

# Određivanje N-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji Cu(II)Ln kompleksa analizom slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor : razvoj i vrednovanje metode

---

**Tomić, Dea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:918066>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Dea Tomić**

**ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI  $\text{Cu(II)L}_n$   
KOMPLEKSA ANALIZOM SLIJEDNIM INJEKTIRANJEM UZ  
SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun**

**Split, listopad 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Dea Tomić**

**ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI  $\text{Cu(II)L}_n$   
KOMPLEKSA ANALIZOM SLIJEDNIM INJEKTIRANJEM UZ  
SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun**

**Split, listopad 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Analitička kemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Maja Biočić

### ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI $\text{Cu(II)}_n$ KOMPLEKSA ANALIZOM SLIJEDNIM INJEKTIRANJEM UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE

Dea Tomić, broj indeksa 124

**Sažetak:** U ovom radu optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cisteina analizom slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks-reakciji, u kojoj tiolna skupina *N*-acetil-L-cisteina reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) kompleks. Pri tome nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) kompleks. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri  $\lambda = 483$  nm. Optimizacijom su obuhvaćeni kemijski parametri (pH-vrijednost i molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ ), kao i parametri SIA sustava (redosljed injektiranja, volumni protok osnovne otopine, volumen injektiranja reagensa, volumen injektiranja analita, volumen petlje zadržavanja i duljina reakcijske uzvojnice). Za optimiziranu metodu određeno je linearno dinamičko područje u rasponu od  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, uz pripadajuću jednadžbu pravca:  $y = 7134 x + 0,0043$  i koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9996$ . Određene su granica dokazivanja (LOD =  $1,3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) i granica određivanja (LOQ =  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>). U određivanju analita, ne interferiraju tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka. Vrednovanje metode uključivalo je ispitivanje točnosti (iskoristivosti), prenošenja signala te dosega (potpunosti reakcije). Mjerenjem niza od 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine analita, utvrđena je ponovljivost metode uz relativno standardno odstupanje, RSD = 2,62 %, dok je učestalost mjerenja 20 uzoraka na sat. Uspoređeni su rezultati razvijene metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja.

**Ključne riječi:** *N*-acetil-L-cistein, slijedna analiza injektiranjem (SIA), spektrofotometrijski detektor

**Rad sadrži:** 68 stranica, 27 slika, 9 tablica, 21 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Franko Burčul, predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević, član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun, član – mentor

**Datum obrane:** 17. listopada 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Analytical chemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** Lea Kukoč Modun, PhD, assistant professor  
**Technical assistance:** Maja Biočić, PhD

### DETERMINATION OF *N*-ACETYL-L-CYSTEINE BASED ON THE REDUCTION OF Cu(II)Ln COMPLEX USING SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD

Dea Tomić, index number 124

**Summary:** In this study, a new method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine using sequential injection analysis with spectrophotometric detector had been optimized and validated. The method is based on a redox reaction in which the thiol group of *N*-acetyl-L-cysteine reduces the bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) complex. This produces a very stable orange complex, the bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I) complex. The resulting complex reaches an absorption maximum at  $\lambda = 483$  nm. The optimization included chemical parameters (pH value and molar ratio of BCS and  $\text{Cu}^{2+}$ ), as well as parameters of the SIA system (sequence of injection of sample and reagent, volume flow of carrier solution, injection volume of the reagent, injection volume of analyte, volume of holding coil and reaction coil length). The method found to be linear over the range from  $4.0 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$  to  $4.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , the following equation had been determined:  $y = 7134x + 0.0043$  and the correlation coefficient,  $R^2 = 0.9996$ . Limit of detection (LOD =  $1.3 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) and the limit of quantification (LOQ =  $4.0 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) were determined. No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations. Validation of the method included evaluating accuracy, carry over and extent of reaction. Repeatability was confirmed based on results of 15 sequential injections of standard analyte solution with relative standard deviation, RSD = 2.62%, at a sampling rate of 20 analysis per hour. Results of the developed method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine were compared with results of the standard Pharmacopoeial method.

**Keywords:** *N*-acetyl-L-cysteine, sequential injection analysis (SIA), spectrophotometric detector

**Thesis contains:** 68 pages, 27 figures, 9 tables, 21 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Franko Burčul, PhD, assistant professor, chair person
2. Ivana Škugor Rončević, PhD, assistant professor, member
3. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant professor, member – supervisor

**Defence date:** October 17, 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	<i>N</i> -acetil-L-cistein .....	2
1.1.1.	Kemijska svojstva .....	2
1.1.2.	Farmakodinamika .....	2
1.1.3.	Farmakokinetika .....	3
1.1.4.	Nuspojave .....	4
1.1.5.	Interakcije .....	4
1.1.6.	Doziranje .....	4
1.1.7.	Kontraindikacije i mjere opreza .....	5
1.1.8.	Farmaceutski oblici .....	5
1.2.	Kinetičke metode analize .....	6
1.2.1.	Red reakcije .....	7
1.2.2.	Zakoni brzine za reakcije pseudoprvo reda .....	7
1.3.	Slijedna analiza injektiranjem .....	9
1.3.1.	Formiranje zone .....	10
1.4.	Spektroskopija .....	12
1.4.1.	Elektromagnetski spektar .....	12
1.4.2.	Apsorpcija zračenja .....	12
1.4.2.1.	Odnos između apsorbancije i koncentracije: Beerov zakon .....	14
1.4.2.2.	Ograničenja Beerovog zakona .....	15
1.4.3.	Molekulska apsorpcijska spektroskopija .....	15
1.4.3.1.	Instrumenti u optičkoj spektroskopiji .....	15
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3.	MATERIJALI I METODE .....	20
3.1.	Priprava otopina .....	21
3.1.1.	Deionizirana voda .....	21
3.1.2.	Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera .....	21
3.1.3.	Otopina natrijevog hidroksida .....	21
3.1.4.	Otopine reagensa .....	21
3.1.5.	Standardna otopina <i>N</i> -acetil-L-cisteina .....	22
3.1.6.	Otopina realnog uzorka .....	22
3.1.7.	Priprava otopina za određivanje <i>N</i> -acetil-L-cisteina metodom koju propisuje Farmakopeja .....	22
3.2.	Dijelovi SIA sustava .....	24

3.2.1.	Programiranje protoka.....	24
3.3.	Ostali korišteni uređaji i oprema .....	26
4.	REZULTATI.....	27
4.1.	Optimizacija kemijskih parametara u SIA sustavu.....	28
4.1.1.	Optimizacija pH-vrijednosti .....	28
4.1.2.	Optimizacija molarnog omjera BCS i Cu <sup>2+</sup> .....	29
4.2.	Optimizacija parametara SIA sustava.....	31
4.2.1.	Optimizacija redoslijeda injektiranja.....	31
4.2.2.	Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine ( $Q_{cs}$ ).....	32
4.2.3.	Optimizacija volumena injektiranja reagensa .....	33
4.2.4.	Optimizacija volumena injektiranja analita.....	34
4.2.5.	Optimizacija volumena petlje zadržavanja .....	35
4.2.6.	Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice .....	36
4.3.	Odabrani optimalni parametri.....	37
4.4.	Obrada rezultata SIA mjerenja .....	38
4.4.1.	Linearno dinamičko područje.....	38
4.4.2.	Granica dokazivanja i granica određivanja .....	40
4.4.3.	Utjecaj interferirajućih vrsta.....	41
4.4.4.	Točnost (iskoristivost).....	43
4.4.5.	Ponovljivost.....	46
4.4.6.	Učestalost analize .....	47
4.4.7.	Prenosivost .....	48
4.4.8.	Doseg reakcije .....	49
4.5.	Primjena razvijene metode na analizu realnog uzorka .....	50
4.6.	Usporedba razvijene metode određivanja <i>N</i> -acetil-L-cisteina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja .....	53
5.	RASPRAVA.....	54
6.	ZAKLJUČAK .....	58
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE.....	60
8.	SAŽETAK.....	63
9.	SUMMARY .....	65
10.	ŽIVOTOPIS.....	67

## *Zahvala*

*Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun i neposrednoj voditeljici dr. sc. Maji Biočić na pomoći pri izradi diplomskog rada te uloženom trudu i vremenu.*

*Od srca hvala svim prijateljima i kolegama koji su učinili studiranje nezaboravnim.*

*Naposljetku, najveće hvala roditeljima Željani i Željku te dragom Marku na beskrajnoj ljubavi i podršci te razumijevanju koje su mi pružili tijekom cjelokupnog obrazovanja.*

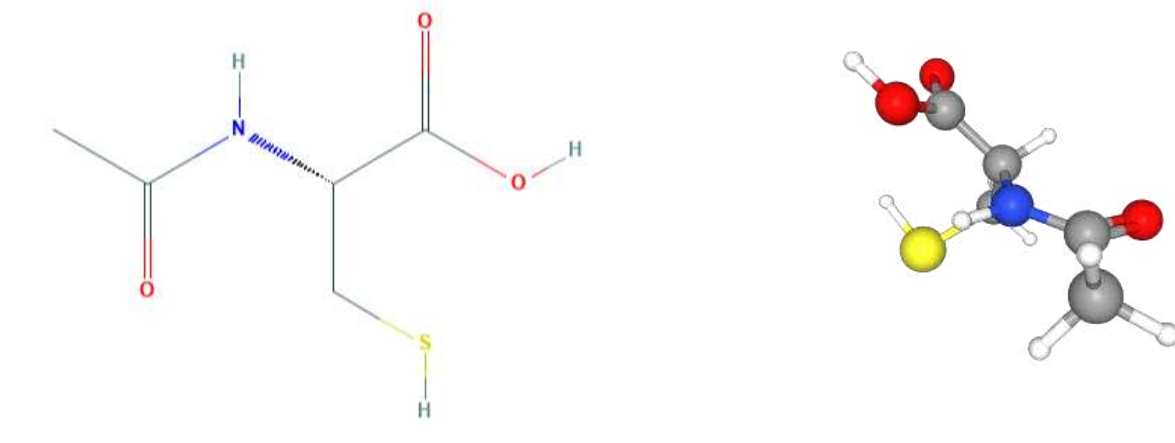


## **1. UVOD**

## 1.1. *N*-acetil-L-cistein

*N*-acetil-L-cistein (NAC) sintetski je aminotiolni antioksidans. U literaturi je poznat i pod imenom *N*-acetilcistein i acetilcistein, dok naziv po IUPAC nomenklaturi glasi (2*R*)-2-acetamido-3-sulfanilpropanska kiselina [1].

U dišnom sustavu *N*-acetil-L-cistein djeluje sekretolitički i sekretomotorički, a osim toga djelotvoran je protuotrov (antidot) kod predoziranja paracetamolom [2].



Slika 1.1. NAC prikazan strukturnom formulom (2D) i molekulskim modelom (3D) [3]

### 1.1.1. Kemijska svojstva

NAC je bijeli kristalinični prah kemijske formule  $C_5H_9NO_3S$  i molekularne mase  $163,2 \text{ g mol}^{-1}$ . 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  $109,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stabilan je na dnevnom svjetlu i pri temperaturi do  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  te nije higroskopan. Konstanta disocijacije  $pK_a$  iznosi  $3,24$  zbog karboksilne skupine [3].

### 1.1.2. Farmakodinamika

NAC je *N*-acetil derivat aminokiseline L-cistein, gdje je acetilna skupina vezana na dušikov atom. Samo je *N*-acetil-L-cistein aktivan oblik koji se metabolizira do cisteina, a zatim do glutationa. Koristi se kao mukolitik jer razgrađuje disulfidne veze mukopolisaharidnih lanaca i ima depolimerizacijski učinak na lance DNK (u gnojnoj sluzi). Na taj način smanjuje viskoznost bronhalnog sekreta pri čemu omogućava njegovo lakše iskašljavanje [4].

Osim toga, NAC ima antioksidacijsko djelovanje koje se ostvaruje na dva načina. Neizravno NAC pospješuje sintezu glutationa, polipeptida značajnog za detoksikaciju štetnih tvari, uz to NAC se izravno veže na slobodne kisikove radikale. Time se objašnjava učinak NAC-a kao antidota (protuotrova) pri trovanju paracetamolom, pri čemu se uglavnom koriste parenteralni oblici. U prevelikim dozama paracetamola dolazi do zasićenja dvaju glavnih metaboličkih putova glukuronidacije i sulfokonjugacije što dovodi do stvaranja hepatotoksičnog metabolita. NAC metabolizmom prelazi u L-cistein koji je prekursor glutationa, tvari potrebne za inaktivaciju štetnog metabolita paracetamola [5,6].

Također, pokazuje određenu kliničku korist u liječenju akutnih trovanja teškim metalima zbog kelatirajućih svojstava [4].

Postoje ograničeni dokazi koji ukazuju na korist primjene NAC-a u kombinaciji s konvencionalnom terapijom u liječenju HIV infekcije [7], različitih dermatoloških stanja [8] te kod neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih poremećaja, uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, neuropatsku bol te moždani udar [9].

### **1.1.3. Farmakokinetika**

NAC se nakon oralne primjene iz probavnog sustava vrlo brzo i gotovo potpuno apsorbira. Oko 50 % NAC-a veže se za proteine iz plazme. Zbog značajnog učinka prvog prolaska kroz jetru, bioraspoloživost oralno primijenjenog NAC-a vrlo je mala (oko 10 %).

Vrijeme polueliminacije NAC-a približno je 1 sat i uglavnom ovisi o brzini biotransformacije u jetri. Poremećaji funkcije jetre produljuju vrijeme polueliminacije u plazmi do 8 sati. U jetri se metabolizira u cistein (aktivni metabolit), diacetilcistin, cistin i druge miješane disulfide. NAC i njegovi metaboliti prisutni su u tri različita oblika: slobodni, vezani za proteine slabim disulfidnim vezama ili ugrađeni u aminokiseline. Najviša razina u plazmi postiže se nakon 1 do 3 sata. Vrijeme polueliminacije nakon intravenske primjene je 30 do 40 minuta.

NAC se izlučuje gotovo isključivo bubrezima i to u obliku neaktivnih metabolita (anorganski sulfati, diacetilcistin). NAC prolazi kroz posteljicu i može se naći u krvi pupkovine. Nema dostupnih podataka o izlučivanju u majčino mlijeko, kao ni o prolasku kroz krvno – moždanu barijeru u ljudi [5, 10].

#### **1.1.4. Nuspojave**

Manje česte nuspojave koje se mogu javiti prilikom uzimanja NAC-a su: glavobolja, vrućica, alergijske reakcije (svrbež, urtikarija, osip, oticanje usana i lica, otežano disanje, tahikardija i hipotenzija), šum u uhu, stomatitis, proljev, povraćanje, štućavica, mučnina i bolovi u trbuhu. Rijetko može doći do zaduhe i bronhospazma (uglavnom u bolesnika s bronhalnom astmom). Postoje vrlo rijetka izvješća o pojavi krvarenja uzrokovana NAC-om, djelomično u sklopu reakcija preosjetljivosti [5, 10].

#### **1.1.5. Interakcije**

Zbog oslabljenog refleksa kašlja, istodobna primjena NAC-a i antitusika može prouzročiti opasan zastoj sekreta. Ne preporučuje se istodobna primjena NAC-a i antibiotika (tetraciklini, osim doksiciklina, aminoglikozidi ili penicilini) jer se smanjuje učinak antibiotika. Između primjene navedenih lijekova i NAC-a treba proći najmanje dva sata. Izvješća o inaktivaciji antibiotika djelovanjem NAC-a i ostalih mukolitikata temelje se na rezultatima *in vitro* ispitivanja, pri čemu su izravno miješane ispitivane supstancije. Također, povećan je vazodilatacijski učinak i inhibicijski učinak na agregaciju trombocita tijekom istovremene primjene gliceriltrinitrata i NAC-a. Klinički značaj navedenog nije potvrđen [5, 10].

#### **1.1.6. Doziranje**

Primjena u djece mlađe od 2 godine se ne preporučuje. Za djecu starosti od 2 do 5 godina maksimalna dnevna doza je 300 mg, a od 6 do 14 godina maksimalna dnevna doza iznosi 400 mg. Za odrasle i djecu stariju od 14 godina najveća dnevna doza iznosi 600 mg. Ako liječnik ne odluči drugačije, liječenje NAC-om ne treba trajati dulje od 4 – 5 dana. Predoziranje može dovesti do gastrointestinalnih smetnji (mučnina, povraćanje, proljev), a kod djece do hipersekrecije. Liječenje je simptomatsko [5, 10].

### **1.1.7. Kontraindikacije i mjere opreza**

Uporaba NAC-a kontraindicirana je ako postoji preosjetljivost. Oprez je potreban u bolesnika s bronhalnom astmom i u bolesnika s ulkusom u anamnezi. Budući da NAC utječe na metabolizam histamina i može prouzročiti simptome njegove netolerancije (npr. glavobolja, vazomotorni rinitis, svrbež), potreban je povećan oprez kod osoba s razvijenom netolerancijom na histamin [5, 10].

Malo je kliničkih podataka o primjeni NAC-a u trudnica. Eksperimentalna ispitivanja na pokusnim životinjama ne upućuju na izravne ili posredne štetne učinke na trudnoću, embrionalni/fetalni razvoj, porođaj ili postnatalni razvoj [5, 10].

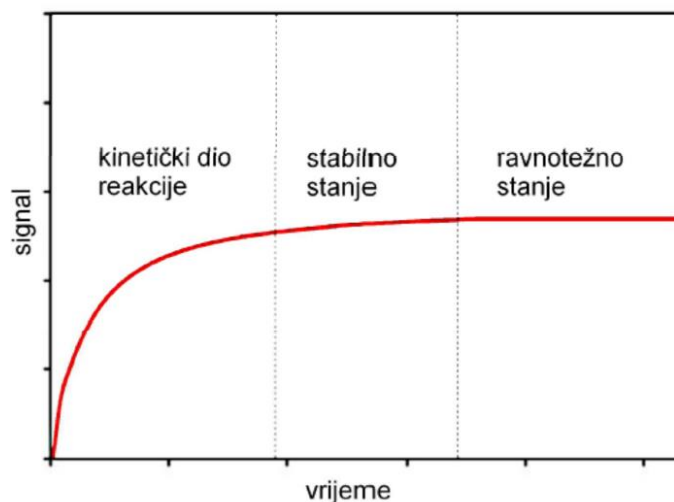
### **1.1.8. Farmaceutski oblici**

NAC je dostupan u različitim farmaceutskim oblicima, koji se razlikuju za različite indikacije. Registriran je u bezreceptnom režimu za liječenje kašlja i prehlade u obliku šumećih tableta, granula za oralnu otopinu, oralne otopine i oralnog praška [11].

Parenteralni oblik lijeka nije registriran u Republici Hrvatskoj, ali se nalazi na bolničkoj listi lijekova kao generički lijek i može se nabaviti za liječenje predoziranja paracetamolom [11].

## 1.2. Kinetičke metode analize

Za razliku od ravnotežnih metoda analize gdje se signal bilježi u trenutcima kada je kemijska reakcija u ravnotežnom ili stabilnom stanju, kod kinetičkih metoda signal se bilježi u kinetičkom dijelu reakcije [12, 13].



Slika 1.2. Razdoblja odabrane kemijske reakcije: kinetički dio, stabilno stanje, ravnotežno stanje [12]

Mjerenja se u kinetičkim metodama obavljaju pod dinamičkim uvjetima u kojima se koncentracije reaktanata i produkata mijenjaju kao funkcija vremena, a kao analitički parametar služi ili nastajanje produkata ili nestajanje reaktanata [12, 13].

Svaka kemijska reakcija koja se odvija prihvatljivom brzinom može poslužiti kao osnova za kinetička mjerenja. Kako bi reakcija mogla poslužiti razvoju pouzdane kinetičke metode mora ispuniti sljedeća tri uvjeta:

- brzina reakcije ne smije biti ni prebrza ni prespora;
- treba biti poznat zakon brzine reakcije;
- način kontinuiranog praćenja koncentracije barem jedne vrste iz odabrane reakcije mora biti poznat.

Reakcija treba biti dovoljno brza kako bi se mjerenja izvršila u prihvatljivom vremenu, ali također dovoljno spora da se stanje ravnoteža ne bi postiglo dok se reaktanti još uvijek miješaju [14].

### 1.2.1. Red reakcije

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



gdje A označava analit, R reagens i P produkt.

Zakon brzine reakcije prikazan općom jednačbom ima oblik:

$$\text{brzina} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [A]^m \cdot [R]^n \quad (1-2)$$

gdje je brzina derivacija koncentracije A, R ili P po vremenu  $t$ . Prve dvije brzine imaju negativan predznak jer se koncentracije analita i reagensa smanjuju napredovanjem reakcije, dok treća ima pozitivan predznak jer koncentracija produkta raste. U gornjem izrazu,  $k$  je konstanta brzine reakcije,  $m$  je red reakcije u odnosu na analit A, a  $n$  je red reakcije u odnosu na reagens R [13].

### 1.2.2. Zakoni brzine za reakcije pseudoprvo reda

Najjednostavniji primjer kemijske reakcije je spontano, nepovratno nestajanje vrste A:



Reakcija je prvog reda u odnosu na A, te je zakon brzine reakcije:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \quad (1-4)$$

Međutim, reakcije prvog reda uglavnom nisu upotrebljive jer se većina analiza temelji na reakcijama koje uključuju barem dvije vrste, analit i reagens. Zakon brzine za takve reakcije najčešće je složen te nije upotrebljiv u analitičke svrhe. Jedine upotrebljive reakcije su one koje je moguće provesti u uvjetima koji dopuštaju pojednostavljenje složenog zakona brzine u oblik za reakciju prvog reda. Takve reakcije nazivaju se reakcijama pseudoprvo reda [13].

Ako se kemijska reakcija odvija u jednom temeljnom koraku:



brzina je proporcionalna koncentraciji svakog od reaktanata, a zakon brzine glasi:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [R] \quad (1-6)$$

Može se pretpostaviti da je navedena reakcija prvog reda u odnosu prema svakom od reaktanata, a ukupno je drugog reda.

Ukoliko za koncentraciju reaktanta R vrijedi da je  $[R] \gg [A]$ , koncentracija R se tijekom reakcije vrlo malo promijeni, pa se može pisati:

$$k \cdot [R] = \text{konstanta} = k' \quad (1-7)$$

Tada jednačina za brzinu reakcije glasi:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k' \cdot [A] \quad (1-8)$$

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

Iako se kod određivanja brzine za kemijske reakcije pseudoprvog reda uz prisutnost suviška reagensa javljaju pogreške, one su prihvatljive. Također, reakcije su rijetko potpuno nepovratne, stoga je važno uvjete održavati takvima da je konstanta brzine za povratnu reakciju vrlo mala, a samim time i brzina povratne reakcije zanemariva, čime je i pogreška zanemariva [13].

Kinetičke metode udovoljavaju zahtjevima farmaceutske industrije za automatizacijom i minijaturizacijom metoda za istraživačka i rutinska kvantitativna mjerenja. Kao najpovoljnija, pokazala se slijedna analiza injektiranjem zbog ekonomičnosti potrošnje otopine uzorka i reagensa uz zadovoljavajuću osjetljivost metode i učestalost mjerenja [15]. Ista će, u nastavku rada, biti detaljno objašnjena, kao i postupak razvoja ove metode kroz optimizaciju osnovnih značajki protočnog sustava.



### 1.3. Slijedna analiza injektiranjem

U drugoj polovici 20. stoljeća, točnije 1975. godine nastupila je laboratorijska automatizacija u kemijskoj analizi. Ružička i Marshall su 1990. godine razvili i opisali tehniku analize slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA). Ona pripada drugoj generaciji protočnih tehnika jer je nastala razvojem analize injektiranjem u protok (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA) [16].

SIA se temelji na slijednom injektiranju uzorka i reagensa u tok struje nosioca. U najjednostavnijoj konfiguraciji, zona uzorka i zona reagensa injektiraju se jedna pored druge, u struju otopine nositelja. Nakon toga slijedi promjena smjera protoka, koja pospješuje međusobno raspršenje injektiranih zona. Na njihovom se sučelju formira produkt reakcije (slika 1.3). Prolaskom nastalog produkta kroz detektor bilježe se promjene u odabranom parametru. Odziv detektora je rezultat dvaju istovremenih kinetičkih procesa: fizikalnog procesa disperzije zone uzorka i kemijske reakcije koja nastaje kao posljedica miješanja analita u uzorku i reagensa [16].



Slika 1.3. SIA: raspršenjem zone uzorka (crveno) u zonu reagensu (plavo) na njihovom sučelju nastaje produkt (žuto) [16]

U usporedbi s FIA sustavom, koja djeluje na principu kontinuiranog protoka, prednost SIA sustava se temelji na programiranom, dvosmjernom i isprekidanom protoku, precizno kontroliranom od strane računala. Time se pospješuje međusobno raspršenje injektiranih zona, a diskontinuirani rad štedi reagens kada je sustav u praznom hodu. Osim toga, u SIA sustavu se aspiriraju diskretni volumeni uzorka i reagensu čime je njihova potrošnja značajno smanjena, a samim time se stvara i daleko manje otpada. Iz toga proizlazi kako je ekonomičnost jedna od glavnih prednosti ovog sustava. Uz to, tehnološki napredak u dizajnu ventila i crpke te kontrole temperature omogućio je postizanje podjednake učestalosti analiza kao i kod FIA sustava. Posebnost SIA sustava omogućava podvrgavanje odabrane količine analiziranog uzorka različitim tretmanima, što daje višestruke informacije, kao što je npr. istodobna analiza dvaju analita (nitrata i nitrita) pomoću uređaja koji se sastoji od samo jednog ventila i jedne crpke [16].

### 1.3.1. Formiranje zone

Kada se uzorak injektira u struju nosioca, dolazi do njihovog međusobnog miješanja. Proces je poznat pod nazivom disperzija ili raspršenje, a rezultat je dvaju procesa: konvekcije i difuzije [16].

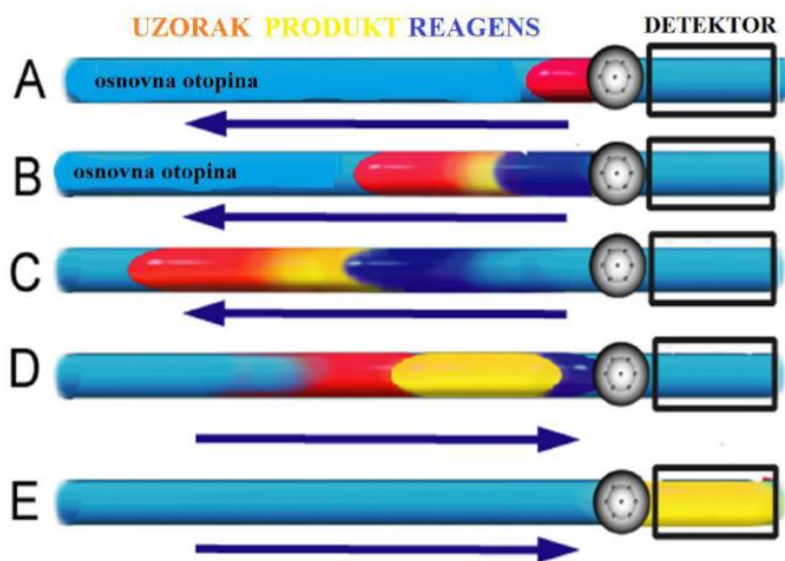
Konvekcija je posljedica laminarnog strujanja u kojem se brzina strujanja uzorka razlikuje ovisno o položaju u odnosu na stijenku cijevi. Tako je brzina uzorka neposredno uz stijenku jednaka nuli dok se segment uzorka u središnjem dijelu cijevi kreće brzinom dvostruko većom od struje nosioca. Kao rezultat, zona uzorka poprima paraboličan oblik [16].

Drugi doprinos disperziji je difuzija koja nastaje kao rezultat koncentracijskog gradijenta između zone uzorka i struje nosioca. Odvija se aksijalno i radijalno u odnosu na smjer strujanja osnovne otopine (slika 1.4). Aksijalna difuzija uzrokuje laminarno gibanje i međusobno miješanje zona. Za protočne analize bitna je samo radijalna difuzija koja smanjuje linearnu brzinu uzorka u sredini cijevi, dok se linearna brzina uzorka uz rub cijevi povećava. Na taj način difuzija osigurava zadržavanje cjelovitosti zone uzorka [16].



Slika 1.4. Prikaz aksijalne i radijalne difuzije [14]

Tek što je uzorak injektiran u sustav na njegovu disperziju utječe nekoliko čimbenika. Prvi je konvekcija zbog laminarnog kretanja osnovne otopine koje je u sredini cijevi brže nego uz rubove. Zatim na disperziju utječu i konvekcija i difuzija (3 do 20 s nakon injektiranja uzorka) te je na kraju, nakon približno 25 s, disperzija samo pod utjecajem difuzije [17].



Slika 1.5. Disperzija u SIA sustavu [16]

U SIA sustavu injektiranjem uzorka (A) te zatim reagensa (B) u struju osnovne otopine, reagens prodire u zonu uzorka zbog aksijalne disperzije. Zatim se kao spojena zona gibaju uzvodno (C). Promjenom smjera toka (D) dolazi do turbulentnog strujanja uzrokovanog ubrzanjem radijalne i aksijalne disperzije. Radijalna disperzija je završena kada reakcijska smjesa dođe do detektora (E). Na kraju ciklusa ispitivanja, sustav se ispire brzim protokom osnovne otopine koja odlazi u otpad (slika 1.5) [16].

Kad je uzorak tek injektiran u sustav, kemijski učinak dominira, te povećanje disperzije povećava i osjetljivost. Nakon nekog vremena učinak razrjeđenja dominira te povećanjem disperzije osjetljivost pada. Zato je kod razvoja metode važno ustanoviti optimalne uvjete zbog najboljeg kompromisa između potpunosti kemijske reakcije i razrjeđenja [16].

## 1.4. Spektroskopija

Izraz spektroskopija se, s povijesnog gledišta, odnosi na granu znanosti koja se bavi svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučenom u komponente, odnosno valne duljine, koje tvore spektar [18].

### 1.4.1. Elektromagnetski spektar

Elektromagnetsko zračenje oblik je energije koji se prenosi velikom brzinom kroz prostor. 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 opisuje se pomoću klasičnog valnog modela čiji su osnovni parametri valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda. Valna duljina ( $\lambda$ ) je udaljenost od vrha do vrha valova. Frekvencija ( $\nu$ ) je broj potpunih oscilacija koje stvara val svake sekunde [13].

Valni model ne obuhvaća pojave povezane s apsorpcijom i emisijom zračenja i ne može ih objasniti. Za bolje razumijevanje, elektromagnetsko zračenje se promatra kao struja pojedinačnih (diskretnih) čestica energije, nazvanih fotonima. Na taj način se svjetlost može promatrati i kao čestica i kao val. Foton je kvant energije elektromagnetskog zračenja. Energija fotona ( $E$ ) izravno je proporcionalna frekvenciji zračenja ( $\nu$ ), a opisuje se jednadžbom:

$$E = h \cdot \nu \quad (1-9)$$

gdje je  $h$  Planckova konstanta ( $6,63 \times 10^{-34}$  J s) [13].

### 1.4.2. Apsorpcija zračenja

U apsorpcijskoj spektroskopiji mjeri se količina apsorbirane svjetlosti kao funkcija valne duljine. Mjerenja apsorpcije mogu dati kvalitativne i kvantitativne podatke o uzorku. Svaka molekulska vrsta ima sposobnost apsorpcije elektromagnetskog zračenja svoje karakteristične frekvencije. Prenošenjem energije na molekulu dolazi do smanjenja intenziteta elektromagnetskog zračenja. Proces u kojem neka kemijska vrsta, prisutna u propusnoj sredini, selektivno smanjuje intenzitet elektromagnetskog zračenja naziva se apsorpcija. Najniže energijsko stanje atoma ili molekule naziva se osnovnim stanjem. Apsorpcija fotona nastaje samo kada je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko, pobuđeno stanje. Pobuđivanje  $M$  u  $M^*$  može se opisati:



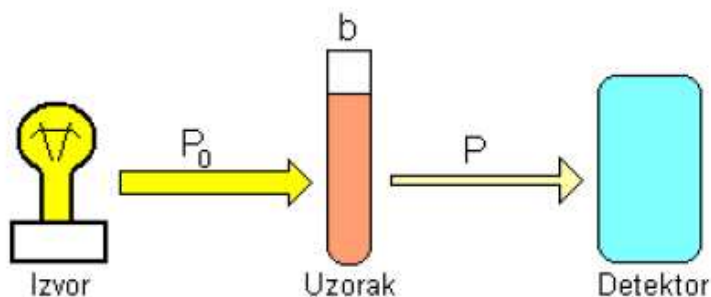
$M^*$  označava pobuđenu česticu. Nakon kratkog vremena ( $10^{-6} - 10^{-9}$  s) pobuđena se vrsta relaksira. Relaksacija je proces u kojem pobuđena vrsta otpušta suvišak energije, pri čemu se vraća u niže energijsko stanje. Suvišak energije prenosi se drugim atomima ili molekulama u istoj okolini. Taj proces uzrokuje malo povišenje temperature u okolini, a opisuje se jednačinom:



Budući da je vijek trajanja  $M^*$  jako kratak, koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku može se smatrati zanemarivom. Također, količina toplinske energije otpuštene tijekom relaksacije je vrlo mala pa se ne može ni detektirati [13].

Apsorpcijske značajke pojedine vrste uglavnom se opisuju apsorpcijskim spektrom. To je grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. Vertikalna os takvih prikaza može biti apsorbancija ili propusnost (transmitancija) izražena u postocima [18].

Kada svjetlost prolazi kroz uzorak njegova se snaga zračenja smanjuje (slika 1.6). Razlog tome je apsorpcija svjetlosti od strane uzorka, odnosno apsorbirajuće vrste [18].



Slika 1.6. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije [18]

Snaga zračenja ( $P$ ) je energija zračenja koja u jednoj sekundi pada na površinu detektora od  $1 \text{ cm}^2$ . Snop svjetlosti, snage zračenja  $P_0$ , prolazi kroz sloj otopine, debljine  $b$  (cm) i koncentracije  $c$ , vrste koja apsorpira. Posljedica je smanjenje snage snopa s  $P_0$  na  $P$ .

Transmitancija  $T$  se definira kao udio upadnog zračenja koji je prošao kroz medij:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1-12)$$

gdje  $P_0$  predstavlja snagu zračenja snopa prije prolaska, a  $P$  snagu zračenja snopa nakon apsorpcije.

Apsorbancija  $A$  definira se jednadžbom:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P} \quad (1-13)$$

Za razliku od transmitancije, apsorbcija otopine se povećava prigušenjem osnovnog snopa.

Apsorbancija i transmitancija, kako su prikazane u navedenim jednadžbama, ne mogu se mjeriti u laboratoriju. Budući da se uzorak nalazi u posudici, treba uzeti u obzir gubitke koji su posljedica međudjelovanja zračenja i stijenki posudice u kojoj je smješten uzorak. Zbog navedenog se uspoređuje snaga snopa zračenja propuštenog kroz mjernu posudicu punjenu otopinom sa snagom zračenja snopa koji prolazi identičnom posudicom punjenom samo otapalom.

Za kompenzaciju tih učinaka primjenjuje se sljedeća jednadžba:

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P} \quad (1-14)$$

odnosno logaritam omjera snage zračenja kroz otapalo i snage zračenja kroz otopinu analiza [13, 18].

#### 1.4.2.1. Odnos između apsorbcije i koncentracije: Beerov zakon

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom ( $A$ ) i veličine koja se određuje (koncentracije  $c$ ) poznat je kao Beerov zakon:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c \quad (1-15)$$

gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti koja se naziva apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljina puta zračenja kroz uzorak, a  $c$  koncentracija apsorbirajuće vrste [13].

Apsorbancija je veličina bez dimenzija, pa se zato jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. Ako je koncentracija izražena u mol L<sup>-1</sup>, a duljina puta zračenja u cm, konstanta proporcionalnosti je izražena u L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> te se naziva molarna apsortivnost,  $\varepsilon$ . Tada je:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1-16)$$

Molarna apsorptivnost,  $\varepsilon$  iskazuje broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbcija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 1 cm [13, 18].

Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju, uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta, ukupna apsorbanacija višekomponentnog sustava iznosi:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n \quad (1-17)$$

gdje indeks  $n$  označuje komponente 1,2,...,  $n$  koje apsorbiraju [13, 18].

#### **1.4.2.2. Ograničenja Beerovog zakona**

Beerov zakon vrijedi za monokromatska zračenja u razrijeđenim otopinama,  $c < 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> te predstavlja granični zakon.

Pri višim koncentracijama smanjuju se udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. To uzrokuje odstupanje od linearnog odnosa apsorbanacije 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 pojavljuju se kada vrste koje apsorbiraju sudjeluju u koncentracijski ovisnim ravnotežama kao što su reakcije disocijacije ili asocijacije [13, 18].

#### **1.4.3. Molekulska apsorpcijska spektroskopija**

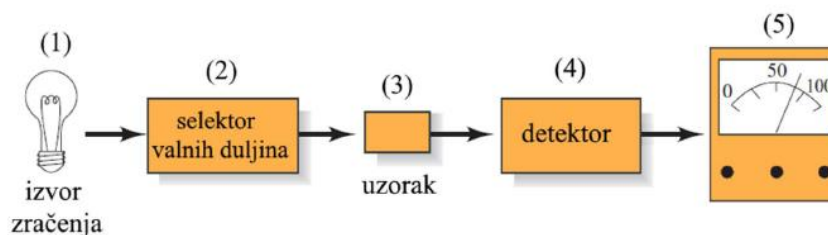
Molekulska apsorpcijska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju primjenjuje se za kvantitativnu analizu te je često korištena instrumentna tehnika u kemijskim laboratorijima [19].

Ultraljubičasto i vidljivo zračenje pobuđuju elektrone koji prebivaju u molekularnoj orbitali niske energije u orbitalu više energije. Prijelaz elektrona između dviju orbitala je elektronski prijelaz, dok je apsorpcijski proces elektronska apsorpcija [19].

##### **1.4.3.1. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji**

Većina spektroskopskih uređaja sastavljena je 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 [18].



Slika 1.7. Sastavni dijelovi instrumenta za apsorpcijsku spektroskopiju [14]

Apsorpcijska spektroskopija zahtijeva vanjski izvor zračenja konstantnog i dovoljno snažnog zračenja koje omogućava jednostavnu detekciju i mjerenje. Žarulja s volframovom ili halogenom niti je izvrstan izbor za područje valnih duljina od 350 do 2500 nm, dok se vodikova i deuterijeva žarulja koristi za emitiranje ultraljubičastog zračenja u području valnih duljina od 160 do 380 nm [18].

Selektorima valnih duljina sužava se mjerno zračenje do uske vrpce, odnosno skupine susjednih valnih duljina, budući da ne mogu osigurati izdvajanje zračenja samo jedne valne duljine. Time utječu na selektivnost i osjetljivost instrumenta. Osnovni tipovi selektora su monokromatori i filtri. Kod monokromatora se izlazne valne duljine mogu kontinuirano mijenjati u relativno širokom spektralnom području dok filtri apsorbiraju sve valne duljine kontinuiranog izvora, osim jedne ograničene vrpce [13, 19].

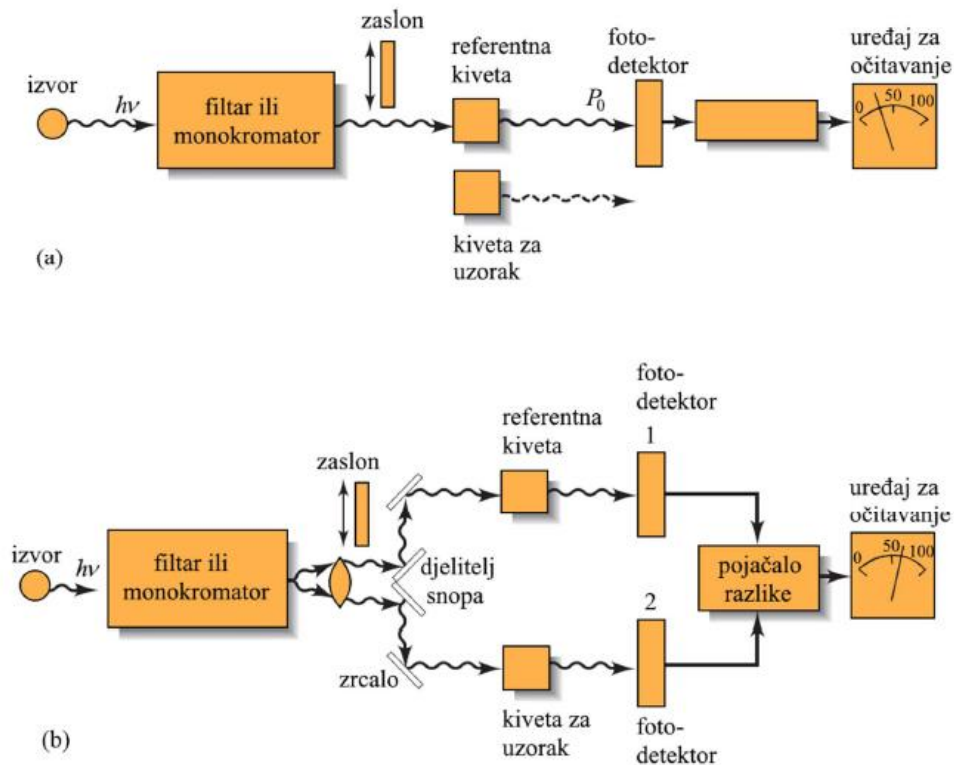
Spremnici za uzorke nazivaju se ćelijama ili kivetama. Moraju imati stijenke izrađene od materijala propusnog u određenom području spektra. Kvarc se upotrebljava za rad u ultraljubičastom i vidljivom području, pa sve do 3000 nm u infracrvenom području. Silikatno staklo se primjenjuje u području 375 – 2000 nm. Plastične kivete se također mogu primijeniti u vidljivom dijelu spektra. Najčešća unutarnja širina kiveta za rad u ultraljubičastom i vidljivom području iznosi 1 cm. Nečistoća, oštećenje i otapalo s vanjske strane kivete mogu utjecati na pogrešku u mjerenju. Otapalo će povećati gubitak zračenja refleksijom, a druge će nečistoće uzrokovati apsorpciju zračenja. Također, moguća su i mehanička oštećenja koja mogu učiniti kivetu nepogodnom za mjerenje [13, 19].

Detektorima zračenja pokazuje se postojanje neke fizikalne promjene. Kada u njega udare fotoni, detektor proizvede električni signal, a odgovor detektora je funkcija valne duljine upadnog zračenja. Osnovni tipovi detektora su fotonski i toplinski.

Procesor signala je uređaj koji pojačava električni signal iz detektora. Također, može mijenjati signal iz istosmjernog u izmjeničan i obrnuto te ukloniti neželjene komponente iz signala filtriranjem. Procesor može izvoditi i određene matematičke operacije na signalu, kao što je diferenciranje, integriranje ili logaritmiranje [13].



Postoje jednostavni jednosnopni i nešto složeniji dvosnopni instrumenti (slika 1.8). Jednosnopni instrumenti nemaju široku primjenu jer se sastoje od jednog izvora zračenja te se kiveta s uzorkom i kiveta s referentnom otopinom naizmjenice umeću u snop zračenja. Nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se apsorbancija prati kao funkcija proteklog vremena. Kod složenijih, dvosnopnih instrumenata, dva snopa nastaju u prostoru pomoću zrcala u obliku slova V, koje se još naziva i djeljiteljem snopa. Jedan od njih prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, a drugi istovremeno prolazi kroz uzorak prema drugome fotodetektoru. Potom se signali prikupljeni putem pridruženih fotodetektora računalno obrađuju te se na uređaju za očitavanje prikazuje njihov omjer ili logaritam njihovog omjera. Kod dvosnopnih uređaja s vremenski odijeljenim snopovima, snopovi su odijeljeni u vremenu pomoću rotirajućeg selektorskog zrcala [13].



Slika 1.8. Shematski prikaz (a) jednosnopnog i (b) dvosnopnog spektrofotometra [14]

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Osnovni cilj istraživanja predstavljenog u ovom diplomskom radu je razvoj i vrednovanje metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor pri valnoj duljini od 483 nm.

Optimizacijom metode obuhvaćeni su sljedeći parametri:

1. pH-vrijednost
2. Molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$
3. Redoslijed injektiranja analita i reagensa
4. Volumni protok osnovne otopine ( $Q_{cs}$ )
5. Volumen injektiranja reagensa
6. Volumen injektiranja analita
7. Volumen petlje zadržavanja
8. Duljina reakcijske uzvojnice

Nadalje, korištenjem optimiziranih parametara protočnog sustava, odredit će se analitičke karakteristike metode:

- a) Linearno dinamičko područje (LDP)
- b) Jednadžba pravca (nagib i odsječak)
- c) Koeficijent linearne regresije,  $R^2$
- d) Granica dokazivanja (LOD)
- e) Granica određivanja (LOQ)

Također, potrebno je vrednovati metodu određivanjem:

1. Utjecaja interferirajućih vrsta
2. Točnosti (iskoristivosti)
3. Ponovljivosti, učestalosti analize, prenošenja signala
4. Dosega (potpunosti) reakcije

Razvijenu i vrednovanu metodu određivanja NAC-a slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor potrebno je primijeniti na određivanje NAC-a kao aktivne tvari u ispitivanom farmaceutskom pripravku. Rezultati će se potom usporediti s rezultatom dobivenim standardnom metodom po Farmakopeji.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Priprava otopina

Za pripravu otopina korištene su kemikalije analitičkog stupnja čistoće te kao otapalo deionizirana voda.

#### 3.1.1. Deionizirana voda

Deionizirana voda pripravljena je sljedećim postupcima: reverzna osmoza, filtracija kroz membranski filter s porama 0,22  $\mu\text{m}$ , deionizacija kroz kationski i anionski izmjenjivač. Za pripravu je korišten uređaj Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska).

#### 3.1.2. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera pripravljena je otapanjem 4,9464 g borne kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Alkaloid, Skopje, Makedonija,  $M = 61,83 \text{ g mol}^{-1}$ ), 4,7980 g octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , VWR Chemicals, Francuska,  $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ ) i 5,4580 g fosforne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ ) uz nadopunjavanje deioniziranom vodom do oznake u odmjernu tikvicu od 2 L. Dobivena otopina približno ima pH-vrijednost 2. Daljnje podešavanje viših pH-vrijednosti izvršeno je dodatkom otopine natrijevog hidroksida ( $\text{NaOH}$ ,  $c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) uz kontrolu pH-vrijednosti pH-metrom.

#### 3.1.3. Otopina natrijevog hidroksida

Otopina natrijevog hidroksida ( $c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem 8,0000 g natrijevog hidroksida ( $\text{NaOH}$ , GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska,  $M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 100 mL deionizirane vode.

#### 3.1.4. Otopine reagensa

Otapanjem 0,1 g bakrovog(II) sulfat pentahidrata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 249,68 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 50 mL deionizirane vode pripravljena je otopina bakra(II) ( $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Otopina batokuprion disulfonske kiseline ( $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem 0,05825 g dinatrijeve soli batokuprion disulfonat hidrata (Sigma – Aldrich, Njemačka,  $M = 564,54 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 50 mL deionizirane vode.

### 3.1.5. Standardna otopina *N*-acetil-L-cisteina

Standardna otopina *N*-acetil-L-cisteina ( $c(\text{NAC}) = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem 0,0816 g *N*-acetil-L-cisteina (Acros Organics, New Jersey, USA,  $M = 163,19 \text{ g mol}^{-1}$ ) u acetatno-boratno-fosfatnom puferu pH-vrijednosti 2, do oznake 50 mL u odmjernoj tikvici. Pripravljane otopine su pohranjene u tamnom prostoru pri temperaturi od 4 °C, čime je osigurana stabilnost otopina najmanje 30 dana. Radne otopine niže koncentracije dnevno su pripravljane odgovarajućim razrjeđivanjem standardne otopine deioniziranom vodom.

### 3.1.6. Otopina realnog uzorka

- 1) Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg granule za oralnu otopinu (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska), pakiranje sadrži ukupno 30 vrećica, a svaka vrećica sadrži 5 g granula što odgovara 100 mg NAC-a. Realni uzorak pripremljen je otapanjem sadržaja jedne vrećice (5 g granula) u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 2) nakon čega je odmjerna tikvica dopunjena deioniziranom vodom do konačnog volumena od 500 mL.
- 2) Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži NAXIL FORTE 600 mg šumeće tablete (Belupo d.d., Koprivnica, Hrvatska), pakiranje sadrži ukupno 20 šumećih tableta. Realni uzorak pripremljen je otapanjem sadržaja jedne šumeće tablete u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 2) nakon čega je odmjerna tikvica dopunjena deioniziranom vodom do konačnog volumena od 500 mL.

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

### 3.1.7. Priprava otopina za određivanje *N*-acetil-L-cisteina metodom koju propisuje Farmakopeja

- **Otopina kalijevog jodida (KI)**

Standardna otopina kalijevog jodida ( $\gamma(\text{KI}) = 166 \text{ g L}^{-1}$ ) pripremlja se otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode [20].

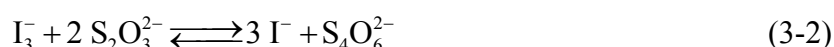
- **Otopina joda,  $c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$**

12,7 g joda,  $\text{I}_2$  i 20 g kalijevog jodida, KI otopljeno je u deioniziranoj 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<sub>2</sub>. Po njegovu potpunom otapanju dodana je preostala količina vode. Otopinu je bilo potrebno zaštititi od svjetla.

### Standardizacija otopine joda

U 20 mL otopine joda ( $c(I_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) dodan je 1 mL razrijeđene octene kiseline i 30 mL deionizirane vode. Pripravljena se otopina titrira koristeći pripremljenu standardnu otopinu natrijevog tiosulfata ( $c(Na_2S_2O_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Kao indikator se koristi 1 mL otopine škroba [20]. Redoks-reakcija standardizacije se odvija prema jednadžbi:



Provedene su tri titracije. Utrošak Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> je 19,85 mL. Poznavajući stehiometriju reakcije moguće je odrediti koncentraciju joda u pripremljenoj otopini (eksperimentalna koncentracija).

$$n(I_2) = n(I_3^-)$$

$$n(I_2) = \frac{1}{2} \times n(S_2O_3^{2-})$$

$$c(I_2) \times f(I_2) \times V(I_2) = \frac{1}{2} \times c(S_2O_3^{2-}) \times f(S_2O_3^{2-}) \times V(S_2O_3^{2-})$$

$$f(I_2) = \frac{\frac{1}{2} \times c(S_2O_3^{2-}) \times f(S_2O_3^{2-}) \times V(S_2O_3^{2-})}{c(I_2) \times V(I_2)}$$

$$f(I_2) = \frac{\frac{1}{2} \times 0,1 \text{ mol L}^{-1} \times 0,9901 \times 19,85 \text{ mL}}{0,05 \text{ mol L}^{-1} \times 20 \text{ mL}} = 0,9827$$

$$f(I_2) = \frac{c_{\text{eksperimentalna}}(I_2)}{c_{\text{teorijska}}(I_2)}$$

$$c_{\text{eksperimentalna}}(I_2) = f(I_2) \times c_{\text{teorijska}}(I_2)$$

$$c_{\text{eksperimentalna}}(I_2) = 0,9827 \times 0,05 \text{ mol L}^{-1} = 0,0491 \text{ mol L}^{-1}$$

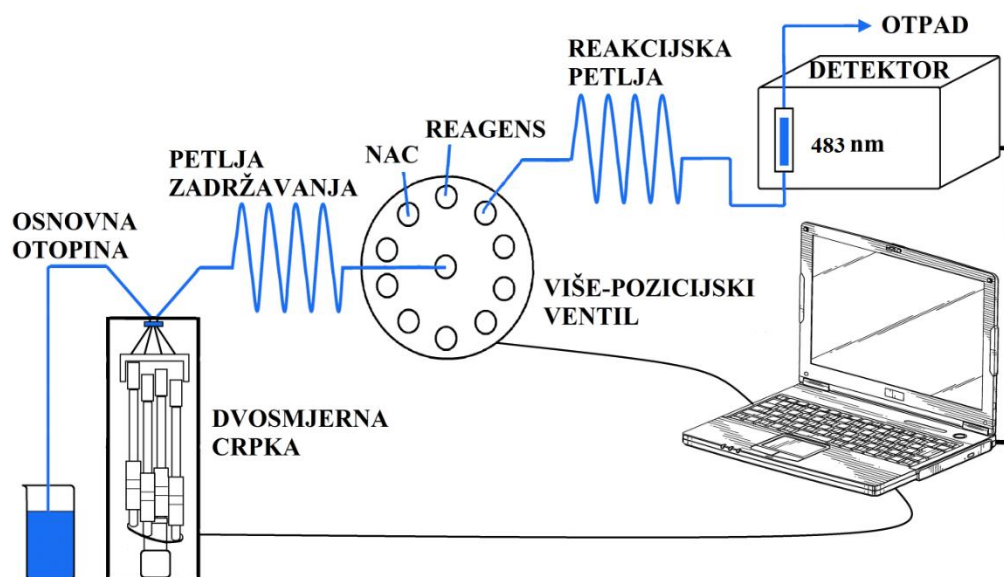
- **Otopina klorovodične kiseline R**

Pripravljaju se miješanjem 17 mL 35 %-tne otopine klorovodične kiseline s deioniziranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL [20].

### 3.2. Dijelovi SIA sustava

SIA sustav korišten za analizu sastoji se od sljedećih dijelova:

1. Dvosmjerna crpka (Valco Instruments, Švicarska) – služi za usisavanje osnovne otopine, uzorka i reagensa u petlju zadržavanja;
2. Višepozicijski selekcijski ventil (Valco Instruments, Švicarska) – omogućava slijedno injektiranje nekoliko različitih otopina uzorka ili reagensa;
3. Petlja zadržavanja – u nju se slijedno injektiraju određeni volumeni otopina reagensa i uzorka kroz odabrane ulaze višepozicijskog selekcijskog ventila;
4. Reakcijska uzvojnica – povezana je s petljom zadržavanja višepozicijskim selekcijskim ventilom;
5. Detektor (dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV – 1601, Kyoto, Japan) – mjerenje se vrši pri valnoj duljini,  $\lambda = 483 \text{ nm}$ , jer pri toj vrijednosti valne duljine kompleks koji nastaje kao produkt reakcije ima apsorpcijski maksimum;
6. Računalo – služi za programsku kontrolu sustava.



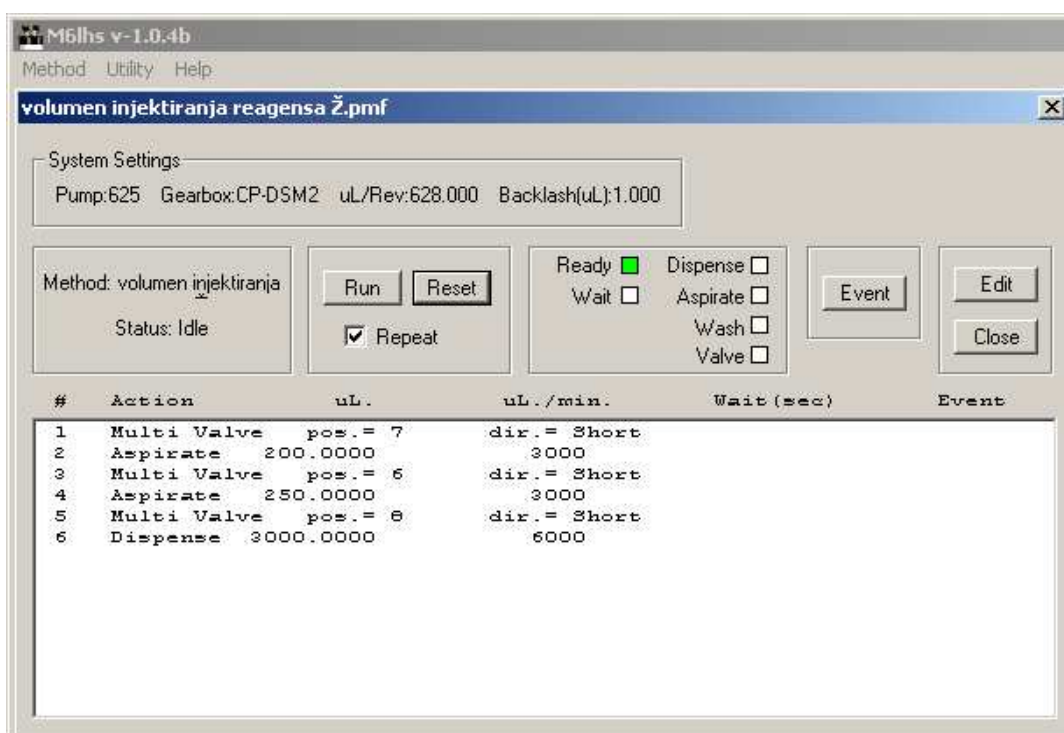
Slika 3.1. Shematski prikaz SIA sustava

#### 3.2.1. Programiranje protoka

Koristeći računalni program M6LHS daju se upute za sve uvjete pri kojima će se obavljati analize te se daju naredbe o programskom slijedu. Na početku rada jako je važno cijeli sustav napuniti osnovnom otopinom (deioniziranom vodom) kako bi se uklonili mjehurići zraka.



Mjerenja se provode odabirom otvora selekcijskog ventila nakon čega se određuje smjer protoka otopine. Postoje dvije moguće naredbe: engl. *aspirate* – usisavanje (usis), odnosno protok usmjeren od otvora na selekcijskom ventilu prema crpki te engl. *dispense* – isisavanje (isis), odnosno protok usmjeren od crpke prema selekcijskom ventilu. Protokom usmjerenim od otvora prema crpki napune se cjevčice sustava osnovnom otopinom te se potom suprotnim smjerom protoka ona gura prema otvoru 8 koji je povezan s protočnom kivetom u optičkom putu spektrofotometra te se izlijeva u otpad. Na taj način sustav je ispran, oslobođen mjehurića zraka i napunjen osnovnom otopinom.



Slika 3.2. Programski slijed određivanja NAC-a

Kod optimiziranog programskog slijeda za određivanje NAC-a prvo se usisa 200  $\mu\text{L}$  reagensa (pozicija 7 višepozicijskog selekcijskog ventila), a potom 250  $\mu\text{L}$  uzorka (pozicija 6 višepozicijskog selekcijskog ventila). Zatim se dvosmjernom crpkom injektira 3000  $\mu\text{L}$  osnovne otopine. Tok osnovne otopine funkcijom isisavanja se usmjerava prema poziciji 8 višepozicijskog selekcijskog ventila. Na taj se način osnovna otopina zajedno s formiranom zonom reagensa i uzorka kreće prema detektoru.

Podaci spektrofotometrijskog mjerenja kontinuirano su bilježeni te pretvarani u oblik pogodan za obradu u programu GraphPad Prism, verzija 6,0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). U navedenom programu izrađene su krivulje umjeravanja te je provedena njihova analiza i statistička obrada podataka mjerenja.

### 3.3. Ostali korišteni uređaji i oprema

Za mjerenje pH-vrijednosti otopina korišten je milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) sa staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413.



Slika 3.3. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) sa staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413

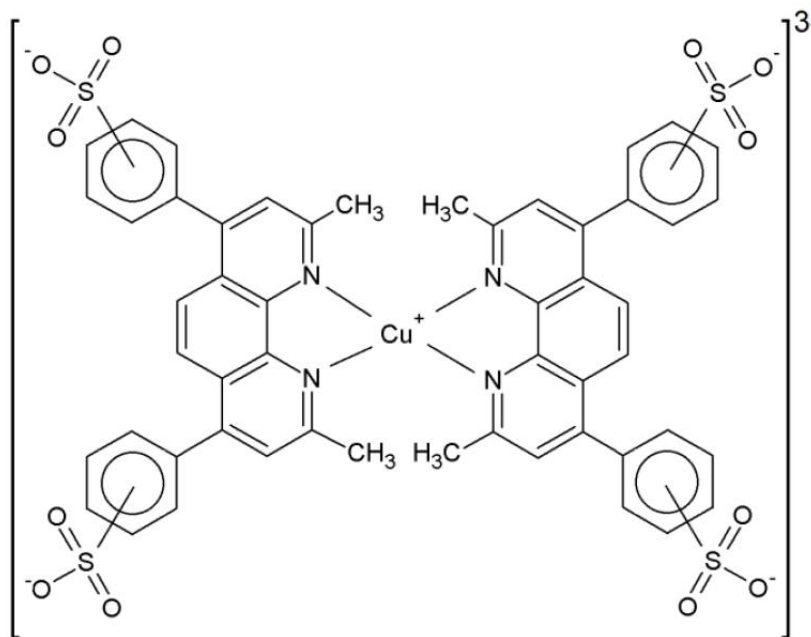
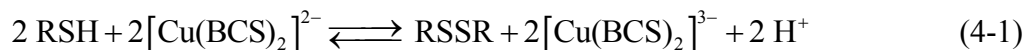
Za dodavanje mikrolitarskih volumena kod pripravljanja standardnih otopina analita, reagensa i interferencija korištene su mikropipete po Eppendorfu (Nichiryo, Tokyo, Japan).



Slika 3.4. Mikropipete

#### **4. RESULTATI**

Mjerenja se temelje na redoks-reakciji, u kojoj tiolna skupina NAC-a reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) kompleks. Pri tome nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) kompleks, koji ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm. Metoda se temelji na sljedećoj kemijskoj reakciji:

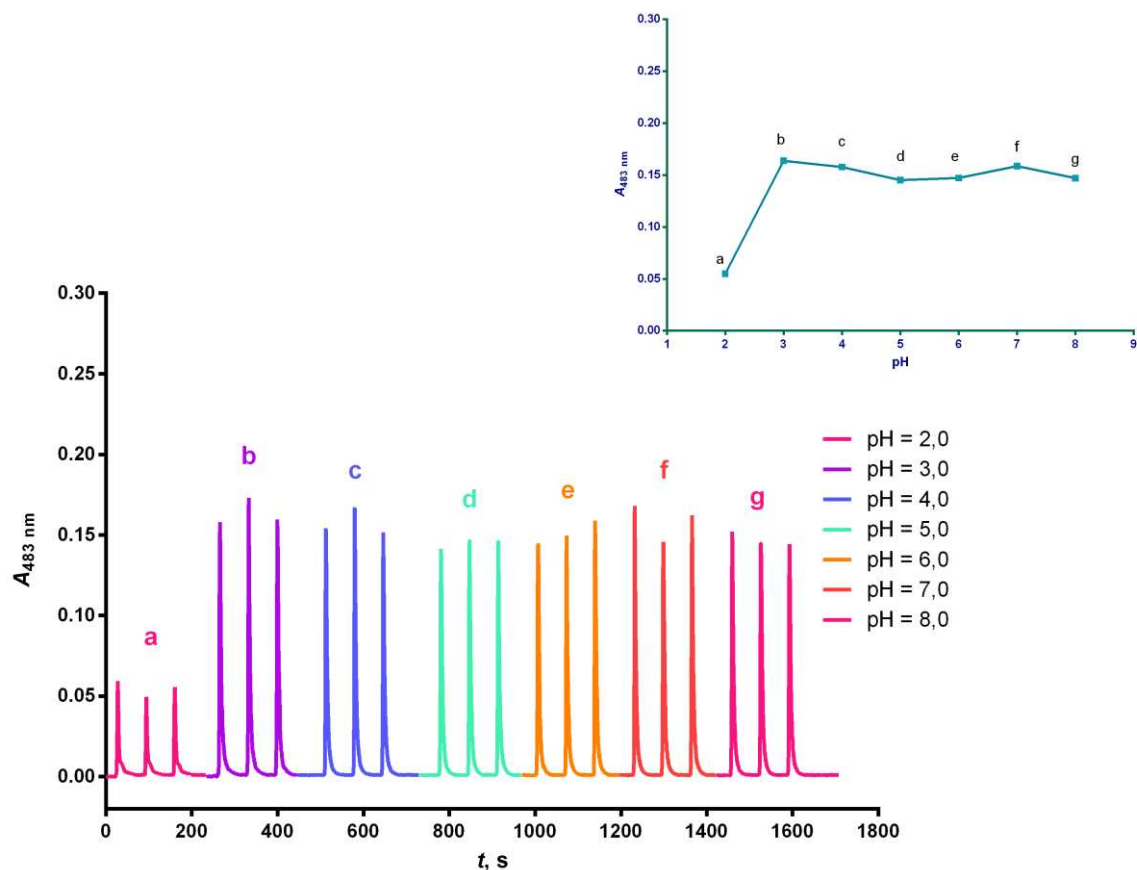


Slika 4.1. Struktura kompleksa  $[\text{Cu}(\text{BCS})_2]^{3-}$  [21]

#### 4.1. Optimizacija kemijskih parametara u SIA sustavu

##### 4.1.1. Optimizacija pH-vrijednosti

Utjecaj pH-vrijednosti otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-boratno-fosfatnog pufera. Kao analit korištena je otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Reakcijska otopina sastoji se od 0,4 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , 1,6 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i 8,0 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera. Maksimalna visina signala postignuta je pri pH-vrijednosti 3,0. Uz to, NAC pokazuje najveću stabilnost pri nižim pH-vrijednostima zbog čega je za daljnja mjerenja odabrana pH-vrijednost 3,0.



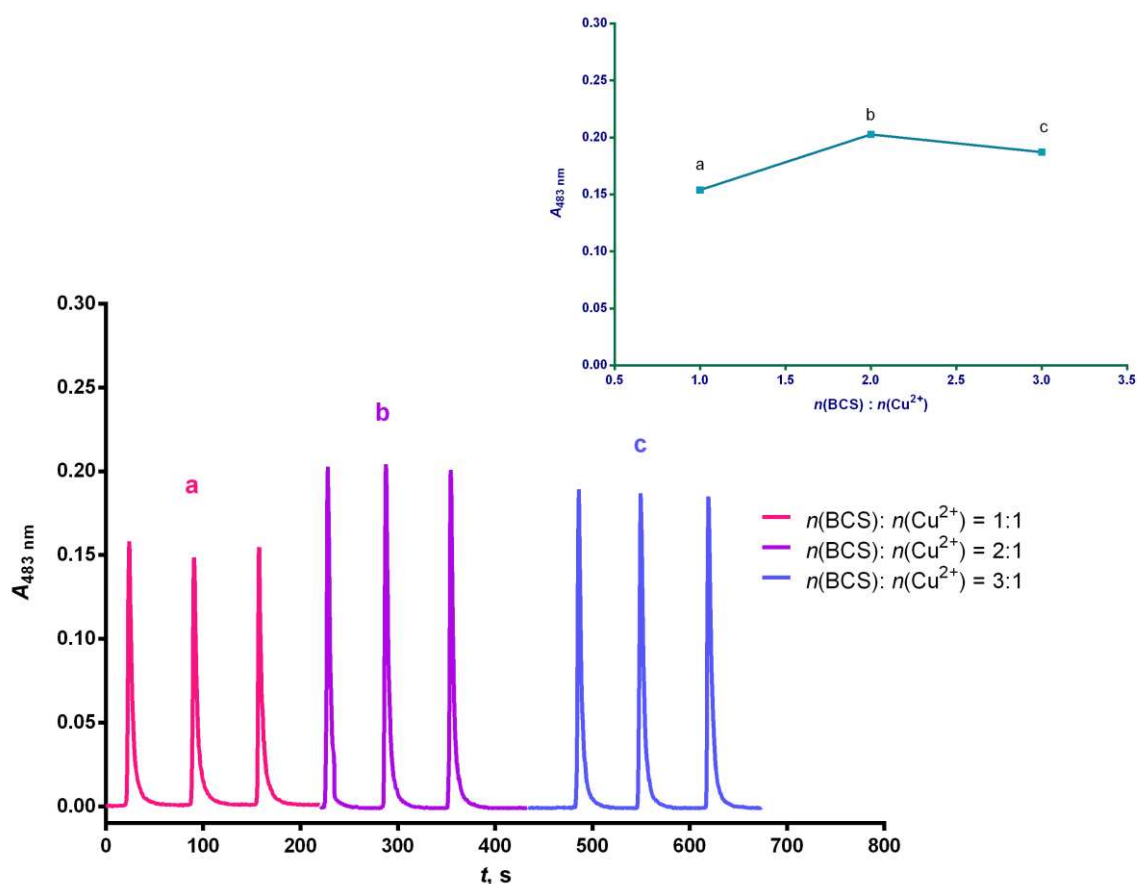
Slika 4.2. Siagram utjecaja pH-vrijednosti na zabilježeni signal. pH-vrijednost: (a) 2,0; (b) 3,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0; (f) 7,0; (g) 8,0. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $Q_{\text{cs}} = 5000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $1000 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o pH-vrijednosti za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.1.2. Optimizacija molarnog omjera BCS i $\text{Cu}^{2+}$

Tijekom eksperimenta optimizacije, koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  održavana je konstantnom,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , dok se koncentracija BCS-a mijenjala u rasponu od  $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  do  $9,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Sukladno tome, molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  mijenjao se u rasponu od 1:1 do 3:1. Da bi se postigao ukupni volumen od  $5 \text{ mL}$ , volumen pufera se prilagođavao obzirom na dodavanu količinu BCS-a. Rezultati su pokazali da se povećanjem molarnog omjera i apsorbancija povećavala te dosegla maksimum kada je molarni omjer BCS-a i  $\text{Cu}^{2+}$  iznosio 2:1.

Tablica 4.1. Prikaz omjera koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ , volumeni i koncentracije korištenih otopina.

$n(\text{BCS}):n(\text{Cu}^{2+})$	$c(\text{BCS}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$c(\text{Cu}^{2+}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$V(\text{BCS}), \text{mL}$	$V(\text{Cu}^{2+}),$ $\text{mL}$	$V(\text{pufer}), \text{mL}$
1:1	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	0,8	0,2	4,0
2:1	$6,4 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	1,6	0,2	3,2
3:1	$9,6 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	2,4	0,2	2,4

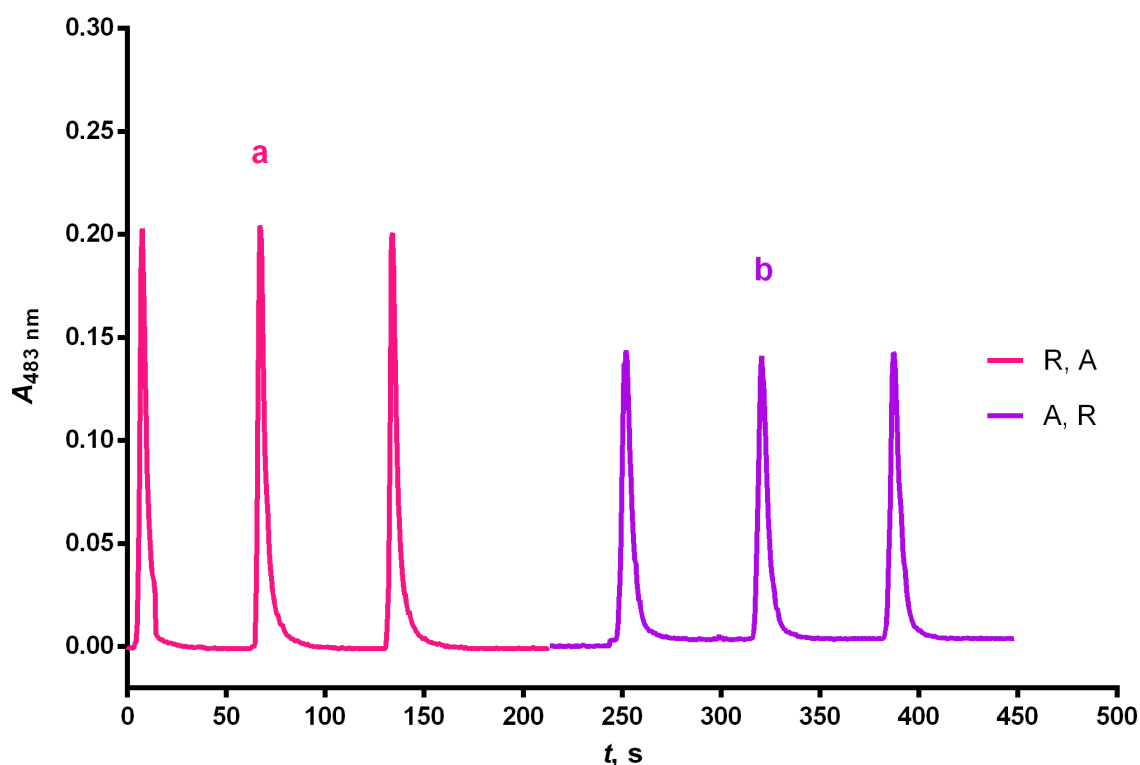


Slika 4.3. Siagram ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu pri različitim molarnim omjerima reagensa. Molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ : (a) 1:1; (b) 2:1; (c) 3:1. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 5000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $1000 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o omjeru BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

## 4.2. Optimizacija parametara SIA sustava

### 4.2.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja

Prilikom optimizacije SIA sustava, ispitan je utjecaj redoslijeda injektiranja otopina reagensa i analita. Provedena su dva mjerenja. U jednom je u petlju zadržavanja prvo injektirana otopina reagensa te potom analit, dok je u drugom redoslijed injektiranja bio obrnut. Veća vrijednost apsorbancije zabilježena je kada se prvo injektira otopina reagensa te potom otopina NAC-a. Taj redoslijed injektiranja korišten je u daljnjim mjerenjima.

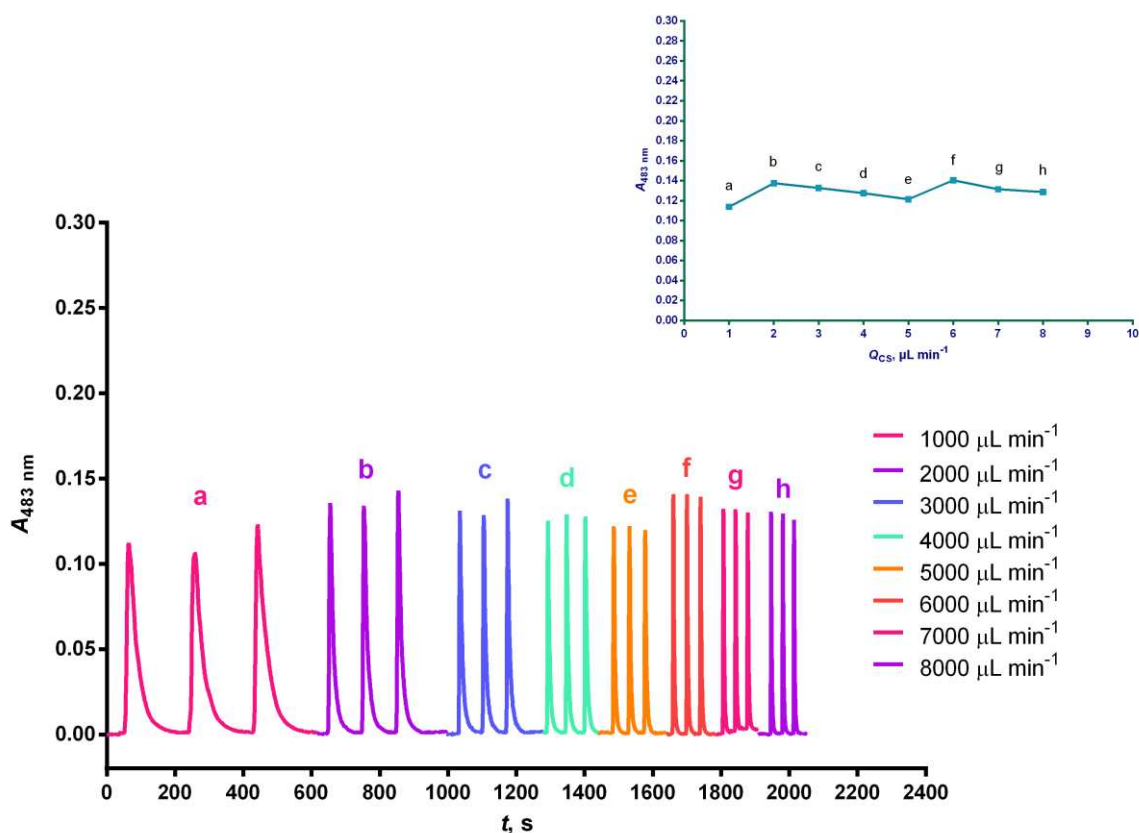


Slika 4.4. Siagram utjecaja redoslijeda injektiranja otopina analita i reagensa na zabilježeni signal. Redoslijed: (a) reagens (R), pa analit (A); (b) analit (A), pa reagens (R).

Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 5000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $1000 \text{ } \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .

#### 4.2.2. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine ( $Q_{cs}$ )

Odabir optimalnog volumnog protoka određuje učestalost mjerenja, tj. broj mjerenja koja se mogu provesti određenom metodom u određenom vremenskom razdoblju. Podešavanjem volumnog protoka može se kontrolirati disperzija te poboljšati osjetljivost metode. S ciljem odabira optimalnog, ispitane su različite vrijednosti volumnog protoka u rasponu od  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  do  $8000 \mu\text{L min}^{-1}$ . Nakon provedenih mjerenja, odabran je volumni protok od  $6000 \mu\text{L min}^{-1}$ , pri kojem je zabilježena maksimalna apsorbancija uz istovremeno prihvatljivu širinu pikova i povrat na baznu liniju.



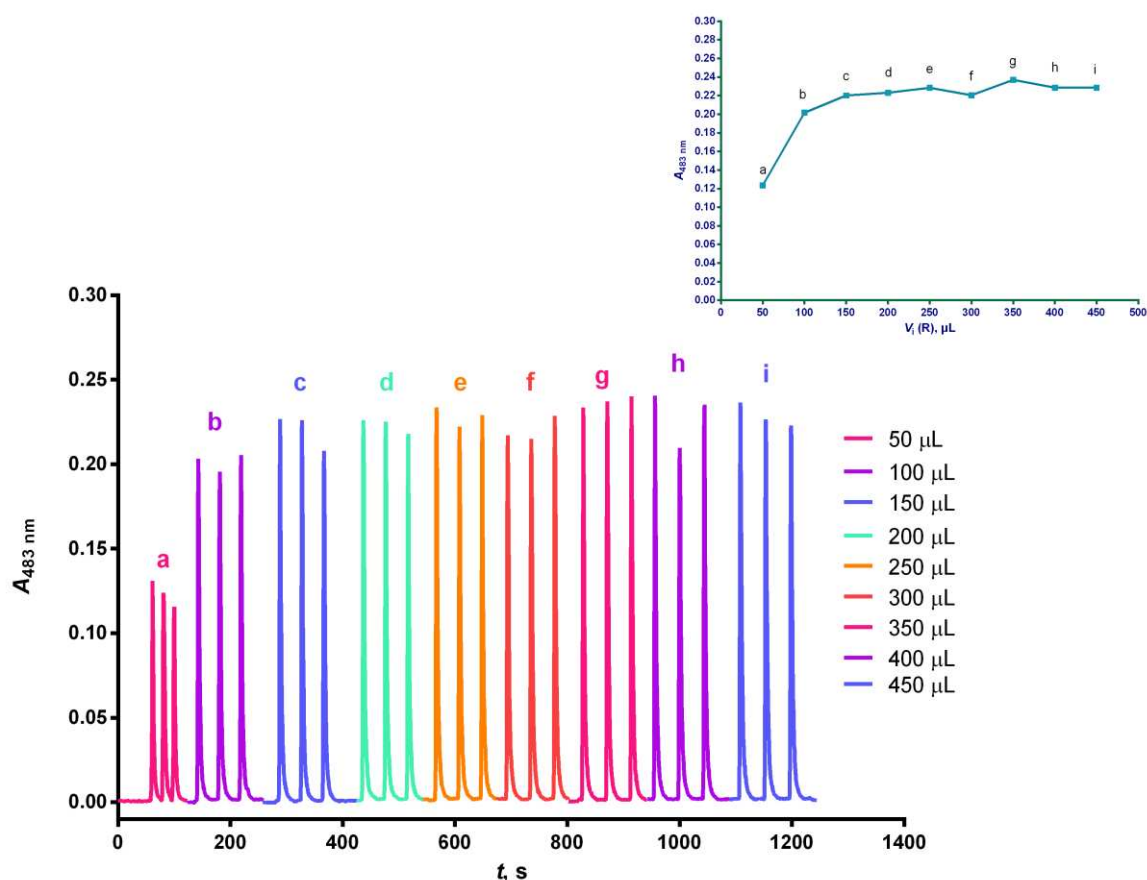
Slika 4.5. Siagram utjecaja volumnog protoka osnovne otopine na zabilježeni signal. Volumni protok osnovne otopine: (a)  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (b)  $2000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (c)  $3000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (d)  $4000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (e)  $5000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (f)  $6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (g)  $7000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; (h)  $8000 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $1000 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.



### 4.2.3. Optimizacija volumena injektiranja reagensa

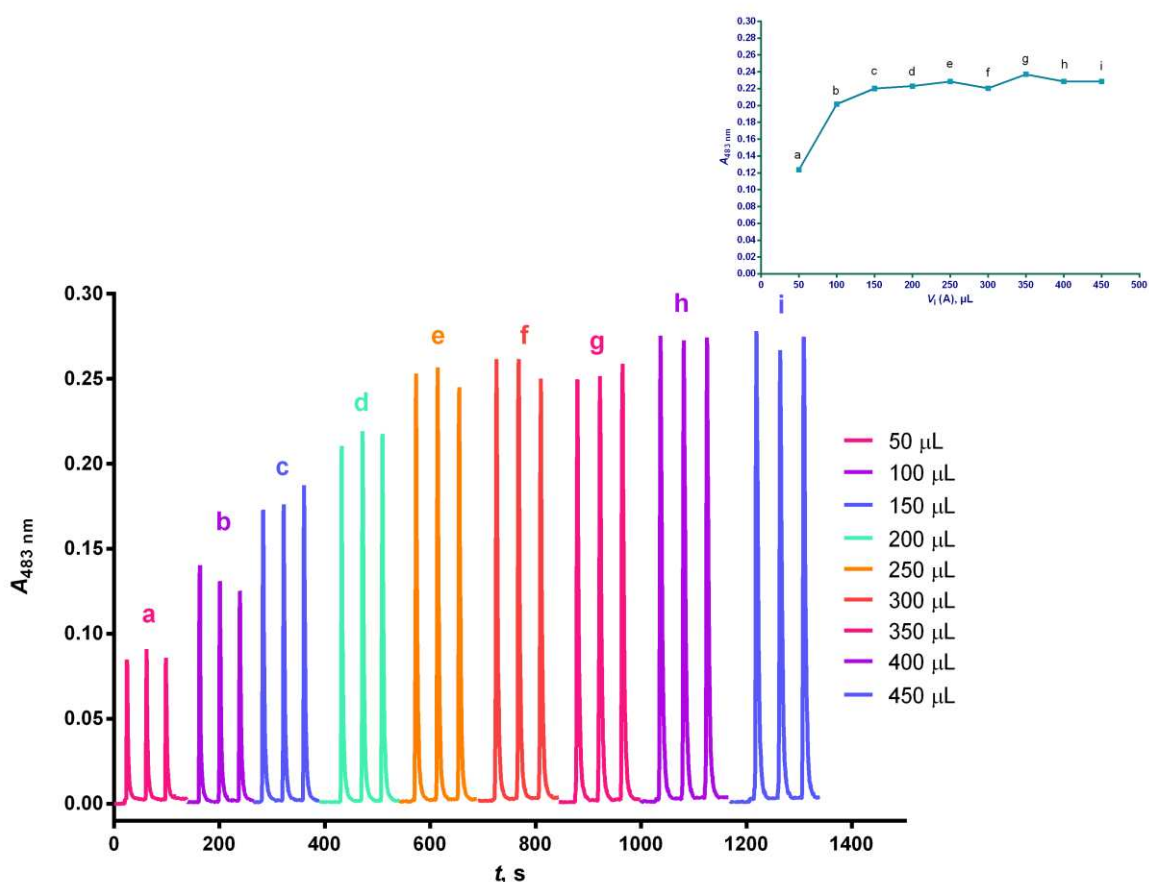
Injektiranjem optimalnog volumena reagensa ostvaruje se potpunost reakcije uz viši signal te povrat na baznu liniju. Injektiranje volumena reagensa većeg od optimalnog, ne vodi do povećanja signala, već rezultira povećanjem količine otpada i posljedično smanjenjem ekonomičnosti analize. S ciljem određivanja optimalnog, ispitivani su volumeni injektiranja reagensa u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Nakon provedenih mjerenja, kao kompromis između iznosa apsorbancije (visine signala) i ponovljivosti rezultata odabran je volumen od 200  $\mu\text{L}$ . Isti je korišten u daljnjim mjerenjima.



Slika 4.6. Siagram optimizacije volumena injektiranja reagensa. Volumen injektiranja reagensa: (a) 50  $\mu\text{L}$ ; (b) 100  $\mu\text{L}$ ; (c) 150  $\mu\text{L}$ ; (d) 200  $\mu\text{L}$ ; (e) 250  $\mu\text{L}$ ; (f) 300  $\mu\text{L}$ ; (g) 350  $\mu\text{L}$ ; (h) 400  $\mu\text{L}$ ; (i) 450  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja analita = 200  $\mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine = 3000  $\mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja = 1000  $\mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice = 70 cm; volumen protočne kivete = 80  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranja reagensa za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.2.4. Optimizacija volumena injektiranja analita

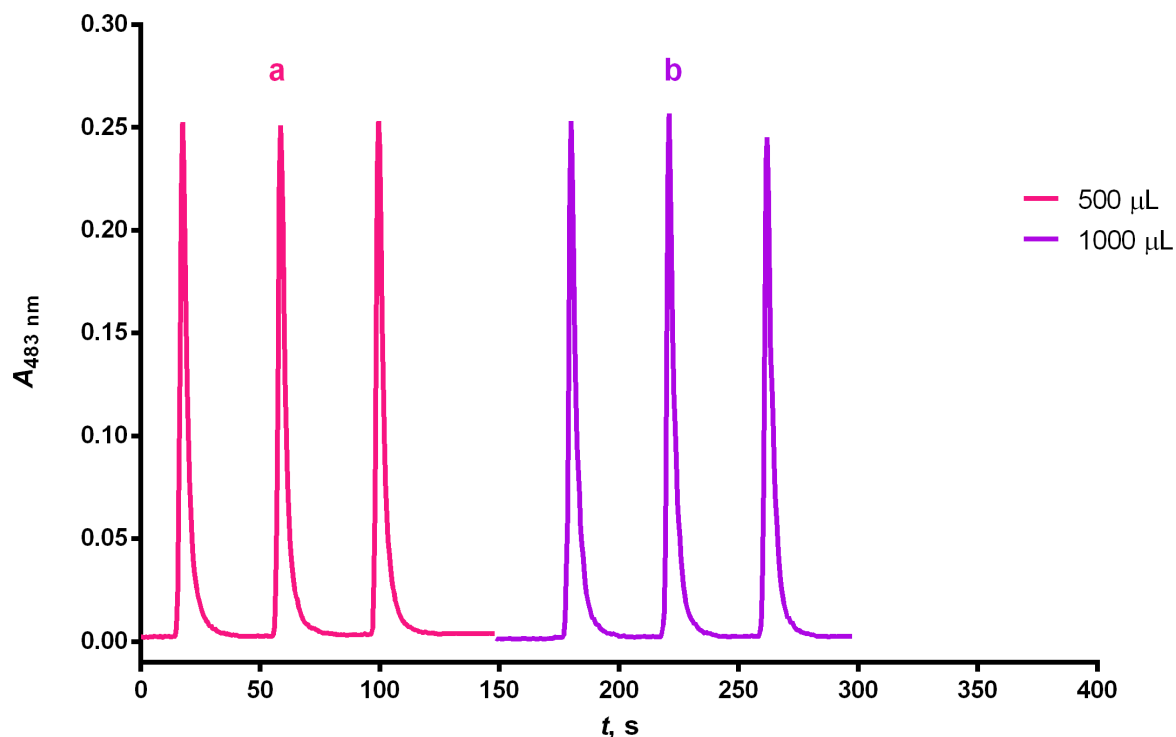
Porastom volumena injektiranog analita, povećava se i analitički signal. Volumeni injektiranja analita korišteni za optimizaciju bili su u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Povećanjem volumena injektiranog analita do 200  $\mu\text{L}$  značajno se povećavao analitički signal, dok su volumeni veći od 200  $\mu\text{L}$  vrlo malo utjecali na daljnje povećanje analitičkog signala. Također, veliki volumeni injektiranog analita zahtijevaju dulje vrijeme povratka, što smanjuje učestalost analiza. Volumen injektiranja analita od 250  $\mu\text{L}$  odabran je kao kompromis između osjetljivosti metode i učestalosti analiza.



Slika 4.7. Siagram utjecaja volumena injektiranja analita na analitički signal. Volumen injektiranja analita: (a) 50  $\mu\text{L}$ ; (b) 100  $\mu\text{L}$ ; (c) 150  $\mu\text{L}$ ; (d) 200  $\mu\text{L}$ ; (e) 250  $\mu\text{L}$ ; (f) 300  $\mu\text{L}$ ; (g) 350  $\mu\text{L}$ ; (h) 400  $\mu\text{L}$ ; (i) 450  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa = 200  $\mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine = 3000  $\mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja = 1000  $\mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice = 70 cm; volumen protočne kivete = 80  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorpcije o volumenu injektiranja analita za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.2.5. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

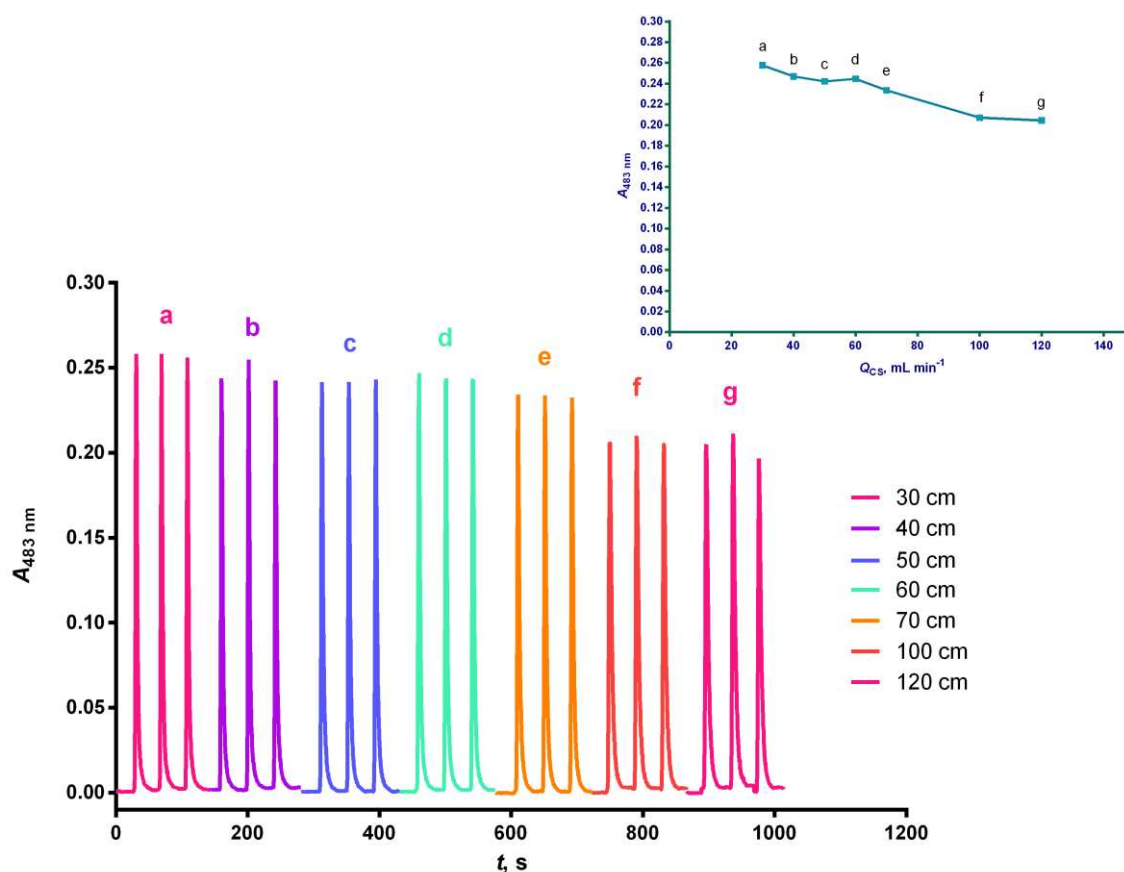
Za optimizaciju su korištene petlje zadržavanja volumena 500  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$ . Budući da nije bilo značajne razlike u visini analitičkog signala, za daljnja mjerenja odabrana je petlja zadržavanja volumena 500  $\mu\text{L}$ . Razlog tomu je manji utrošak struje nosioca te bolja ponovljivost signala.



Slika 4.8. Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja na analitički signal. Volumen petlje zadržavanja: (a) 500  $\mu\text{L}$ ; (b) 1000  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa = 200  $\mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita = 250  $\mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine = 3000  $\mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice = 70 cm; volumen protočne kivete = 80  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .

#### 4.2.6. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice

Duljina reakcijske uzvojnice utječe na potpunost kemijske reakcije. Za optimizaciju su korištene uzvojnice duljina od 30 cm do 120 cm. Ukoliko je reakcijska uzvojnica prekratka, postoji rizik od nepotpune reakcije te slabije ponovljivosti dok upotrebom preduge uzvojnice vrijednosti apsorbancije padaju, zbog povećanog raspršenja zone uzorka. Najveća vrijednost apsorbancije, kao i najbolja ponovljivost, zabilježena je pri duljini reakcijske uzvojnice od 30 cm te je ista odabrana kao optimalna.



Slika 4.9. Siagram utjecaja duljine reakcijske uzvojnice na analitički signal. Duljina reakcijske uzvojnice: (a) 30 cm; (b) 40 cm; (c) 50 cm; (d) 60 cm; (e) 70 cm; (f) 100 cm; (g) 120 cm. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{cs} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa = 200  $\mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita = 250  $\mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine = 3000  $\mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja = 500  $\mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete = 80  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

### 4.3. Odabrani optimalni parametri

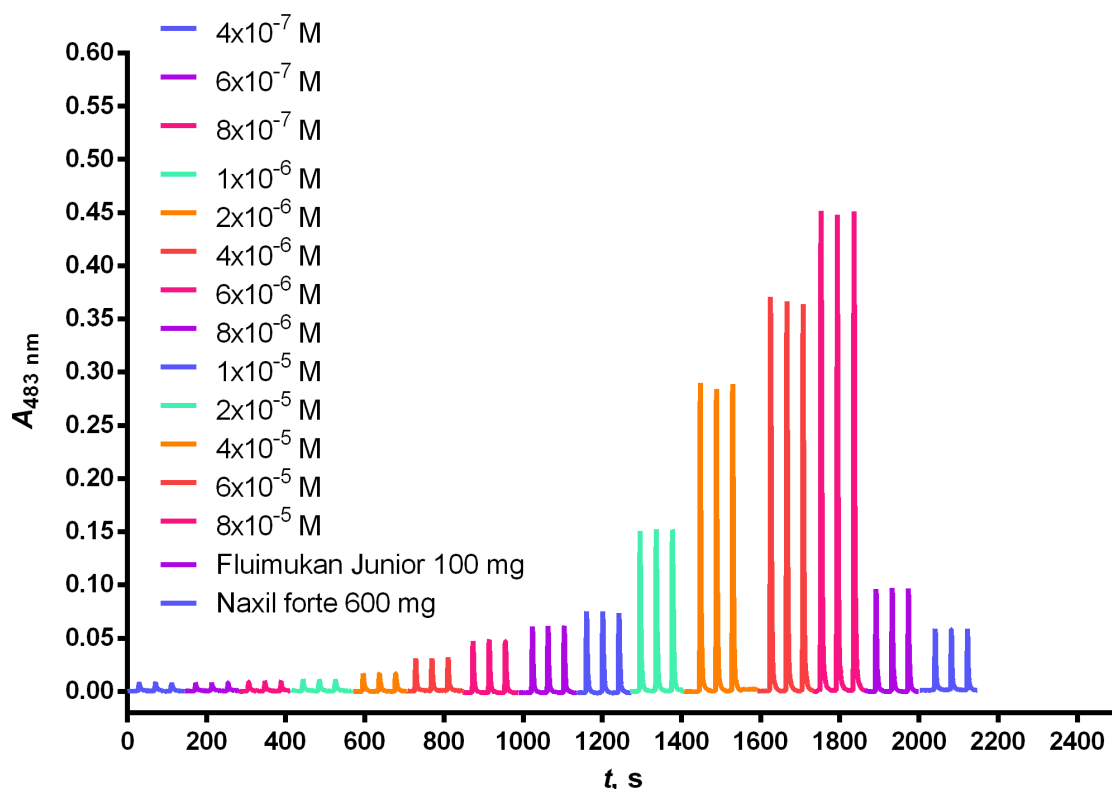
Tablica 4.2. Prikaz odabranih optimalnih parametara

Parametar	Ispitivane vrijednosti	Optimalna vrijednost
pH-vrijednost	2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0	3,0
Molarni omjer BCS i Cu <sup>2+</sup>	1:1; 2:1; 3:1	2:1
Redoslijed injektiranja	R, A; A, R	R, A
Volumni protok osnovne otopine, μL min <sup>-1</sup>	1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000	6000
Volumen injektiranja reagensa, μL	50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450	200
Volumen injektiranja analita, μL	50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450	250
Volumen petlje zadržavanja, μL	500; 1000	500
Duljina reakcijske uzvojnice, cm	30; 40; 50; 60; 70; 100; 120	30

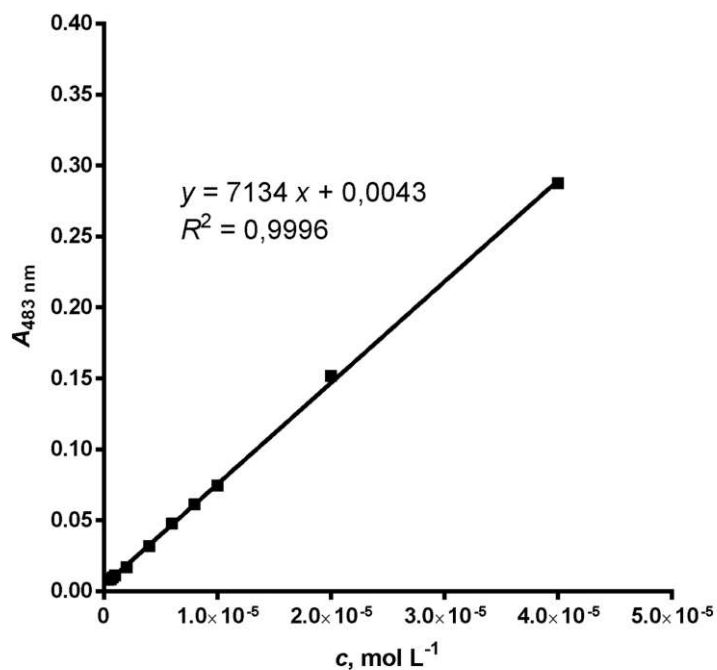
#### 4.4. Obrada rezultata SIA mjerenja

##### 4.4.1. Linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje (LDP) predstavlja raspon koncentracija unutar kojeg je signal proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Standardne otopine analita točno poznatih koncentracija (od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), injektiraju se uzastopno tri puta za pojedinu koncentraciju. Za svaku analiziranu koncentraciju analita u triplikatu određena je aritmetička sredina visine signala (apsorbancije). Za ovu metodu određen je LDP u rasponu od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . U ovom koncentracijskom području, linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije određena je jednadžba pravca:  $y = 7134 x + 0,0043$ , gdje je  $y$  vrijednost apsorbancije, a  $x$  je koncentracija NAC-a izražena u  $\text{mol L}^{-1}$ . Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) za ovaj pravac iznosi 0,9996.



Slika 4.10. Siagram spektrofotometrijskog određivanja *N*-acetil-L-cisteina. Koncentracijski raspon NAC-a od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (a) realni uzorak Fluijukan Junior oralne granule; (b) realni uzorak Naxil Forte šumeće tablete. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $250 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $500 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $30 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .



Slika 4.11. Grafički prikaz linearnog dinamičkog područja spektrofotometrijskog određivanja *N*-acetil-L-cisteina. Koncentracijski raspon NAC-a od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $250 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \text{ } \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $500 \text{ } \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $30 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .

#### 4.4.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) najmanja je količina analita u uzorku koja se može kvalitativno odrediti. Računa se prema sljedećem izrazu:

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

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib krivulje umjeravanja.

Granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) najmanja je količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Računa se prema sljedećem izrazu:

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

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib krivulje umjeravanja.

Standardna devijacija slijepe probe u ovom slučaju iznosila je 0,0003, a nagib krivulje iznosio je 7134. Temeljem jednadžbi izračunata je granica dokazivanja koja iznosi  $1,3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> i granica određivanja koja iznosi  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.



#### 4.4.3. Utjecaj interferirajućih vrsta

Utjecaj mogućih interferirajućih vrsta ispitan je pri koncentraciji NAC-a od  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Pripravljene su otopine tvari koje bi mogle interferirati prilikom određivanja NAC-a, a uobičajeno se nalaze kao pomoćne tvari komercijalnih farmaceutskih pripravaka. Početne koncentracije tvari bile su 500 puta veće od koncentracije analita, s izuzetkom acetilsalicilatne kiseline koja je pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i analit.

Granica tolerancije definirana je kao koncentracija interferirajućih vrsta koje će izazvati pogrešku manju od  $\pm 5$  %. Relativna pogreška izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{\bar{A}_{\text{INT}} - \bar{A}_{\text{NAC}}}{\bar{A}_{\text{NAC}}} \cdot 100 \quad (4-4)$$

Tablica 4.3. Interferirajuće tvari i relativne pogreške

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija (NAC : interferirajuća tvar)	Relativna pogreška, %
Glukoza	1:500	3,55
Fruktoza	1:500	7,37
KNO <sub>3</sub>	1:500	1,70
Laktoza	1:500	7,71
Borna kiselina	1:500	1,70
Limunska kiselina	1:500	47,98
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1:500	27,03
Natrijev citrat	1:500	0,63
Vinska kiselina	1:500	47,72
Acetilsalicilatna kiselina	1:1	0,06

Za one tvari koje su pokazale pogrešku veću od  $\pm 5$  % mjerenja su ponovljena dok nisu utvrđene maksimalne koncentracije interferirajućih vrsta. Potrebno je naglasiti da unatoč smanjenju koncentracija, one su i dalje bile mnogo veće od onih koje su obično prisutne u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

Tablica 4.4. Interferirajuće tvari u nižim koncentracijama i relativne pogreške

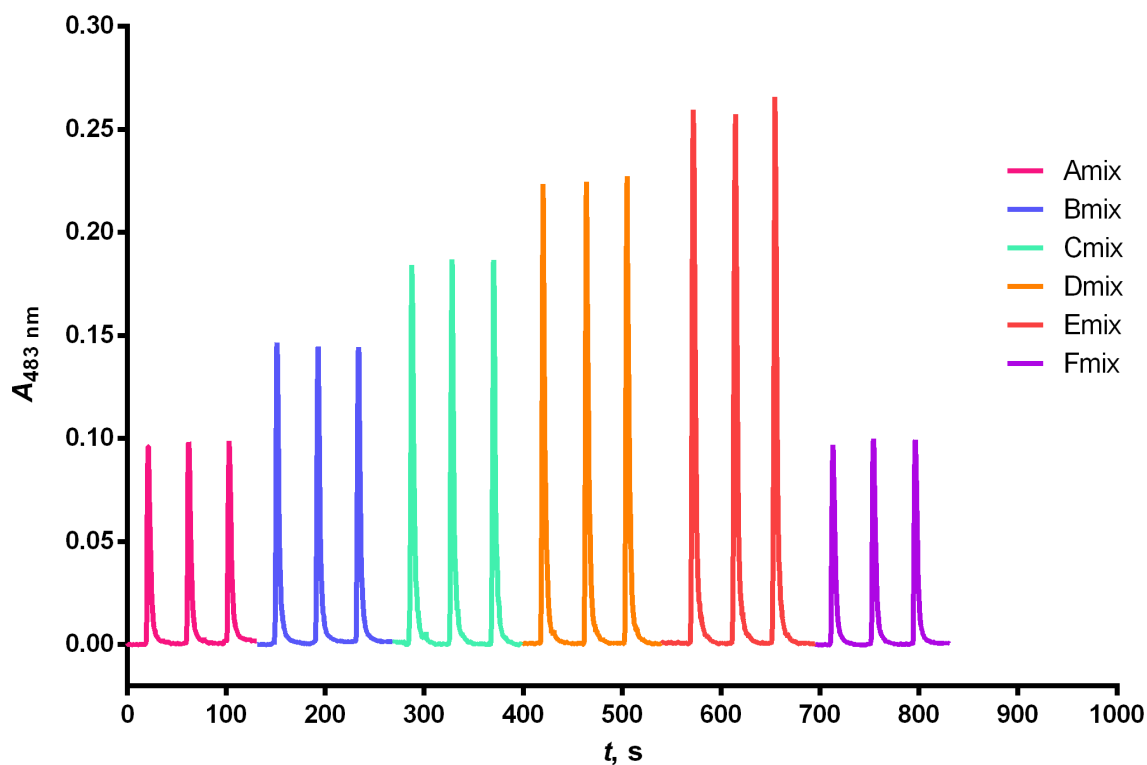
Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija (NAC : interferirajuća tvar)	Relativna pogreška, %
Fruktoza	1:250	1,76
Laktoza	1:400	0,11
Limunska kiselina	1:5	4,33
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1:50	0,06
Vinska kiselina	1:5	0,57

#### 4.4.4. Točnost (iskoristivost)

Iskoristivost metode ujedno upućuje i na njenu točnost. Iskoristivost iskazuje sposobnost metode da izmjeri poznatu količinu tvari. Prilikom vrednovanja metode iskoristivost je ispitana mjerenjem 6 radnih otopina pripremljenih dodavanjem određenog volumena standardne otopine otopini odgovarajućeg realnog uzorka. Koncentracija standardne otopine iznosila je  $1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a koncentracija otopine uzorka bila je  $1,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Priprava radnih otopina prikazana je u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Priprava radnih otopina

Oznaka otopine	$V(\text{analita}), \text{ mL}$	$V(\text{st. otopine}, c = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}), \text{ mL}$	$V(\text{ukupni}), \text{ mL}$	$c_{\text{konačna}}, \text{ mol L}^{-1}$
$A_{\text{mix}}$	1,0	-	10	$1,23 \times 10^{-5}$
$B_{\text{mix}}$	1,0	0,5	10	$1,845 \times 10^{-5}$
$C_{\text{mix}}$	1,0	1,0	10	$2,46 \times 10^{-5}$
$D_{\text{mix}}$	1,0	1,5	10	$3,075 \times 10^{-5}$
$E_{\text{mix}}$	1,0	2,0	10	$3,69 \times 10^{-5}$
$F_{\text{mix}}$	-	1,0	10	$1,23 \times 10^{-5}$



4.12. Siagram određivanja *N*-acetil-L-cisteina:  $c(A_{\text{mix}}) = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(B_{\text{mix}}) = 1,845 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(C_{\text{mix}}) = 2,46 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(D_{\text{mix}}) = 3,075 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(E_{\text{mix}}) = 3,69 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(F_{\text{mix}}) = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $250 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $500 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $30 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .

Tablica 4.6. Prikaz iskoristivosti za pipremljene otopine uzorka

Uzorak	Masa analita u uzorku, mg	Dodana masa analita, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
Fluimukan Junior	100,0	-	103,90	-
		50	156,00	104,00
		100	201,04	100,52
		150	244,13	97,65
		200	292,23	97,41

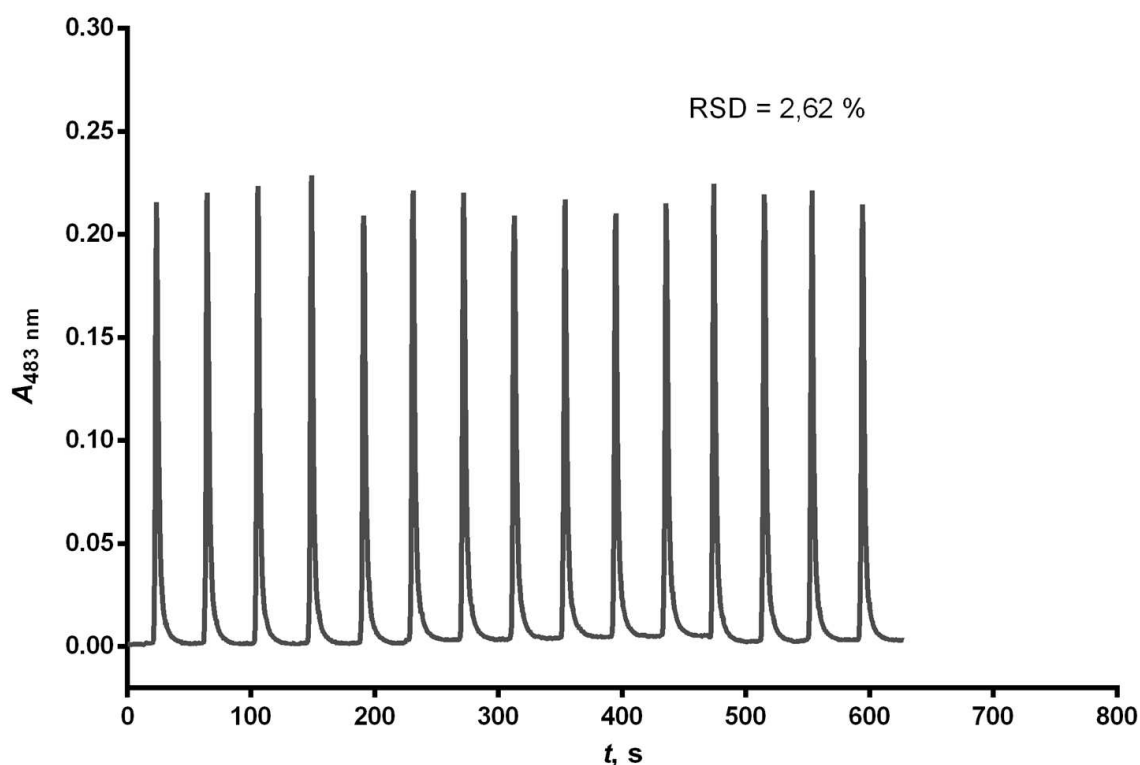
Rezultati ispitivanja iskoristivosti razvijene spektrofotometrijske SIA metode za određivanje NAC-a su navedeni u tablici 4.6., a kreću se u rasponu od 97,41 % do 104,00 %. Rezultati pokazuju zadovoljavajuću točnost razvijene metode čime je potvrđeno da je metoda pouzdana za određivanje NAC-a u farmaceutskim pripravcima.

#### 4.4.5. Ponovljivost

Ponovljivost je slaganje mjerenja izvedenih pri istim uvjetima (jedan laboratorij, isti analitičar, radni uvjeti) u kratkom vremenskom razdoblju. Ponovljivost metode ispitana je mjerenjem niza od 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Ponovljivost se matematički izražava relativnim standardnim odstupanjem (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD). RSD je kvocijent standardnog odstupanja  $s$  i sredine skupa podataka  $\bar{x}$ , a računa se korištenjem izraza:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4-5)$$

Korištenjem navedene jednadžbe izračunat je RSD koji iznosi 2,62 %. Dobiveni rezultat upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode.



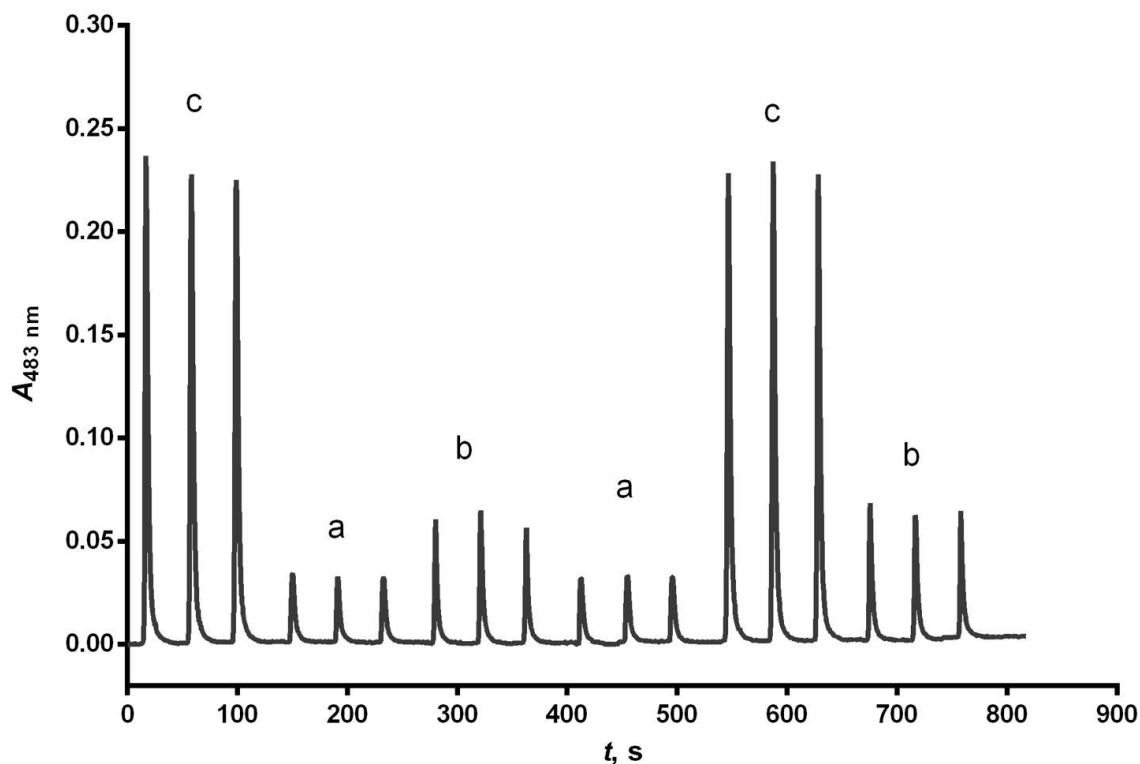
Slika 4.13. Siagram ponovljivost optimizirane metode. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 3$ ;  $Q_{\text{cs}} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa =  $200 \mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita =  $250 \mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine =  $3000 \mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja =  $500 \mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice =  $30 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .

#### 4.4.6. Učestalost analize

Učestalost analize predstavlja broj uzoraka koji se može analizirati unutar vremena od 1 sata. Ovaj parametar je bitan radi utvrđivanja ekonomičnosti analitičke metode kod analize većeg broja uzoraka. Učestalost mjerenja je izračunata analizom siagrama ponovljivosti za koncentraciju  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , na temelju 15 uzastopnih pikova. Tri mjerenja traju prosječno 180 sekundi, odnosno toliko je potrebno vremena za analizu jednog uzorka. S obzirom da jedan sat ima 3600 sekundi, to je oko 20 analiza po satu, što je prosječan broj uzoraka za ovu metodu. Može se reći da je učestalost mjerenja zadovoljavajuća za korištenu tehniku.

#### 4.4.7. Prenosivost

Pojam prenosivost (engl. *Carry Over*) obično se koristi za opisivanje procesa kojim se dijelovi uzorka, reagensa ili otapala prenose u reakcijsku mješavinu kojoj oni ne pripadaju. Prenosivost pokazuje koliki je utjecaj prethodno injektiranog uzorka na rezultat sljedećeg mjerenja. Najčešće se radi o utjecaju mjerenja uzorka više koncentracije na mjerenja uzorka dosta niže koncentracije analita. Ispitano je prenošenje signala injektiranjem uzoraka koji su sadržavali 3 različite koncentracije NAC-a. Injektiranje je provedeno naizmjenice po 3 puta za svaku od koncentracija. Praćen je povratak signala na osnovnu liniju te utjecaj naglih promjena koncentracija na visinu vrha signala. 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 utvrđeno da primjenom optimizirane metode ne dolazi do prenošenja signala.

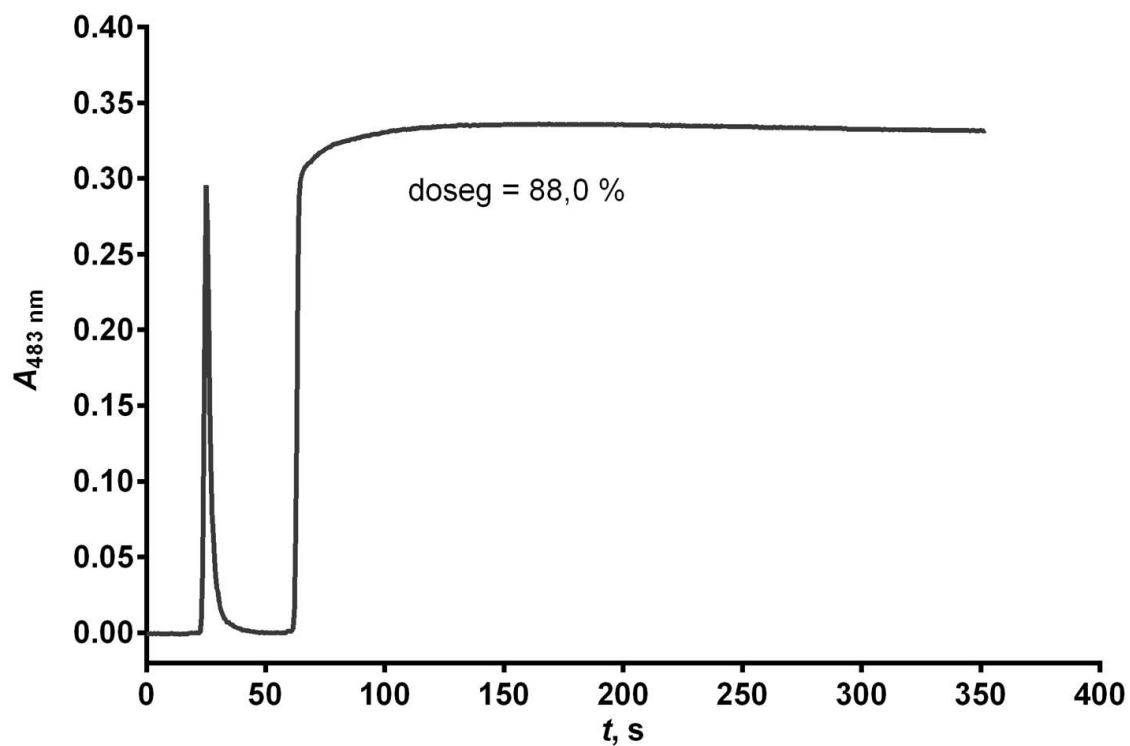


Slika 4.14. Siagram određivanja *N*-acetil-L-cisteina: (a)  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b)  $c(\text{NAC}) = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c)  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; pH = 3;  $Q_{cs} = 6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; volumen injektiranja reagensa = 200  $\mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita = 250  $\mu\text{L}$ ; volumen osnovne otopine = 3000  $\mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja = 500  $\mu\text{L}$ ; duljina reakcijske uzvojnice = 30 cm; volumen protočne kivete = 80  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .



#### 4.4.8. Doseg reakcije

Doseg reakcije ispituje se zaustavljanjem protoka (engl. *Stop Flow*). Temeljem zaustavljenog protoka, u trenutku kada je visina vrha signala dosegla maksimum, reakcija dostiže potpunost u iznosu od 88 % u odnosu na onu koja bi se pri zadanim uvjetima mogla ostvariti uz zaustavljeni protok.



Slika 4.15. Prikaz zaustavljenog protoka u trenutku maksimalne visine vrha signala

#### 4.5. Primjena razvijene metode na analizu realnog uzorka

- 1) Optimizirana metoda primijenjena je za određivanje *N*-acetil-L-cisteina u farmaceutskom pripravku FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg granule za oralnu otopinu (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

Tablica 4.7. Rezultati analize realnog uzorka

Uzorak	$A$	$\bar{A}$
1.	0,0974	0,0968
2.	0,0962	
3.	0,0962	
4.	0,0974	
5.	0,0970	

Napravljeno je 5 mjerenja te je prosječna vrijednost apsorbancije,  $\bar{A} = 0,0968$ , korištena za daljnji izračun. Uvrštavanjem prosječne vrijednosti apsorbancije u jednadžbu pravca ( $y = 7134x + 0,0043$ ), izračunata je koncentracija *N*-acetil-L-cisteina u uzorku,  $c(\text{NAC}) = 1,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

1 mL početne otopine razrijeđen je na 10 mL, a zatim 1 mL te otopine na još 10 mL, što je ukupno razrijeđenje od 1 : 100.

$$c_1 = 1,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_1 = 100 \text{ mL}$$

$$V_2 = 1 \text{ mL}$$

$$c_2 = \frac{1,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$c_2 = 1,29 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Iz izračunate koncentracije računa se množina  $n$ , a iz množine masa  $m$ . Izračunata masa uspoređena je s teorijskom masom tj. masom koja je navedena na sekundarnoj ambalaži korištenog farmaceutskog pripravka.

$$n = c \times V = \frac{m}{M}$$

$$m = c \times V \times M$$

$$m = 1,29 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 163,2 \text{ g mol}^{-1} \times 0,5 \text{ L} = 0,10526 \text{ g} = 105,26 \text{ mg}$$

U analiziranom farmaceutskom pripravku, slijednom analizom injektiranjem određeno je 105,26 mg *N*-acetil-L-cisteina, a na ambalaži je deklarirano 100 mg.

- 2) Optimizirana metoda primijenjena je za određivanje *N*-acetil-L-cisteina u farmaceutskom pripravku NAXIL FORTE 600 mg šumeće tablete (Belupo d.d., Koprivnica, Hrvatska).

Tablica 4.8. Rezultati analize realnog uzorka

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A}$
1.	0,0592	0,0588
2.	0,0580	
3.	0,0592	

Napravljena su 3 mjerenja te je prosječna vrijednost apsorbancije,  $\bar{A} = 0,0588$ , korištena za daljnji izračun. Uvrštavanjem prosječne vrijednosti apsorbancije u jednadžbu pravca ( $y = 7134 x + 0,0043$ ), izračunata je koncentracija *N*-acetil-L-cisteina u uzorku,  $c(\text{NAC}) = 7,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

1 mL početne otopine razrijeđen je na 100 mL, a zatim 1 mL te otopine na još 10 mL, što je ukupno razrijeđenje od 1 : 1000.

$$c_1 = 7,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_1 = 1000 \text{ mL}$$

$$V_2 = 1 \text{ mL}$$

$$c_2 = \frac{7,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \times 1000 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$c_2 = 7,64 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Iz izračunate koncentracije računa se množina  $n$ , a iz množine masa  $m$ . Izračunata masa uspoređena je s teorijskom masom tj. masom koja je navedena na sekundarnoj ambalaži korištenog farmaceutskog pripravka.

$$n = c \times V = \frac{m}{M}$$

$$m = c \times V \times M$$

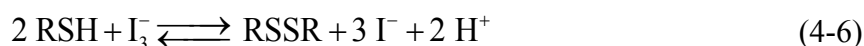
$$m = 7,64 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 0,5 \text{ L} \times 163,2 \text{ g mol}^{-1} = 0,62338 \text{ g} = 623,38 \text{ mg}$$

U analiziranom farmaceutskom pripravku, slijednom analizom injektiranjem određeno je 623,38 mg *N*-acetil-L-cisteina, a na ambalaži je deklarirano 600 mg.

#### 4.6. Usporedba razvijene metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja

Europska farmakopeja za određivanje sadržaja NAC-a u farmaceutskim pripravcima preporučuje metodu redoks-titracije standardnom otopinom joda. Prema protokolu koji propisuje Farmakopeja 0,140 g uzorka se otopi u 60 mL deionizirane vode te se doda 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline. Nakon hlađenja u ledenoj vodi doda se 10 mL kalijevog jodida te se titrira sa 0,05 mol L<sup>-1</sup> otopinom joda do pojave intenzivno modre boje. Kao indikator koristi se škrob.

Metoda se temelji 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 utvrđeno je da se za 16,32 mg NAC-a utroši 1,0183 mL otopine joda ( $c(\text{I}_2) = 0,0491 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Tablica 4.9. Usporedba rezultata razvijene SIA metode i standardne metode prema Farmakopeji

Uzorak	Navedeno, mg	Korištena metoda, mg	Standardna metoda prema Farmakopeji, mg
FLUIMUKAN JUNIOR granule za oralnu otopinu	100	105,26	100,30
NAXIL FORTE šumeće tablete	600	623,38	622,0

## **5. RASPRAVA**

Prilikom izrade ovog rada razvijena je i vrednovana metoda analize slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor za određivanje *N*-acetil-L-cisteina. Razvijena metoda temelji se na redoks-reakciji u kojoj *N*-acetil-L-cistein reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) kompleks do vrlo stabilnog kompleksa narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) kompleksa, koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm.

Budući da se apsorbanacija bilježi u kinetičkom dijelu reakcije, prilikom razvoja metode posebna pažnja posvećena je optimizaciji parametara koji bi mogli utjecati na redoks-reakciju. To su pH-vrijednost i utjecaj molarnih omjera BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ .

Utjecaj pH-vrijednosti otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-borato-fosfatnog pufera. Najveća apsorbanacija postignuta je pri pH-vrijednosti 3,0. Budući da NAC pripada skupini tiolnih spojeva koji pokazuju veću stabilnost pri nižim pH-vrijednostima, odabrana pH-vrijednost iznosila je 3,0.

Prilikom optimizacije molarnog omjera BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ , omjer se mijenjao u rasponu od 1:1 do 3:1. Molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  od 2:1 pokazao se kao optimalan.

U postupku optimizacije ispitani su i parametri SIA sustava: redosljed injektiranja, volumni protok osnovne otopine, volumen injektiranja analita, volumen injektiranja reagensa, volumen petlje zadržavanje te duljina reakcijske petlje.

Ispitana su dva različita redosljeda injektiranja. Viši signal je zabilježen ukoliko se prvo injektira otopina reagensa, a zatim otopina analita.

Optimizacijom volumnog protoka osnovne otopine može se kontrolirati disperzija te poboljšati osjetljivost metode. Također, odabir optimalnog volumnog protoka određuje učestalost mjerenja. Maksimalna apsorbanacija kao i dobra ponovljivost rezultata mjerenja zabilježena je pri protoku od  $6000 \mu\text{L min}^{-1}$ , koji je odabran kao optimalan.

Nadalje, optimiziran je volumen injektiranja reagensa. Ispitivani su volumeni u rasponu od  $50 \mu\text{L}$  do  $450 \mu\text{L}$ . Uzimajući u obzir vrijednost apsorbanacije i ponovljivost rezultata, odabran je volumen injektiranja reagensa od  $200 \mu\text{L}$  kao optimalan.

U sljedećem koraku optimiziran je volumen injektiranja analita korištenjem volumena u rasponu od  $50 \mu\text{L}$  do  $450 \mu\text{L}$ . Volumen injektiranja analita od  $250 \mu\text{L}$  odabran je kao kompromis između osjetljivosti metode i učestalosti analiza.

Imajući u vidu prethodno optimizirane volumene injektiranja reagensa i analita ( $200 \mu\text{L}$  i  $250 \mu\text{L}$ ), ispitan je utjecaj volumena petlje zadržavanja od  $500 \mu\text{L}$  i  $1000 \mu\text{L}$ . Visina analitičkog signala bila je gotovo jednaka, pa je za daljnja mjerenja odabrana petlja zadržavanja volumena  $500 \mu\text{L}$ .

Utjecaj duljine reakcijske uzvojnice ispitan je koristeći uzvojnice duljina od 30 cm do 120 cm. Najviši signal uz najbolju ponovljivost, zabilježen je kod reakcijske uzvojnice duljine 30 cm.

Koristeći odabrane optimizirane parametre, određeno je linearno dinamičko područje za ovu metodu. Mjerenjem niza standardnih otopina analita, utvrđeno je linearno dinamičko područje u rasponu koncentracija od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Jednadžba pravca glasi:  $y = 7134 x + 0,0043$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) iznosi 0,9996. Temeljem vrijednosti standardne devijacije slijepe probe izračunata je granica dokazivanja koja iznosi  $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  i granica određivanja koja iznosi  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Ispitan je utjecaj 500 puta većih koncentracija (u odnosu na NAC) određenih interferirajućih vrsta, koje se uobičajeno nalaze kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Jedino je koncentracija acetilsalicilatne kiseline bila jednaka koncentraciji NAC-a. U tablici 4.3. nalaze se podaci dobiveni mjerenjem apsorbancije. Budući da se radi o značajno većoj koncentraciji navedenih tvari, mjerenja su ponovljena za one tvari čija su odstupanja veća od 5% (fruktoza, laktoza, limunska kislina,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , vinska kislina). Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 4.4. uočljivo je da laktoza ne interferira pri određivanju NAC-a, u 400 puta većim koncentracijama, fruktoza ne interferira pri određivanju NAC-a, u 250 puta većim koncentracijama,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ne interferira pri određivanju NAC-a, u 50 puta većim koncentracijama dok limunska i vinska kislina ne interferiraju tek pri koncentracijama 5 puta većim od koncentracije NAC-a. Važno je napomenuti da su ispitivane koncentracije interferirajućih vrsta značajno veće od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima.

Točnost metode ispitana je mjerenjem 6 radnih otopina pripremljenih dodavanjem određenog volumena standardne otopine otopini odgovarajućeg realnog uzorka. Iz izmjerenih apsorbancija izračunate su koncentracije otopina i uspoređene s prethodno izračunatim teoretskim koncentracijama kako bi na kraju izračunali i iskoristivost za svaku koncentraciju. Iskoristivost, izražena u postocima, kretala se od 97,41 % do 104,00 %, što ukazuje na točnost metode.

Ponovljivost metode ispitana je mjerenjem niza od 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Iz standardne devijacije i srednje vrijednosti svih pikova, izračunato je relativno standardno odstupanje (RSD) koje iznosi 2,62 %. Dobiveni rezultat upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode.

Jedan od bitnih parametara procjene ekonomičnosti i prikladnosti SIA metode za određivanje NAC-a je učestalost analize, odnosno broj uzoraka koji se može analizirati unutar vremena od 1 sata. Analizom siagrama ponovljivosti za koncentraciju  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}$



$L^{-1}$ , izračunata je učestalost od 20 analiza po satu, što je prosječan broj uzoraka za ovu metodu. Može se reći da je učestalost mjerenja zadovoljavajuća za ovaj tip metode i svrhu za koju se koristi.

Ispitano je i prenošenje signala injektiranjem uzoraka koji su sadržavali 3 različite koncentracije NAC-a. Injektiranje je provedeno naizmjenice po 3 puta za svaku od koncentracija. Utvrđeno je da primjenom optimizirane metode ne dolazi do prenošenja signala te je ostvaren povratak na osnovnu liniju bez značajnijeg pomaka.

Konačno je razvijena metoda primjenjena na analizu realnog uzorka, odnosno za određivanje *N*-acetil-L-cisteina u farmaceutskim pripravcima: FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg granule za oralnu otopinu (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i NAXIL FORTE 600 mg šumeće tablete (Belupo d.d., Koprivnica, Hrvatska). Kao usporedna metoda korištena je jodometrijska titracija koju propisuje Farmakopeja. Rezultati prikazani u tablici 4.9. pokazuju jako dobro slaganje rezultata mjerenja razvijenom metodom slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor s rezultatima standardne metode koju propisuje Farmakopeja.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj istraživanja prikazanog u ovom radu bio je optimizacija i vrednovanje metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Analiza je zasnovana na redoks-reakciji u kojoj tiolna skupina NAC-a reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) kompleks do vrlo stabilnog kompleksa narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) kompleks. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm.

Optimizirani su kemijski parametri i parametri SIA sustava te odabrane optimalne vrijednosti: pH-vrijednost (3,0), molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  (2:1), redosljed injektiranja (R, A), volumni protok osnovne otopine ( $6000 \mu\text{L min}^{-1}$ ), volumen injektiranja reagensa ( $200 \mu\text{L}$ ), volumen injektiranja analita ( $250 \mu\text{L}$ ), volumen petlje zadržavanja ( $500 \mu\text{L}$ ) i duljina reakcijske uzvojnice (30 cm).

Tako optimizirana metoda korištena je za mjerenje 13 uzoraka poznate koncentracije s ciljem određivanja linearanog dinamičkog područja (LDP). LDP je utvrđen u rasponu koncentracija od  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Određena je jednadžba pravca ( $y = 7134 x + 0,0043$ ) te koeficijent linearne regresije ( $R^2 = 0,9996$ ). Granica dokazivanja iznosila je  $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  dok je granica određivanja iznosila  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Ispitivanjem utjecaja raznih interferirajućih tvari u koncentracijama većim od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima, nije došlo do značajnog utjecaja na određivanje NAC-a. Iskoristivost metode kretala se od 97,41 % do 104,00 %, što ukazuje na točnost i pouzdanost razvijene metode.

Ponovljivost je određena izračunom relativnog standardnog odstupanja (RSD) koje iznosi 2,62 %. Ispitan je i prijenos signala te je ustanovljeno da uzastopno određivanje različitih koncentracija NAC-a ne utječe na visinu signala i povratak na osnovnu liniju.

Zaključno, optimizirana i vrednovana metoda slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor primijenjena je za određivanje NAC-a u realnom uzorku te su izmjereni rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim analizom standardnom metodom po Farmakopeji, čime je dokazana prikladnost razvijene metode za određivanje sadržaja NAC-a u farmaceutskim pripravcima.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

- [1] Sweetman SC. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London. 2009.
- [2] Drug Bank: Acetylcysteine [Internet; citirano 22.08.2019.]. Dostupno na: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06151>
- [3] PubChem: Acetylcysteine [Internet; citirano 22.08.2019.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcysteine>
- [4] Kelly GS. Clinical applications of *N*-acetylcysteine. Altern Med Rev [Internet]. 1998 Apr [citirano 01.09.2019.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577247>
- [5] Halmed [Internet]. Zagreb: Agencija za lijekove i medicinske proizvode; [citirano 01.09.2019.]. Dostupno na: [http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC\\_UP-I-530-09-14-02-353.pdf](http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-14-02-353.pdf)
- [6] Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on *N*-acetylcysteine: An old drug with new approaches. Life Sci. 2016 Apr [citirano 01.09.2019.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26946308>
- [7] Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. *N*-acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 2007 Aug [citirano 01.09.2019.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602868>
- [8] Adil M, Amin SS, Mohtashim M. *N*-acetylcysteine in dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2018 Nov-Dec [citirano 01.09.2019.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30246706>
- [9] Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the Effects of *N*-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. Molecules [Internet]. 2018 Dec [citirano 01.09.2019.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551603>
- [10] Halmed [Internet]. Zagreb: Agencija za lijekove i medicinske proizvode; [citirano 01.09.2019.]. Dostupno na: [http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC\\_UP-I-530-09-17-01-229.pdf](http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-17-01-229.pdf)
- [11] Francetić I. i sur. Farmakoterapijski priručnik, Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
- [12] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016.

- [13] Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. Boston MA: Cengage Learning; 2013.
- [14] Biočić M. 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: Kinetičke metode analize [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.
- [15] FIALab® [Internet]. FIALab Instruments Inc. Seattle, USA [citirano 15.09.2019.]. Dostupno na: <https://www.flowinjection.com/industries/pharma>
- [16] Flow injection analysis. [Internet; citirano 15.09.2019.]. Dostupno na: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%20.0%20Sequential%20Injection.html>
- [17] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0, Print Version, 2009.
- [18] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003.
- [19] Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F, et al. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: Spektroskopske metode. Zagreb: Medicinska naklada; 1997.
- [20] European Pharmacopoeia 6th Edition. Strasbourg: Council of Europe; 2008: Vol 1.
- [21] Kraljević T. Razvoj kinetičkih spektrofotometrijskih metoda određivanja etilnog estera *N*-acetil-L-cisteina (NACET) temeljenih na formiranju kromogenih kompleksa bakra(I) s različitim ligandima primjenom protočnih tehnika. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.

## **8. SAŽETAK**

U ovom radu optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cisteina analizom slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks-reakciji, u kojoj tiolna skupina NAC-a reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) kompleks. Pri tome nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) kompleks. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri  $\lambda = 483$  nm.

Optimizacijom su obuhvaćeni kemijski parametri (pH-vrijednost i molarni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ ), kao i parametri SIA sustava (redoslijed injektiranja, volumni protok osnovne otopine, volumen injektiranja reagensa, volumen injektiranja analita, volumen petlje zadržavanja i duljina reakcijske uzvojnice).

Za optimiziranu metodu određeno je linearno dinamičko područje u rasponu od  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, uz pripadajuću jednadžbu pravca:  $y = 7134 x + 0,0043$  i koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9996$ . Određene su granica dokazivanja (LOD =  $1,3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) i granica određivanja (LOQ =  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>).

U određivanju analita, ne interferiraju tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka. Vrednovanje metode uključivalo je ispitivanje točnosti (iskoristivosti), prenošenja signala te dosega (potpunosti reakcije). Mjerenjem niza od 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine analita, utvrđena je ponovljivost metode uz relativno standardno odstupanje, RSD = 2,62 %, dok je učestalost mjerenja 20 uzoraka na sat.

Uspoređeni su rezultati razvijene metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja.



## **9. SUMMARY**

In this study, a new method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine using sequential injection analysis with spectrophotometric detector had been optimized and validated. The method is based on a redox reaction in which the thiol group of *N*-acetyl-L-cysteine reduces the bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) complex. This produces a very stable orange complex, the bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I) complex. The resulting complex reaches an absorption maximum at  $\lambda = 483$  nm.

The optimization included chemical parameters (pH value and molar ratio of BCS and  $\text{Cu}^{2+}$ ), as well as parameters of the SIA system (sequence of injection of sample and reagent, volume flow of carrier solution, injection volume of the reagent, injection volume of analyte, volume of holding coil and reaction coil length).

The method found to be linear over the range from  $4.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $4.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, the following equation had been determined:  $y = 7134 x + 0.0043$  and the correlation coefficient,  $R^2 = 0.9996$ . Limit of detection (LOD =  $1.3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) and the limit of quantification (LOQ =  $4.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) were determined.

No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations. Validation of the method included evaluating accuracy, carry over and extent of reaction. Repeatability was confirmed based on results of 15 sequential injections of standard analyte solution with relative standard deviation, RSD = 2.62%, at a sampling rate of 20 analysis per hour.

Results of the developed method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine were compared with results of the standard Pharmacopoeial method.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## OSOBNI PODATCI

- **Ime i prezime:** Dea Tomić
- **Datum i mjesto rođenja:** 29. siječnja 1996., Split, Republika Hrvatska
- **Državljanstvo:** hrvatsko
- **Adresa stanovanja:** Vinogradska 61, 21 000 Split, Republika Hrvatska
- **E-adresa:** [tomicdea@yahoo.com](mailto:tomicdea@yahoo.com)

## OBRAZOVANJE

- **2010. – 2014.** III. gimnazija, Split
- **2014. – 2019.** Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Studij Farmacija

## STRANI JEZICI

- Engleski jezik

## AKTIVNOSTI

- Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) (2016. – 2019.)
- Organizacija skupa predavanja i radionica „Praktična znanja za studente“ (Split, 2018.)
- PMKS: Međunarodno natjecanje u znanju studenata farmacije i medicine (Split, 2018.)
- FARMEBS 2018: 7. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (Zagreb, 2018.)
- EPSA *Summer University* (Izmir, Turska, 2018.)
- 5. Kongres Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Zagreb, 2018.)
- 1. Natjecanje u izradi magistralnih pripravaka, u organizaciji Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Split, 2019.)
- 6. Hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem (Dubrovnik, 2019.)
- 6. Kongres Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Zagreb, 2019.)
- 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine (Split, 2019.)

## NAGRADE

- Dobitnica Dekanove nagrade za izvrsan uspjeh (2016.)