

Identifikacija kompleksnih spojeva galija i aromatskih hidrazona spektrometrijom masa

Njegovec, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:312616>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tihana Njegovec

IDENTIFIKACIJA KOMPLEKSNIH SPOJEVA GALIJA I
AROMATSKIH HIDRAZONA SPEKTROMETRIJOM MASA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Marijane Pocrnić, mag. chem.

Diplomski rad izrađen je u okviru HrZZ projekta IP-2014-09-4841 ARHYD, voditeljica projekta: N. Galić.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nives Galić, i neposrednoj voditeljici asistentici Marijani Pocrnić na prenesenom znanju, stručnom vodstvu, te prije svega, na uloženom trudu i poklonjenom vremenu tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama na pruženoj ljubavi, potpori i razumijevanju, te što su učinili moje studiranje posebnim i nezaboravnim.

Najveću zaslugu dugujem svojim roditeljima i sestrama, koji su mi omogućili školovanje i bili najveća podrška, te bez kojih ništa ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Spektrometrija masa.....	2
2.1.1. Osnovni principi.....	2
2.1.2. Spektrometar masa.....	3
2.1.3. Elektroraspršenje.....	6
2.1.4. Kvadrupolni analizator masa.....	8
2.1.6. Tandemna spektrometrija masa.....	11
2.1.7. Reakcije u tandemnoj spektrometriji masa.....	12
2.2. Aroilhidrazoni	14
2.2.1. ESI-MS i MS/MS analiza aroilhidrazona dobivenih iz nikotinhidrazida.....	16
2.3. Galij i kompleksi galija(III).....	16
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Kemikalije.....	18
3.2. Instrumentacija	18
3.3. Priprema otopina	19
3.4. Spektrometrija masa.....	19
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. MS spektri otopina galija(III) i spojeva H₂L1–H₂L4.....	22
4.1.1. ESI(+) MS/MS analiza odabranih iona	29
4.2. MS spektri otopina čvrstih kompleksa.....	38
4.2.1. ESI(+) MS/MS analiza odabranih iona	42
§ 5. ZAKLJUČAK	49
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	51
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	52
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

IDENTIFIKACIJA KOMPLEKSNIH SPOJEVA GALIJA I AROMATSKIH HIDRAZONA SPEKTROMETRIJOM MASA

Tihana Njegovec

U ovom radu provedena je detaljna masenospektrometrijska analiza kompleksnih spojeva galij(III) i aromatskih hidrazona pripremljenih iz nikotinhidrazida i salicilaldehida, odnosno 2-hidroksi-3-metoksi-, 2-hidroksi-4-metoksi- i 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehida u sustavu otapala metanol/voda. Kao ionizacija korišteno je elektroraspršenje, a kao analizator masa trostruki kvadrupol. Analizirane su otopine kompleksa priređene na dva načina: (i) miješanjem otopina galijeva(III) perklorata i navedenih aromatskih hidrazona pri čemu je variran molarni omjer metala i liganda od 1:1 do 1:4 te (ii) otapanjem čvrstih kompleksnih spojeva galija i aromatskih hidrazona. Spektri masa su u slučaju (i) snimljeni odmah po pripremi otopina i nakon 24 sata. Također je ispitan utjecaj dodatka perklorne i klorovodične kiseline na intenzitet signala u spektrima masa. Snimljeni su i MS/MS spektri odabranih iona, a na temelju rezultata tandemne spektrometrije masa predložene su odgovarajuće sheme fragmentiranja.

(53 + XXV stranica, 43 slike, 12 tablica, 25 literaturnih navoda, jezik izvornika:hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: aroilhidrazoni, fragmentacija, galij, spektrometrija masa

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. doc. dr. sc. Ivana Biljan
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 25. rujna 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF GALLIUM COMPLEXES WITH AROMATIC HYDRAZONES BY MASS SPECTROMETRY

Tihana Njegovec

In this thesis a detailed mass spectrometric analysis of gallium(III) complexes with aromatic hydrazones derived from nicotinic acid hydrazides and salicylaldehyde, namely 2-hydroxy-3-methoxy-, 2-hydroxy-4-methoxy- and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde in methanol/water system was performed. Electrospray was used for ionization, and triplequadrupole as mass analyzer. The solutions of complexes were prepared in two different ways: (i) by mixing solutions of gallium(III) perchlorate and aromatic hydrazones in different molar ratio from 1:1 to 1:4 and (ii) by dissolving solid complexes of gallium(III) and hydrazones. In case of (i) MS spectra were recorded immediately after the preparation of solutions and after 24 hours. The addition of perchloric or hydrochloric acid on signals intensities in mass spectra were examined as well. MS/MS spectra of selected ions were acquired and corresponding fragmentation schemes were proposed.

(53 + XXV pages, 43 figures, 12 tables, 25 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: aroylhydrazones, fragmentation, gallium, mass spectrometry

Mentor: Professor Nives Galić

Assistant mentor: Marijana Pocrnić, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Nives Glič, Professor
 2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
 3. Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 25th September 2019.

§ 1. UVOD

Aroilhidrazoni su proučavani dugi niz godina zbog široke farmakološke i analitičke primjene. Spojevi iz klase aroilhidrazona biološki su aktivni, a aktivnost im se očituje kroz antimikrobno, antitumorsko i protuupalno djelovanje. Sposobnost stvaranja kompleksa s različitim nabijenim i nenabijenim vrstama čini ih dobrim molekulskim sensorima za određivanje metalnih kationa i neutralnih molekula.¹ Nedavna istraživanja pokazala su da se hidrazoni nikotinske kiseline mogu smatrati novim farmakoforima u osmišljavanju novih antikonvulzivnih lijekova.² Vezna svojstva aroilhidrazona prema željezu(III) određena su u sklopu istraživanja bolesti povezanih s prekomjernom količinom željeza u organizmu.³

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika u kojoj se molekule analiziraju na temelju omjera njihove mase i naboja. Prvi korak pri analizi je ionizacija molekula analita u ionizatoru. Nastali ioni se provode kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu te se nakon toga usmjeravaju na detektor. Spektrometrija masa široko se primjenjuje pri određivanju strukture organskih i anorganskih molekula, izotopnog omjera atoma u uzorku, elementnog sastava nekog uzorka te kvalitativnog i kvantitativnog određivanja sastava smjesa.^{4,5} Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) je jedan od blažih načina ionizacije te se vrlo često koristi u analizi bioloških makromolekula.⁶ Da bi se odredili fragmentacijski putovi neke molekule, koristi se tandemna spektrometrija masa (MS/MS) koja uključuje nekoliko stupnjeva odjeljivanja iona na temelju omjera mase i naboja.⁴

Cilj ovog rada bio je primijeniti spektrometriju masa za strukturnu karakterizaciju kompleksa galija i odabranih aroilhidrazona izvedenih iz nikotinohidrazida. Analiza je obuhvaćala istraživanje utjecaja sastava otapala, različitih omjera liganda i galija te vremena na intenzitete signala u spektrima masa. Također je provedena analiza tandemnom spektrometrijom masa, a na temelju ESI(+) MS/MS spektara odabranih iona predložene su odgovarajuće sheme fragmentiranja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa razvija se od četrdesetih godina dvadesetog stoljeća. Najprije je korištena za kvantitativno određivanje ugljikovodika u petrokemijskoj industriji, a kasnijim unapređivanjem počela se koristiti i u ostalim granama znanosti. Danas se koristi u rutinskoj kontroli hrane, forenzici te za praćenje onečišćenja u okolišu, a omogućuje analizu hlapljivih i nehlapljivih spojeva kao što su peptidi, oligosaharidi, fosfolipidi, itd. Granica osjetljivosti je na razini piko-, femto- i atomola, točnost u određivanju atomske mase je 10^{-9} , a rezolucija je povećana i do $8 \times 10^6 m/\Delta m$.^{4,6}

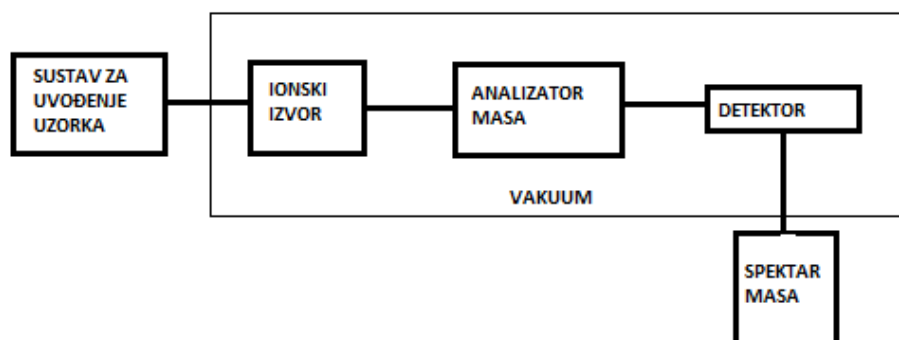
2.1.1. Osnovni principi

U spektrometriji masa prvi korak je nastajanje iona u plinskoj fazi, a zatim njihovo razdvajanje i detektiranje na temelju omjera mase i naboja (m/z). Rezultat analize je spektar koji prikazuje zastupljenost iona u odnosu na omjer mase i naboja. Osim grafički, podaci mogu biti prikazani i u tabličnom obliku. U spektrometriji masa razlikujemo prosječnu, točnu i nominalnu masu. Prosječnu masu dobivamo korištenjem relativne atomske mase iz periodnog sustava elemenata, točnu korištenjem točne atomske mase najzastupljenijeg izotopa, a nominalnu korištenjem nominalne atomske mase najzastupljenijeg izotopa u prirodi. Prosječna, točna i nominalna masa mogu se razlikovati i do nekoliko Da, ovisno o broju atoma i izotopnom sastavu. Signal najvećeg intenziteta je osnovni ili bazni signal, te se intenziteti svih ostalih signala preračunavaju u odnosu na njega. Signal pri najvećoj vrijednosti m/z obično odgovara masi molekule analita, a signali pri manjim vrijednostima m/z su posljedica fragmentiranja ili pregradnje molekulskog iona.⁴

2.1.2. Spektrometar masa

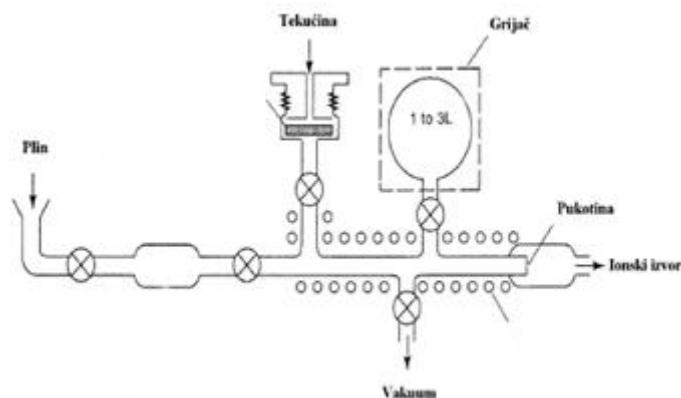
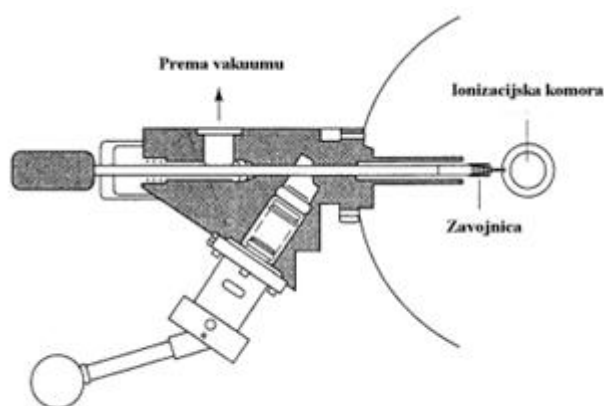
Dijelovi spektrometra masa (slika 2.1) su:

- sustav za uvođenje uzorka,
- ionski izvor,
- analizator masa,
- detektor.



Slika 2.1. Shematski prikaz glavnih dijelova spektrometra masa

Da bi nastali ioni na putu od ionskog izvora do detektora izbjegli sudare s drugim česticama, sustav se nalazi pod visokim vakuumom. Time je spriječen nastanak neželjenih produkata ili gubitak naboja analita. Klasični način uvođenja plinova i tekućina s vrelištem do 500 °C prikazan je na slici 2.2, a način uvođenja krutih uzoraka i uzoraka nehlapljivih tekućina pomoću direktne probe prikazan je na slici 2.3. Za određivanje sastojaka složenih smjesa spektrometar masa se povezuje s plinskom i tekućinskom kromatografijom. U vezanom sustavu plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS), ukoliko se koriste kapilarne kolone moguće je direktno uvođenje eluata u ionizacijsku komoru jer se zbog malih protoka ne narušava vakuum u spektrometru masa. U vezanom sustavu tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-spektrometrija masa (engl. *High-performance liquid chromatography-mass spectrometry*, HPLC-MS) upotrebljavaju se ionizacijske tehnike koje uz ionizaciju analita omogućuju uklanjanje otapala kojime se analit ispire s kromatografske kolone.^{4,7}

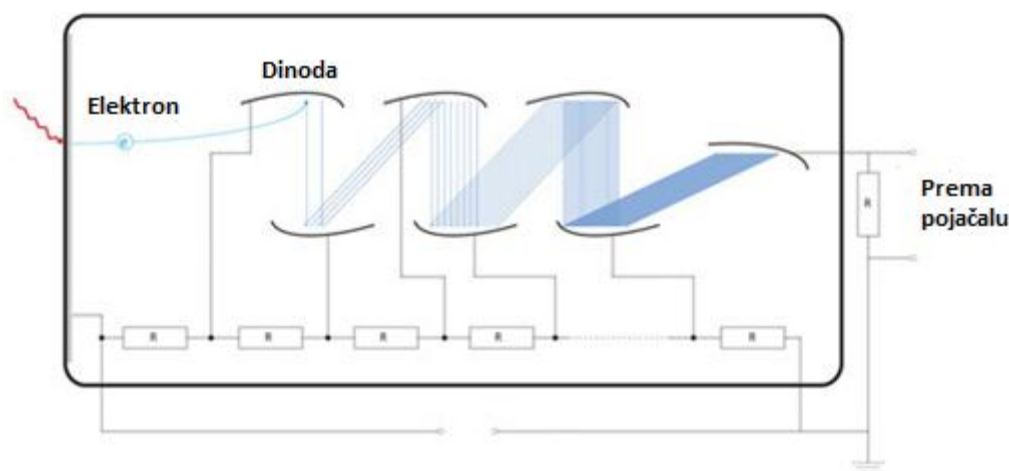
Slika 2.2. Indirektno dovođenje uzoraka u ionizacijsku komoru⁸Slika 2.3. Direktna proba⁸

Postoje različiti načini nastajanja iona u ionskom izvoru. Mogu nastati ionizacijom neutralne molekule, protoniranjem, deprotoniranjem, pravljenjem adukata ili prijenosom nabijene vrste iz kondenzirane u plinsku fazu. S obzirom na različita fizikalno-kemijska svojstva, razvijene su različite ionizacijske tehnike. Za ionizaciju analita u plinskoj fazi prikladne su ionizacija elektronima (engl. *electron ionization*, EI), kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI) i desorpcija poljem (engl. *field desorption*, FI), te je njihova primjena ograničena na dovoljno hlapljive i termički stabilne spojeve. Ako je analit tekućina, koriste se ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI), ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray ionization*, TSP) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Za ionizaciju krutina potrebne su dodatne metode, odnosno primjena čvrste ili tekuće matrice, gdje se nakon djelovanja energetskih čestica ili fotona ioni analita desorbiraju s površine matrice. Takve ionizacijske tehnike su matricom

potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI), desorpcija poljem (engl. *field desorption*, FD), desorpcija plazmom (engl. *plasma desorption*, PD), ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) i ionizacija sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS).^{4,5,7}

Nakon nastajanja iona u ionskom izvoru, oni se odjeljuju na temelju omjera mase i naboja m/z , a za to koristimo različite analizatore masa. Osnovni parametri koji karakteriziraju analizatore masa su gornja granica mase, brzina analize, propusnost, točnost mase i razlučivanje. Kvadrupolni analizatori i analizatori s magnetskim sektorom sukcesivno propuštaju ione tijekom vremena tako da samo ioni određene vrijednosti omjera m/z mogu proći kroz instrument u određeno vrijeme. Ionska stupica (engl. *ion trap*, IT), analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF), Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije (engl. *fourier-transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) i orbitrap su analizatori masa koji simultano analiziraju sve ione. Za tandemnu spektrometriju masa povezuju se isti ili različiti analizatori kako bi se iskoristile najbolje karakteristike pojedinih analizatora masa.⁴

Nakon prolaska kroz analizator masa, ioni se moraju detektirati i prevesti u mjerljivi signal. Detekcija se može temeljiti na naboju, masi ili brzini iona. Danas se najčešće koriste elektronski multiplikator (slika 2.4) i fotomultiplikator koji se temelje na udaru iona na dinodu čime se generiraju sekundarni ioni koji se pretvaraju u mjerni signal.⁴



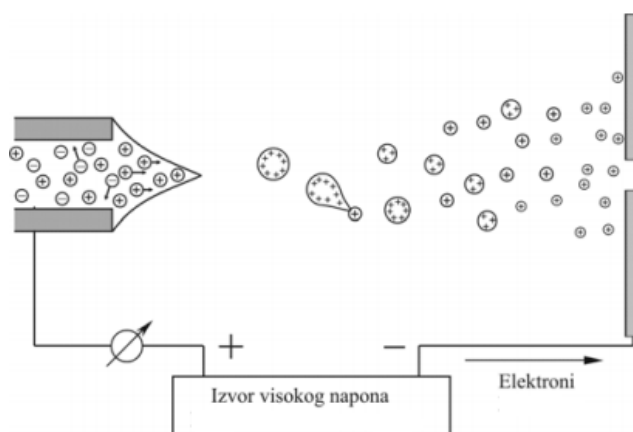
Slika 2.4. Elektronski multiplikator²⁰

2.1.3. Elektroraspršenje

Ionizacija elektroraspršenjem je jedna od najblažih načina ionizacije u spektrometriji masa, kojom se pri atmosferskom tlaku ioni iz otopine prevode u ione u plinskoj fazi. Omogućuje analizu malih i velikih molekula, nenabijenih i ionskih spojeva te nekovalentnih kompleksa. Također omogućuje i direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Kod elektroraspršenja postoji mogućnost nastajanja višestruko nabijenih iona što omogućuje detekciju tvari velikih molekulskih masa i s analizatorima malih vrijednosti m/z . Granice detekcije spuštene su na red veličine atomola (10^{-18} mol) smanjenjem brzine protoka analizirane otopine.⁶ Shematski prikaz elektroraspršenja prikazan je na slici 2.5.

Mehanizam elektroraspršenja podijeljen je u tri faze:

- nastajanje kapljica,
- smanjenje kapljica,
- nastajanje iona u plinskoj fazi.



Slika 2.5. Shematski prikaz elektroraspršenja⁶

Nastajanje kapljica

Otopina koja sadrži analit uvodi se u metalnu kapilaru vanjskog promjera 0,2 nm i unutarnjeg 0,1 nm na koju se primjenjuje napon 2–3 kV, a koja je udaljena 1–3 cm od veće, planarne, suprotne elektrode. Pod utjecajem električnog polja dolazi do odvajanja naboja, te anioni putuju prema metalnoj kapilari, a kationi prema katodi, i akumuliraju se na površini tekućine. Kod određene jakosti električnog polja dolazi do formiranja Taylorovog stožca koji pri dovoljno jakom električnom polju postaje nestabilan i na njegovu se vrhu stvara nit tekućine čija je površina obogaćena pozitivnim ionima. Na određenoj udaljenosti nit postaje nestabilna

i iz nje nastaju kapljice s visokim udjelom pozitivnih iona. Nastale kapljice pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru spektrometra masa. Mijenjanjem polariteta moguće je proizvesti negativno nabijene kapljice.⁶

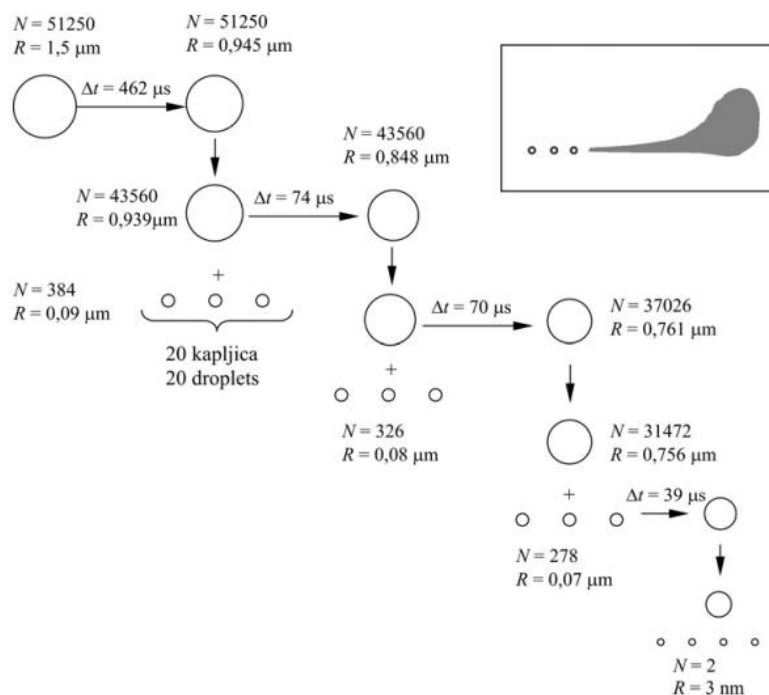
Smanjenje kapljica

Početna veličina kapljica ovisi o protoku otopine i svojstvu otapala. Otapalo se grije, stoga isparava, te dolazi do smanjenja veličine kapljica, no naboj ostaje konstantan. Kad se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetošću, postiže se Rayleighova granica stabilnosti. Unutar 100 μ s, radijus ishodne kapljice je dovoljno blizu toj granici, te Columbovim dijeljenjem nastaju manje kapljice koje nose 2% mase i 15% naboja prethodnih kapljica. Proces dijeljenja se ponavlja dva do tri puta uz konstantno povećanje omjera pozitivnog naboja na površini kapljica i sparenih iona elektrolita u unutrašnjosti (slika 2.6). Dolazi do nesimetričnog dijeljenja kapljica (raspad mlaza) pri čemu nastaju dvije vrste kapljica, velike, sa neželjeno sparenim ionima elektrolita, i male, od kojih nastaju ioni u plinskoj fazi.⁶

Nastajanje iona u plinskoj fazi

Postoje dva modela nastajanja iona u plinskoj fazi. Prema modelu ostatka naboja (Dole, 1968.) nastaje jako mala kapljica radijusa oko 1 nm koja sadrži samo jedan ion te isparavanjem posljednje molekule otapala nastaje ion u plinskoj fazi, a prema modelu isparavanja iona (Iribarne i Thomson, 1976.) iz kapljice radijusa 8 nm sa suviškom od 70 elementarnih naboja, ioni isparavaju prije postignute Rayleighove granice.⁶

Otopina koju podvrgnemo elektroraspršenju, uz analit može sadržavati i produkte elektrokemijskih reakcija te nečistoće iz otapala, kao i elektrolit koji se dodaje uzorku radi poboljšanja desorpcije određene vrste. Tako se kiselina dodaje za povećanje prinosa $[M+H]^+$, a baza za povećanje prinosa $[M-H]^-$ iona. Prisutnost elektrolita i površinski aktivnih tvari može zatamiti signal analita, što je jedan od nedostataka elektroraspršenja kao načina ionizacije.^{4,6}



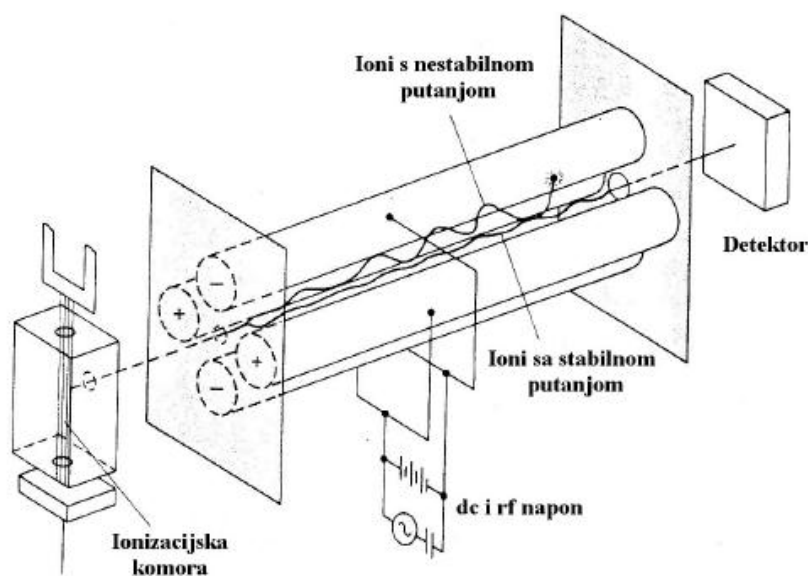
Slika 2.6. Prikaz nastajanja kapljica predaka i potomaka (R = radijus kapljice, N = broj elementarnih naboja na površini kapljice, Δt = vrijeme potrebno za smanjivanje kapljice do veličine kada započinje proces Columbova dijeljenja)⁶

2.1.4. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupol je jedan od najzastupljenijih analizatora. Odjeljivanje iona prema omjeru m/z temelji se na stabilnoj putanji iona u oscilirajućem električnom polju. Ioni su filtrirani tako da samo ioni određene vrijednosti m/z stižu do detektora pa se kvadrupolni analizatori često nazivaju i filteri masa. Nedostatak ovog analizatora je slabo razlučivanje, a prednost je pristupačna cijena, brzina snimanja, te mogućnost povezivanja s kromatografskim tehnikama.

Kvadrupol se sastoji od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane (slika 2.7), jedan par pri tome ima pozitivan, a drugi negativan polaritet. Ioni koji dolaze iz ionskog izvora ubrzani potencijalom 5–15 V ulaze u kvadrupol, te putuju paralelno s elektrodama. Ioni koji ulaze imaju različite vrijednosti m/z i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule. Vrijednost m/z koja je propuštena kroz kvadrupol određena je izmjeničnim (rf) i istosmjernim (dc) potencijalom elektroda. U prvom dijelu ciklusa izmjeničnog potencijala gornja i donja elektroda su pozitivno nabijene, te se pozitivno nabijeni ioni fokusiraju u ravnini. Kod mijenjanja polariteta elektroda, mijenja se i ravnina u kojoj se ioni fokusiraju što za posljedicu

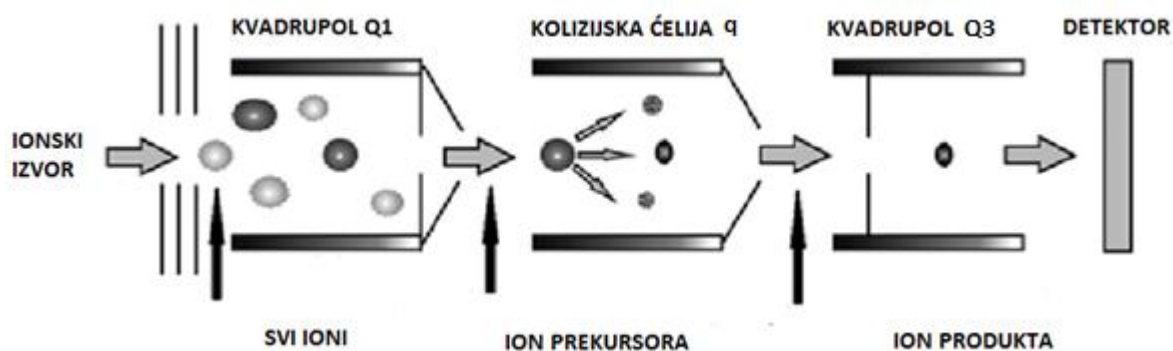
ima gibanje iona putanjom vala čija amplituda ovisi o omjeru m/z , frekvenciji i jačini primijenjenog potencijala. Ioni malog omjera m/z imaju veću brzinu i amplitudu vala te udaraju u elektrodu. Njihovo je gibanje određeno izmjeničnim potencijalom, a budući da se ioni velikih masa sporije refokusiraju, njihovo je gibanje određeno istosmjernim potencijalom te se sporo odmiču od sredine kvadrupola pa su u dovoljnoj mjeri udaljeni da ne udare na detektor. Takvom kombinacijom istosmjernog i izmjeničnog potencijala samo se ioni uskog raspona vrijednosti m/z propuštaju kroz analizator do detektora.^{4,10,11}



Slika 2.7. Shematski prikaz kvadrupola⁵

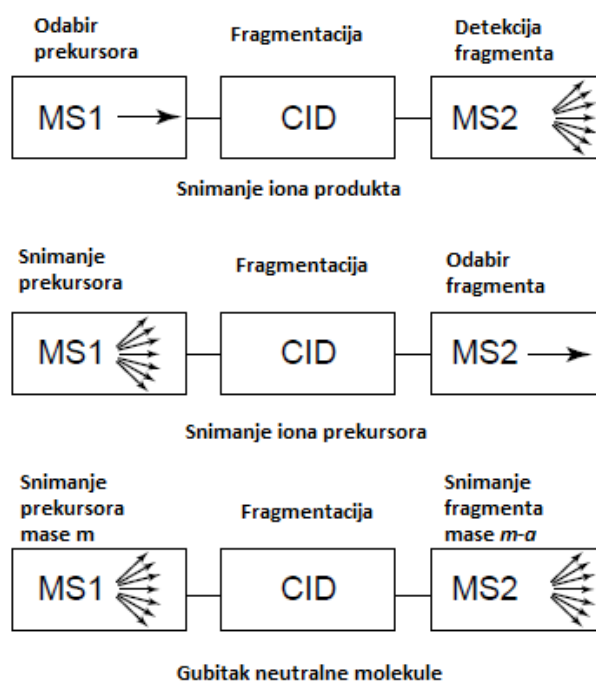
2.1.5. Tandemna spektrometrija masa uz kvadrupol kao analizator masa

Korištenjem trostrukog kvadrupolnog analizatora (slika 2.8) moguće je provesti tandemnu spektrometriju masa. U takvim instrumentima prvi i treći kvadrupol (Q1 i Q3) su klasični kvadrupoli, a središnji (q) služi kao kolizijska ćelija (engl. *collision cell*) u kojoj uslijed kolizije s molekulama plina dolazi do fragmentacije iona ili reakcije ion-molekula.



Slika 2.8. Shematski prikaz instrumenta s tri kvadrupola (prilagođeno iz ref.4)

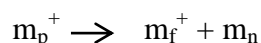
Postoje tri načina snimanja u takvoj tandemnoj spektrometriji masa (slika 2.9). Ako se snima ion produkta ili ion fragmenta, u Q1 se odabere ion određenog omjera m/z koji u q podliježe sudaru s molekulama plina, a nastali fragment se analizira u Q3. Drugi način snimanja je snimanje iona prekursora gdje se u Q3 odabere ion određenog omjera m/z , a prvim se kvadrupolom selektiraju ioni iz kojih reakcijama ili fragmentacijom u q nastaju ti ioni. Treći način snimanja je kada je u oba kvadrupola Q1 i Q3 podešena konstantna razlika u masi a koja odgovara neutralnom gubitku te se ovdje detektiraju ioni mase m iz kojih u q nastaju ioni mase $m-a$.⁴



Slika 2.9. Različiti načini snimanja u tandemnoj spektrometriji masa (prilagođeno iz ref.4)

2.1.6. Tandemna spektrometrija masa

Tandemna spektrometrija masa, ili skraćeno MS/MS, je metoda koja uključuje barem dva koraka analize mase, bilo da dolazi do disocijacije molekula ili kemijske reakcije koja uzrokuje promjenu omjera mase i naboja iona. Prvi analizator se koristi za selekciju iona prekursora koji u reakcijama fragmentacije daje neutralne fragmente i ione produkte koji se analiziraju u drugom analizatoru:



gdje je m_p^+ masa iona prekursora, m_f^+ masa iona produkta, a m_n masa neutralne molekule.⁴

Broj koraka u tandemnoj spektrometriji masa može se povećati pri čemu dobivamo MSⁿ eksperimente (n = broj generacija iona koji se analizira). Tandemna spektrometrija masa može se provoditi u vremenu i prostoru. MSⁿ spektrometrija u vremenu postiže se korištenjem ionske stupice, orbitrapa ili FT-ICR analizatora masa, a u prostoru povezivanjem više sukcesivnih analizatora u nizu.⁴ Tandemna spektrometrija masa zahtijeva fragmentaciju iona prekursora odabranih pomoću prvog analizatora kako bi se u drugom analizatoru analizirali ioni produkta. Ioni koji napuštaju ionski izvor mogu se svrstati u tri kategorije: ioni koji stižu do detektora, a da na tom putu ne dođe do fragmentacije; ioni koji fragmentiraju već u ionskom izvoru pa do detektora dolaze samo ioni fragmenata, te metastabilni ioni koji iz ionskog izvora izlaze bez fragmentacije, međutim fragmentiraju prije nego ion stigne do detektora.⁴ Da bi se olakšala strukturna analiza promatrane molekule, ion prekursor se aktivira kolizijom induciranom disocijacijom (engl. *collision induced dissociation*, CID) ili kolizijom aktiviranom disocijacijom (engl. *collision activated decomposition*, CAD) pri čemu dolazi do povećanja unutrašnje energije, a time i povećanja učestalosti fragmentacije. Ovako inducirana disocijacija uključuje proces od dva koraka. Prvi korak je jako brz (10^{-14} – 10^{-16} s), te se sastoji od kolizije iona i inertnog plina (N₂, Ar ili He) gdje se dio translacijske energije iona pretvara u unutrašnju energiju, te ion prelazi u pobuđeno stanje. Drugi korak je dekompozicija aktiviranog iona.⁴

Način fragmentacije molekula ovisi o količini dovedene energije, a ne o metodi aktivacije iona. S obzirom da je energija jednako raspodijeljena unutar molekule, mjesta cijepanja će biti najslabije veze u molekuli. Iz tog razloga molekule s više atoma trebaju više energije ili više vremena za fragmentaciju.⁴

Postoji nekoliko metoda aktivacije iona kroz sudare. Najčešće je to sudar ubrzanih iona s molekulama inertnog plina. U instrumentima s prostorno odvojenim analizatorima,

između dva analizatora postavljena je kolizijska ćelija. To je zapravo mala komora s ulaznim i izlaznim otvorima koja sadrži inertni plin pod dovoljnim tlakom za sudare s ionima. U MS/MS instrumentima koji se temelje na vremenski odvojenim koracima analize jednostavno se uvodi inertni plin u ionsku stupicu ili ICR.⁴

Za fragmentaciju pri visokoj energiji (nekoliko tisuća eV) koriste se analizatori s magnetskim sektorom ili TOF. U takvim uređajima, kolizijska ćelija je smještena između dva analizatora, a najčešće korišten inertni plin je He. Zbog visoke energije dolazi do elektronske ekscitacije iona te pucanja veza prostorno udaljenih od atoma koji nose naboj.⁴

Za fragmentaciju kod nižih energija (1–100 eV) koriste se trostruki kvadrupol, ionska stupica i ICR analizatori. Povećanje unutarnje energije dovoljno je za vibracijsko pobuđivanje iona te nakon dostizanja određene količine energije dolazi do cijepanja najslabijih veza u molekuli, te su ovdje fragmentacijski mehanizmi usmjereni nabojem, tj. pucaju veze u blizini atoma koji nosi naboj. Kod niže energije koriste se teži plinovi kao što su argon, ksenon ili kripton jer dopuštaju prijenos više energije.^{4,10}

Razvijene su i druge metode aktivacije kao što su:

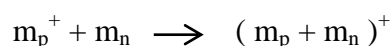
- SID – površinom inducirana disocijacija (engl. *surface induced dissociation*),
- IRMPD – fotodisocijacija ili infracrvena multifotonska disocijacija (engl. *photodissociation or infrared multiphoton dissociation*),
- ECD – disocijacija uvjetovana zahvatom elektrona (engl. *electron capture dissociation*),
- ETD – disocijacija prijenosom elektrona (engl. *electron transfer dissociation*).⁴

2.1.7. Reakcije u tandemnoj spektrometriji masa

Najčešća vrsta reakcije nastala kolizijom sa neutralnom molekulom N odgovara promjeni mase:



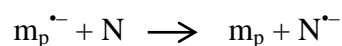
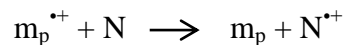
Ako je plin s kojim se sudaraju ioni kemijski reaktivna vrsta može doći do reakcije udruživanja te dobivamo ion adukt s masom većom od iona prekursora:



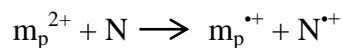
Ove dvije vrste reakcija također su uočene pri koliziji negativnih iona.

Ostale vrste reakcija nastale kolizijom uključuju promjenu naboja:

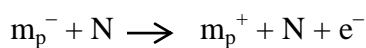
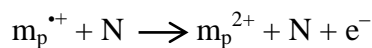
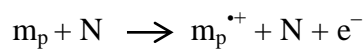
1. Izmjena naboja:



2. Djelomični prijenos naboja:



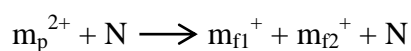
3. Uklanjanje ili inverzija naboja:



Promjena naboja može biti kombinirana sa promjenom mase:



reakcija koja odgovara gubitku naboja i



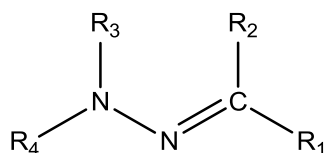
reakcija koja odgovara odvajanju naboja.

Vrsta reakcije koja se promatra ovisi o kinetičkoj energiji iona prekursora koji se sudara s neutralnom molekulom N.

MS/MS spektri se koriste za određivanje strukture, određivanje mehanizma fragmentacije, promatranje reakcija ion–molekula i određivanje termokemijskih podataka.⁴

2.2. Aroilhidrazoni

Hidrazoni su organski spojevi osnovne strukture:



Nastaju reakcijom hidrazina s ketonom ili aldehidom. Aroilhidrazoni nastaju reakcijom aroilhidrazida i ketona ili aldehida i široko su korišteni kao ligandi u koordinacijskoj kemiji. Biološka aktivnost može se pripisati azometinskoj skupini C=N. Oba dušikova atoma su nukleofilnog karaktera, dok atom ugljika posjeduje i elektrofilni i nukleofilni karakter.¹²

Aroilhidrazoni istražuju se zbog svoje farmakološke primjene. Biološka važnost ovih spojeva uključuje antimikrobno, antituberkulozno i protuupalno djelovanje. Također, njihova sposobnost stvaranja kompleksa s metalnim kationima ih čini dobrim analitičkim reagensima za spektrofotometrijsko i spektrofluorimetrijsko određivanje metala, primjerice željeza, nikla, kobalta i bakra.¹ Način koordinacije hidrazonskih liganada ovisi o različitim čimbenicima kao što su uvjeti reakcije, stabilnost nastalog kompleksa, te položaj, broj i priroda supstituenata vezanih na hidrazonski dio molekule. Detaljno su proučavani kompleksi aroilhidrazona dobivenih iz hidrazida nikotinske kiseline sa niklom(II), cinkom(II), aluminijem(III), kadmijem(II), manganom(II) i bakrom(II).¹³

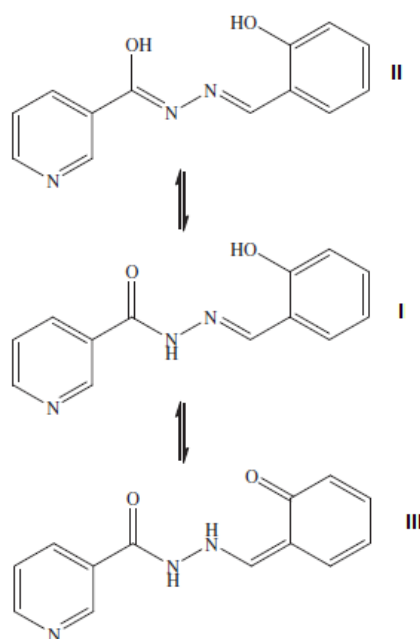
Aroilhidrazoni tipa R-CONH-N=CH-R' dobiveni kondenzacijom aromatskih aldehida i aroilhidrazida čine niz biološki aktivnih liganada koji se koriste u medicinskoj biokemiji. Pogodni supstituenti mogu poboljšati njihova koordinacijska svojstva. Tako primjerice aroilhidrazoni sintetizirani iz salicilaldehida imaju bolja vezna svojstva od onih izvedenih iz benzaldehida zbog dodatne hidroksilne skupine smještene u *ortho* položaju prema dvostrukoj vezi C=N. Proučavan je utjecaj supstituenata na aldehidnom dijelu molekule na svojstva aroilhidrazona s ciljem pripreme novih farmakološki aktivnih spojeva. Promjene u položaju supstituenata mijenjaju svojstva hidrazona, a time dovode do raznolikosti u njihovom potencijalnom terapijskom djelovanju.¹⁴

Poznato je da aroilhidrazoni podliježu keto-enolnoj tautomeriji (slika 2.10). Stabilizacija intramolekulskim te intermolekulskim vodikovim vezama aroilhidrazona s

otapalom čini ketoaminski tautomer (forma I) stabilnijim u otopini.¹⁵⁻¹⁷ Istraživanja su pokazala da kompleksiranje s metalnim ionima uglavnom pogoduje nastanku enoliminskog (forma II) tautomera, gdje hidrazon veže ion metala preko enolnog i fenolnog kisika te azometinskog dušika.¹³ Međutim, kao što je utvrđeno u slučaju kompleksa sa Zn(II), veza s ionom metala može biti ostvarena preko karbonilnog kisika, azometinskog dušika i fenolnog kisika te se ligand u kompleksu nalazi u formi I.¹³

Potvrđeno je i postojanje *E/Z* izomerizacije oko dvostruke $-C=N-$ veze.¹⁶ Različiti tautomerni i izomerni oblici imaju različita spektralna svojstva pa ih se može razlikovati na temelju njihovih IR, UV-Vis i NMR spektara.^{16,18} U slučaju hidrazona nastalih iz hidrazida izonikotinske kiseline pokazalo se kako je u značajnijoj količini prisutan manje stabilan *Z* izomer.¹⁸

Kod aroilhidrazona dobivenih kondenzacijom salicilaldehida i nikotinohidrazida može doći do dodatne tautomerizacije jer se hidroksilna skupina nalazi u *ortho* položaju u odnosu na $C=N$ azometinsku vezu (forma III). Na slici 2.10 prikazane su strukture sva tri moguća tautomera.



Slika 2.10. Tautomeri aroilhidrazona dobivenog iz salicilaldehida i nikotinohidrazida¹⁶

2.2.1. ESI-MS i MS/MS analiza aroilhidrazona dobivenih iz nikotinohidrazida

U radu D. Stražić i suradnika provedena je detaljna strukturna analiza aroilhidrazona dobivenih iz nikotinohidrazida spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem. Snimljeni su MS spektri u pozitivnom, ESI(+), i negativnom načinu rada, ESI(-), kao i MS/MS spektri, te su na temelju dobivenih rezultata predložene sheme fragmentiranja. Bazni signali u MS spektrima odgovaraju ionima $[M+H]^+$ i $[M-H]^-$. Pokazano je da različiti faktori kao što su pH, koncentracija elektrolita i sastav otapala utječu na zastupljenost pojedinih iona. Utjecaj otapala proučen je usporedbom MS spektara uzoraka u metanolu, acetonitrilu te uz dodatak natrijeva acetata. Metanol i acetonitril su polarna otapala i imaju slična svojstva kao što su površinska napetost, hlapljivost i dielektrična konstanta. Metanol je protično, a acetonitril aprotično otapalo stoga drugačija učinkovitost nastajanja iona može rezultirati različitim intenzitetima signala u spektru. Kod dodatka natrijeva acetata intenziteti signala adukata natrija znatno su povećani i signal iona $[M+Na]^+$ postaje bazni signal.¹⁹

Interpretacija MS/MS spektara aroilhidrazona dobivenih iz nikotinohidrazida i 3-metoksi- te 4-metoksisalicilaldehida, pokazala je da u slučaju ta dva izomera, dolazi do razlike u intenzitetima signala zbog različitih fragmentacijskih puteva. U slučaju 3-metoksi izomera, u spektru je uočen novi signal koji se pojavljuje zbog tautomerne konverzije amidnog djela molekule u ketoamino oblik. U slučaju 4- metoksi izomera, ne dolazi do tautomerne promjene i amidni dio molekule je u enolnom obliku tako da navedeni signal nije uočen.¹⁹

2.3. Galij i kompleksi galija(III)

Galij je rijedak kemijski element, pripada 13. grupi elemenata, srebrne je boje i lako se tali. Tragove galija nalazimo u svim rudama aluminijske, a nađen je i u rudama cinka. Elementarni galij dobiva se elektrolizom lužnate otopine galijeva hidroksida. Karakterističan je po vrlo niskom talištu od 29,8 °C. Vrelište mu je visoko (oko 2000 °C) pa je u tekućem agregatnom stanju u najširem području temperature u usporedbi s drugim tvarima koje su također tekućine pri temperaturi blizu sobne. Spojevi galija pripadaju stupnjevima oksidacije +1, +2 i +3, međutim, +1 spojevi galija nisu sa sigurnošću potvrđeni. Spojevi galija stupnja oksidacije +3 slični su odgovarajućim spojevima aluminijske i željezne.²⁰

Tijekom posljednjih godina galij je proučavan zbog široke primjene njegovih kompleksnih spojeva. Kompleksi galija su bioaktivni spojevi, a primjenjuju se i kao materijali u optoelektroničkim uređajima, kao katalizatori i slično. Jaka motivacija za nastavak istraživanja spojeva galija je sposobnost galij(III) nitrata za inhibiranje staničnog rasta tumora *in vivo* i *in vitro*.²¹ Međutim, u vodenim otopinama, mali, ali visoko nabijeni galij(III) ioni gotovo potpuno hidroliziraju u širokom rasponu pH područja i pritom stvaraju različite vrste hidroksida. Da bi se spriječila hidroliza, galij se koordinira s organskim ligandima, takvi galij(III) kompleksi postaju hidrolitički stabilni, posjeduju bolju oralnu biodostupnost te sposobnost prodiranja u membranu.²¹⁻²⁴

Galijevi(III) ioni kompleksirani sa aroilhidrazonima imaju širok spektar terapijskih učinaka, među kojima se ističu njegova antiproliferativna svojstva. Galij se akumulira na mjestima ubrzane celularne proliferacije, posebice u malignim tkivima. Glavni mehanizmi djelovanja galija temelje se na sličnosti kemijskih svojstava sa željezom. Zamjenom željeza(III) s galijem(III) blokira se djelovanje ribonukleotidne reduktaze. Galij ometa apsorpciju i metabolizam željeza, te inducira apoptozu proliferirajućih stanica. Provedena su istraživanja gdje je uspoređena antiproliferativna aktivnost galijeva nitrata i Ga-PIH (pirodoksal-izonikotinoil-hidrazon). Pokazano je da je Ga-PIH aktivniji u smislu inhibicije rasta tumorskih stanica nego sam PIH ili galijev nitrat. Razlog tome je što PIH djeluje kao lipofilni prijenosnik preko stanične membrane. Međutim, ne djeluju svi ligandi klase aroilhidrazona na isti način. U slučaju galijevog kompleksa sa salicilaldehid-*para-t*-butilbenzoil hidrazonom nije se pokazao veći učinak nego kao kod samog liganda, pa se može zaključiti kako promjene u položaju supstituenata mjenjaju svojstva spojeva, a time i njihovo djelovanje.^{14,25}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije:

N'-saliciliden-3-piridinkarbohidrazid (skraćeno **H₂L1**)

N'-(2-hidroksi-3-metoksifenilmetiliden)-3-piridinkarbohidrazid (skraćeno **H₂L2**)

N'-(2-hidroksi-4-metoksifenilmetiliden)-3-piridinkarbohidrazid (skraćeno **H₂L3**)

N'-(2-hidroksi-5-metoksifenilmetiliden)-3-piridinkarbohidrazid (skraćeno **H₂L4**)

Galijev nitrat hidrat, Ga(NO₃)₃ · nH₂O, p.a. čistoća, *Alfa Aesar*

Dimetilsulfoksid, DMSO, p.a. čistoća, *Carlo Erba*

Metanol, CH₃OH, HPLC čistoće, *J. T. Baker*

Galijev(III) perklorat, Ga(ClO₄)₃ – otopina koncentracije 0,01 mol L⁻¹, u vodi

Perklorna kiselina, HClO₄, ishodna otopina koncentracije 0,1 mol L⁻¹, u vodi

Aroilhidrazone je sintetizirao dr. sc. Darko Kontrec na Institutu Ruđer Bošković prema metodi opisanoj u radu T. Benkovića i sur.¹⁷

Otopine galijeva perklorata i perklorne kiseline su ustupljene od strane doc. dr. sc. Ane Budimir sa Farmaceutsko–biokemijskog fakulteta.

3.2. Instrumentacija

Spektri su snimljeni spektrometrom masa Agilent Technologies 6420 Triple Quadrupole uz direktno uvođenje uzoraka preko Agilent 1200 HPLC sustava te uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor. Injektirano je po 5 µL otopine uzorka uz protok mobilne faze od 0,2 mL min⁻¹. Spektri su snimljeni uz pozitivnu ionizaciju ESI(+) u području vrijednosti *m/z* od 10 do 1000. Potencijal na kapilari iznosio je 4 kV, napon fragmentora 135 V, protok plina (N₂) 0,6 dm³ min⁻¹ i temperatura 300 °C. U tandemnoj spektrometriji masa korištene su kolizijske energije 20 –30 V. Kao kolizijski plin korišten je dušik.

3.3. Priprema otopina

3.3.1. Priprema ishodnih otopina aroilhidrazona i galija

Ishodne otopine aroilhidrazona su pripravljene otapanjem određene količine pojedinih aroilhidrazona u metanolu tako da konačne koncentracije iznose $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.2. Priprema otopina kompleksa

Otopine kompleksa pripravljene su miješanjem ishodnih otopina: vodena otopina galijevog perklorata uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,52$) i metanolna otopina hidrazona, tako da je konačan omjer metanol:voda iznosio 1:1. Konačna koncentracija liganda bila je $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a omjer metala i liganda 1:1 i 1:2 za spoj **H₂L1**, odnosno 1:1, 1:2 i 1:4 s ligandima **H₂L2-H₂L4**.

Ispitan je i utjecaj klorovodične kiseline na izgled spektara. Otopine su pripravljene na isti način kako je prethodno opisano, jedino je umjesto perklorne kiseline dodana klorovodična kiselina.

3.4. Spektrometrija masa

3.4.1. MS i MS/MS spektri otopina izoliranih kompleksa galija(III) i aroilhidrazona

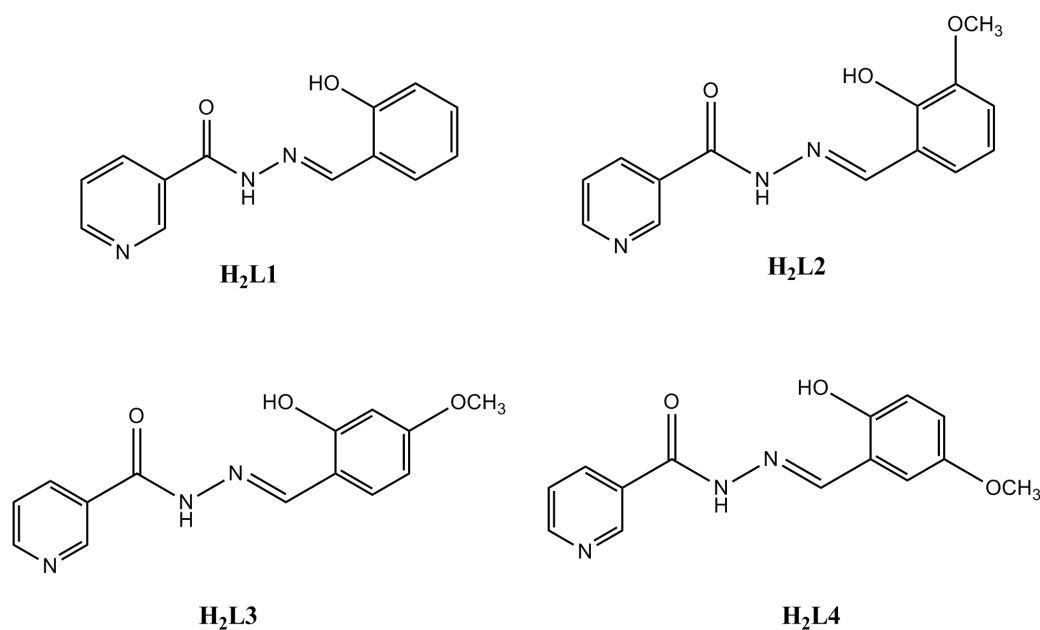
Otopine za snimanje MS i MS/MS spektara priređene su na sljedeći način: izoliran kompleks otopljen je u 100 μL DMSO te je dodan metanol do 10,0 mL. Koncentracija kompleksa iznosila je $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Otopina je uvedena u instrument pomoću mobilne faze sastava metanol:voda 1:1. Snimljeni su MS i MS/MS spektri u pozitivnom načinu rada.

3.4.2. MS i MS/MS spektri otopina galija(III) i aroilhidrazona

MS i MS/MS spektri otopina kompleksa galija i aroilhidrazona (priprava opisana pod 3.3.2) snimani su tako da su otopine kompleksa uvedene u instrument pomoću mobilne faze sastava metanol/voda 1/1. Snimljeni su MS i MS/MS spektri u pozitivnom načinu snimanja.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedena je detaljna karakterizacija kompleksnih spojeva galija(III) i aromatskih hidrazona izvedenih iz nikotinhidrazida i salicilaldehida te njegovih metoksi derivata u sustavu otapala metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu te klorovodičnu kiselinu. Snimljeni su ESI(+) MS te MS/MS spektri otopina galijeva(III) perklorata i navedenih aromatskih hidrazona pri čemu je variriran omjer metala i liganda. Uzorci su snimljeni odmah po pripravi otopina i nakon 24 sata budući da je spektrofotometrijskim mjerenjima određeno vrijeme potrebno za uspostavljanje ravnoteže od približno jednog sata. Također su snimljeni i analizirani MS spektri otopina čvrstih kompleksa sa navedenim ligandima. Tandemna spektrometrija masa provedena je na odabranim pozitivno nabijenim ionima te su predložene odgovarajuće sheme fragmentiranja. Strukture aroilhidrazona prikazane su na slici 4.1.

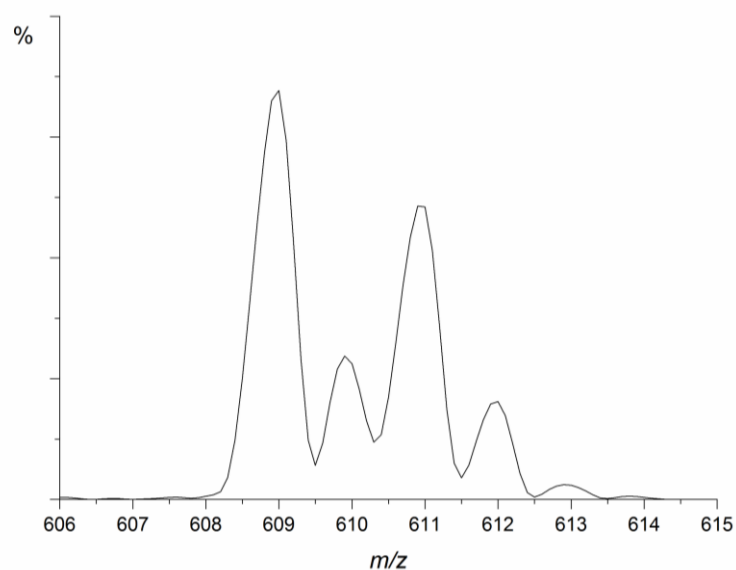


Slika. 4.1. Strukture istraživanih aroilhidrazona

Galij ima dva stabilna izotopa ^{69}Ga i ^{71}Ga udjela približno 60% i 40% (Tablica 4.1). U MS spektrima nastalih kompleksa uočena je karakteristična izotopna raspodjela za ione koji sadrže galij pa su se odgovarajući signali nalazili na vrijednostima m/z i $m/z + 2$. U daljnjem tekstu opisani su ioni mase koja odgovara najzastupljenijem izotopu metala, ^{69}Ga (slika 4.2).

Tablica 4.1. Izotopna raspodjela galija

Izotop galija	Prirodna rasprostranjenost / %
^{69}Ga	60,12
^{71}Ga	39,88

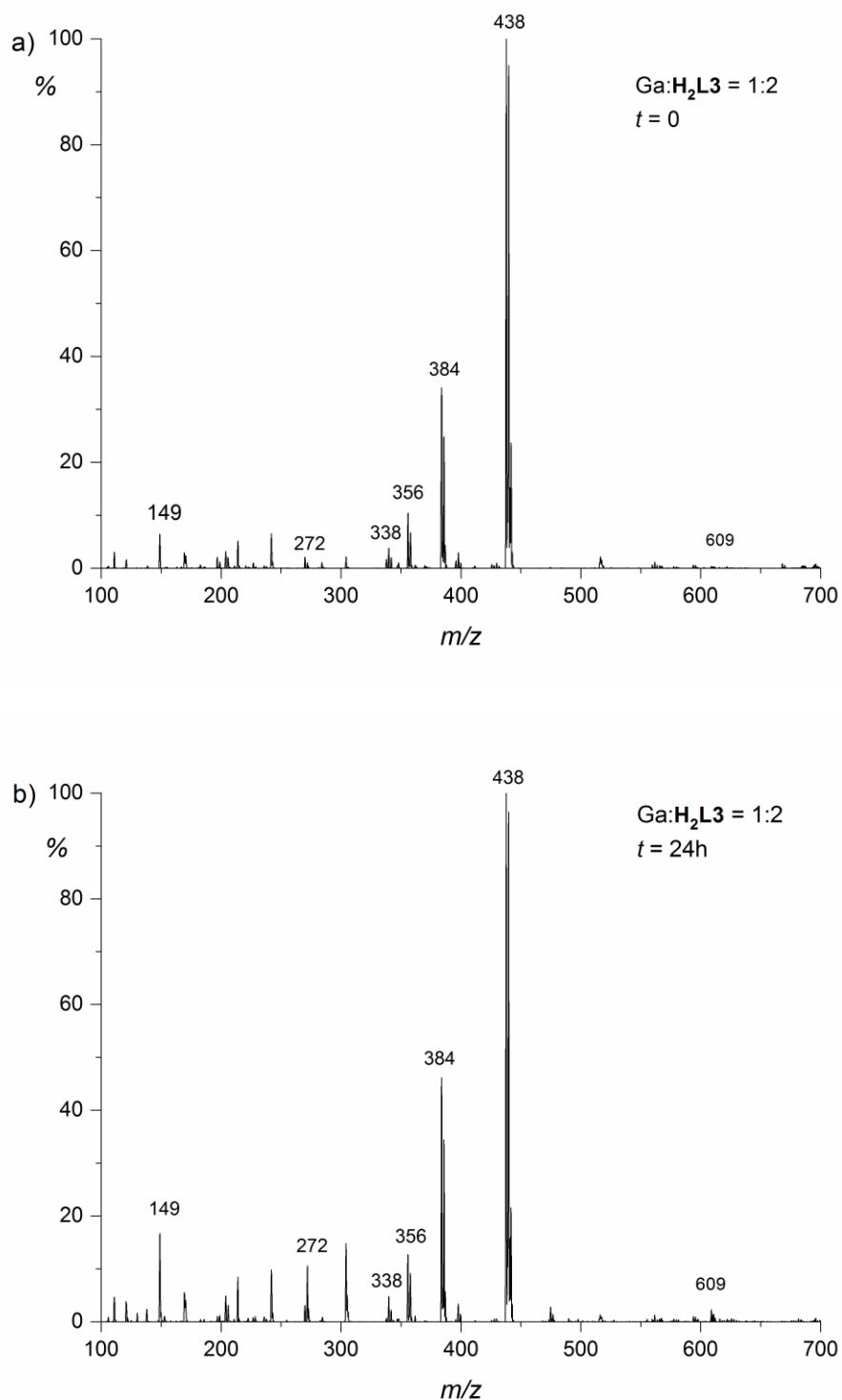
Slika 4.2. Izotopna raspodjela za ion kompleksa $[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$ pri m/z 609

4.1. MS spektri otopina galija(III) i spojeva H₂L1–H₂L4

Snimljeni su spektri masa otopina galijeva(III) perklorata i aroilhidrazona u omjeru 1:2 odmah pri pripravi otopine i nakon 24 sata te su prikazani na slikama 4.3 i D1–D4. Relativni intenziteti signala dani su u tablici 4.2. Također su snimljeni i spektri otopina molarnih omjera metal:ligand 1:1 i 1:4 te su rezultati prikazani u tablicama D1 i D2.

U svim spektrima uočen je signal molekulskog iona pri m/z 549 za kompleks Ga-H₂L1, odnosno pri m/z 609 za ostale komplekse, koji odgovara kompleksu galija s dvije molekule liganda. Povećanjem udjela liganda (povećanje molarnog omjera metal:ligand s 1:1 do 1:4) povećava se udio iona pri m/z 609 (tablica D3). Signal pri m/z 408, odnosno m/z 438, koji odgovara kompleksu galija s jednom molekulom dvostruko deprotoniranog liganda te perklornom kiselinom je osnovni signal u spektrima otopina Ga-H₂L2 i Ga-H₂L3. Signal pri m/z 326, odnosno m/z 356, odgovara kompleksu galija i jedne molekule liganda s vodom. Signal m/z 308, odnosno m/z 338 odgovara kompleksu galija i jedne molekule liganda. Pojava ovog signala, kao i signala koji odgovaraju kompleksu galija i jedne molekule liganda na koje su vezane razne molekule kao što su perklorna kiselina i voda, ukazuje na to da u otopini nastaju ne samo kompleksi u kojima je omjer Ga i liganda 1:2, već i kompleksi omjera 1:1.

Također je u spektrima masa uočen i signal pri m/z 310, odnosno m/z 340, koji bi se mogao asignirati ionima $[^{71}\text{Ga}(\text{III})(\text{L})]^+$ i $[^{69}\text{Ga}(\text{I})(\text{H}_2\text{L})]^+$. U spektrima kompleksa Ga-H₂L1 osnovni signal je pri m/z 242 što odgovara protoniranoj molekuli liganda, a to ukazuje na postojanje neizreagiranih molekula liganda u otopini, odnosno najmanjoj stabilnosti tog kompleksa. U svim spektrima uočeni su i signali u području vrijednosti m/z od 78 do 148 koji odgovaraju ionima nastalim fragmentacijom dijela molekule koji potječe iz hidrazina i detaljno su opisani u radu D. Stražić¹⁹ te neće biti opisivani u ovom radu (slika 4.4). Bitnijih razlika između spektara otopina snimljenih odmah po pripravi i nakon 24 sata nema. Predložene strukture iona navedenih kompleksa prikazane su na slici 4.5.

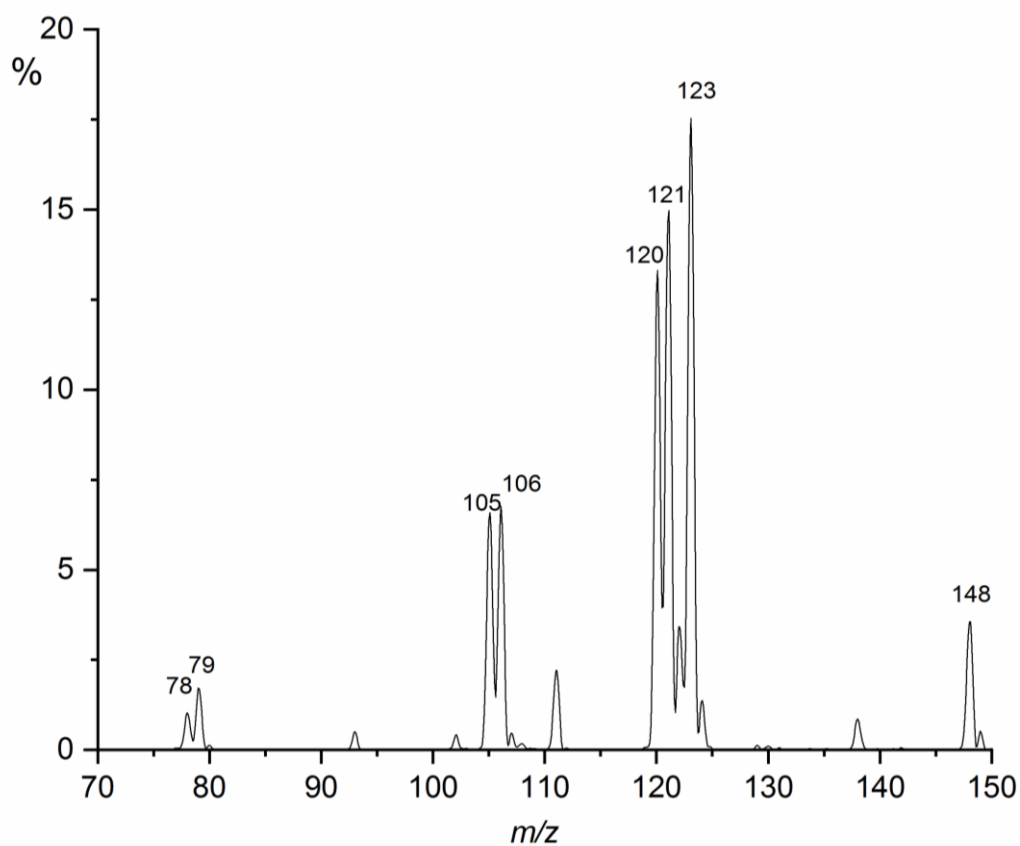


Slika 4.3. Spektri masa otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona H_2L3 i u omjeru 1:2 ($c(H_2L3) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(Ga^{3+}) = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(HClO_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52), a) odmah po pripravi otopine i b) 24 sata nakon priprave otopine. Napon fragmentora 135 V.

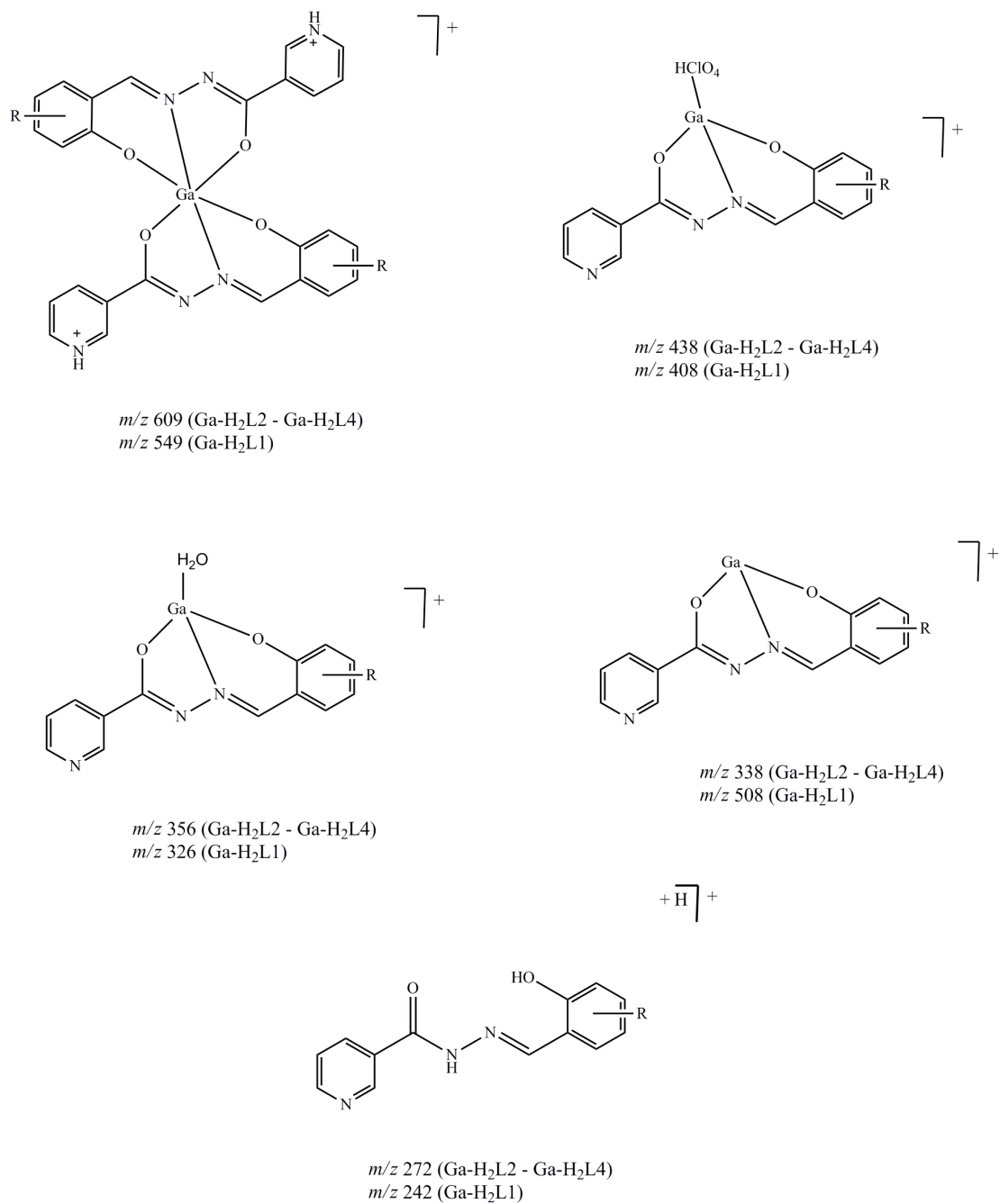
Tablica 4.2. Vrijednosti m/z i relativni intenziteti signala očitani iz spektara masa otopina galijeve(III) perklorata i hidrazona $\mathbf{H_2L1-H_2L4}$ molarnog omjera 1:2 ($c(\mathbf{H_2L}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u otapalu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 2,52$) snimljenih odmah po pripravi otopine i nakon 24 sata

m/z	Rel. intenzitet / %		m/z	Rel. intenzitet / %						Ion
	Ga- $\mathbf{H_2L1}$			Ga- $\mathbf{H_2L2}$		Ga- $\mathbf{H_2L3}$		Ga- $\mathbf{H_2L4}$		
	$t = 0$	$t = 24\text{h}$		$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	
549	16,62	18,68	609	25,37	16,49	0,19	1,93	13,45	8,52	$[\text{Ga}(\mathbf{HL})_2]^+$
408	1,76	3,63	438	92,35	100	100	100	76,92	82,28	$[\text{Ga}(\mathbf{L})(\text{HClO}_4)]^+$
326	2,24	4,47	356	47,00	58,17	10,26	12,72	30,39	30,72	$[\text{Ga}(\mathbf{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$
310	2,72	6,44	340	12,72	11,28	3,35	4,32	8,38	8,48	$[\text{}^{71}\text{Ga}(\text{III})(\mathbf{L})]^{++}$ $[\text{}^{69}\text{Ga}(\text{I})(\mathbf{H_2L})]^+$
308	0,57	0,51	338	8,72	8,58	1,70	0,71	2,72	2,77	$[\text{Ga}(\mathbf{L})]^+$
242	100	100	272	100	79,45	1,01	10,57	54,40	34,46	$[\mathbf{H_2L} + \text{H}]^+$

*Signali relativnog intenziteta 100% pripisani su izotopnom signalu ili aduktima koji nisu navedeni u tablici.



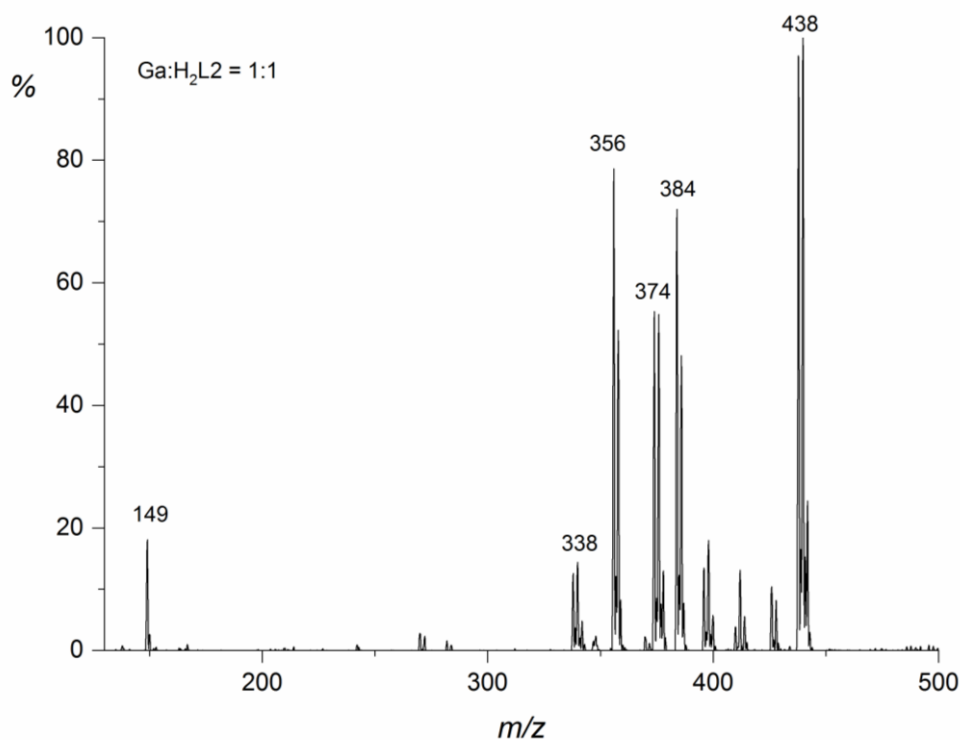
Slika 4.4. Uvećani prikaz dijela spektra od m/z 70 do m/z 150 iz spektra otopine kompleksa Ga-**H₂L3** (molarni omjer metal:ligand 1:2, $t = 24$ h)



R = H (H₂L₁) ; OCH₃ (H₂L₂-H₂L₄)

Slika 4.5. Strukture iona predložene na temelju MS spektara otopina galija i liganada **H₂L1-H₂L4**

Dodatno su snimljeni spektri kompleksa Ga-**H₂L2**, Ga-**H₂L3** i Ga-**H₂L4** u sustavu otapala metanol/voda uz dodatak klorovodične kiseline kako bi se provjerio utjecaj kiseline na izgled MS spektara. Spektar masa kompleksa Ga-**H₂L2** prikazan je na slici 4.6, a relativni intenziteti dobivenih iona u tablici 4.3. Za ione koji sadrže osim galija i klor (koji se uglavnom sastoji od ³⁵Cl i ³⁷Cl, 76% i 24%) uočeni su i izotopni signali pri m/z +4. Izotopni signali iona koji sadrže i galij i klor na vrijednostima m/z +2 mogu biti posljedica kombinacije ⁶⁹Ga i ³⁷Cl ili ⁷¹Ga i ³⁵Cl. Uočeni su signali iona pri m/z 438 [Ga(L)(HClO₄)]⁺, m/z 374 [Ga(L)(HCl)]⁺, m/z 356 [Ga(L)(H₂O)]⁺, m/z 338 [Ga(L)]⁺ i m/z 272 [**H₂L**+H]⁺. Signali iona [**H₂L**+H]⁺ niži su nego u slučaju kada je korištena perklorna kiselina što znači da hidrazon nije znatno disociran ili da je došlo do supresije signala. Signali iona [Ga(L)(HCl)]⁺ pri m/z 374 relativnog intenziteta oko 50% primijećeni su samo kad je korištena klorovodična kiselina. Struktura tog iona prikazana je na slici 4.7. Signali dvostruko nabijenih iona nisu uočeni, kao ni signali koji odgovaraju aduktima s metanolom.

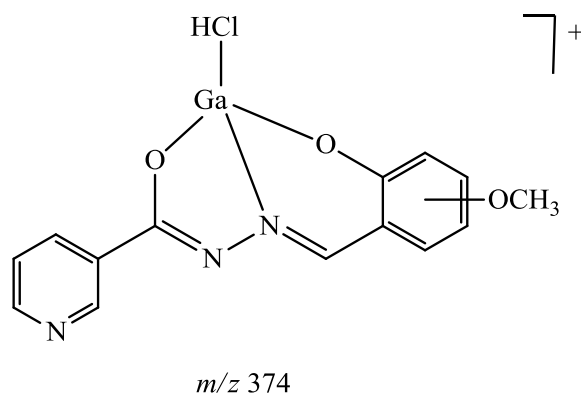


Slika 4.6. Spektar masa otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona **H₂L2** u omjeru 1:1 ($c(\mathbf{H}_2\mathbf{L}) = c(\text{Ga}^{3+}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol/voda 1/1 uz klorovodičnu kiselinu ($c(\text{HCl}) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52) snimljen 24 sata nakon pripreve otopine

Tablica 4.3. Vrijednosti m/z i relativni intenziteti signala očitani iz spektara masa otopina galijeve(III) perklorata i hidrazona **H₂L1–H₂L4** molarnog omjera 1:1 ($c(\text{H}_2\text{L}) = c(\text{Ga}^{3+}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu otapala metanol/voda 1/1 uz klorovodičnu kiselinu ($c(\text{HCl}) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52)

Ion	m/z	Relativni intenzitet / %		
		Ga-H ₂ L2	Ga-H ₂ L3	Ga-H ₂ L4
[Ga(L)(HClO ₄)] ⁺	438	97,05	80,37	84,13
[Ga(L)(HCl)] ⁺	374	55,34	48,94	47,94
[Ga(L)(H ₂ O)] ⁺	356	78,60	28,09	35,00
[Ga(L)] ⁺	338	12,59	1,87	2,95
[H ₂ L + H] ⁺	272	2,38	0,88	3,53

*Signali relativnog intenziteta 100% pripisani su izotopnom signalu ili aduktima koji nisu navedeni u tablici.

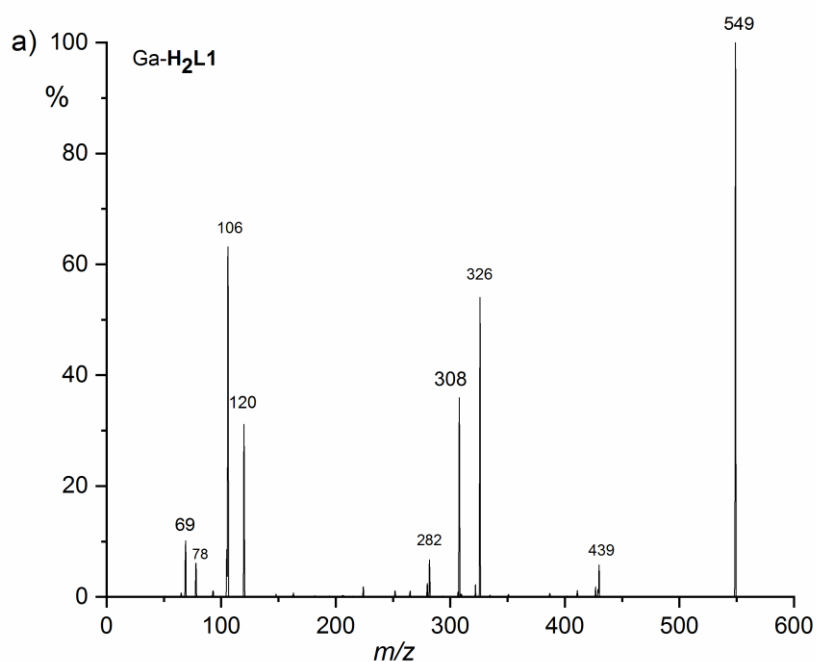


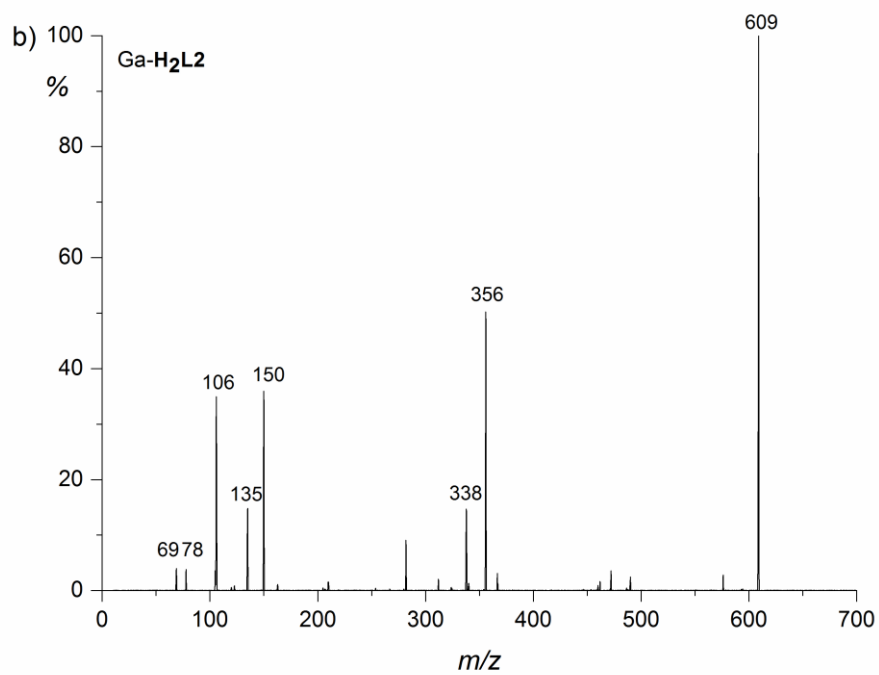
Slika 4.7. Predložena struktura iona sa signalom pri m/z 374 u spektrima otopina kompleksa u sustavu metanol/voda 1/1 uz klorovodičnu kiselinu

4.1.1. ESI(+) MS/MS analiza odabranih iona

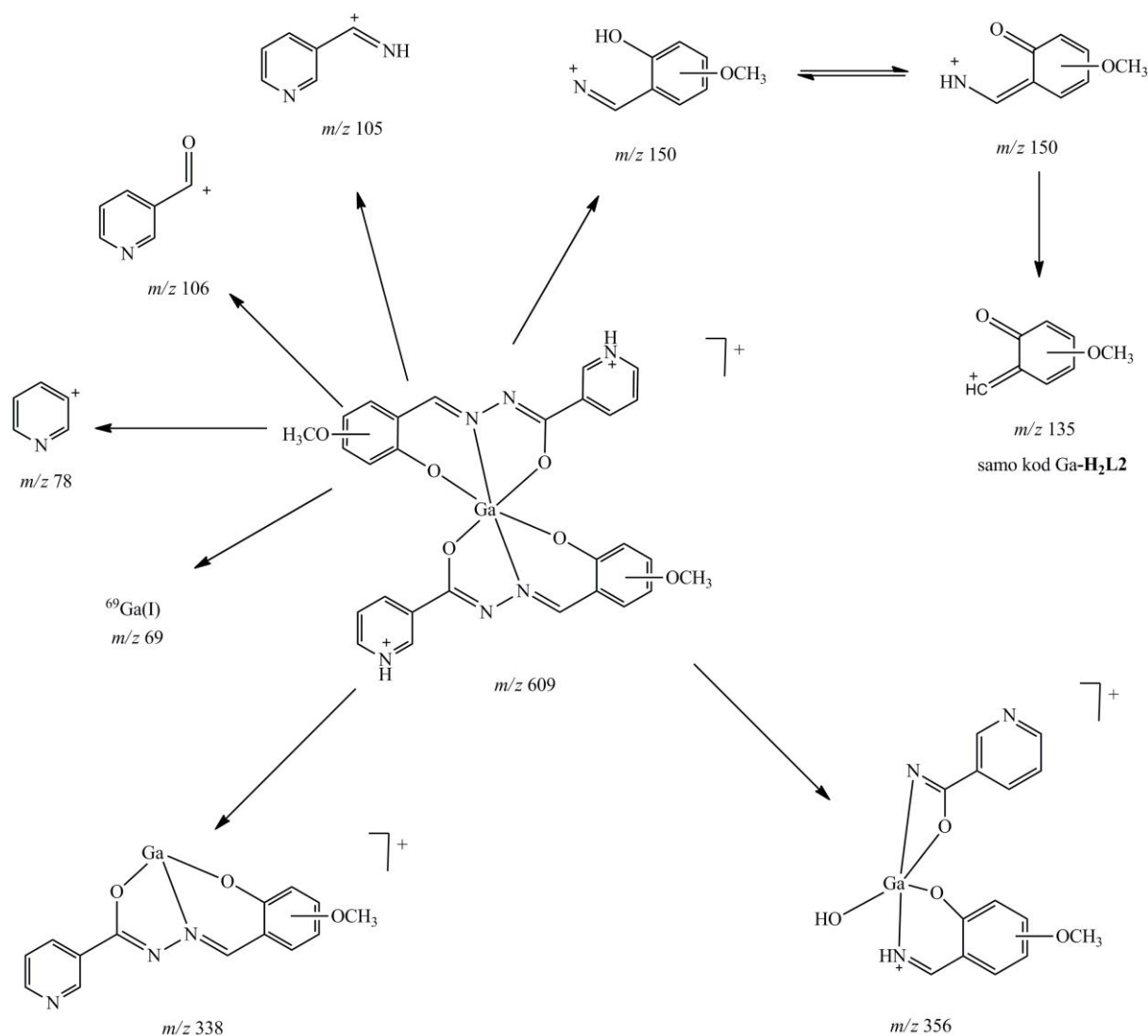
Snimljeni su ESI(+) MS/MS spektri masa iona vrijednosti m/z 549, m/z 408, m/z 326 i m/z 310 za kompleks Ga-**H₂L1** i vrijednosti m/z 609, m/z 438, m/z 356 i m/z 338 za ostale komplekse.

U ESI(+) MS/MS spektrima iona m/z 549 i m/z 609 (slika 4.8) osnovni su signali ujedno i signali molekulskih iona što ukazuje na to da su veze između galija i liganda jake te teško pucaju. Ion m/z 549, odnosno m/z 609 sadrži dvije molekule liganda te fragmentacijom obje molekule liganda nastaju ioni pri m/z 326, odnosno m/z 356, a gubitkom jedne molekule liganda ioni pri m/z 338, odnosno m/z 308, s time da su signali pri m/z 356 i m/z 326 većeg intenziteta u svim kompleksima. Također su uočeni i signali iona koji potječu od hidrazida, pri m/z 106, m/z 105 i m/z 78. Signali navedenih iona su visokih intenziteta (10–60%) što znači da veze unutar liganda lako pucaju. Uočen je i ion pri m/z 150 koji potječe od aldehida. Samo u spektru kompleksa galija sa ligandom **H₂L2** uočen je i ion m/z 135 koji može nastati iz iona m/z 150 koji se nalazi u keto tautomernom obliku.¹⁹ Predložene sheme fragmentiranja prikazane su na slikama 4.9 i D4, a relativni intenziteti dobivenih iona u tablici D4.





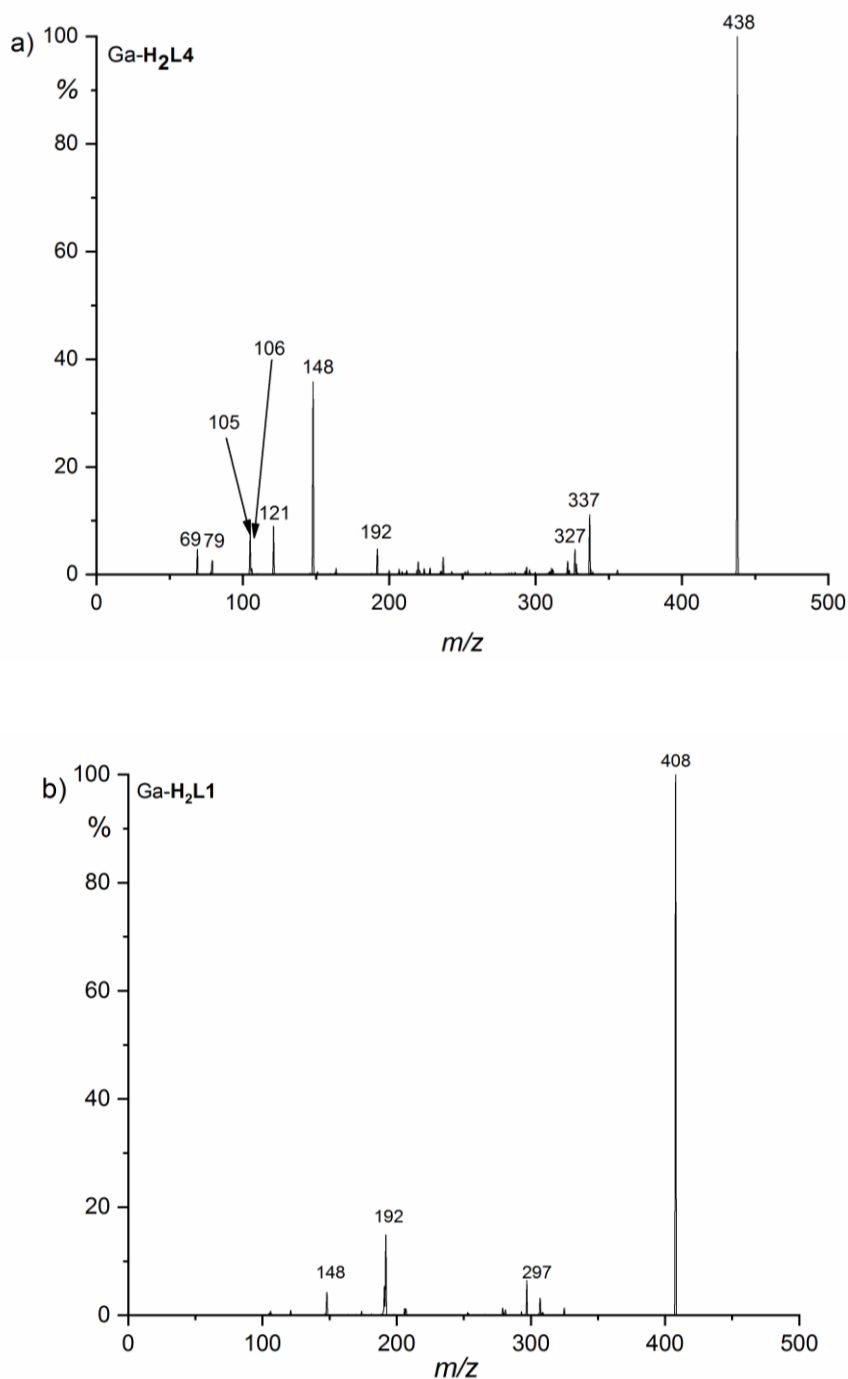
Slika 4.8. MS/MS spektri iona [Ga(HL)₂]⁺ *m/z* 549 (a) i *m/z* 609 (b) dobiveni uz kolizijsku energiju od 30 V



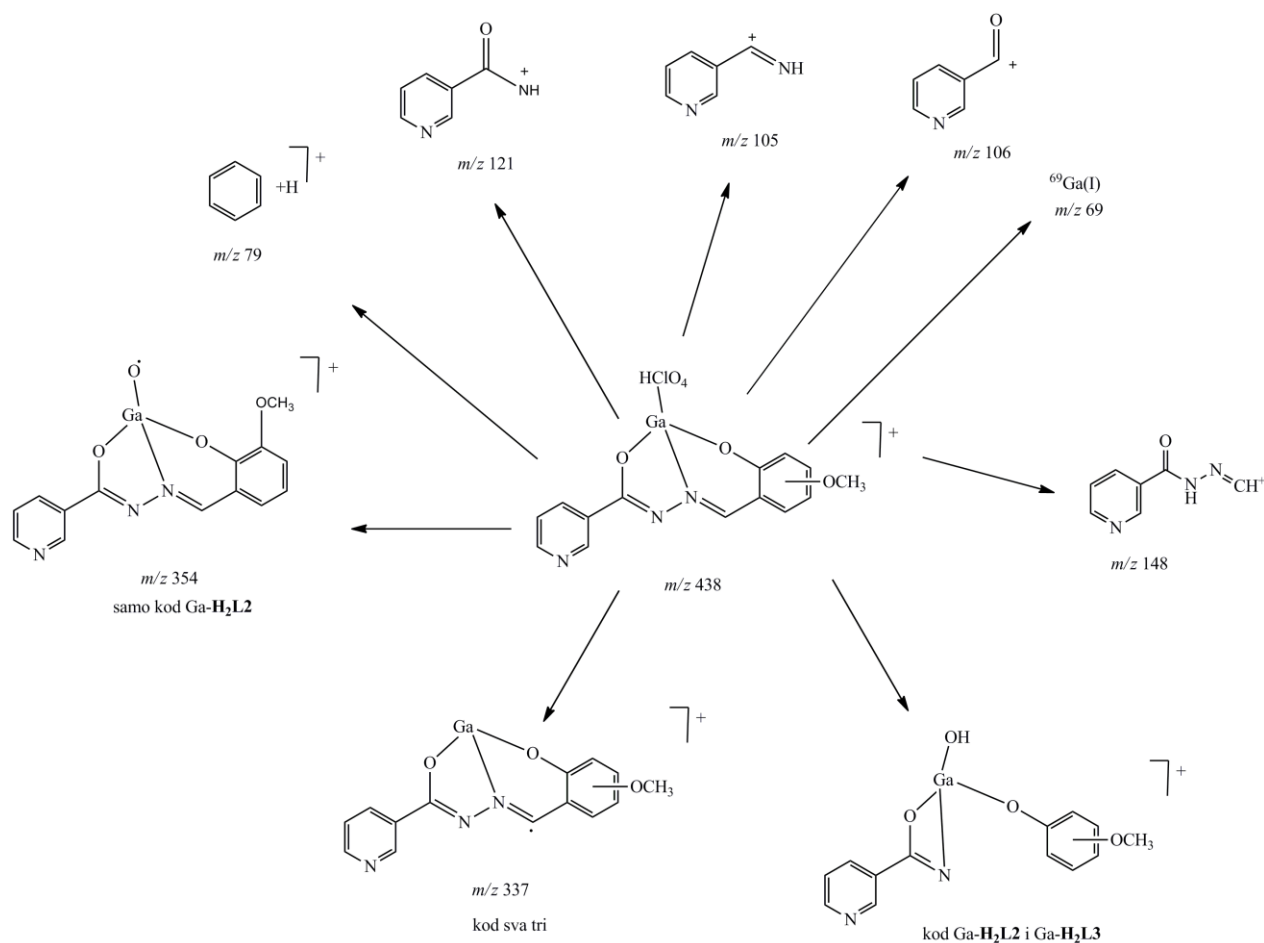
Slika 4.9. Predložena shema fragmentiranja iona $[Ga(HL)_2]^+$ m/z 609 uz kolizijsku energiju od 30 V

U MS/MS spektru iona $[Ga(L)(HClO_4)]^+$ m/z 408, odnosno m/z 438 za metoksi derivate, možemo uočiti da je ion stabilan i veze galija s dušikom i kisikom iz liganda su jake, pa fragmentira gubitkom molekule perklorne kiseline, pri čemu nastaje ion pri m/z 337, ili pucaju veze na ligandu pri čemu nastaju ioni pri m/z 328, m/z 327 i m/z 192. Također su uočeni ioni koji potječu od aldehida pri m/z 78, te ioni koji potječu od hidrazida, pri m/z 148, m/z 121, m/z 106 i m/z 105. MS/MS spektri prikazani su na slici 4.10, a predložene sheme fragmentiranja iona na slikama 4.11 i D5. Podaci o relativnim intenzitetima dobivenih iona prikazani su u tablici D5. U spektru iona m/z 408 možemo uočiti da dolazi do pucanja veza na ligandu te

nastaju ioni pri m/z 297 i m/z 192 koji sadrže galij. Nastaje ion koji potječe od hidrazida pri m/z 148 i ion koji potječe od aldehida pri m/z 120.

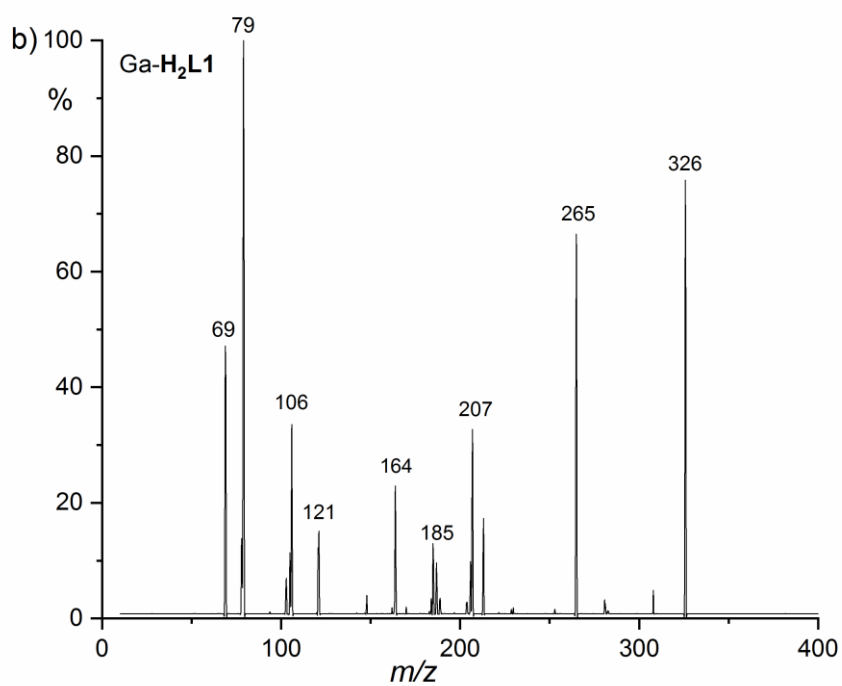
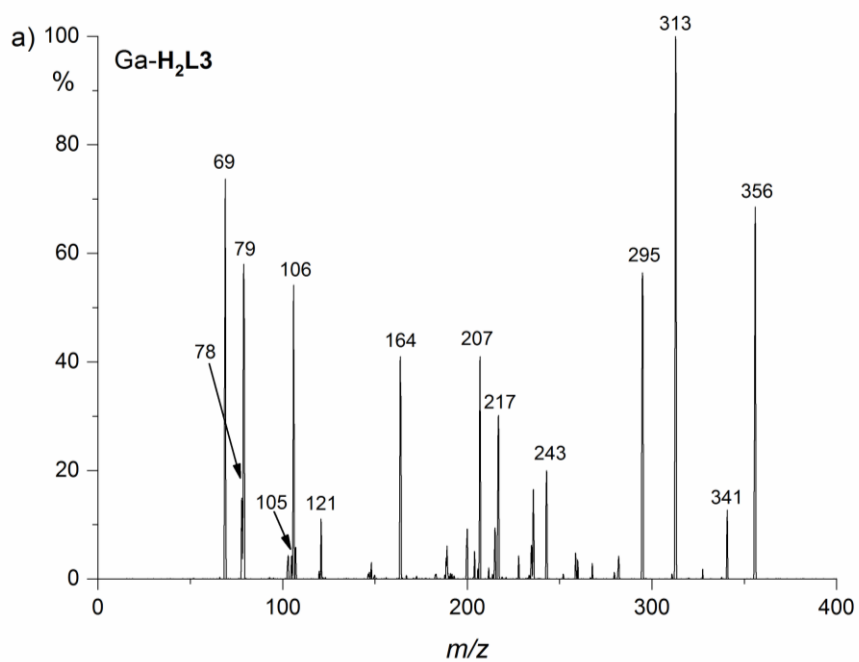


Slika 4.10. MS/MS spektri iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{HClO}_4)]^+$ m/z 438 (a) i m/z 408 (b) dobiveni uz kolizijsku energiju od 20 V

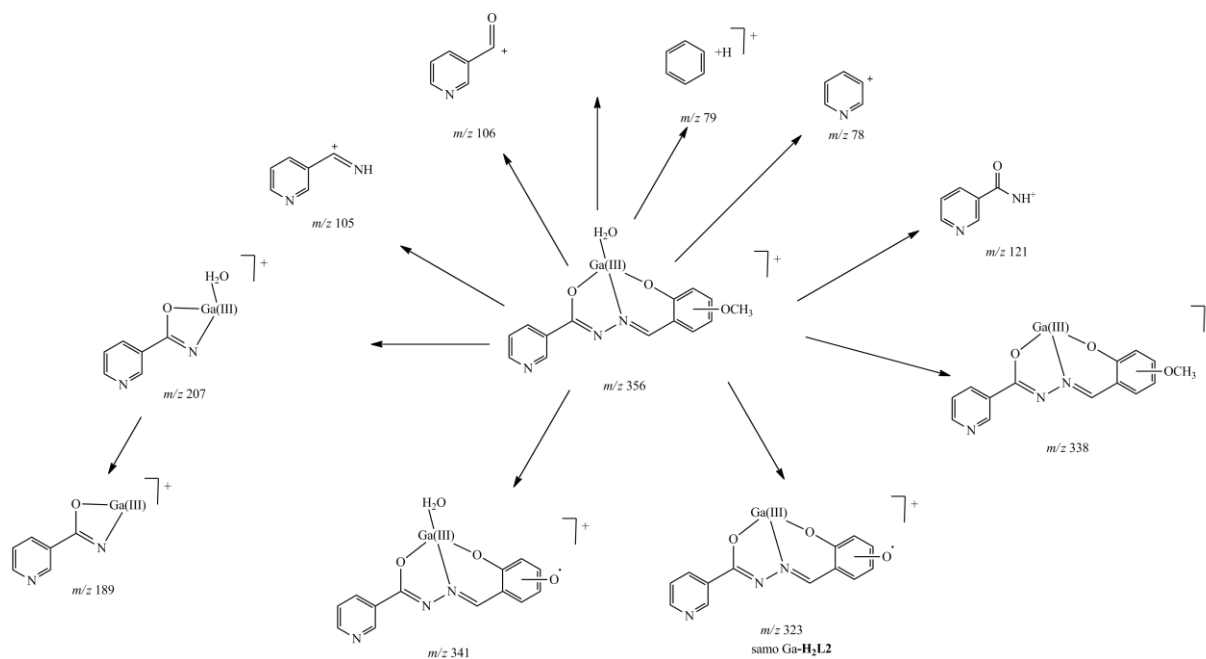


Slika 4.11. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{HClO}_4)]^+$ m/z 438 uz kolizijsku energiju od 20 V

Signal pri m/z 356 asigniran je ionu $[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$ koji fragmentacijom gubi metilnu skupinu i nastaje ion m/z 341, odnosno vodu pri čemu nastaje ion m/z 338. Ostali fragmenti nastaju pucanjem veza na ligandu i sadrže galij. Ion m/z 313 bazni je signal u spektru masa otopine kompleksa galija(III) s H_2L_3 , a ion pri m/z 164 za komplekse galija(III) s H_2L_2 i H_2L_4 . Također su u spektrima uočeni signali iona koji potječu od hidrazida i aldehida. Ion m/z 326 uglavnom fragmentira tako da dolazi do pucanja veza na ligandu i nastaju ioni m/z 207 i m/z 189 koji sadrže galij. Bazni signal je pri m/z 78, a odgovara ionu koji potječe od hidrazida. Uočeni su i ioni pri m/z 121 i m/z 106 koji također potječu od hidrazida. MS/MS spektri prikazani su na slici 4.12, predložene sheme fragmentiranja iona na slikama 4.13 i D6, a relativni intenziteti dobivenih iona u tablici D6.

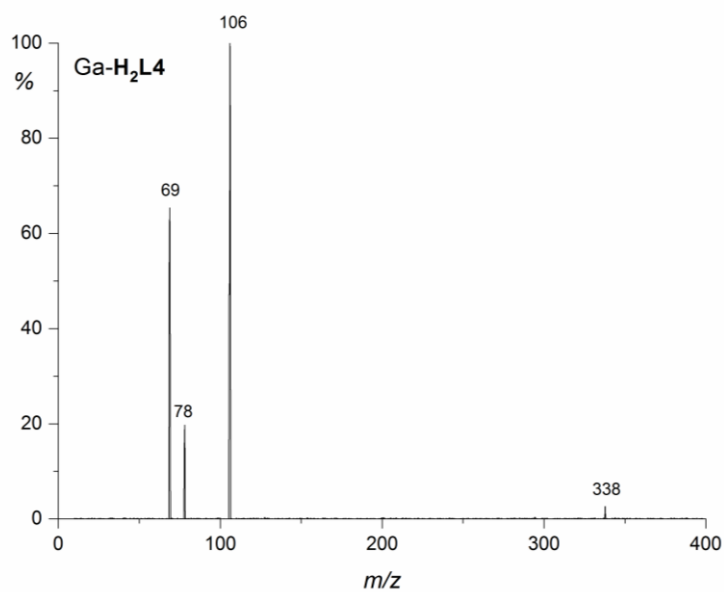


Slika 4.12. MS/MS spektri iona $[Ga(L)(H_2O)]^+$ m/z 356 (a) i m/z 326 (b) dobiveni uz kolizijsku energiju od 30 V

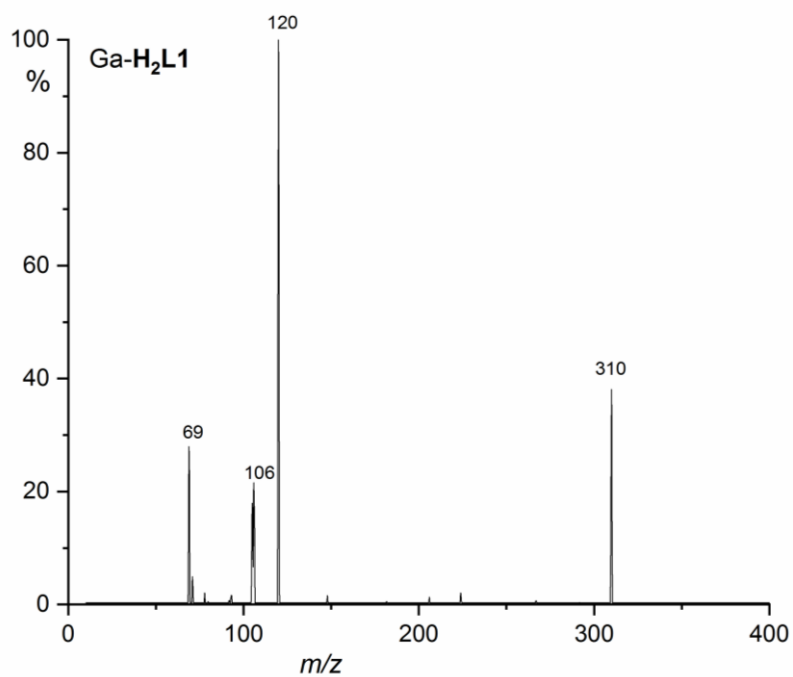


Slika 4.13. Predložena shema fragmentacije ionskog kompleksa $[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 356 uz kolizijsku energiju od 30 V

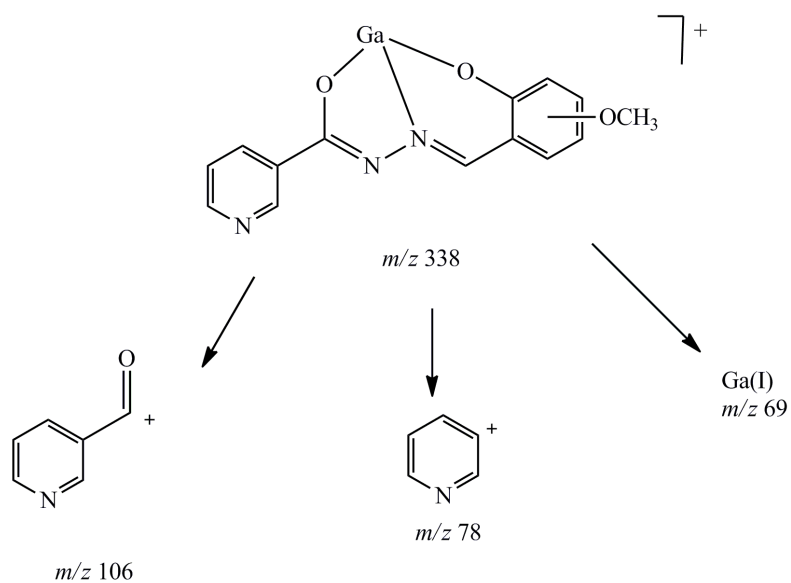
Ion m/z 338, asigniran kao ion $[\text{Ga}(\text{L})]^+$, iz sva tri kompleksa je nestabilan, odmah fragmentira i nastaje pretežito ion m/z 106 čiji signal je bazni signal, a potječe od hidrazida (slika 4.14). Ion m/z 310 moguće je smjesa dva iona različitih struktura, ali istih masa. Na temelju ovih podataka ne može se sa sigurnošću odrediti način koordiniranja liganda i struktura kompleksa. Navedeni ion fragmentacijom daje ione koji potječu od aldehida (m/z 120) i hidrazida (m/z 106) što ukazuje na pucanje veza na ligandu. Fragmentira i na ion m/z 71 i m/z 105 što ukazuje na strukturu $[\text{Ga}(\text{L})]^+$. Predložene sheme fragmentiranja navedenih iona prikazane su na slikama 4.16 i 4.17.



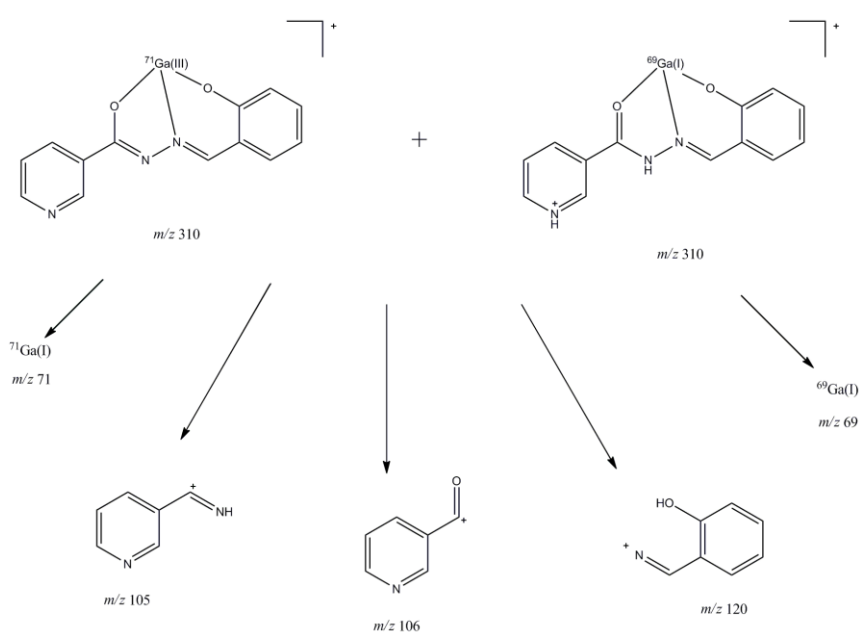
Slika 4.14. MS/MS spektar iona $[\text{Ga}(\text{L})]^+$ m/z 338 dobiven uz kolizijsku energiju od 20 V



Slika 4.15. MS/MS spektar iona m/z 310 dobiven uz kolizijsku energiju od 20 V



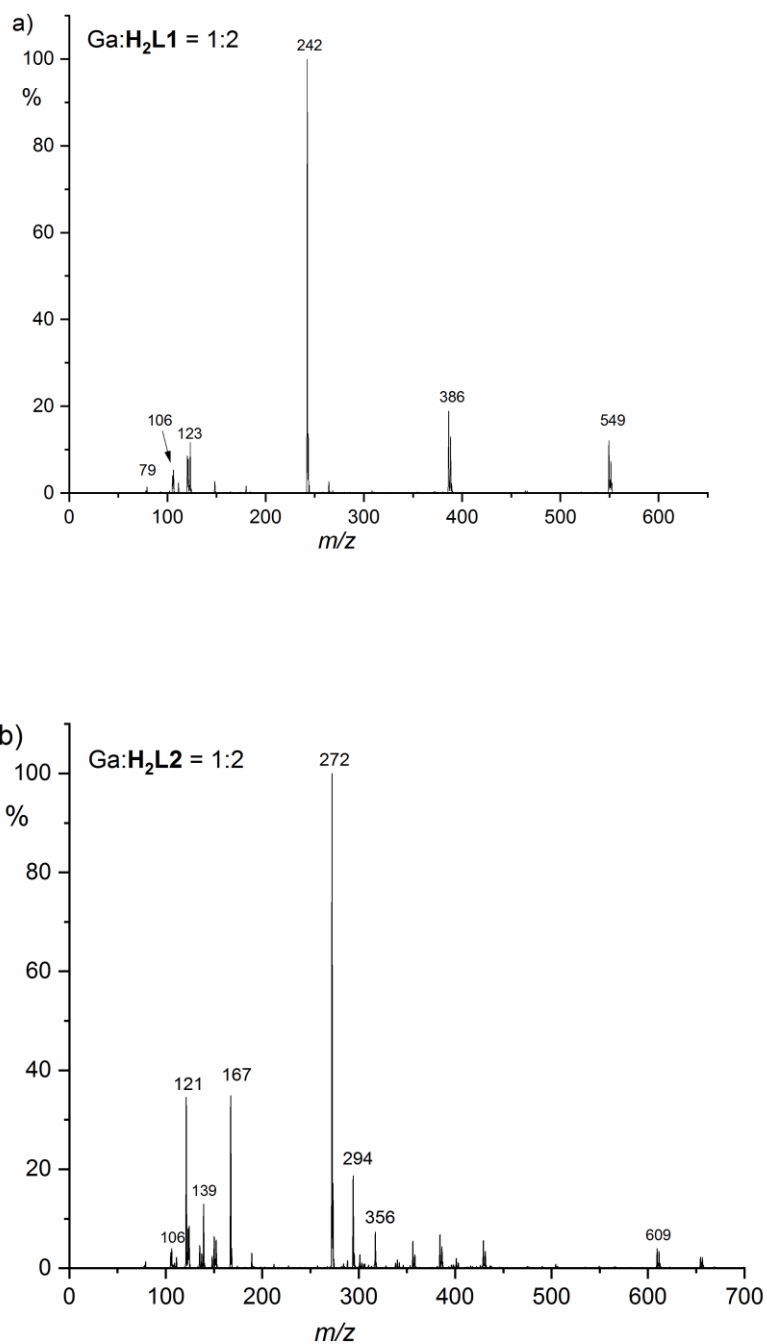
Slika 4.16. Predložena shema fragmentacije iona $[\text{Ga(L)}]^+$ m/z 338 uz kolizijsku energiju od 20 V



Slika 4.17. Predložena shema fragmentacije iona m/z 310 uz kolizijsku energiju od 20 V

4.2. MS spektri otopina čvrstih kompleksa

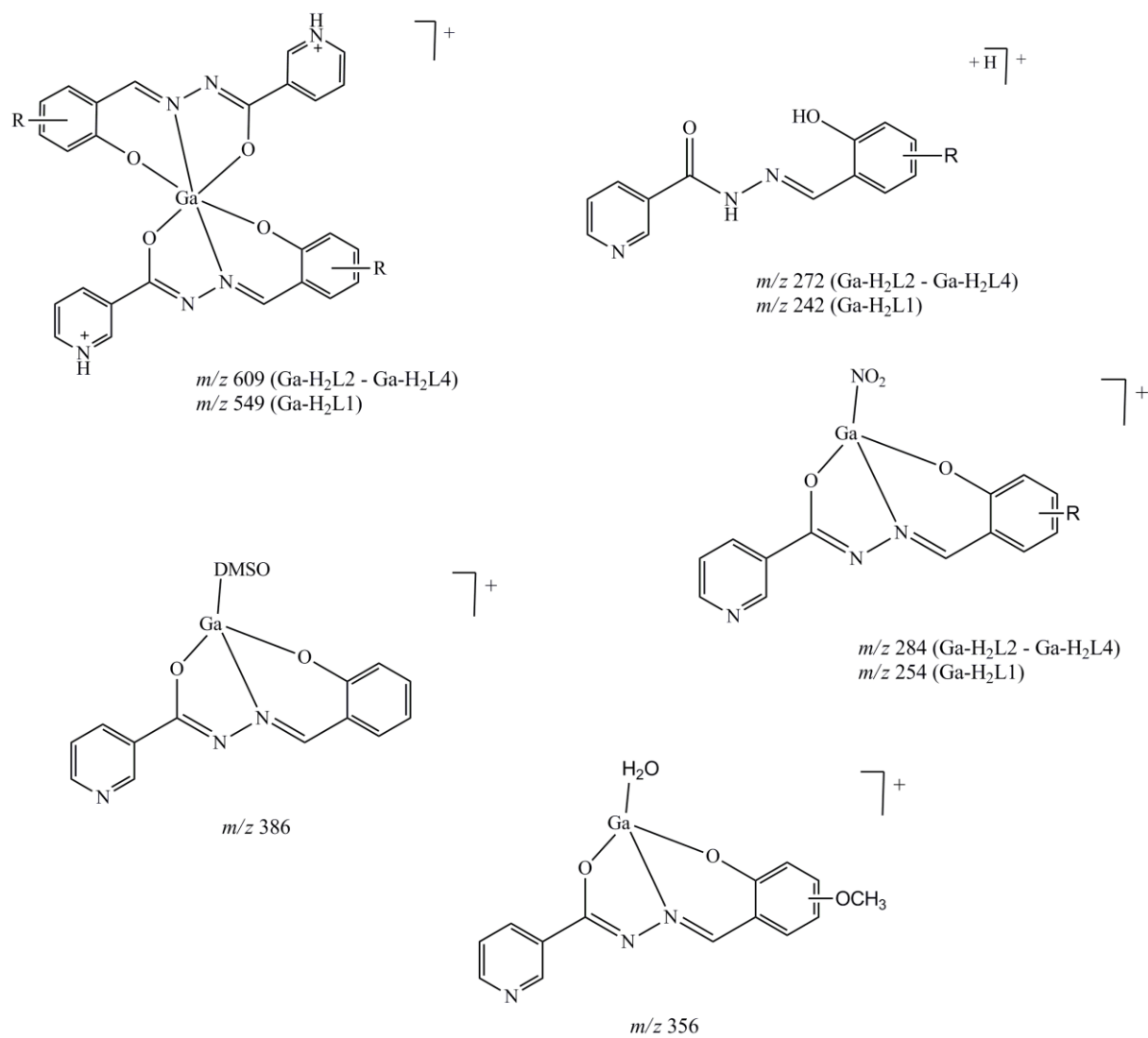
U spektrima otopina čvrstih kompleksa galija i liganada **H₂L1–H₂L4** osnovni signal je assigniran protoniranoj molekuli liganda i nalazi se pri m/z 242 u spektru kompleksa Ga-**H₂L1**, odnosno pri m/z 272 u spektrima ostalih kompleksa. Na temelju toga možemo zaključiti da u otopini postoji ravnoteža nedisociranog i disociranog kompleksa ili da pri ionizaciji dolazi do fragmentacije iona kompleksa pri čemu se otpušta jedna molekula liganda. U svim spektrima prisutni su signali molekulskog iona pri m/z 549, odnosno m/z 609 relativnih intenziteta 3–30%. Uočeni su signali adukata s NO₂, pri m/z 354, odnosno m/z 384 što ukazuje da je ukupni naboj kompleksa pozitivan, a nitrati služe kao protuioni. Na temelju toga možemo zaključiti da ligandi koordiniraju galij(III) enolnim i fenolnim kisikovim atomima te azometinskim dušikom. U spektrima masa uočeni su i signali adukata s natrijem pri m/z 264, odnosno m/z 294. U spektru otopine kompleksa Ga-**H₂L1** uočen je i signal adukta s molekulom DMSO pri m/z 386 relativnog intenziteta oko 20%, a u kompleksima Ga s metkosi derivatima signal adukta s vodom pri m/z 356, manjih intenziteta. Ovi rezultati upućuju na to da fragmentacijom kompleksa nastaje ion [Ga(L)]⁺, koji je veoma reaktivan te spremno stvara adukte sa molekulama otapala. U spektrima su prisutni i signali iona koji potječu od hidrazida pri m/z 148, m/z 123, m/z 121, m/z 106 i m/z 105, te ioni koji potječu od aldehida pri m/z 150, m/z 135 i m/z 120, a detaljnije su opisani u radu D. Stražić¹⁹. Spektri navedenih kompleksa dani su na slikama 4.18 i D7, a relativni intenziteti nastalih iona u tablici 4.4.



Slika 4.18. MS spektri otopina izoliranih kompleksa Ga^{3+} s ligandima $\text{H}_2\text{L1}$ (a) i $\text{H}_2\text{L2}$ (b)

Tablica 4.4. Relativni intenziteti signala iona pri odgovarajućim vrijednostima m/z za otopine čvrstih kompleksa Ga^{3+} s ligandima $\text{H}_2\text{L1}$, $\text{H}_2\text{L2}$, $\text{H}_2\text{L3}$ i $\text{H}_2\text{L4}$

m/z	Rel. int. /%	m/z	Rel. intenzitet / %			Ion
	Ga- $\text{H}_2\text{L1}$		Ga- $\text{H}_2\text{L2}$	Ga- $\text{H}_2\text{L3}$	Ga- $\text{H}_2\text{L4}$	
549	11,33	609	3,81	27,88	5,76	$[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$
386	18,97	-	-	-	-	$[\text{Ga}(\text{L})(\text{DMSO})]^+$
354	0,32	384	5,74	6,60	5,49	$[\text{Ga}(\text{L})(\text{NO}_2)]^+$
-	-	356	5,46	6,36	1,44	$[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$
264	2,74	294	18,67	2,26	2,01	$[\text{H}_2\text{L} + \text{H}]^+ + \text{Na}$
242	100	272	100	100	100	$[\text{H}_2\text{L} + \text{H}]^+$



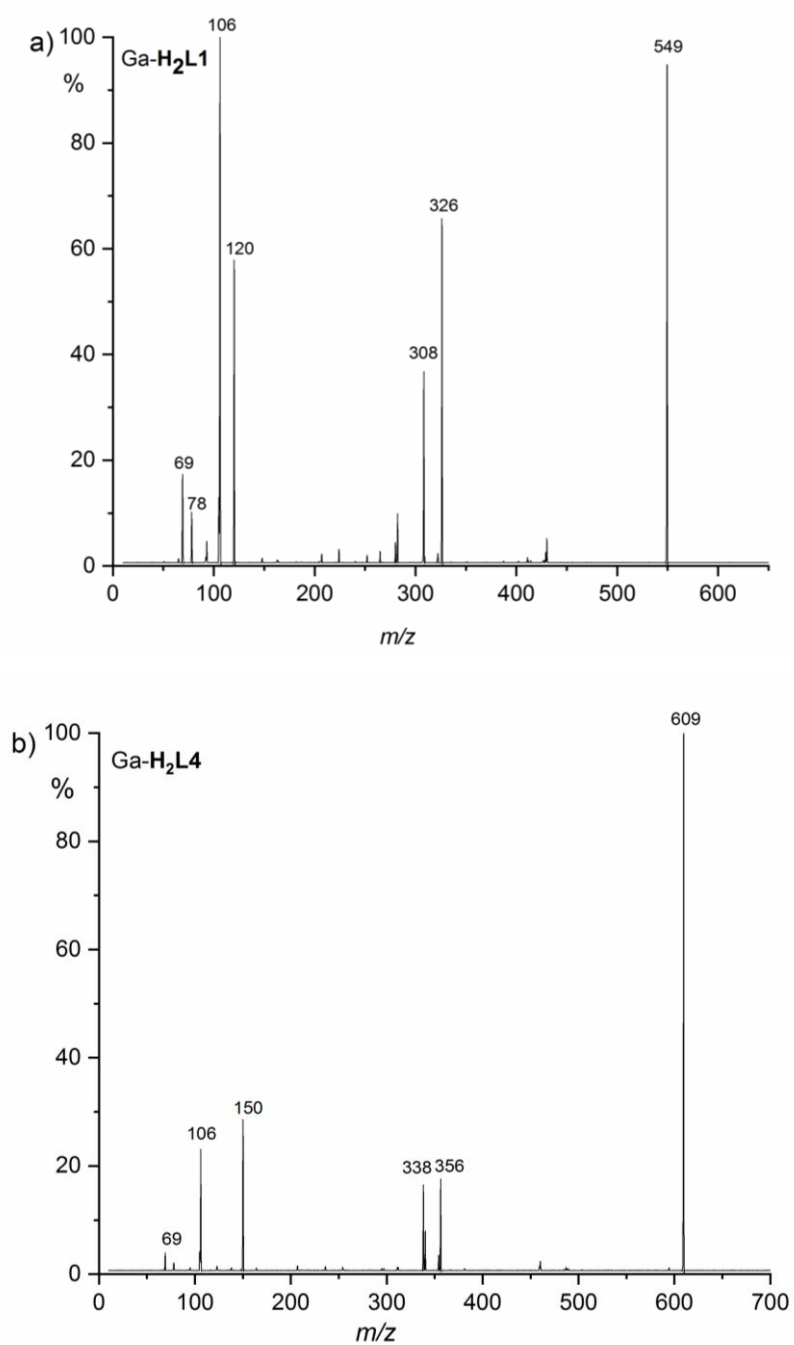
R = H (H₂L1) ; OCH₃ (H₂L2-H₂L4)

Slika 4.19. Predložene strukture iona na temelju MS spektara otopina čvrstih kompleksa galija(III) s ligandima **H₂L1-H₂L4**

4.2.1. ESI(+) MS/MS analiza odabranih iona

Snimljeni su ESI(+) MS/MS spektri masa iona vrijednosti m/z 549 i m/z 386 za kompleks galija(III) s **H₂L1**, odnosno vrijednostima m/z 609 i m/z 356 za komplekse sa spojevima **H₂L2-H₂L4**.

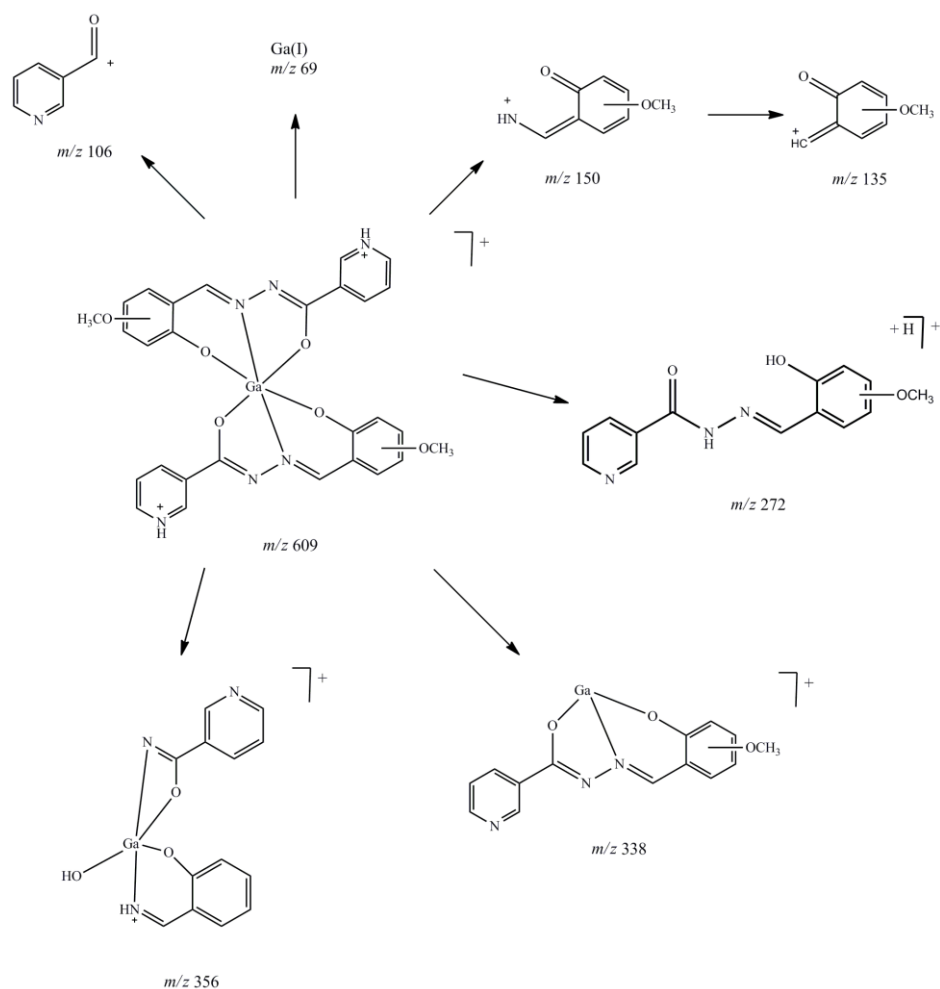
U MS/MS spektrima iona m/z 609 osnovni su signali ujedno i signali molekulskih iona što ukazuje na to da su kompleksi sa metoksi derivatima hidrazona stabilniji u odnosu na onaj sa ligandom **H₂L1**, budući da je u spektru analognog iona pri m/z 549 osnovni signal bio pri m/z 106, što odgovara fragmentu koji potječe od hidrazida. Ioni m/z 549, odnosno m/z 609 sadrže dvije molekule liganda, te fragmentiraju gubitkom jedne molekule liganda pri čemu nastaju ioni m/z 338, odnosno m/z 308 relativnih intenziteta 20–40%. Također nastaju ioni m/z 326, odnosno m/z 356 koji se sastoje od molekule liganda, galija i hidroksilne skupine. U MS/MS spektru uočeni su i signali pri m/z 150 i m/z 135 koji su asignirani aldehidnom dijelu molekule hidrazona. Intenzitet signala pri m/z 135 iznosi 40% u spektrima otopine kompleksa Ga-**H₂L2**, a u ostalim spektrima analogan signal je intenziteta oko 1% što znači da samo kod 3-metoksi derivata dolazi do tautomerne konverzije u ketoaminski oblik pri čemu može nastati ion s pripadnim uočenim signalom. Spektri navedenih iona prikazani su na slici 4.20, a relativni intenziteti dobivenih iona u tablici 4.5. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 609 prikazana je na slici 4.21, a iona m/z 549 na slici D9.



Slika 4.20. MS/MS spektri iona $[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$ m/z 549 (a) i m/z 609 (b) dobiveni uz kolizijsku energiju od 30 V

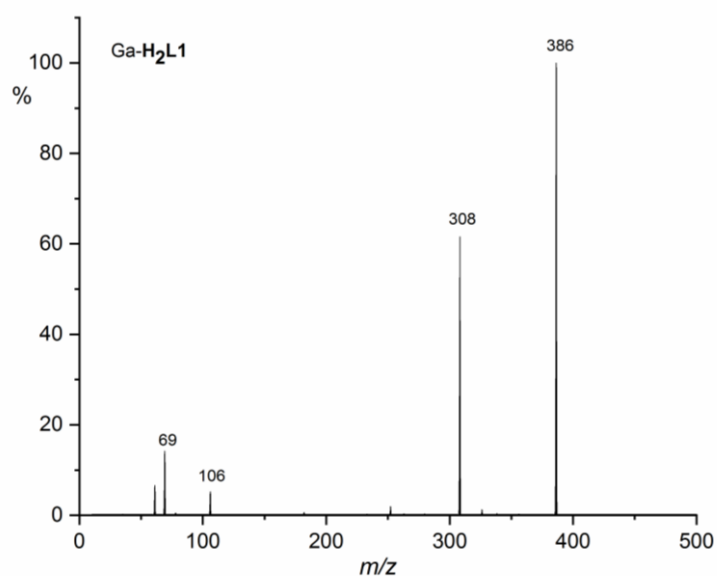
Tablica 4.5. Relativni intenziteti signala iona nastalih fragmentacijom iona $[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$ uz kolizijsku energiju od 30 V

<i>m/z</i>	Rel. int./%	<i>m/z</i>	Relativni intenzitet/%			Ion
	Ga-H ₂ L1		Ga-H ₂ L2	Ga-H ₂ L3	Ga-H ₂ L4	
549	94,89	609	100	100	100	$[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$
326	65,70	356	26,19	31,90	17,61	$[\text{Ga}(\text{HL})_2-253]^+$
308	36,80	338	25,61	26,29	16,57	$[\text{Ga}(\text{L})]^+$
120	57,94	150	42,37	32,27	28,59	$[\text{H}_2\text{L}-122]^+$
-	-	135	39,14	1,09	0,79	$[\text{H}_2\text{L}-137]^+$
106	100	106	50,82	19,96	23,10	$[\text{H}_2\text{L}-166]^+$
69	17,32	69	43,27	7,95	3,97	$[\text{Ga}]^+$

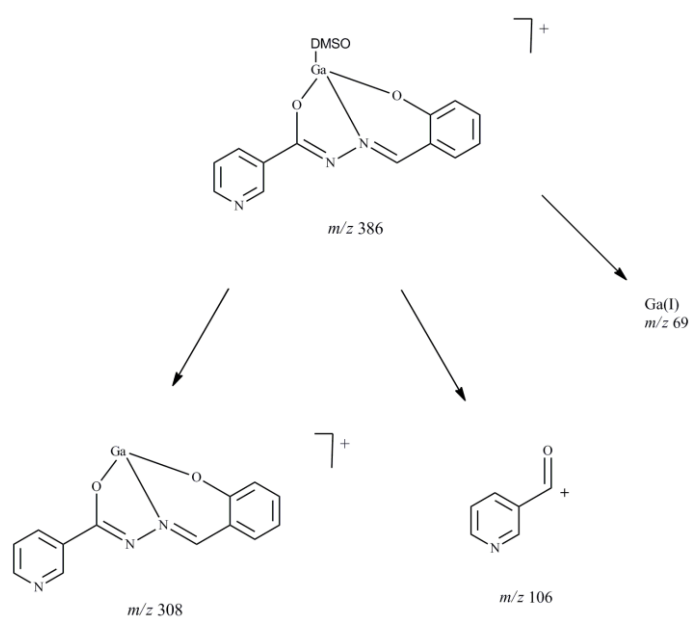


Slika 4.21. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$ m/z 609 uz kolizijsku energiju od 30 V

Ion sa signalom pri m/z 386 uočen samo u MS/MS spektru otopine kompleksa galija(III) s ligandom $\text{H}_2\text{L1}$, odgovara aduktu kompleksa s molekulom DMSO, a fragmentiranjem gubi molekulu DMSO te nastaje ion m/z 308. Također su u spektru uočeni signali iona nastalog pucanjem veza na ligandu pri m/z 106 i pri m/z 69. MS/MS spektar otopine kompleksa galija(III) s $\text{H}_2\text{L1}$ prikazan je na slici 4.22, a predložena shema fragmentiranja na slici 4.23.



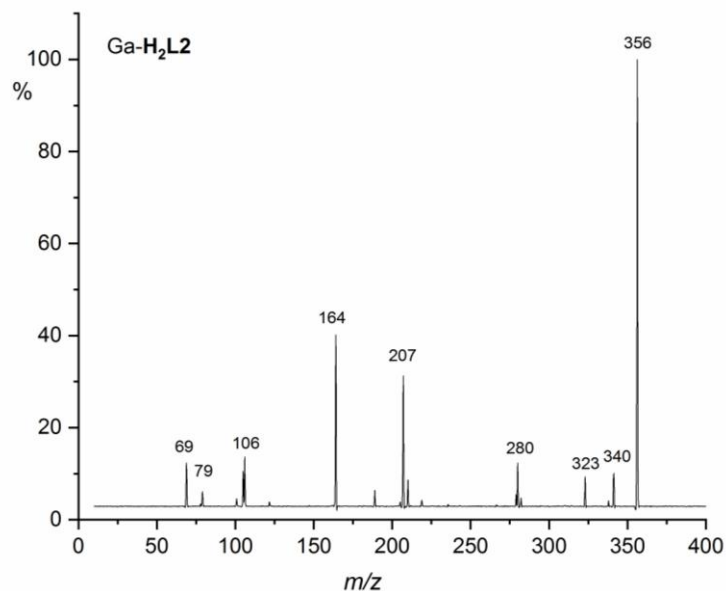
Slika 4.22. MS/MS spektar iona $[\text{Ga}(\text{L1})(\text{DMSO})]^+$ m/z 386 dobiven uz kolizijsku energiju od 15 V



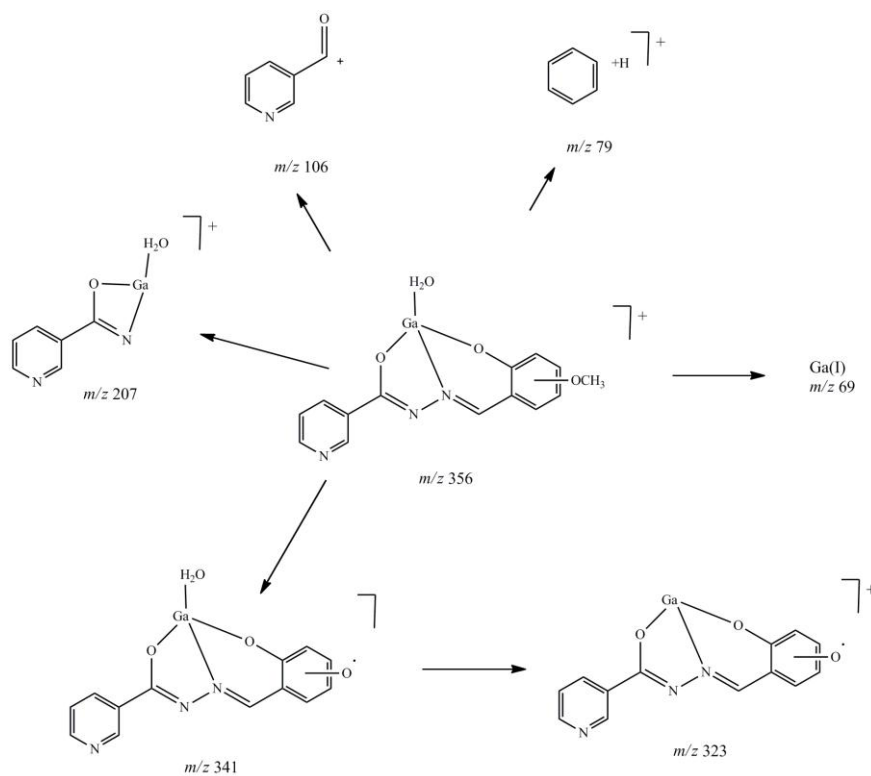
Slika 4.23. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{DMSO})]^+$ m/z 386

Ion $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 356 fragmentira gubitkom metilne skupine pri čemu nastaje ion m/z 341 i gubitkom vode pri čemu nastaje ion m/z 323. Pucanjem veza na ligandu nastaje ion m/z 207 koji sadrži galij. Uočeni su i signali iona pri m/z 106 i m/z 79 koji potječu iz hidrazida i aldehida. Možemo zaključiti da su veze između liganda i galija jače nego veze unutar

molekule liganda. MS/MS spektar navedenog iona prikazan je na slici 4.24, a predložena shema fragmentiranja na slici 4.25.



Slika 4.24. MS/MS spektar iona $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 356 dobiven uz kolizijsku energiju od 20 V



Slika 4.25. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 356

Usporedbom rezultata analize MS spektara otopine i čvrstog stanja možemo zaključiti da kompleksi fragmentiraju uz minimalne razlike. U MS/MS spektrima kompleksa u čvrstom stanju možemo uočiti signale adukta s molekulama otapala pri m/z 364, odnosno pri m/z 394 (adukt s Na), pri m/z 354, odnosno m/z 384 (adukt s NO_2) te pri m/z 386 (adukt s DMSO) čime možemo zaključiti da su kompleksi u čvrstom stanju reaktivniji. U MS spektrima čvrstih kompleksa osnovni signal u svim spektrima je protonirana molekula liganda, dok je u MS spektrima otopina osnovni signal kod pojedinih spektara pri m/z 438. Rezultati tandemne spektrometrije masa odabranih iona pokazuju nam da nastaju isti fragmentni ioni i u otopini i u čvrstom stanju, a razlike se mogu uočiti u intenzitetima pojedinih signala.

§ 5. ZAKLJUČAK

Provedena je MS i MS/MS analiza otopina kompleksnih spojeva galija(III) s četiri aroilhidrazona (**H₂L1–H₂L4**) izvedenih iz nikotinhidrazida i salicilaldehida, odnosno 3-metoksi, 4-metoksi i 5-metoksibenzaldehida. Spektri su snimljeni uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Otopine kompleksnih spojeva priređene su na dva načina: miješanjem vodene otopine galijeva perklorata (pH = 2,52) i metanolne otopine hidrazona pri čemu je variran molarni omjer metal:ligand, odnosno otapanjem čvrstih kompleksa u DMSO-u te razrjeđivanjem smjesom metanola i vode. Osim utjecaja otapala te omjera liganda i galija, ispitan je i utjecaj vremena na intenzitete signala u spektru masa. Na temelju MS/MS spektara odabranih iona predložene su sheme fragmentiranja.

Iako je na osnovu spektrofotometrijskih mjerenja zaključeno da je potrebno oko sat vremena za uspostavljanje ravnoteže pri kompleksiranju galija(III) hidrazonima, u spektrima masa snimljenim odmah po pripravi otopina i nakon 24 sata nije uočena značajna razlika u intenzitetima signala pojedinih iona. Također, vrsta kiseline kojom je reguliran pH otopine galijeva nitrata nije znatno utjecala na izgled spektara masa. U slučaju dodatka klorovodične kiseline, u spektrima je osim adukta s perkloratima uočen i signal koji je odgovarao aduktu s navedenom kiselinom.

U svim spektrima masa otopina sastava metal:ligand 1:1 osnovni signal pripisan je ionu kompleksa galija i liganda sa HClO₄, dok pri najvećem omjeru (1:4) taj signal odgovara signalu liganda, što je bilo i za očekivati.

Za razliku od gore navedenih spektara, u spektrima masa otopina pripremljenih otapanjem izoliranih kompleksnih spojeva uočeni su signali koji odgovaraju sastavu kompleksa 1:2, na temelju čega se može zaključiti da je i sastav izoliranih kompleksa 1:2. Međutim, pri otapanju očito dolazi do disocijacije kompleksa te je osnovni signal pripisan molekuli liganda. Zbog slabe topljivosti kompleksa u većini otapala kompleksi su prvo otopljeni u DMSO-u te su u pripadnim spektrima uočeni signali koji odgovaraju aduktima s molekulom DMSO-a.

Provedena je detaljna MS/MS analiza odabranih iona (kompleksnih iona sastava 1:1 i 1:2, adukata sa molekulama otapala itd.) i predložene odgovarajuće sheme fragmentiranja. Može se zaključiti da u koordinaciji sudjeluju fenolni kisikovi atomi, kisikovi atomi iz

karbonilne skupine u dijelu molekule koji potječe od hidrazida koja je najvjerojatnije enolizirana te azometinski dušik. Točna strukturna karakterizacija kompleksa nije moguća samo na temelju rezultata MS analize. Naime, iako je u slučaju kompleksa galija(III) sa spojem $\mathbf{H_2L_2}$ uočena tautomerna ravnoteža, ne može se sa sigurnošću tvrditi je li ligand u tom obliku koordiniran ili je do tautomerizacije došlo na disociranom ligandu uslijed ionizacije, kao što je uočeno i pri masenospektrometrijskoj analizi samih hidrazona stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja koja uključuju druge tehnike, primjerice vibracijsku spektroskopiju.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

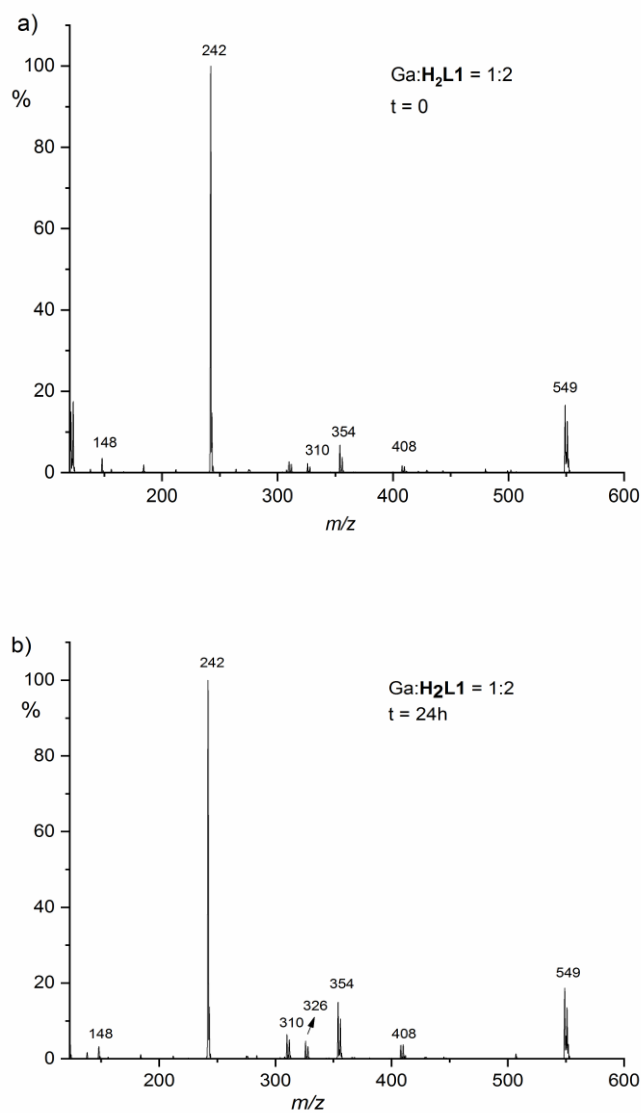
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
CAD	kolizijom aktivirana disocijacija
CI	kemijska ionizacija
CID	kolizijom inducirana disocijacija
dc	istosmjerni potencijal
ECD	disocijacija uvjetovana zahvatom elektrona
EI	ionizacija elektronima
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
ETD	disocijacija prijenosom elektrona
FAB	ionizacija brzim elektronima
FD	desorpcija poljem
FI	ionizacija poljem
FT–ICR MS	Fourier- transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije
GC	plinska kromatografija
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IT	ionska stupica
m/z	omjer mase i naboja
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
m_f	masa fragmenta
m_n	masa neutralne molekule
m_p	masa iona prekursora
MS/MS, MS ⁿ	tandemna spektrometrija masa
PD	desorpcija plazmom
PIH	pirodoksal–izonikotionil-hidrazon
Q	kvadrupol
SID	površinom inducirana disocijacija
SIMS	spektrometrija masa sekundarnim ionima
TOF	analizator koji mjeri vrijeme leta
TSP	ionizacija termoraspršenjem

§ 7. LITERATURNI IZVORI

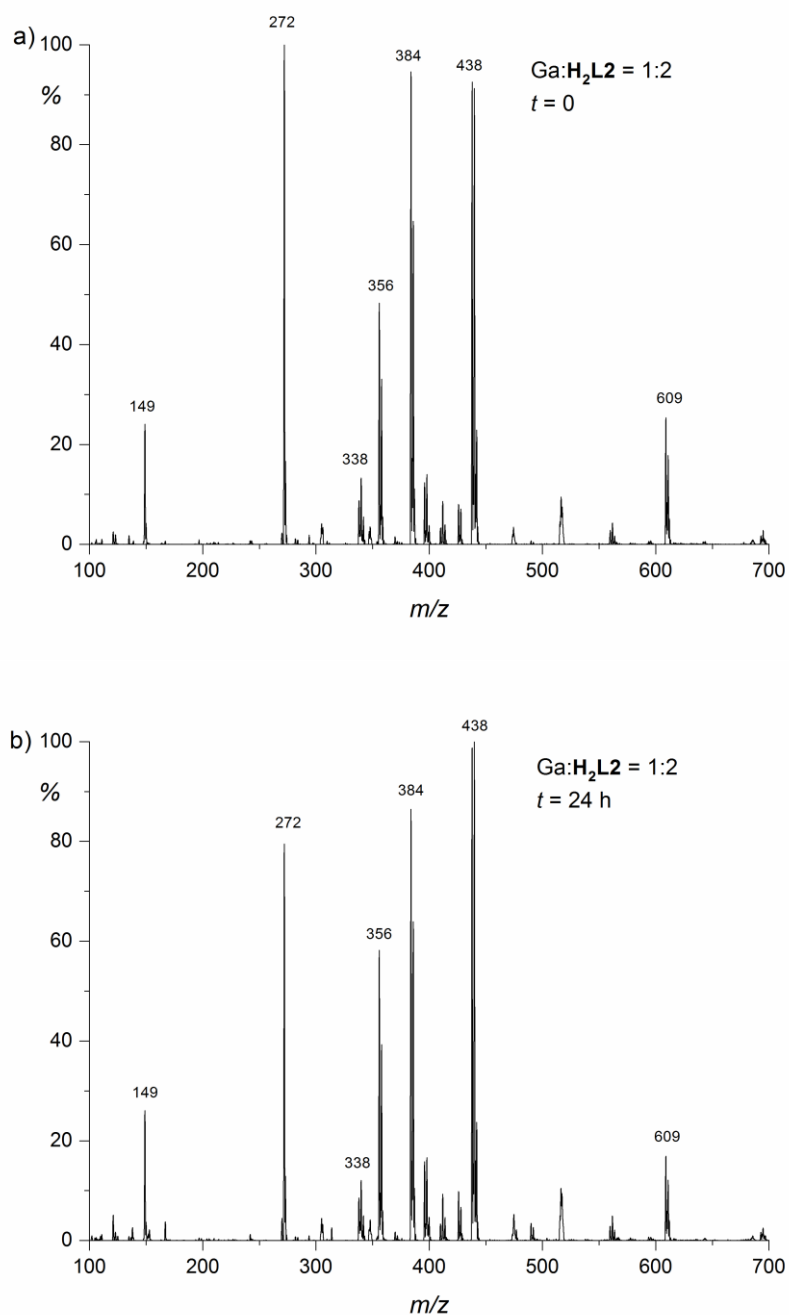
1. A. Goswami, A. K. Singh, *Anal. Bioanal. Chem.* **374** (2002) 554–560.
2. R. Sinha, S. Singh, R. L. Kosha, J. Stables, J. Jain, *Med. Chem. Res.* **20** (2011), 1499–1504.
3. M. Štěrba, O. Popelová, T. Šimůnek, Y. Mazurová, A. Potáčová, M. Adamcová, I. Gunčová, H. Kaiserová, V. Palička, P. Poňka, V. Geršl, *Toxicology* **235** (2007) 150–166.
4. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and Applications*, 3. izdanje, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, str.189–211.
5. C. G. Herbert, R. A. W. Johnstone, *Mass spectrometry basics*, CRC Press LLC, Boca Raton, 2003, str. 250–263.
6. N. Galić, *Kem. ind.* **53** (2004) 117–123.
7. R.M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric identification of organic compounds*, 7. izdanje, John Wiley & Sons Ltd, New York, 2005, str. 12–65.
8. N. Galić, *Spektrometrija masa*, interna skripta, PMF, Zagreb (2016)
9. <https://www.rbdinstruments.com/blog/how-an-electron-multiplier-works/> (datum pristupa 17. Lipnja 2018.)
10. J. H. Gross, *Mass spectrometry*, 2. izdanje, Springer, Heidelberg, 2004, str. 117-221.
11. R. Ekman, J. Silberring, A. Westman–Brinkmalm, A. Kraj, *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2009, str. 156–220.
12. J. March, M. B. Smith, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 3. izdanje, New York: Wiley, New York, 1985, str. 395–416.
13. N. Galić, M. Rubčić, K. Magdić, M. Cindrić, V. Tomišić, *Inorg. Chim. Acta* **366** (2011) 98–104.
14. D. B. Lovejoy, D. R. Richardson, *Expert. Opin. Inv. Drug.* **9** (2000) 1257–1270.
15. N. Galić, A. Dijanošić, D. Kontrec, S. Miljanić, *Spectrochim. Acta A* **95** (2012) 347–353.
16. N. Galić, I. Brođanac, D. Kontrec, S. Miljanić, *Spectrochim. Acta A* **107** (2013) 263–270.
17. T. Benković, D. Kontrec, V. Tomišić, A. Budimir, N. Galić, *J. Solution Chem.* **45** (2016) 1227–1245.

18. P. Kovarikova, K. Varvrova, K. Tomalova, M. Schongut, K. Hruskova, P. Haskova, J. Klimes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 295–302.
19. D. Stažić, T. Benković, D. Gembarovski, D. Kontrec, N. Galić, *Int. J. Mass Spectrom.* **371** (2014) 54–64.
20. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija II.dio*, Školska knjiga, Zagreb, 1995, str. 882–883.
21. B. I. Nikolova, Mladenova, S. E. Angelova, *Bulg. Chem. Commun.* **49** (2017) 237–242.
22. V. Kubicek, J. Havlickova, J. Kotek, G. Tirsco, P. Hermann, E.Toth, I. Lukes, *Inorg. Chem.* **49** (2010) 10960–10969.
23. K. D. Mjos, J. F. Cawthray, E. Polishchuk, M. J. Abrams, G. Orvig, *Dalton Trans.* **45** (2016) 13146–13160.
24. P. V. Racheva, K. T. Stojanova, V. Dimitrova Lekova, A. Nikolov Dimitrov, *Croat. Chem. Acta* **88** (2015) 159–163.
25. T. W. Duma, F. Marsicano, R. D. Hancock, *J. Coord. Chem.* **23** (2009) 221–232.

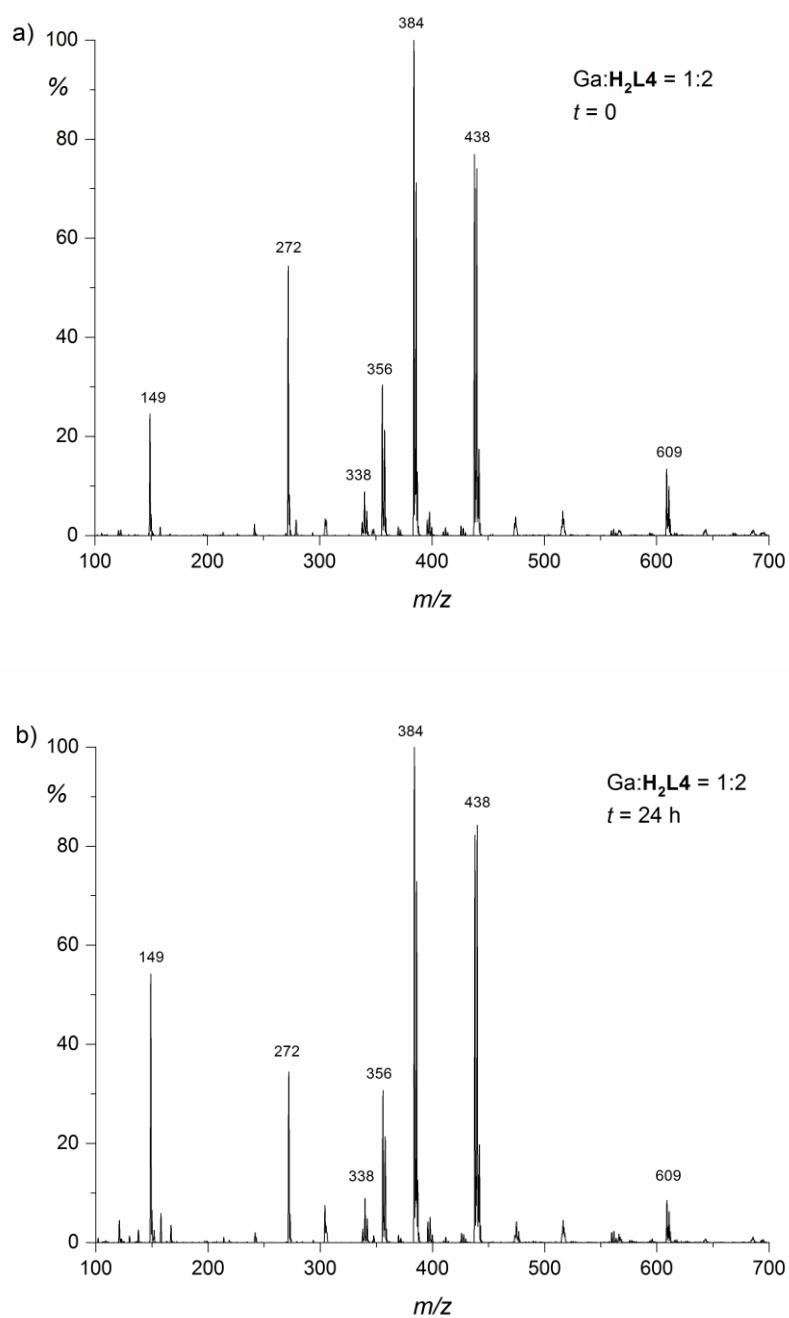
§ 8. DODATAK



Slika D1. Spektri masa otopine galijeve(III) perklorata i hidrazona H_2L1 u omjeru 1:2 ($c(H_2L1) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(Ga^{3+}) = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u otapalu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(HClO_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; $pH = 2,52$) odmah po pripravi otopine (a) i nakon 24 sata (b)



Slika D2. Spektri masa otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona **H₂L₂** u omjeru 1:2 ($c(\text{H}_2\text{L}_2) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{Ga}^{3+}) = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u otapalu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52) odmah po pripravi otopine (a) i nakon 24 sata (b)



Slika D3. Spektri masa otopine galijeve(III) perklorata i hidrazona $\text{H}_2\text{L4}$ u omjeru 1:2 ($c(\text{H}_2\text{L2}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{Ga}^{3+}) = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u otapalu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 2,52$) odmah po pripravi otopine (a) i nakon 24 sata (b)

Tablica D1. Relativni intenzitet iona pri odgovarajućim vrijednostima m/z otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona $\mathbf{H_2L_2-H_2L_4}$ u omjeru 1:4 ($c(\mathbf{H_2L}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u sustavu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52) odmah po pripremi otopine i nakon 24 sata

m/z	Relativni intenzitet / %						Ion
	Ga- $\mathbf{H_2L_2}$		Ga- $\mathbf{H_2L_3}$		Ga- $\mathbf{H_2L_4}$		
	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	
609	12,05	9,68	30,54	22,48	17,05	13,70	$[\text{Ga}(\mathbf{HL})_2]^+$
438	7,55	6,89	30,61	33,17	14,03	14,21	$[\text{Ga}(\mathbf{L})(\text{HClO}_4)]^+$
356	6,80	7,49	4,64	1,50	7,11	5,47	$[\text{Ga}(\mathbf{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$
338	1,28	1,04	1,17	0,22	0,63	0,48	$[\text{Ga}(\mathbf{L})]^+$
272	100	100	100	100	100	100	$[\mathbf{H_2L} + \text{H}]^+$

Tablica D2. Relativni intenzitet iona pri odgovarajućim vrijednostima m/z otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona $\mathbf{H_2L2-H_2L4}$ u omjeru 1:1 ($c(\mathbf{H_2L}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52) odmah po pripravi otopine i nakon 24 sata

m/z	Rel. int. / %		m/z	Relativni intenzitet / %						Ion
	Ga-H ₂ L1			Ga-H ₂ L2		Ga-H ₂ L3		Ga-H ₂ L4		
	$t = 0$	$t = 24\text{h}$		$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	$t = 0$	$t = 24\text{h}$	
549	31,70	43,80	609	1,03	0,82	0	0,28	0,54	0,16	[Ga(HL) ₂] ⁺
408	28,00	49,54	438	100	100	100	100	100	24,66	[Ga(L)(HClO ₄)] ⁺
326	17,01	26,48	356	39,22	43,43	3,28	17,01	28,87	27,26	[G(HL)(OH)] ⁺
310	16,11	35,30	338	7,15	6,09	0,01	0,70	2,45	2,69	[⁷¹ Ga(III)(L)] ⁺ + [⁶⁹ Ga(I)(H₂L)] ⁺
242	100	100	272	1,99	0	0	2,71	0,63	0,44	[H₂L + H] ⁺

*Signali relativnog intenziteta 100% pripisani su izotopnom signalu ili aduktima koji nisu navedeni u tablici.

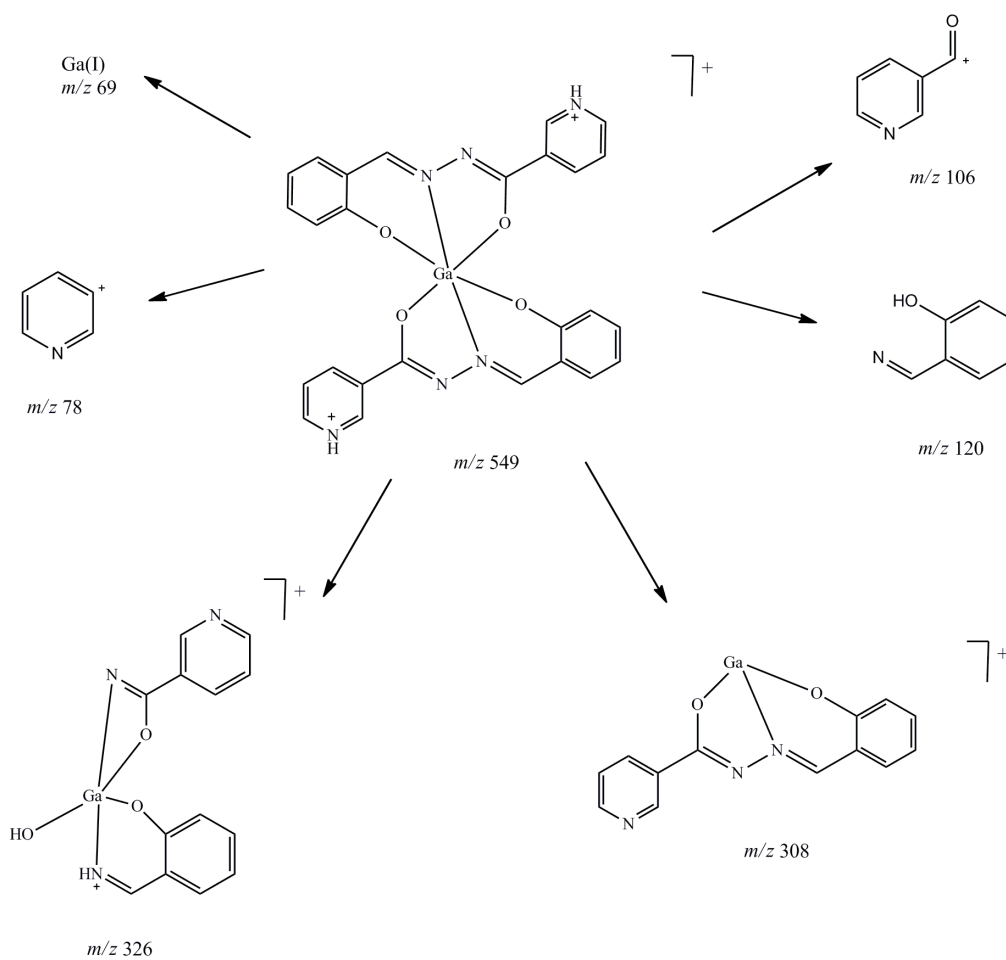
Tablica D3. Relativni intenziteti iona pri odgovarajućim vrijednostima m/z otopine galijeva(III) perklorata i hidrazona $\mathbf{H_2L4}$ u omjeru 1:1, 1:2 i 1:4 ($c(\mathbf{H_2L4}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) u sustavu metanol/voda 1/1 uz perklornu kiselinu ($c(\text{HClO}_4) = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 2,52) odmah po pripravi otopine

Ion	m/z	$\mathbf{Ga^{3+}: H_2L4}$ 1:1	$\mathbf{Ga^{3+}: H_2L4}$ 1:2	$\mathbf{Ga^{3+}: H_2L4}$ 1:4
$[\mathbf{Ga(HL)_2}]^+$	609	0,54	13,45	17,05
$[\mathbf{Ga(L)(HClO_4)}]^+$	438	99,39	76,92	14,03
$[\mathbf{Ga(L)(H_2O)}]^+$	356	28,87	30,39	7,11
$[\mathbf{Ga(L)}]^+$	338	2,45	2,72	0,63
$[\mathbf{H_2L+ H}]^+$	272	0,63	54,41	100

*Signali relativnog intenziteta 100% pripisani su izotopnom signalu ili aduktima koji nisu navedeni u tablici.

Tablica D4. Relativni intenziteti iona $[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$ nastalih fragmentacijom iona m/z 549, odnosno m/z 609 uz kolizijsku energiju od 30 V

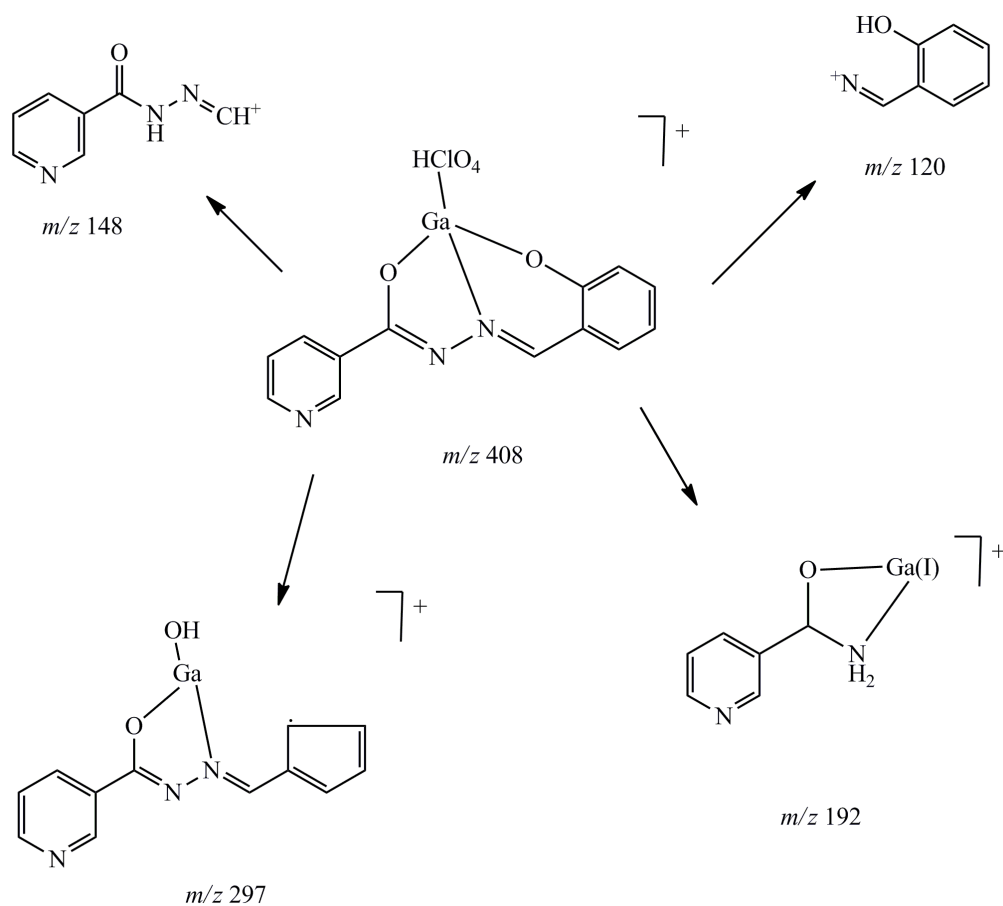
m/z	Rel. int / %	m/z	Rel. intenzitet / %			Ion
	Ga-H ₂ L1		Ga-H ₂ L2	Ga-H ₂ L3	Ga-H ₂ L4	
549	100	609	100	100	100	$[\text{Ga}(\text{HL})_2]^+$
326	54,06	356	50,25	29,27	21,68	$[\text{Ga}(\text{HL})_2-223]^+$
308	35,98	338	14,72	20,14	14,84	$[\text{Ga}(\text{L})]^+$
120	31,14	150	35,93	20,33	36,41	$[\text{H}_2\text{L}-122]^+$
-	-	135	14,81	0	0	$[\text{H}_2\text{L}-137]^+$
106	63,19	106	34,94	7,21	22,37	$[\text{H}_2\text{L}-166]^+$
105	8,57	105	3,63	0,06	1,70	$[\text{H}_2\text{L}-167]^+$
78	6,12	78	3,81	0,58	0,17	$[\text{H}_2\text{L}-194]^+$
69	10,13	69	3,97	1,27	2,15	$[\text{Ga}]^+$



Slika D4. Predložena shema fragmentiranja iona $[Ga(HL)_2]^+$ m/z 549 uz kolizijsku energiju od 30 V

Tablica D5. Relativni intenziteti iona nastalih fragmentacijom iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{HClO}_4)]^+$ m/z 438 uz kolizijsku energiju od 20 V

Ion	m/z	Relativni intenzitet / %		
		Ga-H ₂ L ₂	Ga-H ₂ L ₃	Ga-H ₂ L ₄
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{HClO}_4)]^+$	438	100	100	100
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{O}^*)]^+$	354	49,36	0	0
$[\text{Ga}(\text{L})]^+$	337	0	15,56	11,11
$[\text{Ga}(\text{L})-10]^+$	327	0	5,80	4,73
$[\text{H}_2\text{L}-124]^+$	148	25,94	6,27	35,81
$[\text{H}_2\text{L}-151]^+$	121	8,08	0,49	9,02
$[\text{H}_2\text{L}-166]^+$	106	2,48	0,45	1,09
$[\text{H}_2\text{L}-167]^+$	105	14,69	0,77	7,49
$[\text{C}_6\text{H}_6 + \text{H}]^+$	79	14,45	1,49	2,57
$[\text{Ga}]^+$	69	1,71	2,70	4,67



Slika D5. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{HClO}_4)]^+$ m/z 408 uz kolizijsku energiju od 20 V

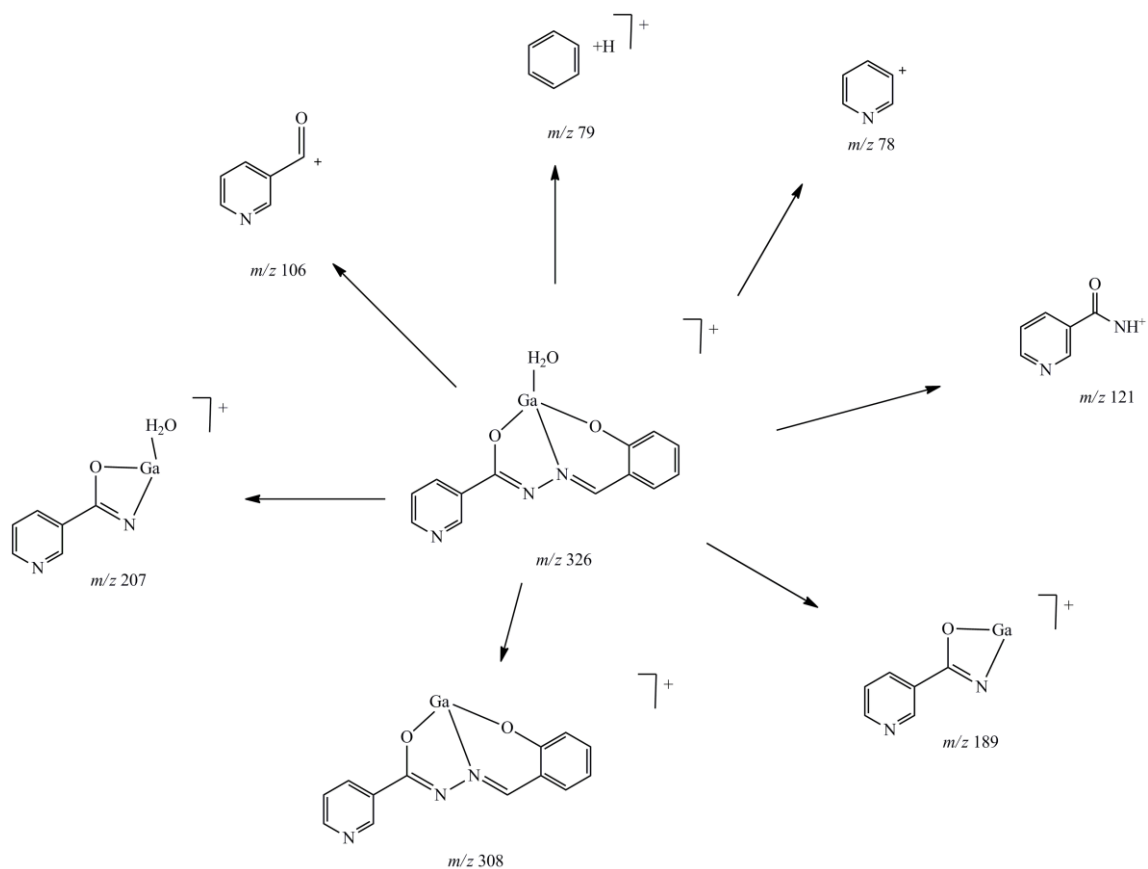
Tablica D6. Relativni intenziteti iona nastalih fragmentacijom iona $[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 356 uz kolizijsku energiju od 30 V

Ion	m/z	Relativni intenzitet / %		
		Ga-H ₂ L ₂	Ga-H ₂ L ₃	Ga-H ₂ L ₄
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$	356	6,97	68,56	19,12
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})-15]^+$	341	2,69	12,74	28,96
$[\text{Ga}(\text{L})]^+$	338	0,31	0,32	0
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{H}_2\text{O}) - 33]^+$	323	3,07	0	0
$[\text{Ga}(\text{L})-43]^+$	295	0,14	56,44	4,97
$[\text{Ga}(\text{L})-131]^+$	207	19,20	40,97	74,02
$[\text{Ga}(\text{L})-149]^+$	189	3,32	6,10	3,35
$[\text{H}_2\text{L}-151]^+$	121	1,05	11,10	11,45
$[\text{H}_2\text{L}-166]^+$	106	25,71	54,14	9,83
$[\text{H}_2\text{L}-167]^+$	105	60,68	4,29	21,27
$[\text{C}_6\text{H}_6 + \text{H}]^+$	79	41,63	58,00	50,38
$[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}]^+$	78	17,11	14,93	12,97
$[\text{Ga}]^+$	69	23,45	73,72	64,04

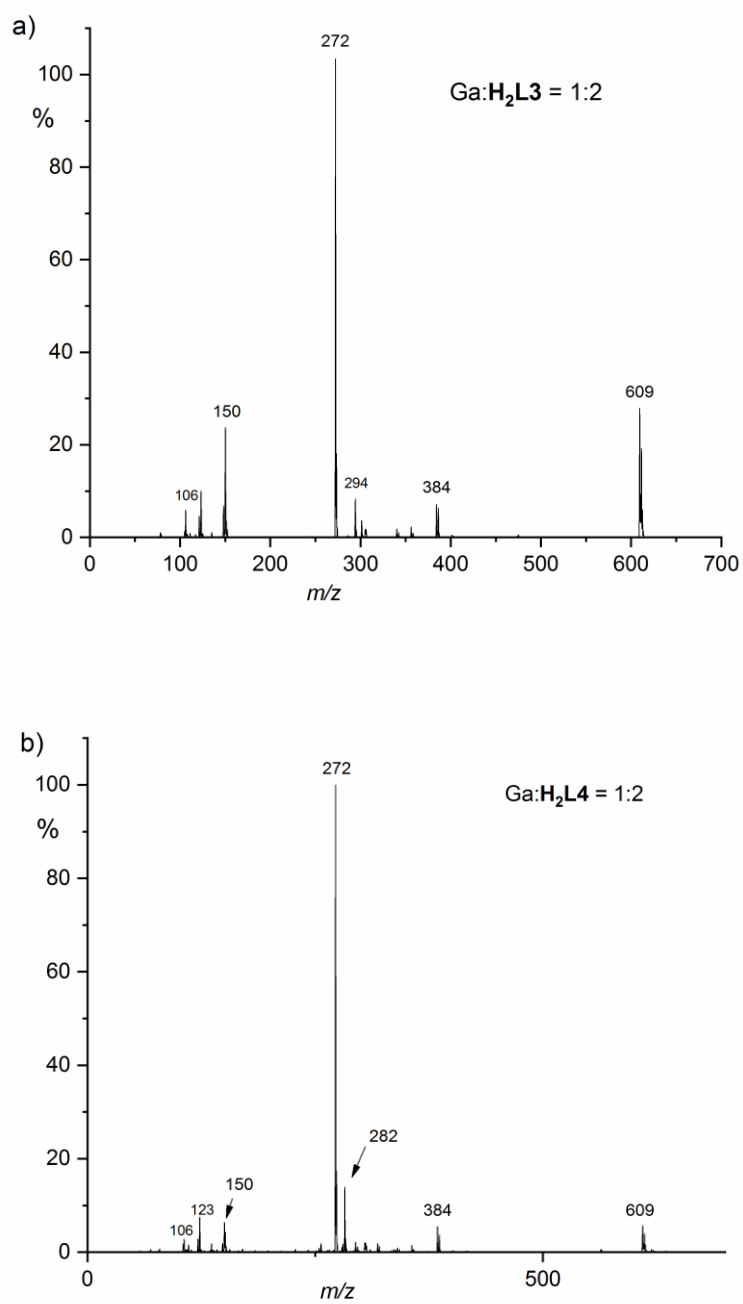
*Signali relativnog intenziteta 100% pripisani su izotopnom signalu ili aduktima koji nisu navedeni u tablici.

Tablica D7. Relativni intenziteti iona nastalih fragmentacijom iona $[\text{Ga}(\mathbf{L1})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 326 uz kolizijsku energiju od 30 V

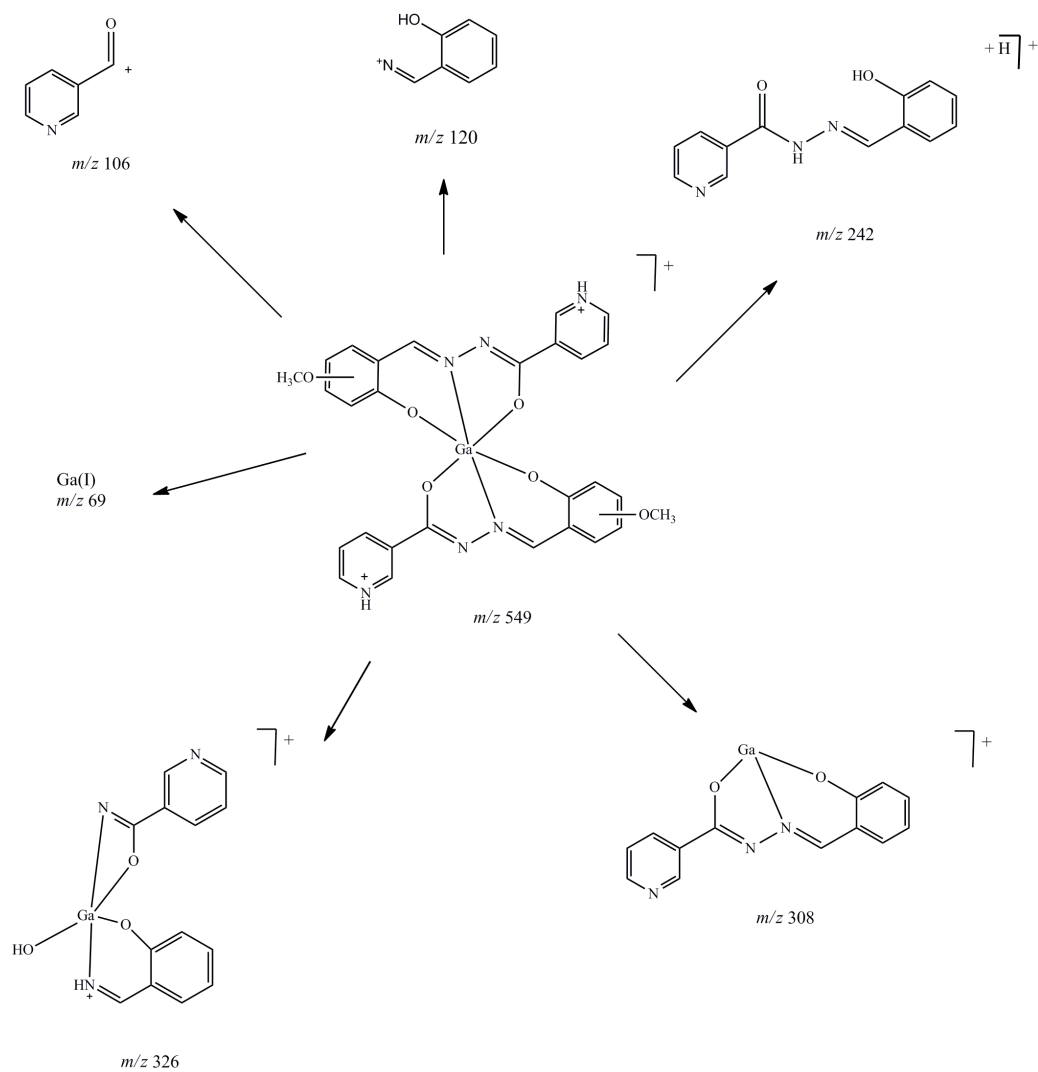
Ion	m/z	Relativni intenzitet / %
$[\text{Ga}(\mathbf{L})(\text{H}_2\text{O})]^+$	326	75,86
$[\text{Ga}(\mathbf{L})]^+$	308	3,12
$[\text{Ga}(\mathbf{L})-101]^+$	207	32,70
$[\text{Ga}(\mathbf{L})-119]^+$	189	3,50
$[\mathbf{H}_2\mathbf{L}-151]^+$	121	14,32
$[\mathbf{H}_2\mathbf{L}-166]^+$	106	33,58
$[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}]^+$	78	100
$[\text{Ga}]^+$	69	47,14



Slika D6. Predložena shema fragmentiranja iona $[\text{Ga}(\text{L1})(\text{H}_2\text{O})]^+$ m/z 326 uz kolizijsku energiju od 20 V



Slika D7. MS spektar otopine izoliranih kompleksa Ga³⁺ sa H₂L₃ (a) i H₂L₄ (b)

Slika D8. Predložena shema fragmentiranja iona m/z 549

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tihana Njegovec

Datum rođenja: 20.11.1993.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola [Osnovna škola Vladimir Nazor, Sveti Ilija]

2008.–2012. Srednja škola [Druga gimnazija, Varaždin]

2012.–2015. Preddiplomski studij [Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku]