$  ретенције у јетри и слезени.

Због слабе гастроинестиналне апсорпције, претпоставља се да је токсичност ретких земљиних метала оралним уношењем мала. Симптоми акутне парентералне токсичности  $Gd$  подразумевају стомачне болове, дијареју, летаргију, мускуларни грч и смрт због респираторног колапса.

Слободни јони гадолинијума имају јонски радијус калцијума и могу ометати функције које зависе од калцијума као што су мускуларна контракција и неуротрансмисија. Скорашње студије су показале да серије лантанида укључујући и  $Gd$  опонашају дејство двовалентних катјона у неколико аспекта паратиroidних функција интеракцијом са површином ћелије „ $Ca^{2+}$  механизмом“ *in vitro*. Под стандардним али нефизиолошким условима температуре и  $pH$ , оба комплекса  $Gd$ -DTPA и  $Gd$ -DOTA су веома стабилни. Ови комплекси се сматрају релативно нетоксични, а због својих парамагнетских својстава су подесни за магнетну резонанцу. Међутим није јасно да комплекс у зависности од својстава серума може дисоцирати метал из свог лиганда. Истраживања на мишевима којима су аплициране интраперитоналне фармаколошке дозе  $Gd$ -DTPA су показала повећање нивоа  $Gd$  у костима. Ова појава је објашњена дехелацијом  $Gd$ -DTPA *in vivo*. Међутим, није недвосмислено потврђено да ли је био која токсичност повезана са овим резонантним контрастним агенсима последица дисоцијације  $Gd$  јона и/или осмозе раствора који компоненте садржи. У скорије време



је сугерисано да акутна токсичност изражена кроз LD<sub>50</sub> може бити у корелацији са *in vitro* стабилности хелата. Неколико аналитичких техника је доступно за мерење лантаноидних елемената, а већина од њих је развијена за њихово одређивање у геолошким узорцима и легурама. Најчешћа метода која се примењује за одређивање Gd у овим срединама је неутронска активациона анализа на недеструктиван начин. У литератури постоје скромни подаци о мерењу Gd у биолошким флуидима и ткиву. Неки истраживачи су користили атомску емисиону спектрометрију за одређивање Gd у ткиву. Остали су користили радиоозначени Gd ради проучавања његове биодистрибуције. За одређивање Gd у серуму и урину коришћена је техника ICP-MS. Део истраживача је користио и електротермалну атомску апсорпциону спектрометрију за одређивање Gd у биолошким флуидима и ткивима.

**Табела 19.** Константе стабилности главних Gd<sup>3+</sup>-комплекса у хуманим интерстицијумским флуидима<sup>69</sup>

Комплекс	log β <sub>p,q,r</sub>	Комплекс	log β <sub>p,q,r</sub>	Комплекс	log β <sub>p,q,r</sub>
[Gd <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> ]	12.200	[Gd(Lys)(Citl)H <sub>3</sub> ]	23.3324	[Gd(Tyr)(Suc)]	7.5023
[Gd <sub>3</sub> (OH) <sub>4</sub> ]	15.829	[Gd(Tyr)(Lys)H]	16.5432	[Gd(Tyr)(Suc)H <sub>3</sub> ]	25.4262
[Gd(His)(Trp)H]	16.937	[Gd(Cit)(Gln)H]	18.132	[Gd(Orn)(Suc)]	8.3513
[Gd(His)(Trp)H <sub>2</sub> ]	24.312	[Gd(Cit)(Gln)H <sub>2</sub> ]	26.213	[Gd(Orn)(Suc)H]	15.4976
[Gd(His)(Trp)H <sub>3</sub> ]	33.950	[Gd(Cit)(Lac)]	10.237	[Gd(Orn)(Suc)H <sub>2</sub> ]	20.2123
[Gd(His)(Thr)H <sub>3</sub> ]	33.380	[Gd(Cit)(Lac)H]	13.965	[Gd(Orn)(Lys)]	7.6177
[Gd(Pro)(Thr)]	9.677	[Gd(Cit)(Lac)H <sub>2</sub> ]	17.307	[Gd(Orn)(Lys)H <sub>2</sub> ]	22.0226
[Gd(Pro)(Trp)]	10.647	[Gd(Cit)(Glu)]	12.662	[Gd(Orn)(Lys)H <sub>3</sub> ]	24.3954
[Gd(Pro)(Trp)H]	17.977	[Gd(Cit)(Glu)H]	18.687	[Gd(Ser)]	5.227
[Gd(Pro)(Trp)H <sub>2</sub> ]	25.602	[Gd(Cit)(Glu)H <sub>2</sub> ]	23.117	[Gd(Ile)]	5.077
[Gd(Pro)(Thr)]	9.877	[Gd(Cit)(His)H <sub>2</sub> ]	27.727	[Gd(Asp) <sub>2</sub> ]	10.037
[Gd(Pro)(Thr)H <sub>2</sub> ]	24.582	[Gd(Cit)(Leu)]	12.667	[Gd(Asp)]	5.767
[Gd(Gly)(Ala)H <sub>2</sub> ]	23.052	[Gd(Cit)(Leu)H]	18.167	[Gd(Sal)]	2.827
[Gd(Val)(Glu)H <sub>2</sub> ]	23.617	[Gd(Cit)(Asp)]	15.132	[Gd(Cit)]	5.995
[Gd(Cit)(Arg)H]	22.035	[Gd(Cit)(Asp)H]	20.827	[Gd(Lac)]	3.347
[Gd(Cit)(Arg)H <sub>2</sub> ]	30.017	[Gd(Cit)(Asp)H <sub>2</sub> ]	24.287	[Gd(Asn) <sub>2</sub> ]	7.267
[Gd(Cit)(Ser)H <sub>2</sub> ]	22.217	[Gd(Sal)]	2.827	[Gd(Citl) <sub>2</sub> ]	7.667
[Gd(Cit)(Ile)H <sub>2</sub> ]	22.557	[Gd(Gly)]	4.127	[Gd(Suc)]	3.107
[Gd(Asp)(Ile)H <sub>2</sub> ]	27.577	[Gd(Ala)]	4.067	[Gd(Thi)]	2.897
[Gd(Asp)(Thr)H <sub>2</sub> ]	25.927	[Gd(Pro)]	4.507	[Gd(Lys)]	3.365
[Gd(Asp)(Ser)H <sub>2</sub> ]	26.287	[Gd(Val)]	3.457	[Gd(Tyr)]	4.247
[Gd(Cit)(Thr)H <sub>2</sub> ]	22.347	[Gd(Thr)]	4.477	[Gd(Orn)]	3.269
[Gd(Glu)(Ala)H <sub>2</sub> ]	23.127	[Gd(His)]	3.087	[Gd(Ox)]	7.137
[Gd(Cit)(Ala)H]	18.428	[Gd(Cys)]	4.827	[Gd(Ox) <sub>2</sub> ]	10.127
[Gd(Cit)(Ala)H <sub>2</sub> ]	26.720	[Gd(Arg)H]	15.852	[Gd(HSA)]	6.465
[Gd(Cit)(Ala)H <sub>3</sub> ]	30.730	[Gd(Glu)]	4.727	[Gd(IgP)]	5.205
[Gd(Cit)(Gly)H]	18.529	[Gd(Glu)H]	11.857	[Gd(HPO <sub>4</sub> )]	5.037
[Gd(Cit)(Gly)H <sub>2</sub> ]	30.935	[Gd(Gln)]	3.917	[Gd(HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	8.847
[Gd(Cit)(Val)H]	18.446	[Gd(Trp)]	5.117	[Gd(OH) <sub>2</sub> ]	6.593
[Gd(Cit)(Val)H <sub>2</sub> ]	26.704	[Gd(Leu)]	4.627	GdPO <sub>4</sub> (s)	-20.010
[Gd(Cit)(Val)H <sub>3</sub> ]	30.660	[Gd(Lys)(Suc)]	7.3159	Gd(OH) <sub>3</sub>	21.700
[Gd(Lys)(Citl)]	7.9325	[Gd(Lys)(Suc)H <sub>3</sub> ]	23.2568	Gd <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (s)	-32.200
[Gd(Lys)(Citl)H]	15.4237	[Gd(Lys)(Suc)H <sub>2</sub> ]	20.3521		
[Gd(Cit)(Gly)H <sub>2</sub> ]	26.911	[Gd(Tyr)(Orn)]	8.5134		

Као слободан јон, гадолинијум је високо токсичан, али се уопштено сматра безбедним приликом администрације у облику хелатног комплекса. Једињења се могу

---

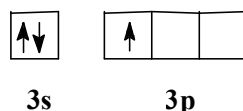
класификовати у зависности да ли су макро-цикличне или линеарне геометрије и да ли су јонски или не. Циклично јонска једињења гадолинијума најлакше ослобађају јон гадолинијума и зато су најбезбеднија.

Најпознатији комерцијални хелатни контрасни агенси гадолинијума за употребу су *Omniscan*, *Multihance*, *Magnevist*, *ProHance*, *Vasovist*, *Eovist* и *OptiMARK*. Гадолинијум контрасни агенси у MRI су се показали безбеднији од контрасних агенаса јода који су се користили у радиографији X-зрацима или компјутерској томографији. Иако су се агенси гадолинијума показали успешним за пацијенте са реналним погоршањем, код пацијената са озбиљним реналним поремећајима која захтевају дијализе, постоји ризик од ретких и озбиљних болести (нефрогена системска фиброза и нефрогена фиброзна дермопатија) који могу имати везу са употребом извесних контрасних агенаса гадолинијума. Иако узрочна веза није у потпуности доказана, према процедурама у SAD пацијенти на дијализи требају добити контрасне агенсе гадолинијума само ако је неопходно и дијализа се треба извршити што раније након скенирања ради моменталног уклањања контрасног агенса из тела.<sup>69,70</sup>

## 1.7. Особине $Al^{3+}$ -јона у воденим растворима

Алуминијум има атомску масу 27.0 (постоји само један природни изотоп), атомски број 13, густину  $2.79 \text{ g/cm}^3$ , тачку топљења  $660.4^\circ\text{C}$  и тачку кључања  $2467^\circ\text{C}$ . То је кристално сиво бели растегљив метал. Редокс потенцијал му је  $-1.66\text{V}$ ,  $+3$  оксидационо стање, и мали атомски радијус од  $57 \text{ pm}$  који омогућава стабилност његових једињења. Метал је који јако хидролизује и уопштено је нерастворан у опсегу рН вредности од 6-8. При рН вредностима које су мање од 6 или веће од 8 као и у условима присуства неорганских и органских лиганата, растворљивост  $Al^{3+}$ -јона је повећана. Чисти алуминијум је нестабилан према оксидацији и у случају контакта са ваздухом формира танак филм оксида по површини, креирајући заштитни слој који је отпоран на корозију. Алуминијум оксид, сиров материјал који се користи у индустрији производње алуминијума појављује се у два изомерна облика:  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  и  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ .<sup>247</sup>

У основном стању атом алуминијума има електронску конфигурацију  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^1$ . Конфигурација задње љуске ( $ns^2 np^1$ ) може се шематски представити:



У воденим растворима алуминијум се налази у стабилном тровалентном стању, хидратисан са шест молекула воде, док је оксидационо стање  $+1$  веома безначајно и ретко. Стабилно тровалентно стање код алуминијума се може објаснити великом енергијом хидратације ( $4180 \text{ kJ/mol}$ ). Енергија хидратације зависи од наелектрисања и величине јона па је за мали јонски радијус од  $0.045 \text{ nm}$  и наелектрисање  $+3$  та енергија велика. Са оксидационим бројем  $+3$  алуминијум гради велики број једињења јонског и ковалентног карактера.

Најчешћа координација алуминијума је четири и шест. Координацији четири одговара  $sp^3$  хибридизација са тетраедарском структуром, док координацији шест одговара  $sp^3d^2$  хибридизација са октаедарском структуром. Са малим јонским радијусом и великим наелектрисањем  $Al^{3+}$ -јон има велики јонски потенцијал и у воденим растворима лако хидролизује у одсуству других лиганата.

Табела 20. Најважнија хемијска својства алуминијума<sup>11</sup>

Ковалентни радијус (nm)	Јонски радијус (nm)	Тачка топљења (K)	Тачка кључања (K)
0.125	0.045	931.15	2573.15
Прва $E_j$ (eV)	Друга $E_j$ (eV)	Трећа $E_j$ (eV)	Редокс потенцијал (V)
5.98	19.0	28.44	$Al^{3+}/Al$ -1.66

У зависности од рН раствора  $Al^{3+}$ -јон хидролизује и даје различите мононуклеарне и полинуклеарне хидролитичке комплексе. При ниским вредностима рН,  $Al^{3+}$ -јон постоји у облику аквакомплекса  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ . Овај комплекс има октаедарску конфигурацију, и веома лако ступа у протон-трансфер реакције.

Са повећањем рН раствора долази до хидролитичких реакција и стварања мононуклеарних комплекса  $[Al(OH)]^{2+}$ ,  $[Al(OH)_2]^+$  и  $Al(OH)_3^0$ . При вишим концентрацијама  $Al^{3+}$ -јона долази до формирања полинуклеарних комплекса различитог састава.

Од нарочитог су значаја комплекси  $Al^{3+}$ -јона са органским лигандима и у литератури постоје одређени подаци о комплексирању  $Al^{3+}$ -јона са органским лигандима. Обзиром да је  $Al^{3+}$ -јон метални јон који припада групи јаких *Lewisovih* киселина, уочљив је његов велики афинитет према органским лигандима који су јаке *Lewisove* базе. У том смислу најзначајније донорске групе су оне које су донори кисеоника са негативним наелектрисањем,  $HO^-$  или  $RO^-$ , али је свакако најзначајнији оксидни  $O^{2-}$  јон.

Табела 21. Хидролитички комплекси  $Al^{3+}$ -јона<sup>11</sup>

Комплекс	Средина ( $mol/dm^3$ )	$mmol/dm^3$	T(K)	$-log\beta$
$[Al(OH)]^{2+}$	0.1 $NaClO_4$	10.0-50.0	298	5.30
	0.5 $NaClO_4$	5.0-50.0	298	4.82
	0.1 $NaNO_3$	0.1-1.0	298	5.33
	0.5 $NaNO_3$	1.0-10.0	298	5.65
$[Al(OH)_2]^+$	0.1 $NaClO_4$	2.5-50.0	298	9.90
$[Al(OH)_3]_{aq}$	0.1 $NaClO_4$	2.5-50.0	298	15.60
$[Al(OH)_4]^-$	0	-	298	-23.00
$[Al_3(OH)_4]^{5+}$	0.6 $NaCl$	2.5-20.0	298	13.13
	3.0 $NaCl$	<0.30	298	-13.44
	0.5 $NaNO_3$	1.0-10.0	298	12.60
	3.0 $NaNO_3$	2.0-80.0	298	13.22
	3.0 $NaClO_4$	<0.15	298	-13.20
	3.0 $NaClO_4$	<0.30	298	-13.12
	3.0 $NaNO_3$	0.01-0.30	298	-13.30
	3.0 $NaNO_3$	0.01-0.30	298	-13.30
$[Al_{13}(OH)_{32}]^{7+}$	1.0 $NaClO_4$	-	298	-104.81
	0.01 $NaClO_4$	-	298	-100.4
	1.0 $KCl$	-	372.6	-64.3
	1.0 $KCl$	-	397.8	-52.9
	1.0 $KCl$	-	422.8	-43.9

Хидроксидни јон формира многе комплексе са  $Al^{3+}$ -јоном, док се оксидни анјон који се теже ствара може наћи у полимерним хидролитичким врстама које премашавају два или више  $Al^{3+}$ -јона. Флуоридни јон је малог радијуса, негативан и изоелектричан са  $OH^-$ . Међутим, и најјача веза флуора и  $Al^{3+}$  је ипак значајно слабија него његова веза са хидроксидним јоном. Ова разлика је последица поларности хидроксидног јона услед усмерености негативног наелектрисања према електрон акцептору (металном јону). Због тога метални јон поседује мању густину негативног наелектрисања при координацији са флуоридним анјоном него у случају координације са хидроксидним.

У воденим растворима  $Al^{3+}$ -јон показује изражен афинитет према одређеним органским лигандима. У том смислу најизраженији афинитет је према монодендатним лигандима као што су: алкоксидни ( $RO^-$ ), феноксидни ( $C_6H_5O^-$ ) и карбоксилатни ( $-COO^-$ ). Ови лиганди се могу наћи и у бидендатним паровима у природним или синтетичким лигандима према којима афинитет не показује само  $Al^{3+}$ -јон већ и остали тровалентни јони. Такви бидендатни парови су на пример катехолатни ( $^-OC_6H_4O^-$ ) и хидокси-ацидни анјон ( $R-CHO^-COO^-$ ). Јаке *Lewisove* базе у раствору испољавају висок афинитет и према водоничном јону, тако да при координацији  $Al^{3+}$ -јона са таквим донорским групама у воденим растворима увек постоји и конкурентна реакција ових група са водоничним јоном.

Литературни подаци указују да се при комплексирану  $Al^{3+}$ -јона са различитим органским лигандима формирају стабилни комплекси при чему је хидролиза без обзира на јаке хидролитичке тенденције јона сузбијена у значајној мери. У табели 22 (страна 86) приказане су одређене константе стабилности  $Al^{3+}$  комплекса са неким изабраним типовима органских лиганата. Њихова разноликост указује на значајну варијацију структуралних типова као и широк опсег константи стабилности.

Константе стабилности за награђене комплексе имају високе вредности па се може закључити да  $Al^{3+}$ -јон гради веома стабилне комплексе са лигандима који садрже више координирајућих група са кисеоником као дономом електронског пара.

У највећем броју случајева, равнотежна константа стабилности (као логаритамска вредност) за реакцију



се приказује као

$$K = \frac{[AIL^{(3-n)+}]}{[Al^{3+}] \times [L^{n-}]} \quad (101)$$

Међутим, није увек случај да се константа равнотеже изражава на овакав начин. За лиганде који су јаке *Lewisove* базе понекад није могуће да се одреди или израчуна концентрација лиганата  $L^{n-}$ . Притом је једна или више константи протоновања било непозната било нетачно одређена, па је рачунање вредности  $\log K$  или немогуће или је вредност нетачна. Ова потешкоћа се превазилази на начин приказан следећим једначинама:



$$K_1^H = \frac{[AIL^{(3-n)+}] \times [H^+]}{[Al^{3+}] \times [HL^{(n-1)}]} \quad (103)$$



$$K_2^H = \frac{[AIL^{(3-n)+}] \times [H^+]^2}{[Al^{3+}] \times [H_2L^{(n-2)}]} \quad (105)$$

На овакав начин равнотежне константе се могу у потпуности прецизно одредити потенциометријском методом, у рН опсегу од 2-12, независно од нетачних или непоузданих вредности константи протоновања лиганата изнад рН 12. Није познато да алуминијум припада елементима у траговима који су есенцијални за људско тело. Прецизно знање о биокинетици овог метала не постоји и може се постићи индиректним тест методама због недостатка природних изотопа. Хумани организам може абсорбовати алуминијум и његове компоненте орално, преко дисања, и парентерално преко медикамената који садрже алуминијум. Не постоје индикације о перкутаној абсорпцији.

Прецизни механизам и локализација апсорпције за орално унет алуминијум није познат за сада. Претпоставка је да се алуминијум абсорбује у стомаку и дуоденуму као и у јејунуму (делу танког црева). Абсорбована количина зависи од растворљивости

једињења алуминијума и нивоа гастроинестиналне рН вредности. Поред тога, гвожђе и флуор утичу на повећање абсорпције. Такође, утицај на абсорпцију алуминијума могу остварити и хормони и витамин D. Дневно нутрационо уношење алуминијума је од 5-10 mg, а мање од 1% ове количине се абсорбује. Истраживања су показала да се алуминијум директно абсорбује у плућима, а количина која ће се абсорбовати зависи од величине удахнутих честица.

**Табела 22.** Константе стабилности  $Al^{3+}$ -комплекса са неким органским лигандима на 298.0 K у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини. L- лиганд (анјон киселине)<sup>11,77</sup>

Лиганд (L)	Комплекс	log β
Млечна киселина, HL	AlL	2.36
	AlL <sub>2</sub>	4.42
	AlL <sub>3</sub>	5.80
Јабучна киселина, H <sub>2</sub> L	AlL	3.32
	AlL	7.98
Лимунска киселина, H <sub>3</sub> L	AlHL	2.94
	AlL	3.31
	AlH <sub>1</sub> L	6.23
	Al <sub>3</sub> (OH)(H <sub>1</sub> L) <sub>3</sub>	14.43
	Al <sub>3</sub> (OH) <sub>4</sub> (H <sub>1</sub> L) <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-10.91
	AlL <sub>2</sub>	7.65
Винска киселина, H <sub>2</sub> L	AlH <sub>1</sub> LH	1.18
	AlH <sub>1</sub> L	5.15
	AlL <sub>2</sub>	3.72
	AlH <sub>1</sub> L <sub>2</sub>	12.67
	AlH <sub>4</sub> L <sub>3</sub> H <sub>4</sub>	-15.92
	AlH <sub>4</sub> L <sub>3</sub>	10.89
	AlH <sub>5</sub> L <sub>3</sub>	12.7
Салицилна киселина, H <sub>2</sub> L	AlLH	-0.2
	AlL <sub>2</sub> H	-2.8
	AlL <sub>3</sub> H	-6.5
Катехол, H <sub>2</sub> L	AlLH <sub>2</sub>	-0.6
	AlL <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	-9.10
	AlL <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	-13.61
	AlHL <sub>2</sub>	6.05
	AlHL <sub>3</sub>	8.05
Серин	Al(HL)	11.21
	AlL	5.71
	Al(OH) <sub>2</sub> L	-2.52
	Al(OH) <sub>3</sub> L	-7.48
	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	4.62
Глутаминска киселина	Al(HL)	12.20
	AlL	7.86
	Al(OH) <sub>2</sub> L	-2.30
	Al(OH) <sub>3</sub> L	-8.44

Неколико истраживачких група је дискутовало секундарну гастроинестиналну абсорпцију удахнутих честица алуминијума. Претпоставља се да се честице алуминијума транспортују преко епитела респираторног тракта у правцу ждрела а потом се гутају. Количина инхалационо унете алуминијумске прашине из природне

околине може се занемарити на садашњем степену сазнања. Ињекциони и инфузиони раствори могу се контаминирати алуминијумом, тако да се неки случајеви парентералног уноса алуминијума не могу искључити. Због тога се са медицинског гледишта пацијентима са реналном дисфункцијом као и онима који се прихрањују парентерално мора посветити посебна пажња у том смислу.

Након релативно брзог уноса алуминијума у интерстицијумске зидове, његова транзиција према крви је значајно спорија. У плазми се алуминијум везује око 80% за протеине, посебно за трансферин. Количина која се тренутно сматра нормалном је око  $5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ .

Алуминијум се може детектовати у свим органима, али једини органи у којима концентрација алуминијума расте са порастом година су плућа и хилусне лимфне жлезде. Са порастом уноса алуминијума његова највећа концентрација је у костима, слезени и срчаном мишићу. Код пацијената са реналном дисфункцијом уочено је повећање концентрације алуминијума у мозгу, због повећане пермеабилности баријере крв-мозак за алуминијум.

Повећани ниво алуминијума у костима се сматра последицом хормонског дисбаланса и дефицијенције витамина D. Орално унет алуминијум који није абсорбован се екскретује као алуминијум фосфат у фецесу. Већина абсорбованог алуминијума се елиминише урином, у количинама мањим од  $14 \mu\text{g}$  дневно. Значајније већи нивои се могу наћи при већим изложеностима алуминијуму. Подаци о биолошком полуживоту алуминијума су различити.

Сумарно, анализирајући податке који су присутни у литератури може се закључити да се алуминијум елиминише у неколико корака па стога постоје и неколико полуживота алуминијума. Тренутно се дискутује о краткотрајном (неколико сати), средњем (неколико дана) и дугом (неколико месеци) полуживоту алуминијума. Нормални нивои концентрације алуминијума у биолошким материјалима се могу приказати табеларно (табела 23).

**Табела 23.** Нормални нивои концентрација алуминијума у биолошким узорцима<sup>72</sup>

Материјал	Тежина	Концентрација
Серум, плазма или целокупна крв	$\leq 5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$	$\leq 0.2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
Урин	$\leq 14 \mu\text{g}/24 \text{ h}$	$\leq 0.5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3/24 \text{ h}$
Кости	$1.5-13.3 \mu\text{g}/\text{g}$	$0.05-0.49 \mu\text{mol}/\text{g}$
Мозак		
<i>Сива маса</i>	$0.80-3.56 \mu\text{g}/\text{g}$	$0.03-0.13 \mu\text{mol}/\text{g}$
<i>Бела маса</i>	$0.74-3.26 \mu\text{g}/\text{g}$	$0.03-0.12 \mu\text{mol}/\text{g}$

Са аспекта токсичности алуминијума, разматрају се патолошке промене на плућима, централном нервном систему и костима. Као последица дејства алуминијума код радника који су у дужем временском периоду били изложени дејству алуминијума уочене су фиброзе плућа (тзв. Шаверова (*Shaver*) болест) и алуминозе праћене пнеумотораксом код радника ангажованих у производњи пиротехничких средстава. Код пацијената на дијализи уочене су појаве енцелопатије или дијализне деменције. Повећана концентрација алуминијума уочена је у пределима мозга код пацијената који болују од Алцхајмерове (*Alchajmerove*) болести. Такође је уочена и веза између алуминијума и остеоелације код пацијената на дијализи. Процена интерне изложености алуминијуму зависи од способности извршења тачних и прецизних мерења у биолошким материјалима. Многи аналитичари су суочени са проблемима детекције алуминијума у опсезима ррб који су повезани са проблемима скупљања, складиштења, третмана и финалних анализа узорака.

За аналитичко одређивање алуминијума предложено је неколико аналитичких метода: флуоресценција X зрацима, неутрон активациона анализа, NMR, графитна AAS

(GFAAS), атомска емисиона спектрометрија, пламена емисија, индуктивно куплована плазма емисиона спектрометрија. Највећи степен успеха у одређивању алуминијума у биолошким материјалима постигнут је применом методе GFAAS.<sup>11, 71-77</sup>



## 1.8. Литературни преглед комплексирања $Al^{3+}$ и $Gd^{3+}$ -јона са флуорохинолонима и литературни модели специјације $Al^{3+}$ и $Gd^{3+}$ -јона у хуманој крвној плазми

### 1.8.1. Литературни преглед комплексирања $Al^{3+}$ и $Gd^{3+}$ -јона са флуорохинолонима

Реакције комплексирања металних јона ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Sr^{3+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) са флуорованим хинолонима (норфлорксацин, офлорксацин, флумекин, налидиксинска киселина, ципрофлорксацин, ...) су интезивно пручаване углавном применом метода потенциометрије и спектрофотометрије у различитим условима температуре, јонске средине, концентрација и рН. Међутим, постоји веома мало литературних података о комплексирању јона метала алуминијума и гадолинијума и флуорохинолона као биолиганда. До сада је проучавано комплексирање  $Al^{3+}$  јона и флуорохинолона норфлорксацина, офлорксацина, флорорксацина и моксифлорксацина методом потенцијометрије и спектрофотометрије.

$Al^{3+}$  јон са норфлорксацином при  $25^{\circ}C$  у  $0,15 \text{ mol/dm}^3$   $NaCl$  јонској средини, гради комплексе типа  $ML$ ,  $ML_2$  и  $ML_3$  са константама стабилности  $\log\beta=7.03$ ;  $\log\beta=12.47$ ; и  $\log\beta=17.92$ .<sup>78</sup>

$Al^{3+}$  јон са офлорксацином при  $25^{\circ}C$  у  $0,1 \text{ mol/dm}^3$   $LiCl$  јонској средини гради комплексе типа  $ML$ ,  $ML_2$  са константама стабилности  $\log\beta=10.2$  и  $\log\beta=14.84$ .<sup>37</sup>

Међутим, приликом проучавања реакција комплексирања  $Al^{3+}$  јона са офлорксацином при  $25^{\circ}C$  у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $LiCl$  јонској средини у присуству  $10 \text{ mmol/dm}^3$   $SDS$ -а потврђен је комплекс типа  $ML$  са константом стабилности  $\log\beta=10,28$ .<sup>38</sup>

$Al^{3+}$  јон са флорорксацином у при  $25^{\circ}C$  у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $LiCl$  јонској средини, гради комплексе типа  $M(HL)L^{2+}$ ,  $M(HL)^{3+}$ ,  $ML^{2+}$ ,  $M(OH)L^+$  и  $M(OH)_2L$  са константама стабилности  $\log\beta=24.87(6)$ ;  $\log\beta=14.02(3)$ ;  $\log\beta=11.41(1)$ ;  $\log\beta=5.2(2)$ ; и  $\log\beta=-1.61(2)$ .<sup>79</sup>

$Al^{3+}$  јон са моксифлорксацином у при  $25^{\circ}C$  у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $LiCl$  јонској средини, гради комплексе типа  $M(HL)L^{2+}$ ,  $M(HL)^{3+}$ ,  $ML^{2+}$ ,  $M(OH)L^+$  и  $M(OH)_2L$  са константама стабилности  $\log\beta=28.47(5)$ ;  $\log\beta=16.59(4)$ ;  $\log\beta=11.66(1)$ ;  $\log\beta=5,28(2)$ ; и  $\log\beta=-2.92(2)$ .<sup>79</sup>

Најзначајнији комплекси  $Al^{3+}$  јона и флуорохинолона ципрофлорксацина, еноксацина, лорексацина и еноксацина приказани су у табели 24, а најзначајнији комплекси  $Al^{3+}$  јона и флуорохинолона лорексацина, офлорксацина, норфлорксацина и спарфлорксацина приказани су у табели 25 (страница 90).<sup>80</sup>

**Табела 24.** Литературни преглед комплексирања  $Al^{3+}$  јона са ципрофлорксацином, еноксацином, лорексацином и еноксацином<sup>80</sup>

$pqr$	$cipro$	$enox$	$enro$	$lorox$
$Al^{3+}$				
(1, -2, 1)	–	$-3.37 \pm 0.09$	$-3.96 \pm 0.08$	$-2.12 \pm 0.06$
(1, -1, 1)	$4.96 \pm 0.03$	$5.26 \pm 0.04$	$4.10 \pm 0.04$	$5.98 \pm 0.09$
(1, 0, 1)	$11.21 \pm 0.05$	$11.27 \pm 0.05$	$9.87 \pm 0.06$	$13.25 \pm 0.08$
(1, 1, 1)	$16.27 \pm 0.0$	$16.33 \pm 0.05$	$15.14 \pm 0.06$	$18.95 \pm 0.07$
(1, 2, 1)	$18.87 \pm 0.09$	$19.24 \pm 0.08$	$18.09 \pm 0.09$	$23.01 \pm 0.08$
(1, -1, 2)	–	$8.99 \pm 0.09$	$7.03 \pm 0.05$	$9.01 \pm 0.16$
(1, 0, 2)	$15.92 \pm 0.08$	$27.31 \pm 0.09$	$14.70 \pm 0.06$	$17.19 \pm 0.37$
(1, 1, 2)	$23.73 \pm 0.05$	$45.04 \pm 0.09$	$21.67 \pm 0.05$	$25.78 \pm 0.14$
(1, 2, 2)	$29.67 \pm 0.06$	$51.43 \pm 0.09$	$27.36 \pm 0.06$	$23.36 \pm 0.11$
(1, 0, 3)	$19.56 \pm 0.16$	$20.32 \pm 0.16$	$22.89 \pm 0.24$	–
(1, 1, 3)	$27.78 \pm 0.29$	$28.56 \pm 0.02$	–	$30.19 \pm 0.33$
(1, 2, 3)	$36.41 \pm 0.07$	$36.85 \pm 0.10$	$37.68 \pm 0.25$	$38.24 \pm 0.29$
(1, 3, 3)	$43.53 \pm 0.08$	$43.83 \pm 0.08$	$44.28 \pm 0.23$	$45.55 \pm 0.44$

$p$ -број јона метала,  $q$ -број  $H^+$  или  $OH^-$  јона у комплексу,  $r$ -број лиганда

**Табела 25.** Литературни преглед комплексирања  $Al^{3+}$  јона са левофлорсаацином, офлорсаацином, норфлорсаацином и спарфлорсаацином<sup>80</sup>

pqr $Al^{3+}$	levo	oflo	nor	spar
(1, -2, 1)	-0.12±0.06	-3.56±0.06	-4.09±0.07	
(1, -1, 1)	7.71±0.06	5.21±0.03	4.71±0.02	6.13±0.05
(1, 0, 1)	13.88±0.05	12.21±0.03	10.23±0.06	13.82±0.05
(1, 1, 1)	18.90±0.05	17.56±0.04	15.36±0.03	17.68±0.07
(1, 2, 1)	21.38±0.10	18.67±0.05	17.80±0.08	20.53±0.09
(1, -1, 2)	7.85±0.20	7.05±0.13	7.77±0.22	8.41±0.25
(1, 0, 2)	16.54±0.09	15.32±0.08	16.28±0.12	17.25±0.17
(1, 1, 2)	24.21±0.09	22.70±0.07	23.50±0.10	24.88±0.14
(1, 2, 2)	31.17±0.08	28.84±0.07	29.46±0.08	29.47±0.19
(1, 0, 3)	18.14±0.28	19.14±0.33	19.17±0.16	-
(1,1,3)	26.49±0.17	27.34±0.25	27.74±0.11	28.40±0.28
(1, 2, 3)	34.05±0.13	34.79±0.24	35.79±0.07	35.80±0.32
(1, 3, 3)	40.85±0.07	41.11±0.15	42.79±0.05	42.53±0.23

p-број јона метала, q-број  $H^+$  или  $OH^-$  јона у комплексу, r-број лигананда

Литературни подаци о комплексирању  $Gd^{3+}$  јона и флуорохинолона нису пронађени током израде ове дисертације. У литературним изворима је пронађено да су синтетизована три комплекса гадолинијума и флуорохинолона ( $Gd(L)_3 \times 6H_2O$ ,  $L=nor, oflo, cipro$ ) који показују јак инхибиторни ефекат на леукемију тип HL-60 (мерено методом МТТ-Метил-Тиазол-Тетразолиум) и тумор јетре тип BEL-7402 (мерено методом SRB-Сумпорродамин Б). Резултати истраживања показују да комплекс  $Gd(oflo)_3 \times 6H_2O$  показује јак инхибиторни ефекат на тумор јетре тип BEL-7402, а комплекс  $Gd(cipro)_3 \times 6H_2O$  показује јак инхибиторни ефекат на леукемију тип HL-60 и тумор јетре тип BEL-7402.<sup>81</sup>

### 1.8.2 Литературни модели специјације $Al^{3+}$ и $Gd^{3+}$ -јона у хуманој крвној плазми

Специјације јона метала ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ga^{2+}$ ,  $In^{3+}$  ...) у хуманој крвној плазми као медијуму су интензивно проучаване, али постоји веома мало литературних података о специјацијама  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми. Током израде докторске дисертације нису пронађени литературни подаци о специјацији јона  $Gd^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми. У анализираним литературним изворима<sup>62-66, 68, 93-96, 98, 100, 101</sup> углавном су проучавања специјација јона метала и хумане крвне плазме била заснована на Мау-овом компјутерском моделу хумане крвне плазме развијеном компјутерским програмом ECCLES или коришћењем базе података JESS.

Равнотежни модел за специјацију  $Al^{3+}$  јона у серуму је 1992. године проучаван компјутерским програмом ECCLES од стране *W.R.Harrisa*<sup>5</sup>, а *J.Wang* је са сарадницима 2004. године компјутерским програмом MINTEQA2 проучавао специјацију  $Gd^{3+}$  јона у хуманом интерстицијумском флуиду<sup>69</sup>.

Ови литературни модели су послужили за поређења са нашим резултатима добијеним компјутерском симулацијом програмом HySS.

## 1.9. Методе за одређивање састава и константи стабилности комплекса

Реакције образовања комплекса доводе до измене колигативних особина раствора (апсорбанције, електродног потенцијала, интензитета расуте светлости ...). Мерењем било ког колигативног параметра који се у процесу настајања комплекса мења могуће је одредити састав, константе стабилности и термодинамичке величине формираног комплекса. Велики број параметара који се могу пратити као и расположивих система за праћење омогућују разноврстан избор метода за анализу насталих комплекса. На основу употребљене технике мерења и врсте прилаза обради експерименталних података све методе се могу поделити у две групе.

Прву групу чине методе обраде експерименталних података које се заснивају на општем прилазу разматрања равнотежа у комплексирајућим срединама независно од примењене технике мерења. Обзиром да се ове методе могу применити за дефинисање карактеристичних величина комплекса независно од тога да ли се концентрација компоненти прати мерењем рН, апсорбанције, проводљивости, ... називају се још и опште методе и у њих се убрајају:

- Бјерумова (*Bjerrum*) метода,
- Леденова (*Leden*) метода,
- Фронеусова (*Froneaus*) метода и
- Жобова (*Jobb*) метода.

Другу групу чине методе обраде експерименталних података које користе мерење специфичних величина уз коришћење одговарајућих техника али могу дати неопходне податке који се могу обрадити првом групом метода. У ову групу спадају:

- електрохемијске методе (потенциометријске, поларографске),
- спектрофотометријске методе,
- поларографске методе,
- методе засноване на јонској измени,
- методе засноване на екстракцији,
- методе засноване на мерењу растворљивости,
- NMR методе,
- EPR методе,
- кинетичке методе и остале.

Експериментално добијени подаци обрађују се одговарајућим математичким методама како би се одредиле константе протоновања лиганда и стабилности насталих комплекса.

### 1.9.1. Потенциометријске методе

Основна карактеристика електрохемијских метода је потпуна независност од осталих метода. Ове методе се користе под условима константног коефицијента активности који се постиже употребом одговарајуће јонске средине раствора. Електрохемијске методе чине:

- потенциометријске методе,
- поларографске методе,
- волтаметријске методе,
- кондуктометријске методе и
- кулометријске методе.

Потенциометријске методе (најчешће коришћене) се могу поделити на директну потенциометрију и потенциометријску титрацију. При директној потенциометрији припрема се раствор са одговарајућом концентрацијом метала и лиганда за свако

мерење потенцијала. Дакле, задатак директне потенциометрије је да се мерењем EMS спрега:

**референтна електрода / испитивани раствор / индикаторска електрода**

одреди потенцијал индикаторске електроде и одговори на питање колика је концентрација јона у испитиваном раствору.

Потенциометријска мерења се користе у испитивањима равнотежа у растворима, за одређивање константи протоновања лиганда, константи стабилности хидролитичких комплекса као и константи стабилности обичних и мешовитих комплекса. Заснивају се на пропорционалности потенцијала мерне (индикаторске) електроде и концентрације електроактивног јона у раствору. Ако се електроактивни јон означи са  $X$ , његова равнотежна концентрација са  $[X]$ , потенцијал индикаторске електроде на којој се одиграва реверзибилна електродна реакција



биће дата Нернстовом (*Nernst*) једначином

$$e = e^0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_{X^{\oplus}}) \quad (107)$$

где је:  $e^0$  - равнотежни потенцијал а  $F$ -Фарадејева константа.

У општем случају потенциометријски се може пратити концентрација већег броја јона под условом да за сваки од њих постоји одговарајућа реверзибилна електрода. Процеси протоновања, хидролизе и комплексирања су праћени повећањем или смањењем концентрације водоничног јона у раствору. Та чињеница омогућава посредно праћење промене концентрације металног јона, лиганда и награђене врсте у раствору на основу мерења рН раствора.

### 1.9.1.1. Потенциометријско одређивање завршне тачке титрације (ZTT)

При проучавању реакција протоновања лиганда и комплексирања метала лигандом који може бити слаба киселина или база неопходно је одредити укупну концентрацију хидронијум јона у раствору. Та концентрација се одређује преко ZTT потенциометријске титрације испитиваног система са стандардним раствором јаке базе.

ZTT се може одредити применом различитих метода као што су:

- метода превојне тачке,
- метода првог и другог извода титрационе криве и
- Гранова (*Gran*) метода.

Прве две методе су погодне у случајевима када крива титрације има симетричан (сигмоидан) облик, а трећа када крива титрације нема симетричан облик или је асиметрична. Због тога је Гранова метода често применљива метода одређивања ZTT у реакцијама комплексирања јона метала због низа предности које поседује:

- није потребно познавати апсолутну вредност концентрације водоничног јона у раствору, тј. није потребна калибрација електродног система што је случај у класичним рН-метријским мерењима,
- може се користити у присуству металног јона који хидролизује или гради комплекс и
- није потребно вршити велики број мерења, нити је неопходно вршити мерења у близини тачке еквиваленције.

Гранова метода се може илустровати на примеру титрације јаке киселине јаком базом. Нека се одређена запремина  $V_0$  јаке киселине, концентрације  $C_k$ , титрује јаком базом концентрације  $C_b$ , у галванској ћелији типа:



где је RE-референтна електрода а SE-стаклена електрода. Константна јонска јачина се обезбеђује додавањем јаког електролита (NaCl, LiCl, NaClO<sub>4</sub>...) у титровани раствор тако да му је концентрација најмање 10 пута већа од полазне концентрације киселине.

Концентрација водоничних јона, после додавања запремине  $V_b$  јаке базе, пре ZTT дефинисана је изразом:

$$C_H = \frac{C_k V_0 - V_b C_b}{V_0 + V_b} \quad (108)$$

У тачки еквиваленције (ZTT):

$$C_k V_0 = C_b V_e \quad (109)$$

где је  $V_e$ -запремина базе потребна за неутрализацију киселине.

Заменом  $C_k$  у израз (109) добија се:

$$C_H = \frac{C_b (V_e - V_b)}{V_0 + V_b} \quad (110)$$

Обзиром да је:

$$pH = -\log C_H f_H = -\log a_H \quad (111)$$

где су  $a_H$  и  $f_H$  активност и коефицијент активности водоничних јона, онда се добија:

$$10^{-pH} = \frac{f_H C_b (V_e - V_b)}{V_0 + V_b} \quad (112)$$

односно:

$$(V_0 + V_b) 10^{-pH} = f_H C_b (V_e - V_b) \quad (113)$$

После тачке еквиваленције (ZTT), концентрација OH<sup>-</sup> јона се представља изразом:

$$C_{OH} = \frac{C_b V_b - C_k V_0}{V_0 + V_b} \quad (114)$$

На основу претходних израза добија се израз за концентрацију OH<sup>-</sup> јона:

$$C_{OH} = \frac{C_b (V_b - V_e)}{V_0 + V_b} \quad (115)$$

Пошто се концентрација водоничног јона може израчунати из једначине :

$$C_H = \frac{K_W}{C_{OH}} \quad (116)$$

где је  $K_W$ -константа јонског производа воде, то се одговарајућим математичким трансформацијама добијају изрази који служе за одређивање тачке еквиваленције из другог дела титрационе криве, тј. после ЗТТ:

$$(V_0 + V_b)10^{pH} = \frac{C_b(V_b - V_0)}{f_H K_W} \quad (117)$$

При цртању Грановог дијаграма на апцису се наноси запремина додате базе, а на ординату  $(V_0+V_b)10^{pH}$  пре тачке еквиваленције, а после тачке еквиваленције на ординату се наноси  $(V_0+V_b)10^{pH}$ . При титрацијама раствора са високим концентрацијама  $H^+$  или  $OH^-$  јона и у случајевима када се титрација изводи при променљивој јонској јачини, почетне тачке одступају од праве Грановог дијаграма. У таквим случајевима ЗТТ се одређује из завршног дела титрације где све тачке леже на правој линији. До одступања од праве линије Грановог дијаграма долази у случајевима када се титрује раствор који садржи метални јон који гради са присутним лигандом комплексе или сам хидролизује. У таквим случајевима у почетном делу титрације тачке леже на правој Грановог дијаграма, док почетком хидролизе или комплексирања тачке почињу одступати од праве. Из тог разлога се ЗТТ одређује из тачака које леже на праволинијском делу Грановог дијаграма. Гранова метода има одређених недостатака. Неопходно је одржавати коефицијент активности јона током титрације константним као и вредност дифузионог потенцијала. Ови услови се постижу ако се користи довољно висока концентрација јона у раствору и не сувише висока концентрација киселине која се титрује (од 0.01-0.05 mol/dm<sup>3</sup>).

### 1.9.2. Спектрофотометријске методе

Спектрофотометријске методе се поред потенциометријских, највише користе за одређивање константи протоновања и константи стабилности награђених комплекса. Оне се заснивају на појави да при грађењу комплекса долази до промене у апсорпционим спектрима, што се у неким случајевима може и визуелно утврдити на основу промене боје, када је комплексно једињење обојено. Интензитет апсорбоване светлости која се пропушта кроз испитивани раствор зависи од концентрација датих компоненти у раствору који апсорбују светлост. Ова зависност апсорпције од концентрације дата је *Lambert-Berovim* законом:

$$A = \epsilon b C \quad (118)$$

где је  $A$ -апсорбанција раствора,  $\epsilon$ -моларни екстинциони коефицијент,  $b$ -дебљина апсорпционог слоја (cm) и  $C$ -концентрација компоненте која апсорбује. Мерењем апсорбанције раствора у функцији концентрације једне од компонената комплекса, или од односа концентрација компонената, могу се добити подаци из којих се може одредити састав и константа стабилности комплекса.

Спектрофотометријске методе које се најчешће користе за изучавање комплекса су:

- метода молских односа,
- *Jobova* метода,

- Adamovič-ева метода,
- Edmouns-Birnbaum-ова метода,
- Bentt-French-ова метода,
- Harvey-Manning-ова метода,
- Henry-Frank-Ostwald-ова метода,
- Nash-ова метода и
- метода Jacimirskog.

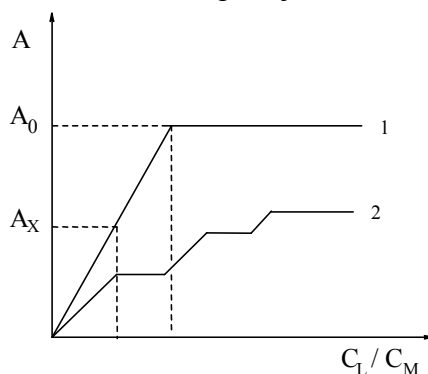
Најчешће коришћена метода за одређивање састава и константи стабилности релативно стабилних комплекса је метода молских односа која ће надаље бити детаљније објашњена. Експериментални поступак ове методе састоји се у мерењу апсорбанције серије раствора у којима се концентрација једне компоненте одржава константном (обично металног јона), а мења концентрација лиганда. Апсорбанција раствора мери се на одређеној таласној дужини и графички се представља у зависности од односа стехиометријских концентрација лиганда ( $C_L$ ) и металног јона ( $C_M$ ) (слика 45).

Ако се образује само један стабилан комплекс (слика 45-крива 1) онда апсорбанца расте линеарно са молским односом и постаје константна када се целокупна количина металног јона веже у комплекс, па даљи додаток лиганда не изазива промену апсорбанције. Тачка прелома криве одређује однос метала и лиганда у комплексу. Када је настали комплекс нестабилан, односно слабо или јако дисосован онда се добија крива која нема јасан прелом па се прелом добија из пресека тангенти. У случају образовања већег броја комплексних једињења и када је разлика у константама стабилности јако велика, онда се добија крива са више прелома (слика 45 крива 2). На основу снимљених апсорпционих спектра, константе стабилности награђених комплекса могу се израчунати на два начина.

Први начин: Предпоставимо да се образује комплекс типа  $ML_n$ , са лигандом који или не подлеже дисоцијацији, или је потпуно дисосован. Константа стабилности комплекса је:

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \quad (119)$$

где су  $[ML_n]$ ,  $[L]$  и  $[M]$  равнотежне концентрације комплекса, лиганда и јона метала.



Слика 45. График функције  $A=f(C_L/C_M)$

Моларни екстинциони коефицијент комплекса  $\varepsilon_k$ , одређује се из графика функције  $A=f(C_L/C_M)$  за случај када је  $C_L$  у вишку, по једначини:

$$\varepsilon_k = \frac{A_0}{[ML_n]b} \quad (120)$$

где је  $A_0$ -апсорбанција која одговара прелому криве. Обзиром да је тада сав метални јон преведен у комплекс, онда је  $[ML_n]=C_M$ , а  $b$ -дебљина апсорпционог слоја.

Када се израчуна средњи моларни апсорпциони коефицијент, онда се за било коју концентрацију лиганда у делу криве, пре хоризонталног дела, налази вредност апсорбанције и израчуна концентрација комплекса по једначини:

$$[ML_n] = \frac{A}{\varepsilon_k b} \quad (121)$$

Равнотежне концентрације метала и лиганда су:

$$[M] = C_M - [ML_n] \quad (122)$$

$$[L] = C_L - n[ML_n] \quad (123)$$

Заменом  $[ML_n]$ ,  $[L]$  и  $[M]$  добија се израз за одређивање константе стабилности:

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{(C_M - [ML_n])(C_L - n[ML_n])^n} \quad (124)$$

Када је лиганд анјон слабе киселине која дисосује по једначини:



онда се равнотежна концентрација лиганда израчунава узимајући у обзир константу дисоцијације киселине:

$$K_d = \frac{[H][L]}{[HL]} \quad (126)$$

као и вредност рН раствора, односно концентрације  $H^+$ -јона.

Узимајући у обзир константу дисоцијације може се израчунати равнотежна концентрација лиганда из следећег израза:

$$[L] = \frac{K_d [HL]}{[HA]} = \frac{K_d (C_L - n[ML_n])}{[H]} \quad (127)$$

Када је лиганд слабо дисосован онда је  $[L] \ll C_L - n[ML_n]$  па се израчунава вредност константе  $\beta_n$ .

Ако је лиганд прилично дисосован онда једначина (127) има облик:

$$[L] = C_L - n[ML_n] - [ML] \quad (128)$$

а равнотежна концентрација лиганда је:

$$[L] = \frac{C_L - n[ML_n]}{1 + [H]/K_d} \quad (129)$$



па се из ове једначине израчунава вредност константе стабилности. Израчунавање се врши за више тачака, а затим се нађе средња вредност.

Други начин: Одређивање константе стабилности комплекса заснива се на логаритамској зависности апсорбације раствора и концентрације лиганда. Ако се образује моно-нуклеарни комплекс типа  $ML_n$  константа стабилности дата је једначином чијим се логаритмовањем добија израз:

$$\log \frac{[ML_n]}{[M]} = \log \beta_n + n \log [L] \quad (130)$$

График функције  $\log[ML_n]/[M]=f(\log[L])$  даје праву за коју је нагиб једнак броју везаних лиганда у комплекс, а одсечак на ординати је  $\log\beta_n$ . Однос  $[ML_n]/[M]$  израчунава се из једначине:

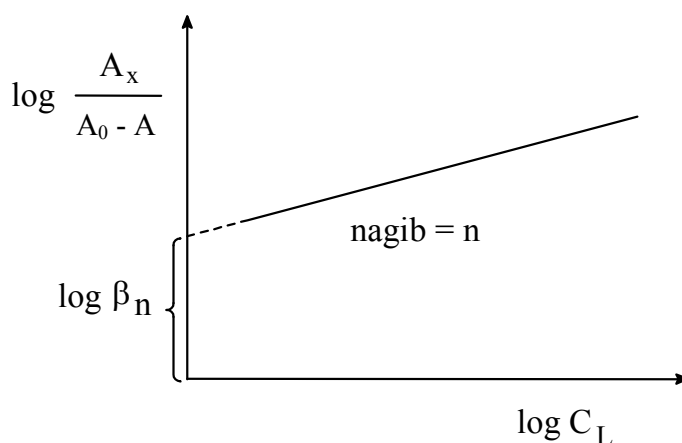
$$[ML_n] = \frac{A_x}{A_0 - A_x} \quad (131)$$

где је  $A_0$ -апсорбација хоризонталног дела криве, а  $A_x$ -апсорбација раствора за било коју вредност концентрације лиганда у првом делу криве.

За одређивање броја везаних лиганда  $n$ , црта се графичка зависност  $\log(A_x/(A_0 - A_x))=f(C_L)$ , при чему се узима да је  $[L] \approx C_L$ , што важи у случају образовања слабијих комплекса.

Поуздани резултати се могу добити ако су концентрације  $[ML_n]$  и  $[M]$  истог реда величине или се разликују за не више од десет пута. Ако се не врше ова израчунавања него се користи укупна концентрација лиганда израчуната константа стабилности је условна константа.

Метода молских односа се не може применити код система код којих не постоји погодан однос између сукцесивних константи стабилности комплекса и система чија једна компонента има малу растворљивост што онемогућава повећање концентрације до вредности потребних за образовање комплекса.<sup>4,11,13,20,60,71</sup>



Слика 46. График функције  $\log(A_x/(A_0 - A_x))=f(C_L)$

### 1.9.3. Масена спектрометрија

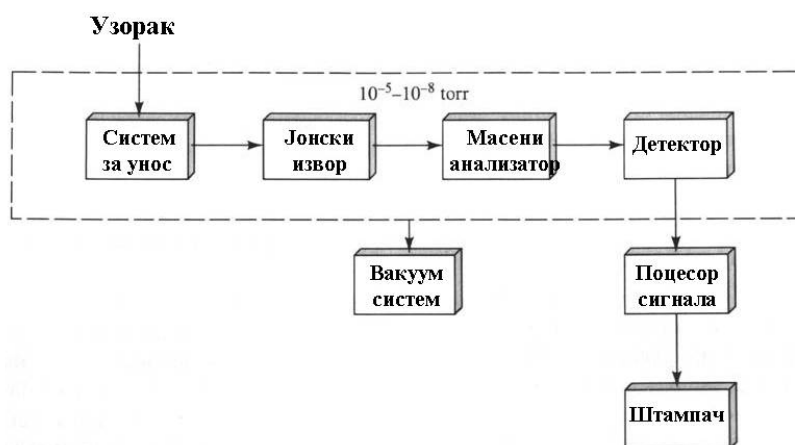
Масена спектрометрија као веома осетљива аналитичка метода заснива се на јонизацији испитиваног анализата, раздвајању образованих јона под дејством магнетног поља и регистровању истих према својој маси, тј. према односу масе према

наелектрисању ( $m/e$ ). Она се користи за квантитативно одређивање атома или молекула и одређивање хемијских и структурних информација о молекулима. Молекули имају карактеристичне фрагментације које дају информације да би се идентификовале структурне компоненте. Масена спектрометрија је у могућности да обезбеди информације о елементалном саставу узорка, хемијским структурама, квантитативном саставу комплексних смеша, структури и саставу чврстих тела и површина и изотопском односу атома у узорку. Код чистих једињења, масена спектрометрија омогућује одређивање молекуларне масе, молекулских формула и структурних информација из процеса фрагментације. Такође омогућује и квантитативну анализу. Код смеша омогућује анализу компонената комбинацијом метода: гасна хроматографија-масена спектрометрија (GC-MS), капиларна електрофлореза-масена спектрометрија и тандем масена спектрометрија (MS-MS).

Генерално, масени спектрометар:

- креира гасно фазне јоне,
- врши раздвајање јона у простору или времену на основу њиховог односа масе и наелектрисања ( $m/e$ ) и
- мери количину јона на сваком односу масе и наелектрисања ( $m/e$ ).

Масени спектрометар садржи основне делове: систем за уношење узорка, јонски извор (комора), магнетни анализатор, детектор и писач.



Слика 47. Масени спектрометар (основни делови)

У масеним спектрима који представљају масе јона у односу према релативном интензитету одговарајуће јонске врсте се разликују различите врсте јона: молекулски јон, фрагментни јони, преуређени јони, метастабилни јони и вишеструко наелектрисани јони. Масени спектри дају основне информације о врсти и релативној концентрацији присутних јонских врста. Моћ раздвајања масеног спектрометра описује се резолуцијом ( $R=m/\Delta m$ ) која се дефинише односом масе јона ( $m$ ) и разлике маса између раздвојених

пикова у масеном спектру ( $\Delta m$ ). Нпр. масени спектрометар са резолуцијом 1000 може раздвојити јоне са односима масе и наелектрисања 100.0 од јона са односом масе и наелектрисања 100.1.

*Молекулски јон* ( $M^+$ ) настаје када се молекулу узорка уклони један електрон, а његов значај је у томе да његова маса представља молекулску тежину анализираног једињења. То је најтежи јон у масеном спектру, често је изразит и лако уочљив на самом крају масеног спектра.

*Фрагментни јони* настају у јонском извору као резултат кидања појединих веза у молекулском јону. Они могу настати и даљом фрагментацијом већ фрагментних јона. Процес фрагментације јона представља читав низ конкурентских реакција које се паралелно одвијају. Фрагментни јони са молекулским јонима чине кључ за идентификацију узорка из његовог масеног спектра.

*Преуређени јони* су посебан случај фрагментних јона који нису последица простог кидања хемијских веза као што је то случај код фрагментних јона, већ су и последица премештања једног атома атома или групе атома из једног положаја у матичном јону у други, због могућности стварања стабилнијег производа. Процесом преуређивања најчешће долази до елиминације стабилних неутралних фрагмената (као што су  $H_2O$ ,  $H_2S$ ,  $HCN$ ,  $C_2H_2$  ...).

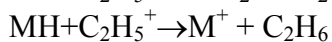
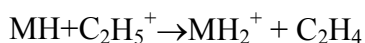
*Метастабилни јони* ( $m^*$ ) настају процесом фрагментације јона од јонског извора ка детектору. Њихови пикови су најчешће на децималним вредностима масених бројева, слабог су интензитета, знатно развучени и понекад тешко уочљиви. Значај ових јона је да они повезују матичне и фрагментне јоне, говоре нам о путевима фрагментације и указују на то шта је од чега настало.

*Вишеструко наелектрисани јони* јављају се код једињења чији су потенцијали јонизације најнижи (ароматична једињења, једињења која садрже хетероатоме ...).<sup>82</sup>

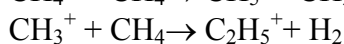
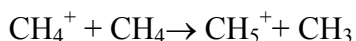
У масеној спектрометрији примењују се различите методе јонизације:

#### *Хемијска јонизација (CI-Chemical ionization)*

Хемијска јонизација користи реагенс јон који реагује са молекулима анализата ради формирања јона протонским или хидридним преносом:



Реагенс јон се добија увођењем метана у извор јона електронског удара. Судари електрона производе  $CH_4^+$  и  $CH_3^+$  који реагују са метаном дајући  $CH_5^+$  и  $C_2H_5^+$ .



#### *Јонизација плазмом и ужареном плазмом (Plasma and glow discharge)*

Плазма је топао парцијално јонизован гас који ефикасно побуђује и јонизује атоме. Најчешћи извор плазме је индуктивно куплована плазма. Ужарена плазма је

плазма под ниским притиском која се ствара између две електроде. Она је посебно ефикасна за јонизацију материјала са чврстих површина.

*Електрон импакт конизација (јонизација електронским ударом) (EI-Electron Impact)*

Електронски зрак који је генерисан из волфрамовог влакна јонизује у гасну фазу атоме или молекуле. Електрон из зрака удара у електрон аналита јона или молекула ради креирања јона.

*Електроспреј јонизација (ESI-Electrospray ionization)*

ESI извор се састоји од веома fine игле за распршивање и серије скимера. Раствор узорка се аеросолира у јонизациону комору. Капљице узорка собом носе наелектрисање приликом напуштања капиларе, а када растварач испари капљице нестају остављајући високо наелектрисане молекуле аналита. Ова јонизација се посебно користи за велике биолошке молекуле који тешко испаравају или јонизују.

*Јонизација бомбардовањем брзим атомима (FAB-Fast atom bombardment)*

Ова јонизација се заснива на бомбардовању чврстог или течног узорка под ниским притиском високо енергетским зраком који се састоји од неутралних атома (најчешће ксенона или аргона) при чему настаје десорпција и јонизација. Користи се за велике биолошке молекуле које је тешко превести у гасну фазу. Узорак се уобичајено диспергује у матриксу као што је глицерол. Ова јонизација узрокује малу фрагментацију уобичајено дајући велики молекулски пик, који омогућава лакше одређивање молекулске масе. Атомски зрак настаје акцелерацијом јона из јонског извора кроз електронску ћелију па јони купе електроне у сударима са неутралним атомима формирајући зрак високо енергетских атома.

*Јонизација електричним пољем (Field ionization)*

Молекули могу изгубити електрон утицајем високог нивоа електричног поља (поље настаје као резултат високог напона између катоде и аноде)-емитера. Емитер се састоји од жице која је обложена угљеничним дендритима који појачавају ефикасност поља.

*Ласерска јонизација (LIMS-Laser ionization)*

Ласерски пулс топи материјал са површине узорка, креира микроплазму која јонизује неке од конституената узорка. Ласерски пулс узрокује испаравање и јонизацију узорка.

*Јонизација ласерском десорпцијом (MALDI-Matrix-assisted laser desorption ionization)*

Јонизација десорпцијом је врста ласерске јонизације испаравања и јонизације великих биолошких молекула (протеина и DNA фрагмената). Биолошки молекули се диспергују на чврстом матриксу (никотинска или дихидробензоична киселина). UV ласерски пулс топи матрикс који је носач великих молекула претварајући их у гасну фазу у јонској форми да би се могао екстрактовати у масеном спектрометру.

*Јонизација плазма десорпцијом (PD-plasma-desorption ionization)*

Распад калифонијума-252 (Cf-252) производи два фисиона фрагмента који се крећу у супротним правцима. Један фрагмент удара у узорак креирајући од 1-10 јона анализата. Други фрагмент удара у детектор стартујући аквизицију података. И ова метода је ефикасна за јонизацију великих биолошких молекула.

*Јонизација резонанцијом (RIMS-resonance ionization)*

Једна или више ласерских зрака се подешава у резонанцији гасне фазе атома или молекула ради стварања јонизационог потенцијала који ствара јон. Чврсти узорак се испарава грејањем или ласерским топљењем.

*Секундарна јонизација (SIMS-secondary ionization)*

Примарни зрак јона као што је нпр.  $3\text{He}^+$ ,  $16\text{O}^+$ ,  $10\text{Ar}^+$  се убрзава и фокусира на површину узорка претварајући материјал у гасну фазу. Око 1% овог материјала је у форми јона, који се након тога могу анализирати масеним спектрометром. Секундарна јонизација има предност да материјал може стално бити стављан са површине ради одређивања концентрација анализата као функцију растојања од оригиналне површине (профилисање дубине).

*Варнична јонизација (Spark ionization)*

Варнични извор јонизује анализат у чврстом узорку пулсирањем струје кроз две електроде. Ако је узорак метал он може бити једна од електрода, у супротном може бити мешан са графитом и постављен у електроду облика шоље.

*Термална јонизација (TIMS-termal ionization)*

Термална јонизација се користи за елементалне материјале. Узорак се поставља на металну траку од платине или ренија и електричном струјом се греје метал до високе температуре. Плочица је често премазана графитом ради смањења укупног ефекта. Постоје неколико врста масене спектрометрије у зависности од дизајна масеног анализатора:

*1. Масена спектрометрија на основи Фуријерових Трансформација*

Масена спектрометрија *Фуријеровим* трансформацијама користи предност јонско-циклотронске резонанце ради селекције и детекције јона. Јони се у магнетном пољу крећу кружном путањом радијусом:

$$r = mv/eB, \quad (132)$$

и фреквенцијом

$$f = eB/\pi m. \quad (133)$$

Крећући се циклотронском фреквенцијом, јони могу адсорбовати радио фреквентну енергију исте фреквенције. Пулс радиофреквентне енергије побуђује јоне у магнетном пољу. Јони реемитују зрачење, што се региструје пријемником. Распад производи слободно индуквани сигнал који се *Фуријеровим* трансформацијама

трансформише да производи емитоване фреквенције и масе присутних јона. Ова врста MS може пружити веома високу резолуцију  $10^6$  што јој даје знатну предност у односу на остале масене спектрометре.

## 2. Масена спектрометрија јонским захватом

Масена спектрометрија јонским захватом користи три електроде ради захвата јона у малој запремини. Предност масене спектрометрије јонским захватом је компактна величина и способност захвата и акумулације јона ради повећања сигнала приликом мерења. Масени анализер састоји се од кружне електроде која раздваја две хемисферичне електроде. Масени спектар се добија променом напона електрода ради избацивања јона из решетке.

## 3. Магнетна масена спектрометрија

Оптички јон у јонској комори масеног спектрометра издваја и убрзава јоне кинетичком енергијом:

$$K.E. = 0.5 mv^2 = eV, \quad (134)$$

где је  $m$ -маса јона,  $v$ -брзина,  $e$ -наелектрисање и  $V$ -напон оптичког јона. Јони улазе у простор цеви између полова магнета и бивају изложени утицају магнетног поља,  $H$ . Јони који имају изједначене центрифугалне и центрипеталне силе пролазе кроз летећу цев.

$$mv^2/r = Hev, \quad (135)$$

$r$ -полупречник закривљености путање јона.

$$r = mv/eH = 1/H \sqrt{2V \frac{m}{e}} \quad (136)$$

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 r^2}{2V} \quad (137)$$

Једначина показује да однос масе и наелектрисања јона који реагују у детектору може варирати променом јачине магнетног поља или напона. Анализер може бити једно фокусни и дупло фокусни. Једно фокусни се заснива на томе да се кружна путања зрака од  $180^\circ$ ,  $90^\circ$  или  $60^\circ$  може користити. Различите силе утичу на сепарације јона према различитим односима масе и наелектрисања. Дупло фокусирани анализатори садрже и један електростатички анализатор који раздваја честице према кинетичким енергијама.

## 4. Квадриполарна масена спектрометрија

Квадриполарни масени филтер састоји се од четири паралелне шипке. Међусобно супротне шипке су носиоци позитивног и негативног наелектрисања. Променом напона у шипкама утиче се на трајекторију јона која је центрирана између шипака. За одређене напоне једино јони са одговарајућим односом масе и наелектрисања пролазе кроз квадриполарни филтер док остали јони скрећу са оригиналне путање. Масени спектар се добија праћењем јона који пролазе кроз квадриполарни филтер пошто се мењају напони између шипака. Квадриполарни масени

спектрометар састоји се од јонског извора, оптичког јона да убрза и фокусира јоне кроз отвор квадриполарног филтера, самог квадриполарног филтера са контролом напона, излазног отвора, јонског детектора, електронике детектора и система високог вакуума.

### 5. Масена спектрометрија на основу времена лета

Ова врста масене спектрометрије користи разлику времена пролаза кроз заклетни регион ради раздвајања јона различитих маса. Ради у пулсном моду тако да се јони производе или екстракују у пулсевима. Електрично поље убрзава све јоне конетичком енергијом  $qV$ , где је  $q$ -наелектрисање јона а  $V$ -примењени напон. Обзиром да је кинетичка енергија јона  $0,5 \text{ mV}^2$ , лакши јони имају већу брзину од јона веће масе па они на детектор стижу знатно раније.

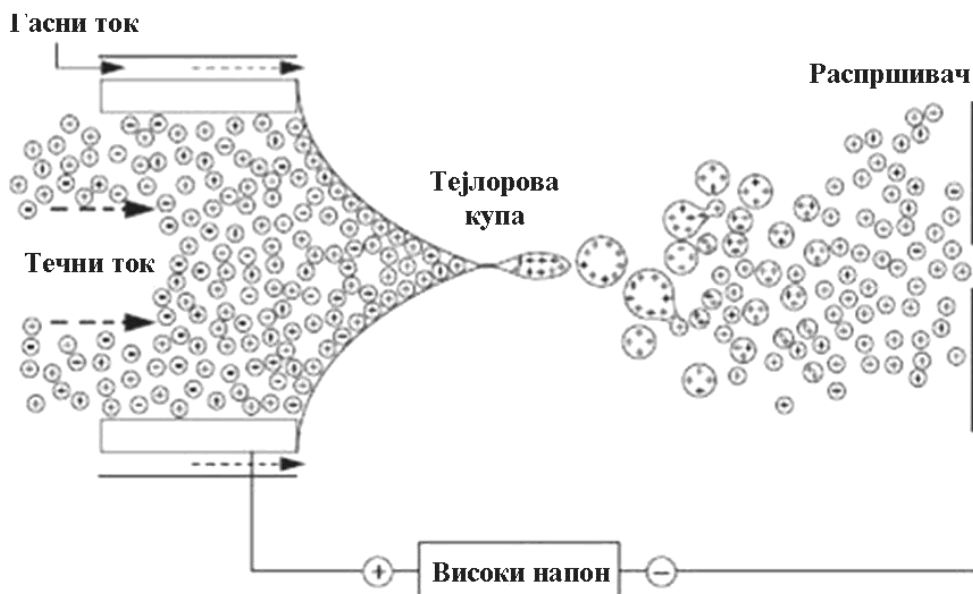
### 6. Резонантно јонизациона масена спектрометрија

Резонантно јонизациона масена спектрометрија користи фотоне да би створила атом или молекул изнад јонизационог потенцијала ради креирања јона. Обзиром да сваки елемент има јединствену структуру енергетских нивоа, ова метода је селективна јонизациона метода. Користи се као корисна метода за проучавање електронске структуре атома или молекула ради квантитативних мерења аналитичких концентрација.

#### 1.9.3.1. Електроспреј масена спектрометрија (ESI MS)

Електроспреј јонизација (ESI) је први пут представљена 1968. године радовима Дола (*Dole*) и сарадника, и куплована са масеном спектрометријом (MS) 1984. године радовима Јамашита (*Yamashita*) и Фена (*Fenn*). У ESI узорак се раствара у поларном испарљивом растварачу, па се ињектује у високи позитивни или негативни потенцијал (релативно у односу на потенцијал распршивача). Висок електрични потенцијал (од 1-4 kV) условљава да флуид формира Тејлорову (*Taylor*) купу која је обogaћена позитивним или негативним јонима на врху. Спреј наелектрисаних капљица се ејектује из Тејлорове (*Taylor*) купе под утицајем електричног поља.

Капљице се скупљају испаравањем уз помоћ топлог тока азотног гаса пролазећи преко фронта јонизационог извора (слика 48).



Слика 48. Шематски приказ извора електроспреј јонзације (ESI)

Јони се формирају на атмосферском притиску и пролазе кроз конични грлић у средишњи вакуум регион, и одатле кроз мали отвор (апертуру) у регион високог вакуума масеног анализатора. ESI се користи са заједничким масеним анализатором. Тачан механизам формирања јона од наелектрисаних капи није у потпуности објашњен и постоје различите теорије које га појашњавају.

Припрема узорка захтева једино растварање узорка у одговарајућој концентрацији у мешавини воде и органског растварача уобичајено метанола, изопропанола или ацетонитрила. Одговарајућа количина сирћетне киселине се често додаје ради олакшавања процеса протоновања молекула анализата у позитивном моду јонизације. У негативном моду јонизације, амонијачни раствор или испарљиви амини се додају ради поспешивања депротоновања молекула анализата.

Осетљивост ESI MS је добра, са ниским детекционим нивоима за многе пептиде. Међутим, осетљивост ESI је у функцији концентрације ињектованог узорка.

Висока брзина протока (од 1-1000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) у конвенционалној ESI MS резултира великим утрошком узорка. Због тога је у предности коришћење најмање могуће брзине протока. Нано ESI (или наноспреј јонизација) је врста ESI ниске брзине протока (од 20-200  $\text{nL}/\text{min}$ ), са знатно мањим утрошком узорка и значајно већом осетљивошћу. Наноспреј ESI се показала као толерантнија према солима од конвенционалне ESI. Субатомски нивои анализата су детектовани купловањем капиларне електрофлорезе са ESI. ESI MS се може користити за анализе поларних молекула у опсезима мањим од 100 Da, до целих вируса масе веће од 2 MDa, чак и 100 MDa за појединачне јоне DNA. Важна особина ESI је способност генерисања дистрибуције вишеструко наелектрисаних јона, који омогућавају анализе веома великих протеина коришћењем масних анализатора са ограниченим опсегом вредности  $m/z$ . Релативно мале промене у условима анализа као што су рН, састав растварача, концентрација соли и парцијална денатурација молекула анализата, може преуредити дистрибуцију наелектрисаног стања молекула.

Комплексан изглед вишеструко наелектрисаних јона чини интерпретацију ESI спектра из комплексних смеша отежаном, и у пракси се користе компјутери ради трансформације пикова у јединствени пик респективне молекуларне масе (или нула наелектрисано стање).

ESI је метода јонизације праћена веома малом фрагментацијом формираних молекулских јона. Због тога, анализе модификованих пептида и протеина као и протеин-лиганд комплекса се могу успешно реализовати применом ESI MS. Чак се и кроз фрагменте који се ретко формирају у ESI, генерисани јони појављују као погодни за дисоцијацију индуковану сударима (CID-Collision induced dissociation), због тога што високо стање наелектрисања молекуларних јона повећава енергију која је расположива за стварање судара. Супресија сигнала анализата узрокована конкуренцијом између електролита и нпр. осталих анализата је главни проблем у ESI и у пракси се може спречити кроз анализе комплексних смеша иако хроматографска раздвајања нису примењена. Ови феномени конкуритивности наелектрисања као и јака зависност експерименталних услова (рН, састав растварача и концентрација соли) на сигнале анализата, чине ризик извођења погрешних квантитативних закључака из ESI MS података. Међутим квантификација се може постићи, у ограниченом концентрационом опсегу употребом пажљиво одабраног интерног стандарда познате количине и блиске хемијске сличности протеина (и)или протеина који је предмет интереса. Комбинација јонизација на атмосферском притиску и континуални ток растварача који се користи у ESI, омогућује директно купловање са сепарационим техникама као што су течна хроматографија и капиларна електрофлореза.

ESI-MS је примењива ради карактеризације раствора сложеног састава (тј. раствора који садрже више комплекса) или у растворима где су присутне полинуклеарне врсте. У општем случају, ESI-MS се примењује ради детекције и



карактеризације појединачних врста у раствору. У случају система метал-лиганд, ESI-MS се користи ради потврђивања стехиометрије ново синтетисаних комплекса. ESI-MS омогућава снимање масених спектра директно из узорка раствора, па се тиме могу анализирати све равнотежне врсте у њиховом полазном окружењу. У зависности од основног наелектрисања врсте у раствору користи се позитиван или негативан јонски мод (ESI<sup>+</sup> или ESI<sup>-</sup>) за добијање најбољих резултата. Стехиометрија присутних врста може се одредити директно из њихових вредности  $m/z$ . Ако из MS спектра не добијемо довољно информација за идентификацију врста, онда се примењују спектри високе резолуције MS/MS и анализира се изотопска шема пикова која води до потпуне идентификације присутних врста. Ова карактеристика је од посебног значаја јер ова техника за разлику од других равнотежних техника даје и приказује директне квалитативне податке. Релативна заступљеност врста и стехиометријске константе стабилности у раствору, добијају се на основу интензитета молекулских пикова. Друга значајна особина ESI-MS технике је висока осетљивост па се њоме могу врло ниске концентрације испитивати. Због тога се ова техника примењује у испитивању биолошких и узорака из човекове околине.

NMR је често коришћена техника за изучавање равнотежа у растворима. За разлику од NMR, ESI-MS може анализирати јонске врсте у раствору без обзира на нуклеарни спин атома градитеља, анализирати појединачне јоне из раствора у којима се врсте брзо размењују и детектују парамагнетичне врсте са истом поузданошћу као и дијагманетичне врсте. Корелација стехиометрије, механизма комплексирања и њихове дистрибуције, и утицај релативних концентрација и/или рН постоји. Из ESI-MS спектра одређује се број, стехиометрија и константе стабилности комплекса. Неке од студија дају податке о потпуном карактерисању равнотежа ESI-MS техником. Параметри који би требало да се изуче при потпуном карактерисању равнотежа, рН, концентрација метал-лиганд и однос метал-лиганд нису варирану у свим студијама већ су држани константним. У неким радовима ESI-MS се користи за потврђивање резултата добијених другим техникама, а у неким ова техника служи за одређивање стехиометрије врста у растворима метал-лиганд. Сва истраживања могу се класификовати према степену поверења са којим се ESI-MS користи. У већини случајева ESI-MS се користи као квалитативна техника са циљем одређивања броја и стехиометрије формираних комплекса у раствору. У другим случајевима, ESI-MS се користи као техника за квантитативно одређивање са циљем да се израчунају концентрације различитих комплекса формираних у раствору, као и њихових константи стабилности.

Примена ESI-MS у квалитативним одређивањима је врло значајна техника јер указује на присуство комплекса високе нуклеарности тј. тримера и тетрамера који не могу бити детектовани другим техникама. Упоређивањем потенциометријских и спектрофотометријских података може се закључити да они указују на модел базиран на мононуклеарним и динуклеарним врстама. Резултати ESI-MS испитивања на истим системима, указују да су димерне врсте много више заступљене него мономерне, што је и теоријским симулацијама и доказано. ESI процес траје  $10^{-2}$ s (време од распршивања раствора до јонског испаравања). Равнотежне пертурбације се увек уочавају код кисело базних равнотежа, чак и за велике биомолекуле захваљујући изузетно великим брзинама преноса протона. Из радова Ванга (*Wanga*) и Суртисина (*Surtisina*) је закључено да се кисело базне равнотеже не могу изучавати овом техником. Проблем који се јавља код ове технике јесу адукти растварача који се координују са металима. Адукти растварача често постоје у раствору у равнотежи, али су то понекад ESI артефакти. Адукти не ометају анализу али знатно компликују стехиометријску анализу присутних пикова. Формирање псеудомолекуларних јона или адуката у току ове анализе је врло често. Ови адукти углавном не учествују у равнотежи, али као артефакти ESI-MS спектра доста отежавају идентификацију присутних врста у

---

раствору. Недостаци ове технике су и што се јонски адукти који нису присутни у раствору могу створити у току процеса јонизације. Упркос чињеници да је ова техника „soft“ техника, могу се јавити фрагментације и полимеризација. Многи присутни протони у метал-лиганд комплексима не могу се увек одредити. ESI-MS спектри су зависни од задатих инструменталних параметера. Различити јони могу дати и различите одговоре. Раствор који се анализира има значајна ограничења: раствор не сме имати велику јонску јачину и мора се додати органски растварач пре почетка анализе. Молекули растварача се уклањају или везују за метал у процесу јонизације. Јонски производи могу подлећи гасно-јонским реакција пре него што стигну у јонизатор. У току процеса јонизације састав раствора може бити нарушен у односу на равнотежне услове.<sup>83,84</sup>

## 2. ЦИЉ, ЗАДАТАК И МЕТОДЕ

### 2.1. Циљ истраживања

Циљ истраживања ове докторске дисертације било је проучавање утицаја флуорохинолона офлоксацина и моксифлоксацина на биодистрибуцију  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми.

У том циљу, извршена су следећа мерења комплексирања у системима:

- $Al^{3+}$  - офлоксацин,
- $Gd^{3+}$  - офлоксацин и
- $Gd^{3+}$  - моксифлоксацин.

На основу ових мерења, проучаван је утицај флуорохинолона (офлоксацина и моксифлоксацина) на биодистрибуцију  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона и извршено је поређење модела добијеног у нашем раду и модела описаних у литератури.

### 2.2. Задатак рада

На основу претходно дефинисаних циљева, задатак овог рада био је:

- Утврђивање састава, стабилности и структуре комплекса:  $Al^{3+}$  -офлоксацин,  $Al^{3+}$  -моксифлоксацин,  $Gd^{3+}$  -моксифлоксацин и  $Gd^{3+}$  -офлоксацин.
- Утврђивање расподеле комплексних врста у функцији рН вредности раствора и концентрације лиганда.
- Утврђивање биодистрибуције  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у физиолошким условима.
- Утврђивање утицаја офлоксацина и моксифлоксацина на биодистрибуцију  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми.

### 2.3. Примењене методе истраживања

У овој дисертацији су примењене следеће методе истраживања:

- Потенцијометријска мерења комплексирања у воденим растворима.
- UV VIS спектрофотометријска мерења комплексирања.
- Масеноспектрометријска мерења хидролизе и комплексирања.
- Компјутерске симулације специјације применом програма HySS.



### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. Реагенси и методе анализе

Сви коришћени реагенси били су аналитичке чистоће без додатног процеса пречишћавања. За аналитички рад коришћено је калибрисано волуметријско посуђе (релативна грешка при волуметријским мерењима је била мања од 1%) класе А. Сва одмеравања су вршена на електронској ваги типа *Ohaus DV215CD* (прецизност  $\pm 0.01$  mg).

**Гадолинијум(III)-хлорид ( $GdCl_3$ ).** Полазни раствор  $Gd^{3+}$ -јона припремљен је растварањем 5.000 g  $Gd_2O_3$  p.a., (Merck, KgaA, Darmstad, Germany) у концентрованој HCl. Добијени раствор је стандардизован комплексометријским титрацијама са EDTA. Одговарајућа количина HCl је додата у полазни раствор ради избегавања почетне хидролизе јона  $Gd^{3+}$ . Вишак HCl киселине је одређен потенциометријски, помоћу Грановог дијаграма. Концентрација полазног раствора гадолинијума била је  $27.5 \text{ mmol/dm}^3$ , и HCl  $47.2 \text{ mmol/dm}^3$  са релативном грешком мањом од 1%. Постојаност укупне концентрације протона у раствору  $GdCl_3$  је сматрана као критеријум за одсуство почетне хидролизе јона  $Gd^{3+}$  и периодично је проверавана титрацијом стандардним раствором NaOH пре сваке серије мерења.

**Алуминијум(III)-хлорид ( $AlCl_3$ ).** Полазни раствор  $Al^{3+}$ -хлорида је припремљен растварањем прекристалисане соли  $Al^{3+}$ -хлорида  $AlCl_3$ , p.a., (Merck) у бидестилованој води. Да би се избегла хидролиза  $Al^{3+}$ -јона у раствор је додата хлороводонична киселина. Концентрација  $Al^{3+}$ -јона је одређена гравиметријски таложењем са амонијум-хидроксидом. Талог се жарио на температури од 1373.15 K и мерио као  $Al^{3+}$ -оксид. Концентрација слободне киселине у раствору  $AlCl_3$  је одређена волуметријски стандардним раствором натријум-хидроксида. Концентрација полазног раствора  $AlCl_3$  је била  $0.099 \text{ mol/dm}^3$ , а хлороводоничне киселине  $0.109 \text{ mol/dm}^3$ .

**Моксифлоксацин.** Стандард моксифлоксацина ( $C_{21}H_{24}FN_3O_4 \times HCl$ ,  $M_r=437.9$  g/mol), жути прах, чистоће веће од 99.9% производ је фирме *Bayer Pharma AG* (Немачка). Стандардни раствор ( $5.35 \text{ mmol/dm}^3$ ) припремљен је директним одмеравањем стандардне супстанце. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

**Офлоксацин.** Полазни раствор офлоксацина ( $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ ,  $M_r=361.4$  g/mol) припремљен је тачним одмеравањем на аналитичкој ваги стандардне супстанце p.a.100% (Hoechst, Frankfurt am Main, F.R.G.). Концентрација полазног раствора била је  $5 \text{ mmol/dm}^3$ .

**Натријум-хидроксид (NaOH).** Полазни раствор натријум-хидроксида припреман је из концентрисаног волуметријског раствора, p.a., (Merck, FRG), номиналне концентрације  $1.0 \text{ mol/dm}^3$  (са максималном декларисаном грешком која је била мања од 2%), растварањем у свежој прокуваној и охлађеној бидестилованој води уз изложеност константном току прочишћеног азота. Раствор је пренешен у пластичну боцу. Након неколико дана из горњег слоја је одпипетирана одговарајућа запремина раствора натријум-хидроксида у нормални суд и разблажена водом до црте. Стандардизација је извршена потенциометријском титрацијом раствора калијум-бифталата, који је коришћен као примарни стандард. Концентрација полазног раствора натријум хидроксида била је  $0.1 \text{ mol/dm}^3$ .

**Хлороводонична киселина (HCl).** За припремање полазног раствора хлороводоничне киселине коришћен је титрисол HCl p.a. (Merck, "Suprapure"). Разблаживањем полазног раствора концентроване киселине направљен је раствор одговарајуће концентрације. Концентрација насталог раствора контролисана је Мерковим волуметријским стандардом са трис(хидроксиметил)-аминометаном. Концентрација полазног раствора хлороводоничне киселине била је  $0.104 \text{ mol/dm}^3$ .

**Натријум-хлорид (NaCl).** Полазни раствор натријум-хлорида ( $M=58.443 \text{ g/mol}$ ) припреман је растварањем прекристалисаног NaCl p.a. (Merck) у бидестилованој води. Концентрација му је одређена упаравањем познате запремине раствора до сува на 423K и каснијим одмеравањем и прорачунавањем. Концентрација раствора NaCl била је  $1.000 \text{ mol/dm}^3$ .

**Литијум-хлорид (LiCl).** Полазни раствор литијум-хлорида ( $M=42.4 \text{ g/mol}$ ) је припремљен растварањем прекристалисаног LiCl, p.a., (Merck) у бидестилованој води. Концентрација је одређена упаравањем познате запремине раствора до сува на 423 K. Концентрација полазног раствора LiCl била је  $0.8846 \text{ mol/dm}^3$ .

**Калијум-бифталат.** Стандардни раствор калијум-бифталата је припремљен од кристалног калијум-бифталата, p.a. (Merck) који је претходно сушен на температури од 110-120°C. Одмерено је 0.6382 g калијум бифталата у суду од 250 ml и суд допуњен бидестилованом водом до црте. Концентрација тако добијеног раствора била је  $0.0125 \text{ mol/dm}^3$ .

**Азот.** Коришћен је за одржавање инертне атмосфере и мешање раствора током титрације. Његово пречишћавање је вршено пропуштањем кроз 10% NaOH, а затим кроз 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, алкални раствор пирогалола,  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  раствор KCl и на крају кроз дестиловану воду.

## 3.2. Инструменти и процедура

Током израде докторске дисертације коришћени су следећи инструменти:

- Аутоматски титратор;
- UV-VIS спектрофотометар;
- Масени спектрометар.

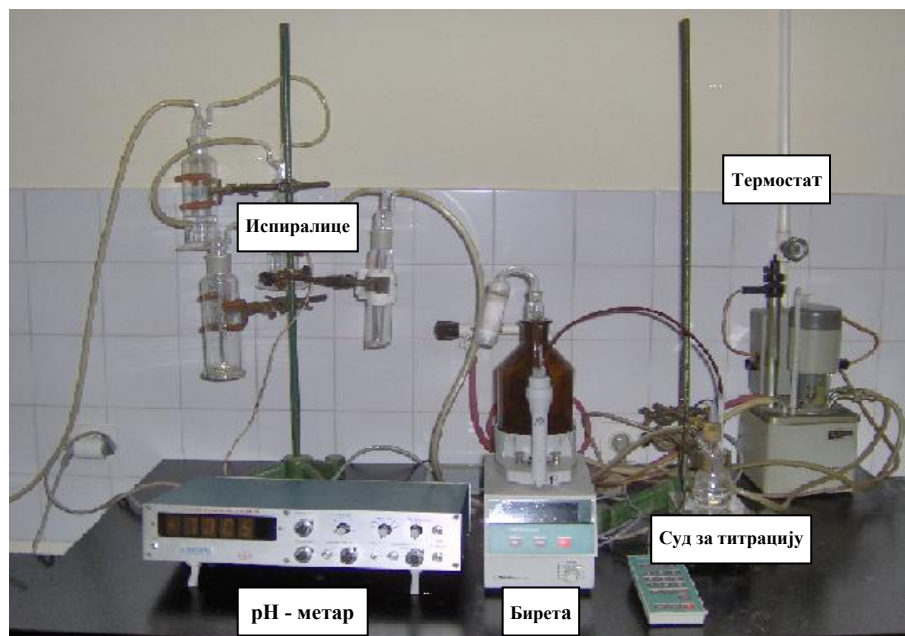
### 3.2.1. Апаратура за извођење потенциометријских титрација

Аутоматски титратор састоји се од рН-метра, аутоматске бирете за додавање титрационог средства, магнетне мешалице и система за увођење инертног гаса (слика 49-страна 111).

Најважнији део уређаја је рН-метар. За мерење рН раствора коришћени су дигитални рН-метри, Tacussel Isis 20000 са прецизношћу од  $\pm 0.002$  рН јединице и Beckman Ф72 ( $0.1 \text{ mV}$  или  $0.001$  рН), опремљени Радиометровом комбинованом електродом. Калибрација рН-метра вршена је пуферима на вредностима рН 4 и 7.

Суд за титрацију у коме су вршене потенциометријске титрације је стаклени балон са двоструким зидовима, између којих протиче термостатирана вода, на температури ( $298.0 \pm 0.5$ )K. У суд је уроњена комбинована електрода и цевчица за довод азота. Сва мерења су вршена уз континуално пропуштање азота кроз раствор да би се остварила инертна атмосфера, уз стално мешање магнетном мешалицом. Азот је пречишћаван проласком кроз систем испираница у којима се налази раствор 10% NaOH, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и дестилована вода.

Додавање титрационог средства вршено је аутоматском биретом, Metrohm Dosimat модел 665. Најмања запремина раствора која се може додати из бирете је  $0.001 \text{ cm}^3$  а номинална запремина бирете је  $5 \text{ ml}$ . Бирета је калибрисана у три тачке, па је израчуната грешка у запремини мања од  $\pm 10 \mu\text{l}$ , а декларисана резолуција  $\pm 5 \mu\text{l}$ . Јонска јачина свих експеримената подешена је као  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$  или  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ . Сва мерења вршена су у инертној атмосфери азота.



Слика 49. Апаратура за извођење потенциометријских титрација

### 3.2.1.1. Процедура рада на pH-метру

Пре мерења pH (или EMS) испитиваног раствора било је потребно pH-метар калибрисати помоћу раствора пуфера који имају тачно познату вредност pH (4 и 7). Електрода се урони у раствор пуфера и сачека се неколико секунди да се читавање заврши. Уколико pH метар не показује ону вредност коју има пуфер помоћу потенциометра се дотера да pH-метар показује тачну вредност пуфера. Електрода се извади из пуфера, испере дестилованом водом и обрише филтер папиром. Након тога се електрода урони у раствор пуфера друге вредности pH и понови поступак. Након калибрације може се приступити мерењу pH раствора.

Да би се редуковала концентрација водоничног јона, база је додавана постепено из аутобирете у малим аликвотима (од  $0.005\text{-}0.01 \text{ cm}^3$ ). Промена потенцијала је праћена након сваког додавања титрационог средства. Протокол титрације је биран тако да реакције хидролизе и комплексирања буду најприближније стањима равнотеже. Стабилно читавање потенцијала се уобичајено вршило од 3-5 минута по додавању титрационог средства од почетка титрације ( $\text{pH} < 3$ ) и од 5-10 минута на  $\text{pH} > 3$ . Потенцијал стаклене електроде дат је изразом  $E = E_0 + Q \times \log h + E_j$ , где је  $h$  - концентрација слободног протона,  $E_0$  - константа која укључује стандардни потенцијал стаклене електроде,  $Q$  - Nernstov фактор стаклене електроде и  $E_j$  - дифузиони потенцијал. Параметри  $E_0$ ,  $Q$  и  $E_j$  су одређени титрацијом јака киселина-јака база због провере погодности система. За време титрација тест раствора,  $E_0$  је одређиван употребом података из ацидо региона где се не дешавају хидролиза и комплексирање (тако да је  $h$  једнака аналитичкој концентрацији протона), наношењем  $E - Q \times \log h$  на  $h$  и екстраполацијом праве линије на вредности  $h = 0$ . Слободна концентрација протона

је израчунавана кроз једначину  $\log h = (E - E_0 - E_j) / Q$ , која је примењена на целу титрациону криву. Све титрације су дупло реализоване. Слагање између две титрације било је боље од 1%.

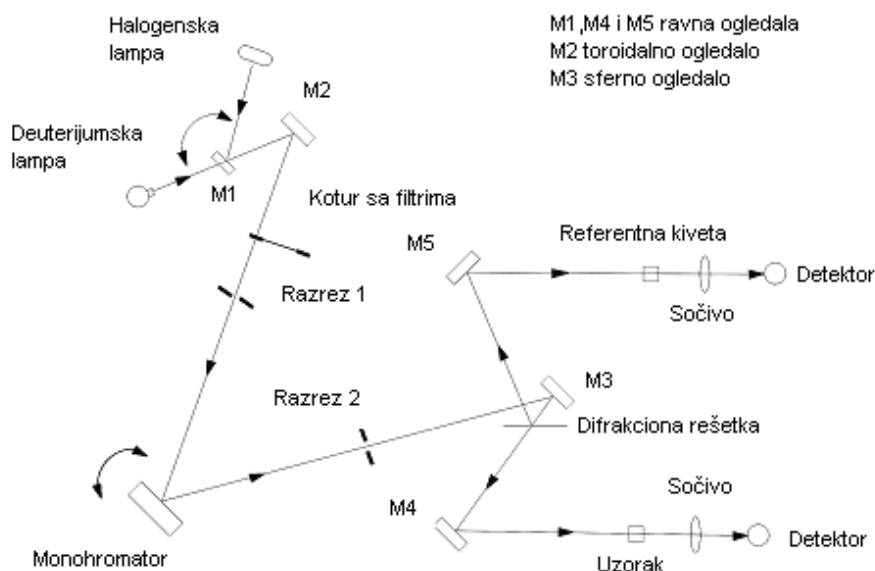
### 3.2.2. UV-VIS спектрофотометар

За спектрофотометријска мерења коришћен је Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS (USA) спектрофотометар са термостатираном кварцном Suprasil киветом.



Слика 50. Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS спектрофотометар

#### 3.2.2.1. Процедура рада на UV-VIS спектрофотометру



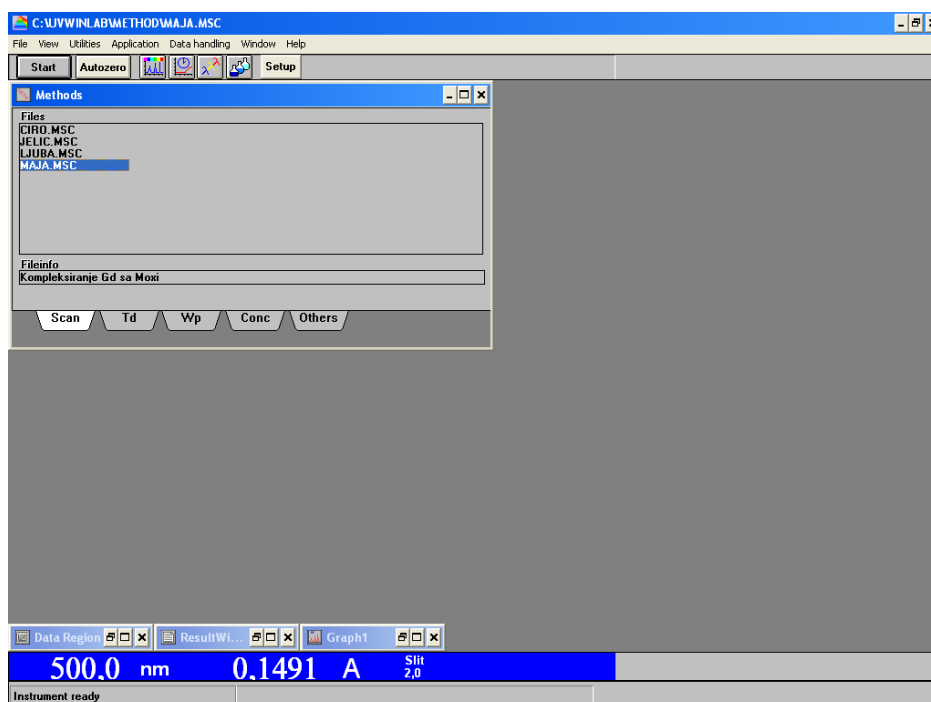
Слика 51. Оптичка шема апсорционог спектрофотометра

Приликом снимања спектра коришћене су две кивете дебљине 1 cm. Једна кивета је пуњена испитиваним раствором, а друга (референтна) истим раствором као и испитивани али без јона метала. Оперативни параметри били су: брзина сканирања 2 nm/s, отвор разреза 0.3 nm, фотометричка сензитивност 0.2 abs. Спектрална мерења вршена су на растворима где је концентрација Gd и моксифлоксацин била константна ( $C_{Gd} = 0.072, 0.033$  и  $0.017 \text{ mol/dm}^3$ ;  $C_{moxi} = 0.051$  и  $0.035 \text{ mol/dm}^3$ ), док је рН варијала од



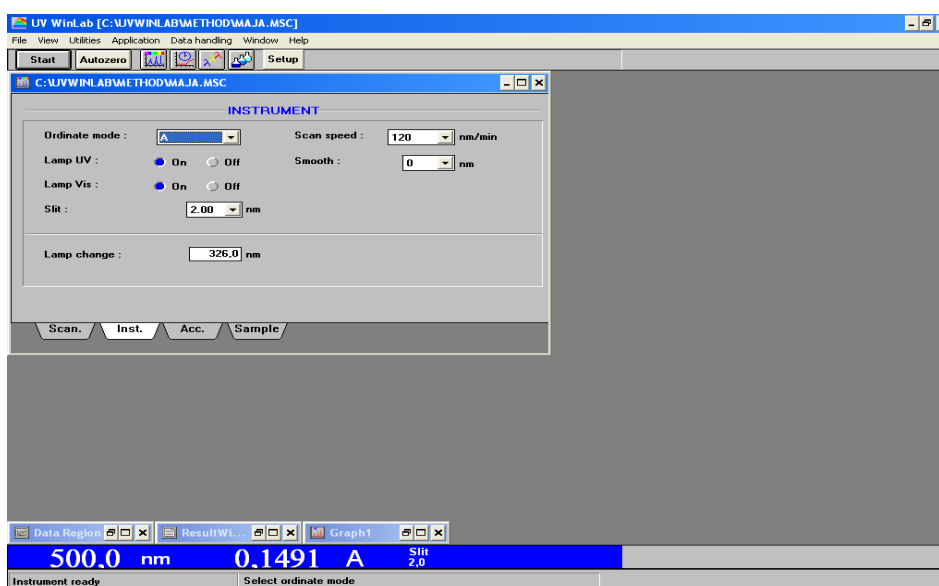
3-9 (10 раствора). рН вредност тест раствора мерена је стакленом каломел електродом. рН вредност сваког тест раствора је контролисана дневно, за време од једне недеље. Стабилне вредности унутар 0.01 рН и 0.004 апсорпционих јединица су постизане после 1 сата и остајале су стабилне за време од неколико дана. Спектар тестираних раствора је сниман у интервалу таласних дужина од 250-450 nm.

За овај рад коришћен је спектрофотометар који је повезан са IBM PC компатибилним рачунаром на коме се налази инсталиран програм UV WinLab чијим се активирањем добија маска програма приказана на слици 52.



Слика 52. Активирање програма-почетна страница након покретања UV WinLab-a

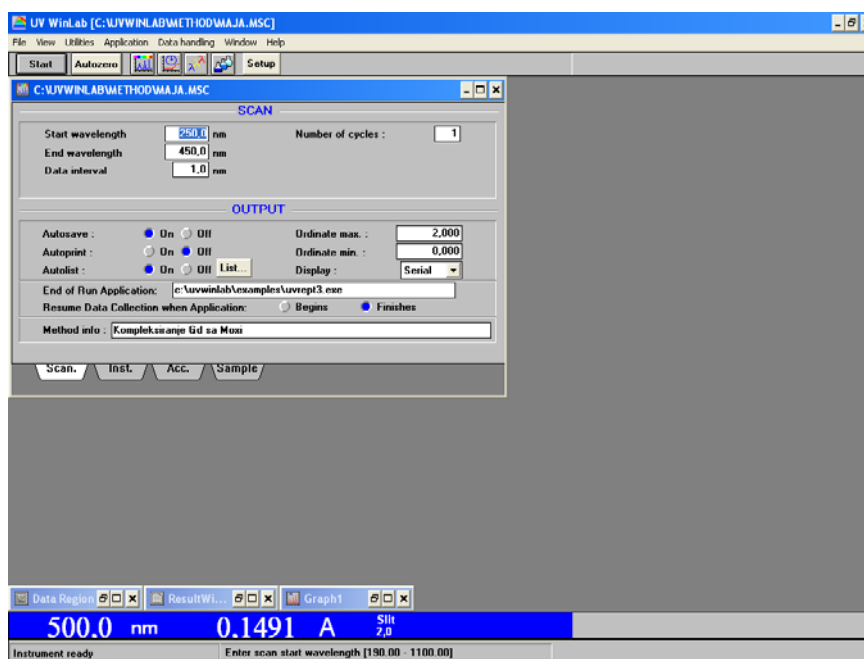
У овој масци се врши избор методе којом ће се радити. То се постиже кликом на жељени метод, којим се дефинишу параметри мерења. Када се изабере метод рада, отвара се маска приказана на слици 53.



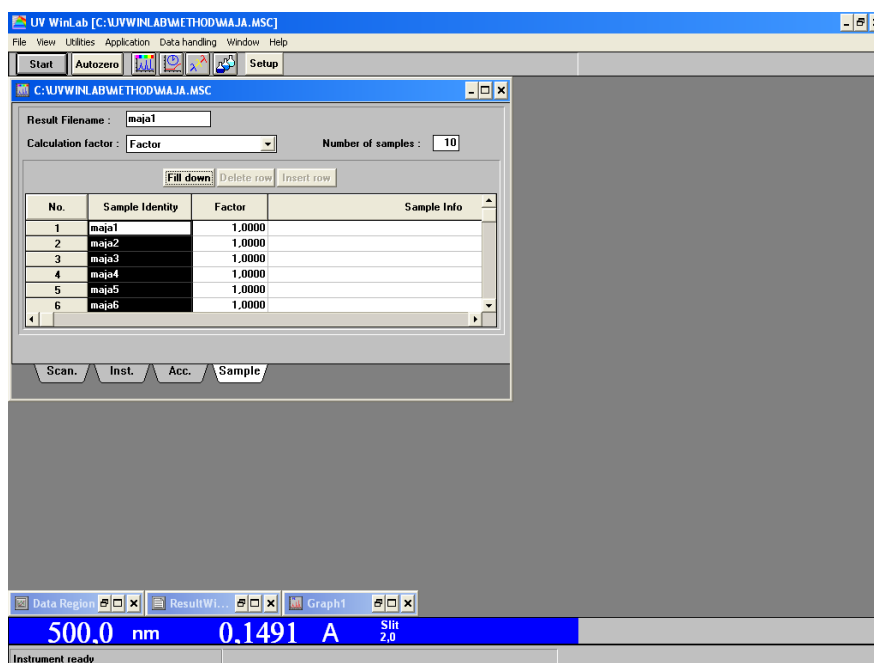
Слика 53. Маска програма за подешавање параметра мерења

У овој масци се подешавају параметри снимања спектра. У пољу *Ordinate mode*

бира се величина која ће бити представљена на ординати. То може бити апсорбанција или екстинкција. У пољу *Scan speed* подешава се брзина снимања спектра (120 nm/min). У овој масци бира се и врста лампе којом ће се снимати спектар једноставним кликом на поља *On* и *Off*. Спектри су снимани у области таласних дужина од 250–450 nm. Извор светлости је деутеријумска (од 250-350 nm) и волфрам-халогена лампа (од 350–450 nm). Такође у овом пољу се подешава и ширина разреза кроз који пролази емитована светлост, бирањем неке од понуђених вредности у пољу *Slit* (2 nm). На следећу маску се прелази тако што се кликне на поље *Scan* након чега се појављује прозор приказан на слици 54. Ова маска омогућава кориснику да зада рачунару у ком опсегу таласних дужина жели да сними спектар. То се постиже уношењем почетне вредности у поље *Start wavelength* и крајње вредности у поље *End wavelength*. У пољу *Data interval* уписује се вредност на ком растојању ће се читавати апсорбанција. Број циклуса снимања се уноси у поље *Number of cycles*.



Слика 54. Маска програма за подешавање почетне и крајње таласне дужине

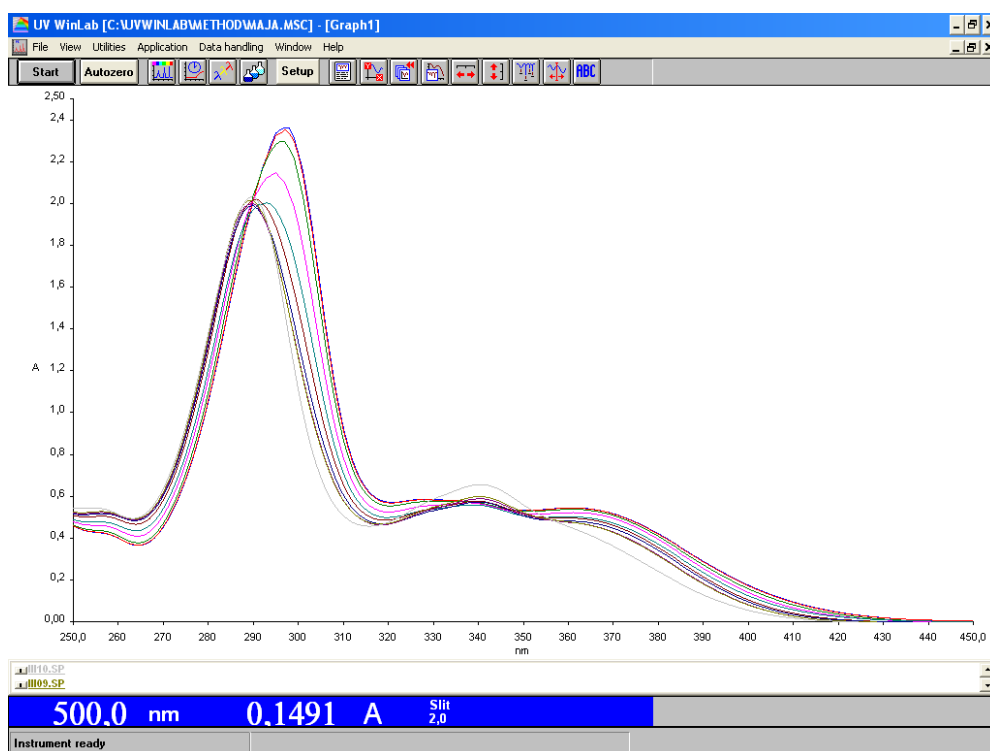


Слика 55. Маска програма за дефинисање броја узорака и назива

Последња маска (слика 55-страна 114) којим се дефинише број узорака којим се жели снимити спектар отвара се кликом на поље *Sample*.

Давање назива спектра се постиже тако што се кликне у поље *Result Filename*, а број узорака који се испитује у поље *Number of samples*.

Када је завршено са задавањем параметра кликне се на поље *Start*, како би отпочело снимање спектра. После неколико секунди рачунар од нас тражи да убацимо кивете са слепом пробом како би се извршила стандардизација апарата ("*нула инструмента*"). Слепа проба садржи све као и анализирани раствор осим испитиване супстанце. Након тога се редом убацују кивете са анализираним растворима и добијају се спектри (слика 56).



Слика 56. Маска програма која даје изглед UV VIS спектра (на слици је спектар моксифлоксацина)

### 3.2.3. Масени спектрометар

#### 3.2.3.1. Процедура рада на масеном спектрометру

Процедура рада на масеном спектрометру подразумева укључивање масеног детектора, оптимизацију његовог рада и извршење анализе узорка. Укључивањем механичке вакуум пумпе потребно је постићи вакуум од најмање  $3 \times 10^{-4}$  thg. Укључивање вакуумског система врши се преко опције *Masslynx* позивајући из основног прозора опцију *Ms Tune*. Из отвореног прозора активира се иконица *Options* а затим *Pump*. Постизање вакуума прати се на графичком приказу вакуум система а може се видети и по светлосној сигнализацији када зелена лампица засветли по достизању вакуума. У следећем кораку подешавају се температуре: *Source temp*, *Desolvation temp* у складу са методом која се користи за испитивани узорак. Уносе се вредности протока гасова и то за *desolvation* гас и *cone* гас. Исправност и спремност детектора прати се преко опције *Diagnostic* где сва поља морају бити зелена. Да би детектор могао да почне са активним радом непосредно пред почетак анализе потребно је отворити улаз у детектор помоћу металне полуге на конусу, отварањем стакленог прозора на фронту детектора и померањем пинцетом за  $90^\circ$ . Да би детектор радио у оптималном режиму за

одређивање испитиване супстанце неопходно је оптимизовати његов рад. Оптимизација детектора се врши на следећи начин: одвије се прикључак колоне на улаз *Source*, прикачи се капилара која води од перисталтичке пумпе, тј. ињекционог шприца у детектор. Напуни се стаклени шприц раствором стандарда у метанолу концентрације од 10-20 mg/l испитиване супстанце, постави у лежиште, осигура сигурносним држачем, врх игле се уведе у ињекторски улаз а на слободан део игле се прикачи уземљење. Кликом на опцију *MS Tune*, отвори се *Analyse* у поље *Pump flow* унесе се препоручена вредност од 10-50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Преко иконе *Syringe pump* активира се рад перисталтичке пумпе. На *MS tune* страници унесе се вредност M+1 или M-1 масе анализираног једињења у кућицу *Mass 1*, *Span 5*, *Gain 1*. Из менија *Option* изабере се опцију *Autotune* и са отвореног прозора позове се *Setup*, и у њој се упише циљана маса у простору *Mass (Da)*. Притиском на *Enter* задаје се команда за почетак аутоматске оптимизације рада детектора и сачека се да се оптимизација заврши. Када је оптимизација завршена подешава се интензитет одговора детектора преко промене нагиба – *Inlet source* који мора бити у таквој позицији да је вертикала која се замишљено повлачи са врха капиларе буде удаљена од 5-7 mm од улаза у конус. То се постиже механичким окретањем великог завртња на кућишту *Inlet source*. На крају оптимизације сви добијени параметри се сачувају под одговарајућим називом. По завршетку комплетног подешавања инструмента склоне се ињекциони шприц из перисталтичке пумпе, откачи капилара са *Inlet source*, прикачи капилара са колоне и појединачно уноси узорак шприцем.

За анализирање се припреми узорак у раствору и извуче шприцем. Да би се извршила анализа датог узорка у табелу узорака преко падајућег менија *Samples* позове се опција *Add* и дода нова линију за испитивани узорак. У ову линију уписује се *File name*–име под којим се чува анализа. *File text*-садржај текста који ће пратити резултате на добијеном спектру. *MS file*-назив методе снимања масених спектра. На опцији *MS method* налазе се сви неопходни параметри за рад у одређеном модусу (ESI +, ESI-, APCI+, APCI-), као и режим снимања TIC, SIR, који су дефинисани за сваку методу. Најважнији параметри су опсег снимања, брзина снимања, конусна волтажа, режим и начин снимања масених спектра. Када су попуњена сва поља у „новоформираној“ линији кликне се на икону RUN и стартује анализа. По завршетку снимања анализира се добијени спектар.



Слика 57. LC MS Agilent 1100

### 3.3. Експериментални резултати

У овој дисертацији, извршена су следећа мерења комплексирања у системима:  $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин,  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин и  $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин. На основу ових мерења, проучаван је утицај флуорохинолона (офлоксацина и моксифлоксацина) на биодистрибуцију  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$ -јона и извршено је поређење модела добијеног у нашем

раду и модела описаних у литератури. У циљу проучавања реакције комплексирања у системима  $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин,  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин и  $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин, извршено је претходно изучавање реакција протоновања офлоксацин и моксифлоксацин анјона и хидролизе  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$ -јона.

### 3.3.1. Протоновање офлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини

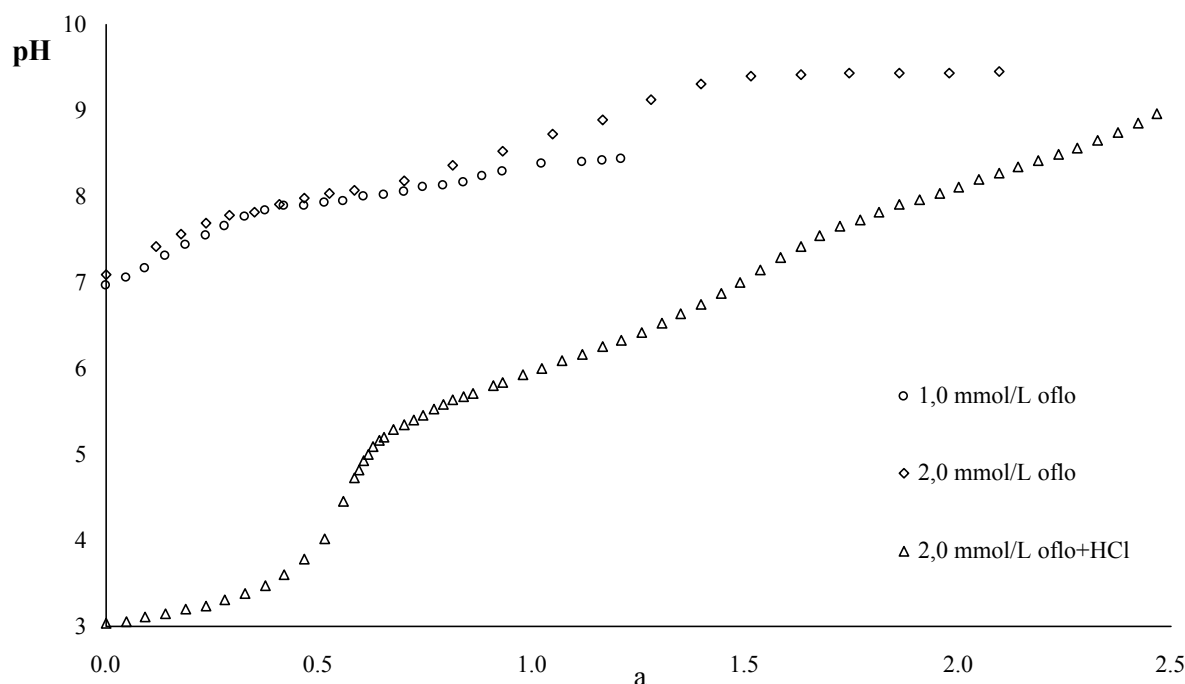
Протоновање анјона офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , проучавано је потенциометријски, титрацијама раствора офлоксацина, при чему су концентрације офлоксацина износиле  $1.0$  и  $2.0 \text{ mmol/dm}^3$ . Титрације испитиваних раствора вршене су стандардним раствором натријум-хидроксида концентрације  $0.130 \text{ mol/dm}^3$ , а резултати су приказани у табели 26.

**Табела 26.** Преглед потенциометријских титрација протоновања офлоксацин анјона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

$N^0$	$L_0$	$H_0$	pH област
1.	2.0	2.0	7.087-9.452
2.	1.0	1.0	6.962-8.429
3.	2.0	3.2	3.036-10.029

$L_0$ -почетна концентрација офлоксацина,  $H_0$ -почетна концентрација киселине.  
Све концентрације су изражене у  $\text{mmol/dm}^3$ .

Добијени резултати представљени су на слици 58 као зависност pH раствора од титрационог параметра  $a$  (Прилог, табеле од 1П-3П).



**Слика 58.** Протоновање анјона офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

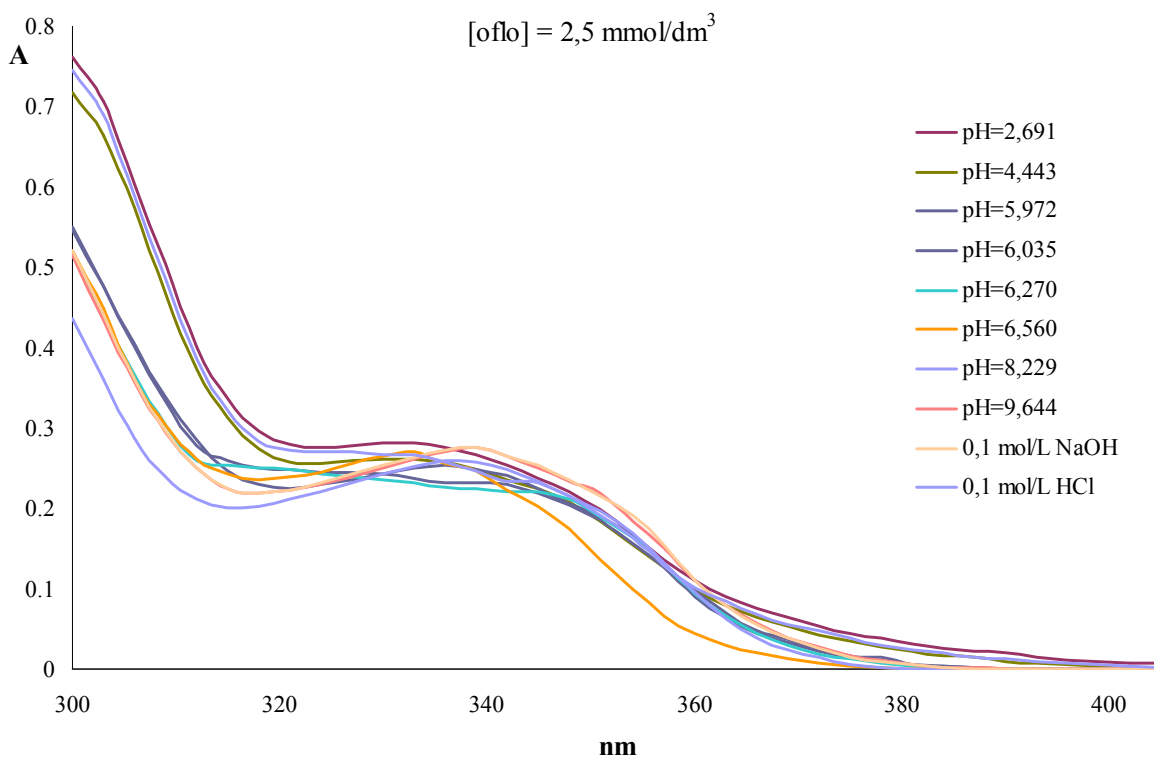
Протоновање офлоксацин анјона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , проучавано је и спектрофотометријски, у области таласних дужина од  $300-400 \text{ nm}$ . За спектрофотометријска мерења направљена је серија раствора офлоксацина концентрације  $2.5 \text{ mmol/dm}^3$ . Сваком од испитиваних раствора pH вредност је подешена у интервалу од  $2.5-10.0$  додавањем одговарајуће запремине стандардног раствора  $\text{NaOH}$  концентрације  $0.130 \text{ mol/dm}^3$ .

**Табела 27.** Вредности концентрације офлоксацина и рН вредности припремљених раствора за спектрофотометријска мерења у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

$N^0$	$L_0$	рН
1.	0.025	2.691
2.	0.025	4.443
3.	0.025	5.972
4.	0.025	6.035
5.	0.025	6.270
6.	0.025	6.560
7.	0.025	8.229
8.	0.025	9.644
9.	0.025	$0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaOH}$
10.	0.025	$0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$

$L_0$  - концентрација офлоксацина у  $\text{mmol/dm}^3$

Вредности концентрације офлоксацина и рН вредности припремљених раствора за мерење приказане су у табели 27, а добијени експериментални резултати приказани су на слици 59 као зависност измерене апсорбације  $A$  од таласне дужине  $\lambda$  (Прилог, табела 4П).



**Слика 59.** Апсорциони спектри офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$  на различитим вредностима рН

### 3.3.2. Протоновање моксифлоксацина у $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$ средини

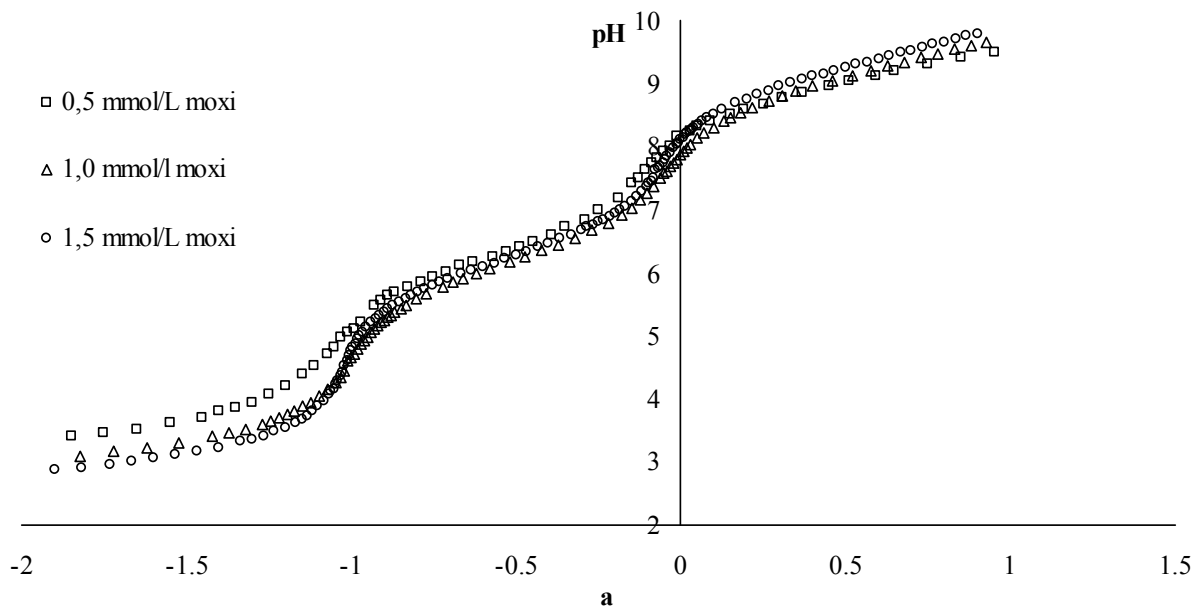
Протоновање анјона моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , проучавано је потенциометријски, титрацијама раствора моксифлоксацина, при чему су концентрације моксифлоксацина износиле  $0.5$ ;  $1.0$  и  $1.5 \text{ mmol/dm}^3$ . Титрације испитиваних раствора вршене су стандардним раствором натријум-хидроксида концентрације  $0.100 \text{ mol/dm}^3$ , а резултати су приказани у табели 28 (страна 119).

**Табела 28.** Преглед потенциометријских титрација протоновања анјона моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

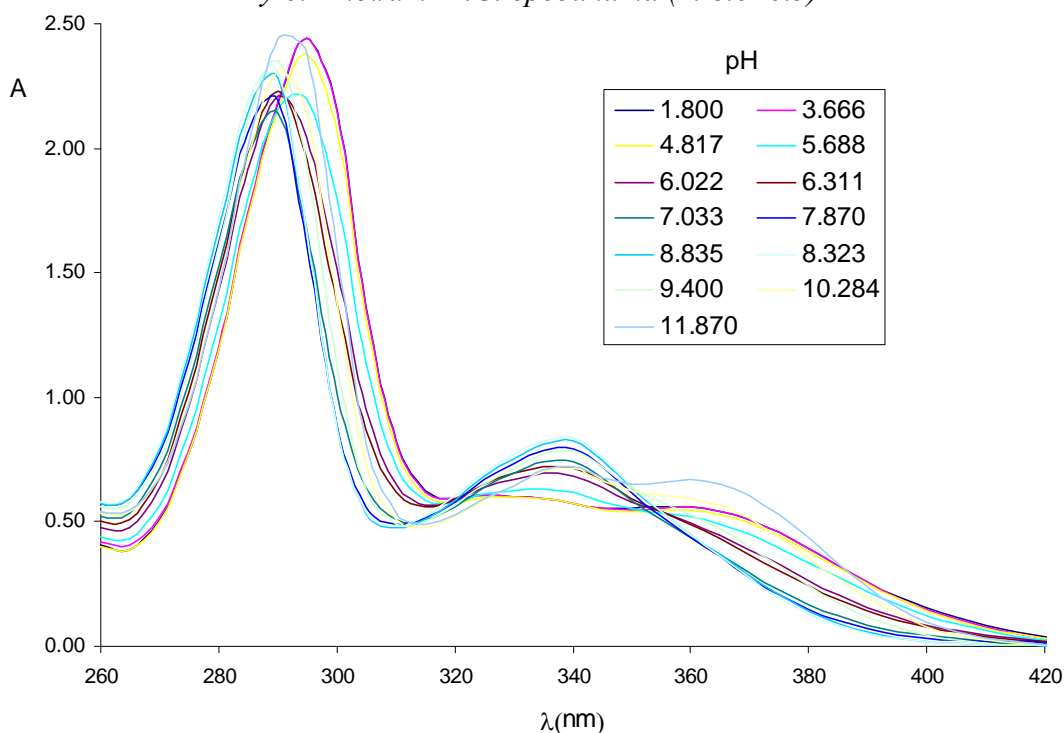
$N^0$	$L_0$	$H_0$	pH област
1.	0.5	6.525	2.186-10.407
2.	1.0	5.321	2.273-9.663
3.	1.5	5.600	2.251-9.795

$L_0$ -почетна концентрација моксифлоксацина,  $H_0$ -почетна концентрација киселине.  
Све концентрације су изражене у  $\text{mmol/dm}^3$ .

Добијени резултати представљени су на слици 60 као зависност pH раствора од титрационог параметра  $a$  (Прилог, табеле од 5П-7П).



**Слика 60.** Протоновање анјона моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$



**Слика 61.** Апсорпциони спектри моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$  на различитим вредностима pH

Протоновање моксифлоксацин анјона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , проучавано је и спектрофотометријски. За спектрофотометријска мерења направљена је серија раствора моксифлоксацина концентрације  $0.05 \text{ mmol/dm}^3$ . Сваком од испитиваних раствора рН вредност је подешена у интервалу од 1.800-11.870 додавањем одговарајуће запремине стандардног раствора NaOH. Укупно је направљено 13 раствора моксифлоксацина (Прилог, табела 8П). Добијени експериментални резултати приказани су на слици 61 (страница 119) као зависност измерене апсорбанције  $A$  од таласне дужине  $\lambda$ .

### 3.3.3. Хидролиза $\text{Al}^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини

Састав и константе стабилности хидролитичких комплекса који се формирају хидролизом  $\text{Al}^{3+}$ -јона узете су из литературних података.<sup>71,79</sup>

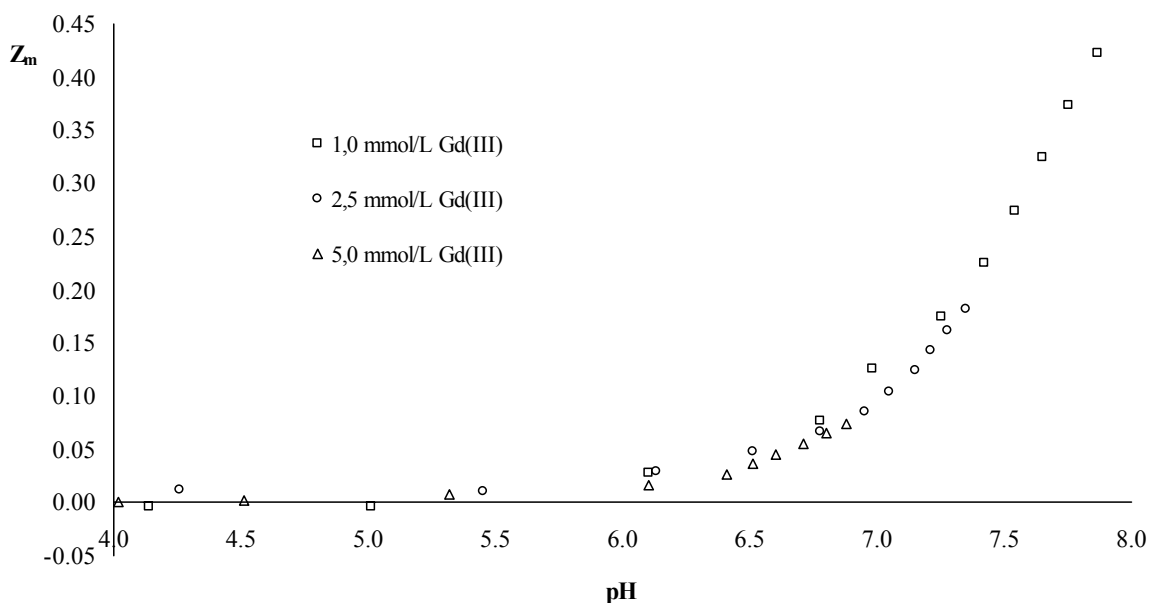
### 3.3.4. Хидролиза $\text{Gd}^{3+}$ -јона у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини

Хидролиза  $\text{Gd}^{3+}$ -јона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини, проучавана је потенциометријском титрацијом од 1.0-5.0 (0.99; 253; и 4.95)  $\text{mmol/dm}^3$  раствора  $\text{Gd}^{3+}$ -јона на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Раствори су припремљени разблаживањем полазног раствора  $\text{Gd}^{3+}$ -хлорида. Збирни преглед потенциометријских титрација хидролизе  $\text{Gd}^{3+}$ -јона приказан је у табели 29 (Прилог, табеле од 9П-11П).

**Табела 29.** Преглед потенциометријских титрација хидролизе  $\text{Gd}^{3+}$ -јона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

$N^0$	$M_0$	$H_0$	рН област	$Z_M(\text{max})$
1.	0.99	1.560	2.786-7.870	0.423
2.	2.53	4.240	2.370-7.350	0.181
3.	4.95	8.540	2.061-6.880	0.074

$M_0$ -почетна концентрација  $\text{Gd}^{3+}$ -јона,  $H_0$ -почетна концентрација киселине,  $Z_M(\text{max})$ -највећи хидроксидни број. Све концентрације су изражене у  $\text{mmol/dm}^3$ .



**Слика 62.** Хидролиза  $\text{Gd}^{3+}$ -јона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

Добијени резултати представљени су на слици 62 у облику зависности средњег



хидроксидног броја,  $Z_M$  од рН раствора. Слика 62 (страна 120) показује да су у LiCl средини хидролитичке криве надређене за различите укупне концентрације гадолинијума, указујући при томе формирање мононуклеарних комплекса. Максимална вредност хидроксидног броја постигнута је пре формирања талога, зависно од укупне концентрације гадолинијума. Почетак таложења условио је нестабилност читавања потенцијала, скоковити раст криве формирања, и визуално појаву замућења раствора. На свим концентрацијама  $Gd^{3+}$ -јона, хидролиза је почињала на вредности рН око 5.

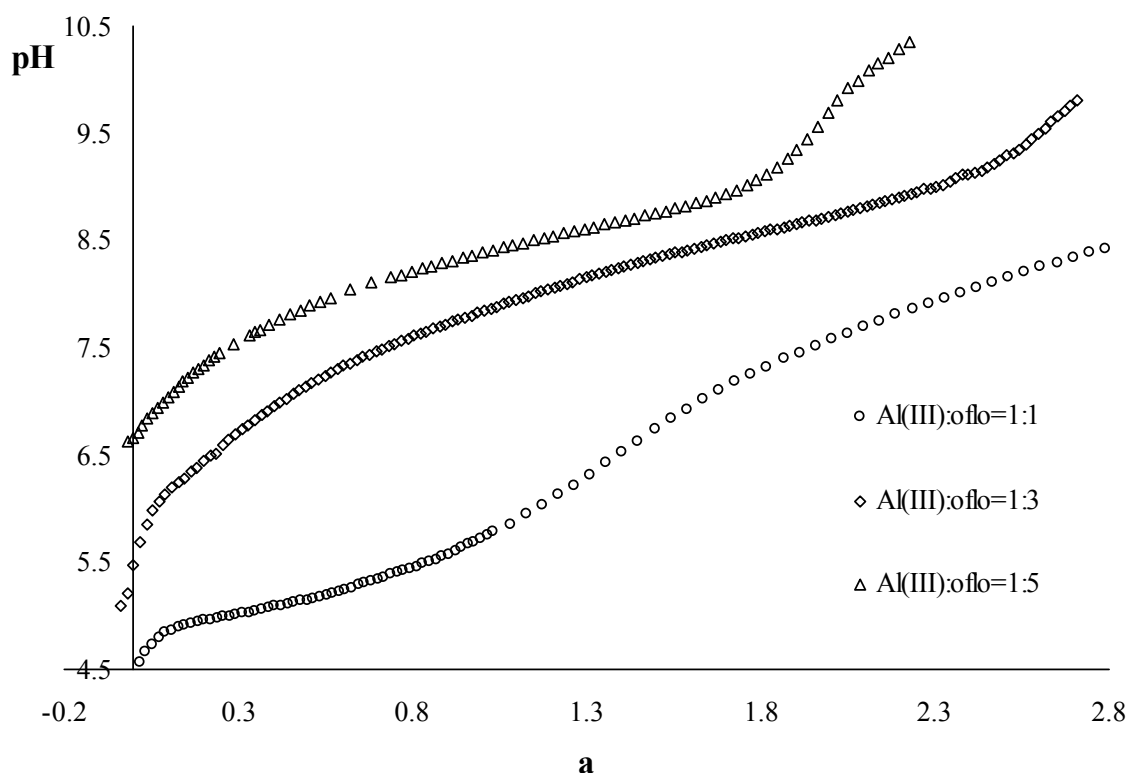
### 3.3.5. Комплексирање $Al^{3+}$ -офлоксадин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини

Комплексирање  $Al^{3+}$ -офлоксадин у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ , проучавано је потенциометријски, титрацијама серије раствора у којима је однос концентрација  $Al^{3+}$ -јона и офлоксадина износио 1:1, 1:3 и 1:5. Титрације испитиваних раствора вршене су стандардним раствором натријум-хидроксида концентрације  $0.130 \text{ mol/dm}^3$ , а резултати праћења реакција комплексирања су приказани у табели 30.

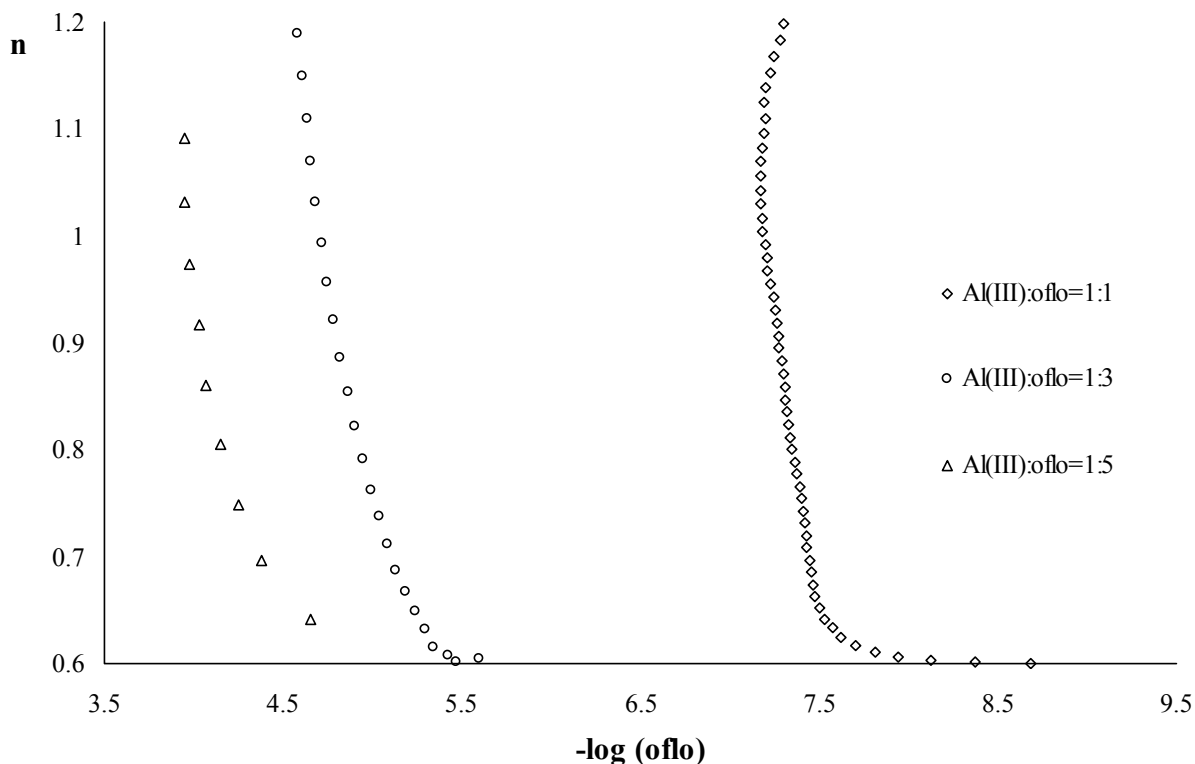
**Табела 30.** Преглед потенциометријских титрација комплексирања  $Al^{3+}$ -офлоксадин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

$N^0$	$M_0$	$H_0$	$L_0$	рН област	$L_0/M_0$	$\bar{n}_{\max}$
1.	1.990	0.186	2.453	3.943-10.423	1:1	1.230
2.	0.995	0.093	2.478	5.096-9.805	1:3	2.460
3.	0.498	0.064	2.490	6.626-10.348	1:5	4.810

Добијени резултати представљени су на сликама 63 и 64 (страна 122) као зависност рН од титрационог параметра  $a$ , и као зависност средњег лигандног броја  $\bar{n}$  од негативног логаритма концентрације офлоксадина (Прилог, табеле од 12П-14П).



**Слика 63.** Комплексирање  $Al^{3+}$ -офлоксадин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ , за концентрационе односе  $[Al^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1, 1:3$  и  $1:5$  као зависност рН од титрационог параметра  $a$



**Слика 64.** Комплексирање  $Al^{3+}$ -офлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , за концентрационе односе  $[Al^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1, 1:3$  и  $1:5$  као зависност средњег лигандног броја од негативног логаритма концентрације офлоксацина

### 3.3.6. Комплексирање $Al^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини

Састав и константе стабилности комплекса који се формирају у растворима  $Al^{3+}$ -моксифлоксацин система узете су из литературних података.<sup>71,79</sup>

### 3.3.7. Комплексирање $Gd^{3+}$ -офлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ NaCl средини

Комплексирање  $Gd^{3+}$ -офлоксацин система проучавано је потенциометријским мерењима у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини, на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ .

**Табела 31.** Преглед потенциометријских титрација комплексирања  $Gd^{3+}$ -офлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

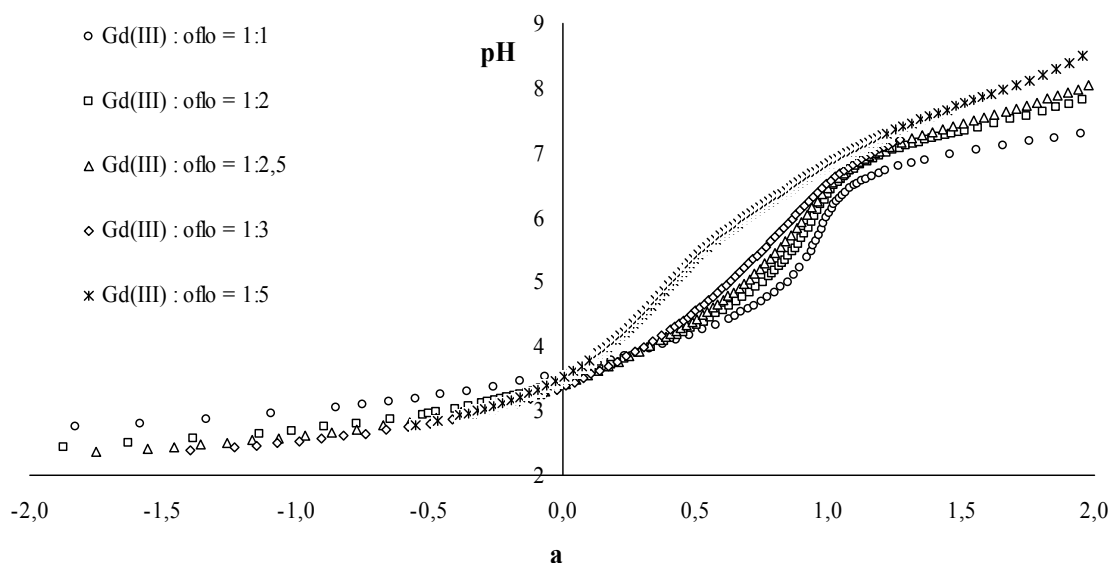
$N^0$	$M_0$	$H_0$	$L_0$	рН област	$M_0/L_0$	$\bar{n}_{\max}$
1.	1.0	5.18	1.0	2.279-10.618	1:1	0.999
2.	1.0	5.05	2.0	2.325-8.864	1:2	1.900
3.	1.0	3.89	2.5	2.359-9.269	1:2.5	2.302
4.	1.0	4.52	3.0	2.378-7.202	1:3	2.518
5.	0.6	1.32	3.0	2.783-9.417	1:5	2.941

$M_0$ -почетна концентрација  $Gd^{3+}$ -јона,  $H_0$ -почетна концентрација хлороводоничне киселине,  $L_0$ -почетна концентрација офлоксацина,  $\bar{n}_{\max}$ -највећа вредност средњег лигандног броја постигнутог у титрацији. Све концентрације су изражене у  $\text{mmol/dm}^3$ .

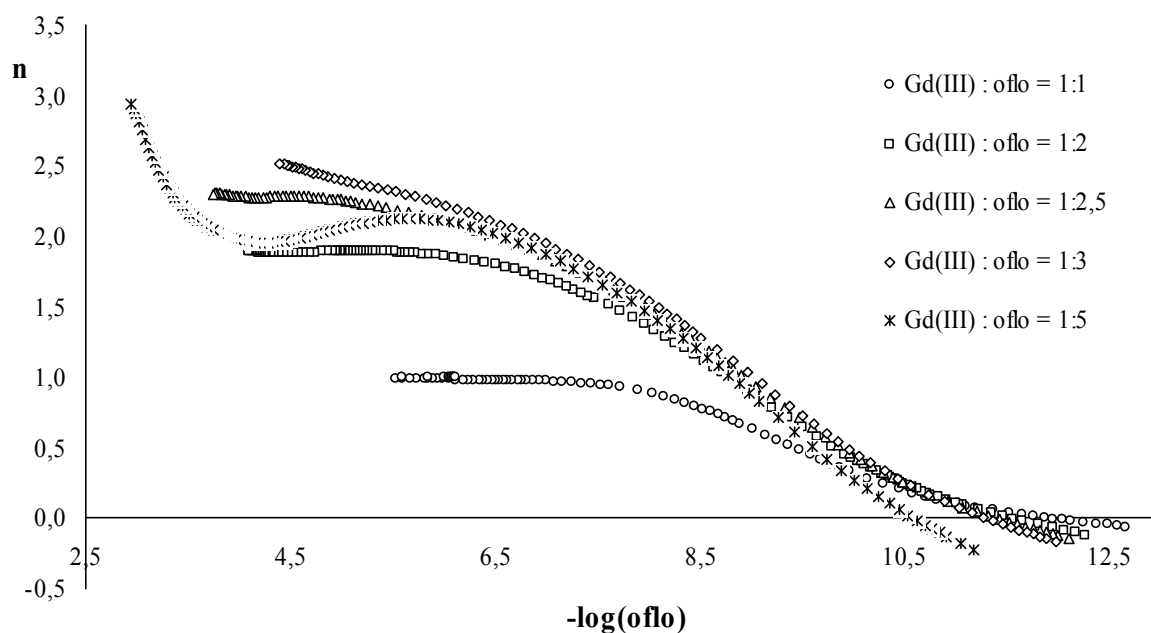
За ова проучавања направљена је серија раствора  $Gd^{3+}$ -јона и офлоксацина у којима је однос концентрација  $Gd^{3+}$ :офлоксацин био 1:1; 1:2; 1:2,5; 1:3; и 1:5. Концентрације  $Gd^{3+}$ -јона у испитиваним растворима приказане су у табели 31. У сваки

испитивани раствор додавана је тачно одређена количина хлороводоничне киселине (HCl) да би се избегло комплексирање или хидролиза  $Gd^{3+}$ -јона на почетку титрације. Испитивани раствори припремани су у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини. Титрације испитиваних раствора вршене су стандардним раствором натријум-хидроксида концентрације  $0.0982 \text{ mol/dm}^3$ , а прегледи реакција комплексирања приказани су у табели 31 (страна 122) (Прилог, табеле од 15П–19П).

Добијени експериментални резултати, приказани су, као зависност pH од титрационог параметра  $a$  (слика 65), и као зависност средњег лигандног броја  $\bar{n}$  од негативног логаритма концентрације офлоксаина (слика 66). Негативна вредност титрационог параметра  $a$  указује на титрацију вишка хлороводоничне киселине.



**Слика 65.** Комплексирање  $Gd^{3+}$ -офлоксаин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини, на температури од  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , за концентрационе односе  $[Gd^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3$  и  $1:5$  као зависност pH од титрационог параметра  $a$



**Слика 66.** Комплексирање  $Gd^{3+}$ -офлоксаин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини, на температури од  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , за концентрационе односе  $[Gd^{3+}]_0:[oflo]_0=1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3$  и  $1:5$  као зависност средњег лигандног броја  $\bar{n}$  од негативног логаритма концентрације офлоксаина

На слици 66 (страница 123) се може уочити да се све криве формирања поклапају до вредности  $\bar{n}=0.5$  при титрацијама у свим односима метал-лиганд. При односу  $M:L=1:1$  крива има константну вредност за  $\bar{n} = 1$  што указује на формирање само комплекса типа  $MLH_n$  где је  $n = 1, 0, -1$ . Надаље ове криве, осим криве 1:1 се поклапају до вредности  $\bar{n} = 1,5$ . Крива 1:2 указује на формирање само комплекса типа  $ML_2H_n$ , где је  $n = 2, 1, 0, -1, -2$ . Остале криве формирања за  $\bar{n} > 2$  представљају настајање мешовитих хидролитичких комплекса који настају услед хидролизе гадолинијума.

### 3.3.8. Комплексирање $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у $0.1 \text{ mol/dm}^3$ LiCl средини

Комплексирање у  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин систему проучавано је потенциометријским мерењима у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини, на  $(298.0 \pm 0.5)K$ . Прво је извршена потенциометријска титрација чистог моксифлоксацина концентрације  $1.07 \text{ mmol/dm}^3$  натријум хидроксидом концентрације  $0.1983 \text{ mol/dm}^3$ . За ова проучавања направљена је серија раствора  $Gd^{3+}$ -јона и моксифлоксацина у којима је однос концентрација  $Gd^{3+}$ :моксифлоксацин био 1:1; 1:2; 1:3 и 1:5. Концентрације  $Gd^{3+}$ -јона у испитиваним растворима приказане су у табели 32. У сваки испитивани раствор додавана је тачно одређена количина хлороводоничне киселине (HCl) да би се избегло комплексирање или хидролиза на почетку. Испитивани раствори припремани су у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини. Титрације испитиваних раствора вршене су стандардним раствором натријум-хидоксида концентрације  $0.1983 \text{ mol/dm}^3$ , а резултати праћења реакција комплексирања приказани су у табели 32 (Прилог, табеле од 20П-24П).

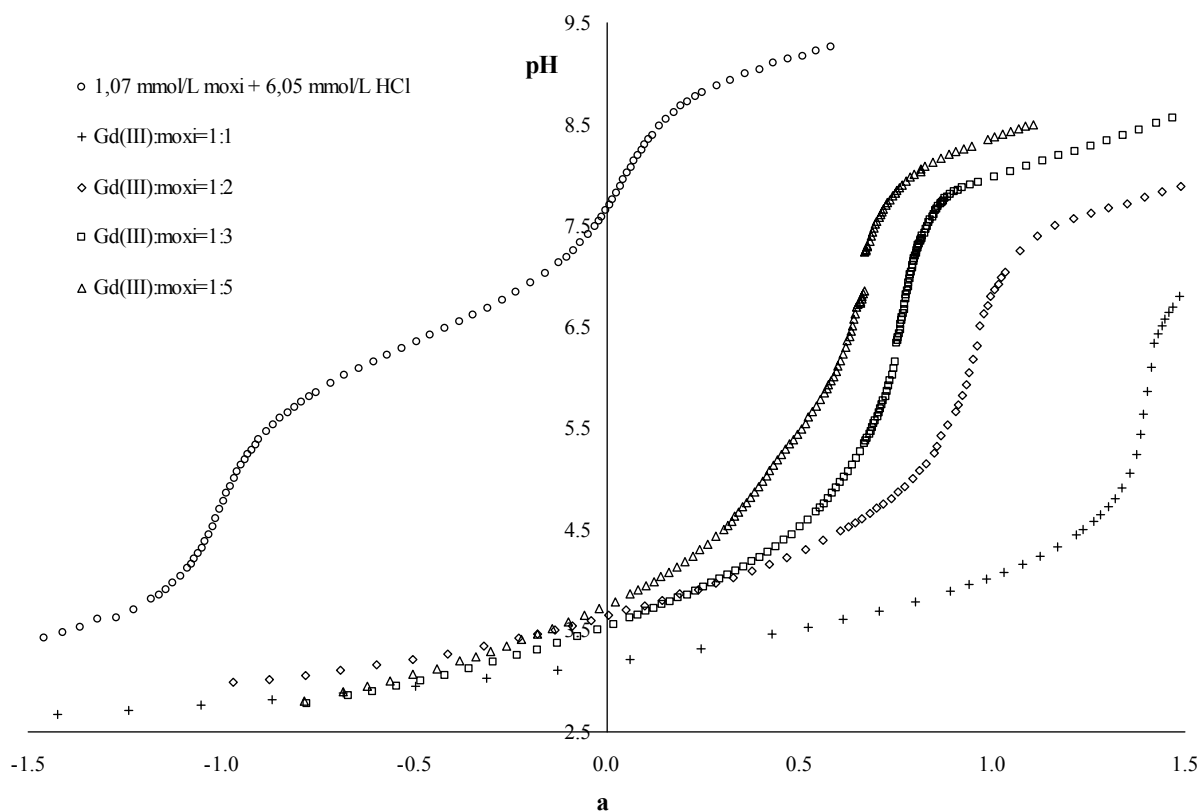
**Табела 32.** Преглед потенциометријских титрација комплексирања  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

$N^0$	$M_0$	$H_0$	$L_0$	pH област	$M_0/L_0$
1.	-	4.93	1.07	2.426-9.262	-
2.	1.00	1.523	1.07	2.670-7.040	1:1
3.	0.55	1.035	1.07	2.984-9.060	1:2
4.	0.80	1.863	2.40	2.780-9.258	1:3
5.	0.50	1.958	2.50	2.799-8.500	1:5

$M_0$ -почетна концентрација  $Gd^{3+}$ -јона,  $H_0$ -почетна концентрација хлороводоничне киселине,  $L_0$ -почетна концентрација моксифлоксацина. Све концентрације су изражене у  $\text{mmol/dm}^3$ .

Добијени експериментални резултати, приказани су као зависност pH од титрационог параметра  $a$  (слика 67, страна 125). Титрационе криве моксифлоксацина у присуству  $Gd^{3+}$ -јона су померене удесно у односу на титрациону криву чистог моксифлоксацина, што указује на формирање комплекса у систему. Обзиром да се титрационе криве чистог моксифлоксацина и криве  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин не поклапају на ниским вредностима pH, може се закључити да се реакције комплексирања дешавају на вредностима pH нижим од 3. Подударање титрационих кривих  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин са различитим односима концентрација метал-лиганд, у pH опсегу око 3 указује на формирање 1:1 комплекса  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин.

Титрациона крива чистог моксифлоксацина показује два издвојена скока, указујући на протоновање лиганда са два протона. У присуству  $Gd^{3+}$ -јона ово протоновање се дешава на нижим вредностима pH, и појава два пуферска подручја на титрационим кривама указује на формирање комплекса са односом метал-лиганд већим од 1:1. Стога се може очекивати формирање комплекса са односима метал-лиганд 1:1; 2:1; 3:1 као и мешовитих комплекса.

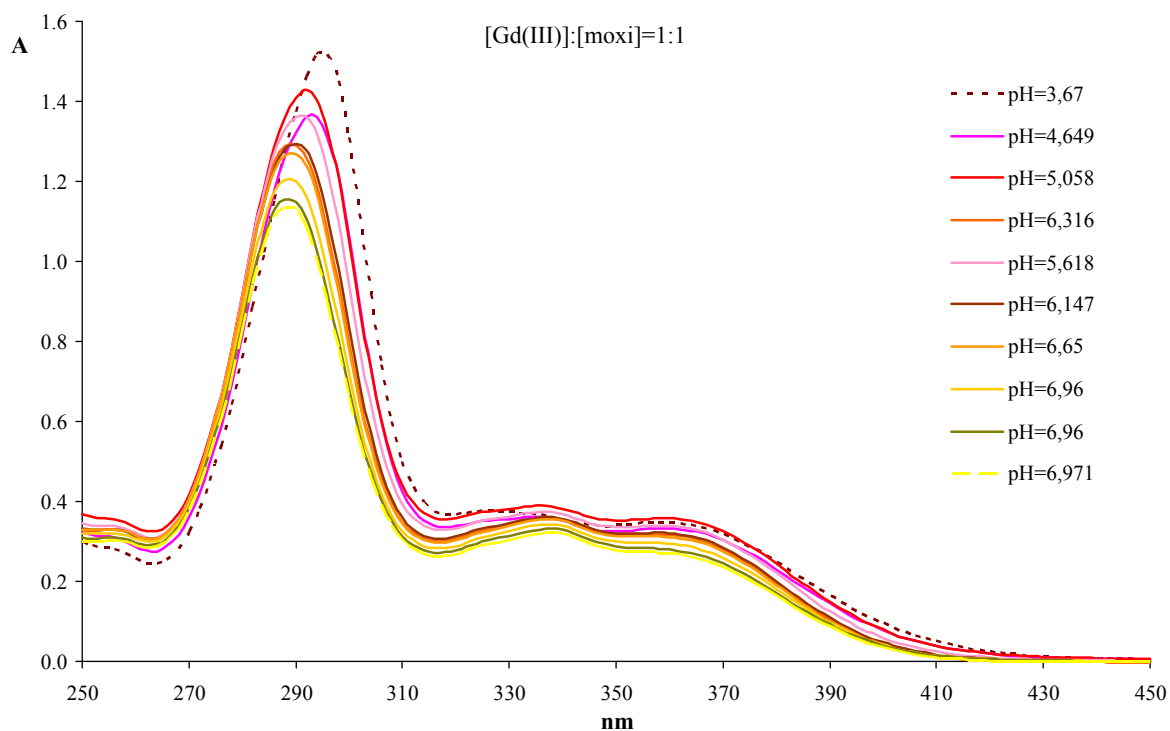


**Слика 67.** Комплексирање  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини, на температури од  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , за концентрационе односе  $[Gd^{3+}]_0 : [moxi]_0 = 1:1, 1:2, 1:3$  и  $1:5$  као зависност рН од титрационог параметра  $a$  (моxi-моксифлоксацин)

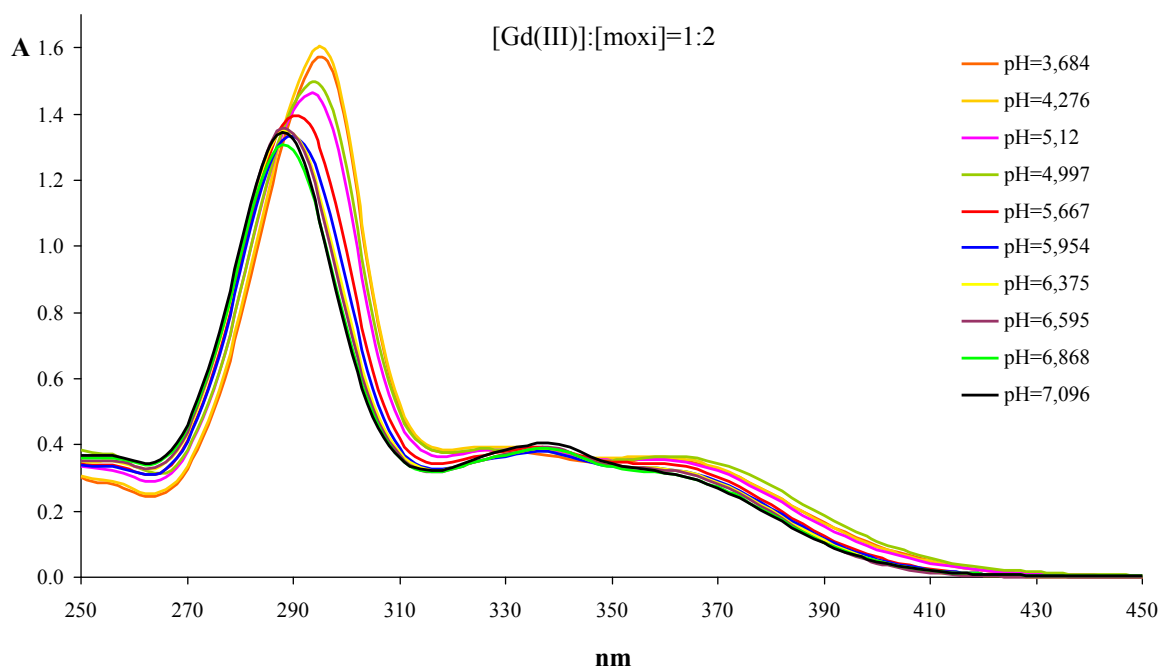
Спектрофотометријска мерења раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система вршена су у области таласних дужина од 250-450 nm, за концентрационе односе  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин 1:1; 1:2; 1:3 и 2:1. рН вредност раствора подешавана је додатком стандарних раствора NaOH и HCl. Експериментално добијени апсорпциони спектри система  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин за проучаване концентрационе односе приказани су на сликама од 68-71 (странице 126-127), као зависност измерене апсорбанције  $A$  од таласне дужине  $\lambda$  (Прилог, табеле од 25П-28П).

Сви UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим рН вредностима показују интензивну високо енергетску траку од 290-300 nm, и ниско енергетску траку у области између 330-380 nm, са два уочљива максимума на око 340 и 370 nm. Високо енергетска трака је последица  $\pi \rightarrow \pi^*$  електронског прелаза у ароматичном прстену, док су максимуми на  $n \rightarrow \pi^*$  последица прелаза у карбонилној и карбоксилној групи. Два мања уочљива максимума у већем опсегу таласних дужина су последица равнотеже моксифлоксацина који формира интермолекуларну водоничну везу са молекулима воде као растварача, и са 4-кето и 3-карбоксилном групом киселине.

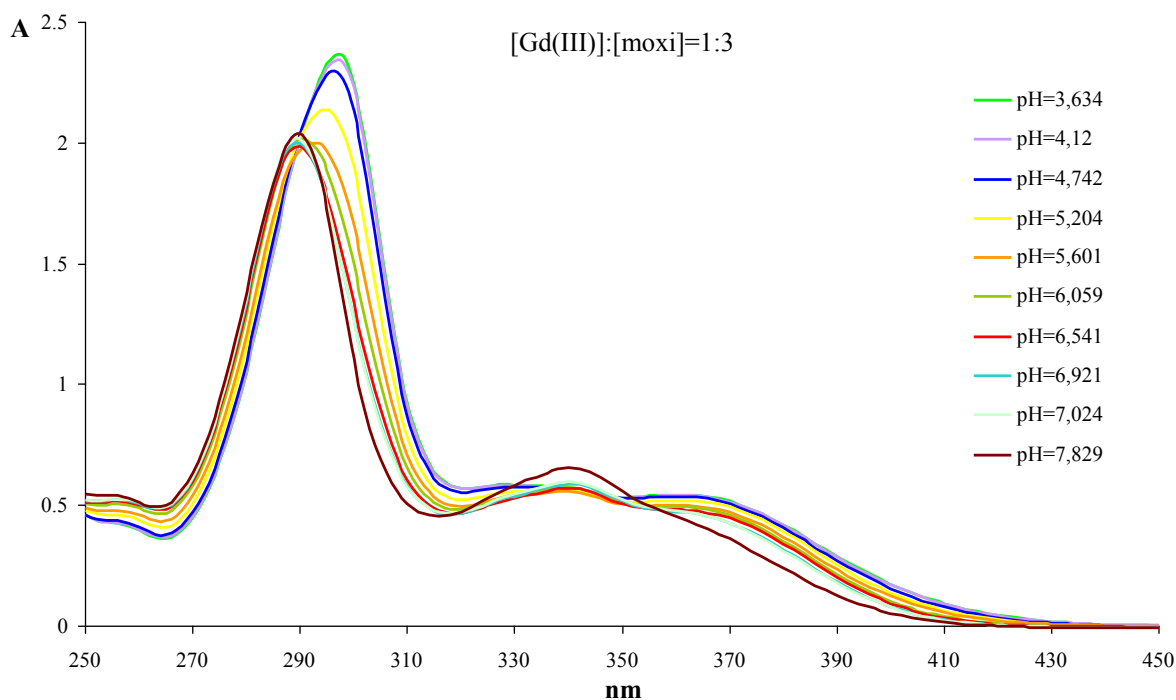
Повећањем рН вредности од 3-8 приметно је да се максимум са већим интензитетом значајно помера улево ка нижим таласним дужинама (хипсохромно или плаво померање). Уочљиво је и битно смањење интензитета овог максимума. Два максимума у области од 330-380 nm, повећањем рН вредности показују мале промене облика, положаја и интензитета трака. Значајно се мање померају ка већим таласним дужинама (батохромно или црвено померање), са мањим порастом интензитета трака. Интензитет траке на 340 nm расте са повећањем вредности рН, а интензитет траке на 370 nm као и високо енергетске траке опада са повећањем вредности рН. У присуству јона  $Gd^{3+}$  у односу на спектар чистог моксифлоксацина, уочљиво је батохромно (црвено) померање свих апсорпционих трака ка већим таласним дужинама.



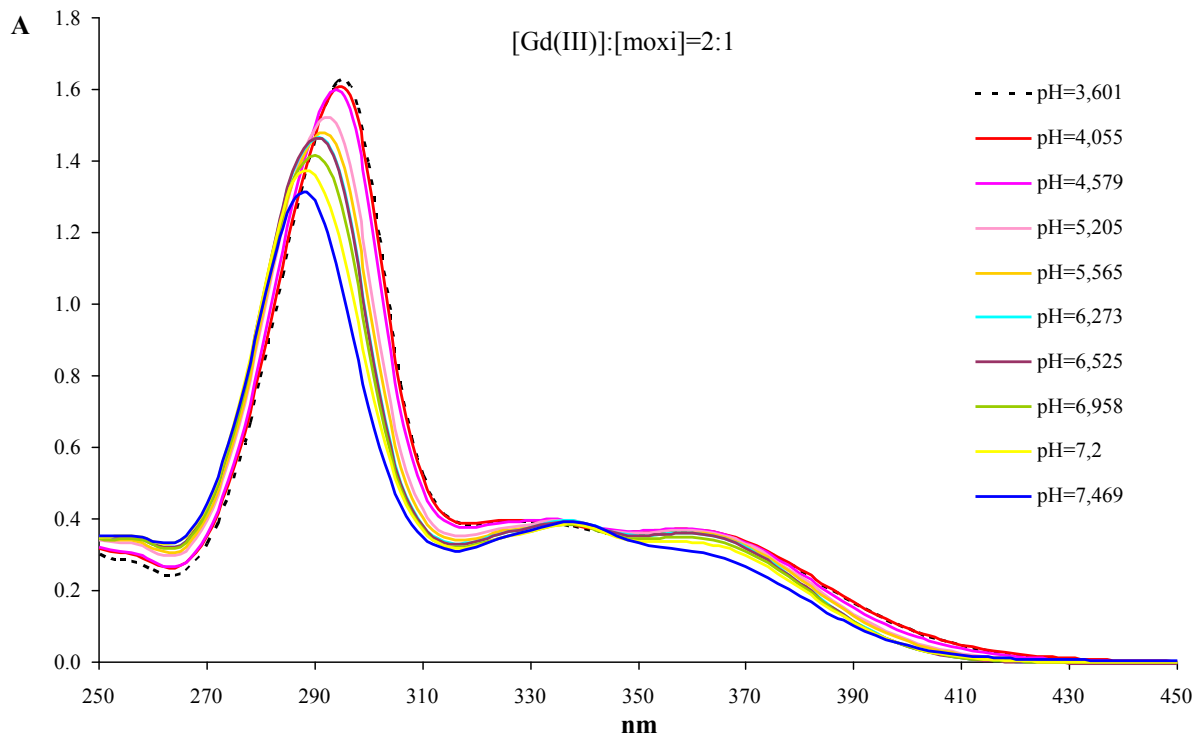
Слика 68. UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим pH вредностима за концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моxi = 1:1 ( $[Gd^{3+}] = 0.033 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi] = 0.035 \text{ mmol/dm}^3$ )



Слика 69. UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим pH вредностима за концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моxi = 1:2 ( $[Gd^{3+}] = 0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi] = 0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )



**Слика 70.** UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим pH вредностима за концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моxi =1:3 ( $[Gd^{3+}]=0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi]=0.0508 \text{ mmol/dm}^3$ )



**Слика 71.** UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система на различитим pH вредностима за концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моxi =2:1 ( $[Gd^{3+}]=0.0715 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi]=0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )

### 3.3.9. Масеноспектрометријско проучавање хидролизе $Gd^{3+}$ јона и комплексирања $Gd^{3+}$ и офлоксацина

Проучавање хидролизе  $Gd^{3+}$  јона и комплексирања  $Gd^{3+}$  и офлоксацина вршено је ESI MS на LC-MS инструменту *Agilent 1100* (слика 57, страна 116) при условима снимања спектра приказаним у табели 33.

**Табела 33.** Услови снимања ESI MS спектра на LC MS *Agilent 1100*

Услови снимања	Вредност
Растварач	50%CH <sub>3</sub> OH/50% вода
Проток	0.2 ml/min
Запремина иницирања	20 $\mu$ l
MS	ESI
Поларитет	+
Напон фрагментора	20-200 V
Капиларни напон	3500 V
Температура гаса за сушење	200°C
Проток гаса за сушење	12 l/min
Притисак распршивача	35 psig
Масени опсег	0-1000 m/z
Мод	Скенирање

Хидролиза  $Gd^{3+}$  јона проучавана је при условима концентрација  $Gd^{3+}$  јона и рН вредностима приказаним у табели 34, при чему је претходно извршено снимање спектра мобилне фазе-растварача (50%CH<sub>3</sub>OH/50% вода), а након тога спектра раствора различитих концентрација  $Gd^{3+}$  јона на рН вредностима у опсегу од 1.530-7.551. ESI MS спектар хидролизе  $Gd^{3+}$  јона приказан је на слици 72 (страна 129), и у Прилогу (слике 29П-38П).

**Табела 34.** Услови проучавања хидролизе  $Gd^{3+}$  јона

Р.бр. узорка	Концентрација	
	$Gd^{3+}$ јона (mol/dm <sup>3</sup> )	рН
1	$10 \times 10^{-3}$	1.530
2	$1 \times 10^{-3}$	2.450
3	$0.5 \times 10^{-3}$	2.781
4	$0.1 \times 10^{-3}$	3.447
5	$0.1 \times 10^{-3}$	5.497
6	$0.025 \times 10^{-3}$	6.043
7	$0.1 \times 10^{-3}$	6.070
8	$0.1 \times 10^{-3}$	6.414
9	$0.025 \times 10^{-3}$	6.654
10	$0.025 \times 10^{-3}$	6.995
11	$0.025 \times 10^{-3}$	7.551

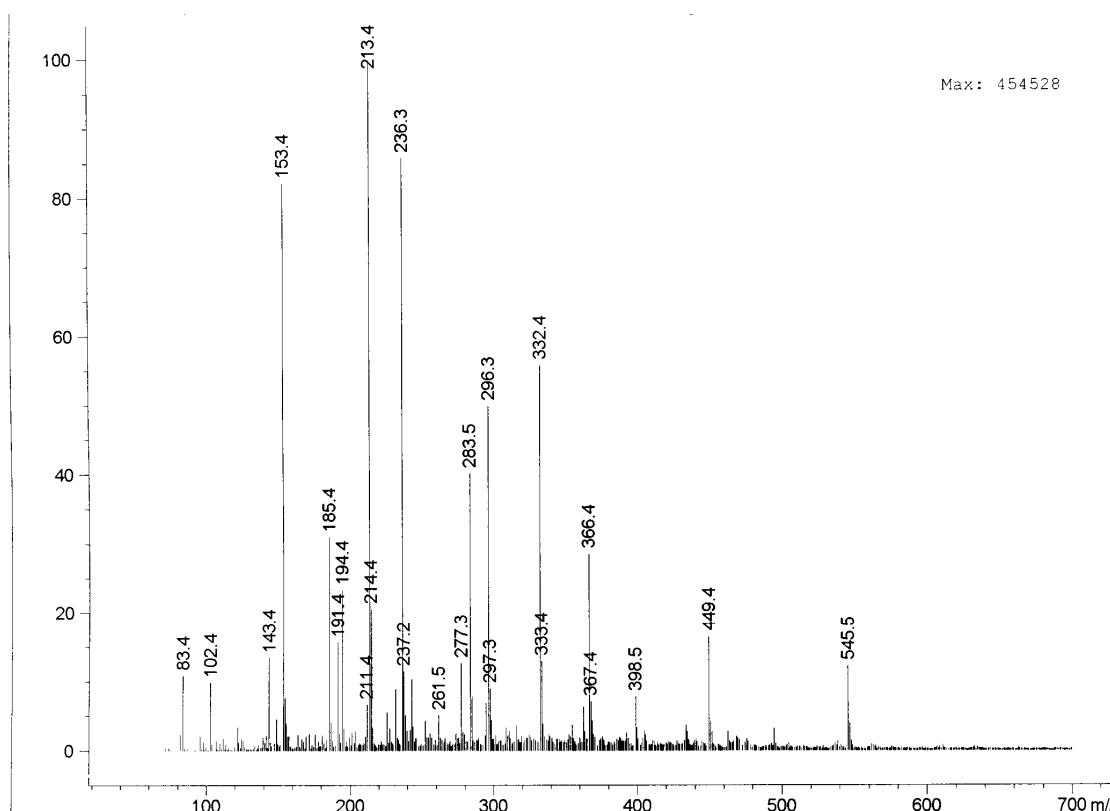
Комплексирање  $Gd^{3+}$  и офлоксацина проучавано је при условима концентрација  $Gd^{3+}$  јона, офлоксацина и рН вредностима приказаних у табели 35 (страна 129), при чему је такође претходно извршено снимање спектра растварача (50%CH<sub>3</sub>OH/50% вода). Након снимања спектра растварача, извршено је снимање спектра чистог офлоксацина на рН 7 (слика 73, страна 130), а потом раствора различитих концентрација гадолинијума и офлоксацина на рН вредностима у опсегу од 4.552-7.150.



ESI MS спектар комплексирања  $Gd^{3+}$  јона и офлоксацина приказан је на слици 74 (страна 130), а неколико карактеристичних у Прилогу (слике 39П-46П).

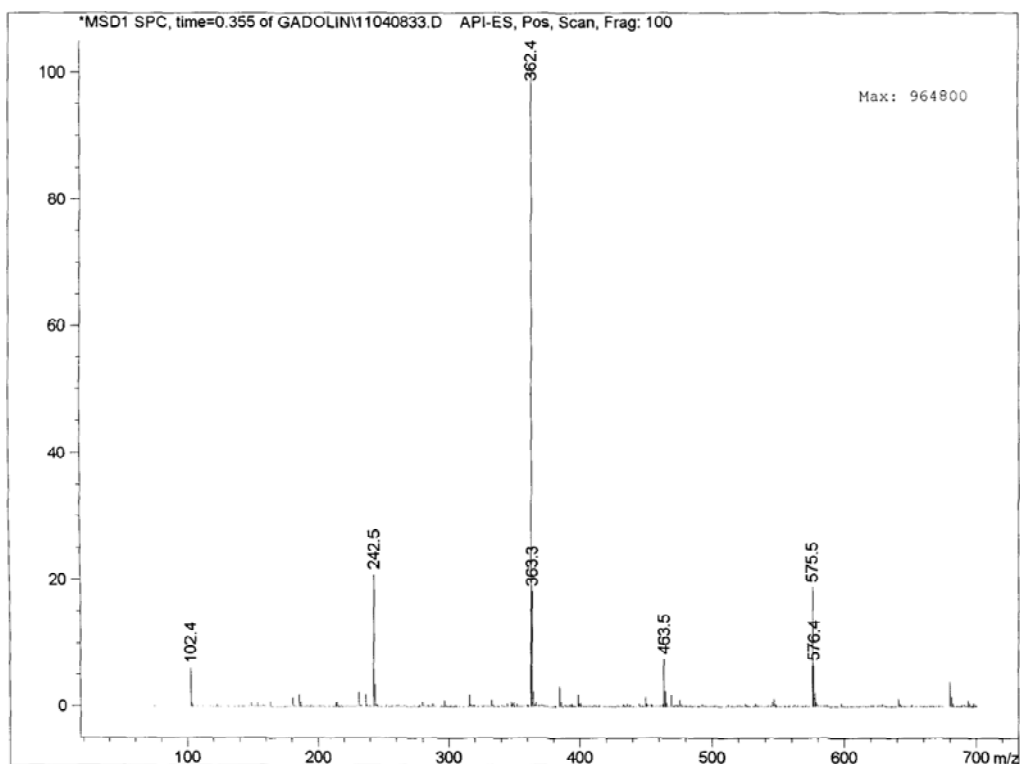
**Табела 35.** Услови проучавања комплексирања  $Gd^{3+}$  јона и офлоксацина

Р.бр. узорка	Концентрација $Gd^{3+}$ јона (mol/dm <sup>3</sup> )	Концентрација офло (mol/dm <sup>3</sup> )	pH
1	-	$0.5 \times 10^{-3}$	7.000
2	$0.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	4.552
3	$0.5 \times 10^{-3}$	$0.5 \times 10^{-3}$	4.622
4	$0.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	5.911
5	$0.5 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	6.440
6	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	4.340
7	$1.0 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-4}$	4.370
8	$2.0 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-4}$	4.730
9	$1.0 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-4}$	4.880
10	$1.0 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-4}$	5.000
11	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	5.110
12	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	6.040
13	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	6.360
14	$1.0 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-4}$	7.150

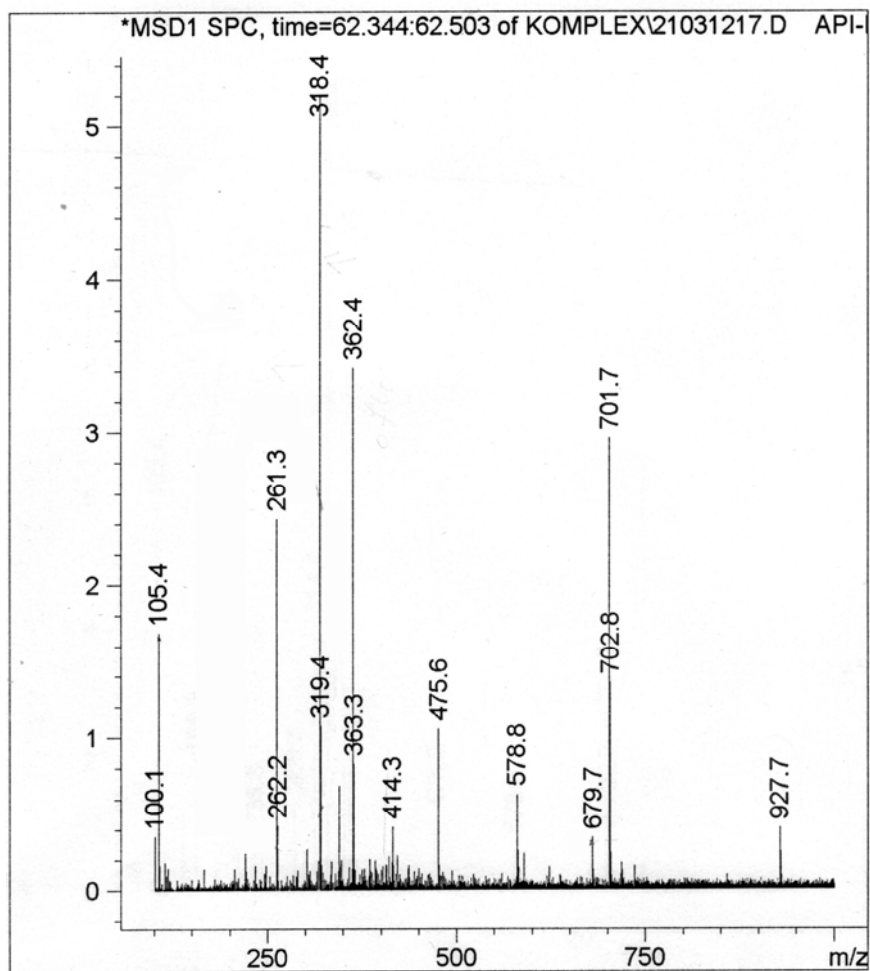


**Слика 72.** ESI MS спектар  $0.1 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>  $Gd^{3+}$  јона на pH 6.070

Идентификација пикова (опсег m/z: 102.4, 143.4, 148.4, 180.4, 185.4, 213.4, 231.3, 242.5, 243.5, 279.4, 280.4, 296.3, 301.3, 315.4, 338.4, 352.4, 380.5, 398.5, 449.4, 463.5, 514.5, 579.6, 679.7) који потичу од растварача извршена је на основу ESI MS спектра растварача (50%CH<sub>3</sub>OH/50% вода).



Слика 73. ESI MS спектар  $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  офлоксацина на pH 7



Слика 74. ESI MS спектар  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$  јона +  $3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  офло на pH 5 (70V)

### 3.3.10. Рачунарско моделирање хумане крвне плазме компјутерским програмом HySS

Јони метала учествују у многим важним биохемијским процесима у организму, а са тачке гледишта координационе хемије могу се поделити у четири категорије: Јони везани за протеине плазме који нису у равнотежи са околним флуидом; Јони везани за протеине слабир везама који могу бити у равнотежи са околним флуидом; Јони везани у комплексе (са нискомолекуларним лигандима крвне плазме); Слободни јони метала;<sup>64</sup>

**Табела 36.** Укупне концентрације лигананда и металних јона за компјутерски модел хумане крвне плазме у HySS

Компонента	mol/dm <sup>3</sup>	Компонента	mol/dm <sup>3</sup>
<b>Протеини</b>		<b>Неоргански лиганди</b>	
Хумани серум албумин (HSA)	7.2×10 <sup>-4</sup>	Карбонат (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	2.5×10 <sup>-2</sup>
Трансферин (Tf)	2.5×10 <sup>-5</sup>	Фосфат (PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	1.6×10 <sup>-3</sup>
<b>Аминокиселине</b>		Тиоцијанат (SCN <sup>-</sup> )	1.4×10 <sup>-5</sup>
Аланин (Ala)	3.7×10 <sup>-4</sup>	Силикат (Sil)	1.4×10 <sup>-4</sup>
Аминобутират (Ambu)	2.4×10 <sup>-5</sup>	Сулфат (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	2.1×10 <sup>-4</sup>
Аргинин (Arg)	9.5×10 <sup>-5</sup>	Амонијак (NH <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2.4×10 <sup>-5</sup>
Аспарагин (Asn)	5.5×10 <sup>-5</sup>	ОН <sup>-</sup>	1.2×10 <sup>-6</sup>
Аспартат (Asp)	5.0×10 <sup>-6</sup>	<b>Карбоксилне киселине</b>	
Цистеин (Cys)	2.3×10 <sup>-5</sup>	Цитрат (Cit)	1.1×10 <sup>-4</sup>
Цистин (Cis)	4.0×10 <sup>-5</sup>	Лактат (Lac)	1.8×10 <sup>-3</sup>
Цитрулин (Citrl)	2.7×10 <sup>-5</sup>	Малат (Mal)	3.5×10 <sup>-5</sup>
Глутамин (Gln)	4.8×10 <sup>-5</sup>	Оксалат (Oxa)	1.2×10 <sup>-5</sup>
Глутаминат (Glu)	5.2×10 <sup>-4</sup>	Пируват (Pyr)	9.5×10 <sup>-5</sup>
Глицин (Gly)	2.4×10 <sup>-4</sup>	Салицилат (Sal)	5.0×10 <sup>-6</sup>
Хистидин (His)	8.5×10 <sup>-5</sup>	Сукцинат (Succ)	4.2×10 <sup>-5</sup>
Хистамин (Hsn)	1.0×10 <sup>-8</sup>	Аскорбат (Asc)	4.3×10 <sup>-5</sup>
Хидроксипролинат (Hupro)	7.0×10 <sup>-6</sup>	<b>Метални јони</b>	
Изолеуцинат (Ile)	6.5×10 <sup>-5</sup>	Ca <sup>2+</sup>	1.43×10 <sup>-3</sup>
Леуцин (Leu)	1.2×10 <sup>-4</sup>	Mg <sup>2+</sup>	6.48×10 <sup>-4</sup>
Лизин (Lys)	1.8×10 <sup>-4</sup>	Cu <sup>2+</sup>	1.0×10 <sup>-18</sup>
Метионин (Met)	2.9×10 <sup>-5</sup>	Fe <sup>2+</sup>	1.0×10 <sup>-11</sup>
Орнитин (Orn)	5.8×10 <sup>-5</sup>	Fe <sup>3+</sup>	1.0×10 <sup>-23</sup>
Фенилаланин (Phe)	6.4×10 <sup>-5</sup>	Pb <sup>2+</sup>	1.0×10 <sup>-14</sup>
Пролин (Pro)	2.1×10 <sup>-4</sup>	Mn <sup>2+</sup>	1.79×10 <sup>-12</sup>
Серин (Ser)	1.2×10 <sup>-4</sup>	Zn <sup>2+</sup>	1.0×10 <sup>-9</sup>
Треонин (Thr)	1.5×10 <sup>-4</sup>	Al <sup>3+</sup>	5.0×10 <sup>-3</sup>
Триптофосфат (Trp)	1.0×10 <sup>-5</sup>	Gd <sup>3+</sup>	1.2×10 <sup>-9</sup>
Тирозин (Tyr)	5.8×10 <sup>-5</sup>	-	-
Валин (Val)	2.3×10 <sup>-4</sup>	-	-

Познавање расподеле јона метала између нискомолекуларних комплекса хумане крвне плазме, треба да допринесе бољем познавању њихових функција. Обзиром да су концентрације слободних јона метала и њихових нискомолекуларних комплекса веома мале (pmol/dm<sup>3</sup>), мерење тих концентрација је изван границе детекције већине аналитичких метода. Стога се изучавање дистрибуције јона метала у хуманој крвној плазми мора извршити компјутерском симулацијом полазећи од познатог квалитативног састава хумане крвне плазме. Основна претпоставка у овом израчунавању јесте да се хумана крвна плазма налази у стационарном стању, односно стању блиском правој равнотежи.

За моделирање расподеле потребни су поуздани подаци о идентитету и стабилности комплекса у плазми, а који често нису доступни. Константе стабилности комплекса које нису измерене, процењују се најчешће применом LFER теорије, и ако је неопходно врши се корекција константи на услове јонске јачине и температуре крвне плазме применом SIT теорије. Најуспешнији поступак моделовања крвне плазме до сада извршили су Мау<sup>64</sup> и сарадници применом компјутерског програма ECCLES.

Након конструкције компјутерског модела хумане крвне плазме у ECCLES-у, појавио се велики број нових података о равнотежама, па се указала и потреба за допуном модела хумане крвне плазме.

У овој дисертацији коришћен је компјутерски програм HySS и подаци публикованих константи стабилности комплекса металних јона и биологанада хумане крвне плазме мале молекулске масе. Развијен је компјутерски модел хумане крвне плазме који укључује 10 јона метала, 43 лиганда (26 аминокиселина, 7 неорганских лиганда, 8 карбоксилних киселина и 2 протеина) и 5941 комплекса. Константе стабилности комплекса узете су из JESS-ове<sup>66</sup>, NIST-ове<sup>67</sup> и IUPAC-ове<sup>85-87</sup> базе константи стабилности, а у случају да се одговарајуће вредности нису могле наћи у базама, коришћени су литературни извори. За добијање поузданих резултата узете су вредности константи стабилности које су блиске онима у физиолошким условима ( $T=310\text{K}$  и  $I=0.15\text{ mol/dm}^3\text{ NaCl}$ ). Пошто те вредности нису увек биле расположиве на основу термодинамичких података ( $\Delta H$  и  $\Delta S$ ) и применом SIT теорије извршена је корекција константи стабилности на физиолошке услове. Јони метала који су укључени у компјутерски модел крвне плазме програмом HySS су:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ . Након развијања компјутерског модела хумане крвне плазме, исти је проширен комплексима јона  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$ . Као лиганди укључени су најзаступљенији протеини, аминокиселине, неоргански лиганди и карбоксилне киселине у серуму. Укупне концентрације лиганда и слободне концентрације јона метала коришћених у компјутерском моделу хумане крвне плазме у HySS-у приказани су у табели 36 (страница 131).

**Табела 37.** Комплекси  $\text{Al}^{3+}$  јона унети у базу у HySS

Комплекс	$\log \beta$	Комплекс	$\log \beta$
$\text{AlH}_1$	-5.5	AlSucc	3.9
$\text{Al}(\text{CO}_3)$	5.7	AlCit	7.98
$\text{Al}(\text{CO}_3)_2$	8.4	AlAsp	7.77
$\text{AlH}(\text{CO}_3)$	10	AlGlu	7.69
$\text{Al}(\text{SO}_4)$	2	AlHAsp	11.24
$\text{AlOxa}$	6.1	$\text{AlH}_2\text{Asp}$	14.48
$\text{AlOxa}_2$	11.09	AlHGlu	11.07
$\text{AlOxa}_3$	15.12	Al H <sub>1</sub> Cit <sub>2</sub>	6.68
$\text{Al}_2\text{Oxa}$	7.47	AlHSucc	7.3
AlGly	7.61	AlSer	5.97
AlCitMal	10.64	AlThr	5.71
AlCitOxa	11.58	Al H <sub>2</sub> Asc <sub>2</sub>	3.55
AlMalOxa	8.86	AlHAsc	1.89
AlHOxa	6.6	AlCys	11.6
AlCitSal	17.83	AlLac	2.4
AlMalSal	15.11	AlH <sub>1</sub> Lac	-0.65
Al H <sub>2</sub> Cit <sub>2</sub>	-0.42	AlCit <sub>2</sub>	12.44
Al <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Cit <sub>3</sub>	12	AlH <sub>1</sub> Cit	4.4
AlMal	4.6	Al (PO <sub>4</sub> )	15.5
AlHMal	6.87	AlH <sub>1</sub> (PO <sub>4</sub> )	11.2
Al Mal <sub>2</sub>	7.62		

Табела 38. Комплекси  $Gd^{3+}$  јона унети у базу у HySS

Комплекс	log $\beta$	Комплекс	log $\beta$	Комплекс	log $\beta$
Gd H <sub>1</sub>	-7.83	GdLac	3.347	GdMet	4.93
Gd H <sub>2</sub>	-15.6	Gd Lac <sub>2</sub>	5.04	Gd Met <sub>2</sub>	9.31
Gd H <sub>3</sub>	-22.16	GdSucc	3.42	GdPhe	4.98
Gd <sub>3</sub> H <sub>4</sub>	-19	Gd Succ <sub>2</sub>	6.58	GdLys	7.42
Gd <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	-14.2	GdAla	5.19	Gd Lys <sub>2</sub>	14.03
Gd (SCN)	0.21	Gd Ala <sub>2</sub>	9.41	GdH <sub>2</sub> Gln	-11
Gd (NH <sub>3</sub> )	0.7	GdAsn	3.85	GdH <sub>3</sub> Gln	-21
Gd (SO <sub>4</sub> )	3	Gd Asn <sub>2</sub>	7.267	GdHCit	8.7
Gd (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5	GdAsp	5.77	GdH <sub>1</sub> Cit	-1
GdOxa	7.137	Gd Asp <sub>2</sub>	10.037	GdH <sub>2</sub> Cit	-7.08
Gd Oxa <sub>2</sub>	10.127	Gd Ser <sub>2</sub>	8.79	GdCit	6.86
GdH <sub>1</sub> Gly	-4.96	Gd (CO <sub>3</sub> )	5.66	Gd Cit <sub>2</sub>	10.53
GdH <sub>3</sub> Gly	-20.6	Gd (CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	9.96	GdHis	4.94
GdH <sub>2</sub> Gly	-10.08	GdThr	4.64	Gd His <sub>2</sub>	9.16
GdHGly	11.94	Gd Thr <sub>2</sub>	9.04	GdLeu	5.21
GlyGd	3.26	GdPro	5.58	Gd Leu <sub>2</sub>	9.52
Gd Gly <sub>2</sub>	9.17	GdHypro	3.92	GdCitrl	2.96
GdPyr	1.97	GdVal	5.1	GdSal	2.827
GdMal	4.45	Gd Val <sub>2</sub>	9.9	GdTrp	5.25
Gd Mal <sub>2</sub>	7.88	GdH <sub>1</sub> Val	-2.97	Gd Trp <sub>2</sub>	9.6
GdHHis	11.3	GdH <sub>2</sub> AspSer	26.29	GdH <sub>2</sub> CitLac	17.307
GdSer	5.227	GdH <sub>2</sub> ThrCit	22.35	GdGluCit	12.662
GdHHisTrp	16.937	GdH <sub>2</sub> AlaGlu	23.13	GdHGluCit	18.687
GdH <sub>2</sub> HisTrp	24.312	GdHAlaCit	18.423	GdH <sub>2</sub> GluCit	23.117
GdH <sub>3</sub> HisTrp	33.95	GdH <sub>2</sub> AlaCit	26.72	GdH <sub>2</sub> HisCit	27.727
GdH <sub>3</sub> HisThr	33.38	GdH <sub>3</sub> AlaCit	30.73	GdLeuCit	12.667
GdProThr	9.677	GdHGlyCit	18.53	GdHLeuCit	18.167
GdProTrp	10.65	GdH <sub>2</sub> GlyCit	26.91	GdAspCit	15.132
GdHProTrp	17.98	GdH <sub>3</sub> GlyCit	30.935	GdHAspCit	20.827
GdH <sub>2</sub> ProTrp	25.602	GdHValCit	18.446	GdH <sub>2</sub> AspCit	24.087
GdThrTrp	9.88	GdH <sub>2</sub> ValCit	26.704	GdLysSucc	7.32
GdH <sub>2</sub> ThrTrp	24.58	GdH <sub>3</sub> ValCit	30.66	GdH <sub>3</sub> LysSucc	23.26
GdH <sub>2</sub> AlaGly	23.05	GdCitrlLys	7.93	GdH <sub>2</sub> CitrlSucc	20.35
GdH <sub>2</sub> GluVal	23.62	GdHCitrlLys	15.42	GdOrnTyr	8.51
GdHArgCit	22.035	GdH <sub>3</sub> CitrlLys	25.33	GdTyrSucc	7.5
GdH <sub>2</sub> ArgCit	30.017	GdHLysTyr	16.54	GdH <sub>3</sub> TyrSucc	25.43
GdH <sub>2</sub> SerCit	22.22	GdHGlnCit	18.13	GdOrnSucc	8.35
GdH <sub>2</sub> IleCit	22.557	GdH <sub>2</sub> GlnCit	26.21	GdHOrnSucc	15.498
GdH <sub>2</sub> AspIle	27.577	GdCitLac	10.24	GdH <sub>2</sub> OrnSucc	20.21
GdH <sub>2</sub> AspThr	25.93	GdHCitLac	13.965	GdLysOrn	7.62
GdH <sub>2</sub> LysOrn	22.03	GdH <sub>3</sub> LysOrn	24.395	Gd H(PO <sub>4</sub> )	5.037
Gd H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	8.85	GdHsa	6.465	GdCitrl	7.67
GdOrn	3.27	GdTyr	4.247	Gd PO <sub>4</sub> (s)	-20.01
Gd H <sub>3</sub> (s)	20.3	Gd <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (s)	-32.2		

Након конструкције компјутерског модела хумане крвне плазме, у базу су додатно унети комплекси метала из базе и флуорохинолона за које су постојали расположиви подаци (офлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, флероксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, спарфлоксацин, ...). Пре уношења комплекса и константи стабилности метал-флуорохинолон, унети су подаци о

---

константама протоновања флуорохинолона. Укупне концентрација флуорохинолона коришћене у бази су биле максималне серумске концентрације истих које су биле познате и доступне из проучавања фармакокинетичких особина флуорохинолона у литератури. У базу су након тога унети комплекси  $Al^{3+}$  (табела 37, страна 132) и  $Gd^{3+}$  (табела 38, страна 133), са константама стабилности које одговарају физиолошким условима.

## 4. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА МЕРЕЊА

### 4.1. Константе протоновања офлоксацин анјона

Константе протоновања офлоксацин анјона одређиване су методом нелинеарне регресије, минимизирањем суме:

$$\sum_i (Z_{H(i)}^e - Z_{H(i)}^c)^2 = U(\beta_n) \quad (134)$$

где је први члан једначине експериментална вредност средњег протонског броја, други члан израчуната вредност на основу прве апроксимације вредности константе протоновања. Минимизирање функције  $U$ , вршено је рачунарским програмом SUPERQUAD.

У оквиру ове дисертације вршено је одређивање константи протоновања офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Добијени експериментални резултати потенциометријских титрација приказани су у експерименталном делу на слици 58 (страница 117) у облику зависности рН раствора од титрационог параметра  $a$ .

Константа протоновања офлоксацин анјона може се дефинисати следећом равнотежом:



У обрачуна су укључене све потенциометријске титрације представљене у табели 26 (страница 117) као и све тачке које су добијене. Обрачуном су обухваћене четири титрације, где је концентрација офлоксацина износила  $0.5$ ;  $1.0$ ; и  $2.0 \text{ mmol/dm}^3$ , у рН опсегу од  $2.020$ - $10.029$ . За почетне вредности константи протоновања при обради експерименталних резултата, коришћене су вредности из различитих литературних подручја. При обрачуна је варирана концентрација протона. Израчуната вредност концентрације протона није се разликовала више од  $0.2\%$  од почетне концентрације па је ова промена концентрације протона прихваћена. Резултати добијени обрачуном рачунарским програмом SUPERQUAD, са најбољим вредностима статистичких параметара  $\chi^2$  и  $s$  приказани су у табели 39.

**Табела 39.** Константе протоновања офлоксацин анјона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$  на основу потенциометријских мерења

Комплекс	$\log(\beta_{p,q,r} \pm \text{SD})$
(0, 1, 1)	$8.212 \pm 0.003$
(0, 2, 1)	$14.240 \pm 0.006$
$\chi^2$	12.78
$s$	1.10

### 4.2. Константе протоновања моксифлоксацин анјона

Константе протоновања  $\beta_n$  моксифлоксацин анјона, дефинисане равнотежом:



одређене су стакленом електродом потенциометријским титрацијама у  $0.10 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . У опсегу рН вредности од  $2.186$ - $10.407$  укупно три потенциометријске титрације су извршене са концентрацијама у опсегу од  $0.5$ - $1.5$

mmol/dm<sup>3</sup>. Спектрофотометријска мерења су вршена у 15 раствора где је концентрација моксифлоксацина била 0.05 mmol/dm<sup>3</sup>, док су вредности рН вариране у опсегу од 4-9.4. Израчунате вредности константи протоновања приказане су у табели 40. Слагање између потенциометријски и спектрофотометријски добијених вредности је боље од 1%, и налазе се у опсегу претходно извештених вредности.

**Табела 40.** Константе протоновања моксифлоксацин анјона у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини на (298.0±0.5)K на основу потенциометријских и спектрофотометријских мерења

Комплекс	Потенциометрија	Спектрофотометрија
	log (β <sub>p,q,r</sub> ±SD)	
(0, 1, 1)	9.34±0.01	9.30±0.02
(0, 2, 1)	15.67±0.01	15.57±0.05

#### 4.3. Хидролитички комплекси Al<sup>3+</sup>-јона

Састав и стабилност комплекса, одређен је на бази претпоставке да Al<sup>3+</sup>-јон ступа у интеракцију са молекулима воде и формира један или више хидролитичких комплекса опште формуле [Al<sub>p</sub>(OH)<sub>q</sub>]<sup>(3p-q)+</sup>. Састав и константе стабилности хидролитичких комплекса који се формирају хидролизом Al<sup>3+</sup>-јона узете су из литературних података.<sup>71,79</sup>

**Табела 41.** Константе стабилности хидролитичких комплекса Al<sup>3+</sup>-јона у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини на (298.0±0.5)K<sup>71,79</sup>

Комплекс	log (β <sub>p,q,r</sub> ±s)
(1, -1, 0)	5.15 ± 0.01
(1, -2, 0)	9.53 ± 0.01
(1, -3, 0)	16.18 ± 0.10
(3, -4, 0)	13.44 ± 0.01
(13, -32, 0)	105.79 ± 0.14
χ <sup>2</sup>	12.36
s	1.11

#### 4.4. Хидролитички комплекси Gd<sup>3+</sup>-јона

Састав и константе стабилности комплекса, одређени су на основу претпоставке да Gd<sup>3+</sup>-јон ступа у интеракцију са молекулима воде и формира један или више хидролитичких комплекса опште формуле [Gd<sub>p</sub>(OH)<sub>q</sub>]<sup>(3p-q)+</sup> према реакцији:



где је количина H<sup>+</sup> јона еквивалентна количини хидроксидних јона везаних за Gd<sup>3+</sup>-јон.

Укупна константа формирања се може дефинисати као:

$$\beta_{p,q} = C_{p,q} [Gd^{3+}]^{-p} [H^+]^{+q} \quad (138)$$

где је C<sub>p,q</sub> равнотежна концентрација (p,q) комплекса и [Gd<sup>3+</sup>] је слободна концентрација Gd<sup>3+</sup>-јона. Општа формула [Gd<sub>p</sub>(OH)<sub>q</sub>]<sup>(3p-q)+</sup> укључује непознату количину молекула воде као растварача и по могућности неке анјоне медијума. Хидратација индивидуалних јона и формирање комплекса Gd<sup>3+</sup>-јона са хлоридним



јонима је изостављена. Концентрација и хлоридних јона и молекула воде је много већа од концентрације  $Gd^{3+}$ -јона. Због тога, није могуће одредити промене у концентрацији хлоридних јона и молекула воде. Да би се избегао ефект формирања комплекса концентрација анјона медијума се држала константном ( $0.1 \text{ mol/dm}^3$ ) и много већом него концентрација  $Gd^{3+}$ -јона. Обзиром да се промене главних коефицијената активности парова ( $p, q$ ) и  $\beta_{p,q}$  вредности не могу истовремено одредити, одржавање константног јонског медијума је коришћено ради одржавања константним главних коефицијената активности.

Састав хидролитичких комплекса и њихове константе стабилности су одређене уз помоћ програма HYPERQUAD 2006. Израчунавања указују на формирање мононуклеарних комплекса  $Gd(OH)^{2+}$  у рН области од 5-7.5. Формирање нерастворних Gd-хидроксида је очекивана из титрационих кривих киселих раствора  $Gd^{3+}$ -хлорида са NaOH. По достизању рН области од  $\sim 7.5$ -9 даље додавање базе је заустављено. Израчунате вредности су са прегледом литературних података приказане у табели 42.

**Табела 42.** Константе стабилности хидролитичких комплекса  $Gd^{3+}$ -јона у воденим растворима на  $(298.0 \pm 0.5)K$  у различитим јонским медијумима  
 $K_{sp} = [Gd^{3+}]x[H^+]^{-3}$

Комплекси	$-\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$	Јонска средина	Референца
(1, -1, 0)	$7.87 \pm 0.03$	$NO_3^- 0.5 \text{ mol/dm}^3$	88
	$8.20 \pm 0.01$	$ClO_4^- 3.0 \text{ mol/dm}^3$	89
	$7.3 \pm 0.3$	$ClO_4^- 1.0 \text{ mol/dm}^3$	90
	$7.83 \pm 0.05$	$ClO_4^- 0.0 \text{ mol/dm}^3$	91
	$7.96 \pm 0.01$	$Cl^- 0.1 \text{ mol/dm}^3$	Ова дисертација
(1, -2, 0)	$13.04 \pm 0.03$	$NO_3^- 0.5 \text{ mol/dm}^3$	88
	$14.6 \pm 0.5$	$ClO_4^- 1.0 \text{ mol/dm}^3$	90
(1, -3, 0) Нерастворан $\log K_{sp}$	$19.32 \pm 0.03$	$NO_3^- 0.5 \text{ mol/dm}^3$	88
	$17.0 \pm 0.5$	$ClO_4^- 1.0 \text{ mol/dm}^3$	90
	$17.90 \pm 0.1$	$Cl^- 0.1 \text{ mol/dm}^3$	Ова дисертација

#### 4.5. Комплекси $Al^{3+}$ -офлоксацин система

Равнотежа у системима  $Al^{3+}$  + офлоксацин се може представити у општој форми:



У обрачун су укључене све потенциометријске титрације представљене у табели 30 (страница 121) као и све тачке које су добијене. Приликом израчунавања константи стабилности насталих комплекса испитивани су различити мононуклеарни и полинуклеарни комплекси и притом је испитано преко двадесет модела да би се нашли најприхватљивији: (1,0,1), (1,0,2), (1,1,1), (1,2,1), (1,1,2), (1,-1,1), (1,-2,1), (1,-3,1), (1,-1,2), (1,-2,2), (1,-2,3) и полимери (2,1,1), (2,2,1), (2,1,2), (2,-1,1), (2,-2,1), (2,-2,2), (2,-3,1), (2,-3,2), (3,-1,1), (3,-2,1), (3,-1,2), (3,-2,2).

За време израчунавања аналитички параметри почетних концентрација  $Al^{3+}$ , офлоксацин протона су држани непромењени. Као полазни модел за обраду титрационих кривих послужили су хидролитички комплекси који су одраније одређени са најбољим статистичким параметрима у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ .

Константе протоновања офлоксацин анјона, одређене у посебним титрацијама, нису оптимизоване током рачунања константи стабилности и коришћене су као константне вредности. Заједно са хидролитичким комплексима прво су у рачун као почетни модел увођени мононуклеарни комплекси типа (1,0,1), (1,-1,1) и полинуклеарни комплекс типа (2,-2,2). Свака титрациона крива је обрађивана посебно да би на крају све тачке титрационих кривих биле укључене у прорачун заједно, где су као полазни модел за обраду коришћени комплекси са најбољим статистичким параметрима. Заједно су обрађиване све титрације са истим концентрационим односом метал-лиганд.

Израчунате вредности рН се нису разликовале од експериментално добијених за више од 0,003 (обично мање), што се може сматрати довољно прихватљивом грешком. Резултати добијени обрачуном рачунарским програмом SUPERQUAD, са најбољим вредностима статистичких параметара  $\chi^2$  и  $s$  приказани су у табели 43.

Резултати обрачуна приказани у табели 43 су указали да се граде четири мононуклеарна и један полинуклеарни комплекс.

**Табела 43.** Константе стабилности комплекса  $Al^{3+}$ -офлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

Комплекс	$\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$
(1, 1, 1)	15.93 $\pm$ 0.03
(1, 0, 2)	14.84 $\pm$ 0.07
(1, 0, 1)	10.20 $\pm$ 0.04
(1, -1, 1)	4.21 $\pm$ 0.05
(2, -2, 1)	6.4 $\pm$ 0.10
$\chi^2$	21.40
$s$	3.40

#### 4.6. Комплекси $Al^{3+}$ -моксифлоксацин система

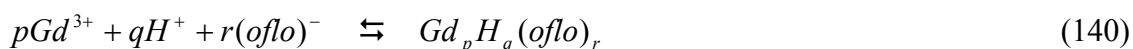
Састав и константе стабилности комплекса који се формирају у растворима  $Al^{3+}$ -моксифлоксацин узете су из литературних података.<sup>71,79</sup>

**Табела 44.** Константе стабилности  $Al^{3+}$ -моксифлоксацин комплекса у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ <sup>246</sup>

Комплекс	$\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$
(1, 1, 1)	16.59 $\pm$ 4
(1, 0, 1)	11.66 $\pm$ 1
(1, -1, 1)	5.28 $\pm$ 2
(1, -2, 1)	-2.92 $\pm$ 2
$\chi^2$	14.30
$s$	1.5632

#### 4.7. Комплекси $Gd^{3+}$ -офлоксацин система

Равнотежа система  $Gd^{3+}$ -офлоксацин се може представити у општој форми:



У обрачун су укључене све потенциометријске титрације представљене у табели 31 (страна 122) као и све тачке које су добијене. Резултати добијени обрачуном

рачунарским програмом HYPERQUAD 2006, са најбољим вредностима статистичких параметара  $\chi^2$  и  $s$  приказани су у табели 45.

**Табела 45.** Константе стабилности комплекса  $Gd^{3+}$ -офлорксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$  за различите концентрационе односе и када су укључене све титрације у обрачун

Комплекс (p,q,r)	$\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$					
	M:L=1:1	M:L=1:2	M:L=1:2,5	M:L=1:3	M:L=1:5	Сви односи
(1, 1, 1)	13.21±0.004	13.03±0.02	13.00 ±0.02	13.33±0.01	13.26±0.04	13.31±0.02
(1, 0, 1)	6.08±0.01					6.00±0.02
(1, -1, 1)	-1.42±0.01					-1.01±0.03
(1, 2, 2)	26.41±0.01	25.97±0.01	25.95±0.02	26.48±0.01	25.39±0.03	26.04±0.02
(1, 1, 2)		18.51±0.03	18.48±0.05	20.67±0.02	19.33±0.06	18.14±0.02
(1, 0, 2)		11.20±0.02	11.18±0.03			11.00±0.09
(1, -1, 2)				5.55±0.03	3.81±0.07	3.34±0.04
(1, -2, 2)		-6.77±0.04	-6.81±0.06			-6.46±0.08
(1, 3, 3)				38.30±0.02	37.13±0.05	37.65±0.06
(1, 2, 3)				30.00±0.02	30.05±0.02	30.71±0.06
Статистика	$\chi^2=10.15$ $s=0.048$	$\chi^2=5.69$ $s=0.75$	$\chi^2=3.08$ $s=1.09$	$\chi^2=10.98$ $s=0.43$	$\chi^2=4.00$ $s=0.81$	$\chi^2=33.81$ $s=1.57$

#### 4.8. Комплекси $Gd^{3+}$ -моксифлорксацин система

Константе стабилности система  $Gd^{3+}$ -моксифлорксацин у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  јонској средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$  на основу потенциометријских и спектрофотометријских мерења за различите концентрационе односе, приказани су у табели 32 (страна 124). Из прелиминарног сета комплекса (табела 46, страна 140), инициран је нови циклус прорачуна, у коме су изабрани подаци потенциометријских и спектрофотометријских мерења третирани заједно. При израчунавањима врсти и константи стабилности насталих комплекса рачунарским програмом HYPERQUAD 2006 а који дају најбоља слагања са експерименталним резултатима, вршено је минимизирање функције,  $U$ :

$$U = (1/N) \sum_{n=1}^N w_{ni} (Y_{ni}^O - Y_{ni}^C)^2, \quad (141)$$

где  $w_{ni}$  представља статистичку тежину  $i$ -тог резидуала у  $n$ -тој тачки титрационе криве,  $Y_{ni}^O$  и  $Y_{ni}^C$  се односе на очитани и израчунати потенцијал (или апсорбанцију) посматраног модела,  $N$  је укупни број експерименталних тачака. Квалитет поклапања је процењиван на основу статистичких параметара.

Вредност  $w_{ni}$  прорачунавана је формулом:

$$w_{ni} = \left( \sum_k \frac{(\partial(Y_{ni}^O - Y_{ni}^C))}{\partial k} \right)^2 \sigma_k^2)^{-1}. \quad (142)$$

Стандардна девијација параметара  $k$ , рачунала се формулом:

$$\sigma_i = \left( \frac{UxG_{ii}}{N-k} \right)^{1/2} \quad (143)$$

а стандардна девијација резидуала  $s$ , формулом:

$$s = [ewe^T / (N - k)] \quad (144)$$

где је  $e$ -вектор у резидуалима потенцијала или апсорбанције.

Прихватање израчунатог модела значило је да је вредност функције  $U$  минимална, стандардна девијација параметара (константи стабилности) мања од 30% вредности параметра, стандардна девијација резидуала мања од 3.0 и вредност *Pearson*-овог теста мања од 12.6.

**Табела 46.** Константе стабилности  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  јонској средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

Комплекс (p,q,r)	Потенциометрија		Спектрофотометрија	
	L/M = 0.5 - 2	L/M = 3 - 5	L/M = 0.5 - 2	L/M = 3 - 5
	$\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$			
(1, 1, 1)	14.72±0.03	14.79±0.06	14.79±0.09	14.75±0.07
(1, 2, 2)	29.65±0.02	29.57±0.08	29.72±0.08	29.67±0.09
(1, 1, 2)	21.20±0.09			
(1, 0, 2)	14.00±0.03		13.8±0.3	
(1, 3, 3)		43.98±0.03		43.95±0.01
(1, 2, 3)		35.18±0.01		
(1, 1, 3)		27.76±0.03		27.80±0.05
(1, 0, 3)		19.00±0.05		19.28±0.08
<b>Статистика</b>	$\chi^2 = 11.82$ $s = 1.23$	$\chi^2 = 15.98$ $s = 1.84$	$\chi^2 = 24.36$ $s = 4.4$	$\chi^2 = 13.65$ $s = 1.3$

Спектрофотометријски подаци су прорачунавани програмом рНАb2006 (који такође припада фамилији рачунарских програма HYPERQUAD али поседује извесна побољшања) и програмом HYPERQUAD који такође поседује и могућност обрачуна спектрофотометријских података. Потенциометријски и спектрофотометријски подаци су се држали конзистентним проценом обе врсте података добијених коришћењем оба рачунарска програма и података добијених њиховом појединачном употребом. На основу прихватљивих критеријума, рачунарским програмом HYPERQUAD 2006 израчунати су крајње прихваћени комплекси (табела 47).

**Табела 47.** Коначно прихваћен модел комплекса за константе стабилности  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

Комплекс (p, q, r)	$\log(\beta_{p,q,r} \pm SD)$
(1, 1, 1)	14.78±0.03
(1, 2, 2)	29.75±0.02
(1, 3, 3)	43.98±0.03
(1, 2, 3)	35.08±0.01
(1, 1, 3)	27.56±0.03
(1, 0, 3)	19.20±0.05
<b>Статистика</b>	$\chi^2 = 12.02$ $s = 2.28$

Комплекси  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона са флуорохинолонима офлоксацином и моксифлоксацином са израчунатим константама стабилности приказани су збирно у табели 48 (страна 141).

**Табела 48.** Збирни приказ комплекса и константи стабилности  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  јона са офлоксацином и моксифлоксацином у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $LiCl$  и  $NaCl$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ 

Јон метала	$Al^{3+}$		$Gd^{3+}$	
	Лиганд	oflo	moxi	oflo
Комплекс (p, q, r)	log ( $\beta_{p,q,r} \pm SD$ )			
(1, 1, 1)	15.93±0.03	16.59±4	13.31±0.02	14.78±0.03
(1, 0, 2)	14.84±0.07		11.00±0.009	
(1, 0, 1)	10.20±0.04	11.66±1	6.00±0.02	
(1, -1, 1)	4.21±0.05	5.28±2	-1.01±0.03	
(2, -2, 1)	6.4±0.10			
(1, -2, 1)		-2.92±2		
(1, 2, 2)			26.04±0.02	29.75±0.02
(1, 1, 2)			18.14±0.02	
(1, -2, 2)			-6.46±0.08	
(1, 3, 3)			37.65±0.06	43.98±0.03
(1, 2, 3)			30.71±0.06	35.08±0.01
(1, 1, 3)			23.14±0.09	27.56±0.03
(1, 0, 3)			15.17±0.08	19.20±0.05
Статистика	$\chi^2=21.40$ $s=3.40$	$\chi^2=14.30$ $s=1.5632$	$\chi^2=33.81$ $s=1.57$	$\chi^2=12.02$ $s=2.28$

#### 4.9. ESI MS спектри хидролизе $Gd^{3+}$ јона и комплекси $Gd^{3+}$ и офлоксацина

Ради интерпретације ESI MS спектра хидролизе  $Gd^{3+}$  јона и комплексирања  $Gd^{3+}$  и офлоксацина, интензитет и положај пикова (сигнала) приказани су у табелама посебно за хидролизу  $Gd^{3+}$  јона (табела 49), посебно за комплексирања  $Gd^{3+}$  и офлоксацина (табела 50, страна 142).

Прво су идентификовани сигнали и вредности  $m/z$  који потичу од растварача (опсег  $m/z$ : 102.4, 124.4, 143.4, 148.4, 180.4, 185.4, 213.4, 231.3, 236.3, 242.5, 243.5, 252.2, 273.4, 279.4, 280.4, 296.3, 299.3, 301.3, 315.4, 317.4, 338.4, 352.4, 361.4, 380.5, 381.5, 398.5, 449.4, 463.5, 514.5, 515.5, 579.6, 679.7, 680.8) како би се елиминисали ови пикови у даљој идентификацији.

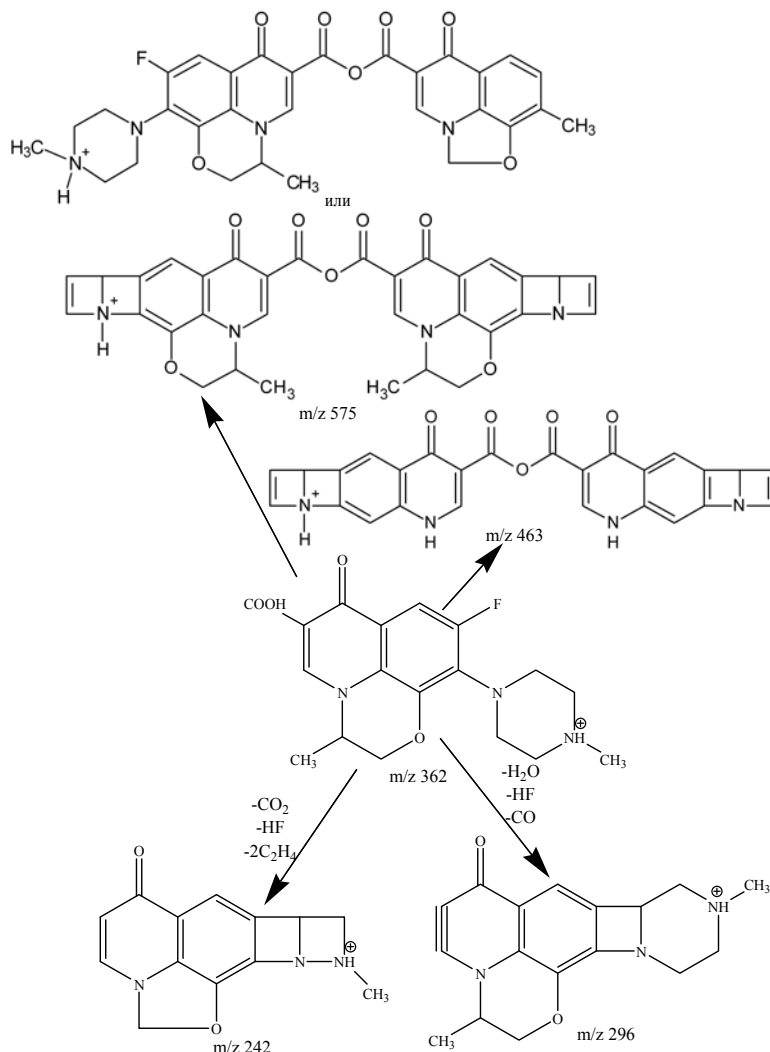
**Табела 49.** Табеларни приказ масених спектра хидролизе  $Gd^{3+}$  јона ( $c=0,025 \text{ mol}$ ) на различитим  $pH$  вредностима

$m/z$						Идентификована врста
$pH$ 6.043	$pH$ 6.070	$pH$ 6.414	$pH$ 6.654	$pH$ 6.995	$pH$ 7.551	
90.4	-	-	90.4	90.4	90.4	$[Gd(H_2O)_6]^{3+}$
133.4	-	-	133.4	133.4	-	$[Gd(OH)(H_2O)_5]^{2+}$
191.4	191.4	191.4	191.4	191.4	-	$Gd(OH)_2^+$
214.4	214.4	214.4	214.4	214.4	214.4	$[Gd(OH)_2Na]^{2+}$
225.5	-	-	225.4	225.4	225.4	$Gd(OH)_2Cl$
261.5	261.5	-	261.5	261.5	-	$Gd(OH)_2Cl(H_2O)_2$
283.5	283.5	283.5	283.5	283.5	283.5	$[GdCl_2(H_2O)_3]^+$
-	-	-	-	-	285.4	$[Gd(OH)_2Cl(H_2O)_2Na]^+$

Анализом ESI MS спектра хидролизе  $Gd^{3+}$  јона, прво су сагледани хидролитички комплекси потврђени потенцијометријском методом (табела 41, страна 136). Након тога у ESI MS спектрима идентификоване су могуће хидролитичке врсте

приказане у табели 49 (страница 141). ESI MS спектралном анализом потврђено је присуство хидролитичких комплекса који су идентификовани и потенциометријском методом ( $Gd(OH)^{2+}$  и  $Gd(OH)_2^+$ ).

Анализом ESI MS спектра офлоксацина и комплексирања офлоксацина и гадолинијума на различитим рН вредностима, утврђено је појављивање доминантних јонских врста на  $m/z$  242.5, 362.4, 363.3 и 575.5. И у овом случају су прво идентификовани пикови који потичу од растварача. Најинтензивнији пик на  $m/z$  362.4 одговара  $[Oflo+H]^+$  јонској врсти, мање интензиван на  $m/z$  363.4 одговара  $[Oflo+2H]^+$  јонској врсти, што је у складу и са литературним подацима.



Шема 4. Шема фрагментације офлоксацина

Табела 50. Табеларни приказ идентификованих врста у ESI-MS спектрима при комплексирању  $Gd^{3+}$  јона и офлоксацина ( $L-oflo^-$ ;  $LH^0-Hoflo$ ;  $LH_2^+-H_2oflo^+$ )

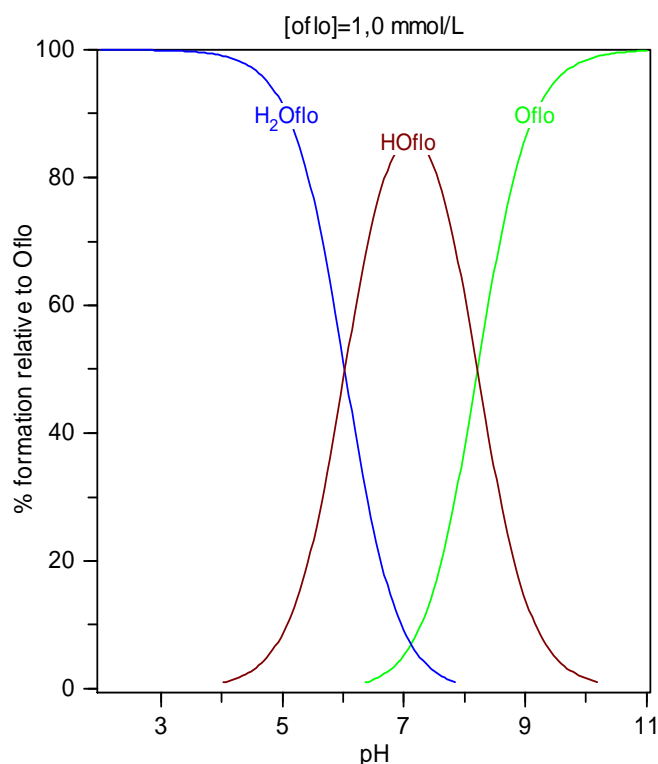
m/z експ.	m/z теор.	Идентификовани јони	Врста од које вероватно потиче ESI-MS јон
701.7	702.7	$[Gd^{3+} + 2L^- - HF - C_3H_5N - 2C_3H_4]^+$	$GdL_2^+$
578.8	579.5	$[Gd^{3+} + 2L^- - C_{15}H_{22}F_2N_4]^+$	$GdL_2^+$
475.6	475.6	$[Gd^{3+} + L^- + LH + 4H_2O]^{2+}$	$GdL_2^+$
414.2	414.4	$[Gd^{3+} + L^- + OH^- + H_2O - C_8H_{13}FN_2]^+$	$GdL^+$
362.3	362.3	$[LH_2]^+$	Слободан лиганд
318.4	318.4	$[LH_2^+ - CO_2]^+$	Молекулски јон

## 5. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

У овој дисертацији су извршена испитивања комплексирања у системима:  $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин,  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин и  $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин. На основу ових мерења, проучаван је утицај флуорохинолона (офлоксацина и моксифлоксацина) на биодистрибуцију  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$ -јона и извршено је поређење модела добијеног у нашем раду и модела описаних у литератури. У циљу проучавања реакције комплексирања у системима  $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин,  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин и  $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин, извршено је претходно изучавање реакција протоновања офлоксацин и моксифлоксацин анјона, као и хидролизе  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$ -јона.

### 5.1. Протоновање офлоксацин анјона

Константе протоновања офлоксацин анјона одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$  где су концентрације офлоксацина износиле 0.5, 1.0, 2.0 и  $2.5 \text{ mmol/dm}^3$ . Резултати добијени обрачуном експерименталних података потенциометријских титрација приказани су у табели 39 (страна 135). Израчунате вредности константи протоновања у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини износе  $\log\beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд):  $\text{Hoflo}$ ,  $\log\beta_{1,1}=8.212 \pm 0.003$ ;  $\text{H}_2\text{oflo}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=14.240 \pm 0.006$ . Дистрибуциони дијаграм офлоксацина концентрације  $1.0 \text{ mmol/dm}^3$  у области рН вредности од 3-11 приказан је на слици 75.



Слика 75. Дистрибуциони дијаграм офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$

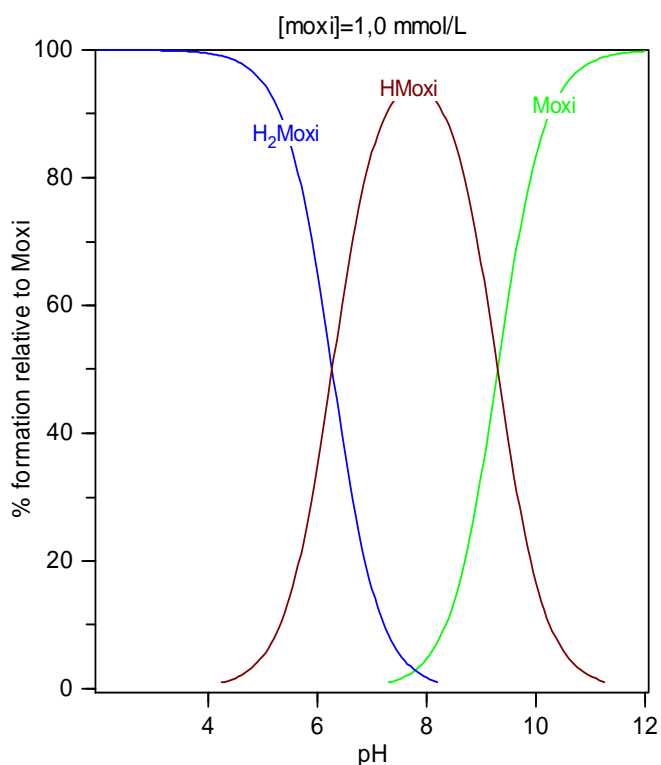
На нижим рН вредностима офлоксацин је протонован на азоту и карбоксилатном анјону. На слици 75 се може видети да се он у раствору налази у катјонском облику који преовлађује на нижим рН вредностима, при рН око 7 највећа је концентрација диполарног јона а на рН већим од 9.5 преовлађује његов анјонски облик. Према томе у реакцијама комплексирања треба ове честице посматрати као лиганде. При повећању рН долази до депротоновања офлоксацина.

UV VIS спектар офлоксацина зависи од рН и састоји се од две апсорпционе траке, при чему је на нижим рН вредностима апсорбанција већа, док у области таласних дужина изнад 360 nm апсорбанција нагло опада.

На слици 59 (страна 118) у експерименталном делу докторске дисертације приказани су спектри офлоксацина на различитим вредностима рН где је уочљива асиметрична нискоенергетска трака на око 330 nm, која потиче од апсорпције пиперизинског супституента и  $\pi$ -електрона карбонила и пиридинског прстена. Симетрична високоенергетска трака на око 270 nm, карактеристична за све хинолоне друге генерације која потиче од делокализованог  $\pi$ -електронског система хинолонског језгра није уочљива, јер је снимање спектра вршено у области спектра од 300-400 nm. Обе траке (карактеристична симетрична високоенергетска и асиметрична нискоенергетска) су резултат  $\pi \rightarrow \pi$  и  $n \rightarrow \pi$  прелаза унутар хинолонског језгра офлоксацина.

## 5.2. Протоновање моксифлоксацин анјона

Константе протоновања анјона моксифлоксацина одређене су потенциометријским титрацијама и спектрофотометријски у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини, на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Резултати добијени обрачуном експерименталних података потенциометријских титрација приказани су у табели 28 (страна 119). Израчунате вредности константи протоновања у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини износе  $\log \beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд):  $\text{Hmoxi}$ ,  $\log \beta_{1,1} = 9.30 \pm 0.020$ ;  $\text{H}_2\text{moxi}^+$ ,  $\log \beta_{2,1} = 15.57 \pm 0.050$ . Слагање између потенциометријски и спектрофотометријски добијених вредности је боље од 1%, и налази се у опсегу претходно публикованих вредности. Дистрибуциони дијаграм моксифлоксацина концентрације  $1.0 \text{ mmol/dm}^3$  у области рН вредности од 3-12 приказан је на слици 76.



Слика 76. Дистрибуциони дијаграм моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$



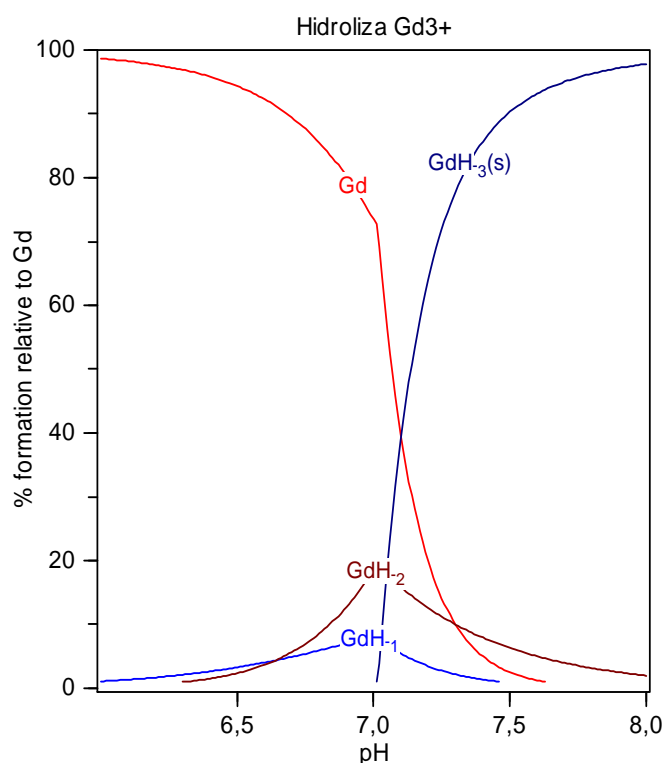
У воденим растворима моксифлоксацин се понаша као амфотермна аминокиселина са изоелектричном тачком  $pI=7.44$ . На основу дистрибуционог дијаграма, може се закључити да моксифлоксацин постоји у катјонском облику при рН нижим од 8 и у анјонском при рН вишим од 8. При рН око 7.5 највећа је концентрација диполарног јона. У реакцијама комплексирања ове честице треба посматрати као лиганде. На рН 7.4 доминантни облик моксифлоксацина је диполарни јон ( $H_2moxi^{\pm}$ ), док је катјонски облик ( $H_2moxi^+$ ) мање заступљен, па му је концентрација практично занемарљива.

На слици 61 (страница 119) у експерименталном делу докторске дисертације приказани су спектри моксифлоксацина на различитим вредностима рН где су уочљива два апсорпциона максимума, оштар, симетричан, високоенергетски и добро дефинисан на 290 nm, и широк, нижеенергетски, мањег интензитета на 320 nm. Приликом промене рН долази до мањег батохромног померања високоенергетске траке. Нискоенергетска трака мења свој облик и интензитет приликом промене рН.

Са повећањем рН вредности до рН 7 интензитет ове траке расте и истовремено долази до појаве још једног слабо раздвојеног апсорпционог максимума на око 330 nm. Са даљим порастом рН вредности, интензитет траке опада и она поприма више симетричан изглед. Раствори моксифлоксацина су обојени слабо жутом бојом, па приликом пораста рН вредности интензитет ове боје јача, па се може закључити да боја потиче од ниско енергетске апсорпције. Обе траке (карактеристична симетрична високоенергетска и асиметрична нискоенергетска) су резултат  $\pi \rightarrow \pi$  и  $n \rightarrow \pi$  прелаза унутар хинолонског језгра моксифлоксацина.

### 5.3. Хидролиза $Gd^{3+}$ -јона

Константе хидролитичких комплекса  $Gd^{3+}$ -јона одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини, при чему су концентрације раствора  $Gd^{3+}$ -јона на  $(298.0 \pm 0.5)K$  износиле од 1.0-5.0 (0.99; 2.53; и 4.95)  $\text{mmol/dm}^3$ .

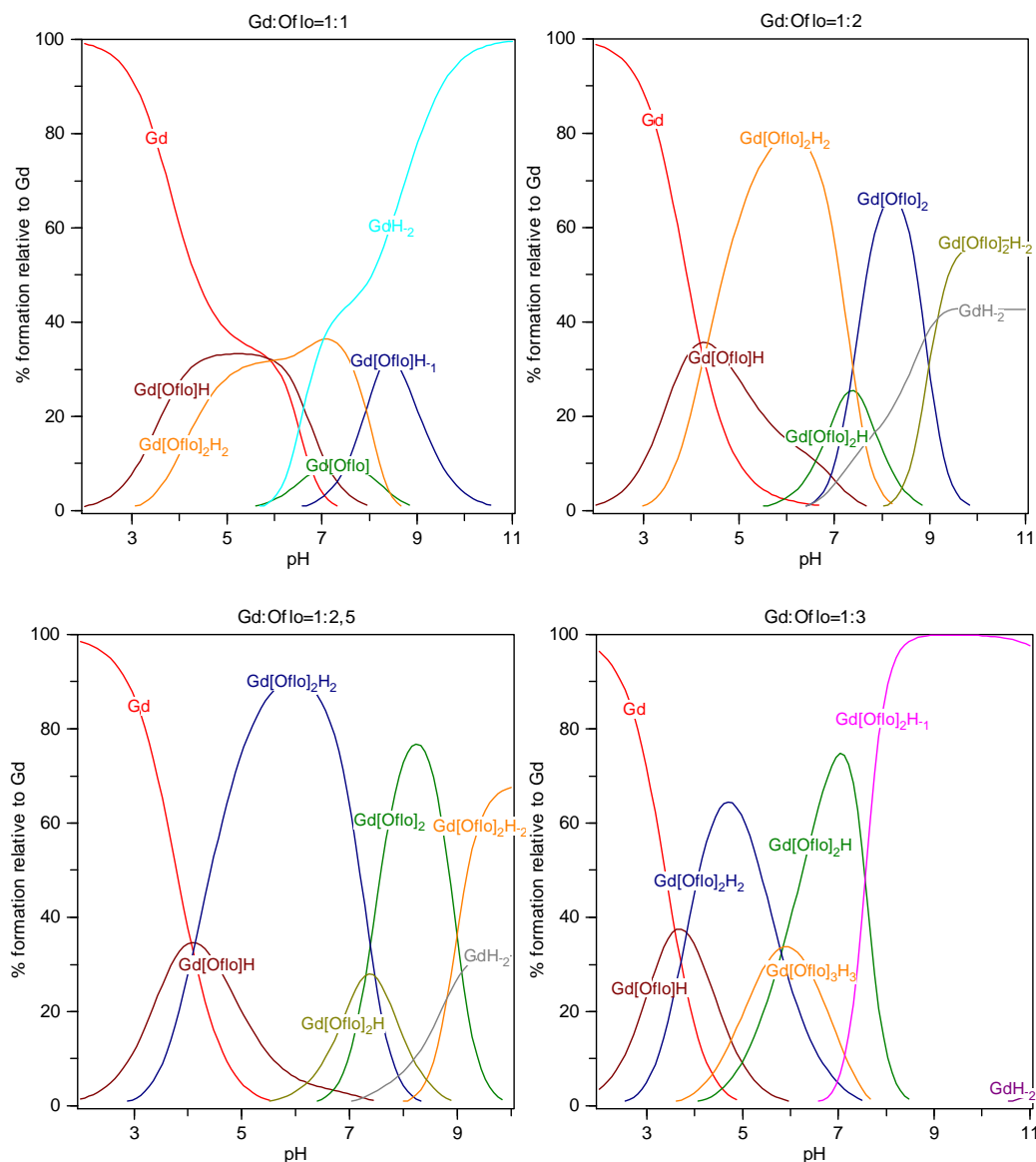


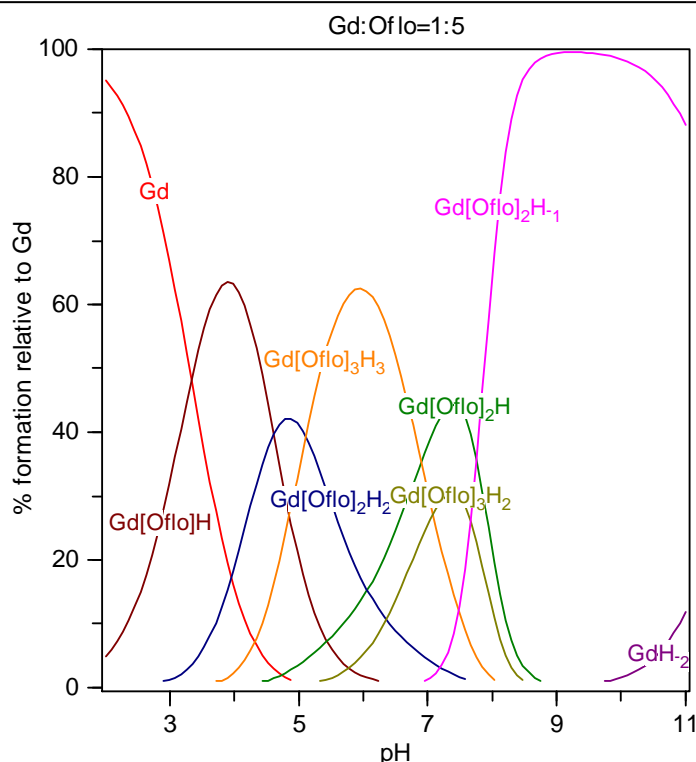
Слика 77. Дистрибуциони дијаграм хидролитичких комплекса  $Gd^{3+}$ -јона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$

Хидролиза  $Gd^{3+}$ -јона проучавана је и ESI MS при условима концентрација  $Gd^{3+}$  јона и pH вредностима приказаних у табели 34 (страна 128) експерименталног рада. Обе методе су потврдиле постојање идентичних хидролитичких комплекса чије су константе стабилности приказане у табели 42 (страна 137). Расподела хидролитичких врста приказана је на слици 77 (страна 145). Као што се са слике може видети  $Gd^{3+}$ -јон хидролизује у опсегу pH вредности од 6-8. На pH вредности око 7 доминантан хидролитички комплекс је  $Gd(OH)_2$ , док је на нешто нижој вредности доминантан комплекс  $GdOH$ . На pH вредностима већим од 7 почиње таложење при чему се хидролитички комплекс  $Gd(OH)_3$  јавља у облику талоба.

#### 5.4. Комплекси $Gd^{3+}$ -офлоксацин система

Константе стабилности комплекса  $Gd^{3+}$ -офлоксацин система одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaCl средини, на  $(298.0 \pm 0.5)K$ , при чему је однос концентрација  $Gd^{3+}$ :офлоксацин био 1:1; 1:2; 1:2,5; 1:3 и 1:5. Концентрација  $Gd^{3+}$ -јона у испитиваним растворима приказане су у табели 31 (страна 122) експерименталног дела рада. Резултати добијени обрачуном експерименталних података потенциометријских титрација приказани су у табелама 45 (страна 139) и 48 (страна 141). Из табела је уочљиво формирање искључиво мононуклеарних врста.





**Слика 78.** Дистрибуциони дијаграми комплекса  $Gd^{3+}$ -јона и офлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $NaCl$  средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$  при различитим концентрационим односима

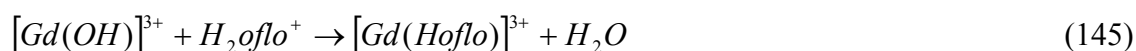
На основу вредности константи стабилности комплекса  $Gd^{3+}$  јона и офлоксацина приказаним у табелама 45 (страница 139) и 48 (страница 141) израчунати су дистрибуциони дијаграми система  $Gd^{3+}$ -офлоксацин за различите концентрационе односе  $Gd^{3+}/oflo$  (слика 78).

Анализом израчунатих комплекса, може се закључити да су комплекси  $[GdHoflo]^{3+}$  и  $[Gd(Hoflo)_2]^{3+}$  идентификовани при свим концентрационим односима метал-лиганд. Комплекс  $[GdHoflo]^{3+}$  настаје у области рН од 2-8 са максималном концентрацијом на рН око 5. Комплекс  $[Gd(Hoflo)_2]^{3+}$  се јавља у области рН од 2-9 са максималном концентрацијом на рН око 7.

При концентрационом односу 1:1 идентификовани су комплекси  $[Gdoflo]^{2+}$  у области рН од 5-9, са максималном концентрацијом на рН 7.5 и комплекс  $[Gd(OH)oflo]^+$  у области рН од 6-11, са максималном концентрацијом на рН 8.5.

При концентрационим односима 1:2 и 1:2.5 идентификовани су и комплекси  $[Gd(Hoflo)oflo]^{2+}$ ,  $[Gd(oflo)_2]^+$  и  $Gd(OH)_2(oflo)_2$ . Комплекс  $[Gd(Hoflo)oflo]^{2+}$  настаје у области рН од 4-10 са максималном концентрацијом на рН 7.5, комплекс  $[Gd(oflo)_2]^+$  настаје у области рН од 6-11, са максималном концентрацијом на рН 8.0 и комплекс  $Gd(OH)_2(oflo)_2$  настаје у области рН већој од 6, са максималном концентрацијом на рН око 11. При концентрационим односима 1:3 и 1:5 идентификовани су и комплекси  $Gd(OH)(oflo)_2$ ,  $[Gd(Hoflo)_3]^{3+}$  и  $[Gd(Hoflo)_2oflo]^{2+}$ . Комплекс  $Gd(OH)(oflo)_2$  идентификован је у области рН од 6-12, са максималном концентрацијом на рН око 9, комплекс  $[Gd(Hoflo)_3]^{3+}$  идентификован је у области рН од 3-9, са максималном концентрацијом на рН 6 и комплекс  $[Gd(Hoflo)_2oflo]^{2+}$  идентификован је у области рН од 4-9, са максималном концентрацијом на рН 7.5.

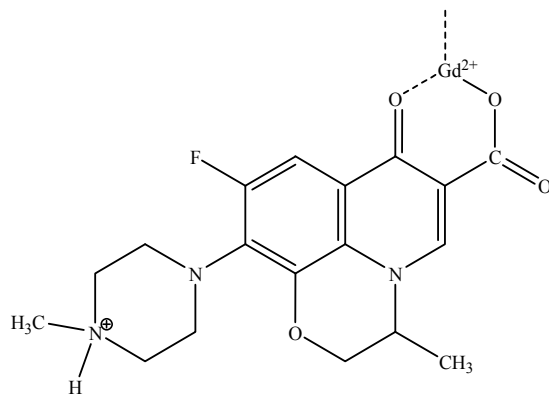
Комплекс (1,1,1) највероватније настаје реакцијом хидролитичких комплекса са катјонским обликом офлоксацина који егзистира на нижим рН вредностима, и може се представити реакцијом:



Формирање овог комплекса је могуће и по другом механизму, по којем комплекс (1,1,1) настаје реакцијом јона  $Gd^{3+}_{(aq)}$  који настаје дисоцијацијом  $GdCl^{3+}$ , са катјонским обликом офлоксацина по реакцији:

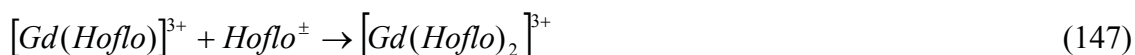


Могућа структура овог комплекса приказана је на слици 79:

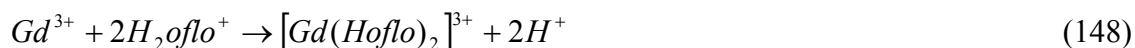


Слика 79. Могућа структура комплекса  $[Gd(Hoflo)]^{3+}$  у раствору

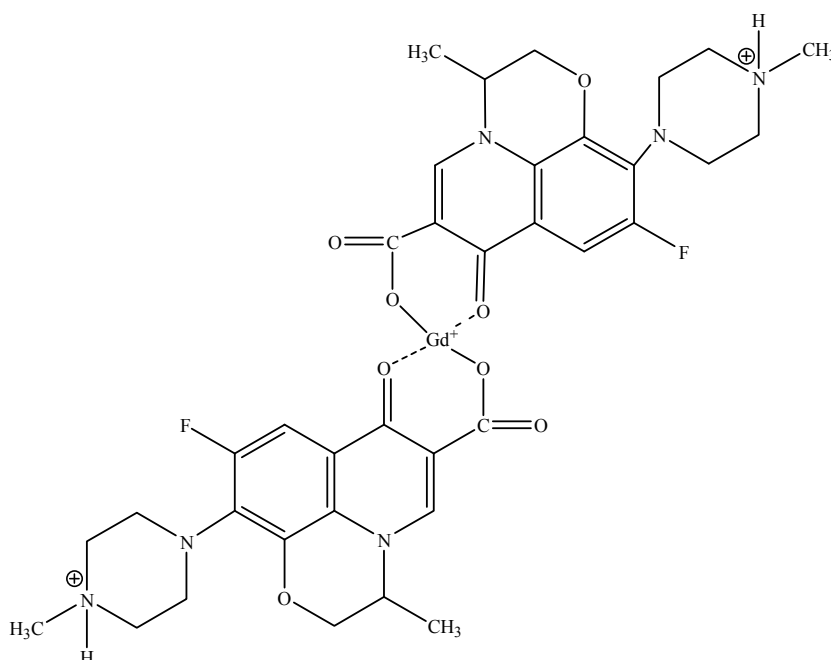
Са повећањем вредности рН, комплекс  $[Gd(Hoflo)]^{3+}$  везује “zwitter” јон офлоксацина дајући комплекс (1,2,2) највероватнијом реакцијом:



Формирање овог комплекса могуће је и по другом механизму по реакцији:



Могућа структура овог комплекса би била:

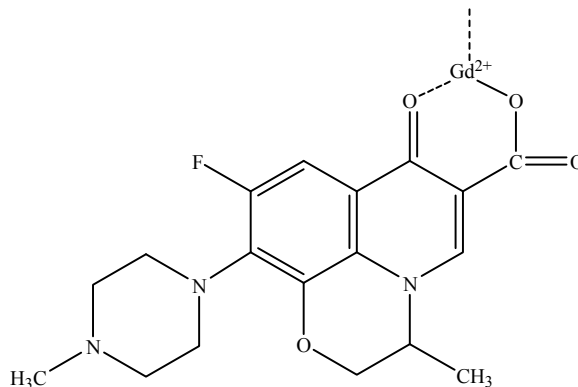


Слика 80. Могућа структура комплекса  $[Gd(Hoflo)_2]^{3+}$  у раствору

Комплекс (1,0,1) може настати реакцијом:

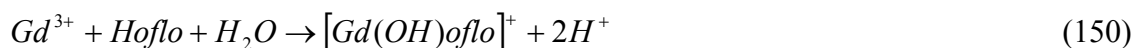


Могућа структура овог комплекса би била:

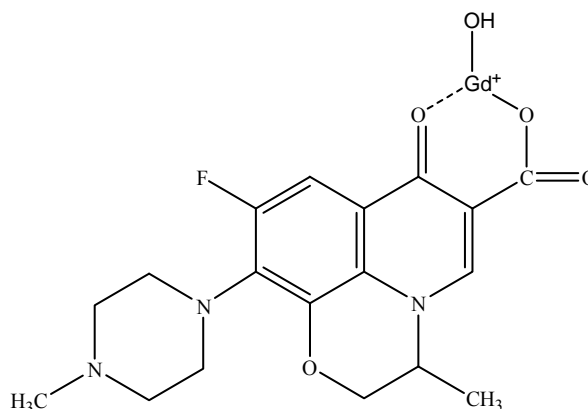


Слика 81. Могућа структура комплекса  $[Gdoflo]^{2+}$  у раствору

Комплекс (1,-1,1) може настати реакцијом:



Могућа структура овог комплекса би била:

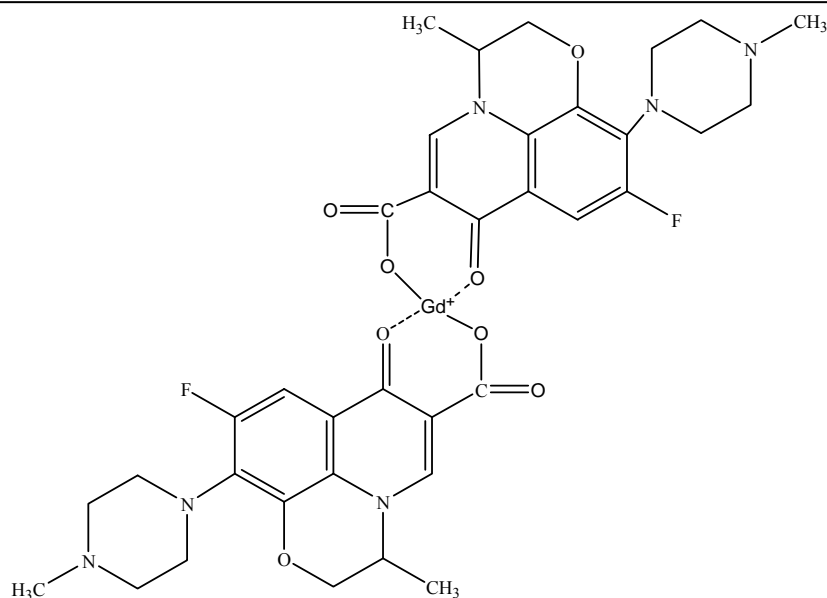


Слика 82. Могућа структура комплекса  $[Gd(OH)oflo]^+$  у раствору

Комплекс (1,0,2) може настати реакцијом:

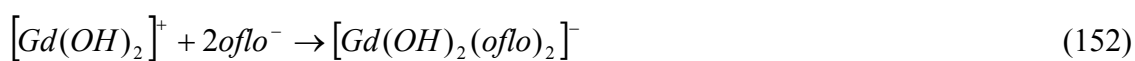


Могућа структура овог комплекса би била:

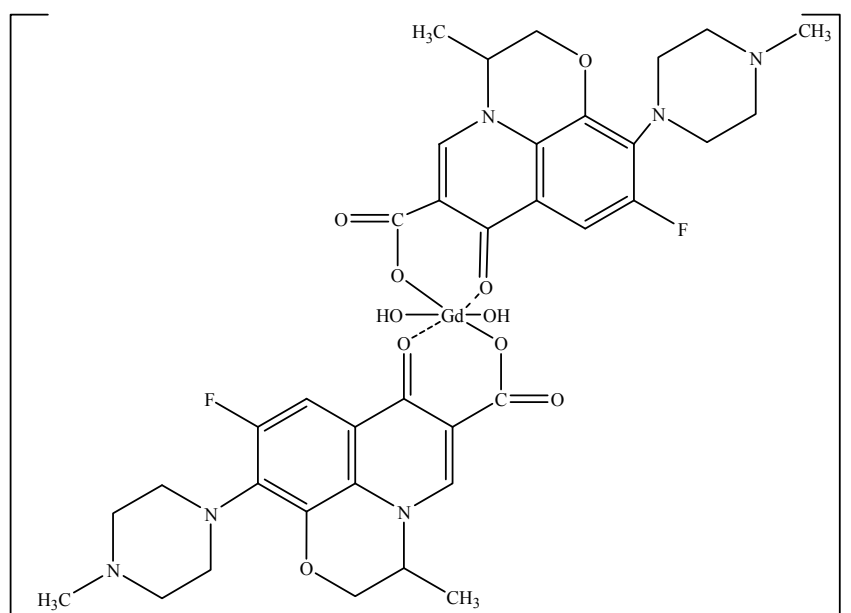


Слика 83. Могућа структура комплекса  $[Gd(oflo)_2]^+$  у раствору

Комплекс (1,-2,2) може настати реакцијом:

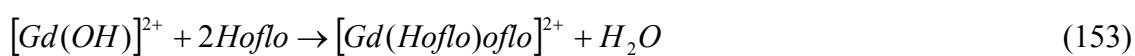


Могућа структура овог комплекса би била:

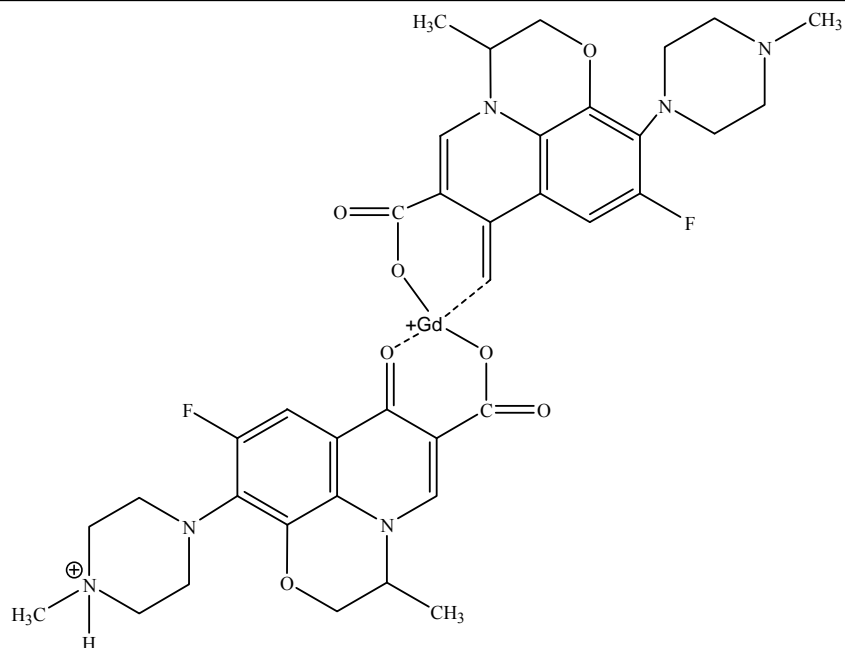


Слика 84. Могућа структура комплекса  $[Gd(OH)_2(oflo)_2]^-$  у раствору

Комплекс (1,1,2) може настати реакцијом:



Могућа структура овог комплекса би била:

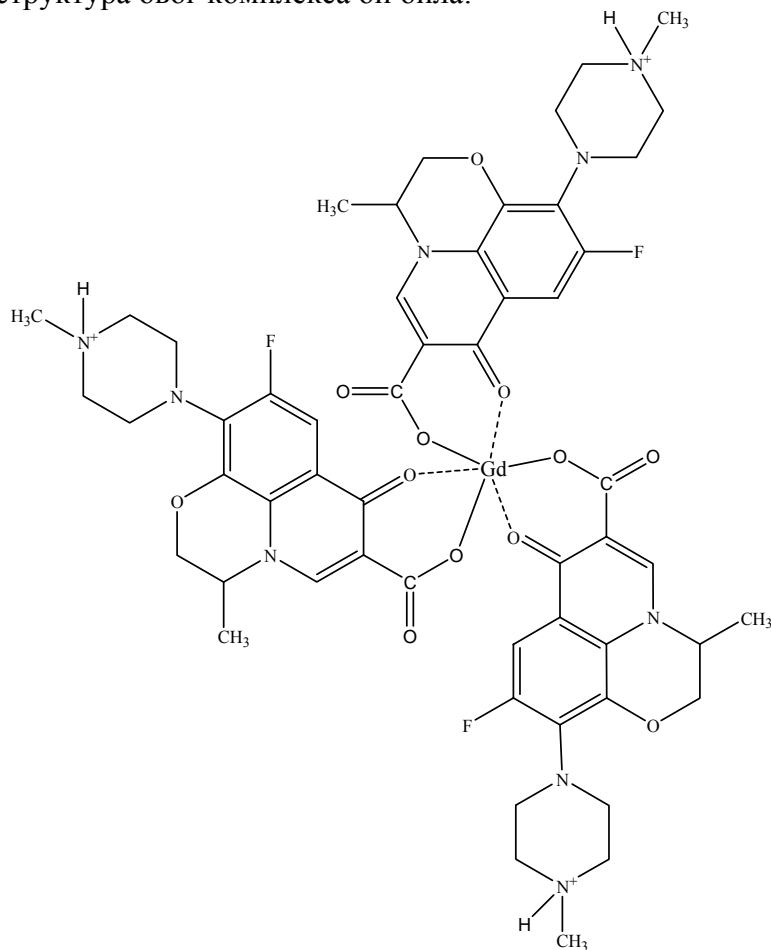


Слика 85. Могућа структура комплекса  $[Gd(Hoflo)oflo]^{2+}$  у раствору

Комплекс (1,3,3) може настати реакцијом:

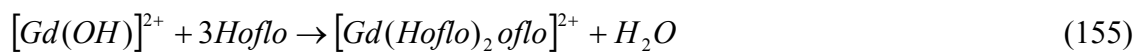


Могућа структура овог комплекса би била:

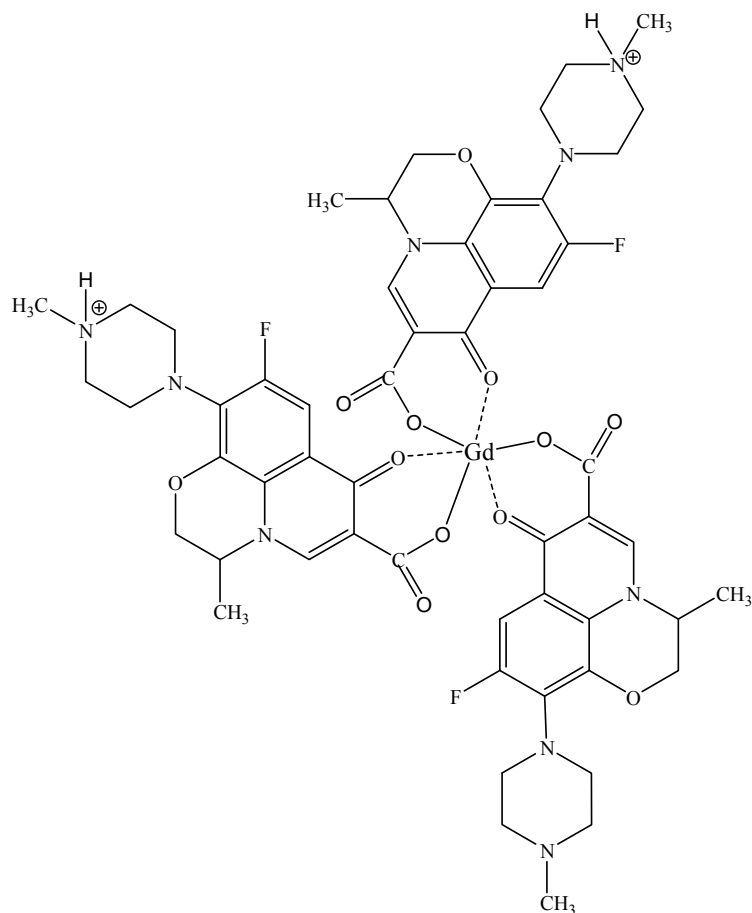


Слика 86. Могућа структура комплекса  $[Gd(Hoflo)_3]^{3+}$  у раствору

Комплекс (1,2,3) може настати реакцијом:



Могућа структура овог комплекса би била:



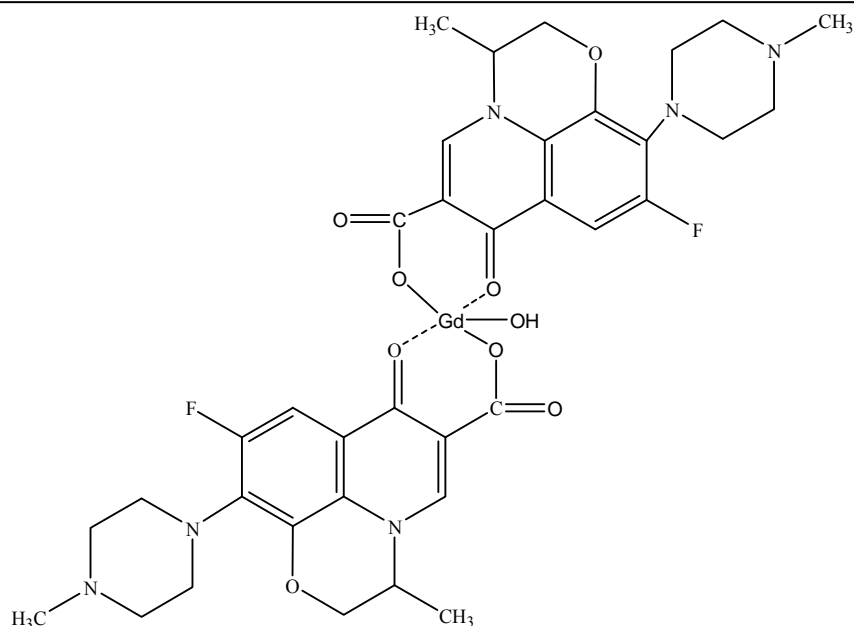
Слика 87. Могућа структура комплекса  $[Gd(Hoflo)_2 oflo]^{2+}$  у раствору

Комплекс (1,-1,2) може настати реакцијом:



Могућа структура овог комплекса би била:

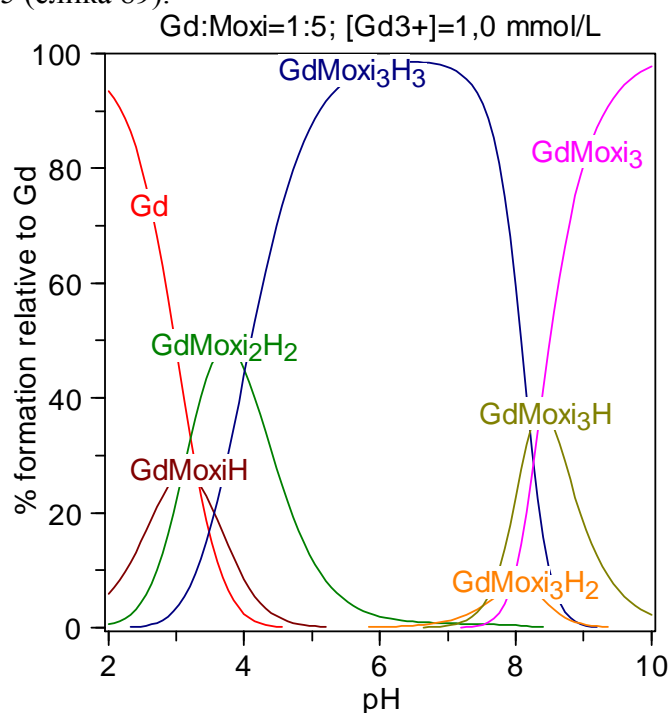




Слика 88. Могућа структура комплекса  $[GdOH(oflo)_2]$  у раствору

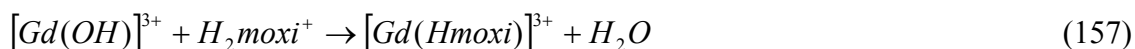
### 5.5. Комплекси $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин система

Константе стабилности комплекса система  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$ , при чему је однос концентрација  $Gd^{3+}$ :моксифлоксацин био 1:1; 1:2; 1:3 и 1:5. Концентрација  $Gd^{3+}$ -јона у испитиваним растворима приказане су у табели 32 (страна 124). Резултати добијени обрачуном експерименталних података потенциометријских титрација, приказани су у табелама 46, 47 и 48 (странице 140 и 141). Из табела је уочљиво формирање искључиво мононуклеарних комплекса. На основу вредности константи стабилности комплекса  $Gd^{3+}$  јона и моксифлоксацина приказаним у табели 48 (страна 141) израчунат је дистрибуциони дијаграми  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин за концентрациони однос  $Gd^{3+}/moxi=1:5$  (слика 89).



Слика 89. Дистрибуциони дијаграми комплекса  $Gd^{3+}$ -јона и моксифлоксацина у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  LiCl средини на  $(298.0 \pm 0.5)K$  за концентрациони однос 1:5

На слици 89 (страница 153) се може уочити да је доминантан комплекс на нижим рН вредностима  $[Gd(Hmoxi)]^{3+}$ , са максималном концентрацијом на рН=4. Овај комплекс се може формирати преко реакције  $Gd^{3+}$ -аква јона и моксифлоксацина у катјонском облику имајући у виду доминантност катјонског облика у области рН од 2-5 по реакцији:

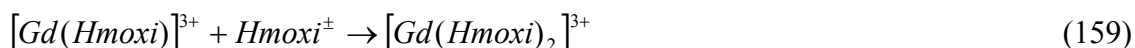


Овај комплекс може настати и и по другом мање вероватном механизму, реакцијом:



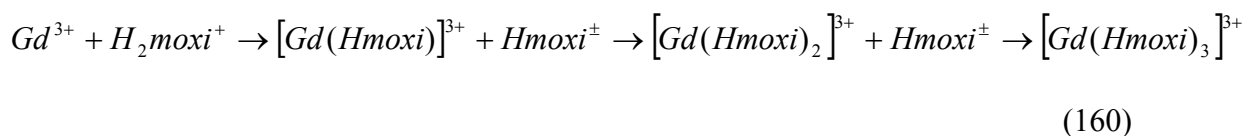
при чему треба имати у виду да карбоксилни протон учествује у везивању водоника интермолекуларно са 4-карбонилним кисеоником и интрамолекуларно са моксифлоксацином и молекулама растварача.

Комплекс  $[Gd(Hmoxi)]^{3+}$  повећањем вредности рН везује "zwitter" јон моксифлоксацина дајући комплекс  $[Gd(Hmoxi)_2]^{3+}$  највероватнијом реакцијом:



Овај комплекс са порастом рН ослобађа протоне дајући мешовити комплекс  $[Gd(Hmoxi)moxi]^{2+}$  са максимумом од 10% на рН 8.

Са слике 89 (страница 152) се може уочити да повећањем рН вредности од киселе до слабо базне средине, формирање комплекса  $[GdHmoxi]^{3+}$ ,  $[Gd(Hmoxi)_2]^{3+}$ ,  $[Gd(Hmoxi)_3]^{3+}$  се врши консекутивним реакцијама:

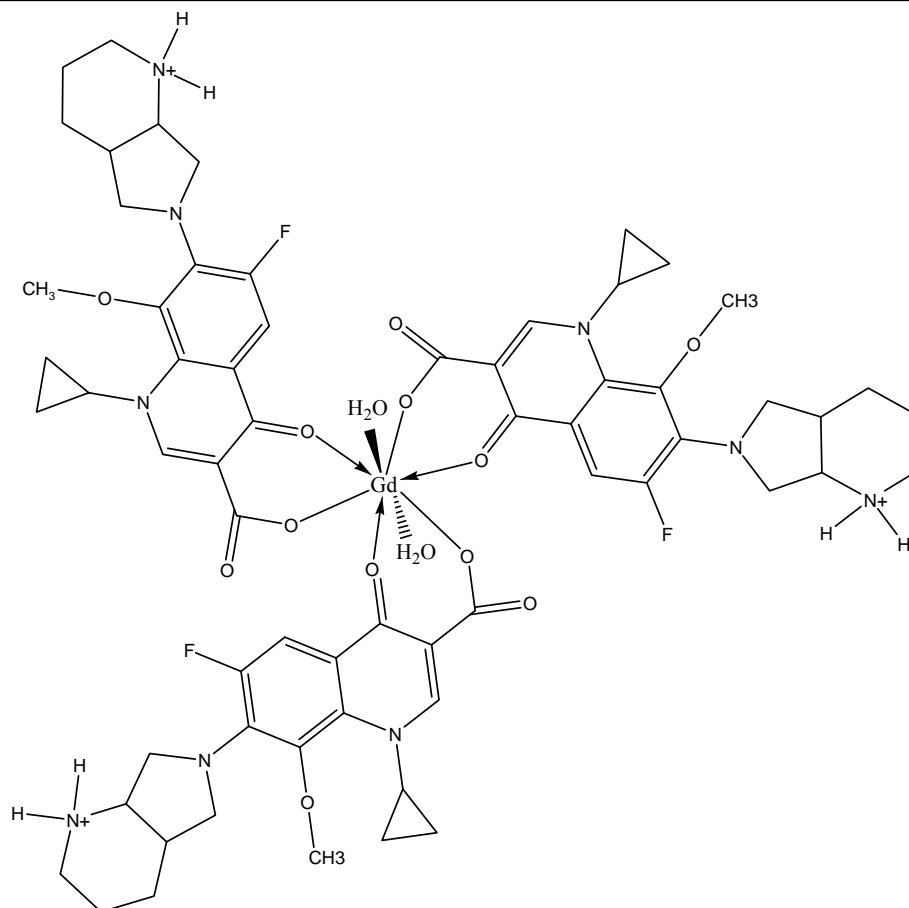


На рН вредностима већим од 7 протонисани лиганди моксифлоксацина у комплексу  $[Gd(Hmoxi)_3]^{3+}$  ослобађају протоне дајући неутрални комплекс  $Gd(Hmoxi)_3$ . Формирање комплекса  $Gd(Hmoxi)_3$  почиње на рН 8 и порастом рН, концентрација овог комплекса расте.

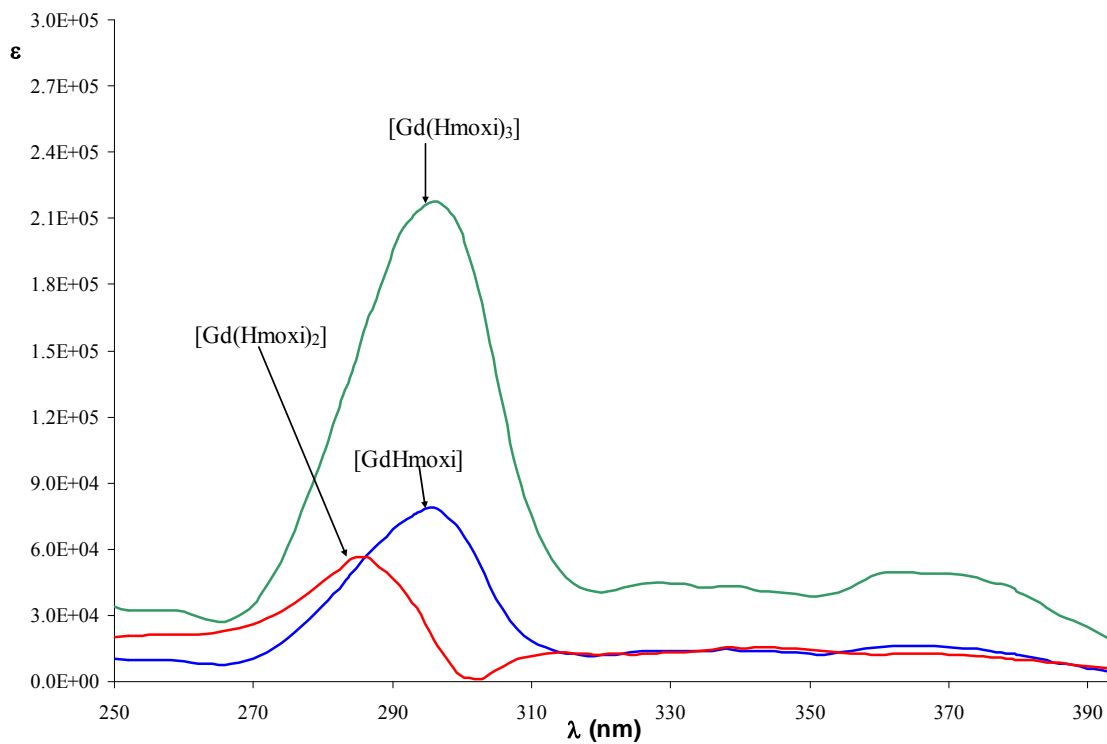
У  $[Gd(Hmoxi)_3]^{3+}$  комплексу моксифлоксацин делује као бидендатни О,О-лиганд са могућим формирањем шесточланим прстеном са 4-кето и 3-карбоксилним кисеоником.  $Gd^{3+}$ -јон показује карактеристике координационих бројева 6, 8 и 9, а са већином лиганата поседује координациони број 8.

Имајући у виду да није пронађено формирање комплекса L/M=4:1, може се претпоставити да су додатна два места у координационој сфери  $Gd^{3+}$ -јона попуњена са молекулама воде. Слични резултат је пронађен и у радовима Турела (*Turel*) и сарадника који су проучавали флуоросцентне особине и структуру  $Eu^{3+}$ -*cipro* комплекса. Они су пронашли да је два бидендатни О,О- *cipro* молекули и четири аква лиганди су координисани са метал. Један *cipro* анјонски док су остали "zwitter"-јонски.<sup>123</sup> Сличне резултате за лантаноидне комплексе са *cipro* су пронашли Пин (*Pin*) и сарадници. Утврђено је да хинолони могу координисати јон метала у различитом стању протонисања (нпр. "zwitter"-јонском, неутралном, и анјонском).

Комплекс  $[Gd(Hmoxi)_3]^{3+}$  је веома стабилан у области рН од 5-8 и вероватно се формира и у хуманој крвној плазми при физиолошким условима.



Слика 90. Могућа структура  $[Gd(Hmoxi)_3]^{3+}$  комплекса у раствору



Слика 91. Израчунати спектри  $Gd$ - $hmoxi$  комплекса

Израчунати спектри у облику зависности моларне апсорптивности од таласне дужине за систем  $Gd$ - $hmoxi$  приказани су на слици 91. Са слике се може уочити да се

спектри  $GdHмоxi^{3+}$ ,  $Gd(Hмоxi)_2^{3+}$  и  $Gd(Hмоxi)_3^{3+}$  разликују од спектра  $Hмоxi$  најизразитије у региону  $n \rightarrow p^*$  прелаза и у опсегу таласних дужина од 330-370 nm. Вероватни разлог за то је кидање интра- и интер-молекулских водоничних веза због координације 4-кето и 3-карбоксилног кисеоника и гадолинијума.

### 5.6. Физиолошки модел хумане крвне плазме у компјутерском програму HySS

Физиолошки модел хумане крвне плазме конструисан је у компјутерском програму HySS.<sup>65</sup> Модел је укључио 8 јона метала и 40 лиганата (26 аминокиселина, 6 неорганских лиганата, 8 карбоксилних киселина) (табела 15, страна 70) из Мау-овог модела<sup>64</sup> конструисаног у компјутерском програму ECCLES, као и комплексе који су у међувремену идентификовани и публиковани. Наш модел је садржавао 5941 комплекса у односу на око 5000 комплекса колико је садржавао Мау-ов модел. Приликом израде физиолошког модела хумане крвне плазме у компјутерском програму HySS, укупне концентрације лиганата су преузете из Мау-овог модела, а почетне и крајње концентрације јона метала су критички анализирани из различитих литературних извора и укључиване у прорачун. Процент дистрибуције јона метала међу лигандима мале молекулске масе добијен у Мау-овом моделу, упоређен је са нашим резултатима физиолошког модела хумане крвне плазме конструисаног у компјутерском програму HySS ради сагледавања постигнуте корелације. Резултати су приказани у табели 51.

**Табела 51.** *Поређење резултата модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у HySS-у<sup>65</sup> и ECCLES-у<sup>64</sup>*

Компјутерски програм→		ECCLES (Мау-ов модел)			HySS (Ова дисертација)			
Комплекс ↓	Наелектрисање ↓	% дистрибуције јона метала међу лигандима мале молекулске масе у хуманој крвној плазми						
<b>Ca<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
HCO <sub>3</sub>	+1		9	9	9	9	9	9
Cit	-1		4	4	4	4	4	4
Lac	+1		3	3	3	1	1	1
PO <sub>4</sub>	-1		2	3	4	2	3	4
CO <sub>3</sub>	0		1	2	3	1	2	3
<b>Mg<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
HCO <sub>3</sub>	+1		5	6	6	7	7	7
Cit	-1		5	5	4	4	4	4
CO <sub>3</sub>	0		1	2	4	2	3	5
Lac	+1		2	2	2	2	2	2
HPO <sub>4</sub>	0		1	1	1	1	1	1
<b>Mn<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
HCO <sub>3</sub>	+1		24	24	24	23	23	23
Cit	-1		10	10	9	10	10	10
CO <sub>3</sub>	0		1	2	4	1	2	4
Oxa	0		2	2	2	2	2	2
HPO <sub>4</sub>	0		1	1	1	1	1	1
<b>Fe<sup>3+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
H <sub>1</sub> Cit	-1		99	99	99	99	99	99

CitSal	-2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
CitGlu	-2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
CitOxa	-2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
<b>Pb<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
Cys	0		76	80	82	75	78	80
CitCys	-3		6	7	7	8	9	10
HCis	+1		8	5	3	8	5	3
HCysPO <sub>4</sub>	-2		2	3	3	3	4	4
HCO <sub>3</sub>	+1		5	2	1	3	1	1
HCys <sub>2</sub>	-1		1	2	3	1	1	2
<b>Cu<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
CisHis	-1		16	21	28	17	24	31
HCisHis	0		20	17	14	17	15	13
His <sub>2</sub>	0		12	11	10	11	10	10
HisThr	0		9	8	7	6	6	5
HisVal	0		5	5	5	4	4	4
HHisLys	+1		5	5	4	5	4	4
HisAla	0		4	4	4	4	4	4
HisSer	0		4	4	4	6	6	6
HisPhe	0		3	3	3	2	2	2
HisGly	0		3	3	3	3	3	3
HisLeu	0		2	2	2	3	3	3
HisGlu	-1		2	2	2	1	1	1
HisGln	0		2	2	2	3	3	3
HHisOrn	+1		2	2	1	2	2	2
HisPro	0		2	1	1	2	1	1
HisIle	0		1	1	1	1	1	1
HisTrp	0		1	1	1	1	1	1
<b>Zn<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
CitCys	-3		50	43	33	46	40	30
Cys <sub>2</sub>	-2		9	19	33	10	19	32
CysHis	-1		9	12	14	8	11	12
Cys	0		4	3	2	3	2	2
His	+1		4	3	1	6	4	2
HCys <sub>2</sub>	-1		1	1	2	2	3	3
His <sub>2</sub>	0		2	1	1	2	2	1
CysGln	-1		<1	1	1	1	1	1
<b>Fe<sup>2+</sup></b>		pH→	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>	<b>7.2</b>	<b>7.4</b>	<b>7.6</b>
HCO <sub>3</sub>	+1					27	23	19
CO <sub>3</sub>	0					14	19	24
His	+1		Није разматрано			10	13	16
Cit	-1		у Мау-овом			8	7	6
Lac	+1		моделу хумане			2	1	1
Gln	+1		крвне плазме			2	2	2
H <sub>1</sub> Cit	-2					1	2	2
HPO <sub>4</sub>	0					1	1	1

Из резултата приказаних у табели 51 (страна 156), уочљиво је да су у оба модела идентификовани исти доминантни комплекси са највећим присутним концентрацијама у хуманој крвној плазми. Израчунавањем процената дистрибуције доминантних комплекса по јонима метала, може се уочити да су слагања између модела велика, са појединачним разликама који не прелазе 5%. Стога се наш модел конструисан у HySS-у може сматрати добрим, а постигнута корелација између модела коректна, те да представља добру основу за даље прорачуне и евентуалну надоградњу. Резултати постигнути прорачуном за јон  $\text{Fe}^{2+}$  нису упоређивани са Мау-овим моделом јер овај јон није ни био укључен у његовом моделу. Приказани су само проценти дистрибуције доминантних комплекса  $\text{Fe}^{2+}$  јона у хуманој крвној плазми.

На физиолошкој рН вредности хумане крвне плазме (рН 7.4) извршено је поређење резултата слободних концентрација лиганата добијених компјутерском симулацијом у Мау-овом моделу и нашег модела у HySS-у. Резултати поређења приказани су у табели 52.

**Табела 52.** *Поређење резултата слободних концентрација лиганата добијених компјутерском симулацијом на рН=7.4 у HySS-у и ECCLES-у*

Лиганд	ECCLES	HySS
	(Мау-ов модел)	(Ова дисертација)
free Ala	$2.87 \times 10^{-6}$	$3.63 \times 10^{-6}$
free Ambu	$3.38 \times 10^{-7}$	$1.40 \times 10^{-7}$
free Arg	$3.40 \times 10^{-6}$	$2.04 \times 10^{-10}$
free Asn	$2.69 \times 10^{-6}$	$4.31 \times 10^{-6}$
free Asp	$7.56 \times 10^{-8}$	$5.65 \times 10^{-8}$
free Citrl	$1.27 \times 10^{-6}$	$3.13 \times 10^{-7}$
free Cys	$5.94 \times 10^{-9}$	$9.34 \times 10^{-9}$
free Cis	$4.61 \times 10^{-7}$	$5.99 \times 10^{-7}$
free Gln	$1.84 \times 10^{-5}$	$2.45 \times 10^{-5}$
free Glu	$4.74 \times 10^{-7}$	$6.80 \times 10^{-7}$
free Gly	$2.47 \times 10^{-6}$	$3.34 \times 10^{-6}$
free His	$2.35 \times 10^{-6}$	$3.23 \times 10^{-6}$
free Hypo	$8.59 \times 10^{-8}$	$1.18 \times 10^{-7}$
free Ile	$6.95 \times 10^{-7}$	$9.16 \times 10^{-7}$
free Leu	$1.32 \times 10^{-6}$	$1.71 \times 10^{-6}$
free Lys	$4.88 \times 10^{-9}$	$7.64 \times 10^{-9}$
free Met	$8.56 \times 10^{-7}$	$1.12 \times 10^{-6}$
free Orn	$5.35 \times 10^{-9}$	$9.69 \times 10^{-9}$
free Phe	$1.97 \times 10^{-8}$	$2.65 \times 10^{-6}$
free Pro	$2.60 \times 10^{-7}$	$3.45 \times 10^{-7}$
free Ser	$4.20 \times 10^{-6}$	$5.49 \times 10^{-6}$
free Thr	$6.87 \times 10^{-6}$	$9.12 \times 10^{-6}$
free Trp	$1.97 \times 10^{-7}$	$2.37 \times 10^{-7}$
free Tyr	$3.49 \times 10^{-9}$	$2.04 \times 10^{-9}$
free Val	$2.66 \times 10^{-6}$	$3.75 \times 10^{-6}$
free Hsn	$1.92 \times 10^{-10}$	$2.63 \times 10^{-10}$
free CO <sub>3</sub>	$3.54 \times 10^{-5}$	$7.27 \times 10^{-5}$
free PO <sub>4</sub>	$3.40 \times 10^{-8}$	$2.80 \times 10^{-8}$
free Slc	$2.67 \times 10^{-10}$	$2.50 \times 10^{-12}$
free SO <sub>4</sub>	$2.04 \times 10^{-4}$	$2.01 \times 10^{-4}$
free (SCN)	$1.40 \times 10^{-5}$	$1.40 \times 10^{-5}$
free NH <sub>3</sub>	$6.55 \times 10^{-7}$	$3.27 \times 10^{-7}$
free Cit	$2.67 \times 10^{-5}$	$2.67 \times 10^{-5}$

free Lac	$1.76 \times 10^{-3}$	$1.79 \times 10^{-3}$
free Mal	$3.11 \times 10^{-5}$	$3.21 \times 10^{-5}$
free Oxa	$1.03 \times 10^{-5}$	$1.01 \times 10^{-5}$
free Pyr	$9.41 \times 10^{-5}$	$9.41 \times 10^{-5}$
free Sal	$1.20 \times 10^{-11}$	$1.25 \times 10^{-11}$
free Succ	$4.04 \times 10^{-5}$	$4.06 \times 10^{-5}$
free Asc	$5.36 \times 10^{-8}$	$4.82 \times 10^{-9}$

Резултати поређења такође указују на добру репродуктивност нашег модела хумане крвне плазме конструисаног у HySS-у, са очекиваним разликама и нижим вредностима слободних концентрација лиганата у нашем моделу (јер је модел садржао већи број комплекса), што је условило очекивано и логично ниже вредности слободних концентрација присутних и укључених лиганата.

При вредностима рН хумане крвне плазме 7.2, 7.4 и 7.6, извршено је поређење резултата укупне концентрације јона метала на основу компјутерске симулације Мау-овог и нашег модела. Резултати поређења приказани су у табели 53. Резултати поређења указују на добро слагање резултата и очекиване мање вредности у нашем моделу.

**Табела 53.** Поређење резултата укупне концентрације јона метала модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у HySS-у и ECCLES-у

Програм →	ECCLES (Мау-ов модел)			HySS (Ова дисертација)		
	7.2	7.4	7.6	7.2	7.4	7.6
Јон метала ↓	Концентрација јона метала [mol/dm <sup>3</sup> ]					
total Ca <sup>2+</sup>	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.46 \times 10^{-3}$	$1.51 \times 10^{-3}$	$1.45 \times 10^{-3}$	$1.45 \times 10^{-3}$	$1.45 \times 10^{-3}$
total Mg <sup>2+</sup>	$6.48 \times 10^{-4}$	$6.56 \times 10^{-4}$	$6.67 \times 10^{-4}$	$6.05 \times 10^{-4}$	$5.84 \times 10^{-4}$	$5.62 \times 10^{-4}$
total Mn <sup>2+</sup>	$1.79 \times 10^{-12}$	$1.83 \times 10^{-12}$	$1.89 \times 10^{-12}$	$1.48 \times 10^{-12}$	$1.36 \times 10^{-12}$	$1.24 \times 10^{-12}$
total Fe <sup>3+</sup>	$4.24 \times 10^{-13}$	$6.68 \times 10^{-13}$	$1.06 \times 10^{-12}$	$2.80 \times 10^{-13}$	$2.10 \times 10^{-13}$	$1.40 \times 10^{-13}$
total Cu <sup>2+</sup>	$6.04 \times 10^{-12}$	$1.57 \times 10^{-11}$	$4.14 \times 10^{-11}$	$3.98 \times 10^{-12}$	$2.99 \times 10^{-12}$	$1.99 \times 10^{-12}$
total Zn <sup>2+</sup>	$1.79 \times 10^{-12}$	$1.84 \times 10^{-7}$	$5.50 \times 10^{-7}$	$4.00 \times 10^{-6}$	$3.00 \times 10^{-6}$	$2.00 \times 10^{-6}$
total Pb <sup>2+</sup>	$2.67 \times 10^{-11}$	$5.88 \times 10^{-11}$	$1.30 \times 10^{-10}$	$1.78 \times 10^{-11}$	$1.34 \times 10^{-11}$	$8.91 \times 10^{-11}$
total Fe <sup>2+</sup>	Јон није био укључен у модел			$1.00 \times 10^{-11}$	$1.00 \times 10^{-11}$	$1.00 \times 10^{-11}$

На основу анализе резултата поређења у табелама 51 (страница 156), 52 (страница 158) и 53 може се закључити да је физиолошки модел хумане крвне плазме конструисан у компјутерском програму HySS, добар, коректан, репродуктиван и у доброј је корелацији са Мау-овим моделом.

Мале промене концентрација металних јона као и варирање броја комплекса и мање разлике у константама нису битније утицале на резултате прорачуна указујући на стабилност конструисаног компјутерског модела хумане крвне плазме. Очекиване разлике у резултатима су у границама прихватљивости, и оне су и унапред предвиђене због разлике у броју унетих комплекса у модел хумане крвне плазме, као и због појаве мањих разлика у кумулативним константама стабилности и минималним разликама вредностима почетних (*initial*) и крајњих (*final*) концентрација које су унете за јоне метала, приликом прорачуна у HySS-у.

### 5.7. Биодистрибуција Al<sup>3+</sup> јона у физиолошким условима

Уношењем комплекса алуминијума у компјутерски модел хумане крвне плазме (табела 37, страна 132) идентификовани су доминантни комплекси овог металног јона у

хуманој крвној плазми. Процент расподеле доминантних (непротеинских) комплекса алуминијума (без присуства трансферина) у хуманој крвној плазми приказан је у табели 54.

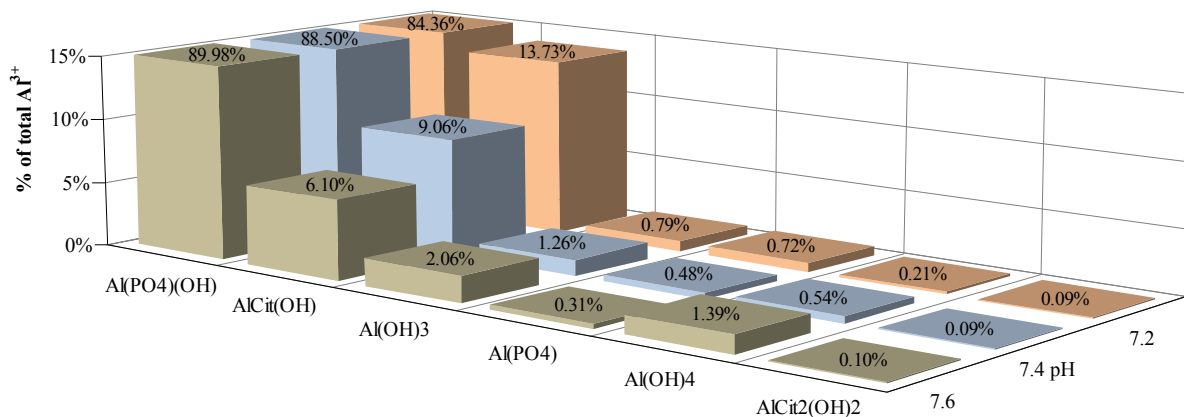
**Табела 54.** Доминантни комплекси  $Al^{3+}$  у хуманој крвној плазми израчунати програмом *HuSS* (без присуства трансферина)

Комплекс↓	pH→	% дистрибуције		
		7.2	7.4	7.6
$[Al(PO_4)(OH)]^-$		84.36	88.50	89.98
$[AlCit(OH)]^-$		13.73	9.06	6.10
$Al(OH)_3$		0.79	1.26	2.06
$AlPO_4$		0.72	0.48	0.31
$[Al(OH)_4]^-$		0.21	0.54	1.39
$[AlCit_2(OH)_2]^{5-}$		0.09	0.09	0.10

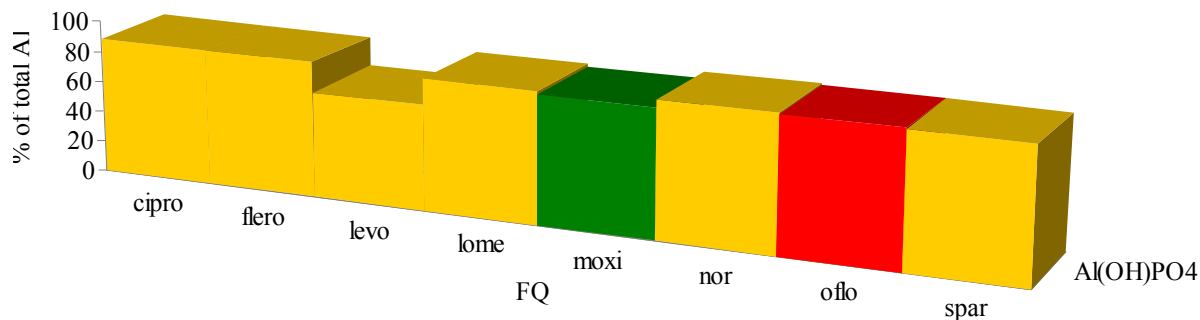
Графички приказ расподеле доминантних комплекса алуминијума у хуманој крвној плазми приказан је на слици 92. У даљем тексту, доминантни комплекси алуминијума биће приказивани без наелектрисања ради једноставности.

Из табеле 54 и слике 92 уочљиво је да су доминантни комплекси  $Al(PO_4)(OH)$  (процент расподеле 84.36-89.98%) и  $AlCit(OH)$  (процент расподеле 6.10-13.73%), док су комплекси  $Al(OH)_3$ ,  $Al(PO_4)$ ,  $Al(OH)_4$  и  $AlCit_2(OH)_2$  испод 2% присутни у хуманој крвној плазми.

Расподела доминантних комплекса алуминијума је анализирана и у присуству флуорохинолона (ципрофлоксацина, флероксацина, левофлоксацина, ломефлоксацина, коксифлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина и спарфлоксацина). Резултати расподела приказани су на сликама од 93-96 (страница 161).



**Слика 92.** Доминантни комплекси  $Al^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми

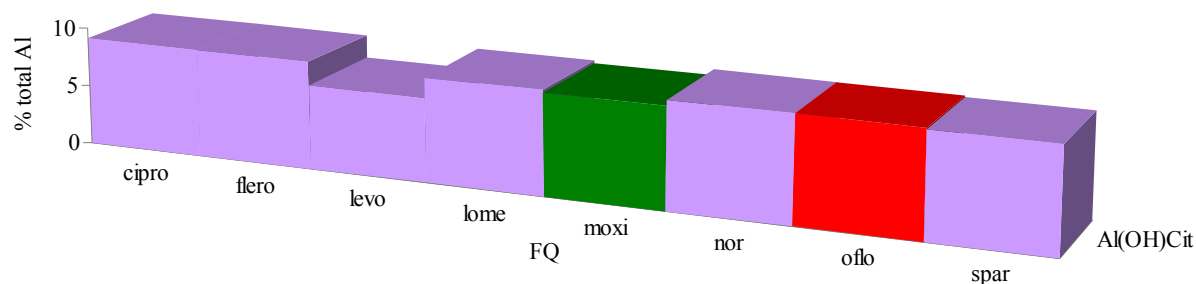


**Слика 93.** Расподела комплекса  $Al(OH)PO_4$  у присуству неких флуорохинолона

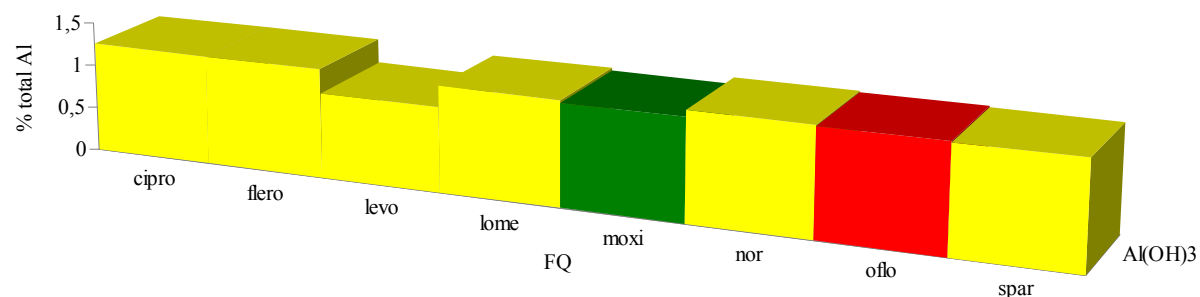


Комплекс  $Al(PO_4)(OH)$  приказује приближно идентичну расподелу у присуству ципрофлоксацина, флероксацина, ломефлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина и спарфлоксацина. У присуству левофлоксацина расподела овог комплекса је мања. Овај комплекс показује мању расподелу у присуству моксифлоксацина него у присуству офлоксацина (слика 93, страна 160).

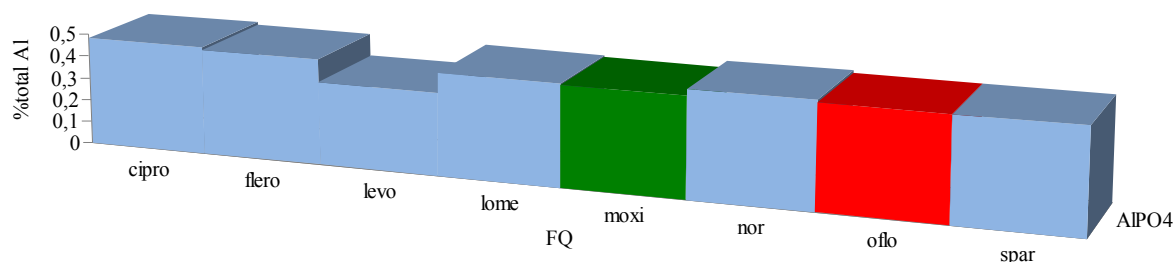
Комплекс  $AlCit(OH)$  је знатно мање доминантан у хуманој крвној плазми (ниже од 10%) па и у присуству неких флуорохинолона. У том смислу, у присуству неких флуорохинолона, његова дистрибуција је слична као и дистрибуција комплекса  $Al(PO_4)(OH)$ . Анализом ових графика се може закључити да је проценат доминанатних комплекса алуминијума нешто већи у присуству офлоксацина него у присуству моксифлоксацина.



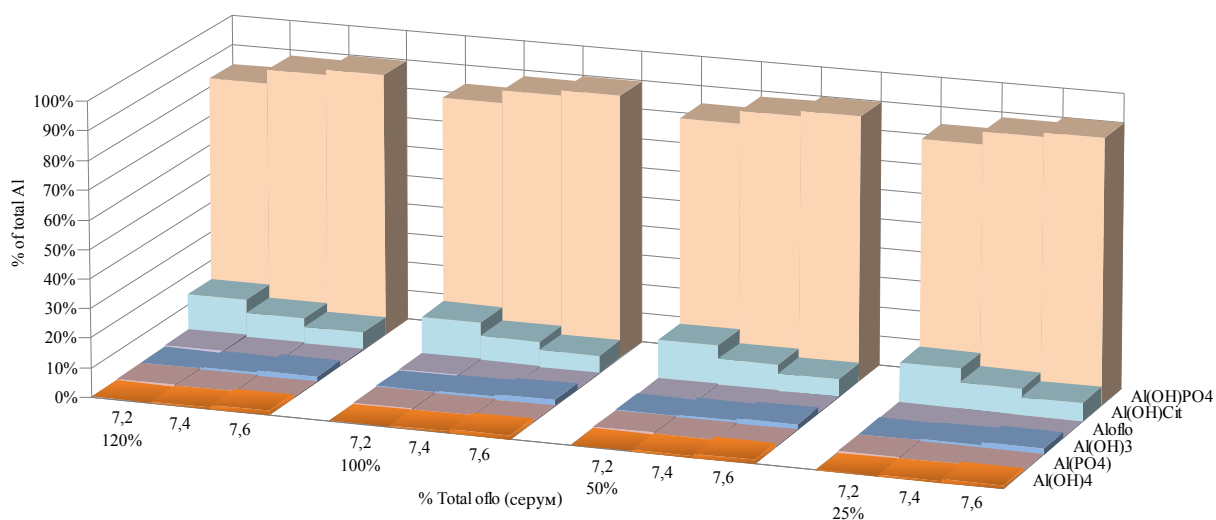
Слика 94. Расподела комплекса  $Al(OH)Cit$  у присуству неких флуорохинолона



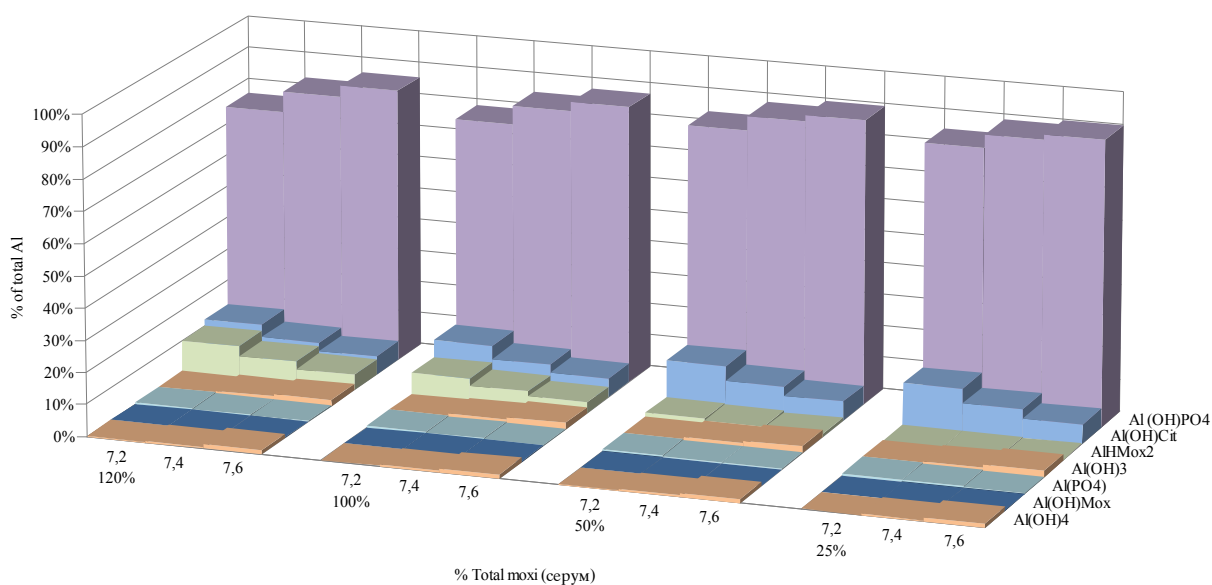
Слика 95. Расподела комплекса  $Al(OH)_3$  у присуству неких флуорохинолона



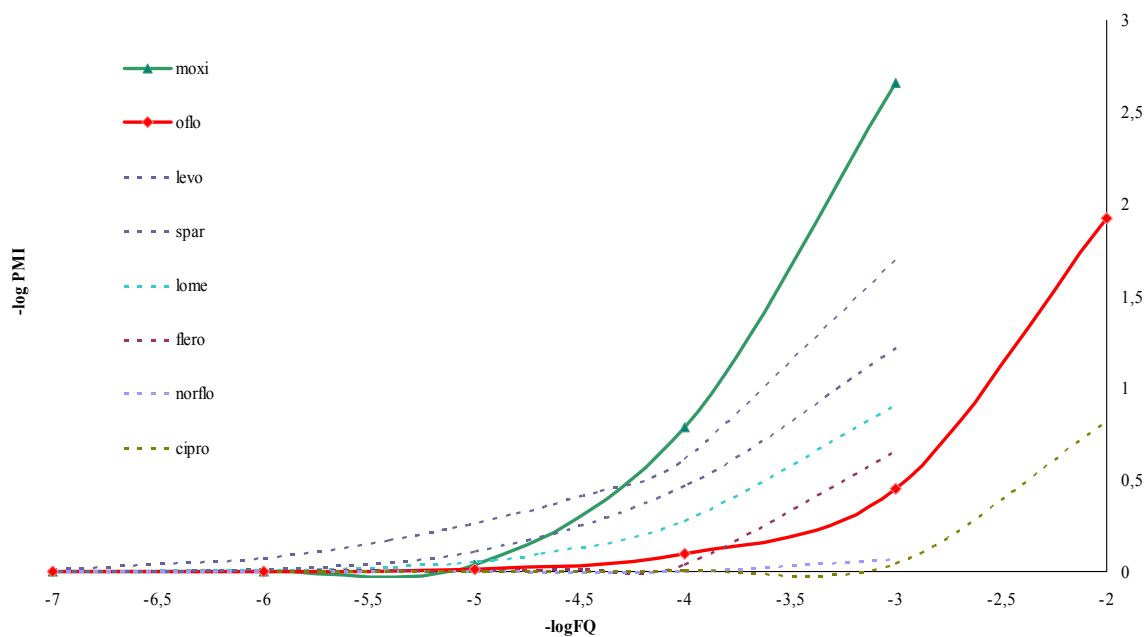
Слика 96. Расподела комплекса  $AlPO_4$  у присуству неких флуорохинолона



Слика 97. Расподела комплекса  $Al^{3+}$  у офлоксацину



Слика 98. Расподела комплекса  $Al^{3+}$  у моксифлоксацину



Слика 99. Криве PMI вредности система  $Al^{3+}$ -FQ

Овај закључак се може донети и анализом расподеле комплекса алуминијума у офлоксацину (слика 97, страна 162) и моксифлоксацину (слика 98, страна 162). Са слика је уочљива слаба веза између дозне зависности офлоксацина и моксифлоксацина у хуманом крвном серуму на расподелу комплекса алуминијума. Криве РМI вредности неких флуорохинолона приказане су на слици 99 (страна 162).

РМI криве система  $Al^{3+}$ -FQ указују да моксифлоксацин најзначајније мобилише  $Al^{3+}$ -јоне у хуманој крвној плазми у односу на друге FQ (oflo, levo, spar, lome, flego, norflo, cipro). Oflo израженије мобилише  $Al^{3+}$ -јоне у хуманој крвној плазми у односу на cipro и norflo а минорно у односу на levo, spar, lome и flego који су бољи мобилизатори  $Al^{3+}$ -јоне у хуманој крвној плазми.

Проучавањем доступних литературних података о равнотежним моделима за специјације алуминијума у хуманом крвном серуму, уочљиво је да је алуминијум од 81-89% везан у нормалном хуманом крвном серуму за протеин трансферин<sup>5,92</sup>. Преостали део од 11-19% стоји на располагању за формирање комплекса са осталим лигандима.

Резултати доминантних комплекса алуминијума у хуманој крвној плазми без присуства трансферина добијени прорачуном компјутерским програмом HySS, приказани у табели 55, указују на релативно добро слагање резултата са литературним моделима, по типу доминантних комплекса и проценту расподеле.

Резултати добијени нашим прорачунима воде општем закључку који је у блиском слагању са публикованим резултатима, да у хуманом крвном серуму не-протеински алуминијум везује фосфате, хидроксиде и цитрате као доминантне лиганде.

**Табела 55.** *Поређење дистрибуције алуминијума компјутерског модела хумане крвне плазме добијеним компјутерском симулацијом у HySS-у и ECCLES-у*

Програм→	ECCLES <sup>5,64</sup>	HySS на рН 7.4 (Ова дисертација)
Комплекс↓	% дистрибуције	
Al(PO <sub>4</sub> )(OH)	80	88.50
AlCit(OH)	10	9.06
Al(OH) <sub>3</sub>	4	1.26
AlPO <sub>4</sub>	3	0.48
Al(OH) <sub>4</sub>	2	0.54
AlCit <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	-	0.09

### 5.8. Биодистрибуција $Gd^{3+}$ јона у физиолошким условима

Уношењем комплекса гадолинијума у конструисани компјутерски модел хумане крвне плазме (табела 38, страна 133) идентификовани су доминантни комплекси јона гадолинијума у хуманој крвној плазми. Процент расподеле доминантних комплекса гадолинијума при минималној концентрацији гадолинијума<sup>69</sup> од  $1.2 \times 10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup> у хуманој крвној плазми на физиолошкој вредности рН приказан је у табели 56.

**Табела 56.** *Доминантни комплекси  $Gd^{3+}$  у серуму на рН 7.4 израчунати програмом HySS при минималној концентрацији  $Gd^{3+}$ -јона*

$[Gd^{3+}] = 1.2 \times 10^{-9}$ mol/dm <sup>3</sup>	
Комплекс↓	% дистрибуције
[GdAspCit] <sup>2-</sup>	29.39
[GdH <sub>2</sub> Cit] <sup>2-</sup>	20.14
[GdCitLac] <sup>-</sup>	11.93
[GdH <sub>2</sub> HisCit] <sup>+</sup>	10.47
[GdHSA] <sup>16-</sup>	7.88

[GdLeuCit] <sup>-</sup>	3.04
GdCit	2.78
GdH <sub>2</sub> GlnCit	2.42
[GdOxa] <sup>+</sup>	1.99
GdH <sub>2</sub> GlyCit	1.65
[GdGluCit] <sup>2-</sup>	1.20
GdH <sub>2</sub> AlaCit	1.16
GdH <sub>2</sub> ValCit	1.15
[GdH <sub>1</sub> Cit] <sup>-</sup>	0.96
[Gd(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	0.69
[GdHAspCit] <sup>-</sup>	0.58
[GdHGlnCit] <sup>-</sup>	0.51
[Gd(CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	0.48
[GdCit <sub>2</sub> ] <sup>3-</sup>	0.35
[GdCitr] <sup>2+</sup>	0.21
GdHGlyCit	0.17
GdHValCit	0.16
GdHAlaCit	0.15
GdH <sub>2</sub> ArgCit	0.13
[GdH <sub>3</sub> HisThr] <sup>4+</sup>	0.06
[GdLac] <sup>2+</sup>	0.06
[GdHGluCit] <sup>-</sup>	0.05
[GdHLeuCit] <sup>-</sup>	0.04
[GdHArgCit] <sup>-</sup>	0.03
[GdOxa <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	0.02
GdH <sub>3</sub>	0.02
[GdSer] <sup>2+</sup>	0.01
[GdMal] <sup>+</sup>	0.01
[GdAla] <sup>2+</sup>	0.01

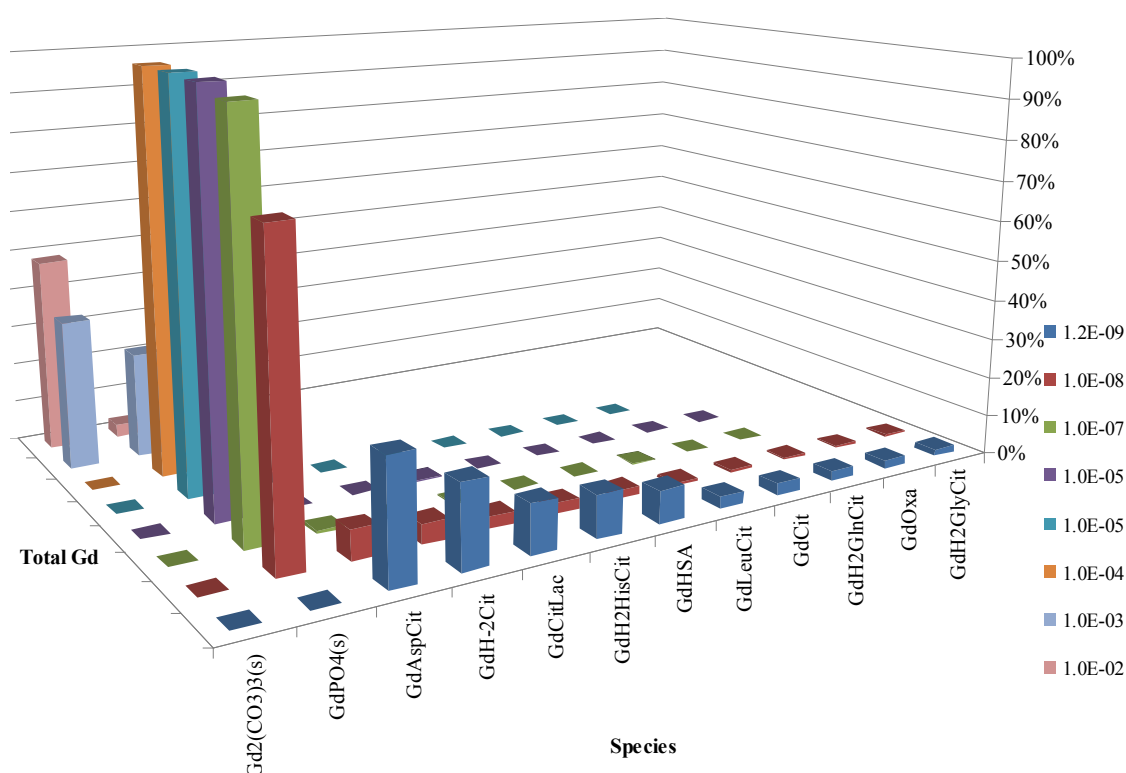
Повећањем концентрације гадолинијума дошло је до промене расподеле доминантних комплексних врста у смислу смањења процента дистрибуције растворних комплекса и фаворизовања формирања нерастворних (таложних) врста.

**Табела 57.** Доминантни комплекси  $Gd^{3+}$  у серуму на pH 7.4 израчунати програмом HySS при различитим концентрацијама  $Gd^{3+}$ -јона

[Gd <sup>3+</sup> ] [mol/dm <sup>3</sup> ] <sub>→</sub>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-3</sup>	5×10 <sup>-3</sup>	7×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>
Комплекс↓	% дистрибуције										
Gd <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (s)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	37.90	43.67	46.20	47.27	48.09
GdPO <sub>4</sub> (s)	0.00	75.67	97.57	99.76	99.98	100.00	31.00	12.64	7.59	5.42	3.80
[GdAspCit] <sup>2-</sup>	29.39	7.15	0.72	0.07	0.01						
[GdH <sub>2</sub> Cit] <sup>2-</sup>	20.14	4.90	0.49	0.05	0.01						
[GdCitLac] <sup>-</sup>	11.93	2.90	0.29	0.03	0.00						
[GdH <sub>2</sub> HisCit] <sup>+</sup>	10.47	2.55	0.25	0.03	0.00						
[GdHSA] <sup>16-</sup>	7.88	1.92	0.19	0.02	0.00						
[GdLeuCit] <sup>-</sup>	3.04	0.74	0.07	0.01	0.00						
GdCit	2.78	0.68	0.07	0.01	0.00						
GdH <sub>2</sub> GlnCit	2.42	0.59	0.06	0.01							
[GdOxa] <sup>+</sup>	1.99	0.48									
GdH <sub>2</sub> GlyCit	1.65	0.40									

$[\text{GdGluCit}]^{2-}$	1.20	0.29
$\text{GdH}_2\text{AlaCit}$	1.16	0.28
$\text{GdH}_2\text{ValCit}$	1.15	0.28
$[\text{GdH}_1\text{Cit}]^-$	0.96	0.23
$[\text{Gd}(\text{CO}_3)_2]^-$	0.69	0.17
$[\text{GdHAspCit}]^-$	0.58	0.14
$[\text{GdHGlnCit}]^-$	0.51	0.12

Доминантни комплекси  $\text{Gd}^{3+}$  у серуму на вредности рН 7.4 израчунати програмом HySS при различитим концентрацијама  $\text{Gd}^{3+}$ -јона приказани су у табели 57 (страница 164), а графички на слици 100. У даљем тексту, доминантни комплекси гадолинијума биће приказивани без наелектрисања ради једноставности.



**Слика 100.** Доминантни комплекси  $\text{Gd}^{3+}$  јона у крвној плазми на рН 7.4 при различитим концентрацијама  $\text{Gd}^{3+}$ -јона

Као што се са слике 100 и табеле 57 (страница 164) може уочити, на минималној вредности концентрације гадолинијума, сви формиранни комплекси гадолинијума су растворни, без појаве нерастворних врста.

Повећањем укупне концентрације гадолинијума формирају се нерастворне врсте.  $\text{GdPO}_4(\text{s})$  се појављује већ при концентрацији гадолинијума од  $10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  и даљим повећањем концентрације (до  $10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ ) постаје доминантна врста. При концентрацијама од  $10^{-7}$ - $10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  проценат  $\text{GdPO}_4(\text{s})$  достиже вредности од 97.57-100%. Истовремено, проценат растворних врста се смањује до минималних вредности. Даљим повећањем концентрације гадолинијума, (при вредностима већим од  $10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) појављује се још један нерастворни комплекс  $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3(\text{s})$ , који постепено постаје доминантна врста. Комплекси  $\text{GdPO}_4(\text{s})$  и  $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3(\text{s})$  остају као доминантне врсте у широком концентрационом опсегу укупних концентрација гадолинијума у хуманом крвном серуму, што је у сагласности са тежњом лантаноида да формирају нерастворне комплексе са фосфатима.

Анализирајући расподеле растворних комплекса гадолинијума, уочљиво је да су примарне растворне врсте гадолинијума у серуму, врсте које садрже HSA и Оха, као и тернарне комплексе цитрата као примарних лиганда. Међу њима проценат комплекса GdCitLac је 11.93% због релативно велике концентрације лактата ( $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ). Повећање концентрација гадолинијума у опсегу у којем су идентификовани растворни комплекси указује да се проценат растворних врста не мења у значајнијем обиму.

Литературни модели дистрибуције растворних и нерастворних комплекса гадолинијума (приказани без наелектрисања) при физиолошким условима pH, температуре и јонске јачине, израчунати компјутерским програмом MINTEQA2 приказани су у табелама 58 и 59.<sup>69</sup>

Табела 58. Дистрибуција комплекса  $Gd^{3+}$  јона (%)<sup>69</sup>

Комплекс↓	Укупна концентрација $Gd^{3+}$ јона [ $\text{mol/dm}^3$ ]						
	$1.203 \times 10^{-9}$	$1.4 \times 10^{-9}$	$2.61 \times 10^{-9}$	$1.0 \times 10^{-6}$	$6.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-3}$	$2.05 \times 10^{-2}$
GdPO <sub>4</sub> (s)	0	7.3	50.1	99.9	99.9	74.92	5.73
Gd <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (s)	0	0	0	0	0.1	25.08	94.16
Растворни	100	92.7	49.9	0.1	0	0	0.1

Табела 59. Дистрибуција растворних комплекса  $Gd^{3+}$  јона (%)<sup>69</sup>

Комплекс↓	Укупна концентрација $Gd^{3+}$ јона [ $\text{mol/dm}^3$ ]				
	$1.203 \times 10^{-9}$	$1.0 \times 10^{-7}$	$5.988 \times 10^{-4}$	$2.074 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-2}$
Free $Gd^{3+}$	5.4	5.4	5.5	6.5	2.6
Gd <sub>3</sub> (OH) <sub>4</sub>	<1	<1	<1	1	78.9
GdCitAlaH <sub>2</sub>	1.6	1.6	1.6	1.6	<1
GdCitGlyH <sub>2</sub>	2.2	2.2	2.2	2.1	<1
GdCitValH <sub>2</sub>	1.4	1.4	1.4	1.3	<1
GdCitGlnH <sub>2</sub>	3.1	3.1	3.1	3	<1
GdCitLac	10	10	9.9	9.5	1.7
GdCitGlu	1.1	1.1	1.1	1	<1
GdCitHisH <sub>2</sub>	1.6	1.6	1.6	1.5	<1
GdCitLeu	7.9	7.9	7.8	7.4	1.2
GdCitAsp	7.7	7.7	7.6	5.3	<1
GdLac	1.1	1.1	1.1	1.3	<1
GdOxa	18.2	18.2	18.3	14.9	1.2
GdHSA	29.6	29.6	29.8	33.6	8.5
GdOH	2.5	2.5	2.5	3	1.2

Према литературним изворима<sup>69</sup> при концентрацијама већим од  $10^{-2} \text{ mol/dm}^3$  појављује се и растворни комплекс Gd<sub>3</sub>(OH)<sub>4</sub> који постепено постаје доминантна врста, на рачун смањења процента комплекса GdHSA и GdOxa. Обзиром да при нашим прорачунима у компјутерском програму HySS, нисмо повећавали концентрације гадолинијума преко вредности од  $10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ , појава овог комплекса није идентификована.

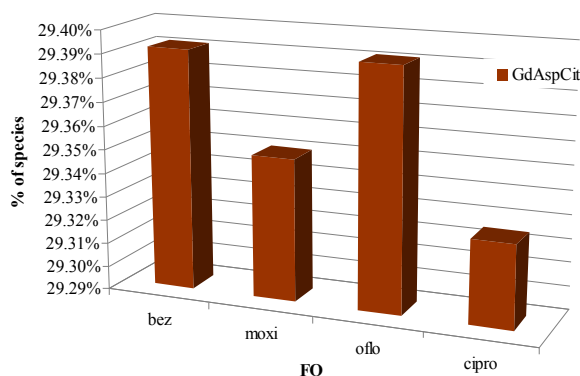
Упоређивањем литературних модела (табеле 58 и 59) и нашег модела (табеле 56 и 57, стране 163 и 164) може се закључити да у опсегу варираних концентрација гадолинијума постоје слагања у понашању нашег модела у компјутерском програму HySS и литературних модела коришћењем компјутерског програма MINTEQA2.<sup>69</sup>

Утицај неких флуорохинолона на расподелу доминантних комплекса приказан је у табели 60 (страна 167) и сликама од 101-107 (стране 167 и 168).

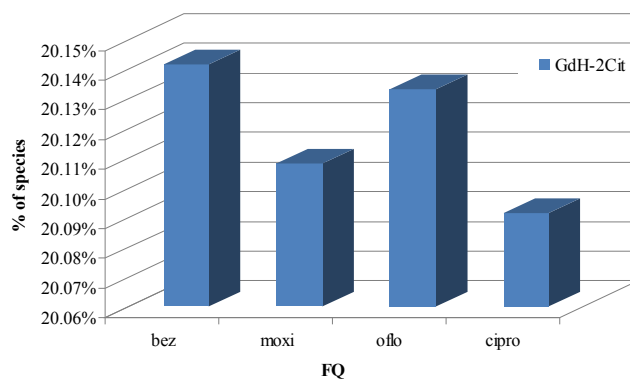
**Табела 60.** Утицај неких флуорохинолона на доминантне комплексе  $Gd^{3+}$  јона у крвној плазми на рН 7.4 израчунати програмом HySS

$[Gd^{3+}] = 1,2 \times 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$

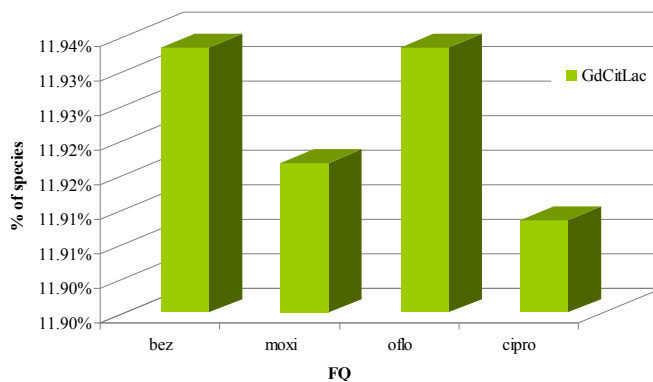
FQ→	без FQ	moxi	oflo	cipro
<b>Комплекс↓</b>	% дистрибуције			
GdAspCit	29.39	29.35	29.39	29.33
GdH <sub>2</sub> Cit	20.14	20.11	20.13	20.09
GdCitLac	11.93	11.92	11.93	11.91
GdH <sub>2</sub> HisCit	10.47	10.45	10.47	10.44
GdHSA	7.88	7.86	7.88	7.86
GdLeuCit	3.04	3.04	3.04	3.03
GdCit	2.78	2.78	2.78	2.77



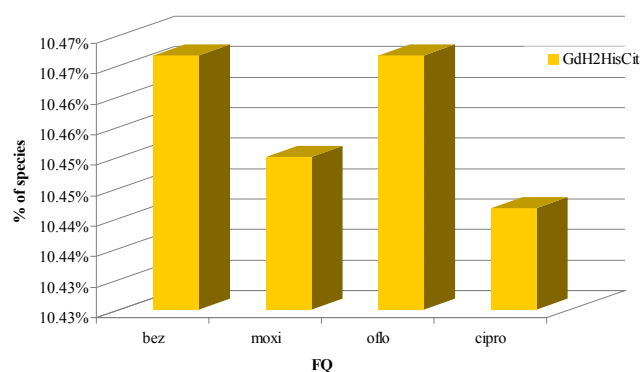
**Слика 101.** Расподела комплекса  $GdAspCit$  без и у присуству неких флуорохинолона



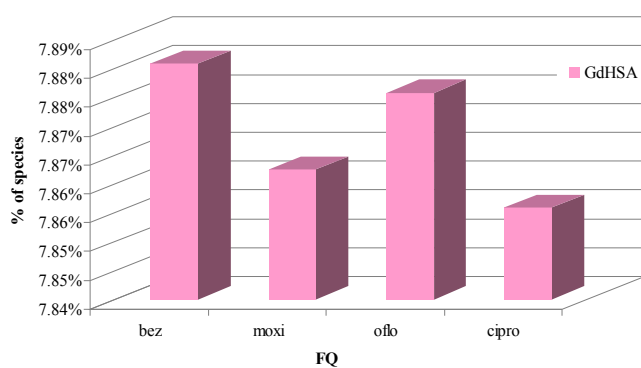
**Слика 102.** Расподела комплекса  $GdH_2Cit$  без и у присуству неких флуорохинолона



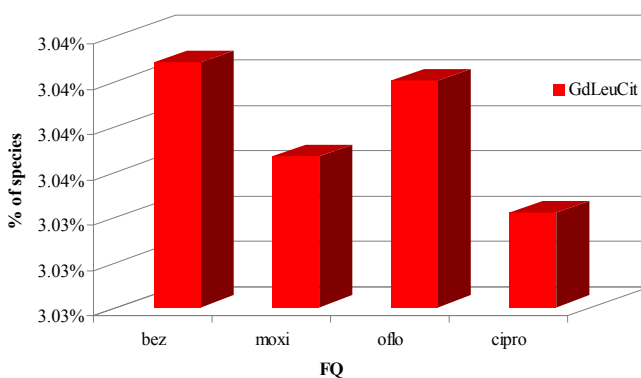
**Слика 103.** Расподела комплекса  $GdCitLac$  без и у присуству неких флуорохинолона



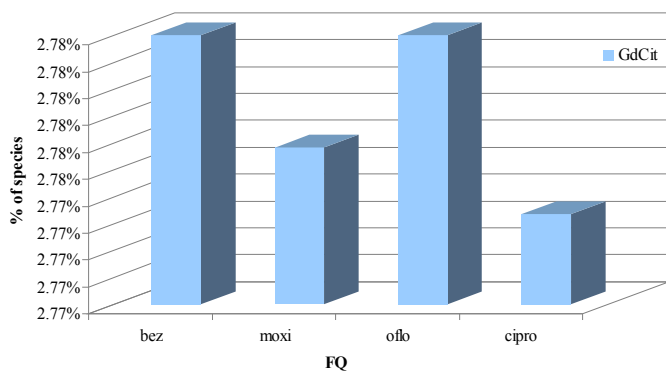
**Слика 104.** Расподела комплекса  $GdH_2HisCit$  без и у присуству неких флуорохинолона



**Слика 105.** Расподела комплекса  $GdHSA$  без и у присуству неких флуорохинолона

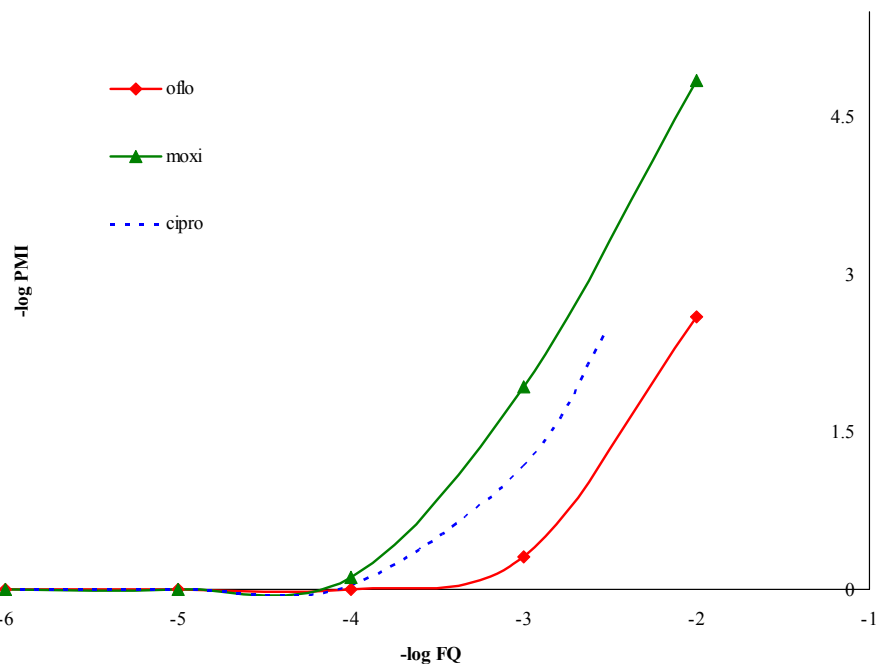


**Слика 106.** Расподела комплекса  $GdLeuCit$  без и у присуству неких флуорохинолона



**Слика 107.** Расподела комплекса  $GdCit$  без и у присуству неких флуорохинолона





Слика 108. Криве PMI вредности система  $Gd^{3+}$ -FQ

Уопштено се може уочити да је утицај флуорохинолона на расподелу комплекса гадолинијума у хуманом крвном серуму веома мали, готово занемарљив, при чему је утицај моксифлоксацина минимално израженији у смислу утицаја на смањење процента расподеле доминантних растворних врста.

Криве PMI вредности система  $Gd^{3+}$ -FQ приказане су на слици 108. PMI криве такође потврђују да моксифлоксацин у хуманој крвној плазми израженије мобилише  $Gd^{3+}$ -јон у односу на офлоксацин и ципрофлоксацин. Офлоксацин минорније мобилише  $Gd^{3+}$ -јон од ципрофлоксацина. У посматраном систему ( $Gd^{3+}$ -FQ) моксифлоксацин је израженији мобилизатор  $Gd^{3+}$ -јона од офлоксацина, што је потврђено и у систему  $Al^{3+}$ -FQ.



## 6. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације испитиване су прототропне и равнотеже комплексирања  $\text{Al}^{3+}$  јона и офлоксацина,  $\text{Gd}^{3+}$  јона и офлоксацина и  $\text{Gd}^{3+}$  и оксифлоксацина, потенциометријским и спектрофотометријским методама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  и  $\text{NaCl}$  средини, на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ .

Проучавање хидролизе  $\text{Gd}^{3+}$  јона и комплексирања  $\text{Gd}^{3+}$  и офлоксацина вршено је и ESI MS методом, а биодистрибуција  $\text{Gd}^{3+}$  и  $\text{Al}^{3+}$  јона у физиолошким условима у хуманој крвној плазми проучавана је компјутерском симулацијом, програмом HySS.

Циљ ових испитивања је био да се проучи утицај флуорохинолона офлоксацина и оксифлоксацина на биодистрибуцију  $\text{Gd}^{3+}$  и  $\text{Al}^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми. На основу мерења комплексирања у системима  $\text{Al}^{3+}$ -офлоксацин,  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин и  $\text{Gd}^{3+}$ -оксифлоксацин, проучаван је утицај флуорохинолона (офлоксацина и оксифлоксацина) на биодистрибуцију  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Gd}^{3+}$  јона, након чега је извршено поређење модела добијеног у нашем раду и модела описаних у литератури.

Свестраним разматрањем добијених експерименталних резултата, њиховом математичком обрадом и поређењем модела добијеног у нашем раду са литературним моделима, дошло се до следећих закључака:

1. Константе протоновања офлоксацина (oflo) одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Константе протоновања офлоксацина  $\log\beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд) износе:  $\text{Hoflo}^+$ ,  $\log\beta_{1,1}=8.212 \pm 0.003$ ;  $\text{H}_2\text{oflo}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=14.240 \pm 0.006$ ;
2. Константе протоновања оксифлоксацина (moxi) одређене су потенциометријским титрацијама у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ , као и спектрофотометријским мерењима. Константе протоновања оксифлоксацина  $\log\beta_{q,r}$  (q-протон, r-лиганд) износе:  $\text{Hmoxi}$ ,  $\log\beta_{1,1}=9.30 \pm 0.020$ ;  $\text{H}_2\text{moxi}^+$ ,  $\log\beta_{2,1}=15.57 \pm 0.050$ .
3. Састав и константе стабилности хидролитичких комплекса који се формирају хидролизом  $\text{Al}^{3+}$ -јона, узете су из литературних података.
4. Хидролиза  $\text{Gd}^{3+}$ -јона у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини, проучавана је потенциометријском титрацијама раствора  $\text{Gd}^{3+}$ -јона на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$  и ESI MS методом. Потенциометријском и методом ESI MS, потврђено је постојање хидролитичких комплекса  $\log\beta_{p,q}$  (p-метал, q-H):  $\text{GdOH}^{2+}$  ( $-\log\beta_{1,-1}=7.96 \pm 0.01$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  ( $\log K_{sp_{1,-3}}=17.90 \pm 0.1$ ).
5. Реакције комплексирања  $\text{Al}^{3+}$ -јона и офлоксацина изучаване су потенциометријском методом у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Обрадом добијених експерименталних резултата нађено је да се формирају протоновани, обични, мешовито хидролитички и полинуклеарно-мешовито хидролитички комплекси са следећим константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, q-лиганд):  $[\text{Al}(\text{Hoflo})]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=15.93 \pm 0.03$ );  $[\text{Al}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=14.84 \pm 0.07$ );  $[\text{Al}\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=10.20 \pm 0.04$ );  $[\text{Al}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=4.21 \pm 0.05$ );  $[\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{oflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{2,-2,1}=6.4 \pm 0.10$ ).
6. Комплексирање у систему  $\text{Gd}^{3+}$ -офлоксацин проучавано је потенциометријским мерењима у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{NaCl}$  средини, на  $(298.0 \pm 0.5) \text{ K}$ . Обрадом добијених експерименталних резултата нађено је да се формирају протоновани, обични, мешовито хидролитички и полинуклеарно-мешовито хидролитички комплекси са следећим константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, q-лиганд):  $[\text{GdHoflo}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=13.31 \pm 0.02$ );  $[\text{Gdoflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,0,1}=6.00 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{OH})\text{oflo}]^+$  ( $\log\beta_{1,-1,1}=-1.01 \pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=26.04 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,1,2}=18.14 \pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{oflo})_2]^+$  ( $\log\beta_{1,0,2}=11.00 \pm 0.09$ );  $\text{Gd}(\text{OH})(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-1,2}=3.34 \pm 0.04$ );  $\text{Gd}(\text{OH})_2(\text{oflo})_2$  ( $\log\beta_{1,-2,2}=-6.46 \pm 0.08$ );  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_3]^{3+}$

- $(\log\beta_{1,3,3}=37.65\pm 0.06)$ ;  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2\text{oflo}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=30.71\pm 0.06$ ). Дистрибуциони дијаграми израчунатих комплекса показују да су у испитиваној области рН, комплекси  $[\text{GdHoflo}]^{3+}$  и  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2]^{3+}$  идентификовани при свим концентрационим односима метал-лиганд при чему се комплекс  $[\text{GdHoflo}]^{3+}$  формира у области рН од 2-8 са максималном концентрацијом на рН око 5, а комплекс  $[\text{Gd}(\text{Hoflo})_2]^{3+}$  се формира у области рН од 2-9 са максималном концентрацијом на рН око 7.
7. Константе стабилности у систему  $\text{Gd}^{3+}$ -моксифлоксацин одређене су у  $0.1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{LiCl}$  средини на  $(298.0\pm 0.5)\text{K}$  на основу потенциометријских и спектрофотометријских мерења. Нађени комплекси са константама стабилности  $\log\beta_{p,q,r}$  (p-метал, q-протон, r-лиганд) су:  $[\text{GdHmoxi}]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,1,1}=14.78\pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,2,2}=29.75\pm 0.02$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_3]^{3+}$  ( $\log\beta_{1,3,3}=43.98\pm 0.03$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2\text{moxi}]^{2+}$  ( $\log\beta_{1,2,3}=35.08\pm 0.01$ );  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})\text{moxi}_2]^+$  ( $\log\beta_{1,1,3}=27.56\pm 0.03$ );  $\text{Gd}(\text{moxi})_3$  ( $\log\beta_{1,0,3}=19.20\pm 0.05$ ). Дистрибуциони дијаграми израчунатих комплекса показују да је у испитиваној области рН доминантан комплекс на нижим рН вредностима  $[\text{GdHmoxi}]^{3+}$ , са максималном концентрацијом на рН 4. Комплекс  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2]^{3+}$  се формира у рН области од 2-7 са максималном концентрацијом на рН 4, комплекс  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_3]^{3+}$  свој максимум има на рН 7, комплекси  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})_2\text{moxi}]^{2+}$  и  $[\text{Gd}(\text{Hmoxi})\text{moxi}_2]^+$  на рН 8, док формирање комплекса  $\text{Gd}(\text{moxi})_3$  почиње при рН вредностима већим од 7.
8. Моделовања хумане крвне плазме вршена су употребом различитих компјутерских програма, при чему је највише коришћен програм ECCLES. Својевремено када је направљен модел хумане крвне плазме употребом компјутерског програма ECCLES (са 7 јона метала и 40 лиганада), садржавао је око 5000 комплекса, код којих су константе стабилности у већини биле процењене, а мали број комплекса је имао константе одређене при физиолошким условима. Овај компјутерски програм је превазиђен по својим перформансама јер ради у окружењу DOS OS, није интерактиван са Windows OS, тешко је доступан, а у време када је модел хумане крвне плазме у њему конструисан, многа мерења и нису узета у обзир. У међувремену, појавили су се нови компјутерски програми који су лако доступни за коришћење, раде под окружењем Windows OS и имају знатно веће и боље техничке могућности. Један од таквих је програм HySS. Компјутерским програмом HySS конструисан је модел хумане крвне плазме који је по слагању добијених резултата репродуктиван и у корелацији је са литературним моделом хумане крвне плазме, израђеним у компјутерском програму ECCLES. Модел је укључио 8 јона метала ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) и 43 лиганада (26 аминокиселина, 7 неорганских лиганада, 8 карбоксилних киселина и 2 протеина) из Мау-овог модела конструисаног у компјутерском програму ECCLES, као и комплексе који су у међувремену идентификовани и публиковани. Модел је садржао укупно 5941 комплекса у односу на око 5000 комплекса колико је садржавао Мау-ов модел. Константе стабилности комплекса узете су за око 90% унетих комплекса из JESS-ове базе константи стабилности. Преостале константе стабилности (око 10%) узете су из NIST-ове и IUPAC-ове базе константи стабилности, а у случају да се одговарајуће вредности нису могле наћи у базама, коришћени су литературни извори. За добијање поузданих резултата узете су вредности константи стабилности које су блиске онима у физиолошким условима ( $T=310\text{K}$  и  $I=0.15 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ ). Пошто те вредности нису увек биле расположиве на основу термодинамичких података ( $\Delta H$  и  $\Delta S$ ) и применом SIT и LFER теорије извршена је корекција константи стабилности на физиолошке услове. Ради проучавања утицаја  $\text{Al}^{3+}$ -јона, у модел хумане крвне плазме унети су комплекси

- из табеле 37 (страница 132), а ради проучавања утицаја  $Gd^{3+}$ -јона, у модел хумане крвне плазме унети су комплекси из табеле 38 (страница 133). Кључна потешкоћа је била у процени слободних концентрација метала због њиховог везивања за протеине хумане крвне плазме, а највећи недостатак је тај што нису узети у обзир проценти везивања метала за протеине, па су концентрације метала процењене.
9. Проучавањем биодистрибуције  $Al^{3+}$ -јона компјутерском симулацијом, установљено је да су у хуманој крвној плазми доминантни комплекси  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  (процент дистрибуције око 90%) и  $[AlCit(OH)]^-$  (процент дистрибуције од 6-13% у зависности од рН), док су комплекси  $Al(OH)_3$ ,  $Al(PO_4)$ ,  $[Al(OH)_4]^-$  и  $[AlCit_2(OH)_2]^{5-}$  испод 2%. Најдоминантнији комплекс  $[Al(PO_4)(OH)]^-$  приказује приближно идентичну концентрацију у присуству флуорохинолона цiproфлоксацина, флероксацина, ломефлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина и спарфлоксацина, док у исто време показује мању концентрацију у присуству моксифлоксацина него у присуству офлоксацина. Комплекс  $[AlCit(OH)]^-$  има мању концентрацију у хуманој крвној плазми (ниже од 10%) у односу на фосфатни комплекс, па и у присуству неких флуорохинолона. Уопштено се може закључити да је у присуству офлоксацина већа концентрација доминантних комплекса него у присуству моксифлоксацина, што значи да моксифлоксацин испољава већи утицај на биодистрибуцију  $Al^{3+}$  јона него офлоксацин. Резултати доминантних комплекса  $Al^{3+}$  јона у хуманој крвној плазми (не узимајући у обзир везивање за трансферин), указују на релативно добро слагање резултата са литературним моделима, по врсти доминантних комплекса и проценту њихове расподеле. Резултати наших прорачуна воде општем закључку да у серуму не-протеински  $Al^{3+}$ -јон везује фосфате, хидроксиде и цитрате као доминантне лиганде.
  10. Проучавањем биодистрибуције  $Gd^{3+}$ -јона компјутерском симулацијом у испитиваном опсегу концентрација, установљено је да су доминантне таложне врсте. Међу њима, првенствено се формира  $GdPO_4(s)$  због своје велике стабилности, док се комплекс  $Gd_2(CO_3)_3(s)$  појављује након тога. Међу растворним врстама  $Gd^{3+}$ -јона, доминантни комплекси су комплекси  $[GdHSA]^{16-}$ ,  $[GdOxa]^+$  и тернарни комплекси са цитратима као примарним лигандима. На ниским концентрацијама гадолинијума ( $10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ ) доминирају растворне врсте, док повећањем концентрација ( $10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  и даљим повећањем) долази до формирања нерастворних (таложних) комплекса као доминантних.
  11. Моксифлоксацин у хуманој крвној плазми значајније мобилише јоне  $Al^{3+}$  и  $Gd^{3+}$  као лиганд у односу на офлоксацин.
  12. Значај нашег рада се огледа у чињеници, да се добијени резултати у овој докторској дисертацији могу користити за проучавање специјација у сложенијим условима и интеракцијама које обухватају не само лекове, него и токсичне супстанце. Иако савремене базе које се користе за моделирање хумане крвне плазме садрже преко 8000 комплекса, предложена база је интерактивна, графички је оријентисана, поуздана и релативно једноставна за употребу. Њена надоградња је сразмерно једноставна а исправка неког од података директна.



## ЛИТЕРАТУРА

1. J.J.R.Frausto, R.J.P.Williams, *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
2. S.J.Lippard, J.M.Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, 1994.
3. P.M.Harrison, R.J.Hoare, *Outline Studies in Biology. Metals in Biochemistry*, Chapman and Hall, London, 1980.
4. Р.Јелић, *Испитивање равнотежа комплексирања алуминијум(III) и гвожђе(III)-јона са неким алифатичним аминокиселинама*, докторска дисертација, Универзитет у Крагујевцу, 1997.
5. W.R.Harris, *Equilibrium model for speciation of aluminum in serum*, Clin. chem. 38/9, 1809-1818, 1992.
6. P.Hermann, J.Kotek, V.Kubicek, I.Lukes, *Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes*, Dalton Trans., 3027-3047, 2008.
7. M.Port, J.M.Idee, C.Medina, C.Robic, M.Sabatou, C.Corot, *Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review*, Biometals, 21, 469-490, 2008.
8. I.Turel, N.Bukovec, *Complex formation between some metals and a quinolone family member (ciprofloxacin)*, Polyhedron, Vol.15, N°2, 269-275, 1996.
9. X.G. Huang, H.S.Zhang, Y.X.Li, M.F.Li, *Simultaneous spectrophotometric determination of norfloxacin, ofloxacin and lomefloxacin in rabbit blood serum by use of chemometrics*, J.Chil.Chem.Soc, 54, N°3, 204-207, 2009.
10. C.J.Eboka, A.B.Afolabi, *In-vitro Adsorption of Fluoroquinolones on some pharmaceutical Adsorbents*, Trop J.Pharm. Res, 5(1), 533-538, 2006.
11. И.Лазаревић, *Утицај површински активних супстанци на прототропне и равнотеже комплексирања у раствору алуминијум(III)-јона и офлоксацина*, магистарска теза, Универзитет у Крагујевцу, 2000.
12. А.Ђурђевић, *Физичко-хемијска истраживања неких антибиотика и антивиrotика у биофлуидима и дозираним облицима*, докторска дисертација, Универзитет у Крагујевцу, 2009.
13. М.Обрадовић, Д.Веселиновић, П.Ђурђевић, *Физичко хемијске методе испитивања равнотежа у комплексирајућим срединама*, Филозофски факултет Ниш и Факултет за физичку хемију Београд, 1996.
14. J.G.Dick, *Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, London, 1973.
15. D.Harvey, *Modern analytical chemistry*, Mc-Graw-Hill, Boston, 2000.
16. V.T.Andriole, *The Quinolones, 3<sup>rd</sup> edition*, Academic Press, London, 2000.
17. J.M.Domagala, *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*, J.Antimicrob.Chemoter., 33, 685-706, 1994.
18. J.Turindge, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones*, Drugs, Suppl.2, 58, 29-36, 1999.
19. F.V.Vambeke, J.M.Michot, J.V.Eldere, M.Tulkens, *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 256-280, 2005.
20. А.Ђирић, *Деривативно спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у крвном серуму*, дипломски рад, Универзитет у Крагујевцу, ПМФ, 2006.
21. D.Cheng, W.R.Xu, C.X.Liu, *World J Gastroenterol.*, 13(17), 2496-2503, 2007.
22. D.A.Williams, T.L.Lemke, *Foye's principles of Medicinal Chemistry*, Fifth edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2002.
23. K.T.Novak, B.Noszal, I.Hermecz, G.Keresturi, Be.Podany, G.Gyorgy, *Protonation Equilibria of Quinolone Antibacterials*, J. Pharm. Sci., 79 (11), 1990.

24. I.A.Parshikov, J.D.Moody, J.P.Freeman, J.O.Lay Jr., A.J.Williams, T.M.Heinze, J.B.Sutherland, *Formation of conjugates from ciprofloxacin and norfloxacin in cultures of Trichoderma viride*, Mycoloq, 94 (1), 1, 2002.
25. 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.
26. I.A.Parshikov, J.D.Moody, J.P.Freeman, J.O.Lay Jr., A.J.Williams, T.M.Heinze, J.B.Sutherland, *Formation of conjugates from ciprofloxacin and norfloxacin in cultures of Trichoderma viride*, Mycoloq, 94, (1), 1, 2002.
27. I.A.Parshikov, J.P.Freeman, J.O.Lay Jr., R.D.Beger, A.J.Williams, J.B.Sutherland, *Microbiological Transformation of Enrofloxacin by the Fungus Mucor ramannianus*, Appl. Envir. Microbio., 66(6), 2664, 2000
28. M.P.Lopez-Gresa, R.Ortiz, L.Perello, J.Latorre, M.L.Gonzalez, S.G.Granda, M.P.Priede, E.Canton, *Interactions of metal with two quinolone antimicrobial agents (Cinoxacin and ciprofloxacin) Spectroscopic and X-ray structural characterization. Antibacterial studies*, J. Inorg. Biochem., 92, 65, 2002.
29. J.Polster, H.Lachmann, *Spectrometric Titration: Analysis of Chemical Equilibria*, ICH, Basel, 1989.
30. J.H.Borrell, M.T.Montero, *Calculating Microspecies Concentration of Zwitterion Amphoteric Compounds: Ciprofloxacin as Example*, J. Chem. Educ.; 74, 1311, 1997.
31. K.T.Novak, B.Noszal, I.Hermecz, G.Kereszturi, B.Podanyi, G.Szasz, *Protonation Equilibria of Quinolone Antibacterials*, J. Pharm. Sci.; 79, 1023, 1990.
32. H.R.Park, K.Y.Chung, H.Ch.Lee, J.K.Lee, K.M.Bark, *Ionization and Divalent Cation Complexation of Quinolone Antibiotics in Aqueous Solution*, Bull. Korean Chem. Soc., 21, 2000.
33. A.I.Drakopoulos, P.C.Ioannou, *Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution*, Anal. Chim. Acta 354, 197, 1997.
34. J.Sun, S.Sakai, Y.Tauchi, Y.Deguchi, J.Chen, R.Zhang, K.Morimoto, *Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium*, Euro. J. Pharm. and Biopharm., 54, 51, 2002.
35. D.S.Lee, H.J.Han, K.Kim, W.B. Park, J.K.Ch, J.H.Kim, *Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues*, J. Pharm. Biomed. Anal., 12, 157, 1994.
36. G.Popović, Lj.Milovanović, V.Kapetanović, *Study od acib-base equilibria of fleroxacin*, J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 859, 1998.
37. P.T.Đurđević, M.Jelikić-Stankov, *Study of solution equilibrium between aluminium(III) ion and ofloxacin*, J. Pharm. Biomed. Anal., 19, 501-510, 1999.
38. I.Lazarević, M.Jelikić-Stankov, P.Đurđević, *The effect of sodium dodecylsulfate on prototropic equilibria in the aluminium(III)-ofloxacin system*, Main Group Metal Chem., 21(10), 1998.
39. U.Neugebauera, A.Szeghalmib, M.Schmitta, W.Kieferb, J.Poppa, U.Holzgrabec, *Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones*, Spectrochim. Acta Part A 61, 1505, 2005.
40. K.T.Novak, B.Noszal, I.Hermecz, G.Keresturi, Be.Podany, Gyorgy, *Protonation Equilibria of Quinolone Antibacterials*, J. Pharm. Sci., 79(11), 1990.
41. P.Đurđević, R.Jelić, M.Jelikić-Stankov, D.S.Veselinović, D.Stankov, *Complexation behaviour of cadmium(II) ion with nalidixic acid in chloride medium*, J. Serb. Chem. Soc., 60(5), 403, 1995.
42. P.Đurđević, M.Jelikić-Stankov, J.Odović, *Study of solution equilibria iron(III) ion and ciprofloxacin in pure nitrate ionic medium and micellar medium*, Polyhedron 19, 1085, 2000.



43. A.K.Chattah, Y.G.Linck, G.A.Monti; P.R.Levesein, S.A.Breda, R.H.Manzo, M.E.Olivera, *NMR and IR characterization of the aluminium complexes of norfloxacin and ciprofloxacin fluoroquinolones*, Magn. Reson. Chem., 45, 850, 2007.
44. N.J.Garrido, L.Perello, R.Ortiz, G.Alzuet, M.G.Alvarez, E.Canton, M.L.Gonzalez, S.G.Granda, M.P.Priede, *Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structure of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin*, J. Inorg. Biochem., 99, 677, 2005.
45. M.Imran, J.Iqbal, S.Iqbal, N.Ijaz, *In vitro antibacterial studies of ciprofloxacin-imines and their complexes with Cu(II), Ni(II), Co(II) and Zn(II)*, Tubitak, 31, 67, 2007.
46. D.K.Saha, S.Padhye, C.E.Anson, A.K.Powell, *Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complexes*, Trans. Metal Chem., 28, 579, 2003.
47. P.Ball, V. T. Andriole (Ed), *The quinolones*, Academic Press, San Diego, CA, 1-31, 2000.
48. G.Sheehan, A.R.Roland, D. E. Low, *Fluoroquinolone Antibiotics*, Basel, 1-10, 2003.
49. J.R.Anacona, C.Toledo, *Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of ciprofloxacin*, Trans. Metal Chem. 26, 228, 2001.
50. D.K.Saha, U.Sandbhor, K.Shirisha, S.Padhye, D.Deobagkar, C.E.Anson, A.K.Powell, *A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline*, Bioorg. Medic. Chem. Lett., 14, 3027, 2004.
51. J.Al-Mustafa, *Magnesium, calcium and barium perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin*, Acta Chim. Slov. 49, 457, 2002.
52. P.Đurđević, R.Jelić, M.Jelikić-Stankov, D.S.Veselinović, D.Stankov, *Complexation behaviour of cadmium(II) ion with nalidixic acid in chloride medium*, J. Serb. Chem. Soc., 60(5), 403, 1995.
53. S.A.Sadeek, *Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes*, J. Molec. Struct., 753, 1, 2005.
54. B.Macias. M.V.Villa, I.Rubio, A.Castineiras, J.Borras, *Complexes of Ni(II) and Cu(II) with ofloxacin. Crystal structure of a new Cu(II) ofloxacin complex*, J. Inorg. Biochem., 84, 163, 2001.
55. L.Farkas, M.Gabor, F.Kallay, *In Topics in flavonoid Chemistry and Biochemistry*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 24, 1973.
56. М.Јеликић-Станков, П.Ђурђевић, *Хемија антибиотика хинолонског тина, монографија*, Фармацеутски факултет, Београд, 1999.
57. H.A.Okeri, I.M.Arhehwoh, *Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials. I Ofloxacin*, African Journal of Biotechnology, Vol.7 (6), 670-680, 2008.
58. P.Calza, C.Medana, F.Carbone, V.Giancotti and C.Baiocchi, *Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 1533–1552, 2008.
59. Bayer AG, Bussines Group Pharma, *Marketing Authorization Application*, data on file, November 2000.
60. М.Журкић, *Проучавање равнотежа у раствору гадолинијум(III)-јона и моксифлоксацина*, дипломски рад, Универзитет у Крагујевцу, ПМФ, 2009.
61. D.A.Skoog, D.M.West, F.J.Holler, S.R.Crouch, *Analytical chemistry*, Eight Edition, Thomson/Brooks/Cole, 2005.
62. T. Kiss, A. Odani, *Demonstration of the importance of metal ion speciation in bioactive systems*, Bull. Chem. Soc. Jpn. Vol. 80, N<sup>o</sup>9, 1691–1702, 2007.
63. F.Quintus, *Metal speciation in environmental and biological systems*, Environmental Health Perspectives 103, Supplement 1, February 1995.

64. P.May, P.W.Linder, D.R.Williams, *Computer simulation of metal-ion equilibrium in biofluids: Models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium (II), magnesium (II), manganese (II), iron (III), copper (II), zinc (II) and lead (II) ions in human blood plasma*, J.Chem. Soc.. Dalton Trans., 588-595, 1977.
65. L.Alderhihi, P.Gans, A.Ienco, D.Peters, A.Sabatini, A.Vacca, *Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species*, Elsevier, Coordination Chemistry Reviews 184, 311-318, 1999.
66. P.M.May, D.Rowland, E.Königsberger, G.Hefter, *JESS, a Joint Expert Speciation System – IV: A large database of aqueous solution physicochemical properties with an automatic means of achieving thermodynamic consistency*, Talanta 81, 142–148, 2010.
67. R.M.Smith, A.E.Martell, R.J.Motekaitis, *NIST Standard Reference Database 46, NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 8.0 For Windows*, U.S. Department of Commerce, Technology Administration, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD 20899, Texas A&M University, College Station, TX 77843-3255, May 2004.
68. P.Letkeman, *Computer-modelling of metal speciation in human blood serum*, Computer series, 182, Vol.73, N<sup>o</sup>2, 165-170, February 1996,
69. J.Wang, H.Zhang, K.Yang, C.Niu, *Computer simulation of Gd(III)speciation in human interstitial fluid*, BioMetals, 17, 599-603, 2004.
70. H.G.Seiler, A.Sigel, H.Sigel, *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, Marcel Dekker.Inc, Chapter 29, 365-369, 1994.
71. Љ.Јоксовић, *Утицај растварача и јонске средине на хидролизу и комплексирање алуминијум(III)-јона са флуорованим хинолонима*, докторска дисертација, Универзитет у Крагујевцу, ПМФ, 2008.
72. H.G.Seiler, A.Sigel, H.Sigel, *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, Marcel Dekker.Inc, Chapter 16, 217-224, 1994.
73. И. Филиповић, С. Липановић, *Опћа и анорганска кемија*, Школска књига, Загреб, 295-313, 1982.
74. N.Milić, Ž.Bugarčić, P.Đurđević, *Hydrolysis of the Aluminium(III) Ion in Sodium Perchlorate Medium*, J. Serb. Chem. Soc. 55(12), 723-729, 1990.
75. N.Milić, Ž.Bugarčić, P.Đurđević, *Hydrolysis of aluminum (III) ion in sodium nitrate medium*, Can. J. Chem. Vol.69, 28-32, 1991.
76. N.Milić, Ž.Bugarčić, S.Nikezić, *Hydrolysis of the aluminium(III) ion in sodium chloride medium*, Gazzetta Chimica Italiana, 121, 45-48, 1991.
77. E.Martell, R.J.Motekaitis, R.M.Smith, *Aluminium complexes of hydroaliphatic and hydroxyaromatic ligands in aqueous systems – some problems and solutions*, Polyhedron, 9, 171-187, 1990.
78. S.C.Wallis, B.G.Charles, L.R.Gahan, L.J.Filippich, M.G.Bredhauer and P.A.Duckworth, *Interaction of Norfloxacin with Divalent and Trivalent Prarmaceutical Cations. In Vitro Complexation and in Vivo Pharmacokinetic Studies in the dog*, Journal of Pharmaceutical Science Vol.5, N<sup>o</sup>8, August 1996.
79. P.Djurdjević, Lj.Joksović, R.Jelić, A.Djurdjević, and M.Jelikić Stankov, *Solution Equilibria between Aluminum(III) Ion and some Fluoroquinolone Family Members. Spectroscopic and Potentiometric Study*, Chem. Pharm. Bull. 55(12), 1689-1699, 2007.
80. B.Urbaniak, Z.J.Kokot, *Analysis of the factors that significantly influence the stability of fluoroquinolone-metal complexes*, Analytica Chimica Acta, 647, 54-59, 2009.
81. W.Guo-Ping, L.Qun-Fang, J.Zhejiang University (*Science edition*), 30(4), 417–442, 2003.
82. Ј.Мишовић, Т.Аст, *Инструменталне методе хемијске анализе*, Друго издање, ТМФ, 1975.

83. H.M.Dion, L.K.Ackerman, H.H.Hill. *Detection of inorganic ions from water by electrospray ionization-ion mobility spectrometry*, Elsevier, Talanta, 57, 1161–1171, 2002.
84. R.Ekman, J.Silberring, A.Westman-Brinkmalm, A.Kraj, *MASS SPECTROMETRY, Instrumentation, Interpretation, and Applications*, Published by John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.
85. D.Perrin, *Stability constants of metal-ion complexes, part B, Organic Ligands*, IUPAC chemical data series, N<sup>o</sup>22, Australian National University, Canberra.
86. L.G.Sillen, A.E.Martell, *Stability constants of metal-ion complexes*, The chemical society, Burlington house, W.1, 1964.
87. L.Pettit, K.Powell, *SC-Database*, Academic Software and IUPAC, 2004.
88. P.Hermann, J.Kotek, V.Kubiček, I.Lukeš, *Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes (review)*, Dalton Trans., 3027–3047, 2008.
89. M.Port, J.-Marc Idee, C.Medina, C.Robic, M.Sabatou, C.Corot, *Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review*, Biometals, 21, 469–490, 2008.
90. P.Đurđević, R.Jelić, D.Džajević, M.Cvijović, *Solution Equilibria between Aluminium(III) ion and l-Histidine or l-Tyrosine*, Metal Based Drugs, 8, 235–248, 2002.
91. H.M.Irving, M.G.Miles, L.D.Pettit, *A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode*, Anal. Chim. Acta, 38, 475–488, 1967.
92. L.O.Ohman, R.B.Martin, *Citrate as the main small molecule binding Al<sup>3+</sup> in Serum*, Clin,Chem.40/4, 598-601, 1994.
93. G.E.Jackson, *Aluminium, gallium and indium in biological fluids-a computer model of blood plasma*, Polyhedron, Vol.9, N<sup>o</sup>2/3, 163-170, 1990.
94. P.Zatta, P.Zambenedetti, R.Milacic, *Aluminum toxicity: the relevant role of the metal speciation*, Analisis magazine, 26, N<sup>o</sup>6, 72-76, 1998.
95. W.R.Harris, C.Keen, *Calculations of the distribution of zinc in a computer model of human serum*, the journal of nutrition, 1677-1682, 1989.
96. G.E.Jackson, M.J.Byrne, *Metal Ion speciation in blood Plasma: Gallium-67-citrate and MRI Contrast agents*, The Journal of nuclear medicine, Vol.37, N<sup>o</sup>2, February 1996.
97. G.E.Jackson, S.Wynchank, M.Woudenberg, *Gadolinium (III) complex Equilibria: The implications for Gd(III) MRI Contrast Agents*, Magnetic resonance in medicine 16, 57-66, 1990.
98. Y.Wang, X.LU, S.Y.wang, J.F.Han, K.Y.Yang, C.J.Niu, J.Z.NI, *Study on effect of Gd(III) speciation on Ca(II) speciation in human blood plasma by computer simulation*, Chinese Chemical Letters, Vol.12, N<sup>o</sup>2, 161-162, 2001.
99. J.Shimada, K.Shiba, T.Oguma, H.Miwa, Y.Yoshimura, T. Nishikawa, Y.Okabayashi, T.Kitagawa, S.Yamamoto, *Effect of Antacid on Adsorption of the quinolone lomefloxacin*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1219-1224, 1992.
100. J.Wang, H.Zhang, K.Yang, C.Niu, J.Ni, *Computer simulation of Zn(II) speciation and effect of Gd(III) on Zn(II)speciation in human blood plasma*, Biological trace element Research, Vol.96, 125-131, 2003.
101. L.Konigsberger, E. Konigsberger, P.May, G.T.Hefter, *Complexation of iron (III) and iron(II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma*, Journal of Inorganic Biochemistry, 78, 175-184, 2000.
102. G.Berthon, *Handbook of Metal-Ligand interactions in biological fluids, Bioinorganic chemistry*, Vol.2, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Hong Kong, 1134, 1996.

103. W.B.Herring, B.S.Leavell, L.M.Paixao, J.H.Yoe, *Trace metals in human plasma and red blood cells*, The American Journal of Clinical Nutrition, Vol.8, 848-854, 1960.
104. J.Dolovich, S.Levans, E.Nieboer, *Occupational asthma from nickel sensitivity: I Human serum albumin in the antigenic determinant*, British Journal of industrial medicine, 14, 51-55, 1984.
105. T.Kiss, E.Kiss, E.Garribba, H.Sukurai, *Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum*, J.of Inorg.Biochem., 80, 65-73, 2000.
106. H.Sun, H.Li, A.B.Mason, R.C.Woodworth, P.J.Sedler, *N-lobe versus C-lobe complexation of bismuth by human transferrin*, Biochem. J., 105-111, 1999.
107. H.Sun, H.Li, A.B.Mason, R.C.Woodworth, P.J.Sedler, *Competitive binding of Bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma*, The J. of Biological Chemistry, Vol.276, N°12, 8829-8835, 2001.
108. R.Pakdaman, F.B.Abdallah, J.M.E.H.Chahine, *Transferrin, is a mixed chelate-protein ternary complex involved in the mechanism of iron uptake by serum-transferrin in vitro?*, J.Mol.Biol., 293, 1273-1284, 1999.
109. J.M.E.H.Chahine, R.Pakdaman, *Transferrin, a mechanism for iron release*, Eur.J.Biochem, 230, 1102-1110, 1995.
110. W.R.Harris, Z.Wang, Y.Z.Hamada, *Competition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of albumin*, Inorg.Chem., 42, 3262-3273, 2003.
111. H.Sun, M.C.Cox, H.Li, P.J.Sadler, *Rationalisation of metal binding to transferrin: Prediction of metal-protein stability constants*, Structure and Bonding, Vol.88, 71-102, 1997.
112. S.Thangadurai, S.K.Shukla, A.K.Srivastava, Y.Anjaneyulu, *X-ray powder diffraction patterns for certain fluoroquinolone antibiotic drugs*, Acta Pharm. 53, 295-303, 2003.
113. P.Caravan, C.Comuzzi, W.Crooks, T.J.McMurry, G.R.Choppin, S.R.Woulfe, *Thermodynamic stability and kinetic inertness of MS-325, a new blood pool agent for magnetic resonance imaging*, Inorg.Chem. 40, 2170-2176, 2001.
114. U.Neugebauer, A.Szeghalmi, M.Schmitt, W.Kiefer, J.Popp, U.Holzgrabe, *Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones*, Elsevier, 61, 1505-1517, 2005.
115. D.S.Lee, H.J.Han, K.Kim, W.B.Park, J.K.Cho, J.H.Kim, *Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues*, J.of Pharm.&Biomed.Anal, Vol.12, N°2, 157-164, 1994.
116. V. Nischwitz, A.Berthele, B.Michalke, *Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid barrier*, Anal.Chim.Acta, 627, 258-269, 2008.
117. V.A.Granadillo, J.E. Tahain, O.Salgado, L.E. Elejalde, B. R. Iturbe, G.B. Romero, R.A. Romero, *The influence of the blood levels of lead, aluminum and vanadium upon the arterial hypertension*, Elsevier, Clinica Chimica Acta, 233, 47-59, 1995.
118. A.S.Tracey, G.R.Willsky, E.S.Takeuchi, *Vanadium, Chemistry, Biochemistry, Pharmacology, and practical application*, Taylor&Francis Group, LLC, CRC Press, 153-166, 2007.
119. H.R. Park, T.H. Kim, K.M. Bark, *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various Environments, Invited review*, Eur. J. Med. Chem., 37, 443-460, 2002.
120. S. Sakore, S. Choudhari, B. Chakraborty, *Biowaiver monograph for immediate release solid oral dosage forms: Ofloxacin*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 2, Suppl 4, 156-161, 2010.

- 
121. T.Diwakar, K.Rajat, *Preformulative studies for floating tablet of ofloxacin*, International journal of pharmacy&life sciences, 1(7), 419-427, 2010.
  122. Y.Cui, Y.Zhang, X.Tang, *In vitro and in vivo evaluation of ofloxacin sustained release pellets*, International Journal of Pharmaceutics 360, 47–52, 2008.
  123. D. Čurman, P. Živec, I. Leban, I. Turel, A. Polishchuk, K. D.Klika, E. Karaseva, V. Karasev, *Polyhedron*, 27, 1489–1496, 2008.
  124. M.Hughesa, R.Poole, *Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts*, Review article, Journal of general microbiology 137, 725-734, 1991.
  125. H.B.Röllin, C.M.C.A.Nogueira, *Identification of aluminium fractions in serum using the techniques of high performance liquid chromatography, ultrafiltration and zeemanatomic absorption spectrometry*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem 35(3), 215-222, 1997.
  126. P.M.May, G.L.Smith, D.R.Williams, *Computer calculation of Zinc(II)-complex distribution in milk*, The Journal of nutrition, 1990-1993, 1982.



**ПРИЛОГ**

---

**Потенциометријске титрације протоновања анјона офлоксацина**
**Табела 1П**

Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.00 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина са 0.093 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

<b>ml. NaOH</b>	<b>pH</b>	<b>a</b>
0.000	6.962	0.00
0.010	7.049	0.05
0.020	7.171	0.09
0.030	7.313	0.14
0.040	7.438	0.19
0.050	7.549	0.23
0.060	7.661	0.28
0.070	7.756	0.33
0.080	7.842	0.37
0.090	7.889	0.42
0.100	7.893	0.47
0.110	7.926	0.51
0.120	7.954	0.56
0.130	7.992	0.61
0.140	8.027	0.65
0.150	8.058	0.70
0.160	8.103	0.75
0.170	8.122	0.79
0.180	8.172	0.84
0.190	8.228	0.88
0.200	8.284	0.93
0.220	8.378	1.02
0.240	8.398	1.12
0.250	8.419	1.16
0.260	8.429	1.21

**Табела 2П**

Потенциометријска титрација 20.0 ml 2.003 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина са 0.093 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

<b>ml. NaOH</b>	<b>pH</b>	<b>a</b>
0.000	7.087	0.00
0.050	7.420	0.12
0.075	7.563	0.17
0.100	7.687	0.23
0.125	7.773	0.29
0.150	7.814	0.35
0.175	7.909	0.41
0.200	7.986	0.47
0.225	8.032	0.52
0.250	8.065	0.58
0.300	8.190	0.70
0.350	8.371	0.81
0.400	8.533	0.93
0.450	8.720	1.05

---



0.500	8.898	1.16
0.550	9.131	1.28
0.600	9.310	1.40
0.650	9.409	1.51
0.700	9.420	1.63
0.750	9.430	1.75
0.800	9.438	1.86
0.850	9.445	1.98
0.900	9.452	2.10

Табела 3П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 2.000 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина + 3.225 mmol/dm<sup>3</sup> HCl са 0.093 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

ml. NaOH	pH	a
0.000	3.036	0.00
0.020	3.061	0.05
0.040	3.100	0.09
0.060	3.143	0.14
0.080	3.192	0.19
0.100	3.244	0.23
0.120	3.304	0.28
0.140	3.384	0.33
0.160	3.479	0.37
0.180	3.598	0.42
0.200	3.773	0.47
0.220	4.018	0.51
0.240	4.458	0.56
0.250	4.723	0.58
0.255	4.823	0.59
0.260	4.922	0.61
0.265	5.009	0.62
0.270	5.098	0.63
0.275	5.163	0.64
1.020	8.745	2.37
1.040	8.846	2.42
1.060	8.962	2.47
1.080	9.095	2.51
1.100	9.247	2.56
1.120	9.411	2.61
1.140	9.585	2.65
1.160	9.757	2.70
1.180	9.907	2.75
1.200	10.029	2.79

## Апсорпциони спектри протоновања анјона офлоксацина

Табела 4П

Апсорпциони спектри офлоксацина у UV-VIS области.  
 $C_{\text{oflo}}=2.50 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на 298 К

pH	Апсорбанција								0.1	0.1
	6.035	2.691	4.443	5.972	6.27	6.56	8.229	9.644	mol/dm <sup>3</sup> NaOH	mol/dm <sup>3</sup> HCl
$\lambda$ (nm)										
300	0.55	0.762	0.717	0.547	0.515	0.52	0.436	0.515	0.521	0.744
303	0.476	0.707	0.664	0.477	0.44	0.448	0.361	0.434	0.441	0.69
306	0.405	0.604	0.573	0.401	0.366	0.361	0.287	0.357	0.361	0.588
309	0.339	0.503	0.467	0.332	0.304	0.303	0.239	0.294	0.297	0.486
312	0.285	0.401	0.374	0.277	0.259	0.261	0.212	0.25	0.251	0.386
315	0.246	0.337	0.313	0.26	0.254	0.242	0.201	0.225	0.225	0.321
318	0.23	0.297	0.274	0.25	0.25	0.236	0.202	0.218	0.218	0.283
321	0.225	0.28	0.257	0.249	0.249	0.239	0.211	0.222	0.222	0.273
324	0.229	0.276	0.256	0.245	0.242	0.245	0.22	0.23	0.231	0.271
327	0.236	0.278	0.259	0.244	0.24	0.255	0.232	0.24	0.242	0.27
330	0.243	0.281	0.261	0.242	0.235	0.264	0.242	0.251	0.253	0.267
333	0.25	0.282	0.262	0.237	0.231	0.271	0.252	0.262	0.263	0.266
336	0.253	0.276	0.257	0.232	0.226	0.256	0.26	0.27	0.272	0.258
339	0.248	0.266	0.248	0.232	0.225	0.246	0.258	0.275	0.275	0.247
342	0.241	0.253	0.236	0.23	0.221	0.223	0.248	0.265	0.264	0.234
345	0.225	0.238	0.225	0.219	0.22	0.202	0.233	0.25	0.254	0.232
348	0.206	0.22	0.207	0.204	0.211	0.174	0.215	0.233	0.235	0.215
351	0.189	0.198	0.183	0.185	0.189	0.136	0.196	0.218	0.216	0.191
354	0.166	0.167	0.154	0.156	0.163	0.1	0.169	0.184	0.191	0.164
357	0.13	0.137	0.126	0.126	0.13	0.067	0.132	0.151	0.154	0.129
360	0.098	0.11	0.099	0.091	0.093	0.045	0.095	0.111	0.111	0.102
363	0.069	0.091	0.079	0.064	0.066	0.03	0.062	0.08	0.079	0.085
366	0.048	0.076	0.064	0.044	0.044	0.02	0.038	0.057	0.056	0.068
369	0.036	0.064	0.053	0.033	0.029	0.012	0.023	0.038	0.038	0.056
372	0.023	0.054	0.043	0.022	0.018	0.007	0.015	0.027	0.025	0.047
375	0.016	0.045	0.035	0.015	0.012	0.003	0.005	0.016	0.015	0.038
378	0.01	0.039	0.027	0.015	0.007	0.001	0.001	0.011	0.01	0.03
381	0.006	0.031	0.022	0.006	0.004	0	0	0.006	0.005	0.024
384	0.004	0.026	0.017	0.003	0.002	0	0	0.002	0.001	0.02
387	0.002	0.022	0.014	0.002	0	0	0	0.001	0	0.015
390	0	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0.012
393	0	0.014	0.007	0	0	0	0	0	0	0.009
396	0	0.011	0.006	0	0	0	0	0	0	0.007
399	0	0.01	0.004	0	0	0	0	0	0	0.006
402	0	0.008	0.001	0	0	0	0	0	0	0.004
405	0	0.007	0	0	0	0	0	0	0	0.002

---

**Потенциометријске титрације протоновања анјона моксифлоксацина**
**Табела 5П**

Потенциометријска титрација 20 ml 0.5 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина  
у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

<b>ml. NaOH</b>	<b>pH</b>	<b>a</b>
0.00	2.186	-14.050
0.10	2.221	-13.050
0.20	2.260	-12.050
0.30	2.297	-11.050
0.40	2.344	-10.050
0.50	2.394	-9.050
0.60	2.453	-8.050
0.70	2.520	-7.050
0.80	2.600	-6.050
0.85	2.645	-5.550
0.90	2.696	-5.050
0.95	2.754	-4.550
1.00	2.818	-4.050
1.05	2.897	-3.550
1.10	2.997	-3.050
1.15	3.122	-2.550
1.18	3.223	-2.250
1.20	3.298	-2.050
1.22	3.398	-1.850
1.23	3.458	-1.750
1.24	3.524	-1.650
1.25	3.611	-1.550
1.26	3.712	-1.450
1.27	3.817	-1.400
1.27	3.861	-1.350
1.28	3.930	-1.300
1.28	4.067	-1.250
1.29	4.194	-1.200
1.29	4.386	-1.150
1.29	4.513	-1.110
1.30	4.719	-1.070
1.30	4.811	-1.050
1.30	4.988	-1.030
1.30	5.047	-1.010
1.31	5.115	-0.990
1.31	5.218	-0.970
1.31	5.494	-0.930
1.31	5.563	-0.910
1.32	5.629	-0.890
1.32	5.698	-0.870
1.32	5.774	-0.830

---

1.33	5.857	-0.790
1.33	5.940	-0.750
1.33	6.006	-0.710
1.34	6.111	-0.670
1.34	6.183	-0.630
1.35	6.261	-0.570
1.35	6.342	-0.530
1.36	6.408	-0.490
1.36	6.482	-0.450
1.37	6.596	-0.390
1.37	6.719	-0.350
1.38	6.846	-0.290
1.38	6.990	-0.250
1.39	7.196	-0.190
1.39	7.424	-0.150
1.39	7.512	-0.130
1.39	7.640	-0.110
1.40	7.733	-0.090
1.40	7.819	-0.070
1.40	7.929	-0.050
1.40	7.999	-0.030
1.40	8.163	-0.010
1.41	8.256	0.030
1.41	8.320	0.050
1.41	8.394	0.090
1.42	8.511	0.150
1.42	8.594	0.190
1.43	8.676	0.250
1.44	8.783	0.310
1.44	8.859	0.370
1.45	8.966	0.450
1.46	9.045	0.510
1.46	9.135	0.590
1.47	9.197	0.650
1.48	9.305	0.750
1.49	9.407	0.850
1.50	9.501	0.950
1.60	10.076	1.950
1.61	10.161	2.050
1.62	10.220	2.150
1.63	10.265	2.250
1.64	10.306	2.350
1.65	10.343	2.450
1.66	10.382	2.550
1.67	10.407	2.650

---

Табела 6П

Потенциометријска титрација 20 ml 1 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина  
у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml.NaOH	pH	a
0.00	2.273	-6.321
0.10	2.314	-5.821
0.20	2.363	-5.321
0.30	2.415	-4.821
0.40	2.476	-4.321
0.50	2.547	-3.821
0.60	2.634	-3.321
0.70	2.740	-2.821
0.75	2.808	-2.571
0.80	2.884	-2.321
0.85	2.978	-2.071
0.90	3.098	-1.821
0.92	3.158	-1.721
0.94	3.225	-1.621
0.96	3.305	-1.521
0.98	3.401	-1.421
0.99	3.455	-1.371
1.00	3.521	-1.321
1.01	3.599	-1.271
1.02	3.639	-1.246
1.02	3.698	-1.221
1.03	3.747	-1.196
1.03	3.803	-1.171
1.04	3.883	-1.146
1.04	3.949	-1.121
1.05	4.058	-1.096
1.05	4.151	-1.071
1.06	4.271	-1.046
1.06	4.349	-1.031
1.06	4.447	-1.021
1.06	4.611	-1.011
1.06	4.657	-1.001
1.07	4.716	-0.991
1.07	4.787	-0.981
1.07	4.875	-0.971
1.07	4.927	-0.961
1.07	4.988	-0.951
1.08	5.046	-0.941
1.08	5.103	-0.931
1.08	5.152	-0.921
1.08	5.203	-0.911
1.08	5.252	-0.901
1.09	5.291	-0.891

---

1.09	5.326	-0.881
1.09	5.367	-0.871
1.09	5.438	-0.851
1.10	5.492	-0.831
1.10	5.583	-0.801
1.11	5.661	-0.771
1.12	5.779	-0.721
1.13	5.842	-0.691
1.13	5.914	-0.661
1.14	5.991	-0.621
1.15	6.060	-0.581
1.16	6.168	-0.521
1.17	6.259	-0.471
1.18	6.349	-0.421
1.19	6.447	-0.371
1.20	6.550	-0.321
1.21	6.665	-0.271
1.22	6.793	-0.221
1.23	6.917	-0.181
1.23	7.022	-0.151
1.24	7.153	-0.121
1.24	7.255	-0.101
1.25	7.368	-0.081
1.25	7.500	-0.061
1.25	7.576	-0.051
1.26	7.618	-0.041
1.26	7.683	-0.031
1.26	7.747	-0.021
1.26	7.803	-0.011
1.26	7.870	-0.001
1.27	7.926	0.009
1.27	7.980	0.019
1.27	8.027	0.029
1.27	8.129	0.049
1.28	8.220	0.069
1.28	8.308	0.099
1.29	8.398	0.129
1.29	8.453	0.149
1.30	8.531	0.179
1.31	8.622	0.219
1.32	8.729	0.269
1.33	8.802	0.309
1.33	8.873	0.349
1.34	8.954	0.399
1.36	9.042	0.459
1.37	9.128	0.519
1.38	9.211	0.579
1.39	9.277	0.629

---

---

1.40	9.342	0.679
1.41	9.403	0.729
1.42	9.469	0.779
1.43	9.535	0.829
1.44	9.598	0.879
1.45	9.664	0.929

---

Табела 7П

Потенциометријска титрација 20 ml 1.5 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина  
у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

<b>ml.NaOH</b>	<b>pH</b>	<b>a</b>
0.00	2.252	-4.733
0.05	2.272	-4.567
0.10	2.292	-4.400
0.15	2.312	-4.233
0.20	2.336	-4.067
0.25	2.360	-3.900
0.30	2.385	-3.733
0.35	2.412	-3.567
0.40	2.443	-3.400
0.45	2.473	-3.233
0.50	2.507	-3.067
0.55	2.544	-2.900
0.60	2.585	-2.733
0.65	2.628	-2.567
0.70	2.677	-2.400
0.75	2.733	-2.233
0.80	2.799	-2.067
0.85	2.874	-1.900
0.88	2.914	-1.817
0.90	2.965	-1.733
0.92	3.005	-1.667
0.94	3.054	-1.600
0.96	3.103	-1.533
0.98	3.166	-1.467
1.00	3.235	-1.400
1.02	3.316	-1.333
1.03	3.364	-1.300
1.04	3.416	-1.267
1.05	3.477	-1.233
1.06	3.548	-1.200
1.07	3.633	-1.167
1.08	3.685	-1.150
1.08	3.739	-1.133
1.09	3.805	-1.117
1.09	3.876	-1.100
1.10	3.964	-1.083

---

---

1.10	4.065	-1.067
1.10	4.114	-1.060
1.10	4.162	-1.053
1.11	4.221	-1.047
1.11	4.282	-1.040
1.11	4.353	-1.033
1.11	4.429	-1.027
1.11	4.515	-1.020
1.12	4.611	-1.013
1.12	4.686	-1.007
1.12	4.757	-1.000
1.12	4.824	-0.993
1.12	4.883	-0.987
1.13	4.946	-0.980
1.13	4.997	-0.973
1.13	5.051	-0.967
1.13	5.132	-0.953
1.14	5.206	-0.940
1.14	5.274	-0.927
1.15	5.333	-0.913
1.15	5.385	-0.900
1.15	5.431	-0.887
1.16	5.480	-0.873
1.16	5.543	-0.853
1.17	5.600	-0.833
1.17	5.641	-0.820
1.18	5.691	-0.800
1.19	5.742	-0.780
1.19	5.800	-0.753
1.20	5.845	-0.733
1.21	5.901	-0.707
1.22	5.977	-0.667
1.23	6.041	-0.633
1.24	6.095	-0.600
1.25	6.156	-0.567
1.26	6.219	-0.533
1.27	6.280	-0.500
1.28	6.340	-0.467
1.29	6.400	-0.433
1.30	6.467	-0.400
1.31	6.537	-0.367
1.32	6.606	-0.333
1.33	6.677	-0.300
1.34	6.719	-0.283
1.34	6.760	-0.267
1.35	6.804	-0.250
1.35	6.849	-0.233
1.36	6.898	-0.217

---



---

1.36	6.949	-0.200
1.37	7.001	-0.183
1.37	7.062	-0.167
1.38	7.130	-0.150
1.38	7.203	-0.133
1.39	7.292	-0.117
1.39	7.366	-0.103
1.39	7.410	-0.097
1.39	7.449	-0.090
1.40	7.495	-0.083
1.40	7.630	-0.077
1.40	7.649	-0.067
1.40	7.696	-0.060
1.40	7.747	-0.053
1.41	7.794	-0.047
1.41	7.848	-0.040
1.41	7.887	-0.033
1.41	7.989	-0.020
1.42	8.032	-0.013
1.42	8.071	-0.007
1.42	8.105	0.000
1.42	8.144	0.007
1.42	8.180	0.013
1.43	8.208	0.020
1.43	8.235	0.027
1.43	8.274	0.033
1.43	8.303	0.040
1.44	8.359	0.053
1.44	8.406	0.067
1.44	8.457	0.080
1.45	8.509	0.100
1.46	8.580	0.127
1.47	8.685	0.167
1.48	8.756	0.200
1.49	8.824	0.233
1.50	8.884	0.267
1.51	8.950	0.300
1.52	9.006	0.333
1.53	9.060	0.367
1.54	9.111	0.400
1.55	9.160	0.433
1.56	9.211	0.467
1.57	9.258	0.500
1.58	9.304	0.533
1.59	9.348	0.567
1.60	9.397	0.600
1.61	9.447	0.633
1.62	9.484	0.667

---

1.63	9.533	0.700
1.64	9.577	0.733
1.65	9.620	0.767
1.66	9.659	0.800
1.67	9.699	0.833
1.68	9.750	0.867
1.69	9.795	0.900

### Апсорпциони спектри протоновања анјона моксифлоксацина

Табела 8П

Апсорпциони спектри моксифлоксацина у UV-VIS области.  
 $C_{\text{моxi}}=5.35 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  у  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ LiCl}$  средини на 298 К

Апсорбанција													
рН	1.800	3.666	4.817	5.688	7.033	7.870	8.835	10.284	11.870	6.022	6.311	8.323	9.400
$\lambda(\text{nm})$													
320	0.593	0.592	0.583	0.579	0.563	0.583	0.588	0.523	0.527	0.588	0.593	0.603	0.566
322	0.598	0.598	0.590	0.592	0.594	0.617	0.625	0.550	0.553	0.609	0.617	0.641	0.599
324	0.604	0.604	0.596	0.605	0.624	0.652	0.663	0.576	0.579	0.629	0.642	0.679	0.633
326	0.607	0.606	0.600	0.615	0.651	0.683	0.698	0.600	0.601	0.647	0.663	0.714	0.663
328	0.605	0.604	0.598	0.620	0.674	0.710	0.728	0.620	0.620	0.660	0.679	0.744	0.690
330	0.602	0.602	0.597	0.625	0.695	0.734	0.755	0.642	0.641	0.671	0.693	0.771	0.715
332	0.600	0.599	0.595	0.629	0.714	0.757	0.780	0.666	0.666	0.681	0.707	0.795	0.739
334	0.597	0.597	0.593	0.632	0.731	0.777	0.803	0.691	0.693	0.690	0.718	0.818	0.764
336	0.592	0.592	0.589	0.632	0.743	0.792	0.821	0.711	0.715	0.695	0.726	0.835	0.783
338	0.584	0.584	0.582	0.628	0.747	0.799	0.829	0.720	0.725	0.694	0.727	0.842	0.790
340	0.575	0.574	0.572	0.619	0.741	0.792	0.824	0.714	0.720	0.685	0.718	0.835	0.784
342	0.564	0.563	0.561	0.605	0.722	0.772	0.802	0.697	0.703	0.669	0.701	0.813	0.764
344	0.556	0.555	0.552	0.590	0.694	0.741	0.769	0.675	0.683	0.649	0.677	0.778	0.735
346	0.552	0.550	0.546	0.575	0.658	0.701	0.727	0.653	0.666	0.626	0.649	0.735	0.702
348	0.550	0.548	0.543	0.563	0.622	0.658	0.682	0.636	0.655	0.604	0.621	0.689	0.670
350	0.552	0.550	0.543	0.553	0.586	0.616	0.638	0.623	0.651	0.583	0.595	0.643	0.641
352	0.555	0.553	0.544	0.545	0.552	0.577	0.596	0.615	0.652	0.564	0.571	0.601	0.615
354	0.558	0.556	0.546	0.539	0.521	0.540	0.558	0.610	0.657	0.547	0.549	0.561	0.592
356	0.560	0.558	0.548	0.533	0.492	0.506	0.522	0.606	0.662	0.531	0.528	0.523	0.571
358	0.561	0.559	0.548	0.527	0.465	0.473	0.488	0.602	0.666	0.515	0.509	0.487	0.551
360	0.560	0.558	0.546	0.519	0.437	0.441	0.454	0.596	0.668	0.497	0.488	0.451	0.529
362	0.556	0.554	0.542	0.509	0.409	0.409	0.420	0.587	0.665	0.479	0.466	0.416	0.506
364	0.549	0.547	0.534	0.497	0.380	0.376	0.386	0.574	0.658	0.458	0.443	0.380	0.482
366	0.539	0.537	0.524	0.483	0.352	0.343	0.351	0.558	0.646	0.436	0.419	0.344	0.455
368	0.526	0.523	0.510	0.467	0.323	0.311	0.317	0.538	0.629	0.413	0.394	0.309	0.427
370	0.509	0.507	0.494	0.449	0.294	0.279	0.283	0.514	0.607	0.389	0.368	0.274	0.397
372	0.490	0.488	0.475	0.429	0.266	0.249	0.251	0.487	0.579	0.364	0.342	0.241	0.366
374	0.469	0.466	0.454	0.407	0.239	0.220	0.220	0.457	0.548	0.338	0.316	0.210	0.335
376	0.446	0.443	0.432	0.385	0.214	0.194	0.192	0.426	0.513	0.313	0.291	0.181	0.304
378	0.421	0.418	0.407	0.362	0.191	0.169	0.165	0.392	0.476	0.288	0.266	0.155	0.274
380	0.395	0.392	0.381	0.338	0.169	0.147	0.141	0.357	0.436	0.264	0.243	0.131	0.244
382	0.368	0.364	0.355	0.313	0.149	0.127	0.119	0.322	0.395	0.240	0.220	0.110	0.216
384	0.338	0.334	0.326	0.287	0.130	0.109	0.099	0.285	0.351	0.216	0.197	0.090	0.187
386	0.311	0.307	0.299	0.263	0.113	0.093	0.082	0.251	0.311	0.195	0.177	0.074	0.162
388	0.285	0.281	0.274	0.240	0.099	0.080	0.068	0.220	0.272	0.175	0.159	0.061	0.139
390	0.260	0.255	0.249	0.218	0.087	0.069	0.056	0.190	0.236	0.157	0.142	0.050	0.119
392	0.236	0.230	0.225	0.197	0.076	0.060	0.046	0.163	0.202	0.140	0.126	0.041	0.100

394	0.213	0.207	0.203	0.177	0.066	0.052	0.037	0.138	0.172	0.125	0.112	0.033	0.084
396	0.192	0.186	0.182	0.159	0.057	0.045	0.030	0.116	0.144	0.111	0.099	0.027	0.070
398	0.172	0.165	0.162	0.141	0.050	0.040	0.024	0.097	0.120	0.098	0.088	0.022	0.057
400	0.153	0.147	0.143	0.125	0.043	0.035	0.020	0.080	0.098	0.086	0.077	0.018	0.047
402	0.136	0.129	0.126	0.109	0.037	0.031	0.016	0.065	0.080	0.076	0.068	0.015	0.038
404	0.121	0.114	0.111	0.096	0.032	0.028	0.013	0.053	0.064	0.066	0.059	0.012	0.031
406	0.107	0.100	0.097	0.083	0.028	0.025	0.010	0.043	0.051	0.058	0.051	0.010	0.025
408	0.094	0.087	0.084	0.072	0.024	0.023	0.008	0.034	0.041	0.050	0.045	0.008	0.020
410	0.083	0.075	0.073	0.062	0.021	0.021	0.007	0.027	0.032	0.044	0.039	0.007	0.016
412	0.072	0.065	0.063	0.053	0.018	0.019	0.006	0.022	0.025	0.038	0.033	0.006	0.013
414	0.063	0.056	0.054	0.045	0.015	0.018	0.005	0.018	0.020	0.032	0.028	0.005	0.010
416	0.054	0.047	0.046	0.038	0.013	0.017	0.004	0.014	0.015	0.028	0.024	0.005	0.008
418	0.047	0.040	0.039	0.032	0.011	0.016	0.003	0.011	0.012	0.024	0.021	0.004	0.007
420	0.040	0.034	0.033	0.026	0.010	0.015	0.003	0.009	0.009	0.020	0.017	0.003	0.005
422	0.035	0.029	0.027	0.021	0.008	0.014	0.002	0.007	0.007	0.017	0.015	0.003	0.005
424	0.030	0.024	0.023	0.018	0.007	0.014	0.002	0.006	0.006	0.014	0.012	0.003	0.004
426	0.025	0.020	0.019	0.014	0.006	0.013	0.002	0.005	0.004	0.012	0.010	0.003	0.003
428	0.021	0.016	0.015	0.011	0.005	0.013	0.002	0.004	0.004	0.010	0.009	0.002	0.003
430	0.018	0.013	0.012	0.009	0.004	0.013	0.001	0.004	0.003	0.008	0.007	0.002	0.002
432	0.015	0.011	0.010	0.007	0.004	0.012	0.001	0.003	0.002	0.007	0.006	0.002	0.002
434	0.013	0.009	0.008	0.005	0.003	0.012	0.001	0.003	0.002	0.006	0.005	0.002	0.002
436	0.011	0.007	0.006	0.004	0.003	0.012	0.001	0.003	0.002	0.005	0.004	0.002	0.002
438	0.009	0.005	0.005	0.003	0.003	0.012	0.001	0.002	0.001	0.005	0.004	0.002	0.002
440	0.008	0.004	0.004	0.002	0.002	0.011	0.001	0.002	0.001	0.004	0.003	0.002	0.002

### Потенциометријске титрације хидролизе $Gd^{3+}$ -јона

Табела 9П

Потенциометријска титрација 20 ml 0.99 mmol/dm<sup>3</sup>  $Gd^{3+}$   
са 0.1983 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	F	H	h	Z
0.000	2.786	0.0327	1.510	1.510	0.000
0.005	2.802	0.0316	1.460	1.455	-0.005
0.010	2.817	0.0305	1.410	1.406	-0.004
0.015	2.835	0.0293	1.360	1.349	-0.011
0.020	2.850	0.0283	1.310	1.303	-0.007
0.025	2.875	0.0267	1.261	1.259	-0.002
0.030	2.891	0.0257	1.211	1.213	0.003
0.035	2.908	0.0248	1.161	1.167	0.006
0.040	2.927	0.0237	1.111	1.117	0.006
0.045	2.948	0.0226	1.061	1.064	0.003
0.050	2.969	0.0215	1.012	1.014	0.002
0.055	2.990	0.0205	0.962	0.966	0.004
0.060	3.013	0.0195	0.912	0.916	0.004
0.065	3.044	0.0181	0.863	0.853	-0.010
0.070	3.075	0.0169	0.813	0.794	-0.019
0.075	3.100	0.0159	0.764	0.750	-0.014
0.080	3.130	0.0149	0.714	0.700	-0.014
0.085	3.148	0.0143	0.664	0.671	0.007
0.090	3.193	0.0129	0.615	0.605	-0.010
0.095	3.229	0.0119	0.565	0.557	-0.008
0.100	3.270	0.0108	0.516	0.507	-0.009
0.105	3.315	0.0097	0.466	0.457	-0.009

0.110	3.362	0.0087	0.417	0.410	-0.007
0.115	3.420	0.0076	0.368	0.359	-0.009
0.120	3.480	0.0067	0.318	0.313	-0.006
0.125	3.563	0.0055	0.269	0.258	-0.011
0.130	3.629	0.0047	0.220	0.222	0.002
0.135	3.727	0.0038	0.170	0.177	0.007
0.140	3.835	0.0029	0.121	0.138	0.017
0.145	3.972	0.0021	0.072	0.101	0.029
0.150	4.140	0.0015	0.023	0.068	0.046
0.155	4.390	0.0008	-0.027	0.038	0.066
0.160	4.917	0.0002	-0.076	0.011	0.088
0.165	5.805	0.0000	-0.125	0.001	0.128
0.170	6.650	0.0000	-0.174	0.000	0.176

Табела 10П

Потенциометријска титрација 20 ml 2.53 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>  
са 0.1983 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	F	H	h	Z
0.000	2.370	0.0853	4.230	4.236	0.003
0.020	2.391	0.0814	4.028	4.036	0.003
0.040	2.414	0.0772	3.826	3.828	0.001
0.060	2.435	0.0737	3.624	3.648	0.009
0.080	2.460	0.0696	3.423	3.443	0.008
0.100	2.488	0.0653	3.222	3.228	0.002
0.120	2.515	0.0615	3.022	3.034	0.005
0.140	2.546	0.0573	2.822	2.825	0.001
0.160	2.577	0.0534	2.623	2.630	0.003
0.180	2.611	0.0494	2.423	2.432	0.003
0.200	2.649	0.0453	2.225	2.228	0.001
0.220	2.693	0.0410	2.026	2.014	-0.005
0.240	2.738	0.0370	1.828	1.816	-0.005
0.260	2.787	0.0331	1.631	1.622	-0.004
0.280	2.843	0.0291	1.434	1.426	-0.003
0.300	2.910	0.0250	1.237	1.222	-0.006
0.320	2.982	0.0212	1.041	1.035	-0.002
0.340	3.072	0.0172	0.845	0.841	-0.001
0.370	3.257	0.0113	0.551	0.550	-0.001
0.380	3.334	0.0094	0.454	0.460	0.003
0.390	3.425	0.0077	0.356	0.373	0.007
0.400	3.560	0.0056	0.259	0.274	0.006
0.405	3.631	0.0048	0.210	0.232	0.009
0.410	3.697	0.0041	0.162	0.200	0.015
0.415	3.779	0.0034	0.113	0.165	0.021
0.420	3.900	0.0026	0.064	0.125	0.024
0.425	4.014	0.0020	0.016	0.096	0.032
0.430	4.167	0.0014	-0.033	0.068	0.040
0.435	4.352	0.0009	-0.081	0.044	0.050
0.440	4.600	0.0005	-0.130	0.025	0.061

Табела 11П

Потенциометријска титрација 20 ml 4.95 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>  
са 0.1983 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	F	H	h	Z
0.000	2.047	0.1795	8.510	8.570	0.012
0.050	2.075	0.1687	7.994	8.035	0.008
0.100	2.104	0.1582	7.481	7.516	0.007
0.150	2.136	0.1473	6.970	6.982	0.002
0.200	2.169	0.1369	6.462	6.471	0.002
0.250	2.204	0.1266	5.957	5.970	0.003
0.300	2.243	0.1160	5.454	5.458	0.001
0.350	2.284	0.1058	4.953	4.966	0.003
0.400	2.332	0.0950	4.455	4.446	-0.002
0.450	2.384	0.0845	3.959	3.945	-0.003
0.500	2.440	0.0744	3.466	3.467	0.000
0.550	2.507	0.0639	2.975	2.972	-0.001
0.600	2.587	0.0533	2.486	2.472	-0.003
0.650	2.681	0.0430	2.000	1.991	-0.002
0.700	2.801	0.0327	1.516	1.510	-0.001
0.720	2.856	0.0289	1.324	1.330	0.001
0.740	2.927	0.0245	1.131	1.130	0.000
0.760	3.002	0.0207	0.939	0.951	0.002
0.780	3.094	0.0167	0.747	0.769	0.004
0.800	3.212	0.0128	0.556	0.586	0.006
0.820	3.366	0.0090	0.365	0.396	0.006
0.830	3.432	0.0077	0.269	0.004	-0.054
0.840	3.513	0.0064	0.174	0.207	0.007
0.850	3.590	0.0054	0.079	0.166	0.018
0.860	3.669	0.0045	-0.016	0.122	0.028
0.870	3.764	0.0036	-0.111	0.089	0.040
0.880	4.200	0.0013	-0.206	0.060	0.054

### Потенциометријске титрације комплексирања система Al<sup>3+</sup>-офлоксацин

Табела 12П

Потенциометријска титрација 25.0 ml 0.498 mmol/dm<sup>3</sup> Al<sup>3+</sup>-јона + 2.49 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина + 0.047 mmol/dm<sup>3</sup> HCl са 0.091 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	6.626	-0.02	4.81	0.23
0.010	6.653	0.00	4.78	0.27
0.020	6.717	0.01	4.72	0.30
0.030	6.776	0.03	4.66	0.33
0.040	6.837	0.04	4.60	0.36
0.050	6.886	0.05	4.55	0.41
0.060	6.943	0.07	4.50	0.45
0.070	6.992	0.08	4.45	0.49
0.080	7.045	0.10	4.40	0.54
0.090	7.090	0.11	4.36	0.59
0.100	7.137	0.13	4.32	0.64

0.110	7.179	0.14	4.28	0.70
0.120	7.223	0.16	4.25	0.75
0.130	7.263	0.17	4.21	0.80
0.140	7.303	0.19	4.18	0.86
0.150	7.339	0.20	4.15	0.92
0.160	7.377	0.21	4.12	0.97
0.170	7.411	0.23	4.09	1.03
0.180	7.444	0.24	4.07	1.09
0.210	7.538	0.29	4.00	1.27
0.240	7.622	0.33	3.94	1.45
0.250	7.648	0.35	3.92	1.51
0.260	7.671	0.36	3.91	1.58
0.280	7.720	0.39	3.88	1.70
0.300	7.766	0.42	3.86	1.83
0.320	7.810	0.45	3.83	1.96
0.340	7.849	0.48	3.82	2.09
0.360	7.890	0.51	3.80	2.22
0.380	7.930	0.53	3.79	2.36
0.400	7.968	0.56	3.78	2.49
0.440	8.038	0.62	3.77	2.78
0.480	8.102	0.68	3.78	3.07
0.520	8.153	0.74	3.82	3.39
0.540	8.175	0.77	3.85	3.56
0.560	8.204	0.80	3.88	3.72
0.580	8.234	0.83	3.91	3.89
0.600	8.260	0.86	3.97	4.06
0.620	8.285	0.88	4.04	4.24
0.640	8.311	0.91	4.14	4.43
0.660	8.336	0.94	4.30	4.62
0.680	8.362	0.97	4.58	4.81

Табела 13II

Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.995 mmol/dm<sup>3</sup> Al<sup>3+</sup>-јона + 2.478 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина + 0.093 mmol/dm<sup>3</sup> HCl са 0.0907 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	5.096	-0.04	7.07	1.00
0.010	5.215	-0.02	6.86	0.98
0.020	5.468	0.00	6.43	0.87
0.030	5.687	0.02	6.08	0.75
0.040	5.847	0.04	5.84	0.68
0.050	5.978	0.05	5.66	0.62
0.060	6.058	0.07	5.56	0.61
0.070	6.127	0.09	5.47	0.60
0.080	6.191	0.11	5.40	0.60
0.090	6.241	0.13	5.34	0.62
0.100	6.287	0.15	5.29	0.63
0.110	6.338	0.16	5.24	0.65
0.120	6.387	0.18	5.19	0.67
0.130	6.440	0.20	5.13	0.69
0.140	6.487	0.22	5.09	0.71
0.150	6.341	0.24	5.27	0.81

0.160	6.590	0.26	4.99	0.76
0.170	6.636	0.27	4.95	0.79
0.180	6.687	0.29	4.90	0.82
0.190	6.734	0.31	4.86	0.85
0.200	6.780	0.33	4.82	0.89
0.210	6.827	0.35	4.78	0.92
0.220	6.871	0.37	4.75	0.96
0.230	6.913	0.38	4.72	0.99
0.240	6.955	0.40	4.68	1.03
0.250	6.993	0.42	4.66	1.07
0.260	7.029	0.44	4.63	1.11
0.270	7.067	0.46	4.61	1.15
0.280	7.102	0.47	4.59	1.19
0.290	7.140	0.49	4.56	1.23
0.300	7.173	0.51	4.54	1.27
0.310	7.204	0.53	4.53	1.31
0.320	7.236	0.55	4.51	1.35
0.330	7.267	0.57	4.50	1.40
0.340	7.299	0.58	4.48	1.44
0.350	7.329	0.60	4.47	1.48
0.360	7.357	0.62	4.46	1.53
0.370	7.386	0.64	4.46	1.57
0.380	7.414	0.66	4.45	1.61
0.390	7.438	0.68	4.45	1.66
0.400	7.463	0.69	4.45	1.70
0.410	7.488	0.71	4.45	1.75
0.420	7.511	0.73	4.46	1.79
0.430	7.536	0.75	4.46	1.84
0.440	7.560	0.77	4.47	1.88
0.450	7.585	0.79	4.48	1.93
0.460	7.608	0.80	4.50	1.97
0.470	7.629	0.82	4.52	2.02
0.480	7.654	0.84	4.54	2.07
0.490	7.676	0.86	4.57	2.11
0.500	7.697	0.88	4.61	2.16
0.510	7.720	0.90	4.66	2.21
0.520	7.741	0.91	4.72	2.26
0.530	7.762	0.93	4.80	2.31
0.540	7.783	0.95	4.92	2.36
0.550	7.804	0.97	5.10	2.41
0.560	7.826	0.99	5.47	2.46

Табела 14П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.99 mmol/dm<sup>3</sup> Al<sup>3+</sup>-јона + 2.453 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина + 0.186 mmol/dm<sup>3</sup> HCl са 0.0907 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	3.943	-0.08	9.32	0.59
0.010	4.006	-0.06	9.20	0.60
0.020	4.135	-0.04	8.95	0.60
0.030	4.271	-0.02	8.68	0.60
0.040	4.430	0.00	8.38	0.60

---

0.050	4.563	0.02	8.12	0.60
0.060	4.658	0.04	7.94	0.61
0.070	4.730	0.05	7.81	0.61
0.080	4.789	0.07	7.71	0.62
0.090	4.839	0.09	7.62	0.62
0.100	4.869	0.11	7.57	0.63
0.110	4.897	0.13	7.53	0.64
0.120	4.918	0.15	7.50	0.65
0.130	4.934	0.16	7.48	0.66
0.140	4.948	0.18	7.46	0.67
0.150	4.958	0.20	7.45	0.69
0.160	4.968	0.22	7.45	0.70
0.170	4.980	0.24	7.43	0.71
0.180	4.990	0.26	7.43	0.72
0.190	4.998	0.28	7.42	0.73
0.200	5.009	0.29	7.41	0.74
0.210	5.021	0.31	7.40	0.75
0.220	5.033	0.33	7.39	0.77
0.230	5.048	0.35	7.38	0.78
0.240	5.062	0.37	7.36	0.79
0.250	5.075	0.39	7.35	0.80
0.260	5.088	0.40	7.34	0.81
0.270	5.100	0.42	7.33	0.82
0.280	5.113	0.44	7.32	0.84
0.290	5.126	0.46	7.31	0.85
0.300	5.137	0.48	7.31	0.86
0.310	5.150	0.50	7.30	0.87
0.320	5.166	0.52	7.29	0.88
0.330	5.182	0.53	7.28	0.89
0.340	5.196	0.55	7.27	0.91
0.350	5.209	0.57	7.26	0.92
0.360	5.223	0.59	7.26	0.93
0.370	5.241	0.61	7.25	0.94
0.380	5.262	0.63	7.23	0.96
0.390	5.284	0.65	7.21	0.97
0.400	5.301	0.66	7.21	0.98
0.410	5.321	0.68	7.20	0.99
0.420	5.342	0.70	7.19	1.00
0.430	5.362	0.72	7.18	1.02
0.440	5.382	0.74	7.17	1.03
0.450	5.402	0.76	7.17	1.04
0.460	5.422	0.77	7.17	1.06
0.470	5.442	0.79	7.17	1.07
0.480	5.463	0.81	7.18	1.08
0.490	5.485	0.83	7.19	1.10
0.500	5.509	0.85	7.20	1.11
0.510	5.529	0.87	7.22	1.12
0.520	5.553	0.89	7.25	1.14
0.530	5.577	0.90	7.28	1.15
0.540	5.610	0.92	7.32	1.17
0.550	5.637	0.94	7.40	1.18
0.560	5.667	0.96	7.52	1.20

---



---

0.570	5.695	0.98	7.75	1.21
0.580	5.725	1.00	8.59	1.23

---

**Потенциометријске титрације комплексирања система  $Gd^{3+}$ -офлоксацин**

**Табела 15П**

Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm<sup>3</sup>  $Gd^{3+}$  и 1.0 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	2.279	-5.266	12.654	-0.063
0.100	2.323	-4.775	12.568	-0.055
0.200	2.372	-4.284	12.473	-0.047
0.300	2.426	-3.793	12.368	-0.038
0.400	2.488	-3.302	12.249	-0.028
0.500	2.559	-2.811	12.112	-0.017
0.550	2.599	-2.566	12.035	-0.010
0.600	2.642	-2.320	11.952	-0.003
0.650	2.690	-2.075	11.859	0.005
0.700	2.743	-1.829	11.757	0.014
0.750	2.803	-1.584	11.642	0.025
0.800	2.872	-1.338	11.511	0.039
0.850	2.952	-1.093	11.359	0.056
0.900	3.046	-0.847	11.181	0.078
0.920	3.089	-0.749	11.099	0.089
0.940	3.136	-0.651	11.012	0.102
0.960	3.188	-0.553	10.916	0.117
0.980	3.244	-0.454	10.813	0.135
1.000	3.306	-0.356	10.699	0.155
1.020	3.374	-0.258	10.575	0.180
1.040	3.450	-0.160	10.440	0.209
1.060	3.534	-0.062	10.292	0.243
1.080	3.626	0.037	10.131	0.284
1.100	3.728	0.135	9.958	0.332
1.110	3.783	0.184	9.866	0.359
1.120	3.840	0.233	9.772	0.387
1.130	3.900	0.282	9.674	0.417
1.140	3.963	0.331	9.573	0.449
1.150	4.029	0.380	9.469	0.483
1.160	4.099	0.429	9.362	0.518
1.170	4.172	0.478	9.250	0.555
1.180	4.250	0.528	9.135	0.593
1.190	4.333	0.577	9.014	0.632
1.200	4.423	0.626	8.886	0.673
1.205	4.471	0.650	8.820	0.693
1.210	4.522	0.675	8.751	0.714
1.215	4.575	0.699	8.679	0.735
1.220	4.632	0.724	8.604	0.756

---

1.225	4.692	0.749	8.525	0.777
1.230	4.758	0.773	8.441	0.799
1.235	4.829	0.798	8.352	0.820
1.240	4.908	0.822	8.255	0.842
1.245	4.997	0.847	8.148	0.864
1.250	5.099	0.871	8.028	0.885
1.255	5.220	0.896	7.890	0.907
1.260	5.367	0.920	7.726	0.927
1.263	5.472	0.935	7.611	0.939
1.265	5.551	0.945	7.527	0.946
1.267	5.636	0.955	7.437	0.953
1.269	5.726	0.965	7.342	0.958
1.271	5.818	0.974	7.247	0.963
1.273	5.907	0.984	7.155	0.967
1.275	5.990	0.994	7.069	0.970
1.277	6.066	1.004	6.992	0.973
1.279	6.133	1.014	6.924	0.975
1.281	6.192	1.024	6.864	0.976
1.283	6.245	1.033	6.811	0.977
1.285	6.292	1.043	6.764	0.978
1.287	6.334	1.053	6.722	0.979
1.290	6.389	1.068	6.666	0.979
1.293	6.438	1.082	6.618	0.980
1.296	6.481	1.097	6.576	0.981
1.299	6.519	1.112	6.538	0.981
1.302	6.554	1.127	6.504	0.981
1.305	6.585	1.141	6.473	0.982
1.310	6.633	1.166	6.426	0.982
1.315	6.674	1.190	6.386	0.982
1.320	6.712	1.215	6.350	0.983
1.330	6.777	1.264	6.287	0.983
1.340	6.834	1.313	6.234	0.983
1.350	6.883	1.362	6.188	0.984
1.370	6.968	1.461	6.110	0.984
1.390	7.041	1.559	6.045	0.985
1.410	7.106	1.657	5.988	0.985
1.430	7.167	1.755	5.938	0.985
1.450	7.225	1.853	5.892	0.986
1.470	7.281	1.952	5.849	0.986
1.490	7.338	2.050	5.809	0.986
1.530	7.455	2.246	5.734	0.987
1.570	7.590	2.443	5.662	0.989
1.610	7.772	2.639	5.591	0.990
1.650	8.103	2.835	5.520	0.993
1.690	9.325	3.032	5.596	0.997
1.730	10.012	3.228	5.838	0.999
1.790	10.387	3.523	6.006	0.999
1.810	10.466	3.621	6.043	0.999

---

1.820	10.501	3.670	6.059	0.999
1.830	10.533	3.719	6.074	0.999
1.840	10.563	3.768	6.089	0.999
1.850	10.592	3.817	6.102	0.999
1.860	10.618	3.866	6.115	0.999

Табела 16П

Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> и 2.0 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	2.325	-2.365	12.260	-0.121
0.100	2.374	-2.120	12.165	-0.104
0.200	2.429	-1.874	12.060	-0.086
0.300	2.491	-1.629	11.940	-0.067
0.400	2.561	-1.383	11.804	-0.044
0.500	2.644	-1.138	11.644	-0.017
0.550	2.692	-1.015	11.552	-0.002
0.600	2.744	-0.892	11.451	0.016
0.650	2.803	-0.769	11.339	0.037
0.700	2.869	-0.647	11.212	0.062
0.750	2.944	-0.524	11.068	0.092
0.760	2.961	-0.499	11.037	0.099
0.770	2.978	-0.475	11.005	0.107
0.800	3.032	-0.401	10.902	0.131
0.820	3.071	-0.352	10.829	0.149
0.840	3.112	-0.303	10.750	0.170
0.850	3.134	-0.278	10.709	0.181
0.860	3.157	-0.254	10.667	0.193
0.870	3.180	-0.229	10.623	0.206
0.880	3.205	-0.205	10.578	0.219
0.890	3.230	-0.180	10.531	0.233
0.900	3.256	-0.156	10.483	0.248
0.910	3.282	-0.131	10.433	0.264
0.920	3.310	-0.107	10.382	0.281
0.930	3.339	-0.082	10.329	0.299
0.940	3.368	-0.058	10.275	0.317
0.950	3.399	-0.033	10.219	0.338
0.960	3.431	-0.008	10.162	0.359
0.970	3.463	0.016	10.102	0.381
0.980	3.497	0.041	10.042	0.405
0.990	3.531	0.065	9.980	0.430
1.000	3.567	0.090	9.916	0.456
1.020	3.641	0.139	9.784	0.513
1.040	3.719	0.188	9.647	0.574
1.060	3.801	0.237	9.505	0.641
1.080	3.886	0.286	9.357	0.711
1.100	3.976	0.335	9.205	0.786

---

1.120	4.069	0.384	9.048	0.865
1.130	4.118	0.409	8.967	0.905
1.140	4.167	0.434	8.885	0.946
1.150	4.218	0.458	8.801	0.988
1.160	4.271	0.483	8.716	1.030
1.170	4.325	0.507	8.629	1.073
1.180	4.380	0.532	8.539	1.116
1.190	4.438	0.556	8.448	1.160
1.200	4.497	0.581	8.354	1.204
1.210	4.559	0.605	8.257	1.248
1.220	4.623	0.630	8.158	1.292
1.230	4.690	0.654	8.055	1.337
1.240	4.760	0.679	7.948	1.381
1.250	4.834	0.704	7.837	1.426
1.260	4.912	0.728	7.721	1.470
1.270	4.994	0.753	7.600	1.514
1.280	5.082	0.777	7.473	1.558
1.285	5.129	0.789	7.407	1.580
1.290	5.177	0.802	7.339	1.601
1.295	5.228	0.814	7.268	1.623
1.300	5.281	0.826	7.196	1.644
1.305	5.336	0.839	7.120	1.665
1.310	5.394	0.851	7.042	1.686
1.315	5.455	0.863	6.961	1.706
1.320	5.520	0.875	6.877	1.726
1.325	5.589	0.888	6.789	1.746
1.330	5.662	0.900	6.697	1.765
1.335	5.740	0.912	6.600	1.783
1.340	5.823	0.925	6.500	1.800
1.345	5.911	0.937	6.397	1.816
1.350	6.002	0.949	6.293	1.830
1.355	6.094	0.961	6.189	1.843
1.360	6.185	0.974	6.090	1.853
1.365	6.270	0.986	5.998	1.862
1.370	6.349	0.998	5.914	1.869
1.375	6.420	1.010	5.841	1.874
1.380	6.483	1.023	5.775	1.878
1.385	6.540	1.035	5.718	1.881
1.390	6.590	1.047	5.667	1.884
1.395	6.636	1.060	5.621	1.886
1.400	6.677	1.072	5.580	1.888
1.405	6.715	1.084	5.542	1.889
1.410	6.749	1.096	5.508	1.890
1.420	6.811	1.121	5.447	1.892
1.430	6.864	1.145	5.393	1.894
1.440	6.912	1.170	5.346	1.895
1.450	6.956	1.195	5.302	1.895
1.460	6.996	1.219	5.263	1.896

---

1.470	7.032	1.244	5.226	1.896
1.480	7.067	1.268	5.191	1.896
1.490	7.099	1.293	5.159	1.896
1.500	7.130	1.317	5.127	1.896
1.510	7.160	1.342	5.098	1.896
1.520	7.188	1.366	5.069	1.896
1.530	7.215	1.391	5.041	1.896
1.540	7.242	1.416	5.014	1.895
1.550	7.268	1.440	4.988	1.895
1.560	7.294	1.465	4.962	1.894
1.570	7.319	1.489	4.937	1.894
1.580	7.343	1.514	4.912	1.894
1.600	7.392	1.563	4.863	1.893
1.625	7.452	1.624	4.803	1.891
1.650	7.513	1.686	4.744	1.890
1.675	7.574	1.747	4.686	1.888
1.700	7.638	1.808	4.628	1.887
1.720	7.691	1.857	4.581	1.885
1.740	7.746	1.907	4.534	1.884
1.760	7.805	1.956	4.488	1.884
1.780	7.867	2.005	4.441	1.883
1.800	7.933	2.054	4.395	1.883
1.820	8.004	2.103	4.350	1.883
1.840	8.081	2.152	4.306	1.884
1.860	8.166	2.201	4.263	1.885
1.870	8.212	2.226	4.242	1.886
1.880	8.261	2.250	4.222	1.887
1.890	8.312	2.275	4.203	1.888
1.900	8.367	2.299	4.184	1.889
1.910	8.425	2.324	4.167	1.890
1.920	8.488	2.348	4.150	1.892
1.930	8.555	2.373	4.134	1.893
1.940	8.626	2.398	4.120	1.895
1.950	8.702	2.422	4.107	1.897
1.960	8.781	2.447	4.096	1.898
1.970	8.864	2.471	4.087	1.900

Табела 17П

Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> и 2.5 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	2.359	-1.752	12.097	-0.146
0.100	2.412	-1.555	11.995	-0.125
0.150	2.440	-1.457	11.939	-0.113
0.200	2.471	-1.359	11.880	-0.101
0.250	2.504	-1.261	11.817	-0.088
0.300	2.538	-1.162	11.750	-0.074

---

0.350	2.576	-1.064	11.677	-0.059
0.400	2.617	-0.966	11.598	-0.043
0.450	2.661	-0.868	11.512	-0.024
0.500	2.710	-0.770	11.418	-0.004
0.550	2.764	-0.671	11.314	0.019
0.600	2.824	-0.573	11.198	0.046
0.650	2.892	-0.475	11.068	0.078
0.700	2.970	-0.377	10.920	0.117
0.750	3.059	-0.279	10.751	0.166
0.800	3.163	-0.180	10.556	0.229
0.820	3.209	-0.141	10.470	0.259
0.840	3.258	-0.102	10.378	0.293
0.860	3.310	-0.063	10.282	0.329
0.880	3.365	-0.023	10.180	0.370
0.900	3.423	0.016	10.073	0.416
0.920	3.484	0.055	9.961	0.465
0.940	3.549	0.095	9.844	0.520
0.960	3.617	0.134	9.722	0.579
0.980	3.687	0.173	9.595	0.642
1.000	3.761	0.212	9.464	0.710
1.020	3.838	0.252	9.328	0.781
1.040	3.918	0.291	9.188	0.857
1.060	4.001	0.330	9.044	0.935
1.080	4.088	0.369	8.894	1.016
1.090	4.133	0.389	8.818	1.057
1.100	4.179	0.409	8.739	1.099
1.110	4.226	0.428	8.660	1.141
1.120	4.274	0.448	8.578	1.184
1.130	4.323	0.468	8.495	1.227
1.140	4.373	0.487	8.410	1.271
1.150	4.425	0.507	8.324	1.314
1.160	4.478	0.527	8.235	1.358
1.170	4.533	0.546	8.143	1.402
1.180	4.590	0.566	8.050	1.446
1.190	4.648	0.586	7.954	1.490
1.200	4.709	0.605	7.855	1.534
1.210	4.771	0.625	7.753	1.577
1.220	4.835	0.644	7.649	1.620
1.230	4.902	0.664	7.542	1.663
1.240	4.971	0.684	7.431	1.706
1.250	5.043	0.703	7.318	1.748
1.260	5.117	0.723	7.202	1.789
1.270	5.194	0.743	7.082	1.829
1.280	5.273	0.762	6.960	1.868
1.290	5.356	0.782	6.835	1.906
1.300	5.442	0.802	6.708	1.943
1.310	5.531	0.821	6.578	1.978
1.320	5.624	0.841	6.446	2.012

---

---

1.330	5.720	0.860	6.312	2.044
1.340	5.821	0.880	6.176	2.074
1.350	5.924	0.900	6.041	2.102
1.360	6.031	0.919	5.907	2.127
1.370	6.139	0.939	5.776	2.149
1.380	6.245	0.959	5.653	2.169
1.390	6.348	0.978	5.539	2.187
1.400	6.443	0.998	5.436	2.201
1.410	6.531	1.018	5.346	2.214
1.420	6.610	1.037	5.268	2.224
1.430	6.680	1.057	5.199	2.233
1.440	6.744	1.077	5.139	2.240
1.450	6.801	1.096	5.086	2.247
1.460	6.853	1.116	5.038	2.252
1.470	6.901	1.135	4.995	2.257
1.480	6.944	1.155	4.956	2.261
1.490	6.985	1.175	4.920	2.265
1.500	7.023	1.194	4.886	2.268
1.520	7.092	1.234	4.825	2.273
1.540	7.154	1.273	4.770	2.276
1.560	7.211	1.312	4.719	2.279
1.580	7.265	1.351	4.671	2.281
1.600	7.316	1.391	4.626	2.282
1.620	7.364	1.430	4.582	2.282
1.640	7.411	1.469	4.540	2.283
1.660	7.457	1.509	4.498	2.283
1.680	7.503	1.548	4.458	2.282
1.700	7.548	1.587	4.418	2.282
1.720	7.593	1.626	4.379	2.281
1.740	7.639	1.666	4.340	2.281
1.760	7.685	1.705	4.302	2.280
1.780	7.731	1.744	4.265	2.279
1.800	7.779	1.784	4.228	2.279
1.820	7.827	1.823	4.191	2.278
1.840	7.878	1.862	4.155	2.278
1.860	7.930	1.901	4.120	2.278
1.880	7.984	1.941	4.086	2.279
1.900	8.040	1.980	4.053	2.280
1.920	8.100	2.019	4.021	2.281
1.940	8.164	2.059	3.989	2.283
1.960	8.232	2.098	3.959	2.285
1.980	8.306	2.137	3.930	2.288
2.000	8.387	2.176	3.902	2.291
2.020	8.478	2.216	3.875	2.295
2.040	8.580	2.255	3.850	2.299
2.060	8.696	2.294	3.826	2.302
2.080	8.827	2.333	3.803	2.305
2.100	8.970	2.373	3.781	2.306

---

2.120	9.120	2.412	3.760	2.305
2.140	9.269	2.451	3.739	2.302

Табела 18II

Потенциометријска титрација 20 ml 1.0 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> и 3.0 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	2.378	-1.395	11.979	-0.173
0.100	2.433	-1.232	11.873	-0.145
0.150	2.463	-1.150	11.815	-0.131
0.200	2.495	-1.068	11.753	-0.116
0.250	2.530	-0.986	11.687	-0.099
0.300	2.566	-0.904	11.615	-0.082
0.350	2.606	-0.823	11.539	-0.063
0.400	2.649	-0.741	11.455	-0.042
0.450	2.697	-0.659	11.364	-0.019
0.500	2.749	-0.577	11.264	0.007
0.550	2.806	-0.495	11.153	0.037
0.600	2.871	-0.413	11.028	0.073
0.650	2.944	-0.332	10.889	0.115
0.700	3.027	-0.250	10.730	0.167
0.750	3.123	-0.168	10.549	0.231
0.780	3.187	-0.119	10.429	0.278
0.810	3.257	-0.070	10.298	0.332
0.840	3.332	-0.021	10.158	0.393
0.860	3.386	0.012	10.058	0.439
0.880	3.442	0.045	9.954	0.489
0.900	3.501	0.078	9.845	0.543
0.920	3.563	0.110	9.732	0.602
0.940	3.628	0.143	9.615	0.664
0.960	3.695	0.176	9.493	0.731
0.980	3.765	0.209	9.367	0.801
1.000	3.838	0.241	9.237	0.874
1.020	3.913	0.274	9.103	0.951
1.040	3.992	0.307	8.963	1.030
1.060	4.073	0.339	8.819	1.112
1.080	4.159	0.372	8.669	1.195
1.100	4.248	0.405	8.513	1.280
1.110	4.294	0.421	8.433	1.323
1.120	4.341	0.438	8.350	1.366
1.130	4.390	0.454	8.266	1.410
1.140	4.440	0.470	8.179	1.453
1.150	4.491	0.487	8.091	1.496
1.160	4.543	0.503	8.000	1.539
1.170	4.597	0.519	7.908	1.583
1.180	4.652	0.536	7.813	1.625
1.190	4.708	0.552	7.716	1.668



---

1.200	4.766	0.569	7.617	1.710
1.210	4.826	0.585	7.515	1.751
1.220	4.886	0.601	7.412	1.792
1.230	4.948	0.618	7.308	1.832
1.240	5.011	0.634	7.201	1.872
1.250	5.076	0.650	7.094	1.910
1.260	5.141	0.667	6.986	1.947
1.270	5.207	0.683	6.878	1.983
1.280	5.273	0.700	6.769	2.018
1.290	5.340	0.716	6.660	2.051
1.300	5.408	0.732	6.552	2.083
1.310	5.476	0.749	6.444	2.113
1.320	5.545	0.765	6.337	2.142
1.330	5.614	0.781	6.230	2.169
1.340	5.684	0.798	6.126	2.194
1.350	5.754	0.814	6.022	2.218
1.360	5.824	0.830	5.920	2.240
1.370	5.894	0.847	5.820	2.261
1.380	5.965	0.863	5.721	2.280
1.390	6.036	0.880	5.625	2.298
1.400	6.106	0.896	5.532	2.314
1.410	6.176	0.912	5.442	2.329
1.420	6.245	0.929	5.355	2.344
1.430	6.313	0.945	5.272	2.357
1.440	6.379	0.961	5.194	2.370
1.450	6.444	0.978	5.120	2.382
1.460	6.505	0.994	5.051	2.393
1.470	6.565	1.010	4.987	2.404
1.480	6.621	1.027	4.927	2.414
1.490	6.675	1.043	4.872	2.424
1.500	6.726	1.060	4.821	2.434
1.510	6.774	1.076	4.773	2.443
1.520	6.820	1.092	4.729	2.451
1.530	6.863	1.109	4.688	2.459
1.540	6.904	1.125	4.650	2.467
1.550	6.944	1.141	4.615	2.474
1.560	6.981	1.158	4.581	2.481
1.570	7.016	1.174	4.549	2.488
1.580	7.051	1.191	4.520	2.494
1.590	7.083	1.207	4.491	2.499
1.600	7.115	1.223	4.464	2.505
1.610	7.145	1.240	4.438	2.509
1.630	7.202	1.272	4.390	2.518

---

Табела 19II

Потенциометријска титрација 20 ml 0.6 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> и 3.0 mmol/dm<sup>3</sup> офлоксацина у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl са 0.0982 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

ml. NaOH	pH	a	(-log oflo)	$\bar{n}$
0.000	2.783	-0.550	11.176	-0.222
0.050	2.848	-0.468	11.048	-0.179
0.100	2.924	-0.386	10.902	-0.128
0.120	2.957	-0.353	10.837	-0.104
0.140	2.993	-0.321	10.768	-0.077
0.160	3.031	-0.288	10.694	-0.049
0.180	3.072	-0.255	10.616	-0.017
0.200	3.115	-0.223	10.531	0.018
0.220	3.162	-0.190	10.441	0.058
0.240	3.213	-0.157	10.344	0.102
0.260	3.267	-0.124	10.239	0.151
0.280	3.326	-0.092	10.127	0.208
0.300	3.390	-0.059	10.006	0.271
0.320	3.458	-0.026	9.876	0.342
0.340	3.532	0.007	9.736	0.422
0.360	3.611	0.039	9.587	0.511
0.380	3.695	0.072	9.427	0.608
0.400	3.786	0.105	9.257	0.715
0.420	3.883	0.138	9.076	0.829
0.430	3.934	0.154	8.980	0.889
0.440	3.987	0.170	8.882	0.951
0.450	4.041	0.187	8.780	1.013
0.460	4.098	0.203	8.675	1.077
0.470	4.156	0.219	8.566	1.142
0.480	4.217	0.236	8.453	1.208
0.490	4.280	0.252	8.335	1.274
0.500	4.345	0.268	8.214	1.341
0.510	4.413	0.285	8.088	1.407
0.520	4.483	0.301	7.958	1.472
0.530	4.555	0.318	7.824	1.536
0.540	4.629	0.334	7.687	1.599
0.550	4.704	0.350	7.548	1.659
0.560	4.780	0.367	7.407	1.717
0.570	4.856	0.383	7.267	1.772
0.580	4.931	0.399	7.127	1.823
0.590	5.006	0.416	6.990	1.871
0.600	5.080	0.432	6.857	1.914
0.610	5.151	0.449	6.727	1.953
0.620	5.221	0.465	6.601	1.988
0.630	5.289	0.481	6.480	2.018
0.640	5.354	0.498	6.363	2.045
0.650	5.418	0.514	6.252	2.067
0.660	5.479	0.530	6.144	2.085

---

0.670	5.539	0.547	6.041	2.100
0.680	5.596	0.563	5.942	2.111
0.690	5.652	0.579	5.848	2.119
0.700	5.707	0.596	5.757	2.124
0.710	5.759	0.612	5.669	2.126
0.720	5.811	0.629	5.585	2.125
0.730	5.861	0.645	5.504	2.123
0.740	5.910	0.661	5.425	2.118
0.750	5.959	0.678	5.349	2.112
0.760	6.006	0.694	5.276	2.105
0.770	6.053	0.710	5.205	2.096
0.780	6.099	0.727	5.136	2.086
0.790	6.144	0.743	5.069	2.076
0.800	6.189	0.759	5.004	2.065
0.810	6.233	0.776	4.941	2.054
0.820	6.278	0.792	4.879	2.042
0.830	6.321	0.809	4.819	2.031
0.840	6.365	0.825	4.760	2.020
0.850	6.409	0.841	4.702	2.010
0.860	6.452	0.858	4.646	1.999
0.870	6.495	0.874	4.591	1.990
0.880	6.538	0.890	4.537	1.982
0.890	6.580	0.907	4.484	1.974
0.900	6.623	0.923	4.433	1.968
0.910	6.665	0.940	4.383	1.963
0.920	6.706	0.956	4.335	1.959
0.930	6.748	0.972	4.287	1.956
0.940	6.788	0.989	4.242	1.955
0.950	6.829	1.005	4.197	1.955
0.960	6.868	1.021	4.154	1.956
0.970	6.907	1.038	4.112	1.958
0.980	6.946	1.054	4.072	1.962
0.990	6.984	1.070	4.033	1.966
1.000	7.020	1.087	3.995	1.971
1.010	7.057	1.103	3.959	1.978
1.020	7.092	1.120	3.924	1.985
1.030	7.127	1.136	3.891	1.993
1.040	7.160	1.152	3.859	2.001
1.050	7.193	1.169	3.827	2.011
1.060	7.226	1.185	3.798	2.020
1.070	7.257	1.201	3.769	2.031
1.080	7.288	1.218	3.741	2.041
1.100	7.348	1.250	3.688	2.064
1.120	7.405	1.283	3.639	2.087
1.140	7.461	1.316	3.594	2.112
1.160	7.514	1.349	3.551	2.138
1.180	7.565	1.381	3.512	2.165
1.200	7.615	1.414	3.474	2.192

---

1.220	7.664	1.447	3.439	2.220
1.240	7.712	1.480	3.405	2.249
1.260	7.759	1.512	3.374	2.278
1.280	7.806	1.545	3.344	2.308
1.300	7.853	1.578	3.315	2.339
1.320	7.900	1.611	3.288	2.370
1.350	7.971	1.660	3.249	2.419
1.380	8.043	1.709	3.213	2.469
1.410	8.119	1.758	3.178	2.522
1.440	8.199	1.807	3.145	2.576
1.470	8.285	1.856	3.113	2.632
1.500	8.381	1.905	3.082	2.691
1.530	8.490	1.954	3.053	2.751
1.560	8.621	2.003	3.024	2.812
1.590	8.784	2.052	2.996	2.871
1.610	8.922	2.085	2.978	2.907
1.630	9.094	2.118	2.960	2.934
1.650	9.304	2.151	2.943	2.945
1.660	9.417	2.167	2.934	2.941

### Потенциометријске титрације комплексирања система $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин

Табела 20П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.07 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1983 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl средини

ml. NaOH	pH	C <sub>H</sub>	h	a
0.000	2.426	0.00493	0.00375	-4.61
0.005	2.434	0.00488	0.00368	-4.56
0.010	2.443	0.00483	0.00361	-4.51
0.030	2.468	0.00463	0.00340	-4.33
0.050	2.496	0.00442	0.00319	-4.14
0.100	2.571	0.00392	0.00269	-3.68
0.150	2.660	0.00342	0.00219	-3.22
0.175	2.713	0.00317	0.00194	-2.99
0.200	2.772	0.00292	0.00169	-2.75
0.225	2.840	0.00267	0.00145	-2.52
0.250	2.920	0.00242	0.00120	-2.29
0.275	3.012	0.00217	0.00097	-2.06
0.300	3.132	0.00193	0.00074	-1.83
0.310	3.191	0.00183	0.00064	-1.73
0.320	3.256	0.00173	0.00055	-1.64
0.330	3.334	0.00163	0.00046	-1.55
0.335	3.376	0.00158	0.00042	-1.50
0.340	3.424	0.00153	0.00038	-1.46
0.345	3.478	0.00148	0.00033	-1.41
0.350	3.538	0.00143	0.00029	-1.36
0.355	3.609	0.00139	0.00025	-1.32
0.360	3.625	0.00134	0.00024	-1.27

---

0.365	3.709	0.00129	0.00020	-1.23
0.370	3.809	0.00124	0.00016	-1.18
0.372	3.855	0.00122	0.00014	-1.16
0.374	3.909	0.00120	0.00012	-1.14
0.376	3.968	0.00118	0.00011	-1.12
0.378	4.038	0.00116	0.00009	-1.10
0.380	4.120	0.00114	0.00008	-1.09
0.381	4.160	0.00113	0.00007	-1.08
0.382	4.205	0.00112	0.00006	-1.07
0.383	4.258	0.00111	0.00006	-1.06
0.384	4.317	0.00110	0.00005	-1.05
0.385	4.380	0.00109	0.00004	-1.04
0.386	4.448	0.00108	0.00004	-1.03
0.387	4.525	0.00107	0.00003	-1.02
0.388	4.605	0.00106	0.00002	-1.01
0.389	4.691	0.00105	0.00002	-1.00
0.390	4.775	0.00104	0.00002	-0.99
0.391	4.850	0.00103	0.00001	-0.98
0.392	4.923	0.00102	0.00001	-0.98
0.393	5.000	0.00101	0.00001	-0.97
0.394	5.067	0.00100	0.00001	-0.96
0.395	5.131	0.00099	0.00001	-0.95
0.396	5.185	0.00098	0.00001	-0.94
0.397	5.236	0.00097	0.00001	-0.93
0.398	5.285	0.00096	0.00001	-0.92
0.399	5.332	0.00095	0.00000	-0.91
0.400	5.381	0.00095	0.00000	-0.90
0.402	5.458	0.00093	0.00000	-0.88
0.404	5.527	0.00091	0.00000	-0.86
0.406	5.590	0.00089	0.00000	-0.85
0.408	5.648	0.00087	0.00000	-0.83
0.410	5.704	0.00085	0.00000	-0.81
0.412	5.754	0.00083	0.00000	-0.79
0.414	5.802	0.00081	0.00000	-0.77
0.416	5.850	0.00079	0.00000	-0.75
0.420	5.935	0.00075	0.00000	-0.72
0.424	6.015	0.00071	0.00000	-0.68
0.428	6.090	0.00067	0.00000	-0.64
0.432	6.157	0.00063	0.00000	-0.60
0.436	6.224	0.00059	0.00000	-0.57
0.440	6.290	0.00056	0.00000	-0.53
0.444	6.355	0.00052	0.00000	-0.49
0.448	6.417	0.00048	0.00000	-0.46
0.452	6.481	0.00044	0.00000	-0.42
0.456	6.548	0.00040	0.00000	-0.38
0.460	6.616	0.00036	0.00000	-0.34
0.464	6.688	0.00032	0.00000	-0.31
0.468	6.763	0.00028	0.00000	-0.27
0.472	6.842	0.00024	0.00000	-0.23
0.476	6.928	0.00021	0.00000	-0.20
0.480	7.025	0.00017	0.00000	-0.16
0.484	7.132	0.00013	0.00000	-0.12

---

0.486	7.189	0.00011	0.00000	-0.10
0.488	7.254	0.00009	0.00000	-0.09
0.490	7.327	0.00007	0.00000	-0.07
0.492	7.407	0.00005	0.00000	-0.05
0.494	7.495	0.00003	0.00000	-0.03
0.495	7.539	0.00002	0.00000	-0.02
0.496	7.586	0.00001	0.00000	-0.01
0.497	7.642	0.00000	0.00000	0.00
0.498	7.700	-0.00001	0.00000	0.01
0.499	7.758	-0.00002	0.00000	0.02
0.500	7.822	-0.00003	0.00000	0.03
0.501	7.886	-0.00004	0.00000	0.03
0.502	7.952	-0.00005	0.00000	0.04
0.503	8.017	-0.00006	0.00000	0.05
0.504	8.077	-0.00007	0.00000	0.06
0.505	8.134	-0.00008	0.00000	0.07
0.506	8.193	-0.00008	0.00000	0.08
0.507	8.248	-0.00009	0.00000	0.09
0.508	8.300	-0.00010	0.00000	0.10
0.509	8.348	-0.00011	0.00000	0.11
0.510	8.391	-0.00012	0.00000	0.12
0.512	8.478	-0.00014	0.00000	0.14
0.514	8.551	-0.00016	0.00000	0.16
0.516	8.616	-0.00018	0.00000	0.17
0.518	8.675	-0.00020	0.00000	0.19
0.520	8.725	-0.00022	0.00000	0.21
0.522	8.773	-0.00024	0.00000	0.23
0.524	8.814	-0.00026	0.00000	0.25
0.528	8.875	-0.00030	0.00000	0.29
0.532	8.933	-0.00034	0.00000	0.32
0.536	8.995	-0.00037	0.00000	0.36
0.540	9.042	-0.00041	0.00000	0.40
0.544	9.098	-0.00045	0.00000	0.43
0.548	9.144	-0.00049	0.00000	0.47
0.552	9.174	-0.00053	0.00000	0.51
0.556	9.220	-0.00057	0.00000	0.54
0.560	9.262	-0.00061	0.00000	0.58

Табела 21П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 1.10 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> + 1.07 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	C <sub>H</sub>	h	a
0.000	2.670	0.00152	0.00214	-1.42
0.020	2.716	0.00132	0.00192	-1.24
0.040	2.764	0.00112	0.00172	-1.05
0.060	2.819	0.00093	0.00152	-0.87
0.080	2.880	0.00073	0.00132	-0.68
0.100	2.947	0.00053	0.00113	-0.50
0.120	3.023	0.00033	0.00095	-0.31
0.140	3.110	0.00013	0.00078	-0.13

0.160	3.211	-0.00006	0.00062	0.06
0.180	3.326	-0.00026	0.00047	0.24
0.200	3.460	-0.00046	0.00035	0.43
0.210	3.535	-0.00055	0.00029	0.52
0.220	3.614	-0.00065	0.00024	0.62
0.230	3.697	-0.00075	0.00020	0.71
0.240	3.790	-0.00085	0.00016	0.80
0.250	3.894	-0.00094	0.00013	0.89
0.255	3.950	-0.00099	0.00011	0.94
0.260	4.011	-0.00104	0.00010	0.99
0.265	4.077	-0.00109	0.00008	1.03
0.270	4.151	-0.00114	0.00007	1.08
0.275	4.230	-0.00119	0.00006	1.12
0.280	4.325	-0.00124	0.00005	1.17
0.285	4.442	-0.00128	0.00004	1.22
0.287	4.493	-0.00130	0.00003	1.24
0.290	4.575	-0.00133	0.00003	1.26
0.292	4.650	-0.00135	0.00002	1.28
0.294	4.723	-0.00137	0.00002	1.30
0.296	4.809	-0.00139	0.00002	1.32
0.298	4.910	-0.00141	0.00001	1.34
0.300	5.052	-0.00143	0.00001	1.36
0.302	5.236	-0.00145	0.00001	1.38
0.303	5.434	-0.00146	0.00000	1.38
0.304	5.634	-0.00147	0.00000	1.39
0.305	5.860	-0.00148	0.00000	1.40
0.306	6.102	-0.00149	0.00000	1.41
0.307	6.333	-0.00150	0.00000	1.42
0.308	6.432	-0.00151	0.00000	1.43
0.309	6.507	-0.00152	0.00000	1.44
0.310	6.576	-0.00153	0.00000	1.45
0.311	6.641	-0.00154	0.00000	1.46
0.312	6.696	-0.00155	0.00000	1.47
0.314	6.802	-0.00157	0.00000	1.49
0.316	6.895	-0.00159	0.00000	1.50
0.318	6.930	-0.00160	0.00000	1.52
0.320	6.980	-0.00162	0.00000	1.54
0.322	7.040	-0.00164	0.00000	1.56

Табела 22П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.55 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> + 1.07 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	C <sub>H</sub>	h	a
0.000	2.984	0.00104	0.00104	-0.97
0.010	3.019	0.00094	0.00096	-0.87
0.020	3.062	0.00084	0.00087	-0.78
0.030	3.108	0.00074	0.00078	-0.69
0.040	3.158	0.00064	0.00070	-0.60
0.050	3.213	0.00054	0.00061	-0.50
0.060	3.274	0.00044	0.00053	-0.41

---

0.070	3.344	0.00034	0.00045	-0.32
0.080	3.421	0.00024	0.00038	-0.23
0.085	3.461	0.00019	0.00035	-0.18
0.090	3.501	0.00014	0.00032	-0.13
0.095	3.549	0.00009	0.00028	-0.09
0.100	3.601	0.00004	0.00025	-0.04
0.105	3.649	-0.00001	0.00022	0.01
0.110	3.700	-0.00006	0.00020	0.05
0.115	3.749	-0.00010	0.00018	0.10
0.120	3.802	-0.00015	0.00016	0.14
0.125	3.857	-0.00020	0.00014	0.19
0.130	3.908	-0.00025	0.00012	0.24
0.135	3.965	-0.00030	0.00011	0.28
0.140	4.028	-0.00035	0.00009	0.33
0.145	4.092	-0.00040	0.00008	0.38
0.150	4.156	-0.00045	0.00007	0.42
0.155	4.226	-0.00050	0.00006	0.47
0.160	4.300	-0.00055	0.00005	0.52
0.165	4.392	-0.00060	0.00004	0.56
0.170	4.481	-0.00065	0.00003	0.61
0.172	4.519	-0.00066	0.00003	0.63
0.174	4.561	-0.00068	0.00003	0.65
0.176	4.609	-0.00070	0.00002	0.66
0.178	4.657	-0.00072	0.00002	0.68
0.180	4.705	-0.00074	0.00002	0.70
0.182	4.751	-0.00076	0.00002	0.72
0.184	4.808	-0.00078	0.00002	0.74
0.186	4.867	-0.00080	0.00001	0.76
0.188	4.926	-0.00082	0.00001	0.77
0.190	5.000	-0.00084	0.00001	0.79
0.192	5.074	-0.00086	0.00001	0.81
0.194	5.153	-0.00088	0.00001	0.83
0.196	5.250	-0.00090	0.00001	0.85
0.197	5.320	-0.00091	0.00000	0.86
0.198	5.420	-0.00092	0.00000	0.87
0.200	5.530	-0.00094	0.00000	0.89
0.202	5.658	-0.00096	0.00000	0.90
0.203	5.733	-0.00097	0.00000	0.91
0.204	5.826	-0.00098	0.00000	0.92
0.205	5.925	-0.00099	0.00000	0.93
0.206	6.048	-0.00100	0.00000	0.94
0.207	6.177	-0.00101	0.00000	0.95
0.208	6.315	-0.00102	0.00000	0.96
0.209	6.509	-0.00103	0.00000	0.97
0.210	6.623	-0.00104	0.00000	0.98
0.211	6.714	-0.00105	0.00000	0.99
0.212	6.800	-0.00106	0.00000	1.00
0.213	6.872	-0.00107	0.00000	1.01
0.214	6.925	-0.00108	0.00000	1.02
0.215	6.984	-0.00109	0.00000	1.02
0.216	7.040	-0.00109	0.00000	1.03
0.220	7.253	-0.00113	0.00000	1.07

---



0.225	7.400	-0.00118	0.00000	1.12
0.230	7.501	-0.00123	0.00000	1.16
0.235	7.565	-0.00128	0.00000	1.21
0.240	7.617	-0.00133	0.00000	1.26
0.245	7.674	-0.00138	0.00000	1.30
0.250	7.718	-0.00143	0.00000	1.35
0.255	7.774	-0.00147	0.00000	1.40
0.260	7.834	-0.00152	0.00000	1.44
0.265	7.890	-0.00157	0.00000	1.49
0.270	7.942	-0.00162	0.00000	1.53
0.275	7.990	-0.00167	0.00000	1.58
0.280	8.030	-0.00172	0.00000	1.63
0.290	8.125	-0.00181	0.00000	1.72
0.300	8.190	-0.00191	0.00000	1.81
0.310	8.250	-0.00201	0.00000	1.91
0.320	8.325	-0.00210	0.00000	2.00
0.330	8.396	-0.00220	0.00000	2.09
0.340	8.471	-0.00230	0.00000	2.18
0.350	8.550	-0.00239	0.00000	2.28
0.360	8.633	-0.00249	0.00000	2.37
0.370	8.725	-0.00259	0.00000	2.46
0.380	8.827	-0.00268	0.00000	2.55
0.390	8.939	-0.00278	0.00000	2.65
0.400	9.060	-0.00287	0.00000	2.74

Табела 23П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.80 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> + 2.40 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	C <sub>H</sub>	h	a
0.000	2.780	0.00186	0.00166	-0.78
0.050	2.854	0.00161	0.00140	-0.67
0.080	2.899	0.00145	0.00126	-0.61
0.110	2.950	0.00130	0.00112	-0.55
0.140	3.005	0.00115	0.00099	-0.48
0.170	3.061	0.00100	0.00087	-0.42
0.200	3.125	0.00085	0.00075	-0.36
0.230	3.186	0.00070	0.00065	-0.29
0.260	3.254	0.00055	0.00056	-0.23
0.285	3.313	0.00042	0.00049	-0.18
0.310	3.376	0.00030	0.00042	-0.13
0.335	3.441	0.00018	0.00036	-0.07
0.360	3.507	0.00005	0.00031	-0.02
0.380	3.564	-0.00005	0.00027	0.02
0.400	3.625	-0.00015	0.00024	0.06
0.410	3.655	-0.00020	0.00022	0.08
0.420	3.688	-0.00024	0.00021	0.10
0.430	3.719	-0.00029	0.00019	0.12
0.440	3.756	-0.00034	0.00018	0.15
0.450	3.787	-0.00039	0.00016	0.17
0.460	3.821	-0.00044	0.00015	0.19

---

0.470	3.856	-0.00049	0.00014	0.21
0.480	3.892	-0.00054	0.00013	0.23
0.490	3.929	-0.00059	0.00012	0.25
0.500	3.967	-0.00064	0.00011	0.27
0.510	4.007	-0.00068	0.00010	0.29
0.520	4.045	-0.00073	0.00009	0.31
0.530	4.088	-0.00078	0.00008	0.33
0.540	4.131	-0.00083	0.00007	0.36
0.550	4.177	-0.00088	0.00007	0.38
0.560	4.225	-0.00093	0.00006	0.40
0.570	4.277	-0.00098	0.00005	0.42
0.580	4.331	-0.00102	0.00005	0.44
0.590	4.388	-0.00107	0.00004	0.46
0.600	4.451	-0.00112	0.00004	0.48
0.610	4.518	-0.00117	0.00003	0.50
0.620	4.589	-0.00122	0.00003	0.52
0.630	4.668	-0.00127	0.00002	0.54
0.635	4.710	-0.00129	0.00002	0.55
0.640	4.756	-0.00131	0.00002	0.56
0.645	4.801	-0.00134	0.00002	0.58
0.650	4.849	-0.00136	0.00001	0.59
0.655	4.903	-0.00139	0.00001	0.60
0.660	4.955	-0.00141	0.00001	0.61
0.665	5.013	-0.00143	0.00001	0.62
0.670	5.071	-0.00146	0.00001	0.63
0.675	5.133	-0.00148	0.00001	0.64
0.680	5.199	-0.00151	0.00001	0.65
0.685	5.268	-0.00153	0.00001	0.66
0.690	5.344	-0.00155	0.00000	0.67
0.692	5.373	-0.00156	0.00000	0.67
0.694	5.403	-0.00157	0.00000	0.68
0.696	5.437	-0.00158	0.00000	0.68
0.698	5.466	-0.00159	0.00000	0.69
0.700	5.502	-0.00160	0.00000	0.69
0.702	5.537	-0.00161	0.00000	0.69
0.704	5.571	-0.00162	0.00000	0.70
0.706	5.609	-0.00163	0.00000	0.70
0.708	5.646	-0.00164	0.00000	0.71
0.710	5.687	-0.00165	0.00000	0.71
0.712	5.727	-0.00166	0.00000	0.72
0.714	5.771	-0.00167	0.00000	0.72
0.716	5.813	-0.00168	0.00000	0.72
0.718	5.861	-0.00169	0.00000	0.73
0.720	5.913	-0.00170	0.00000	0.73
0.722	5.964	-0.00171	0.00000	0.74
0.724	6.019	-0.00172	0.00000	0.74
0.726	6.085	-0.00173	0.00000	0.74
0.728	6.148	-0.00174	0.00000	0.75
0.730	6.335	-0.00175	0.00000	0.75
0.731	6.361	-0.00175	0.00000	0.76
0.732	6.390	-0.00175	0.00000	0.76
0.733	6.428	-0.00176	0.00000	0.76

---

---

0.734	6.469	-0.00176	0.00000	0.76
0.735	6.517	-0.00177	0.00000	0.76
0.736	6.557	-0.00177	0.00000	0.77
0.737	6.591	-0.00178	0.00000	0.77
0.738	6.635	-0.00178	0.00000	0.77
0.739	6.674	-0.00179	0.00000	0.77
0.740	6.722	-0.00179	0.00000	0.77
0.741	6.774	-0.00180	0.00000	0.78
0.742	6.812	-0.00180	0.00000	0.78
0.743	6.849	-0.00181	0.00000	0.78
0.744	6.890	-0.00181	0.00000	0.78
0.745	6.928	-0.00182	0.00000	0.78
0.746	6.969	-0.00182	0.00000	0.79
0.747	7.010	-0.00183	0.00000	0.79
0.748	7.040	-0.00183	0.00000	0.79
0.749	7.077	-0.00184	0.00000	0.79
0.750	7.110	-0.00184	0.00000	0.79
0.751	7.139	-0.00185	0.00000	0.80
0.752	7.169	-0.00185	0.00000	0.80
0.753	7.198	-0.00185	0.00000	0.80
0.754	7.226	-0.00186	0.00000	0.80
0.755	7.252	-0.00186	0.00000	0.81
0.756	7.276	-0.00187	0.00000	0.81
0.757	7.299	-0.00187	0.00000	0.81
0.758	7.320	-0.00188	0.00000	0.81
0.759	7.339	-0.00188	0.00000	0.81
0.76	7.357	-0.00189	0.00000	0.82
0.761	7.374	-0.00189	0.00000	0.82
0.762	7.392	-0.00190	0.00000	0.82
0.764	7.424	-0.00191	0.00000	0.82
0.766	7.456	-0.00192	0.00000	0.83
0.768	7.490	-0.00193	0.00000	0.83
0.77	7.522	-0.00194	0.00000	0.84
0.772	7.555	-0.00195	0.00000	0.84
0.774	7.586	-0.00195	0.00000	0.85
0.776	7.614	-0.00196	0.00000	0.85
0.778	7.644	-0.00197	0.00000	0.85
0.78	7.665	-0.00198	0.00000	0.86
0.782	7.688	-0.00199	0.00000	0.86
0.784	7.710	-0.00200	0.00000	0.87
0.786	7.728	-0.00201	0.00000	0.87
0.788	7.744	-0.00202	0.00000	0.87
0.79	7.761	-0.00203	0.00000	0.88
0.793	7.782	-0.00204	0.00000	0.89
0.796	7.802	-0.00206	0.00000	0.89
0.801	7.827	-0.00208	0.00000	0.90
0.806	7.850	-0.00211	0.00000	0.91
0.811	7.866	-0.00213	0.00000	0.92
0.821	7.900	-0.00218	0.00000	0.94
0.831	7.930	-0.00222	0.00000	0.96
0.851	7.984	-0.00232	0.00000	1.01
0.871	8.032	-0.00241	0.00000	1.05

---

0.891	8.085	-0.00251	0.00000	1.09
0.911	8.136	-0.00260	0.00000	1.13
0.931	8.184	-0.00269	0.00000	1.17
0.951	8.234	-0.00279	0.00000	1.22
0.971	8.284	-0.00288	0.00000	1.26
0.991	8.337	-0.00297	0.00000	1.30
1.011	8.391	-0.00307	0.00000	1.34
1.031	8.445	-0.00316	0.00000	1.38
1.051	8.502	-0.00325	0.00000	1.43
1.071	8.562	-0.00335	0.00000	1.47
1.091	8.624	-0.00344	0.00000	1.51
1.111	8.672	-0.00353	0.00000	1.55
1.131	8.738	-0.00362	0.00000	1.59
1.151	8.808	-0.00371	0.00000	1.63
1.171	8.880	-0.00380	0.00000	1.68
1.181	8.915	-0.00385	0.00000	1.70
1.191	8.950	-0.00390	0.00000	1.72
1.201	8.987	-0.00394	0.00000	1.74
1.211	9.028	-0.00399	0.00000	1.76
1.221	9.071	-0.00403	0.00000	1.78
1.231	9.117	-0.00408	0.00000	1.80
1.241	9.161	-0.00412	0.00000	1.82
1.251	9.208	-0.00417	0.00000	1.84
1.261	9.258	-0.00421	0.00000	1.87

Табела 24П

Потенциометријска титрација 20.0 ml 0.50 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup> + 2.5 mmol/dm<sup>3</sup> моксифлоксацина са 0.1006 mol/dm<sup>3</sup> NaOH у 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl

ml. NaOH	pH	C <sub>H</sub>	h	a
0.000	2.799	0.00196	0.00159	-0.78
0.050	2.896	0.00170	0.00127	-0.68
0.080	2.949	0.00155	0.00112	-0.62
0.110	3.004	0.00140	0.00099	-0.56
0.140	3.063	0.00125	0.00086	-0.50
0.170	3.127	0.00109	0.00075	-0.44
0.200	3.197	0.00094	0.00064	-0.38
0.220	3.247	0.00084	0.00057	-0.34
0.240	3.297	0.00074	0.00050	-0.30
0.260	3.353	0.00064	0.00044	-0.26
0.280	3.409	0.00054	0.00039	-0.22
0.300	3.466	0.00044	0.00034	-0.18
0.320	3.525	0.00034	0.00030	-0.14
0.340	3.587	0.00024	0.00026	-0.10
0.360	3.650	0.00014	0.00022	-0.06
0.380	3.717	0.00005	0.00019	-0.02
0.400	3.788	-0.00005	0.00016	0.02
0.420	3.863	-0.00015	0.00014	0.06
0.430	3.903	-0.00020	0.00013	0.08
0.440	3.945	-0.00025	0.00011	0.10
0.450	3.987	-0.00030	0.00010	0.12

---

0.460	4.032	-0.00035	0.00009	0.14
0.470	4.079	-0.00040	0.00008	0.16
0.480	4.129	-0.00045	0.00007	0.18
0.490	4.180	-0.00049	0.00007	0.20
0.500	4.235	-0.00054	0.00006	0.22
0.510	4.295	-0.00059	0.00005	0.24
0.520	4.358	-0.00064	0.00004	0.26
0.530	4.426	-0.00069	0.00004	0.28
0.540	4.501	-0.00074	0.00003	0.30
0.545	4.541	-0.00076	0.00003	0.31
0.550	4.582	-0.00079	0.00003	0.32
0.555	4.624	-0.00081	0.00002	0.33
0.560	4.672	-0.00084	0.00002	0.34
0.565	4.718	-0.00086	0.00002	0.35
0.570	4.766	-0.00088	0.00002	0.36
0.575	4.816	-0.00091	0.00002	0.37
0.580	4.865	-0.00093	0.00001	0.38
0.585	4.916	-0.00096	0.00001	0.39
0.590	4.975	-0.00098	0.00001	0.40
0.595	5.025	-0.00100	0.00001	0.41
0.600	5.077	-0.00103	0.00001	0.42
0.605	5.129	-0.00105	0.00001	0.43
0.610	5.181	-0.00108	0.00001	0.44
0.615	5.234	-0.00110	0.00001	0.45
0.620	5.286	-0.00113	0.00001	0.46
0.625	5.339	-0.00115	0.00000	0.47
0.630	5.390	-0.00117	0.00000	0.48
0.635	5.442	-0.00120	0.00000	0.49
0.640	5.495	-0.00122	0.00000	0.50
0.645	5.550	-0.00125	0.00000	0.51
0.650	5.604	-0.00127	0.00000	0.52
0.655	5.659	-0.00129	0.00000	0.53
0.660	5.716	-0.00132	0.00000	0.54
0.665	5.776	-0.00134	0.00000	0.55
0.670	5.845	-0.00137	0.00000	0.56
0.673	5.883	-0.00138	0.00000	0.57
0.676	5.922	-0.00140	0.00000	0.58
0.679	5.965	-0.00141	0.00000	0.58
0.682	6.010	-0.00142	0.00000	0.59
0.685	6.059	-0.00144	0.00000	0.60
0.688	6.110	-0.00145	0.00000	0.60
0.691	6.165	-0.00147	0.00000	0.61
0.694	6.227	-0.00148	0.00000	0.61
0.697	6.293	-0.00150	0.00000	0.62
0.700	6.362	-0.00151	0.00000	0.63
0.702	6.410	-0.00152	0.00000	0.63
0.704	6.462	-0.00153	0.00000	0.63
0.706	6.516	-0.00154	0.00000	0.64
0.708	6.571	-0.00155	0.00000	0.64
0.710	6.631	-0.00156	0.00000	0.65
0.712	6.693	-0.00157	0.00000	0.65
0.714	6.715	-0.00158	0.00000	0.65

---

---

0.716	6.738	-0.00159	0.00000	0.66
0.717	6.753	-0.00159	0.00000	0.66
0.718	6.775	-0.00160	0.00000	0.66
0.719	6.799	-0.00160	0.00000	0.66
0.720	6.827	-0.00161	0.00000	0.67
0.721	6.854	-0.00161	0.00000	0.67
0.722	7.235	-0.00162	0.00000	0.67
0.723	7.248	-0.00162	0.00000	0.67
0.724	7.267	-0.00162	0.00000	0.67
0.725	7.292	-0.00163	0.00000	0.68
0.726	7.309	-0.00163	0.00000	0.68
0.728	7.349	-0.00164	0.00000	0.68
0.730	7.393	-0.00165	0.00000	0.69
0.732	7.434	-0.00166	0.00000	0.69
0.734	7.472	-0.00167	0.00000	0.69
0.736	7.509	-0.00168	0.00000	0.70
0.738	7.544	-0.00169	0.00000	0.70
0.740	7.575	-0.00170	0.00000	0.71
0.742	7.604	-0.00171	0.00000	0.71
0.744	7.630	-0.00172	0.00000	0.71
0.746	7.656	-0.00173	0.00000	0.72
0.749	7.694	-0.00174	0.00000	0.72
0.752	7.726	-0.00176	0.00000	0.73
0.755	7.759	-0.00177	0.00000	0.74
0.758	7.790	-0.00179	0.00000	0.74
0.761	7.819	-0.00180	0.00000	0.75
0.764	7.850	-0.00182	0.00000	0.75
0.767	7.875	-0.00183	0.00000	0.76
0.770	7.903	-0.00184	0.00000	0.77
0.775	7.938	-0.00187	0.00000	0.78
0.780	7.974	-0.00189	0.00000	0.79
0.785	8.007	-0.00192	0.00000	0.80
0.795	8.036	-0.00196	0.00000	0.82
0.795	8.061	-0.00196	0.00000	0.82
0.800	8.085	-0.00199	0.00000	0.83
0.810	8.128	-0.00203	0.00000	0.85
0.820	8.166	-0.00208	0.00000	0.87
0.830	8.199	-0.00213	0.00000	0.89
0.840	8.230	-0.00218	0.00000	0.91
0.850	8.260	-0.00222	0.00000	0.93
0.860	8.287	-0.00227	0.00000	0.95
0.880	8.346	-0.00236	0.00000	0.99
0.890	8.371	-0.00241	0.00000	1.01
0.900	8.400	-0.00246	0.00000	1.03
0.910	8.425	-0.00251	0.00000	1.05
0.920	8.455	-0.00255	0.00000	1.07
0.930	8.484	-0.00260	0.00000	1.09
0.940	8.500	-0.00265	0.00000	1.11

---

Апсорпциони спектри комплексирања система  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин

Табела 25П

UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за  
 концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин=1:1  
 ( $[Gd^{3+}] = 0.033 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[моxi] = 0.035 \text{ mmol/dm}^3$ )

Апсорбанција										
рН	3.67	4.649	5.058	6.316	5.618	6.147	6.65	6.96	6.96	6.971
$\lambda$ (nm)										
250	0.3008	0.322	0.3674	0.3292	0.345	0.3324	0.3299	0.3207	0.3092	0.3009
252	0.2899	0.3146	0.3609	0.327	0.3402	0.3293	0.3275	0.3187	0.3078	0.2996
254	0.2845	0.3116	0.3587	0.3283	0.3399	0.3297	0.3287	0.32	0.3089	0.3011
256	0.28	0.3084	0.3564	0.3293	0.3388	0.3302	0.3295	0.3207	0.3097	0.3021
258	0.2713	0.3004	0.3489	0.3248	0.3324	0.3249	0.3248	0.3167	0.3059	0.2984
260	0.2577	0.2878	0.3366	0.315	0.321	0.3143	0.3152	0.3076	0.2975	0.2902
262	0.2461	0.2771	0.3258	0.3064	0.3109	0.3053	0.3064	0.3	0.2908	0.2838
264	0.2437	0.2758	0.325	0.3077	0.311	0.3057	0.3072	0.3012	0.2925	0.2855
266	0.2552	0.2888	0.339	0.3236	0.326	0.3206	0.3226	0.3162	0.3076	0.3003
268	0.2818	0.3168	0.3702	0.3563	0.3578	0.3522	0.3543	0.3472	0.3379	0.3306
270	0.3233	0.3608	0.4177	0.407	0.4068	0.4012	0.4033	0.3945	0.3838	0.3761
272	0.3799	0.4204	0.4832	0.4754	0.4739	0.4677	0.4703	0.4589	0.4465	0.4375
274	0.4517	0.4961	0.566	0.5623	0.5588	0.5516	0.5542	0.5402	0.5244	0.5148
276	0.5391	0.5872	0.6654	0.6649	0.6605	0.6518	0.6548	0.6365	0.6173	0.6061
278	0.6411	0.694	0.7819	0.7834	0.7787	0.7678	0.7712	0.747	0.7233	0.7111
280	0.7575	0.8139	0.9122	0.9131	0.9099	0.8955	0.8983	0.8672	0.8393	0.825
282	0.8887	0.9433	1.0505	1.0469	1.0469	1.028	1.0286	0.9911	0.9565	0.9406
284	1.0237	1.0694	1.1818	1.1651	1.1731	1.1465	1.1447	1.0998	1.0589	1.0415
286	1.1543	1.1775	1.2869	1.2474	1.2717	1.2329	1.2261	1.1737	1.1286	1.1089
288	1.2696	1.261	1.3594	1.2866	1.3304	1.2793	1.2648	1.2036	1.1556	1.1366
290	1.3747	1.3239	1.4081	1.2915	1.3622	1.295	1.2689	1.1999	1.1488	1.1281
292	1.46	1.3618	1.4286	1.2592	1.3622	1.2766	1.2386	1.1603	1.1052	1.0848
294	1.5149	1.3628	1.4047	1.1879	1.3202	1.2162	1.1675	1.0845	1.0272	1.007
296	1.5155	1.3111	1.3285	1.0771	1.2276	1.1147	1.0579	0.9764	0.9211	0.9009
298	1.4518	1.2126	1.2097	0.9415	1.0973	0.9819	0.9239	0.8501	0.801	0.7811
300	1.31	1.0644	1.0521	0.797	0.941	0.8348	0.7807	0.7188	0.6796	0.6606
302	1.1195	0.8961	0.8843	0.6609	0.7835	0.6924	0.6475	0.599	0.5684	0.5507
304	0.9183	0.7336	0.729	0.5462	0.6429	0.5706	0.535	0.4983	0.4751	0.4594
306	0.7404	0.5984	0.6019	0.457	0.5319	0.4754	0.4483	0.4207	0.4029	0.3888
308	0.6007	0.4961	0.5067	0.3927	0.4504	0.4061	0.3859	0.3645	0.3502	0.3374
310	0.5013	0.4251	0.4404	0.3493	0.3947	0.3598	0.3439	0.3263	0.3139	0.3024
312	0.4359	0.379	0.3972	0.3215	0.359	0.3302	0.3171	0.3018	0.2907	0.2799
314	0.3964	0.352	0.3715	0.3061	0.3385	0.3136	0.3022	0.2882	0.2777	0.2677
316	0.3754	0.3386	0.3586	0.2994	0.329	0.3062	0.2958	0.2824	0.2722	0.2624
318	0.3677	0.335	0.3553	0.3	0.3277	0.3065	0.2966	0.283	0.2731	0.2637
320	0.3674	0.3376	0.3581	0.3054	0.3322	0.3116	0.302	0.2886	0.2782	0.2688
322	0.3712	0.3431	0.3638	0.3135	0.3394	0.3193	0.3104	0.2966	0.2862	0.277
324	0.3747	0.3488	0.3706	0.3226	0.347	0.3278	0.3191	0.3053	0.2949	0.2858
326	0.3759	0.3523	0.3757	0.3302	0.3533	0.3348	0.3267	0.3131	0.3028	0.2933
328	0.3736	0.3533	0.3776	0.3351	0.3566	0.3391	0.3322	0.3185	0.3081	0.2983
330	0.3728	0.3553	0.3812	0.3412	0.3618	0.345	0.3384	0.3247	0.3144	0.3048
332	0.3716	0.3576	0.3851	0.3476	0.3669	0.3506	0.3445	0.3307	0.3199	0.3106
334	0.37	0.3598	0.3885	0.354	0.3714	0.3562	0.3504	0.3372	0.3261	0.3165
336	0.3668	0.3597	0.3896	0.3584	0.3744	0.3599	0.3548	0.3414	0.3302	0.3207
338	0.3618	0.3567	0.3879	0.3592	0.3735	0.36	0.3556	0.3422	0.3314	0.322

340	0.3558	0.3508	0.3819	0.3548	0.3681	0.3554	0.3514	0.3381	0.3279	0.319
342	0.3492	0.3433	0.3733	0.3462	0.3596	0.347	0.3431	0.3305	0.3205	0.3108
344	0.344	0.3355	0.3643	0.336	0.3503	0.3372	0.3328	0.3202	0.31	0.3007
346	0.3409	0.3301	0.3577	0.3269	0.3427	0.3288	0.3241	0.3112	0.301	0.2917
348	0.3399	0.327	0.3533	0.3206	0.3375	0.3231	0.3174	0.3039	0.2929	0.2841
350	0.341	0.3262	0.3514	0.3168	0.3354	0.3201	0.3134	0.2991	0.2877	0.2787
352	0.3427	0.3271	0.3518	0.3153	0.3352	0.3192	0.3119	0.2968	0.2845	0.2757
354	0.3451	0.3292	0.3536	0.3159	0.3365	0.3201	0.3118	0.2962	0.2832	0.2742
356	0.347	0.3314	0.3556	0.3169	0.3383	0.3207	0.3123	0.2961	0.2824	0.2735
358	0.3481	0.3324	0.3569	0.3171	0.3393	0.321	0.3124	0.2958	0.2813	0.2723
360	0.3473	0.332	0.357	0.316	0.3384	0.3201	0.3109	0.2939	0.2792	0.2704
362	0.3453	0.3303	0.3551	0.3132	0.3365	0.3175	0.308	0.2909	0.2758	0.2667
364	0.3415	0.3269	0.3512	0.3084	0.3321	0.3124	0.3028	0.2859	0.2706	0.2615
366	0.3357	0.3211	0.3452	0.3013	0.3253	0.3052	0.2958	0.2789	0.2636	0.2546
368	0.3278	0.313	0.3365	0.2915	0.3159	0.2958	0.2862	0.2697	0.2547	0.246
370	0.3185	0.3034	0.3258	0.2798	0.3046	0.2839	0.2744	0.2589	0.2443	0.2355
372	0.3069	0.2917	0.3129	0.2657	0.2909	0.2701	0.2605	0.2457	0.232	0.2233
374	0.294	0.2784	0.2983	0.2503	0.2757	0.2545	0.2452	0.2316	0.2182	0.2099
376	0.2795	0.2633	0.2817	0.2332	0.2583	0.2374	0.228	0.2156	0.203	0.195
378	0.2641	0.2473	0.2641	0.2149	0.2402	0.2194	0.2104	0.1989	0.1876	0.1794
380	0.2481	0.2306	0.2456	0.1958	0.2216	0.201	0.1918	0.1813	0.1714	0.1637
382	0.2314	0.2137	0.2266	0.1768	0.2022	0.1815	0.1736	0.1641	0.1547	0.1476
384	0.2124	0.1939	0.2048	0.1555	0.1803	0.161	0.1527	0.1449	0.137	0.13
386	0.1956	0.1766	0.1858	0.1369	0.1613	0.1427	0.1345	0.1281	0.1211	0.1144
388	0.1792	0.16	0.1674	0.1193	0.1432	0.1252	0.1173	0.1119	0.1061	0.0997
390	0.1634	0.144	0.1499	0.103	0.126	0.1088	0.1012	0.0969	0.0921	0.086
392	0.1481	0.1287	0.1331	0.0877	0.1101	0.0936	0.0864	0.083	0.079	0.0732
394	0.1336	0.1145	0.118	0.074	0.0954	0.0799	0.073	0.0706	0.0674	0.0619
396	0.1199	0.1013	0.1036	0.0617	0.0819	0.0675	0.061	0.0593	0.0569	0.0516
398	0.1071	0.089	0.0907	0.0507	0.0698	0.0564	0.0503	0.0492	0.0473	0.0424
400	0.0954	0.078	0.0791	0.0414	0.0593	0.0471	0.0413	0.0408	0.0393	0.0347
402	0.0846	0.068	0.0688	0.0332	0.05	0.0389	0.0336	0.0335	0.0323	0.0278
404	0.0748	0.0591	0.0595	0.0264	0.0421	0.0319	0.0269	0.0273	0.0266	0.0222
406	0.0656	0.0512	0.0514	0.0206	0.0351	0.0261	0.0213	0.0221	0.0214	0.0173
408	0.0574	0.0441	0.0442	0.0158	0.0291	0.021	0.0165	0.0176	0.0173	0.0133
410	0.0504	0.0382	0.0382	0.012	0.0242	0.0168	0.0129	0.0141	0.0139	0.0099
412	0.0439	0.033	0.0333	0.0089	0.0202	0.0137	0.0099	0.0114	0.0113	0.0076
414	0.0383	0.0282	0.0287	0.0064	0.0165	0.0109	0.0076	0.0091	0.0091	0.0056
416	0.0329	0.0242	0.0248	0.0043	0.0137	0.0088	0.0056	0.0073	0.0072	0.0038
418	0.0285	0.021	0.0217	0.003	0.0114	0.0072	0.0043	0.006	0.0061	0.0027
420	0.0246	0.0182	0.019	0.0017	0.0095	0.0059	0.003	0.005	0.005	0.0016
422	0.0212	0.0157	0.0168	0.0007	0.0078	0.0046	0.0021	0.004	0.0039	0.0009
424	0.0183	0.0136	0.0149	0	0.0065	0.0037	0.0013	0.0032	0.0032	0.0001
426	0.0158	0.0121	0.0134	0	0.0055	0.0031	0.0009	0.0029	0.0028	0
428	0.0138	0.0106	0.0121	0	0.0046	0.0026	0.0004	0.0024	0.0024	0
430	0.012	0.0094	0.011	-0.001	0.0039	0.0021	0.0001	0.0021	0.0021	0
432	0.0104	0.0083	0.01	-0.001	0.0034	0.0017	0	0.0018	0.0017	0
434	0.0092	0.0075	0.0092	-0.001	0.0029	0.0015	0	0.0017	0.0017	0
436	0.008	0.0068	0.0086	-0.001	0.0025	0.0012	0	0.0017	0.0015	-0.001
438	0.0071	0.0062	0.0081	-0.001	0.0022	0.0011	0	0.0016	0.0013	-0.001
440	0.0065	0.0059	0.0077	-0.001	0.0021	0.001	0	0.0015	0.0013	-0.001
442	0.006	0.0054	0.007	-0.002	0.0017	0.0008	0	0.0015	0.0012	-0.001
444	0.0055	0.0052	0.0069	-0.002	0.0016	0.0007	0	0.0014	0.0012	-0.001
446	0.0052	0.0049	0.0064	-0.002	0.0015	0.0006	0	0.0012	0.0011	-0.001
448	0.0048	0.0046	0.0062	-0.002	0.0013	0.0005	0	0.0012	0.0011	-0.001
450	0.0045	0.0044	0.0058	-0.002	0.0011	0.0004	0	0.0011	0.0009	-0.001



Табела 26П

UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за  
 концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин=1:2  
 ( $[Gd^{3+}] = 0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi] = 0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )

рН	Апсорбанција									
	3.684	4.276	5.12	4.997	5.667	5.954	6.375	6.595	6.868	7.096
$\lambda$ (nm)										
250	0.3001	0.308	0.337	0.3863	0.3431	0.3373	0.3518	0.3511	0.3602	0.3683
252	0.2893	0.2974	0.3289	0.3772	0.3386	0.334	0.3494	0.3496	0.3589	0.3669
254	0.2839	0.2924	0.3255	0.3729	0.3381	0.3338	0.3504	0.351	0.3603	0.3678
256	0.2796	0.2884	0.3223	0.3704	0.3373	0.3333	0.3503	0.3516	0.3606	0.3671
258	0.2709	0.2797	0.314	0.3547	0.331	0.3275	0.3449	0.3466	0.3559	0.361
260	0.2572	0.2658	0.301	0.3345	0.3199	0.3171	0.3349	0.3368	0.3472	0.3509
262	0.2452	0.2535	0.2898	0.321	0.3103	0.3082	0.3267	0.3288	0.3406	0.3436
264	0.243	0.2509	0.2886	0.3123	0.3108	0.3092	0.3286	0.331	0.3443	0.3473
266	0.255	0.2633	0.302	0.315	0.3268	0.3253	0.3461	0.3489	0.3629	0.3667
268	0.2824	0.2915	0.3318	0.3396	0.3602	0.3586	0.3813	0.3849	0.3989	0.404
270	0.3256	0.336	0.3787	0.3842	0.4122	0.4099	0.4356	0.4403	0.453	0.4601
272	0.3848	0.3967	0.4428	0.447	0.4831	0.4803	0.5097	0.5157	0.5257	0.5357
274	0.4593	0.4733	0.5231	0.5264	0.5719	0.5679	0.6019	0.6096	0.6155	0.6296
276	0.549	0.5656	0.6195	0.6216	0.6775	0.6719	0.7107	0.7203	0.7208	0.7393
278	0.654	0.6743	0.7317	0.7332	0.7988	0.791	0.8348	0.8462	0.8388	0.8633
280	0.7759	0.7991	0.859	0.86	0.9334	0.9224	0.9703	0.9828	0.9658	0.9953
282	0.9109	0.9383	0.996	0.9979	1.074	1.0584	1.1086	1.1223	1.0941	1.1283
284	1.051	1.0814	1.1299	1.1326	1.2025	1.1801	1.2283	1.2424	1.204	1.2419
286	1.186	1.2188	1.2475	1.2529	1.3034	1.2712	1.312	1.3237	1.2787	1.3188
288	1.307	1.3425	1.3396	1.3489	1.3648	1.3207	1.3479	1.3557	1.3059	1.3461
290	1.4153	1.4525	1.4105	1.4251	1.3923	1.3334	1.3416	1.342	1.2893	1.3247
292	1.5051	1.5396	1.4538	1.4775	1.3837	1.3088	1.2933	1.2858	1.2296	1.2544
294	1.5642	1.5968	1.462	1.4984	1.3381	1.2493	1.2079	1.1918	1.1334	1.1433
296	1.5673	1.5957	1.4192	1.469	1.2511	1.1533	1.092	1.069	1.0119	1.0077
298	1.5029	1.5246	1.3216	1.3814	1.1299	1.0301	0.9596	0.9317	0.8802	0.8672
300	1.3559	1.374	1.1711	1.2353	0.9829	0.8908	0.8221	0.7937	0.7513	0.7351
302	1.1587	1.173	0.9938	1.0549	0.8289	0.7508	0.6921	0.6671	0.6346	0.6195
304	0.9494	0.96	0.8176	0.8709	0.6862	0.6242	0.5796	0.5591	0.5358	0.5243
306	0.7632	0.7721	0.6668	0.7104	0.5679	0.5205	0.4894	0.4736	0.4581	0.4505
308	0.6169	0.6254	0.5508	0.5862	0.4786	0.4427	0.4222	0.4104	0.4006	0.3964
310	0.5129	0.5215	0.4693	0.4974	0.4167	0.3889	0.3755	0.3669	0.361	0.3597
312	0.4453	0.4535	0.4166	0.439	0.3769	0.3542	0.3459	0.3394	0.3361	0.337
314	0.4041	0.4128	0.3853	0.4034	0.3538	0.3344	0.3292	0.324	0.3225	0.325
316	0.3828	0.3918	0.3697	0.3845	0.3433	0.3257	0.3223	0.3182	0.3175	0.3216
318	0.3745	0.3841	0.365	0.3771	0.3418	0.3251	0.3228	0.3194	0.319	0.3244
320	0.3748	0.3849	0.3672	0.3772	0.3463	0.33	0.329	0.326	0.3255	0.3325
322	0.3784	0.3891	0.3732	0.3812	0.3546	0.3386	0.3385	0.3362	0.3356	0.3439
324	0.3821	0.3932	0.3791	0.385	0.3632	0.3474	0.3488	0.3469	0.346	0.3561
326	0.3832	0.395	0.3827	0.3869	0.37	0.3549	0.3577	0.3564	0.3555	0.3669
328	0.3814	0.3943	0.384	0.3863	0.3746	0.3598	0.3638	0.3635	0.3624	0.3748
330	0.3803	0.3934	0.3859	0.3866	0.3792	0.3653	0.3708	0.3705	0.3694	0.3834
332	0.3788	0.3922	0.3872	0.3862	0.3837	0.3709	0.3768	0.3774	0.3763	0.3914
334	0.3771	0.3914	0.389	0.3865	0.3883	0.376	0.3838	0.3846	0.3832	0.399
336	0.3738	0.3875	0.3879	0.3841	0.3909	0.3785	0.388	0.3896	0.388	0.4044
338	0.3691	0.3836	0.3852	0.3803	0.3908	0.3795	0.3893	0.3912	0.3898	0.4067
340	0.3623	0.3769	0.3789	0.3732	0.3855	0.3742	0.3848	0.3873	0.3852	0.4022
342	0.356	0.3701	0.3711	0.3656	0.3772	0.3659	0.376	0.3782	0.376	0.393
344	0.3504	0.364	0.3633	0.3585	0.3668	0.3556	0.3641	0.3657	0.3635	0.3792

346	0.3476	0.3607	0.3576	0.3539	0.358	0.346	0.353	0.354	0.3512	0.3655
348	0.3471	0.3594	0.354	0.3519	0.3514	0.3387	0.3438	0.3446	0.3408	0.353
350	0.3484	0.3602	0.3526	0.3525	0.3476	0.3342	0.3377	0.3378	0.333	0.3429
352	0.3505	0.3617	0.3527	0.3544	0.3454	0.3312	0.3334	0.3333	0.3269	0.3353
354	0.3529	0.3636	0.3541	0.3577	0.3448	0.3304	0.3318	0.3312	0.3233	0.3302
356	0.3553	0.3651	0.3553	0.3614	0.345	0.3302	0.3304	0.3295	0.3205	0.3256
358	0.3565	0.3656	0.356	0.3641	0.3441	0.3299	0.329	0.328	0.3181	0.3213
360	0.3558	0.3646	0.3548	0.3652	0.3422	0.3272	0.3262	0.3246	0.3142	0.3159
362	0.3541	0.3618	0.3524	0.3653	0.3389	0.3242	0.3225	0.3206	0.3092	0.31
364	0.3501	0.3572	0.3479	0.3636	0.333	0.3188	0.3166	0.3146	0.3027	0.3021
366	0.3441	0.35	0.3408	0.3594	0.3251	0.3111	0.3083	0.3057	0.2938	0.2926
368	0.3357	0.341	0.3319	0.353	0.315	0.3011	0.298	0.2949	0.2832	0.281
370	0.3263	0.33	0.3211	0.3448	0.3027	0.2892	0.2856	0.2823	0.271	0.2681
372	0.3145	0.3175	0.3088	0.3347	0.2888	0.2757	0.2718	0.2678	0.2572	0.2536
374	0.3011	0.303	0.2944	0.3225	0.273	0.2606	0.256	0.2517	0.242	0.2381
376	0.286	0.2871	0.2781	0.3082	0.2555	0.2438	0.2386	0.234	0.2253	0.2215
378	0.2703	0.2706	0.2616	0.293	0.2374	0.2263	0.2209	0.2155	0.2084	0.2041
380	0.2534	0.2528	0.2437	0.2768	0.2189	0.2081	0.202	0.1966	0.1906	0.1863
382	0.2361	0.2349	0.2257	0.2596	0.1995	0.1894	0.1832	0.1777	0.1729	0.1686
384	0.2166	0.2148	0.2052	0.2391	0.1782	0.1689	0.1626	0.1565	0.1534	0.1497
386	0.1991	0.1968	0.1872	0.221	0.1597	0.151	0.1442	0.1379	0.1364	0.1329
388	0.1821	0.1795	0.1699	0.2032	0.142	0.1338	0.127	0.1206	0.1204	0.1172
390	0.1657	0.163	0.1532	0.1859	0.1252	0.1177	0.1107	0.1044	0.1052	0.1025
392	0.1499	0.147	0.1375	0.1689	0.1095	0.1026	0.0957	0.0893	0.0913	0.0888
394	0.1346	0.1318	0.1224	0.1525	0.0951	0.0885	0.0816	0.0755	0.0784	0.0762
396	0.1204	0.1177	0.1087	0.137	0.082	0.076	0.0692	0.0633	0.0671	0.0652
398	0.1072	0.1047	0.0961	0.1223	0.0703	0.0648	0.0582	0.0525	0.0569	0.0554
400	0.0952	0.0929	0.0847	0.109	0.06	0.0549	0.0485	0.0432	0.0481	0.0468
402	0.084	0.0819	0.0743	0.0965	0.0508	0.0464	0.0402	0.0352	0.0404	0.0394
404	0.0737	0.0719	0.065	0.085	0.0428	0.0388	0.033	0.0283	0.0339	0.033
406	0.0644	0.0628	0.0567	0.0746	0.036	0.0325	0.027	0.0226	0.0284	0.0277
408	0.056	0.0547	0.0493	0.0653	0.0301	0.0269	0.0217	0.0177	0.0237	0.0231
410	0.0487	0.0476	0.043	0.0573	0.0253	0.0225	0.0177	0.0142	0.0202	0.0197
412	0.0417	0.0409	0.0372	0.0497	0.0209	0.0186	0.014	0.0106	0.0169	0.0164
414	0.0358	0.035	0.0322	0.0433	0.0172	0.0152	0.0112	0.0081	0.0143	0.014
416	0.0303	0.0298	0.0278	0.0374	0.0143	0.0125	0.0087	0.0062	0.0121	0.0119
418	0.0257	0.0253	0.0242	0.0326	0.0117	0.0104	0.0068	0.0044	0.0105	0.0103
420	0.0216	0.0214	0.021	0.0283	0.0096	0.0084	0.0053	0.0031	0.0092	0.0089
422	0.0182	0.018	0.018	0.0246	0.0079	0.007	0.0042	0.0021	0.0081	0.008
424	0.0153	0.0151	0.0159	0.0216	0.0065	0.0059	0.0033	0.0015	0.0072	0.0072
426	0.0126	0.0126	0.0139	0.0188	0.0052	0.0047	0.0023	0.0007	0.0065	0.0065
428	0.0104	0.0104	0.0122	0.0165	0.0042	0.004	0.0018	0.0003	0.0059	0.006
430	0.0085	0.0086	0.0108	0.0145	0.0034	0.0033	0.0013	0	0.0055	0.0057
432	0.0069	0.007	0.0095	0.0129	0.0027	0.0027	0.0008	0	0.0051	0.0052
434	0.0056	0.0059	0.0086	0.0116	0.0022	0.0023	0.0007	0	0.0049	0.0052
436	0.0045	0.0048	0.0078	0.0103	0.0017	0.002	0.0004	0	0.0047	0.0049
438	0.0036	0.0039	0.0072	0.0094	0.0015	0.0017	0.0003	0	0.0045	0.0049
440	0.0029	0.0029	0.0065	0.0085	0.0009	0.0013	0	-0.001	0.0042	0.0046
442	0.0022	0.0024	0.0059	0.0077	0.0006	0.0011	0	-0.001	0.0041	0.0044
444	0.0018	0.002	0.0056	0.007	0.0006	0.001	0	-0.001	0.004	0.0044
446	0.0014	0.0017	0.0053	0.0064	0.0005	0.0009	0	-0.001	0.0038	0.0044
448	0.0011	0.0015	0.005	0.006	0.0004	0.0008	0	-0.001	0.0038	0.0042
450	0.0009	0.0012	0.0048	0.0056	0.0003	0.0007	0	-0.001	0.0037	0.0042

Табела 27П

UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за  
 концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин=1:3  
 ( $[Gd^{3+}] = 0.0165 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi] = 0.0508 \text{ mmol/dm}^3$ )

Апсорбанција										
рН	3.634	4.12	4.742	5.204	5.601	6.059	6.541	6.921	7.024	7.829
$\lambda$ (nm)										
250	0.458	0.4589	0.4629	0.4784	0.4872	0.5067	0.5149	0.5184	0.5234	0.5447
252	0.4388	0.4397	0.4461	0.4657	0.4785	0.5013	0.5115	0.5161	0.5211	0.5418
254	0.4293	0.4306	0.4386	0.461	0.4763	0.5016	0.5132	0.5184	0.5235	0.5432
256	0.425	0.4265	0.4358	0.4606	0.4774	0.5044	0.5169	0.522	0.5268	0.5419
258	0.4168	0.4183	0.4281	0.4547	0.4731	0.5016	0.5146	0.5191	0.5235	0.5313
260	0.3986	0.4002	0.4102	0.4386	0.4595	0.4886	0.5031	0.5067	0.5104	0.5127
262	0.377	0.378	0.3889	0.4187	0.4423	0.4721	0.4883	0.4917	0.4955	0.4963
264	0.3645	0.3662	0.3773	0.4086	0.4349	0.4657	0.4834	0.4872	0.4913	0.4946
266	0.3706	0.3719	0.3843	0.4171	0.4458	0.4779	0.4967	0.5026	0.5071	0.5153
268	0.399	0.4012	0.4149	0.4501	0.4803	0.5162	0.5357	0.5436	0.5485	0.5622
270	0.4512	0.4535	0.4695	0.5077	0.5397	0.5805	0.6017	0.6113	0.6178	0.635
272	0.5261	0.5293	0.5483	0.5907	0.6258	0.6737	0.6966	0.7085	0.7155	0.7356
274	0.6235	0.6274	0.6508	0.6985	0.7367	0.7935	0.8184	0.8333	0.8417	0.8629
276	0.7429	0.7474	0.7763	0.8293	0.8718	0.9385	0.9661	0.9844	0.9933	1.016
278	0.8863	0.8906	0.925	0.9842	1.0287	1.1077	1.1352	1.1566	1.167	1.1908
280	1.0515	1.0574	1.0969	1.1629	1.2079	1.2974	1.3267	1.3495	1.3625	1.3801
282	1.2395	1.2476	1.2912	1.3602	1.4014	1.5019	1.5272	1.5485	1.5644	1.5708
284	1.4463	1.4513	1.4984	1.5643	1.6	1.699	1.7182	1.744	1.7566	1.7524
286	1.6495	1.6587	1.7014	1.7523	1.7728	1.8665	1.873	1.8935	1.9135	1.9037
288	1.8472	1.8526	1.8843	1.9086	1.8995	1.9706	1.9638	1.9821	2.0009	2.0028
290	2.0143	2.0162	2.0368	2.0196	1.9693	2.0159	1.9886	2	2.0156	2.0365
292	2.1675	2.1643	2.1612	2.0947	1.9967	2.0002	1.9432	1.9449	1.9549	1.9786
294	2.2848	2.2697	2.2515	2.1348	1.9944	1.9411	1.8502	1.8295	1.8428	1.8317
296	2.3517	2.334	2.2972	2.1233	1.9311	1.8272	1.7023	1.6622	1.6664	1.61
298	2.3612	2.3345	2.2642	2.0432	1.82	1.6766	1.5282	1.4681	1.4671	1.351
300	2.2393	2.232	2.1309	1.9025	1.6564	1.4951	1.3361	1.2681	1.261	1.1073
302	2.0332	2.0119	1.9091	1.6789	1.4509	1.2929	1.1475	1.0796	1.0715	0.9055
304	1.7407	1.7243	1.6222	1.4185	1.231	1.0961	0.9732	0.9134	0.9053	0.7506
306	1.4264	1.4099	1.3267	1.1655	1.0221	0.9169	0.8221	0.7733	0.7676	0.6373
308	1.1476	1.1325	1.0697	0.9491	0.846	0.7686	0.6992	0.6626	0.659	0.5582
310	0.9285	0.9184	0.871	0.7849	0.7111	0.6567	0.6076	0.5804	0.5786	0.5065
312	0.7749	0.7671	0.7326	0.6701	0.6171	0.5788	0.5431	0.5239	0.5235	0.4752
314	0.6756	0.67	0.6435	0.5961	0.5565	0.5288	0.5021	0.4891	0.4901	0.4599
316	0.6143	0.6102	0.5898	0.5518	0.5202	0.4997	0.4781	0.4693	0.4715	0.4563
318	0.5828	0.5793	0.5621	0.5305	0.5019	0.4866	0.4682	0.4631	0.466	0.4619
320	0.5708	0.5681	0.5535	0.5238	0.498	0.4859	0.4686	0.4662	0.4698	0.4751
322	0.5718	0.5691	0.5561	0.5283	0.5031	0.4936	0.4776	0.4772	0.4821	0.4948
324	0.5775	0.5753	0.564	0.5373	0.5132	0.5067	0.4914	0.4933	0.4982	0.5185
326	0.5833	0.5818	0.5713	0.5466	0.5242	0.5208	0.5067	0.5108	0.5164	0.5428
328	0.5862	0.5819	0.5769	0.5525	0.5323	0.5339	0.5204	0.5275	0.5329	0.5664
330	0.5842	0.5816	0.5769	0.5563	0.5387	0.5428	0.5296	0.5381	0.5477	0.5844
332	0.5822	0.5811	0.5771	0.5596	0.5434	0.5504	0.5398	0.55	0.5579	0.6022
334	0.5799	0.5789	0.5765	0.562	0.5496	0.5571	0.5497	0.5622	0.5689	0.6187
336	0.5783	0.5782	0.5765	0.5657	0.5554	0.5667	0.5602	0.5741	0.5816	0.6354
338	0.5736	0.575	0.5745	0.5687	0.5581	0.5749	0.569	0.5844	0.5929	0.6488
340	0.5668	0.5679	0.5706	0.5641	0.5577	0.5765	0.572	0.588	0.5974	0.656
342	0.5564	0.5586	0.5606	0.5572	0.5526	0.5709	0.5682	0.5849	0.5948	0.6533
344	0.5475	0.5481	0.5497	0.5466	0.5421	0.5598	0.5573	0.5733	0.5825	0.6395

346	0.5375	0.5392	0.5395	0.534	0.5282	0.5435	0.5402	0.5548	0.5636	0.6166
348	0.5335	0.5346	0.5331	0.5243	0.5154	0.5279	0.5212	0.5352	0.5425	0.5881
350	0.5317	0.5308	0.5283	0.5175	0.5064	0.5139	0.5054	0.516	0.5223	0.5583
352	0.5329	0.5316	0.5278	0.5147	0.5007	0.5048	0.4942	0.5019	0.5077	0.5326
354	0.5352	0.5341	0.5297	0.5145	0.498	0.4995	0.4883	0.4921	0.4961	0.5081
356	0.5393	0.5384	0.5329	0.5172	0.4992	0.4978	0.4852	0.4854	0.4886	0.4896
358	0.5414	0.5411	0.5354	0.5199	0.4995	0.497	0.4836	0.4798	0.483	0.4707
360	0.5435	0.5437	0.5371	0.5205	0.5002	0.4956	0.4817	0.475	0.4774	0.4543
362	0.5434	0.5426	0.5367	0.5212	0.4994	0.494	0.4796	0.4715	0.4717	0.4382
364	0.5413	0.5401	0.5342	0.5202	0.4974	0.4903	0.476	0.4647	0.4653	0.421
366	0.5354	0.5351	0.5288	0.514	0.4918	0.4834	0.4689	0.4557	0.4549	0.4019
368	0.5273	0.5269	0.5196	0.506	0.4834	0.4738	0.4603	0.4433	0.4425	0.3821
370	0.5162	0.5146	0.5079	0.4944	0.471	0.4608	0.4466	0.4287	0.4267	0.3608
372	0.5019	0.5	0.4924	0.479	0.4556	0.4443	0.43	0.4105	0.4072	0.3373
374	0.4853	0.484	0.4747	0.4615	0.4384	0.4263	0.4122	0.3908	0.3873	0.3138
376	0.4661	0.4639	0.4547	0.441	0.4182	0.404	0.3905	0.3685	0.3645	0.2897
378	0.444	0.4418	0.4325	0.4181	0.3948	0.3801	0.3663	0.3432	0.3396	0.2644
380	0.4213	0.4186	0.4084	0.3938	0.3701	0.3542	0.3407	0.3182	0.3139	0.2401
382	0.3963	0.394	0.3821	0.3672	0.3445	0.3272	0.3145	0.2917	0.2873	0.2162
384	0.37	0.3677	0.3554	0.3397	0.3179	0.2997	0.2867	0.2638	0.2602	0.1923
386	0.3407	0.3384	0.3249	0.3093	0.2875	0.2687	0.2564	0.2348	0.2311	0.1688
388	0.3147	0.3123	0.2983	0.2818	0.2607	0.2413	0.2295	0.2083	0.2052	0.1476
390	0.2884	0.2861	0.2715	0.2543	0.2342	0.2142	0.2027	0.1828	0.1798	0.1278
392	0.2638	0.2613	0.2464	0.229	0.2093	0.1891	0.1779	0.1591	0.1564	0.1102
394	0.2399	0.2372	0.2219	0.2044	0.1857	0.1651	0.1547	0.1369	0.1344	0.0938
396	0.2169	0.2144	0.1991	0.1813	0.1635	0.1429	0.1328	0.1164	0.1143	0.0792
398	0.1948	0.1923	0.1771	0.1595	0.1427	0.122	0.1126	0.0975	0.0959	0.0661
400	0.1744	0.1717	0.157	0.1398	0.1239	0.1039	0.0948	0.0813	0.0799	0.0546
402	0.1555	0.1531	0.1386	0.1216	0.1072	0.0876	0.079	0.0666	0.0653	0.0443
404	0.1382	0.1358	0.1218	0.1054	0.0922	0.0729	0.0654	0.0538	0.0529	0.0357
406	0.1222	0.1197	0.1063	0.0908	0.0788	0.0603	0.0533	0.043	0.0423	0.0283
408	0.1076	0.1049	0.0923	0.0778	0.0669	0.0494	0.0428	0.0336	0.0334	0.0217
410	0.0942	0.0922	0.0801	0.0661	0.0569	0.0403	0.0344	0.026	0.0259	0.0167
412	0.0822	0.0802	0.0689	0.056	0.0482	0.0322	0.027	0.0195	0.0198	0.0122
414	0.0716	0.0695	0.0588	0.0472	0.0405	0.0254	0.0209	0.0143	0.0145	0.0082
416	0.0617	0.0598	0.0499	0.0395	0.034	0.0199	0.0158	0.01	0.0102	0.0053
418	0.0534	0.0517	0.0424	0.0329	0.0287	0.0154	0.0119	0.0065	0.0068	0.003
420	0.0453	0.0438	0.0352	0.0267	0.0235	0.0113	0.0085	0.0038	0.004	0.0006
422	0.0387	0.0372	0.0292	0.0219	0.0192	0.0081	0.006	0.0016	0.0021	0
424	0.0326	0.0314	0.0241	0.0177	0.0162	0.0058	0.004	0	0.0001	-0.001
426	0.0273	0.0262	0.0193	0.014	0.0131	0.0035	0.002	-0.001	-0.001	-0.003
428	0.0228	0.0222	0.0152	0.0107	0.0106	0.0014	0.0007	-0.002	-0.002	-0.003
430	0.019	0.0183	0.0119	0.0083	0.0086	0.0004	0	-0.003	-0.003	-0.004
432	0.0155	0.0152	0.0093	0.0056	0.007	0	-0.001	-0.003	-0.003	-0.004
434	0.0127	0.0126	0.0069	0.004	0.0054	-0.001	-0.001	-0.004	-0.004	-0.005
436	0.0105	0.0103	0.0047	0.0024	0.004	-0.002	-0.002	-0.004	-0.004	-0.005
438	0.0084	0.0086	0.003	0.001	0.0031	-0.003	-0.002	-0.005	-0.004	-0.005
440	0.0069	0.0074	0.0022	0.0002	0.0027	-0.003	-0.002	-0.005	-0.004	-0.005
442	0.0057	0.0062	0.0009	0	0.0019	-0.003	-0.002	-0.005	-0.004	-0.005
444	0.0045	0.0051	0	-0.001	0.0009	-0.004	-0.003	-0.005	-0.005	-0.005
446	0.0034	0.0041	0	-0.002	0.0003	-0.004	-0.003	-0.005	-0.005	-0.005
448	0.003	0.0036	-0.001	-0.002	0.0003	-0.004	-0.003	-0.005	-0.005	-0.005
450	0.0026	0.003	-0.001	-0.002	0	-0.004	-0.003	-0.005	-0.005	-0.005

Табела 28П

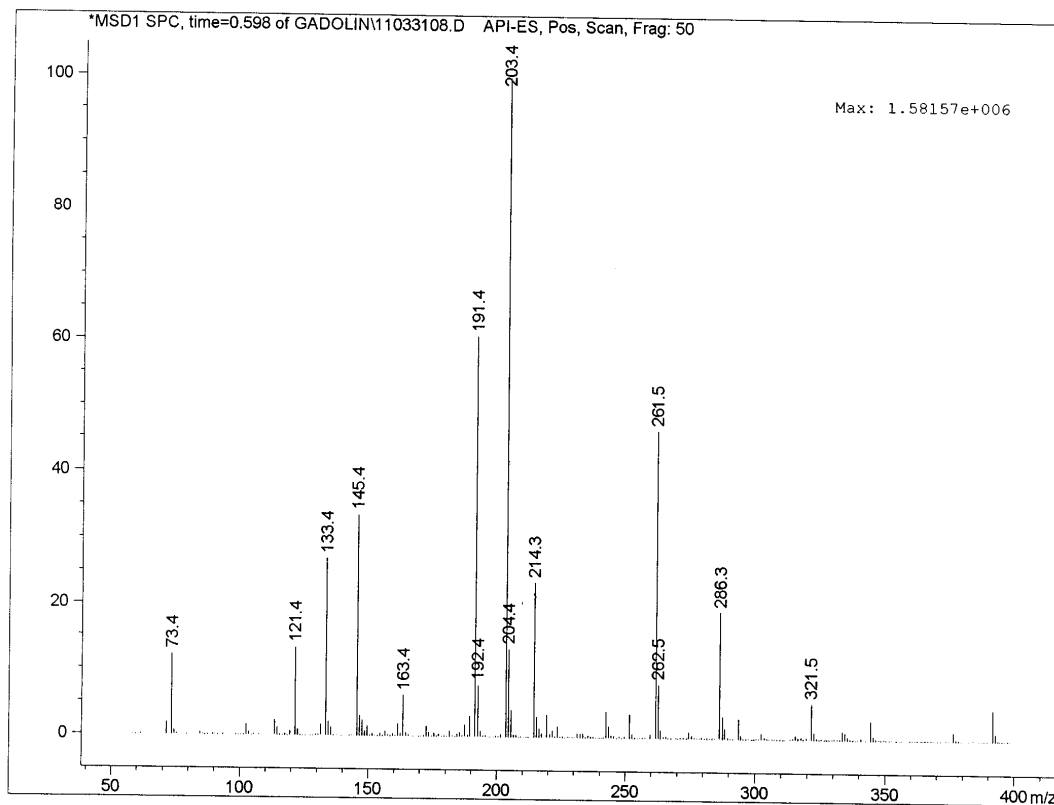
UV-VIS спектри раствора  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацина на различитим рН вредностима за  
 концентрациони однос  $Gd^{3+}$ -моксифлоксацин=2:1  
 ( $[Gd^{3+}] = 0.0715 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $[moxi] = 0.0349 \text{ mmol/dm}^3$ )

Апсорбанција										
рН	3.601	4.055	4.579	5.205	5.565	6.273	6.525	6.958	7.2	7.469
$\lambda$ (nm)										
250	0.3011	0.3193	0.3216	0.3417	0.3473	0.3508	0.3504	0.3451	0.3506	0.3547
252	0.2903	0.3091	0.3128	0.3359	0.3426	0.348	0.3478	0.3429	0.3493	0.3535
254	0.2852	0.3043	0.3093	0.3348	0.3422	0.3495	0.3492	0.3448	0.3513	0.3545
256	0.2811	0.3004	0.306	0.3332	0.3412	0.3503	0.35	0.3457	0.3528	0.3543
258	0.2719	0.2913	0.2966	0.3249	0.3333	0.344	0.344	0.3403	0.3483	0.349
260	0.2574	0.2772	0.2816	0.3102	0.3195	0.3311	0.3311	0.3288	0.3385	0.3392
262	0.2447	0.2655	0.2686	0.298	0.3079	0.3201	0.3201	0.3186	0.3301	0.3321
264	0.2422	0.2642	0.2664	0.2968	0.307	0.3199	0.32	0.3188	0.3316	0.3351
266	0.2544	0.2774	0.2799	0.3117	0.3224	0.336	0.3362	0.3347	0.3488	0.3532
268	0.2829	0.307	0.3105	0.3449	0.3558	0.3706	0.371	0.369	0.3844	0.3888
270	0.3278	0.3529	0.3586	0.3965	0.4081	0.4252	0.4257	0.4231	0.4399	0.4434
272	0.3886	0.4151	0.4237	0.4668	0.479	0.4989	0.4998	0.4961	0.515	0.5162
274	0.4657	0.4929	0.5059	0.5552	0.5682	0.5917	0.5933	0.5882	0.6091	0.6076
276	0.559	0.5867	0.6054	0.6619	0.6757	0.7032	0.7055	0.6987	0.7208	0.7149
278	0.6688	0.6971	0.7227	0.7877	0.8019	0.834	0.8365	0.8273	0.8497	0.837
280	0.7945	0.823	0.8567	0.9287	0.9435	0.9793	0.9824	0.97	0.9896	0.9672
282	0.9348	0.9619	1.0023	1.079	1.0918	1.1305	1.1343	1.1174	1.1332	1.0984
284	1.0796	1.1044	1.1485	1.2213	1.2299	1.2671	1.2697	1.2487	1.2567	1.21
286	1.221	1.2408	1.2841	1.3393	1.34	1.3697	1.3713	1.3446	1.3412	1.2873
288	1.3479	1.3615	1.3993	1.4268	1.4165	1.4325	1.4339	1.3977	1.3735	1.3127
290	1.4622	1.4684	1.4975	1.4909	1.4649	1.4645	1.4634	1.4156	1.3621	1.2918
292	1.5541	1.553	1.57	1.5223	1.4801	1.4571	1.4544	1.3947	1.3102	1.2229
294	1.6155	1.6053	1.6014	1.5045	1.446	1.4007	1.3948	1.3286	1.22	1.1153
296	1.6183	1.5962	1.5646	1.4198	1.3472	1.2812	1.2732	1.2076	1.0942	0.9819
298	1.5475	1.5151	1.4547	1.2733	1.1933	1.1146	1.1053	1.0493	0.9506	0.8432
300	1.3942	1.3568	1.2804	1.0877	1.0095	0.9288	0.9201	0.8773	0.8048	0.714
302	1.1893	1.1536	1.0732	0.8959	0.8272	0.755	0.7479	0.7178	0.6723	0.6017
304	0.9707	0.9421	0.8703	0.7239	0.6691	0.6109	0.6057	0.5861	0.5607	0.5095
306	0.7782	0.7585	0.6997	0.5881	0.547	0.5036	0.4996	0.4863	0.4741	0.438
308	0.6284	0.6167	0.5717	0.4909	0.4606	0.4295	0.4265	0.4168	0.4106	0.3857
310	0.5232	0.5177	0.4841	0.4261	0.4038	0.3815	0.3793	0.3709	0.3673	0.3502
312	0.4542	0.4529	0.4278	0.3856	0.3686	0.3522	0.3505	0.3426	0.3396	0.3279
314	0.4127	0.4136	0.3949	0.3625	0.3488	0.3361	0.3346	0.3268	0.3238	0.3157
316	0.3912	0.3936	0.379	0.3525	0.3403	0.33	0.3287	0.3205	0.3171	0.3117
318	0.3838	0.3865	0.375	0.3519	0.3407	0.3317	0.3304	0.3217	0.3177	0.3144
320	0.3842	0.3871	0.378	0.3572	0.3463	0.3383	0.3371	0.328	0.3237	0.3215
322	0.3886	0.3916	0.3844	0.3654	0.3547	0.3477	0.3468	0.3372	0.3331	0.3323
324	0.3927	0.3952	0.39	0.3728	0.3628	0.357	0.3557	0.3463	0.3433	0.3437
326	0.3943	0.3969	0.3935	0.3784	0.3688	0.3643	0.3634	0.354	0.3521	0.3544
328	0.3923	0.3953	0.3938	0.3815	0.3726	0.3695	0.3686	0.3598	0.3586	0.3626
330	0.3916	0.3946	0.3953	0.386	0.3776	0.3764	0.3759	0.3659	0.3655	0.3704
332	0.3905	0.3936	0.3969	0.3906	0.3834	0.3832	0.3827	0.3729	0.3724	0.3775
334	0.3888	0.3931	0.3983	0.3952	0.3887	0.3902	0.3896	0.3803	0.3794	0.3855
336	0.3857	0.3902	0.3975	0.3967	0.3914	0.3943	0.3941	0.3846	0.3847	0.3911
338	0.3811	0.3853	0.3936	0.3947	0.3902	0.3944	0.3939	0.3854	0.3864	0.3935
340	0.374	0.3782	0.3861	0.3882	0.3834	0.3881	0.3878	0.3797	0.3815	0.3896
342	0.3673	0.3712	0.3779	0.3792	0.374	0.3788	0.3784	0.3703	0.3727	0.38
344	0.3614	0.3651	0.3709	0.3698	0.3644	0.3681	0.368	0.3595	0.3605	0.3671

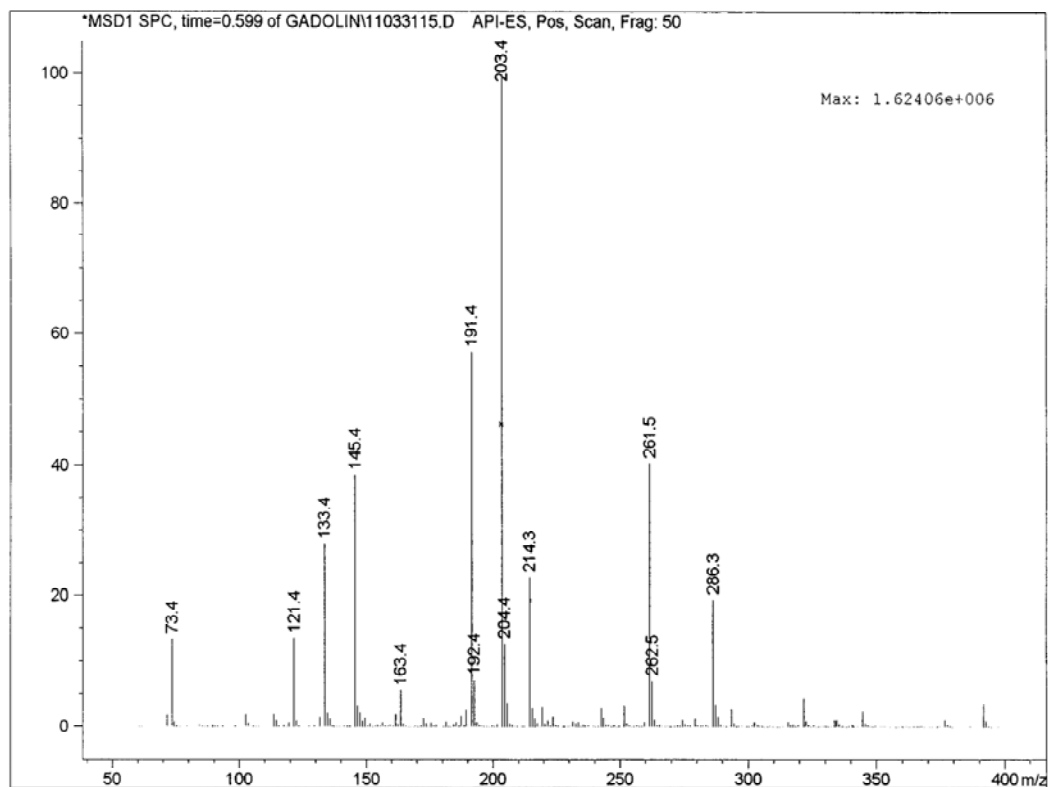
346	0.3591	0.3623	0.3672	0.3637	0.3579	0.3606	0.3599	0.3513	0.3504	0.3539
348	0.3584	0.3614	0.3652	0.3605	0.3541	0.3557	0.3547	0.3455	0.3426	0.3424
350	0.3599	0.3629	0.3661	0.3603	0.3534	0.3541	0.3535	0.3437	0.3377	0.3335
352	0.3616	0.3649	0.3677	0.3618	0.3548	0.3549	0.354	0.3438	0.3354	0.3267
354	0.3642	0.3675	0.3701	0.3646	0.3577	0.3573	0.3563	0.3457	0.3354	0.3222
356	0.3658	0.3698	0.3722	0.3671	0.3602	0.3595	0.3588	0.3479	0.336	0.3184
358	0.3672	0.3712	0.3735	0.3692	0.3622	0.3609	0.3605	0.3493	0.3362	0.3153
360	0.3661	0.3703	0.3721	0.3685	0.362	0.36	0.3597	0.349	0.3352	0.3109
362	0.3639	0.3684	0.3694	0.3663	0.3601	0.3577	0.3573	0.3465	0.3322	0.3053
364	0.3593	0.3637	0.3643	0.3617	0.3554	0.3524	0.3519	0.3417	0.327	0.298
366	0.3524	0.3574	0.3568	0.3539	0.3482	0.3444	0.3438	0.3342	0.3197	0.2892
368	0.3436	0.3481	0.3467	0.3436	0.3378	0.3332	0.3327	0.3235	0.3094	0.2778
370	0.3328	0.3377	0.3348	0.3309	0.3254	0.3197	0.3192	0.3104	0.2972	0.2653
372	0.3198	0.3246	0.3204	0.3158	0.3101	0.3034	0.3029	0.2948	0.2826	0.2511
374	0.3056	0.3104	0.3048	0.2986	0.2929	0.2851	0.2844	0.2773	0.2662	0.2358
376	0.2896	0.2947	0.2869	0.2801	0.2743	0.2651	0.2644	0.2582	0.2478	0.2193
378	0.2733	0.2776	0.269	0.2601	0.2544	0.2439	0.2432	0.2379	0.229	0.2024
380	0.2553	0.2595	0.249	0.2392	0.2333	0.2214	0.2208	0.2164	0.2088	0.1847
382	0.2376	0.2412	0.23	0.2182	0.2122	0.1996	0.1985	0.1953	0.1887	0.1674
384	0.2167	0.2205	0.2075	0.1944	0.1884	0.1749	0.1737	0.1714	0.1665	0.1479
386	0.1986	0.2021	0.188	0.1736	0.1676	0.1534	0.1522	0.1505	0.147	0.1313
388	0.181	0.1843	0.1696	0.154	0.1478	0.1333	0.132	0.1308	0.1284	0.1157
390	0.1641	0.1672	0.1517	0.1352	0.1291	0.1143	0.113	0.1124	0.1109	0.1009
392	0.1478	0.1507	0.135	0.1178	0.1117	0.0969	0.0955	0.0954	0.0947	0.0875
394	0.1325	0.1352	0.1194	0.1017	0.0957	0.0811	0.0798	0.08	0.08	0.0751
396	0.1181	0.1208	0.1049	0.0873	0.0814	0.0673	0.0658	0.0664	0.0669	0.0641
398	0.1049	0.1074	0.0919	0.0744	0.0687	0.0551	0.0536	0.0545	0.0554	0.0544
400	0.0926	0.0949	0.0801	0.0628	0.0574	0.0445	0.0431	0.0441	0.0452	0.0458
402	0.0815	0.0837	0.0694	0.0527	0.0477	0.0355	0.0341	0.0353	0.0367	0.0386
404	0.0712	0.0736	0.0599	0.0439	0.0393	0.0282	0.0266	0.0279	0.0294	0.0325
406	0.0621	0.0645	0.0515	0.0364	0.0322	0.0219	0.0204	0.0219	0.0234	0.0272
408	0.0536	0.0559	0.0438	0.0298	0.026	0.0167	0.0151	0.0166	0.0182	0.0227
410	0.0463	0.0487	0.0373	0.0243	0.0209	0.0126	0.0112	0.0126	0.0141	0.0191
412	0.0397	0.0423	0.0318	0.0198	0.0168	0.0093	0.0078	0.0093	0.0107	0.0163
414	0.0336	0.0363	0.0265	0.0158	0.0132	0.0067	0.0052	0.0068	0.008	0.0138
416	0.0284	0.0312	0.0223	0.0127	0.0103	0.0046	0.0032	0.0048	0.0061	0.0118
418	0.0236	0.0266	0.0184	0.0099	0.0078	0.0029	0.0017	0.0031	0.0043	0.0102
420	0.0198	0.0227	0.0152	0.0077	0.0062	0.0019	0.0005	0.002	0.0032	0.0092
422	0.016	0.0193	0.0124	0.0059	0.0044	0.0008	0	0.0011	0.0021	0.0081
424	0.0132	0.0164	0.0101	0.0044	0.0033	0.0001	-0.001	0.0003	0.0013	0.0075
426	0.0107	0.0139	0.0081	0.0032	0.0023	0	-0.001	0	0.001	0.007
428	0.0084	0.0117	0.0064	0.0022	0.0015	0	-0.001	0	0.0005	0.0065
430	0.0066	0.0099	0.0051	0.0013	0.0008	-0.001	-0.002	0	0.0001	0.0061
432	0.0053	0.0085	0.0041	0.0009	0.0006	-0.001	-0.002	0	0.0001	0.0059
434	0.0039	0.0073	0.0031	0.0003	0.0001	-0.001	-0.002	0	0	0.0057
436	0.0029	0.0061	0.0023	0	0	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0055
438	0.0019	0.005	0.0016	0	0	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0054
440	0.001	0.0042	0.001	0	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0051
442	0.0004	0.0036	0.0006	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0053
444	0	0.003	0.0002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0051
446	0	0.0024	0	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.005
448	0	0.0022	0	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0051
450	0	0.0017	0	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	0	0.0049

Масени спектри хидролизе  $Gd^{3+}$  јона

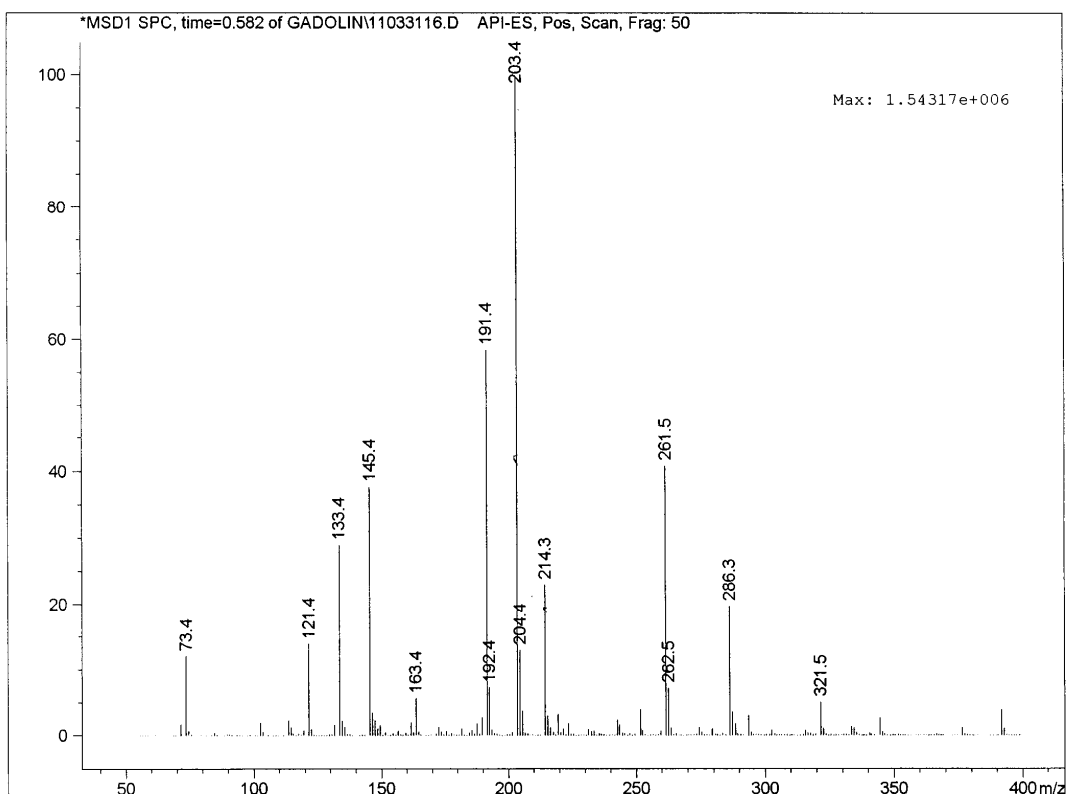
Слика 29П  
ESI MS спектар  $10.0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 Gd^{3+}$  на pH 1.530



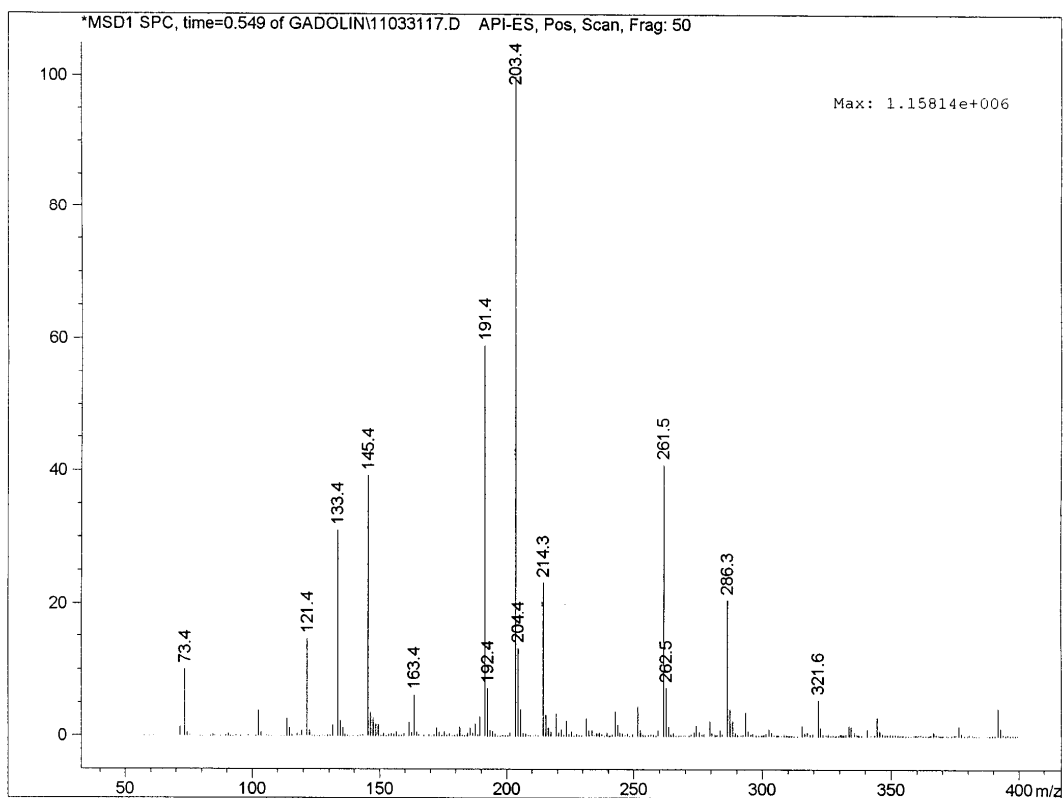
Слика 30П  
ESI MS спектар  $1.0 \text{ mmol/dm}^3 Gd^{3+}$ , pH 2.450



**Слика 31П**  
**ESI MS спектар 0.5 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, рН 2.781**

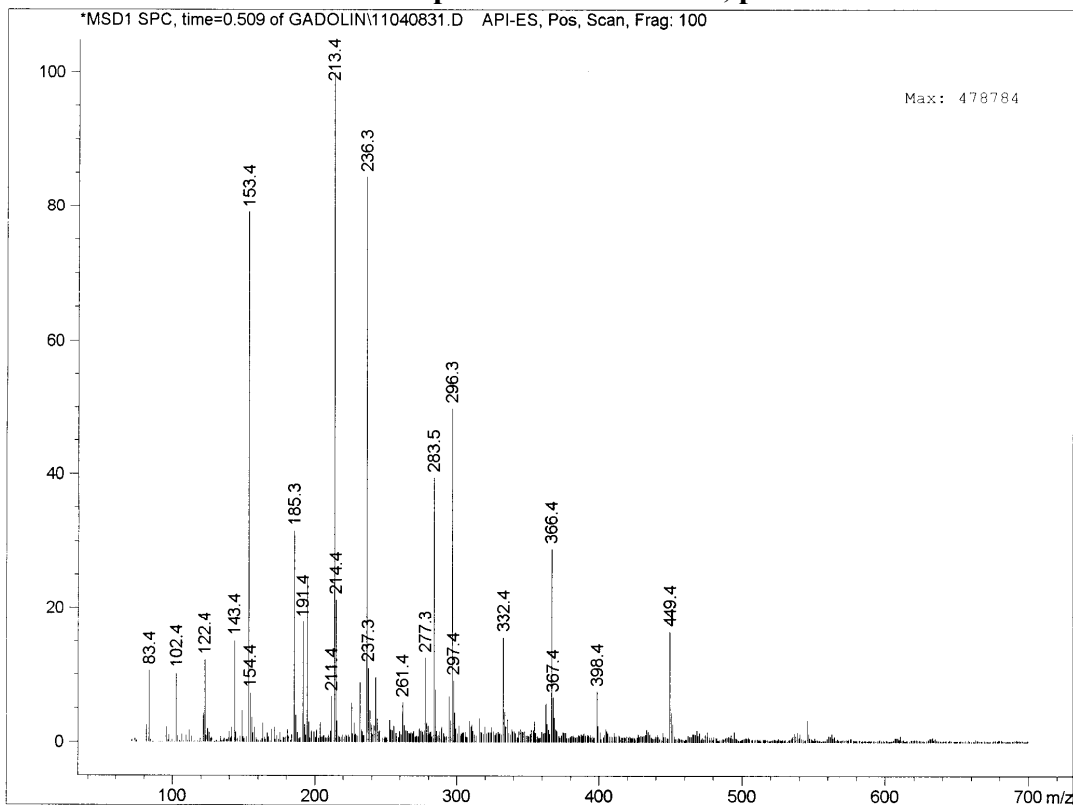


**Слика 32П**  
**ESI MS спектар 0.1 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, рН 3.447**

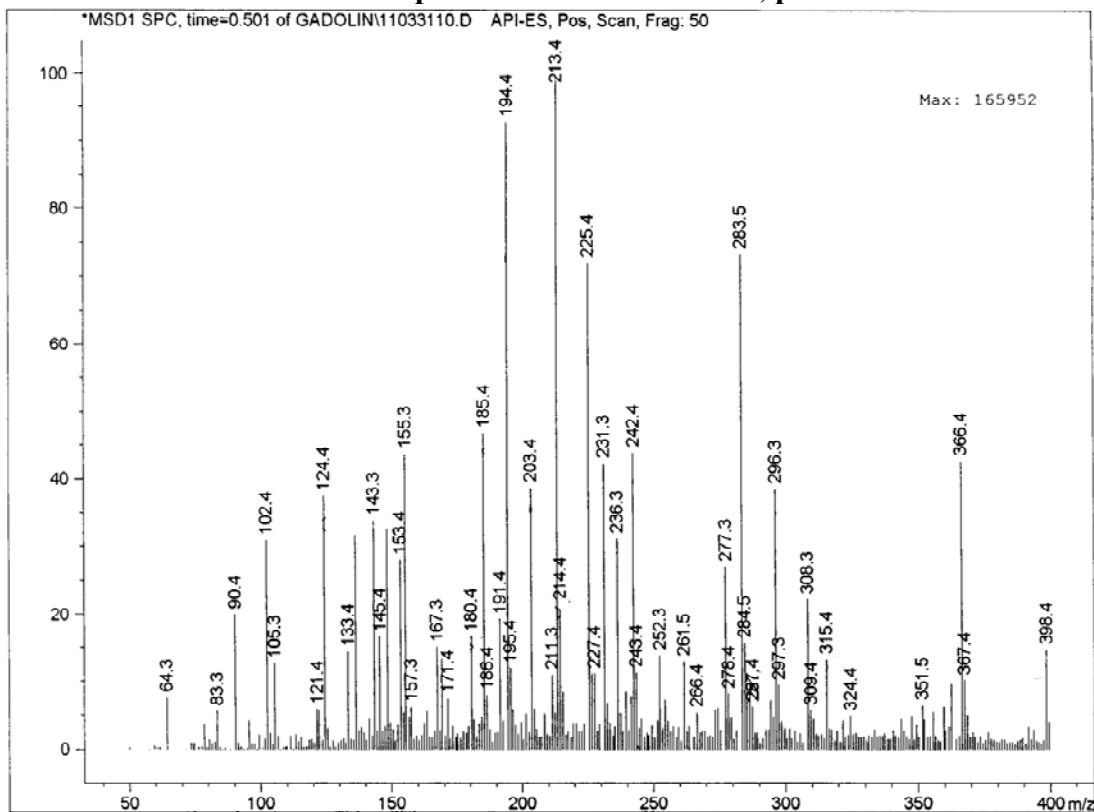




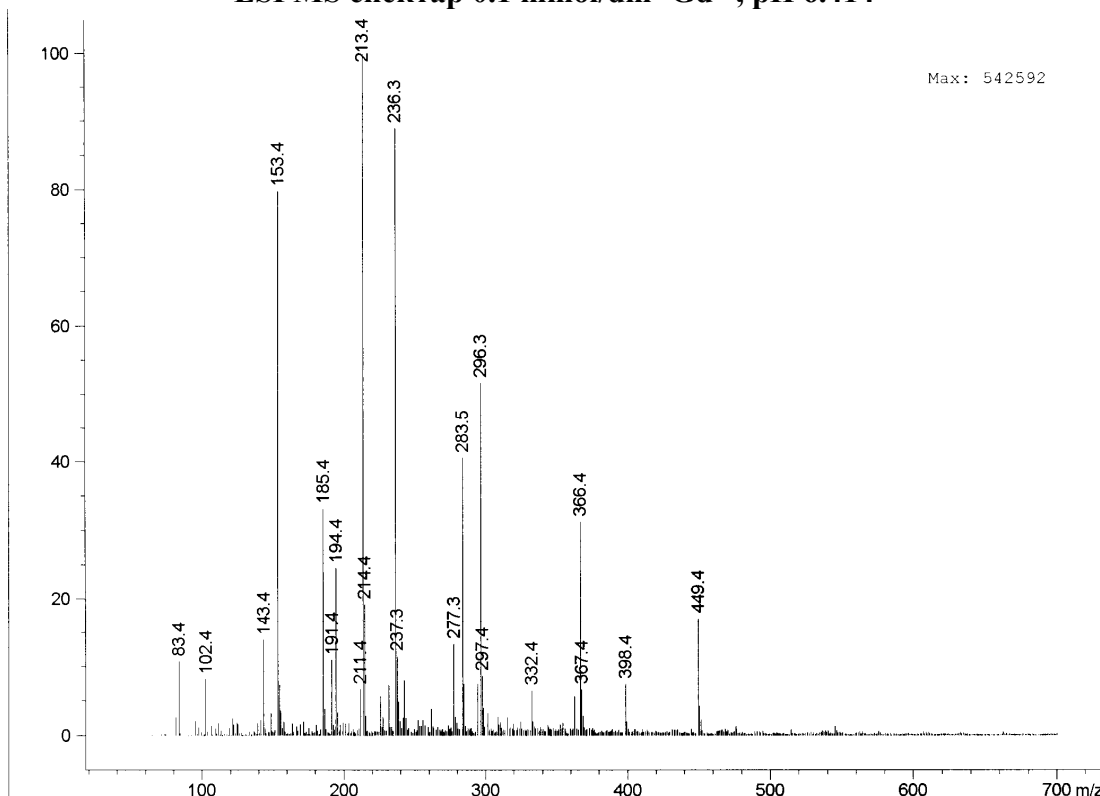
Слика 33П  
ESI MS спектар  $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , pH 5.497



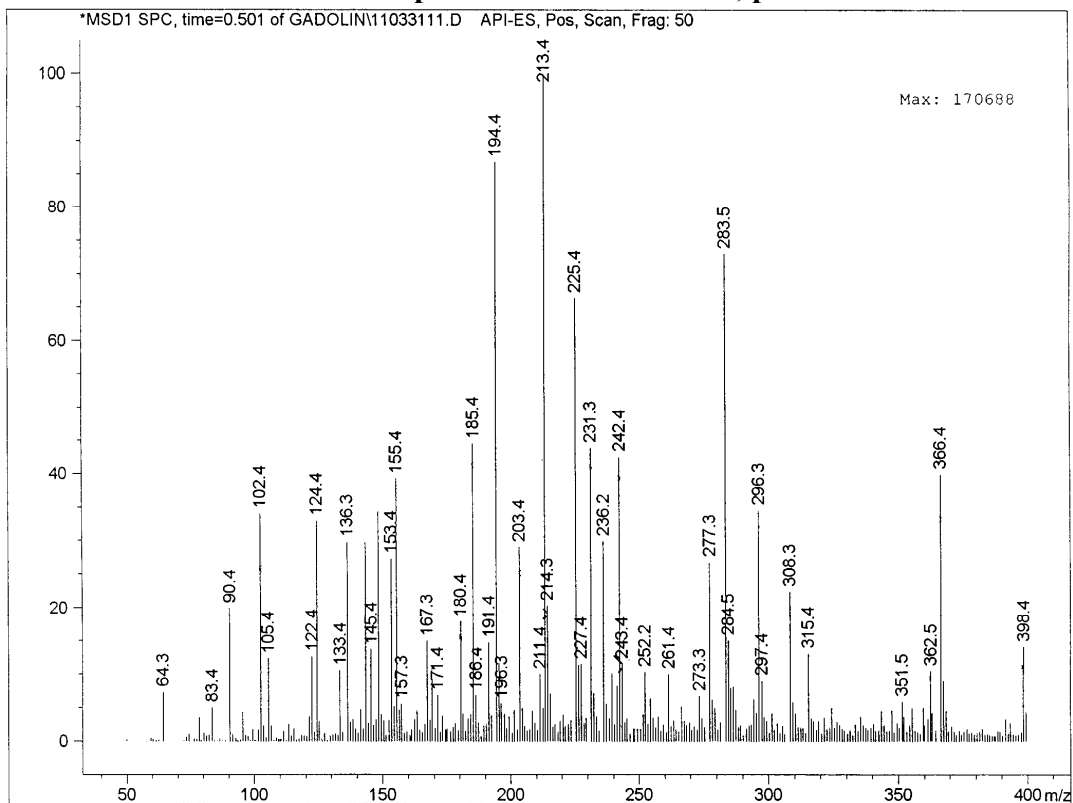
Слика 34П  
ESI MS спектар  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+}$ , pH 6.043



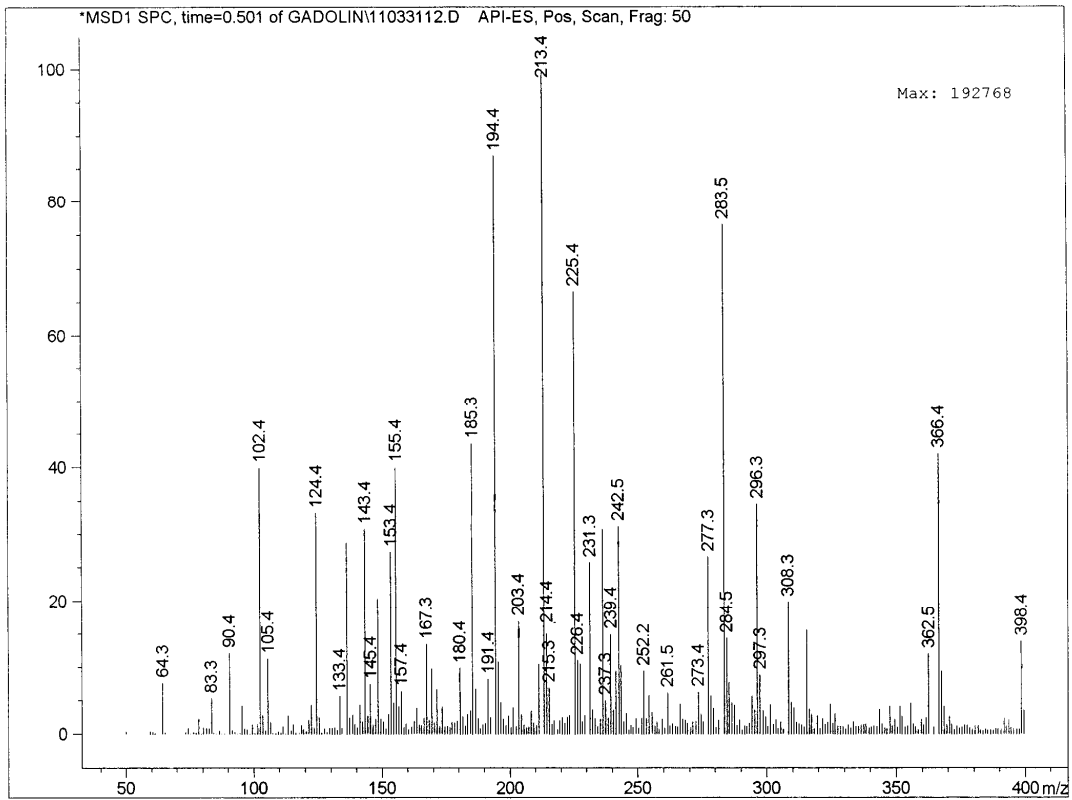
**Слика 35П**  
**ESI MS спектар 0.1 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, pH 6.414**



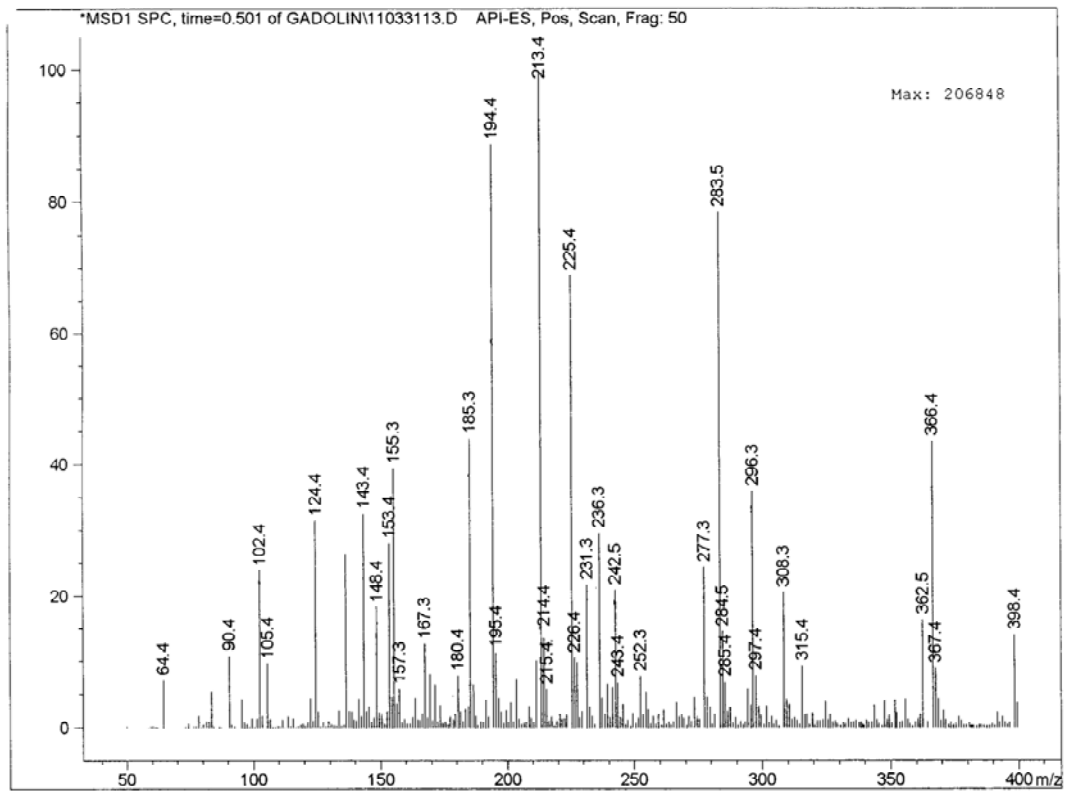
**Слика 36П**  
**ESI MS спектар 0.025 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, pH 6.654**



**Слика 37П**  
**ESI MS спектар 0.025 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, pH 6.995**

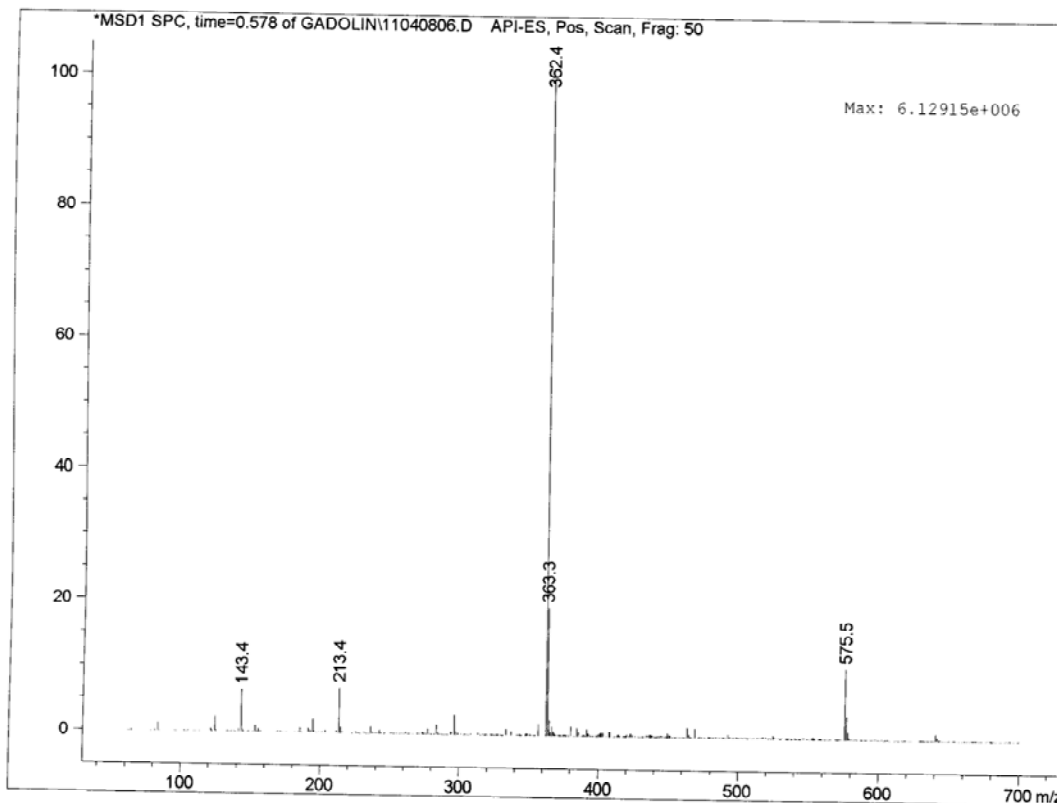


**Слика 38П**  
**ESI MS спектар 0.025 mmol/dm<sup>3</sup> Gd<sup>3+</sup>, pH 7.551**

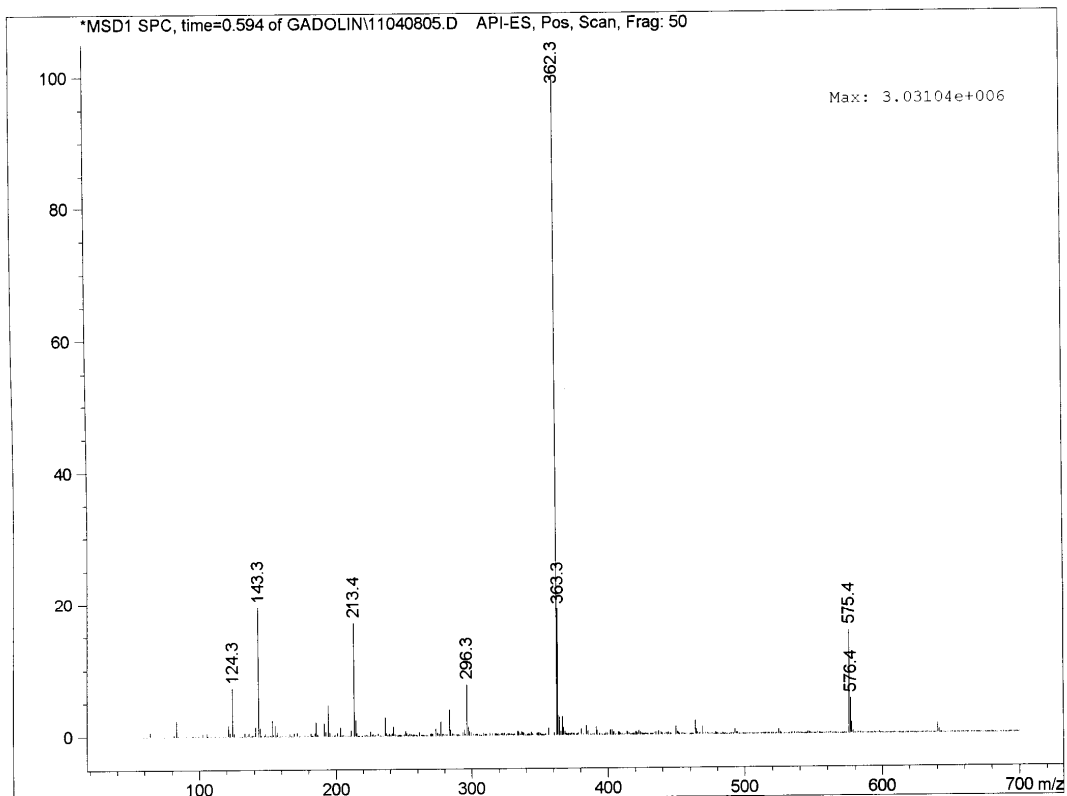


Масени спектри комплексирања  $Gd^{3+}$  јона и офлоксацина

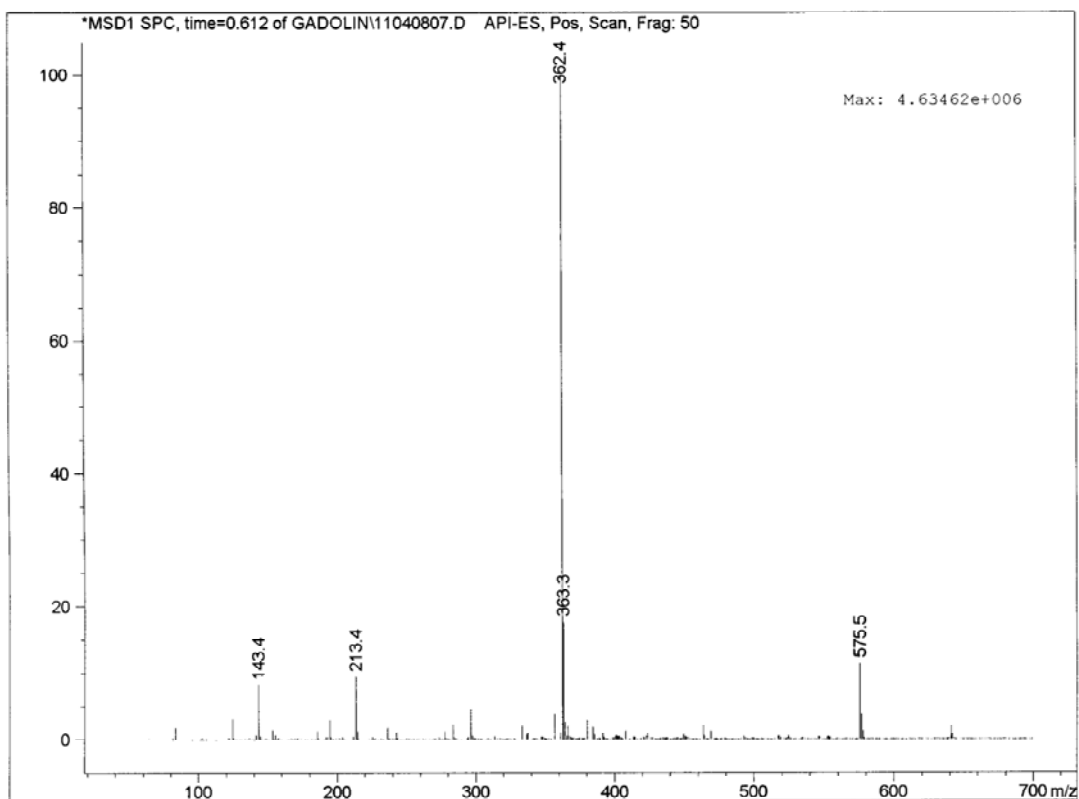
Слика 39П  
ESI MS спектар  $0.5 \text{ mmol/dm}^3 Gd^{3+} + 1.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 4.552



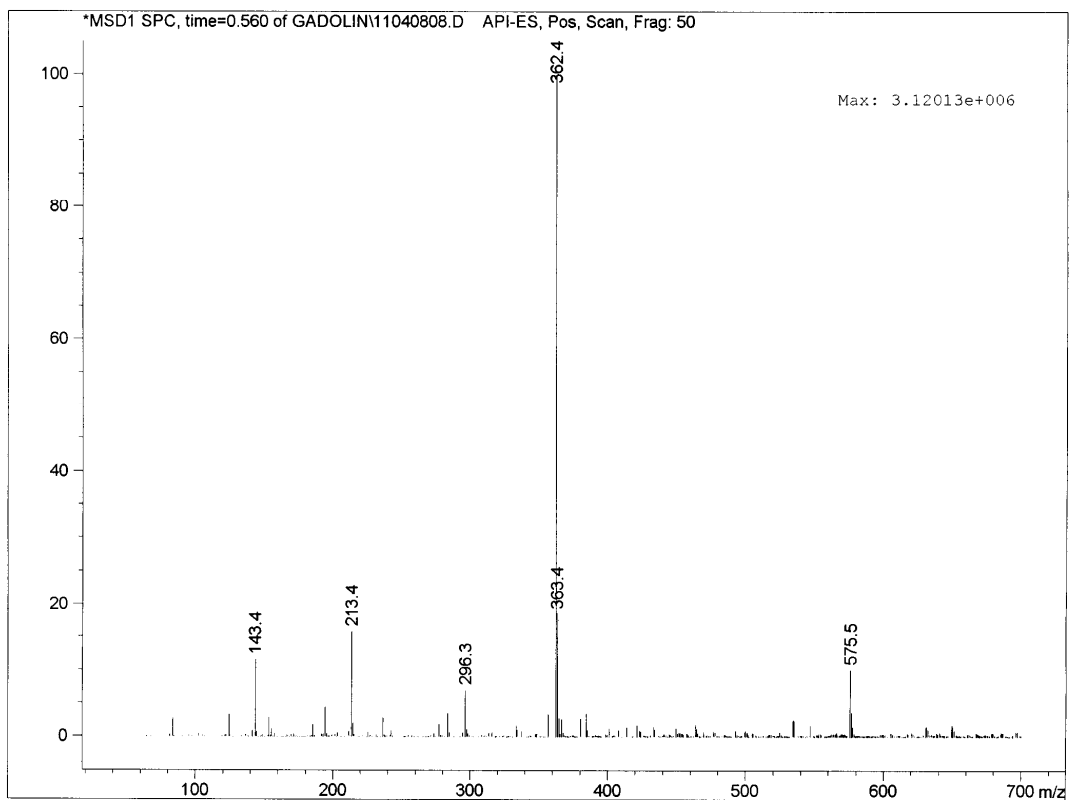
Слика 40П  
ESI MS спектар  $0.5 \text{ mmol/dm}^3 Gd^{3+} + 0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 4.662



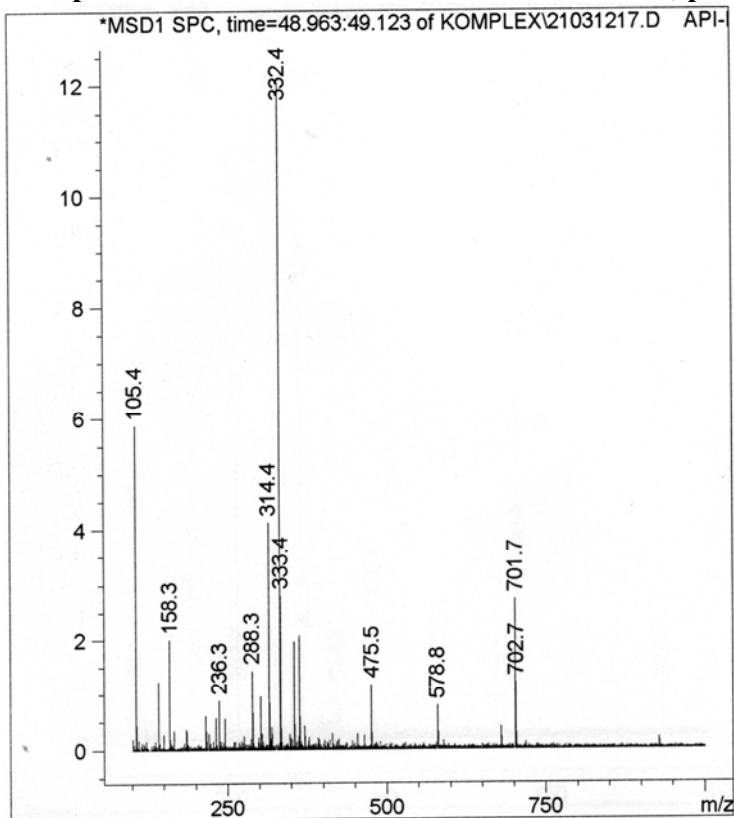
**Слика 41П**  
**ESI MS спектар  $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 1.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 5.911**



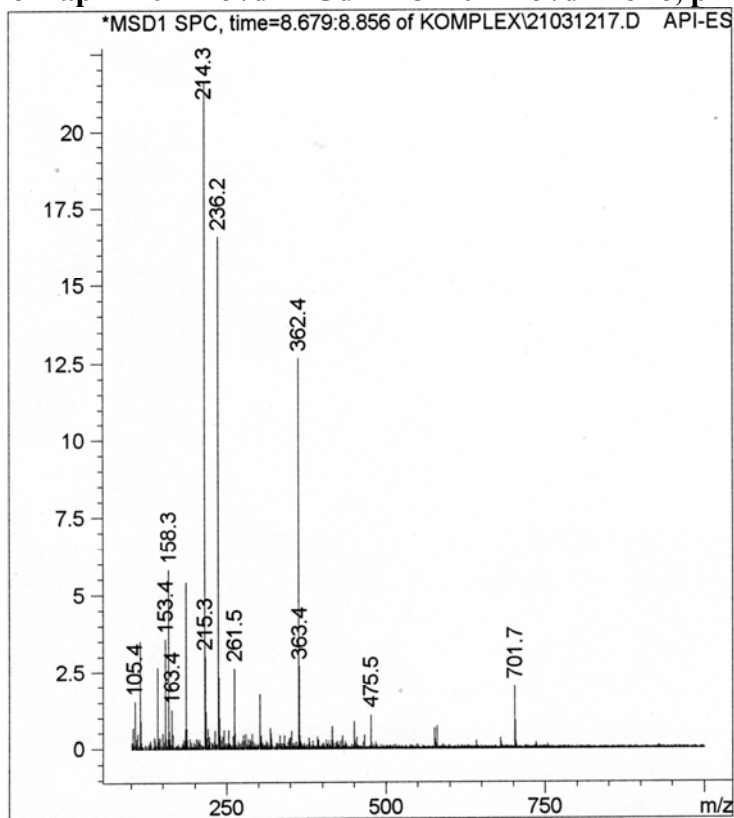
**Слика 42П**  
**ESI MS спектар  $0.5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 2.0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 6.440**



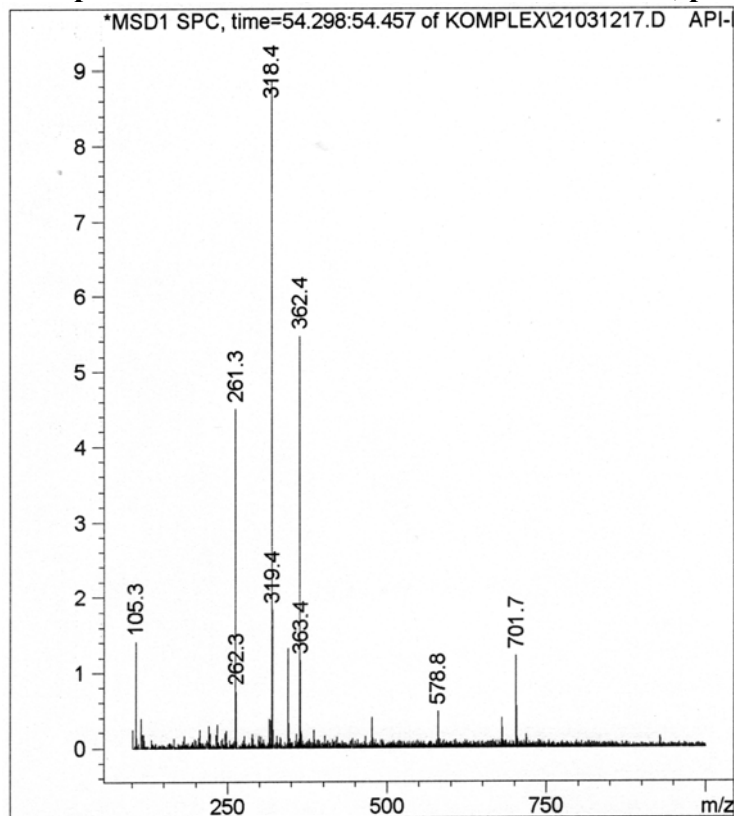
**Слика 43П**  
**ESI MS спектар  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo, pH 5.11 (70V)}$**



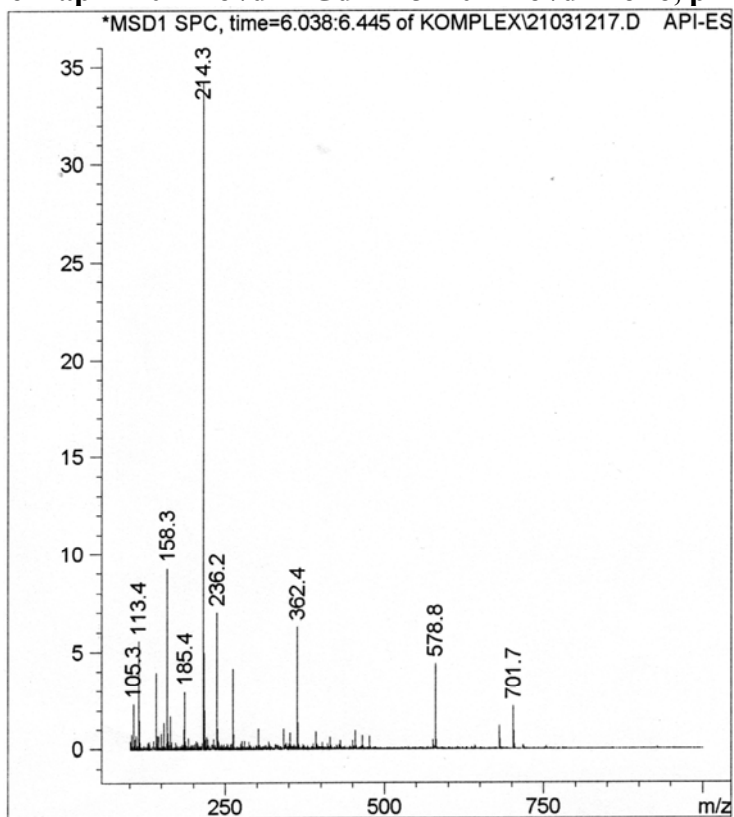
**Слика 44П**  
**ESI MS спектар  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo, pH 4.88 (70V)}$**



Слика 45П  
ESI MS спектар  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 4.73 (30V)



Слика 46П  
ESI MS спектар  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ Gd}^{3+} + 3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ oflo}$ , pH 4.37 (30V)







---

**БИОГРАФИЈА**

мр Иван Т. ЛАЗАРЕВИЋ

мр Иван Т. ЛАЗАРЕВИЋ рођен је 11.06.1969. године у Крушевцу. Основну школу завршио је у Крушевцу, Војну гимназију у Загребу (средња оцена 5.00), а Војну академију смер АБХО у Београду и Крушевцу (средња оцена 9.94). Запослио се у Школском Центру АБХО у Крушевцу 1992. године.

Магистрирао је на ПМФ-у у Крагујевцу 2000. године (средња оцена 9.00), одбравивши магистарску тезу под насловом „*Утицај површински активних супстанци на прототропне и равнотеже комплексирања у раствору алуминијум(III)-јона и офлоксацина*“.

Активно се бавио научним истраживањима у подручју неорганске токсикологије, неорганске хемије и хемије водених раствора.

Уписао је 2007. године Докторске студије на ПМФ-у у Крагујевцу (студијски програм *Неорганска хемија*). Положио је све наставним планом предвиђене испите (на студијској групи *Хемија*, модул *Неорганска хемија*) са средњом оценом 9.00.

Објавио већи број радова, чланака, скрипти, лекција и Правила и Упутстава из стручних области АБХО. На листи је експерата и предавача међународне Организације за забрану хемијског оружја (ОРСВ). Похађао више стручних курсева у земљи и иностранству.

Тренутно на дужности заменика команданта Центра за усавршавање кадрова АБХО Војске Србије у Крушевцу.

Говори енглески језик.

Ожењен, отац двоје деце.



---

**РАДОВИ ПРОИСТЕКЛИ ИЗ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Из докторске дисертације, публиковано је три научна рада и четири научна саопштења.

**Научни радови:**

1. P. Đurđević, M. Jelikić-Stankov, I. Lazarević, *The effect of surfactants on equilibria in aluminum(III) ion+ofloxacin solutions and adsorption of ofloxacin on aluminum-oxide*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 74, 1261-1271, 2001. IF=1,376; M21.
2. P. Đurđević, R. Jelić, Lj. Joksović, I. Lazarević, M. Jelkić-Stankov, *Study of solution equilibria between gadolinium(III) ion and moxifloxacin*, Acta Chim. Slov. 57, 386–397, 2010. IF=1,066; M23.
3. M. Cvijović, V. Kilibarda, M. Jelikić-Stankov, I. Lazarević, I. Jakovljević, Lj. Joksović, P. Đurđević, *ESI-MS Study of Speciation in Hydrolyzed Aluminum Chloride Solutions* J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-11, 2012. IF=1,444; M22.

**Научна саопштења:**

1. М. Јеликић-Станков, И. Лазаревић, П. Ђурђевић, *Утицај површински активних материја на адсорпцију офлоксацина на  $\gamma$ -алуминијум оксиду*, 43. Саветовање Српског хемијског друштва, Београд, FH1, 121-124, 24 и 25. јануар 2005.
2. А. Ћирић, I. Lazarević, R. Jelić, M. Jelikić-Stankov, P. Đurđević, *Speciation on aluminium(III)-fluoroquinolone family members solutions*, 15 Euroanalysis, Innsbruck, Austria, P015-B2, 6-10 September 2009.
3. И. Ж. Јаковљевић, И. Лазаревић, Љ. Јоксовић, А. Ћирић, Р. Јелић, П. Ђурђевић, *Равнотеже комплексирања Gd(III)-јона са неким флуорохинолонима*, 49. Саветовање Српског хемијског друштва, АН04-О, 29-32, Крагујевац, 13-14. мај 2011.
4. И. Т. Лазаревић, И. Јаковљевић, А. Ћирић, М. Јеликић-Станков, Р. Јелић П. Ђурђевић, *Рачунарско моделирање хумане плазме*, 49. Саветовање Српског хемијског друштва, Крагујевац, АН10-Р, 46-49, 13-14. мај 2011.

Публиковани радови из докторске дисертације, презентовани су на наредним странама.



## The Effect of Surfactants on Equilibria in Aluminium(III) Ion + Ofloxacin Solution and Adsorption of Ofloxacin on Aluminium-Oxide

Predrag Djurdjevic,\* Milena Jelikic-Stankov,<sup>†</sup> and Ivan Lazarevic<sup>††</sup>

Faculty of Science, p.o. box 60, 34000 Kragujevac, Yugoslavia

<sup>†</sup>Faculty of Pharmacy, 11000 Belgrade, Yugoslavia

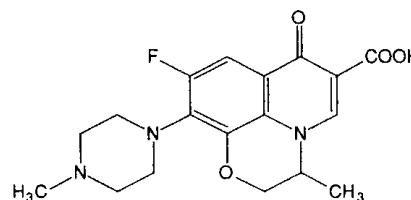
<sup>††</sup>Military School for RB Defense, 37000 Krusevac, Yugoslavia

(Received September 11, 2000)

The protonation and complex formation equilibria in aluminium(III) + ofloxacin (Hoflo) solutions in the presence of either cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 5.0 mmol L<sup>-1</sup>), cetylpyridinium chloride (CPCL, 2.0 mmol L<sup>-1</sup>) or polyethylene glycol tert-octylphenyl ether (triton X-100, 1.0 mmol L<sup>-1</sup>) have been studied by glass-electrode potentiometric measurements in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl ionic medium at 298 K. In the concentration range 0.4 ≤ C<sub>Al</sub> ≤ 1.0 mmol L<sup>-1</sup>, with a ligand to metal ratio of 1:1 to 5:1, and 3.5 ≤ -log h ≤ 7.0, a non-linear least squares treatment of the data indicate that in all studied systems the complex Al(oflo)<sup>2+</sup> forms as the dominating one. Its overall stability constant (log β) is in the range 10.37–11.90 (depending on the type of surfactant), which is about 1 log unit higher than in the absence of surfactants. The formation of bis(ofloxacinato) and mixed protonated or hydrolytic complexes is largely suppressed in the presence of surfactants. The adsorption of ofloxacin on aluminium oxide was studied in neutral, acidic (0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl) and alkaline (0.001 mol L<sup>-1</sup> NaOH) media; in absence and presence of ionic surfactants; sodium dodecylsulfate (SDS, 10 mmol L<sup>-1</sup>); or CTAB (5.0 mmol L<sup>-1</sup>). The adsorption is of the Freundlich type and is higher in neutral media with no presence of surfactants, while in an acidic medium it is significantly enhanced in the presence of SDS. Both surfactants increase the adsorption in an alkaline medium. The observed phenomena were explained based on the hydrophilic/lipophilic properties of the surfactants.

In the previous work<sup>1</sup> we studied the complex formation equilibria between Al<sup>3+</sup> ion and ofloxacin (Hoflo) in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl ionic medium at 298 K. At ligand-to-metal concentration ratios between 2:1 to 10:1 the main complexes found were Al(oflo)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Al(Hoflo)<sup>3+</sup> and Al(oflo)<sup>2+</sup> with several mixed hydrolytic complexes, in the pH range 3.0–8.0. In the presence of sodium dodecylsulfate (SDS), hydrolysis was favored, and only the formation of the Al(oflo)<sup>2+</sup> complex was detected at higher ligand-to-metal concentration ratios (> 3).<sup>2</sup> Since the presence of SDS was unfavorable for complexation, in the present work we used cationic, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and cetylpyridinium chloride (CPCL) and a neutral surfactant, polyethylene glycol *tert*-octyl phenyl ether (triton X-100), with a ligand-to-metal concentration ratio of up to 5:1 to study their effect on identity and stability of species formed in the Al<sup>3+</sup> + ofloxacin system.

Ofloxacin (9-fluoro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido(1,2,3-*de*)1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid), H(oflo), belongs to the class of fluorinated 4-quinolone antibiotics, which finds use in the treatment of systemic urinary and respiratory infections.<sup>3,4</sup> From the chemical structure (Scheme 1) it may be seen that ofloxacin belongs to a class of heterocyclic amino acids, which in solution may exist in cationic, zwitterionic, neutral and anionic forms. The neutral form (Hoflo) presented in Scheme 1, actually, for the difference of naturally occurring amino acids may exist in solution, since the protonation constant of carboxylate group and



Scheme 1. Structure of ofloxacin.

tertiary nitrogen are not separated too much apart.<sup>5,6</sup> Thus, the number of forms as well as the vicinity of the carbonyl and carboxyl groups make ofloxacin a suitable ligand for hard acid metal ions, particularly for aluminium(III) and iron(III) ions. Aluminium is generally regarded as a toxic or detrimental element.<sup>7,8</sup> Nevertheless, its compounds are extensively used pharmaceutically as antacids, phosphate binders or adjuvants in various protein-based vaccines. Environmental sources of aluminium include food, food additives, drinks, aerosols, etc. Normally, despite an oral intake ranging from 5 to 10 mg daily (ingestion of food, aluminium-based drugs and drink, atmospheric dust), aluminium is very little absorbed in serum and tissues.<sup>9</sup> Normal serum levels are 0.07 to 0.30 μmol L<sup>-1</sup>. However, high levels of aluminium may accumulate in the tissues of patients who have renal insufficiency or kidney failure, and are treated by dialysis fluids that contain aluminium, or are given aluminium hydroxide gels to control a high plasma phosphate level.<sup>10</sup> These patients may develop blood, bone or

brain diseases, which may be linked to excess aluminum.<sup>11</sup> Clinical investigations<sup>12,13</sup> have shown that concomitant intake of ofloxacin and aluminum-based drugs results in a reduced maximal serum concentration of ofloxacin accompanied by decrease in AUC (area under the "concentration vs time" curve), thus leading to a decreased bio-availability of the drug, down to 30%. An explanation for this interaction may be chelation between aluminium and ofloxacin and/or the adsorption of ofloxacin on the surface of aluminium-hydroxide/aluminium phosphate. These interactions may result in an increased availability of soluble aluminium. As already pointed out by several authors,<sup>14,15,16</sup> dietary carboxylic acids (especially citric) may form stable complexes with Al, giving rise to shift of the dissolution equilibrium of poorly soluble  $\text{Al}(\text{OH})_3$  or  $\text{AlPO}_4$  to the right, and thus to increase their solubility. In this way, released aluminium ions may be complexed into neutral forms either by dietary acids or by other substances present in gastrointestinal (gi) tract. These forms could then pass through the gi membrane.<sup>17</sup> Therefore, it may be expected that the simultaneous ingestion of ofloxacin and  $\text{Al}(\text{OH})_3$  can lead to the formation of soluble Al-complexes that can be absorbed by the gi tract. Various surface-active substances, normally present in the gi tract,<sup>17</sup> will influence the aluminium-ofloxacin complex formation. Also, the cellular uptake of aluminium-ofloxacin complexes is dependent on their interaction with membrane phospholipids so as to mimic their function; the effect of surfactants (or, surface-active agents, SAA), CTAB, CPCL and triton X-100 on complex formation between  $\text{Al}^{3+}$  and ofloxacin was studied. These substances alter the properties of solution interfaces (solution-vapor, solution-solid, etc.).<sup>18</sup> In this way, SAA may influence the processes taking place at or inside the interfaces. The SAA are generally classified as either anionic, cationic or nonionic (neutral) according to the charge of their hydrophilic head group upon dissolution in water.<sup>19</sup> If sufficient SAA is added to an aqueous solution, aggregation of its molecules occurs, giving rise to ordered structures called micelles. Micelles are often spherical in shape, but at a larger concentration of SAA, they can take other, more distorted forms.<sup>20</sup> The threshold concentration of SAA at which micelles begin to form is termed the critical micelle concentration (CMC).<sup>21</sup> The CMC values<sup>22</sup> are for SDS, 8.2 for CTAB 0.70–0.98 for CPCL 0.58–0.62 and for triton X-100 0.24–0.90  $\text{mmol L}^{-1}$ . The CMC values vary with the composition and concentration of the supporting ionic medium; therefore, in this work we used significantly higher concentrations of SAA than their CMC. Other substances present in solution could partition into the interior of the micelle, thereby increasing the total aqueous solubility of the substance by a process referred to as micellar solubilization.<sup>23</sup> Thus, the surfactant would have the effect to solubilize both the quinolone and its chelate complex with aluminum, to exclude water molecules from the complexation reaction sphere and to prevent the hydrolysis of Al-ofloxacin complexes.

The primary aim of the present paper was to provide reliable data concerning speciation in aluminium(III) + ofloxacin + surfactant solutions so that they could be used in modeling studies of aluminium-based drugs and ofloxacin interactions in vivo. Adsorption phenomena play important roles in hydrolyzed aluminium solutions. Aluminium hydroxide and various

hydrolytic polymers are surface active and can easily adsorb changed species from a solution. It is therefore of interest to study adsorption in a model system,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  + Hoflo, in order to gain a better understanding of speciation in  $\text{Al}^{3+}$  + ofloxacin solutions. The adsorption of ofloxacin on aluminium oxide and the effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate (SDS, 10.0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) and a cationic one, CTAB (5.0  $\text{mmol L}^{-1}$ ), were investigated to derive a model for ofloxacin bio-availability upon a concomitant intake of aluminium-antacids and ofloxacin.

The solution equilibria between the aluminium(III) ion and ofloxacin in the presence of CTAB, CPCL or triton X-100 were studied by potentiometry in the 2:1 to 5:1 concentration range of ofloxacin to aluminium. The protonation equilibria of the ofloxacin anion as well as the hydrolysis of aluminium (in the presence of CPCL) were investigated in separate experiments.

## Experimental

**Reagents and Analysis.** A stock solution of aluminium(III) chloride was prepared by dissolving doubly recrystallized  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  p.a. (Merck) in twice-distilled water. The appropriate amount of HCl was added to avoid an initial hydrolysis of the  $\text{Al}^{3+}$  ion. The aluminium content was determined gravimetrically by precipitation with either 8-quinolinol or ammonia. Both methods gave the same results within 0.3%. The concentration of free acid was determined potentiometrically using a Gran plot. The constancy of the total proton concentration with time was considered to be a criterion for the absence of initial aluminium(III) hydrolysis, and was periodically checked by titration against standard NaOH before each series of measurements.

Ofloxacin, purity 100% ( $M_r = 361.4$ ) was from Hoechst (Frankfurt am Main, F.R.G.). Standardization was performed by potentiometric titration against standard NaOH. Sodium *n*-dodecyl sulfate (SDS),  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ ,  $M_r = 288.4$ , cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB),  $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]\text{Br}^-$ ,  $M_r = 364.5$ , and cetylpyridinium chloride were products of Sigma (USA) while polyethylene glycol *tert*-octylphenyl ether (triton X-100),  $M_r = 647$ , was a product of Fluka (Austria). Before use SDS was purified by washing with ether and 95% ethanol and subsequently dried in a desiccator containing  $\text{P}_2\text{O}_5$ . CTAB and CPCL were washed with ethanol and recrystallized from water. The traces of poly(ethyleneglycol)s in triton were removed by extraction with *n*-butanol. A purity of surfactants was checked with TLC and spectrophotometry according to recommended procedure<sup>24,25</sup> and by a measurement of the pH of their water solution. No basic impurities were detected.

A sodium hydroxide solution was prepared from concentrated volumetric solutions p.a. (Merck) by diluting with freshly boiled doubly distilled water, and cooled under a constant flow of purified nitrogen. The alkali concentration was checked by titration against potassium hydrogen phthalate. The hydrochloric acid solution was made from HCl "Suprapure" (Merck) and standardized against tris(hydroxymethyl)aminomethane. A solution of lithium chloride was prepared from LiCl, p.a. (Merck) by dissolving recrystallized salt in twice-deionized water. The concentration was determined by evaporation of a known volume of solution to dryness at 573 K and weighing the residue.

**Equipment.** Potentiometric measurements were carried out using a Tacussel Isis 20000 digital pH-meter with a resolution

$\pm 0.1$  mV (in some measurements an extended scale was used with a resolution  $\pm 0.01$  mV). The pH meter was equipped with a Tacussel TC-100 combined electrode. Titrant was delivered from a Metrohm Dosimat model 665. A constant temperature was maintained with a VEB Prufgerate model E3E circulating ultrathermostat. Spectral measurements were made on single-beam Pye Unicam SP5-600 spectrophotometer.

**Procedure.** All titrations were performed in a double-mantled, thermostated glass vessel closed with a Teflon cork. A constant temperature, to  $(298.0 \pm 0.1)$  K, was maintained by circulating thermostated water through a jacket. Purified and oxygen-free nitrogen gas was bubbled through the solution to provide an inert atmosphere and stirring. Additional stirring of the solution was achieved with a magnetic stirrer.

An electrochemical cell used for potentiometric measurements may be represented as RE/test solution (TS)/GE, where RE and GE denote reference and glass electrode, respectively. The general composition of the test solution was: TS =  $M \text{ Al}^{3+}$ ,  $H \text{ H}^+$ ,  $X \text{ SAA}$ ,  $L \text{ oflo}$ ,  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Cl}^-$ , where  $M$ ,  $H$ ,  $X$ , and  $L$  denote the total molar concentrations of the corresponding species.

The potential of the glass electrode is given by the expression:

$$E = E_0 + Q \log h + E_j,$$

where  $h$  is the concentration of free proton(s),  $E_0$  is a constant which includes the standard potential of the glass electrode,  $Q$  is the slope of the glass electrode response and  $E_j$  is a liquid-junction potential, whose contribution to  $E$  was found to be negligible.  $E_0$  was determined as described previously.<sup>2</sup> Experimental data obtained in strong acid–strong base titration were analyzed with the aid of the Magec<sup>26</sup> program. The calculated values were  $Q = 59.1$  mV and self-protolysis constant of water,  $\text{p}K_{\text{W}} = 13.50(2)$ . In the presence of surfactants the obtained values for  $\text{p}K_{\text{W}}$  were  $13.12 \pm 0.02$  (CTAB),  $13.01 + 0.03$  (CPCL) and  $13.40 \pm 0.06$  (triton).

To reduce the concentration of hydrogen ion, the alkali was added stepwise from an autoburette in small aliquots (0.005–0.01 mL). The potential was monitored after each addition of titrant. The titration protocol was chosen in such a way that the hydrolysis and complexation reactions would proceed under conditions as close to true equilibrium as possible. To achieve this, potential readings were taken every 5 min until steady values of  $\pm 0.1$  mV  $\text{min}^{-1}$  were obtained. Hence, the average equilibration time for each point was 5–10 min at the beginning of titration and 20–30 min when complexation or hydrolysis occurred. If stabilization of potential readings could not be achieved within this time interval, the addition of a new aliquot of titrant was initiated, and corresponding point was excluded from the calculations. No back titrations were performed. Instead, agreement between duplicate titrations (better than 1%) served as a criterion for reversibility of the reaction. The titrations were terminated when drifted potential readings were obtained and turbidity of the solutions was observed.

**Adsorption of Ofloxacin on Aluminium Oxide.** Prior to use, aluminium-oxide (Merck, p.a.) was heated to 1373 K for three hours, and afterwards cooled to room temperature in a desiccator containing CaO. A series of test tubes with grounded stoppers were prepared by washing in concentrated hot  $\text{HNO}_3$ . 0.1 g of aluminium oxide was weighed (with accuracy  $\pm 0.1$  mg) into each of the test tubes. Varying volumes of the stock solution of ofloxacin (0.1–0.5 mL) were transferred into tubes using an Eppendorf micro-pipette. Then, three series were prepared by the further addition of either, distilled water,  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$  or  $0.001$

$\text{mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ , so as to make the final volume of the solution 5.0 mL. Other series were prepared in the same way, but with the addition of either SDS ( $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) or CTAB ( $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Tubes were stoppered, clamped into a thermostated (298 K) shaker, and energetically shaken for 3 hours. The concentration of ofloxacin was determined spectrophotometrically at 270 nm. The calibration curve was taken in the concentration range of ofloxacin between  $1\text{--}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Data Treatment.** Three kinds of equilibria should be considered in the present study: (a) protonation of the ofloxacin ion, (b) hydrolysis of the aquaaluminium(III) ion, and (c) general three-component equilibria,



which include the case  $q = 0$ , i.e. the formation of pure binary complexes of  $\text{Al}^{3+}$ . Negative values of  $q$  represent hydroxo complexes. The overall protonation constants of ofloxacin were determined in separate experiments. The hydrolysis of aquaaluminium(III) ion was taken into account based on our previous work.<sup>27</sup> Thus, in evaluating the three component equilibria (c), the binary models (a) and (b) were considered as being known.

A mathematical analysis of the experimental data was performed with the aid of a general least-squares program, Superquad.<sup>28</sup> In Superquad calculations the identity and stability of complexes which give the best fit to the experimental data were determined by minimizing the error-squares sum of the potentials ( $U$ ):

$$U = \sum w_i (E_{\text{obs}} - E_{\text{calc}})^2,$$

where  $w_i$  represents a statistical weight assigned to each point of the titration curve,  $E_{\text{obs}}$  and  $E_{\text{calc}}$  refer to the measured potential of the cell and the calculated one assuming the specific model and trial constants, respectively. The best model was chosen using the following criteria: (a) the lowest value of  $U$ , (b) standard deviation in calculated stability constants less than 0.15 log units (ie. about 10%, of the corresponding stability constant value), (c) standard deviations in potential residuals, defined as:

$$s = \{e^T / (N - k)\},$$

where  $e$  is a vector in potential residuals ( $E_{\text{obs}} - E_{\text{calc}}$ ),  $w$  is a weighting matrix,  $N$  is the number of observations and  $k$  is the number of refinable parameters, with a standard deviation in volume readings of 0.005 mL and a standard deviation in potential readings of 0.1 mV should be less than 3.0. (d) goodness-of-fit statistics,  $\chi^2$  (Pearson's test) at the 95% confidence level, with 6 degree of freedom, less than 12.6 and (e) reasonably random scatter of potential residuals without any significant systematic trends. Along with Superquad the program Best<sup>29</sup> was also used for calculations.

## Results and Discussion

**The Effect of CPCL on Hydrolysis of the Aquaaluminium(III) Ion.** The hydrolysis of aquaaluminium in the absence of surfactants<sup>1</sup> and in the presence of either SDS, CTAB, tween 20 or triton X-100,<sup>30</sup> in  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiCl}$ , at 298 K, was studied in our earlier work so the results obtained there were used in this work. The main hydrolytic species were  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Al}_3(\text{OH})_4^{5+}$  and  $\text{Al}_{13}(\text{OH})_{32}^{7+}$ . In addition to this

Table 1. Summary of Potentiometric Experimental Data Obtained in 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl(S) Ionic Medium at 298 K  
 CTAB = cetyltrimethylammonium bromide, CPCL = cetylpyridinium chloride. C<sub>X</sub> denotes concentration of corresponding species in mmol L<sup>-1</sup>.

Run	C <sub>Al</sub>	C <sub>offo</sub>	C <sub>HCl</sub>	S + CTAB	S + CPCL	S + Triton	pH range	Z <sub>max</sub>
1	5.0	—	3.0	—	2.0	—	2.587–4.231	0.127
2	2.0	—	3.0	—	2.0	—	2.593–4.526	0.329
3	1.0	—	3.0	—	2.0	—	2.533–4.485	0.500
4	0.5	2.5	3.0	—	2.0	—	2.853–7.091	1.80
5	1.0	2.5	3.0	—	2.0	—	2.737–6.616	1.90
6	2.0	2.5	3.0	—	2.0	—	2.624–6.192	1.17
7	1.0	2.4	3.0	5.0	—	—	2.640–6.712	1.40
8	0.6	1.0	2.0	5.0	—	—	3.082–6.988	1.58
9	0.4	1.2	2.0	5.0	—	—	3.025–7.123	1.86
10	1.0	2.4	3.0	—	—	1.0	2.714–6.100	1.22
11	0.6	1.0	2.0	—	—	1.0	2.799–6.153	1.59
12	0.4	1.2	2.0	—	—	1.0	2.939–7.498	2.0

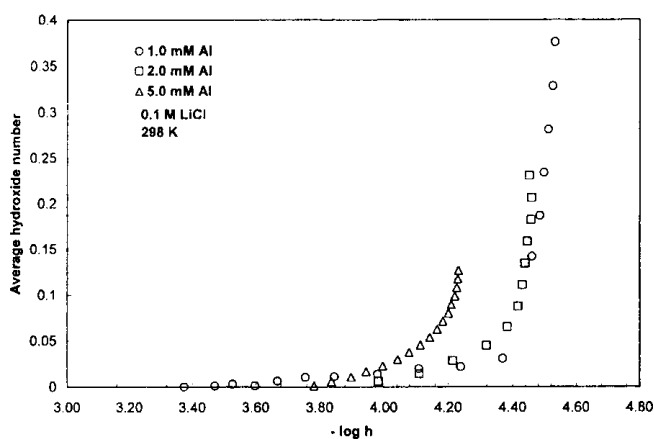


Fig. 1. Hydrolysis of Al<sup>3+</sup> in 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl medium, at 298 K in the presence of 2.0 mmol L<sup>-1</sup> cetylpyridinium-chloride.

primary model, soluble Al(OH)<sub>3</sub> and solid Al(OH)<sub>3</sub> were added. Since the effect of CPCL on hydrolysis was not studied previously in this work, it was investigated under the same experimental conditions. The obtained experimental data are summarized in Table 1. Under the chosen experimental conditions the aquaaluminum(III) ion hydrolyzes between pH 3.5 and 4.5, depending on its concentration. The maximum value reached for the average hydroxide number, Z, defined as:  $Z = (h - H)/M$ , was ca. 0.4. The data show that, for each concentration of aluminum studied, separate titration curves,  $Z = Z(-\log h)$ , were obtained (Fig. 1). This indicates the formation of polynuclear complexes. The pH region in which hydrolysis occurs depends upon the total concentration of aluminium. Thus, as the concentration of Al increases, the beginning of the hydrolysis shifts toward lower pH values, while at the same time the degree of the hydrolysis decreases. Possible complexation of the aluminium ion with the chloride ion from the ionic medium should appear as a constant effect because of the relatively high concentration of the medium; therefore, it should not affect the number of hydroxide ions bound to aluminium. Though the titrations were performed over a wide pH range, for the purpose of calculations, some reduction of the number of points was necessary. Points at pH

values lower than 3.0, where the hydrolysis is negligible, and at pH's higher than 4.5, where solutions became turbid and colloid formation may take place, were excluded from the calculations.

Reacting with water molecules the aluminium ion forms one or more hydrolytic complexes of the general composition Al<sub>p</sub>(OH)<sub>q</sub><sup>(3p-q)+</sup> [further abbreviated as (p, q)] whose overall formation constants, β<sub>p,q</sub>, may be defined as

$$\beta_{p,q} = C_{p,q} m^{-p} h^q,$$

where C<sub>p,q</sub> denotes the equilibrium concentration of the (p, q) complex and m is the concentration of the free aluminium ion. First, each titration curve was processed separately using the program Best. Complexes from the initial set comprising (1, -1), (1, -2), (1, -3), (2, -1), (2, -2), (2, -3), (2, -4), (2, -6), (3, -3), (3, -4), (6, -12), (6, -15), (6, -18), (8, -12) and (13, -32) were introduced one at a time until the minimum value of σ<sub>fit</sub> was obtained. During the calculations, all of the titration parameters (M<sub>0</sub>, H<sub>0</sub>) were kept constant while the pH values in a repeated cycle of calculations were adjusted until the best possible value of σ<sub>fit</sub> was obtained. The calculations indicate that the hydrolytic curves can be fitted with the complexes: Al(OH)<sup>2+</sup>, Al(OH)<sub>3</sub>(aq), Al<sub>3</sub>(OH)<sub>4</sub><sup>5+</sup> and Al<sub>13</sub>(OH)<sub>32</sub><sup>7+</sup>. All of the titration curves were then processed together, this time using the program Superquad. In Superquad calculations the E<sub>0</sub> values were allowed to float, while all analytical parameters were held constant. All of the complexes found in the Best calculations were accepted, except of tridecamer. A stepwise introduction of other complexes from the initial set lead either to their rejection or to a much worse set of statistical parameters determining the goodness of the fit. The higher hydrolytic polymers were not accepted as well. To decide which set of complexes gave the best fit, all aforementioned complexes were refined together. No acceptable fit was obtained. Therefore, in the next calculation cycle the stability constant of the monomer Al(OH)<sup>2+</sup> was held constant (fixed) while these of Al(OH)<sub>3</sub> and Al<sub>3</sub>(OH)<sub>4</sub><sup>5+</sup> were varied. Both complexes were accepted with the values for log β being slightly higher than in a previous calculation. Thus, the results of the calculation show that the experimental data can be fitted



Table 2. The Stability Constants of Hydrolytic Complexes of Aluminium in 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl Ionic Medium, at 298 K, in the Presence of Cetylpyridinium-Chloride  
The constants ( $\beta_{p,q}$ ) are defined for the equilibrium:  $p\text{Al}^{3+} + q\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Al}_p(\text{OH})_q^{(3p-q)^+}$ .  $K_S$  is a solubility product defined for equilibrium:  $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s}) + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$ .

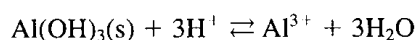
Species	$\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$	$\text{Al}_3(\text{OH})_4^{3+}$	$\text{Al}(\text{OH})_3(\text{aq})$	$\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$
$-\log \beta_{p,q}$	$4.81 \pm 0.06$	$13.82 \pm 0.02$	$14.17 \pm 0.08$	$pK_S = 10.38 \pm 0.02$

Statistical parameters of the fit:  $\chi^2 = 12.0\text{--}12.5$ ;  $s = 1.3\text{--}1.6$

with the complexes  $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{aq})$  and  $\text{Al}_3(\text{OH})_4^{5+}$ . Their respective stability constants ( $\log \beta_{p,q}$ ) are given in Table 2. It can be seen that the calculated statistical parameters of the fit satisfy all of the acceptance criteria, thus confirming the existence of the (1, -1), (1, -3) and (3, -4) hydrolytic complexes in the presence of CPCL with high probability. The distribution diagram of the formed hydrolytic complexes was calculated using the program Solgaswater,<sup>30</sup> and is given in Fig. 2. The complex  $\text{Al}_3(\text{OH})_4^{5+}$  is important only at higher concentrations of aluminium. Insoluble hydroxide forms between pH 4.0 and 4.5, depending on the total aluminium concentration. Because its relative quantity sharply increases with increasing the pH of the solution, part of the measurements were actually

performed in a micro-heterogeneous system. It seems that the formation of the tridecimer, characteristic of the hydrolysis of the  $\text{Al}^{3+}$  aqua ion in the presence of other SAA, is suppressed in the presence of CPCL.

**Determination of the Solubility Product of  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .** The solubility product of aluminium hydroxide in the presence of CPCL was determined from the hydrolytic curves (Fig. 1) employing a procedure described in previous work.<sup>27</sup> For the reaction:



the equilibrium constant,  $K_S$ , is defined as

$$K_S = \frac{[\text{Al}^{3+}]}{[\text{H}^+]_p^3}$$

The concentration of hydrogen ion, at which precipitation (or dissolution) of aluminium hydroxide begins,  $[\text{H}^+]_p$ , was determined by extrapolation of higher, nearly linear part of the hydrolytic curve to intercept with the  $-\log h$  axes. From the point of intercept,  $\text{pH}_{\text{ext}}$ , the concentration of hydrogen ion was calculated as

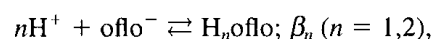
$$[\text{H}^+]_p = \frac{1}{\gamma_+} 10^{-\text{pH}_{\text{ext}}}$$

where the activity coefficient for hydrogen ion,  $\gamma_+$ , was calculated from the extended Debye-Huckel equation.<sup>31</sup> The free concentration of aluminium ion,  $[\text{Al}^{3+}]$ , was calculated from the equation

$$C_{\text{Al}} = [\text{Al}^{3+}] + \sum p\beta_{p,q} [\text{Al}^{3+}]^p [\text{H}^+]^{-q}$$

which, for total aluminum concentrations, 1.0, 2.0 or 5.0 mmol L<sup>-1</sup>, was solved for free aluminium concentrations using the program Species.<sup>32</sup> The average value of  $K_S$  was  $\text{p}K_S = 10.38 \pm 0.02$ , which is slightly higher than that in pure ionic medium,  $\text{p}K_S = 10.32 \pm 0.04$ .<sup>27</sup>

**Protonation of the Ofloxacin Ion.** The overall protonation constants,  $\beta_n$ , of the ofloxacin anion, defined according to equilibrium



were determined by glass electrode potentiometric titrations in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl medium at 298 K. Three titrations were carried out with 0.5; 1.2 and 2.45 mmol L<sup>-1</sup> total ofloxacin

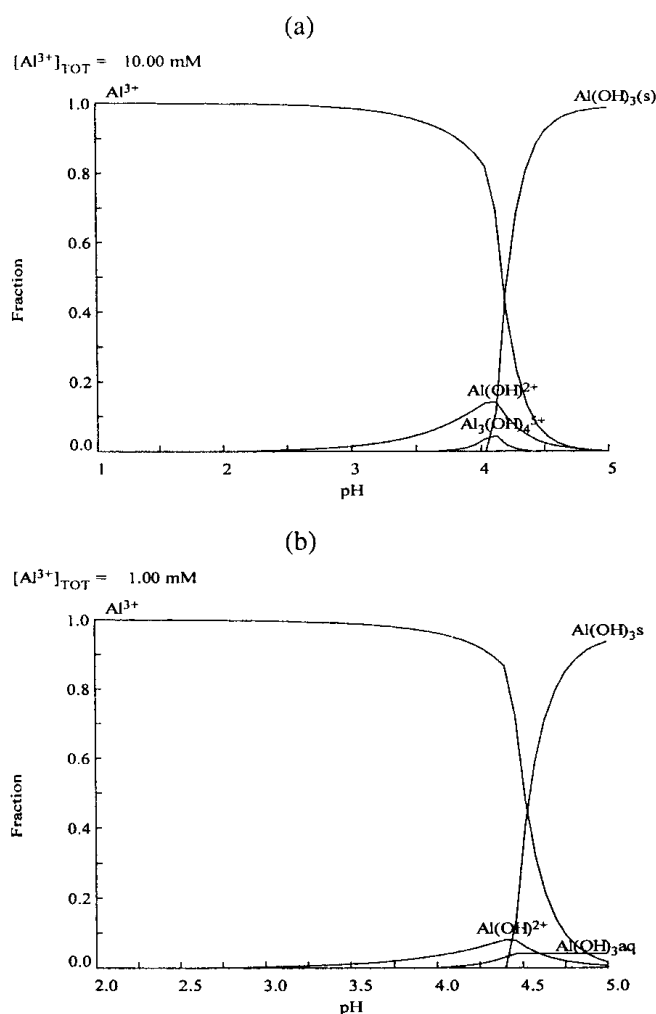


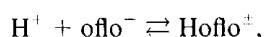
Fig. 2. Distribution diagram of  $\text{Al}^{3+}$  hydrolytic products: (a),  $[\text{Al}^{3+}]_{\text{tot}} = 10.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (b),  $[\text{Al}^{3+}]_{\text{tot}} = 1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  (0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl + 2.0 mmol L<sup>-1</sup> cetylpyridinium chloride, 298 K).

Table 3. Calculated Protonation Constants of Ofloxacin Anion in 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl ionic Medium (S), in the Presence or Surfactants, at 298 K

SDS = sodium dodecylsulfate, CTAB = cetyltrimethylammonium bromide, CPCL = cetylpyridinium chloride.  $\beta_n$  denotes overall protonation constant for equilibrium:  $n\text{H}^+ + \text{oflo}^- \rightarrow \text{H}_n\text{oflo}$  ( $n = 1, 2$ ) while  $K_i$  denotes successive protonation constant defined for equilibrium:  $\text{H}^+ + \text{H}_{i-n+1}\text{oflo} \rightarrow \text{H}_i\text{oflo}$  ( $n = 2, i = 1, 2$ ).

Stability constant	S	S + CPCL	S + CTAB	S + SDS	S + Triton
Log $\beta_1$	8.212 ± 0.003	8.21 ± 0.04	8.42 ± 0.04	9.03 ± 0.01	9.24 ± 0.02
Log $\beta_2$	14.24 ± 0.01	14.51 ± 0.07	16.17 ± 0.05	16.98 ± 0.1	16.32 ± 0.3
Log $K_1$	8.212	8.21	8.42	9.03	9.24
Log $K_2$	6.03	6.30	7.75	7.96	7.08

concentrations, with the addition of either, CTAB (5.0 mmol L<sup>-1</sup>), CPCL (2.0 mmol L<sup>-1</sup>) or triton X-100 (1.0 mmol L<sup>-1</sup>), in the pH range between 2.4 to 10.2. The experimental data were treated by using the Superquad program. In total, 110 points were included in the calculations. The results are given in Table 3 together with statistical parameters from Superquad calculations ( $\chi^2$  and  $s$ ). As can be seen from Table 3, protonation constants of the ofloxacin anion are considerably different in the presence of surfactants than in a pure ionic medium. Data in a pure ionic medium and in the presence of SDS are taken from previous studies.<sup>1,2</sup> The first successive protonation constant (log  $K_1$ ) refers to the protonation of tertiary 4'-piperazinyl nitrogen, while the second one (log  $K_2$ ) refers to protonation of the carbonylate group.<sup>5,6</sup> The stabilizing effect on the first protonation increases in the order S  $\equiv$  CPCL < CTAB < SDS < triton, while on the second protonation the order is S < CPCL < triton < CTAB < SDS. Thus, triton exerts highest influence on a first protonation, while SDS and CTAB show greater influence on the second protonation. Since the first protonation leads to the formation of the zwitterionic form of ofloxacin, according to the equation



which may easily partition into the interior of neutral surfactant triton X-100, the equilibrium is shifted to the right, thus giving rise to a higher value of the protonation constant. The second protonation gives cationic form of the ofloxacin with positively charged 4'-nitrogen; therefore, anionic SDS by surrounding the H<sub>2</sub>oflo<sup>+</sup> molecule prevents its dissociation.

**The Aluminium(III)-Ofloxacin System in the Presence of Surfactants.** The experimental data obtained by *emf* measurements in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl medium 298 K and in the presence of CTAB (5.0 mmol L<sup>-1</sup>), CPCL (2.0 mmol L<sup>-1</sup>) and triton X-100 (1.0 mmol L<sup>-1</sup>) are summarized in Table 1. In the studied pH range (2.5–7.5) the maximum apparent ligand number reached was ca. 2.2. The highest concentration ratio of ofloxacin to Al<sup>3+</sup> was 5:1. Beyond pH 7.0, solutions became turbid and drifting potential readings were obtained. No higher concentration ratios of ofloxacin to Al were used due to the low solubility of ofloxacin and because they would seriously change the constancy of the medium. In addition, the buffering effect of ofloxacin may hinder the reliable potentiometric measurements. Part of the obtained titration curves is shown in Fig. 3 as the dependence of pH on the titration parameter,  $a$ . The distinct separation of Al<sup>3+</sup> + oflo titration curves in the presence of surfactants from these of ofloxacin itself, and Al<sup>3+</sup>

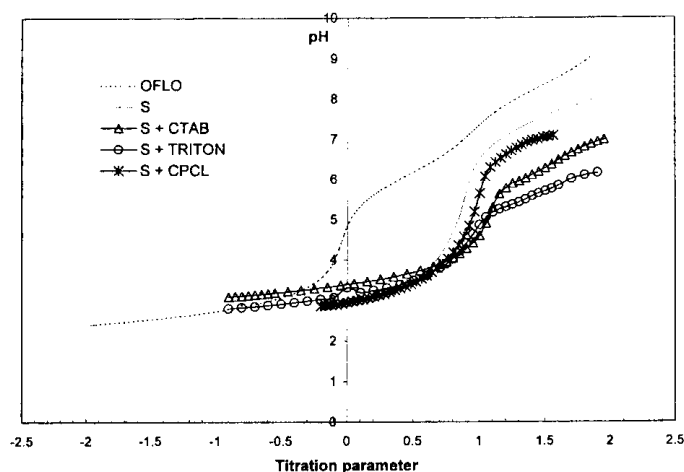


Fig. 3. Titration curves pH =  $f(a)$ , for Al<sup>3+</sup> + ofloxacin solutions in 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiCl + surfactants medium, at 298 K. Titration curves for ofloxacin and Al<sup>3+</sup> + ofloxacin were taken from Ref. 1.

+ ofloxacin without the addition of surfactants, indicates the formation of strong complexes between aluminium and ofloxacin.

The establishment of equilibrium in solutions was moderately slow, especially at the pH values higher than 6.0. High turbidity of solutions was observed at pH values near to 7.5.

In order to derive a speciation model for each studied system, the experimental data were plotted as the dependence of the average ligand number,  $Z_{\text{Al}}$  on  $-\log[\text{oflo}]$ . First, the titration parameter,  $a$ , was calculated using the formula

$$a = \frac{BV_B + V_0L - V_0[\text{HCl}]}{V_0L}$$

where  $B$  and  $V_B$  denote the concentration and volume of a strong base (NaOH), respectively, while  $V_0$  and  $L$  are the initial volume and concentration (oflo) of the titrated solution. Thus, the titration parameter was set to zero at the beginning of titration of the cationic form of ofloxacin. Negative values of  $a$  represent the titration of an excess of strong acid (HCl). The concentration of free ligand was calculated from the formula

$$l = [\text{oflo}] = \frac{(2-a) - h + [\text{OH}^-]}{\beta_1 h + 2\beta_2 h^2},$$

Table 4. Calculated Stability Constants of  $\text{Al}^{3+}$ -Ofloxacin Complexes in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{LiCl}(\text{S})$  Ionic Medium, in the Presence of Surfactants, at 298 K  
Concentrations of surfactants were: SDS,  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Triton,  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; CTAB,  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  and CPCL,  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Species	S <sup>a)</sup>	S + SDS <sup>b)</sup>	S + triton	S + CTAB	S + CPCL
Al(Hofflo)	$15.93 \pm 0.03$	—	$16.40 \pm 0.08$	—	—
Al(oflo) <sub>2</sub>	$14.84 \pm 0.07$	—	—	—	—
Al(oflo)	$10.20 \pm 0.04$	$10.28 \pm 0.08$	$10.37 \pm 0.08$	$11.56 \pm 0.02$	$11.90 \pm 0.08$
Al(OH)oflo	$4.21 \pm 0.05$	$3.04 \pm 0.1$	—	—	—
Al <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> oflo	$6.4 \pm 0.1$	$4.56 \pm 0.06$	—	$3.6 \pm 0.1$	$3.4 \pm 0.1$
$\chi^2$					
S					

a) Data taken from Ref. 1. b) Data taken from Ref. 2.

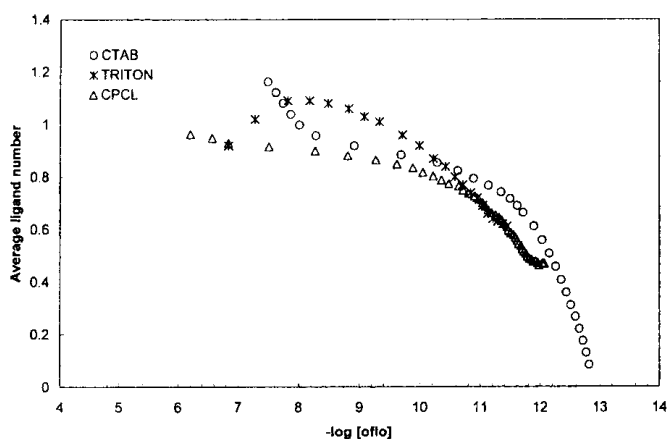


Fig. 4. Formation curves in  $\text{Al}^{3+}$  + ofloxacin system, in the presence of either, CTAB, CPCL or triton X-100.

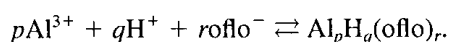
The expression for the average ligand number was then

$$Z_{\text{Al}} = \frac{C_L - l \cdot \alpha_{\text{L(H)}}}{C_{\text{Al}}}$$

where  $\alpha_{\text{L(H)}}$  is defined as  $\alpha_{\text{L(H)}} = 1 + \beta_1 h + \beta_2 h^2$ .

An analysis of the formation curves (Fig. 4) indicates the formation of mononuclear complexes over a relatively wide range of ligand concentrations, corresponding to pH values between 3.5 and 5.5. Since  $Z_{\text{Al}}$  approaches a plateau at ca. 1.0, it means that either the complex  $\text{Al}(\text{oflo})_2^{2+}$  or some mixed mononuclear complexes may be important. Two buffer regions could be seen on the titration curves. The first buffer region is seen at a pH of about 3.5, and the other one at pH 5.5 to 7.0 (depending on the type of surfactant).

The equilibria in the oflo +  $\text{Al}^{3+}$  system may be represented in a general form:



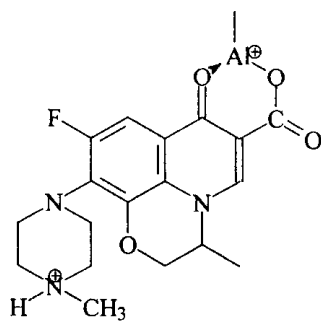
The stability constants of various ( $p$ ,  $q$ ,  $r$ ) species formed in the above reaction, may be defined as

$$\beta_{p,q,r} = C_{p,q,r} m^{-p} h^{-q} l^{-r}$$

where  $C_{p,q,r}$  denotes the equilibrium concentration of the com-

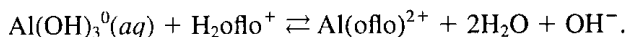
plex;  $m$ ,  $h$  and  $l$  denote free concentrations of aluminium(III), proton and ofloxacin respectively. To determine the composition and stability constants of the formed species, the titration data were analyzed using the programs Best and Superquad. The following complexes were selected to find the model which best fit the experimental data: (1, 0, 1), (1, 0, 2), (1, 1, 1), (1, 2, 1), (1, 1, 2), (1, -1, 1), (1, -2, 1), (1, -3, 1), (1, -1, 2), (1, -2, 2), (1, -2, 3) and polymers (2, 1, 1), (2, 2, 1), (2, 1, 2), (2, -1, 1), (2, -2, 1), (2, -2, 2), (2, -3, 1), (2, -3, 2), (3, -1, 1), (3, -2, 1), (3, -1, 2), (3, -2, 2). More than 20 various models were tested. During the calculations, the analytical parameters ( $M_0$ ,  $H_0$  and  $L_0$ ) were held constant, while the  $E_0$  values were allowed to float. The hydrolytic complexes and protonated species of ofloxinate were not refined during the calculations. First, each titration curve was treated separately using the program Best. Complexes were added to the model one at a time until the lowest value of  $\sigma_{\text{fit}}$  was achieved (usually less than 0.003). These complexes were then used as the starting model for the Superquad calculations. Then, the data belonging to all titration curves, referred to one particular surfactant, were treated together. The refined values of  $E_0$  served as an additional criterion for model selection. If they were different from experimental ones for more than 0.5 mV, the model was considered to be inadequate. The finally accepted complexes are given in Table 4. As can be seen from the Table 4, in the presence of surfactants speciation in the  $\text{Al}^{3+}$  + ofloxacin system considerably changes in comparison with that in their absence. In the presence of cationic SAA (CTAB and CPCL) the dominating complex is  $\text{Al}(\text{oflo})_2^{2+}$  with a significantly higher value of the stability constant than in a pure ionic medium. The presence of neutral SAA, triton X-100, suppresses the formation of hydrolytic complexes and favors the protonated one. The probable structure of a protonated complex is presented in Scheme 2. It may have three or two positively charged sites, depending on whether 4-carbonyl oxygen is bound to Al by a covalent or coordinative bond, respectively. Because the triply-positive structure is not probable, the structure in Scheme 2 is the dominant one in solution. Neutral SAA prevents an attack of water on the Al-O bond by intercalating the  $\text{Al}(\text{Hoflo})_3^{3+}$  molecule into the interior of a neutral micelle. In this way, additional stabilization of protonated complex occurs.

The effect of cationic SAA on Al-oflo complexation originates from their influence on the hydrolysis of aluminium and the dissociation of ofloxacin. A change in the reactive species

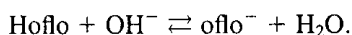


Scheme 2. Possible structure of the Al-oflo complex.

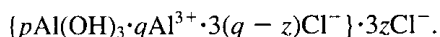
leads to a change in the identity of the formed complex species. Cationic SAA favor the formation of  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , which may be regarded as a soluble colloidal micelle, and at the same time lower the concentration of the zwitterionic form of ofloxacin. Thus, the main reaction in the system should be



Alkalinization of the solution may lead to increasing of oflo concentration



The aluminium hydroxide micelle is positively charged due to aluminium-ion adsorption on the surface, and may be represented as<sup>33</sup>



Due to an electrostatic repulsion, this micelle is not protected by cationic SAA, and is additionally prone to an attack of negatively charged ofloxacin.

A distribution diagram of the Al-ofloxacin species in the presence of triton X-100 is shown in Fig. 5a. At a total Al concentration of  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  and ligand-to-metal ratio 2.5:1 the maximum formation of the  $\text{Al}(\text{Hoflo})^{3+}$  complex takes place in the pH interval 3–5. The formation of solid  $\text{Al}(\text{OH})_3$  begins at pH 5.3 and it is a shift of 1.2 pH units toward a more acidic medium in comparison with the Al-oflo system with no presence of SAA (Fig. 5b). Effectively, it means, since the pH interval in which soluble species of Al exist, is narrowed, that in the presence of triton, dissolution of  $\text{Al}(\text{OH})_{3(s)}$ , under the action of ofloxacin, will be hindered. Probably, solid  $\text{Al}(\text{OH})_3$  becomes coated with neutral SAA and thus, protected. The distribution diagram in the presence of CTAB (Fig. 5c) shows that the dominating complex is  $\text{Al}(\text{oflo})^{2+}$ , which forms in the pH interval 3–6. The beginning of precipitation of  $\text{Al}(\text{OH})_3$  is at pH 5.7. This wider range of pH values in which soluble aluminium species exist means that CTAB enhances the solubility of  $\text{Al}(\text{OH})_3$  in comparison with triton X-100. A similar effect is exerted by CPCL. If distribution diagrams in the presence of SAA are compared with that in their absence it may be noted that the pH of the beginning of  $\text{Al}(\text{OH})_{3(s)}$  precipitation in the absence of SAA is at 6.5, and it is a shift of about 2 pH units in comparison with the beginning of precipitation in purely hydrolyzed aluminium solutions (pH 4.5).<sup>1</sup> Thus, in the gi tract

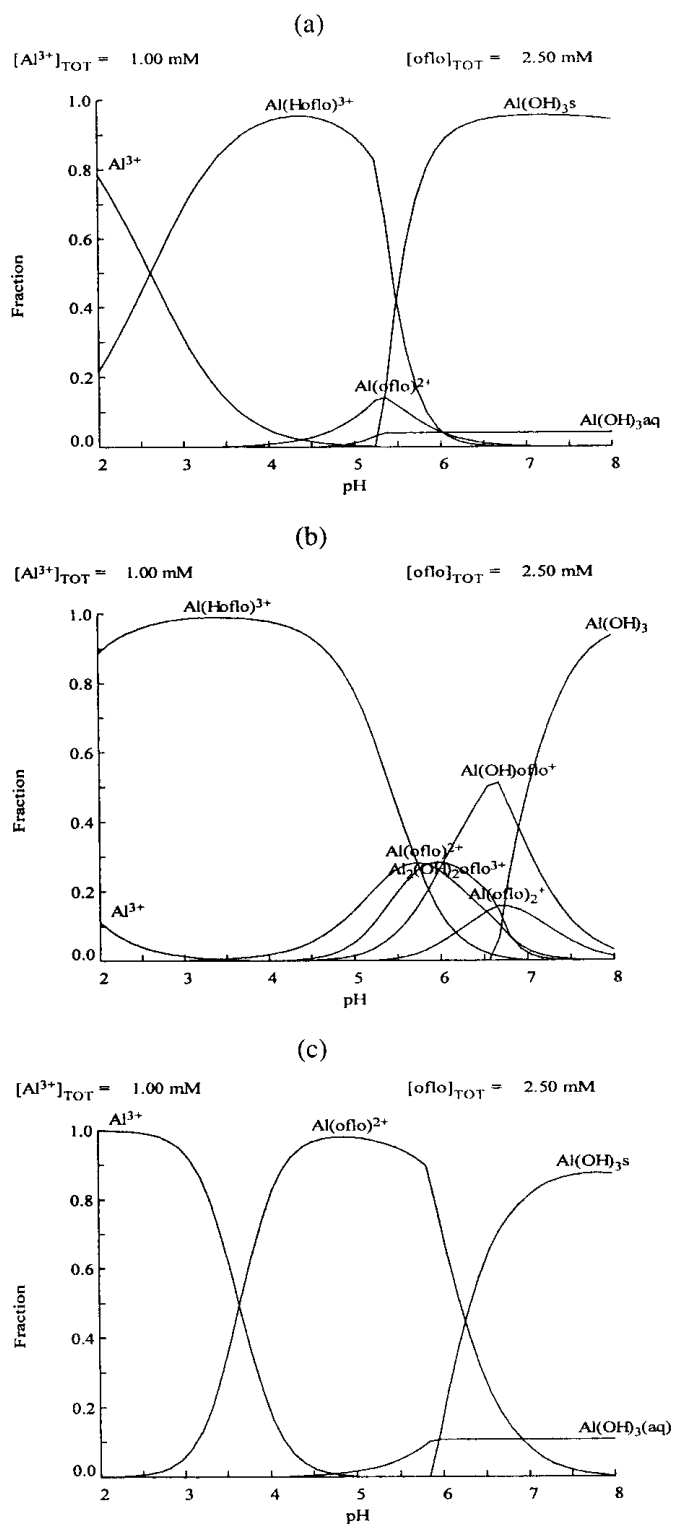


Fig. 5. Distribution diagram of  $\text{Al}^{3+}$  species in  $\text{Al}^{3+}$  + ofloxacin systems. (a) in the presence of  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  triton X-100, (b) with no addition of surfactants ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  LiCl, 298 K, Ref. 1), (c) in the presence of  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB.

ofloxacin may enhance the availability of soluble aluminium. Since, however the absorption mainly takes place in the proximal small intestine,<sup>34</sup> the extent of possible absorption will be determined by the presence of bioligands which can bind aluminium in the form of neutral, liposoluble, complexes and pH (6.5–7) in this section of the small intestine.<sup>35</sup> The most im-

portant ligand is phosphate. For constructing the distribution diagram in the presence of phosphate the data presented by Berthon et al.<sup>36</sup> were used. The distribution diagram in the presence of phosphate (Fig. 6), in absence of ternary complex formation, shows that ofloxacin will have no influence on solubilized aluminium absorption in the intestine. Most solubilized aluminium in the stomach, will be excreted with bowel mucus in the form of insoluble phosphate, in feces, while there exist the possibility that one small fraction may be absorbed in the form of a neutral complex,<sup>37</sup>  $\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{PO}_4$ . Anionic aluminate may play an important role in absorption only in some pathological cases of increased pH values, reduced phosphate concentration and prolonged contact of digestion products with epithelial cells of the small intestine. In blood plasma, however distribution diagrams<sup>38</sup> suggest that ofloxacin may enhance aluminium (not bound to transferrin) excretion in urine, since it forms stable, positively charged complexes. Surfactants ameliorate the formation of  $\text{Al}(\text{oflo})_2^+$  complex, and may thus favor urinary excretion of serum aluminium.

**Absorption of Ofloxacin on Aluminium Oxide.** In order to quantify the bio-availability of ofloxacin in the presence of Al-based antacids, as a model system, we examined the adsorption of ofloxacin on aluminum oxide in neutral, acidic and alkaline media, in both the absence and presence of ionic SAA, SDS and CTAB. The concentration range of ofloxacin was  $7\text{--}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . The adsorption isotherms are given in Figs. 7a, 7b and 7c, as the dependence of the extent of adsorption (mmoles of ofloxacin adsorbed per gram of aluminum-oxide) on the concentration of ofloxacin. It can be seen that the isotherms are of Freundlich type

$$\frac{n}{m} = kc^{1/x},$$

where  $n$  denote moles of adsorbate,  $m$  mass of adsorbents,  $k$  and  $n$  are constants while  $c$  stands for concentration. The adsorption in neutral medium (Fig. 7a) is much greater in absence of SAA, and significantly decreases in their presence. Adsorbents, aluminium oxide tends to have a positively charged surface by the adsorption of either hydrogen or  $\text{Al}^{3+}$  ions.<sup>33</sup> Since

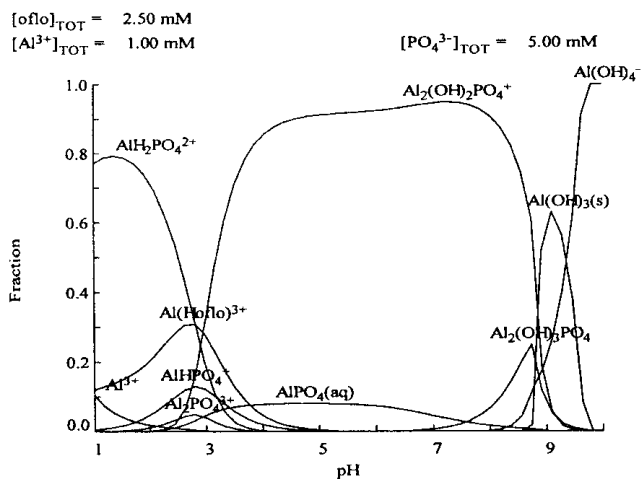


Fig. 6. Distribution diagram of  $\text{Al}^{3+}$  species in  $\text{Al}^{3+}$  + ofloxacin + phosphate solution in the presence of triton X-100. Data for stability of phosphate species are taken from Ref. 36.

their concentration is extremely low, it adsorbs ofloxacin from the solution in which it mainly exists as zwitterions. In the presence SAA, competition for adsorption sites between ionic surfactants and ofloxacin occurs, resulting in decreasing ofloxacin adsorption.

In acidic medium adsorption is greatly enhanced in the presence of SDS (Fig. 7b). This may be explained by taking into account an electrostatic attraction between a positively charged surface of aluminum and a negative  $\text{OSO}_3^-$  group of SDS.

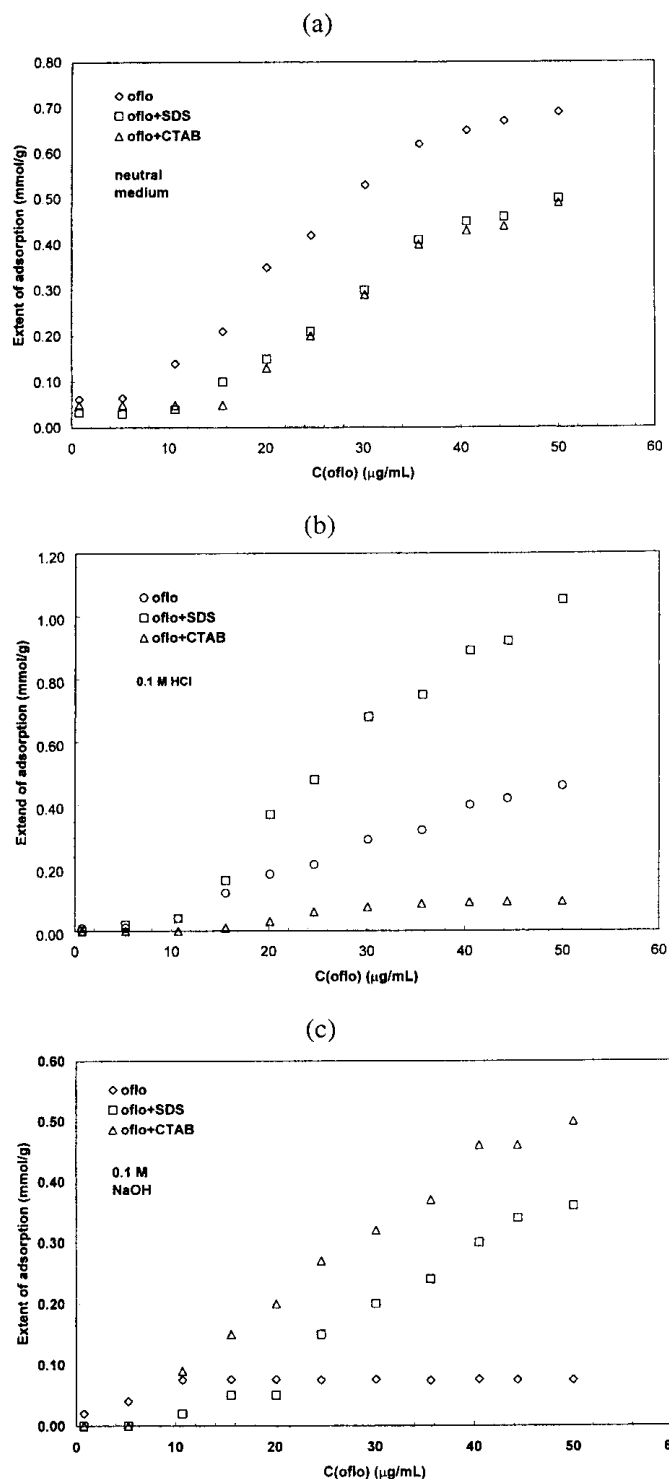


Fig. 7. Adsorption of ofloxacin on aluminum-oxide. (a) in neutral medium, (b) in  $0.1\ \text{mol L}^{-1}$  HCl, (c) in  $0.001\ \text{mol L}^{-1}$  NaOH.

solution 1 mM NaOH

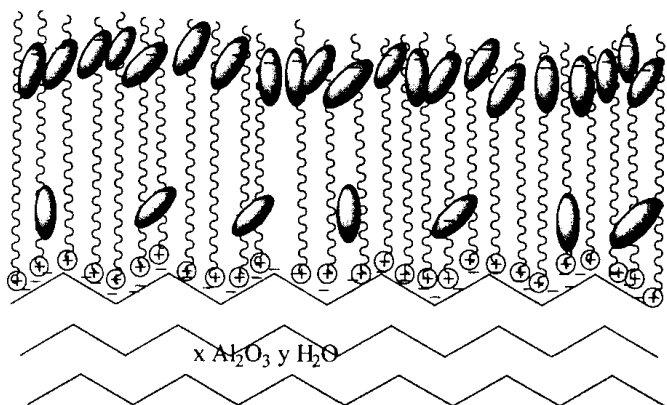


Fig. 8. Adsorption of ofloxacin on aluminium-oxide in the presence of CTAB in  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH.

However, such an arrangement is unfavorable for the hydrocarbon tail of SDS, which becomes exposed to water.<sup>39</sup> Since ofloxacin is an amphiphilic molecule, its hydrophobic part may be intercalated into hydrocarbon tails of SDS, while the polar positively charged part (protonated nitrogen) becomes reverted to water. In the absence of SAA, the adsorption of the cationic form of ofloxacin decreases due to competition with hydrogen ions. Positively charged CTAB obviously completely hinders the adsorption of ofloxacin.

In an alkaline medium, aluminum surface becomes negative due to the adsorption of hydroxide ions from the solution (Fig. 7c). Thus, in the same way as SDS in acidic medium, CTAB promotes adsorption of ofloxacin anion. SDS decreases adsorption because of competitive adsorption while in absence of SAA ofloxacin anion is adsorbed in small extent due to competition with hydroxide ion. The model, which may explain the obtained data in the presence of CTAB is depicted in Fig. 8. Ofloxacin anion possesses an amphiphilic character with the hydrophobic part involving. A quinolone nucleus and the substituted piperazine and hydrophilic one consisting of carboxylate and carbonyl groups. CTAB is adsorbed on an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  negatively charged (from  $\text{OH}^-$ ) surface, while the ofloxacin anion is intercalated into the hydrophobic part of CTAB, so that its negatively charged end is turned toward water. Some ofloxacin molecules may approach the surface of the adsorbent, in which case its negative end is turned to surface due to electrostatic forces. Molecules remaining in solution are probably solubilized by CTAB micelles. S-shaped isotherms, characteristic for adsorption of ionic SAA on polar adsorbents<sup>40</sup> were not detected in the presence of ofloxacin. This means that bi-layer adsorption of SAA is hindered in ofloxacin solution.

## References

- 1 P. Djurdjevic and M. Jelkic-Stankov, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**, 501 (1999).
- 2 I. Lazarevic, M. Jelkic-Stankov, and P. Djurdjevic, *Main Group Met. Chem.*, **21**, 609 (1998).
- 3 V. Andriole, "The Quinolones," Academic Press, London (1988).

- 4 M. Neuman, *Clin. Pharmacolinet.*, **14**, 96 (1988); T. Bergan, Quinolones in "Antimicrobial Agents, Annual 2," ed by P. K. Peterson and J. Verhoef, Elsevier, Amsterdam (1987), pp. 161–183.
- 5 D. S. Lee, H. J. Han, K. Kim, W. B. Park, J. K. Cho, and J. H. Kim, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 157 (1994).
- 6 M. Jelkic, D. Veselinovic, and P. Djurdjevic, *Talanta*, **39**, 665 (1992).
- 7 A.C. Alfrey, Toxicity of detrimental metal ions: aluminum. In "Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids. Bioinorganic medicine," Vol 2, ed by G. Berthon, Marcell Dekker (1995), pp. 735–742; G. Berthon, *Coord. Chem. Rev.*, **149**, 241 (1996).
- 8 R. B. Martin, *Clin. Chem.*, **32**, 1797 (1986); W. R. Harris, G. Berthon, J. Philip Day, C. Exley, T. P. Flaten, W. Forbes, T. Kiss, C. Orvig, and P. Zatta, *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 543 (1996).
- 9 C. Exley, E. Burgess, J. Philip Day, E. H. Jeffery, S. Melethil, and R. A. Yokel, *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 569 (1996); S. S. Buys, J. P. Kushner, Hematologic effects of aluminum toxicity, in "Aluminum and health: A critical review," ed by H. Gitelman, Marcel Dekker, N.Y. (1989), pp. 235–256; "Handbook of toxicity of inorganic compounds," ed by R. L. Bertholf, M. R. Wills, J. Savory, H. G. Seiler, H. Sigel, and A. Sigel, Marcel Dekker, N.Y. (1988), pp. 55–64.
- 10 "Aluminum in biology and medicine," Ciba Foundation Symposium. Vol. 169, ed by D. J. Chadwick, J. Whelan, Wiley, Chichester (1992); B. Corain, G. G. Bombi, A. Tapparo, M. Perazzolo, and P. Zatta, *Coord. Chem. Rev.*, **149**, 11 (1996).
- 11 J. Savory, C. Exley, W. F. Forbes, Y. Huang, J. G. Joshi, T. Kruck, D. R. C. McLachlan, and I. Wakayama, *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 615 (1996); G. D. Fasman and C. D. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11232 (1994); T. Kiss, *Archives Gerontol. Geriatrics*, **21**, 99 (1995); "Aluminum in chemistry, biology and medicine," ed by R. B. Martin, Aluminum in biological systems, in M. Nicolini, P. F. Zatta, and B. Corain, Cortina International, Verona, Raven Press, New York (1991), pp. 3–20.
- 12 K. M. Deppermann and H. Lode, *Drugs*, **45**(3), 65 (1993).
- 13 S. C. Wallis, B. G. Charles, L. R. Gahan, L. J. Filippich, M. D. Bredhauer, and P. A. Duckworth, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 803 (1996); H. C. Neu, *Am. J. Med.*, **87**, 25 (1989); H. Shishido, K. Matsumoto, T. Nagatake, and S. Tabuchi, *Chemotherapy*, **36**, 256 (1988).
- 14 M. Venturini Soriano and G. Berthon, *J. Inorg. Biochem.*, **69**, 1 (1998), N. Alliey, M. Venturini Soriano, and G. Berthon, *Annals Clin. Lab. Sci.*, **26**, 122 (1996), G. Berthon and S. Dayde, *J. Am. Coll. Nutr.*, **11**, 340 (1992).
- 15 J. L. Domingo, M. Gomez, and J. M. Llobet, J. Corbella, *Kidney Int.*, **39**, 598 (1991); J. L. Domingo, M. Gomez, D. J. Sanchez, and J. M. Llobet, J. Corbella, *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **79**, 377 (1993).
- 16 N. A. Partridge, F. E. Regnier, J. L. White, and S. L. Hem, *Kidney Int.*, **35**, 1413 (1989); P. Slanina, W. Frech, L. G. Edtrom, L. Loof, S. Slorach, and A. Cedergren, *Clin. Chem.*, **32**, 539 (1986).
- 17 J. J. Powell and R. P. Thompson, *Proc. Nutr. Soc.*, **52**, 241 (1993); N. J. Birch, Intestinal absorption and metal ligand interactions, in "Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids: Bioinorganic Chemistry," Vol. 2, ed by G. Berthon, Marcell Dekker, N.Y., pp. 773–780; G. B. van der Voet, "Intestinal absorption of aluminum," in "Aluminum in biology and medicine," Ciba Foundation Symposium, Vol. 169. Chichester, J. Wiley (1992),

pp. 109–122.

18 B. Kueper, M. Pitts, T. Simpkin, and T. Sale, "Technology Practices Manual for Surfactants and Cosolvents," Rice Univ., Houston (1997), Chapter 4; A. Abramzon, "Poverhnostno-aktivnye veschestva (Surface Active Substances)," Khimiya, Leningrad (1981).

19 "Surfactant-Enhanced Subsurface Remediation," ACS Symposium Series 594, ed by D. A. Sabatini, R. C. Knox, and J. H. Harwell, American Chemical Society, Washington (1995).

20 A. I. Serdyuk, R. V. Kucher, "Micellyarnye perehody v rastvorah poverhnostno aktivnykh veschestv (Micellar transitions in solutions of surface active substances)," Naukova Dumka, Kiev (1987).

21 M. J. Rosen, "Surfactants and Interfacial Phenomena," 2nd ed, J. Wiley and Sons, New York (1989).

22 S. B. Savvin, R. K. Tshernova, and S. N. Shtykov, "Aanaliticheskie Reagenty. Poverhnostno-aktivnye veschestva (Analytical Reagents. Surface Active Substances)," Nauka, Moskva (1991); P. Mukerjee, K. J. Mysels, "Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems," US Dept. Commerce. Nat. Bur. Stand. Nat. Stand. Ref. Data Ser. No. 36, Washington D.C. (1971).

23 P. H. Elworthy, A. T. Florence, and C. B. MacFarlane, "Solubilization by Surface Active Agents," Chapman and Hall, London (1968).

24 K. Toel and S. Motomizu, T. Umano, *Talanta*, **29**, 103 (1982)

25 W. Selig and Z. Fresenius, *Anal. Chem.*, **300**, 183 (1980).

26 P. W. Linder, R. G. Torington, and D. R. Williams, "Analysis Using Glass Electrode," Open University Press, Milton Keynes (1984).

27 P. Djurdjevic, R. Jelic, and D. Dzajevic, *Main Group Met. Chem.*, **23**, 409 (2000).

28 P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195.

29 A. E. Martell and R. M. Motekaitis, "Determination and Use of Stability Constants," VCH, Weinheim (1988).

30 G. Eriksson, *Anal. Chim. Acta*, **112**, 375 (1979).

31 A. L. Horvath, "Handbook of aqueous electrolyte solutions," Ellis Horwood Ltd., Chichester (1985), pp 206–232; D. Dobos, "Electrochemical data," Akademiai Kiado, Budapest (1978).

32 L. D. Pettit (University of Leeds), personal communication.

33 J. Y. Bottero, J. L. Berisllon, Aluminium and Iron(III) Chemistry: Some implications for organic substances removal in I. H. Suffet, P. MacCarthy (eds.), "Aquatic Humic Substances—Influence on Fate and Treatment of Pollutants," Advances in Chemistry Series 219, American Chemical Society, Washington (1989), pp. 425–442; W. Stumm and J. J. Morgan, "Aquatic Chemistry," Wiley Intersci., N.Y. (1970), pp. 445–512.

34 C. Guyton, "Textbook of Medical Physiology," 8th Edition, W. B. Saunders Comp., Harcourt Brace Jovanovic, Philadelphia (1991).

35 W. D. Kaehny, A. P. Hegg, A. C. Alfrey, *New Eng. J. Med.*, **296**, 1389 (1977); D. P. Froment, B. A. Molitoris, B. Buddington, N. Miller, and A. C. Alfrey, *Kidney Int.*, **36**, 978 (1989).

36 S. Dayde, M. Fillella, and G. Berthon, *J. Inorg. Biochem.*, **38**, 241 (1990); N. Alliey, F. Biron, M. Venturini Soriano, and G. Berthon, *J. Inorg. Biochem.*, **59**, 241 (1995).

37 C. Orvig, G. Berthon, Speciation studies in relation to aluminum bioavailability, in G. Berthon (ed), "Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids: Bioinorganic chemistry," Vol. 2, Mercel Dekker, N.Y. (1995), pp. 1266–1280.

38 W. R. Harris, *Clin. Chem.*, **40**, 1809 (1994); P. E. Gardiner, M. Stoeppler, and H. W. Nurnberg, The speciation of aluminum in human blood serum, in P. Bratter, P. Schramel (ed), "Trace element analytical chemistry in medicine and biology," Gruyter & Co., Berlin (1984), pp. 299–310.

39 D. Attwood, A. T. Florence, "Surfactant Systems," Chapman and Hall, London (1983); "Micellization, Solubilization and Microemulsions," ed by K. L. Mittal, Plenum Press, N.Y. (1977); Internet WEB, <http://www.surfactants.net>.

40 G. D. Parfitt and C. H. Rochester, "Adsorption from solution at the solid/liquid interface." Academic Press, London (1983).





Scientific paper

# Study of Solution Equilibria Between Gadolinium(III) Ion and Moxifloxacin

Predrag Djurdjević,<sup>1</sup> Ratomir Jelić,<sup>2,\*</sup> Ljubinka Joksović,<sup>1</sup>  
Ivan Lazarević,<sup>3</sup> and Milena Jelikić-Stankov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, p.o.box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Medical Faculty, University of Kragujevac, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia,

<sup>3</sup> CBRN Training Center of Serbian Army, MP 6910,37000 Kruševac, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

\* Corresponding author: E-mail: rjelic@kg.ac.rs;

Tel.: +381 34 306 800 ext. 226; Fax: +381 34 306 800

Received: 12-10-2009

## Abstract

The complex formation equilibria between gadolinium(III) ion and moxifloxacin (MOXI) were studied in aqueous solutions. The investigations were performed by glass electrode potentiometric (ionic medium: 0.1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl, 298 K) and UV spectrophotometric measurements. In the concentration range 0.5 ≤ [Gd<sup>3+</sup>] ≤ 1.0; 1.0 ≤ [MOXI] ≤ 2.0 mmol dm<sup>-3</sup> ([MOXI]/[Gd] = 1 : 1 to 5 : 1) and pH between 2.5 and 9.0, gadolinium(III) and moxifloxacin form the complexes of the composition: Gd(HMOXI)<sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub><sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub>MOXI<sup>2+</sup>, Gd(HMOXI)(MOXI)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Gd(MOXI)<sub>3</sub>. The stability constants of the complexes were calculated with the aid of Hyperquad2006 suite of programs, taking into account the hydrolysis of Gd<sup>3+</sup> ion and protonation of moxifloxacin anion. The possible structure of the complexes, in solution, and their formation mechanism is suggested. The effect of moxifloxacin, and for comparison purpose, DTPA on gadolinium(III) plasma speciation was evaluated by computer simulation.

**Keywords:** Gadolinium; moxifloxacin; complex formation; solution equilibrium, speciation

## 1. Introduction

Quinolones are synthetic antibacterial agents widely used in clinical practice for urinary and respiratory infection treatments.<sup>1</sup> Moxifloxacin (MOXI) (1-cyclopropyl-7-[2,8-diazobicyclo(4.3.0)nonane]-6-fluoro-8-methoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid) (Fig. 1) is a

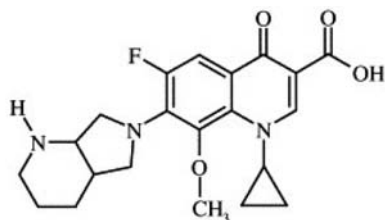


Fig. 1. Structure of moxifloxacin

new 8-methoxyquinolone derivate of fluoroquinolones with enhanced activity against Gram-positive bacteria while preserving high activity against Gram-negative bacteria.<sup>2</sup>

Fluoroquinolones suppress cell growth by inhibiting activity of bacterial DNA gyrase, an essential bacterial enzyme that maintains superhelical twists in DNA.<sup>3</sup> Some evidence suggests that these drugs interact directly with DNA, blocking the activity of DNA-gyrase repair enzymes.<sup>4</sup>

Recent studies indicate an important role of metal ions in the mechanism of action of these drugs.<sup>5</sup> In the first place, the activity of quinolones is reduced in the presence of certain metal ions by the formation of sparingly soluble metal complexes.<sup>6</sup> On the other hand, it was proposed that metal ions (especially magnesium) are involved in the mechanism of action of these

drugs.<sup>7–10</sup> Structural studies have also been performed on magnesium – norfloxacin<sup>11</sup>, magnesium – ciprofloxacin<sup>12–15</sup> and magnesium – ofloxacin and levofloxacin complexes.<sup>16</sup> Metal ions may change the bio-availability of quinolones by changing their solubility or their lipophilicity. The metal complexes of quinolones may have new biological properties in terms of altered minimal inhibitory concentration, antibacterial spectrum, etc.<sup>17</sup> Recently, three novel gadolinium complexes of fluoroquinolone,  $Gd(L)_3 \cdot 6H_2O$  {L = Norfloxacin (NFLX), Ofloxacin (OFLX) and Ciprofloxacin (CPLX), respectively}, have been synthesized and inhibitory effect of the ligands and complexes on leukemia HL-60 cell line has been measured by using MTT (Methyl-Thiazol-Tetrazolium) assay method and liver cancer BEL-7402 cell line measured by SRB (Sulphurhodamin B) method.<sup>18</sup> The results indicate that the complex  $Gd(OFLX)_3 \cdot 6H_2O$  has strong inhibitory effect on BEL-7402 cell line and  $Gd(CPLX)_3 \cdot 6H_2O$  has strong inhibitory effect on HL-60 and BEL-7402 cell lines.

Gadolinium based chelates are widely used as magnetic resonance, or CT scan imaging agents.<sup>19,20</sup> These chelates may interact with quinolones upon concomitant intake (patients already on antibacterial therapy) or release free gadolinium ion in plasma which may interact with plasma or other ligands (ie. drugs). On the other hand quinolone chelates of gadolinium may be candidates for imaging agents.

Therefore, the aim of the present paper is to quantitatively examine the equilibria in moxifloxacin solution in the presence of gadolinium ion to gain better understanding of the identity, stability and speciation in gadolinium and fluoroquinolone family member, moxifloxacin, aqueous solutions. The speciation model derived from such fundamental study should help in pharmacokinetic studies of quinolones in the presence Gd-containing agents and also in the study of toxic effects of Gd-ion upon concomitant intake of Gd-containing compounds and fluoroquinolones.

In this work we studied the complex formation between gadolinium(III) ion and moxifloxacin by using potentiometric and UV spectrophotometric measurements.

## 2. Experimental

### 2. 1. Reagents and Analysis

All reagents were of analytical grade purity and were used without further purification. Doubly distilled water was used for preparation of all solutions. Calibrated class A volumetric glassware (relative error in volume measurements less than 1%) was used for analytical work. All mass measurements were made on an electronic balance Ohaus model DV215CD (precision:  $\pm 0.01$  mg). The stock solution of gadolinium(III) chloride was prepared by dissolving  $Gd_2O_3$ , (p.a., Merck) in HCl

(“Suprapure”, Merck) and standardized by complexometric titrations using EDTA. The appropriate amount of HCl was added into a stock solution to avoid initial hydrolysis of  $Gd^{3+}$  ion. The excess HCl concentration in the gadolinium chloride stock solution was determined potentiometrically using Gran’s method, ie., by plotting  $(V_0 + V_b) \cdot 10^{E/Q}$  against  $V_b \cdot V_0$  is initial volume of the titrated solution,  $V_b$  is a volume of added strong base (NaOH),  $E$  is a measured emf of the cell and  $Q$  is a slope of the glass electrode response. A straight line so obtained, intersects  $V_b$  axis at point which is equal to  $V_e$  (equivalence volume). The concentration of gadolinium stock solution was  $0.0275 \text{ mol/dm}^3$  and HCl,  $0.0472 \text{ mol/dm}^3$  with relative uncertainty better than 1%, as calculated by error propagation formulae. The constancy of the total proton concentration in  $GdCl_3$  solution with time was considered as a criterion for the absence of initial  $Gd^{3+}$  hydrolysis and was periodically checked by titration against standard NaOH before each series of measurements.

Moxifloxacin hydrochloride, (declared purity > 99%), yellow powder,  $M_r = 437.9$ , was obtained from BayerPharma AG (Germany). The standard solution of moxifloxacin ( $5.35 \text{ mmol/dm}^3$ ) was prepared by direct weighing of the standard substance. The standard solution of HCl was added and its concentration was determined by Gran’s method as  $6.35 \text{ mmol/dm}^3$ .

A sodium hydroxide solution was prepared from concentrated volumetric solutions (p.a., Merck, FRG), of nominal concentration  $1 \text{ mol/dm}^3$  (maximum declared error less than 2%) by dilution with freshly boiled doubly distilled water, followed by cooling under a constant flow of purified nitrogen. The alkali concentration was checked by titration against potassium hydrogen phthalate. The prepared titrant had a concentration  $0.100 \text{ mol/dm}^3$ .

A hydrochloric acid solution was made from HCl, (“Suprapure”, Merck) and standardized against tris-(hydroxymethyl)aminomethane. The final concentration was  $0.104 \text{ mol/dm}^3$ .

A lithium chloride solution was prepared from LiCl, (p.a., Merck), by dissolving the re-crystallized salt in twice-deionized water. The concentration of this solution was determined by evaporation of a known volume of solution to dryness at 423 K and weighing the residue.

Nitrogen gas, used for stirring solutions and providing an inert atmosphere during the titrations, was purified by passing it through 10% NaOH then 10%  $H_2SO_4$ , alkaline solution of pyrogallol,  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  solution of KCl and finally distilled water.

### 2. 2. Apparatus and Procedure

Potentiometric titrations were carried out in a double-walled glass vessel, thermostatted at 298 K. Measurements were made on a Tacussel Isis 20000 pH meter (precision  $\pm 0.1$  mV or  $\pm 0.002$  pH units) equipped with a Ra-

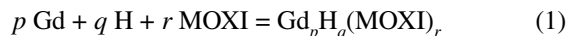
diometer combined electrode. A Metrohm Dosimat model 665 automatic burette with anti-diffusion tip, was used for delivery of the titrant. The nominal volume of the burette was 5.00 mL. The burette was calibrated in three points. Thus the calculated error in volume was less than  $\pm 10 \mu\text{L}$  and declared resolution was  $\pm 5 \mu\text{L}$ . The ionic strength of all test solutions was adjusted to  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  with lithium chloride. All measurements were performed under a nitrogen atmosphere.

To reduce the concentration of the hydrogen ion, the alkali was added stepwise from an autoburette in small aliquots ( $0.005\text{--}0.01 \text{ cm}^3$ ). The potential was monitored after each addition of titrant. The titration protocol was chosen in such a way that the hydrolysis and complexation reactions would proceed in the conditions as close to true equilibrium as possible.<sup>21</sup> Usually stable potential readings were obtained in 3–5 min after addition of the titrant at the beginning of the titration ( $\text{pH} < 3$ ) and in 5–10 min at pH values higher than 3. Potential of the glass electrode is given by the expression:  $E = E_0 + Q \log h + E_j$  where  $h$  is the concentration of free proton,  $E_0$  is a constant which include standard potential of the glass electrode,  $Q$  is the slope of the glass electrode response and  $E_j$  is liquid junction potential. The parameters,  $E_0$ ,  $Q$  and  $E_j$  were determined by strong acid – strong base titration to check the system suitability. During the titrations of the test solutions the  $E_0$  was determined using the data in the acidic region where no hydrolysis or complexation takes place (so that  $h$  is equal to the analytical concentration of proton), by plotting  $E - Q \log h$  against  $h$  and extrapolating the straight line so obtained to  $h = 0$ . The free proton concentration was then calculated through the equation:  $\log h = (E - E_0 - E_j)/Q$  which was applied to the whole titration curve. All titrations were carried in duplicate. The agreement between duplicate titration was better than 1%. The water autoprotolysis constant was taken as  $pK_w = 13.78 \pm 0.02$ .

Spectral measurements were made on double beam UV–Vis spectrophotometer model Lambda 35 (Perkin Elmer, U.S.A.). Operational parameters were: scan speed, 2 nm/s, slit width, 0.3 nm, photometric sensitivity, 0.2 abs. units. Matching pair of 1 cm quartz cuvettes was used for measuring the spectra. Spectral measurements were made on solutions in which the concentration of gadolinium and moxifloxacin were constant ( $C_{Gd} = 0.072$ ,  $0.033$  and  $0.017 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $C_{MOXI} = 0.051$  and  $0.035 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) while pH was varied between 3.0 and 9.0 (10 solutions). The pH of the test solutions was measured with glass-calomel electrode couple, which was calibrated as a hydrogen concentration probe according to procedure of Irving *et al.*<sup>22</sup> The pH of each test solution was checked daily, during one week. The stable values, within 0.01 pH and 0.004 absorbance units, were attained after 1 h and remained stable during couple of days. Spectra of the test solutions were recorded in 250–450 nm wavelength interval.

## 2. 3. Data Treatment

The species formed in the studied systems were characterized by the general equilibrium:



and the corresponding constants are given by:

$$\beta_{p,q,r} = \frac{[\text{Gd}_p\text{H}_q(\text{MOXI})_r]}{[\text{Gd}]^p[\text{H}]^q[\text{MOXI}]^r} \quad (2)$$

where MOXI is the deprotonated molecule of the ligand. Fully protonated moxifloxacin is denoted as  $\text{H}_2\text{MOXI}^+$ .

In this study, the convention has been adopted whereby a complex containing a metal ion, M, proton, H and ligand L, takes the general formula  $\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$ , where  $p$ ,  $q$  and  $r$  are the stoichiometric indices of the components in the complex. A negative values for  $q$  refers to proton removal or hydroxide ion addition during formation of the complex. Thermodynamically these two processes are equivalent and cannot be distinguished potentiometrically. The equilibrium constant for the formation of this complex from its components is then designated by the symbol  $\beta_{p,q,r}$ . For convenience the species  $\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$  is denoted by the three stoichiometric coefficients ( $p, q, r$ ) given in the order M, H, L. For simplicity, the charges of these species are omitted.

Three kinds of equilibria should be considered in the present study: (a) protonation of moxifloxacin anion; (b) hydrolysis of  $\text{Gd}^{3+}$  ion; and (c) general three component equilibria, which include the case  $q = 0$ , *i.e.* the formation of pure binary complexes of  $\text{Gd}^{3+}$ . The overall protonation constants of moxifloxacin anion and stability constants of hydrolytic complexes of  $\text{Gd}^{3+}$  ion were determined in separate experiments. Thus, in evaluation of three component equilibria (c), the binary models (a) and (b) were considered as known. The concentration stability constants of the complexes,  $\beta_{p,q,r}$  were calculated with the aid of the suite of computer programs Hyperquad2006.<sup>23</sup> In Hyperquad calculations the identity and stability of complexes which give the best fit to the experimental data, were determined by minimizing the objective function,  $U$ :

$$U = (1/N) \sum_{n=1}^N w_{ni} (Y_{ni}^o - Y_{ni}^c)^2 \quad (3)$$

where  $w_{ni}$  represents a statistical weight assigned to  $i^{\text{th}}$  residual at  $n^{\text{th}}$  point of titration curve, and  $Y_{ni}^o$  and  $Y_{ni}^c$  refer to observed and calculated either potential or absorbance ( $o = \text{observed}$ ,  $c = \text{calculated}$ ) assuming the specific model and trial constants, respectively.  $N$  is the total number of experimental points. Quality of the fit was judged by usual statistical parameters. The weight  $w_{ni}$  defined as reciprocal of the variance in the residual  $Y_{ni}^o - Y_{ni}^c$  is calculated using an error propagation formula:

$$w_{ni} = \left( \sum_k \frac{(\partial(Y_{ni}^o - Y_{ni}^c))}{\partial k} \right)^2 \sigma_k^2 \quad (4)$$

where the summation extends over all parameters,  $k$ , for which errors,  $\sigma_k$ , are specified and include titrant volume error ( $\pm 2 \mu\text{L}$ ), error in emf readings ( $\pm 0.2 \text{ mV}$ ) and error in absorbance readings ( $\pm 0.002 \text{ abs units}$ ). The standard deviations of the parameters being refined are calculated using the formula:

$$\sigma_i = \left( \frac{U \times G_{ii}}{N - k} \right)^{1/2} \quad (5)$$

where  $G_{ii}$  is inverted Hessian used in the Gauss Newton procedure to minimize  $U$ . The standard deviations in residuals,  $s$ , was calculated as:

$$s = \left\{ \frac{e^T e}{N - k} \right\} \quad (6)$$

where  $e$  is a vector in residuals either potential or absorbance. Acceptance of the model assumed minimum value of  $U$ , random distribution of residuals, standard deviation of parameters (stability constants) less than 30% of the parameter value, standard deviation in residuals less than 3.0 and Pearson's test less than 12.6.

The spectrophotometric data were evaluated with the aid of the program pHAB2006<sup>24</sup> (which also belongs to Hyperquad family but possesses some additional and improved features) and the program Hyperquad which is capable to treat spectral data. Potentiometric and spectrometric data were made consistent by concomitantly evaluating both kind of data with the aid of Hyperquad 2006 suite of programs using the best model obtained in separate treatment.

### 3. Results and Discussion

In order to study speciation in three-component system  $\text{Gd}^{3+} - \text{H}^+$  (or  $\text{OH}^-$ ) – moxifloxacin, it is necessary first to characterize the binary equilibria, *i.e.* hydrolysis of gadolinium(III) ion and protonation of moxifloxacin anion, under exactly the same experimental conditions as for complexation study.

#### 3. 1. Hydrolysis of Gadolinium(III) Ion

The emf data of the hydrolysis of 1.0–5.0 mmol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{Gd}^{3+}$  ion in a 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  LiCl medium are presented in Fig. 2 as the dependence of the hydroxide number of  $\text{Gd}^{3+}$  on the free hydrogen ion concentration,  $-\text{lg } h$  (pH). The hydroxide number  $Z_{\text{Gd}}$  denotes an average number of hydroxide ions reacted per  $\text{Gd}^{3+}$  ion and was calculated from the analytical concentration of hydrogen ions,  $\text{H}^+$ , the measured free hydrogen ion concentration,  $h$ , and the total concentration of the  $\text{Gd}^{3+}$  ion,  $C_{\text{Gd}}$ , according to expression:

$$Z_{\text{Gd}} = \frac{h - H}{C_{\text{Gd}}} \quad (7)$$

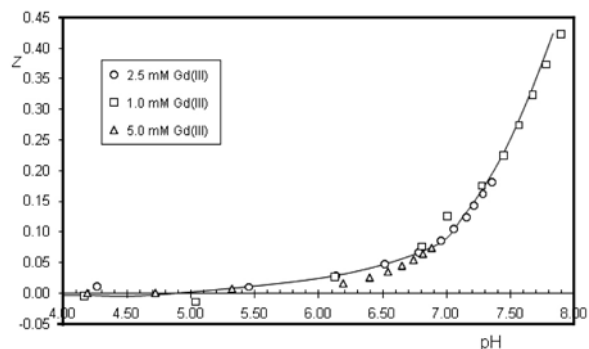
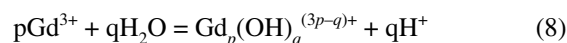


Fig. 2. Hydrolysis of  $\text{Gd}^{3+}$  ion in a 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  LiCl medium, at 298 K, where mM denotes mmol  $\text{dm}^{-3}$ . Points are experimental data, while the line has been calculated from the composition and stability of the complexes.

Fig. 2 shows that in LiCl medium the hydrolytic curves are superimposed for the different total gadolinium concentrations thus indicating the formation of mononuclear complexes. The maximum value of the hydroxide number reached before the precipitation occurred, was between 0.08 and 0.42 depended on gadolinium concentration. The onset of precipitation was indicated by unstable potential readings, steep rise of formation curve and visually, as appearance of slight opacity of solution. At each total concentration of the  $\text{Gd}^{3+}$  ions, hydrolysis started at about pH 5.

The stability and composition of the complexes formed were determined on the basis of the assumption that the  $\text{Gd}^{3+}$  ion interacts with water molecules and forms one or more hydrolytic complexes of the general formula  $\text{Gd}_p(\text{OH})_q^{(3p-q)+}$  according to reaction:



where the amount of  $\text{H}^+$  produced is equivalent to the quantity of hydroxide ions bound to the  $\text{Gd}^{3+}$  ion. The overall formation constants,  $\beta_{p,q}$  can be defined as:

$$\beta_{p,q} = C_{p,q} [\text{Gd}^{3+}]^{-p} [\text{H}^+]^{+q} \quad (9)$$

where  $C_{p,q}$  denotes the equilibrium concentration of the  $(p,q)$  complex and  $[\text{Gd}^{3+}]$  is the free concentration of  $\text{Gd}^{3+}$  ion. The general formula  $\text{Gd}_p(\text{OH})_q^{(3p-q)+}$  is also understood to include an unknown amount of  $\text{H}_2\text{O}$  as solvent and possibly some anions of the medium.

In reaction (8), the hydration of individual ions and complex formation of the  $\text{Gd}^{3+}$  ion with chloride ions are omitted. The concentration of both chloride ions and water molecules is much higher than the concentration of the  $\text{Gd}^{3+}$  ion; therefore, it is not possible to determine the changes in concentration of the chloride ions and water molecules. In order to avoid the complex formation effect, the concentration of the medium anion was kept constant (0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$ ) and much higher than that of the  $\text{Gd}^{3+}$  ion. Also, since changes in the mean activity coefficients of

the  $(p, q)$  pairs and  $\beta_{p,q}$  values can not be simultaneously determined, the constant ionic medium approach<sup>25</sup> was used to keep mean activity coefficients constant.

The composition of the hydrolytic complexes and their stability constants were determined with the aid of program Hyperquad2006. The calculation indicates the formation of only mononuclear complex  $\text{Gd}(\text{OH})^{2+}$  in the pH range 5.0 to 7.5. The calculated value of the stability constant ( $-\log \beta_{1,-1}$ ) for the complex  $\text{Gd}(\text{OH})^{2+}$  is  $7.96 \pm 0.01$ . This result compares well with literature data (Table 1).

is shown in Fig. 3. Distribution of gadolinium has been calculated by the program Hyss2006.<sup>30</sup> The formation of the complex  $\text{Gd}(\text{OH})^{2+}$  started at pH 5.7, and with increasing pH, the concentration of this complex increases. The highest concentration of this complex is at pH 7.0. Further increase in pH leads to onset of insoluble  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  whose concentration sharply increases upon increasing pH. We did not detect the formation of any polynuclear hydrolytic species, though scarce literature data indicate the formation of (2,-2) and (3,-4) species.

**Table 1.** Review of mononuclear hydrolytic species of gadolinium(III) ion in aqueous solutions at 298 K and various ionic media.

Species	$-\log \beta_{p,q}$	Ionic medium	Reference
(1,-1)	$7.87 \pm 0.03$	Nitrate, 0.5 M	26
	$8.20 \pm 0.01$	Perchlorate, 3 M	27
	$7.3 \pm 0.3$	Perchlorate, 1 M	28
	$7.83 \pm 0.05$	Perchlorate, 0	29
	$7.96 \pm 0.01$	Chloride, 0.1 M	this work
(1,-2)	$13.04 \pm 0.03$	Nitrate, 0.5 M	26
	$14.6 \pm 0.5$	Perchlorate, 1M	28
(1,-3), solid, $\log K_{sp}$	$19.32 \pm 0.03$	Nitrate, 0.5 M	26
	$17.0 \pm 0.5$	Perchlorate, 1M	28
	$17.9 \pm 0.1$	Chloride, 0.1 M	this work

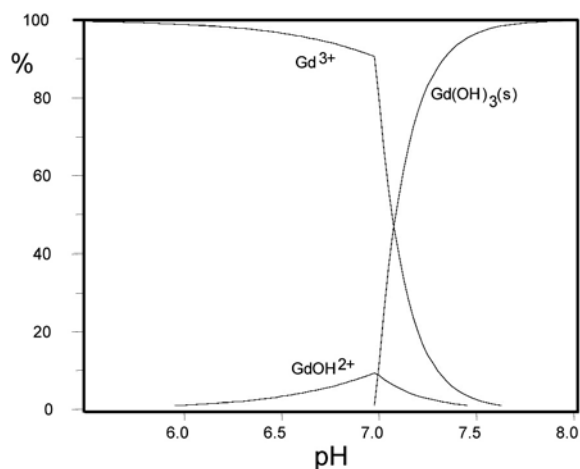
**Table 2.** Calculated values of the solubility product of  $\text{Gd}(\text{OH})_3(\text{s})$ ,  $K_{sp} \text{Gd}(\text{OH})_3$

$C(\text{Gd}^{3+})$ , mM	$-\log h_p$	$p[\text{Gd}^{3+}]$	$p[\text{OH}^-]$	$K_{sp} \text{Gd}(\text{OH})_3$
1.00	7.00	3.04	6.78	17.96
2.50	6.85	2.63	6.93	17.92
5.00	6.70	2.32	7.08	17.78

*Note.* The equilibrium concentrations of  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $[\text{Gd}^{3+}]$ , were calculated from  $C_{\text{Gd}} = [\text{Gd}^{3+}] + \beta_{1,-1} [\text{Gd}^{3+}] \cdot [\text{H}^+]^{-1}$ .

The formation of insoluble Gd-hydroxide was estimated from experimental titration curves of acidified solutions of gadolinium(III) chloride with sodium hydroxide. When  $\text{pH} \sim 7.5\text{--}9$  was reached further addition of alkali was stopped since the excess of alkali was not connected with gadolinium hydrolysis. The titration curves were plotted as the dependence of pH on the titration parameter (amount of strong base added per mole of  $\text{Gd}^{3+}$ ). The point of inflexion of pH-metric curve corresponds to the start of formation of hydroxide precipitate. For each total concentration of  $\text{Gd}^{3+}$  ion the beginning of precipitation was determined ( $-\log h_p$ ). Assuming the formation of  $\text{Gd}(\text{OH})_3(\text{s})$  only, the solubility product  $K_{sp} = [\text{Gd}^{3+}] \cdot [\text{H}^+]^{-3}$  was calculated from the known free concentration of  $\text{Gd}^{3+}$ . The results are given in Table 2.

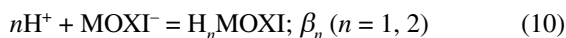
Thus, calculated average value of solubility product of  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  is  $\log K_{sp} = 17.9 \pm 0.1$ . The distribution diagram of the hydrolytic complexes of gadolinium(III) ion



**Fig. 3.** The distribution of  $\text{Gd}^{3+}$  hydrolytic species in 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  LiCl ionic medium at 298 K.  $C_{\text{Gd}} = 1.00 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

### 3. 2. Protonation of Moxifloxacin Anion

Protonation constants,  $\beta_n$ , of the moxifloxacin anion, defined according to the equilibrium:



were determined by glass electrode potentiometric titrations in 0.10 mol dm<sup>-3</sup> LiCl medium at 298.15 K. Three titrations were carried out with 0.25, 0.50 and 1.10 mmol dm<sup>-3</sup> total fluoroquinolone concentrations, in the pH range between 3.0 and 10.2. Spectrophotometric measurements were made on solutions in which the concentration of moxifloxacin was the same (0.05 mmol dm<sup>-3</sup>) while the pH values were varied between 4.0 and 9.4 (15 solutions were used). The calculated values of protonation constants are given in Table 3. Agreement between potentiometrically and spectrophotometrically obtained values was better than 1%. The obtained values are in the range with previously reported data.<sup>31</sup>

**Table 3.** Potentiometrically and spectrophotometrically determined protonation constants of moxifloxacin (MOXI) defined as:

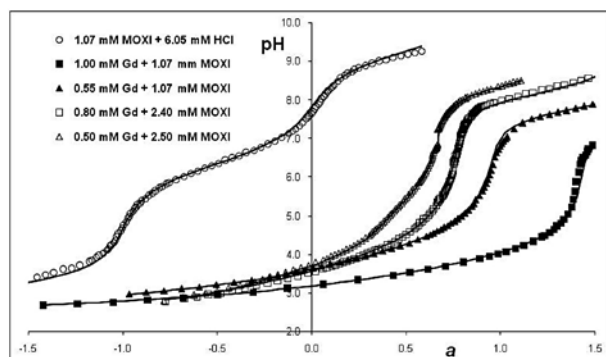
$$K_1 = [\text{HMOXI}]/[\text{H}][\text{MOXI}], K_2 = [\text{H}_2\text{MOXI}]/[\text{HMOXI}][\text{H}]$$

	Potentiometric	Spectrophotometric
log $K_1$	9.34 ± 0.01	9.30 ± 0.02
log $K_2$	6.33 ± 0.01	6.27 ± 0.05

### 3. 3. Complex Formation of Gd<sup>3+</sup> with Moxifloxacin

**Potentiometric Measurements** The experimental data obtained by emf measurements in 0.1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl medium at 298 K are shown in Fig. 4.

In order to derive the speciation model for each studied system the experimental data were plotted as the de-



**Fig. 4.** Potentiometric titration of Gd<sup>3+</sup> – moxifloxacin solutions with standard NaOH in 0.1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl ionic medium at 298 K. Full lines denote calculated curves. The concentration in mmol dm<sup>-3</sup> is denoted as mM.

pendence of pH on the titration parameter. The titration parameter,  $a$ , was calculated through the formula

$$a = \frac{C_{\text{NaOH}}V_{\text{NaOH}} - V_0C_{\text{HCl}}}{V_0L} \quad (11)$$

where  $V_0$  and  $L$  are the initial volume and concentration of moxifloxacin in the titrated solution. Negative values of  $a$  represent the titration of excess of strong acid (HCl). Titration curves of moxifloxacin in the presence of gadolinium ion (Fig. 4) are shifted to the right compared to moxifloxacin alone thus indicating strong complex formation in the system. Since the titration curves of moxifloxacin alone and Gd<sup>3+</sup> + moxifloxacin do not coincide at low pH values it may be inferred that complexation reaction proceeds even at pH values lower than *ca.* 3. Coincidence of the titration curves of Gd<sup>3+</sup> + moxifloxacin with different ligand to metal concentration ratios in the pH region around 3 indicates the formation of the 1 : 1 complexes. The titration curve of moxifloxacin alone shows two well separated jumps indicating the titration of two protons from the ligand. In the presence of gadolinium ion these protons are titrated at lower pH values and appearance of two buffer regions on the titration curves points to formation of the complexes with ligand to metal ratio higher than 1 : 1. Thus the formation of complexes with the stoichiometry L/M = 1 : 1; 2 : 1 and 3 : 1 as well as mixed complexes may be expected.

To find the model that gives the best fit to the experimental data, various complexes and combinations thereof were included in Hyperquad2006 calculations up to ligand to metal mole ratio 4:1. During the calculations, the analytical parameters (total metal, ligand and proton concentration) were held constant. The pure hydrolytic complexes and protonated moxifloxacin species were not refined during the calculations. Different strategies were employed in the refinement operations: (i) fixing selected constants to simplify the optimization procedure, (ii) reducing the number of experimental points included in calculations, (iii) “piecewise” fitting of the experimental data. Initially, each titration was treated separately. All the complexes found in this way were included as the starting model for subsequent calculations.

The GdHMOXI and Gd(HMOXI)<sub>2</sub> complexes were found at all titrations and concentration ratios. The scatter of the values of their stability constants is within the experimental errors. The complexes Gd(HMOXI)(MOXI) and Gd(MOXI)<sub>2</sub> were found at a MOXI:Gd concentration ratio of 2 : 1 and 1 : 1. At the higher concentration ratios (as L/M = 3 : 1 and 5 : 1) a significant improvement of the fit was achieved with the introduction of the complexes (1,3,3), (1,2,3), (1,1,3) and (1,0,3). Mixed hydrolytic complexes are not important even at higher pH values. The complexes with a stoichiometry L/M ≥ 4 were not found.

The preliminary set of complexes obtained in separate calculations is given in Table 4. Statistical parameters which determine the quality of fit are also given.

**Table 4.** Stability constants of gadolinium – moxifloxacin complexes formed in a 0.1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl ionic medium, at 298 K. L/M denotes ligand to metal mole ratio.

Species (p,q,r)	$\log \beta_{p,q,r} \pm \sigma$			
	Potentiometric		Spectrophotometric	
	L/M = 0.5–2	L/M = 3–5	L/M = 0.5–2	L/M = 3–5
(1, 1, 1)	14.72 ± 0.03	14.79 ± 0.06	14.79 ± 0.09	14.75 ± 0.07
(1, 2, 2)	29.65 ± 0.02	29.57 ± 0.08	29.72 ± 0.08	29.67 ± 0.09
(1, 1, 2)	21.20 ± 0.09			
(1, 0, 2)	14.00 ± 0.03		13.8 ± 0.3	
(1, 3, 3)		43.98 ± 0.03		43.95 ± 0.01
(1, 2, 3)		35.18 ± 0.01		
(1, 1, 3)		27.76 ± 0.03		27.80 ± 0.05
(1, 0, 3)		19.00 ± 0.05		19.28 ± 0.08
Statistics	$\chi^2 = 11.82$ $s = 1.2$	$\chi^2 = 15.98$ $s = 1.8$	$\chi^2 = 24.36$ $s = 4.4$	$\chi^2 = 13.65$ $s = 1.3$

The calculated errors ( $\sigma$ ) in stability constants reflect the fitting error (due to model) and experimental errors in titrant volume and potential or absorbance readings. Systematic errors on analytical concentrations could not be taken into account; they are rather assumed to be absent. Careful preparation of working solutions, and agreement between replicate titrations ensures the absence of systematic errors thus, it may be assumed that the magnitude of relative errors on concentrations is far less than the errors arising from the choice of model, regression and instrumental errors. It can thus be assumed that uncertainty on stability constants is well represented by calculated standard deviation.

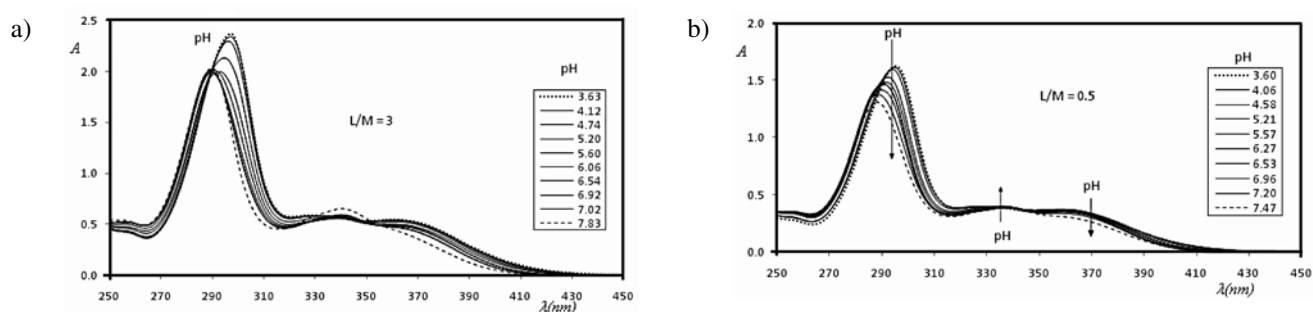
**Spectrophotometric Measurements** Spectral measurements were performed on Gd<sup>3+</sup> – moxifloxacin solutions in which the concentration of both, gadolinium ion and moxifloxacin was kept constant while pH was varied by the addition of the standard HCl or NaOH, as appropriate. All UV/Vis spectra show evidence of an intensive band centered at 290 nm and another lower energy broad band appears between 330 and 380. This band shows two well resolved maxima at 340 and 370 nm (Fig. 5).

The high energy band is mainly due to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition in the aromatic ring. The longest wavelength maximum is due to an  $n \rightarrow \pi^*$  (HOMO–LUMO) electronic transition<sup>32</sup> and consists of two sub-peaks which are

caused by an equilibrium of the moxifloxacin forming an intermolecular hydrogen bond with the solvent molecule water and moxifloxacin forming an intramolecular hydrogen bond of the 4-keto and the 3-carboxylic acid group.<sup>33–35</sup>

Upon increasing the pH from *ca.* 3 to 8 higher energy band shows significant changes in position and maximum intensity (hypsochromic shift). The lower energy band exhibits however, only small changes in a shape, position and intensity (bathochromic shift). Intensity of the band at 340 nm increases upon increasing the pH. Intensity of the band at 370 nm and higher energy band decreases with increasing the pH. In the presence of gadolinium ion, in comparison with the spectrum of moxifloxacin alone, all bands are shifted toward higher wavelengths.

The spectral data were first evaluated with the aid of the pHAb2006 program. In calculations, the molar absorptivities of moxifloxacin anion, H(MOXI) and H<sub>2</sub>(MOXI) were known from spectral measurements of moxifloxacin anion protonation and were fixed, while those of gadolinium(III) – aqua ion and pure hydrolytic complexes were set to zero. The calculations were carried out in the following way: the complexes found by potentiometry were included in pHAb calculations and their stability constants were allowed to float. When the best fit of



**Fig. 5.** The UV–Vis spectra of Gd<sup>3+</sup> – moxifloxacin solutions at different pH values and ligand (L) to metal (M) concentration ratios: (a) L/M = 3, (b) L/M = 0.5

the spectra was achieved the stability constants were varied one at a time simultaneously with variation of molar absorptivities. The accepted results of calculation are given in Table 4.

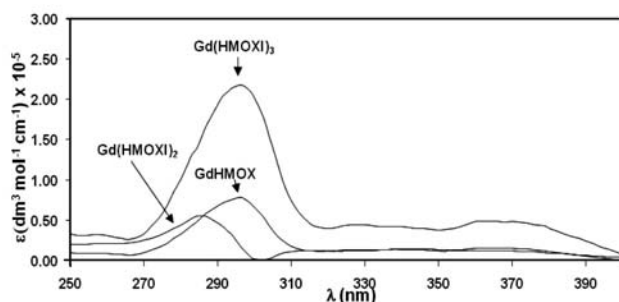


Fig. 6. The calculated spectra of Gd–moxifloxacin species

Along with the stability constants, in spectral calculations, the molar absorptivities of the complexes were calculated. The calculated spectra for Gd–moxifloxacin system are presented in Fig. 6. As seen from Fig. 6 the calculated spectra of GdHMOXI<sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub><sup>3+</sup> and Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, complexes differs from that of pure HMOXI most significantly in the region of *n* → *p*\* transition in the 330–370 nm wavelength interval. It is probably caused by breaking the intra- and intermolecular hydrogen bonds due to coordination of both 4-keto and 3-carboxyl oxygens to gadolinium.

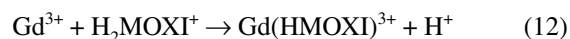
From preliminary set of complexes (Table 4) a new calculation cycle was initiated, this time both selected potentiometric and spectrophotometric data were treated concomitantly. On the basis of acceptance criteria the final accepted set of complexes was derived and this set is shown in Table 5.

The distribution diagram of species in the Gd<sup>3+</sup> – moxifloxacin system, for the concentration ratio [MOXI]/[Gd] = 5 : 1 is shown in Fig 7. As can be seen from Fig. 7, the dominating complex at lower pH values is Gd(HMOXI)<sup>3+</sup>, with the maximum concentration at pH = 4. This complex may be formed *via* the reaction of Gd<sup>3+</sup> aqua ion and moxifloxacin cation bearing in mind that

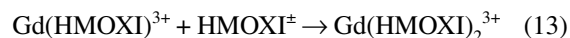
Table 5. Final set of complexes obtained by potentiometric and spectrophotometric measurements in Gd<sup>3+</sup> – moxifloxacin solutions at 0.1 mol/dm<sup>3</sup> LiCl ionic medium and 298 K.

Species	log β ± σ
Gd(HMOXI) <sup>3+</sup>	14.78 ± 0.03
Gd(HMOXI) <sub>2</sub> <sup>3+</sup>	29.75 ± 0.02
Gd(HMOXI) <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	43.98 ± 0.03
Gd(HMOXI) <sub>2</sub> MOXI <sup>2+</sup>	35.08 ± 0.01
Gd(HMOXI)(MOXI) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	27.56 ± 0.03
Gd(MOXI) <sub>3</sub> <sup>0</sup>	19.20 ± 0.05
Statistics	χ <sup>2</sup> = 12.02 s = 2.28

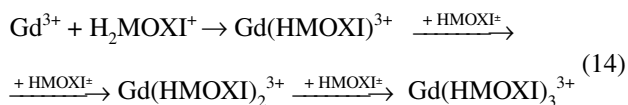
these species predominate in the 2.0–5.0 pH region.



This reaction, from the electrostatic point of view, is not favorable, but one should bear in mind that the carboxyl proton participates in hydrogen bonding both intermolecular with 4-carbonyl oxygen and intramolecular with another moxifloxacin and solvent molecules. This facilitates its release by the action of Gd<sup>3+</sup> ion. The complex Gd(HMOXI)<sup>3+</sup> upon increasing the pH, binds another zwitterionic molecule of moxifloxacin and gives the complex Gd(HMOXI)<sub>2</sub><sup>3+</sup> *via* the reaction path:



This complex with increasing pH releases protons and gives mixed complex Gd(HMOXI)MOXI<sup>2+</sup> with a maximum of 10 % concentration at pH 8. As can be seen from Fig. 7, in going from acidic to weakly alkaline medium gradual formation of complexes GdHMOXI<sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub><sup>3+</sup> and Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup> takes place probably by consecutive reactions:



At pH values higher than 7, protonated moxifloxacin ligands in the complex Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup> release protons and give neutral complex Gd(MOXI)<sub>3</sub>. The formation of the complex Gd(MOXI)<sub>3</sub> starts at about pH = 8 and with increasing pH, the concentration of this complex increases.

In Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup> complex moxifloxacin acts as a bidentate O,O- ligand with a probable formation of six-membered ring by 4-keto and 3-carboxyl oxygens (Fig. 8). Gadolinium(III) ion exhibits characteristic coordination numbers 6, 8 and 9.<sup>36</sup> With the most ligands Gd<sup>3+</sup> takes coordination number 8.<sup>37</sup> Since we did not find any evidence for the formation of L/M = 4 : 1 complex it may be assumed that additional two coordination sites in the gadolinium coordination sphere are filled with water molecules. The similar result was found by Turel *et al.*<sup>38</sup>, in studying the fluorescence properties and structure of Eu<sup>3+</sup> – ciprofloxacin complex. They found that two bidentate O,O-bonded ciprofloxacin molecules and four aqua ligands are coordinated to the metal. One ciprofloxacin is anionic while the other is zwitterionic. Similar results for lanthanide complexes with ciprofloxacin was found by Pin *et al.*<sup>39</sup> In this work we also found that quinolones may coordinate to metal ion in various states of protonation (ie, zwitterionic, neutral and anionic form). The complex Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup> is very stable in the 5.0–8.0 pH and is probably formed in plasma, under physiological conditions.



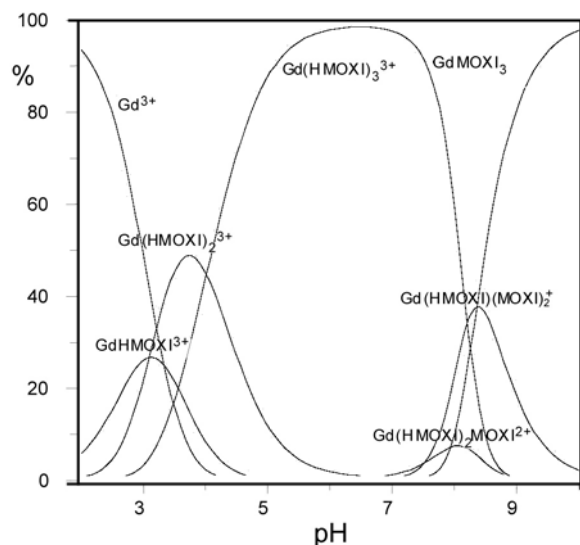


Fig. 7. Distribution diagram of Gd – moxifloxacin species at ligand-to-metal concentration ratio = 5 : 1 and total gadolinium concentration  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$

### 3. 4. Computer Simulation of the Effect of Moxifloxacin on Gadolinium(III) Distribution in Plasma

The low-molecular weight complex distribution of Gd(III) ion in human blood plasma was first studied by Jackson et al.<sup>40</sup> by computer simulation. Webb et al.<sup>41</sup> stu-

died  $\text{Gd}^{3+}$  and  $\text{Ce}^{3+}$  distribution in the gastrointestinal tract and Yue Wang et al.<sup>42</sup> studied  $\text{Gd}^{3+}$  speciation in human blood plasma taking into account the precipitates and some important mixed complexes. Jinping Wang<sup>43</sup> studied  $\text{Gd}^{3+}$  speciation in human interstitial fluid. The results of these studies reveal that at lower gadolinium concentration the metal is mainly bound to citrate. At millimolar level of  $\text{Gd}^{3+}$  concentration and without taking into account the insoluble complexes, transferrin, citrate and glutamate appear as main binders. Introduction of insoluble species into the speciation scheme indicates the predominance of phosphate. DTPA has an effect on  $\text{Gd}^{3+}$  distribution at concentrations approximately higher than  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . We used the simplified model of human blood plasma taking into account only the most important ligands (transferrin, albumin, citrate, phosphate, oxalate, carbonate glutamate and hydroxide) to study the effect of moxifloxacin and DTPA on  $\text{Gd}^{3+}$  ion distribution between low molecular weight complexes. As competitive the following metal ions were considered:  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . The speciation was calculated for different total concentrations of  $\text{Gd}^{3+}$  ion at  $\text{pH} = 7.4$  using the program Hyss2006. From Fig. 7 it is seen that *tris* complex of moxifloxacin and gadolinium is predominant at physiological range of pH so that this complex only was taken into account in speciation calculations.

The data for stability constants of various complexes were taken from literature.<sup>44</sup> Where more than single data were available the corresponding constants were avera-

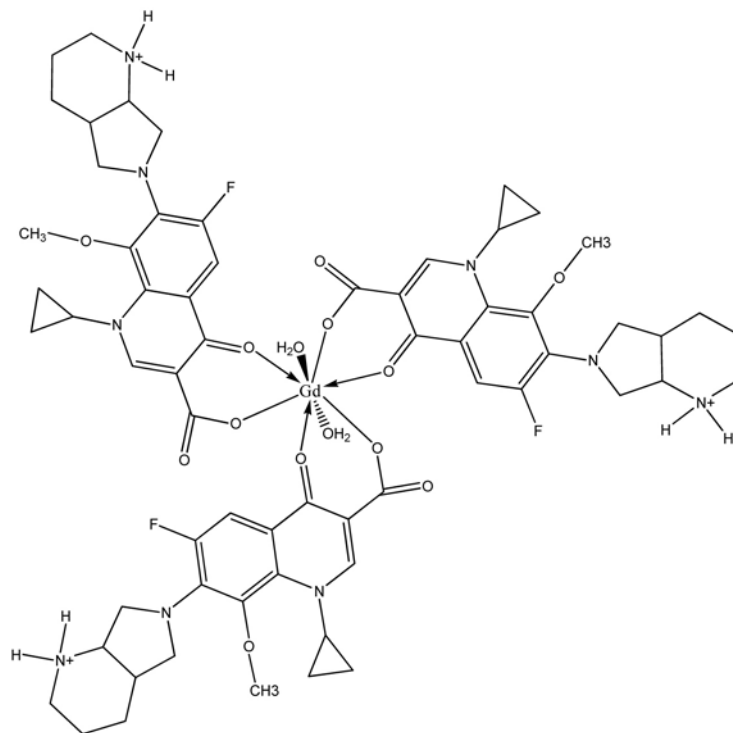


Fig. 8. Possible structure of  $\text{Gd}(\text{HMOXI})_3^{3+}$  complex in solution.

ged. The plasma concentrations of ligands were taken from reference 45.

The results of calculations indicate that when insoluble phosphate ( $\log {}^*K_{sp0} = -25.62$ ) was introduced into simulation it is predominant species of all up to the  $10^{-2}$

mol dm<sup>-3</sup> Gd<sup>3+</sup>. The relative fraction of Gd(OH)<sub>3(s)</sub> ( $\log {}^*K_{sp} = 17.9$ ) increases with increasing total Gd(III) concentration. However, Jackson et al.<sup>40</sup> found that kinetics of the formation of insoluble gadolinium(III) phosphate is very slow so that in considering fast complexation with DTPA and moxifloxacin the formation of phosphate may

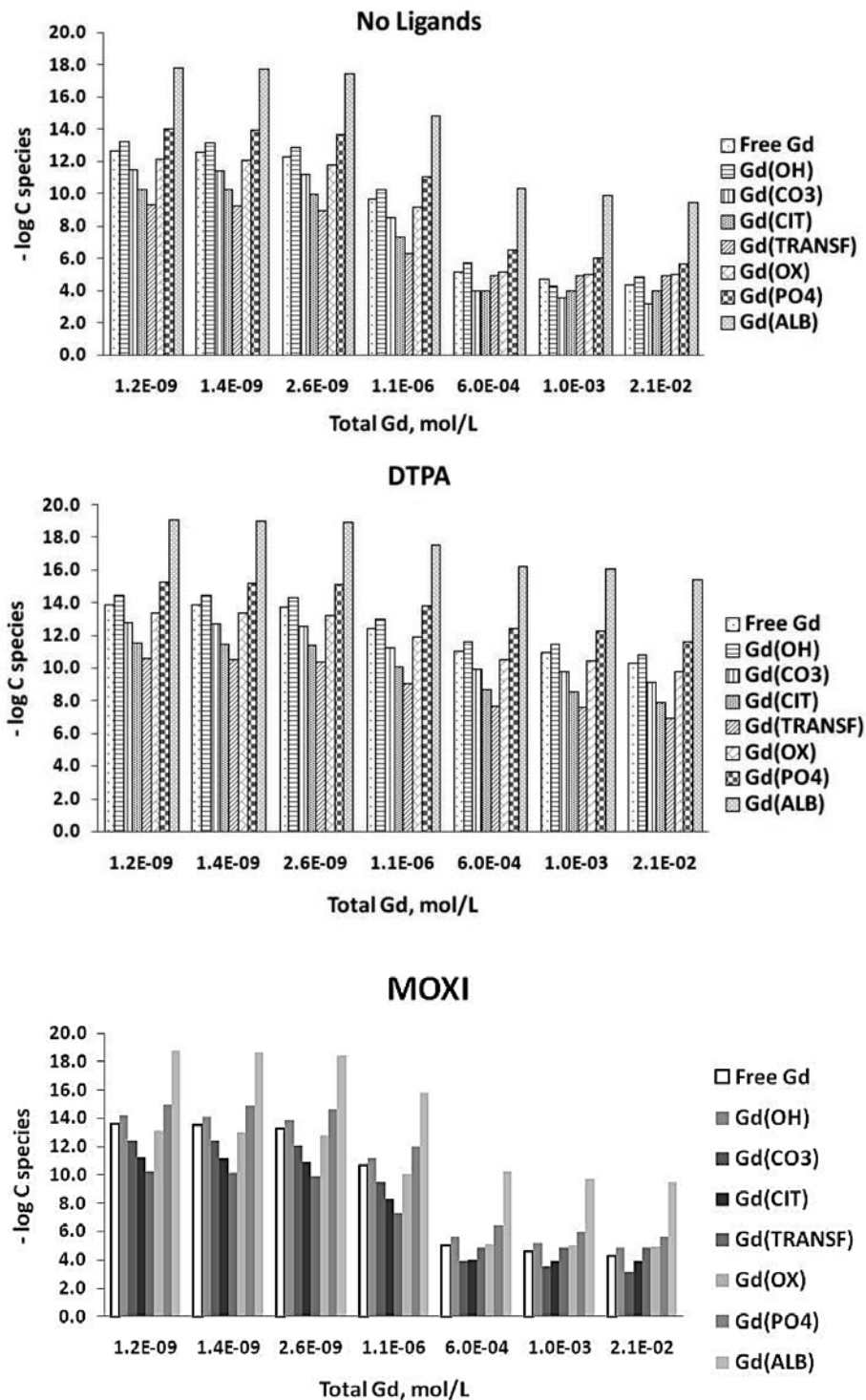


Fig. 9. Calculated distribution of gadolinium species in human plasma at pH = 7.4. CIT = citrate, TRANSF = transferrin, OX = oxalate, ALB = albumin

not be taken into account. Soluble species consist of low molecular weight ligand complexes (carboxylate, amino acid), protein complexes (albumin, transferrin, IgG) free  $Gd^{3+}$  and so on. We calculated the distribution only for main binders neglecting amino acid other than glutamic, and ternary complexes. The results are given in Fig. 9 as the distribution of various complexes. Normal  $Gd^{3+}$  plasma level is lower than  $0.3 \mu\text{g/L}$ <sup>46</sup> but upon administering  $Gd(\text{DTPA})$  for the purpose of MRI, glomerular filtration rate measurements or CT scanning, its concentration may increase up to toxic levels ( $\sim 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) followed by its retention in bones.<sup>46</sup> The increase in toxicity was ascribed to facilitated dissociation of the complex in the plasma environment.<sup>19,20</sup>  $Gd^{3+}$  toxicity is due to its interference with  $\text{Ca}^{2+}$  – dependent functions.

DTPA significantly affects the concentration of free  $Gd^{3+}$  and the effect is more pronounced with increasing total gadolinium concentration. Moxifloxacin is effective chelator at lower gadolinium total concentration but at millimolar range of total gadolinium concentration distribution of low molecular weight complexes is almost unchanged.

## 4. Conclusion

Gadolinium(III) ion and moxifloxacin form *in vitro* in aqueous solution, array of complexes of which the *tris* complex  $Gd(\text{HMOXI})_3$  predominates at physiological pH values. In accord with literature data for similar complexes, the moxifloxacin is bound to metal ion by carboxylate and 4-carbonyl oxygen. This complex is stable enough to exhaust the normal gadolinium concentration in plasma upon oral intake of one 400 mg dose of moxifloxacin, at low  $Gd^{3+}$  concentration ( $10^{-9}$ – $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) so that the presence of moxifloxacin may change  $Gd^{3+}$  distribution in plasma. However, at higher  $Gd^{3+}$  concentrations moxifloxacin is not competitive chelator with regard to MRI agents (such as DTPA).

## 5. Acknowledgement

Financial support from the Ministry of Science and Technological Development of Serbia, under the project 142013, is gratefully acknowledged.

## 5. References

1. P. Ball, The Quinolones. History and overview. In: V. T. Andriole (Editor). The Quinolones, Academic Press, San Diego, **2000**, 2–24.
2. M. Donati, M. R. Fermepin, A. Olmo, L. D'Apote and R. Cevenini, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1999**, *43*, 825–827.
3. G. Klopman, S. Wang, M.R. Jacobs, J. J. Ellner, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, *37*(9), 1807–1815.

4. K. Drlica, D. C. Hooper, Mechanism of Quinolone Action, In: D. C. Hopper, J. S. Wolfson, (Editors). Quinolone Antimicrobial Agents, (3<sup>rd</sup> Edition), American Society for Microbiology, Washington DC, **2003**, 19–41.
5. I. Turel, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, 27–47.
6. S. Lober, S. Ziege, M. Rau, G. Schreiber, A. Mignot, P. Koeppe, H. Lode, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*(5), 1067–1071.
7. G. Palu, S. Valisena, G. Ciarrocchi, B. Gatto, M. Palumbo, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1992**, *89*, 9671–9675.
8. I. Turel, A. Šonc, M. Zupančič, K. Sepčič, T. Turk, *Metal Based Drugs*, **2000**, *7*(2), 101–104.
9. S. Lecomte, M. H. Baron, M. T. Chenon, C. Couprie, N. J. Moreau, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, *38*(12), 2810–2816.
10. C. Sissi, M. Andreolli, V. Cecchetti, A. Fravolini, B. Gatto, M. Palumbo, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*(9), 1555–1561.
11. Z. F. Chen, R. G. Xiong, J. L. Zuo, Z. Guo, X. Z. You, H. K. Fun, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 4013–4014.
12. M. Župančič, R. C. Korošec, P. Bukovec, *J. Thermal Anal. Calorim.*, **2001**, *63*, 787–795.
13. J. Al-Mustafa, *Acta Chim. Slov.*, **2002**, *49*, 457–466.
14. I. Turel, P. Živec, A. Pevec, S. Tempelaar, G. Psomas, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *23*, 3718–3727.
15. S. K. Upadhyay, P. Kumar, V. Arora, *J. Struct. Chem.*, **2006**, *47*(6), 1078–1083.
16. P. Drevenšek, J. Košmrlj, G. Giester, T. Skauge, E. Sletten, K. Sepčič, I. Turel, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 1755–1763.
17. L. J. Ming, *Med. Res. Rev.*, **2003**, *23*(6), 697–762.
18. W. Guo-ping, L. Qun-fang, *J. Zhejiang University (Science edition)*, **2003**, *30*(4), 417–442. (Google search)
19. P. Hermann, J. Kotek, V. Kubiček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2008**, 3027–3047.
20. M. Port, J.-Marc Idee, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou, C. Corot, *Biometals*, **2008**, *21*, 469–490.
21. P. Djurdjević, R. Jelić, D. Džajević, M. Cvijović, *Metal Based Drugs*, **2002**, *8*, 235–248.
22. H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, *38*, 475–488.
23. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, **1996**, *43*, 1739–1753.
24. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Ann. Chim.*, **1999**, *89*, 45–49.
25. L.-O. Ohman, S. Sjöberg, *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, *149*, 33–57.
26. L. G. Rodenas, S. J. Liberman, *Talanta*, **1991**, *38*(3), 313–318.
27. T. Amaya, H. Kakihana, M. Maeda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1973**, *46*, 2889–2890.
28. J. Kragten, L. G. Decnop-Weever, *Talanta*, **1980**, *27*(12), 1047–1050.
29. G. D. Klungness, R. H. Byrne, *Polyhedron*, **2000**, *19*, 99–107.
30. L. Alderighi, P. Gans, A. Lenzo, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *184*, 311–318.

31. P. Djurdjević, Lj. Joksović, R. Jelić, A. Djurdjević, and M. Jelikić Stankov, *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, *55*(12), 1689–1699.
32. C. H. Song, H. W. Ryu, J. K. Park, T. S. Ko, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **1999**, *20*, 727–730.
33. D. Gimenez, D. Grasso, L. Sarabia, M. C. Ortiz, *Talanta*, **2004**, *64*, 442–451.
34. U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, U. Holzgrabe, *Spectrochim. Acta A*, **2005**, *61*, 1505–1517.
35. H. R. Park, T. H. Kim, K. M. Bark, *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, *37*, 443–460.
36. L. C. Thompson, Complexes, in K. A. Gschneidner Jr, L. Eyring (Eds.), *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, North Holland Pub. Co., **1979**, 209–297.
37. G. Choppin and E. N. Rizkalla, Solution chemistry of actinides and lanthanides, in K. A. Gschneidner Jr, L. Eyring, G. R. Choppin and G. H. Lander (Eds), *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier Science B.V., **1994**, 559–590.
38. D. Čurman, P. Živec, I. Leban, I. Turel, A. Polishchuk, K. D. Klika, E. Karaseva, V. Karasev, *Polyhedron*, **2008**, *27*, 1489–1496.
39. L. Jia-Bin, Y. Pin, G. Fei, H. Gao-Yi, Y. Kai-Bei, *Chinese J. Chem.*, **2001**, *19*(6), 598–605.
40. G. E. Jackson, S. Wynchank, M. Woudenbergh, *Magnetic Res. Med.*, **1990**, *16*, 57–66.
41. L. M. Webb, D. M. Taylor, D. R. Williams, *J. Alloy and Compounds*, **1998**, *12*, 271–273.
42. Y. Wang, X. Lu, S. Y. Wang, J. F. Han, K. Y. Yang, C. J. Niu, J. Z. Ni, *Chin. Chem. Lett.*, **2001**, *12*(2), 161–162.
43. J. Wang, H. Zhang, K. Yang, C. Niu, *Biomaterials*, **2004**, *17*, 599–603.
44. SC-Database. IUPAC stability constants database. Academic Software. UK. **2005**.
45. C. Burtis, E. Ashwood, D. Brunns, B. Sawyer (editors), *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6<sup>th</sup> edition, Saunders – Elsevier, St. Louis, USA. **2008**, 836–873.
46. H. Seiler, A. Sigel, H. Sigel, *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, N.Y., **1994**, 365–369.

## Povzetek

Raziskovali smo ravnotežja nastanka kompleksov med gadolinijevimi(3+) ioni in moxifloxacinom (MOXI) v vodnih raztopinah. Uporabili smo potenciometrične meritve s stekleno elektrodo (ionski medij: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl, 298 K) in UV spektrofotometrične meritve. V koncentracijskem območju 0,5 ≤ [Gd<sup>3+</sup>] ≤ 1,0; 1,0 ≤ [MOXI] ≤ 2,0 mol dm<sup>-3</sup> ([MOXI]/[Gd<sup>3+</sup>] = 1 : 1 do 1 : 5) in pH med 2,5 in 9,0, tvorijo gadolinijevi(3+) ioni s moxifloxacinom komplekse s sestavo: Gd(HMOXI)<sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub><sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, Gd(HMOXI)<sub>2</sub>MOXI<sup>2+</sup>, Gd(HMOXI)(MOXI)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Gd(MOXI)<sub>3</sub>. Konstante stabilnosti so bile izračunane s programom Hyperquad2006 z upoštevanjem hidrolize gadolinijevih(3+) ionov in protonacije aniona moxifloxacina. Napovedali smo možne strukture kompleksov v raztopini in predpostavili mehanizem njihovega nastanka. Z računalniško simulacijo smo ovrednotili vpliv moxifloxacina in ga primerjali z vplivom DTPA na porazdelitev gadolinijevih(3+) zvrsti v krvni plazmi.

## ESI-MS Study of Speciation in Hydrolyzed Aluminum Chloride Solutions

Mirjana Cvijović,<sup>a</sup> Vesna Kilibarda,<sup>b</sup> Milena Jelikić-Stankov,<sup>c</sup> Ivan Lazarević,<sup>d</sup>  
Ivan Jakovljević,<sup>e</sup> Ljubinka Joksović<sup>e</sup> and Predrag Đurđević<sup>\*,e</sup>

<sup>a</sup>The Copper Mill, Sevojno, 31000 Užice, Serbia

<sup>b</sup>Military Medical Academy, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup>Chair of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>d</sup>CBRN Training Center of the Serbian Armed Forces, 37000 Kruševac, Serbia

<sup>e</sup>Chemistry Department, Faculty of Science, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

Soluções de AlCl<sub>3</sub> foram analisadas em concentrações de 0,03 a 5,0 mmol dm<sup>-3</sup> e pH de 3,5 a 6,0 por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e analisador quadrupolar (ESI-Q-MS). Esses dados espectrais foram comparados com os obtidos por ressonância magnética nuclear (NMR) de <sup>27</sup>Al e potenciometria. Espécies resultantes da hidrólise do cátion alumínio em solução apresentaram-se principalmente como complexos carregados positivamente (+1) com moléculas de água coordenadas (n = 1-3) ao metal. As análises revelaram que complexos poliméricos de carga +2 e +3 (em concentrações mais elevadas de Al e pH > 4) contêm íons cloretos coordenados. O aspecto geral dos espectros de massas é dependente de parâmetros instrumentais tais como taxa de fluxo de solvente, temperatura na fonte de ionização e voltagens do cone e capilar. Assim, o ajuste fino do instrumento com relação a estes parâmetros foi realizado. Uma tensão de cone de amostra não superior a 50 V levou à melhor correspondência entre dados de potenciometria, ressonância magnética nuclear de <sup>27</sup>Al e espectrometria de massas.

Solutions of AlCl<sub>3</sub> were analyzed at concentrations from 0.03 to 5.0 mmol dm<sup>-3</sup> and pH from 3.5 to 6.0 using an electrospray ionization quadrupole mass spectrometer (ESI-Q-MS). Mass spectral data were compared with those obtained by <sup>27</sup>Al nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and potentiometry. Hydrolytic aluminum species were present in solution mainly as +1 positively charged complexes with n coordinated water molecules (n = 1-3). Analysis revealed that polymeric complexes of +2 and +3 charges (at higher Al concentrations and pH > 4) contained coordinated chloride ions. The general appearance of the mass spectra is dependent on instrumental parameters such as solvent flow rate, ionization source temperature and cone and capillary voltages. Thus, fine tuning of the instrument with respect to these parameters was performed. Sample cone voltages not exceeding 50 V led to the best agreement between potentiometric, <sup>27</sup>Al NMR and mass spectral data.

**Keywords:** aluminum, hydrolysis, mass spectrometry

## Introduction

Aluminum ions are extremely prone to hydrolysis due to their high affinity toward negatively charged oxygen. Several excellent reviews devoted to various aspects of aluminum hydrolysis, summarizing data accumulated over several decades, were published.<sup>1-6</sup> The extent of hydrolysis and the identity and stability of the hydrolytic species formed in solution depend upon many factors,

such as the nature and concentration of the supporting ionic medium, pH, nature and concentration of the base used to force hydrolysis, aging time and presence of other substances that may interact with aluminum(III) and/or with water molecules.<sup>7-26</sup> So, to fit the observed experimental data, various models for aluminum hydrolysis, including low molecular weight (lmw), oligomers (omw) and higher molecular weight polymers (hmw), have been proposed.<sup>1,4,27-35</sup>

Various transformations of Al species in solution such as hydrolysis, polymerization, flocculation, precipitation and

\*e-mail: preki@kg.ac.rs

crystallization can be described by two general models, namely “core + link” and “cage-like” Keggin,  $\text{Al}_{13}$ . These models were reviewed by Bi *et al.*<sup>36</sup> The “core + link” model is best suited for the explanation of transient state processes under moderate rate of base injection during the titration of Al solutions. According to this model, hydroxyl-Al changes from monomeric to polymeric through the continuous speciation change from small polymer (linear shape)  $\rightarrow$  intermediate-size polymer (2D-planar shape)  $\rightarrow$  large polymer, following an hexameric ring model. The structure of the polymers is the same as that of  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , in which the basic units are either single or double hexameric rings. The most stable polymer is two-dimensional  $\text{C-Al}_{13}^{9+}$ , which self-assembles to three-dimensional Keggin or  $\text{K-Al}_{13}^{7+}$  during the aging of the solution.<sup>37-46</sup> The amorphous Al-hydroxide is formed through a surface coordination process or a gradual growth process from  $[\text{Al}(\text{OH})_3]_{n(\text{aq})}$  ( $n = 2-12$ ) to sediment  $[\text{Al}(\text{OH})_3]_n$  ( $n \rightarrow \infty$ ) in the pH region from 4 to 7. In a “cage-like” model, the hydrolyzed Al solutions contain only monomeric, dimeric, Keggin Al-13 polymeric and some larger polymerized Al species. Prolonged aging of weakly acidic aluminum solutions at elevated temperatures yields polynuclear species including  $[\text{Al}_{30}\text{O}_8(\text{OH})_{56}(\text{H}_2\text{O})_{26}]^{18+}$ , referred to as  $\text{Al}_{30}$ -mer.<sup>10</sup> Polymeric species are metastable and during the aging step undergo structural re-organization. These species can be transformed from one to another directly. The  $\text{K-Al}_{13}$  transforms slowly to  $\text{Al}(\text{OH})_3$  through the aggregation, in the process of aging, of partially hydrolyzed Al species.<sup>47</sup> Bi *et al.*<sup>36</sup> summarized both models into the following scheme: at an average hydroxyl to aluminum ratio (defined as  $Z = [\text{OH}]/[\text{Al}]$ ,  $Z$  ca. 0.2), only hexa-aqua  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  and  $\text{Al}(\text{OH})_3^0$  exist in solution together with small polymers of general formula  $\text{Al}_m(\text{OH})_{Zm}^{(3m-Zm)+}$ . The polymers exist as transient species up to  $Z$  ca. 2.5. Beyond this value, the main Al species are large  $\text{Al}_{13}$ – $\text{Al}_{54}$  polymers and sol/gel  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . The polymer charges range between +7 to +18. At higher values of  $Z$ , precipitation occurs by aggregation of polymeric species, so that the main constituents of the solution are  $[\text{Al}(\text{OH})_3]_{n(\text{aq})}$  and  $\text{Al}_x\text{O}_y(\text{OH})_z^{(3x-y-2z)+}$ . At the same time, the gel begins to dissolve ( $\text{pH} > 6$ ) and the soluble  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  complex forms.<sup>36,45</sup>

Recently, much useful information concerning the identity of hydrolyzed aluminum species has been obtained by mass spectrometric measurements.<sup>48-54</sup> “Soft” ionization techniques such as electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) were extensively used. ESI-MS spectra do not exactly represent the speciation picture of the solution “before the measurement” due to perturbations occurring after the sample injection in the

ion source and before the ion detection. Therefore, the experimental conditions should be adjusted in such way that nebulization and desolvation do not disturb labile hydrolytic process in the solution. Also, the change in the pH of the droplet environment (due to its decrease in volume) does not cause charge reduction in the hydrolytic complexes pinched out from the droplet.

The most comprehensive ESI-MS study of aluminum hydrolysis was performed by Sarpola *et al.*<sup>51-54</sup> They reported several different anionic and cationic Al-complexes ranging from monomeric to polymeric species ( $\text{Al}_{30}$ ) in chloride, sulfate and mixed chloride and sulfate media. The effect of the anion on speciation was also studied. By using the ESI-TOF-MS (electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry) technique, they found three different pH ranges in which the speciation of Al differed from each other: at pH ca. 3 the dominant forms were dimeric  $[\text{Al}_2\text{O}(\text{OH})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_{0-3}]^+$  and trimeric  $[\text{Al}_3\text{O}(\text{OH})_4\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_{0-3}]^+$ , while at pH ca. 5 larger polymers with the  $\text{Al}_{13}$  core were dominant. The charge of these complexes ranged from  $-2$  to  $+3$ , and the disagreement with the  $+7$  charge of Keggin polymers was explained by the presence of terminal chloro atoms. At neutral pH, the formation of colloids and precipitates was indicated by the loss of all signals from the spectra. The largest aluminum cation found by Sarpola *et al.*<sup>51</sup> was the  $\text{Al}_{30}$  cluster as  $[\text{Al}_{30}\text{O}_{35}(\text{OH})_{17}]^{3+}$ . In more recent work,<sup>54</sup> the results obtained by ESI-TOF-MS were re-investigated by using tandem mass spectrometry with triple-quadrupole instrument. No anionic spectra were observed. Signals of the monomeric complexes  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$  and  $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_n]^+$  ( $n = 1, 2, 3$ ) dominated the full scan spectra. At higher collisional energy, two hydroxo groups formed a bridging oxo ligand, with the loss of one water molecule. Chloro ligands were not present as bridging ions since at even low collisional energies they were eliminated as HCl. It was observed that even small dimeric and trimeric complexes were able to capture aqua ligands and the fragment ion spectra broadened toward higher  $m/z$  values. ESI-MS was also applied to aluminum hydrolysis studies in very diluted aluminum chloride solutions by Zhao *et al.*<sup>50</sup> They divided all hydrolytic species into four groups. The first group, formed at pH ca. 4, consisted of monomeric and dimeric species. At pH ca. 4.8, trimeric to pentameric species formed and upon raising the pH to ca. 5.0, these species polymerized to higher oligomers from  $\text{Al}_6$  to  $\text{Al}_{10}$ . The fourth group contained the polymerization products from  $\text{Al}_{11}$  to  $\text{Al}_{21}$ , and finally flocks appeared at pH ca. 6.4. Urabe *et al.*<sup>48,49</sup> studied the speciation of aluminum hydrolytic complexes in chloride solutions by applying ESI-Q-MS (electrospray ionization-quadrupole-

mass spectrometry), ESI-Q-MS/MS (electrospray ionization-quadrupole-tandem mass spectrometry) and ESI-TOF-MS measurements. Hydrolysis was not forced by the addition of base, *i.e.*, it was carried out in the aluminum concentration range of 0.02 to 100 mmol dm<sup>-3</sup> without pH adjustment. Aluminum species existed in solution mainly as positively charged monomeric aluminum hydroxides with several water molecules. In addition to monomers, some polymers were identified (Al<sub>2</sub>, Al<sub>3</sub>, Al<sub>4</sub> and Al<sub>5</sub>) with +1 charge. In positive mode, no complexation with chloride was observed. According to Urabe *et al.*<sup>48</sup>, in partially neutralized AlCl<sub>3</sub> solution (C<sub>Al</sub> = 1 mmol dm<sup>-3</sup>, Z = 1.5), triply charged tridecamer and doubly charged tridecamer, Al<sub>13</sub><sup>2+</sup>, were observed at *m/z* 279-309 and *m/z* = 409 + 9n (n = 0-7) respectively. Tridecameric species differed by the number of water molecules in the cluster.

Available literature data indicate that the main problem encountered in ESI-MS studies of aluminum hydrolysis is the correspondence between equilibrium state in solution and species present in the MS source (gas phase reaction). Generally, classical methods (potentiometry, multinuclear magnetic resonance (MR) spectroscopy and spectrophotometry) identified much less species than ESI-MS, indicating that most species observed by MS are rather characteristic of the MS gas phase than of the solution. Thus, optimal tuning of the mass spectrometry instrument should be performed in order to obtain maximum agreement between spectral and potentiometric data. It has been established in previous work<sup>49</sup> that ESI-Q-MS preserves the dissolution state of aluminum ion better than ESI-TOF-MS.

In the present work, the hydrolysis of aluminum chloride under various conditions using the ESI-Q-MS technique was studied to establish a correspondence between real speciation in hydrolyzed aluminum solutions and signals obtained in ESI-MS. From such set of known species, it would be in principle possible to establish the realistic model of hydrolysis, *i.e.*, to give the preference to some of the above described models.

## Experimental

### Reagents

The standard aluminum chloride solution was prepared by dissolving Al sheets (99.98% purity, Merck, Darmstadt, FRG) in HCl (Suprapure, Merck). The content of aluminum was checked by gravimetry and ICP-OES (inductively coupled plasma – optical emission spectrometry). The aluminum concentration was 0.1000 ± 0.0005 mol dm<sup>-3</sup>. The content of strong acid (HCl) in the aluminum solution was

determined potentiometrically using the Gran method, and the concentration of HCl was 0.153 ± 0.002 mol dm<sup>-3</sup>. Methanol (P.A., Merck) was distilled twice before use. Formic acid and NaOH were reagent grade purity (Merck). Tetramethylammonium hydroxide (TMA) and ammonium hydroxide were Sigma-Aldrich products (Austria).

### Instruments

ESI-MS spectra were recorded on a Waters (Milford, USA) LC/MS instrument equipped with a Micromass model ZQ 2000 API single quadrupole mass detector, operating under the control of the MassLynx 4.0 software. The instrument was used as a simple ESI-MS equipment, *i.e.*, the column was by-passed. Samples were introduced by flow injection analysis with either water or water/methanol 50:50 (v/v %) as solvent flow phase with a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. The sample was introduced into the ESI probe by manual injection with the use of a Hamilton Microliter syringe. Samples were also introduced by continuous flow at 10 µL min<sup>-1</sup>. Spectra were taken in positive mode. For pH measurements, a Mettler Toledo DL 50 instrument equipped with a radiometer combined electrode was used.

Optimal MS conditions were established by a series of preliminary experiments and the best operational parameters were: capillary voltage 3.5 kV, cone voltage 50 V, extractor voltage 3 V, source temperature 125 °C, desolvation temperature 200 °C and dynamic range *m/z* 40-1000.

The solvent used was aqueous formate buffer. The cone (nitrogen) and desolvation gas flows were set at 50 and 450 L h<sup>-1</sup> respectively.

<sup>27</sup>Al NMR spectra were recorded at 130.28 MHz on a Bruker DRX spectrometer with AlCl<sub>3</sub> in 6.0 mol dm<sup>-3</sup> HCl as external standard. Digital resolution was 1.27 Hz *per* point.

Potentiometric titrations were performed with a Radiometer DTS 800 titrator (Copenhagen, Denmark) equipped with a Radiometer combined electrode.

## Results

Hydrolyzed aluminum samples were prepared in the following way: a volume of the AlCl<sub>3</sub> stock solution was diluted with water to the desired concentration and the pH of the solutions was adjusted to the 3.2-6.0 range by addition of either NaOH/HCl or formic acid/NH<sub>4</sub>OH. Solutions were aged either for 4 h or for 7, 15 or 30 days. During the aging period, the pH value was periodically checked, and the values stable to 0.01 pH units for 15 min were recorded.

The nature of the resulting mass spectrum was dependent on various parameters such as applied voltages, solvents, pH and concentration of the solutions. First, the effect of voltages at the electrospray needle, RF lens and sample cone was investigated on  $\text{AlCl}_3$  plus quercetin solutions ( $C_{\text{Al}} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{quercetin}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), according to Deng and Berkel.<sup>55</sup> The potentials were varied in the range of 2.0 to 4.5 kV at the needle, 0 to 200 V at the cone and 0 to 20 V at the lenses. These conditions were adjusted to produce the  $[\text{Al}(\text{quercetin-H})_2]^+$  complex as the dominant ion.<sup>55</sup> It was found that the intensity of the  $[\text{Al}(\text{quercetin-H})_2]^+$  pseudo-molecular ion signal at  $m/z$  629 decreases with increasing cone voltages and is almost independent of the RF lens voltages. So, the voltage at the needle was kept at 3.5 kV. The sample cone voltage was further investigated on  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  aluminum chloride solutions at pH 4.20. This voltage was varied between 10 and 200 V (10, 20, 45, 50, 70, 100, 150 and 200 V). Along with voltages, the desolvation temperature (200-300 °C) and gas flow (300-450  $\text{L h}^{-1}$ ) were varied. The optimum area and clean baseline were obtained at cone voltages of 45-50 V, even for low intensity signals. The optimum desolvation temperature was set at 200 °C since higher temperatures produced a high number of low intensity signals. When the cone voltage was raised to 150 V, the signals of  $m/z$  higher than 300 became more intense and the observable spectral area extended toward higher  $m/z$  values. At the same time, the background noise increased and low intensity signals became indistinguishable from the background. A sample cone voltage of 200 V increased the noise and the amount of overlapping signals in the cationic spectra. The final optimal conditions are listed in Table 1. Some of the obtained ESI-MS spectra at different cone voltages are shown in Figure 1.

**Table 1.** Optimal instrumental conditions for ESI-MS measurements

Parameters	
Sample flow rate	10 $\mu\text{L min}^{-1}$
Capillary voltage	3.5 kV
Sample cone voltage	50 V
Extractor voltage	3 V
R.f. lens	5 V
Source temperature	125 °C
Desolvation temperature	200 °C
Mass range	$m/z$ 40-1000
Resolution	2000
Cone gas flow rate	50 $\text{L h}^{-1}$
Desolvation gas flow rate	450 $\text{L h}^{-1}$

The composition of the solvent also influences the appearance of the spectra. The spectra were recorded using water or water/methanol as solvents (pH 4.20). The most distinctive feature of the spectra was seen at  $m/z$  61 and was assigned to the dihydroxo complex,  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ . In the spectrum recorded using a water/ammonium formate to methanol rate of 90:10 (v/v %), this signal disappears, indicating that the lowering of the solvent dielectric constant and surface tension is unfavorable for polyol formation.

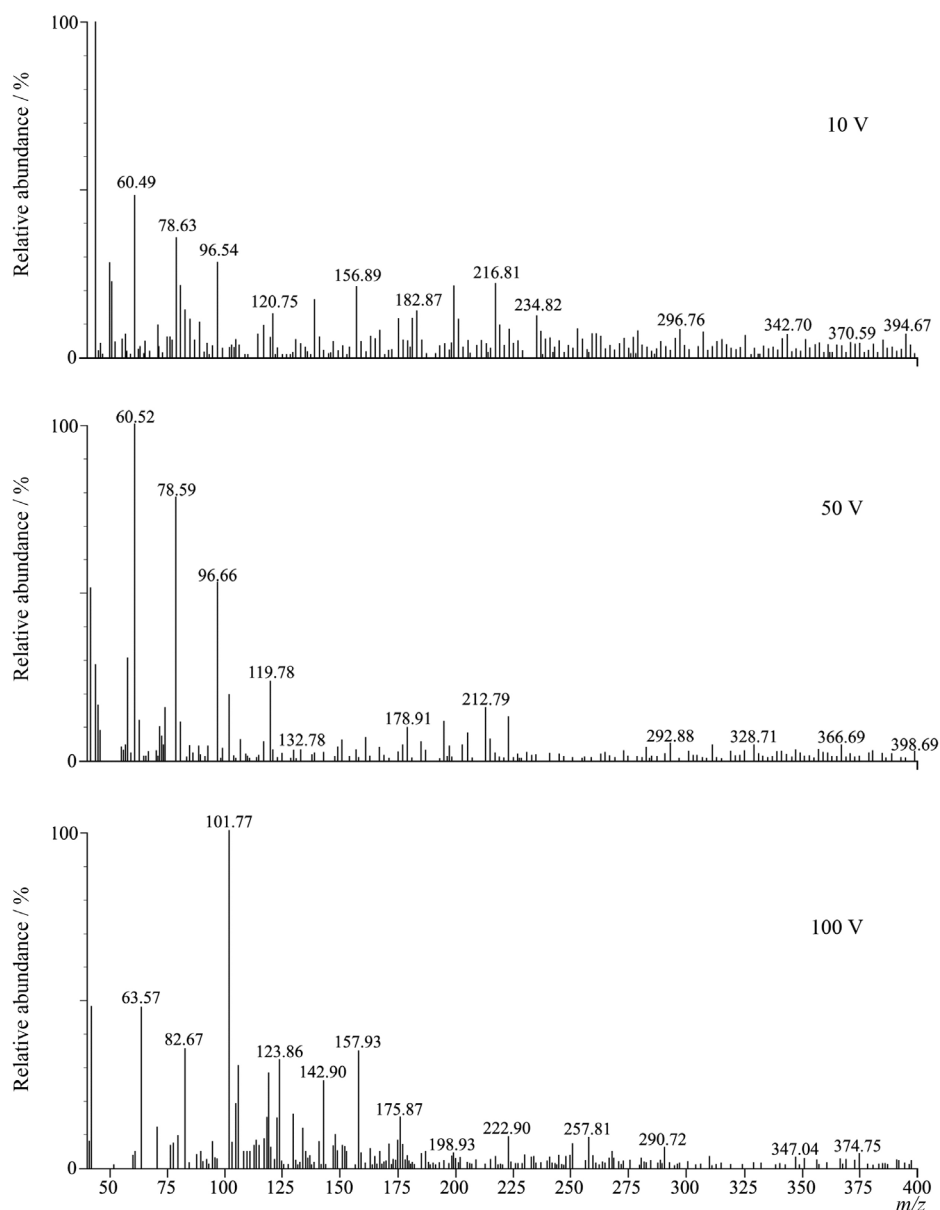
In order to study the speciation of  $\text{Al}^{3+}$  hydrolytic complexes, the ESI-MS spectra were recorded at different pH values (3.20 to 6.20) and at a constant aluminum concentration of  $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  under the optimal operational conditions. Clear solutions were observed up to pH 5.00; at this pH value, the solutions were stable for a prolonged period of time up to two days (*i.e.*, no turbidity or precipitation was observed). At higher pH values, the solutions stayed clear for 2-3 h after the addition of base, and then a gradual turbidity developed. Most of the ESI-MS signals in solutions of pH between 5.50 to 6.20 disappeared. A representative spectrum at pH 3.59 is shown in Figure 2 and the identified species are given in Table 2.

The majority of the species identified in ESI-MS spectra were singly charged. Since the  $\text{Al}^{3+}$  aqua ion is present in all solutions, the formation of mononuclear Al-OH species may proceed in the gas phase, through charge reduction during the dehydration process:



ESI-MS spectra of hydrolyzed aluminum solutions were also indicative of the presence of various polynuclear hydrolytic complexes containing  $\text{Al}_2$ - $\text{Al}_7$  cores. The singly charged complexes predominate. Each complex ion was identified by its  $m/z$  value, though different complexes containing  $(\text{OH})_2^{2-}$  and  $\text{O}(\text{OH})^{2-}$  groups may correspond to identical  $m/z$  values. When chloride ions were coordinated to Al, then the chlorine isotopic distribution was employed for identification of the Al-complexes. The  $[\text{AlCl}_3 + \text{H}^+]$  and  $[\text{AlCl}_2]^+$  signals were seen at  $m/z$  133 and 97, respectively. These species are not characteristic of the solutions and have probably been formed during the nebulization process. Intensive signals in the  $m/z$  60-100 region were assigned to binary mononuclear hydroxo complexes, *i.e.*,  $[\text{Al}(\text{OH})]^{2+}$  and  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ . These complexes are characteristic of low concentration, hydrolyzed Al solutions and form rapidly and reversibly.<sup>1-8</sup> The  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$  species may contain up to two water molecules in the coordination sphere.





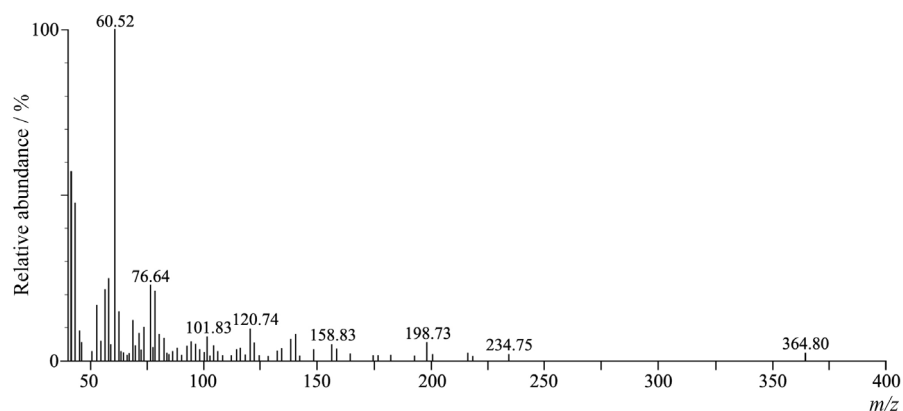
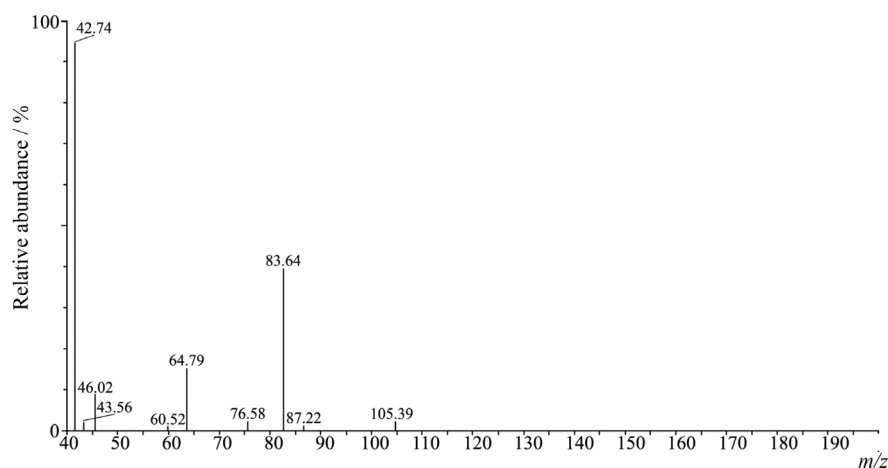
**Figure 1.** ESI-MS spectra of a  $5.0 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{AlCl}_3$  solution, pH 4.20, at various cone voltages.

Some polymeric species appear as hydrated or chloro species whose charge was always found to be +1. This leads to the conclusion that these species may contain, in their structures, bridging oxo or hydroxo groups. Other polymeric species containing the  $\text{Al}_3$ ,  $\text{Al}_4$ ,  $\text{Al}_5$  and  $\text{Al}_7$  cores were much less abundant at micromolar aluminum concentrations. The  $\text{Al}_3$  and  $\text{Al}_4$  polymers contain chloride, which reduces their charge and perhaps promotes polymerization. Chloro complexes may form metastable ion pairs from positively charged  $\text{Al-OH}$  species and chloride anions during the ESI nebulization. These complexes may be stable enough to be detected by quadrupole mass analyzer, *i.e.*, the complexes do not dissociate during the time needed to reach the detector (*ca.* 100  $\mu\text{s}$ ). Water

molecules are coordinated to central aluminum in many hydrolytic polymers; up to five water molecules were found. These complexes are only partially hydrolyzed, and further deprotonation of coordinated water molecules may appear at higher pH values as a competitive process to prevent further polymerization. However, a different hydrolytic scheme is seen in aged aluminum solutions (Figure 3). The spectrum shows only a few signals which were assigned to  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ ,  $[\text{Al}_6(\text{OH})_{13}]^{5+}$  and  $[\text{Al}_4(\text{OH})_9]^{3+}$ . The most intense peak was given by the aqua aluminum ion; this is understandable because of the relatively low pH of the solution. Other intense signals belong to tetrameric and hexameric species, indicating that, even at mildly acidic pH, the polymerization proceeds to a significant degree. Upon

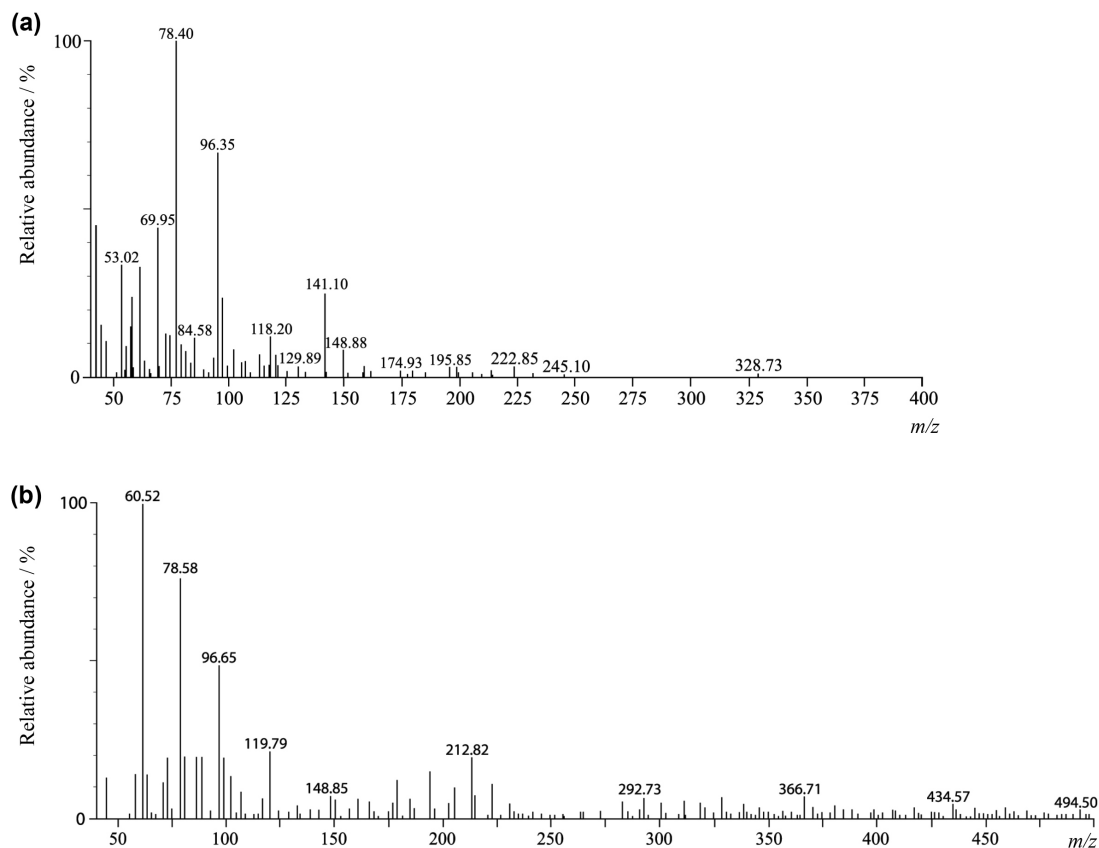
**Table 2.** Identified species in  $2.7 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> solutions of AlCl<sub>3</sub> at different pH values

Observed <i>m/z</i>	Identified species	pH	Importance
57	[Al(H <sub>2</sub> O) <sub>8</sub> ] <sup>3+</sup>	3.59-4.81	
61	[Al(OH) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
70	[Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> Cl] <sup>2+</sup>	3.19-4.81	chloro species
79	[Al(OH)Cl] <sup>+</sup> and/or [Al(OH) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] <sup>+</sup>	3.19-4.81	chloro species
97	[Al(OH) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
103	[Al <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (OH)] <sup>+</sup>	3.59	
121	[Al <sub>2</sub> O(OH) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
123	[Al <sub>2</sub> (OH) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O)] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
133	[Al(OH) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
157	[Al <sub>2</sub> O(OH) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	
175	[Al <sub>2</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>+</sup> and/or [Al <sub>2</sub> O(OH) <sub>2</sub> Cl(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-3.59	chloro species
217	[Al <sub>3</sub> O(OH) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O)] <sup>+</sup>	3.59-4.81	oligomer
235	[Al <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>+</sup>	3.59	
253	[Al <sub>3</sub> O(OH) <sub>5</sub> Cl(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.19-4.81	chloro species
277	[Al <sub>4</sub> O(OH) <sub>9</sub> ] <sup>+</sup>	3.59-4.81	polynuclear

**Figure 2.** ESI-MS spectra of a  $2.7 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> AlCl<sub>3</sub> solution, pH 3.59, cone voltage 50 V, taken in water as the mobile phase.**Figure 3.** ESI-MS spectrum of a 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> AlCl<sub>3</sub> solution at pH 3.30, aged for one month.

further pH increase, the intensity of the aqua aluminum ion signal decreases sharply, and new signals appear that can be assigned to species with Al<sub>7</sub> to Al<sub>12</sub> cores. At pH between

5.0 and 6.0 most signals disappear from the spectra and only lighter polymer cores (Al<sub>2</sub> and Al<sub>3</sub>) were detected in solution before precipitation took place.



**Figure 4.** (a) ESI-MS spectrum of a  $1.0 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{AlCl}_3$  solution, pH 4.35, sample cone voltage of 50 V. (b) ESI-MS spectrum of  $1.0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{AlCl}_3$  solution, pH 4.23, 50 V.

The effect of various aluminum concentrations on the MS spectra was investigated at pH 4.20, and aluminum concentrations were varied between  $0.1 \times 10^{-3}$  and  $1.0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  with one day of aging time. The representative spectra are shown in Figures 4a and 4b. The identified species are shown in Table 3.

For aluminum concentrations in the millimolar range, higher polymers containing  $\text{Al}_8$ - $\text{Al}_{13}$  cores were observed. The single-charge complexes were observed for  $\text{Al}_1$  to  $\text{Al}_4$ , as well as for  $\text{Al}_7$  cores. The +2 and +3 charges were found for  $\text{Al}_8$ - $\text{Al}_{13}$  cores.

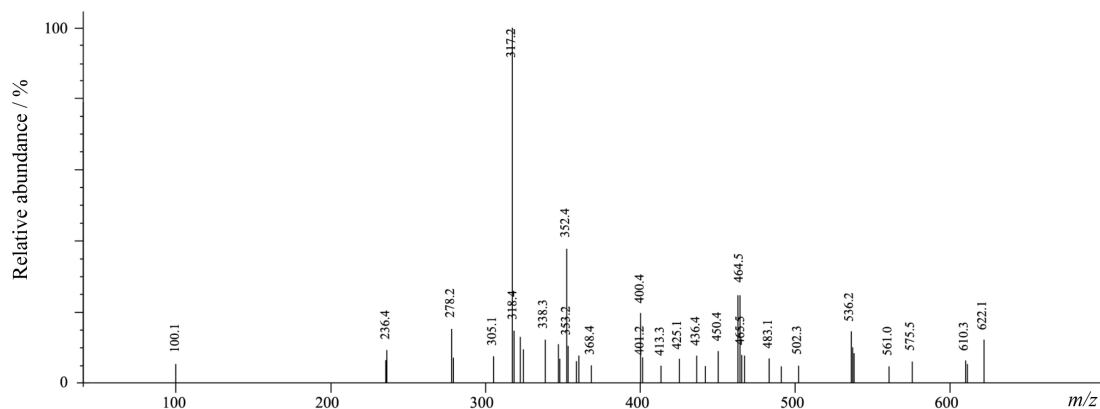
We have also examined the spectra of solutions in which the total concentration of aluminum ion was  $5.0$  mmol  $\text{dm}^{-3}$  at pH 4.05 with relatively high concentration of chloride ion (total chloride =  $150$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ). A representative spectrum is given in Figure 5.

The whole process is clearly composed of two stages. In the first stage the lighter charged particles reach the detector. In the second stage heavier, larger polymers form in the droplets by clustering of oligomers with sodium and chloride ions and possibly water molecules. The transfer of these clusters into the gas phase is inefficient so low intensity signals are produced. It is seen that the majority of complexes contain chloride either as a coordinated ion or

as a counter ion. No attempt to identify these polymers was made. Single-charged species prevail at higher pH values

**Table 3.** Identified species in  $\text{AlCl}_3$  solutions with aluminum concentrations from  $0.1 \times 10^{-3}$  to  $1.0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  at pH 4.20

Observed $m/z$	Species	Concentration of solution (mol $\text{dm}^{-3}$ )
61	$[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
70	$[\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]^{2+}$	$1 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$
79	$[\text{Al}(\text{OH})\text{Cl}]^+$ and/or $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
97	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
133	$[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
175	$[\text{Al}_2\text{H}_9\text{O}_7]^+$ and/or $[\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
193	$[\text{Al}_7\text{O}_6(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and/or $[\text{Al}_2\text{O}(\text{OH})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ and/or $[\text{Al}_2(\text{OH})_4\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	$1 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
199	$[\text{Al}_3\text{O}(\text{OH})_6]^+$	$1 \times 10^{-4}$
213	$[\text{Al}_{13}\text{O}_{18}]^{3+}$	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
247	$[\text{Al}_5\text{O}_7]^+$	$5 \times 10^{-4}$
253	$[\text{Al}_3\text{O}(\text{OH})_3\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	$5 \times 10^{-4}$
375	$[\text{Al}_3\text{O}_4(\text{OH})_2\text{Cl}_4]^{2+}$	$5 \times 10^{-4};$
494	$[\text{Al}_7\text{O}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	$5 \times 10^{-4}; 1 \times 10^{-3}$



**Figure 5.** ESI-MS spectra of an aluminum chloride solution ( $C_{\text{Al}} = 5.0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{Cl}^-} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH 4.05).

(> 4.8). The most intense signals in the whole pH range investigated could be attributed to  $\text{Al}_2\text{-Al}_6$  cores.

## Discussion

From the general inspection of Tables 2 and 3, it may be seen that the species found in our work are consistent with earlier literature reports,<sup>48-54</sup> although some of the signals in the recorded mass spectra could not be assigned. The main problems encountered in the interpretation of the ESI-MS spectra are perturbations that occur in the droplets. Three kinds of perturbations may occur in the ESI-MS ion source: in solution, at the liquid-gas interface and in the gas phase. These perturbations may be linked to the formation of hydrolytic polymers in the droplets, different transfer efficiencies from the droplets to the gas phase for different complexes (according to their charge to radius ratio and surface activity), and subsequent partial thermal decomposition of the polymers.<sup>53</sup>

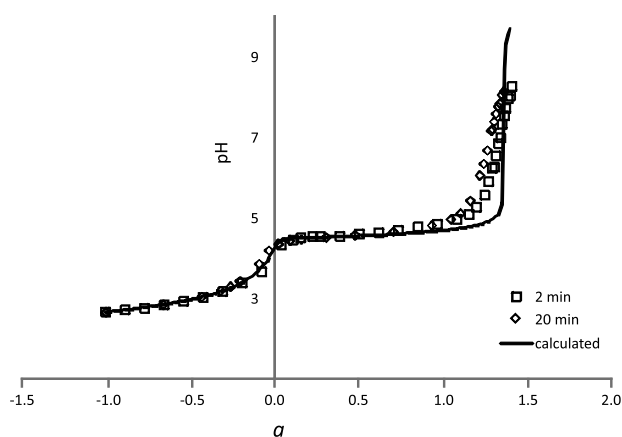
Perturbations in solution occur in the droplets during their evaporation. Evaporation of droplets changes the concentration of dissolved species and consequently causes equilibrium shifts due to pH, concentration, temperature and ionic strength changes. Perturbations at the liquid-gas interface depend upon the radius of the droplets and the surface activity of the ions. These parameters influence the efficiency with which different species are transferred from the droplets to the gas phase and therefore change their concentration. Perturbations in the gas phase are fragmentations or other thermally induced reactions taking place after the transfer of the ions to the gas phase and before their detection. The formation of polymeric hydrolytic complexes can occur as a result of perturbations in the droplets when  $\text{Al}^{3+}$  solutions are electrosprayed. Whether the formation of polymeric hydrolytic species is the result of true equilibrium in solution or perturbations in ESI-MS source, it can be judged by comparison of the

results obtained by different methods and by tuning the instrumental parameters of ESI-MS.

In ESI-MS the aluminum chloride signal is found at  $m/z$  133. It disappears in solutions in which the pH is higher than 4.50 and this result is consistent with  $^{27}\text{Al}$  NMR spectra. These spectra were taken at different pHs in the range of 3.30 to 6.50. The aqua aluminum ion signal is assigned to 0 ppm. The small peak at 0.34 ppm seen in the pH range of 3-5 was attributed to the mono-hydrolyzed species,  $\text{Al}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$  formed in the first step of the hydrolysis,<sup>56</sup> while the broad, small intensity peaks at 4.5 ppm that appear at pH > 4.0 were attributed to low molecular weight species,  $\text{Al}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_8^{4+}$  and  $\text{Al}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_9^{5+}$ .<sup>56</sup> In theory,<sup>57,58</sup> it is possible to find signals from monomers up to 9 ppm. However, in this work, signals with S/N ratio higher than 3 were not found in this region. Higher hydrolytic polymers produced very broad peaks, seen as an increase in the area between 10 and 40 ppm upon increasing pH. Since these peaks are overlapped and immersed into the background, their analysis by NMR spectroscopy is difficult. Tridecameric or polymeric species containing thirteen aluminum ions,  $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ , were identified at 62.5 ppm.<sup>59,60</sup> This polymer begins to form at pH *ca.* 4 and the signal is at the maximum intensity at pH *ca.* 5.5. Upon further increase in pH, the signal suddenly disappears at pH *ca.* 6.0 and no NMR evidence is found for the formation of lighter polymers. After a short period of aging, turbidity and flocculation take place in the system. However, ESI-MS indicates the formation of  $\text{Al}_3\text{-Al}_8$  polymers in this pH range, which may suggest that the Keggin polymer first transforms to lighter polymers before precipitation. The tridecamer contains a tetrahedral aluminum surrounded by twelve octahedral aluminums all bound to each other through oxygen. The tetrahedral aluminum gives a distinct sharp peak at 62.5 ppm<sup>59,60</sup> relative to the monomeric  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ . The other twelve aluminums in the tridecamer as well as other large

amorphous polymeric aluminum species produce a very broad peak around 40 ppm that is not easily integrated because it is not clearly defined. However, the integration between *ca.* 40 to 80 ppm shows that the area increased up to 10% upon rising the pH from 5.0 to 6.0.

Potentiometric titrations were carried out with two different protocols of base addition: in one titration set, each new portion of the base was added (at the rate of  $0.05 \text{ mL s}^{-1}$ ) five minutes after the potential stabilization, while in the other case the addition of the base was initiated 20 min after the potential stabilization, at the same rate. Further sets of titrations were made in such a way that, at some definite value of pH, the addition of the base was stopped until the potential readings taken over a prolonged period of time showed relative standard deviation less than 3%. Titration curves showed pronounced hysteresis in the region in which the titration parameter (*a*) ranged between 1.0 and 1.5 (Figure 6). Up to *a* close to 0.2, the solutions remained clear even for a prolonged period of time. Titration curves obtained under different kinetic conditions coincided up to *a* values close to 0.2 (Figure 6). With higher values of *a*, relatively fast addition of the base did not produce visible changes in the solutions and the potentials remained steady. However, leaving such solutions for one or more hours without the addition of the base, unsteady potentials (relative standard deviation in potential readings > 5%) with slight opacity were produced. Further increase of the titration parameter led to the formation of microcolloids and, at *a* close to 1, a permanent precipitate was formed. Thus, the broad region of the titration curves involving the *plateau* and the steep rise of pH (Figure 6) corresponds to a meta-stable state with the main step attributable to the formation of soluble  $\text{Al}(\text{OH})_{3(\text{aq})}$ . These species subsequently form a supersaturated solution, and when the number of nucleation centers reaches a critical



**Figure 6.** Titration curves of  $\text{AlCl}_3$  solutions with two different titration protocols. The solid line denotes the titration curve calculated with the data given in Table 4.

value, it begins to condense by forming polymeric rings, and precipitates. Attempts to fit these titration curves with sets of complexes taken from databases (Table 4), gave an excellent fit up to *Z* (hydroxyl to aluminum ratio) close to 1.0. At higher values of *Z*, the calculated curve goes closer to the experimental curve obtained with slow base addition.

**Table 4.** Literature data on aluminum hydrolytic complexes<sup>61-63</sup>

Species	$\log \beta$
$\text{AlH}_{-1}$	-5.5
$\text{AlH}_{-2}$	-11.3
$\text{AlH}_{-3(\text{aq})}$	-16.3
$\text{AlH}_{-4}$	-6.96
$\text{AlH}_{-5}$	-43.1
$\text{Al}_2\text{H}_{-2}$	-7.7
$\text{Al}_3\text{H}_{-4}$	-13.9
$\text{Al}_3\text{H}_{-11}$	-63.0
$\text{Al}_6\text{H}_{-15}$	-60.7
$\text{Al}_8\text{H}_{-22}$	-93.0
$\text{Al}_{13}\text{H}_{-22}$	-106.1
$\text{AlH}_{-3(\text{s})}$	-10.3

Differences between ESI and potentiometric speciation are observed for species which are detected by ESI with different number of acidic protons, that is, with different charges. The data available in the literature<sup>64,65</sup> showed the key role of the radius (*r*) of the droplets in determining the relative intensity of the ESI-MS ions. The radius can affect directly the effectiveness by which the ions are transferred to gas phase. Solution perturbations can be increased by larger droplets. Since the passage of the ions to the gas phase is delayed, this gives the reactions in the droplets more time to occur. At the same time, larger *r* values increase the gas phase concentration of surface active complexes and decrease that of surface inactive complexes.

Comparing ESI-MS, NMR and potentiometric data, it can be concluded that the best agreement was obtained with low molecular mass hydrolytic species. This probably results from the fact that, in polymerized aluminum solutions, the density and viscosity of the solution increase with consequent increase of the surface tension of the droplet. Thus, higher energies are needed to pinch out the higher molecular weight species from the droplet.

## Conclusion

The ESI-MS technique was successfully applied in the study of aluminum hydrolysis in chloride-containing

aqueous medium. Low molecular weight hydrolytic species with +1 and +2 charge prevail in solution in the pH range 3-6 and at mild ESI conditions. Higher polymers,  $Al_5$  to  $Al_{13}$ , are transient species seen at pH values higher than 4.5 and shortly after preparing the solution. Aging of solutions with pH values up to 6 did not produce polymers higher than  $Al_{13}$ . Most polymeric species contain chlorides bound directly to aluminum ions.

## Acknowledgement

The financial aid from the Ministry of Education and Science of Serbia under the project grant 172016 is gratefully acknowledged.

## References

1. Baes, C. F.; Mesmer, R. E.; *The Hydrolysis of Cations*; John Wiley & Sons: New York, 1976.
2. Nazarenko, V. A.; Antonovich, V. P.; Nevskaya, E. M.; *Gidroliz Ionov Metallov v Razbavlennykh Rastvorakh*; Atomizdat: Moscow, 1979.
3. Hayden, P. L.; Rubin, A. J. In *Aqueous Environmental Chemistry of Metals*; Rubin, A. J., ed.; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, 1974.
4. Orvig, C. In *Coordination Chemistry of Aluminum*; Robinson, G. H., ed.; VCH Publishers: New York, 1993, p. 85.
5. Nordstrom, D. K.; May, H. M. In *The Environmental Chemistry of Aluminum*; Sposito, G., ed.; CRC Press, Inc. Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1996, p. 39.
6. Öhman, L.-O.; Sjöberg, S.; *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *149*, 33.
7. Wesolowski, D. J.; Palmer, D. A.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, *58*, 2947.
8. Palmer, D. A.; Wesolowski, D. J.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57*, 2929.
9. Akitt, J. W.; Elders, J. M.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1986**, 10.
10. Bertsch, P. M.; Parker, D. R. In *The Environmental Chemistry of Aluminum*; Sposito, G., ed.; CRC Press, Inc. Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1996, p. 117.
11. Brosset, C.; Biedermann, G.; Sillén, L. G.; *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 1917.
12. Brown, P. L.; Sylva, R. N.; Batley, G. E.; Ellis, J.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1967.
13. Martell, A. E.; Hancock, R. D.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J.; *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *149*, 311.
14. Browne, B. A.; Driscoll, C. T.; *Science* **1992**, *256*, 1667.
15. Frippiate, J. J.; Van Cauwelaert, F.; Bosmans, H.; *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 2458.
16. Akitt, J. W.; Elders, J. M.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 1347.
17. Matijević, E.; Stryker, L. J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *22*, 68.
18. Shen, Y.-H.; Dempsey, B. A.; *Environ. Int.* **1998**, *24*, 899.
19. Parks, G. A.; *Am. Mineral.* **1972**, *57*, 1163.
20. Aveston, J.; *J. Chem. Soc.* **1965**, 4438.
21. Matijević, E.; Težak, B.; *J. Phys. Chem.* **1953**, *57*, 951.
22. Matijević, E.; Mathai, K. G.; Ottewill, R. H.; Kerker, M.; *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 826.
23. Bottero, J. Y.; Tchoubar, D.; Cases, J. M.; Flessinger, F.; *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3667.
24. Seichter, W.; Mögel, H.-J.; Brand, P.; Salah, D.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 1998, 795.
25. Milic, N. B.; Bugarcic, Z. D.; Djurdjevic, P. T.; *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 28.
26. Bottero, J. Y.; Cases, J. M.; Fiessinger, F.; Poirier, J. E.; *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 2933.
27. Hayden, P. L.; Rubin, A. J. In *Aqueous-Environmental Chemistry of Metals*; Rubin, A. J., ed.; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, 1976, p. 317.
28. Sillén, L. G.; *Q. Rev. Chem. Soc.* **1959**, *13*, 146.
29. Turner, R. C.; Ross, G. J.; *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 723.
30. Turner, R. C.; *Can. J. Chem.*, **1976**, *54*, 1910.
31. Parker, W. O.; Millini, R.; Kiricsi, I.; *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 571.
32. Stumm, W.; Morgan, J. J.; *Aquatic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; John Wiley & Sons: New York, 1981.
33. Akitt, J. W.; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1989**, *21*, 1.
34. Akitt, J. W.; Greenwood, N. N.; Khandelwal, B. L.; Lester, G. D.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1972**, 604.
35. Akitt, J. W.; Farthing, A.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1981**, 1606.
36. Bi, S.; Wang, C.; Cao, Q.; Zhang, C.; *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 441.
37. Keggin, J. F.; *Nature* **1933**, *131*, 908.
38. Keggin, J. F.; *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1934**, *144*, 75.
39. Baker, L. C. W.; Figgis, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3794.
40. Allouche, L.; Gérardin, C.; Loiseau, T.; Férey, G.; Taulelle, F.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 511.
41. Johansson, G.; *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 771.
42. Casey, W. H.; Rustad, J. R.; *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* **2007**, *35*, 21.
43. Fu, G.; Nazar, L. F.; Bain, A. D.; *Chem. Mater.* **1991**, *3*, 602.
44. Wang, M.; Muhammed, M.; *Nanostruct. Mater.* **1999**, *11*, 1219.
45. Shi, B.; Li, G.; Wang, D.; Tang, H.; *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *54*, 88.
46. Bradley, S. M.; Kydd, R. A.; Fyfe, C. A.; *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1181.
47. Casey, W. H.; Phillips, B. L.; Karlsson, M.; Nordin, S.; Nordin, J. P.; Sullivan, D. J.; Neugebauer-Gawford, S.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 2951.
48. Urabe, T.; Tsugoshi, T.; Tanaka, M.; *J. Mol. Liq.* **2008**, *143*, 70.

49. Urabe, T.; Tanaka, M.; Kumakura, S.; Tsugoshi, T.; *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 591.
50. Zhao, H.; Liu, H.; Qu, J.; *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *330*, 105.
51. Sarpola, A.; Hietapelto, V.; Jalonen, J.; Jokela, J.; Laitinen, R. S.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 423.
52. Sarpola, A.; Hellman, H.; Hietapelto, V.; Jalonen, J.; Jokela, J.; Rämö, J.; Saukkoriipi, J.; *Polyhedron* **2007**, *26*, 2851.
53. Sarpola, A.; *The Hydrolysis of Aluminum, a Mass Spectrometric Study*, Ph.D. Thesis, University of Oulu, Finland, *Acta Univ. Oul.* **2007**, C 279, 1.
54. Sarpola, A.; Hietapelto, V.; Jalonen, J.; Jokela, J.; Laitinen, R. S.; Rämö, J.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1209.
55. Deng, H.; Van Berkel, G. J.; *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1080.
56. Perry, C. C.; Shafran, K. L.; *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *87*, 115.
57. Tossell, J. A.; *J. Magn. Reson.* **1998**, *135*, 203.
58. Kubicki, J. D.; Sykes, D.; Apitz, S. E.; *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 903.
59. Klopogge, J. T.; Seykens, D.; Geus J. W.; Jansen, J. B. H.; *J. Non-Cryst. Solids* **1992**, *142*, 87.
60. Casey, W. H.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1.
61. Pettit, L.; Powell, J. K.; *Stability Constant Database and Mini-SCDatabase*, version 5.8.; IUPAC and Academic Software: Otley, UK, 2008.
62. Smith, R. M.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; *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.
63. May, P. M.; Rowland, D.; Murray, K.; *JESS-Joint Expert Speciation System*, version 6.4; Murdoch University: Perth, Australia, 2005.
64. Di Marco, V. B.; Ravene, L.; Dean, A.; Traldi, P.; *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 868.
65. Di Marco, V. B.; Bombi, G. G.; Zambon, S.; *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 120.

Submitted: October 24, 2011

Published online: May 15, 2012





## Uticao površinski aktivnih materija na adsorpciju ofloksacina na $\gamma$ -aluminijum oksidu

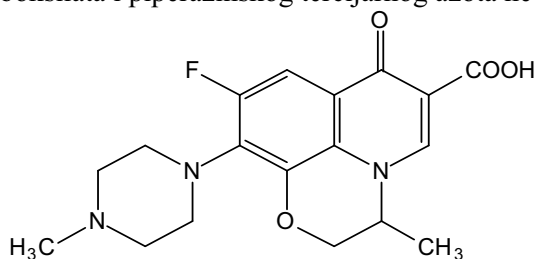
Milena J. Stankov, Ivan Lazarević\*, Predrag Đurđević\*\*

*Farmaceutski fakultet, 11000 Beograd,*

*\*ABHO Školski centar, 37000 Kruševac*

*\*\*Prirodno-matematički fakultet, 34000 Kragujevac*

Ofloksacin (9-fluoro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-2,3-dihidro-7H-pirido(1,2,3-de)1,4-benzoksazin-6-karboksilna kiselina (šema 1) je fluorisani 4-hinolonski antibiotik koji se koristi u lečenju respiratornih i urinarnih infekcija. Iz njegove formule se vidi da pripada grupi heterocikličnih amino kiselina pa u rastvoru može postojati u obliku katjona, dipolarnog jona, neutralnog molekula i anjona. Neutralni oblik (šema 1) postoji, za razliku od prirodnih amino kiselina, u rastvoru i relativno širokoj pH oblasti imajući u vidu da se konstante protonovanja karboksilata i piperazinskog tercijarnog azota ne razlikuju mnogo.



Šema 1. Formula ofloksacina

Klinička ispitivanja pokazuju da paralelno uzimanje ofloksacina i antacida na bazi aluminijuma dovodi do smanjenja koncentracije ofloksacina u krvi što je takođe praćeno smanjenjem PIK-a (površina ispod krive „koncentracija – vreme“). To dovodi do smanjenja bio-raspoloživosti ofloksacina i to za oko 30%. Moguće objašnjenje ovog efekta je kompleksiranje ofloksacina i jona aluminijuma i/ili adsorpcija ofloksacina na površini antacida – aluminijum hidroksida ili aluminijum fosfata. Obe interakcije mogu dovesti do povećanja koncentracije rastvornog aluminijuma, a samim tim i do njegovih toksičnih efekata. Ofloksacin može pomeriti ravnotežu:  $Al(OH)_3 + 3 H^+ \rightleftharpoons Al^{3+} + 3 H_2O$  na desno, vezivanjem tragova aluminijum jona nastalih disocijacijom slabo rastvornog jedinjenja (hidroksida ili fosfata). Na taj način oslobođeni joni aluminijuma mogu stupiti u interakcije sa drugim supstancama prisutnim u gastrointestinalnom traktu ili u serumu pa ako se tom prilikom nagrade električno neutralni kompleksi oni lako mogu proći kroz lipidnu barijeru ćelijskih membrana i dovesti do ispoljavanja toksičnih efekata aluminijuma. Površinski aktivne materije (PAM) dovode do solubilizacije ofloksacina i helata aluminijuma i ofloksacina, vezuju vodu prisutnu u koordinacionoj sferi kompleksa i sprečavaju hidrolizu aluminijuma. Na taj način oni dovode do povećane bioraspoloživosti aluminijuma<sup>1</sup>.

Primarni cilj ovog rada je da omogući modeliranje interakcija između ofloksacina i aluminijumskih antacida u kiseloj sredini želudca kao i u baznoj sredini dvanaestopalačnog creva.

### Eksperimentalni deo

Pre upotrebe  $\gamma$ -aluminijum oksid (p.a. Merck) žaren je na 1373 K nekoliko časova a potom hlađen do sobne temperature i eksikatoru koji je sadržavao CaO. Rastvor ofloksacina (p.a. Hoechst, Frankfurt am Main, Nemačka) pripremljen je rastvaranjem odvage ofloksacina u bidestilisanoj vodi (100,0  $\mu$ g/mL). Natrijum dodecilsulfat (SDS) (p.a. Sigma, USA) prečišćen je pranjem sa etrom i alkoholom i osušen u eksikatoru koji je napunjen fosfor-pentoksidom. Cetiltrimetilamonijum-bromid (CTAB) (p.a. Sigma, USA) ispran je etanolom i rekristalisan iz bidestilisane vode. Svi ostali reagensi bili su čistoće p.a proizvodi Merck, Darmstadt, Nemačka. Pripremljena je serija epruveta sa šlifovanim staklenim zatvaračem tako što je oprana u vreloj koncentrovanoj azotnoj kiselini. Potom je odmereno 0,1 g ili 0,2 g (sa tačnošću  $\pm$  0,0001 g)  $Al_2O_3$  u svaku epruvetu. Različite zapremine osnovnog rastvora ofloksacina (0,1 – 2,5 mL) prenete su u svaku epruvetu pomoću Eppendorf mikro pipete. Zatim su epruvete podeljene u tri serije. U prvoj seriji u jednu grupu epruveta dodata je bidestilisana voda, u drugu 0,100 mol/L HCl, a u treću 0,001 mol/L rastvor NaOH do ukupne zapremine rastvora 5,00 mL. Druga serija pripremljena je slično kao i prva s tim da je u svaku epruvetu dodat rastvor SDS-a tako da mu je ukupna koncentracija u epruvetama bila 10,0 ili 12,0 mmol/L. U trećoj seriji u epruvete je dodan rastvor CTAB-a tako da mu je ukupna koncentracija bila 1,0 ili 5,0 mmol/L. Epruvete su zatvorene i učvršćene u termostatoru mućkalicu (298 K). Mućkanje je vršeno 5 časova. Koncentracija ofloksacina određena je spektrofotometrijski na 280 nm. Kalibraciona kriva dobijena je u koncentracionom opsegu ofloksacina od

1 – 50  $\mu\text{g/mL}$ . Nakon merenja koncentracije ofloksacina rastvor iz epruveta je ofiltriran, a čvrsta supstanca preneti na guč i isprana hladnom bidestilovanom vodom. Nakon sušenja preko noći u eksikatoru napunjenom sumpornom kiselinom snimljeni su infracrveni spektri svih taloga u nujolu u oblasti  $4000 - 250 \text{ cm}^{-1}$ . Takođe je snimljen DSC termogram nekih taloga.

### Eksperimentalni rezultati

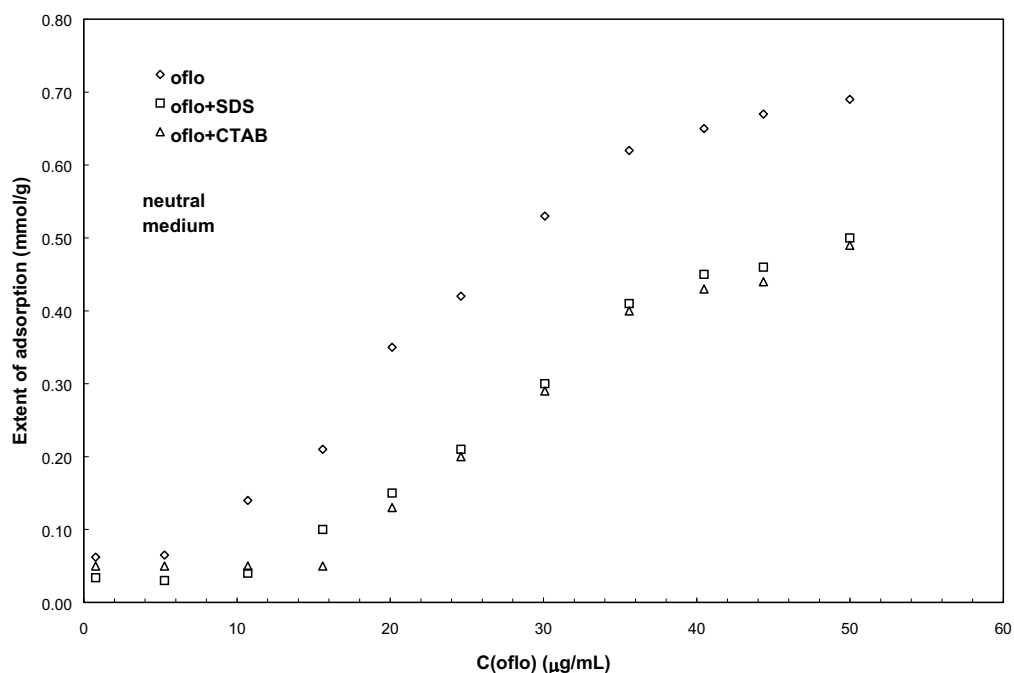
Na slikama 1 i 2 prikazane su dobijene adsorpcione izoterme ofloksacina kao zavisnost obima adsorpcije ofloksacina od analitičke koncentracije ofloksacina u rastvoru.

Vidi se da su sve izoterme Freundlichovog tipa:

$$\frac{n}{m} = kc^{1/x}$$

gde je  $n$  broj molova adsorbovanog ofloksacina,  $m$  masa aluminijum oksida,  $k$  i  $x$  su konstante, a  $c$  je analitička koncentracija ofloksacina.

Kao što se iz slike 1 vidi u neutralnoj sredini (pH od 6,70 do 7,10) obim adsorpcije ofloksacina ( $n/m$  u gornjoj jednačini) znatno je veći bez prisustva PAM dok dodatak bilo SDS-a ili CTAB-a značajno smanjuje adsorpciju pri obe izučavane koncentracije PAM. Taj efekat može se objasniti na sledeći način: adsorbens, aluminijum oksid ima tendenciju da adsorbuje pozitivne jone iz rastvora odnosno, da naelektriše svoju površinu pozitivno. To se postiže adsorpcijom bilo vodoničnog bilo aluminijumovog jona ili oba. Pošto je koncentracija oba jon u neutralnim rastvorima ofloksacina vrlo mala, a ofloksacin je u obliku dipolarnog jona on se svojim pozitivnim krajem adsorbuje na adsorbensu. Međutim, u prisustvu PAM dipolarni ofloksacin se solubilizuje i teži da ostane u rastvoru (SDS), dok se pozitivni CTAB kompetitivno adsorbuje i istiskuje ofloksacin.

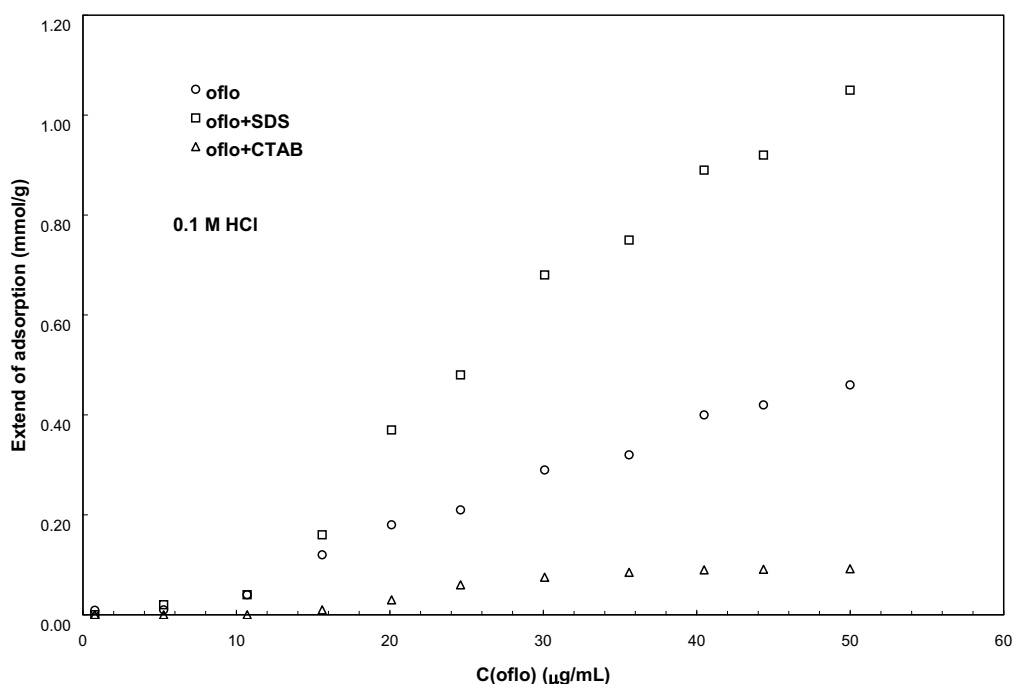


Slika 1. Adsorpcija ofloksacina na aluminijum oksidu pri pH = 6.8

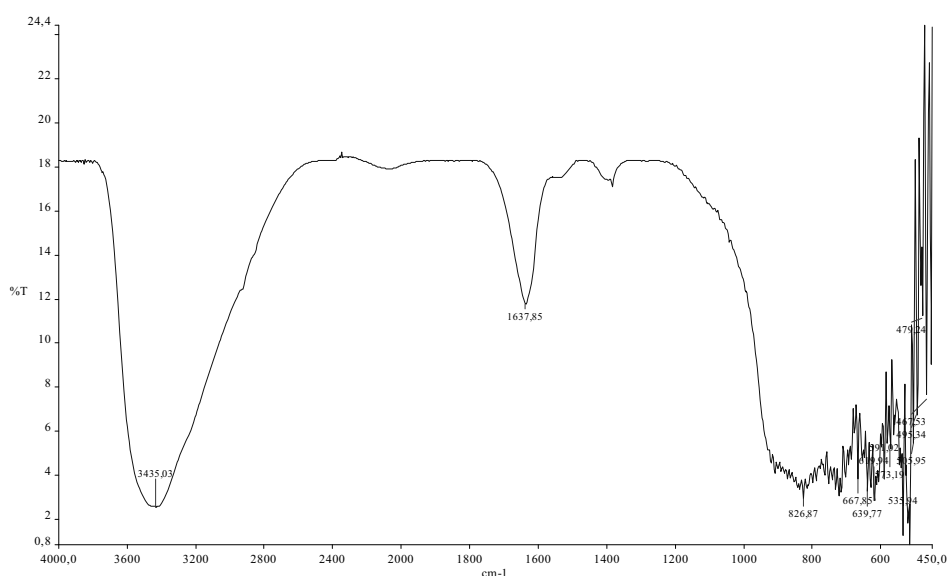
U kiselj sredini adsorpcija je znatno povećana u prisustvu SDS-a (slika 2). U ovom slučaju postoji jaka interakcija između pozitivno naelektrisane površine adsorbensa i negativne sulfo grupe PAM-a. Međutim, takva adsorpcija zahteva reorijentaciju molekula SDS-a sa ekspozicijom hidrofobnog ugljovodoničnog niza ka vodi, što je energetski jako nepovoljno. Da bi se smanjila ova energetska barijera u krajeve ugljovodoničnog niza ugrađuje se ofloksacin katjon i okreće svoj pozitivni kraj (protonovani piperazinski azot) ka vodi. Na taj način u sistemu postoje dve vrste adsorbovanog ofloksacina: jedna koja je neposredno vezana za površinu adsorbensa (kompetitivno sa vodoničnim jonom) i druga koja je vezana u hidrofobnom ugljovodoničnom nizu, budući da je molekul ofloksacina u celini hidrofoban. Pozitivni CTAB kompetitivno sprečava adsorpciju ofloksacina ali ga hidrofobno ne vezuje.

U alkalnoj sredini površina aluminijum oksida naelektrisana je negativno usled adsorpcije hidroksidnog jona iz rastvora. Ofloksacin postoji u rastvoru kao negativno naelektrisani anjon. Dakle, bez prisustva PAM njegova adsorpcija biće smanjena u odnosu na neutralnu sredinu, zbog kompeticije sa hidroksidnim jonima. U prisustvu CTAB-a može se očekivati da će pozitivni CTAB povećati adsorpciju ofloksacin anjona u odnosu na

adsorpciju iz alkalne sredine bez PAM-a, jer se svojom pozitivnom cetiltrimetilamonijum grupom okreće ka površini adsorbensa istovremeno interkalirajući anjone ofloksacina. U prisustvu SDS-a adsorpcija je smanjena zbog odbijanja negativnog kraja SDS-a i anjona ofloksacina. Infracrveni spektri (slika 3.) ukazuju da se apsorpcija karbonilne grupe koja se u slobodnom ofloksacinu nalazi između  $1670\text{ cm}^{-1}$  i  $1690\text{ cm}^{-1}$  (zavisno od toga da li je u katjonskom ili neutralnom obliku) pomera prilikom adsorpcije na  $1630\text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na jaku interakciju sa adsorbensom, verovatno hemisorpciju. Najveće promene u ic spektrima vide se u oblasti  $3200 - 2100\text{ cm}^{-1}$  gde u adsorbatu iščezava uska traka na  $2150\text{ cm}^{-1}$ , a traka na oko  $3000\text{ cm}^{-1}$  znatno se širi. DSC termogram pokazuje dehidrataciju u obliku širokog pika malog intenziteta do oko  $110^{\circ}\text{C}$ , a zatim se vide dva pika u oblasti do  $220^{\circ}\text{C}$  koji odgovaraju razlaganju ofloksacina, verovatno dekarboksilaciji na oko  $170^{\circ}\text{C}$  i otkidanju piperazina na oko  $210^{\circ}\text{C}$ . Nema bitne razlike u DSC termogramu čistog ofloksacina i adsorbata. Model kojim se može objasniti adsorpcija u baznoj sredini, u prisustvu CTAB-a predstavljen je na slici 4. CTAB je adsorbovan zbog elektrostatičkih interakcija sa negativnom površinom aluminijum oksida<sup>2</sup>. Hidrofobni anjon ofloksacina interkalira se u micele CTAB-a i na taj način omogućava njihovu stabilizaciju jer okreće ka vodi svoje negativno naelektrisane karboksilatne grupe.

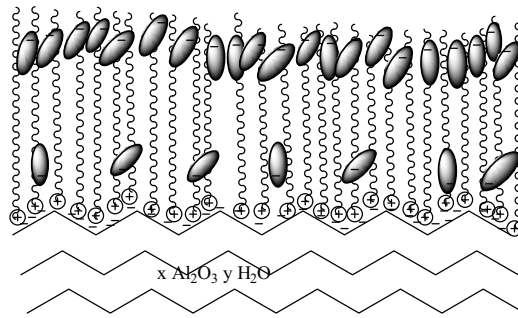


Slika 2. Adsorpcija ofloksacina na aluminijum oksidu u kiseljoj sredini



Slika 3. IC spektri adsorbovanog ofloksacina na aluminijum oksidu

solution 1 mM NaOH



Slika 4. Šematski prikazana adsorpcija ofloksacina u prisustvu CTAB-a

### Zaključak

Površinski aktivne materije znatno utiču na adsorpciju ofloksacina na aluminijum oksidu. Povećanje obima adsorpcije primetno je u kiseljoj sredini u prisustvu SDS-a, dok u baznoj sredini SDS negativno utiče na adsorpciju, odnosno smanjuje je dok je CTAB povećava. Uticaj PAM na adsorpciju može se objasniti hidrofobnim interakcijama PAM-a i ofloksacina čiji je molekul kao celina hidrofoban.

### The effect of surface active substances on ofloxacin adsorption on $\gamma$ -alumina surface

*Surface active substances SDS and CTAB, significantly influence the adsorption of ofloxacin on the surface of aluminum oxide. The effect is pH dependent. Adsorption is of Freundlich type and is higher in neutral media with no presence of surfactants, while in acidic medium it is significantly enhanced in the presence of SDS. CTAB increases the adsorption in alkaline medium while SDS exerts opposite effect. The observed phenomena may be explained by lipophilic interactions between surfactants and ofloxacin. IR spectra and thermograms of adsorbate indicate strong interaction between alumina surface and neutral ofloxacin.*

### Literatura:

1. G. Hoeffken, H. Lode, R. Wiley, T. Glatzel, D. Sievers, T. Olschewski, Rev. Infect. Dis. 10(Suppl. 1), 138 (1988); S. Lober, S. Ziege, M. Rau, G. Schreiber, A. Mignot, P. Koeppe, H. Lode, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, **43** (1999) 1067
2. P. Đurđević, M. Jelikić-Stankov, I. Lazarevic, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **74** (2001) 1261

## P015-B2

### Speciation in Aluminium(III) – Fluoroquinolone Family Members Solutions

A. Ciric<sup>1</sup>, I. Lazarevic<sup>2</sup>, R. Jelic<sup>3</sup>, M. Jelkic-Stankov<sup>4</sup>, P. Djurdjevic<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Faculty of Science, Chemistry Department, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Serbian Armed Forces – CBRN, 37000 Krusevac, Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Kragujevac, S. Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup>Faculty of Pharmacy, Institute of Analytical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

Aluminium can be regarded as detrimental and in particular neurotoxic element. The iatrogenic aluminum originates mainly from aluminum-containing phosphate binders and aluminum-containing antacids administered to uremic patients or those with gastric or duodenal ulcer.

Fluorinated quinolones are chemically weak substituted heterocyclic amino acids which primarily find use in the treatment of urinary and respiratory infections. Clinical investigations have shown that concomitant intake of fluoroquinolones and aluminum-containing compounds (eg. antacids) results in reduced maximal plasma concentration accompanied by the decrease in AUC.

In our previous works we have investigated complex formation equilibria of aluminum with fluoroquinolones norfloxacin, ofloxacin, fleroxacin and moxifloxacin. Composition and stability of complex species were determined.

The objective of this work was to assess the influence of fluoroquinolones, on bioavailability of aluminum through computer-aided speciation calculation.

The calculations were performed with the program Hyss2006 and the model for human plasma was taken from the literature. The main binding species for aluminium in blood are transferrin, albumin, citrate, phosphate and hydroxide. Very low concentration of fluoroquinolones in plasma do not affect the plasma levels of Al-citrate and Al-phosphate. At concentration levels of fluoroquinolones higher than 0.02 mmol/L, the levels of citrate and phosphate complexes begins to decrease and in some time the concentration of Al-fluoroquinolone complexes increases. These complexes are charged and could be excreted by kidneys. Thus in case of toxic levels of aluminum in plasma the fluoroquinolone would be able to partly bind aluminum through chelation.



## Ravnoteže kompleksiranja Gd(III)-jona sa nekim fluorohinolonima

Ivan Ž. Jakovljević, Ivan Lazarević\*, Ljubinka Joksović, Andrija Ćirić, Ratomir Jelić\*\*, Predrag Đurđević

*Prirodno-matematički fakultet, P.fah 60, 34000 Kragujevac, Srbija*

*\*Centar za usavršavanje kadrova ABHO Vojske Srbije, Balkanska 57, 37000 Kruševac, Srbija*

*\*\*Medicinski fakultet, Jovana Cvijića bb., 34000 Kragujevac, Srbija*

### Uvod

Fluorovani hinoloni su antibakterijska sredstva<sup>1-3</sup> koja se koriste kod urinarnih i bubrežnih infekcija, a novije generacije ovih antibiotika i kod respiratornih infekcija. Oni u svojoj strukturi sadrže karbonilnu i karboksilnu grupu u vicinalnom položaju. Stoga su ove supstance potencijalno dobri helatori jona metala. Gadolinijum pripada grupi lantanoida i ima tendenciju da gradi komplekse sa sintetičkim i prirodnim ligandima. Helati gadolinijuma, kao što je Gd-DTPA i Gd-DOTA, imaju široku upotrebu kao kontrastni agensi<sup>4</sup> u magnetnoj rezonanci (MRI) i kompjuterskoj tomografiji (CT). Gd-DTPA helati se preporučuju kao bezbedni neradioaktivni indikatori glomerularne filtracije (GFR) koji mogu biti alternativni metod za određivanje renalnog klirensa u kliničkim studijama. Ovi helati mogu reagovati sa gore navedenim fluorohinolonima pri istovremenom korišćenju ovih supstanci (kod pacijenata koji su već na antibakterijskoj terapiji) ili otpustiti slobodan gadolinijum koji može reagovati sa ligandima iz krvne plazme ili drugim ligandima (npr. lekovima). Sa druge strane fluorohinolonski helati gadolinijuma mogu biti dobri kandidati za nove dijagnostičke agense. Zbog toga, je cilj ovog rada bio da se kvantitativno ispituju ravnoteže u rastvorima navedenih fluorohinolona u prisustvu jona gadolinijuma da bi se bolje razumeo sastav, stabilnost kao i raspodela kompleksa gadolinijuma i fluorohinolona u vodenim rastvorima kao i u humanoj plazmi.

### Rezultati i diskusija

Svi reagensi bili su analitičke čistoće i korišćeni su bez dodatnog procesa prečišćavanja. Bidestilovana voda je korišćena za pripremanje svih rastvora.

Polazni rastvor Gd(III)-jona pripremljen je rastvaranjem Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> p.a., (Merck) u HCl. Dobijeni rastvor je standardizovan kompleksometrijskim titracijama sa EDTA. Višak HCl kiseline je određen potenciometrijski pomoću Granovog dijagrama. Polazni rastvori fluorohinolona su pripremljeni tačnim odmeravanjem standarda supstanci p.a.čistoće (> 99.9%) na analitičkoj vagi. Rastvori drugih koncentracija su dobijeni razblaživanjem osnovnih rastvora fluorohinolona.

Potenciometrijske titracije su izvođene u titracionom sudu sa duplim zidovima koji je termostatan na 298 K. Merenje je vršeno pH-metrom Backman Φ72 sa automatskom biretom Metrohm Dosimat 665 i kombinovanom staklenom elektrodom (Radiometer). Jonska sredina je podešena sa 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl i sve titracije su izvođene u struji azota koji je prethodno propušan kroz rastvore NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i bidestilovanu vodu. Koncentracioni opseg jona metala bio je 0,6 mmol/dm<sup>3</sup> ≤ [Gd(III)] ≤ 3 mmol/dm<sup>3</sup>, a fluorohinolona 1 mmol/dm<sup>3</sup> ≤ [FQ] ≤ 3 mmol/dm<sup>3</sup> pri koncentracionom odnosu T<sub>Gd</sub>:T<sub>L</sub> = 1:1 do 1:5. Vrste kompleksa u ispitivanim sistemima su okarakterisane opštom jednačinom ravnoteže:



a odgovarajuće konstante stabilnosti su date jednačinom:

$$\beta_{p,q,r} = \frac{[\text{Gd}_p\text{H}_q\text{FQ}_r]}{[\text{Gd}]^p [\text{H}]^q [\text{FQ}]^r} \quad (2)$$

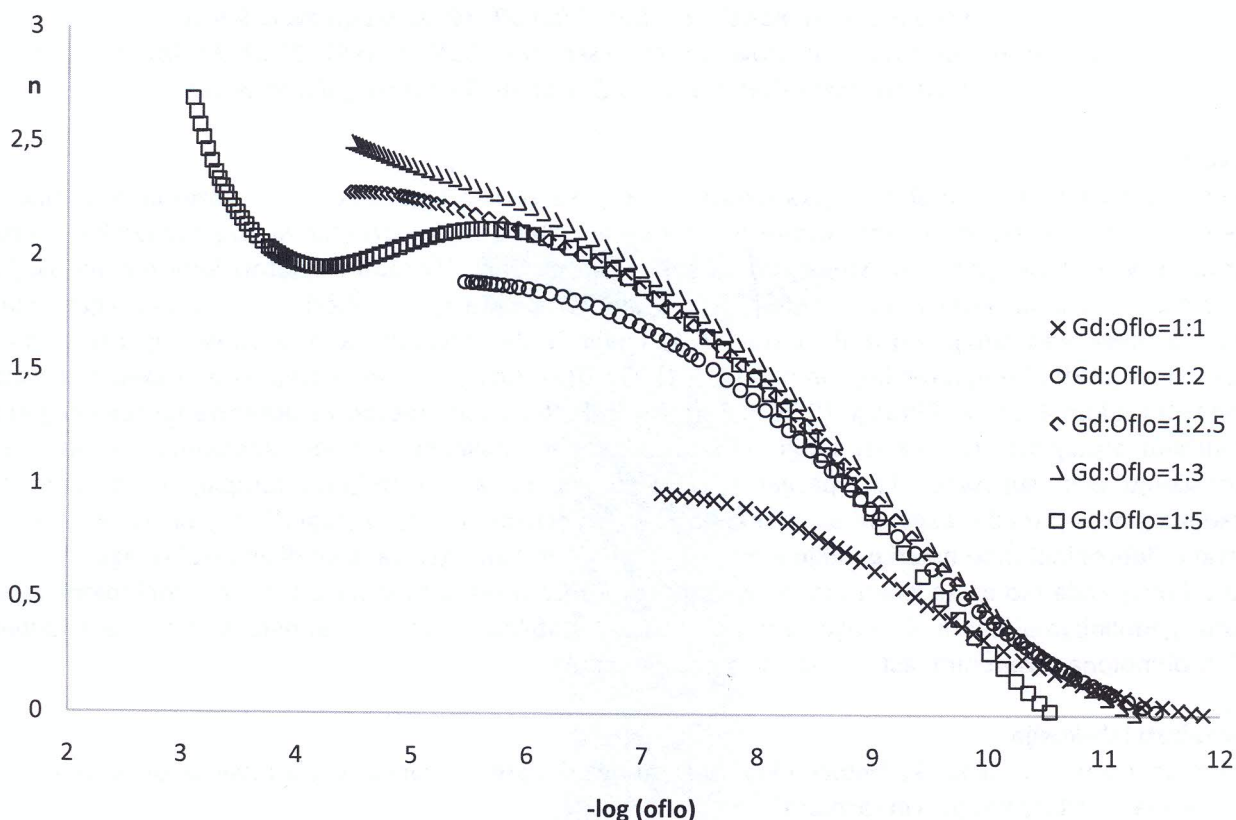
gde FQ označava deprotonovan oblik molekula liganda. Potpuno protonovani oblik molekula liganda obeležen je kao H<sub>2</sub>FQ<sup>+</sup>. Sastav i konstante stabilnosti nagrađenih kompleksa u rastvoru mogu se odrediti na osnovu eksperimentalno određene zavisnosti srednjeg ligandnog broja,  $\bar{n}$ , od negativnog logaritma koncentracije slobodnog liganda (-logL). Srednji ligandi broj se računa prema formuli:

$$\bar{n} = \frac{T_L - [L](1 + \sum_n \beta_{LH_n} [H]^n)}{T_M} \quad (3)$$

gde je slobodna koncentracija liganda jednaka:

$$[L] = \frac{T_M - [H] + [OH]}{\sum_n \beta_{LH_n} [H]^n} \quad (4)$$

gde je  $T_L$ -ukupna koncentracija liganda,  $L$ -koncentracija slobodnog liganda a  $T_M$  –koncentracija jona metala. Eksperimentalno dobijene krive formiranja za Gd-Oflo sistem prikazane su na slici 1.



Slika 1. Krive formiranja u sistemu Gd-Oflo

Na Slici 1 se vidi da se sve krive formiranja poklapaju do vrednosti  $n = 0,5$ . Pri odnosu  $T_M:T_L = 1:1$  kriva ima konstantnu vrednost  $n = 1$  pri  $pL < 8$  što ukazuje na stvaranje samo kompleksa tipa  $ML$ . Ostale krive formiranja, osim krive 1:1, se poklapaju do vrednosti  $\bar{n} = 1,5$  što ukazuje na formiranje kompleksa istih vrsta. Kriva 1:2 ukazuje na stvaranje samo kompleksa tipa  $ML_2$ . Pri  $> 2$  krive se razilaze što ukazuje na stvaranje mešovitih hidrolitičkih kompleksa.

Obrada eksperimentalnih podataka u cilju izračunavanja konstanti stabilnosti formiranih kompleksa je vršena programom Hyperquad<sup>5</sup>2006 na osnovu nalaženja minimalne vrednosti sume kvadrata potencijala:

$$S = \sum w_i (E_{obs} - E_{calc})^2 \quad (5)$$

gde  $w_i$  predstavlja statističku težinu koja se dodeljuje svakoj tački titracione krive, a  $E_{obs}$  i  $E_{calc}$  odnose se na mereni, odnosno izračunati potencijal ćelije za pretpostavljeni model sa odgovarajućim konstantama stabilnosti. Za pronalaženje modela koji daje najbolje podešene eksperimentalne podatke, različiti kompleksi i kombinacije uključeni su u Hyperquad2006 izračunavanja. U svim titracijama su nađeni binarni kompleksi tipa  $ML$ ,  $ML_2$  i  $ML_3$  u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti ( $2,0 \leq pH \leq 9,5$ ). Osim ovih kompleksa nađeni su i mešoviti kompleksi tipa  $MH_qL_p$  gde su  $p$  i  $q$  kod ciprofloksacina,  $(p,q) = (1,1), (2,2), (2,1), (3,3)$ ; kod ofloksacina  $(1,1), (2,2), (2,1), (3,3), (3,2), (3,1)$ , i kod moksifloksacina,  $(p,q) = (1,1), (2,2), (2,1), (3,3), (3,2), (3,1)$ . Negativne vrednosti  $q$  ukazuju na hidrolitičke komplekse. U ispitivanim sistemima polinuklearni komplekski nisu nađeni. Prihvaćeni rezultati izračunavanja prikazani su u Tabeli 1. Takođe su dati i statistički podaci koji određuju kvalitet izračunavanja.



Tabela 1. Konstante stabilnosti Gd(III)-FQ nastalih u 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl jonskoj sredini na 298 K  
SD označava standardnu devijaciju. p-broj jona metala, r-broj jona liganda, q-broj jona H<sup>+</sup> ili OH<sup>-</sup>

Kompleks	log $\beta_{p,q,r} \pm SD$			
	p,q,r	Gd-moxi*	Gd-oflo	Gd-cipro
(0,1,1)		9,34±0,01	8,01±0,01	8,52±0,01
(0,2,1)		15,67±0,01	14,20±0,01	14,68±0,02
(1,-1,0)		7,96±0,01	7,96±0,01	7,96±0,01
(1, 1, 1)		14,72±0,03	13,31±0,02	14,27±0,03
(1,0,1)		/	6,01±0,03	6,70±0,02
(1, 2, 2)		29,65±0,02	26,05±0,01	27,60±0,07
(1, 1, 2)		21,20±0,09	18,14±0,02	19,90±0,02
(1, 0, 2)		14,00±0,03	11,03±0,08	12,77±0,03
(1, 3, 3)		43,98±0,03	37,64±0,04	40,64±0,08
(1, 2, 3)		35,18±0,01	30,71±0,04	/
(1, 1, 3)		27,76±0,03	23,11±0,08	/
(1, 0, 3)		19,00±0,05	15,18±0,08	/
Statistika		$\chi^2=11,82$	$\chi^2=5,38$	$\chi^2=11,21$
		s=1,20	s=1,61	s=1,94

Specijacija u sistemu Gd<sup>3+</sup>-oflo data je na slici 2 u obliku distribucionog dijagrama zavisnosti molske frakcije od pH. Sa slike se vidi da je na pH 5 dominantan kompleks Gd(Hoflo)<sub>2</sub><sup>3+</sup> koji pri povećanju pH protolizuje i u reakciji sa još jednim molekulom liganda daje Gd(oflo)<sub>3</sub>. Ovaj kompleks lako prolazi kroz ćelijsku membranu, budući da je električno neutralan i može dovesti do povećanja toksičnog dejstva Gd<sup>3+</sup>.

Slika 2. Distribicioni dijagram za Gd-Oflo sistem za koncentracioni odnos T<sub>M</sub>:T<sub>L</sub>=1:3

**Zaključak**

Kompleks  $Gd(\text{oflo})_3$  lako prolazi kroz ćelijsku membranu, budući da je električno neutralan i može dovesti do povećanja toksičnog dejstva  $Gd^{3+}$ .

**Complex formation equilibria between Gd(III)-ion and some fluoroquinolones**

*Complex formation between Gd(III)-ion and fluoroquinolones, ciprofloxacin (II generation), ofloxacin (II generation) and moxifloxacin (IV generation) were studied by potentiometric titrations at 298 K in ionic medium NaCl (0.1 mol/dm<sup>3</sup>). In the concentration range 0.6 mmol/dm<sup>3</sup> ≤ [Gd(III)] ≤ 3 mmol/dm<sup>3</sup> and 1 mmol/dm<sup>3</sup> ≤ [FQ] ≤ 3 mmol/dm<sup>3</sup> at concentration ratio M:L = 1:1 to 1:5, binary complexes ML, ML<sub>2</sub> and ML<sub>3</sub> were found in the entire pH region (2-9.5). In addition to the dominant binary complexes the following mixed complexes of the MH<sub>q</sub>L<sub>p</sub> type were found: ciprofloxacin, (p,q) = (1,1), (1,-1), (2,2), (2,1), (2,-2), (3,3); ofloxacin, (p,q) = (1,1), (1,-1), (2,2), (2,1), (2,-1), (2,-2), (3,3), (3,2), (3,1), (3,-1) and moxifloxacin, (p,q) = (1,1), (2,2), (2,1), (3,3), (3,2), (3,1). Negative values of q denote hydrolytic complexes. Polynuclear complexes were not found in the systems examined. The distribution diagram indicates the dominance of the Gd(oflo)<sub>3</sub> at neutral pH values which may be physiologically active.*

**Literatura**

1. C. Siporin, C. L. Heifetz, J. M. Domagala, The new generation of quinolones, Marcel Dekker, N. Y., 1990.
2. V. Andriole, The Quinolones, Academic Press, London, 1988
3. M. Neuman, Clinical Pharmacokinetics 14, 96-121; T. Bergan, Quinolones in P.K. Peterson and J. Verhoef (Eds.), Antimicrobial Agents, Annual 2, Elsevier, Amsterdam, pp 161-183, 1987.
4. G.E. Jackson, S. Wynchank, M. Woudenberg, Gadolinium (III) complex Equilibria: The implications for Gd(III) MRI Contrast Agents, Magnetic resonance in medicine 16, 57-66, 1990.
5. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, **43**, (1996), 1739.

## Računarsko modelovanje humane krvne plazme

Ivan T. Lazarević, Ivan Jakovljević\*, Andrija Ćirić\*, Ratomir Jelić\*\*, Milena Jelikić-Stankov\*\*\*, Predrag Đurđević\*

Centar za usavršavanje kadrova ABHO Vojske Srbije, Balkanska 57, 37000 Kruševac, Srbija

\*Prirodno-matematički fakultet, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija

\*\*Medicinski fakultet, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Srbija

\*\*\*Farmaceutski fakultet, V. Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

### Uvod

Opšte je poznato da metalni joni imaju važnu ulogu u biološkim sistemima. U humanoj krvnoj plazmi kao i u ostalim biološkim fluidima, mogu se klasifikovati u četiri posebne frakcije: oni koji su inkorporirani u metaloproteine i koji su neizmenljivi (npr. bakar vezan u ceruloplazmi); oni koji su relativno slabo vezani sa proteinima i koji su u labilnoj ravnoteži sa sličnim jonima u rastvorima (npr. bakar vezan u serumskom albuminu); oni koji su kompleksirani sa brojnim ligandima niske molekulske mase, uključujući anjone amino kiselina, karboksilate, karbonate, fosfate, salicilate i askorbate; i slobodni metalni joni ili akva joni. Modelovanje specijacija u krvnoj plazmi otpočeli su Perin (*Perrin*) i saradnici<sup>1-3</sup>. Njihovi najraniji modeli bili su ograničeni na metalne jone  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  sa izabranim aminokiselinama (16 početno, a naknadno 22) kao ligandima. U kasnijem periodu, razvio je sisteme u koje je uključio proteine (albumin i globulin) kao i metalne jone  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>1-3</sup> Prvi modeli su bili ograničeni na jedan ili dva metalna jona sa ograničenim brojem liganada. Razvoj brzih kompjutera sa većim memorijama omogućio je da ovi modeli mogu biti prošireni na višekomponentne sisteme. U modelu krvne plazme koji su razvili Mej (*May*) i saradnici<sup>4</sup>, razmatrano je istovremeno 7 metalnih jona, 40 liganada sa oko 5000 njihovih kompleksa. Suštinski proces u razvoju bilo kog modela specijacije je definisanje niza hemijskih ravnoteža koje opisuju razmatrani sistem. Prilikom definisanja ravnoteža, potrebno je uključiti i vrednosti ravnotežnih konstanti. Ovo je jedna od najtežih prepreka u procesu modelovanja specijacija, jer precizne konstante ravnoteža nisu uvek raspoložive, a u nekim slučajevima, sve moguće ravnoteže nisu ni identifikovane. Na osnovu stehiometrije reakcije i konstante ravnoteže koncentracija neke komponente  $i$ , koja se pojavljuje u i reakcija biće:

$$S_j = \beta_j \prod_i x_i^{k(i,j)}, \quad (1)$$

gde je  $S_j$  - koncentracija vrste  $j$ ,  $\beta_j$  - ravnotežna konstanta,  $x_i$  - ravnotežna koncentracija komponente  $i$ ,  $k(i,j)$  stehiometrijski koeficijenti komponenata. Serije ravnoteža, zajedno sa ukupnom i koncentracijom slobodnih komponenata, čine kompjuterski model ili bazu podataka razmatranog sistema.

Hyperquad Simulation and Speciation (HySS) je računarski program<sup>5</sup> napravljen u više verzija (HySS1, HySS2, HySS2003, HySS2006, HySS2009) za Windows operativni sistem. Program ima dve osnovne funkcije: simulaciju potencijometrijskih titracionih krivih i izračunavanje ravnotežnih koncentracija čestica u rastvoru. Struktura softvera HySS se zasniva na tome, da se ravnotežne koncentracije komponenata  $[A]$ ,  $[B]$  itd., dobijaju rešavanjem sistema jednačina balansa masa:

$$T_A = [A] + \sum_i a_i \beta_i [A]^{a_i} [B]^{b_i} \dots + \sum_j p_j C_j \quad (2)$$

$$T_B = [B] + \sum_i a_i \beta_i [A]^{a_i} [B]^{b_i} \dots + \sum_j q_j C_j, \quad (3)$$

gde su  $A$ ,  $B$  itd. reagensi,  $a$ ,  $b$ , ...,  $p$ ,  $q$ , itd. stehiometrijski indeksi,  $\beta$  predstavlja (kumulativnu) ravnotežnu konstantu, a  $C$  predstavlja molarnu koncentraciju nerastvorne vrste (količina čvrste komponente podeljena sa zapreminom rastvora) i koristi se ukoliko ima nerastvornih vrsta. Broj ravnoteža u krvnoj plazmi je jako veliki. Mej<sup>4</sup> i saradnici su konstruisali početni i osnovni kompjuterski model krvne plazme (kompjuterskim programom ECCLES) u pokušaju da izračunaju koncentraciju svih mogućih vrsta u ravnoteži i da objasne neka klinička posmatranja. Nakon konstrukcije osnovnog modela krvne plazme u ECCLES-u, pojavio se veliki broj novih podataka o ravnotežama, pa se ukazala i potreba za dopunom osnovnog modela krvne plazme. Novi kompjuterski programi za proučavanje specijacija u dinamičkim višekomponentnim sistemima (npr. krvna plazma), napisani su pod Windows operativnim sistemom pružajući korisnicima lakši i fleksibilniji rad u odnosu

na unos potrebnih podataka i grafički prikaz rezultata izračunavanja. Iz tih razloga, u ovom radu program HySS primenjen je za modelovanje humane krvne plazme, koji je uključio najzastupljenije jone i ligande. Dobijeni rezultati upoređeni su sa publikovanim rezultatima Mejovog modela pri tri pH vrednosti krvne plazme.

## Rezultati i diskusija

U HySS računarskom modelovanju humane plazme razmatrani su joni metala i ligandi koji su najviše zastupljeni u plazmi u fiziološkim uslovima. Korišćene vrste prikazane su u Tabeli 1. Srednje koncentracije liganada u plazmi su preuzete iz Mejovog modela<sup>4</sup>. Slobodne koncentracije jona metala<sup>4,6</sup> u plazmi određene su iz publikovanih vrednosti izmerenih koncentracija jona metala uzimajući u obzir da je frakcija metala raspoloživa za vezivanje sa ligandima niske molekulske mase određena: a) vezivanjem metala za proteine plazme (albumin, transferin, specifični metalo-proteini) b) proizvodom rastvorljivosti ( $K_{s,o}$ ) slabo rastvornih jedinjenja sa jonima plazme ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Ravnoteže a) i b) ograničavaju raspoloživu frakciju metala, pri čemu metalo-proteini imaju i ulogu „pufera“ metala, odnosno, otpuštanjem jona metala omogućavaju održavanje njihove slobodne koncentracije u krvnoj plazmi. Koncentracija slobodnih jona metala u plazmi izračunata je na osnovu publikovanih konstanti vezivanja za proteine i proizvoda rastvorljivosti. Korišćene vrednosti date su u Tabeli 1. Konstante stabilnosti kompleksa uzete su iz NIST-ove baze<sup>7</sup> i iz IUPAC-ove baze konstanti stabilnosti<sup>8</sup>, a u slučaju da se odgovarajuće vrednosti nisu mogle naći u bazama, korišćeni su adekvatni literaturni izvori. Ukupno je u model uključeno oko 3000 kompleksa, pri čemu su osim binarnih, uključeni i mešoviti kompleksi, pre svega sa aminokiselinama. Za dobijanje pouzdanih rezultata uzete su vrednosti konstanti stabilnosti koje su bliske onima u fiziološkim uslovima (310 K i 0,15 mol/dm<sup>3</sup> NaCl). Pošto te vrednosti nisu uvek bile raspoložive na osnovu termodinamičkih podataka ( $\Delta H$  i  $\Delta S$ ) i primenom SIT teorije izvršena je korekcija konstanti stabilnosti na fiziološke uslove.

Tabela 1. Ukupne koncentracije liganada i metalnih jona za osnovni model u krvnoj plazmi

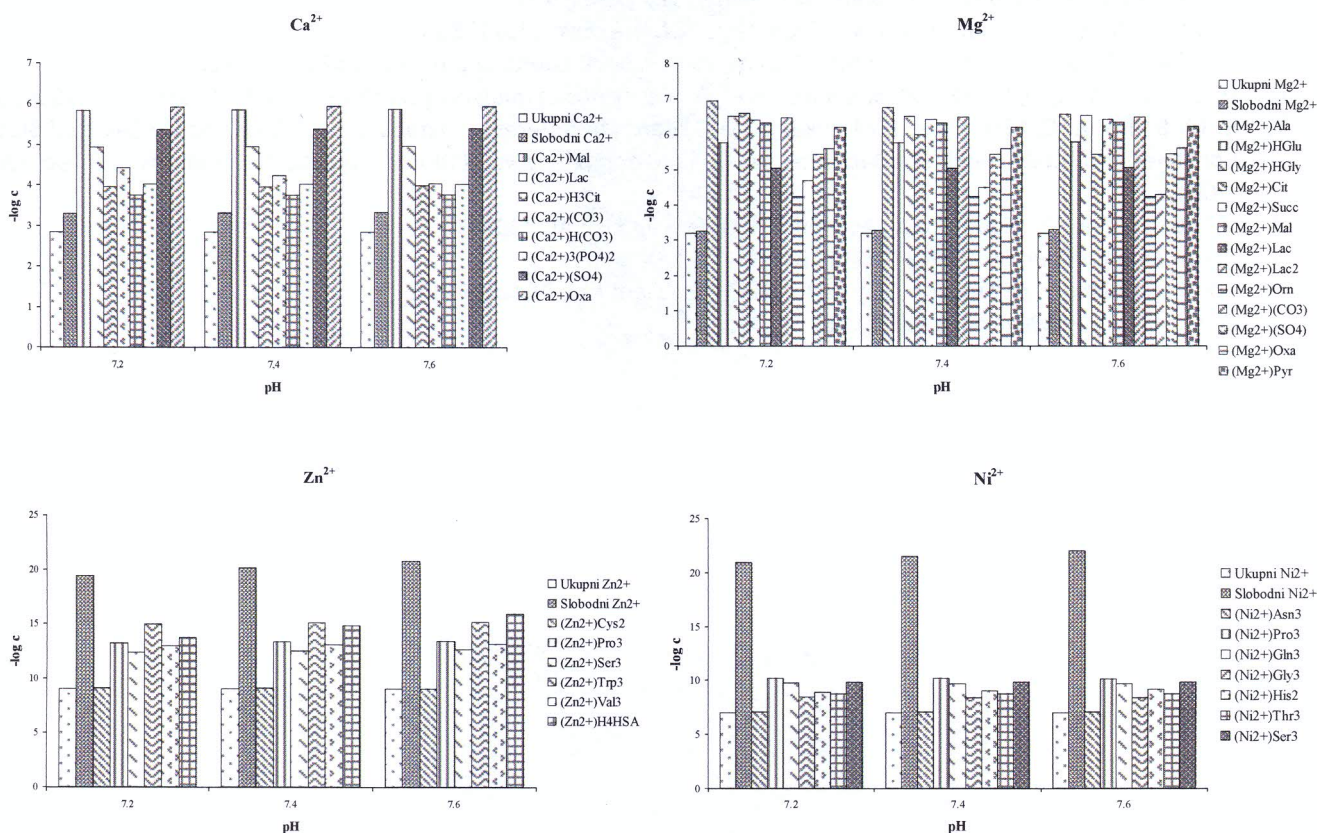
Komponenta	[mol/dm <sup>3</sup> ]	Komponenta	[mol/dm <sup>3</sup> ]
<b>Proteini</b>		<b>Neorganski ligandi</b>	
Humani serum albumin (HSA)	$7,2 \times 10^{-4}$	Karbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ )	$2,5 \times 10^{-2}$
Transferin (Tf)	$2,5 \times 10^{-5}$	Fosfat ( $\text{PO}_4^{2-}$ )	$1,6 \times 10^{-3}$
<b>Aminokiseline</b>		Tiocijanat ( $\text{SCN}^-$ )	$1,4 \times 10^{-5}$
Alanin (Ala)	$3,7 \times 10^{-4}$	Silikat (Sil)	$1,4 \times 10^{-4}$
Aminobutirat (Ambu)	$2,4 \times 10^{-5}$	Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	$2,1 \times 10^{-4}$
Arginin (Arg)	$9,5 \times 10^{-5}$	Amonijak ( $\text{NH}_3$ )	$2,4 \times 10^{-5}$
Asparagin (Asn)	$5,5 \times 10^{-5}$	$\text{OH}^-$	$1,2 \times 10^{-6}$
Aspartat (Asp)	$5,0 \times 10^{-6}$	<b>Karboksilne kiseline</b>	
Cistein (Cys)	$2,3 \times 10^{-5}$	Citrat (Cit)	$1,1 \times 10^{-4}$
Cistin (Cis)	$4,0 \times 10^{-5}$	Laktat (Lac)	$1,8 \times 10^{-3}$
Citrulin (Citrl)	$2,7 \times 10^{-5}$	Malat (Mal)	$3,5 \times 10^{-5}$
Glutamin (Gln)	$4,8 \times 10^{-5}$	Oksalat (Oxa)	$1,2 \times 10^{-5}$
Glutaminat (Glu)	$5,2 \times 10^{-4}$	Piruvat (Pyr)	$9,5 \times 10^{-5}$
Glicin (Gly)	$2,4 \times 10^{-4}$	Salicilat (Sal)	$5,0 \times 10^{-6}$
Histidin (His)	$8,5 \times 10^{-5}$	Sucinat (Succ)	$4,2 \times 10^{-5}$
Histamin (Hsn)	$1,0 \times 10^{-8}$	Askorbat (Asc)	$4,3 \times 10^{-5}$
Hidroksiprolinat (Hypro)	$7,0 \times 10^{-6}$	<b>Metalni joni</b>	
Izoleucinat (Ile)	$6,5 \times 10^{-5}$	$\text{Ca}^{2+}$	$1,43 \times 10^{-3}$
Leucin (Leu)	$1,2 \times 10^{-4}$	$\text{Mg}^{2+}$	$6,48 \times 10^{-4}$
Lizin (Lys)	$1,8 \times 10^{-4}$	$\text{Cu}^{2+}$	$1,0 \times 10^{-18}$
Metionin (Met)	$2,9 \times 10^{-5}$	$\text{Fe}^{2+}$	$1,0 \times 10^{-11}$
Ornitin (Orn)	$5,8 \times 10^{-5}$	$\text{Fe}^{3+}$	$1,0 \times 10^{-23}$
Fenilalanin (Phe)	$6,4 \times 10^{-5}$	$\text{Pb}^{2+}$	$1,0 \times 10^{-14}$
Prolin (Pro)	$2,1 \times 10^{-4}$	$\text{Mn}^{2+}$	$1,79 \times 10^{-12}$
Serin (Ser)	$1,2 \times 10^{-4}$	$\text{Zn}^{2+}$	$1,0 \times 10^{-9}$
Treonin (Thr)	$1,5 \times 10^{-4}$	$\text{Ni}^{2+}$	$9,9 \times 10^{-8}$
Triptofosfat (Trp)	$1,0 \times 10^{-5}$	$\text{VO}^{2+}$	$1,0 \times 10^{-9}$
Tirozin (Tyr)	$5,8 \times 10^{-5}$	$\text{Bi}^{3+}$	$2,0 \times 10^{-8}$
Valin (Val)	$2,3 \times 10^{-4}$		

Rezultati izračunavanja slobodnih koncentracija jona metala dobijenih u našem radu (programom HySS) i publikovanih (programom ECCLES) dati su u Tabeli 2. Neslaganja kod pojedinih metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), mogu se pripisati razlikama u vrednostima korišćenih konstanti stabilnosti kompleksa u našem radu i izvršenoj korekciji koncentracija na proizvod rastvorljivosti.

Tabela 2. Poređenje rezultata osnovnog modela krvne plazme u ECCLES-u<sup>4</sup> i HySS-u<sup>5</sup>

Program	HySS			ECCLES			
	pH→	7,2	7,4	7,6	7,2	7,4	7,6
↓Jon metala		Koncentracija jona metala, mol/dm <sup>3</sup>					
$\text{Ca}^{2+}$		$1,43 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-3}$	$1,46 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-3}$
$\text{Mg}^{2+}$		$6,48 \times 10^{-4}$	$6,48 \times 10^{-4}$	$6,48 \times 10^{-4}$	$6,48 \times 10^{-4}$	$6,56 \times 10^{-4}$	$6,67 \times 10^{-4}$
$\text{Mn}^{2+}$		$1,79 \times 10^{-12}$	$1,79 \times 10^{-12}$	$1,79 \times 10^{-12}$	$1,79 \times 10^{-12}$	$1,83 \times 10^{-12}$	$1,89 \times 10^{-12}$
$\text{Fe}^{3+}$		$2,26 \times 10^{-19}$	$1,00 \times 10^{-23}$	$1,84 \times 10^{-19}$	$4,24 \times 10^{-13}$	$6,68 \times 10^{-13}$	$1,06 \times 10^{-12}$
$\text{Cu}^{2+}$		$1,00 \times 10^{-18}$	$1,00 \times 10^{-18}$	$1,00 \times 10^{-18}$	$6,04 \times 10^{-12}$	$1,57 \times 10^{-11}$	$4,14 \times 10^{-11}$
$\text{Zn}^{2+}$		$1,00 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-9}$	$1,79 \times 10^{-12}$	$1,84 \times 10^{-7}$	$5,50 \times 10^{-7}$
$\text{Pb}^{2+}$		$1,00 \times 10^{-14}$	$1,00 \times 10^{-14}$	$1,00 \times 10^{-14}$	$2,67 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-11}$	$1,30 \times 10^{-10}$

Raspodela pojedinih kompleksa u plazmi prikazana je u obliku histograma na Slici 1. Raspodela je prikazana za jone  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  i komplekse koji se u plazmi formiraju u najvećoj koncentraciji.



Slika 1. Raspodela kompleksa u humanoj plazmi

Sa Slike 1 se može uočiti da je efekat pH na distribuciju kompleksa jona metala u plazmi značajan, u smislu promene koncentracija pojedinih kompleksnih vrsta. Uočljivo je formiranje binarnih i protonovanih binarnih kompleksa kao najdominantnijih. Jon  $\text{Ca}^{2+}$  formira kao dominantne komplekse najviših koncentracija ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) sa malatom i laktatom, kao i rastvorne komplekse sa citratom, oksalatom, karbonatom, sulfatom i fosfatom. Jon  $\text{Mg}^{2+}$  formira komplekse najviših koncentracija ( $10^{-4}$ - $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>) sa alaninom, glutaminatom, glicinom, sukcinatom, malatom, ornitinom i piruvatom. Jon  $\text{Zn}^{2+}$  formira komplekse značajno manjih koncentracija ( $10^{-10}$ - $10^{-14}$  mol/dm<sup>3</sup>) sa cisteinom, prolinom, serinom, triptofosfatom, valinom i humanim serum

albuminom, a Ni<sup>2+</sup> formira komplekse u koncentracijama 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> mol/dm<sup>3</sup> sa asparaginom, histidinom, treoninom, prolinom, glicinom i serinom. Vezivanje jona metala za karboksilne kiseline i esencijalne amino-kiseline Krebsovog ciklusa i esencijalne amino-kiseline, može uticati na njihov metabolizam kao i na bioraspoloživost pojedinih amino-kiselina.

### Zaključak

Baza podataka formirana na osnovu literaturnih podataka o sastavu i stabilnosti kompleksa esencijalnih metala i biologanada, može se koristiti u programu HySS<sup>5</sup> za modelovanje raspodele metala i liganada niske molekulske mase u humanoj plazmi. Rezultati dobijeni za fiziološke uslove u skladu su sa raspoloživim literaturnim podacima<sup>9-11</sup>.

### Computer modeling of human blood plasma

*The computer model of human blood plasma has been developed using speciation program HySS and published stability constant data on complexes between essential metal ions and blood bioligands of low molecular mass. 11 metal ions and 42 ligands forming around 3000 complexes were included in speciation calculations. The calculated metal distribution between bioligands under physiological conditions is in agreement with so far published data and indicates considerable influence of small pH changes on speciation.*

### Literatura:

1. D. D. Perrin, *Nature*, **206** (1965) 170.
2. D. D. Perrin, *Suomen Kem.*, **42** (1969) 205.
3. P. S. Hallman, D. D. Perrin, A. E. Watt, *Biochem.J.*, **121** (1971) 549.
4. P. May, P. W. Linder, D. R. Williams, *J.Chem.Soc., Dalton Trans.*, (1977) 588.
5. L. Alderghi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, **184** (1999) 311.
6. H. G. Seiler, A. Sigel, H. Sigel, *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, Marcel Dekker.Inc., (1994) 365.
7. R. M. Smith, A. E. Martell, R. J. Motekaitis, NIST Standard Reference Database 46, NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 8.0 For Windows, National Institute of Standards and Technology, (2004).
8. L. Pettit, K. Powell, SC-Database, Academic Software and IUPAC, (2004).
9. P. Letkeman, *J.Chem.Ed.*, **73(2)** (1996) 165.
10. J. Wang, H. Zhang, K. Yang, Ch. Nin, J. Nu, *Biol.Trace Elem.Res.*, **96** (2003) 125.
11. G. E. Jackson, *Polyhedron*, **9** (1990) 163.