

Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva (N-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa) kao ? ...

Biočić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:332052>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Maja Biočić

**Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize
injektiranjem u protok za određivanje
farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva
(*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina,
tiopronina i glutationa) kao čistih tvari te u
farmaceutskim pripravcima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Maja Biočić

**Development of kinetic methods and
methods of flow injection analysis for the
determination of pharmaceutically active
thiolic compounds (*N*-acetyl-L-cysteine,
cysteine, penicillamine, tiopronin and
glutathione) in pure form and in
pharmaceutical formulations**

DOCTORAL THESIS

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Maja Biočić

**Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize
injektiranjem u protok za određivanje
farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva
(*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina,
tiopronina i glutatona) kao čistih tvari te u
farmaceutskim pripravcima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentorica:

doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Split, 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Maja Biočić

**Development of kinetic methods and
methods of flow injection analysis for the
determination of pharmaceutically active
thiolic compounds (*N*-acetyl-L-cysteine,
cysteine, penicillamine, tiopronin and
glutathione) in pure form and in
pharmaceutical formulations**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
POVJERENSTVO ZA OCJENU DOKTORSKE DISERTACIJE

Pristupnica **Maja Biočić, mag. ing. cheming.** predala je izrađenu doktorsku disertaciju
dana: _____

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Mladen Miloš, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević, znanstvena savjetnica, Institut za oceanografiju i
ribarstvo, Split

Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

Prihvatilo je izrađenu doktorsku disertaciju dana: _____

Obrana doktorske disertacije će se održati dana: _____

Predsjednik povjerenstva:

Prof. dr. sc. Mladen Miloš

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Potvrđuje se povjerenstvo za obranu doktorske disertacije pristupnice **Maje Biočić, mag. ing. cheming.** u sastavu:

Prof. dr. sc. Mladen Miloš, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević, znanstvena savjetnica, Institut za oceanografiju i
ribarstvo, Split

Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

Ujedno se potvrđuje da je doktorska disertacija obranjena dana: _____

Dekan:

Prof. dr. sc. Igor Jerković

UDK:	612.398.192:543.23+602.615(043.3)
Znanstveno područje:	Prirodne znanosti
Znanstveno polje:	Kemija
Znanstvena grana:	Analitička kemija
Institucija:	Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za analitičku kemiju
Mentor rada:	Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Broj stranica:	191
Broj slika:	118
Broj tablica:	30
Broj priloga:	0
Broj literaturnih referenci:	219
Datum obrane:	18. siječnja 2019.
Rad je pohranjen u:	Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4

Tema rada prihvaćena je na 10. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu održanoj dana 07. travnja 2016. godine.

*Živjeti u svijetu i pri tom ne biti svjestan smisla svijeta isto je
kao i lutati velikom knjižnicom i pri tom ne doticati knjige.*

Dan Brown
"Izgubljeni simbol"

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun na stručnom vodstvu, prenesenom znanju i savjetima tijekom izvedbe eksperimentalnog rada i izrade doktorske disertacije.

Ovim putem želim se zahvaliti i prof. dr. sc. Njegomiru Radiću na poticaju i korisnim savjetima tijekom pregleda doktorske disertacije.

Svim prijateljima i kolegama koji su izravno i neizravno bili uključeni u cijelu znanstvenu priču veliko hvala na nesebičnoj potpori, poticaju i prijateljstvu.

Na samom kraju, najveće hvala Nikoli te roditeljima Željki i Frani koji su imali silno strpljenje i razumijevanje i bili najveća podrška.



SAŽETAK

Razvijene su i vrednovane nove, brze i osjetljive kinetičke metode i metode analize injektiranjem u protok (FIA) uz spektrofotometrijski detektor za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa u čistom obliku te u farmaceutskim pripravcima. Predložene metode temelje se na redukcijskom djelovanju navedenih analita na redoks-aktivni kolorimetrijski bis neokuproin bakrov(II) reagens. Apsorbancija reduciranog bis neokuproin bakrovog(I) kompleksa bilježi se spektrofotometrijski pri 458 nm.

Optimizirani su parametri kemijske reakcije. Temeljem kinetičkih spektrofotometrijskih mjerenja, prilikom konstruiranja krivulja umjeravanja, primjenjene su računske metode početne brzine i metode određenog vremena. Krivulja umjeravanja za metodu početne brzine linearna je u koncentracijskom području od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za *N*-acetil-L-cistein, cistein i glutation, te od $8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za penicilamin i tiopronin. Nagibi krivulja umjeravanja kod metode početne brzine ($n \approx 1,0$) potvrđuju reakcije pseudoprvog reda za određivanje razmatranih tiolnih spojeva. Kod metode određenog vremena krivulje umjeravanja su linearne u koncentracijskom rasponu od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za *N*-acetil-L-cistein i penicilamin (u 1 min) kao i za cistein (u 0,5 min) te od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za tiopronin i glutation (u 1 min) s odgovarajućim granicama dokazivanja, jednadžbama linearnosti i koeficijentima korelacije. Nisu zabilježene interferencije pomoćnih tvari koje su uobičajeno prisutne u farmaceutskim formulacijama. Obje predložene računske metode uspješno su primijenjene za određivanje razmatranih tiolnih spojeva u komercijalnim farmaceutskim pripravcima te su uspoređene s rezultatima dobivenim preporučenim metodama prema Britanskoj farmakopeji.

Prilikom razvoja novih spektrofotometrijskih metoda analize injektiranjem u protok za određivanje razmatranih tiolnih spojeva u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani, ispitani su kemijski parametri i parametri protočnog sustava. Optimizacija parametara je provedena primjenom univarijantne metode. Vrednovanje metode analize injektiranjem u protok provedeno je konstruiranjem krivulja umjeravanja, određivanjem granice dokazivanja i određivanja, selektivnosti, preciznosti i točnosti. Razvijene metode su linearne u rasponu koncentracija od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za *N*-acetil-L-cistein i penicilamin, od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za cistein, od $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ za tiopronin i od $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do 8×10^{-5}

mol L⁻¹ za glutation. Eksperimentalna mjerenja su potvrdila primjenjivost razvijenih metoda za pouzdano određivanje *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani uz učestalost mjerenja od 180 injektiranja na sat za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, penicilamina i glutationa te 120 injektiranja na sat za određivanje cisteina i glutationa. Predložene metode analize injektiranjem u protok su jednostavne, brze, osjetljive i ponovljive uz minimalnu potrošnju reagensa i stvaranja otpada.

Ključne riječi:

N-acetil-L-cistein, cistein, penicilamin, tiopronin, glutation, kinetičke metode, analiza injektiranjem u protok (FIA), spektrofotometrijski detektor

SUMMARY

Novel, rapid and sensitive kinetic methods and flow injection analysis (FIA) methods with spectrophotometric detection for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine, cysteine, penicillamine, tiopronin and glutathione in their pure form and in pharmaceutical preparations have been developed and validated. The proposed methods are based on the reduction properties of the above mentioned analytes using redox-active colorimetric bis neocuproine copper(II) reagent. The absorbance of the reduced bis neocuproine copper(I) complex is monitored spectrophotometrically at 458 nm.

The parameters of the chemical reactions have been optimized. Using kinetic spectrophotometric measurements, the computational initial rate and fixed time methods were utilized for constructing the calibration graphs. For the initial rate method the graphs showed linearity in concentration range from $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for *N*-acetyl-L-cysteine, cysteine and glutathione, and from $8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for penicillamine and tiopronin, respectively. The slopes of the initial rate method calibration curves ($n \approx 1.0$) confirmed the first order reaction for the determination of the above considered thiolic compounds. For the fixed time method the graphs are linear in concentration range from $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for *N*-acetyl-L-cysteine and penicillamine (at 1 min) as well as for cysteine (at 0.5 min), and from $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for tiopronin and glutathione (at 1 min), with corresponding limit of detections, equations and correlation coefficients. No interferences were observed from the excipients that are commonly present in pharmaceutical formulations. Both proposed computational methods were successfully applied for the determination of considered thiolic compounds in their commercial pharmaceutical formulations which were compared to the results obtained by the recommended methods according to Britain Pharmacopoeia.

During the development of a novel flow injection analysis spectrophotometric procedure for the determination of considered thiolic compounds in pharmaceutical formulations, the primary chemical and flow manifold parameters were examined. Optimum conditions of the parameters are achieved by univariate method. The flow injection methods were validated in terms of linear dynamic range, limit of detection, limit of quantitation, selectivity, precision, and accuracy. The methods found to be linear over the range from $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for *N*-acetyl-L-cysteine and penicillamine, from $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for cysteine, from 4×10^{-7}

mol L⁻¹ to 8×10^{-5} mol L⁻¹ for tiopronin and from 2×10^{-6} mol L⁻¹ to 8×10^{-5} mol L⁻¹ for glutathione. Measurements confirmed their suitability for the reliable determination of *N*-acetyl-L-cysteine, cysteine, penicillamine, tiopronin and glutathione in pharmaceutical preparations and dietary supplements at a sampling rate of 180 analyses per hour for *N*-acetyl-L-cysteine, penicillamine, glutathione and 120 analyses per hour for cysteine and glutathione, respectively. The proposed methods are simple, rapid, sensitive and reproducible with minimal reagent consumption and waste generation.

Key words:

N-acetyl-L-cysteine, cysteine, penicillamine, tiopronin, glutathione, kinetic methods, flow injection analysis (FIA), spectrophotometric detector

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. <i>N</i> -acetil-L-cistein	2
1.1.1. Kemijska svojstva	2
1.1.2. Biokemijska svojstva	3
1.1.3. <i>N</i> -acetil-L-cistein u farmaceutskim pripravcima.....	3
1.1.4. Analitičke metode određivanja <i>N</i> -acetil-L-cisteina.....	3
1.2. Cistein	10
1.2.1. Kemijska svojstva	10
1.2.2. Biokemijska svojstva	11
1.2.3. Cistein u farmaceutskim pripravcima	12
1.2.4. Analitičke metode određivanja cisteina	12
1.3. Penicilamin.....	20
1.3.1. Kemijska svojstva	20
1.3.2. Biokemijska svojstva	20
1.3.3. Analitičke metode određivanja penicilamina.....	21
1.4. Tiopronin.....	27
1.4.1. Kemijska svojstva	27
1.4.2. Biokemijska svojstva	27
1.4.3. Analitičke metode određivanja tiopronina.....	28
1.5. Glutation.....	34
1.5.1. Kemijska svojstva	34
1.5.2. Biokemijska svojstva	35
1.5.3. Analitičke metode određivanja glutaciona	36
2. OPĆI DIO	42
2.1. Kinetičke metode analize	42
2.1.1. Red reakcije.....	43

2.1.2. Zakoni brzine za reakcije prvog reda	44
2.1.3. Zakoni brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda	44
2.1.4. Vrste kinetičkih metoda	45
2.1.4.1. Diferencijalne metode	45
2.1.4.1.1. Metoda početne brzine	46
2.1.4.2. Integralne metode.....	47
2.1.4.2.1. Metoda određenog vremena.....	47
2.1.5. Praćenje napredovanja reakcije.....	47
2.1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda	51
2.2. Metode analize injektiranjem u protok (FIA)	52
2.2.1. Osnove strujanja i raspršenje prilikom injektiranja u protok.....	53
2.2.2. Prijenos tvari: konvekcija i difuzija	55
2.2.3. Reynoldsov broj	58
2.2.4. Fiagram	59
2.2.5. Osnovni dijelovi FIA instrumentacije.....	61
2.2.5.1. Injekcijski ventil.....	62
2.2.5.2. Crpka.....	63
2.2.5.3. Prijenosni sustav – priključci i reakcijske cijevi.....	64
2.2.5.4. Detektori	66
2.2.6. Izvedbe FIA sustava.....	67
2.2.7. FIA sustavi i "zelena analitička kemija" (<i>Green Analytical Chemistry</i> , GAC)	69
2.3. Spektrofotometrijski detektori	71
2.3.1. Svojstva elektromagnetskog zračenja	71
2.3.1.1. Valna svojstva zračenja.....	71
2.3.1.2. Čestična svojstva zračenja: fotoni.....	73
2.3.2. Elektromagnetski spektar	73

2.3.2.1. Spektroskopska mjerenja	74
2.3.3. Apsorpcija zračenja.....	75
2.3.3.1. Beerov zakon	77
2.3.4. Molekulska apsorpcijska spektroskopija	79
2.3.4.1. Molekulski spektrofotometri.....	80
2.4. Protokoli koje propisuje Farmakopeja za određivanje tiolnih spojeva.....	83
2.4.1. Titracije temeljene na oksidacijsko-redukcijskim ravnotežama, redoks titracije	83
2.4.1.1. Redoks-titracije standardnom otopinom joda	83
2.4.1.2. Redoks-titracije standardnom otopinom natrijeva tiosulfata	84
2.4.2. Titracije temeljene na kiselo-baznim reakcijama u nevodenom mediju... 85	
2.4.2.1. Potencijometrija	85
2.4.2.1.1. Izravna potencijometrija	86
2.4.2.1.2. Potencijometrijska titracija	87
3. MATERIJALI I METODE	89
3.1. Priprava otopina	89
3.1.1. Standardne otopine tiolnih spojeva	89
3.1.2. Otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa	89
3.1.3. Priprava acetatno-boratno-fosfatnog pufera.....	90
3.1.4. Otopina natrijevog hidroksida.....	90
3.1.5. Otopine realnih uzoraka (Fluimukan, Metalcaptase, Captimer, L-glutathione).....	91
3.1.6. Otopine za određivanje tiolnih spojeva prema metodama koje propisuje Farmakopeja [Council of Europe, <i>European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1</i> , Council of Europe, Strasbourg, 2007].....	93
3.1.6.1. Otopina perklorne kiseline	93
3.1.6.2. Otopina joda.....	93
3.1.6.3. Otopina natrijevog tiosulfata.....	93

3.1.6.4. Otopina kalijevog bromata.....	94
3.1.6.5. Otopina octene kiseline.....	94
3.1.6.6. Otopina klorovodične kiseline (HCl R)	94
3.1.6.7. Otopina razrijeđene klorovodične kiseline (HCl R1)	94
3.1.6.8. Otopina kalijevog jodida.....	94
3.1.6.9. Otopina škroba	94
3.2. Kinetičke metode analize – instrumentacija i procedura	95
3.3. Metode analize injektiranjem u protok – instrumentacija i procedura.....	96
3.4. Metode određivanja farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva prema protokolu Farmakopeje [British Pharmacopoeia Commission, <i>British Pharmacopoeia</i> 2009, The Stationery Office, London, 2008]	97
3.4.1. Određivanje penicilamina metodom koju propisuje Farmakopeja	97
3.4.2. Određivanje glutationa metodom koju propisuje Farmakopeja.....	97
3.4.3. Određivanje <i>N</i> -acetil-L-cisteina metodom koju propisuje Farmakopeja ..	98
3.4.4. Određivanje tiopronina metodom koju propisuje Farmakopeja	98
3.5. Ostala korištena oprema i uređaji.....	99
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	100
4.1. Kinetičke metode analize	105
4.1.1. Optimizacija uvjeta kemijske reakcije	106
4.1.2. Analitička iskoristivost kinetičkih mjerenja	117
4.1.2.1. Metoda početne brzine	123
4.1.2.2. Metoda određenog vremena.....	124
4.1.3. Vrednovanje razvijenih kinetičkih metoda analize tiolnih spojeva	128
4.1.3.1. Točnost kinetičkih metoda analize tiolnih spojeva.....	128
4.1.3.2. Interferencije	130
4.1.3.3. Realni uzorci	132
4.2. Metode analize injektiranjem u protok (FIA)	134
4.2.1. Optimizacija reakcijskih uvjeta (kemijskih parametara) u FIA sustavu .	134

4.2.2. Optimizacija parametara FIA sustava	138
4.2.2.1. Volumni protok osnovne otopine.....	138
4.2.2.2. Volumni protok otopine reagensa	142
4.2.2.3. Volumen injektiranja otopine analita.....	146
4.2.2.4. Duljina reakcijske uzvojnice	150
4.2.3. Obrada rezultata FIA mjerenja.....	154
4.2.3.1. Točnost (iskoristivost)	159
4.2.3.2. Utjecaj interferirajućih vrsta	160
4.2.3.3. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala)	162
4.2.3.4. Ispitivanje dosega (potpunosti) reakcije zaustavljanjem protoka .	169
4.2.4. Primjenjivost razvijenih FIA metoda u usporedbi sa standardnim metodama prema Britanskoj farmakopeji (realni uzorci).....	172
5. ZAKLJUČAK	175
6. LITERATURA	178
ŽIVOTOPIS	186

1. UVOD

Tiolni spojevi (RSH) sadrže vrlo reaktivnu funkcionalnu skupinu, tiolnu skupinu (*Sulphydryl*, –SH), koja određuje njihove kemijske i biološke značajke. Drugi, tradicionalan naziv, merkaptani (lat. *Mercurium captans*, "hvatači žive") se također temelji na svojstvu tiolne skupine da se čvrsto veže za živu. Izrazita kemijska reaktivnost tiolnih spojeva iskazana je sudjelovanjem tiolne skupine u gotovo svim poznatim kemijskim reakcijama bioloških stanica. Reakcije uključuju supstituciju –SH skupine, reakcije adicije, eliminacije i oksidacije s ciljem stvaranja kovalentnih veza između atoma sumpora i ugljika (S–C), dvaju atoma sumpora (S–S), sumpora i kisika (S–O), ali i između sumpora i metala (S–M). Tiolni spojevi su sumporni analozi alkohola budući da je kisik iz hidroksilne (–OH) skupine zamijenjen sumporom. Za razliku od alkohola, tiolni spojevi pokazuju mnogo veću reaktivnost upravo zahvaljujući atomu sumpora koji je nukleofilniji od kisikova atoma.^[1] Kao takvi, tiolni spojevi su važni stanični antioksidansi (*reducensi*). Biološka aktivnost tiolnih spojeva ovisi o sposobnosti oksidacije tiolne skupine zbog oksidacijskog stresa kojem je sumpor izložen. Ovakvo svojstvo omogućuje razlikovanje tiolnih spojeva od drugih bioloških molekula čije su funkcionalne skupine prema nukleofilnosti vrlo slične.^[2] Osim u biološkim sustavima tiolni spojevi imaju značajnu ulogu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te u industriji aroma.^[3] Farmaceutski proizvodi koji sadrže tiolne spojeve koriste se kao različiti terapijski pripravci i dodaci prehrani.^[4] Zbog značaja tiolnih spojeva u biološkim sustavima, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, sve je veći interes za razvojem novih, brzih i osjetljivih metoda njihovog određivanja. U ovom doktorskom radu prikazat će se razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanja tiolnih spojeva sa izraženim redukcijskim svojstvima: *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa.

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da su u dosadašnjim istraživanjima, za određivanje razmatranih tiolnih spojeva u farmaceutskim pripravcima i biološkim uzorcima, u najvećem udjelu korištene slijedeće analitičke tehnike: spektrofotometrija, fluorimetrija, kemiluminescencija, elektroanalitičke tehnike (potencijometrija, amperometrija, voltometrija), atomska apsorpcijska spektrometrija (*Atomic Absorbance Spectrometry*, AAS), zatim tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i tekućinske kromatografije visoke

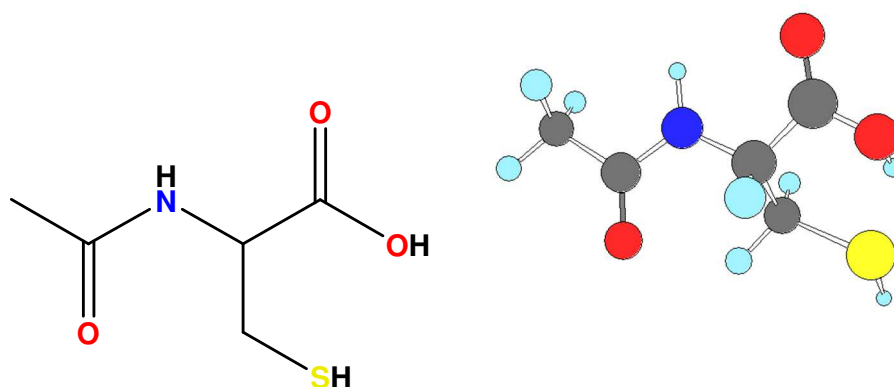
djelotvornosti na obrnutim fazama (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). U značajnom broju su zastupljene i metode analize u protoku koje uključuju analizu injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*, FIA) te analizu slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*, SIA). U nastavku će za svaki pojedini tiolni spoj biti uspoređene objavljene metode analize s pripadajućim tehnikama.

1.1. *N*-acetil-L-cistein

N-acetil-L-cistein (NAC), u literaturi poznat i kao *N*-acetilcistein, acetilcistein, 2–acetamido–3–sulfanilpropanska kiselina (prema IUPAC-u), je sintetski aminotiolni antioksidans. Koristi se prvenstveno kao mukolitik te kao protuotrov (*antidot*) kod predoziranja paracetamolom.^[5]

1.1.1. Kemijska svojstva

NAC je bijeli kristalinični prah kemijske formule $C_5H_9NO_3S$ i molne mase 163,2 g mol^{-1} . Karakterističnog je mirisa i kiselog okusa. Topljiv je u vodi, alkoholu, vrućem izopropilnom alkoholu, metil acetatu i etil acetatu, dok je netopljiv u eteru i kloroformu. Talište mu je na temperaturi 109,5 °C.^[6] Stabilan je na dnevnom svjetlu i pri temperaturama do 120 °C, te nije higroskopan. Konstanta disocijacije pK_a iznosi 3,24 s obzirom na karboksilnu skupinu.^[7]



Slika 1-1 *N*-acetil-L-cistein prikazan strukturnom formulom (2D) i molekulskim modelom (3D)

1.1.2. Biokemijska svojstva

NAC je *N*-acetil derivat aminokiseline L-cistein, gdje je acetilna skupina vezana na dušikov atom. Samo *N*-acetil-L-cistein je aktivan oblik koji se metabolizira do cisteina, a zatim do glutationa. Koristi se kao lijek protiv kašlja (mukolitik), jer omogućuje razgradnju disulfidnih veza u sluzi. Na taj način regulira izlučivanje sluzi pri upali i smanjuje stvaranje mukoznog sekreta, pri čemu olakšava iskašljavanje.^[8]

Ovaj spoj je komercijalno dostupan kao farmaceutski pripravak te kao dodatak prehrani zbog antioksidacijskog djelovanja i protektivnog učinka za jetru. NAC povećava sintezu glutationa u jetri, polipeptida, važnog za detoksikaciju štetnih tvari. Zbog kelatirajućih svojstava može pomoći pri uklanjanju teških metala iz organizma.^[9]

1.1.3. *N*-acetil-L-cistein u farmaceutskim pripravcima

NAC je dostupan u različitim farmaceutskim oblicima, koji se razlikuju za različite indikacije. Dostupan je u obliku:^[9]

- otopine za inhalaciju - koristi se u mukolitičkoj terapiji;
- otopine za intravensku injekciju - za liječenje predoziranja paracetamolom;
- oralne otopine - primjenjive u obliku sirupa u mukolitičkoj terapiji;
- šumeće tablete - za liječenje kašlja i prehlade u mukolitičkoj terapiji;
- tablete - za liječenje kašlja i prehlade u mukolitičkoj terapiji.

NAC se u obliku otopine za intravensku injekciju isključivo koristi za liječenje predoziranja paracetamolom te je kao takav dostupan samo na recept, dok se u bezreceptnoj distribuciji pojavljuju otopine za oralnu upotrebu, tablete te šumeće tablete.^[9]

1.1.4. Analitičke metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina

U dostupnoj literaturi pronađene su objavljene metode za određivanje NAC-a u čistom obliku, u farmaceutskim pripravcima i biološkim uzorcima (tkiva ili stanice), uz korištenje sljedećih analitičkih tehnika: titrimetrija, spektrofotometrija, fluorimetrija, kromatografija, potenciometrija, konduktometrija i voltometrija.

Jedna od najranije objavljenih metoda određivanja NAC-a je katalitička titracija srebrovim nitratom, gdje je završna točka titracije određena spektrofotometrijski pri 537 nm.^[10]

Fluorimetrijsko određivanje NAC-a se temelji na formiranju kompleksa terbijevih(III) i uranijevih(III) iona s NAC-om kao fluorescentnih vrsta.^[11]

Objavljene su dvije kinetičke metode određivanja NAC-a uz potenciometrijski detektor. Jedna kinetička metoda se temelji na reakciji stvaranja slabo topljivih soli između analita i srebrovih(I) iona korištenjem komercijalne selektivne jodidne elektrode,^[12] a druga na reakciji između analita i jodata uz dodatak jodida, uz istu indikatorsku elektrodu.^[13]

Opisana je i metoda elektrokatalitičke oksidacije NAC-a na nanočesticama čija je jezgra od željezovog(III) oksida, a ljuska od kobaltovog heksacijanoferata. Za određivanje NAC-a primijenjene su amperometrija i voltometrija sa linearnom promjenom potencijala.^[14]

Objavljeno je i nekoliko kromatografskih metoda određivanja NAC-a u biološkim uzorcima: tekućinska kromatografija spregnuta s elektrokemijskim detektorom;^[15] tekućinska kromatografija na obrnutim fazama uz spektrometrijski detektor;^[16] zatim tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz spektrofotometrijski detektor^[17] i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na obrnutim fazama spregnuta sa spektrofotometrom u vidljivom dijelu zračenja^[18] ili u ultraljubičastom dijelu zračenja^[19].

U literaturi se može pronaći veliki broj metoda određivanja NAC-a u farmaceutskim pripravcima uz spektrofotometrijski detektor. Analitičke karakteristike navedenih metoda su uspoređene u tablici 1-1(a), a uključuju klasičnu spektrofotometriju, kinetičke metode analize i metode analize injektiranjem u protok. Iz navedenih podataka je vidljivo da FIA metoda omogućuje analizu znatno većeg broja uzoraka, uz šire koncentracijsko područje određivanja NAC-a. Metode se temelje na redoks reakcijama i/ili združenim redoks i kompleksometrijskim reakcijama.

U tablici 1-1(b) navedene su metode analize u protoku uz različite detektore (spektrofotometrijski, kemiluminiscencijski, fluorimetrijski, turbidimetrijski i potenciometrijski detektor). Za razliku od spektrofotometrijskog detektora, metode analize u protoku s ostalim detektorima ostvaruju manju učestalost uzorkovanja, više granice dokazivanja, kao i uže linearno koncentracijsko područje određivanja NAC-a.

Tablica 1-1(a) Usporedba literaturnih podataka razvijenih metoda za određivanje NAC-a uz spektrofotometrijski detektor

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[20]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	515	$4,5 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 20 min)	0,34	farmaceutski pripravci
[21]	<i>o</i> -ftalaldehid i izoleucin	335	$3,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-7}$	klasična	0,30	farmaceutski pripravci
[22]	paladijev(II) klorid	375	$2,5 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	klasična (očitanje signala 10 min)	1,92	farmaceutski pripravci
[23]	ninhidrin i enzim akrilaza	550	np	np	klasična	np	tkivo
[24]	željezo(III) i ferozin	562	$1,2 \times 10^{-7} - 3,7 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 5 min)	1,53	farmaceutski pripravci
[25]	kalijev jodat i leuko ksilen cijanol	613	$1,2 \times 10^{-6} - 9,8 \times 10^{-6}$	np	klasična	np	farmaceutski pripravci
[26]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil- <i>s</i> -triazin (TPTZ)	593	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-7}$	klasična	np	farmaceutski pripravci
[27]	kobalt(III)-etilendiamintetraoctena kiselina, paladijev(II) klorid i hipofosfit	540	$6,6 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-6}$ $8,3 \times 10^{-7} - 1,7 \times 10^{-5}$	np	kinetika	3,30	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[28]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$8,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min)	np	farmaceutski pripravci
[29]	4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa 1,3-diazol (NBD-Cl)	424	$1,2 \times 10^{-5} - 1,3 \times 10^{-4}$ $4,9 \times 10^{-5} - 7,4 \times 10^{-5}$	np	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 30 min) metoda početne brzine	0,50	farmaceutski pripravci
[30]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-s- triazin (TPTZ)	593	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ $4,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-7}$ $1,0 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min) metoda početne brzine	np	farmaceutski pripravci
[31]	bakar(II) i neokuproin	458	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-7}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 1 min) metoda početne brzine	0,50	farmaceutski pripravci
[32]	paladijev(II) klorid	380	$5,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-5}$	FIA (učestalost injektiranja 45 h ⁻¹)	1,40	farmaceutski pripravci
[33]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$3,5 \times 10^{-6} - 4,3 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	1,50	farmaceutski pripravci
[34]	brom	400	$1,6 \times 10^{-4} - 1,6 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-5}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	1,20	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[35]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$ $1,6 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-4}$	np	FIA	np	farmaceutski pripravci
[36]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)	593	$6,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	0,29	farmaceutski pripravci
[37]	željezo(III) i heksacijanoferat(III)	700	$3,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	FIA (učestalost injektiranja 70 h ⁻¹)	np	farmaceutski pripravci
[38]	željezo(III) i fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	3×10^{-7}	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	2,50	farmaceutski pripravci
[39]	cerij(IV) i feroin	500	$6,5 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	1,40	farmaceutski pripravci
[40]	o-ftalaldehid i izoleucin	335	$9,8 \times 10^{-5} - 9,8 \times 10^{-4}$	np	FIA (učestalost injektiranja 126 h ⁻¹)	0,60	farmaceutski pripravci
[41]	cinkov(II) fosfat	540	$3,0 \times 10^{-5} - 1,5 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	0,50	farmaceutski pripravci
[42]	bakar(II) i neokuproin	458	$6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 180 h ⁻¹)	0,50	farmaceutski pripravci

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*)

Tablica 1-1(b) Usporedba literaturnih podataka za određivanje NAC-a metodama analize u protoku uz različite detektore

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[32]	paladijev(II) klorid	380	$5,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-5}$	spektrofotometar	1,40	FIA (učestalost injektiranja 45 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[33]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$3,5 \times 10^{-6} - 4,3 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	1,50	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[34]	brom	400	$1,6 \times 10^{-4} - 1,6 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-5}$	spektrofotometar	1,20	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[35]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$ $1,6 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-4}$	np	spektrofotometar	np	FIA	farmaceutski pripravci
[36]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)	593	$6,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	0,29	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[37]	željezo(III) i heksacijanoferat(III)	700	$3,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	spektrofotometar	np	FIA (učestalost injektiranja 70 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[38]	željezo(III) i fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	2,50	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[39]	cerij(IV) i feroin	500	$6,5 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	1,40	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[40]	o-ftalaldehid i izoleucin	335	$9,8 \times 10^{-5} - 9,8 \times 10^{-4}$	np	spektrofotometar	0,60	FIA (učestalost injektiranja 126 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[41]	cinkov(II) fosfat	540	$3,0 \times 10^{-5} - 1,5 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	0,50	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[42]	bakar(II) i neokuproin	458	$6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	0,50	FIA (učestalost injektiranja 180 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[43]	AgI elektroda	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	np	potencijometar	np	FIA	np
[44]	srebrov nitrat	410	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$	turbidimetrijski detektor	2,00	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[45]	luminol i hipoklorit	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,09	FIA	farmaceutski pripravci
[46]	luminol i vodikov peroksid uz bakar kao katalizator	/	$2,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,44	FIA (učestalost injektiranja 40 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[47]	dijamantna elektroda dopirana borom	/	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-8}$	amperometar	4,1	FIA	farmaceutski pripravci
[48]	monobromobiman (MBB)	$\lambda_{\text{ex}} = 390$ $\lambda_{\text{em}} = 480$	$1,5 \times 10^{-4} - 4,6 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-6}$	fluorimetar	1,50	SIA (učestalost injektiranja 36 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci

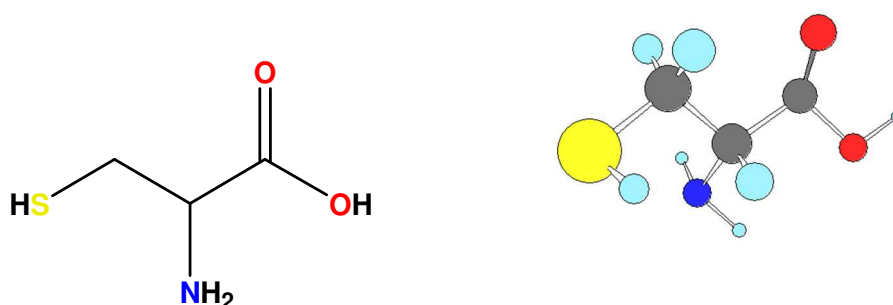
LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*); SIA - analiza slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*)

1.2. Cistein

Cistein (CYS), u bazi podataka pod nazivom (2R)-2-amino-3-sulfanilpropanska kiselina (prema IUPAC-u), je polarna neesencijalna aminokiselina koja se sintetizira u ljudskom organizmu. Svojstva su određena tiolnom ($-SH$) skupinom koja čini cistein hidrofobnom aminokiselinom. Zbog nukleofilnog svojstva tiolne skupine, cistein učestalo sudjeluje u enzimskim reakcijama.^[49]

1.2.1. Kemijska svojstva

Cistein je pri sobnoj temperaturi bezbojan ili gotovo bijeli, kristalinični prah molekulske formule $C_3H_7NO_2S$ i molne mase $121,16 \text{ g mol}^{-1}$. Drugi kemijski nazivi cisteina su: β -merkaptalanin, 2-amino-3-merkaptopropanska kiselina, 1-amino-2-merkaptopropionska kiselina, β -tiolpropionska kiselina. Topljiv je u polarnim otapalima kao što su voda, etanol, octena kiselina i vodena otopina amonijaka. Netopljiv je u eteru, acetonu, etil acetatu, benzenu, ugljikovom dioksidu i ugljikovom tetrakloridu. Topljivost u vodi iznosi 277 g L^{-1} pri 25°C . Točka taljenja cisteina je pri temperaturi 240°C , a do termičkog raspada dolazi pri 260°C . Cistein je slaba kiselina koja disocira u tri stupnja. U prvom stupnju disocira karboksilna ($-COOH$) skupina s konstantom disocijacije $K_{a1} = 1,95 \times 10^{-2}$. Drugi stupanj disocijacije kontrolira konstanta disocijacije $K_{a2} = 4,68 \times 10^{-9}$ i pripada amino skupini ($-NH_2$) te u trećem stupnju disocira tiolna skupina ($-SH$) s konstantom disocijacije $K_{a3} = 1,66 \times 10^{-11}$.^[50]



Slika 1-2 L-cistein prikazan strukturnom (2D) formulom i molekulskim (3D) modelom

U neutralnim i slabo lužnatim vodenim otopinama cistein se oksidira do cistina uz prisutnost zraka ili filtracijom kroz ugljen. Otopine cisteina u kiselom mediju su stabilne i do nekoliko dana. Čisti kristalinični prah cisteina je stabilniji od pripremljenih otopina budući da se otopine cisteina vrlo brzo kontaminiraju metalima u tragovima (osobito bakrom i željezom).^[51]

1.2.2. Biokemijska svojstva

Cistein je veoma važan biološki spoj koji sudjeluje u različitim staničnim funkcijama. Između dvadeset prirodnih aminokiselina cistein je jedinstvena aminokiselina, podložna redoks reakcijama zahvaljujući reaktivnoj tiolnoj skupini. Biološki je značajan za sintezu proteina, detoksikaciju i različite metaboličke funkcije ljudskog organizma.^[52] Nalazi se u sastavu većine proteina, ali u malim količinama. Ograničavajući je prekursor u proizvodnji aminokiseline taurina.^[53] Cistein je supstrat koji određuje brzinu unutarstanične sinteze glutathiona. Skoro je sav izvanstanični cistein prisutan u oksidiranom obliku. Zbog toga je izvanstanični cistein primarni izvor unutarstaničnog cisteina, nužnog za sintezu glutathiona.^[54]

Cistein nije tipična neesencijalna aminokiselina, jer se sintetizira iz esencijalne aminokiseline metionina, koji je donor tiolne skupine i neesencijalne aminokiseline serina. Sinteza cisteina započinje konverzijom metionina u homocistein koji reakcijom sa serinom prelazi u cistation. U posljednjem koraku hidrolizom cistationa nastaju cistein i homoserin.^[49]

Tiolna skupina zbog nukleofilnog svojstva može sudjelovati u enzimskoj katalizi i podliježe reakcijama oksidacije i esterifikacije. Oksidacijom dviju molekula cisteina i njihovim kovalentnim povezivanjem disulfidnom vezom preko atoma sumpora formira se cistin. Cistin sadrži hidrofobne ostatke i povećava stabilnost proteina uslijed nastanka disulfidnog mosta.^[55] Navedena reakcija oksidacije je reverzibilna, stoga redukcijom, u kojoj dolazi do pucanja disulfidne veze, ponovno nastaju dvije molekule cisteina.^[56]

Poremećaj metabolizma cisteina uključuje cistinozu, autosomnu recesivnu nasljednu bolest karakteriziranu nakupljanjem velikih količina slobodnog cistina (nevezanog za proteine) u brojnim tkivima.^[55] Nadalje, poremećaj razgradnje cisteina može dovesti do pojave cistinurije. Cistinurija je benigni genetski poremećaj reapsorpcije cisteina i strukturno sličnih aminokiselina (lizin, arginin, ornitin) čija je jedina komplikacija moguće stvaranje cistinskih kamenaca uslijed povećanog izlučivanja. Cistinurija se liječi alkalizacijom urina, primjerice sodom bikarbonom i povećanim unosom tekućine ili D-penicilaminom i tioproninom.^[57,58]

Upravo su disulfidne veze cistina odlučujuće u određivanju strukture mnogih proteina. Budući da cistein sudjeluje u reakcijama elektronskog prijelaza, pomaže enzimima u katalitičkim reakcijama te ima reduksijska (antioksidacijska) svojstva.

Budući da tiolna skupina pokazuje visoki afinitet prema teškim metalima, proteini koji sadrže cistein će vezivati metale kao što su živa, olovo i kadmij.

1.2.3. Cistein u farmaceutskim pripravcima

Cistein je na tržištu dostupan u obliku farmaceutskih pripravaka i dodatka prehrani. U oftamologiji se koristi kao aktivna tvar kapi za oči koje se primjenjuju za saniranje kemijski izazvanih opeklini.^[59]

Stvarajući disulfidne veze cistein daje čvrstoću strukturnom proteinu kose – keratinu.^[60] Zbog navedenog svojstva često se nalazi u oralnim dodacima prehrani za rast i čvrstoću kose u obliku cisteina ili dimera cistina, ali ne kao osnovna djelatna tvar već u kombinaciji s različitim vitaminima i mineralima. Cistein se nalazi u KAL Hair force kapsulama®, MERZ Spezial dražeje Koža/kosa/nokti®, a cistin u Krka Fitoval kapsulama® i DUCRAY anacaps kapsulama® i MERZ Spezial Hair dražejama®.



Slika 1-3 Farmaceutski pripravci koji sadrže cistein

1.2.4. Analitičke metode određivanja cisteina

Određivanje cisteina u biološkim tekućinama prilikom kliničkih ispitivanja te u pripravcima kao dodatak prehrani je veoma značajno s obzirom na navedenu ulogu cisteina u staničnim funkcijama. U literaturi su objavljene metode za određivanje cisteina primjenom sljedećih analitičkih tehnika: spektrofotometrije, fluorimetrije, potenciometrije, amperometrije i voltometrije, atomske apsorpcijske spektrometrije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na obrnutim fazama (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Također se koriste kinetičke metode analize i metode analize u protoku (*Flow Injection Analysis*, FIA i *Sequential injection Analysis*, SIA).

Jedna od najranije objavljenih metoda određivanja cisteina datira iz 1988. godine. Cistein se određivao u smjesi sa cistinom, u uzorcima urina, katalitičkom titracijom. Signal je bilježen fototitratorom.^[61] Dvije godine kasnije razvijena je još jedna metoda katalitičke titracije za određivanje cisteina. Kao titrant korišten je srebrov nitrat, a završna točka titracije je bilježena spektrofotometrijski.^[10]

Fluorimetrijski detektor također je korišten za određivanje cisteina. Opisana metoda zasniva se na fluorescencijskoj reakciji cisteina sa amonijevim 7-fluorobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-sulfonatom.^[62]

Cistein se pred kraj 20.-og stoljeća određivao i potenciometrijskom titracijom u obliku kobaltovog(II) kompleksa. Završna točka titracije je eksperimentalno određena primjenom elektrokemijskog članka u kojem je kao indikatorska elektroda korištena ion selektivna sulfidna elektroda.^[63]

U novije vrijeme razvijaju se i kinetičke elektroanalitičke metode određivanja cisteina. Opisana je kinetička metoda uz potenciometrijski detektor za određivanje cisteina koja se temelji na reakciji formiranja slabo topljivog taloga između cisteina i srebrovih(I) iona. Signal je praćen pomoću elektrokemijskog članka s indikatorskom ion selektivnom elektrodom, bilježenjem ovisnosti mjerenog potencijala o vremenu. Metoda je primijenjena na određivanje cisteina u farmaceutskim pripravcima.^[12]

Korištenjem cikličke voltametrije i konoamperometrije praćena je elektrokatalitička oksidacija cisteina na nanočesticama kobaltovog heksacijanoferata. Metoda je primijenjena na određivanje razmatranog analita u uzorcima urina i krvnog seruma.^[64]

U literaturi je pronađena i metoda za određivanje cisteina u vinu u obliku živinih kompleksa primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije.^[65]

Već 90.-ih godina korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) za određivanje cisteina u farmaceutskim pripravcima uz spektrofotometrijski detektor. Metoda detekcije se temeljila na reakciji između cisteina i 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeve kiseline). Reakcijom je formiran žuto obojeni kromofor koji je bilježen u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.^[66] Kasnije se ista tehnika primijenila za određivanje cisteina u biološkim uzorcima. Nakon kromatografskog odijeljivanja, cistein je derivatiziran

također 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) uz bilježenje signala spektrofotometrijskim detektorom u vidljivom dijelu elektromagnetskog zračenja.^[17]

Razvijena je kromatografska metoda na obrnutim fazama za određivanja cisteina u biološkom uzorku, točnije u ljudskoj plazmi.^[18] Dva desetljeća kasnije, također se primijenila ista tehnika uz isti detektor za određivanje cisteinu u ljudskoj plazmi. Tiolna skupina cisteina u reakciji s 2-kloro-1-metilkinolin tetrafluoroboratom formira derivat detektibilan spektrofotometrijski u ultraljubičastom dijelu zračenja.^[67] Istom tehnikom cistein je određivan i u urinu. Postupak uključuje redukciju disulfidnih veza, a potom kemijsko prevođenje analita u detektibilan derivat.^[19]

Objavljena je i kromatografska tehnika primijenjena za određivanje cisteina uz elektrokemijski detektor.^[15]

Značajan broj objavljenih spektrofotometrijskih metoda određivanja cisteina temelji se na redukcijskom djelovanju tiolne skupine. Nakon redoks reakcije te kompleksometrijske reakcije uz različite ligande, nastali kromogeni produkti bilježe se na spektrofotometrijskom detektoru (tablica 1-2(a)). Pretragom literature pronađene objavljene metode određivanja cisteina u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani, klasičnom spektrofotometrijom, kinetičkim metodama analize i metodama analize injektiranjem u protok uz spektrofotometrijski detektor, sumarno su prikazane u tablici 1-2(a).

Objavljene metode analize injektiranjem u protok za određivanje cisteina osim spektrofotometrijske detekcije, uključuju i fluorimetrijske, kemiluminiscencijske i amperometrijske detektore (tablica 1-2(b)). Kao što je vidljivo iz tablice 1-2(b) objavljene metode analize injektiranjem u protok uz spektrofotometrijski detektor imaju značajno veću učestalost injektiranja, od onih s drugim navedenim detektorima.

Tablica 1-2(a) Usporedba literaturnih podataka razvijenih metoda za određivanje CYS uz spektrofotometrijski detektor

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[24]	željezo(III) i ferozin	562	$1,7 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 10 min)	1,64	farmaceutski pripravci
[68]	živa(II) i bis(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridine)ditiocijanato rutenij(II) (N3)	461	$5,0 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-8}$	klasična	5,7	np
[27]	kobalt(III)-etilendiamintetraoctena kiselina, paladijev(II) klorid i hipofosfit	540	$4,1 \times 10^{-7} - 3,4 \times 10^{-6}$ $8,3 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$	np	kinetika	3,60	farmaceutski pripravci
[28]	željezo(III)-fenantrolin i bakar(II)	510	$8,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	$2,05 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min)	np	farmaceutski pripravci
[69]	amonijev 18-molibdofosfat (18-AMP)	820	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 240 h ⁻¹)	np	dodaci prehrani
[70]	željezo(III)/fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	1,80	farmaceutski pripravci i dodaci prehrani
[71]	kobalt(II) ioni uklopljeni u polimerni materijal	360	$8,3 \times 10^{-6} - 7,4 \times 10^{-4}$	np	FIA (učestalost injektiranja 90 h ⁻¹)	0,80	farmaceutski pripravci
[72]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$1,0 \times 10^{-6} - 9,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 45 h ⁻¹)	0,32	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[35]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$8,0 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$	np	FIA	np	farmaceutski pripravci
[73]	5,10,15,20-tetrakis(4- <i>N</i> -trimetilammoniofenil) (TTMAPP)	433	$2,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 30 h ⁻¹)	0,73	farmaceutski pripravci (injekcije), preparati za oblikovanje kose
[74]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-6}$	SIA (učestalost injektiranja 15 h ⁻¹)	np	kvaščeve gljivice, <i>S. Cerevisiae</i> (fermentacija)

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*)

Tablica 1-2(b) Usporedba literaturnih podataka za određivanje CYS metodama analize injektiranjem u protok (FIA) uz različite detektore

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[69]	amonijev 18-molibdofosfat (18-AMP)	820	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	np	FIA (učestalost injektiranja 240 h ⁻¹)	dodaci prehrani
[70]	željezo(III)/fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	1,8	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci i dodaci prehrani
[73]	5,10,15,20-tetrakis(4- <i>N</i> -trimetilamoniofenil) (TTMAPP)	433	$2,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	0,73	FIA (učestalost injektiranja 30 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci (injekcije), preparati za oblikovanje kose
[71]	kobalt(II) ioni uklopljeni u polimerni materijal	360	$8,3 \times 10^{-6} - 7,4 \times 10^{-4}$	np	spektrofotometar	0,80	FIA (učestalost injektiranja 90 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[72]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$1,0 \times 10^{-6} - 9,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	0,32	FIA (učestalost injektiranja 45 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[35]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$8,0 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$	np	spektrofotometar	np	FIA	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[74]	feroin (željezo(III) i 1,10-fenantrolin)	510	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	np	SIA (učestalost injektiranja 15 h ⁻¹)	<i>S. cerevisiae</i> , kvaščeve gljivice
[75]	18-molibdo-2-fosfat (18-MPA)	690	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	0,90	FIA (učestalost injektiranja 20 h ⁻¹)	biološki dodaci prehrani
[52]	talij(III)	$\lambda_{\text{ex}} = 227$ $\lambda_{\text{em}} = 419$	$2,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-7}$	fluorimetar	1,80	FIA (učestalost injektiranja 20 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[76]	inhibicija oksidacije tiamina uz Hg(II)	$\lambda_{\text{ex}} = 356$ $\lambda_{\text{em}} = 445$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	np	fluorimetar	1,14	FIA (učestalost injektiranja 22 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[77]	talij(III)	$\lambda_{\text{ex}} = 227$ $\lambda_{\text{em}} = 419$	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$7,0 \times 10^{-7}$	fluorimetar	1,40	FIA (učestalost injektiranja 16 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci; sok od limuna; voda; šampon za kosu
[78]	bakar(II) i 5-(3-fluo-4-chlorophenylazo)-8-benzenesulfon-amidoquinoline (FCPBSQ)	$\lambda_{\text{ex}} = 326$ $\lambda_{\text{em}} = 365$	$4,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-8}$	fluorimetar	1,79	FIA (učestalost injektiranja 64 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[79]	ftaldialdehid	$\lambda_{\text{ex}} = 340$ $\lambda_{\text{em}} = 456$	$1,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$	np	fluorimetar	1,30	FIA (učestalost injektiranja 75 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[56]	talij(III)	$\lambda_{\text{ex}} = 250$ $\lambda_{\text{em}} = 430$	$5,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	np	fluorimetar	1,01	FIA (učestalost injektiranja 54 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci; biološke tekućine
[45]	luminol i hipoklorit	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	np	kemiluminiscencijski detektor	2,36	FIA	farmaceutski pripravci
[46]	luminol i vodikov peroksid uz bakar kao katalizator	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,98	FIA (učestalost injektiranja 40 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[80]	nikal(IV) i perjodat	515	$3,0 \times 10^{-8} - 2,5 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-8}$	kemiluminiscencijski detektor	2,00	FIA	biološke tekućine
[81]	luminol i vodikov peroksid katalizirani Au koloidom	425	$1,0 \times 10^{-9} - 7,0 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-10}$	kemiluminiscencijski detektor	2,10	FIA	biološke tekućine
[82]	elektroda obložena filmom rutenijevog oksida i cijanida	/	$4,1 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-4}$	np	amperometrija	np	FIA (učestalost injektiranja 110 h ⁻¹)	np

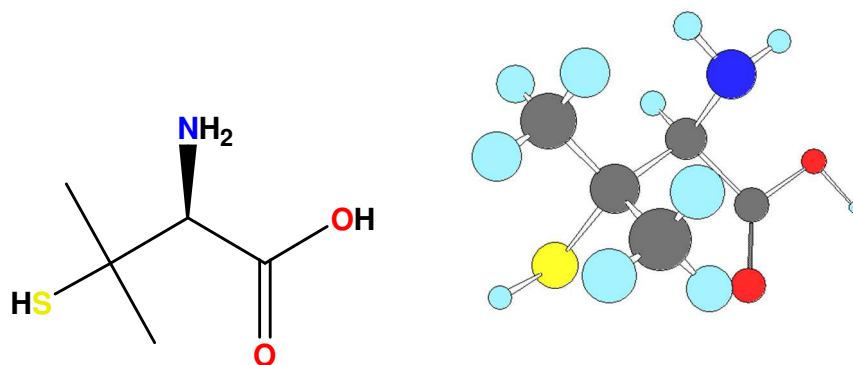
LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*); SIA - analiza slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*)

1.3. Penicilamin

D-penicilamin (PEN) ili (2S)-2-amino-3-metil-3-sulfanilbutanska kiselina (prema IUPAC-u) prirodni je izvor sumpora u organizmu budući da sadrži aminokiselinu koja pripada amino-tiolnoj obitelji. PEN je tiolni lijek koji se koristi u liječenju prvenstveno djelujući kao kelatirajuće sredstvo za uklanjanje iona teških metala.^[83] Koristi se čisti oblik D (ili S) lijeka, jer su L (ili R) oblik i DL (RS)-racemična smjesa mnogo otrovniji, pokazuju teške nuspojave.^[84] Penicilamin je α -aminokiselinski metabolit penicilina, međutim ne pokazuje antibiotska svojstva.

1.3.1. Kemijska svojstva

PEN je pri sobnoj temperaturi bijeli ili gotovo bijeli, kristalinični prah. Karakterističnog je mirisa te kiselog okusa, molekulske formule $C_5H_{11}NO_2S$ i molne mase $149,21 \text{ g mol}^{-1}$. Osim naziva spoja prema IUPAC-u česti sinonimi naziva penicilamina su 3-merkapt-D-valin i D- β,β -dimetilcistein. Penicilamin je potpuno topljiv u vodi te neznatno topljiv u alkoholu. 1 %-tna vodena otopina ima pH-vrijednost od 4,5 do 5,5.^[83] Talište mu je na temperaturi $202\text{--}206 \text{ }^\circ\text{C}$.^[85]



Slika 1-4 D-penicilamin prikazan strukturnom (2D) formulom i molekulskim (3D) modelom

1.3.2. Biokemijska svojstva

PEN je tiolni lijek koji se koristi u liječenju Wilsonove bolesti, djelujući kao kelatirajuće sredstvo za uklanjanje bakra. Primjenjuje se u liječenju nekoliko poremećaja, uključujući reumatoidni artritis, retinopatiju u nedonoščadi, primarnu bilijarnu cirozu, cistinuriju te progresivnu sistemska sklerozu.^[83]

S obzirom na kelatirajuće svojstvo, penicilamin potpomaže eliminaciju određenih iona teških metala iz tijela, uključujući bakar, olovo i živu formirajući s njima stabilne topljive komplekse koji se lako izlučuju putem bubrega. Svojstvo je osobito izraženo prilikom trovanja ionima teških metala, osobito kod trovanja olovom.^[57]

Dokazana je učinkovitost PEN-a kod liječenja Wilsonove bolesti, autosomno recesivnog poremećaja transporta bakra koji dovodi do prekomjernog nakupljanja tog metala u jetri, mozgu, bubrezima i eritrocitima. Time je narušena homeostaza bakra u organizmu.^[86] Učinkovito liječenje uključuje lijekove koji smanjuju koncentraciju bakra. Penicilamin smanjuje koncentraciju bakra na nekoliko načina. Glavni učinak PEN-a je stvaranje kelata s cirkulirajućim bakrom, koji se tad izlučuju putem urina. Nadalje, PEN smanjuje afinitet proteina i polipeptida prema bakru. Na taj način omogućuje uklanjanje bakra iz tkiva. Penicilamin također potiče jetrenu sintezu metalotioneina, proteina koji se veže s bakrom u netoksični produkt.^[57]

Kao što je ranije spomenuto (poglavlje 1.2.2.) penicilamin se koristi za liječenje cistinurije. Cistinurija je genetski poremećaj metabolizma koji dovodi do povećanog izlučivanja aminokiseline cistina, kao i strukturno sličnih aminokiselina arginina, lizina i histidina preko urina te spada u poremećaje transporta aminokiselina. Posljedica toga je povećano izlučivanje cistina i to čak 20-30 puta, što uzrokuje stvaranje cistinskih kamenaca u mokraćnom sustavu.^[87] Liječenje cistinurije penicilaminom se temelji na smanjenju koncentracije urinarnog cistina pri čemu PEN sprječava stvaranje kamenaca i(ili) pospješuje postupno otapanje postojećih kamenaca. PEN formira kompleks sa cistinom u obliku topljivog disulfida (PEN-cistin disulfid), koji je znatno topljiviji od cistina i lakše se izlučuje te je stoga učinkovit u liječenju cistinurije.^[57,58]

Penicilamin se primjenjuje kao antireumatski lijek u liječenju reumatoidnog artritisa. To je teška, kronična, upalna bolest vezivnog tkiva koja se najviše očituje na zglobovima. U ovom poremećaju imunološki sustav napada hrskavično tkivo, kosti, i ponekad unutarnje organe.^[57,88]

1.3.3. Analitičke metode određivanja penicilamina

U dostupnoj literaturi, najveći broj objavljenih metoda određivanja penicilamina uključuje spektrofotometrijski detektor, te su one navedene u tablici 1-3(a). Metode se temelje na redoks reakcijama u jednom koraku ili na redoks i kompleksometrijskim

reakcijama u dva združena koraka. Pri tome analit sudjeluje u reakciji kao reducens, a potom nastaje obojen produkt detektibilan u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.

Osim metoda sa spektrofotometrijskim detektorom, koje su navedene u tablici 1-3(a), objavljene su metode određivanja penicilamina uz sljedeće analitičke tehnike: potenciometrija, fluorimetrija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, atomska apsorpcijska spektrometrija.

Metoda određivanja PEN-a katalitičkom titracijom temeljena je na reakciji PEN-a sa srebrovim nitratom uz određivanje završne točke titracije spektrofotometrijski.^[10]

Potenciometrijska titracija je primijenjena za određivanje penicilamina otopinom olovļjevog perklorata uz korištenje indikatorske ion selektivne olovļjeve elektrode.^[89]

Korištenjem indikatorske elektrode na bazi srebrovog jodida (AgI), provedeno je potenciometrijsko određivanje PEN-a.^[90]

Voltometrijska metoda određivanja PEN-a temelji se na korištenju dijamantne tankoslojne elektrode dopirane borom.^[91]

Prema dostupnoj literaturi, pronađeno je nekoliko kromatografskih metoda određivanja penicilamina, primjerice: tekućinska kromatografija sa detektorom u ultraljubičastom području elektromagnetskog zračenja,^[92] tekućinska kromatografija visoke djelotvornost sa detektorom u ultraljubičastom području elektromagnetskog zračenja^[19] i tekućinska kromatografija visoke djelotvornost i kapilarna elektroforeza uz fluorescencijsku detekciju^[93].

Razvojem kinetičkih metoda analize ostvaruje se uvid u samu kinetiku kemijske reakcije stoga su kinetičke metode također zastupljene uz spektrofotometrijske (tablica 1-3(a)), potenciometrijske^[11,12] i amperometrijske^[94] detektore.

Metode analize injektiranjem u protok (FIA) osim sa spektrofotometrijskim detektorom se često sprežu sa kemiluminiscentnim detektorom, fluorimetrom ili elektroanalitičkim detektorom. U tablici 1-3(b) su navedene FIA metode uz različite detektore i različite reakcijske sustave. Upravo metode analize injektiranjem u protok spregnute s kemiluminiscencijskim detektorom ostvaruju značajno niže granice dokazivanja, točnije veću osjetljivost metode. Razlog tome je svojstvo penicilamina, tiolnog spoja, da može pospješiti emisiju tijekom reakcije kemiluminiscencije.

Nadalje, objavljeno je nekoliko metoda analize slijednim injektiranjem u protok (SIA) uz spektrofotometrijski, fluorescencijski i kemiluminiscencijski detektor (tablica 1-3(b)).

Tablica 1-3(a) Usporedba literaturnih podataka razvijenih metoda za određivanje PEN uz spektrofotometrijski detektor

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[20]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	515	$4,5 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 20 min)	0,34	farmaceutski pripravci
[95]	kobaltovi(II) ioni i nitrit	250	$3,4 \times 10^{-5} - 3,4 \times 10^{-4}$	np	klasična (očitanje signala 15 min)	np	farmaceutski pripravci
[96]	kobalt(II) u bazičnom mediju	360	$2,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-4}$	np	klasična	np	farmaceutski pripravci
[97]	željezo(III) i 2,4,6-tri(2'-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ)	595	$1,7 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 30 min)	np	farmaceutski pripravci
[98]	2,6-diklorokinon-4-klorimid (DCQ) i dimetil sulfoksid	431	$2,7 \times 10^{-5} - 1,3 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6}$	klasična	1,36	farmaceutski pripravci
[99]	ninhidrin	570	$3,4 \times 10^{-4} - 4,0 \times 10^{-3}$	np	klasična	np	np
[100]	1,2-naftokinon-4-sulfonat (NQS)	425	$6,7 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-5}$	klasična	np	farmaceutski pripravci
[87]	4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-CL)	468	$6,7 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-7}$	klasična (očitanje signala 30 min)	0,50	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[101]	natrijev azid i jod	348	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-7}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min)	np	farmaceutski pripravci i biološke tekućine
[102]	kalijev permanganat	610	$1,3 \times 10^{-5} - 6,7 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 20 min)	np	farmaceutski pripravci
[28]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	510	$8,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min)	np	farmaceutski pripravci
[96]	kobalt(II) u bazičnom mediju	360	$1,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3}$	np	FIA (učestalost injektiranja 150 h ⁻¹)	1,80	farmaceutski pripravci
[103]	paladij(II) u klorovodičnom mediju	400	$1,0 \times 10^{-5} - 7,0 \times 10^{-4}$	np	FIA	0,80	farmaceutski pripravci
[104]	kobalt(II) u bazičnom mediju	360	$3,4 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 70 h ⁻¹)	1,30	farmaceutski pripravci
[105]	1,2-naftokinon-4-sulfonat	498	$3,4 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	FIA	0,53	farmaceutski pripravci

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*)

Tablica 1-3(b) Usporedba literaturnih podataka za određivanje PEN metodama analize injektiranjem u protok (FIA) uz različite detektore

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[96]	kobalt(II) u bazičnom mediju	360	$1,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3}$	np	spektrofotometar	1,80	FIA (učestalost injektiranja 150 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[103]	paladij(II) u klorovodičnom mediju	400	$1,0 \times 10^{-5} - 7,0 \times 10^{-4}$	np	spektrofotometar	0,80	FIA	farmaceutski pripravci
[104]	kobalt(II) u bazičnom mediju	360	$3,4 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	1,30	FIA (učestalost injektiranja 70 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[105]	1,2-naftokinon-4-sulfonat	498	$3,4 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	spektrofotometar	0,53	FIA	farmaceutski pripravci
[106]	Tl(III) u klorovodičnom mediju	$\lambda_{\text{ex}} = 227$ $\lambda_{\text{em}} = 419$	$3,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$	$6,2 \times 10^{-8}$	fluorimetar	0,48	FIA (učestalost injektiranja 90 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[45]	hipoklorit i luminol	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,03	FIA	farmaceutski pripravci
[46]	luminol i vodikov peroksid uz bakar kao katalizator	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,38	FIA (učestalost injektiranja 40 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[107]	luminol i $[\text{Ag}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$	/	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-9}$	kemiluminiscencijski detektor	0,23	FIA	farmaceutski pripravci i biološke tekućine
[108]	cerij(IV) i kinin	/	$1,3 \times 10^{-8} - 1,3 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-9}$	kemiluminiscencijski detektor	4,00	FIA	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[109]	cerij(IV) i kinin	/	$6,7 \times 10^{-9} - 1,3 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-9}$	kemiluminiscencijski detektor	3,00	FIA	farmaceutski pripravci
[91]	dijamantna tankoslojna elektroda dopirana borom	/	$5,0 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-8}$	amperometar	1,80	FIA	farmaceutski pripravci
[90]	Ag/AgI elektroda	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	$< 1 \times 10^{-4}$	potenciometar	np	FIA	farmaceutski pripravci
[110]	Au elektroda i kalijev permanganat	/	$6,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-6}$	bioamperometar	2,89	FIA (učestalost injektiranja 80 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[111]	željezo(III) u klorovodičnom mediju	600	$1,7 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3}$	np	spektrofotometar	0,98	SIA (učestalost injektiranja 50 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[112]	nikal(II)	270	$3,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-7}$ ($9,0 \times 10^{-10}$)	spektrofotometar	np	SIA (učestalost injektiranja 200 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[113]	fluorescamin	$\lambda_{\text{ex}} = 355$ $\lambda_{\text{em}} = 495$	$3,4 \times 10^{-5} - 5,4 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-7}$	fluorimetar	2,50	SIA (učestalost injektiranja 50 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[48]	monobromobiman (MBB)	$\lambda_{\text{ex}} = 390$ $\lambda_{\text{em}} = 480$	$1,5 \times 10^{-4} - 4,6 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-6}$	fluorimetar	1,2	SIA (učestalost injektiranja 36 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[114]	tris(bipiridil)rutenij(II) i peroksidisulfat	/	$1,3 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-7}$	kemiluminiscencijski detektor	1,3	SIA (učestalost injektiranja 30 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci

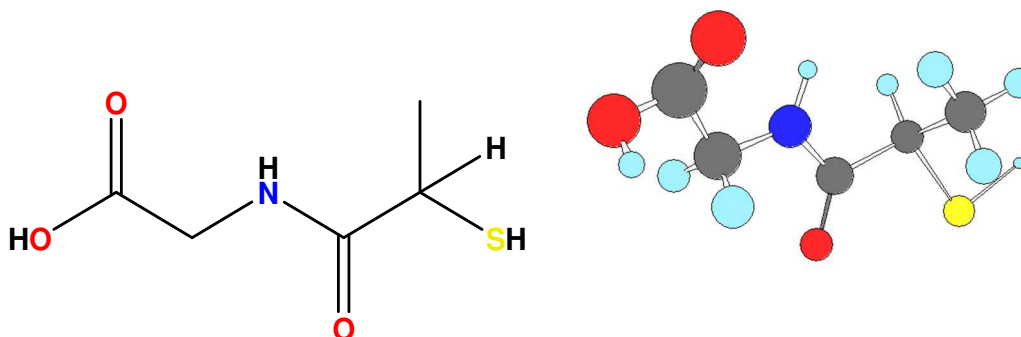
LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*); SIA - analiza slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*)

1.4. Tiopronin

Tiopronin (MPG) također poznat kao *N*-(2-merkaptopropionil)-glicin, 2-(2-sulfanil-propanoil-amino) octena kiselina (prema IUPAC-u). Tiopronin je sintetski aminotiolni spoj s redukcijskim svojstvima i sposobnošću kompleksiranja. U medicinske svrhe koristi se prvenstveno za liječenje cistinurije te reumatoidnog artritisa, Wilsonove bolesti, kao mukolitik, antioksidans i protuotrov kod trovanja teškim metalima, osobito živom.^[115,116]

1.4.1. Kemijska svojstva

Tiopronin je bijeli kristalinični prah molekulske formule $C_5H_9NO_3S$, molne mase $163,19 \text{ g mol}^{-1}$. Karakterističnog je mirisa te nije higroskopan, a temperatura tališta iznosi od 95°C do 97°C .^[117] Tiopronin je slaba kiselina koja disocira u dva stupnja. U prvom stupnju disocira karboksilna skupina ($-\text{COOH}$) s konstantom disocijacije $K_{a1} = 2,51 \times 10^{-4}$, a u drugom stupnju disocira tiolna skupina ($-\text{SH}$) s konstantom disocijacije $K_{a2} = 1,82 \times 10^{-9}$.^[118]



Slika 1-5 Tiopronin prikazan strukturnom (2D) formulom i molekulskim (3D) modelom

1.4.2. Biokemijska svojstva

Tiopronin je sintetski spoj, sulfhidril acetil derivat aminokiseline glicina koji sadrži tri elektron-donorske funkcionalne skupine: amidnu, karboksilnu i tiolnu skupinu. Njegova svojstva su vrlo slična ranije opisanom tiolnom spoju penicilaminu.

Kao reducirajući i kompleksirajući reagens, MPG cijepa disulfidne veze amino kiseline cistin te tvori tiopronin-cisteinski kompleks koji je topljiv u tjelesnim

tekućinama. To svojstvo se koristi kako bi se pospješilo izlučivanje cistina urinom kod rijetke genetske bolesti cistinurije. Premda se u urinu nakupljaju sve aminokiseline u visokim koncentracijama, jedino cistin, dibazična aminokiselina s disulfidnom vezom, zbog svoje niske topljivosti stvara kristale uzrokujući bubrežni kamenac. Kristali se počinju formirati kada koncentracija cistina poraste iznad 250 mg po litri urina (dosegne se zasićenje). Liječenje cistinurije tioproninom zasniva se na cijepanju disulfidne veze cistina, pri čemu nastaje amino kiselina cistein koja je 50 puta topljivija.^[57,58] Tiopronin se koristi u slučajevima teške homozigotne cistinurije kada je urinarni cistin veći od 500 mg na dan. S obzirom na to da je ova bolest rijetka (jedan bolesnik na 10 000 zdravih), tiopronin se svrstava u lijekove za rijetke i teške bolesti kod malog broja pacijenata (*"orphan drugs"*).^[119,120,121]

Redukcijsko djelovanje tiopronina se smatra glavnim mehanizmom njegovog zaštitnog učinka, antioksidacijskog djelovanja. Točnije, mehanizam zaštitnog djelovanja tiopronina temelji se na sposobnosti njegove reaktivne –SH skupine da veže kemijske radikale.^[54]

Redukcijsko svojstvo se pokazalo korisno i kod cijepanja disulfidnih veza kod bronhijalnog sekreta. Upravo zbog cijepanja mukopolisaharidnih lanaca u dišnom sustavu smanjuje se viskoznost bronhijalnog sekreta i postiže mukolitički i mukoregulatorni učinak olakšavanja iskašljavanja.^[115]

Koristi se i kod reumatoidnog artritisa gdje ima protuupalno djelovanje, posebice u slučajevima nedjelotvornosti penicilamina ili nuspojava uzrokovanih penicilaminom.^[115]

Zbog sposobnosti kompleksiranja metala može se koristiti i kao protuotrov kod trovanja teškim metalima, posebice živom.^[122]

1.4.3. Analitičke metode određivanja tiopronina

U dostupnoj literaturi su opisane metode određivanja tiopronina korištenjem klasične spektrofotometrije, fluorimetrije, katalitičke titracije, kemiluminiscencije, potencijometrije, voltometrije, kromatografije različitih izvedbi, zatim kinetičkih metoda analize i analize injektiranjem u protoku uz različite detektore.

Jedna od starijih metoda određivanja MPG je katalitička titracija srebrovim nitratom gdje je završna točka titracije određena spektrofotometrijski pri 537 nm.^[10]

Opisano je i fluorimetrijsko određivanje tiopronina uz instrumentaciju za zaustavljeni protok koje se zasniva na inhibicijskom djelovanju MPG-a na redoks sustav koji obuhvaća nekoliko enzima.^[123]

Kemiluminiscencijsko određivanje tiopronina se zasniva na pojačanju intenziteta kemiluminiscencije u njegovoj prisutnosti. Primjerice MPG pospješuje emisiju u reakciji između luminola i vodikovog peroksida u bazičnoj otopini. Takav je mehanizam primijenjen na određivanje tiopronina u farmaceutskim pripravcima.^[124]

Objavljena je i elektroluminiscencijska metoda određivanja tiopronina temeljena na svojstvu tiopronina koji snažno pospješuje elektrokemiluminiscenciju kompleksa tris(2,2-bipiridin)rutenij(II) u bazičnoj otopini koja se odvija na platinskoj elektrodi. Razvijena metoda je primijenjena na određivanje MPG u farmaceutskim pripravcima.^[125]

Mjerenje (kinetičkog signala) kemiluminiscencije kinetičkom metodom uz instrumentaciju za zaustavljeni protok omogućilo je razvoj još jedne metode određivanja tiopronina. Navedena reakcija kemiluminiscencije je posljedica reakcije tiopronina sa sumpornom kiselinom i kalijevim permanganatom kao oksidansom u prisutnosti formaldehida koji ima ulogu pojačavanja emisije.^[126]

Elektroanalitički detektori su također pronašli primjenu u razvoju metoda za određivanje tiopronina. Određivanja tiopronina ostvareno je razvojem izravne potenciometrije, potenciometrijske titracije, kao i kinetičke potenciometrijske metode korištenjem AgI membrane.^[127] Voltametrijska metoda određivanja tiopronina razvijena je pomoću ugljikove elektrode modificirane sintetiziranim nanokristalnim Ni₅₀–Fe₅₀ legurama i ferocen karboksilnom kiselinom. Potom je primijenjena na određivanje MPG u farmaceutskim tabletama i biološkim uzorcima.^[128]

Tiopronin se u složenijim maticama kao što su krv, plazma i/ili urin, određuje korištenjem kromatografskih tehnika uz različite detektore. Kromatografske metode analize za određivanje MPG u biološkim uzorcima razvijene su uz različite modifikacije i izvedbe, kao što je tekućinska kromatografija spregnuta sa masenim spektrometrom^[129,130], tekućinska kromatografija sa detektorom u ultraljubičastom području elektromagnetskog zračenja^[92], zatim tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa detektorom u ultraljubičastom području elektromagnetskog zračenja^{[19], [131]}, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i kapilarna elektroforeza uz fluorescencijsku detekciju^[93].

U dostupnoj literaturi opisano je nekoliko razvijenih kinetičkih mehanizama oksidacije tiopronina uz različite reagense, ali ne i samog određivanja MPG-a. Jedan takav reakcijski mehanizam se temeljio na kinetici reakcije tiopronina sa kompleksima platine(IV). Reakcija je ostvarena korištenjem instrumentacije za zaustavljeni protok uz spektrofotometar kao detektor i slijedi pseudoprvi red reakcije.^[132] Zatim je još jedan reakcijski mehanizam oksidacije tiopronina razvijen korištenjem instrumentacije za zaustavljeni protok: oksidacija tiopronina koja se odvija pomoću bromata u kiselj otropini i broma u vodenoj otropini, a spektrofotometrijski se bilježi kinetički odziv pri 390 nm.^[133] Nadalje, u novijoj objavljenoj metodi oksidacijom tiopronina pomoću cerija(IV) u perklornoj kiselini razvijena je složena kinetika reakcije drugog reda. Pri tom se koristila instrumentacija za zaustavljeni protok, a kinetički odziv se pratio spektrofotometrijski pri 330 nm.^[134]

Budući da je spektrofotometrijski detektor cjenovno dostupan većini laboratorija te jednostavan za korištenje, najčešće se primjenjuje posebice u vidljivom području elektromagnetskog zračenja gdje nema značajnih interferencija pratećih tvari. U tablici 1-4(a) navedene su objavljene metode određivanja tiopronina uz spektrofotometrijski detektor, u farmaceutskim pripravcima. S obzirom na navedeno, najčešći su redoks reakcijski sustavi željeza(III) sa različitim kromogenim reagensima koji uključuju i reakcije kompleksiranja.

U posljednje vrijeme primjena metoda analize injektiranjem u protok (FIA) se znatno povećava u analitičkim laboratorijima zahvaljujući jednostavnom, brzom i ekonomičnom rukovanju navedenom tehnikom. Osim uz spektrofotometrijski detektor, u tablici 1-4(b) navedene su FIA metode za određivanje tiopronina uz fluorescencijski, kemiluminiscencijski i amperometrijski detektor. Metode su primijenjene na određivanje MPG-a u farmaceutskim pripravcima i u biološkim sustavima.

Tablica 1-4(a) Usporedba literaturnih podataka razvijenih metoda za određivanje MPG uz spektrofotometrijski detektor

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[20]	željezo(III) i 1,10-fenantrolin	515	$4,5 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	np	klasična (očitanje signala 20 min)	0,34	farmaceutski pripravci
[135]	natrijev 1,2-naftokinon-4-sulfonat i hidroksidni ion	445	$2,4 \times 10^{-6} - 9,6 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-6}$	klasična	0,88	farmaceutski pripravci
[26]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)	593	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-7}$	klasična	np	farmaceutski pripravci
[136]	željezo(III) i kalijev fericijanid	735	$2,5 \times 10^{-7} - 5,5 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-8}$	klasična	1,30	farmaceutski pripravci i biološke tekućine
[137]	fosfomolibdensko plavilo (fosfat i molibdat)	730	$9,8 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-6}$	klasična	0,92	farmaceutski pripravci
[138]	vodikov peroksid i kiselo plavi krom K uz hemoglobin	563	$5,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	$8,5 \times 10^{-6}$	klasična	4,10	farmaceutski pripravci
[139]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ)	593	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ $4,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-8}$ $1,3 \times 10^{-7}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 3 min) metoda početne brzine (očitanje signala 3 min)	np	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[103]	paladij(II) u klorovodičnom mediju	400	$1,0 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-4}$	np	FIA	0,30	farmaceutski pripravci
[140]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ)	593	$6,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-6}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	0,50	farmaceutski pripravci

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*)

Tablica 1-4(b) Usporedba literaturnih podataka za određivanje MPG metodama analize injektiranjem u protok (FIA) uz različite detektore

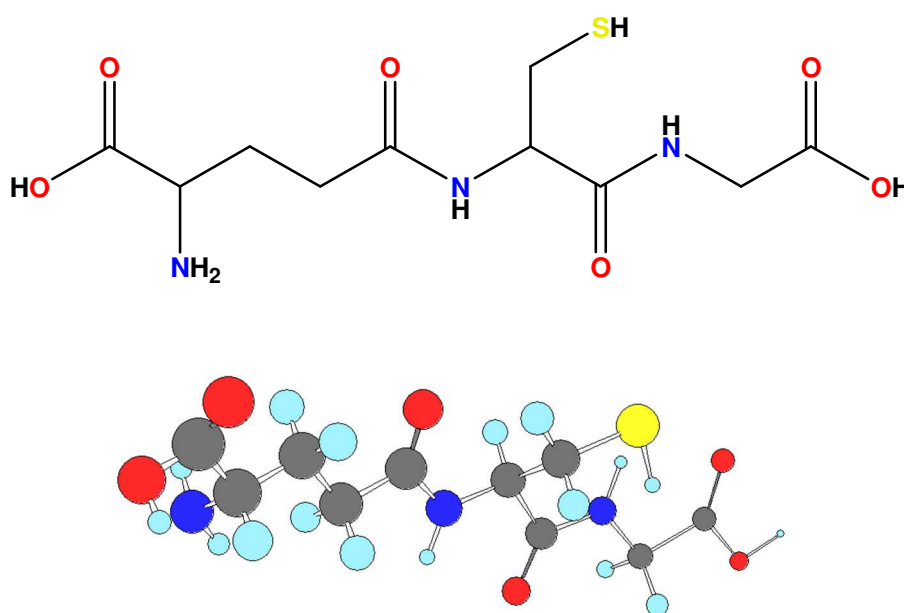
Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[103]	paladij(II) u klorovodičnom mediju	400	$1,0 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-4}$	np	spektrofotometar	0,30	FIA	farmaceutski pripravci
[140]	željezo(III) i 2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ)	593	$6,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-6}$	spektrofotometar	0,50	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[106]	talijski(III) u klorovodičnom mediju	$\lambda_{\text{ex}} = 227$ $\lambda_{\text{em}} = 419$	$8,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-8}$	fluorimetar	1,04	FIA (učestalost injektiranja 45 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[141]	oksidacija tiamina uz Hg(II)	$\lambda_{\text{ex}} = 365$ $\lambda_{\text{em}} = 445$	$1,0 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-5}$	np	fluorimetar	1,17	FIA (učestalost injektiranja 25 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[142]	cerij(IV) i kinin	/	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-7}$	kemiluminiscencijski detektor	4,80	FIA	biološki uzorci
[143]	cerij (IV) i kinin	/	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-7}$	kemiluminiscencijski detektor	4,80	FIA	biološki uzorci
[144]	cerij (IV) i kinin	/	$1,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-7}$	kemiluminiscencijski detektor	2,00	FIA	farmaceutski pripravci
[145]	cerij (IV) uz rodamin 6G i kinin	/	$1,0 \times 10^{-7} - 7,0 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-8}$	kemiluminiscencijski detektor	2,60	FIA (učestalost injektiranja 80 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[46]	luminol i vodikov peroksid uz bakar kao katalizator	/	$2,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,15	FIA (učestalost injektiranja 40 h ⁻¹)	farmaceutski pripravci
[45]	hipoklorit i luminol	/	$1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$	np	kemiluminiscencijski detektor	1,71	FIA	farmaceutski pripravci
[146]	elektroda s dijamantnim filmom	/	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-8}$	amperometar	1,62	FIA	farmaceutski pripravci

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*); SIA - analiza slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*)

1.5. Glutation

Glutation (GSH), u bazi podataka naveden pod nazivom (2S)-2-amino-5[[[(2R)-1-(karboksimetilamino)-1-okso-3-sulfanilpropan-2-il]amino]-5-oksopentanoična kiselina (prema IUPAC-u) je sintetski aminotiolni spoj s redukcijskim svojstvima i sposobnošću kompleksiranja. Glutation se još kemijski naziva γ -L-glutamil-L-cisteinglicin. Kao protein koji se sintetizira u jetri, ima važnu ulogu u međustaničnom metabolizmu te imunološkom odgovoru organizma. U prirodi se nalazi u voću, povrću i mesu, ali je brzina njegove adsorpcije iz hrane jako mala. Primjenjuje se najčešće u liječenju Parkinsonove bolesti te kao protuotrov kod trovanja teškim metalima.^[147]



Slika 1-6 Glutation prikazan strukturnom (2D) formulom i molekulskim (3D) modelom

1.5.1. Kemijska svojstva

Glutation je bijeli ili gotovo bijeli, kristalinični prah molekulske formule C₁₀H₁₇N₃O₆S i molne mase 307,32 g mol⁻¹. Topljiv je u vodi, razrijeđenom etanolu, tekućem amonijaku, dimetilformamidu i dietil eteru.^[148] Glutation je potrebno zaštititi od svjetla, a njegova temperatura tališta iznosi 195 °C.^[149] Prema svom kemijskom sastavu glutacion je tripeptid koji se sastoji od tri aminokiseline: glicina, cisteina i glutaminske kiseline.^[150,151]

1.5.2. Biokemijska svojstva

Glutation (GSH) je tripeptid koji posjeduje sulfhidrilnu skupinu (–SH). Prisutan je u dva oblika: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Iz njihovog omjera moguće je dobiti podatke o oksidacijskom stanju stanice. U većini je stanica omjer GSH-a prema GSSG-u veći od 500. Oksidirani se oblik može prevesti u reducirani djelovanjem enzima glutation-reduktaze, flavoproteina koji kao izvor elektrona koristi molekulu NADPH.^[152]



Kao derivat aminokiselina, glutation ima nekoliko važnih uloga. Glutation je prisutan u svim tkivima gdje ima ključnu ulogu antioksidansa. U reakciji sa štetnim aerobnim nusproduktima (vodikovim peroksidom i organskim peroksidima) doprinosi njihovu eliminaciji, čime potvrđuje svoje važno detoksikacijsko djelovanje.

Prisutan je u životinjskim stanicama gdje se ponaša kao sulfhidrilni pufer i tako štiti eritrocite od oksidacijskog oštećenja. Mehanizam puferskog djelovanja je kruženje između tiolnog, reduciranog oblika (GSH) i oksidiranog (GSSG) oblika sa disulfidnom vezom.^[152]

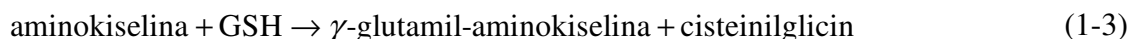
Svojstva glutaciona pripisuju se, među ostalim, i djelovanju enzima glutation-S-transferaze koji kataliziraju reakcije konjugacije mnogih potencijalno otrovnih elektrofilnih ksenobiotika sa glutationom prema reakciji (2-2), gdje je R elektrofilni ksenobiotik.^[152]



Različiti ksenobiotici i endobiotici elektrofilnih svojstava su supstrati u reakcijama konjugacije s glutationom. Stoga GSH ima ulogu u metabolizmu ksenobiotika. Dok neke tvari izravno stupaju u reakciju s glutationom, neke se prethodno moraju transformirati u elektrofilne metabolite. Česti supstrati uključuju karcinogene metabolite tvari poput pesticida i aflatoksina B1. Reakcije konjugacije su katalizirane enzimima glutation-S-transferaze koji kataliziraju stvaranje tioeterskih konjugata između glutaciona i ksenobiotika. To je skupina enzima podijeljenih u različite vrste temeljem slijeda aminokiselina. Tioeterski se konjugati mogu izlučivati putem žuči ili se daljnim reakcijama mogu prevesti u merkapturane kiseline i izlučiti urinom.^[152]

Tkivo sa smanjenom koncentracijom GSH postaje sklonije oštećenjima spojevima koji bi se inače konjugirali s GSH. Niska razina glutaciona prisutna je u Parkinsonovoj bolesti što uzrokuje ranije propadanje stanica živčanog sustava.^[153]

GSH je uključen i u ciklus za koji se pretpostavlja da prenosi aminokiseline kroz membrane bubrega:



Ovom se reakcijom pospješuje prijenos određenih aminokiselina kroz stanične membrane nakon čega se aminokiselina hidrolizira iz kompleksa sa GSH, a GSH se resintetizira iz cisteinilglicina. Ta je reakcija katalizirana enzimom γ -glutamil-transferaza (GGT) koji se nalazi na membrani bubrežnih tubula i u stanicama žučnih kanala. Budući da se enzim oslobađa u krv iz jetrenih stanica, iz toga proizlazi njegova dijagnostička važnost u hepatobilijarnim bolestima.^[151]

Iako je u početku bila prisutna skeptičnost prema djelotvornosti oralnih pripravaka glutaciona, određena su istraživanja pokazala da uzimanje dodataka prehrani sa sadržajem GSH od 250 mg do 1000 mg povećava razinu glutaciona u stanicama.^[154]

Istraživanja ukazuju na povezanost poremećaja metabolizma GSH sa mnogim bolestima uključujući bolesti oka, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, cističnu fibrozu, astmu, kroničnu opstruktivnu bolest pluća te neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.^[155]

1.5.3. Analitičke metode određivanja glutaciona

U literaturnim zapisima, opisane su metode određivanja glutaciona uz sljedeće analitičke tehnike: spektrofotometriju, potenciometriju, fluorimetriju, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, atomsku apsorpcijsku spektrometriju i kinetičke metode analize spregnute sa spektrofotometrijskim i potenciometrijskim detektorom. Objavljen je i značajan broj metoda određivanja u protoku; najčešće metode analize injektiranjem u protok (FIA) uz različite detektore, a u novije vrijeme i metode slijednim injektiranjem u protok (SIA) uz spektrofotometrijski detektor (tablica 1-5(b)).

Jedan od najranijih radova opisuje fluorimetrijsko određivanje glutaciona, koje se temelji na reakciji fluorescencije GSH sa amonijevim 7-fluorobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-sulfonatom.^[62]

Potenciometrija je primijenjena kao detekcijska tehnika u sprezi sa kinetičkom metodom određivanja glutaciona. Razvijena metoda se temelji na reakciji formiranja slabo topljivog taloga između GSH i srebrovih(I) iona. Signal je praćen elektrokemijski pomoću indikatorske ion selektivne elektrode bilježenjem ovisnosti izmjerene potencijala o vremenu.^[12]

HPLC tehnika je također zastupljena u metodama analize glutaciona u biološkim uzorcima i tekućinama uz spektrofotometrijski detektor. Po kromatografskom odijeljivanju, GSH je derivatiziran 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) uz praćenje signala nastalog

žuto obojenog kromofora spektrofotometrijskim detektorom u vidljivom dijelu elektromagnetskog zračenja.^[17] Dva desetljeća kasnije, također se primijenila HPLC tehnika na obrnutim fazama (RC-HPLC) uz isti detektor za određivanje glutaciona u ljudskoj plazmi. Glutation se prevodi u reducirani oblik čija tiolna skupina u reakciji s 2-kloro-1-metilkinolin tetrafluoroboratom formira derivat detektibilan spektrofotometrijski u ultraljubičastom dijelu zračenja.^[67] Još je jedna kromatografska tehnika primijenjena za određivanje glutaciona uz elektrokatalitičko određivanje GSH. Metoda se temelji na elektrokatalitičkom učinku elektrode od staklastog ugljika modificirane adsorbiranim željezom(III) i kalijevim heksacijanoferatom (III), (fericijanid), koji stvara obojene komplekse koji se nazivaju prusko plavilo. Na taj način se katalizira oksidacija glutaciona u kiselom mediju.^[15]

U literaturi je opisana i metoda za određivanje glutaciona u vinu u obliku živinih kompleksa primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije.^[65]

U tablici 1-5(a) navedeno je samo nekoliko razvijenih metoda dostupnih u literaturi za određivanje GSH uz spektrofotometar kao detekcijsku tehniku, gdje je određivanje GSH temeljeno na redoks i(ili) kompleksometrijskim reakcijama uz različite reakcijske sustave. Naime glutation je kao analit dobio na važnosti od samog kraja 20.-og stoljeća kada je započelo znanstveno zanimanje za njegov izraziti antioksidacijski učinak u organizmu. Pri tom su i novije tehnike analize u protoku (FIA, a kasnije i SIA) primijenjene za razvoj metoda uz spektrofotometrijski, fluorescencijski, kemiluminiscencijski i elektroanalitičke detektore, posebice u biološkim sustavima (tablica 1-5(b)).

Pojedine razvijene metode su često uključivale određivanje i reduciranog i oksidiranog oblika glutaciona. Posebice su interesantne opisane SIA metode: prva se temelji na enzimskoj reakciji određivanja oksidiranog i reduciranog glutaciona spektrofotometrijski pri 412 nm u ljudskoj krvi pomoću 2-nitro-5-tiobenzojeve kiseline,^[156] dok se druga metoda temelji na reakciji GSH sa etil propiolatom stvarajući tioakrilni derivat detektibilan u ultraljubičastom području^[157].

Tablica 1-5(a) Usporedba literaturnih podataka razvijenih metoda za određivanje GSH uz spektrofotometrijski detektor

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Način mjerenja	RSD, %	Vrsta uzorka
[68]	živa(II) i bis(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridine)ditiocijanato rutenij(II) (N3)	461	$5,0 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-8}$	klasična	5,70	np
[158]	nanočestice zlata modificirane ftalnom kiselinom	400	$1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-10}$	klasična (očitanje signala 1 min)	2,10	dodaci prehrani
[28]	željezo(III)-fenantrolin i bakar(II)	510	$8,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$	kinetika metoda određenog vremena (očitanje signala 5 min)	np	farmaceutski pripravci
[159]	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) uz enzim GSSG redutaza	412	$1,7 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-5}$ (GSH) $1,7 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-5}$ (GSSG)	$5,0 \times 10^{-5}$ (GSSG)	FIA (učestalost injektiranja 30 h ⁻¹)	3,80 (GSH)	biološki uzorci
[70]	željezo(III)/fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-7}$	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	1,90	dodaci prehrani

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*)

Tablica 1-5(b) Usporedba literaturnih podataka za određivanje GSH metodama analize injektiranjem u protok uz različite detektore

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[159]	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) uz enzim GSSG redutaza	412	$1,7 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5}$ (GSH) $1,7 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$ (GSSG)	$5,0 \times 10^{-5}$ (GSSG)	spektrofotometar	3,80 (GSH)	FIA (učestalost injektiranja 30 h ⁻¹)	biološki uzorci
[160]	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)	420	$5,0 \times 10^{-3} - 6,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$	LED-LDR kolorimetar	2,00	FIA (učestalost injektiranja 48 h ⁻¹)	dodaci prehrani
[70]	Fe(III)/fericijanid	735	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	1,90	FIA (učestalost injektiranja 60 h ⁻¹)	dodaci prehrani
[161]	luminol i natrijev perjodat	/	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-5}$	$8,0 \times 10^{-9}$	kemiluminiscencijski detektor	4,00	FIA	biološke tekućine
[162]	luminol i vodikov peroksid	/	$3,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-8}$	kemiluminiscencijski detektor	3,40	FIA	sintetski uzorci
[80]	nikal(IV) i perjodat	515	$3,1 \times 10^{-7} - 3,1 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	kemiluminiscencijski detektor	1,80	FIA	biološke tekućine
[163]	luminol kataliziran Au nanocjevčicama	/	$5,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-11}$	kemiluminiscencijski detektor	2,10	FIA	kvaščeve gljivice <i>S. cerevisiae</i>
[81]	luminol i vodikov peroksid katalizirani Au koloidom	425	$7,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-8}$	kemiluminiscencijski detektor	1,40	FIA	biološke tekućine
[164]	vodikov peroksid	/	$5,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$	np	amperometrija	2,00	FIA (učestalost injektiranja 20 h ⁻¹)	np

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[82]	elektroda obložena filmom rutenijevog oksida i cijanida	/	$4,1 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-4}$	np	amperometrija	np	FIA (učestalost injektiranja 110 h ⁻¹)	np
[165]	glutation sulfhidril oksidaza i osmij-polivinil piridin gel polimer kao dvostruki sloj filma na staklenoj ugljikovoj elektrodi	/	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$ (GSH) $2,0 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-4}$ (GSSG)	5×10^{-7} (GSH) $1,2 \times 10^{-6}$ (GSSG)	amperometrija	np	FIA	np
[166]	elektroda modificirana bakrovim heksacijanoferatom	/	$4,0 \times 10^{-5} - 5,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	amperometrija	3,27	FIA	biološke tekućine
[167]	staklasta ugljikova i Pt elektroda	/	$1,6 \times 10^{-9} - 1,3 \times 10^{-8}$ (GSH) $3,3 \times 10^{-7} - 8,1 \times 10^{-6}$ (GSSG)	$3,3 \times 10^{-10}$ (GSH) $1,6 \times 10^{-7}$ (GSSG)	amperometrija	np	FIA	medicinski pripravci
[168]	elektroda modificirana bakrovim heksacijanoferatom	/	$9,0 \times 10^{-5} - 9,9 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-5}$	voltometrija	1,86	FIA	biološke tekućine

Referenca	Reagensi	λ , nm	LDP, mol L ⁻¹	LOD, mol L ⁻¹	Detektor	RSD, %	Način mjerenja	Vrsta uzorka
[169]	cjevasta srebrova elektroda u otopini živinog(II) klorida i jodida	/	$5,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-2}$	np	potenciometrija	np	FIA	np
[156]	2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina	412	$1,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-6}$ (GSH) $4,7 \times 10^{-8} - 1,5 \times 10^{-6}$ (GSSG)	$3,1 \times 10^{-8}$ (GSH) $1,4 \times 10^{-8}$ (GSSG)	spektrofotometar	5,00	SIA	biološke tekućine
[157]	etil propiolat	285	$3,9 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-7}$	spektrofotometar	3,00	SIA (učestalost injektiranja 100 h ⁻¹)	dodaci prehrani

LDP - linearno dinamičko područje; LOD - granica dokazivanja (*Limit of Detection*); RSD - relativno standardno odstupanje (*Relative Standard Deviation*); np - nema podataka; FIA - analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*); SIA - analiza slijednim injektiranjem u protok (*Sequential Injection Analysis*)

2. OPĆI DIO

2.1. Kinetičke metode analize

Kinetičke metode analize se razlikuju od ravnotežnih, odnosno termodinamičkih metoda zato što se kod ravnotežnih metoda analitički signal uzorkuje u trenucima ravnotežnog ili stabilnog stanja kemijske reakcije, a kod kinetičkih metoda se signal uzorkuje u kinetičkom dijelu reakcije.

Mjerenja se u kinetičkim analitičkim metodama obavljaju pod dinamičkim uvjetima, a analitički parametar je nastajanje produkata ili nestajanje reaktanata. Kinetičke metode upotrebljavaju se u vremenskom intervalu u kojem se koncentracije reaktanata i produkata znatno mijenjaju, a brzina nestajanja reaktanata i nastajanja produkata se mjeri na odgovarajući način.^[170] Signal se, kod sustava pod kinetičkom kontrolom, mijenja s vremenom (slika 2-1). Kod većine kemijskih reakcija brzina reakcije raste porastom koncentracije reaktanata. Ponekad je moguće koristiti istu reakciju za razvoj ravnotežne metode i kinetičke metode.^[170,171]

Mjerenja se u termodinamičkim metodama obavljaju u reakcijskim sustavima koji se nalaze u ravnoteži te su koncentracije stalne. Signal se bilježi nakon što kemijski sustav uđe u stanje ravnoteže te koncentracije reaktanata i produkata postanu stalne, a samim time i signal konstantan.^[170,171]

Kinetičke metode su izuzetno pogodne za analizu, jer omogućavaju osjetljivo i selektivno određivanje u svega nekoliko minuta uz upotrebu odgovarajućeg detektora bez predobrade uzorka.

Selektivnost se kod kinetičkih metoda postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razliku u brzinama reakcije kojima analit i moguće interferencije reagiraju. Kod termodinamičkih se metoda selektivnost postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razlike u ravnotežnim konstantama.^[172]

Kinetičke metode omogućavaju uspješnu analitičku iskoristivost sporih kemijskih reakcija, koje su neprihvatljive za razvoj ravnotežnih metoda određivanja. Svaka kemijska reakcija koja se odvija prihvatljivom brzinom, primjerice unutar 10 minuta, može poslužiti kao osnova za kinetička mjerenja. Odabrana kemijska reakcija treba zadovoljiti tri uvjeta kako bi poslužila razvoju pouzdane kinetičke metode^[171,172]:

- brzina reakcije ne smije biti ni prebrza ni prespora;
- treba biti poznat zakon brzine reakcije;

- način kontinuiranog praćenja koncentracije bar jedne vrste iz odabrane reakcije mora biti poznat.

Reakcija mora biti dovoljno brza da se odvije u razumnom vremenu, a dovoljno spora da se ne postigne stanje ravnoteže dok se reagensi miješaju. Brzina je važna i kod određivanja analita u smjesi, jer su kinetičke metode određivanja moguće samo kada je razlika između brzina reakcija analita i drugih vrsta u smjesi dovoljno velika. Kod razvoja i primjene kinetičkih metoda nužno je da koncentracija analita određuje brzinu odabrane reakcije. Stoga, kod kinetičkog eksperimenta treba primijeniti pouzdan način praćenja napredovanja reakcije s vremenom, odnosno praćenje promjena koncentracije reaktanata ili produkata s vremenom.^[171,172] Čest postupak praćenja kinetike kemijske reakcije u analitičkom laboratoriju su potencijometrijski ili spektrofotometrijski detektori.^[170]

Obzirom na temeljne principe te analitičku iskoristivost, kinetičke metode su slične metodama temeljenim na enzimski kataliziranim reakcijama (enzimske metode). Kinetičke i enzimске metode mogu udovoljiti analitičkom zahtjevu prilikom tzv. analize analita u tragovima, obzirom na njihovu osjetljivost i selektivnost. U tom smislu mogu se u nekim slučajevima usporediti s radiokemijskim metodama analize. Utvrđivanje odnosa između brzine reakcije i koncentracije analita je značajan analitički segment kod razvoja kinetičkih i enzimskih metoda, stoga navedene metode možemo podvesti pod naziv analitičke metode brzine reakcije.

2.1.1. Red reakcije

Kemijska reakcija koja se odvija u određenom vremenu može se općenito prikazati:



gdje A označava analit, R reagens i P produkt.

Temeljem navedene kemijske reakcije (2-1), empirijski zakon brzine reakcije glasi:

$$\text{brzina} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [A]^m \cdot [R]^n \quad (2-2)$$

gdje je brzina derivacija koncentracije A, R ili P po vremenu t . Potrebno je naglasiti da prve dvije brzine imaju negativan predznak iz razloga što se koncentracija analita i reagensa (reaktanata) smanjuju tijekom odvijanja reakcije. Nadalje, k je konstanta brzine, m je red reakcije s obzirom na analit A, dok je n red reakcije s obzirom na reagens R. Ukupni red reakcije je $p = m + n$. Primjerice ako je $m = 1$ i $n = 2$, reakcija će biti 1. reda s obzirom na A, 2. reda s obzirom na R, pa je reakcija ukupno 3. reda.

2.1.2. Zakoni brzine za reakcije prvog reda

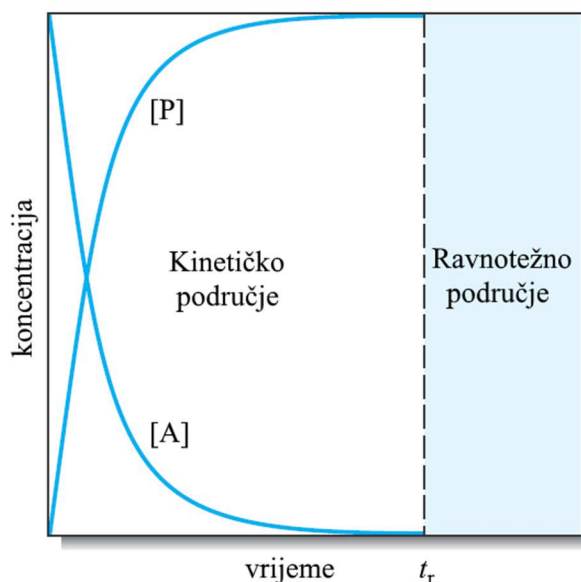
Najjednostavnija kemijska reakcija koja se matematički može opisati je dekompozicija tvari A, kao primjerice radioaktivna dekompozicija^[172]:



Reakcija je prvog reda s obzirom na reaktant A, pa je zakon brzine reakcije:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \quad (2-4)$$

Reakcije prvog reda nisu iskoristive u analitičkoj kemiji budući da se metode određivanja temelje na reakcijama između najmanje dvije kemijske vrste, analita i reagensa.



Slika 2-1 Grafički prikaz smanjenja koncentracije analita i povećanje koncentracije produkta u ovisnosti o vremenu. Koncentracije analita i produkta se kontinuirano mijenjaju do vremena t_r (kinetičko područje). Nakon vremena t_r koncentracije analita i produkta su stalne (ravnotežno stanje).^[172]

Obzirom da su zakoni brzine za reakcije koje uključuju dvije kemijske vrste složeni, potrebno ih je provoditi u uvjetima koji omogućuju pojednostavljenje složenih zakona brzine kemijske reakcije kako bi takve reakcije bile analitički iskoristive.

2.1.3. Zakoni brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda

Kemijske reakcije u analitičkoj kemiji uključuju barem dvije kemijske vrste, analit i reagens. Zakon brzine za reakciju koja uključuje dvije kemijske vrste izrazito je složen i nepogodan za kvantitativno korištenje. Jedine upotrebljive kinetičke metode su one koje omogućuju pojednostavljenje složenog zakona brzina u oblik za reakciju prvog reda

(2-4). Reakcija višeg reda koja se izvodi tako da omogućuje pojednostavljenje naziva se reakcijom pseudoprvog reda.

Ako se pretpostavi da je analitička reakcija nepovratna:



i da se odvija u jednom koraku uz jedinične stehiometrijske koeficijente, može se pretpostaviti da je reakcija prvog reda u odnosu prema svakom od reaktanata, a s obzirom na ukupnu reakciju je drugoga reda. Brzina će stoga biti proporcionalna koncentraciji svakog od reaktanata pa je zakon brzine:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [R] \quad (2-6)$$

Ako se eksperiment izvede u uvjetima kada je $[R]$ značajno veća od $[A]$ onda se može zaključiti da tijekom kinetičkog dijela reakcije koncentracija reagensa praktički ostaje nepromijenjena pa se izraz za brzinu mijenja:

$$k \cdot [R] = \text{konstanta} = k' \quad (2-7)$$

Kako u zadanim eksperimentalnim uvjetima brzina ovisi samo o koncentraciji jednog reaktanta (analita) kažemo da je reakcija pseudoprvog reda obzirom na analit.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k' \cdot [A] \quad (2-8)$$

Reakcije su rijetko potpuno nepovratne, a strogi opis kinetike reakcije drugog reda koja se odvija u jednom koraku uzima u obzir i povratnu reakciju. Uvjeti se moraju održavati takvima da je konstanta brzine za povratnu reakciju vrlo mala, a samim time i brzina povratne reakcije zanemariva, čime se uvodi vrlo mala pogreška pretpostavkom o ponašanju prema pseudoprvom redu.^[171]

2.1.4. Vrste kinetičkih metoda

Kinetičke metode se dijele u dvije osnovne skupine. Prema vrsti odnosa koji postoji između mjerene veličine i koncentracije analita, dijele se na diferencijalne i integralne.^[171,172]

2.1.4.1. Diferencijalne metode

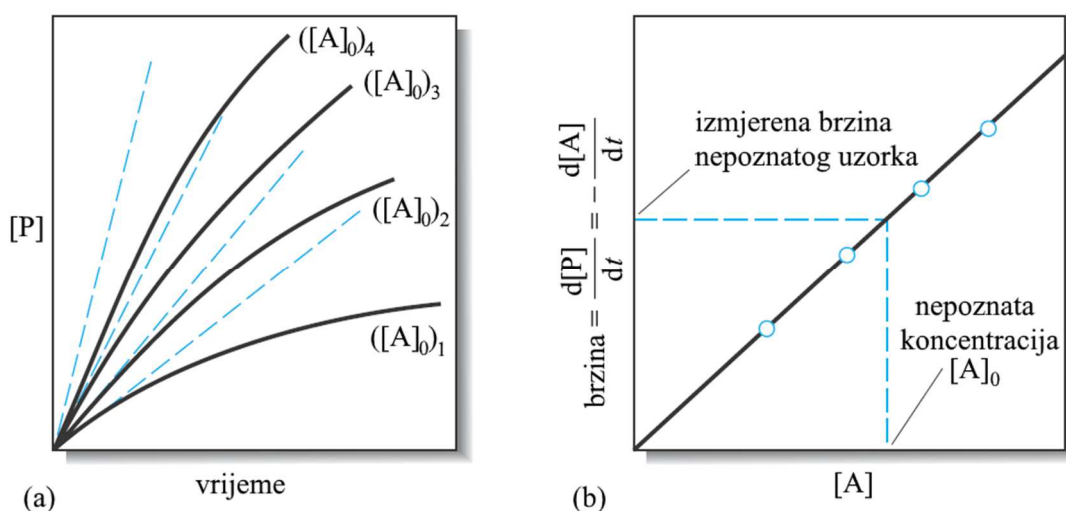
Kod diferencijalne metode koncentracije se računaju iz brzina reakcija pomoću diferencijalnog oblika izraza za brzinu:

$$-\left(\frac{d[A]}{dt}\right) = k \cdot [A]_t = k \cdot [A]_0 \cdot e^{-kt} \quad (2-9)$$

Brzine se određuju mjerenjem nagiba krivulje koja opisuje koncentraciju analita ili produkta kao funkciju vremena reakcije (slika 2-2).

Izbor vremena pri kojem se mjeri brzina reakcije temelji se na čimbenicima kao što su paralelne reakcije koje uzrokuju interferencije te mogućnost i preciznost mjerenja u određenom vremenu. Često se brzina mjeri blizu vremena $t = 0$, jer se u tom dijelu eksponencijalne krivulje postiže linearnost, pa je moguće jednostavno odrediti nagib pomoću tangente na krivulju.

Kod reakcije pseudoprvog reda utrošak suviška reagensa je malen, kako bi se izbjegla pogreška zbog promjene k , koja bi se pojavila promjenom koncentracije reagensa. Relativna pogreška određivanja nagiba minimalna je na početku reakcije, jer je u tom području nagib najveći.



Slika 2-2 Prikaz podataka određivanja koncentracije tvari A diferencijalnom metodom. (a) Pune linije su prikazi koncentracija produkta kao funkcije vremena za četiri početne koncentracije tvari A. Isprekidane linije su tangente na krivulje za $t \rightarrow 0$. (b) Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji tvari A.^[172]

2.1.4.1.1. Metoda početne brzine

Iz nagiba tangente na početni dio kinetičke krivulje određuje se početna brzina reakcije. Za određivanje uvjetne konstante brzine reakcije k' i reda reakcije, n , logaritamske vrijednosti početnih brzina reakcije prikazuju se u ovisnosti o logaritamskim vrijednostima koncentracija analita. Regresijska analiza izračunanih vrijednosti napravljena je korištenjem slijedeće jednadžbe:

$$\log K = \log \frac{\Delta A}{\Delta t} = \log k' + n \log c \quad (2-10)$$

gdje je K brzina reakcije, k' uvjetna konstanta brzine reakcije, c je analitička koncentracija analita te n (nagib regresijskog pravca) red reakcije.^[172]

2.1.4.2. Integralne metode

Integralne metode primjenjuju integralne oblike jednadžbi brzina prvog reda:

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt}, \quad (2-11)$$

dok su grafičke metode temeljene na jednadžbi:

$$\ln[A]_t = -k \cdot t + \ln[A]_0 \quad (2-12)$$

Grafički prikaz prirodnog logaritma eksperimentalno mjerene koncentracije analita kao funkcije vremena je pravac nagiba $-k$ i odsječak $-\ln[A]_0$ na osi y .^[172]

2.1.4.2.1. Metoda određenog vremena

Metoda određenog vremena temelji se na jednadžbi:

$$[A]_0 = \frac{[A]_t}{e^{-kt}} \quad (2-13)$$

Postupak umjeravanja izvodi se standardnom otopinom poznate koncentracije $[A]_0$. $[A]_t$ se određuje u precizno određenom vremenu reakcije (t), a potom se računa e^{-kt} . Uzorci nepoznate koncentracije analiziraju se mjerenjem $[A]_t$ u istom reakcijskom vremenu te se koncentracije analita računaju pomoću izraza (2-13).^[172]

Kod metode određenog vremena izmjerena veličina je upravo proporcionalna koncentraciji analita. Druga prednost ove metode je da se mjerenje može provesti u bilo kojem vremenu (trenutku) t tijekom napredovanja kemijske reakcije prvog reda. Uz navedeno, preciznost analitičkih rezultata se približava preciznosti korištene instrumentacije.^[172]

2.1.5. Praćenje napredovanja reakcije

Kako bi se pouzdano mogla odrediti koncentracija analita kod kinetičkih mjerenja, potrebno je ostvariti uvjete za mjerenje početne brzine razmatrane reakcije. Kada su ostvareni eksperimentalni uvjeti pri kojima je koncentracija reagensa tijekom kinetičkog mjerenja konstantna, za računanje brzine reakcije, nakon miješanja analita i reagensa,

potrebno je mjeriti promjenu (smanjenje) koncentracije analita ili promjenu (rast) koncentracije produkta.^[171]

Eksperimentalne metode određivanja brzina reakcija uzimaju u obzir da li je promatrana reakcija brza ili spora. Reakcija je brza ukoliko se kvantitativno 50 % reakcije odvije u vremenu od 10 sekundi ili manje. Analitičke metode koje primjenjuju brze reakcije zahtijevaju instrumentaciju koja će omogućiti brzo miješanje reaktanata i veliku učestalost bilježenja mjerenih podataka.^[172]

Potrebno je određeno vrijeme za miješanje analita i reagensa, odnosno za pokretanje reakcije čiju brzinu mjerimo. Unutar vremena miješanja napredovanje reakcije je sporije od očekivanog koji slijedi iz brzine reakcije. Kod kinetičkih mjerenja je potrebno utvrditi vrijeme miješanja, odnosno vrijeme od dodavanja analita u reakcijsku otopinu do prvog pouzdanog mjerenja koncentracije odabrane vrste.

Za kvantitativnu analitičku iskoristivost kinetičkih metoda značajan je izbor mjernih tehnika koje omogućuju praćenje koncentracije analita ili produkta kemijske reakcije s vremenom.^[171] Najprikladniji način bilježenja kinetičkih podataka je kontinuirano promatranje napredovanja reakcije pomoću spektrofotometrije, konduktometrije, potenciometrije ili neke druge instrumentne tehnike.^[170]

Spektrofotometrijske tehnike se često koriste u farmaceutskoj industriji zbog svoje jednostavnosti, široke dostupnosti i ekonomske prihvatljivosti.^[170]

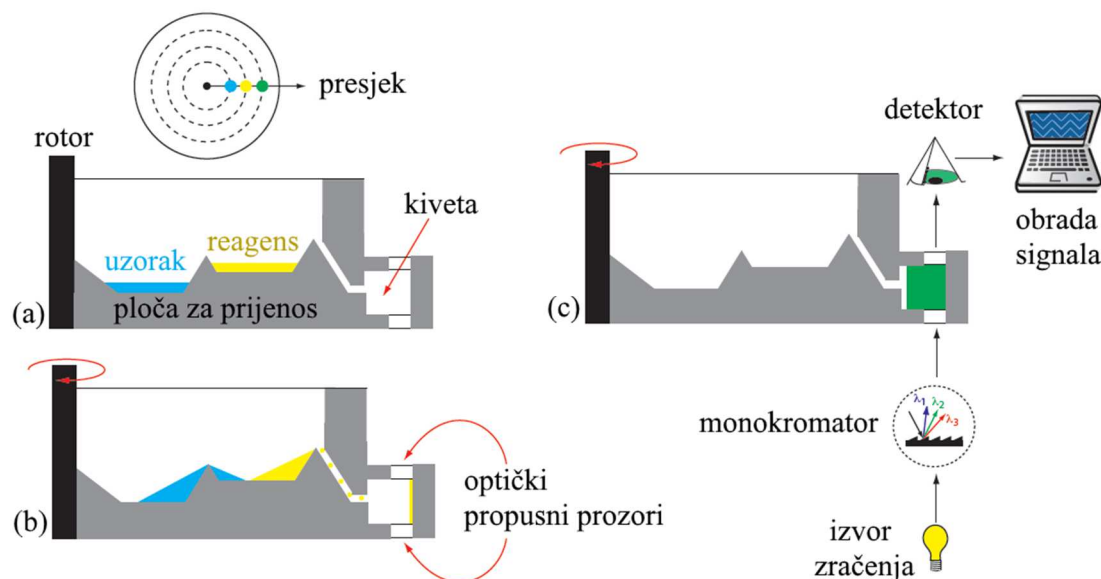
Kod mjerenja brzih kemijskih reakcija unijet će se velika pogreška u mjerenje ako se neprikladno bilježe promjene koncentracija, dok se kod mjerenja kinetičkih sporih reakcija ne događaju bitne promjene za vrijeme bilježenja signala.

Signal se u mnogim kinetičkim metodama određivanja bilježi u prvim trenucima reakcije. Prednost ovog pristupa je brza, automatska analiza, kojom se može obraditi veliki broj uzoraka u kratkom vremenu. Nedostatak je u potrebi za automatizacijom sustava, jer prijenos uzorka i reagensa u reakcijsku posudu mora biti vrlo brzo proveden, a njihovo miješanje ponovljivo, dok potreba za uvođenjem dodatne instrumentacije donekle poskupljuje analizu.^[173]

Za prvu automatsku kinetičku analizu korišten je centrifugalni analizator koji omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu (slika 2-3).^[171,173]

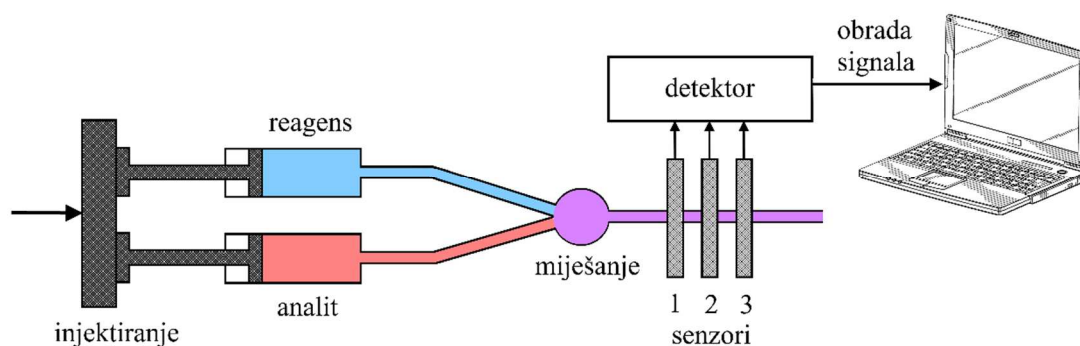
Uzorak i reagens se nalaze u odvojenim posudicama na ploči za prijenos koja je pričvršćena za rotor centrifuge. Okretanjem centrifuge, centrifugalna sila prebacuje uzorak i reagens u kivetu u kojoj se otopine miješaju. Jednostavan optički sustav sastoji se od izvora zračenja, monokromatora i detektora, a nalazi se s vanjske strane ploče te se

apsorbancija mjeri prolaskom reakcijske smjese kroz optički put. Ovaj sustav omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.^[171,173]



Slika 2-3 Shematski prikaz centrifugalnog analizatora: (a) komore sadrže uzorak i reagens; (b) miješanje uzorka i reagensa; (c) konfiguracija spektrofotometrijskog detektora^[173]

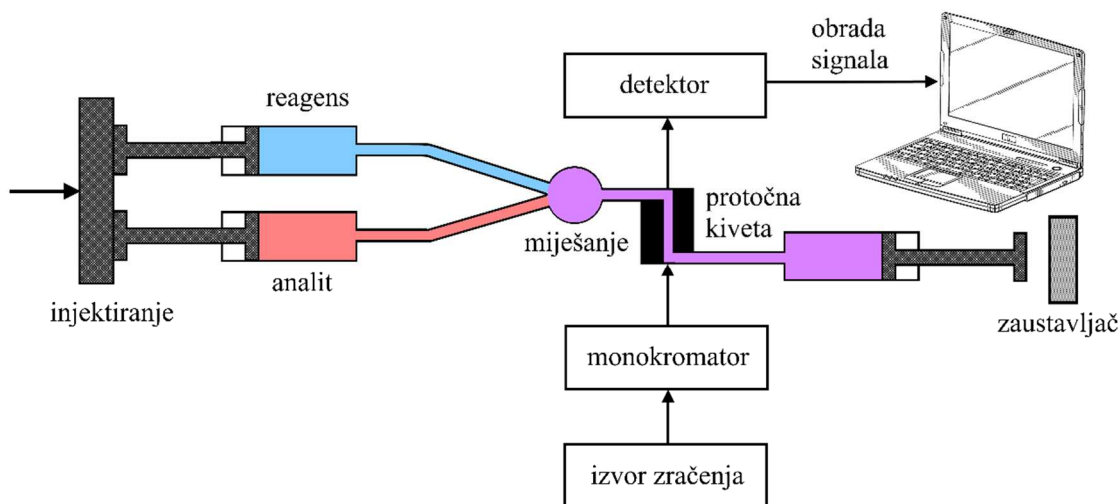
Kod metode kontinuiranog protoka analit i reagens odabranom brzinom ulaze u prostor za miješanje, te nastavljaju put prema detektoru. Na putu prema detektoru odvija se kemijska reakcija, te povećanje udaljenosti detektora od mjesta miješanja rezultira smanjenjem koncentracije analita, a porastom koncentracije produkta kemijske reakcije. Ako je protok kroz sustav konstantan, na svakoj točki uzduž izlazne cjevčice, koncentracije analita i produkta kemijske reakcije imat će stabilne vrijednosti (slika 2-4).^[171,173]



Slika 2-4 Aparatura za kinetička mjerenja metodom kontinuiranog protoka (korištena ilustracija uz dopuštenje autora)^[171]

Kod kinetičkog mjerenja vrlo brzih reakcija koristi se instrumentacija za zaustavljeni protok (slika 2-5).^[171,173]

Volumeni otopina uzorka i reagensa precizno su izmjereni te se razdvojenim štrcaljkama uvode u posudu za miješanje, a njihov se protok zaustavlja pomoću povratnog tlaka štrcaljke za zaustavljanje. U optičkom putu instrumenta spektrofotometrijski se prati odvijanje reakcije.

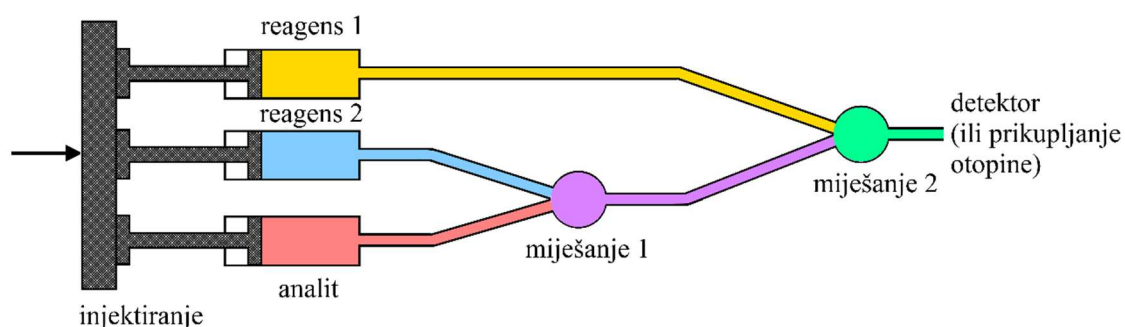


Slika 2-5 Aparatura za kinetička mjerenja metodom zaustavljenog protoka (korištena ilustracija uz dopuštenje autora)^[171]

Instrumentacija za zaustavljeni protok omogućava završetak miješanja otopine i početak kinetičkih mjerenja u samo 0,5 milisekundi. Vezanjem automatskog uređaja za uzorkovanje na štrcaljku za uzorkovanje, moguće je analizirati i do nekoliko stotina uzoraka po satu.

Kod brzih reakcija, ako se u vremenu potrebnom za dobivanje analitičkog signala, koncentracija praćene vrste ne mijenja, za određivanje brzine kemijske reakcije te analitičke primjene kinetičkog eksperimenta, potrebno je primijeniti metodu zaustavljene reakcije (slika 2-6).

Istovremenim potiskivanjem klipova na sva tri injektora započinje kinetički eksperiment. Miješanjem analita i reagensa 2 pokreće se reakcija te daljnjim miješanjem reakcijske otopine s reagensom 1 dolazi do promjene reakcijskih uvjeta i prekida napredovanja reakcije. Prikupljena otopina sadržava u sebi kinetičku informaciju i može se analizirati s vremenskom odgodom koristeći različite analitičke tehnike.^[171,173]



Slika 2-6 Aparatura za kinetička mjerenja metodom zaustavljene reakcije (korištena ilustracija uz dopuštenje autora)^[171]

2.1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda

Brzina reakcije i instrumentalna tehnika kojom se prati brzina reakcije faktori su koji određuju granicu određivanja kinetičkih metoda. Brže reakcije imaju niže granice određivanja, jer je signal proporcionalan brzini reakcije. Uglavnom se koriste spektrofotometrijske i potenciometrijske tehnike za praćenje odvijanja reakcije koje svojim ograničenjima utječu na dostignutu granicu određivanja (najmanja koncentracija ispitivane tvari u uzorku koja se može odrediti sa prihvatljivom preciznošću i točnošću).

Kinetičke metode su potencijalno podložne većim pogreškama od ravnotežnih metoda, zbog djelovanja nekontroliranih ili slabo kontroliranih parametara kao što su pH-vrijednost i temperatura. Iako izravnim računanjem, kinetičke metode mogu postići umjereno točne rezultate (relativna pogreška od 1 – 5 %), točnost je manja od točnosti ravnotežnih metoda.^[173]

Preciznost kinetičkih metoda je određena šumom u signalu instrumenta kojim se prati odvijanje reakcije. Kod integralnih metoda moguća je preciznost od 1 – 2 % dok je preciznost diferencijalnih metoda nešto manja.^[173]

Osjetljivost se kod metode određenog vremena može povećati provođenjem mjerenja u uvjetima kada je koncentracija promatrane vrste visoka. Ako je promatrana vrsta produkt, mjerenja se provode nakon određenog vremena od početka reakcije. Mjerenja se provode na početku reakcije ako je promatrana vrsta analit ili neka reagirajuća vrsta, jer su tada koncentracije reagirajućih vrsta visoke.

Selektivnost kinetičkih metoda temelji se na prilagođavanju uvjeta odvijanja reakcije, jer se time postiže razlika u brzini reakcije analita i interferirajućih vrsta.

2.2. Metode analize injektiranjem u protok (FIA)

U drugoj polovici 20. stoljeća, točnije 1975. godine nastupila je laboratorijska automatizacija u kemijskoj analizi. Ružička i Hansen su u Nizozemskoj razvili i opisali tehniku analize injektiranjem u protok s ciljem automatizacije kemijskog postupka. Analiza injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*, FIA) je skupina tehnika koje se temelje na kontinuiranom protoku. Posljednjih 40 godina navedena tehnika donijela je mnoge prednosti analitičkim laboratorijima kao što su: brzina analize, automatizirano rukovanje otopinama, minijaturizacija instrumentacije i niska cijena analize. Trenutačno postoji podjela FIA tehnika u četiri kategorije:^[174]

- Injektiranje u protok (*Flow Injection*, FI);
- Slijedno injektiranje (*Sequential Injection*, SI);
- Injektiranje u suspenziju čestica (*Bead Injection*, BI);
- Kromatografija slijednim injektiranjem (*Sequential Injection Chromatography*, SIC).

Injektiranje u protok (*Flow Injection*, FI) je prva generacija FIA tehnika. FI se temelji na injektiranju uzorka u jednosmjerni tok struje nosioca koji se potom miješa sa reagensom u stjecištu (točki spajanja otopina analita i reagensa). Navedena tehnika u protoku može se odvijati pri konstantnoj brzini protoka (*constant flow rate*, CFI) ili u programiranom načinu protoka (*programmed flow mode*, PFI).^[175,176]

Tijekom protjecanja injektirane zone, zona uzorka se raspršuje u struji reagensa, pri čemu započinje formiranje produkta između zone uzorka i reagensa. Na taj način koncentracijski gradijent nastaje raspršenjem same zone uzorka, a prijelazni signal zabilježen prolaskom kroz detektor odražava gradijent zone uzorka. Detektor postavljen na izlaznom dijelu protoka bilježi promjenu boje ili nekog drugog parametra koji se mijenja prolaskom zone formiranog produkta kroz protočnu kivetu. Odziv detektora je rezultat dvaju procesa koji se istovremeno odvijaju: disperzije uzorka i kemijske reakcije koja nastaje kao posljedica miješanja analita u uzorku i reagensa.^[174,177]

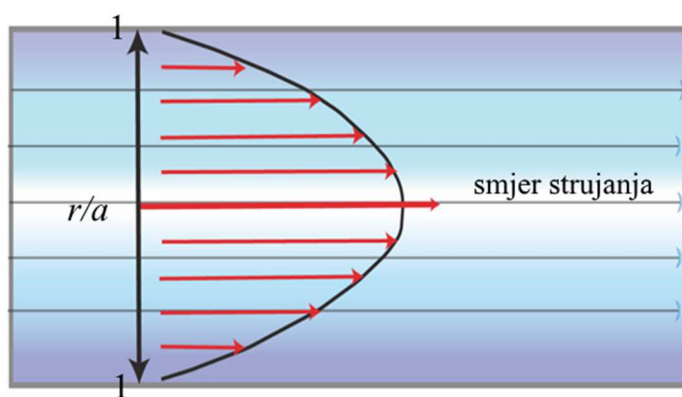
SI i BI temelje se na slijednoj injekciji uzorka i reagensa, u tok struje nosioca, nakon čega slijedi promjena smjera protoka, koja pospješuje međusobno raspršenje injektiranih zona. Tok struje nosioca je programiran, kako bi se optimizirao protok tijekom postupka analize. Dok je SI tehnika dizajnirana za rukovanje tekućinama, BI tehnika koristi suspenzije prikladnih materijala u obliku kuglica za kolone punjene krutim reagensima ili odgovarajućim ligandima. SIC je kromatografska tehnika u razvoju, koja koristi

programabilni protok prilikom odjeljivanja komponenata, na temelju razlike u brzinama razdvajanja, na kratkim kolonama.

Laboratorij na ventilu (*Lab-on-Valve*, LOV) je izvedba koja omogućava smanjenje SI i BI instrumentacije na mikrolitarski raspon kroz integraciju i miniaturizaciju.^[174]

2.2.1. Osnove strujanja i raspršenje prilikom injektiranja u protok

Prolaskom otopine uzorka ili analita kroz ravnu cijev cilindričnog presjeka, pri određenoj konstantnoj brzini protoka, odvija se laminarno strujanje. Pri uvjetima laminarnog strujanja uzorak zauzima parabolični oblik unutar cijevi koji je pod utjecajem aksijalne (vodoravne) i radijalne (okomite) disperzije, odnosno raspršenja.^[174]



Slika 2-7 Prikaz laminarnog strujanja u cijevi cilindričnog presjeka

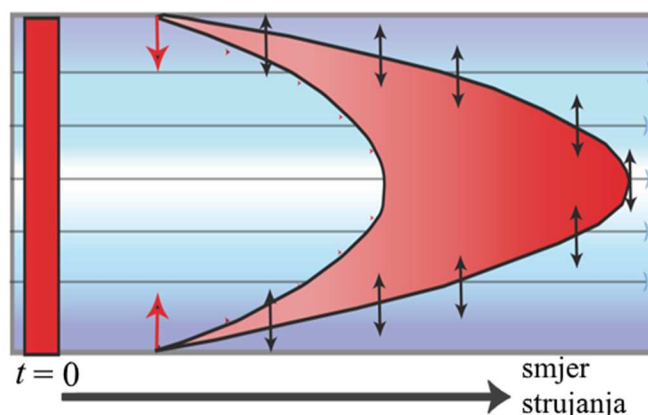
Pri uvjetima laminarnog strujanja svi elementi fluida kreću se paralelno sa smjerom strujanja, a profil brzine zauzima oblik prikazan slikom 2-7. Pri tome je, prema Poiseuille-ovom zakonu, brzina strujanja uz stjenku cjevčice jednaka nuli, a maksimalnu vrijednost dostiže u središtu cijevi gdje je radijus, r jednak nuli. Brzinu strujanja moguće je izračunati u bilo kojoj koordinati prema sljedećem izrazu:^[174]

$$u = 2\bar{u} \cdot \left[1 - \left(\frac{r}{a} \right)^2 \right], \quad (2-14)$$

gdje je r okomita (radijalna) udaljenost, a je radijus kanala, dok je $\bar{u}$ srednja vrijednost brzine strujanja.

Zbog navedenog se dio mase fluida, početnog pravokutnog profila, koji se injektira u vremenu $t = 0$, raspršuje duž profila brzine. Pri tom nastaje šuplji, parabolično oblikovani koncentracijski gradijent (slika 2-8). Tijekom prolaska kroz detektor, gradijent formira oštru, asimetričnu krivulju sa dugim segmentom zaostatka ("rep"). Takav oblik je uzrokovan usporenim pomicanjem strujnica uz stjenke cijevi. Detektor koji bilježi signal

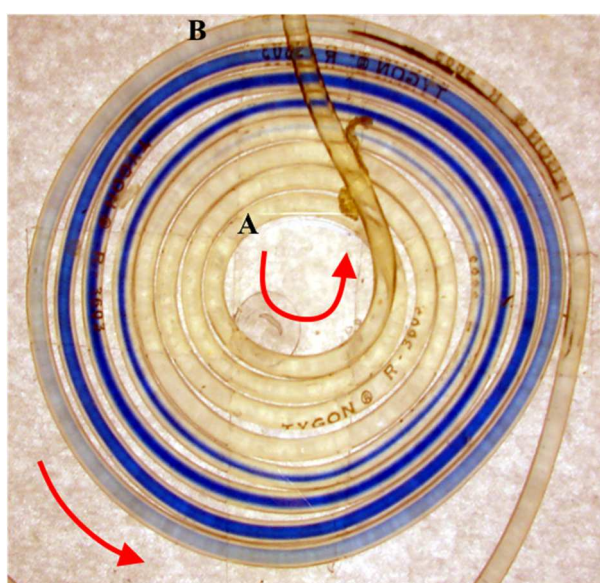
odziva mora moći brzo reagirati (detektirati promjenu tj. signal), uz minimalni volumen i mogućnost okomitog praćenja gradijenta u protjecanju.^[174]



Slika 2-8 Parabolikno raspršenje uslijed laminarnog strujanja u cijevi cilindričnog presjeka

Kao što je već naglašeno, raspršenje u laminarnom strujanju se odvija i aksijalno i radijalno na smjer strujanja otopine uzorka ili analita.

Kao fizikalan proces, radijalno raspršenje može značajno utjecati i po potrebi povećati prijenos tvari kod FIA tehnike upravo u radijalnom smjeru strujanja fluida. Do miješanja, točnije raspršenja zone uzorka u struji osnovne otopine sa strujom reagensa doći će onda kada se elementi tekućine na prednjem rubu disperzijske zone (A) pomaknu prema središnjem dijelu strujne linije, a istim postupkom elementi na pratećem rubu (B) bit će dovoljno brzo pomaknuti prema središnjoj struji (slika 2-9).



Slika 2-9 Prikaz izduženog paraboliknog gradijenta kojeg zauzima zona boje prilikom protjecanja kroz cijev. Može se uočiti oštar vršni rub i vrlo dugački udubljeni dio repa, u koji prodire bezbojni gradijent otopine struje nosioca.

Povećanje okomitog prijenosa tvari istovremeno će rezultirati smanjenjem ukupne duljine zone raspršenja. Neophodno je da se miješanje odvije brzo kako bi kemijska reakcija započela što je prije moguće.

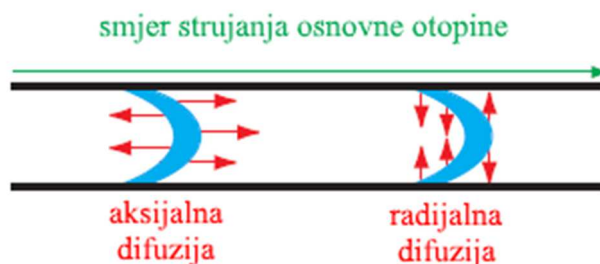
2.2.2. Prijenos tvari: konvekcija i difuzija

Prijenos tvari se odvija difuzijom i konvekcijom. Difuzija, koju pokreću razlike u koncentracijama, može se promatrati kao unutarnja sila, dok se konvekcija provodi vanjskim silama, kao što su razlike tlaka, centrifugalne ili druge mehaničke sile. U uvjetima laminarnog strujanja, difuzija je jedini proces prijenosa tvari odgovorna za okomiti prijenos tvari.^[174]

Kada se uzorak injektira u struju osnovne otopine (nosioca), uzorak poprima početni pravokutni oblik širine w (slika 2-11 (a)). Strujanjem uzorka kroz zonu miješanja i reakcijsku zonu, širina zone uzorka se povećava zbog raspršenja uzorka u struji nosioca. Disperzija ili raspršenje je posljedica dvaju procesa: konvekcije zbog strujanja osnovne otopine i difuzije zbog koncentracijskog gradijenta koji se formira između uzorka i struje nosioca.^[177]

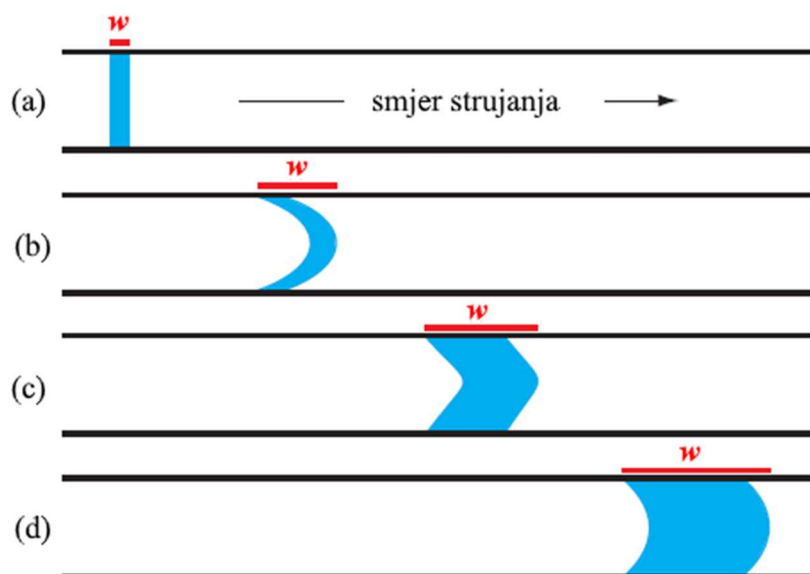
Konvekcija se odvija kada su zadovoljeni uvjeti laminarnog strujanja. Prilikom laminarnog strujanja linearna brzina uzorka uz rub cijevi jednaka je nuli, a segment uzorka u sredini cijevi se kreće brzinom dvostruko većom od struje nosioca. Rezultat takvog strujanja je parabolični oblik prikazan na slici 2-11 (b). Tada je konvekcija dominantan oblik disperzije, osobito u prvih 100 milisekunda od injektiranja uzorka.^[177]

Drugi doprinos disperziji je difuzija, zbog koncentracijskog gradijenta između zone uzorka i struje nosioca. Difuzija se može odvijati aksijalno i radijalno na smjer strujanja osnovne otopine (slika 2-10). Samo je radijalna difuzija značajna kod analize injektiranjem u protok.



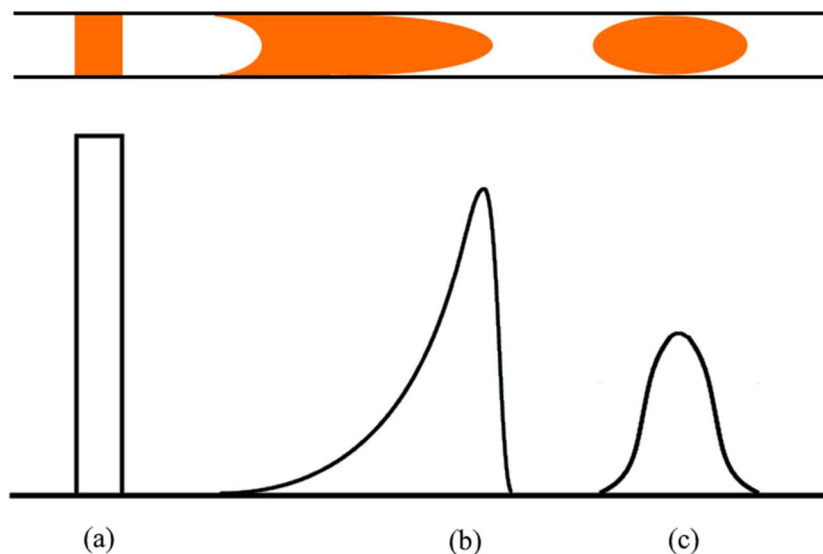
Slika 2-10 Prikaz aksijalne i radijalne difuzije u cijevi

Aksijalna difuzija smanjuje linearnu brzinu uzorka u sredini cijevi, dok se linearna brzina uzorka uz rub cijevi povećava. Na taj način difuzija osigurava cjelovitost zone uzorka (slika 2-11 (c)). Prvih 3 do 20 s nakon injektiranja uzorka i konvekcija i difuzija značajno doprinose raspršenju. Nakon približno 25 s jedino difuzija doprinosi disperziji rezultirajući oblikom zone uzorka prikazanom slikom 2-11 (d).^[177]



Slika 2-11 Utjecaj disperzije na oblik zone uzorka za različito proteklo vrijeme FIA analize: (a) pri injektiranju uzorka; (b) kada konvekcija dominira raspršenjem; (c) kada i konvekcija i difuzija doprinose raspršenju; (d) kada difuzija dominira raspršenjem. Crvena linija označava širinu, w , oblika zone uzorka.

Kao što se vidi na slici 2-12, zona boje (a) koja se injektira u struju nosioca započinje dobivati oštri šuplji konusni oblik (b), budući da se središte struje kreće dvostrukom brzinom srednje vrijednosti brzine protoka, dok trenje uz stjenke cijevi uzrokuje formiranje pratećeg ruba fluida. Ukoliko se okomito raspršenje dovoljno brzo odvija, tijekom protjecanja zone, ono preoblikuje paraboličnu zonu uzorka u oblik valjka. Na taj se način početna ulazna pravokutna zona (A) pretvara iz asimetrične zone (B) u konačni Gaussov (c) oblik krivulje.^[174]



Slika 2-12 Prikaz utjecaja disperzije u FIA sustavu na oblik analitičkog signala

U vodenim otopinama difuzijski koeficijenti iona imaju vrijednosti koje se pri sobnoj temperaturi kreću od 6×10^{-10} do $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Temeljem Fickovog zakona, duljina difuzije L_d omogućava procjenu udaljenosti koju prelazi ion ili molekula koeficijenta difuzije D unutar vremenskog intervala t , prema jednadžbi:^[174]

$$L_d = \sqrt{4 \cdot D \cdot t} \quad (2-15)$$

Budući da zona uzorka protječe brzinom od 10 cm s^{-1} FIA kanalom, difuzija nema utjecaja na aksijalno raspršenje pri tim uvjetima. Što se tiče radijalnog raspršenja za standardne dimenzije kanala unutarnjeg promjera od 0,8 mm, element fluida koji se nalazi na vanjskom rubu bi u najboljem slučaju dostigao središnji dio struje u vremenu od 20 sekundi (ako fluid struji pravocrtno). Stoga dio zone uzorka koji zaostaje kao rep neće dovoljno brzo proteći i tako očistiti kanal protoka, kako bi se postigla praktična brzina uzorkovanja (primjerice 2 injektiranja u minuti). Budući da je difuzija pri strogim uvjetima laminarnog strujanja jedino sredstvo prijenosa tvari, miješanje uzorka s reagensima neće se odviti dovoljno brzo i zbog toga se sama FI tehnika može smatrati neizvedivom.^[31] Ipak, ono što čini FIA tehnike izvedljivima je dizajn kanala, gdje se kod stjencišta (engl. *Confluence point*) ostvaruje turbulentno strujanje. Također promjena brzine i/ili smjera strujanja primjerice kontroliranim programiranjem protoka, dolazi do prekida laminarnog strujanja, s ciljem postizanja radijalnog miješanja. Time se također može postići turbulentno strujanje koje će biti objašnjeno u poglavlju 2.3.3.

2.2.3. Reynoldsov broj

Osborne Reynolds, britanski fizičar i izumitelj, proučavao je strujanje vode u dugim ravnim glatkim cijevima kako bi pronašao kritičnu brzinu protoka, pri čemu je laminarno strujanje bilo poremećeno stvaranjem vrtloga. Rezultat njegovog istraživanja je jednačica koja nosi njegovo ime:

$$\text{Re} = \frac{4\rho \cdot \bar{u}}{\pi \cdot 2r \cdot \nu}, \quad (2-16)$$

gdje je Re Reynoldsov broj, ρ je gustoća, $\bar{u}$ srednja vrijednost brzine protoka, a ν viskoznost.

Reynoldsov broj označava ravnotežu između sila prijenosa i viskoznih sila. Kada je Reynoldsov broj veći od 2000, prevladava turbulentno strujanje, a kada je vrijednost Reynoldsovog broja manja od 1000, ostvareni su uvjeti laminarnog strujanja u cijevima, pri čemu je jedini oblik prijenosa tvari difuzija u radijalnom smjeru.^[174]

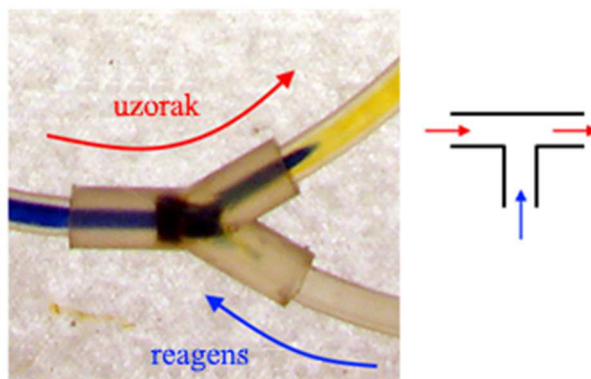
Ipak su dimenzije Reynoldsove aparature i uvjeti njegovog eksperimenta bili daleko različiti od uvjeta u kojima djeluju FIA tehnike.^[178] Njegove cijevi bile su apsolutno ravne, unutarnjeg promjera od 6 do 500 mm te duljine od 3 do 5 m. Reynoldsov protok stabiliziran je tek kada je poduzeo velike mjere predostrožnosti kako bi se izbjegle promjene protoka. Trebala se utvrditi maksimalnu brzinu protoka, na kojoj se može održati laminarna brzina strujanja. Pokazao je da će prepreka koja se postavi unutar cijevi izazvati turbulentno strujanje pri značajno nižim vrijednostima Re. Iz tog razloga je pogrešno pretpostaviti da FIA sustav radi pri laminarnim uvjetima strujanja.^[174]

Promjena brzine strujanja je najučinkovitiji način stvaranja lokalne turbulencije, čime se prekida laminarno strujanje uzorka i time mijenja parabolični profila strujanja. Turbulentno strujanje se može postići:

- spajanjem dvaju tokova;
- naglom promjenom geometrije kanala;
- zaustavljanjem protoka;
- ubrzavanjem ili izmjenom smjera protoka.

Analiza injektiranjem u protok je do nedavno primjenjivala samo prva dva navedena postupka. U točki stjecišta dolazi do spajanja dvaju tokova gdje se struja nosioca zajedno sa zonom uzorka miješa sa zonom reagensa. Ako su brzine protoka struje uzorka i struje reagensa jednake i geometrija točke miješanja (stjecišta) je pravilna, odvija se istovremeno miješanje zbog lokalne turbulencije.

Slijedna injekcija je tehnika pojedinačnog toka i stoga se oslanja na promjenu geometrije protoka i programiranje protoka s ciljem pospješivanja miješanja zone uzorka i zone reagensa. Zahvaljujući programiranju protoka, turbulencija je osigurana upravo ubrzavanjem, zaustavljanjem ili izmjenom smjera protoka.

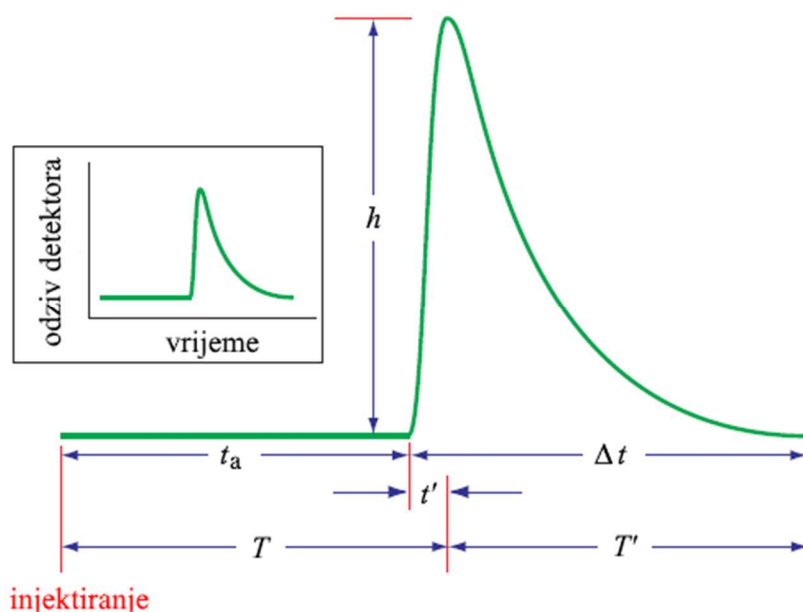


Slika 2-13 Lokalna turbulencija kao posljedica spajanja dvaju tokova i/ili promjenom geometrije kanala

2.2.4. Fiagram

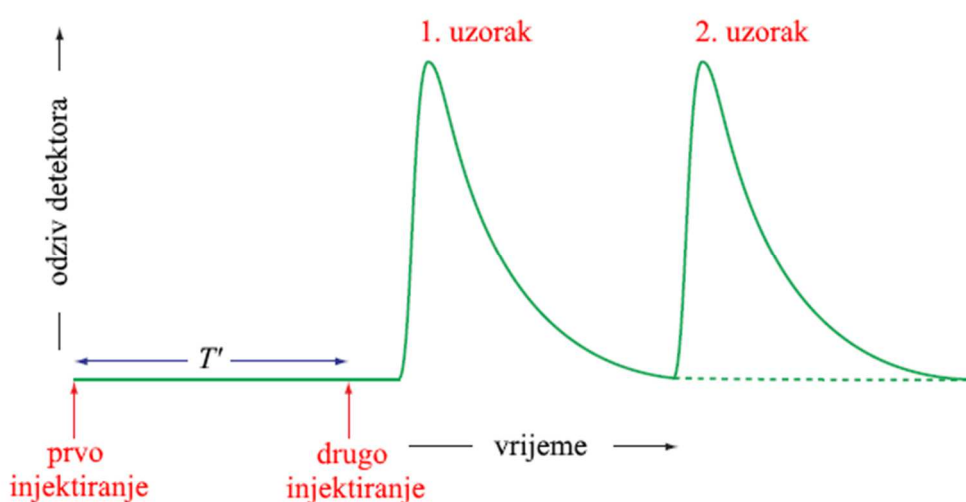
Fiagram ili zbrojni vremenski signal FIA analize je grafički prikaz odziva detektora kao funkcije vremena. Nekoliko parametara opisuje fiagram injektiranog uzorka. Vrijeme potrebno od trenutka injektiranja uzorka do detektora je definirano dvama parametrima: putno vrijeme, t_a , je vrijeme između injektiranja uzorka i dostizanja najisturenije zone uzorka do detektora; vrijeme zadržavanja, T , je vrijeme potrebno za postizanje maksimuma signala odnosno pika (engl. *Peak*). Razlika između vremena zadržavanja i putnog vremena je t' . Vrijednost t' se približava nuli kada konvekcija doprinosi raspršenju, a povećava se kad doprinos difuzije postaje veći.^[177]

Vrijeme potrebno za prolazak uzorka kroz protočnu kivetu detektora te povratak signala na osnovnu liniju je definirano također dvama parametrima: Δt , je proteklo vrijeme od dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka na detektor, do prolaska zaostalog dijela (repa) zone uzorka; vrijeme povratka, T' , je proteklo vrijeme od postizanja maksimuma signala do njegovog povratka na osnovnu liniju. Visina signala, h , označava razliku između maksimuma signala i signala osnovne linije.^[177]



Slika 2-14 Figram analize injektiranjem u protok: odziv detektora kao funkcije vremena

Od opisanih parametara fiagrama najvažniji su visina signala h i vrijeme povratka T' . Visina signala je izravno ili neizravno povezana s koncentracijom analita i služi za kvantitativno određivanje. Osjetljivost FIA metode je određena visinom signala, a vrijeme povratka određuje učestalost injektiranja uzoraka. Ukoliko se sljedeći uzorak injektira u vremenu T' nakon injektiranja prvog uzorka, doći će do minimalnog preklapanja između dviju FIA krivulja. Stoga će se injektiranjem uzoraka pri kraju vremena T' , ostvariti maksimalan broj analiziranih uzoraka.^[177]

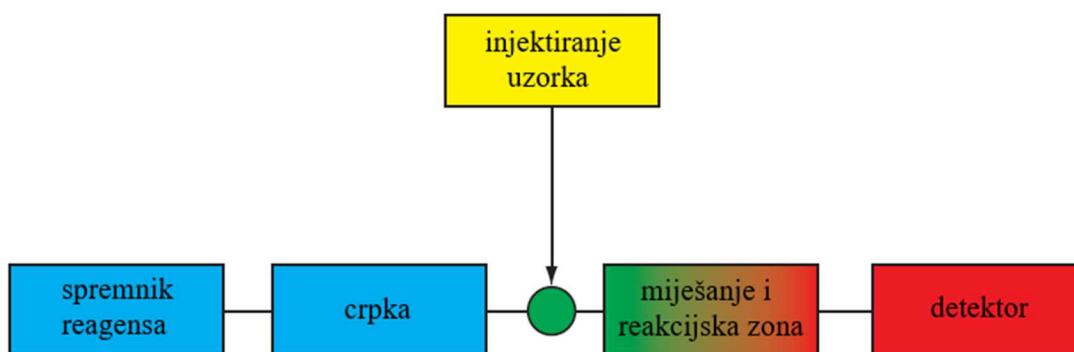


Slika 2-15 Utjecaj vremena povratka na učestalost analiza

Na visinu pika i vrijeme povratka utječe raspršenje zone uzorka te fizikalna i kemijska svojstva FIA sustava. Fizikalni parametri koji utječu na h i T' su: volumen injektiranog uzorka, protok, duljina, promjer i geometrijske karakteristike reakcijskih zona miješanja (uzvojnice) te prisutnost stjecašta, gdje dolazi do miješanja razdvojenih struja. Kinetike kemijskih reakcija u kojoj sudjeluju uzorak i reagensi u funkciji osnovne otopine također utječu na visinu signala i vrijeme povratka.^[177]

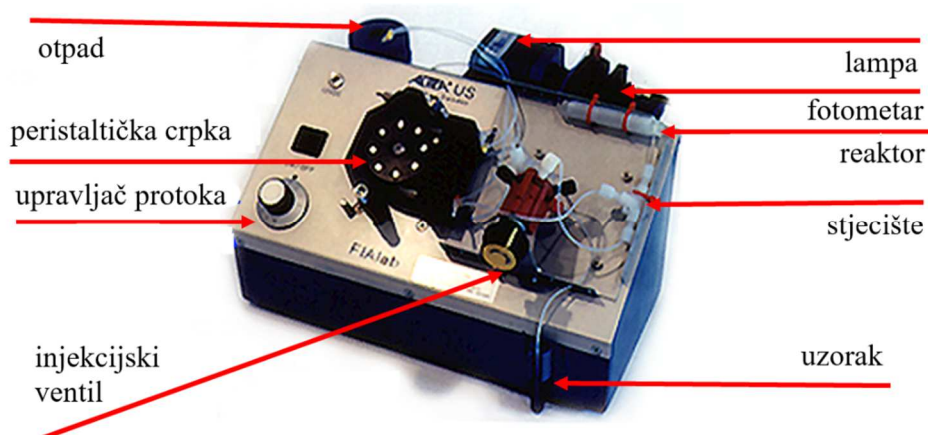
2.2.5. Osnovni djelovi FIA instrumentacije

Za razliku od centrifugalnog analizatora opisanog kod kinetičkih metoda analize, kod kojeg je broj uzoraka ograničen veličinom ploče za prijenos, FIA omogućuje brzu analizu neograničenog broja uzoraka. Sam princip izvođenja FIA analize prikazan je na slici 2-16. Reagens, koji je u ovom slučaju struja nosioca, se nalazi u spremniku. Njegov konstantan protok osigurava crpka kroz sustav cijevi koje sačinjavaju prijenosni FIA sustav. Uzorak se izravno injektira u struju nosioca koja je u ovom slučaju reagens. Otopina nosioca struji kroz jednu ili više zona miješanja, time i reakcijskih zona, prije nego stigne do protočne kivete detektora.^[177]



Slika 2-16 Shematski prikaz principa i osnovnih komponenti FIA sustava s jednom strujom reagensa

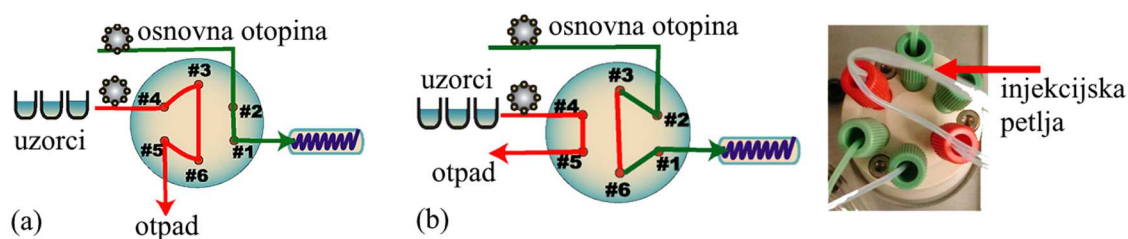
Jednostavan FIA sustav sa ručnim upravljanjem sastoji se od peristaltičke crpke, dvosmjernog injekcijskog ventila sa ručnim upravljanjem, sustava priključaka (konektora), cijevi i reaktora, protočne kivete i detektora (najčešće je to spektrofotometar uz računalo s mogućnošću prikupljanja i bilježenja podataka).^[179]



Slika 2-17 Prikaz jednostavnog FIA sustava sa ručnim upravljanjem proizvedenog u FIAlab-u, kao izvrstan alat za obučavanje u studentskom laboratoriju ili za istraživački rad i analizu malih volumena uzoraka^[179]

2.2.5.1. Injekcijski ventil

Injektiranje točno određenih volumena uzoraka u protok postiže se niskotlačnim injekcijskim ventilom sa šest kanala i injekcijskom petljom. Injektiranje uzorka mora se odvijati brzo (poput hitca) kako ne bi došlo do remećenja struje osnovne otopine. Volumen vanjske injekcijske petlje (prikazan na slici 2-18) se odabire u rasponu od 50 do 1000 μL . Ventil se može ručno ili automatski prebaciti iz funkcije punjenja pozicije: (4,5) u način injektiranja pozicije: (2,1). Injekcijska petlja pozicije: (3,6) se može puniti ručno pomoću štrcaljke ili automatski s automatskim uzorkivačem pomoću crpke. Važno je zadržati duljinu cijevi između spremnika uzorka i ulaza br. 4 na injekcijskom ventilu što je moguće kraće da bi se sačuvao uzorak s aspekta potrošnje i stabilnosti te kako bi se izbjeglo unakrsno onečišćenje uzorka sa uzorkom. Korisno je uvođenje mjehurića zraka i ispiranje između uzoraka.^[179]

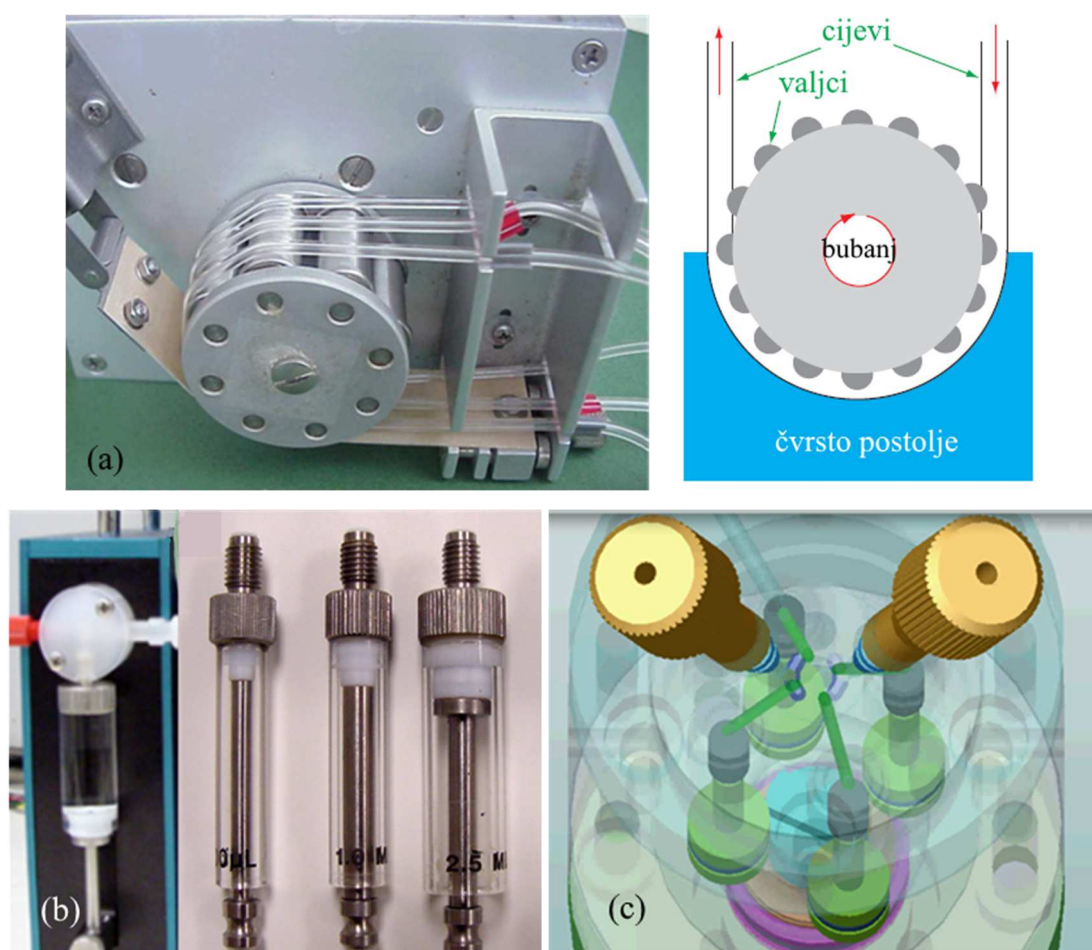


Slika 2-18 Prikaz načina (a) punjenja i (b) injektiranja injekcijskog ventila sa šest kanala prema pozicijama

2.2.5.2. Crpka

Razvoj injektiranja u protok povezan s razvojem transporta tekućina, stoga je crpka osnova prijenosnog sustava. Peristaltičke crpke se najčešće primjenjuju kao pogon protoka fluida u FI sustavu.

Peristaltičke crpke (slika 2-19(a)) osiguravaju kontinuirani protok u nekoliko paralelnih kanala. Brzina protoka osnovne otopine i otopina reagensa može se jednostavno podesiti brzinom vrtnje bubnja i odabirom unutarnjeg promjera (*Inner Diameter*, I.D.) cijevi peristaltičke crpke.^[177,179] Na vanjskom dijelu bubnja peristaltičke crpke nalaze se valjci koji protiskuju otopinu. Prednost korištenja peristaltičkih crpki je njihova niska cijena, iako cijena potrošnog materijala (peristaltičkih cijevi) višestruko premašuje cijenu crpke tijekom svog vijeka trajanja. Najveći nedostatak peristaltičkih crpki je smanjenje elastičnosti cijevi, što uzrokuje smanjenje brzine protoka tijekom rada. Iz tog razloga peristaltičke cijevi trebaju zamjenu, a crpka se mora često umjeravati.^[35]



Slika 2-19 (a) Peristaltička crpka i njen shematski prikaz; dvosmjerne crpke: (b) s injektiranjem (*syringe*) i (c) miliGAT crpka bez injektiranja (*syringe free*)

Dvosmjerne crpke s injektiranjem (*syringe pump*) su druga vrsta crpki koje se upotrebljavaju kod FI tehnika (slika 2-19(b)). Osiguravaju protok visoke ponovljivosti tijekom duljeg razdoblja uporabe, bez potrebe za servisiranjem. Crpke s injektiranjem su izdržljive i ujedno kemijski otporne. Njihov nedostatak je nemogućnost ostvarivanja kontinuiranog protoka izvan kapaciteta injektora. Ponovno punjenje injektora je nedostatak u usporedbi s peristaltičkom crpkom, jer ometa protok čime se smanjuje učestalost uzorkovanja prilikom serijskih određivanja.^[179]

Dvosmjerna crpka bez injektiranja (*syringe free pump*), miliGAT, predstavlja nedavni napredak u razvoju pogona i transporta fluida (slika 2-19(c)). Kombinira prednosti peristaltičke crpke, kontinuiranog punjenja, sa svim prednostima dvosmjerne crpke s injektiranjem. Omogućuje široki raspon brzina protoka u polaznom i povratnom smjeru te postoji mogućnost kontrole računalom. Jedinstvena izvedba temelji se na četiri mikro injektora koji se pomiču oko kosog diska smještenog na osovini. Brzinu rotacije kontrolira brzina protoka i stupanj rotacije prenesenog volumena.^[179]

2.2.5.3. Prijenosni sustav – priključci i reakcijske cijevi

Većina komponenata FI i SI sustava povezana je cijevima unutarnjeg promjera od 0,5 mm do 0,8 mm. Prijenosne cijevi, reakcijske cijevi i priključne komponente najčešće su izrađene od različitih polimernih materijala, točnije od poli(tetrafluoroetilen) (Teflon) i poli(eter-eter-keton) (PEEK). Koristi se i nehrđajući čelik zbog niza prednosti kao što je provodnost topline, nepropusnost plina te površinska svojstava koja smanjuju adsorpciju proteina. Većina cijevi od polimernih materijala je prozirna i često je označena bojom, tako da se unutarnji promjer cijevi može vidjeti već na prvi pogled.^[179]

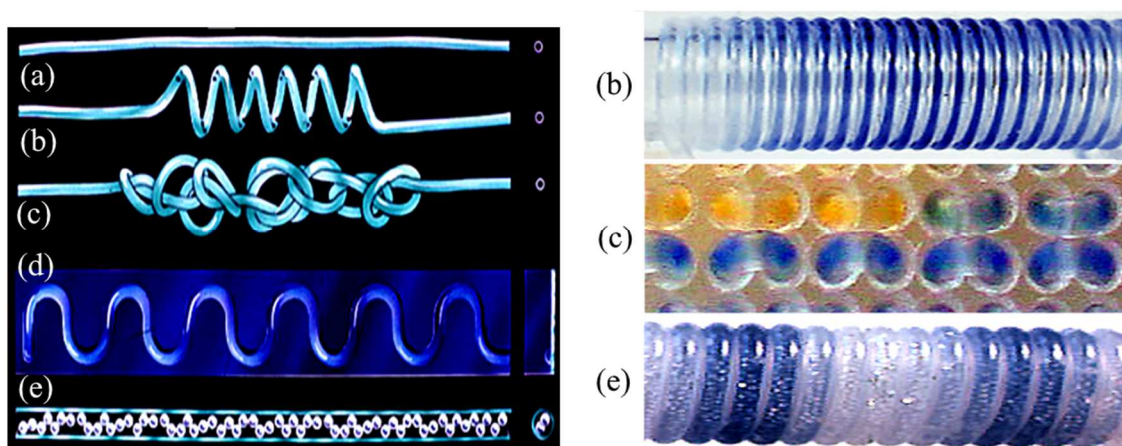
Prijenosni sustav opremljen je vijcima (engl. *ferrules*) i steznim maticama (engl. *nuts*). Vijci su dizajnirani za povezivanje cijevi, a stezne matice imaju funkciju pričvršćivanja cijevi. Budući da svi FIA sustavi rade pri niskom tlaku, nije potrebno koristiti dodatne priključke koji su primjerice dizajnirani za kromatografske tehnike analize.^[179]



Slika 2-20 Komponente prijenosnog sustava: cijevi, vijci, stezne matice

Prijenosni sustav uključuje i reaktore različite geometrijske izvedbe prikazane na slici 2-21. Umjesto uobičajene ravne cijevi (a) kao ravnog reaktora, reaktor može biti izveden namatanjem cijevi u obliku reakcijske uzvojnice (b). Zatim se pletenjem cijevi može ostvariti izvedba spletenog reaktora (c), utiskivanjem cijevi u obliku sinusoide (d, rešetke s perforiranim cijevima) ili punjenjem cijevi s inertnim zncima odnosno kuglicama (e).

FIA sustavi najčešće koriste reaktore u obliku uzvojnice. Učinkovitije od uzvojnica su ručno spleteni reaktori ili rešetke s perforiranim cijevima. Reaktori s jednostrukim kugličnim nizom (*Single Bead String*) su najučinkovitiji, ali njihov omjer površine i volumena je mnogo veći od ostalih reaktora i može dovesti do adsorpcije analita na stacionarnu fazu zrnaca. Utisnuti reaktori su polukružnog promjera, ostavljajući dijelove koji se sporo ispiru.^[179]



Slika 2-21 Različite izvedbe reakcijskih cijevi: ravni reaktor (a); reakcijska uzvojnica (b); spleteni reaktor (c); sinusoidni reaktor (d); punjeni reaktor (e)

2.2.5.4. Detektori

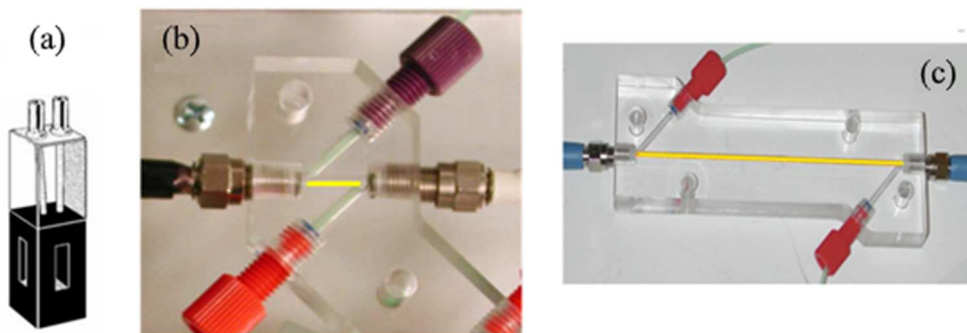
Najčešće korišteni detektori za FIA analizu su elektrokemijski i spektrofotometrijski detektori. U novije vrijeme optička vlakna su donijela revoluciju u izvedbi instrumenata za analizu injektiranjem u protok olakšavajući postavljanje protočnih kiveta na najbolju poziciju putanje protoka.^[177]

Korištenje optičkih vlakana također je utjecalo na dizajn toka fluida. Dok je nekada kod UV-VIS spektrofotometrije jedini izbor bio optički put dug 1 cm, volumena protočne kivete od 80 μL (slika 2-22 (a)), sada su dostupni manji volumeni optičkih protočnih kiveta koje nude raspon optičkog puta od 0,01 cm do 25 cm. Na taj način, promjenom protočne kivete, odziv se može prilagoditi koncentraciji analita unutar gotovo tri reda veličine.^[179]

Što se tiče izvedbe, postoje dvije vrste protočnih kiveta:

- standardne slobodne protočne kivete koje se mogu koristiti za bilo koju vrstu analizatora;
- protočne kivete integrirane u izvedbi *lab-on-valve*.

Primjer slobodne protočne kivete je Z-kiveta prikazana na slici s optičkim putem od 1 cm (slika 2-22(b)) i 10 cm (slika 2-22(c)). Te se protočne kivete mogu rastaviti zbog čišćenja.^[179]



Slika 2-22 (a) Protočna kiveta optičkog puta 1 cm; Z-ćelija s optičkim putem duljine 1 cm (b) i 10 cm (c)

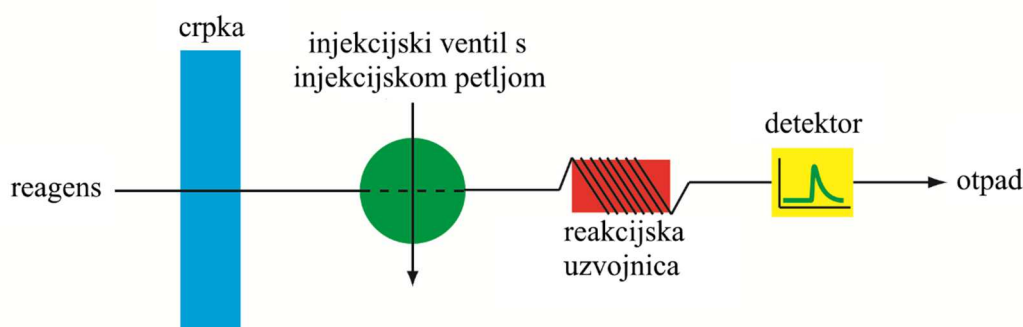
Prednost integriranja protočnih ćelija u *lab-on-valve* izvedbu (LOV, laboratorij na ventilu), je dobra definiranost puta toka uzorka od točke injektiranja do detekcije, te njegovog minimalnog volumena. Najnovija konstrukcija omogućuje odvajanje protočnih kiveta od LOV izvedbe. Takva značajka olakšava prebacivanje između protočnih kiveta različitih funkcionalnosti, što čini LOV izvedbu kompatibilnom s 15 mm, 50 mm, 100

mm i 200 mm dugačkim optičkim putevima, kao i protočnim kivetama za fluorescenciju i kemiluminiscenciju.^[179]

2.2.6. Izvedbe FIA sustava

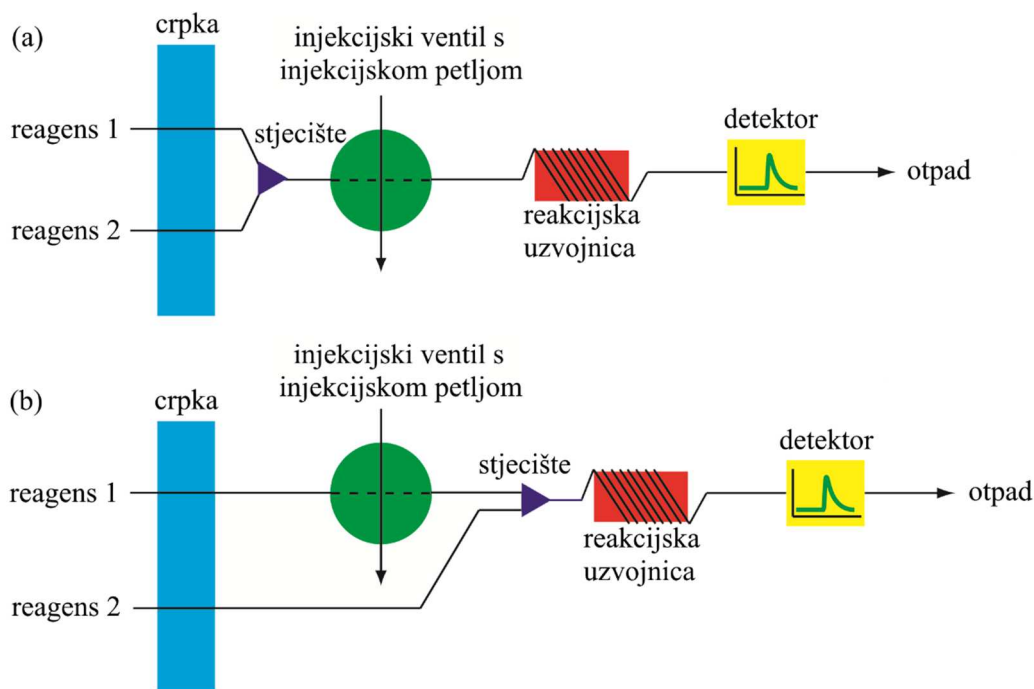
Prijenosni dio FIA sustava osigurava povezivanje struja osnovne otopine, uzorka i reagensa koji reagiraju sa uzorkom. Svaka je struja reagensa zasebna struja smještena u kanalu, a svi se kanali moraju spojiti prije nego što osnovna otopina dosegne detektor.

Najjednostavnija izvedba prijenosnog sustava uključuje samo jedan kanal, čiji se osnovni prikaz nalazi na slici 2-23. Ovakav jednokanalni FIA sustav se obično koristi za izravne analize koje ne zahtijevaju odvijanje kemijske reakcije. U tom slučaju prijenos struje osnovne otopine služi samo za brzi i ponovljivi prijenos uzorka do detektora. Jednokanalni prijenosni sustav koristi se i u kombinaciji s atomskim apsorpcijskim spektrometrom kao detektorom, ali i za određivanje pH-vrijednosti uzorka ili određivanje koncentracije iona metala pomoću ion selektivne elektrode.



Slika 2-23 Shematski prikaz jednokanalnog sustava za analizu injektiranjem u protok u kojem reagens služi i kao struja nosioca i kao vrsta koja reagira s uzorkom

Jednokanalni sustav (slika 2-23) se može koristiti za sustave u kojima se prati produkt kemijske reakcije između uzorka i reaktanta. U tom slučaju struja nosioca prenosi uzorak prema detektoru i istovremeno reagira sa uzorkom. S obzirom da se uzorak miješa s osnovnom otopinom, koristi se manja brzina strujanja.

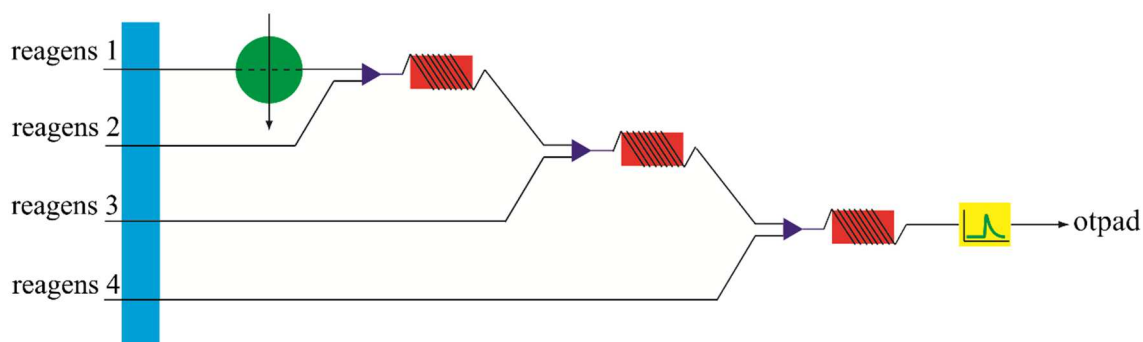


Slika 2-24 Shematski prikaz dva dvokanalna sustava za analizu injektiranjem u protok: (a) kada se dvije struje otopina reagensa susreću i miješaju neposredno prije injektiranja uzorka; (b) kada se dvije struje reagensa miješaju nakon injektiranja uzorka u struju osnovne otopine

Većina sustava za protočnu analizu injektiranjem koji zahtijevaju odvijanje kemijske reakcije imaju više od jednog kanala. Na ovaj način postiže se kontrola miješanja reagensa i interakcija između reagensa i uzorka. Dvokanalni sustav prikazan je na slici 2-24 u dvije moguće izvedbe. Na slici 2-24(a) je prikazano korištenje dvokanalnog sustava, kada se reagensi ne mogu prethodno miješati zbog njihove reaktivnosti, odnosno kada su reagensi nestabilni. Dvije struje otopina reagensa susreću se i miješaju neposredno prije injektiranja uzorka.

Dvokanalni sustav se također može koristiti za miješanje drugog reagensa nakon injektiranja uzorka u struju osnovne otopine, kao što je prikazano na slici 2-24(b). Ovaj prikaz prijenosnog sustava se općenito koristi za kvantitativnu analizu mnogih analita.

Složeniji sustavi koji imaju tri ili više kanala također se upotrebljavaju, ali zbog prevelike mogućnosti izvedbi različitih kombinacija nije ih jednostavno prikazati. Primjer jednog četverokanalnog FIA sustava je prikazan na slici 2-25.



Slika 2-25 Shematski prikaz četverokanalnog sustava za analizu injektiranjem u protok

2.2.7. FIA sustavi i "zelena analitička kemija" (*Green Analytical Chemistry, GAC*)

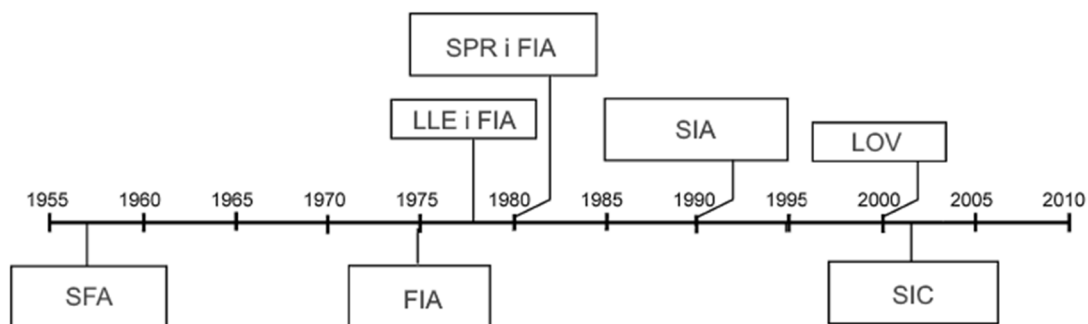
Razvoj kemijske i farmaceutske industrije i težnja za razvojem novih analitičkih metoda zahtjeva povećanu svijest i odgovornost prema ekologiji. Iz tog se razloga primjenjuju normirani standardi upravljanja okolišem koji upravljaju industrijom, a između ostalog i odnosima između zemalja, čime se utječe istovremeno na rad i doprinos znanstvenika. Učinci kojima se teži je značajno smanjenje toksičnih i štetnih komponenti prilikom procesa proizvodnje, a time smanjenje stvaranja štetnog i opasnog otpada, ili pak njihova potpuna eliminacija. To je rezultiralo razvojem čistijih i učinkovitih postupaka, a time i razvoj novih tehnika i metoda u skladu s uvjetima "zelene analitičke kemije" (*Green Analytical Chemistry, GAC*).^[180]

Razvijanje postupaka "zelene analitičke kemije" je izravno povezano s razvojem metoda analize u protoku. Promjene u izvedbi protočnih sustava, kao i novi pristup protoku, doveli su do izvanrednih novih mogućnosti smanjenja potrošnje reagensa i prikupljanja otpada bez ometanja analitičkog postupka. Recikliranje otapala, ponovna uporaba reagensa i zbrinjavanje otpada na licu mjesta su još neke strategije koje se mogu primijeniti u protočnim sustavima kako bi se postigli ekološki čišći postupci.^[181]

Analiza u protoku obuhvaća skupinu analitičkih tehnika koje su primjenjive u rutinskim i istraživačkim laboratorijima, omogućujući vremenski brže mjerenje uz minimalno prisustvo samog analitičara. Nadalje, priprava uzoraka se provodi uz minimalne volumene otopina kiselina, a određivanjem u protoku se korisno izbjegava nekadašnja potreba za čuvanjem uzoraka. Iz tog razloga su automatizirane FIA metode nerazdvojivo povezane s razvojem ekološki čistijih analitičkih postupaka.^[180]

Metode analize injektiranjem u protok zadovoljavaju nekoliko načela i zahtjeva GAC-a. Potrošnja reagensa je značajno smanjena u usporedbi s klasičnim reakcijama "u čaši", kao i nastali otpad. FIA metodama se također omogućuje kruženje i ponovna upotreba reagensa. Predobrada uzoraka je često jednostavnija i brža čime se također izbjegava nepotrebno onečišćenje kemikalijama. Smanjen je mogući rizik izlaganja analita štetnim tvarima obradom uzorka u zatvorenom sustavu, a analitički postupak je uz automatizaciju manje ovisan o operateru.

Na slici 2-26 nalazi se kronološki prikaz metoda analize u protoku koje doprinose "zelenoj analitičkoj kemiji", točnije smanjenju volumena utrošenog reagensa: analiza u protoku uz razdvajanje uzoraka mjehurićima zraka (*Segmented Flow Analysis*, SFA 1957); analiza injektiranjem u protok (FIA 1975); ekstrakcija tekuće-tekuće i analiza injektiranjem u protok (*Liquid-liquid Extraction*, LLE i FIA 1978); reaktori s krutom fazom i analiza injektiranjem u protok (*Solid-phase Reactors*, SPR i FIA 1980); analiza slijednim injektiranjem (SIA 1990); laboratorij na ventilu (LOV 2000); kromatografija slijednim injektiranjem (SIC 2002).^[181]



Slika 2-26 Kronološki prikaz razvoja metoda analize u protoku koje doprinose "zelenoj analitičkoj kemiji" (GAC)^[181]

2.3. Spektrofotometrijski detektori

Spektrofotometrija je spektrometrijska metoda određivanja koncentracije tvari u uzorku mjerenjem količine apsorbirane svjetlosti. Postupak koji se temelji na apsorpciji svjetlosti u vidljivom području se zove kolorimetrija. Ovo poglavlje je usmjereno na interakciju ultraljubičastog i vidljivog zračenja s tvarima.^[182,183]

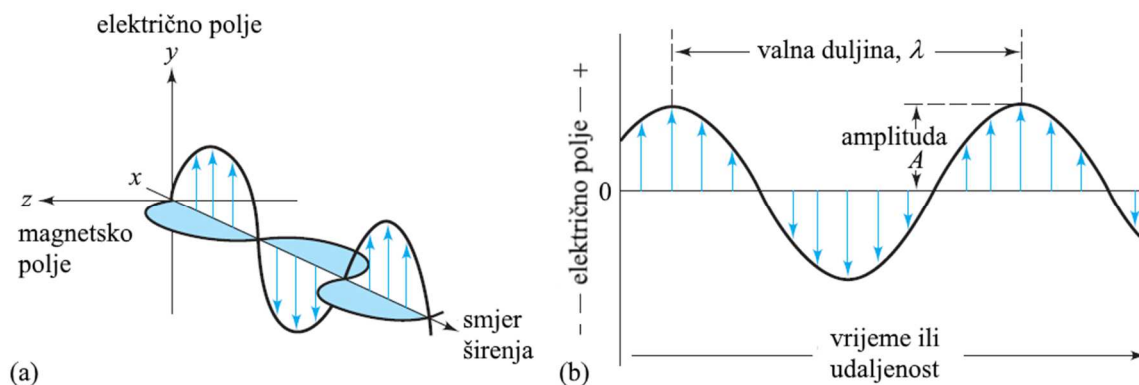
2.3.1. Svojstva elektromagnetskog zračenja

Elektromagnetsko zračenje je oblik energije koji se prenosi velikim brzinama kroz prostor ($3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ u vakuumu). Svjetlošću nazivamo elektromagnetsko zračenje u ultraljubičastom (UV), vidljivom (VIS) i infracrvenom (IR) dijelu spektra, iako se pojam svjetlost strogo odnosi samo na vidljivo zračenje. Elektromagnetsko zračenje može se opisati pomoću valnog modela sa svojstvima valne duljine, frekvencije, brzine i amplitude. Za razliku od zvučnih valova, svjetlosni valovi ne zahtijevaju prijenosni medij; svjetlost može putovati kroz vakuum. Svjetlost putuje milijun puta brže od zvuka.^[184]

Valni model ne obuhvaća pojave povezane uz apsorpciju i emisiju zračenja i ne može ih objasniti. Stoga se elektromagnetsko zračenje može promatrati čestičnim modelom kao struja diskretnih pakiranja energije ili pojedinačnih čestica nazvanih fotonima. Na taj način se svjetlost može promatrati i kao čestica i kao val. Energija fotona je izravno proporcionalna njegovoj frekvenciji, stoga čestice i valovi nisu međusobno isključivi već su komplementarni.^[184]

2.3.1.1. Valna svojstva zračenja

Valni model elektromagnetskog zračenja prikazan je na slici 2-27(a), sastoji se od okomito oscilirajućeg električnog i magnetskog polja. Električno polje za jedan frekvencijski val sinusoidno oscilira u prostoru (slika 2-27(b)). Električno polje je prikazano kao vektor čija je duljina proporcionalna snazi polja. Apscisa (os x) predstavlja ili vrijeme potrebno da zračenje prođe čvrstu točku u prostoru ili udaljenost u određenom vremenu. Pri tom je smjer u kojem polje titra (oscilira) okomito na smjer u kojem se zračenje širi.



Slika 2-27 Valna priroda snopa elektromagnetskog zračenja s jednom frekvencijom: (a) u ravni je prikazan polarizirani val koji se proteže duž apscise. Električno polje titra u ravnini okomito na magnetsko polje. U slučaju da zračenje nije polarizirano, komponenta električnog polja bi se vidjela u svim ravninama; (b) Prikazano je samo titranje električnog polja. Amplituda vala je duljina vektora električnog polja u maksimumu vala, a valna duljina je udaljenost između dva uzastopnih maksimuma.

Na slici 2-27(b) prikazana je amplituda sinusoidnog vala, A , te je definirana i valna duljina, λ . Period zračenja, p , je vrijeme potrebno za prolazak uzastopnih maksimuma ili minima kroz čvrstu točku u prostoru, izraženo u sekundama.

Frekvencija, ν , je broj oscilacija vektora električnog polja po jedinici vremena i jednak je $1/p$. Frekvencija svjetlosnog vala ili bilo kojeg vala elektromagnetskog zračenja određuje se pomoću izvora koji ga emitira i ostaje konstantna bez obzira na sredstvo kojim se prenosi. Suprotno tome, brzina vala, v , kojom fronta vala prolazi sredstvom ovisi upravo o sredstvu kojim se širi i o frekvenciji.

Valna duljina, λ , je linearna udaljenost između dva uzastopna maksimuma ili minimuma vala. Umnožak frekvencije (ν -valovi u jedinici vremena: s^{-1}) i valne duljine (λ -udaljenost po valu, cm ili m) jednak je brzini širenja vala (v -udaljenost po jedinici vremena: $cm\ s^{-1}$ ili $m\ s^{-1}$), kako je prikazano u jednadžbi (2-17). I brzina i valna duljina ovise o sredstvu kojim se zračenje širi.^[182]

$$v = \nu \cdot \lambda \quad (2-17)$$

Valni broj, $\bar{\nu}$, definiran je kao broj prijeđenih valova u jednom cm. Valni broj je recipročna vrijednost valne duljine s pripadajućom mjernom jedinicom cm^{-1} .

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (2-18)$$

Snaga zračenja, P , izražena u vatima, W, je energija snopa koja pada na jediničnu površinu u jedinici vremena, sekundi, s. Intenzitet zračenja, I , je snaga zračenja po jedinici prostornog kuta. Obje veličine su povezane s kvadratom amplitude, A (slika 2-27(b)).^[184]

2.3.1.2. Čestična svojstva zračenja: fotoni

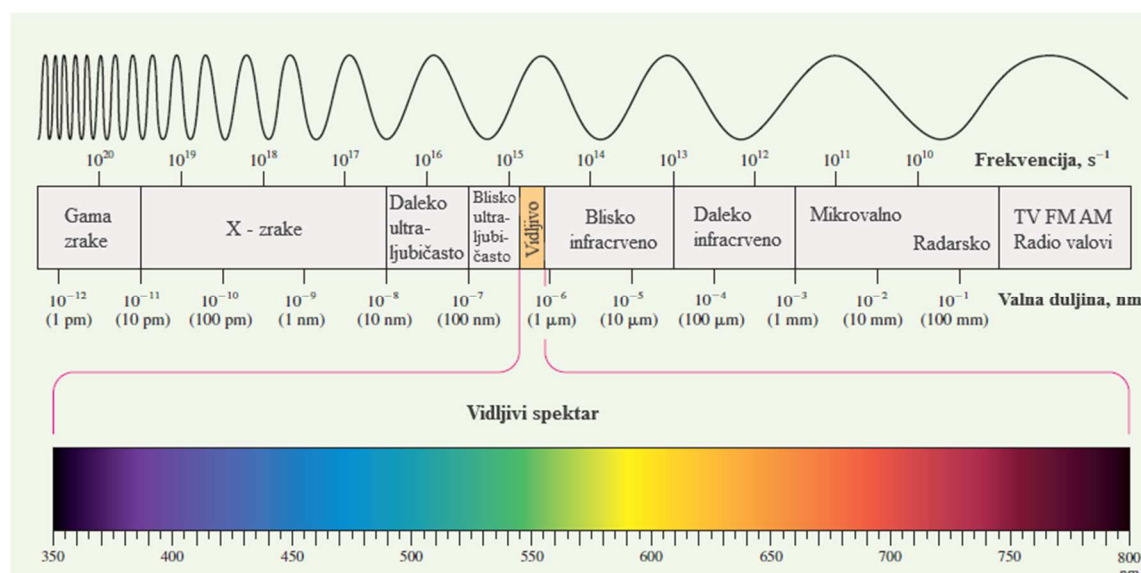
Kada tvar apsorbira elektromagnetsko zračenje, podliježe energijskim promjenama. Upravo zbog takvih međudjelovanja tvari i zračenja potrebno je naglasiti prirodu čestica svjetlosti kao snopa fotona ili kvanta. Energija fotona ovisi o frekvenciji zračenja, valnoj duljini i valnom broju, a prikazana je jednadžbom:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \bar{\nu}, \quad (2-19)$$

gdje je h Planckova konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$ J s), a c brzina svjetlosti (3×10^8 m s⁻¹ ili 3×10^{10} cm s⁻¹).

2.3.2. Elektromagnetski spektar

Elektromagnetski spektar obuhvaća elektromagnetsko zračenje širokog raspona energije (frekvencija), a tako i valnih duljina. Na slici je uočljivo kako vidljivi spektar zauzima jako mali dio spektra. Različite vrste zračenja, primjerice gama zrake ili radio valovi se razlikuju od vidljivog dijela spektra samo prema energiji (frekvenciji) fotona.^[184]



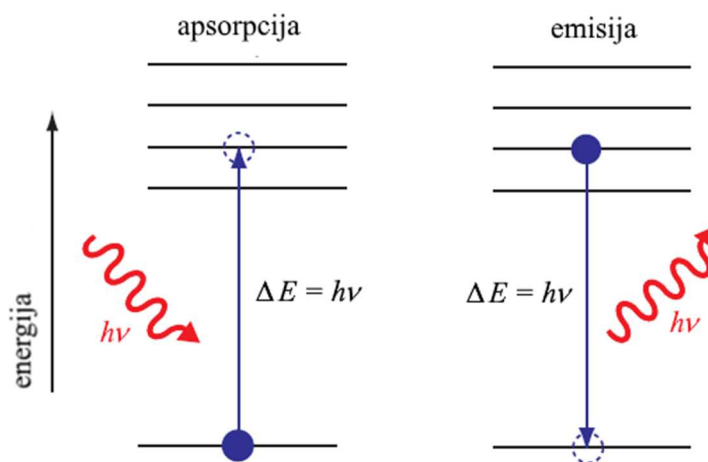
Slika 2-28 Elektromagnetski spektar se proteže od visokoenergijskih (frekvencija) gama zraka do niskoenergijskih (frekvencijskih) radio valova. Vidljivo područje, izdvojeno u donjem dijelu, proteže se od ljubičastog (≈ 380 nm) do crvenog područja (≈ 800 nm).

Spektrokemijske metode koje obuhvaćaju vidljivo (VIS) zračenje, ultraljubičasto (UV) i infracrveno (IR) zračenje nazivaju se optičkim metodama unatoč činjenici da ljudsko oko nije osjetljivo na UV ili IR zračenje.

2.3.2.1. Spektroskopska mjerenja

Praćenjem interakcije zračenja s tvarima moguće je dobiti informacije o uzorku. Analit u uzorku se može pobuditi djelovanjem toplinske energije, električne energije, svjetlosti, čestica ili kemijske reakcije. Prethodno pobuđivanju, tvar je u svom osnovnom stanju, odnosno stanju najniže energije. Pobuđivanjem se uzrokuje da pojedine vrste tvari prijeđu u pobuđeno stanje, stanje više energije. Tvar će prijeći u pobuđeno stanje ukoliko je energija kojom se pobuđuje jednaka razlici njenih energijskih nivoa. Mjerenjem elektromagnetskog zračenja emitiranog prilikom povratka u njihovo osnovno stanje ili mjerenjem količine apsorbiranog elektromagnetskog zračenja mogu se zabilježiti podatci o promatranoj tvari.

Na slici 2-29 su pobliže prikazani procesi koji se odvijaju prilikom emisije i/ili apsorpcije. Emisijska spektroskopija obuhvaća metode u kojima toplina ili električna energija pobude ostvaruje mogućnost mjerenja emitirane snage zračenja prilikom povratka tvari iz pobuđenog stanja u njeno osnovno stanje. Apsorpcijska spektroskopija omogućuje mjerenje količine apsorbiranog zračenja. Apsorpcijska mjerenja mogu osigurati i kvalitativnu i kvantitativnu informaciju o uzorku.^[184] U nastavku će biti naglasak na apsorpcijskoj spektroskopiji u ultraljubičastom i vidljivom području spektra.



Slika 2-29 Pojednostavljeni energijski dijagram prikazuje apsorpciju i emisiju atoma ili molekule u obliku fotona

2.3.3. Apsorpcija zračenja

Svaka molekulska vrsta ima sposobnost apsorpcije elektromagnetskog zračenja karakteristične frekvencije. Dva važna zahtjeva moraju biti zadovoljena kako bi analit apsorbirao elektromagnetsko zračenje. Prvi uvjet je postojanje mehanizma prema kojem električno i magnetsko polje zračenja ostvaruje međudjelovanje s analitom. U ultraljubičastom i vidljivom području zračenja, apsorpcija fotona utječe na promjenu energije valentnih elektrona analita. Vibracijska energija veze je pod utjecajem apsorpcije infracrvenog zračenja. Drugi uvjet je da energija fotona, $h\nu$, mora biti jednaka razlici energije, ΔE , između dva kvantna stanja analita.^[183]

Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta, prisutna u propusnoj sredini, selektivno smanjuje intenzitet elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica ima jedinstven skup i raspored energijskih stanja, gdje je osnovno stanje najniže. Kada je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice nastaje apsorpcija fotona. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko, pobuđeno stanje. Pobuđivanje vrste M u ekscitiranu vrstu M^* može se opisati jednačom (2-20).



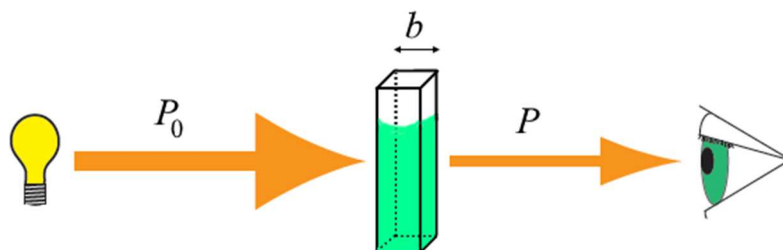
Pobuđena vrsta se nakon kratkog vremena ($10^{-6} - 10^{-9}$ s) vraća, relaksira do svojeg prethodnog ili osnovnog stanja. Suvišak energije se prenosi drugim atomima ili molekulama u istoj okolini. Taj proces uzrokuje malo povišenje temperature okoliša i može se izraziti jednačom:



Koncentracija pobuđenih čestica se može smatrati zanemarivom budući da je vijek trajanja ekscitirane vrste M^* jako kratak. Količina toplinske energije koja se otpusti tijekom relaksacije također je jako mala da se ne može niti detektirati. Upravo se apsorpcijskim mjerenjima najmanje moguće remeti energija proučavanog sustava.

Apsorpcijske značajke pojedine vrste opisuju se grafičkim prikazom neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, valnog broja ili frekvencije koja se naziva apsorpcijskim spektrom. Kod takvih prikaza vertikalna os može biti apsorbancija ili propusnost (transmitancija) izražena u postocima.^[184]

Kada svjetlost prolazi kroz uzorak njegova se snaga zračenja smanjuje. Razlog tome je apsorpcija svjetlosti od strane uzorka, odnosno apsorbirajuće vrste.



Slika 2-30 Proces apsorpcije kao posljedica prigušenja snopa zračenja

Snaga zračenja (P) je energija zračenja koja u jednoj sekundi pada na površinu detektora od 1 cm^2 . Snop svjetlosti, snage zračenja P_0 , prolazi kroz sloj otopine, debljine b u cm i koncentracije c , vrste koja apsorbira što za posljedicu ima smanjenje snage snopa s P_0 na P .

Transmitancija T ili propusnost je udio upadnog zračenja koji je prošao kroz medij na koji pada zračenje:

$$T = \frac{P}{P_0}, \quad (2-22)$$

gdje je P_0 ulazna snaga snopa svjetlosti, a P je snaga snopa nakon apsorpcije.

Apsorbancija A je logaritam omjera snage upadnog zračenja P_0 i propušenog zračenja P kroz uzorak. Apsorbancija otopine se, za razliku od transmitacije, povećava s prigušenjem osnovnog snopa.

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P} \quad (2-23)$$

Transmitancija i apsorbancija prema jednadžbama (2-22) i (2-23) se ne mogu mjeriti u laboratoriju, jer uzorak kojem se određuje apsorbancija mora biti smješten u posudicu. Gubitak uzrokuje međudjelovanje zračenja i stijenki posudice refleksijom i apsorpcijom, kao i nehomogenost otapala te raspršenje na velikim molekulama. Zbog navedenog se uspoređuju snage snopa zračenja koji je propušten kroz mjernu posudicu punjenu otopinom sa snagom snopa koji prolazi istu posudu punjenu samo otapalom. Sljedeća jednadžba prikazuje eksperimentalnu apsorbanciju:

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P}. \quad (2-24)$$

2.3.3.1. Beerov zakon

Beerov zakon pokazuje ovisnost između veličine mjerene apsorpcijskom metodom, A i veličine koja se određuje, koncentracije, c .

Beerov zakon može se prikazati sljedećom jednažbom:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c, \quad (2-25)$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti koja se naziva apsorptivnost, b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c koncentracija apsorbirajuće vrste.

Budući da je apsorbancija bezdimenzijska veličina, mjerna jedinica za apsorptivnost se određuje iz jednažbe (2-25). Ako je koncentracija izražena u mol L^{-1} , a duljina puta zračenja u cm , konstanta proporcionalnosti je izražena u $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ te se naziva molarna apsorbivnost, ε . Jednažba (2-25) tada poprima oblik:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2-26)$$

Molarna apsorptivnost, ε iskazuje broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbancija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 1 cm . Apsorbancija jednaka jedinici postiže se kada je 90 % upadnog zračenja apsorbirano (2-27).

$$A = \log \frac{P_0}{P} = 1 = \log 10 = \log \frac{100}{10} \quad (2-27)$$

Za razliku od molarne apsorptivnosti, Sandellova osjetljivost, (*Sandell's sensitivity*, S predstavlja količinu tvari, izraženu u miligramima, koja je nužna za postizanje apsorbancije od 0,001. Apsorbancija jednaka 0,001 postiže se kada je apsorbirano 0,23 % upadnog zračenja.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = 0,001 = \log 1,0023 = \log \frac{100}{99,77} \quad (2-28)$$

Sandellova osjetljivost se računa koristeći sljedeći izraz:

$$S = \frac{10^{-3}}{a}, \quad (2-29)$$

izražena u $\mu\text{g cm}^{-2}$ kada je apsorptivnost a izražena u jedinicama $\text{L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^[185]

Beerov zakon se može primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta. Ukupna apsorbancija višekomponentnog sustava je zbroj pojedinačnih apsorbancija komponenata pri istoj valnoj duljini.

$$A_{\text{uk}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n, \quad (2-30)$$

gdje indeks n označuje komponente $1, 2, \dots, n$ koje apsorbiraju.

Ograničenja Beerovog zakona

Beerov zakon vrijedi samo za niske koncentracije analita. Dva su doprinosa ovakvom temeljnom ograničenju Beerovog zakona. Kod viših koncentracija pojedinačne čestice analita se više ne ponašaju međusobno neovisno. Rezultirajuća interakcija između čestica analita može promijeniti apsorptivnost analita. Drugi doprinos ograničenju je ovisnost apsorptivosti analita o indeksu refrakcije uzorka. Budući da se indeks refrakcije mijenja kako se mijenja i koncentracija analita, vrijednosti a odnosno ε se također mogu mijenjati. Za dovoljno niske koncentracije analita, indeks loma je u suštini konstantan i krivulja umjeravanja je linearna.^[183]

Beerov zakon vrijedi za monokromatska zračenja u razrijeđenim otopinama $\{c < 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ te predstavlja granični zakon. Kad su koncentracije vrste od interesa veće od $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, smanjuju se udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. To za posljedicu ima odstupanje od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji.

Ako se u razrijeđenim otopinama tvari koja apsorbira nalaze visoke koncentracije drugih vrsta, pojavljuje se sličan učinak, jer blizina stranih iona i tvari koje apsorbiraju mijenja molarnu apsorptivnost ove druge što uzrokuje odstupanje od Beerovog zakona.

Kemijska odstupanja od Beerova zakona posljedica su asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorbira s otapalom. Posljedica kemijskih odstupanja je nastanak produkata apsorpcijskih značajki različitih od značajki analita.

2.3.4. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

Molekulska apsorpcijska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju primjenjuje se za kvantitativnu analizu, te je najčešće korištena instrumentna tehnika u kemijskim laboratorijima.

Ultraljubičasto i vidljivo zračenje pobuđuju elektrone koji prebivaju u molekulskoj orbitali niske energije u orbitalu više energije. Prijelaz elektrona između dviju orbitala je elektronski prijelaz, dok je apsorpcijski proces elektronska apsorpcija.

Za apsorpciju zračenja u organskim molekulama u području valnih duljina od 180 do 780 nm (UV/VIS) odgovorna su međudjelovanja između fotona i dvije vrste elektrona: elektrona koji izravno sudjeluju u stvaranju veze ili elektrona koji su lokalizirani oko atoma kao što su kisik, sumpor, dušik i halogeni elementi.

Valna duljina apsorpcije organske molekule ovisi o tome koliko su čvrsto njegovi elektroni vezani. Zajednički elektronski parovi koji formiraju jednostruke kovalentne veze (ugljik-ugljik ili ugljik-vodik) su čvrsto povezani i njihovo pobuđivanje zahtijeva odgovarajuće energije koje odgovaraju valnim duljinama u vakuumskom ultraljubičastom području (<180 nm). Spektri jednostrukih kovalentnih veza nisu analitički iskoristivi zbog eksperimentalnih poteškoća pri radu u tom području. Razlog tome je što kvarc i pojedine komponente atmosfere apsorbiraju zračenje ispod 180 nm. Međutim organski spojevi čiji elektroni formiraju dvostruke i trostruke kovalentne veze nisu tako čvrsto povezani te ih je lakše pobuditi elektromagnetskim zračenjem. Dakle, vrste s nezasićenim vezama općenito pokazuju uporabljive apsorpcijske vrpce. Nezasićene organske funkcionalne skupine koje apsorbiraju u ultraljubičastom ili vidljivom području su kromofori.

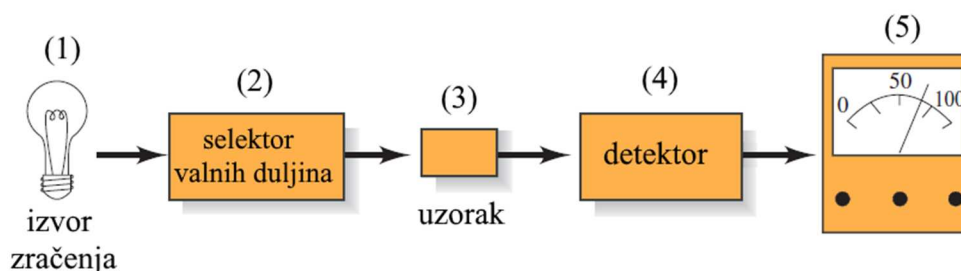
Zasićeni organski spojevi koji sadrže heteroatome kao što su kisik, dušik, sumpor ili halogeni elementi, imaju nevezne elektrone koji mogu biti pobuđeni zračenjem u rasponu valnih duljina od 170 do 250 nm.

Anorganski spojevi apsorbiraju široko područje vidljivog zračenja u barem jednom oksidacijskom stanju te su stoga ti spojevi obojeni. Apsorpcija nastaje kada elektroni prelaze između popunjenih i nepopunjenih *d*-orbitala s energijama koje ovise o vezanim ligandima za ione metala. Energijske razlike između *d*-orbitala (time i položaja odgovarajućih apsorpcijskih maksimuma) ovise o položaju elementa u periodnom sustavu, njegovom oksidacijskom stupnju i prirodi koordinacijski vezanog liganda.

2.3.4.1. Molekulski spektrofotometri

Većina je spektrofotometrijskih uređaja sastavljena od pet osnovnih dijelova:

1. stabilnog izvora zračenja;
2. selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja;
3. jednog ili više spremnika za uzorke;
4. detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal;
5. procesora signala i uređaja za njegovo očitavanje.^[184]



Slika 2-31 Dijelovi instrumenta za apsorpcijska mjerenja^[184]

Izvor zračenja mora biti stabilnog i snažnog zračenja koji omogućuje jednostavnu detekciju i mjerenje. Žarulja s volframovom ili halogenom niti je izvrstan izvor za područje valnih duljina od 350 do 2500 nm, dok vodikova ili deuterijeva žarulja emitira zračenje u području valnih duljina od 160 do 400 nm.

Selektor valnih duljina osigurava izdvajanje određenog valnog područja, budući da ne može osigurati izdvajanje zračenja samo jedne valne duljine. Točnije, selektor izdvaja skupinu susjednih valnih duljina koja se naziva vrpca. Te valne duljine su simetrično raspoređene oko nazivne valne duljine. Širina vrpce selektora je širina vrpce koja odgovara širini maksimuma u polovici njegove visine, a izražava se u jedinicama valne duljine. Selektori za proizvodnju uskih vrpca zračenja su monokromatori i filtri. Monokromatori mogu kontinuirano mijenjati izlazne valne duljine u relativno širokom spektralnom području, a filtri apsorbiraju sve valne duljine kontinuiranog izvora, osim jedne ograničene vrpce.

Spremnik za uzorke (čelije ili kivete) moraju imati stijenke izrađene od materijala propusnog u određenom području spektra. Kvarc se upotrebljava za rad u ultraljubičastom području (<350 nm), a može se primijeniti preko vidljivog sve do 3000 nm u infracrvenom području. Silikatno staklo se primjenjuje u području između 375 i 2000 nm.

Plastične posudice se također mogu primijeniti u vidljivom dijelu spektra. Najčešći optički put (širina kivete) za rad u ultraljubičastom i vidljivom području iznosi 1 cm.

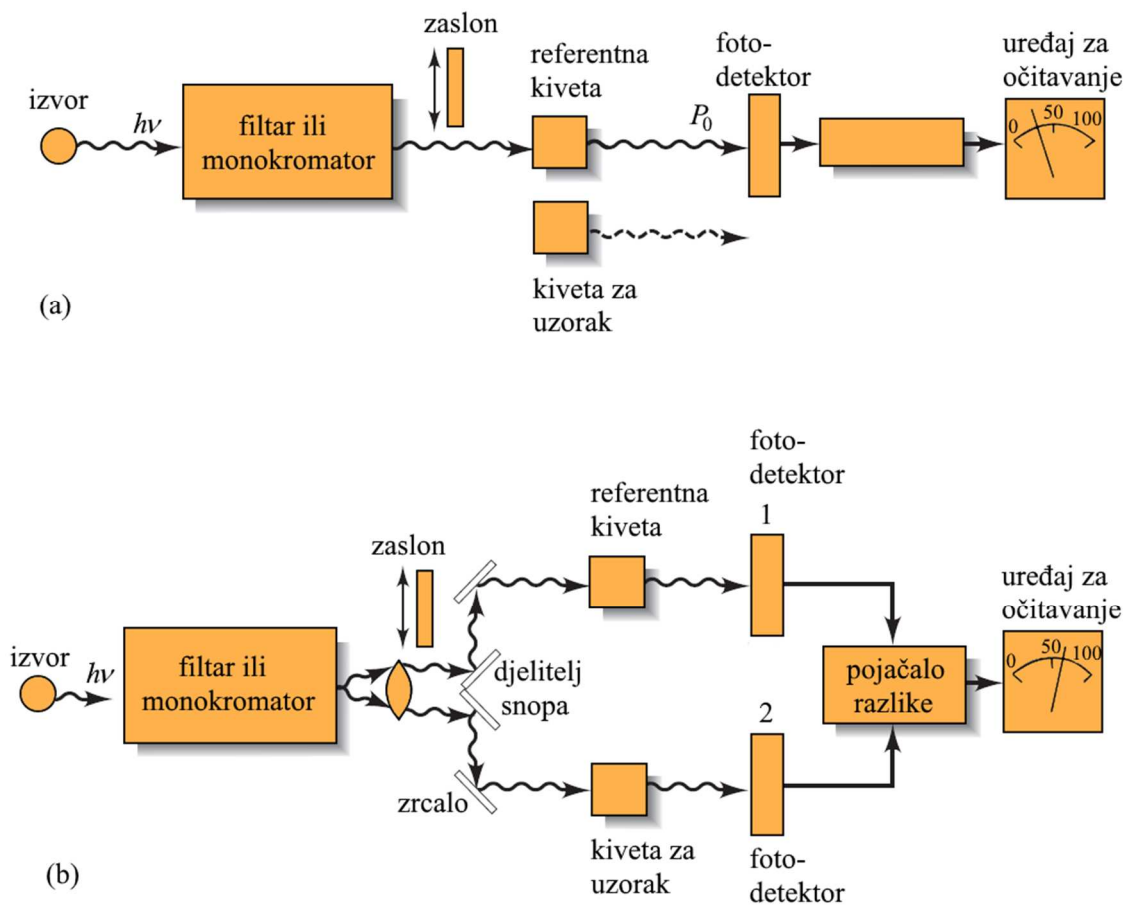
Detektor je uređaj koji pokazuje postojanje neke fizikalne promjene. Kada u njega udare fotoni, detektor proizvede električni signal, a odgovor detektora je funkcija valne duljine upadnog zračenja.

Procesor signala je uređaj koji pojačava električni signal iz detektora. Takav uređaj može mijenjati signal iz istosmjernog u izmjeničan i obrnuto, filtrirati ga zbog uklanjanja neželjenih komponenata. Procesor može izvoditi i matematičke operacije diferenciranja, logaritmiranja ili integriranja signala.

Spektrometar je spektroskopski uređaj koji pomoću monokromatora ili polikromatora zajedno sa pretvornikom pretvara intenzitet zračenja u električni signal. Spektrofotometar je spektrometar koji omogućuju mjerenje omjera snage zračenja dvaju snopova uz uvjet mogućnosti mjerenja apsorbancije. Spektrofotometri pružaju značajnu prednost iz razloga što se valna duljina može kontinuirano mijenjati, što omogućuje snimanje apsorpcijskih spektara. Jednostavnost, robusnost i niski troškovi su dodatne prednosti uređanja za spektrofotometrijska mjerenja. Većina spektrofotometara najčešće osigurava mjerenje u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra te ponekad u bliskom infracrvenom području. Izvedba spektrofotometra kao instrumenta obuhvaća dvije skupine: jednosnopni i dvosnopni spektrofotometri (slika 2-32).

Jednosnopni instrumenti su mnogo jednostavniji, ali nemaju široku primjenu, jer je potrebno kivetu s uzorkom i kivetu s referentnom otopinom naizmjenice umetati u snop zračenja. Nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorbancija kao funkcija proteklog vremena.

Kod složenijih, dvosnopnih instrumenata dva snopa nastaju u prostoru pomoću zrcala oblika slova V, koje se naziva djeliteljem snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, dok drugi istodobno prolazi kroz uzorak prema drugome fotodetektoru. Dva izlazna signala se pojačavaju. Elektronički se određuje njihov omjer ili logaritam njihovog omjera koji se potom prikazuje na uređaju za očitavanje.^[184]



Slika 2-32 Shematski prikaz instrumentacije (a) jednosnopnog i (b) dvosnopnog spektrofotometra^[182]

2.4. Protokoli koje propisuje Farmakopeja za određivanje tiolnih spojeva

2.4.1. Titracije temeljene na oksidacijsko-redukcijskim ravnotežama, redoks titracije

Redoks titracije se temelje na redoks reakciji između analita i titranta, a napredovanje reakcije se može pratiti potenciometrijski. Analit koji ima redukcijska svojstva određuje se titracijom standardnim otopinama oksidirajućih tvari primjerice standardnom otopinom joda. Suprotno tome, određivanje oksidirajućih tvari se temelji na određivanju pomoću standardne otopine titranta koji je redukcijsko sredstvo, primjerice natrijeva tiosulfata.

2.4.1.1. Redoks-titracije standardnom otopinom joda

Izravna titracijska metoda određivanja analita redukcijskih svojstava provodi se standardnom otopinom joda. Oksidacijsko djelovanje joda se temelji na reakciji redukcije joda (trijodida) u jodid.



Jod, I_3^- je slabo oksidacijsko sredstvo te se s njim može odrediti samo određen broj reducirajućih tvari. Odnosno, može se koristiti za određivanje analita koji imaju standardni redukcijski potencijal niži od 0,535 V. Ipak ovaj nedostatak relativno niskog standardnog redukcijskog potencijala, ujedno je i prednost, jer jod na ovaj način može djelovati selektivno.

Budući da je jod slabo topljiv u vodi, topljivost mu se može povećati ukoliko se otopini doda jodid, zbog reakcije formiranja kompleksa.



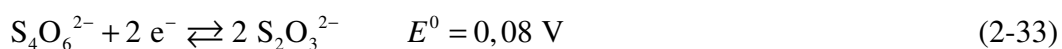
Završnu točku titracije standardnom otopinom joda moguće je odrediti upotrebom škroba kao indikatora. Kada je jod titrant, škrob se može dodati na početku titracije. Zbog amiloze, aktivne komponente škroba u otopini, prva kap titranta u suvišku će u završnoj točki titracije obojiti bezbojnu otopinu modrom bojom (pojava I_3^-). Modra boja je posljedica formiranog produkta između amiloze iz škroba i joda, I_2 . Intenzitet modre boje, odnosno reakcija između amiloze i joda, ovisi o temperaturi reakcijske otopine te se preporučuje niža temperatura. Budući da je škrob biorazgradiv, otopina škroba mora biti svježije pripravljena.^[186]

U slučaju kada jod nije titrant već se određuje titracijski kao analit oksidans, trijodidni ion je prisutan tijekom cijele titracije, dok se potpuno ne reducira u jodid. Kako bi se odredila završna točka titracije, škrob se smije dodati u otopinu neposredno prije točke ekvivalencije. U završnoj točki titracije će se intenzivna modra boja otopine obezbojiti (nestanak I_3^-). Ukoliko se škrob doda ranije, jod će se trajno vezati za amilozu iz škroba te će modra boja zaostati i nakon što je dostignuta točka ekvivalencije. Tada indiciranje završne točke titracije neće biti moguće.^[186]

Redoks titracija sa standardnom otopinom joda će se primijeniti u ovom radu kao standardna metoda za određivanje NAC-a i MPG-a prema Britanskoj farmakopeji.^[187]

2.4.1.2. Redoks-titracije standardnom otopinom natrijeva tiosulfata

Neizravna titracijska metoda određivanja oksidirajućih tvari provodi se pomoću otopina reagensa koji imaju redukcijska svojstva. Izravne titracije su rijetke budući da su standardne otopine reducensa podložne oksidaciji s kisikom iz zraka. Natrijev tiosulfat ($Na_2S_2O_3$) je primjer standardne otopine reducensa koja ne reagira s kisikom iz zraka i upotrebljava se u jodimetriji.^[188]



Slaba oksidacijska sredstva u neutralnoj ili kiseloj sredini oksidiraju tiosulfat, $S_2O_3^{2-}$ u tetratonat, $S_4O_6^{2-}$. Iz tog razloga se koristi otopina joda i jodida. Otopini uzorka (oksidacijskog sredstva) doda se suvišak jodida (primjerice kalijeva jodida, KI). Oksidans reagira s jodidom pri čemu nastaje ekvivalentna količina joda, a zatim se nastali jod titrira standardnom otopinom natrijevog tiosulfata prema reakciji (2-34).



Indikator kod redoks titracija standardnom otopinom natrijeva tiosulfata je također škrob. Prijelaz boje otopine je iz plave u bezbojnu budući da jod nestaje kada je reakcija završena. Škrob je potrebno dodati pri kraju titracije kada početna boja joda izblijedi i ostane samo svijetlo-žuta boja.^[186]

U ovom radu primijenit će se redoks titracija sa standardnom otopinom natrijeva tiosulfata kao standardna metoda za određivanje GSH prema protokolu koji propisuje Britanska farmakopeja.^[189]

2.4.2. Titracije temeljene na kiselo-baznim reakcijama u nevodenom mediju

Veliki broj organskih ili anorganskih spojeva su kiseline ili baze. Njihovo je određivanje moguće korištenjem standardne otopine jake baze ili jake kiseline kao titranta. U slučaju kada postoje ograničenja korištenja vodenog medija kod kiselo-baznih titracija, u analitičkom laboratoriju se primjenjuju kiselo-bazne titracije u nevodenom mediju.

Ukoliko su konstante slabih kiselina i slabih baza jako male ($<10^{-9}$) ili ako je umnožak koncentracije i konstante mali broj, takve se slabe kiseline i slabe baze ne mogu odrediti titracijom, jer u području točke ekvivalencije nije uočljiva promjena pH-vrijednosti. Zbog toga ih se prethodno titraciji treba prevesti u njihove soli ili provesti titraciju u nevodenom mediju. Kod titracija u nevodenom otapalu jakost organskih kiselina ili baza je povećana pa je i njihovo određivanje moguće.

Nadalje, voda je za jake kiseline izjednačujuće otapalo. Stoga se jake kiseline u vodi ne mogu odrediti u smjesi. Kiseline koje su jake u vodenom mediju, uporabom odgovarajućeg nevodenog medija, postaju slabe sa različitim konstantama. Ukoliko je razlika u konstantama veća od 10^4 moguće je njihovo pojedinačno određivanje u smjesi.^[190]

Naposlijetku, kod nekih kiselo-baznih titracija, reaktanti i(ili) produkti su netopljivi u vodi, pa je potrebno koristiti druga otapala.^[190] Iz navedenih razloga se vodeni medij zamjenjuje s prikladnim organskim ili anorganskim otapalom.

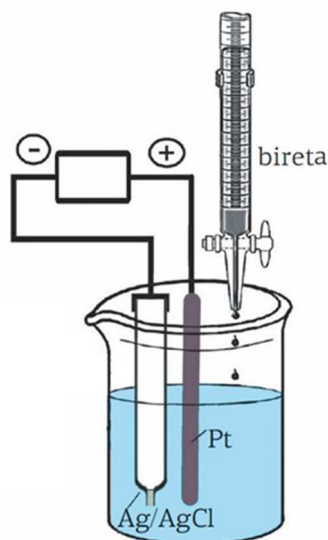
2.4.2.1. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju razlike potencijala između dviju elektroda elektrokemijskog članka, a ta razlika je analitički signal.

Elektrokemijski članak se sastoji od dvije elektrode (polučlanka): referentne i indikatorske elektrode. Referentna elektroda je elektroda čiji je potencijal, E_{RE} , neovisan o aktivitetu (koncentraciji) analita ili o nekoj drugoj ionskoj vrsti u ispitivanoj otopini. Indikatorska elektroda je elektroda uronjena u otopinu analita čiji potencijal, E_{IE} , ovisi o aktivitetu (koncentraciji) analita.

Potencijal članka mjeri se eksperimentalno, s ciljem određivanja koncentracije analita u otopini. Potencijal članka dan je jednadžbom:

$$E_C = E_{IE} - E_{RE}, \quad (2-35)$$



Slika 2-33 Mjerni sklop za potenciometrijsko praćenje napredovanja redoks titracije, uz uporabu komercijalne izvedbe Ag/AgCl elektrode (korištena ilustracija uz dopuštenje autora)^[191]

Potenciometrijske metode se primjenjuju za određivanje koncentracija iona izravnim mjerenjem potencijala indikatorskih elektroda ili za određivanje završne točke kod titracija.^[192]

2.4.2.1.1. Izravna potenciometrija

Izravna potenciometrijska mjerenja su brz i pogodan način određivanja aktiviteta brojnih kationa i aniona. Izravna potenciometrija temelji se na linearnom odnosu između potencijala indikatorske elektrode i logaritma aktiviteta mjerenog iona ili omjera aktiviteta elektroaktivnih iona prisutnih u otopini. Nernstov izraz opisuje linearan odnos između potencijala i aktiviteta:

$$E_{\text{IE}} = E^0 - \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{n \cdot F} \log \frac{a(A_{\text{red}})}{a(A_{\text{oks}})}, \quad (2-36)$$

gdje je: E_{IE} = elektrodni potencijal redoks-para izražen u V;

E^0 = standardni elektrodni potencijal redoks-para izražen u V;

R = plinska konstanta koja iznosi: $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

T = temperatura izražena u K;

F = Faradayeva konstanta koja iznosi: $9,648670 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$;

n = broj elektrona koji sudjeluje u polureakciji;

$a(A_{\text{red}})$ = aktivitet reduciranog oblika redoks-para;

$a(A_{\text{oks}})$ = aktivitet oksidiranog oblika redoks-para.

2.4.2.1.2. Potenciometrijska titracija

Za određivanje viših koncentracija iona u otopinama nije prikladno izravno potenciometrijsko mjerenje. Potencijal indikatorske elektrode s Nernstovim odzivom, logaritamska je funkcija koncentracije iona u otopini. Kod viših koncentracija veća je točnost određivanja primjenom potenciometrijske titracije nego primjenom izravne potenciometrije. Kod nižih koncentracija analita potenciometrijska titracija nije primjenjiva. Stoga se rezultati dobiveni potenciometrijskom titracijom razlikuju se od onih dobivenih izravnim potenciometrijskim mjerenjem.^[192]

Potenciometrijska titracija se temelji na mjerenju potencijala odgovarajuće indikatorske elektrode, odnosno elektrokemijskog članka, indikatorska-referentna elektroda, kao funkcije volumena dodanog titranta. Potenciometrijsko određivanje točke ekvivalencije pogodno je za kiselo-bazne reakcije, reakcije formiranja kompleksa, redoks-reakcije i reakcije nastajanja slabo topljivog taloga, kao i za titracije u vodenim i nevodnim otapalima.

Mjerenje promjene potencijala indikatorske elektrode (odnosno elektrokemijskog članka) tijekom titracije, kao funkcije volumena titranta, služi za utvrđivanje završne točke titracije.

Tijek titracije prati se mjerenjem promjene potencijala indikatorske elektrode. Indikatorska elektroda može biti osjetljiva za analit, titrant ili produkt reakcije, a odziv elektrode mora slijediti promjenu koncentracije razmatrane ionske vrste bez većeg vremenskog zaostatka. Izbor otapala i temperatura mogu utjecati na brzinu kemijske reakcije i na stupanj njene potpunosti. Neposredno u blizini točke ekvivalencije dolazi do nagle promjene potencijala indikatorske elektrode. Takva promjena potencijala slijedi iz Nernstove jednadžbe. Relativna promjena koncentracije najveća je u samoj točki ekvivalencije, te je stoga nagla promjena potencijala indikatorske elektrode. Na oblik i visinu skoka potencijala na potenciometrijskoj S-krivulji utječu svojstva kemijske reakcije na kojoj se temelji potenciometrijska titracija. Skok je, kod reakcija nastajanja kompleksa, viši što je stabilnost nastalog kompleksa veća, a primjerice kod taložnih reakcija što je produkt topljivosti manji. Što je manja koncentracija analita, manji je i skok potencijala. Utvrđivanjem završne točke titracije, iz koncentracije titranta i volumena u završnoj točki titracije moguće je izračunati koncentraciju analita u ispitivanom uzorku.

Točnije vrijednosti volumena titranta u završnoj točki titracije mogu se odrediti matematičkim računskim metodama prve i druge derivacije. Računanjem promjene potencijala po jedinici volumena titranta (dE / dV), prva derivacija pokazuje maksimum u završnoj točki potenciometrijske titracije. Tada je nagib titracijske krivulje najveći u točki infleksije. Metodom druge derivacije (d^2E / d^2V) može se još točnije odrediti završna točka titracije, u kojoj dolazi do promjene predznaka, a tada će druga derivacija imati vrijednost 0.^[192]

Za određivanje PEN u ovom radu primjenjena je potenciometrijska titracija kao standardna metoda prema protokolu Britanske farmakopeje. S ciljem točnijeg određivanja završne točke potenciometrijske titracije korištene su računske metode prve i druge derivacije.^[193]

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljene su od kemikalija stupnja čistoće analitičkog reagensa. Kao otapalo korištena je deionizirana voda (Milli-Q) ukoliko nije drugačije navedeno. Deionizirana voda je pripravljana korištenjem uređaja Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska) kroz slijedeće postupke: reverznu osmozu, filtraciju kroz aktivni ugljen (zbog uklanjanja organskih nečistoća), deionizaciju kroz kationski i anionski izmjenjivač te filtraciju kroz membranski filter s porama 0,22 μm (zbog uklanjanja mikroorganizama).

3.1.1. Standardne otopine tiolnih spojeva

Standardne otopine tiolnih spojeva (RSH) $\{c(\text{RSH}) = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljane su otapanjem odgovarajućih količina tiolnih spojeva: 0,1632 g *N*-acetil-L-cisteina (NAC, Merck, Damstadt, Njemačka, $M = 163,20 \text{ g mol}^{-1}$); 0,1212 g cisteina (CYS, Merck, Damstadt, Njemačka, $M = 121,20 \text{ g mol}^{-1}$); 0,1492 g penicilamina (PEN, Fluka Chemika, Buch, Switzerland, $M = 149,20 \text{ g mol}^{-1}$); 0,1632 g tiopronina (MPG, Sigma, St. Louis, Missouri, USA, $M = 163,20 \text{ g mol}^{-1}$); 0,3073 g glutationa (GSH, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, $M = 307,30 \text{ g mol}^{-1}$) u acetatno-boratno-fosfatnom puferu, pH = 3, do oznake 100 mL na odmjerne tikvici. Pripravljane otopine su pohranjene u tamnom prostoru pri temperaturi od 4 °C, čime je osigurana stabilnost otopina najmanje 30 dana. Radne otopine dnevno su pripravljane odgovarajućim razrjeđivanjem standardnih otopina deioniziranom vodom.

3.1.2. Otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa

Preliminarna priprava otopine kompleksa započeta je pripravom pojedinačnih otopina bakra(II) (bakrov(II)sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) i neokuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, Nc). Otapanjem 0,0250 g bakrovog(II)sulfat pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, Kemika, Zagreb, $M = 249,68 \text{ g mol}^{-1}$) u deioniziranoj vodi ukupnog volumena 100 mL pripravljena je otopina bakra(II) $\{c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$. Zbog slabe topljivosti neokuproina u vodi, pripravljena je niža koncentracija $\{c(\text{Nc}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$ otapanjem 0,0208 g neokuproin hidrata ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, $M = 208,26 \text{ g mol}^{-1}$) u odmjerne tikvici od 100 mL u približno 90 mL deionizirane vode. Zatvorena tikvica je

držana u ultrazvučnoj kupelji kroz 30 minuta, kako bi se pospješila topljivost neokuproina, nakon čega je dopunjena deioniziranom vodom do oznake 100 mL.

Povećanje topljivosti neokuproina u vodi postiže se miješanjem neokuproina s otopinom bakra(II) pri čemu nastaje bis neokuproin bakrov(II) kompleks $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}$ topljiv u vodi.^[194] Standardna otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa $\{c(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljana je iz bakrovog(II)sulfat pentahidrata $(\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, Kemika, Zagreb, $M = 249,68 \text{ g mol}^{-1}$) i neokuproin hidrata $(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, $M = 208,26 \text{ g mol}^{-1}$) u deioniziranoj vodi. 0,0250 g bakrovog(II) sulfat-pentahidrata i 0,0500 g neokuproina se otopi u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena 100 mL u odmjernoj tikvici. Tako pripremljena otopina ima odgovarajući omjer iona metala, Cu^{2+} i liganda, Nc ($\text{Cu}^{2+} : \text{Nc} = 1 : 2,4$) koji je određen u optimizacijskom dijelu eksperimenta. Topljivost kompleksa se povećava primjenom ultrazvučne kupelji kroz 15 minuta. Tako pripremljena otopina kompleksa stabilna je najmanje 30 dana pri 4°C .^[194]

3.1.3. Priprava acetatno-boratno-fosfatnog pufera

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera $\{c = 4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$, pripremljena je otapanjem i miješanjem 4,95 g borne kiseline (H_3BO_3 , Alkaloid, Skopje, Makedonija; $M = 61,83 \text{ g mol}^{-1}$), 5,92 g octene kiseline (CH_3COOH , glacijalna, VWR Chemicals, Francuska; $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$) i 7,84 g fosforne kiseline (H_3PO_4 , Kemika, Zagreb; $M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$) u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 2,0 L. Pripremljena otopina pufera približno ima vrijednost $\text{pH} = 2$. Željena pH -vrijednost ($\text{pH} = 3$) podešavana je dodatkom otopine natrijevog hidroksida, NaOH $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ uz kontrolu pH -vrijednosti pH -metrom.

3.1.4. Otopina natrijevog hidroksida

Otopina natrijevog hidroksida, NaOH $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ pripremljena je otapanjem 8,00 g natrijeva hidroksida (NaOH , Sv. Nedjelja, Hrvatska; $M = 40,0 \text{ g mol}^{-1}$) u 100 mL deionizirane vode.

3.1.5. Otopine realnih uzoraka (Fluimukan, Metalcaptase, Captimer, L-glutathione)

Realni uzorci NAC-a su ispitivani u trima različitim formulacijama farmaceutskog pripravka FLUIMUKAN® – u obliku granula za pripravu sirupa, granula za oralnu otopinu i šumećih tableta.

Prema deklaraciji navedenoj na ambalaži FLUIMUKAN® AKUT JUNIOR granula za otopinu (Sandoz, Zagreb, Hrvatska), pakiranje sadrži ukupno 30 g granula od kojih se pripravlja 75 mL sirupa. Navedeno je da se u 5 mL pripremljene otopine nalazi 100 mg NAC-a. Temeljem navedenih podataka izračunano je da se u 2 g granula nalazi 100 mg NAC-a. Realni uzorak pripravljen je otapanjem 2 g granula u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 3), a zatim je do konačnog volumena od 500 mL odmjerna tikvica nadopunjena deioniziranom vodom.

Prema deklaraciji FLUIMUKAN® 100 mg granula za otopinu (Lek Zagreb, Zagreb, Hrvatska), svaka vrećica sadrži 5 g granula što odgovara 100 mg NAC-a. Realni uzorak pripravljen je otapanjem sadržaja jedne vrećice, odnosno 5 g granula, u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 3). Otopina je potom razrijeđena deioniziranom vodom do 500 mL u odmjernoj tikvici.

Šumeće tablete FLUIMUKAN® 200 mg i 600 mg (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska) deklarirano sadrže 200 mg, odnosno 600 mg NAC-a po jednoj šumećoj tableti. Realni uzorak je pripravljen otapanjem jedne šumeće tablete u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 3) nakon čega je otopina dopunjena deioniziranom vodom do 500 mL u odmjernoj tikvici.



Slika 3-1 Farmaceutski pripravci FLUIMUKAN®: granule za otopinu (100 mg NAC), JUNIOR granule za otopinu (5 mL = 100 mg NAC), šumeće tablete AKUT (200 i 600 mg NAC)

Farmaceutski pripravak s tvorničkim nazivom Metalcaptase® (Heyl Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Njemačka), sadrži penicilamin kao aktivnu tvar deklariranog sadržaja 300 mg penicilamina. Otopina realnog uzorka je pripravljena

otapanjem tablete u 100 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera ($\text{pH} = 3$). Suspenzija je filtrirana kroz filter papir te je filtrat razrijeđen deioniziranom vodom do oznake na odmjernoj tikvici na konačan volumen od 500 mL.

Prema deklaraciji ambalaže farmaceutskog pripravka Captimer[®], svaka tableta sadrži 100 mg tiopronina. Otopina realnog uzorka pripremljena je otapanjem jedne tablete ($m = 0,4860 \text{ g}$) u 100 mL acetatno-fosfatno-borato-fosfatnog pufera ($\text{pH} = 3$), a zatim u deioniziranoj vodi koja se dodaje do oznake u odmjernoj tikvici od 500 mL.

Za pripravu otopine realnog uzorka glutathiona korištene su kapsule L-gluthione[®] (Solaray, Park City, Utah, SAD). Prosječna masa sadržaja jedne kapsule iznosi 0,3079 g, a deklarirani sadržaj glutathiona iznosi 50 mg. Otopina je pripremljena otapanjem sadržaja 1 kapsule u 100 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera ($\text{pH} = 3$) nakon čega je dopunjena deioniziranom vodom do 500 mL u odmjernoj tikvici.



Slika 3-2 Farmaceutski pripravci: Metalcaptase[®] tablete (300 mg PEN), Captimer[®] tablete (100 mg MPG), L-gluthione[®] kapsule (50 mg GSH)

Razrijeđene otopine realnih uzoraka su pripravljanje u deioniziranoj vodi neposredno prije samog određivanja. Pripravljanje otopine nisu stabilne, te su se morale analizirati unutar 24 sata.

3.1.6. Otopine za određivanje tiolnih spojeva prema metodama koje propisuje

Farmakopeja [Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, 2007]

3.1.6.1. Otopina perklorne kiseline

Otopina perklorne kiseline $\{c(\text{HClO}_4) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$ potrebna je za određivanje PEN-a potencijometrijskom titracijom koju propisuje farmakopeja. Otopina je pripravljena dodavanjem 8,5 mL HClO_4 $\{w(\text{HClO}_4) = 71,0 - 73,0 \% \text{ m/m}; M = 100,45 \text{ g mol}^{-1}\}$ u odmjernu tikvicu od 1000 mL, koja već sadrži 900 mL ledene (glacijalne) octene kiseline $\{M(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 60,01 \text{ g mol}^{-1}\}$. Otopina se promiješa, doda se 30 mL acetatnog anhidrida $\{w(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3) = 97,0 \% \text{ m/m}; M = 102,1 \text{ g mol}^{-1}\}$ te razrijedi do oznake ledenom octenom kiselinom. Pripravljenu otopinu je potrebno ostaviti 24 sata da odstoji.^[195]

3.1.6.2. Otopina joda

Otopina joda $\{c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, glutationa, i tiopronina prema metodama koje propisuje farmakopeja. 12,7 g joda, I_2 i 20 g kalijevog jodida, KI otopljeno je u destiliranoj vodi i razrijeđeno u odmjernoj tikvici do konačnog volumena od 1000 mL. Zbog veće topljivosti joda u otopini jodida prvo je otopljen KI u maloj količini deionizirane vode te potom dodan I_2 . Po njegovu potpunom otapanju dodana je preostala količina vode. Otopinu je bilo potrebno zaštititi od svjetla.^[195]

Standardizacija otopine joda

U 20 mL otopine joda $\{c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ dodan je volumen od 1 mL razrijeđene octene kiseline i 30 mL destilirane vode. Pripravljena se otopina titrira koristeći pripravljenu standardnu otopinu natrijevog tiosulfata $\{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}\}$. Kao indikator se koristi 1 mL otopine škroba. Redoks-reakcija standardizacije se odvija prema jednadžbi (2-37).^[195]

3.1.6.3. Otopina natrijevog tiosulfata

Otopina natrijevog tiosulfata $\{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$ je reagens pripremljen za standardizaciju otopine joda. Otopljeno je 25 g natrijevog tiosulfata i 0,2 g natrijevog karbonata u deioniziranoj vodi. Potom se otopina razrijedila istim otapalom do volumena odmjerne tikvice od 1000 mL.^[196]

Standardizacija otopine natrijevog tiosulfata

Standardizacija pripravljenog natrijevog tiosulfata se provodi standardnom otopinom kalijevog bromata $\{c(\text{KBrO}_3) = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$. U 10 mL KBrO_3 se doda 40 mL deionizirane vode, 10 mL otopine kalijevog jodida i 5 mL razrijeđene otopine klorovodične kiseline, HCl R1. Titrira se pripravljenom standardnom otopinom natrijevog tiosulfata uz dodatak 1 mL otopine škroba kao indikatora.^[196]

3.1.6.4. Otopina kalijevog bromata

Standardna otopina kalijevog bromata $\{c(\text{KBrO}_3) = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$ priprema se otapanjem 5,5670 g KBrO_3 u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 1000 mL.^[195]

3.1.6.5. Otopina octene kiseline

Razrijeđena otopina octene kiseline za standardizaciju otopine joda, pripremljena je miješanjem 28,6 mL ledene (glacijalne) octene kiseline $\{M(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 60,01 \text{ g mol}^{-1}\}$ deioniziranom vodom u odmjerne tikvici na konačan volumen od 100 mL.^[197]

3.1.6.6. Otopina klorovodične kiseline (HCl R)

Razrijeđena otopina HCl R je pripremljena miješanjem 17 mL 35 %-tne otopine HCl deioniziranom vodom u odmjerne tikvici na konačan volumen od 100 mL.^[198]

3.1.6.7. Otopina razrijeđene klorovodične kiseline (HCl R1)

Razrijeđena otopina HCl R1 se priprema razrjeđenjem 1 mL otopine HCl R (73 g L^{-1} HCl) u 200 mL deionizirane vode.^[198]

3.1.6.8. Otopina kalijevog jodida

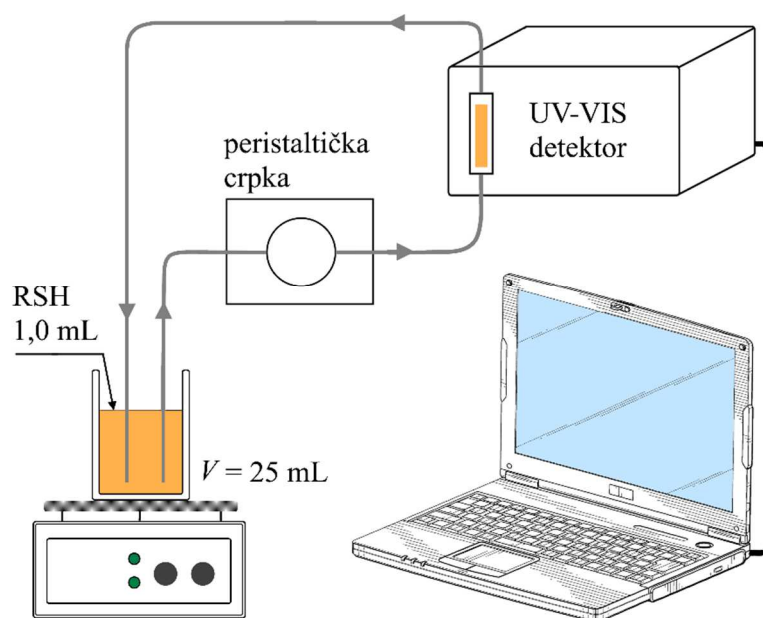
Standardna otopina kalijevog jodida $\{\gamma(\text{KI}) = 166 \text{ g L}^{-1}\}$ je pripremljena otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode.^[199]

3.1.6.9. Otopina škroba

Otopina škroba $\{w(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n = 20 \% \text{ m/m}\}$ se priprema otapanjem 2 g škroba u 100 mL vruće deionizirane vode. Otopina se hlađenjem izbistri.^[200]

3.2. Kinetičke metode analize – instrumentacija i procedura

Sustav za spektrofotometrijsko praćenje kinetike kemijskih reakcija tiolnih spojeva (RSH) prikazan je na slici 3-3. Sastoji se od peristaltičke crpke, teflonskih cjevčica i spektrofotometra za ultraljubičasto i vidljivo područje elektromagnetskog spektra opremljenim protočnom kivetom. Termostatirana reakcijska posuda u kojoj se nalazi 6,0 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$), 2,5 mL otopine bakar(II)-neokuproina $\{c(\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$ te 15,5 mL deionizirane vode, nalazi se na magnetskoj miješalici koja osigurava jednoliko miješanje reakcijske otopine. U reakcijsku otopinu jednu minutu nakon početka eksperimenta dodan je 1,0 mL analita čime je započeta reakcija. Konačan volumen reakcijske otopine je iznosio 25,0 mL.^[31]

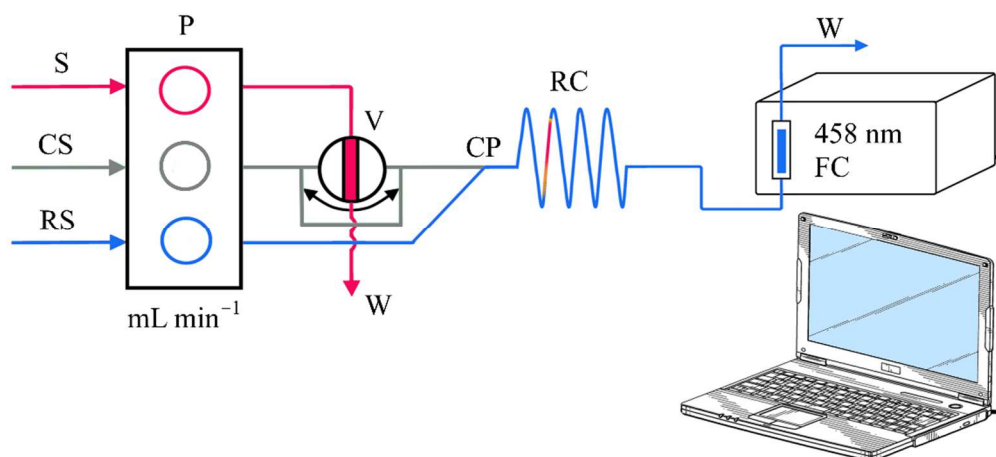


Slika 3-3 Shematski prikaz mjerne instrumentacije za određivanje RSH kinetičkom spektrofotometrijskom metodom^[31]

Ukupni volumen protočne kivete i cjevčica koje čine protočni sustav iznosi 2,0 mL, stoga se pri protoku od 6 mL min^{-1} cijela reakcijska otopina tri puta u minuti izmjenjivala kroz protočnu kivetu. Apsorbancija je kontinuirano bilježena kao funkcija proteklog vremena pri valnoj duljini $\lambda = 458 \text{ nm}$.

3.3. Metode analize injektiranjem u protok – instrumentacija i procedura

Shematski dijagram FIA sustava koji se koristi u ovom radu prikazan je na slici 3-4. Sastoji se od peristaltičke crpke sa osam kanala (Ismatec, Zurich, Švicarska) koja osigurava konstantnu brzinu strujanja otopine reagensa (RS) i ultračiste vode kao struje nosioca (CS) pri protoku $6,0 \text{ mL min}^{-1}$. Šestpozicijski injekcijski ventil (Rheodyne, Model 5020, Anachem, Luton, UK) korišten je za injektiranje standardnih otopina tiolnih spojeva i uzoraka u struju nosioca. Prijenosni sustav je sastavljen od politetrafluoroetilenskih cijevi (PTFE, 0,8 mm i.d.). Reakcija se započinje injektiranjem standardne otopine ili otopine uzorka ($500 \mu\text{L}$) u struju osnovne otopine. Tada se formira zona uzorka koja strujanjem dolazi do stjecašta (CP), gdje se spaja sa strujom reagensa. Reagens se sastoji od $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ bakra(II) i $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ neokuproina u acetatno-boratno-fosfatnom puferu. Pri tom se redoks-reakcija odvija u konačnom protoku koji struji kroz reakcijsku uzvojniciu (RC) (duljina: 40 – 60 cm, i.d. 0,8 mm), što odgovara volumenu od $200 \mu\text{L}$. Formirani obojeni kompleks protječe kroz protočnu kivetu (optički put 10 mm i unutarnji volumen $160 \mu\text{l}$) smještenoj na optičkom putu dvosnognog spektrofotometra (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japan), a apsorbancija se kontinuirano prati pri 458 nm. S obzirom na vrijeme mjernog ciklusa od 20 s, ostvareno je 180 injektiranja na sat.^[42]



Slika 3-4 Shema sustava za analizu injektiranjem u protok: P, peristaltička crpka; S, uzorak ili standardna otopina tiolnog spoja; CS, otopina nosioca (H_2O); RS, otopina reagensa; V: šestpozicijski injekcijski ventil; CP, stjecašte; RC, reakcijska uzvojnica; spektrofotometrijski detektor opremljen protočnom kivetom (FC); W, izljev^[42]

3.4. Metode određivanja farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva prema protokolu Farmakopeje [British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia 2009*, The Stationery Office, London, **2008**]

3.4.1. Određivanje penicilamina metodom koju propisuje Farmakopeja

Britanska farmakopeja preporučuje kiselo-baznu titraciju u nevodenom mediju kao metodu za određivanje sadržaja penicilamina u farmaceutskim pripravcima prema navedenom protokolu.

Otopi se 0,1 g penicilamina u 30 mL anhidrida octene kiseline $\{w(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 99,6\%$ m/m; $M = 60,01 \text{ g mol}^{-1}\}$ te se titrira sa otopinom perklorne kiseline $\{c(\text{HClO}_4) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$. Potenciometrijski se odredi završna točka titracije.^[193]

Prema literaturi iz Britanske farmakopeje iz 2008. godine, 1 mL perklorne kiseline $\{c(\text{HClO}_4) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$ odgovara 14,92 mg $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$.

3.4.2. Određivanje glutathiona metodom koju propisuje Farmakopeja

Metoda za neizravno određivanje sadržaja glutathiona u dodacima prehrani koju preporučuje Britanska farmakopeja je redoks-titracija standardnom otopinom natrijeva tiosulfata.^[189]

Prema protokolu koji propisuje Farmakopeja sadržaj glutathiona se određuje povratnom titracijom. Uzorak mase 0,5 g i 2,0 g kalijevog jodida otopi u 50 mL deionizirane vode. Nakon hlađenja, otopini se doda 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline i 20 mL otopine joda, $\{c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}\}$. Pripravljena otopina se ostavi na tamnom mjestu 15 minuta kako bi se omogućila oksidacija glutathiona. Po završetku oksidacije, višak dodanog joda se titrira standardnom otopinom natrijeva tiosulfata $\{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}\}$, a kao indikator se koristi otopina škroba. Volumen od 1 mL škroba se dodaje neposredno pred kraj titracije, te se u završnoj točki titracije očekuje obezbojenje otopine zbog nestanka I_3^- u reakciji. Ujedno se provodi titracija slijepe probe.

Metoda se zasniva na povratnoj redoks-titraciji u kojoj otopina joda oksidira glutathion (3-1), a zatim se suvišak dodanog joda određuje standardnom otopinom natrijeva tiosulfata (3-2):



pri čemu 1 mL otopine joda $\{c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}\}$ odgovara 30,37 mg GSH.^[189]

3.4.3. Određivanje *N*-acetil-L-cisteina metodom koju propisuje Farmakopeja

Metodu redoks-titracije standardnom otopinom joda za određivanje sadržaja NAC-a u farmaceutskim pripravcima preporučuje Britanska farmakopeja.^[187] Jod se koristi kao standardna otopina titranta za određivanje određenog broja reducirajućih tvari budući da ima relativno nizak standardni redukcijski potencijal, što ograničava njegovu izravnu primjenu kod određenih redoks-titracija.

Po protokolu koji propisuje Farmakopeja NAC se određuje tako da se 0,140 g uzorka otopi u 60 mL deionizirane vode te se doda 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline R. Nakon hlađenja u ledenoj vodi doda se 10 mL kalijevog jodida te se titrira sa 0,05 mol L⁻¹ otopinom joda do pojave intenzivno modre boje. Kao indikator koristi se škrob.

Metoda se zasniva na redoks-reakciji u kojoj NAC (RSH spoj) reducira jod u jodid.



Zbog prisutnog škroba u otopini, odnosno njegove aktivne komponente amiloze, prva kap titranta u suvišku, u završnoj točki titracije, oboji otopinu intenzivno modrom bojom.

Ovom metodom je utvrđeno da je za 16,32 mg NAC-a potrebno utrošiti 1 mL otopine joda { $c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ }.^[187]

3.4.4. Određivanje tiopronina metodom koju propisuje Farmakopeja

Budući da je tiopronin lijek za rijetke bolesti (*orphan drug*) nema pripadajuće monografije kao ni metode koju propisuje Farmakopeja za određivanje samog tiopronina. Iz tog razloga se MPG određivao po protokolu za određivanje njemu sličnog tiolnog spoja iste molne mase, *N*-acetil-L-cisteina, NAC (poglavlje 3.4.3.). Britanska farmakopeja preporučuje jodimetrijsku titraciju za određivanje sadržaja NAC-a u farmaceutskim pripravcima.^[187] Pri tom se koristi otopina joda kao standardna otopina oksidansa za određivanje tiolnih reducirajućih tvari.

Utvrđeno je da je za 16,32 mg NAC-a potrebno utrošiti 1 mL otopine joda { $c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ }. Pretpostavka je da su te vrijednosti jednake i za tiopronin.^[187]

3.5. Ostala korištena oprema i uređaji

pH-vrijednost otopina određivana je pomoću milivoltmetra Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljenim staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®.



Slika 3-5 Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®

Mikropipete (Nichiryo, Tokyo, Japan) su korištene za dodavanje mikrolitarskih volumena kod pripravljanja standardnih otopina analita, reagensa i interferencija.



Slika 3-6 Mikropipete Nichiryo za dodavanje volumena od 0,5 do 1000 μL

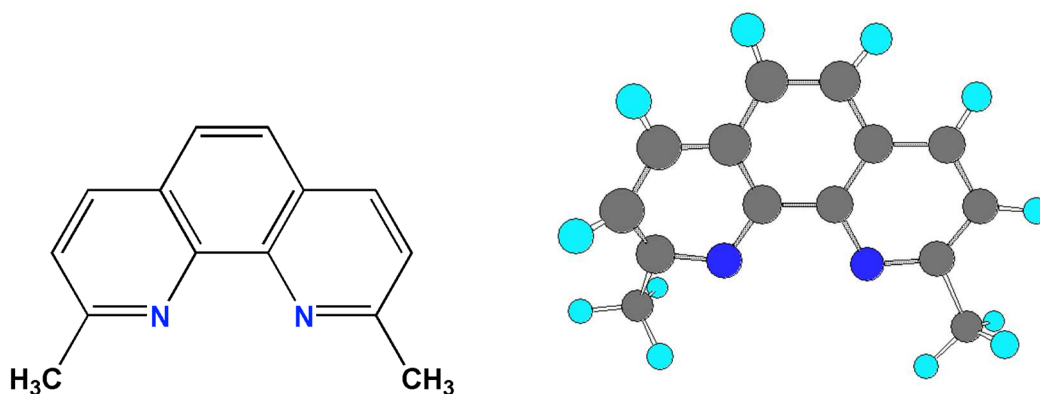
4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvijene i opisane kinetičke metode analize i metode analize injektiranjem u protok uz spektrofotometrijski detektor temelje se na redoks reakciji u kojoj tiolni, RSH spojevi, reduciraju bis neokuproin bakrov(II) kompleks. Pri tome nastaje stabilan bis neokuproin bakrov(I) kompleks, žuto-narančaste boje, koji ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini $\lambda = 458$ nm.



Apsorbancija kompleksa $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$ koji nastaje tijekom reakcije kontinuirano se mjeri korištenjem UV-VIS spektrofotometra s protočnom kivetom, pri valnoj duljini od 458 nm.

Kelatirajući ligand, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), molekulske formule $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$ i molne mase $208,26 \text{ g mol}^{-1}$, je prema strukturnoj formuli heterociklički organski spoj. Topljivost neokuproina dobra je u većini organskih otapala, a u vodi je djelomično topljiv. Gustoća neokuproina iznosi $1,178 \text{ g mL}^{-1}$. Točka tališta mu je između 159 i 162 °C, a točka vrelišta pri temperaturi od $367,4$ °C.^[201]



Slika 4-1 Neokuproin prikazan strukturnom formulom (2D) i molekulskim modelom (3D)

Zbog zadovoljavajućih iznosa konstanti formiranja kompleksa,^[202] ovaj sintetizirani derivat fenantrolina primjenjiv je kao kolorimetrijski reagens za određivanja vrlo malih količina prijelaznih metala, primjerice paladija^[201] i bakra.^[201,203] Konstante formiranja bidentatnog liganda neokuproina sa bakrom(II) i bakrom(I) redom iznose $5,01 \times 10^{11}$ i $1,26 \times 10^{19}$.^[204,205] Uzimajući u obzir navedene konstante formiranja

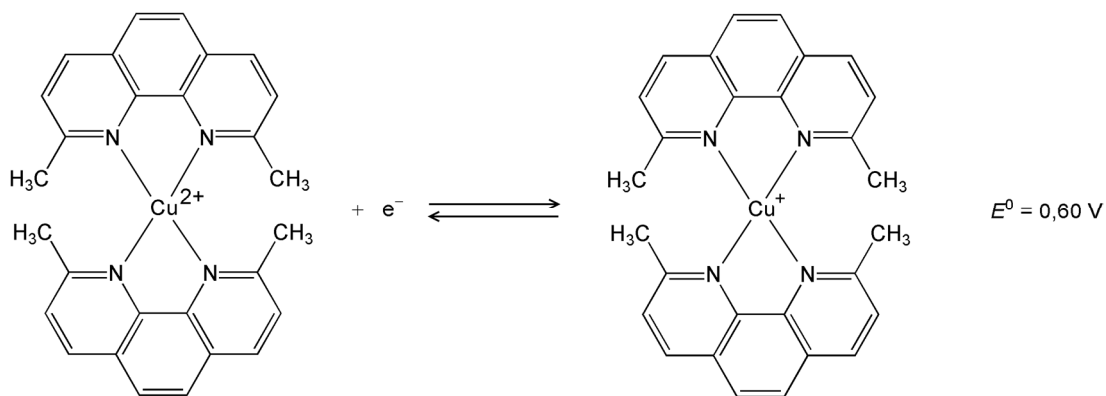
kompleksa, bis neokuproin bakrov(I) kompleks je stabilniji u tetraedarskoj geometrijskoj strukturi u usporedbi sa kompleksom bakra(II) i neokuproina.^[206]

Neokuproin se kao kolorimetrijski reagens u oksidirajućem spoju započeo primjenjivati u zadnjim desetljećima 20. stoljeća. Znanstveni tim iz Turske, 2004. godine primijenio je ovaj reagens (neokuproin u spoju s bakrom(II)) u svojim antioksidacijskim metodama koje je nazvao CUPRAC metode (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*, CUPRAC).^[207] CUPRAC je najčešće korišten kao reagens za spektrofotometrijsko određivanje različitih reducirajućih tvari, primjerice spojeva (lijekova) koji neutraliziraju želučanu kiselinu^[202], polifenola kao dodataka prehrani^[207,208], zatim proteina^[209], askorbinske kiseline (vitamina C) u hrani i napitcima^[207,208,210,211], vitamina E^[207,208,212], ali i određivanja antioksidacijskog djelovanja cisteina i glutationa u smjesi s polifenolima^[213].

Reakcija redukcije bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa u prisutnosti reducirajućih tvari je relativno brza (budući da se kod bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa prijelaz elektrona odvija mehanizmom vanjske sfere (ljuske) kada u trenutku prijenosa ne postoji kovalentna veza između oksidansa i reducensa), a rezultirajuće obojenje zbog formiranog $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$ je dovoljno vremena stabilno.^[214]

Kako je opisano u dostupnim znanstvenim člancima, neokuproin se uobičajeno koristi u slabo kiselom i neutralnom reakcijskom mediju ($\text{pH} = 6 - 7$), čija je pH-vrijednost podešena dodatkom otopine amonijevog acetata. Upravo takav reakcijski medij u navedenoj CUPRAC metodi omogućuje bolju simulaciju fiziološkog okruženja reducensa (antioksidansa) u organizmu. Ipak, u nekim djelovima organizma pH-vrijednost je puno niža. Budući da je neokuproin topljiv i u vodi i u ulju (organskom otapalu), omogućuje istovremeno određivanje i lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa.^[214]

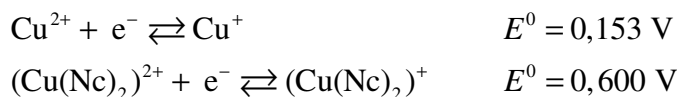
Standardni redoks potencijal $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} / (\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$ kompleksa iznosi 0,600 V što je mnogo viša vrijednost od redoks potencijala samog $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ redoks para (0,153 V).^[203]



Slika 4-2 Polureakcija redukcije bis neocuproin bakrovog(II) kompleksa do kromofora bis neocuproin bakrovog(I) kompleksa koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri 458 nm

U nastavku je prikazan utjecaj reakcija formiranja kompleksa na redukcijski potencijal redoks-para bakra(II) i bakra(I), kada oba oblika redoks-para stvaraju kompleks sa neocuproinom.

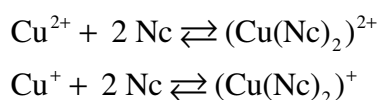
Redukcijski potencijal redoks-para $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ povećava se sa 0,153 V na 0,600 V. S obzirom da ligand neocuproin (Nc) tvori stabilne obojene komplekse s bakrovim(I) i bakrovim(II) ionima, pomoću poznatih konstanti formiranja navedenih kompleksa moguće je izvesti izraz za izračunavanje redukcijskog potencijala redoks para $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}$ i $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$.



Primjenom Nernstova izraza može se izračunati redoks-potencijal redoks para $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$:

$$E = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{[\text{Cu}^+]}{[\text{Cu}^{2+}]}$$

U reakcijskoj sredini koja sadrži neocuproin formirat će se stabilni kompleksi bakra(II) i bakra(I) s navedenim ligandom:



U razmatranoj reakcijskoj sredini mijenja se ravnotežna koncentracija bakrovih iona koja se može izraziti primjenom analitičke koncentracije i udjela slobodnog iona:

$$[\text{X}] = c_{\text{X}} \cdot \alpha_{\text{X}}$$

$$E = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\alpha(\text{Cu}^+)}{\alpha(\text{Cu}^{2+})} - 0,0592 \log \frac{c(\text{Cu}^+)}{c(\text{Cu}^{2+})}$$

Pri poznatim uvjetima udjel bakrovih iona je konstantan, te se može uvrstiti u izraz za formalni potencijal:

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\alpha(\text{Cu}^+)}{\alpha(\text{Cu}^{2+})}$$

Udjeli bakrovih iona se mogu računati koristeći ukupne ili pojedinačne konstante nastajanja kompleksa:

$$\alpha(\text{Cu}^+) = \frac{[\text{Cu}^+]}{c(\text{Cu}^+)} = \frac{[\text{Cu}^+]}{[(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+]} = \frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+ \cdot [\text{Nc}]^2}$$

$$\alpha(\text{Cu}^{2+}) = \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{c(\text{Cu}^{2+})} = \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}]} = \frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} \cdot [\text{Nc}]^2}$$

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+ \cdot [\text{Nc}]^2}}{\frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} \cdot [\text{Nc}]^2}}$$

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+}}{\frac{1}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}}}$$

Uvrštavanjem udjela iskazanih korištenjem konstanti nastalih kompleksa u izraz za formalni potencijal, dolazi se do izraza iz kojeg se može zaključiti o odnosu konstanti stabilnosti kompleksa $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}$ i $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$.

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+}$$

Konstante formiranja razmatranih kompleksa mogu se pronaći u literaturi.^[204,205]

$$\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} = 5,01 \times 10^{11}$$

$$\log \beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} = 11,7$$

$$\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+ = 12,6 \times 10^{19}$$

$$\log \beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+ = 19,1$$

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592 \log \frac{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}}{\beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+}$$

$$E^0' = E^0(\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+) - 0,0592(\log \beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+} - \log \beta(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+)$$

$$E^0' = 0,153 - 0,0592 \cdot (-7,40)$$

$$E^0' = 0,153 + 0,438$$

$$E^0' = 0,591 \text{ V}$$

Razlika između izračunane vrijednosti formalnog potencijala (0,591 V) i vrijednosti koja se nalazi u literaturi (0,600 V), posljedica je računanja s koncentracijama umjesto aktivitetima, ali i utjecaja vrijednosti korištenih konstanti formiranja kompleksa.

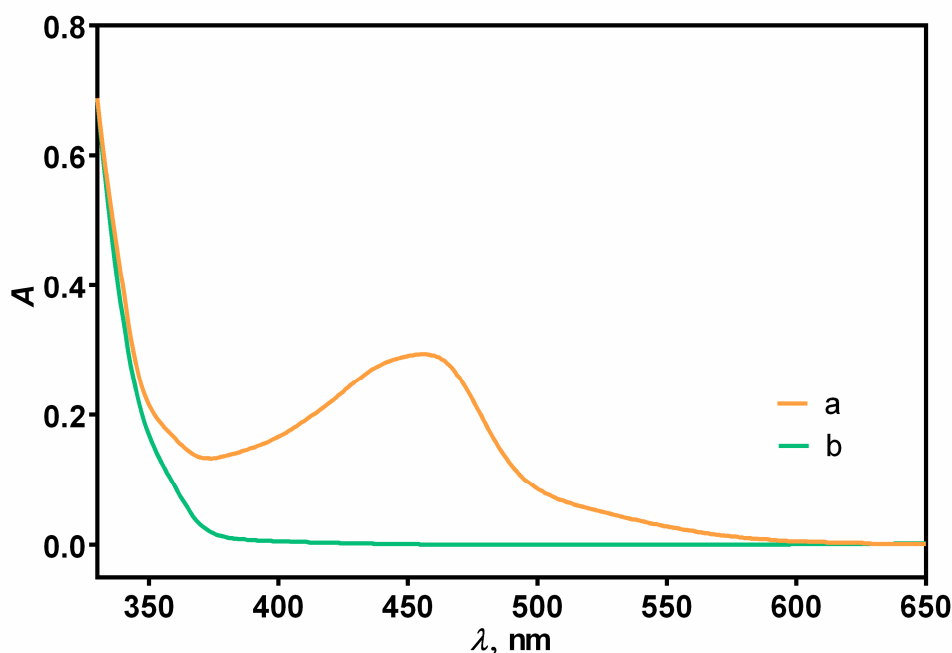
Kao što je navedeno u poglavlju 2., u literaturi su opisane spektrofotometrijske metode određivanja razmatranih tiolnih spojeva, čiji se kemizam u prvom koraku temelji na redoks reakciji redukcije željeza(III) do željeza(II) uz tiolne spojeve kao reducirajuće tvari. U sljedećem koraku, željezo(II) formira komplekse s različitim ligandima: 1,10-fenantrolin (fen), ferozin, 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), heksacianoferat(III) i fericijanid.

Standardni potencijal redoks para bakar(II) / bakar(I) u otopini neokuproina (0,600 V) može se usporediti sa formalnim potencijalom pri optimiziranim uvjetima redoks para željezo(III) / željezo (II) u otopini sa TPTZ-om (0,578 V). Potencijali navedenih redoks aktivnih kolorimetrijskih reagensa su niži od formalnog potencijala redoks para željezo(III) / željezo(II) u otopini 1,10-fenantrolina (1,197 V).^[30]

Može se zaključiti kako je bis neokuproin bakrov(II) reagens blaži, ali time i selektivniji oksidans od kompleksa koji formiraju željezo(III) i fenantrolin. Jedino reducirajuće tvari (reducensi) kojima je standardni (formalni) potencijal niži od 0,600 V će imati termodinamičku predispoziciju interferirati u predloženoj metodi. S druge strane, veća osjetljivost bis neokuproin bakrova(II) reagensa je vjerojatno posljedica kinetike razmatrane reakcije. Bis neokuproin bakrov(I) reagens je trenutačan produkt izmjene jednog elektrona reagensa s RSH tijekom reakcije redukcije dok se spomenuta reakcija sa željezo(III) / željezo(II) i fenantrolinom provodi kroz dva koraka, što zahtijeva dulje vrijeme. U prvom koraku analit reducira željezo(III) do željeza(II), a potom u drugom koraku željezo(II) formira kompleks sa ligandom fenantrolinom. Dodatna prednost bis neokuproin bakrova(II) reagensa je odsutnost interferencija fosfatnih iona, koja je prisutna u reakcijskim sustavima sa željezo(III) / željezo(II). Na taj način je moguće ispitati široki raspon pH-vrijednosti. Fosfatni ioni interferiraju u metodi temeljenoj na redukciji željeza(III) do željeza(II), jer fosfati stvaraju komplekse sa željezom(III). Nadalje predložena metoda se odvija u kiseloj sredini (acetatno-borarno-fosfatni pufer, pH = 3,0) gdje je otopina analita značajno stabilnija, a redukcijska svojstva većine interferencija su smanjena, čime je pospješena selektivnost predložene metode.

4.1. Kinetičke metode analize

Razvoju kinetičke spektrofotometrijske metode, prethodila su ispitivanja spektralnih karakteristika formiranog reduciranog $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$ i oksidiranog $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}$ oblika kompleksa, s ciljem utvrđivanja mogućih spektralnih interferencija. Iz prikaza spektra na slici 4-3 vidljivo je da oksidirani oblik kompleksa $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^{2+}$, ne apsorbira pri apsorpcijskom maksimumu reduciranog oblika kompleksa $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$, koji se nalazi pri 458 nm.^[31]



Slika 4-3 Spektar: (a) bis neokuproin bakrovog(I) kompleksa i (b) bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa. Spektar (a) je posljedica redukcije bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa s *N*-acetil-L-cisteinom, $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (referentna kiveta: deionizirana voda).

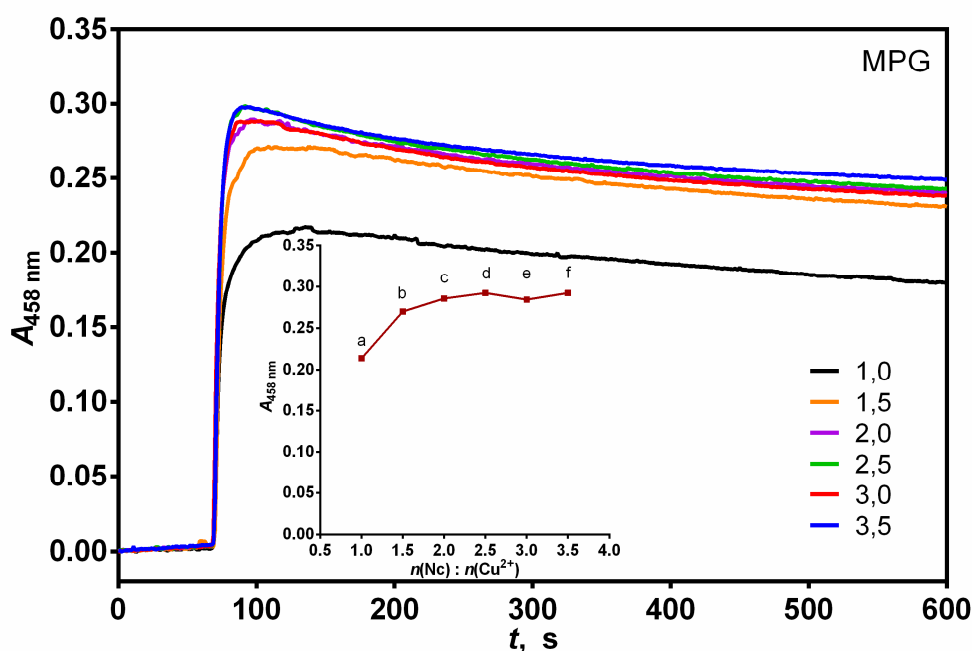
Važno je naglasiti da se razvijena kinetička spektrofotometrijska metoda provodi u vidljivom području elektromagnetskog zračenja (458 nm), daleko od ultraljubičastog područja. Naime, pomoćne tvari prisutne u farmaceutskim pripravcima te komponente pufera često interferiraju apsorbancijom u ultraljubičastom području, što je kod predstavljene kinetičke metode izbjegnuto.

Nadalje, eksperimentalno izmjerena molarna apsorptivnost ($7775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) odgovara vrijednosti navedenoj u literaturi, koja iznosi približno $7500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^[203]

4.1.1. Optimizacija uvjeta kemijske reakcije

Mjerna instrumentacija za određivanje tiolnih spojeva kinetičkom spektrofotometrijskom metodom prikazana je na slici 3-3 (poglavlje 3.2.) Ispitivanjem kinetike razmatrane reakcije pristupilo se optimizaciji parametara kemijske reakcije: koncentraciji reagensa, pH-vrijednosti te temperaturi reakcije.

Molarni omjer bakra(II) i neokuproina u reakcijskoj smjesi ispitan je pripravljanjem pojedinačnih otopina bakra(II) i neokuproina (poglavlje 3.1.2.). Tijekom eksperimenta optimizacije, koncentracija bakra(II) održavana je konstantnom, ($c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), dok je koncentracija neokuproina mijenjana u rasponu od $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Sukladno tome, molarni omjer neokuproina i bakra(II) se mijenjao od 1,0 do 3,5.



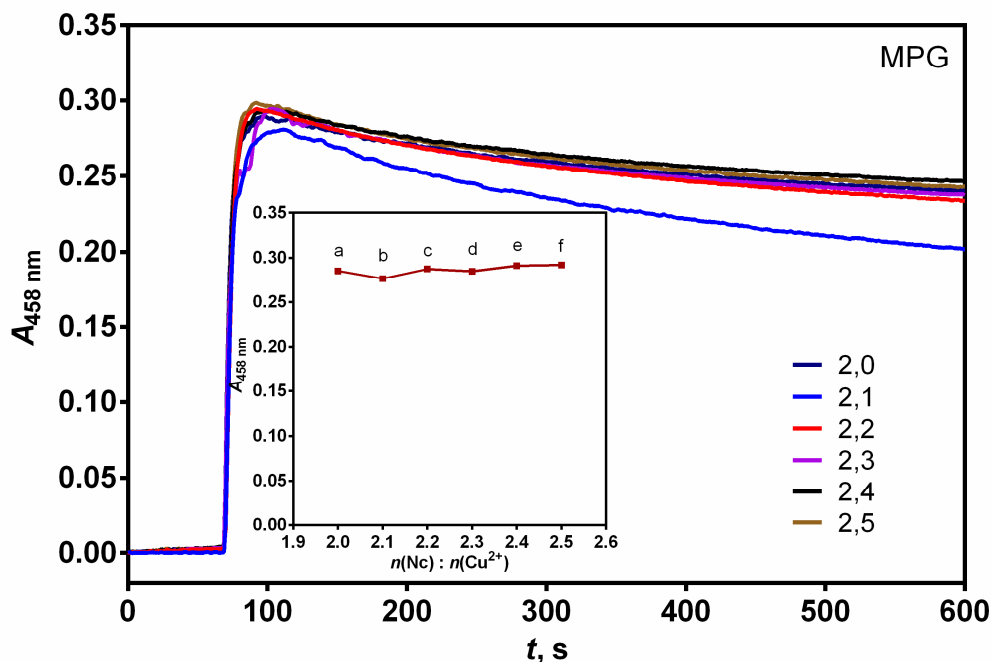
Slika 4-4 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim molarnim omjerima reagensa: (a) 1,0; (b) 1,5; (c) 2,0; (d) 2,5; (e) 3,0; (f) 3,5; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,0; temperatura 25 °C; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

Utjecaj molarnog omjera liganda i iona metala u kompleksnom spoju prikazana za analit tiopronin (slika 4-4). Rezultati pokazuju da se povećanjem koncentracije liganda, neokuproina, uz stalnu koncentraciju iona metala, bakra(II), povećava brzina reakcije i apsorbancija. Povećanjem molarnog omjera, apsorbancija se povećavala i dosegla konstantnu vrijednost kada je molarni omjer neokuproina i bakra(II) iznosio 2,5.

Zbog boljeg uvida u utjecaj molarnog omjera ispitan je utjecaj molarnog omjera neokuproina i bakra(II) u užem rasponu, od 2,0 do 2,5. Na prvi pogled na slici 4-5 nema značajnije promjene brzine reakcije i apsorbancije u užem rasponu molarnog omjera od 2,1 do 2,5, ali pri molarnom omjeru 2,4 apsorbancija dostiže konstantnu vrijednost te promatrani kinetički odziv pokazuje dostatno visoku i stabilnu ovisnost apsorbancije o vremenu. Stoga pri pH-vrijednosti 6,0 odabrani optimalni molarni omjer neokuproina i bakra(II) iznosi 2,4 za sve analizirane tiolne spojeve.

Tablica 4-1 Prikaz molarnih omjera neokuproina i bakra(II), pripadajućih koncentracija i zabilježenih apsorbancija otopina pri stalnoj koncentraciji tiopronina, $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

$n(\text{Nc}) / n(\text{Cu}^{2+}), \text{ mol}$	$c(\text{Cu}^{2+}), \text{ mol L}^{-1}$	$c(\text{Nc}), \text{ mol L}^{-1}$	$A_{458 \text{ nm}}$
1,0	$8,0 \times 10^{-5}$	$8,0 \times 10^{-5}$	0,214
1,5	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	0,270
2,0	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-4}$	0,286
2,1	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-4}$	0,277
2,2	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,76 \times 10^{-4}$	0,288
2,3	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,84 \times 10^{-4}$	0,285
2,4	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-4}$	0,291
2,5	$8,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	0,292
3,0	$8,0 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-4}$	0,2842
3,5	$8,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-4}$	0,2922

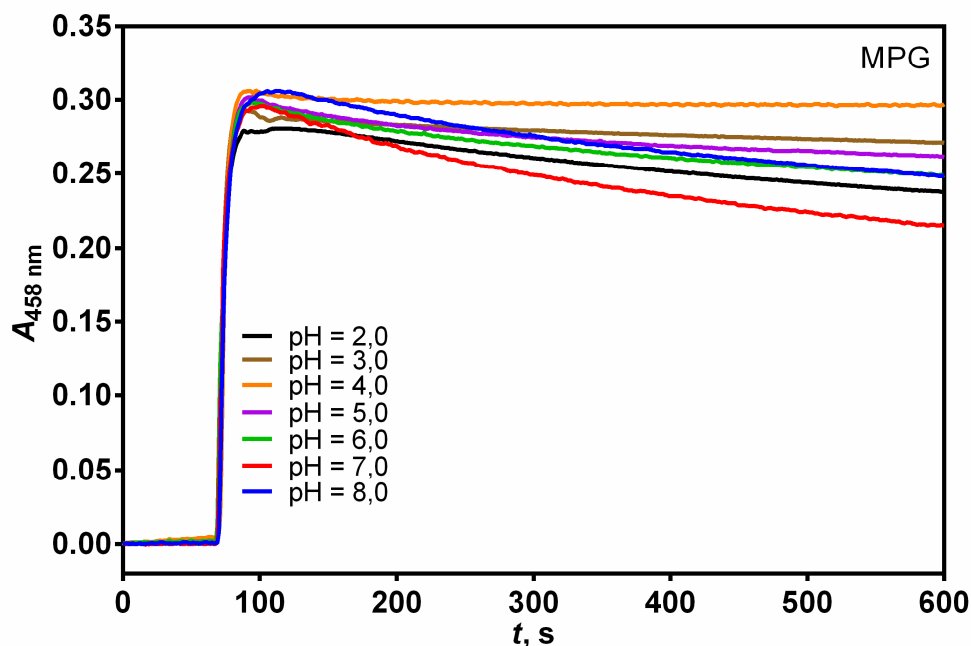


Slika 4-5 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim molarnim omjerima reagensa: (a) 2,0; (b) 2,1; (c) 2,2; (d) 2,3; (e) 2,4; (f) 2,5; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,0; temperatura 25 °C; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

S obzirom da nakon molarnog omjera reagensa 2,4 više nema značajnije promjene u visini signala, može se smatrati da visina signala isključivo ovisi o koncentraciji analita, odnosno da su postignuti uvjeti za reakciju pseudoprvog reda.

Utjecaj pH-vrijednosti kod kinetičkog spektrofotometrijskog određivanja tiolnih spojeva ispitan je u rasponu pH-vrijednosti od 2,0 do 8,0, koristeći otopinu acetatno-borato-fosfatnog pufera. Odgovarajuće pH-vrijednosti su podešene dodavanjem otopine natrijeva hidroksida.

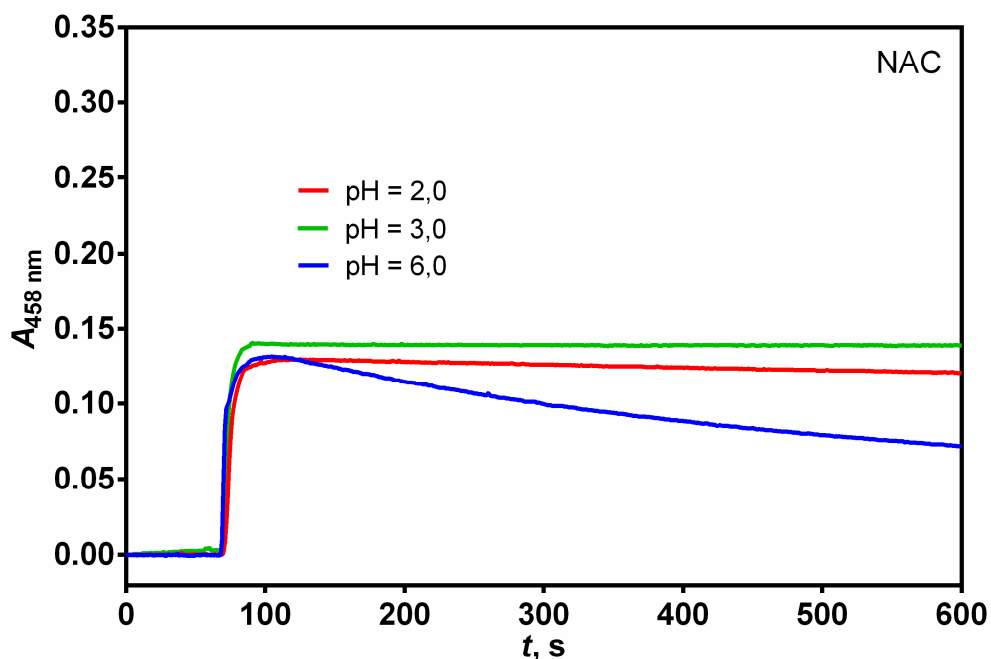
U širokom rasponu pH-vrijednosti brzine reakcije i same apsorbancije nisu se značajno promijenile u prvoj minuti odvijanja reakcije. Iako je prema dostupnoj literaturi otopina bakra(II) i neokuproina korištena u slabo kiselom do neutralnom reakcijskom mediju, zbog održavanja fiziološkog medija tijekom antioksidacijskih mehanizama u organizmu^[214], zabilježeni kinetički signal je stabilniji pri nižim pH-vrijednostima. Budući da su otopine tiolnih spojeva stabilnije pri nižim pH-vrijednostima, za daljnja mjerenja je odabran reakcijski medij acetatno-borato-fosfatnog pufera pH-vrijednosti 3,0.



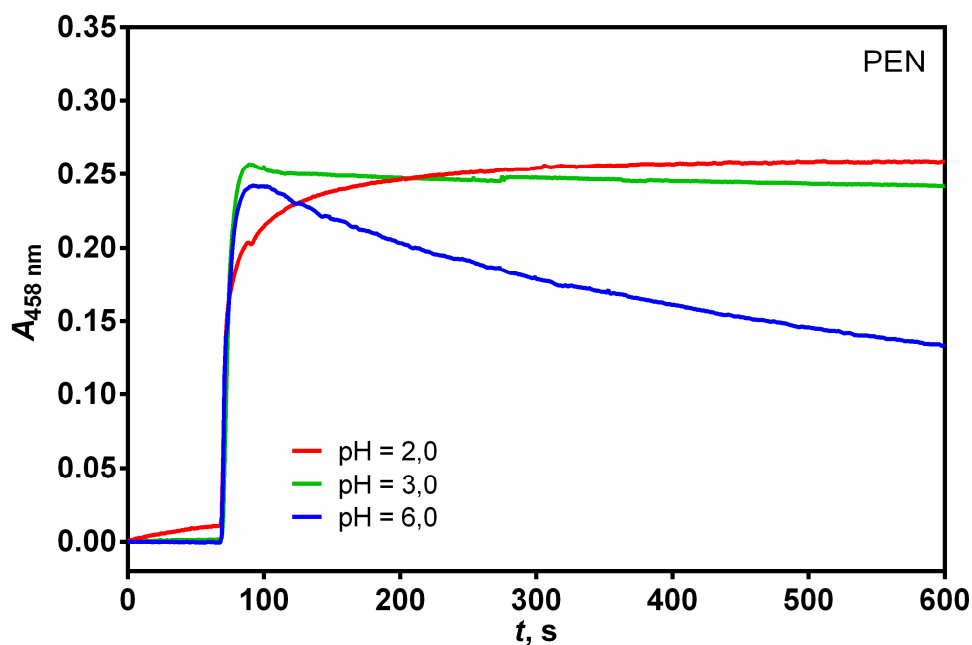
Slika 4-6 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim pH-vrijednostima: pH = 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura 25°C ; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

Pri višim pH-vrijednostima kinetički signal prilikom određivanja tiopronina (slika 4-6) ne dostiže stabilno stanje. Već pri pH-vrijednostima višim od 4,0 apsorbancija se značajno smanjuje s vremenom. Pri pH = 6,0, prilikom određivanja svih tiolnih spojeva, vidljiva je nestabilnost reduciranog kompleksa. Nestabilnost signala je povezana sa nestabilnošću formiranog reduciranog $(\text{Cu}(\text{Nc})_2)^+$ kompleksa pri višoj pH-vrijednosti reakcijskog medija. Tada je moguća djelomična oksidacija nastalog kompleksa.

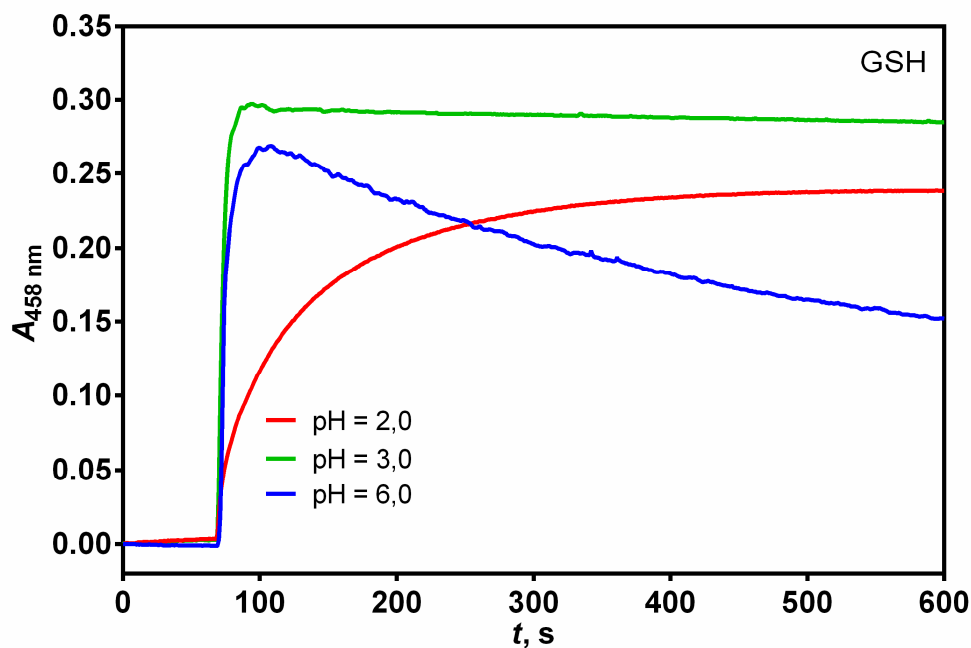
Kod preostalih optimizacija pH-vrijednosti tiolnih spojeva, pažnja je posvećena nižim pH-vrijednostima zbog ranije navedenog.



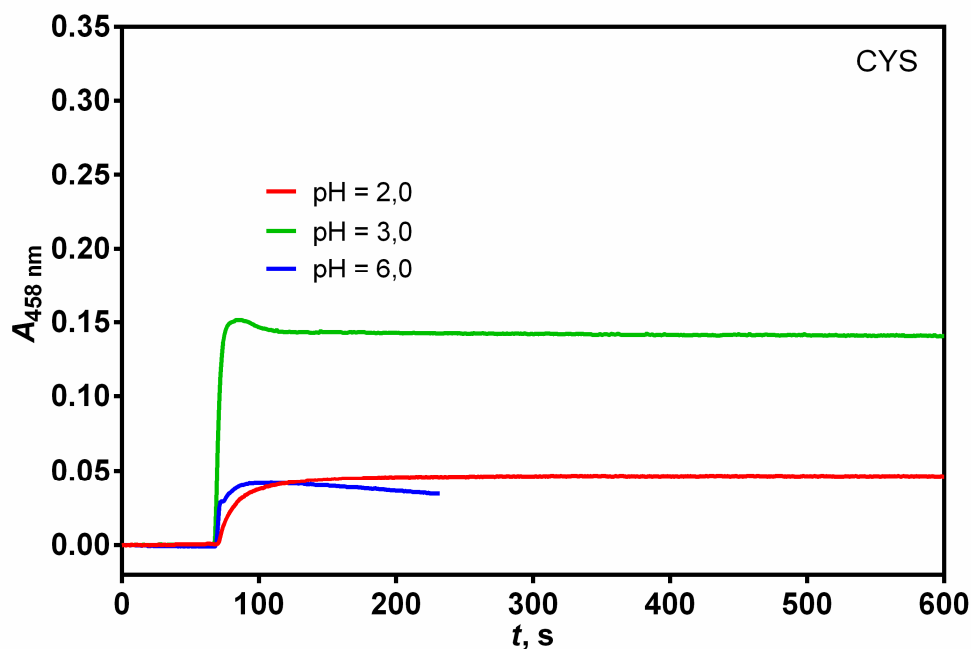
Slika 4-7 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim pH-vrijednostima: pH = 2,0; 3,0; 6,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura 25 °C; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



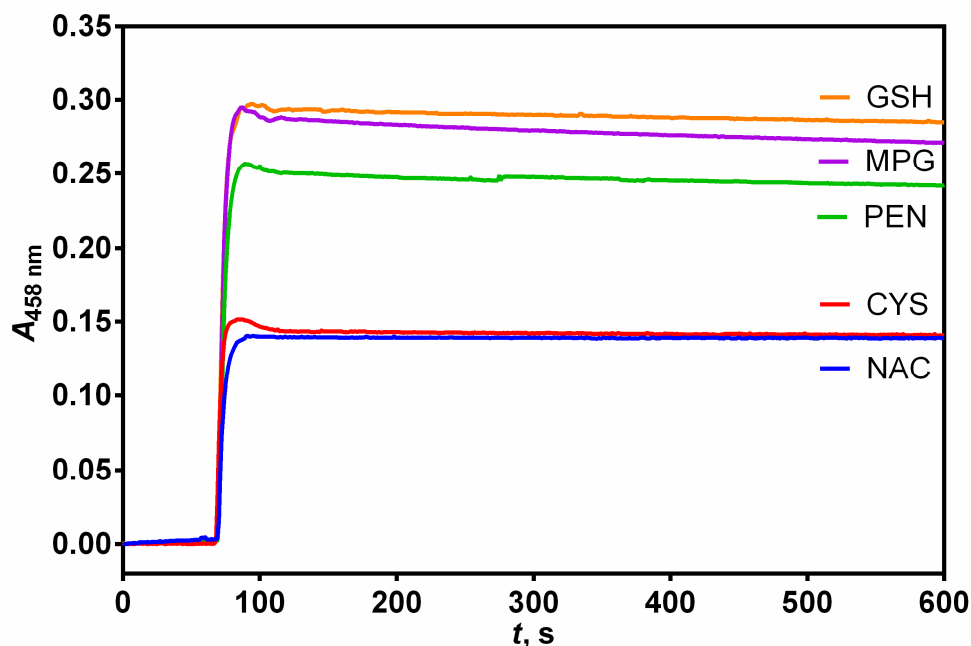
Slika 4-8 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim pH-vrijednostima: pH = 2,0; 3,0; 6,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura 25 °C; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



Slika 4-9 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim pH-vrijednostima: pH = 2,0; 3,0; 6,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura 25°C ; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



Slika 4-10 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim pH-vrijednostima: pH = 2,0; 3,0; 6,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura 25°C ; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

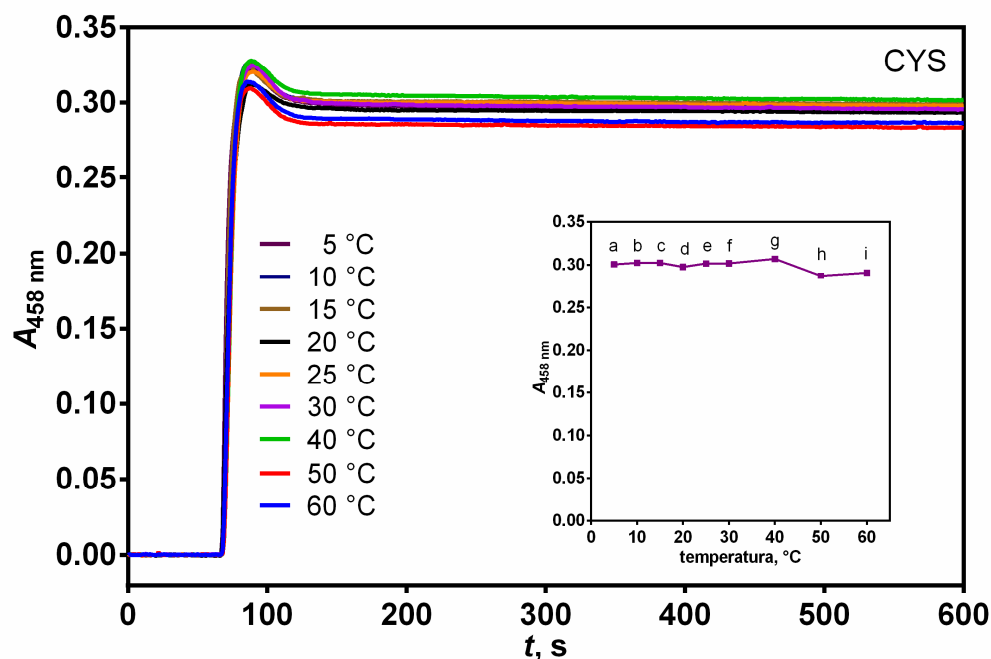


Slika 4-11 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu za sve razmatrane tiolne spojeve. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{RSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

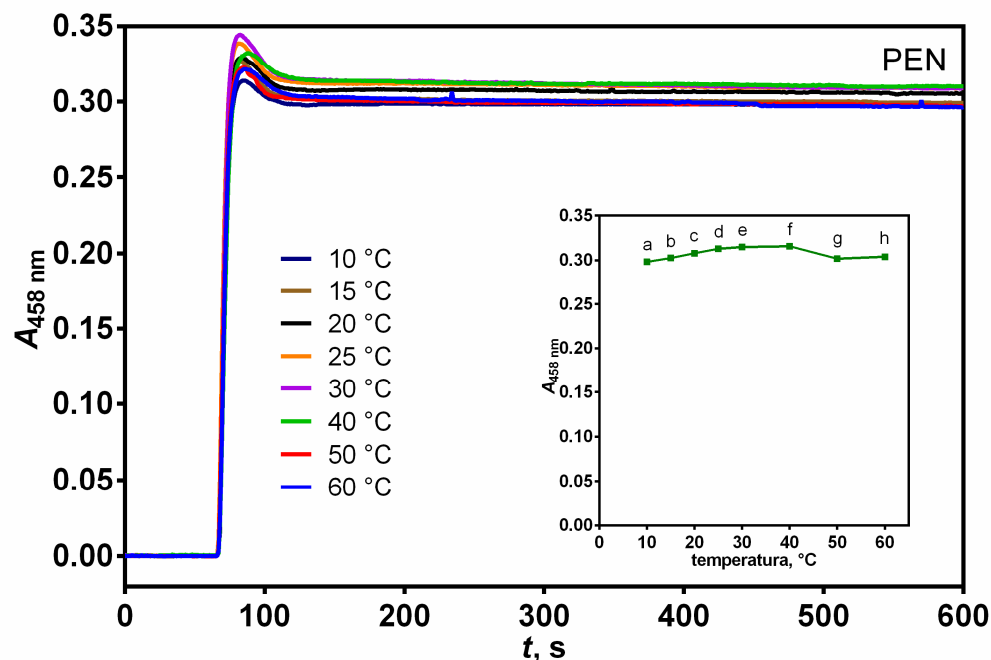
Na slici 4-11 prikazana je ovisnosti apsorbancija o vremenu za sve razmatrane tiolne spojeve pri optimalnoj pH-vrijednosti 3,0, pri kojoj je ostvarena stabilnost signala. Utvrđena kinetika reakcija određivanja razmatranih tiolnih spojeva, obećava mogućnost razvoja metoda analize injektiranjem u protok.

Kod reakcija sa sporijom kinetikom, povišenjem temperature ubrzava se kemijska reakcija čime se povećava osjetljivost određivanja.^[215]

Učinak temperature na kinetiku predloženih reakcija ispitan je promjenom temperature termostatisane reakcijske posude u rasponu od 5°C do 60°C . U navedenom širokom temperaturnom rasponu, kinetička krivulja određivanja cisteina (slika 4-12) ne pokazuje značajniju promjenu apsorbancije. Međutim pri višim temperaturama (iznad 40°C) dolazi do manjeg opadanja apsorbancije s vremenom. Razlog tome može biti nestabilnost mjernog sustava budući da se grijanjem otopine zagrijevaju cijevi koje osiguravaju kontinuirano kruženje reakcijske otopine pri čemu se stvaraju mjehurići zraka. Slično se događa i kod određivanja penicilamina, gdje je utjecaj mjehurića u sustavu vidljiviji u obliku manjih nepravilnosti kod zabilježenih signala pri 50°C i 60°C (slika 4-13).

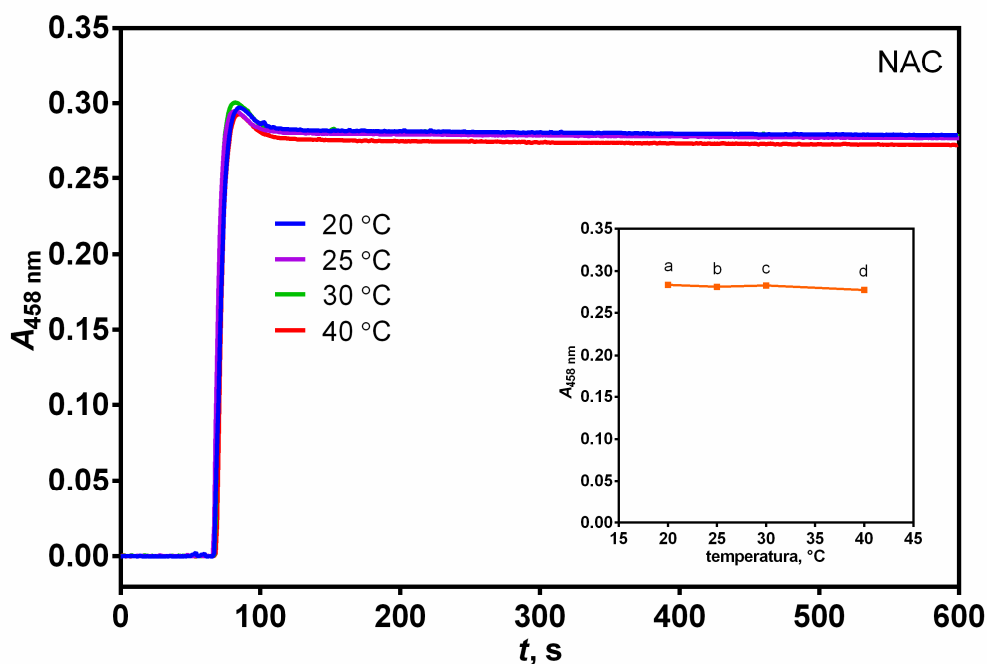


Slika 4-12 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim temperaturama: (a) 5; (b) 10; (c) 15; (d) 20; (e) 25; (f) 30; (g) 40; (h) 50; (i) 60 $^{\circ}\text{C}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

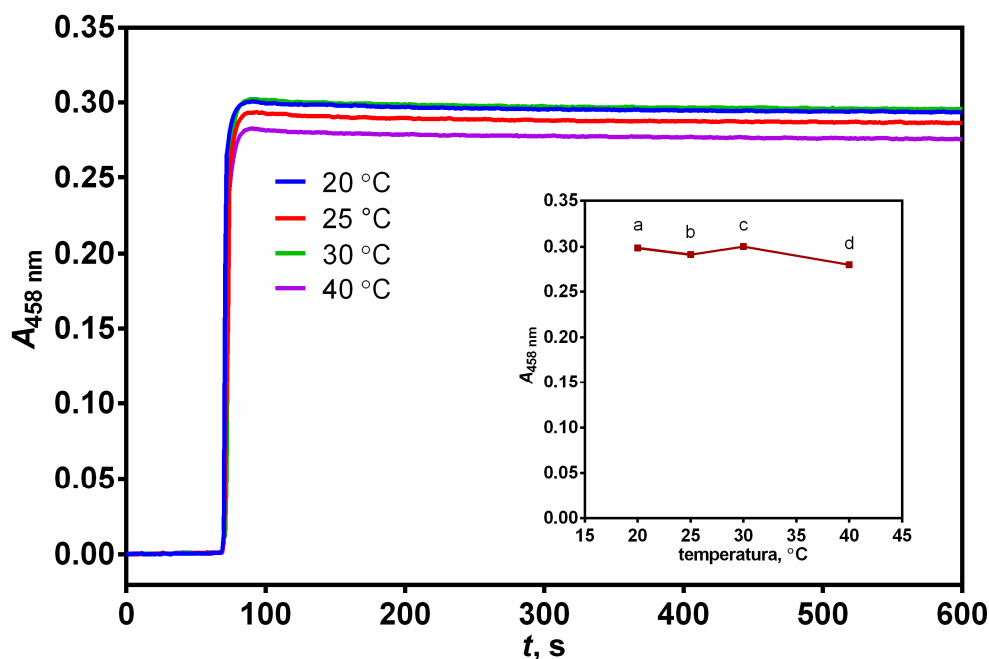


Slika 4-13 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim temperaturama: (a) 10; (b) 15; (c) 20; (d) 25; (e) 30; (f) 40; (g) 50; (h) 60 $^{\circ}\text{C}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

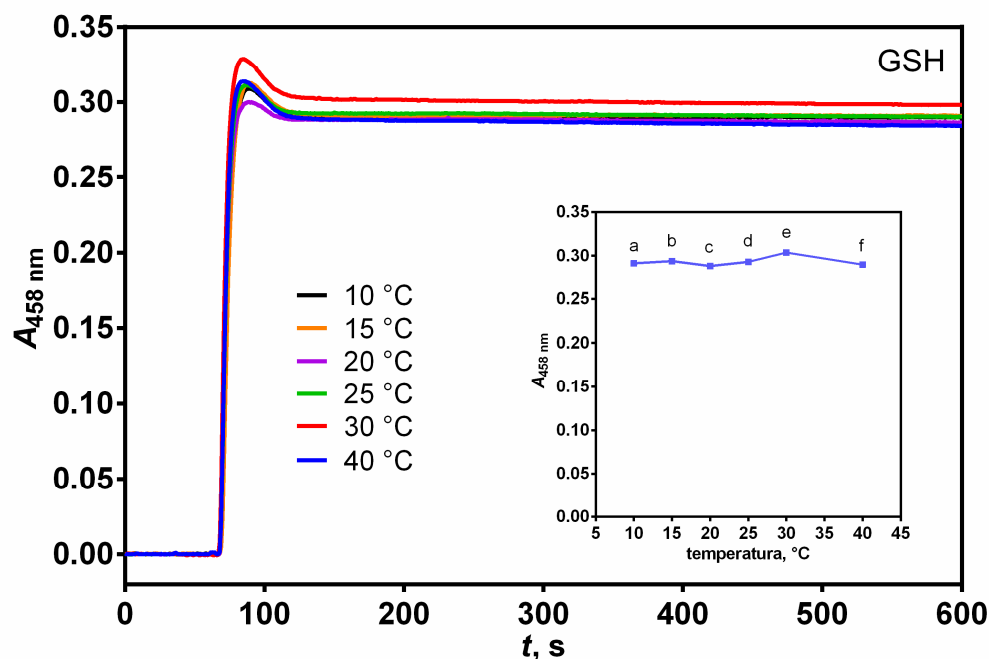
Budući da je kinetika i preostalih predloženih reakcija određivanja NAC-a, MPG-a i GSH brza, temperatura značajno ne utječe na visinu signala. Rezultati pokazuju da je predložena redoks reakcija temperaturno neovisna u navedenom rasponu temperatura, te brzina reakcije i stabilnost signala ostaju isti u širokom rasponu temperatura. Pri 25 °C brzina formiranja kompleksa je dostatna i iz tog je razloga odabrana laboratorijska temperatura od 25 °C, pri kojoj se eksperiment može provesti tako da se kinetički sustav ne mora termostatirati tijekom mjerenja.



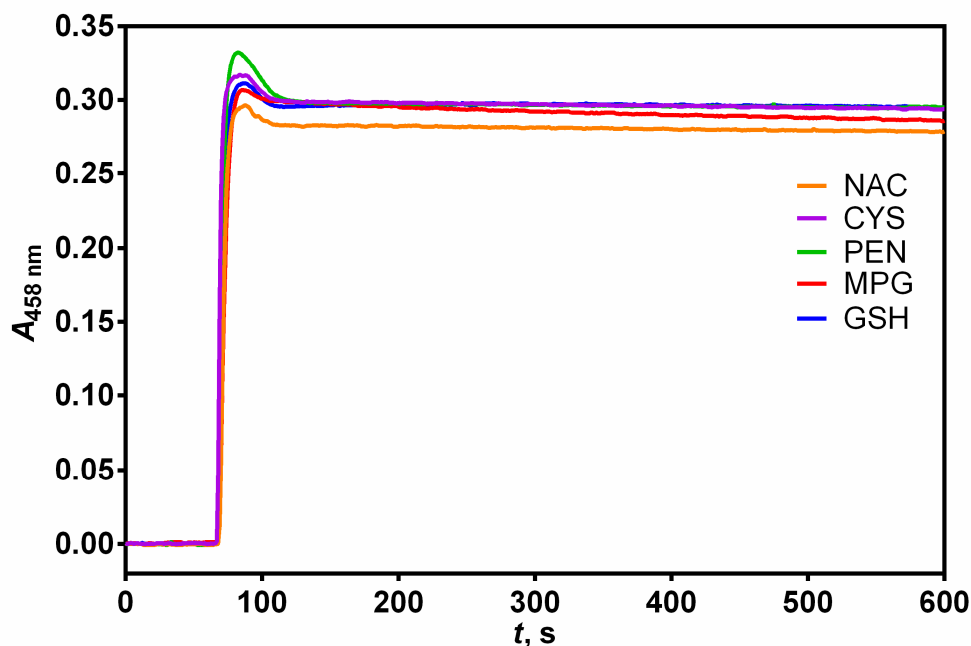
Slika 4-14 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim temperaturama: (a) 20; (b) 25; (c) 30; (d) 40 °C. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



Slika 4-15 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim temperaturama: (a) 20; (b) 30; (c) 40 °C. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



Slika 4-16 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim temperaturama: (a) 10; (b) 15; (c) 20; (d) 25; (e) 30; (f) 40 °C. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.



Slika 4-17 Ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu za razmatrane tiolne spojeve. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{RSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; analit je dodan jednu minutu nakon početka eksperimenta.

Temeljem optimiziranih kemijskih parametara predloženih redoks reakcija, grafički je prikazana ovisnost apsorbancije o proteklom vremenu (slika 4-17) za razmatrane tiolne spojeve. Kinetičke krivulje pokazuju brzu kinetiku redoks reakcija razmatranih tiolnih spojeva.

Uspoređujući slike 4-11 i 4-17, podaci na slici 4-11 su ostvareni pri eksperimentalnim uvjetima koji su preuzeti iz rada autora A. Besada^[95]. Međutim istraživanje je usmjeravalo na pronalaženje optimalnog molarnog omjera neokuproina i bakra(II) kao i njihovih optimalnih koncentracija, stoga korišteni optimalni molarni omjer i koncentracija neokuproina i bakra(II) ne pružaju mogućnost selektivnog određivanja razmatranih tiolnih spojeva u smjesi što nije ni bio cilj ovog rada.

4.1.2. Analitička iskoristivost kinetičkih mjerenja

Pri temperaturi od 25 °C u kiselom reakcijskom mediju acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 3,0) te uz analitičku koncentraciju bakra(II) ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) i neokuproina ($2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) eksperimentalno su izmjereni kinetički zapisi ovisnosti apsorbancije o vremenu za različite koncentracije *N*-acetil-L-cisteina (NAC), cisteina (CYS), penicilamina (PEN), tiopronina (MPG) i glutationa (GSH). Eksperimentalni podatci dobiveni kinetičkim mjernim sustavom obrađeni su korištenjem dviju računskih metoda: metodom početne brzine i metodom određenog vremena, pomoću računalnih programa Excel i GraphPad. U nastavku su prikazani grafički prikazi zapisa eksperimentalnih mjerenja za određivanje pojedinih tiolnih spojeva kao i pripadajuće krivulje umjeravanja određene dvjema računskim metodama koje su opisane u poglavlju 2.1.4.

Primjenom metode najmanjeg kvadrata, provedena je regresijska analiza za proračun nagiba pravaca, odsječaka na osi *y* i određivanja koeficijenata korelacije (R^2) za obje računske metode.

Kod metode određenog vremena i metode početne brzine izračunane su granice dokazivanja i granice određivanja prema jednadžbama (4-2) i (4-3). Izračunane granice dokazivanja za pojedini tiolni spoj su navedene u tablicama 4-2 i 4-8, dok su granice određivanja RSH odgovarale najnižim koncentracijama linearnog dinamičkog područja odgovarajućeg analita.

Granica dokazivanja (*Limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvalitativno odrediti. Izraz za izračunavanje granice dokazivanja glasi:

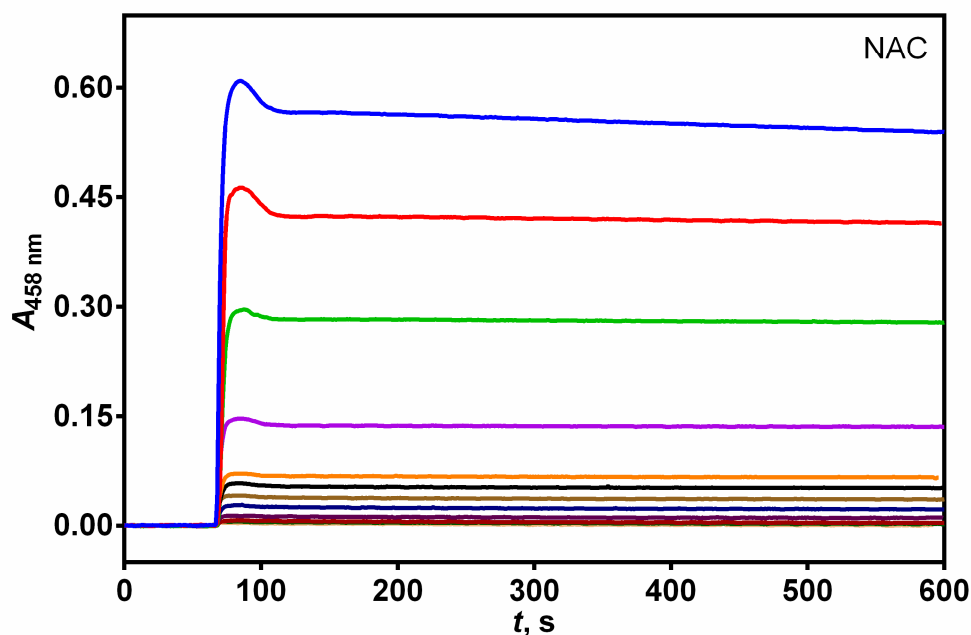
$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_b}{m} \quad (4-2)$$

gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a m je nagib krivulje umjeravanja.^[216]

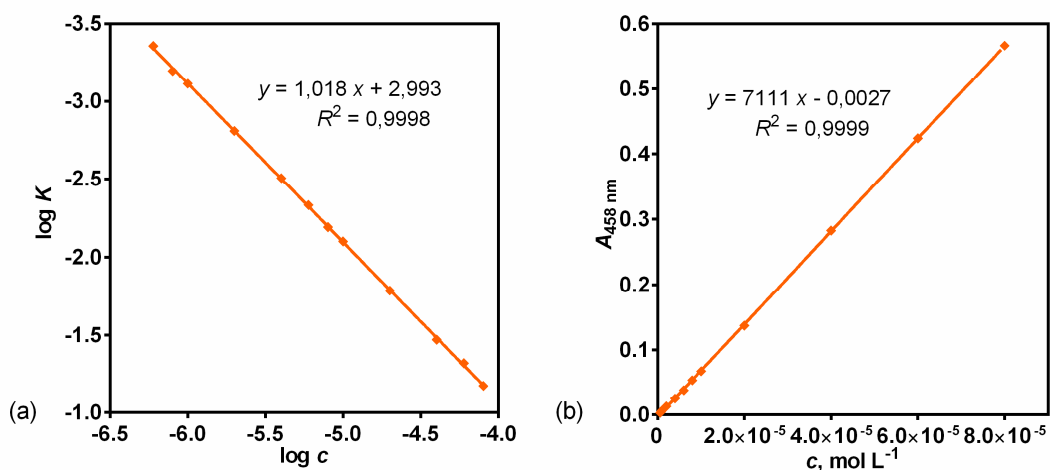
Granica određivanja (*Limit of quantification*, LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Izraz za izračunavanje granice određivanja glasi:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_b}{m} \quad (4-3)$$

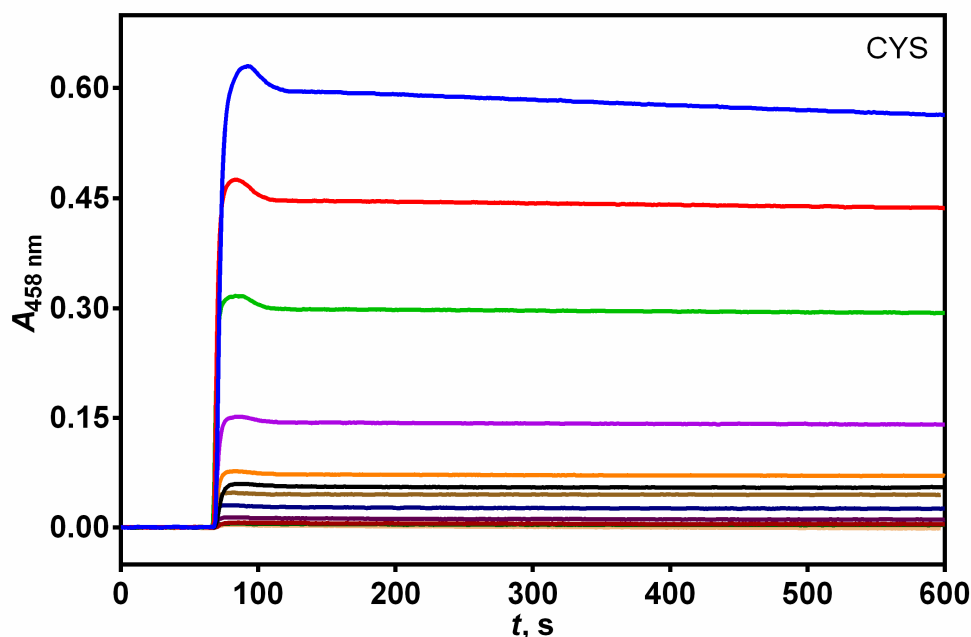
gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a m je nagib krivulje umjeravanja.^[216]



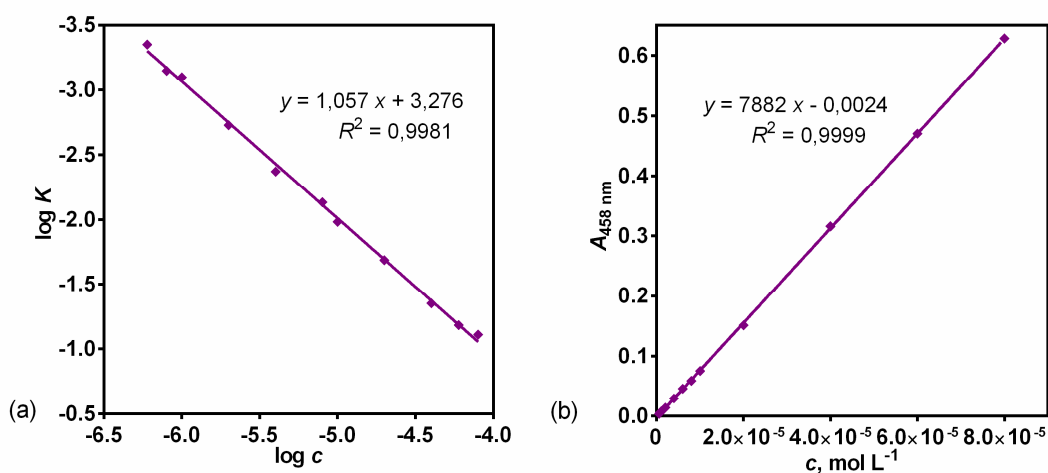
Slika 4-18 Ovisnost apsorbancije o vremenu za predloženu redoks reakciju određivanja *N*-acetil-L-cisteina (NAC). Koncentracijsko područje NAC-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; analit je dodan 1 min nakon početka eksperimenta.



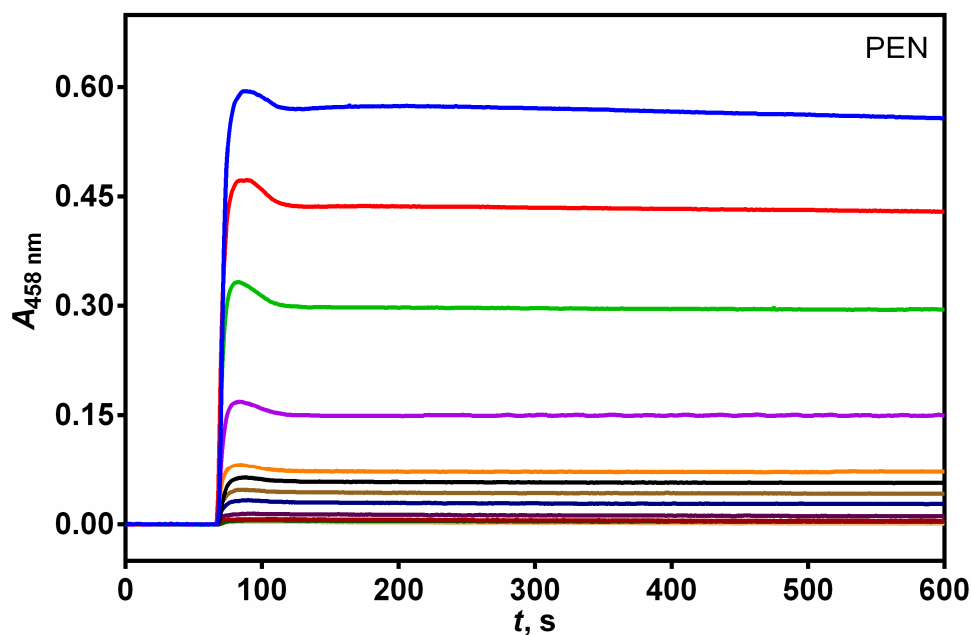
Slika 4-19 (a) Grafički prikaz ovisnosti $\log K$ o $\log c$, za metodu početne brzine: $c(\text{NAC}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; K je brzina reakcije (s^{-1}); (b) Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za metodu određenog vremena: $c(\text{NAC}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; apsorbancija je u kinetičkom eksperimentu zabilježena 1 minutu nakon početka reakcije (120 s mjerenja).



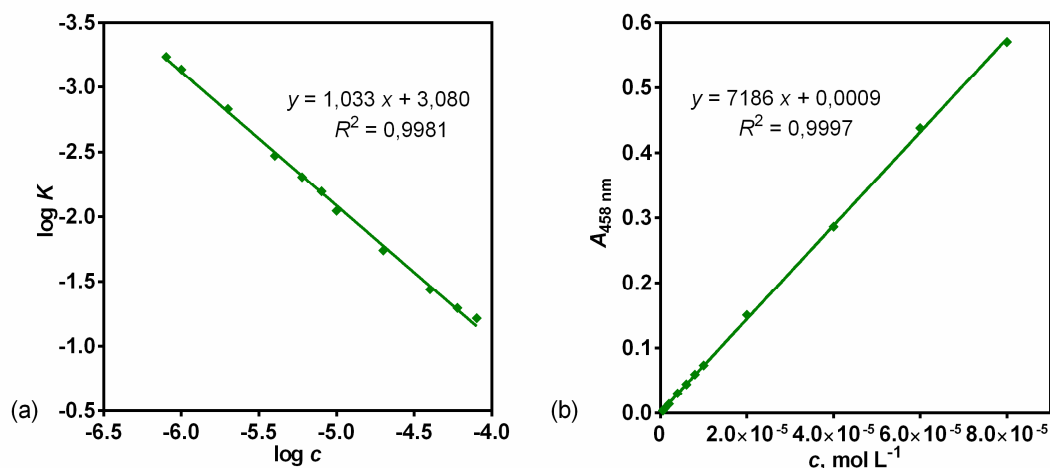
Slika 4-20 Ovisnost apsorbancije o vremenu za predloženu redoks reakciju određivanja cisteina (CYS). Koncentracijsko područje CYS-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; analit je dodan 1 min nakon početka eksperimenta.



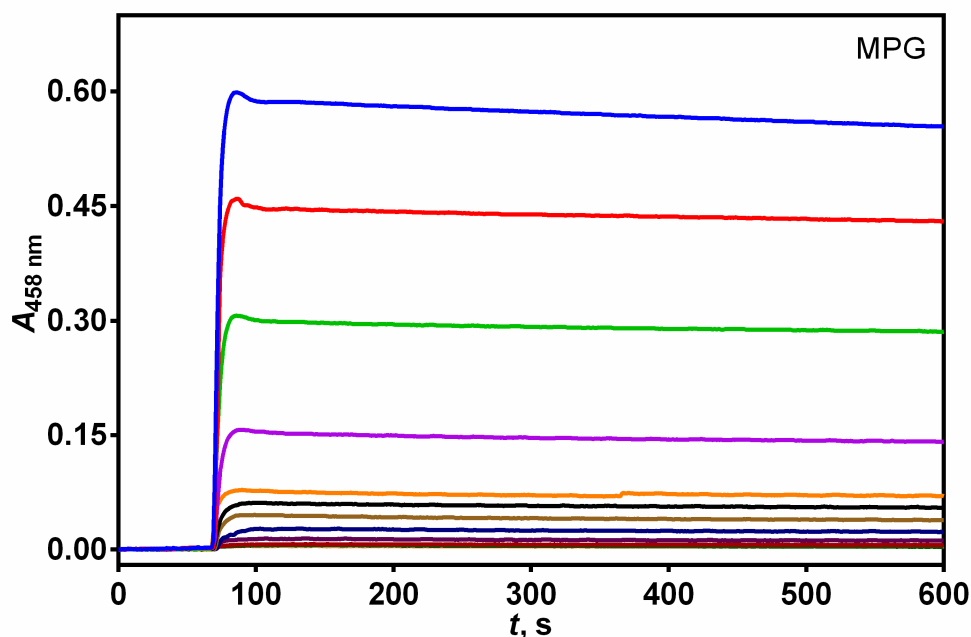
Slika 4-21 (a) Grafički prikaz ovisnosti $\log K$ o $\log c$, za metodu početne brzine: $c(\text{CYS}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; K je brzina reakcije (s^{-1}); (b) Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za metodu određenog vremena: $c(\text{CYS}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; apsorbancija je u kinetičkom eksperimentu zabilježena 0,5 minuta nakon početka reakcije (90 s mjerenja).



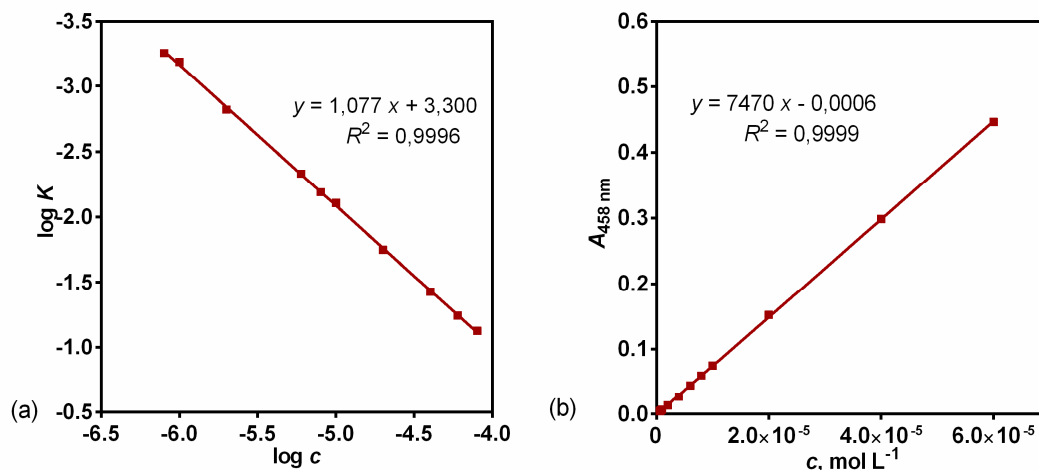
Slika 4-22 Ovisnost apsorbancije o vremenu za predloženu redoks reakciju određivanja penicilamina (PEN). Koncentracijsko područje PEN-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; analit je dodan 1 min nakon početka eksperimenta.



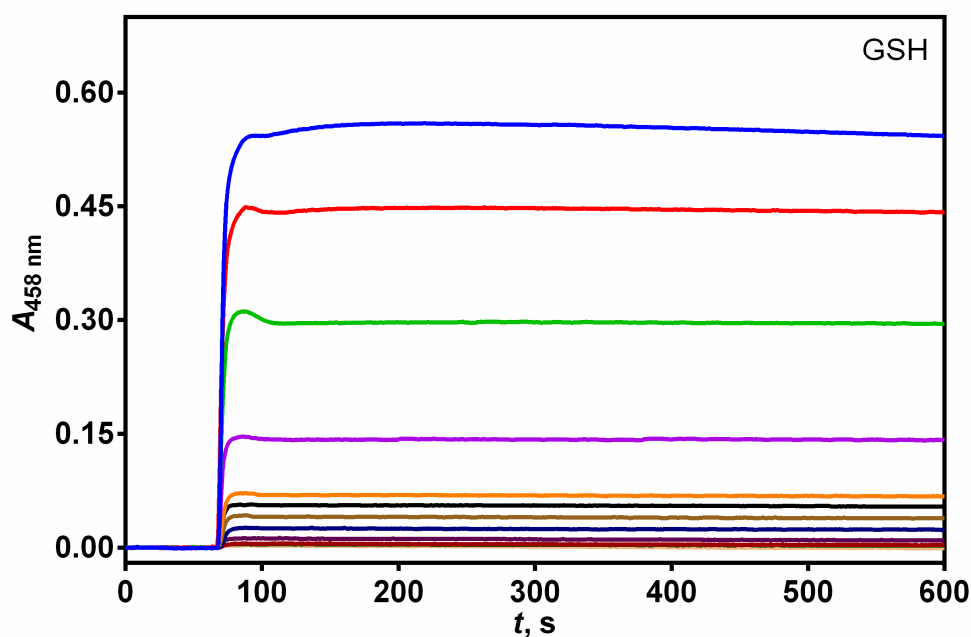
Slika 4-23 (a) Grafički prikaz ovisnosti $\log K$ o $\log c$, za metodu početne brzine: $c(\text{PEN}) = 8,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; K je brzina reakcije (s^{-1}); (b) Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za metodu određenog vremena: $c(\text{PEN}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; apsorbancija je u kinetičkom eksperimentu zabilježena 1 minutu nakon početka reakcije (120 s mjerenja).



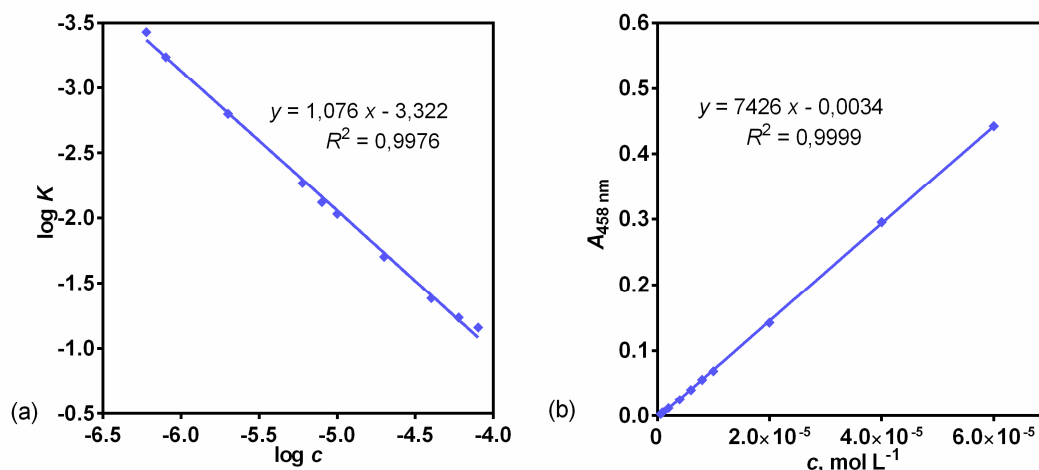
Slika 4-24 Ovisnost apsorbancije o vremenu za predloženu redoks reakciju određivanja tiopronina (MPG). Koncentracijsko područje MPG-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; analit je dodan 1 min nakon početka eksperimenta.



Slika 4-25 (a) Grafički prikaz ovisnosti $\log K$ o $\log c$, za metodu početne brzine: $c(\text{MPG}) = 8,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; K je brzina reakcije (s^{-1}); (b) Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za metodu određenog vremena: $c(\text{MPG}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; apsorbancija je u kinetičkom eksperimentu zabilježena 1 minutu nakon početka reakcije (120 s mjerenja).



Slika 4-26 Ovisnost apsorbancije o vremenu za predloženu redoks reakciju određivanja glutationa (GSH). Koncentracijsko područje GSH: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; analit je dodan 1 min nakon početka eksperimenta.



Slika 4-27 (a) Grafički prikaz ovisnosti $\log K$ o $\log c$, za metodu početne brzine: $c(\text{GSH}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; K je brzina reakcije (s^{-1}); (b) Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za metodu određenog vremena: $c(\text{GSH}) = 6,0 \times 10^{-7}$ do $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; apsorbancija je u kinetičkom eksperimentu zabilježena 1 minutu nakon početka reakcije (120 s mjerenja).

4.1.2.1. Metoda početne brzine

Metodom početne brzine određene su početne brzine reakcija (K) iz nagiba tangenti povučenih na strmi dio kinetičkih krivulja ($\Delta A/\Delta t$), ukoliko je red reakcije n jednak jedinici:

$$K = \frac{\Delta A}{\Delta t} = k' \cdot c^n \quad (4-4)$$

gdje je K brzina reakcije, A apsorbancija, t mjereno vrijeme, k' konstanta brzine pseudoprvog reda reakcije, c molarna koncentracija analita. Logaritamski oblik jednadžbe (4-4) glasi:

$$\log K = \log \frac{\Delta A}{\Delta t} = \log k' + n \log c. \quad (4-5)$$

Logaritamski zapis brzine reakcije ($\log K$) je prikazan kao funkcija logaritma koncentracije RSH ($\log c$). Iz eksperimentalnih podataka, prema logaritamskoj jednadžbi pravca određen je nagib pravca n koji približno iznosi 1 za sve određivane tiolne spojeve (tablica 4-2), stoga se može zaključiti da predložene redoks reakcije tiolnih spojeva sa bis neokuproin bakrovim(II) kompleksom slijede pseudoprvi red reakcije.

Tablica 4-2 Analitički parametri za metodu početne brzine razmatranih tiolnih spojeva

Analit	LDP, mol L ⁻¹	log K = n log c + log k'		R ²	LOD, mol L ⁻¹
		Nagib, n	Odsječak, log k'		
NAC	6,0×10 ⁻⁷ – 8,0×10 ⁻⁵	1,018	2,993	0,9998	1,7×10 ⁻⁷
CYS	6,0×10 ⁻⁷ – 8,0×10 ⁻⁵	1,057	3,276	0,9981	1,8×10 ⁻⁷
PEN	8,0×10 ⁻⁷ – 8,0×10 ⁻⁵	1,033	3,080	0,9981	2,4×10 ⁻⁷
MPG	8,0×10 ⁻⁷ – 8,0×10 ⁻⁵	1,077	3,300	0,9996	2,4×10 ⁻⁷
GSH	6,0×10 ⁻⁷ – 8,0×10 ⁻⁵	1,076	3,322	0,9976	1,8×10 ⁻⁷

4.1.2.2. Metoda određenog vremena

Kod metode određenog vremena analitički signali za različite koncentracije RSH su zabilježeni u točno određenom vremenu reakcije. Tijekom optimizacije ove računske metode, promatrani su različiti vremenski intervali za bilježenje apsorbancije. Krivulje umjeravanja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji RSH konstruirane su u točno određenom vremenu, te se odabire vrijeme u kojem je postignuta najbolja linearnost te najšire linearno koncentracijsko područje. Prihvatljivi rezultati su postignuti već na samom početku kemijske reakcije, a zadovoljavajuću linearnost se postiže 4 minute nakon početka kemijske reakcije. Međutim, budući da postoji stanovita nestabilnost reakcijskog produkta u kasnijem vremenu bilježenja signala ($t > 200$ s), osobito pri višim koncentracijama analita, vremenski intervali veći od 1 minute, iako imaju iskoristive vrijednosti, nisu pogodni za uzorkovanje signala.

Temeljem proračuna analitičkih parametara kinetičkih metoda analize određivanja tiolnih spojeva, određene su spektrometrijske karakteristike metoda: molarna apsorptivnost, ε i Sandellova osjetljivost, S , navedene u tablici 4-3.

Tablica 4-3 Spektrometrijske karakteristike kinetičke metode analize tiolnih spojeva

	NAC	CYS	PEN	MPG	GSH
$\lambda_{\max}$, nm	458	458	458	458	458
ε , L mol ⁻¹ cm ⁻¹	6369	7252	7010	7226	6333
S , $\mu\text{g cm}^{-2}$	$2,56 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-2}$	$2,13 \times 10^{-2}$	$2,26 \times 10^{-2}$	$4,85 \times 10^{-2}$

Tablica 4-4 Rezultati regresijske analize kod metode određenog vremena za određivanje NAC

Vrijeme uzorkovanja signala, min	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Linearno dinamičko područje, mol L ⁻¹	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$
Nagib regresijskog pravca	7601	7111	7113	7097	7090	7065	7041	7006
Odsječak na osi y	-0,0032	-0,0027	-0,0030	-0,0028	-0,0033	-0,0031	-0,0035	-0,0034
Korelacijski koeficijent, R ²	0,9997	0,9999	1,000	1,000	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

Tablica 4-5 Rezultati regresijske analize kod metode određenog vremena za određivanje CYS

Vrijeme uzorkovanja signala, min	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Linearno dinamičko područje, mol L ⁻¹	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$
Nagib regresijskog pravca	7882	7485	7471	7461	7441	7418	7383	7342
Odsječak na osi y	-0,0024	-0,0023	-0,0025	-0,0028	-0,0028	-0,0027	-0,0026	-0,0028
Korelacijski koeficijent, R ²	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9998

Tablica 4-6 Rezultati regresijske analize kod metode određenog vremena za određivanje PEN

Vrijeme uzorkovanja signala, min	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Linearno dinamičko područje, mol L ⁻¹	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$
Nagib regresijskog pravca	7628	7186	7232	7247	7249	7245	7224	7198
Odsječak na osi y	0,0032	0,0009	0,0005	0,0001	-0,0002	-0,0002	-0,0002	-0,0002
Korelacijski koeficijent, R ²	0,9978	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9996	0,9995

Tablica 4-7 Rezultati regresijske analize kod metode određenog vremena za određivanje MPG

Vrijeme uzorkovanja signala, min	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Linearno dinamičko područje, mol L ⁻¹	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$
Nagib regresijskog pravca	7624	7470	7447	7424	7409	7398	7358	7324
Odsječak na osi y	-0,0013	-0,0006	-0,0010	-0,0013	-0,0017	-0,0020	-0,0023	-0,0025
Korelacijski koeficijent, R ²	0,9996	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

Tablica 4-8 Rezultati regresijske analize kod metode određenog vremena za određivanje GSH

Vrijeme uzorkovanja signala, min	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Linearno dinamičko područje, mol L ⁻¹	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$
Nagib regresijskog pravca	7592	7426	7478	7505	7510	7516	7521	7517
Odsječak na osi y	-0,0029	-0,0034	-0,0037	-0,0041	-0,0042	-0,0044	-0,0047	-0,0049
Korelacijski koeficijent, R^2	0,9993	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

Tablica 4-9 Analitički parametri za metodu određenog vremena razmatranih tiolnih spojeva (RSH)

Analit	Vrijeme uzorkovanja signala, min*	LDP, mol L ⁻¹	$y = ax + b$		R^2	LOD, mol L ⁻¹
			Nagib, a	Odsječak, b		
NAC	1,0 (120 s)	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	7111	-0,0027	0,9999	$1,7 \times 10^{-7}$
CYS	0,5 (90 s)	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	7882	-0,0024	0,9999	$1,6 \times 10^{-7}$
PEN	1,0 (120 s)	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	7186	0,0009	0,9997	$1,4 \times 10^{-7}$
MPG	1,0 (120 s)	$6,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-5}$	7470	-0,0006	0,9999	$1,4 \times 10^{-7}$
GSH	1,0 (120 s)	$6,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-5}$	7426	-0,0034	0,9999	$1,1 \times 10^{-7}$

* Vrijeme u min označava vrijeme od dodatka analita do uzorkovanja signala. Vrijeme u s označava vrijeme od početka analitičkog mjerenja do uzorkovanja signala.

4.1.3. Vrednovanje razvijenih kinetičkih metoda analize tiolnih spojeva

U postupku vrednovanja razvijenih kinetičkih metoda određivanja tiolnih spojeva ispitani su: točnost metoda te utjecaj interferirajućih tvari, a zatim su opisane kinetičke metode analize primijenjene na određivanje razmatranih tiolnih spojeva u realnim uzorcima.

4.1.3.1. Točnost kinetičkih metoda analize tiolnih spojeva

Točnost metoda provjerena je ispitivanjem iskoristivosti kinetičkih spektrofotometrijskih metoda određivanja tiolnih spojeva koje su obrađene dvjema računskim metodama: metodom početne brzine i metodom određenog vremena.

Iskoristivost je svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita u uzorku. Zbog toga je iskoristivost izravno povezana sa točnošću metode i može se koristiti za procjenu njene primjenjivosti, posebice kada nema odgovarajuće referentne metode ili referentnog uzorka.

Iskoristivost metode se ispituje dodajući poznate količine standardne otopine tiolnih spojeva u otopinu farmaceutskog uzorka ili dodatka prehrani prije analize razvijenom metodom.

Iskoristivost metode određivanja cisteina nije mogla biti ispitana jer nisu dostupni komercijalni pripravci koji sadrže cistein.

U tablici 4-10 i 4-11 prikazani su rezultati ispitivanja iskoristivosti razvijenih kinetičkih metoda obrađeni dvjema računskim metodama. Iskoristivost izražena u postotcima kretala se u rasponu između 94,8 % i 102,9 %. Rezultati podržavaju točnost razvijenih kinetičkih metoda kao i odsutnost interferirajućih tvari u korištenim uzorcima.

Tablica 4-10 Ispitivanje iskoristivosti kinetičkih spektrofotometrijskih metoda analize određivanja RSH koristeći metodu početne brzine

Uzorak	Masa analita u uzorku, mg	Dodana masa analita, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
Fluimukan granule^a	100,0	–	100,8	–
		50	151,0	100,3 ± 0,7
		100	203,1	102,4 ± 1,0
		150	248,7	98,6 ± 1,1
		200	303,8	101,5 ± 1,1
Metalcaptase^b	300,0	–	300,7	–
		50	332,9	95,1 ± 1,0
		100	387,4	96,9 ± 0,8
		150	435,0	96,7 ± 1,7
		200	474,0	94,8 ± 1,4
Captimer^c	100,0	–	101,5	–
		50	154,4	102,9 ± 0,5
		100	195,4	97,7 ± 0,8
		150	253,5	101,4 ± 0,9
		200	288,9	96,3 ± 1,1
L-glutathione^d	50,0	–	51,1	–
		50	98,1	98,1 ± 0,3
		100	147,2	98,1 ± 0,6
		150	196,6	98,3 ± 0,4
		200	254,0	101,6 ± 0,8

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula koje sadrže 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^d Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

Tablica 4-11 Ispitivanje iskoristivosti kinetičke spektrofotometrijske metode analize određivanja RSH uz metodu određenog vremena

Uzorak	Masa analita u uzorku, mg	Dodana masa analita, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
Fluimukan granule^a	100,0	–	99,8	–
		50	149,8	99,9 ± 0,4
		100	202,6	101,3 ± 0,1
		150	247,2	98,9 ± 0,5
		200	305,0	101,7 ± 0,9
Metalcaptase^b	300,0	–	249,8	–
		50	346,9	99,1 ± 0,5
		100	396,7	99,2 ± 1,0
		150	456,2	101,4 ± 0,3
		200	504,1	100,8 ± 1,1
Captimer^c	100,0	–	100,7	–
		50	151,1	100,8 ± 0,1
		100	197,8	98,9 ± 1,1
		150	248,0	99,2 ± 0,9
		200	297,1	99,0 ± 0,5
L-glutathione^d	50,0	–	50,7	–
		50	98,8	98,8 ± 0,0
		100	147,7	98,4 ± 0,2
		150	195,8	97,9 ± 0,4
		200	242,5	97,0 ± 0,1

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula koje sadrže 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^d Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

4.1.3.2. Interferencije

Ispitan je utjecaj mogućih interferirajućih vrsta u smjesi sa tiolnim spojevima, koje mogu izazvati pogreške kod određivanja analita od interesa, a uobičajeno se nalaze kao pomoćne tvari komercijalnih farmaceutskih pripravaka.

Utjecaj stranog iona ili tvari ispitan je određivanjem koncentracije RSH u sintetskim otopinama koje sadrže RSH ($c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i različite koncentracije stranih tvari ili iona.

Dopuštena granica tolerancije je definirana kao koncentracija interferirajućih vrsta koje će izazvati pogrešku manju od $\pm 5 \%$ (4-6). S obzirom na izračunanu dopuštenu granicu tolerancije (jednadžba 4-6), u tablici 4-12 su navedene dopuštene koncentracije navedenih interferirajućih vrsta.

$$\text{Re } (\%) = \frac{\bar{A}_{\text{INT}} - \bar{A}_{\text{RSH}}}{\bar{A}_{\text{RSH}}} \cdot 100 \quad (4-6)$$

Tablica 4-12 Najviše dopuštene koncentracije interferirajućih vrsta prilikom određivanja tiolnih spojeva ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) razvijenim kinetičkim metodama

Analit	NAC	CYS	PEN	MPG	GSH
Interferirajuće tvari	Dopuštena koncentracija interferirajućih vrsta, mol L^{-1}				
Glukoza	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Fruktoza	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Saharoza	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$
Laktoza	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Kalijev nitrat	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Natrijev sulfat	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Natrijev citrat	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Borna kiselina	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Limunska kiselina	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Vinska kiselina	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Acetilsalicilna kiselina	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$

Čak 500 puta veća količina ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) ispitivanih ionskih vrsta (Na^+ , K^+ , NO_3^- , SO_4^{2-}) i organskih kiselina (borna kiselina, vinska kiselina, limunska kiselina) u odnosu na analit, RSH ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) nije uzrokovala interferencije. Nadalje, 100 puta veća koncentracija šećera (glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze) nije interferirala.

Potrebno je naglasiti da su ispitivane koncentracije interferirajućih vrsta mnogo veće od onih koje se obično nalaze u komercijalnim farmaceutskim proizvodima. Međutim pojava interferencija je očekivana kod prisutnosti tvari koje su snažni reducensi, kao što je askorbinska kiselina ili hidrazin, ali takve reducirajuće tvari nisu uobičajeno u sastavu farmaceutskih pripravaka i dodataka prehrani koji sadrže NAC, CYS, PEN, MPG i GSH. Naravno, i svi razmatrani tiolni spojevi interferiraju jedni drugima.

4.1.3.3. Realni uzorci

Razvijene kinetičke spektrofotometrijske metode određivanja tiolnih spojeva primijenjene su za određivanje RSH u različitim komercijalno dostupnim farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani. Priprava otopina farmaceutskih pripravaka (realnih uzoraka) navedena je u poglavlju 3.1.5.

Za svaki uzorak napravljena su tri mjerenja te je prosječna vrijednost apsorbancije korištena za daljnji proračun. Temeljem pripadajućih jednadžbi pravca dviju računskih kinetičkih metoda, dobivenih iz krivulja umjeravanja standardnih otopina tiolnih spojeva, izračunana je koncentracija pojedinačnog tiolnog spoja u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani. Potom je izračunana masa tiolnih spojeva u uzorku koja je uspoređena s masom koja je navedena na sekundarnoj ambalaži korištenih farmaceutskih pripravaka i dodataka prehrani. Standardne metode prema Britanskoj farmakopeji su poslužile kao usporedbene metode, a rezultati su prikazani u tablici 4-13.

Eksperimentalne vrijednosti obje računске metode pokazuju dobro slaganje rezultata mjerenja predloženim kinetičkim metodama uz spektrofotometrijski detektor sa kiselo-baznom potenciometrijskom titracijom u nevodenom mediju za određivanje PEN i redoks titracijama za određivanje NAC, MPG i GSH prema Britanskoj farmakopeji. Razvijene kinetičke spektrofotometrijske metode određivanja NAC, PEN, MPG, GSH su pouzdane za određivanje razmatranih tiolnih spojeva u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani bez prethodne složene obrade realnog uzorka.

Tablica 4-13 Određivanje RSH u realnim uzorcima razvijenim kinetičkim metodama analize uz spektrofotometrijski detektor i standardnim metodama koje propisuje Britanska farmakopeja

Uzorak	Deklarirana masa analita u uzorku, mg	Određena masa analita, mg Metoda A	Određena masa analita, mg Metoda B	Određena masa analita, mg Metoda C
Fluimukan granule^a	100	103,4 ± 0,5	102,6 ± 0,4	101,5 ± 0,8
Fluimukan Akut Junior sirup^b	100	100,8 ± 0,2	100,2 ± 0,3	100,3 ± 0,6
Fluimukan Akut šumeće tablete^c	600	605,2 ± 0,6	604,5 ± 0,9	605,6 ± 0,9
Metalcaptase^d	300	298,2 ± 0,5	294,8 ± 0,6	301,5 ± 0,8
Captimer^e	100	102,5 ± 0,7	100,7 ± 1,1	101,1 ± 1,4
L-glutathione^f	50	51,1 ± 0,8	50,7 ± 0,9	46,8 ± 0,7

^A Metoda početne brzine;

^B Metoda određenog vremena;

^C Standardna metoda prema Britanskoj farmakopeji;

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula koje sadrže 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku granula za otopinu koja sadrži 100 mg NAC-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 600 mg NAC-a;

^d Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^e Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^f Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

4.2. Metode analize injektiranjem u protok (FIA)

Razvoj metoda analize injektiranjem u protok (FIA) podrazumijeva ispitivanje utjecaja eksperimentalnih parametara (kemijskih parametara i parametara FIA sustava) na visinu analitičkog signala, detaljnije na osjetljivost, ponovljivost i moguću učestalost mjerenja. Kemijski parametri (pH-vrijednost, temperatura, koncentracija reaktanata) određuju kemizam reakcije, a parametri protočnog sustava (volumen injektiranog uzorka V_i , duljina reakcijske uzvojnice l , volumni protok osnovne otopine Q_{CS} i otopine reagensa Q_{RS}) utječu na doseg reakcije i učestalost injektiranja.

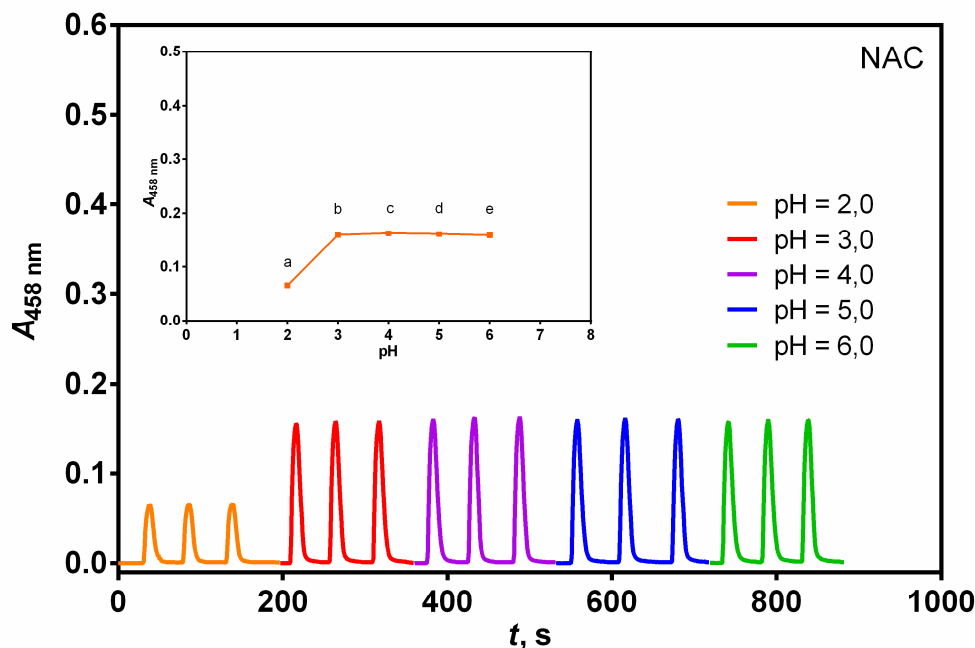
Optimizacijom kemijskih parametara i parametara protočnog sustava primarni je cilj unaprijediti analitička svojstva metode: osjetljivost, točnost i ponovljivost. Također je nužno utvrditi učestalost injektiranja, potrošnju reagensa i uzorka kao i cijenu potrebne opreme.

FIA metode se temelje na prethodno predloženoj redoks reakciji (4-1), prikazanoj i opisanoj u poglavlju 4., u kojoj tiolni spoj reducira zelenkasto obojeni bis neokuproin bakrov(II) kompleks u bis neokuproin bakrov(I) kompleks čija je otopina žuto-narančasto obojena. Već je ranije utvrđeno da kinetika reakcija određivanja razmatranih tiolnih spojeva obećava mogućnost razvoja metoda analize injektiranjem u protok.

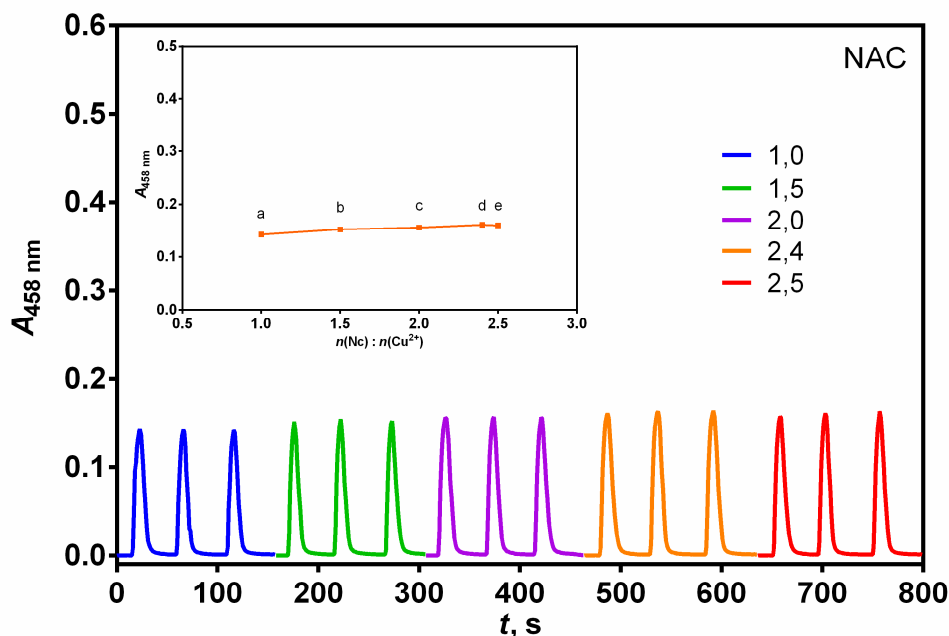
4.2.1. Optimizacija reakcijskih uvjeta (kemijskih parametara) u FIA sustavu

Prethodno optimizirani kemijski parametri kod kinetičkih metoda analize, provjeravani su prilikom razvoja metoda analize injektiranjem u protok. Metode analize injektiranjem u protok spadaju u kinetičke metode analize, budući da se signal bilježi u trenutku dok reakcija nije postigla stabilno stanje, odnosno u kinetičkom dijelu reakcije. Zbog osobitosti protočnog sustava i preklapanja zona u FIA sustavu, nije nužno slaganje vrijednosti kemijskih parametara sa optimiziranim kemijskim parametrima razvijene kinetičke metode analize "u čaši".

Već je kod optimizacije kemijskih parametara kinetičkih metoda analize utvrđena neovisnost brzine reakcije o pH-vrijednosti reakcijskog medija (unutar 10 s od početka reakcije). Navedeno je potvrđeno i prilikom optimizacije pH-vrijednosti reakcijskog medija u FIA sustavu. Zbog stabilnosti tiolnih spojeva pri nižim pH-vrijednostima za daljnja mjerenja je odabrana pH-vrijednost 3,0, najniža pH-vrijednost kod koje je postignuta maksimalna visina signala.



Slika 4-30 Fiagram optimizacije pH-vrijednosti kod određivanja NAC-a. pH-vrijednost: (a) 2,0; (b) 3,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o pH-vrijednosti za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

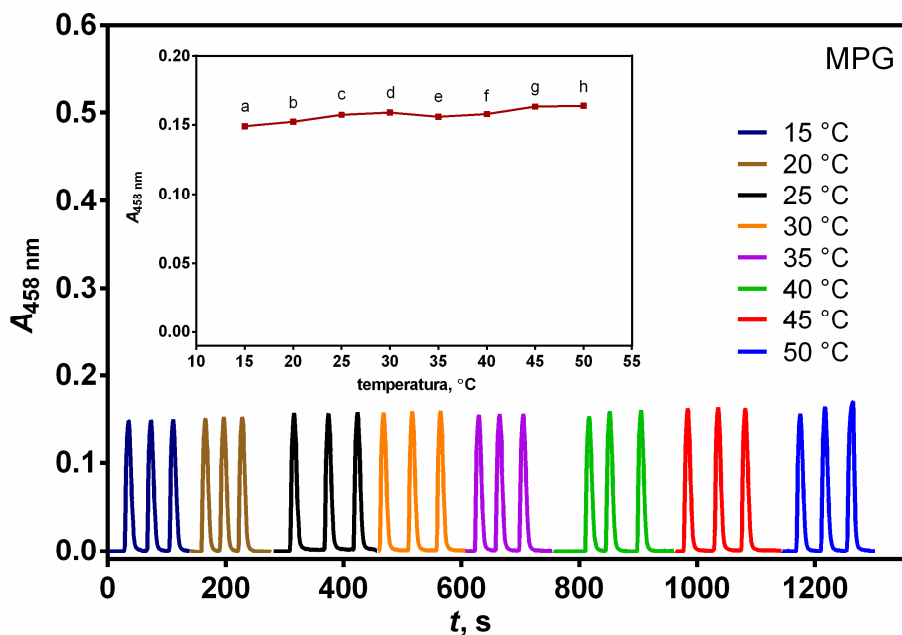


Slika 4-31 Fiagram optimizacije molarnog omjera reagensa kod određivanja NAC-a. Molarni omjer reagensa: (a) 1,0; (b) 1,5; (c) 2,0; (d) 2,4; (e) 2,5. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o molarnom omjeru reagensa za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

Koncentracija kolorimetrijskog reagensa optimizirana je na sljedeći način: koncentracija bakra(II) je održavana konstantnom, dok se koncentracija neokuproina mijenjala. Pri tome se molarni omjer neokuproina i bakra(II) mijenjao od 1,0 do 2,5. Visina vrha signala se neznatno povećava do omjera 2,0 što je vidljivo iz fiagrama optimizacije molarnog omjera reagensa (slika 4-31). S obzirom na visinu signala i ponovljivost, molarni omjer 2,4 odabran je kao optimalan.

Povišenje temperature uglavnom ima utjecaj na kemijske reakcije sa sporijom kinetikom te se u takvom slučaju povišenjem temperature može povećati osjetljivost metode. Međutim u protočnom sustavu, kod viših temperatura smanjuje se topljivosti plinova u grijanom sustavu, odnosno javljaju se mjehurići koji remete mjereni signal, kao i stabilnost osnovne linije.^[215]

U postupku optimizacije temperature, reakcijske otopine, kao i reakcijska uzvojnica, bile su uronjene u vodenu kupelj kontrolirane temperature, između 15 i 50 °C. Sama protočna kiveta unutar spektrofotometra nije bila termostatirana. Budući da je već pri sobnoj temperaturi brzina redoks reakcije značajna, promjene temperature reakcijske smjese nisu imale utjecaj na kinetiku same reakcije. Upravo je utvrđena temperaturna neovisnost prednost ove metode, jer se FIA sustav ne može lako termostatirati, a pri višim temperaturama signal je nestabilan. Unatoč manjim oscilacijama u temperaturi netermostatiranog sustava, laboratorijska mjerenja su ponovljiva i precizna, što je vidljivo na slici 4-32, a odabrana optimalna temperatura iznosi 25 °C.



Slika 4-32 Diagram optimizacije temperature kod određivanja MPG. Temperature: (a) 15; (b) 20; (c) 25; (d) 30; (e) 35; (f) 40; (g) 45; (h) 50 °C. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o temperaturi za spektrofotometrijsko određivanje MPG-a.

Optimalni kemijski parametri: pH-vrijednost, koncentracija bakra(II) i neokuproina i temperatura utvrđeni u prethodnom kinetičkom istraživanju, potvrđeni su u postupku optimizacije metoda analize injektiranjem u protok (tablica 4-13).

Tablica 4-13 Optimizacija parametara kemijske reakcije

Parametri	Ispitano područje	Optimalni uvjeti				
		NAC	CYS	PEN	MPG	GSH
Valna duljina, λ , nm	340 – 650	458	458	458	458	458
pH-vrijednost	2,0 – 8,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Molarni omjer Nc/Cu(II)	1,0 – 3,5	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Temperatura, °C	20 – 50	25	25	25	25	25

4.2.2. Optimizacija parametara FIA sustava

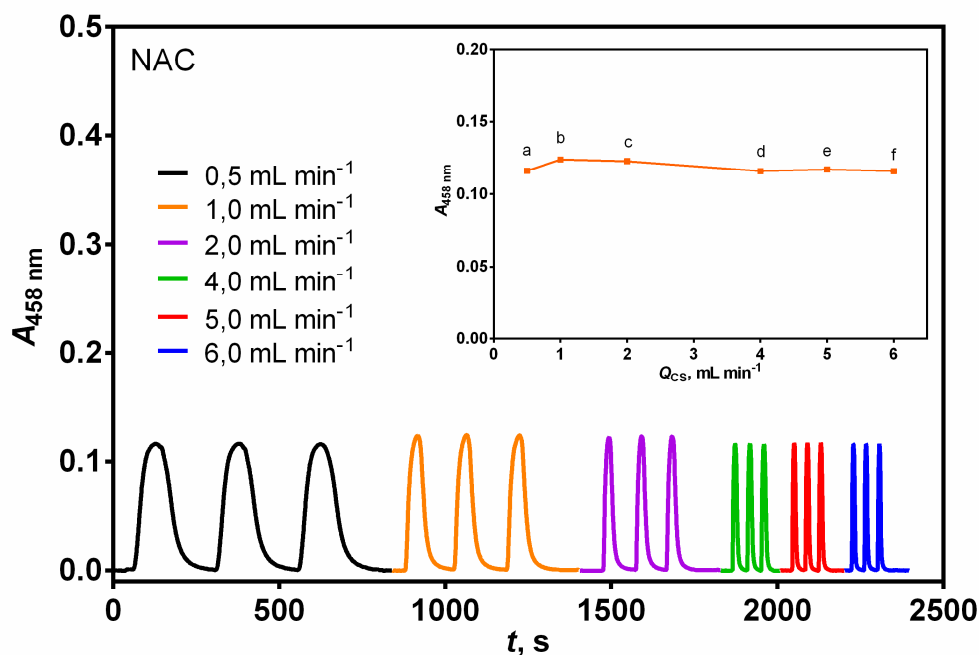
Optimizacija parametara FIA sustava je postupak koji se može provesti primjenom univarijantne metode^[217] ili multivarijantne kompjuterske metode^[218] (matematička simpleks metoda). Dok se kod univarijantne metode mijenja vrijednost jednog parametra, zadržavajući druge parametre pri konstantnim vrijednostima, multivarijantna metoda omogućuje istovremeno mijenjanje različitih parametara s ciljem postizanja geometrijskog simpleks oblika.^[218]

Za optimizaciju parametara protočnog sustava kao i kemijskih parametara, korištena je univarijantna metoda. Pri tome se jedna varijabla eksperimentalno mijenjala dok su druge varijable zadržavane pri njihovim konstantnim vrijednostima.^[218] Zatim je ta optimizirana varijabla zadržana stalnom, a sljedeća se mijenjala. Postupak se ponavljao za sve varijable, a optimalne vrijednosti su odabrane kao kompromis između učestalosti injektiranja, ponovljivosti analitičkog signala, stabilnosti bazne linije te osjetljivosti i selektivnosti metode.

4.2.2.1. Volumni protok osnovne otopine

Osnovna otopina u FIA sustavu struji kontinuirano bez zaustavljanja volumnog protoka. Volumni protok osnovne otopine, Q_{CS} ovisi o peristaltičkoj crpki, odnosno o onom rasponu volumnog protoka kojeg može osigurati, a da pri tom ne dođe do popuštanja sustava povezanih cijevi. Q_{CS} značajno utječe na disperziju: povećanjem volumnog protoka, smanjuje se disperzija zona reagensa i analita, a tako i putno vrijeme, t_a i vrijeme zadržavanja, T . Veći volumni protok skraćuje vrijeme reakcije, te smanjuje osjetljivost, ali se s druge strane povećava učestalost injektiranja.

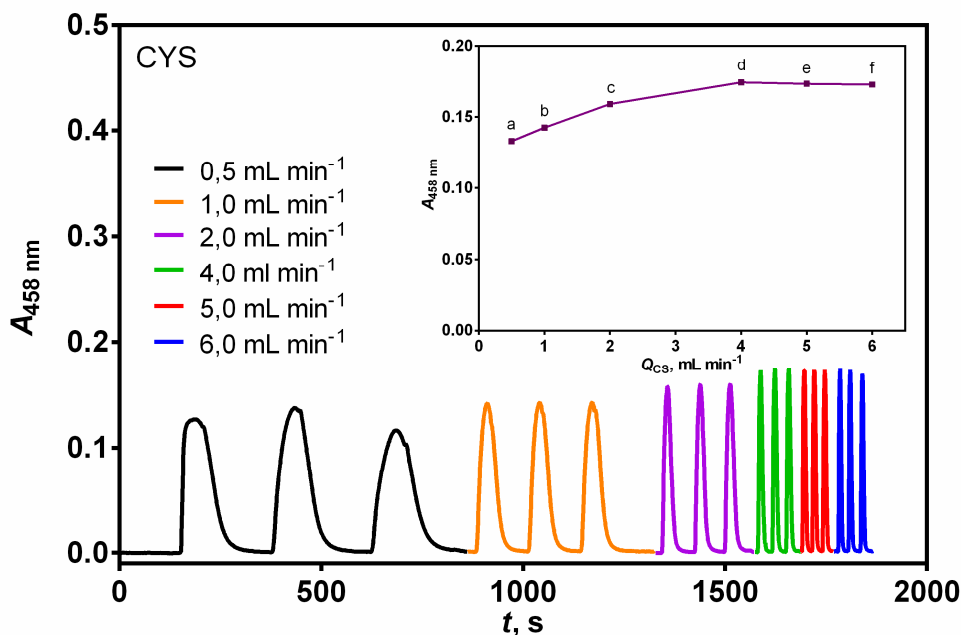
U nastavku su navedeni rezultati optimizacija volumnog protoka osnovne otopine za FIA metode određivanja tiolnih spojeva od interesa. Volumni protok otopine nosioca mijenjan je u rasponu od 0,5 do 6,0 mL min⁻¹.



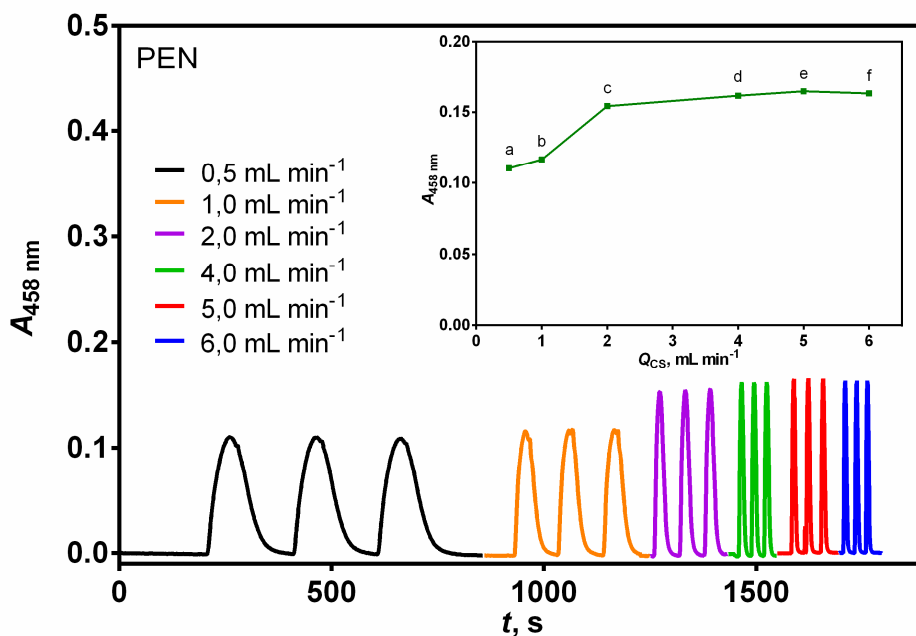
Slika 4-33 Diagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja NAC-a, Q_{CS} : (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 mL min⁻¹. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

Kod metode određivanja NAC-a povećanjem volumnog protoka osnovne otopine povećava se visina signala, te se istovremeno povećava brzina povratka signala na osnovnu liniju. S obzirom na brzu kinetiku razmatrane reakcije moguće je odabrati najveći volumni protok osnovne otopine iznosa 6,0 mL min⁻¹, a da pri tome ne bude ugrožena osjetljivost metode (slika 4-33).

Povećanjem volumnog protoka osnovne otopine, u FIA metodi određivanja cisteina, visina signala je značajno rasla, jednako kao i brzina povratka na osnovnu liniju. Pri volumnom protoku 4,0 mL min⁻¹, signal je najstabilniji i najviši te je brzina povratka na osnovnu liniju zadovoljavajuća (slika 4-34).



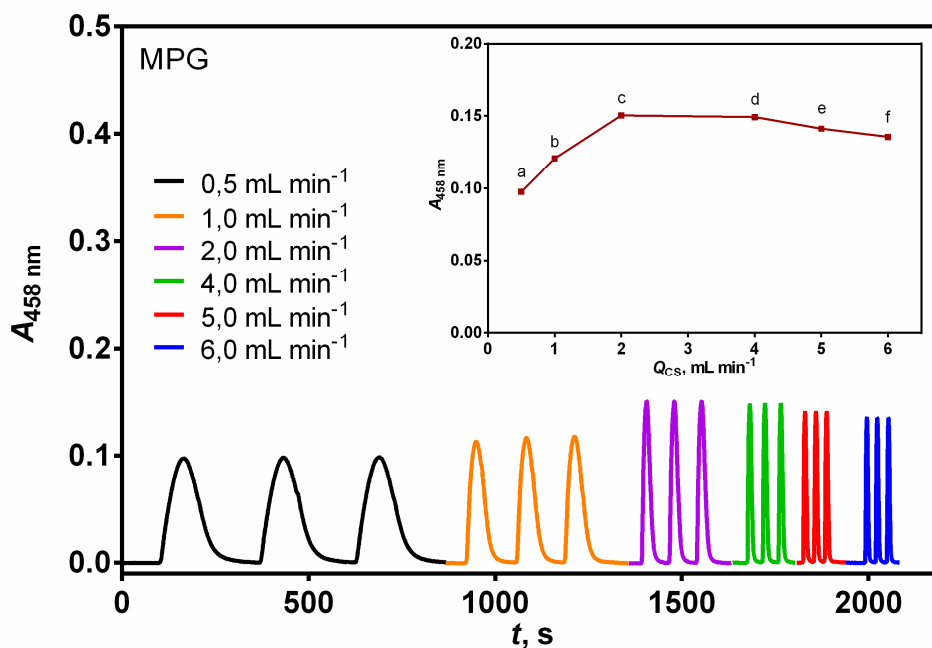
Slika 4-34 Diagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja CYS-a, Q_{CS} : (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{RS} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje CYS-a.



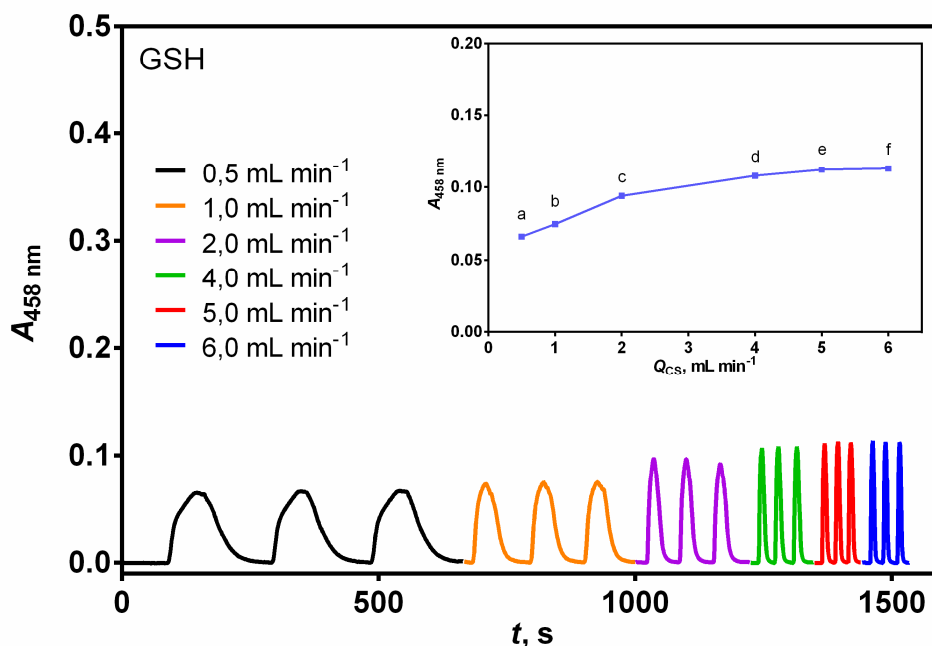
Slika 4-35 Diagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja PEN-a, Q_{CS} : (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{RS} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje PEN-a.

Prilikom određivanja penicilamina FIA metodom, povećanje volumnog protoka osnovne otopine značajno utječe na smanjenje disperzije, a pri tome i na putno vrijeme t_a . Već pri volumnom protoku $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ vidljiv je nagli porast signala kao i brzine povratka na osnovnu liniju. Odabran je volumni protok osnovne otopine $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ s obzirom da je najviši i najstabilniji signal postignut pri navedenom volumnom protoku (slika 4-35).

Pri višim volumnim protocima osnovne otopine neznatno se smanjuje visina signala tijekom određivanja tiopronina (MPG) u FIA metodi (slika 4-36), dok je vrijeme povratka maksimuma signala na osnovnu liniju skraćeno (vrijeme povratka T' se smanjuje). Optimalan Q_{CS} iznosi $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ za određivanje MPG-a FIA metodom s obzirom na najviši signal, a uz zadržavanje razumne učestalosti injektiranja.



Slika 4-36 Fiagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja MPG-a, Q_{CS} : (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{RS} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje MPG-a.



Slika 4-37 Fiagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja GSH, Q_{cs} : (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 mL min⁻¹. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje GSH.

Veći volumni protok osnovne otopine prilikom određivanja glutationa FIA metodom, uzrokuje povećanje signala i istovremeno smanjenje vremena zadržavanja T' , pri čemu se povećava učestalost uzorkovanja. S obzirom da pri volumnom protoku 5,0 i 6,0 mL min⁻¹ nema značajnijih promjena u visini signala, a i vrijeme povratka na osnovnu liniju se neznatno razlikuje, odabran je volumni protok osnovne otopine 5,0 mL min⁻¹ (slika 4-37).

4.2.2.2. Volumni protok otopine reagensa

Volumni protok otopine reagensa prvenstveno utječe na količinu reagensa koja se dovodi u kontakt s analitom. Povećanjem volumnog protoka reagensa povećava se i visina signala. Međutim povećanjem volumnog protoka otopine reagensa povećava se i ukupni volumni protok u stjencištu, te dalje kroz reakcijsku uzvojnici. Time je smanjeno vrijeme odvijanja kemijske reakcije kao i njen doseg, a time i visina signala.

Prilikom optimizacije volumnog protoka otopine reagensa korištene su cijevi različitih unutarnjih promjera. Promjena volumnog protoka otopine reagensa omogućena

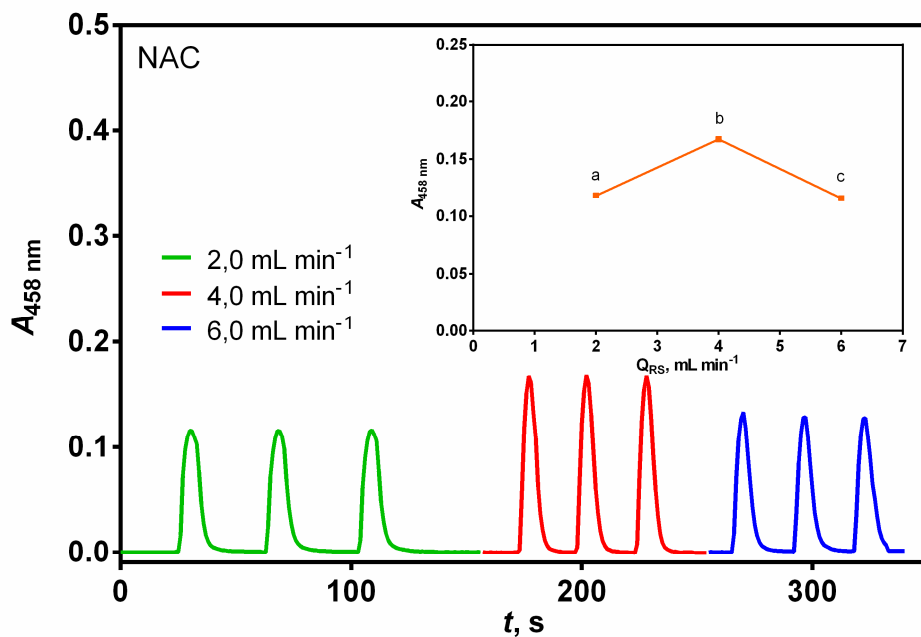
je promjenom cijevi različitog unutarnjeg promjera: *orange / white* 0,64 mm, *white / white* 1,02 mm, *gray / gray* 1,30 mm, pri konstantnoj brzini crpke.

Volumni protok otopine reagensa (Q_{RS}) mijenjan je između 1,0 i 6,0 mL min⁻¹ pri konstantnom optimalnom volumnom protoku otopine nosioca (osnovne otopine) za pojedini analit. Prema tome, ukupan volumni protok, u stjecištu, mijenjao se od 5,0 do 12,0 mL min⁻¹ (tablica 4-14).

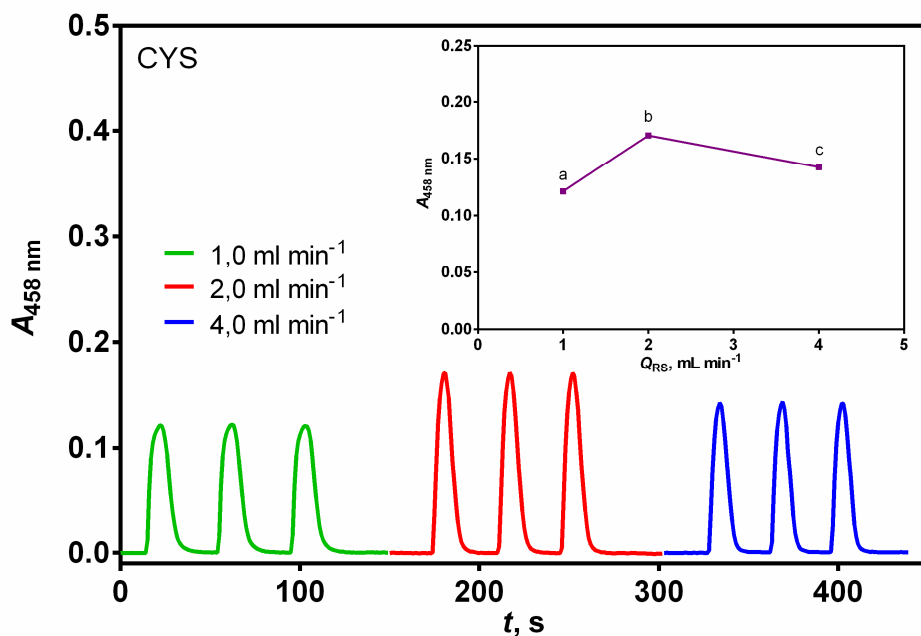
Tablica 4-14 Volumni protoci otopine reagensa i pripadajući ukupni volumni protoci u stjecištu

Analit	Q_{CS} , mL min ⁻¹	Q_{RS} , mL min ⁻¹			Q_{uk} , mL min ⁻¹		
		<i>orange / white</i>	<i>white / white</i>	<i>gray / gray</i>	<i>orange / white</i>	<i>white / white</i>	<i>gray / gray</i>
NAC	6,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
CYS	4,0	1,0	2,0	4,0	5,0	6,0	8,0
PEN	5,0	1,5	3,0	5,0	6,5	8,0	10,0
MPG	4,0	1,0	2,0	4,0	5,0	6,0	8,0
GSH	5,0	1,5	1,5	1,5	6,5	8,0	10,0

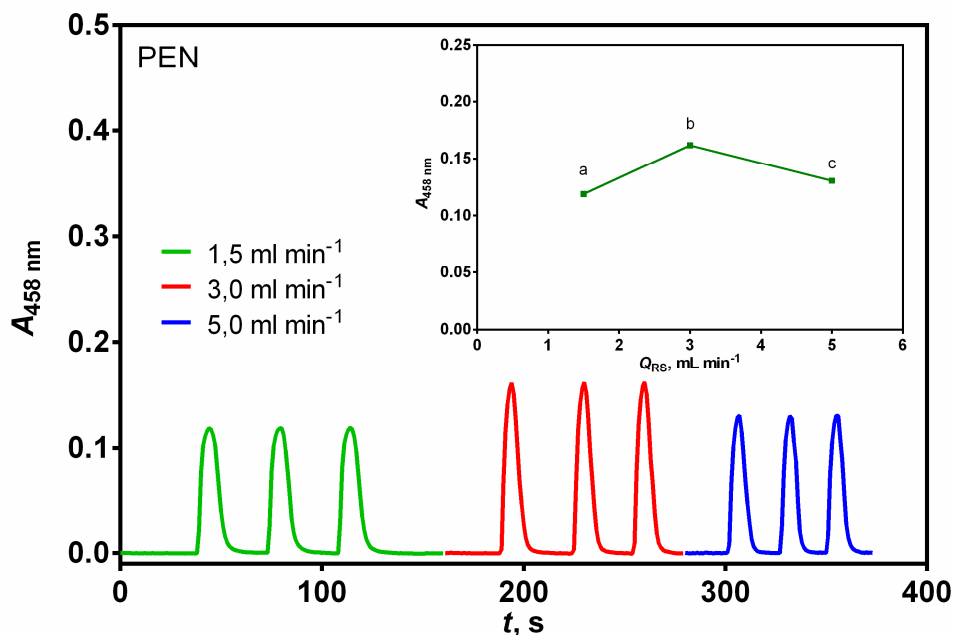
Kao što je vidljivo iz prikazanih fragmana optimizacija volumnog protoka otopine reagensa, u razvijanim protočnim metodama određivanja razmatranih tiolnih spojeva (slika 4-38; 4-39; 4-40; 4-41; 4-42) postoji pravilnost ovisnosti visine izmjerenih signala o volumnom protoku otopine reagensa. Pri manjem protoku (cijev *orange / white* 0,64 mm), signal je bio niži, budući da je i dostupnost reagensa bila niska. Pri najvećoj brzini strujanja (cijev *gray / gray* 1,30 mm), ukupni protok je porastao te se smanjio doseg reakcije unatoč značajnom povećanju dostupnosti reagensa. Optimalni unutarnji promjer cijevi struje reagensa *white / white* 1,02 mm odabran je uz pripadajući volumni protok otopine reagensa, jer je pri tom promjeru cijevi i volumnom protoku postignut veći i stabilniji signal. Potrošnja reagensa pri odabranim volumnim protocima iznosila je maksimalno 4 mL po jednom određivanju analita u triplicatu (tri uzastopna injektiranja analita).



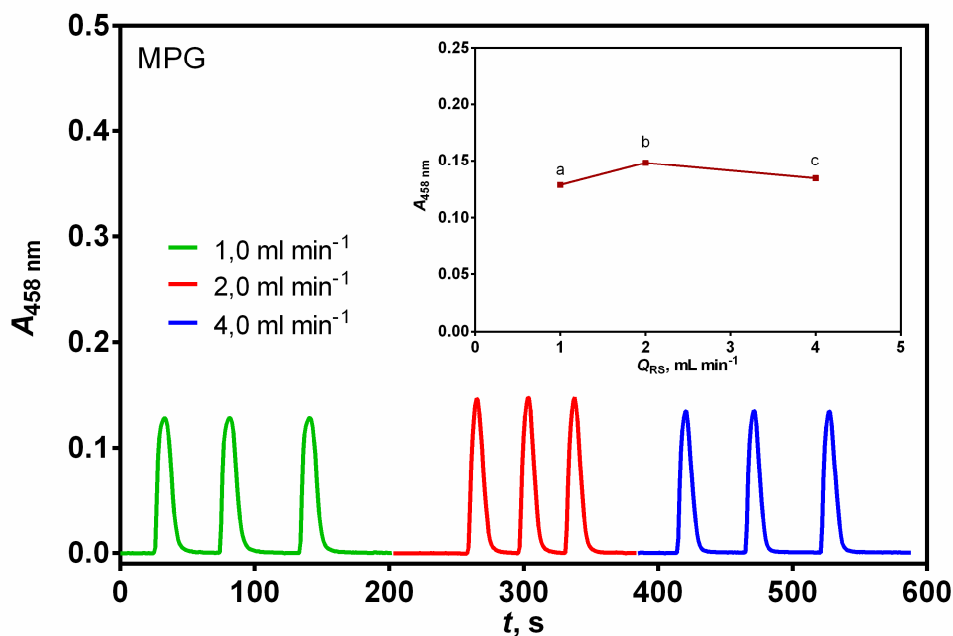
Slika 4-38 Diagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja NAC-a, Q_{RS} : (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{CS} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 60 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.



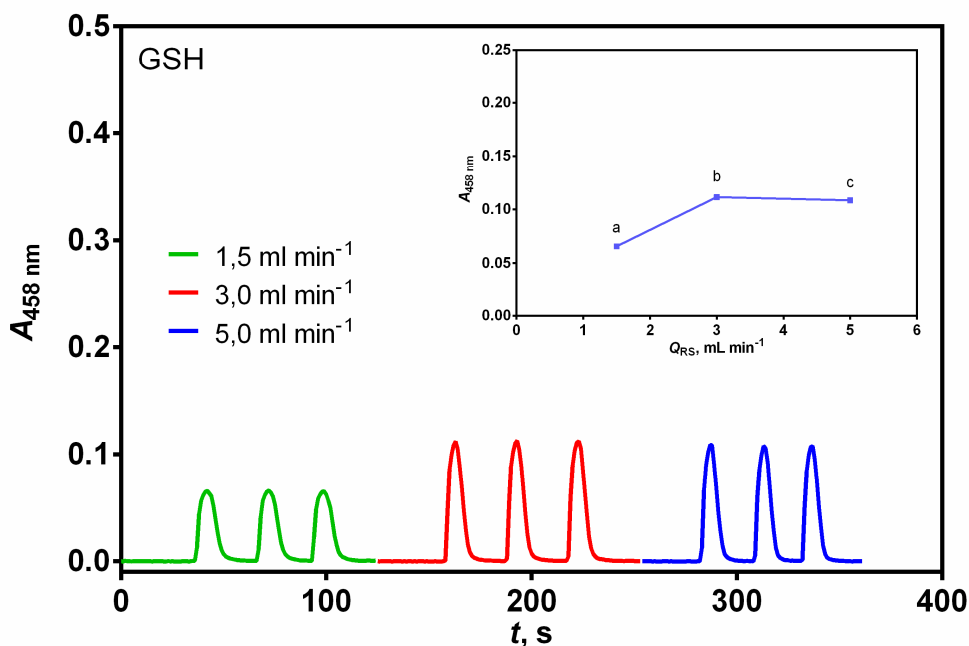
Slika 4-39 Diagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja CYS-a, Q_{RS} : (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 4,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{CS} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje CYS-a.



Slika 4-40 Diagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja PEN-a, Q_{RS} : (a) 1,5; (b) 3,0; (c) 5,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25 °C; $Q_{CS} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje PEN-a.



Slika 4-41 Diagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja MPG-a, Q_{RS} : (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 4,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25 °C; $Q_{CS} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje MPG-a.

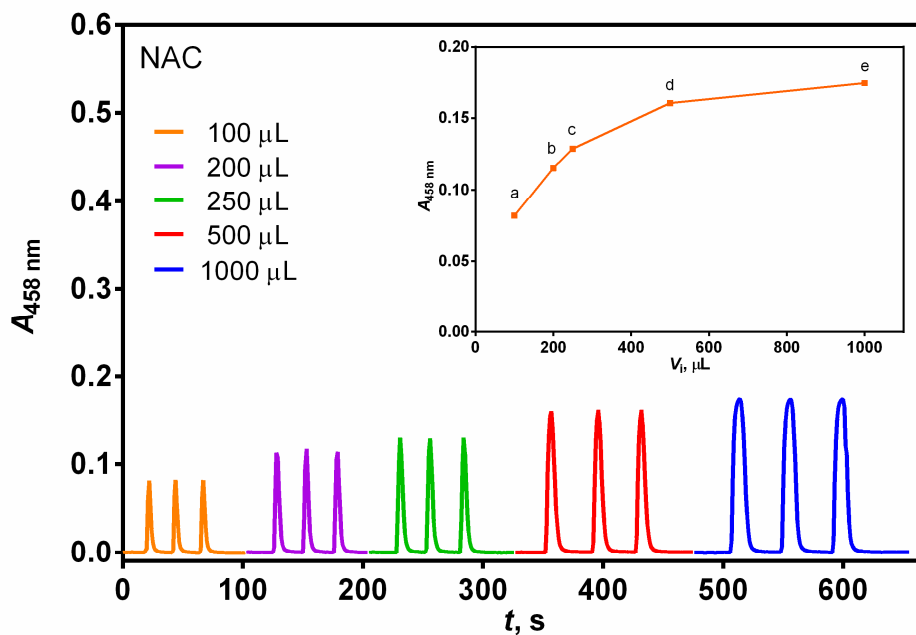


Slika 4-42 Fiagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja GSH, Q_{RS} : (a) 1,5; (b) 3,0; (c) 5,0 mL min^{-1} . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{CS} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje GSH.

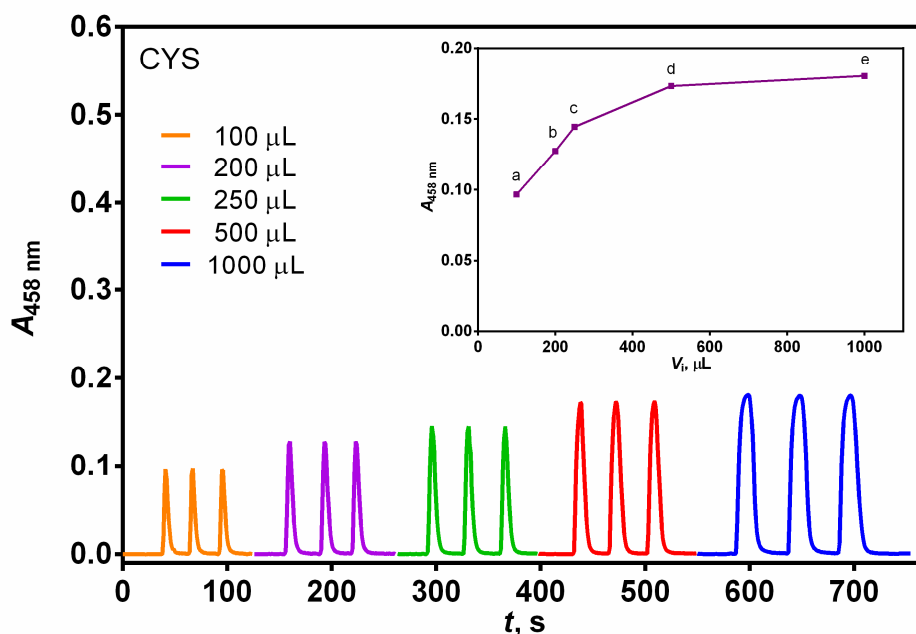
4.2.2.3. Volumen injektiranja otopine analita

Volumen injektiranja otopine uzorka (analita), V_i , kontrolira količinu analita koji se injektira u struju osnovne otopine, a optimizira se mijenjanjem duljine (odnosno volumena) injekcijske petlje smještene na injekcijskom ventilu. Utjecaj volumena injektiranja na određivanje tiolnih spojeva ispitan je injektiranjem različitih volumena RSH, koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Volumeni injektiranja definirani su volumenom injekcijske petlje od 100 do 1000 μL .

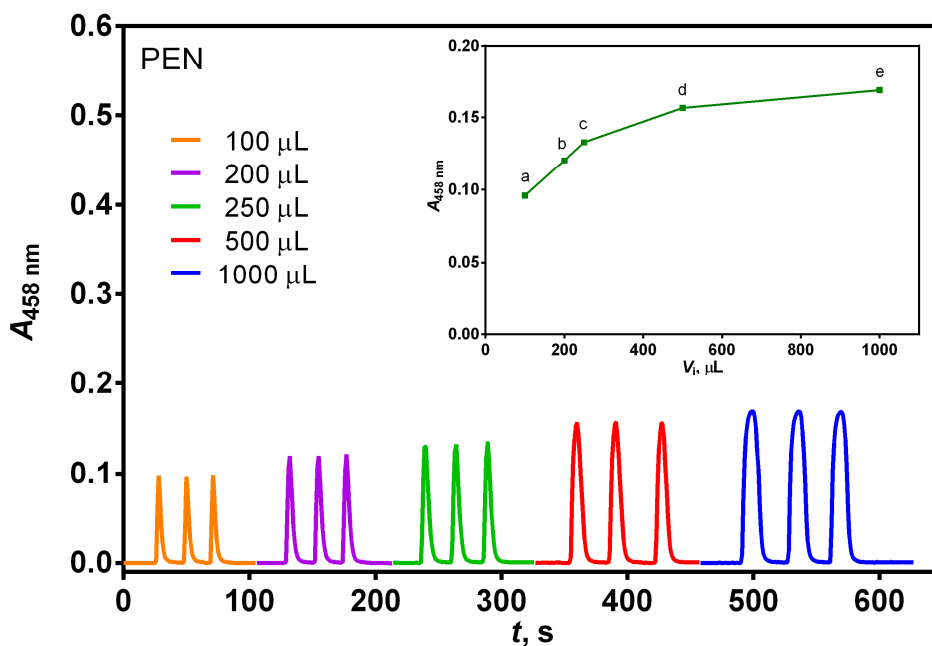
Razmatranjem zabilježenih fiagrama optimizacije V_i prilikom određivanja razmatranih tiolnih spojeva, uočen je veoma sličan obrazac ponašanja signala, gdje povećanjem volumena injektiranja uzoraka dolazi do nelinearnog povećanja signala (slika 4-43; 4-44; 4-45; 4-46; 4-47). Nadalje, povećanjem volumena injektiranog uzorka povećava se i ukupni volumen zone reagensa i analita te se povećava raspršenje što će rezultirati širim signalima u osnovici.



Slika 4-43 Fiagram optimizacije volumena injektiranog uzorka kod određivanja NAC-a, V_i : (a) 100; (b) 200; (c) 250; (d) 500; (e) 1000 μL . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $l = 60 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranog uzorka za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.



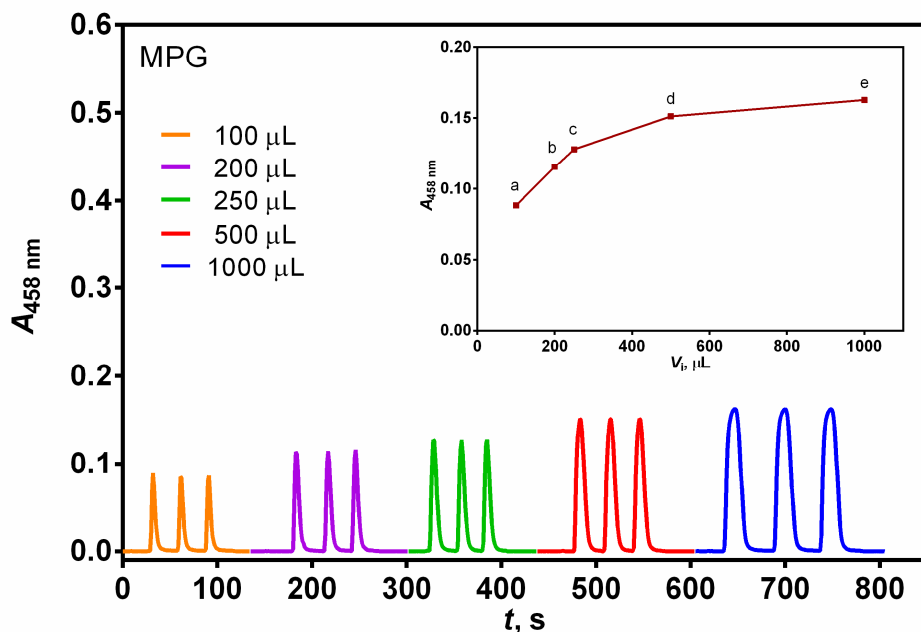
Slika 4-44 Fiagram optimizacije volumena injektiranog uzorka kod određivanja CYS-a, V_i : (a) 100; (b) 200; (c) 250; (d) 500; (e) 1000 μL . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranog uzorka za spektrofotometrijsko određivanje CYS-a.



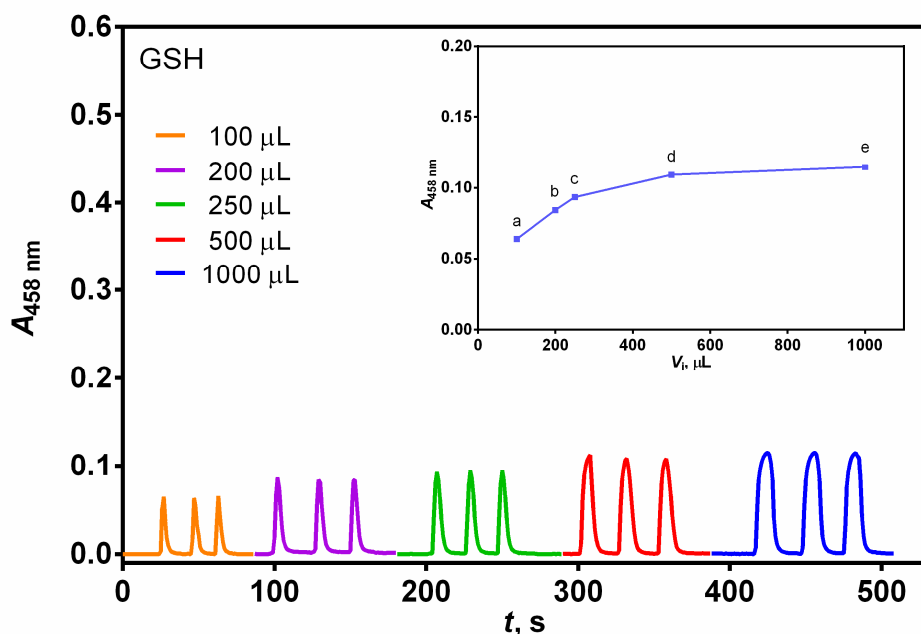
Slika 4-45 Fiagram optimizacije volumena injektiranog uzorka kod određivanja PEN-a, V_i : (a) 100; (b) 200; (c) 250; (d) 500; (e) 1000 μL . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranog uzorka za spektrofotometrijsko određivanje PEN-a.

Ukoliko se razmotre osnovice pikova na fiagramima optimizacije V_i , tijekom injektiranja 100, 200 i 250 μL otopina tiolnih spojeva od interesa, vidljiva je neznatna promjena širine pika s povećanjem V_i , a pri tom signal raste pri čemu se povećava osjetljivost metoda. Međutim pri volumenu injektiranja analita od 500 μL , vidljiv je značajan porast visine signala uz neznatno povećanje širine osnovice pika.

Nadalje je vidljiv je vrlo malen utjecaj daljnjih povećanja volumena injektiranih analita (većih od 500 μL) na povećanje analitičkog signala, tijekom određivanja razmatranih tiolnih spojeva FIA metodom. Injektiranjem 1000 μL RSH, širina pika u osnovici se značajno povećava, pri čemu se povećava i vrijeme potrebno za povratak na osnovnu liniju. Dolazi do povećanja razlike između vremena zadržavanja i putnog vremena uslijed sve većeg doprinosa difuzije. Time je smanjena učestalost analiza. Stoga je volumen injektiranja 500 μL *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutaciona odabran kao optimalan, ostvarujući kompromis između osjetljivosti i učestalosti analize.



Slika 4-46 Fiagram optimizacije volumena injektiranog uzorka kod određivanja MPG-a, V_i : (a) 100; (b) 200; (c) 250; (d) 500; (e) 1000 μL . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranog uzorka za spektrofotometrijsko određivanje MPG-a.



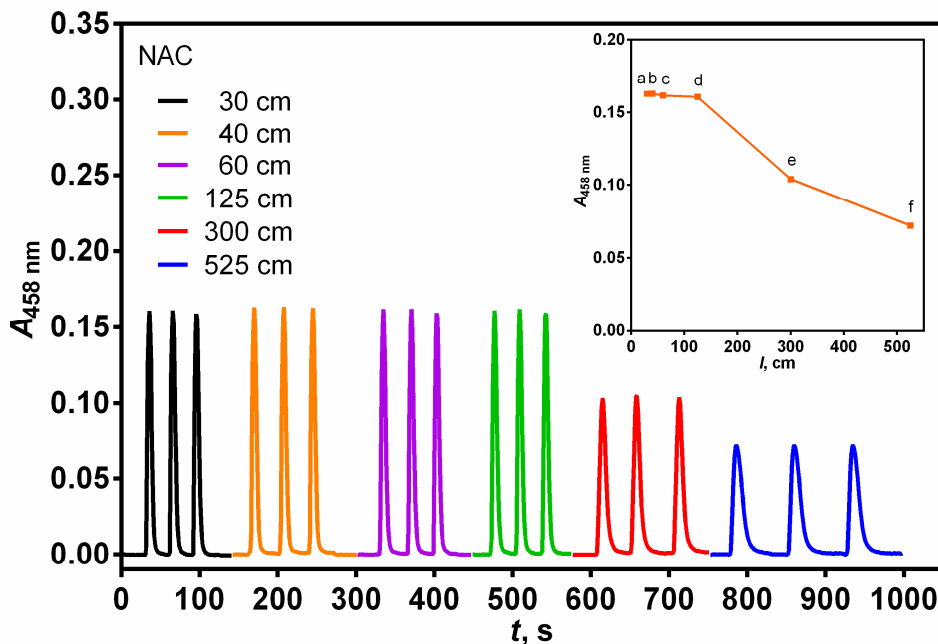
Slika 4-47 Fiagram optimizacije volumena injektiranog uzorka kod određivanja GSH, V_i : (a) 100; (b) 200; (c) 250; (d) 500; (e) 1000 μL . Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranog uzorka za spektrofotometrijsko određivanje GSH.

4.2.2.4. Duljina reakcijske uzvojnice

U reakcijskoj uzvojnici dolazi do preklapanja zone analita i reagensa gdje se odvija i redoks-reakcija. Stoga duljina reakcijske uzvojnice određuje vrijeme reakcije između analita i reagensa. Kod duljih reakcijskih uvojnica povećava se vrijeme odvijanja reakcije, čime se ostvaruje veća potpunost reakcije, a samim time i veća osjetljivost metode. Duljina reakcijske uzvojnice utječe i na stabilnost osnovne linije.

Disperzija uzorka je značajan čimbenik prilikom optimizacije duljine reakcijske uzvojnice, a mijenja se sa oblikom cijevi. Disperzija je maksimalna u ravnim cijevima, dok zanemarivo manji utjecaj pokazuje kod spiralno namotanih cijevi. Prilikom ispitivanja utjecaja duljine reakcijske uzvojnice na određivanje razmatranih tiolnih spojeva, korišteni su ravni reaktori duljine 30, 40 i 60 cm te reakcijske uzvojnice duljine 125, 300 i 525 cm.

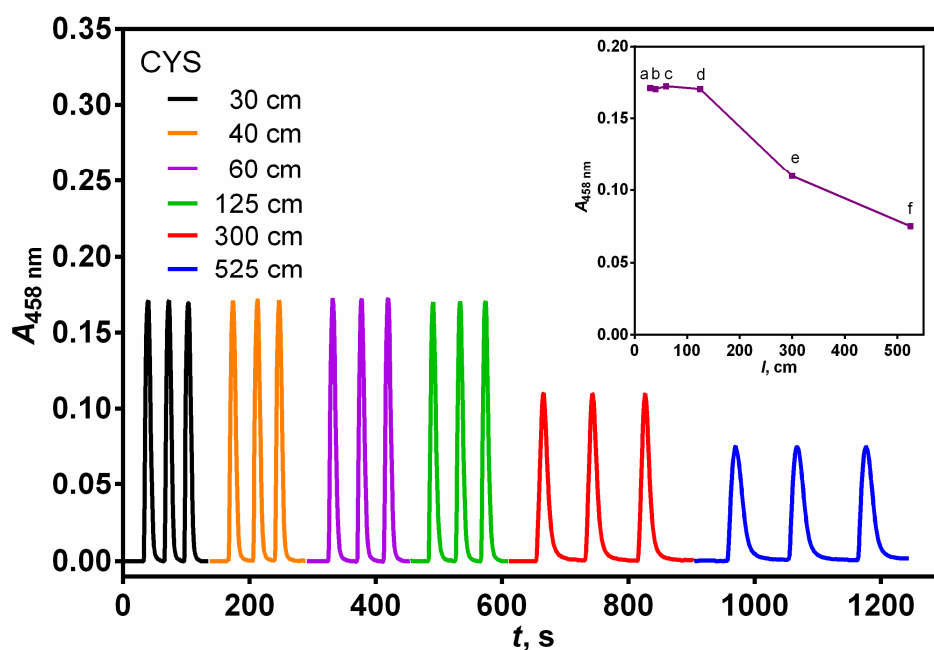
Na sljedećim slikama (slika 4-48; 4-49; 4-50; 4-51; 4-52;) prikazan je utjecaj duljine reakcijske uzvojnice na određivanje NAC-a, CYS-a, PEN-a, MPG-a i GSH, ispitivan u rasponu od 30 do 525 cm, što odgovara volumenu od 0,15 do 2,64 mL.



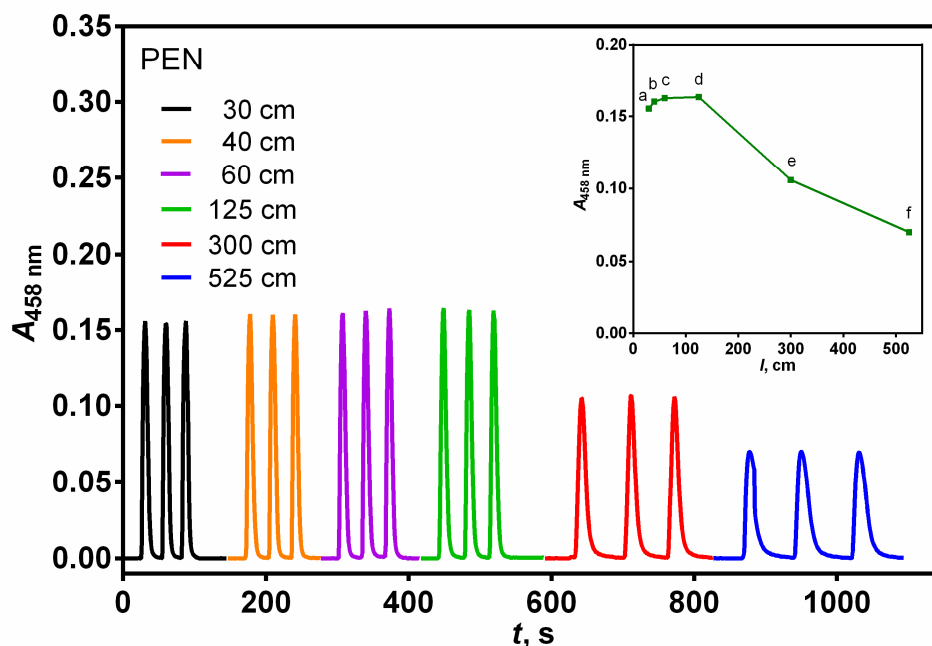
Slika 4-48 Figram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja NAC-a, *l*: (a) 30; (b) 40; (c) 60; (d) 125; (e) 300; (f) 525 cm. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

Iako duljina reakcijske uzvojnice određuje vrijeme reakcije između analita i reagensa, dijagrami ovisnosti apsorbancije o vremenu tijekom određivanja navedenih tiolnih spojeva pokazuju da nema značajnog utjecaja duljine reakcijske uzvojnice u rasponu od 30 do 60 cm zbog brze redoks reakcije.

Povećanjem duljine reakcijskih uzvojnica od 30 do 125 cm, nema značajnog povećanja širine zbrojnih vremenskih signala tijekom određivanja ispitivanih tiolnih spojeva. Pri tome nema ni značajnih promjena u visini signala. Tijekom određivanja PEN-a, MPG-a i GSH (slike 4-50; 4-51; 4-52), blago povećanje visina signala se može smatrati zanemarivim zbog brze kinetike redoks reakcija u kojima sudjeluju navedeni tiolni spojevi. Kod reakcijske uzvojnice duljine 125 cm, nešto veće širine osnovica signala upućuju na blagi utjecaj disperzije prilikom određivanja NAC-a, CYS-a, PEN-a, MPG-a i GSH.



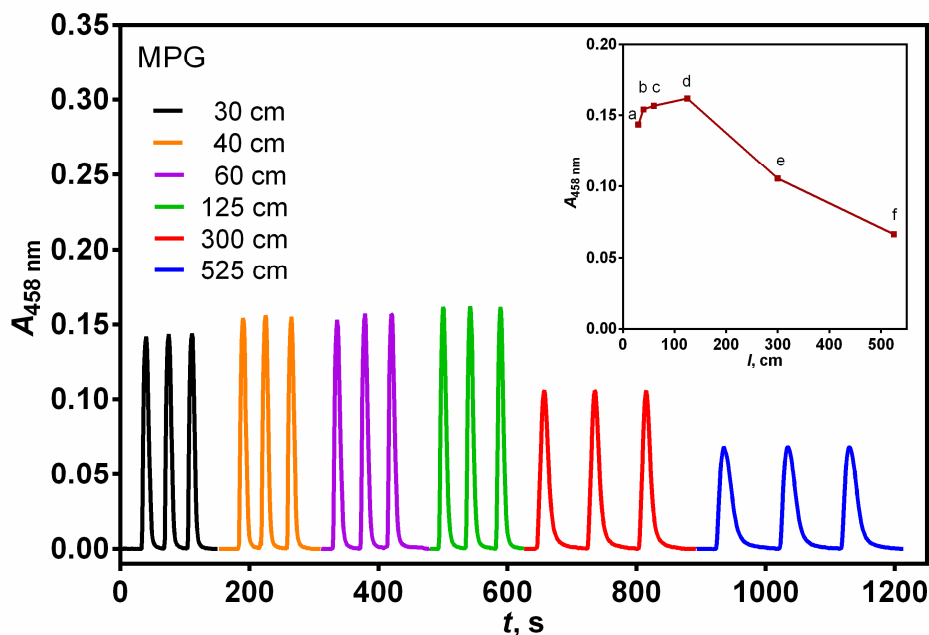
Slika 4-49 Diagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja CYS-a, *l*: (a) 30; (b) 40; (c) 60; (d) 125; (e) 300; (f) 525 cm. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje CYS-a.



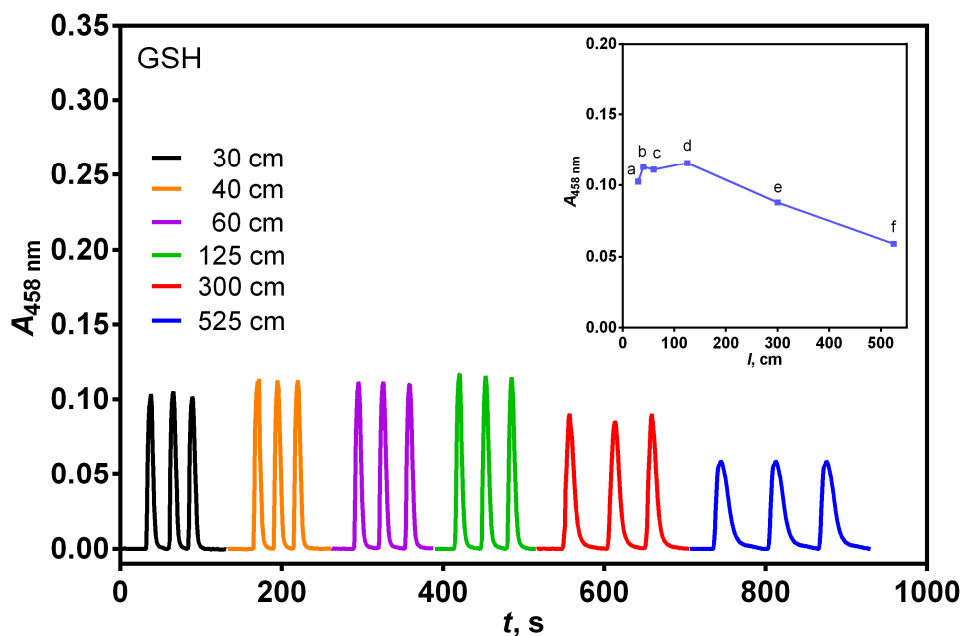
Slika 4-50 Diagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja PEN-a, l : (a) 30; (b) 40; (c) 60; (d) 125; (e) 300; (f) 525 cm. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje PEN-a.

Pri većim duljinama reakcijske uzvojnice (300 i 525 cm), kod određivanja razmatranih RSH, signal se naglo smanjuje zbog povećanja disperzije uzorka, a uslijed toga se i širina pika povećava. Pri tome ne dolazi do pomaka osnovne linije, ali se vrijeme zadržavanja povećava.

Uzimajući u obzir visinu vrha signala, stabilnost bazne linije i vrijeme povratka na osnovnu liniju, duljine reakcijskih uzvojnica 40 cm su odabrane kao optimalne i korištene za daljnja mjerenja prilikom kvantitativne analize NAC-a, PEN-a, MPG-a i GSH. Duljina reakcijske uzvojnice 60 cm odabrana je kao optimalna prilikom određivanja CYS-a uzimajući u obzir ponovljivost i visinu vrha signala. Zbog brzih kinetika reakcija navedenih tiolnih spojeva i bis-neokuproin bakrova(II) kompleksa, dostatne su male duljine reakcijskih uzvojnica (40 i 60 cm).



Slika 4-51 Diagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja MPG-a, l : (a) 30; (b) 40; (c) 60; (d) 125; (e) 300; (f) 525 cm. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje MPG-a.



Slika 4-52 Diagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja GSH, l : (a) 30; (b) 40; (c) 60; (d) 125; (e) 300; (f) 525 cm. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje GSH.

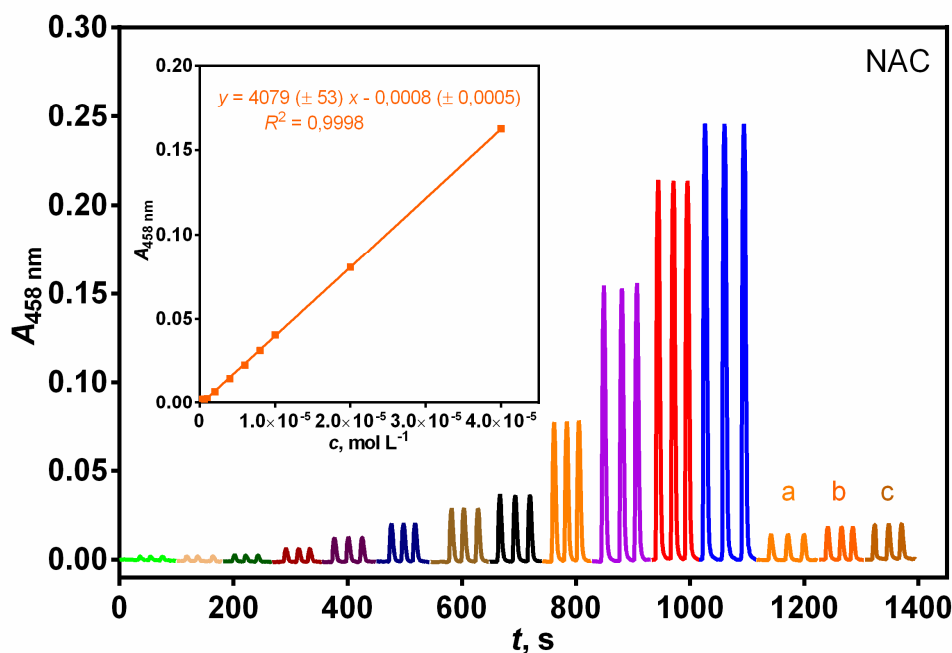
Tablica 4-15 Optimizacija parametara protočnog sustava

Parametri	Ispitano područje	Optimalni uvjeti				
		NAC	CYS	PEN	MPG	GSH
Volumni protok osnovne otopine, Q_{CS} , mL min ⁻¹	0,5 – 6,0	6,0	4,0	5,0	4,0	5,0
Volumni protok struje reagensa, Q_{RS} , mL min ⁻¹	1,5 – 6,0	4,0	2,0	3,0	2,0	3,0
Volumen injektiranja analita/uzorka, V_i , µL	100 – 1000	500	500	500	500	500
Duljina reakcijske uzvojnice, l , cm	30 – 525	40	60	40	40	40

4.2.3. Obrada rezultata FIA mjerenja

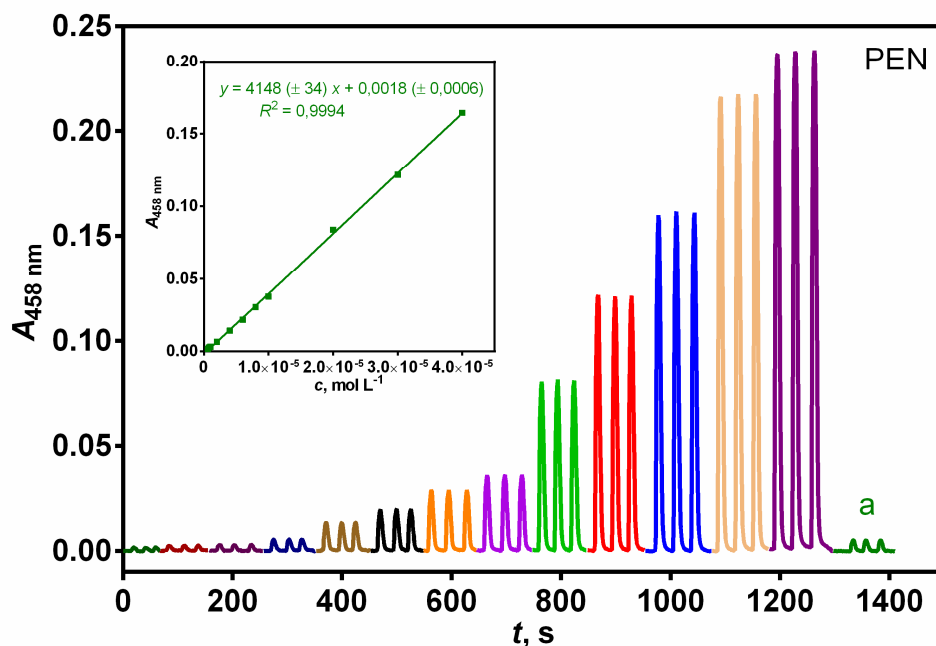
Provjereni kemijski parametri i parametri protočnog sustava optimizirani univarijantnom metodom za svaki razmatrani tiolni spoj (tablica 4-15), primijenili su se za određivanje razmatranih tiolnih spojeva metodom analize injektiranjem u protok. Standardne otopine analita točno poznatih koncentracija, injektiraju se uzastopno tri puta (triplikat) za pojedinu koncentraciju RSH. Zabilježeni su fiagrami za svaki pojedini tiolni spoj. Za svaku analiziranu koncentraciju analita u triplikatu određena je aritmetička sredina visine signala (apsorbancije).

Linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije tiolnih spojeva dobivene su jednadžbe pravaca uz pripadajuće koeficijent linearne regresije R^2 . Razvijene FIA metode za određivanje NAC, CYS, PEN, MPG i GSH su pokazale linearnost za široko područje koncentracija (približno dva reda veličine, što je ograničeno korištenim detektorom). Izračunane su najmanje količine RSH u uzorku koje se mogu kvalitativno odrediti (LOD) i koje se mogu kvantitativno odrediti (LOQ) prema odgovarajućim jednadžbama (4-2) i (4-3), a navedene su u tablici 4-16.

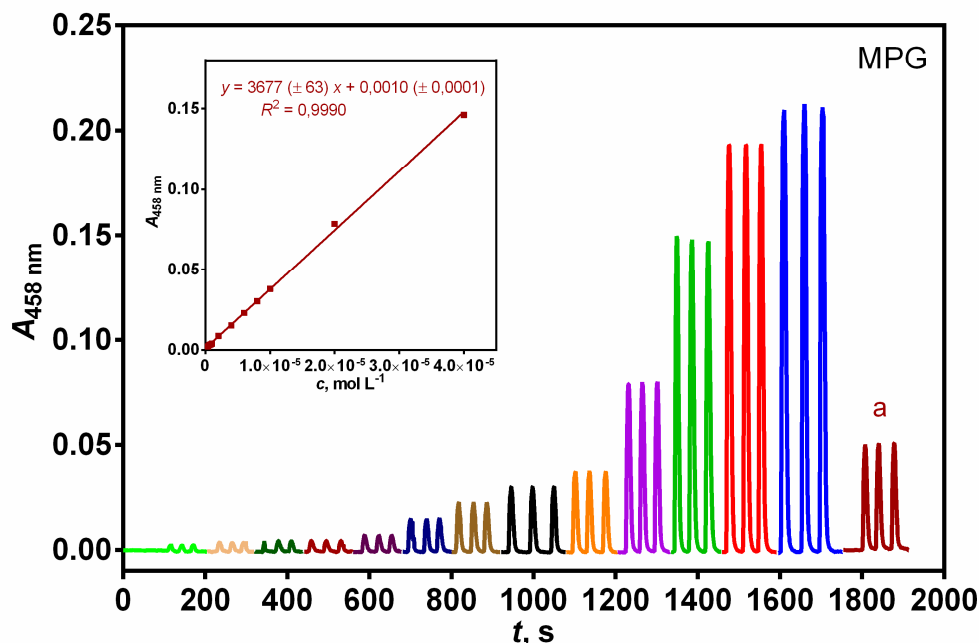


Slika 4-53 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja *N*-acetil-L-cisteina. Koncentracijski raspon NAC-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (a) realni uzorak Fluimukan granule; (b) realni uzorak Fluimukan Akut Junior sirup; (c) realni uzorak Fluimukan Akut šumeće tablete. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o koncentraciji NAC-a.

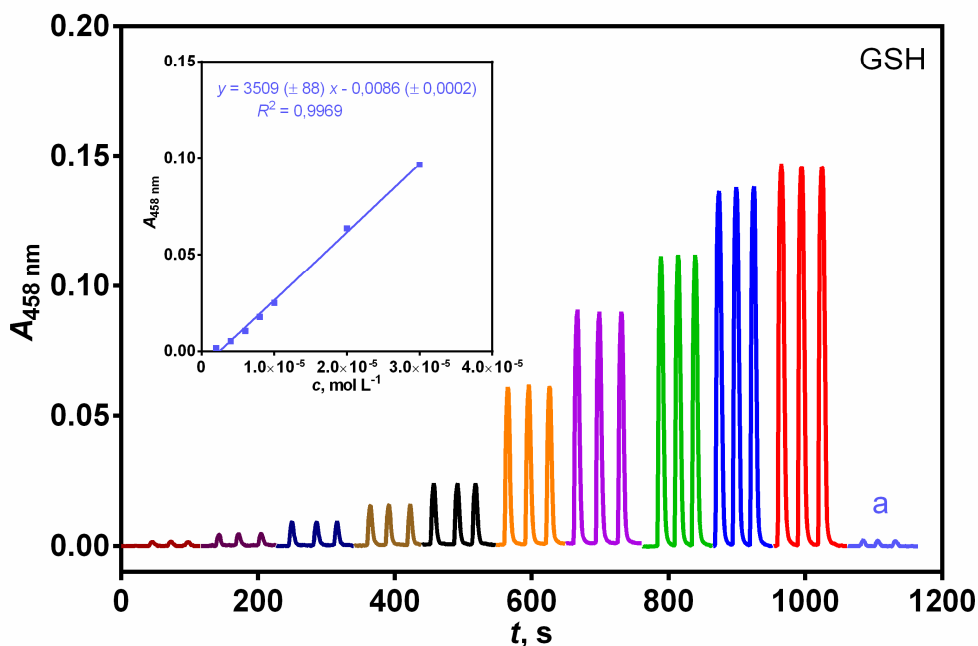
Na slikama 4-53; 4-54; 4-55; 4-56; 4-57 prikazani su fiagrami spektrofotometrijskog određivanja razmatranih tiolnih spojeva mjerenih u različitim koncentracijskim područjima. Uz signale ovisnosti apsorbancije o vremenu standardnih otopina NAC, PEN, MPG i GSH, prikazani su i izmjereni signali realnih uzoraka (označeni malim slovima (a), (b) ili (c)). Realni uzorci cisteina nisu prikazani budući da nema dostupnih komercijalnih pripravaka koji sadrže cistein (slika 4-57). Realni uzorci su farmaceutskih pripravci i dodatci prehrani koji sadrže odgovarajuće tiolne spojeve kao aktivne tvari: Fluimukan (NAC); Metalcaptase (PEN); Captimer (MPG); *L*-glutathione (GSH).



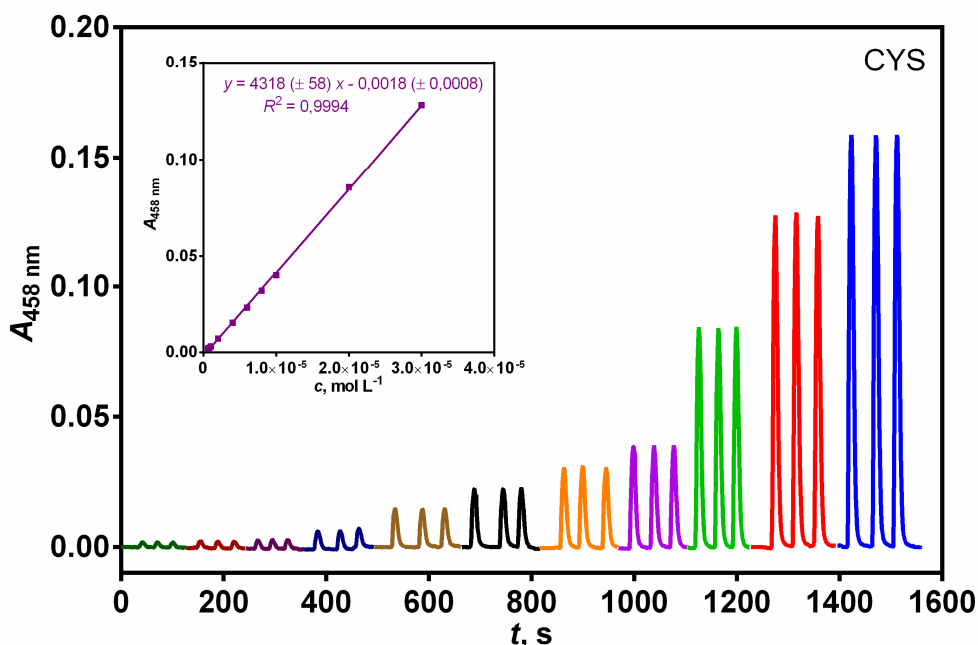
Slika 4-54 Diagram spektrofotometrijskog određivanja penicilamina. Koncentracijski raspon PEN-a: $6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (a) realni uzorak Metalcaptase. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o koncentraciji PEN-a.



Slika 4-55 Diagram spektrofotometrijskog određivanja tiopronina. Koncentracijski raspon MPG-a: $4,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (a) realni uzorak Captimer. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o koncentraciji MPG-a.



Slika 4-56 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja glutationa. Koncentracijski raspon GSH-a: $2,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (a) realni uzorak L-glutathione. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o koncentraciji GSH.



Slika 4-57 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja cisteina. Koncentracijski raspon CYS-a: $6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$; $l = 60 \text{ cm}$. Umetak: ovisnost apsorbancije o koncentraciji CYS-a.

Tablica 4-16 Analitički parametri spektrofotometrijske FIA metode za određivanje RSH

Analit	Raspon koncentracija krivulja umjeravanja, mol L⁻¹	Linearno dinamičko područje, mol L⁻¹	Jednadžba pravca	R²	LOD, mol L⁻¹
NAC	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$y = 4079 x - 0,0008$	0,9998	$1,4 \times 10^{-7}$
CYS	$6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-5}$	$y = 4318 x - 0,0018$	0,9994	$1,5 \times 10^{-7}$
PEN	$6,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$y = 4148 x + 0,0018$	0,9994	$1,7 \times 10^{-7}$
MPG	$4,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$	$y = 3677 x + 0,0010$	0,9990	$1,3 \times 10^{-7}$
GSH	$2,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$	$y = 3509 x - 0,0086$	0,9969	$1,4 \times 10^{-7}$

4.2.3.1. Točnost (iskoristivost)

Točnost pokazuje podudaranje mjerene vrijednosti x_i s pravom ili očekivanom vrijednosti x_t , a izražava se kao apsolutna E ili relativna pogreška E_r (4-7).^[219]

$$E_r(\%) = \frac{x_i - x_t}{x_t} \cdot 100 \quad (4-7)$$

Tablica 4-17 Ispitivanje iskoristivosti FIA metode

Uzorak	Masa analita u uzorku, mg	Dodana masa analita, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
Fluimukan Akut Junior sirup^a	100,0	–	101,5	–
		50	151,1	100,7 ± 0,1
		100	202,7	102,0 ± 0,3
		150	252,6	101,3 ± 0,4
		200	299,9	99,6 ± 0,1
Metalcaptase^b	300,0	–	304,1	–
		50	355,3	101,5 ± 0,4
		100	410,4	102,6 ± 1,0
		150	457,2	101,6 ± 0,2
		200	486,0	97,2 ± 1,0
Captimer^c	100,0	–	98,1	–
		50	149,0	99,3 ± 0,9
		100	197,2	98,6 ± 1,1
		150	247,5	99,0 ± 0,8
		200	304,5	101,5 ± 0,6
L-glutathione^d	50,0	–	49,2	–
		50	97,2	97,2 ± 0,5
		100	149,3	99,5 ± 0,2
		150	202,2	101,1 ± 0,1
		200	256,8	102,7 ± 1,0

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula za otopinu koja sadrži 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^d Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

Iskoristivost metode upućuje na njenu točnost, a iskazuje sposobnost metode da izmjeri poznatu količinu supstance. Prilikom vrednovanja metode iskoristivost je ispitana dodatkom poznate mase ispitivane tvari otopinama odgovarajućeg realnog uzorka,

korištenjem standardnih otopina tiolnih spojeva, a zatim su pripravljene otopine analizirane razvijenim FIA metodama.

Rezultati ispitivanja iskoristivosti razvijenih spektrofotometrijskih FIA metoda za određivanje NAC, PEN, MPG i GSH su navedeni u tablici 4-17, a kreću se u rasponu od 97,2 do 102,7 %. Rezultati pokazuju zadovoljavajuću točnost razvijenih FIA metoda čime je potvrđeno da su iste metode pouzdane za određivanje tiolnih spojeva od interesa u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani.

4.2.3.2. Utjecaj interferirajućih vrsta

Ispitan je utjecaj interferirajućih vrsta koje su često prisutne u farmaceutskim pripravcima na određivanje tiolnih spojeva od interesa. Ispitivanja su provedena mjerenjem signala $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ RSH u odsutnosti i u prisutnosti interferencija. Dopuštena granica tolerancije iznosi $\pm 5 \%$. 500 puta veće koncentracije ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) natrija, kalija, nitrata, i sulfata nisu interferirale prilikom analize tiolnih spojeva. Također, 500 puta veći suvišak ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) glukoze, fruktoze, saharoze, kao i laktoze, nije interferirao određivanju RSH.

Borna kiselina i acetilsalicilna kiselina su pomoćne tvari koji su često prisutne uz tiolne spojeve u farmaceutskim pripravcima. Borna kiselina u suvišku od 500 puta ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) i acetilsalicilna kiselina u jednakoj koncentraciji kao i analit ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) nisu interferirale.

Vinska i limunska kiselina u 100 puta većoj koncentraciji ($4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) nisu interferirale prilikom određivanja NAC-a, međutim su značajno interferirale određivanju CYS, PEN, MPG i GSH. Natrijev citrat je također prešao granicu dopuštene tolerancije i interferirao pri određivanju CYS i MPG (tablica 4-18). Budući da navedene tvari imaju jako redukcijsko djelovanje, ne interferiraju razmatranim tiolnim spojevima tek u jednakoj koncentraciji kao i analit ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Međutim, koncentracije interferirajućih tvari, koje su ispitivane u ovom radu, su znatno veći od onih koji se obično nalaze u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Interferencije se očekuju od tvari koje posjeduju snažna redukcijska svojstva, npr. hidrazin ili askorbinska kiselina.^[42] Također je utvrđeno da razmatrani tiolni spojevi međusobno interferiraju.

Tablica 4-18 Najviše dopuštene koncentracije interferirajućih vrsta prilikom određivanja RSH ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) razvijenim FIA metodama

Analit	NAC	CYS	PEN	MPG	GSH
Interferirajuće tvari	Dozvoljena koncentracija interferirajućih tvari, mol L^{-1}				
Glukoza	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Fruktoza	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Saharoza	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Laktoza	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Kalijev nitrat	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$
Natrijev sulfat	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$
Natrijev citrat	$2,0 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-3}$
Borna kiselina	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Limunska kiselina	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$
Vinska kiselina	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$
Acetilsalicilna kiselina	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$

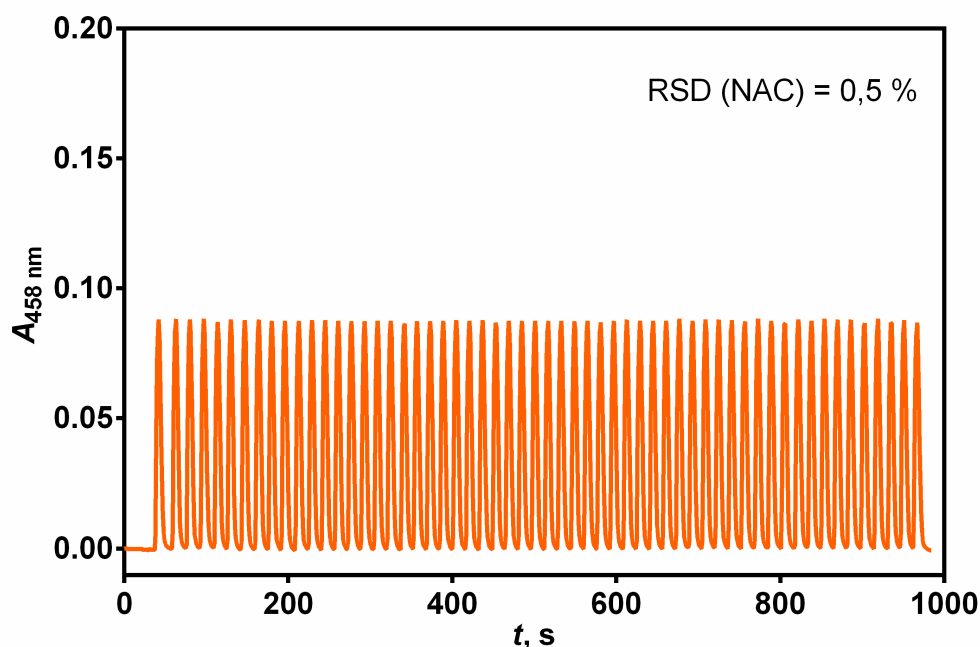
4.2.3.3. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala)

Preciznost predstavlja međusobno slaganje dvaju ili više rezultata mjerenja izvedenih na potpuno isti način (uzorak, analitičar, mjerni sustav, radni uvjeti), a izražava se standardnim odstupanjem, varijancom te relativnim standardnim odstupanjem.^[219] Preciznost razvijenih FIA metoda definirana je ispitivanjem ponovljivosti metode i prenošenja signala.

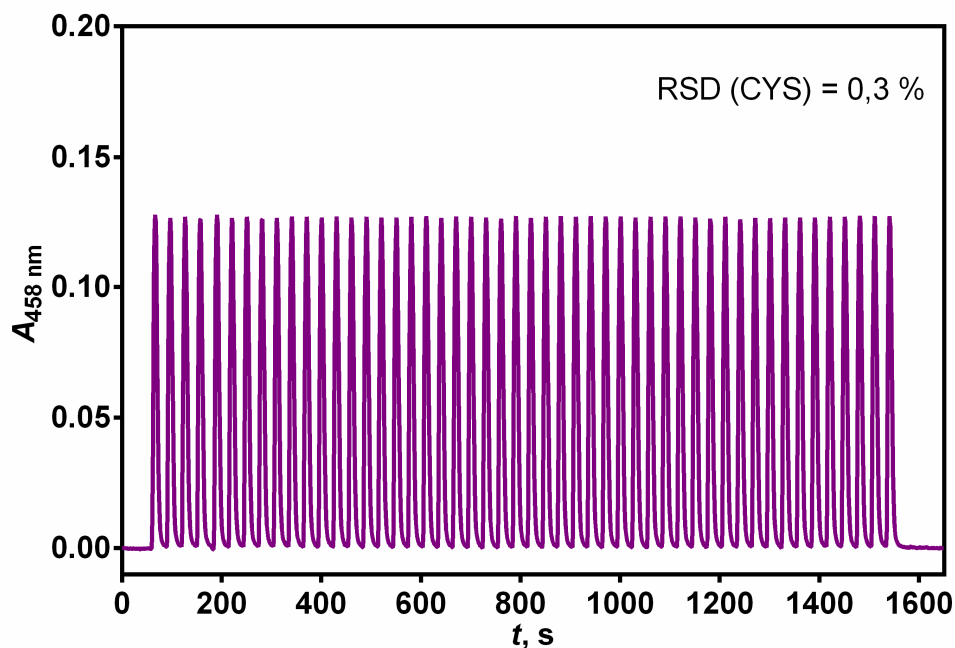
Ponovljivost signala standardnih otopina tiolnih spojeva ispitana je uzastopnim injektiranjem njihovih standardnih otopina, a izražava se relativnim standardnim odstupanjem (*Relative standard deviation*, RSD). RSD je kvocijent standardnog odstupanja s i sredine skupa podataka $\bar{x}$, i računa se korištenjem izraza:

$$s_{\text{rel}}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100. \quad (4-8)$$

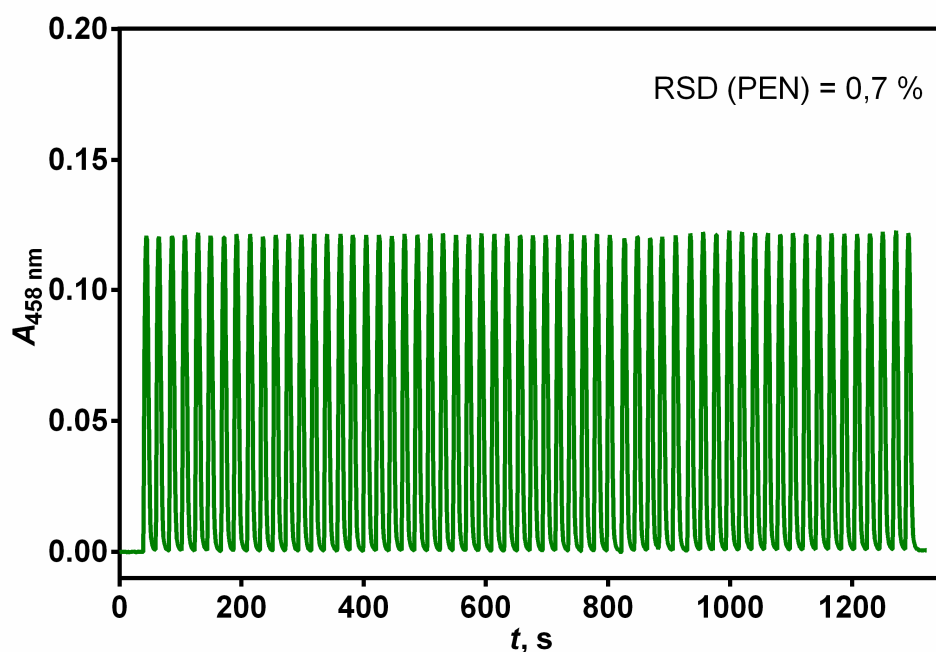
Ponovljivost signala standardnih otopina *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa, ispitana je prema odabranim vrijednostima koncentracija linearnih dinamičkih područja navedenih analita, kroz niz uzastopnih injektiranja. Ostvarena su relativna standardna odstupanja manja od 1,0 % što se može smatrati zadovoljavajućim.



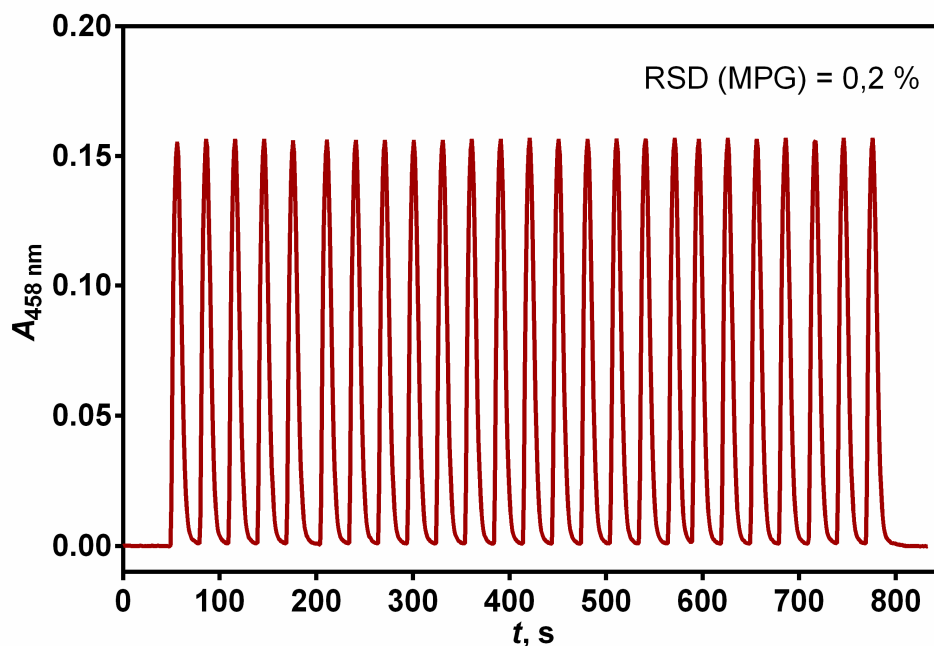
Slika 4-58 Diagram spektrofotometrijskog određivanja NAC-a pri optimiziranim uvjetima za 60 uzastopnih injektiranja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$; $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $V_i = 500 \mu\text{L}$; $l = 40 \text{ cm}$.



Slika 4-59 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja CYS-a pri optimiziranim uvjetima za 50 uzastopnih injektiranja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 60 \text{ cm}$.

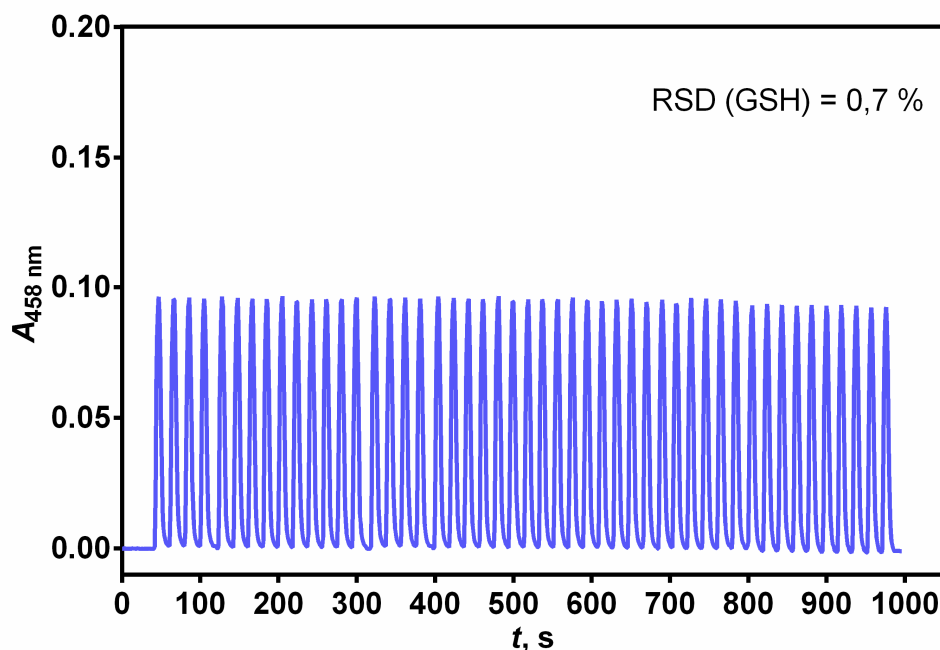


Slika 4-60 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja PEN-a pri optimiziranim uvjetima za 60 uzastopnih injektiranja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.



Slika 4-61 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a pri optimiziranim uvjetima za 25 uzastopnih injektiranja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

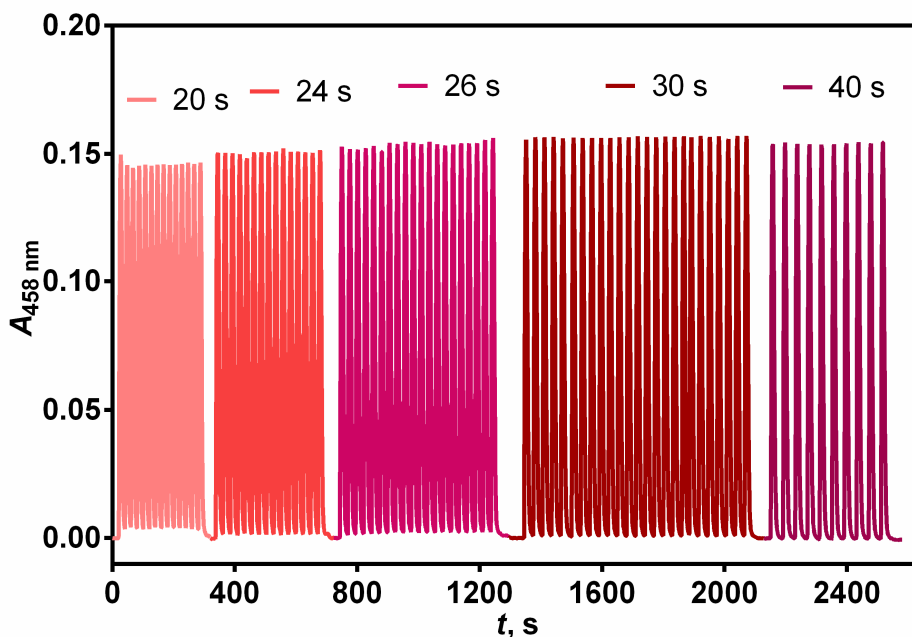
Ispitivanje ponovljivosti signala prilikom određivanja NAC-a provedeno je za 60 uzastopnih injektiranja (slika 4-58), pri čemu ostvareno odstupanje iznosi 0,3 %. Fiagrami određivanja PEN i GSH (slika 4-60 i 4-62) pokazuju vrijednosti odstupanja 0,7 % tijekom 60 odnosno 50 uzastopnih injektiranja penicilamina i glutaciona. Dok je prilikom određivanja CYS i MPG (slika 4-59, 4-61), ostvarena ponovljivost od 0,3 % te 0,2 % za 60 odnosno 25 uzastopnih injektiranja.



Slika 4-62 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja GSH-a pri optimiziranim uvjetima za 50 uzastopnih injektiranja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

Temeljem utvrđene ponovljivosti signala razvijenih FIA metoda, ispitana je i učestalost analiza tiolnih spojeva razvijenih spektrofotometrijskih metoda analiza injektiranjem u protok. Učestalost analize definira se kao broj uzoraka koji se može analizirati unutar vremena od 1 sata. Vrijeme povratka T' , definirano kao vrijeme između pojavljivanja maksimuma signala i povratka na osnovnu liniju (opisano u poglavlju 2.2.4., slika 2-14, 2-15), određuje učestalost injektiranja uzoraka. Pri tome se na fiagramu promatra i vrijeme Δt , odnosno vrijeme protjecanja od dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka do detektora do povratka na osnovnu liniju.

Fiagram određivanja tiopronina (slika 4-63) prikazuje zbrojne vremenske signale za različita vremena Δt . Za vrijeme Δt : 20, 24 i 26 s jasno je vidljivo da ne dolazi do povratka signala na osnovnu liniju, stoga navedena vremena nisu pouzdana za analizu. Međutim prilikom injektiranja uzorka tiopronina uzastopce svakih 15 s ($\Delta t = 30 \text{ s}$), povratak signala na osnovnu liniju je osiguran te se može utvrditi učestalost analize (120 h^{-1}) pri navedenoj brzini injektiranja tiopronina. Daljnje povećanje Δt (40 s) utječe na smanjenje učestalosti injektiranja, odnosno bilježenja analitičkog signala.



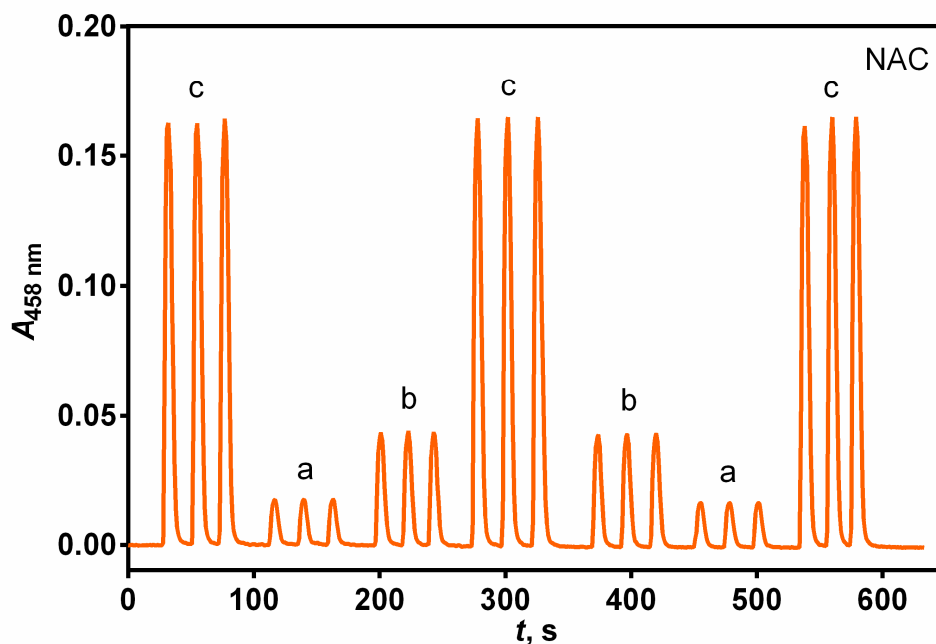
Slika 4-63 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a pri optimiziranim uvjetima za različita vremena Δt : 20; 24; 26; 30; 40 s. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

Utvrđeno vrijeme povratka tijekom određivanja NAC-a, PEN-a i GSH, iznosi 10 s, te 15 s za određivanje CYS i MPG.

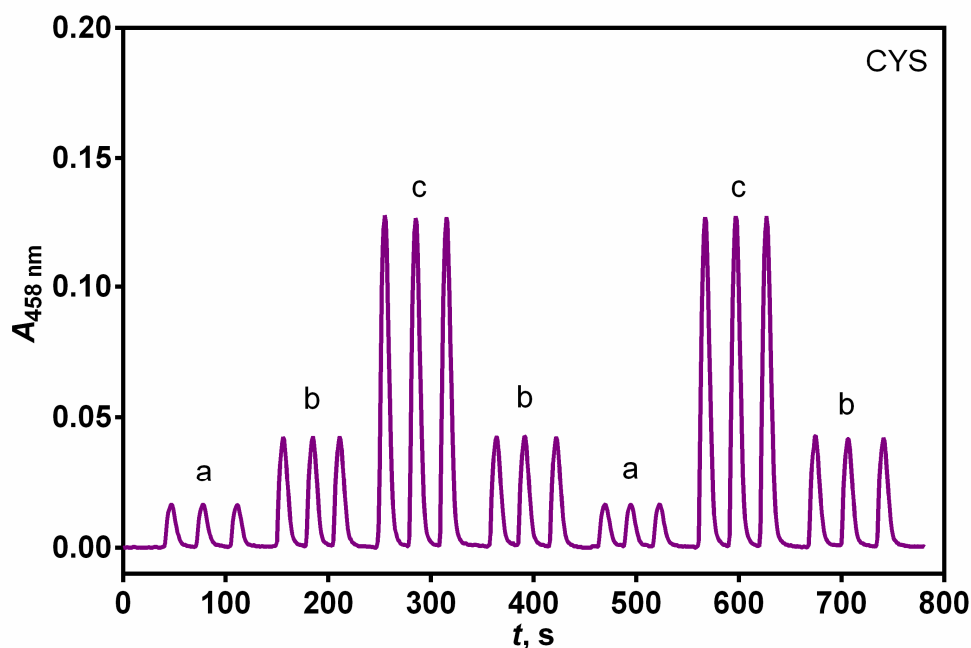
Temeljem razmatranih vremena (Δt i T'), zabilježena učestalost analiza predloženih tiolnih spojeva iznosi 180 h^{-1} za NAC, PEN i GSH, odnosno 120 h^{-1} za CYS i MPG. Tijekom mjerenja nije zabilježen pomak osnovne linije ili otklon apsorbancije.

Metode analize injektiranjem u protok, u usporedbi s kinetičkim metodama analize, značajno smanjuju vrijeme potrebno za određivanje analita budući da se postižu velike učestalosti analiza.

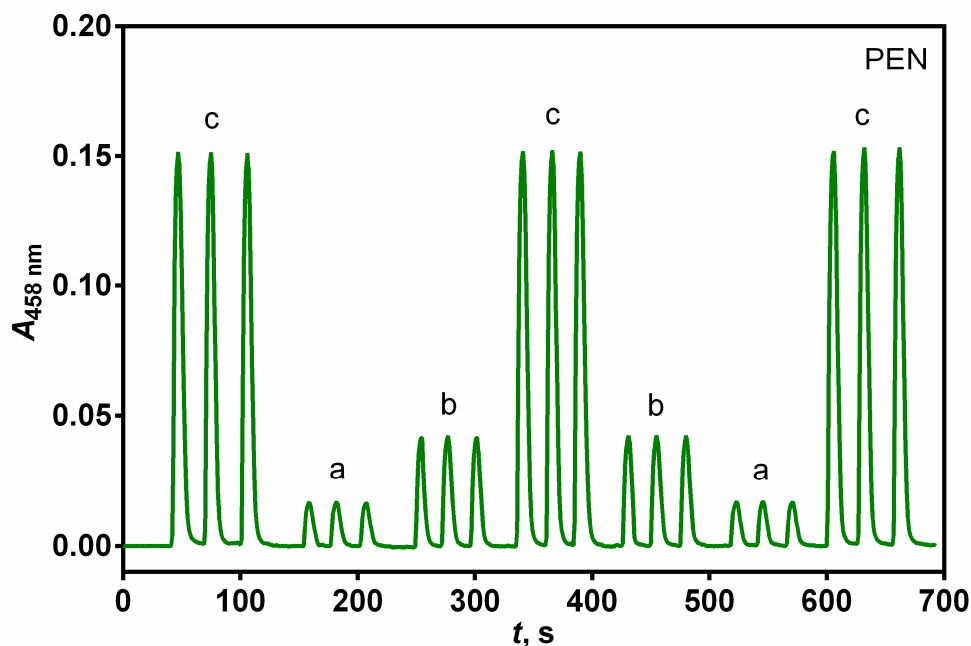
Prenošenje signala (*Carryover*) je ispitano injektiranjem uzoraka koji su sadržavali tri različite koncentracije tiolnih spojeva. Injektiranje je provedeno naizmjenice po tri puta za svaku od koncentracija tiolnih spojeva. Prilikom izvođenja eksperimenta nije zabilježen utjecaj izmjena koncentracija na samu visinu vrha signala, te je ostvaren povratak na osnovnu liniju bez značajnijeg pomaka. Time je potvrđeno da neovisno o ispitanim koncentracijama tiolnih spojeva, primjenom optimiziranih FIA metoda ne dolazi do prenošenja signala iz prethodnog seta injektiranja u sljedeći. Vidljivo je da visina signala za neku koncentraciju ostaje nepromijenjena neovisno o koncentraciji koja je prethodila u postupku injektiranja.



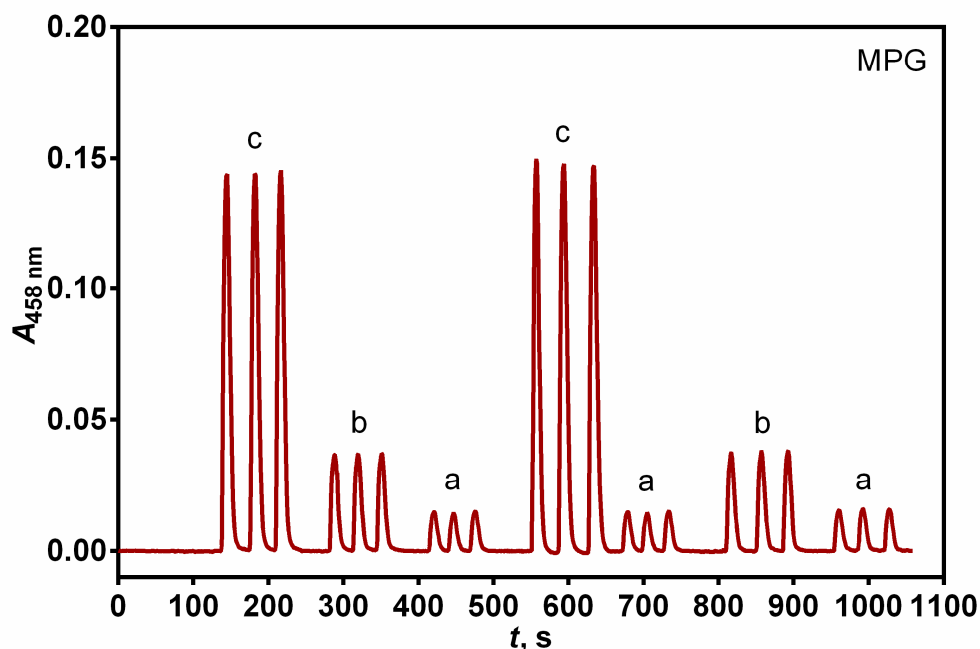
Slika 4-64 Diagram spektrofotometrijskog određivanja NAC-a pri optimiziranim uvjetima: (a) $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{NAC}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.



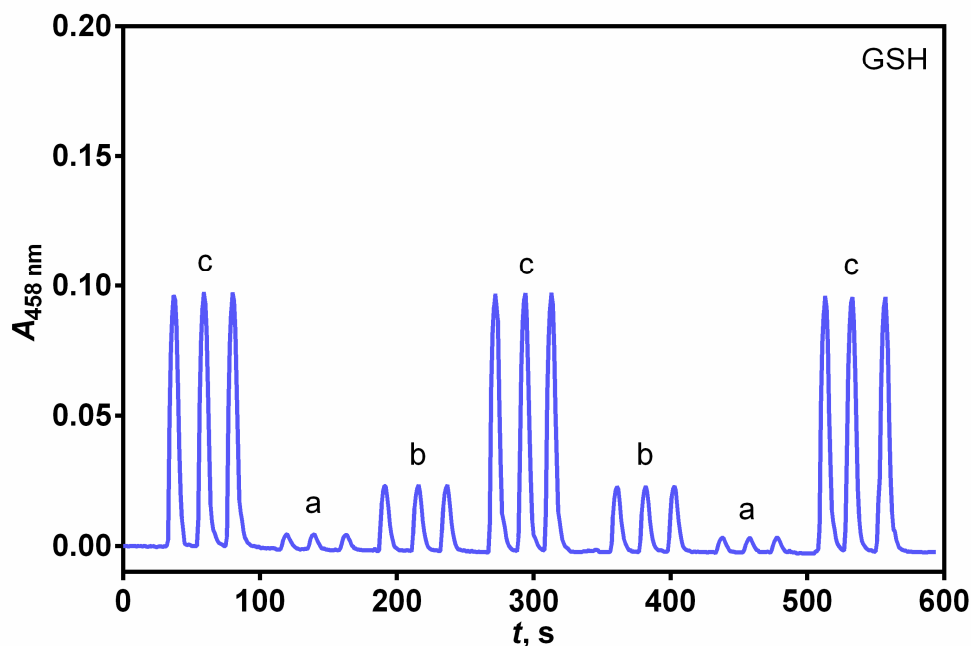
Slika 4-65 Diagram spektrofotometrijskog određivanja CYS-a pri optimiziranim uvjetima: (a) $c(\text{CYS}) = 4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{CYS}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{CYS}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 60 \text{ cm}$.



Slika 4-66 Diagram spektrofotometrijskog određivanja PEN-a pri optimiziranim uvjetima: (a) $c(\text{PEN}) = 4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{PEN}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{PEN}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.



Slika 4-67 Diagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a pri optimiziranim uvjetima: (a) $c(\text{MPG}) = 4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{MPG}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{MPG}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 3,0; temperatura 25 °C; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

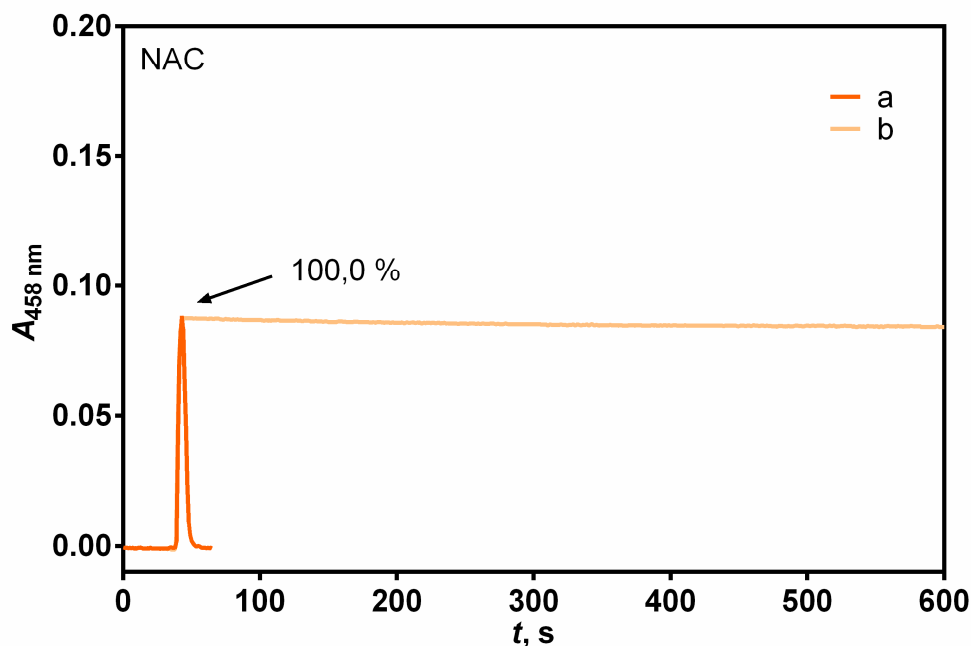


Slika 4-68 Fiagram spektrofotometrijskog određivanja GSH pri optimiziranim uvjetima: (a) $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{GSH}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{GSH}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

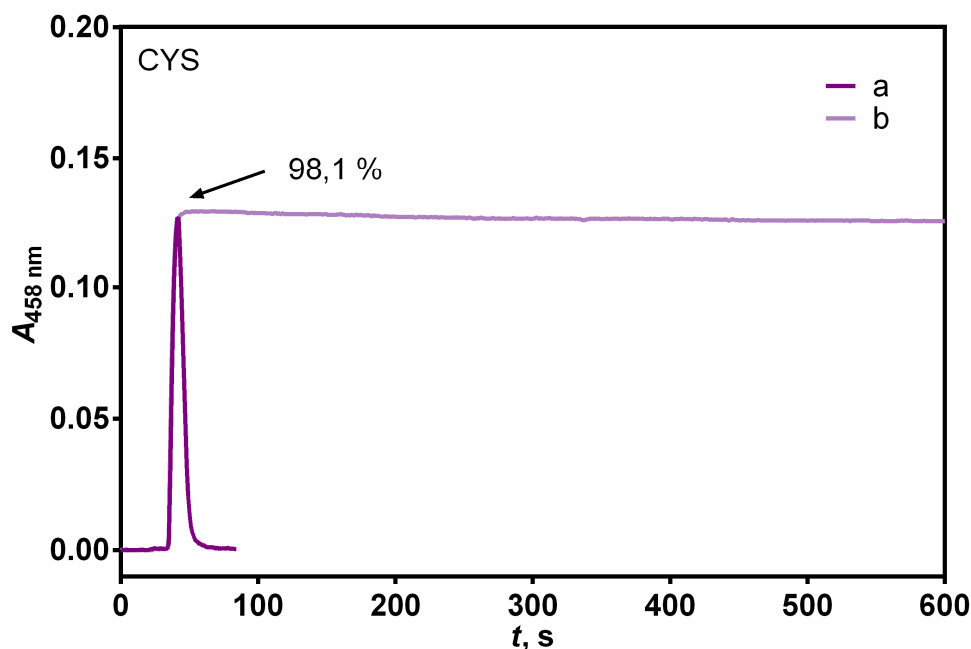
4.2.3.4. Ispitivanje doseg (potpunosti) reakcije zaustavljanjem protoka

FIA je tehnika koja temelji na kontinuiranom protoku (poglavlje 2.3.). Ipak kontinuirani volumni protok, Q , se može zaustaviti u trenutku kada je visina vrha signala dostigla maksimum. Zaustavljanjem protoka (*Stop Flow*) zaustavlja se prijenos tvari konvekcijom, što dovodi do zaustavljanja procesa disperzije zone uzorka koji se nalazi u protočnoj kivet. Pri tome disperzija ostaje konstantna, neovisna o vremenu zadržavanja, izuzev malog, ali neznatnog doprinosa difuzije između molekula.

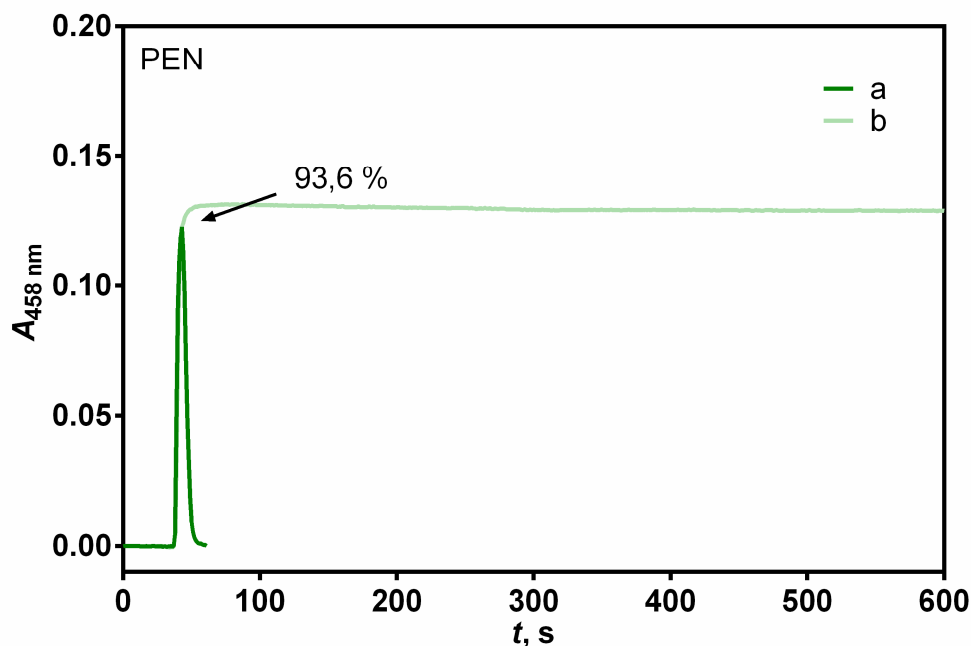
Na sljedećim fiagramima prikazan je eksperimentalni zapis analitičkog signala kod određivanja tiolnih spojeva u uvjetima zaustavljenog protoka. Također je u usporedbi s fiagramom određivanja istih tiolnih spojeva pri optimiziranim uvjetima navedenima u tablici 4-13 i 4-14, izračunana potpunost reakcije. Reakcije dostižu potpunost 100,0 % za određivanje NAC-a, 98,1 % za određivanje CYS-a, 93,6 % za određivanje PEN-a, 95,2 % za određivanje MPG te 72,3 % za određivanje GSH u odnosu na one koje bi se pri zadanim uvjetima mogle ostvariti uz zaustavljen protok.



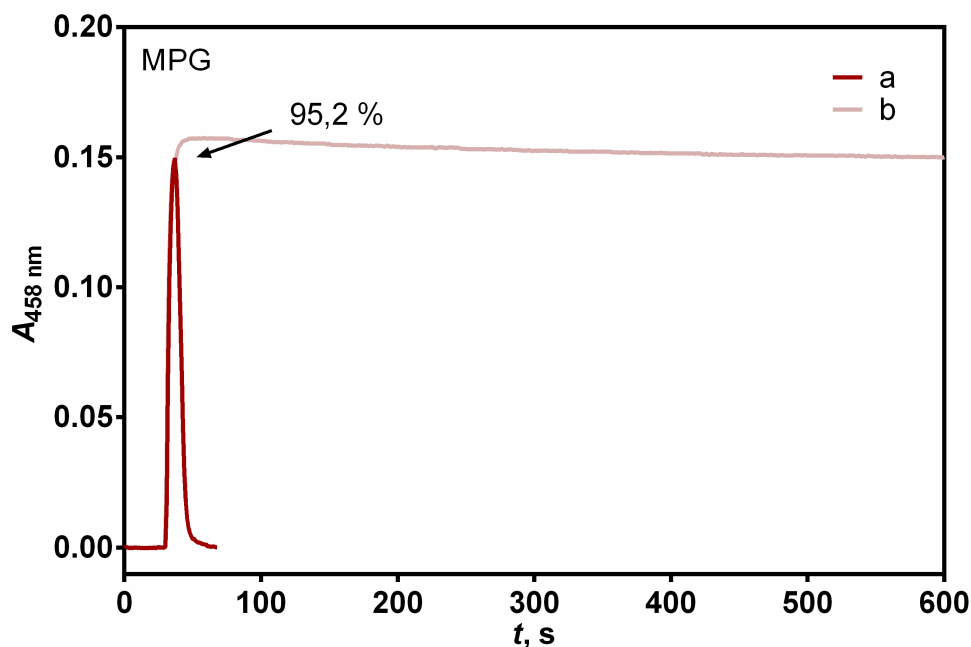
Slika 4-69 (a) Diagram spektrofotometrijskog određivanja NAC-a pri optimiziranim uvjetima; (b) zaustavljeni protok u trenutku maksimalne visine vrha signala; Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{NAC}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.



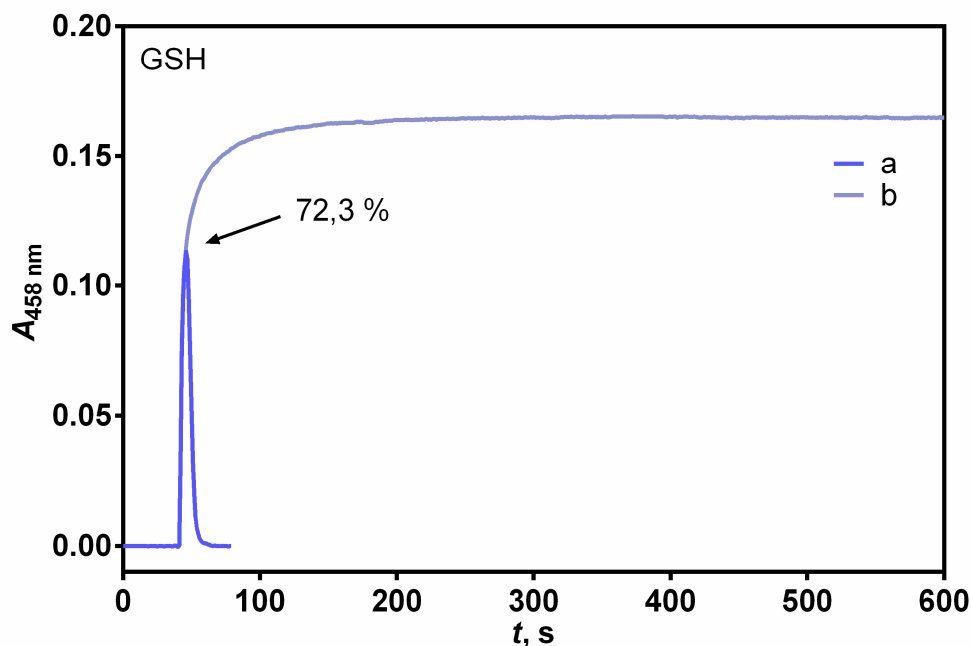
Slika 4-70 (a) Diagram spektrofotometrijskog određivanja CYS-a pri optimiziranim uvjetima; (b) zaustavljeni protok u trenutku maksimalne visine vrha signala; Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{CYS}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 60 \text{ cm}$.



Slika 4-71 (a) Diagram spektrofotometrijskog određivanja PEN-a pri optimiziranim uvjetima; (b) zaustavljeni protok u trenutku maksimalne visine vrha signala; Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{PEN}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$



Slika 4-72 (a) Diagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a pri optimiziranim uvjetima; (b) zaustavljeni protok u trenutku maksimalne visine vrha signala; Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{MPG}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q_{\text{CS}} = 4,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.



Slika 4-73 (a) Diagram spektrofotometrijskog određivanja GSH pri optimiziranim uvjetima; (b) zaustavljeni protok u trenutku maksimalne visine vrha signala; Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{Nc}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 3,0$; temperatura 25°C ; $Q_{\text{CS}} = 5,0 \text{ mL min}^{-1}$, $Q_{\text{RS}} = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_i = 500 \mu\text{L}$, $l = 40 \text{ cm}$.

4.2.4. Primjenjivost razvijenih FIA metoda u usporedbi sa standardnim metodama prema Britanskoj farmakopeji (realni uzorci)

S ciljem konačnog vrednovanja FIA metoda uz spektrofotometrijski detektor, razvijene metode su primjenjene na određivanje tiolnih spojeva u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani. Za svaki uzorak napravljena su tri mjerenja (triplikat) te je prosječna vrijednost apsorbancije korištena za daljnji proračun, kao što je prikazano na slikama 4-53, 4-54, 4-55, 4-56. Koristeći jednadžbe pravaca linearne regresije, koje su dobivene iz krivulja umjeravanja, pripremljenih pomoću standardnih otopina RSH, izračunana je koncentracija RSH u farmaceutskim pripravcima. Iz izračunane koncentracije izračunana je masa RSH koja je potom uspoređena s masom koja je navedena na sekundarnoj ambalaži korištenih farmaceutskih pripravaka i dodataka prehrani.

Rezultati prikazani u tablici 4-19 pokazuju dobro slaganje rezultata mjerenja predloženom analizom injektiranjem u protok uz spektrofotometrijski detektor sa standardnim metodama titracije koje propisuje farmakopeja.

Tablica 4-19 Određivanje RSH u realnim uzorcima razvijenim FIA metodama uz spektrofotometrijski detektor i standardnim metodama koje propisuje Britanska Farmakopeja

Uzorak	Deklarirana masa u uzorku, mg	FIA metoda, mg	Standardna metoda, mg
Fluimukan granule^a	100	102,4 ± 0,8	101,5 ± 0,8
Fluimukan Akut Junior sirup^b	100	101,5 ± 0,9	100,3 ± 0,6
Fluimukan Akut šumeće tablete^c	600	601,9 ± 1,6	605,6 ± 0,9
Metalcaptase^d	300	308,4 ± 1,1	301,5 ± 0,8
Captimer^e	100	100,9 ± 0,6	101,1 ± 1,4
L-glutathione^f	50	48,5 ± 0,8	46,8 ± 0,7

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula koje sadrže 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku granula za otopinu koje sadrže 100 mg NAC-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 600 mg NAC-a;

^d Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^e Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^f Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

Nasuprot razvijenim kinetičkim metodama analize za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutaciona, koje su pogodan preduvjet za razvoj metoda analize injektiranjem u protok, FIA ima značajnu prednost zbog automatizacije analitičkog postupka, pri čemu je moguće ostvariti značajno veći broj analiza u određenom vremenu. Dodatna prednost FIA metoda je već naglašena minimalna potrošnja reagensa.

Rezultati određivanja ostvareni razvojem i vrednovanjem kinetičke spektrofotometrijske analize injektiranjem u protok uspoređeni su sa rezultatima eksperimentalno dobivenim korištenjem standardnih titracijskih metoda koje propisuje Britanska farmakopeja. Titracijske metode, bilo redoks ili kiselo-bazne metode, primijenjene u ovom doktorskom radu, svakako zahtjevaju dulje vrijeme analize, ali i značajno veću potrošnju reagensa, točnije otopine titranta. Titracijska određivanja se provode kroz tri mjerenja. Već na samom početku titracijskog određivanja, uobičajeno 50 mL standardne otopine titranta je utrošeno punjenjem birete, neovisno koliki će utrošak titranta biti zabilježen prilikom određivanja samog analita. Standardne otopine titranta često su visokih koncentracija (reda veličine 10^{-1} ili 10^{-2} mol L⁻¹). Tako velika količina otpadnih kemikalija, kao i njihova visoka koncentracija, ne pridonose jasnim uvjetima "zelene analitičke kemije".

Tablica 4-20 Usporedba potrošnje reagensa FIA metoda i metoda koje propisuje standardna metoda prema farmakopeji pri određivanju razmatranih tiolnih spojeva, za tri uzastopna određivanja uzoraka

Analit	Realni uzorak	FIA	Standardna metoda
		Petrošnja reagensa, mL (koncentracija reagensa, mol L ⁻¹)	
NAC	Fluimukan granule ^a	4,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	6,0 (5,0 × 10 ⁻²)
	Fluimukan Akut Junior sirup ^b	4,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	12,0 (5,0 × 10 ⁻²)
	Fluimukan Akut šumeće tablete ^c	4,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	18,0 (5,0 × 10 ⁻²)
PEN	Metalcaptase ^d	3,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	30,0 (1,0 × 10 ⁻¹)
MPG	Captimer ^e	3,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	6,0 (5,0 × 10 ⁻²)
GSH	L-glutathione ^f	3,0 (1,0 × 10 ⁻⁴)	55,0 (1,0 × 10 ⁻¹)

^a Farmaceutski pripravak u obliku granula koje sadrže 100 mg NAC-a;

^b Farmaceutski pripravak u obliku granula za otopinu koja sadrži 100 mg NAC-a;

^c Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 600 mg NAC-a;

^d Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 300 mg PEN-a;

^e Farmaceutski pripravak u obliku tableta koje sadrže 100 mg MPG-a;

^f Dodatak prehrani u obliku kapsula koje sadrže 50 mg GSH-a.

U tablici 4-20 prikazana je potrošnja reagensa razvijenih FIA metoda i titracijskih metoda prema farmakopeji. Uspoređeni su volumeni reagensa za tri uzastopna mjerenja uzorka. Vidljivo je značajno smanjenje potrošnje reagensa FIA metodama, gdje utrošeni volumeni reagensa ne prelaze 4,0 mL. Potrošnja reagensa kod FIA metoda je uvjetovana volumnim protokom otopine reagensa.

Upotrebom minimalne količine reagensa vrlo niske koncentracije, a time stvaranjem male količine otpada, razvijene su metode analize injektiranjem u protok koje minimalno onečišćuju okoliš te su u skladu s uvjetima "zelene analitičke kemije". Pri tom je moguće izvršiti veliki broj analiza razmatranih tiolnih spojeva (više od 100 mjerenja na sat) uz cjenovno prihvatljiv i relativno dostupan spektrofotometrijski detektor u standardnom analitičkom laboratoriju.

5. ZAKLJUČAK

U istraživanju obuhvaćenom ovom doktorskom disertacijom opisane su razvijene i vrednovane brze i osjetljive kinetičke metode analize i metode analize injektiranjem u protok (FIA) uz spektrofotometrijski detektor za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa kao čistih tvari te u farmaceutskim pripravcima. Razvijene metode se temelje na redoks reakciji u kojoj analit (pojedini tiolni spoj) reducira kolorimetrijski bis neokuproin bakrov(II) kompleks do bis neokuproin bakrovog(I) kompleksa koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 458 nm. Predstavljeni kolorimetrijski reagens je stabilan, selektivan i zadovoljavajuće brzo reagira s tiolnim spojevima (reducensima). Iznos redukcijskog potencijala redoks-para bakrovih(II) i bakrovih(I) kompleksa sa ligandom neokuproinom navedenog u literaturi ($E^0 = 0,600$ V) odgovara izračunanoj vrijednosti formalnog potencijala ($E^0 = 0,591$ V) istog redoks para uz poznate i dostupne konstante formiranja razmatranih kompleksa, te standardnog potencijala redoks para bakrovih(II) i bakrovih(I) iona.

Korištenjem sustava za kinetička mjerenja optimizirani su kemijski parametri predloženih redoks-reakcija te je utvrđeno da su brze (odvijaju se u jednom koraku), temperaturno neovisne te se mogu odvijati u širokom području pH-vrijednosti. Primijenjene su dvije računske metode obrade kinetičkog zapisa reakcija: metoda početne brzine i metoda određenog vremena. Krivulja umjeravanja za metodu početne brzine linearna je u koncentracijskom području od 6×10^{-7} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za *N*-acetil-L-cistein, cistein i glutation, te od 8×10^{-7} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za penicilamin i tiopronin. Određivanje tiolnih spojeva kinetičkim metodama uz spektrofotometrijski detektor moguće je u širokom području linearnosti za obje računske metode, točnije kroz dva reda veličina. Metodom početne brzine potvrđeno je da predložene redoks reakcije slijede pseudoprvi red reakcije ($n \approx 1,0$), dakle brzine kemijske reakcije ovise samo o koncentraciji analita. Kod primijenjene metode određenog vremena krivulje umjeravanja su linearne u koncentracijskom rasponu od 6×10^{-7} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za *N*-acetil-L-cistein i penicilamin (u 1 min) kao i za cistein (u 0,5 min) te od 6×10^{-7} mol L⁻¹ do 6×10^{-5} mol L⁻¹ za tiopronin i glutation (u 1 min). Za obje računske metode izračunane su granice dokazivanja, a primjenom metode najmanjeg kvadrata, provedena je regresijska analiza za računanje jednadžbi pravca linearnog dinamičkog područja i zadovoljavajućih koeficijenata korelacije. Razvijene

metode su dovoljno osjetljive te se mogu odrediti koncentracije razmatranih tiolnih spojeva reda veličine 10^{-7} mol L⁻¹ bez korištenja skupe instrumentacije.

Kinetičke metode analize uz spektrofotometrijski detektor za razliku od klasične spektrofotometrije zahtijevaju dodatnu, ali ipak cjenovno dostupnu instrumentaciju: peristaltičku crpku koja će osigurati konstantan protok reakcijske otopine.

Vrijeme u kojem se kemijske reakcije odvijaju je relativno kratko (manje od 2 minute), a razvijene kinetičke metode pružaju više informacija o kemizmu reakcije. Potrošnja reagensa je prednost razvijenih kinetičkih metoda analize, osobito u usporedbi sa standardnim metodama prema Britanskoj farmakopeji, koja propisuje klasične titracijske metode za određivanje predloženih analita. Dok primjena titrimetrijskih metoda zahtijeva veće volumene reagensa (ponekad veće od 50 mL) prilikom jedne titracije, kod kinetičkih metoda analiza volumen kolorimetrijskog reagensa koji sudjeluje u reakciji iznosi 2,5 mL čime je definirana potrošnja po jednom mjerenju analita.

Tijekom vrednovanja razvijenih metoda, ispitan je utjecaj interferirajućih vrsta koje ni u visokim koncentracijama nisu izazvale pogreške prilikom određivanja analita od interesa. Primjena razvijenih kinetičkih metoda na određivanje tiolnih spojeva kao aktivnih tvari u farmaceutskim pripravcima je pokazala zadovoljavajuću točnost, kao i iskoristivost metoda (iskoristivost je bila u rasponu od 94,8 do 102,9 %).

Kinetike predloženih redoks reakcija ukazale su na mogućnost razvoja metoda analize injektiranjem u protok. Temeljem navedenog, razvijene su nove FIA metode za određivanje *N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa uz optimizaciju kemijskih parametara i parametara protočnog sustava. Konstruirane su krivulje umjeravanja u području koncentracija od 6×10^{-7} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za *N*-acetil-L-cistein i penicilamin, od 6×10^{-7} mol L⁻¹ do 4×10^{-5} mol L⁻¹ za cistein, od 4×10^{-7} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za tiopronin i 2×10^{-6} mol L⁻¹ do 8×10^{-5} mol L⁻¹ za glutation s odgovarajućim izračunanim granicama dokazivanja, jednadžbama linearne regresije i koeficijentima korelacije. Interferirajuće vrste, koje se uobičajeno nalaze kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima, nisu uzrokovale pogreške prilikom određivanja analita od interesa. Provjerena točnost metode je zadovoljavajuća, uz ispitanu iskoristivost metode u rasponu od 97,0 do 101,7 %. Uz ispitivanje utjecaja interferirajućih vrsta i iskoristivosti metoda, FIA metode su nadalje vrednovane određivanjem analita od interesa u komercijalno dostupnim farmaceutskim formulacijama (Fluimukan®, Metalcaptase®, Captimer®, L-glutathione®). Nema

značajnih razlika između rezultata dobivenih preporučenim metodama prema Britanskoj Farmakopeji i rezultata dobivenih korištenjem razvijenih FIA metoda. U usporedbi s redoks titracijama i kiselo-baznim titracijama u nevodenom mediju, koje preporučuje Britanska Farmakopeja, FIA metode su znatno brže (omogućuju jednu analizu u triplikatu u minuti). Potrošnja reagensa je također smanjena, uz utrošak od najviše 4,0 mL po uzorku (u triplikatu), za razliku od standardnih titrimetrijskih metoda gdje je za analizu jednog uzorka u triplikatu potrebno 50 mL reagensa. Stoga razvijene FIA metode ostvaruju prednost zbog velike učestalosti uzorkovanja (više od 100 mjerenja na sat), te su ekološki prihvatljive zbog niske potrošnje reagensa.

Analiza farmaceutskih pripravaka u današnje doba zauzima jedno od najznačajnijih polja analitičke kemije. Rutinske analize u kontroli kvalitete provode se na velikom broju uzoraka, s ciljem osiguravanja sukladnosti sadržaja farmaceutskih pripravaka s propisanim (dozvoljenim) koncentracijskim područjima. Zbog velike količine uzoraka koji se moraju analizirati u vrlo kratkom vremenu, nužno je potrebna automatizacija analitičkih metoda. Upravo razvijenim metodama analize injektiranjem u protok za određivanje razmatranih tiolnih spojeva, moguće je izvršiti veliki broj analiza s izvrsnom uštedom reagensa u skladu s uvjetima "zelene analitičke kemije" i uz cjenovno relativno dostupnim spektrofotometrijskim detektorima.

6. LITERATURA

- [1] S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, **1994**, p. 231, 281.
- [2] I. Dalle-Donne, R. Rossi, *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877, 3271.
- [3] P. D. Tzanavaras, *Open Chem. Biomed. Methods J.*, **2010**, 3, 37.
- [4] G. A. Goodman, L. S. Goodman, T. W. Rall and F. Murad, *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Edition, MacMillan, New York, **1985**.
- [5] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1548.
- [6] *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005*, (Eds.: D. L. Ride), CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**, p. 130 (3-6), <http://www.hbcpnetbase.com>
- [7] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., (Eds.: A. Osol), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, **1980**, p. 805.
- [8] G.S. Kelly, *Alt. Med. Rev.* **1998**, 3, 114.
- [9] *Agencija za lijekove i medicinske proizvode*; Halmed, Zagreb, **2007–2015** <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-11-01-115.pdf>
- [10] P. Vinas, M. Hernandez Cordoba, C. Sanchez-Pedreno, *Analyst* **1990**, 115, 757.
- [11] E. A. Taha, N. Y. Hassan, F. A. Aal, L. El-Sayed A. Fattah, *J. Fluoresc.* **2007**, 17, 293.
- [12] A. Martinović, Nj. Radić, *Anal. Lett.* **2007**, 40, 2851.
- [13] A. Martinović, Nj. Radić, *Acta Chim. Slov.* **2009**, 56, 503.
- [14] H. Heli, S. Majdi, N. Sattarahmady, *Sens. Actuators, B* **2010**, 145, 185.
- [15] W. Hou, E. Wang, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 316, 155.
- [16] K. Kusmieriek, E. Bald, *Chromatographia* **2008**, 67, 23.
- [17] M. J. Nozal, J. L. Bernal, L. Toribio, P. Marinero, O. Moral, L. Manzananas, E. Rodriguez, *J. Chromatogr. A* **1997**, 778, 347.
- [18] D. Tsikas, J. Sandmann, M. Ikic, J. Fauler, D. O. Stichenothe, J. C. Frölich, *J. Chromatogr. B* **1998**, 708, 55.
- [19] K. Kusmieriek, G. Chwatko, R. Glowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. B* **2009**, 877, 3300.
- [20] M. A. Raggi, V. Cavrini, A. M. Di Pietra, *J. Pharm. Sci.* **1982**, 71, 1384.
- [21] M. C. Garcia Alvarez-Coque, M. J. Medina Hernandez, R. M. Vilanueva Camanas, C. Mongay Fernandez, *Analyst* **1989**, 114, 975.
- [22] T. S. Jovanović, B. S. Stanković, *Analyst* **1989**, 114, 401.
- [23] V. Ogbu and G. Cohen, *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 25, 362.
- [24] M. Abu Eid, *Microchim. Acta* **1998**, 129, 91.
- [25] F. Buhl and M. Galkowska, *Chem. Anal. Warsaw* **2006**, 51, 623.
- [26] L. Kukoc-Modun, Nj. Radić, *Int. J. Anal. Chem.* **2011**, 2011, 1.
- [27] M. Soledad Garcia, C. Sanchez-Pedreno, M. I. Alberio, *Analyst* **1990**, 115, 989.
- [28] A. Martinović, L. Kukoc-Modun, N. Radić, *Anal. Lett.* **2007**, 40, 791.
- [29] E. A. Taha, N. Y. Hassan, F. A. Aal, L. El-Sayed A. Fattah, *ScienceAsia* **2008**, 34, 107.

- [30] L. Kukoc-Modun, Nj. Radić, *Anal. Sci.* **2010**, 26, 491.
- [31] Nj. Radić, L. Kukoc-Modun, M. Biocic, *Croat. Chem. Acta* **2013**, 86, 65.
- [32] C. Sanchez-Pedreno, I. Alberro, S. Garcia, V. Rodenas, *Analyst* **1992**, 117, 925.
- [33] A. L. De Toledo Fornazari, W. T. Suarez, H. J. Vieira, O. Fatibello-Filho, *Acta Chim. Slov.* **2005**, 52, 164.
- [34] W. T. Suarez, H. J. Vieira, O. Fatibello-Filho, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 771.
- [35] A. Martinović, Š. Cerjan-Stefenović, Nj. Radić, *J. Chem. Metrol.* **2008**, 2, 1.
- [36] L. Kukoc-Modun, I. Plazibat, Nj. Radić, *Croat. Chem. Acta* **2011**, 84, 81.
- [37] W. T. Suarez, O. D. Pessoa-Neto, B. C. Janegitz, H. J. Vieira, R. C. Faria, O. Fatibello-Filho, *Anal. Lett.* **2011**, 44, 2394.
- [38] A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi, *Chem. Res. Chinese U.* **2010**, 26, 893.
- [39] H. J. Vieira, O. Fatibello-Filho, *Quim. Nova* **2005**, 28, 797.
- [40] M. J. Medina Hernandez, M. C. Garcia Alvarez-Coque, E. Bonet Domingo, R. M. Villanueva Camanas, *Pharmazie* **1990**, 45, 745.
- [41] W. T. Suarez, A. A. Madi, F. C. Vicentini, O. Fatibello-Filho, *Anal. Lett.* **2007**, 40, 3417.
- [42] L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, M. Biocic, Nj. Radić, *Anal. Lett.* **2016**, 49, 607.
- [43] Nj. Radić, J. Komljenović, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 360, 675.
- [44] W. T. Suarez, H. J. Vieira, O. Fatibello-Filho, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 360, 675.
- [45] I. Lopez Garcia, P. Vinas, J. A. Martinez Gil, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 345, 723.
- [46] P. Vinas, I. Lopez Garcia, J. A. Martinez Gil, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, 15.
- [47] N. Nantaphol, O. Chailapakul, W. Siangproh, *Electroanalysis* **2014**, 26, 1024.
- [48] P. D. Tzanavaras, T. D. Karakosta, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 882.
- [49] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2010, p. 236.
- [50] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th Edition on CD-ROM, (Ed.: M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman), Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, USA, **2001**, p. 2810.
- [51] *The Merck Indeks of Chemicals and Drugs 7th Ed.*, USA, **1960**, p. 316.
- [52] A. A. Ensafi, B. Rezaei, S. Nouroozi, *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 288.
- [53] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, **2010**, p. 262.
- [54] G. Atmaca, *Yonsei Med. J.* **2004**, 45, 776.
- [55] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, **2010**, p. 18, 251.
- [56] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Carpena, *Analyst* **1992**, 117, 1025.
- [57] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1459.

- [58] T. Knoll, A. Zollner, G. Wendt-Nordahl, M. S. Michel, P. Alken, *Pediatr. Nephrol.* **2005**, *20*, 19.
- [59] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1936.
- [60] M. C. Miniaci, C. Irace, A. Capuozzo, M. Piccolo, A. Di Pascale, A. Russo, P. Lippiello, F. Lepre, G. Russo, R. Santamaria, *J. Cel. Biochem.* **2016**, *117*, 402.
- [61] M. Marquez, M. Silva, D. Perez-Bendito, *Analyst* **1988**, *113*, 1373.
- [62] T. Toyooka, K. Imai, *Analyst* **1984**, *109*, 1003.
- [63] A. Campiglio, *Analyst* **1992**, *117*, 1507.
- [64] N. Sattarahmady, H. Heli *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 74.
- [65] E. Bramanti, R. Cavallaro, M. Onor, R. Zamboni, A. D'Ulivo, *Talanta* **2008**, *74*, 936.
- [66] D. R. Jenke, D. S. Brown, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1509.
- [67] R. Glowacki, E. Bald, *J. Chrom. B* **2009**, *877*, 3400.
- [68] Y. Hao, D. Xiong, L. Wang, W. Chen, B. Zhou, Y.-N. Liu, *Talanta* **2013**, *115*, 253.
- [69] A. V. Petrova, R. Ishimatsu, K. Nakano, T. Imato, A. B. Vishnikin, L. N. Moskvina, A. V. Bulatov, *J. Anal. Chem.* **2016**, *71*, 172.
- [70] A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi, *Chem. Res. Chin. Univ.* **2010**, *26*, 893.
- [71] M. Catala Icardo, L. Lahuerta Zamora, J. Martinez Calatayud, *Analyst* **1998**, *123*, 1685.
- [72] N. Teshima, T. Nobuta, T. Sakai, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *438*, 21.
- [73] J. Liu, J. Itoh, *Talanta* **2006**, *70*, 791.
- [74] S. H. Lee, O. J. Sohn, Y. S. Yim, K. A. Han, G. W. Hyung, S. H. Chough, J. I. Rhee, *Talanta* **2005**, *68*, 187.
- [75] A. V. Bulatov, A. V. Petrova, A. B. Vishnikin, L. N. Moskvina, *Microchemical Journal* **2013**, *110*, 369.
- [76] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, G. Lambertos, *Talanta* **1991**, *38*, 1235.
- [77] B. Rezaei, A. A. Ensafi, S. Nouroozi, *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1067.
- [78] Q. Cao, Y. Zhao, Z. Hu, Q. Xu, *Indian J. Chem.* **2001**, *40A*, 1344.
- [79] B. Bermudez, F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Microchem. J.* **1987**, *35*, 315.
- [80] Y. Dong, M. Su, P. Chen, H. Sun, *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 1071.
- [81] P. Yang, Y. Chen, Q. Zhu, F. Wang, L. Wang, Y. Li, *Microchim. Acta* **2008**, *163*, 263.
- [82] J. A. Cox, T. J. Gray, *Electroanalysis* **1990**, *2*, 107.
- [83] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1456.
- [84] W. F. Kean, C. J. L. Lock, H. E. Howard-Lock, *J. Lancet.* **1991**, *338*, 1565.
- [85] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th Edition on CD-ROM, (Ed.: M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman), Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, USA, **2001**, p. 7159.
- [86] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, **2010**, p. 574.

- [87] A. A. Elbashir, A. A. B. Alfadil, *World J. Anal. Chem.* **2013**, *1*, 18.
- [88] D. Schorn, A. G. Mowat, *Rheumatol Rehabil.* **1977**, *16*, 223.
- [89] S. M. Donahe, G. E. Janauer, T. D. Zucconi, *Anal. Lett.* **1978**, *B11*, 721.
- [90] Nj. Radić, J. Komljenović, D. Dobčnik, *Croat. Chem. Acta.* **2000**, *73*, 263.
- [91] N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, *Talanta* **2002**, *58*, 1213.
- [92] K. Kusmieriek, E. Bald, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *590*, 132.
- [93] L. Cao, T. Wei, Y. Shi, X. Tan, J. Meng, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2017**, DOI: 10.1080/10826076.2017.1348953
- [94] A. A. J. Torriero, H. D. Piola, N. A. Martinez, N. V. Panini, J. Raba, J. J. Silber, *Talanta* **2007**, *71*, 1198.
- [95] A. Besada, *Anal. Lett.* **1988**, *21*, 435.
- [96] P. Vinas, J. A. Sanchez-Pedreno, M. H. Cordoba, *Microchem. J.* **1990**, *41*, 2
- [97] P. B. Issopoulos, S. E. Salta, *Il Farmaco* **1997**, *52*, 113.
- [98] A. A. Al-Majed, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 827
- [99] T. Rojanarata, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, C. Saehuan, *Talanta* **2010**, *82*, 444.
- [100] A. A. Elbashir, S. F. Awad, *J. Pharmacovigilance* **2013**, *1*, 1.
- [101] M. I. Walash, M. E. S. Metwally, A. M. El-Brashy, A. A. Abdelal, *Il Farmaco* **2003**, *58*, 1325.
- [102] M. I. Walash, A. M. El-Brashy, M. S. Metwally, A. A. Abdelal, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 517.
- [103] M. S. Garcia, C. Sanchez-Prieto, M. I. Albero, V. Rodenas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 633.
- [104] B. Gomez-Taylor Corominas, J. Pferzschner, M. Catala Icardo, L. Lahuerta Zamoraa, J. Martinez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 281.
- [105] G. J. Abbas, D. N. Taha, M. S. Mashko, *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2224.
- [106] T. Perez Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, C. Sidrach de Cardona, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *15*, 33.
- [107] L. Ma, M. Fan, X. Xu, W. Kanga, H. Shi, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1463.
- [108] Z. D. Zhang, W. R. G. Baeyens, X. R. Zhang, G. Van Der Weken, *Analyst* **1996**, *121*, 1569.
- [109] Z. D. Zhang, W. R. G. Baeyens, X. R. Zhang, G. Van Der Weken, *Biomed. Chromatogr.* **1995**, *9*, 287.
- [110] L. J. Li, H. Cheng, Q. F. Chen, W. Y. Huang, *Anal. Chem.: Indian J.* **2007**, *5*, 57.
- [111] F. E. O. Suliman, H. A. J. Al-Lawati, S. M. Z. Al-Kindy, I. E. M. Nour, S. B. Salama, *Talanta* **2003**, *61*, 221.
- [112] A. Martinović-Bevanda, Nj. Radić, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 669.
- [113] F. E. O. Suliman, Z. H. Al-Lawati, S. M. Z. Al-Kindy, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1131.
- [114] F. El. O. Suliman, M. M. Al-Hinai, S. M. Z. Al-Kindy, S. B. Salama, *Talanta* **2008**, *74*, 1256.
- [115] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1467.
- [116] G. A. Goodman, L. S. Goodman, T. W. Rall and F. Murad, *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Edition, Panamericana, Madrid, **1989**, p. 1537.

- [117] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th Edition on CD-ROM, (Ed.: M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman), Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, USA, **2001**, p. 9532.
- [118] Y. Sugiura, Y. Hirayama, *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 679.
- [119] Goodman & Gilman's *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th Edition, (Eds.: L. L. Brunton, B. Chabner, B. Knollman) Medical, New York, 1989, p. 14.
- [120] M. S. Carlsson, T. Denneberg, B. M. Emanuelsson, B. Kagedal, S. Lindgren, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *45*, 79.
- [121] A. Lindell, T. Denneberg, E. Hellgren, J. O. Jeppsson, H. G. Tiselius, *Urol. Res.* **1995**, *23*, 111.
- [122] J. L. Domingo, *Reprod. Toxicol.* **1995**, *9*, 105.
- [123] J. Xu, R. Cai, J. Wang, Z. Liu, X. Wu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 334.
- [124] J. Lu, C. Lau, S. Yagisawa, K. Ohta, M. Kai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 1033.
- [125] D. Kong, X. Huang, B. Lin, J. Jiang, Q. Li, Q. Wei, Y. Chi, G. Chen, *Talanta* **2014**, TAL15246 <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.043>
- [126] J. A. Murillo Pulgarin, J. M. Lemus Gallego, M. N. Sanchez Garcia, *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 1836.
- [127] L. Kukoč Modun, Nj. Radić, *Croat. Chem. Acta.* **2006**, *79*, 533.
- [128] M. Baghayeri, B. Maleki, R. Zarghani, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 175.
- [129] B. Jiang, Y. Xu, F. Xu, J. Sun, N. Li, Y. Luo, Q. Guo, *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 655.
- [130] B. Yuan, N. Zhai, X. Jiang, Y. Jin, C. Liu, C. Li, H. Xu, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.1738
- [131] T. M. Huang, C. H. Deng, Y. J. Yu, X. W. Zheng, G. L. Duan, *Chromatographia* **2006**, *63*, 551.
- [132] S. Huo, H. Shi, D. Liu, S. Shen, J. Zhang, C. Song, T. Shi, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *125*, 9.
- [133] W. Mbiya, R. Adigun, T. Tran, Y. Htwe, R. H. Simoyi, *Aust. J. Chem.* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1071/CH14126>
- [134] S. Shen, X. Chi, J. Dong, S. Huo, H. Tian, L. Xu, T. Shi, *J. Mol. Liq.* **2017**, *246*, 1.
- [135] Q. Li, L. Gao, *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 89.
- [136] L. Litao, L. Jing, L. Quanmin, *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *67*, 41.
- [137] B. Fan, Y. Wang, J. Yang, T. Ni, Q. Li, *Asian J. Chem.* **2014**, *26*, 331.
- [138] F. Tian, W. Zhu, Y. Liu, Y. Chen, *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 885.
- [139] L. Kukoc-Modun, Nj. Radić, *Croat. Chem. Acta.* **2010**, *82*, 189.
- [140] L. Kukoc-Modun, Nj. Radić, *Chem. Anal. (Warsaw)* **2009**, *54*, 871.
- [141] T. Perez Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, G. Lambertos, *Microchem. J.* **1991**, *44*, 72.
- [142] Y. Zhao, W. R. G. Baeyens, X. Zhang, A. C. Calokerinos, K. Nakashima, G. Van Der Weken, A. Van Overbeke, *Chromatographia* **1997**, *44*, 31.
- [143] Y. Zhao, W. R. G. Baeyens, X. Zhang, K. Nakashima, A. C. Calokerinos G. Van Der Weken, A. Van Overbeke, *Biomed. Chromatogr.* **1997**, *11*, 115.

- [144] Y. Zhao, W. R. G. Baeyens, X. Zhang, A. C. Calokerinos, K. Nakashima, G. Van Der Weken, *Analyst* **1997**, 122, 103.
- [145] T. Perez Ruiz, C. Martinez-Lozano, W. R. G. Baeyens, A. Sanz, M. T. San-Miguel, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 17, 823.
- [146] W. Siangproh, N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, *Fresenius Anal. Chim. Acta* **2003**, 499, 183.
- [147] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, p. 1448.
- [148] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th Edition on CD-ROM, (Ed.: M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman), Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, New Jersey, USA, **2001**, p. 4488.
- [149] *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005*, (Eds.: D. L. Ride), CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**, p. 418 (3-294), <http://www.hbcpnetbase.com>
- [150] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, **2013**, p. 586.
- [151] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, **2010**, p. 611.
- [152] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, **2013**, p. 701.
- [153] M. Smeyne, R. J. Smeyne, *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 62, 13.
- [154] J. P. Richie Jr., S. Nichenametla, W. Neidig, A. Calcagnotto, J. S. Haley, T. D. Schell, J. E. Muscat, *Eur. J. Nutr.* **2015**, 54, 251.
- [155] N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C. L. Hammond, *Biol. Chem.* **2009**, 390, 191.
- [156] A. R. T. S. Araujo, M. L. M. F. S. Saraiva, J. L. F. C. Lima, *Talanta* **2008**, 74, 1511.
- [157] C. K. Zacharis, P. D. Tzanavaras, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2010**, 13, 461.
- [158] E. Detsri, P. Seeharaj, *Colloids Surf., A* **2017**, 533, 125.
- [159] F. A. M. Redegeld, M. A. J. van Opstal, E. Houdkamp, W. P. van Bennekom, *Anal. Biochem.* **1988**, 174, 489.
- [160] S. Supharoek, N. Youngvises, J. Jakmunee, *Anal. Sci.* **2012**, 28, 651.
- [161] A. A. Ensafi, T. Khayamian, F. Hasanpour, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 140.
- [162] L. Wang, Y. Li, D. Zhao, C. Zhu, *Microchim. Acta* **2003**, 141, 41.
- [163] C. Lua, Q. Li, S. Chena, L. Zhaob, Z. Zheng, *Talanta* **2011**, 85, 476.
- [164] I. Satoh, *Anal. Chim. Acta* **1988**, 214, 415.
- [165] L. Mao, K. Yamamoto, *Electroanalysis* **2000**, 12, 577.
- [166] D. R. Shankaran, S. S. Narayanan, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 75, 501.
- [167] O. Zitka, D. Huska, S. Krizkova, V. Adam, G. J. Chavis, L. Trnkova, A. Horna, J. Hubalek, R. Kizek, *Sensors* **2007**, 7, 1256.
- [168] D. R. Shankaran, S. S. Narayanan, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2001**, 29, 816.
- [169] M. Kolar, D. Dobčnik, Nj. Radić, *Pharmazie* **2000**, 55, 913.

- [170] Nj. Radić, L. Kukoc-Modun, *Kinetic Methods of Analysis with Potentiometric and Spectrophotometric Detectors – Our Laboratory Experiences*, Chapter 3, Intech, **2012**, p. 71.
- [171] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, p. 678.
- [172] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th Edition, Belmont, USA, **2014**, p. 819.
- [173] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0*, Print Version, **2009**, p. 885.
- [174] <http://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html> [citirano 14.01.2018.]
- [175] J. Ružička, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta.* **1975**, 78, 145.
- [176] J. Ružička, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta.* **1978**, 99, 37.
- [177] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0*, Print Version, **2009**, p. 920.
- [178] O. Reynolds, *Proceedings of Royal Society of London*, **1883**, 35, 84.
- [179] <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.0%20Flow%20Injection.html> [citirano 12.01.2018.]
- [180] F. R. P. Rocha, J. A. Nobrega, O. Fatibello Filho, *Green Chem.* **2001**, 3, 216.
- [181] W. R. Melchert, B. F. Reis, F. R. P. Rocha, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 714, 8.
- [182] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, **2010**, p. 393
- [183] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0*, Print Version, **2009**, p. 543
- [184] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th Edition, Belmont, USA, **2014**, p. 650.
- [185] R. A. Al-Okab, A. A. Syed, *Talanta* **2007**, 72, 1239.
- [186] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, p. 407.
- [187] British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia 2009*, The Stationery Office, London, **2008**, p. 109.
- [188] Nj. Radić, L. Kukoč, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d. d., Zagreb, **2016**, p. 408.
- [189] British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia 2009*, The Stationery Office, London, **2008**, p. 2787.
- [190] Nj. Radić, L. Kukoč, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d. d., Zagreb, **2016**, p. 228.
- [191] Nj. Radić, L. Kukoč, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d. d., Zagreb, **2016**, p. 354.
- [192] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th Edition, Belmont, USA, **2014**, p. 535.
- [193] British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia 2009*, The Stationery Office, London, **2008**, p. 4572.
- [194] V. Cavrini, R. Gatti, P. Roveri, M. Rosa Cesaroni, *Analyst* **1988**, 113, 1447.
- [195] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 516.
- [196] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 518.

- [197] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 391.
- [198] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 441.
- [199] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 474.
- [200] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, p. 489.
- [201] P. Nilsson, *Neocuproine*, e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, **2012**, <https://doi.org/10.1002/047084289X.rn01440>
- [202] A. A. Sayed, A. Syeda, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2007**, *21*, 315.
- [203] E. Tutem, R. Apak, F. Baykut, *Analyst* **1991**, *116*, 89.
- [204] B. R. James, R. J. P. Williams, *J. Chem. Soc.* **1961**, 2007.
- [205] L. G. Sillen, A. E. Martell, *Stability constants of metal ion complexes*, Chemical Society Special Publication 25, The Chemical Society, London, **1964**, p. 717.
- [206] M. Ozyurek, K. Guclu, E. Tutem, K. S. Baskan, E. Ercag, S. E. Celik, S. Baki, L. Yildiz, S. Karaman, R. Apak, *Anal. Methods*, **2011**, DOI: 10.1039/c1ay05320e
- [207] R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, S. E. Karademir, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7970.
- [208] R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, S. E. Celik, *Microchim. Acta*, **2008**, *160*, 413.
- [209] K. Sozgen, S. D. Cekic, E. Tutem, R. Apak, *Talanta* **2006**, *68*, 1601.
- [210] K. Guclu, K. Sozgen, E. Tutem, M. Ozyurek, R. Apak, *Talanta* **2005**, *65*, 1226.
- [211] M. Ozyurek, K. Guclu, B. Bektasoglu, R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *588*, 88.
- [212] E. Tutem, R. Apak, E. Gunaydi, K. Sozgen, *Talanta*, **1997**, *44*, 249.
- [213] S. D. Cekic, K. S. Baskan, E. Tutem, R. Apak, *Talanta* **2009**, *79*, 344.
- [214] M. Ozyurek, K. Guclu, R. Apak, *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 652.
- [215] F. R. P. Rocha, J. A. Nobrega, *The Chemical Educator*, Springer-Verlag, New York, **1999**, *4*, 1.
- [216] H. Beitollahi, J. B. Raoof, R. Hosseinzadeh, *Talanta* **2011**, *85*, 2128.
- [217] S. Liawruangrath, S. Sakulphaemaruethai, *Talanta* **2003**, *59*, 9.
- [218] A. San Vicente, A. Arranz, J.M. Moreda, J.F. Arranz, *Anal. Chim. Acta* **1994**, *298*, 87.
- [219] Nj. Radić, L. Kukoč, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d. d., Zagreb, **2016**, p. 19.

ŽIVOTOPIS

Maja Biočić je rođena 21. kolovoza 1986. godine u Splitu gdje je završila II. jezičnu gimnaziju. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, 2008. godine je završila sveučilišni preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo. 2010. godine je na istom fakultetu završila sveučilišni diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul: Kemijsko procesno inženjerstvo i stekla naziv magistra inženjerka kemijskog inženjerstva. Tijekom studija je sudjelovala u nastavi kao demonstrator na vježbama iz Fizikalne kemije I i II. Dobitnica je Rektorove nagrade za studentski rad "Kristalizacija glicina u sušioniku s raspršivanjem" u akad. god. 2008./2009. izrađenom na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Sa istim studentskim radom sudjelovala je u posterskoj sekciji na *VIII. Susretu mladih kemijskih inženjera* 2010. godine, te je iste godine rad objavljen u zborniku skupova s međunarodnom recenzijom. Po završetku studija (od 2011. godine) u svojstvu naslovnog asistenta sudjeluje u eksperimentalnoj nastavi i seminarskom dijelu nastavnog procesa sljedećih predmeta: Analitička kemija (preddiplomski studij Kemijska tehnologija); Analitička kemija I i II (preddiplomski studij Kemija; integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija); Instrumentne metode analize (preddiplomski studij Kemija; diplomski studij Kemijska tehnologija); Instrumentne metode analize u farmaciji (integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija) na Kemijsko-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Splitu. U veljači 2013. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij "Kemija mediteranskog okoliša" na Kemijsko-tehnološkom fakultetu. Potom je u listopadu 2014. godine zaposlena kao asistent u Zavodu za analitičku kemiju na istom fakultetu. U ožujku 2015. godine je održala javnu obranu teme doktorskog rada pod naslovom "Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva (*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa) kao čistih tvari te u farmaceutskim pripravcima" iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstveno polje kemije, grana analitička kemija. Koautorica je 4 znanstvena rada u časopisima indeksiranim u *Current Contents*. Do sada je sudjelovala na 4 domaća znanstvena skupa, 7 međunarodnih, te 2 znanstvena skupa s međunarodnim sudjelovanjem, među kojima se može istaknuti *XI. Susret mladih kemijskih inženjera* 2016. u Zagrebu, gdje je održala usmeno izlaganje o rezultatima svog znanstvenog istraživanja.

Od ožujka 2017. godine suradnica je na projektu "Biljke kao izvor bioaktivnih sumpornih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala (BioSMe)", Hrvatske zaklade za znanost. Kao neposredna voditeljica sudjelovala je u izradi osam završnih radova te jedanaest diplomskih radova. Osim znanstvenog i nastavnog rada, sudjelovala je u brojnim popularizacijama znanosti kao član projekta popularizacije znanosti i kemije kroz predavanja, radionice i eksperimentalni rad za osnovne i srednje škole pod nazivom "Znanstvena školica" od 2013. godine. Između ostalog sudjelovala je na manifestacijama Festivala znanosti od 2013. do 2015. godine, u humanitarnoj akciji Božićne fritulijade u prosincu 2016. godine u organizaciji studenata Farmacije, te je u rujnu 2018. godine sudjelovala i u popularizaciji znanosti Europske komisije unutar akcije Marie Skłodowska-Curie (MSCA) pod nazivom "Europska noć istraživača".

Popis znanstvenih radova u časopisima koje kategorizira *Current Contents (CC)* i *Web of Science (WoS)*:

1. L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, **M. Biocic**, Nj. Radić, Kinetic Spectrophotometric Determination of *N*-Acetyl-L-cysteine Ethyl Ester (NACET) Generating Chromogenic Copper(I) L_n Complexes with Different Ligands, *Croatica Chemica Acta*, **2017**, 90, (2), 263-271.
2. L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, **M. Biocic**, Nj. Radić, Flow Injection Analysis of *N*-acetyl-L-cysteine Based on the Reduction of Copper(II)- neocuproine Reagent, *Analytical Letters*, **2016**, 49, (5), 607-617.
3. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, **M. Biočić**, Kinetic Spectrophotometric Determination of *N*-acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent, *Croatica Chemica Acta*, **2013**, 86, (1), 65-71.
4. L. Kukoč-Modun, **M. Biočić**, Nj. Radić, Indirect method for spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations with 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine by flow-injection analysis, *Talanta*, **2012**, 96, 174-179.

Popis znanstvenih radova u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom:

1. A. Sander, T. Penović, **M. Biočić**, K. Miholić, Crystallization of different salts during spray drying, *19 th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2010*, Prag, **2010**, 1-17.

Popis sudjelovanja na domaćim znanstvenim i stručnim skupovima:

1. **M. Biočić**, A. Rogošić, T. Kraljević, L. Kukoč Modun, Nj. Radić, Razvoj i vrednovanje metode određivanja glutaciona u farmaceutskim pripravcima slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor, XII. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA KNJIGA SAŽETAKA Book of Abstracts XII Meeting of Young Chemical Engineers, Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 22.–23. veljače 2018. p. 150-150 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
2. Baletić, M. Buljac, M. N. Mužek, **M. Biočić**, L. Kukoč Modun, Blažević, Ivica, *Lepidium Sativum L.* as a potential hyperaccumulator of copper, XII. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA KNJIGA SAŽETAKA, Book of Abstracts XII Meeting of Young Chemical Engineers, Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 22.–23. veljače 2018. p. 149-149 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
3. **M. Biočić**, L. Kukoč Modun, Nj. Radić, Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva (*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutaciona) kao čiste tvari te u farmaceutskim pripravcima, Knjiga Sažetaka XI. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA 2016., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 18.–19. veljače 2016, Zagreb, p. 48-48 (usmeno priopćenje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
4. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, Razvoj kinetičke spektrofotometrijske metode za određivanje cisteina, penicilamina, tiopronina i glutaciona, kao čiste tvari i u farmaceutskim pripravcima, XXIV. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA XXIV.CROATIAN MEETING OF CHEMISTS AND CHEMICAL ENGINEERS Zagreb: HDKI/CSCE, 21.–24. travnja 2015, Zagreb, p. 120-120 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
5. L. Kukoč-Modun, D. Tsikas, **M. Biocic**, T. Kraljevic, Nj. Radić, ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA I *N*-ACETIL-L-CISTEIN ETIL ESTERA PRIMJENOM SIA METODE SA SPEKTROFOTOMETRIJSKOM DETEKCIJOM, XXIV. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, XXIV.CROATIAN MEETING OF CHEMISTS AND CHEMICAL ENGINEERS Zagreb: HDKI/CSCE, 21.–24. travnja 2015, Zagreb, p. 129-129 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

6. Nj. Radić, L. Kukoč-Modun, **M. Biočić**, Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cisteina zasnovano na redukciji bakar(II)-neokuproin reagensa, X. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA 2014, 20.–21. veljače 2014. Zagreb, p. 181-181 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
7. **M. Biočić**, K. Miholić, I. Bujanović, T. Penović, DOBIVANJE KRISTALINIČNIH PRAŠAKA U SUŠIONIKU S RASPRŠIVANJEM, VIII. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA 2010, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 18–19 veljače 2010., p. 70-70 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Popis sudjelovanja na međunarodnim znanstvenim skupovima:

1. L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, **M. Biocic**, Nj. Radić, D. Modun, Development of Flow Injection and Sequential Injection Methods for the Determination of *N*-Acetyl-L-Cysteine Ethyl Ester (NACET) Generating Chromogenic Copper(I)Ln Complexes With Different Ligands, Flow Analysis & Capillary Electrophoresis 2018 Book of Abstracts, Hradec Kralove, 25.–27. lipnja 2018. p. 35-35 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
2. L. Kukoč-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, **M. Biočić**, Nj. Radić, Kinetic Spectrophotometric Determination of *N*-acetylcysteine Ethyl Ester using Bichinchoninic Acid, Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 21–23 Octobre 2016, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, 2016. p. 51-51 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. L. Kukoč-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, **M. Biočić**, Nj. Radić, Flow Injection Spectrophotometric Determination of *N*-acetylcysteine Ethyl Ester Based on the Reduction of Copper(II)-bichinchoninic Acid Complex, Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 21–23 Octobre 2016, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, 2016. p. 53-53 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, T. Kraljevic, Nj. Radić, Development of flow methods for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations, 21st Scientific Symposium of the Austrian Pharmacological Society. Joint Meeting with the British Pharmacological Society and the Pharmacological Societies of Croatia, Serbia and Slovenia Graz, 16–18 September 2015, Graz,

- Austria: Austrian Pharmacological Society and Medical University of Graz, 2015, p. 33-34 (poster, međunarodna recenzija, sažetak)
5. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, Determination of pharmaceutical active thiolic compounds, penicillamine, cysteine, tiopronine and glutathione by flow injection analysis with spectrophotometric detection, Flow Analysis XIII Book of Abstracts, 05–10 July 2015, Prague: Charls University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, 2015, p. 109-109 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 6. L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, **M. Biocic**, T. Kraljevic, Nj. Radić, Sequential injection analysis of the novel lipophilic amino acid thiol *N*-acetylcysteine ethyl ester (NACET) with spectrophotometric detection, Flow Analysis XIII Book of Abstracts, 05–10 July 2015, Prague: Charls University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, 2015, p. 110-110 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 7. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, New kinetic method for determination of *N*-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations, Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 10–12 Octobre 2014, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, 2014, p. 44-44 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 8. L. Kukoč-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, **M. Biočić**, Nj. Radić, Kinetic and flow injection spectrophotometric determination of *N*-acetylcysteine ethyl ester based on the reduction of copper(II)-neocuproine, Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 10–12 Octobre 2014, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, 2014. p. 59-59 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 9. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, New kinetic method for determination of *N*-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations, Prvi hrvatski kongres kliničke farmacije s međunarodnim sudjelovanjem Optimizacija farmakoterapije i sigurnost bolesnika, 10–12 April 2014, Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2014, p. 84-84 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 10. L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, Flow injection analysis of *N*-acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent, 18th International Conference on Flow Injection Analysis, 15–20 September 2013, Porto, p. 155-155 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

11. Nj. Radić, L. Kukoc-Modun, **M. Biocic**, Kinetic Spectrophotometric Determination of *N*-acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent, 4th EuCheMS Chemistry Congress, 26–30 August 2012, Prague, p. 1145-1145 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
12. L. Kukoč-Modun, **M. Biocic**, Nj. Radić, Indirect method for spectrophotometric determination of ascorbic acid with 2, 4, 6-tripyridyl-*s*-triazine by Flow Injection Analysis, 17th International Conference on Flow Injection Analysis, 03–08 July 2011, Warszawa, p. 143-143 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)