

# Razvoj i vrednovanje metode određivanja tiopronina u farmaceutskim pripravcima protočno injekcijskom tehnikom uz spektrofotometrijski detektor

---

**Palošek, Silvija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:904075>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-08**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Silvija Palošek**

**RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ODREĐIVANJA TIOPRONINA U  
FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA PROTOČNO INJEKCIJSKOM TEHNIKOM  
UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2022./2023.**

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun**

**Split, listopad 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno područje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Analitička kemija  
**Tema rada:** prihvaćena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta i na 24. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Lea Kukoč Modun  
**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Maja Biočić Šormaz

#### **RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ODREĐIVANJA TIOPRONINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA PROTOČNO INJEKCIJSKOM TEHNIKOM UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR**

Silvija Palošek, broj indeksa 201820

**Sažetak:** Upotrebom protočno injekcijske analize uz spektrofotometrijski detektor razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicin) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj tiopronin sudjeluje kao reducens, a bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) se reducira u žuto-narančasti spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorbancija nastalog spoja mjerena je pri 483 nm. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni kemijski parametri i parametri protočnog sustava pri kojima je izvršeno određivanje linearnog dinamičkog područja u rasponu koncentracija od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Linearnom regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca  $y = 5016 x + 0,0019$  uz koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9998$  te granicu određivanja (LOQ) od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> i granicu dokazivanja (LOD) od  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Vrednovanjem metode ustanovljena je njezina točnost uz raspon iskoristivosti od 96,06% do 100,74%. Osim laktoze, saharoze, limunske, vinske i acetilsalicilne kiseline, ostale pomoćne tvari farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Metoda je pokazala zadovoljavajuću ponovljivost uz relativno standardno odstupanje od 1,42% i tijekom jednog sata omogućuje 60 analiza u triplicatu, odnosno ukupno 180 analiza. Primjenom metode nije došlo do prenošenja signala, a utvrđeni doseg reakcije iznosi 92%. Razvijena metoda uspoređena je sa standardnom metodom po Farmakopeji i može se uspješno primijeniti za određivanje tiopronina u farmaceutskim pripravcima.

**Ključne riječi:** tiopronin, analiza inkjektiranjem u protok, spektrofotometrijski detektor

**Rad sadrži:** 70 stranica, 6 tablica, 34 slike i 56 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva:** izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević

izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun

**Datum obrane:** 27. listopada 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, 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 science  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Analytical chemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 79 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35 and Faculty Council of School of Medicine, session no.24  
**Mentor:** Associate professor Lea Kukoč Modun, PhD  
**Technical assistance:** Postdoctoral researcher Maja Biočić Šormaz, PhD

### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE METHOD FOR THE DETERMINATION OF TIOPRONIN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS USING THE FLOW INJECTION TECHNIQUE WITH A SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR

Silvija Palošek, index number 201820

**Summary:** A new method for determining tiopronin (*N*-2-mercaptopropionyl-glycine) in pharmaceutical formulations was developed and evaluated using flow injection analysis with a spectrophotometric detector.. The method is based on a redox reaction in which tiopronin acts as a reductant, reducing bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) to bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I), a yellow-orange compound. The absorbance of the resulting compound was measured at 483 nm. The univariate method was used to select optimal chemical parameters and parameters of the flow system, the linear dynamic range was determined in the concentration range from  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  to  $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Using linear regression analysis, the equation  $y = 5016 x + 0.0019$  was obtained with the correlation coefficient  $R^2 = 0.9998$  as well as the limit of quantification (LOQ) of  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  and the limit of detection (LOD) of  $9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Performing the evaluation of the method its accuracy was established within a range of recovery from 96,06% to 100,74%. Aside from lactose, sucrose, citric acid, tartaric acid and acetylsalicylic acid, other excipients of pharmaceutical preparations do not interfere when measuring the tiopronin signal. The method showed satisfactory reproducibility with a relative standard deviation of 1.42% and allows for 60 analyses in triplicate, or a total of 180 analyses, during one hour. The application of the method did not result in the carryover of a signal, and the determined reach of the reaction is 92 %. The developed method was compared to the standard method according to the Pharmacopoeia and can be successfully applied for the determination of tiopronin in pharmaceutical formulations.

**Keywords:** tiopronin (MPG), injection flow analysis (FIA), spectrofotometric detector

**Thesis contain:** 70 pages, 6 tables, 34 figures and 56 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** Associate professor, Franko Burčul, PhD                    president  
Associate professor, Ivana Škugor Rončević, PhD            member  
Associate professor, Lea Kukoč Modun, PhD                    mentor

**Defence date:** 27. October 2023.

**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

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Tiopronin, <i>N</i>-2-merkaptopropionil-glicin (MPG)</b> .....	2
<b>1.1.1. Kemijska svojstva</b> .....	2
<b>1.1.2. Farmakokinetika</b> .....	3
<b>1.1.3. Farmakodinamika</b> .....	3
<b>1.1.4. Doziranje i način primjene</b> .....	4
<b>1.1.5 Nuspojave</b> .....	5
<b>1.1.6. Interakcije</b> .....	6
<b>1.1.7. Trudnoća i dojenje</b> .....	6
<b>1.1.8. Posebne terapijske skupine</b> .....	6
<b>1.1.9. Analitičke metode određivanja tiopronina</b> .....	6
<b>1.2. Opći dio</b> .....	7
<b>1.2.1. Kinetičke metode analize</b> .....	7
<b>1.2.2. Red reakcije</b> .....	9
<b>1.3. Protočno injekcijska analiza (FIA)</b> .....	10
<b>1.3.1. Raspršenje (disperzija) injektiranog uzorka</b> .....	11
<b>1.3.2. Fiagram</b> .....	12
<b>1.3.3. Instrumentacija FIA sustava</b> .....	14
<b>1.3.3.1. Crpka</b> .....	14
<b>1.3.3.2. Injekcijski ventil</b> .....	15
<b>1.3.3.3. Prijenosni sustav</b> .....	16
<b>1.3.3.4. Detektor</b> .....	17
<b>1.3.4. Izvedbe modela FIA sustava</b> .....	18
<b>1.3.5. Primjena i značaj protočno injekcijske analize</b> .....	20
<b>1.4. Spektrofotometrija</b> .....	20
<b>1.4.1. Beerov zakon i njegova ograničenja</b> .....	21
<b>1.4.2. Dijelovi spektrofotometra</b> .....	22
<b>1.4.3. Izvedbe spektrofotometara</b> .....	23
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>3.1. Priprava otopina</b> .....	27
<b>3.1.1. Otopina standarda tiopronina (<i>N</i>-2-merkaptopropionil-glicin, MPG)</b> .....	27
<b>3.1.2. Otopina reagensa, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II)</b> .....	27
<b>3.1.3. Otopina acetatno-fosfatno-boratnog pufera</b> .....	28

3.1.4. Otopina acetatnog pufera .....	28
3.1.5. Otopina natrijevog hidroksida .....	29
3.1.6. Otopina realnog uzorka tiopronina .....	29
3.1.7. Otopine za određivanje tiopronina metodom koju propisuje Farmakopeja ...	30
3.1.7.1. Otopina kalijevog jodida, KI .....	31
3.1.7.2. Otopina joda, I <sub>2</sub> .....	31
3.1.7.3. Otopina octene kiseline, HAc .....	31
3.1.7.4. Otopina klorovodične kiseline, HCl .....	31
3.1.7.5. Otopina škroba .....	32
3.1.7.6. Standardizacija otopine joda, I <sub>2</sub> .....	32
3.1.8. Uređaji i instrumenti korišteni tijekom laboratorijskog rada .....	32
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>34</b>
4.1. Reakcija na kojoj se temelji metoda .....	35
4.2. Optimizacija parametara FIA sustava .....	35
4.2.1 Optimizacija pH-vrijednosti .....	36
4.2.2. Optimizacija molnog omjera reagensa BCS i Cu <sup>2+</sup> .....	37
4.2.3. Optimizacija volumena protočne kivete; $V_{\lambda}$ .....	38
4.2.4. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine; $Q_{CS}$ .....	38
4.2.5. Optimizacija volumnog protoka otopine reagensa; $Q_{RS}$ .....	39
4.2.6. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita; $V_i$ .....	40
4.2.7. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice; $l$ .....	41
4.3. Analitičke karakteristike metode .....	43
4.3.1. Linearno dinamičko područje (LDP) i krivulja umjeravanja .....	43
4.3.2. Granica određivanja i granica dokazivanja .....	43
4.4 Točnost metode .....	44
4.5. Utjecaj interferencija .....	46
4.6. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala) i doseg reakcije ..	47
4.7. Analiza realnog uzorka .....	49
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>51</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>56</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>59</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>67</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>69</b>

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lei Kukoč Modun na ponuđenoj temi diplomskoga rada, stručnom vodstvu te savjetima tijekom izvedbe i pisanja diplomskog rada.*

*Veliko hvala i dr. sc. Maji Biočić Šormaz na uloženom trudu, strpljenju i pomoći u izradi i pisanju diplomskog rada.*

*Zahvalila bih se i djelatnicima Kemijsko - tehnološkog fakulteta i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu na ljubaznosti, pristupačnosti i pružanju znanja i kompetencija tijekom studiranja.*

*Hvala obitelji, prijateljima i kolegama na potpori, strpljenju i razumijevanju tijekom cjelokupnog školovanja.*



## **1. UVOD**

## 1.1. Tiopronin, *N*-2-merkaptopropionil-glicin (MPG)

Predmet interesa ovog rada (analit) je spoj *N*-2-merkaptopropionil-glicin (MPG), također znan kao tiopronin, sutilan, tiosol, kaptimer, thiola®, vinkol, IUPAC-ovog naziva 2-(2-sulfanoilpropanoilamino) octena kiselina [1]. Tiopronin je sulfhidril acetil derivat glicina, svojstvima sličan D-penicilaminu. Sintetski je spoj koji se svrstava u skupinu tiolnih spojeva (u kemijskim reakcijama skraćeno RSH), budući da kao sumporni analog alkoholnih spojeva na mjestu hidroksilne (-OH) skupine posjeduje sulfhidrilnu (-SH) skupinu, odnosno atom sumpora mijenja atom kisika u srodnoj strukturi. Zahvaljujući elektron donorskom potencijalu, tiolni spojevi rado tvore komplekse s ionima metala poput bakra, olova i žive, čime ih uspješno vežu i uklanjaju iz organizma sprječavajući njihovo štetno djelovanje i blokiranje enzimskih sustava [2]. Tiopronin se kao receptni lijek stoga može koristiti kao antidot u trovanju teškim metalima, kao i kod Wilsonove bolesti kako bi vezao višak bakra koji se nakuplja u tijelu. Opisana je i njegova primjena u liječenju cistinurije (više u poglavlju 1.1.3. Farmakodinamika). Pokazalo se i da štiti od oštećenja uzrokovanih ishemijom/reperfuzijom, a može biti učinkovit protiv oštećenja izazvanih zračenjem, čak i pri niskim dozama. Tiopronin se također koristi u liječenju reumatoidnog artritisa, bolesti jetre i kao mukolitik kod respiratornih poremećaja [3]. Istražuju se i njegova potencijalna neuroprotektivna svojstva kod aneurizme zbog subarahnoidnog krvarenja [4].

### 1.1.1. Kemijska svojstva

Tiopronin je kristalinični prašak bijele boje i karakterističnog mirisa. Molekularna masa mu je  $163,20 \text{ g mol}^{-1}$ , a temperatura tališta  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $97 \text{ }^\circ\text{C}$  [5]. Budući da je slaba kiselina, disocira u dva stupnja; prvi stupanj disocijacije karboksilne skupine (COOH) ima konstantu disocijacije,  $K_{a1} = 2,51 \times 10^{-4}$  a drugi stupanj disocijacije tiolne skupine (SH) ima konstantu disocijacije  $K_{a2} = 1,82 \times 10^{-9}$  [6].



Slika 1. 2D struktura tiopronina [7].

### 1.1.2. Farmakokinetika

Oralno primijenjen tiopronin postiže maksimalnu vrijednost koncentracije u krvi 3 - 6 sati nakon uzimanja. Vrijeme poluživota ukupno mjerenog tiopronina iznosi 53 sata, dok tiopronin nevezan za proteine plazme nestaje iz organizma brže, uz vrijeme poluživota od 1,8 sati. Nevezani tiopronin ima manje vrijednosti vremena zadržavanja (6 sati) i volumena distribucije (41 L) od frakcije tiopronina koja se veže za proteine plazme (vrijeme zadržavanja 58 sati, a volumen distribucije 455 L). Navedeno ukazuje na značajan postotak vezivanja tiopronina za proteine plazme i tkiva. Vežanje tiopronina na proteine plazme ostvaruje se formiranjem disulfidnih mostova sa slobodnom tiolnom skupinom plazmatskih albumina. Apsolutna bioraspoloživost tiopronina je 63 % dok je bioraspoloživost izračunata iz urinarne ekskrecije 47 %. Osnovni metabolit tiopronina je 2-merkaptopropionska kiselina (2-MPA) koja nastaje reakcijama hidrolize iz osnovnog spoja [4]. Urinarnom ekskrecijom u prvih 6 sati nakon oralne primjene izluči se velik dio tiopronina (74 %), a u 12 sati od primjene ekskrecija je gotovo potpuna (izluči se 98 % lijeka). Iz navedenih parametara zaključeno je da bi se primijenjen kao lijek u tretiranju cistinurije tiopronin trebao davati u podijeljenim dozama, barem dvaput dnevno za postizanje optimalnog terapijskog učinka [8].

### 1.1.3. Farmakodinamika

Tiopronin ima kompleksirajuća i antioksidativna svojstva te se koristi u terapijske svrhe prvenstveno u liječenju teških oblika autosomno recesivnog genetskog defekta transepitelijalnog transporta cistina i drugih dibazičnih aminokiselina u bubregu tzv. cistinurije, karakterizirane obilnim količinama aminokiseline cistina u urinu (veće od 500 mg po danu). Budući da je cistinurija rijedak genetski poremećaj, tiopronin se svrstava u lijekove za liječenje rijetkih i teških bolesti tzv. *“orphan drugs”*. Zbog neadekvatne reapsorpcije dibazičnih aminokselina u proksimalnom tubulu bubrega, dolazi do njihove hipereksekrecije i nakupljanja u urinu te posljedično zbog slabe topljivosti cistina u normalnom pH mediju urina manjem od 7, stvaraju se bubrežni kamenci. Cistinurija predstavlja 1-2 % slučajeva bubrežnih kamenaca općenito, a 6-8 % slučajeva bubrežnih kamenaca u djece uz visoku prevalenciju povišenog krvnog tlaka i kronične bubrežne bolesti. Terapija cistin vezujućim tiolnim spojevima tioproninom i D-penicilaminom koristi se kao druga linija liječenja u slučaju neadekvatnog odgovora na nefarmakološke mjere liječenja poput alkalizacije urina, povećanog unosa tekućine i smanjenog unosa proteina i soli u prehrani. Tiopronin je reducirajući agens koji ulazi u reakciju s disulfidnom vezom cistina čime se vrši tiolno - disulfidna zamjena i stvara se topljiviji produkt cistein čime se smanjuje stvaranje bubrežnih

kamenaca. Tiopronin i D-penicilamin pretvaraju cistin u miješani disulfid, 50 puta topljiviji od samog cistina [3,4,7,9,10].

Zbog kompleksirajućih svojstava tiopronin se može koristiti za vezivanje bakra koji se u tijelu nakuplja kod Wilsonove bolesti uzrokujući preopterećenje organizma. Smatra se i učinkovitim kelatorom teških metala kao što je živa čime se može spriječiti akutno i kronično trovanje tim metalom [4,11].

Tiopronin nudi nekoliko prednosti u odnosu na slične lijekove, uključujući povoljniji profil nuspojava od D-penicilamina i bolju bioraspoloživost od *N*-acetilcisteina. Štoviše, osnovni metabolit tiopronina, 2-merkaptopropionska kiselina, također je snažan hvatač radikala. Mogućnost redukcije disulfidne veze između oksidiranih bioloških tiola poput disulfida glutationa omogućuje tioproninu jaka antioksidacijska svojstva koja se mogu koristiti za zaštitu od nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti uzrokovane kemoterapijom, kod trovanja zračenjem i ishemijsko-reperfuzijske ozljede srčanog i plućnog tkiva. Istražuje se i utjecaj tiopronina na oksidacijske procese koji dovode do zamućenja leće u senilnoj katarakti [12].

Opisana je i faza 1 kliničkog ispitivanja neuroprotektivnog utjecaja tiopronina na oštećenja izazvana neurotoksičnim aldehidom 3-aminopropanalom (3-AP) koji doprinosi ozljedi mozga nakon cerebralne ishemije. Tiopronin potencijalno veže i neutralizira navedeni spoj pri čemu se sprječavaju daljnja oštećenja [13].

#### **1.1.4. Doziranje i način primjene**

Oralno primijenjen tiopronin indiciran je kod odrasle i pedijatrijske populacije ( $\geq 20$  kg) s ozbiljnom homozigotnom cistinurijom koja ne odgovara na sam tretman nefarmakološkim mjerama poput povećanog unosa tekućine, alkalizacije urina i modifikacije režima prehrane. Uzima se na prazan želudac, jedan sat prije ili dva sata nakon obroka. Tablete s produljenim oslobađanjem mogu se uzimati neovisno o uzimanju hrane. Ukoliko postoji problem pri gutanju tablete, može se zdrobiti i pomiješati sa žličicom jabučnog soka i tako pripremljenu suspenziju uzeti odmah ili držati u hladnjaku do 2 sata. Alkoholna pića treba izbjegavati dva sata prije i tri nakon uzimanja tiopronina [9].

Početna doza za odrasle je 800 mg dnevno podijeljenih u tri dnevne doze koje se uzimaju uvijek u isto vrijeme. Prosječna dnevna doza dostiže 1000 mg i prilagođava se održavanju cistina u granicama njegove topljivosti u urinu ( $< 250 \text{ mg L}^{-1}$ ). Djeca tjelesne težine 20 kilograma ili veće u početku uzimaju dozu od  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  koja se titrira prema

potrebi, ali obično ne prelazi dnevnu dozu od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . Kod djece tjelesne težine manje od 20 kilograma upotreba tiopronina se ne preporuča. U slučaju propuštene doze, zaboravljena se tableta uzima čim se pacijent sjeti, osim ako je uskoro vrijeme za sljedeću dozu. U tom slučaju propuštena doza se preskače i nastavlja se s uobičajenim terapijskim režimom. Ne uzimaju se dvije doze odjednom bez savjetovanja s liječnikom. U slučaju prethodno razvijenih teških nuspojava na D-penicilamin preporuča se početi terapiju s nižim dozama. Urinarni cistin kontrolira se mjesec dana nakon uvođenja terapije i zatim svaka tri mjeseca. Testiranje na proteinuriju vrši se prije uvođenja terapije i svakih 3-6 mjeseci tijekom uzimanja lijeka. Ukoliko dođe do razvoja proteinurije, liječenje se može nastaviti u manjim dozama ili se prekida u potpunosti uz daljnje praćenje bubrežne funkcije [14,15].

### 1.1.5 Nuspojave

U liječenju cistinurije kao druga linija liječenja nakon nefarmakoloških metoda mogu se koristiti D-penicilamin i tiopronin, s time da tiopronin ima manje zabilježenih neželjenih učinaka te je u odnosu na D-penicilamin manje teških nuspojava koje bi zahtijevale prestanak liječenja. Međutim, osobe koje su imale neželjene reakcije na prethodnu terapiju D-penicilaminom sklonije su razvoju nuspojava pri liječenju tioproninom zbog čega se savjetuje praćenje terapijskog učinka i potencijalne proteinurije u intervalima od 3 do 6 mjeseci tijekom uzimanja terapije [16,17]. Neke od zabilježenih nuspojava uključuju:

- Hepatotoksičnost - žutica, povećani jetreni enzimi;
- Kožni poremećaji - učestalost nije navedena: preosjetljivost, artralgiya, limfadenopatija;
- Mučnina, povraćanje, dijareja, čirevi u ustima – vrlo često (10 % i više);
- Dispepsija, nelagoda, nadutost;
- Metabolički poremećaji – često (1 % - 10 %): anoreksija;
- Dermatološki poremećaji - često (1% - 10%): osip, ekhimoza, svrbež, urtikarija, boranje kože;
- Hematološki poremećaji - često (1 % - 10 %): anemija;
- Respiratorni poremećaji - često (1 % - 10 %): kašalj;
- Bubrežni poremećaji - nefrotski sindrom, zatajenje bubrega;
- Neurološki poremećaji - vrtoglavica, glavobolja, astenija;
- Mišićno-koštani poremećaji - vrlo često (1 % - 10 %): artralgiya;

- Ostalo: bol u leđima, bol u bokovima, oticanje zglobova, nelagoda u udovima, mišićno-koštana nelagoda, mialgija, bol u vratu, bol u ekstremitetima, umor, slabost, goznica, periferni edem [18].

#### **1.1.6. Interakcije**

Određeni lijekovi poput abakavira, aklofenaka, acetaminofena, acemetacina, acetilsalicilne kiseline, alogliptina, alprazolama mogu smanjiti brzinu izlučivanja tiopronina čime se povećava njegova razina u serumu [4].

Acetazolamid može povećati brzinu izlučivanja tiopronina što može rezultirati nižom razinom u serumu i potencijalno smanjenjem učinkovitosti [4].

#### **1.1.7. Trudnoća i dojenje**

Dugotrajna ispitivanja kancerogenosti i mutagenosti nisu provedena s tioproninom. U eksperimentalnim studijama na životinjama pokazalo se da visoke doze tiopronina ometaju održavanje trudnoće i održivost fetusa. Nisu otkriveni defekti neuralne cijevi kada je tiopronin davan miševima i štakorima u dozama do 10 puta većim od najveće preporučene doze za ljude. Međutim, ne isključuje se mogućnost teratogenosti, kao što je to uočeno kod lijeka D-penicilamina, koji djeluje sličnim mehanizmom kao tiopronin i kod kojega se primjena lijeka u trudnoći nastavlja u slučaju veće koristi terapije u odnosu na rizik neželjenih učinaka [19]. Postoje izvješća o slučajevima nefropatije, odnosno nefrotskog sindroma te supresije laktacije povezane s tioproninom zbog čega njegova primjena u dojilja nije preporučena [4,15].

#### **1.1.8. Posebne terapijske skupine**

Poznato je da se tiopronin u velikoj mjeri izlučuje putem bubrega, a rizik od nuspojava na ovaj lijek može biti veći u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega. Budući da je veća vjerojatnost da će stariji bolesnici imati smanjenu bubrežnu funkciju, treba biti oprezan pri odabiru doze, a može biti korisno pratiti bubrežnu funkciju [19].

Thiola® (tiopronin) tablete nisu odobrene za upotrebu u pedijatrijskih bolesnika koji teže 20 kg ili manje niti u pedijatrijskih bolesnika koji ne mogu gutati tablete. Tiopronin se ne preporučuje za dojilje i nije utvrđena sigurnost za djecu u dobi od 9 godina ili mlađu [19].

#### **1.1.9. Analitičke metode određivanja tiopronina**

U literaturi su opisane metode određivanja tiopronina koja uključuju konvencionalnu spektrofotometriju koja se temelji na stvaranju kompleksa s metalnim ionima, fluorometriju,

kemiluminiscenciju, tekućinsku kromatografiju i plinsku kromatografiju. Instrumentacija koja se koristi kod navedenih metoda je skupa, jednako tako i korišteni reagensi, metode su vremenski zahtjevne te ih trebaju provoditi educirani analitičari. [20,21,22,23].

Zbog relativno visoke učestalosti nuspojave tiopronina tijekom liječenja različitih bolesti (trombocitopenija, agranulocitoza, proteinurija, nefrotski sindrom i druge), od kojih su neke ovisne o dozi, preporučuje se praćenje lijeka u uzorcima urina, seruma ili drugih bioloških tekućina tijekom liječenja. Stoga je opisan niz metoda kvantifikacije navedenog spoja korištenjem kromatografskih tehnika [3].

Zbog potrebe za velikom učestalošću analiza u farmaceutskoj industriji, potreban je razvoj automatskih metoda analiza. Pregledom literature pronađeno je nekoliko kinetičkih metoda određivanja tiopronina injektiranjem u protok.

- Opisana je metoda za određivanje penicilamina, tiopronina i glutaciona u farmaceutskim formulacijama kinetičkom spektrofotometrijom, a temelji se na redoks reakciji gdje tiolni spoj (RSH) reducira bis neokuproin bakrov(II) kompleks u bis neokuproin bakrov(I) kompleks. Signal formiranog kompleksa u kinetičkom području reakcije izmjeren je na 458 nm [20].
- Opisana je FIA metoda za određivanje tiopronina u rasponu  $1 \times 10^{-5}$  -  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Postupak se temelji na kemiluminescencijskoj reakciji tiopronina s Ce(IV) u mediju sumporne kiseline uz korištenje rodamina 6G i kinina kao fluorofora. FIA metoda je brza i precizna i omogućuje mjerenja do 80 otopina na sat [24].
- Za određivanje penicilamina i tiopronina predložene su dvije FIA metode uz spektrofotometrijski detektor. Postupci se temelje na stvaranju žutih kompleksa između ovih spojeva koji sadrže tiol i Pd(II) u mediju od 1 mol L<sup>-1</sup> ili 0,25 mol L<sup>-1</sup> HCl. Raspon mjerenja za tiopronin je  $1 \times 10^{-5}$  -  $6 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> [25].

## 1.2. Opći dio

### 1.2.1. Kinetičke metode analize

Ovisno o načinu određivanja koncentracije analita, analitičke tehnike i metode mogu upotrebljavati:

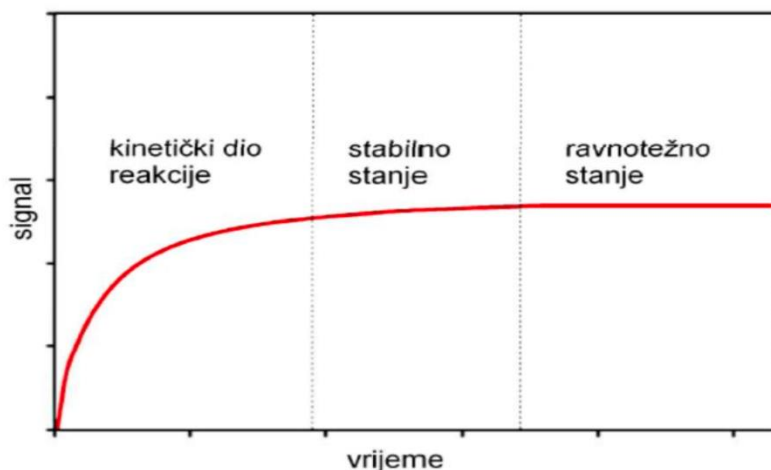
- Ravnotežu kemijske reakcije
- Kinetiku kemijske reakcije ili fizikalnog procesa [26].

Analitički signal može se mjeriti u kinetičkom dijelu reakcije ili pri postizanju ravnotežnog stanja. U kinetičkim metodama signal je određen brzinom reakcije u kojoj sudjeluje analit. Nužno je da koncentracija analita određuje brzinu navedene reakcije koja se najčešće povećava povećanjem koncentracije samog analita. Napredovanjem reakcije mijenjaju se koncentracije analita koji nestaju u reakciji i produkta koji nastaje, a posljedično tome mjereni signal mijenja se s vremenom. Za razliku od kinetičkih metoda, kod ravnotežnih ili termodinamičkih metoda analitički signal se određuje u trenutku postizanja ravnotežnog ili ostvarenog stabilnog stanja kemijske reakcije u kojoj sudjeluje analit, pri čemu su koncentracije analita i produkta stalne, a samim je time i mjereni signal konstantan. Iste reakcije ponekad možemo upotrijebiti za razvoj ravnotežne i kinetičke metode, ovisno o vremenu u kojemu bismo mjeriti analitički signal i činjenici je li reakcija u kinetičkom području ili je postigla ravnotežno stanje. Prednosti kinetičkih metoda, međutim, očite su kod sporih reakcija koje teško postižu ravnotežno stanje [26,27,28].

Za razvoj pouzdane kinetičke metode odabrana kemijska reakcija mora udovoljavati nužnim uvjetima:

- Brzina kemijske reakcije mora biti dovoljno brza da se mjerenje izvrši u prihvatljivom vremenskom intervalu, ali dovoljno spora da ne postigne ravnotežno stanje u periodu miješanja reaktanata. Drugim riječima, brzina ne bi trebala biti ni prebrza ni prespora.
- Zakon brzine reakcije treba biti poznat
- Praćenje tijeka reakcije mora se omogućiti kontinuiranim praćenjem promjene koncentracije sudionika reakcije; analita, produkta ili reagensa koji reagira s analitom. U analitičkim laboratorijima u svrhu praćenja kemijske reakcije koriste se potenciometrijski ili spektrofotometrijski detektori [27,28].





**Slika 2.** Razdoblja kemijske reakcije: kinetički dio, stabilno stanje, ravnotežni dio [26].

Unatoč raznolikosti kemijskih kinetičkih metoda, 1960-ih godina one više nisu bile u uobičajenoj uporabi. Glavno ograničenje njihovog šireg prihvaćanja bila je sklonost značajnim pogreškama zbog nekontroliranih ili slabo kontroliranih varijabli - temperature i pH kao dva primjera - i prisutnosti interferencija koje aktiviraju ili inhibiraju katalitičke reakcije. Do 1980-ih, poboljšanja u instrumentaciji i metodama analize podataka kompenzirala su ta ograničenja, osiguravajući daljnji razvoj kemijskih kinetičkih metoda analize [27].

Pogodnost kinetičkih metoda i sve veći razvoj i upotreba leže u činjenici da su navedene metode osjetljive i selektivne u određivanju signala tijekom svega par minuta korištenjem odgovarajućeg detektora bez potrebe za predobradom uzorka [28].

### 1.2.2. Red reakcije

Općeniti prikaz kemijske reakcije moguć je izrazom:



A predstavlja analit, R je reagens, a P produkt kemijske reakcije.

Empirijski oblik zakona brzine može se prikazati na sljedeći način:

$$\text{brzina} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \times [A]^m \times [R]^n$$

(1-2)

Brzina kemijske reakcije ovisi o koncentracijama sudionika reakcije i jednaka je promjeni koncentracije A, R i P u vremenu  $t$ . Negativni predznaci u izrazima za promjenu koncentracije po vremenu za A i R označavaju da se navedeni sudionici tijekom reakcije troše, dok produkt P nastaje napredovanjem reakcije. Simbol  $k$  označava konstantu brzine, a  $m$  i  $n$  su redovi reakcije u odnosu na analit A, odnosno reagens R. Ukupni red reakcije računa se kao  $p = m + n$  [28,29].

### 1.3. Protočno injekcijska analiza (FIA)

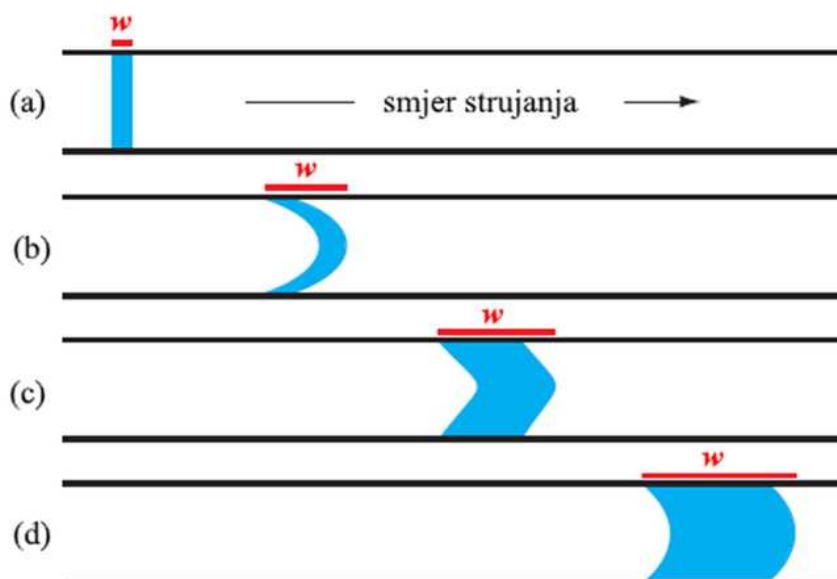
Sredinom 1970-ih znanstvenici Ružička i Hansen razvili su i opisali analizu injektiranjem u protok (engl. *flow injection analysis*, FIA) kao vrlo učinkovitu i brzu tehniku analize velikog broja uzoraka. FIA omogućuje jednostavnost primjene, minijaturizaciju sustava uz mogućnost korištenja opreme lako dostupne analitičkim laboratorijima te smanjuje vrijeme i troškove analize. Tehnika se temelji na kontinuiranom protoku osnovne otopine nosioca, koja i sama može biti reagens, u čiju se struju toka u pravilnim intervalima injektira određeni volumen uzorka, odnosno analita. Daljnjim tokom otopine u stjecištu dolazi do spajanja sa strujom reagensa u konačnu struju čijim se protjecanjem duž reaktora postiže miješanje i formira produkt raspršenjem zone uzorka u struji reagensa. Produkt se detektira na izlaznom dijelu sustava pomoću odgovarajućeg detektora koji mjeri apsorbanciju ili neki drugi parametar tijekom prolaska kroz kivetu. Uređaj je povezan s osobnim računalom zbog interpretacije podataka. Protočna analiza injektiranjem spada u kinetičke metode analize budući da se signal uzorkuje u vremenskom intervalu kada kemijska reakcija nije postigla ravnotežno stanje [30,31].



**Slika 3.** a) injektiranje uzorka (ružičasta boja) u struju osnovne otopine koja je ujedno i reagens (plava boja na slici) b) raspršenje uzorka i formiranje zone uzorka u struji otopine reagensa c) na granici zone uzorka i reagensa formira se detektibilni produkt (žuta boja) [31].

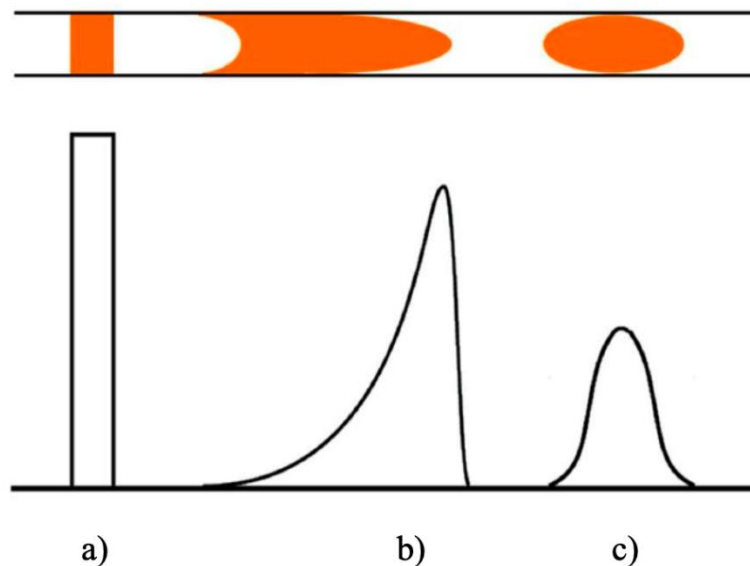
### 1.3.1. Raspršenje (disperzija) injektiranog uzorka

Pri početnom injektiranju uzorak poprima pravokutan izgled i nastavlja se dalje širiti i mijenjati do karakterističnog paraboličnog oblika zbog raspršenja koje je posljedica dvaju procesa: konvekcije i difuzije. Konvekcija je dominantna u prvih 100 milisekundi od injektiranja uzorka. Prolazak injektiranog uzorka odvija se kroz ravnu cjevčicu cilindričnog presjeka kojom struji osnovna otopina čija je brzina protoka konstantna. Navedeni uvjeti karakteriziraju laminarni tip strujanja zbog čega uzorak poprima oblik parabole pri čemu su brzine strujanja uz rubove cjevčice jednake nuli. Zbog sile trenja formira se prateći rub fluida koji zaostaje za vršnim dijelom zone uzorka budući da je u središtu cjevčice brzina najveća. Od 3. do 20. sekunde nakon injektiranja, obliku zone uzorka jednako doprinose konvekcija i difuzija koja nastaje zbog koncentracijskog gradijenta između osnovne otopine i zone uzorka, a može biti aksijalna i radijalna na smjer strujanja osnovne otopine pri čemu je samo radijalna od značaja za FIA sustav jer omogućuje da se zadrži cjelovitost zone uzorka. Nakon 25. sekunde dominantan proces u oblikovanju izgleda zone uzorka je difuzija [32,33].



**Slika 4.** Utjecaj raspršenja na izgled zone uzorka a) početno injektiranje uzorka b) konvekcija dominantno doprinosi raspršenju c) konvekcija i difuzija jednako doprinose raspršenju d) difuzija doprinosi raspršenju [33].

Na slici 5. dodatno je prikazana promjena oblika zone uzorka uzrokovana raspršenjem. Od početnog oblika pravokutnika pri injektiranju uzorka (slika 5.a), zona poprima asimetrični oblik dominantnim utjecajem procesa konvekcije (slika 5.b) nakon čega radijalna difuzija vraća oblik krivulje u pravilan Gaussov oblik (slika 5.c) [33].



**Slika 5.** Utjecaj raspršenja na izgled zone uzorka koju detektor očitava kao signal [33].

### 1.3.2. Fiagram

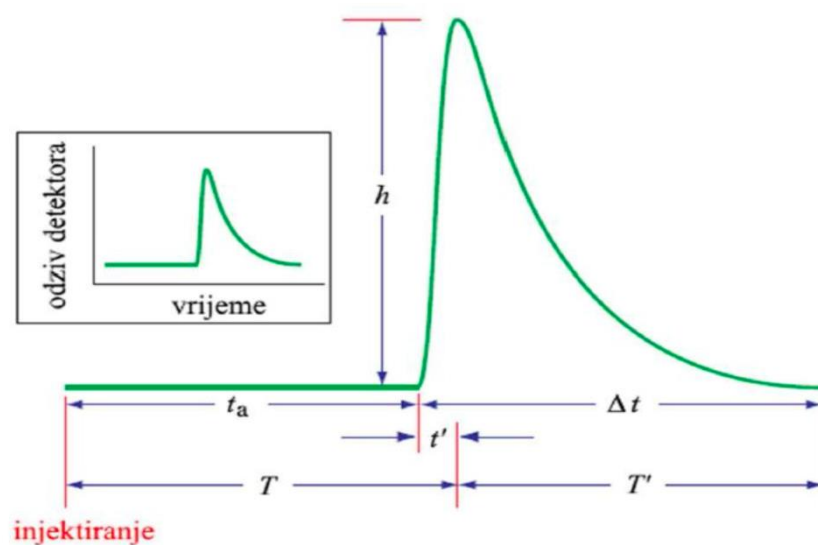
Fiagram je grafički prikaz odziva detektora u ovisnosti o vremenu, odnosno niz krivulja koje predstavljaju pojedinačne signale koje detektor bilježi prolaskom formiranog produkta kroz protočnu ćeliju (kivetu) u vremenu kada konvekcija i difuzija oblikuju izgled zone uzorka. Na slici 6. prikazani su karakteristični parametri koji opisuju fiagram:

Vrijeme potrebno od injektiranja do dolaska na detektor opisano je sljedećim parametrima:

- $t_a$  - putno vrijeme, vrijeme potrebno od injektiranja uzorka u struju osnovne otopine do dolaska vršnog dijela zone uzorka na detektor;
- $T$  - vrijeme boravka, vrijeme potrebno od injektiranja uzorka do postizanja maksimalnog signala (pik krivulje);
- $t' = T - t_a$ , razlika između vremena boravka i putnog vremena čija se vrijednost smanjuje utjecajem konvekcije, a povećava utjecajem difuzije na raspršenje zone uzorka.

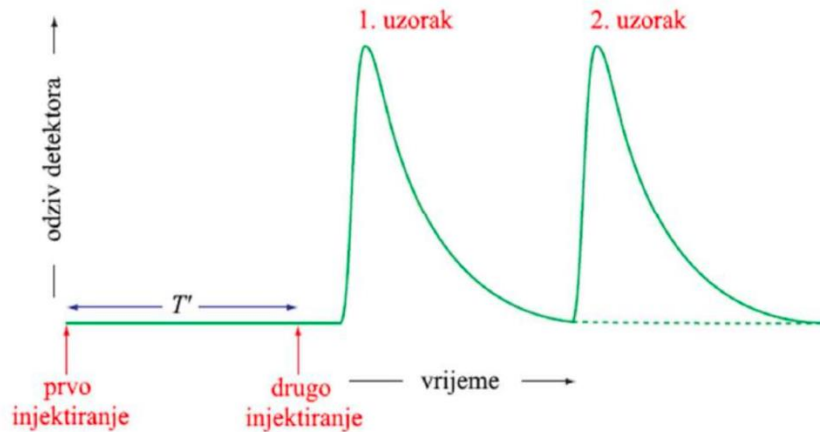
Vrijeme potrebno za prolazak zone uzorka kroz kivetu detektora također je opisano koristeći sljedeće parametre:

- $\Delta t$  - cjelokupno vrijeme od početka rasta krivulje s bazne linije i postizanja pika do ponovnog povratka na baznu liniju, odnosno od dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka do detektora pa do prolazna zadnjeg oštrog dijela zone uzorka kroz detektor;
- $T'$  - vrijeme povratka, vrijeme potrebno da se nakon postizanja maksimuma signal vrati na baznu liniju;
- $h$  - visina vrha, razlika između maksimuma signala u piku krivulje i signala na baznoj liniji [34].



**Slika 6.** Fiagram uz pripadajuće karakteristične parametre  $t_a$ ,  $T$ ,  $t'$ ,  $\Delta t$ ,  $T'$ ,  $h$  [35].

Od svih parametara ključni su visina vrha i vrijeme povratka. Visina vrha određuje selektivnost metode jer je povezana s koncentracijom analita. Veća koncentracija istog analita dovodi do veće visine signala na fiagramu. Vrijeme povratka određuje koliko često je moguće injektirati uzorke, pri čemu je optimalan broj injektiranja uz minimalno preklapanje krivulja postignut ako je razlika između dva pojedina injektiranja uzorka jednaka vremenu povratka  $T'$  (prikazano na slici 7.) [34].



**Slika 7.** Utjecaj vremena povratka na broj analiza [35].

Na visinu vrha i vrijeme povratka utjecaj ima kinetika kemijskih reakcija između analita i reagensa, raspršenje zone uzorka, kemijska svojstva protočnog sustava kao i fizikalni parametri: brzina protoka, duljina, promjer i karakteristike uzvojnice kao i prisutnost stjecišta. Svi parametri protočnog sustava se moraju eksperimentalno utvrditi za pojedinu reakciju i optimizirati kako bi signal (osjetljivost metode) bio što veći, a vrijeme povratka na baznu liniju što kraće. Generalno vrijednosti obaju parametara zadovoljavaju uz povećanje brzine protoka, smanjenjem duljine promjera reaktora te spajanjem struja otopina prije samog injektiranja analita. Za veću osjetljivost povoljniji je veći volumen injektiranog analita, ali je stoga posljedično veće i vrijeme povratka [34].

### 1.3.3. Instrumentacija FIA sustava

Jednostavan FIA sustav sastoji se od peristaltičke crpke koja osigurava kontinuirani protok otopine, dvosmjernog injekcijskog ventila, sustava cijevi, reaktora i priključaka, protočne kivete i detektora [35].

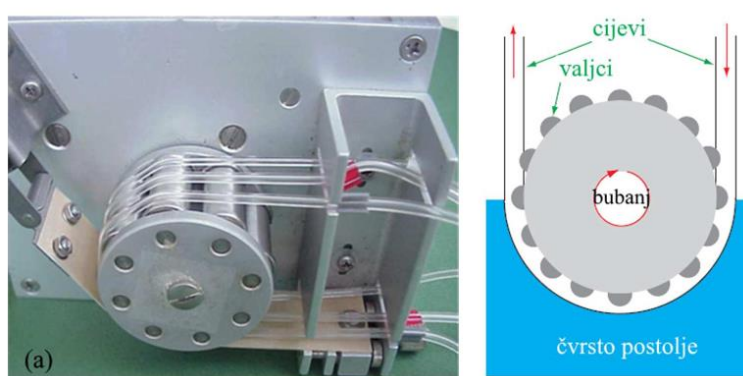
U narednim podnaslovima detaljnije su opisani pojedinačni dijelovi FIA instrumentacije.

#### 1.3.3.1. Crpka

Peristaltička crpka je najčešća pogonska jedinica koja osigurava kontinuirani protok strujama fluida otopine nosioca i reagensa. Brzina protoka ovisi o unutarnjem promjeru cjevčica crpke i brzini rotacije niza valjaka na vanjskoj strani površine bubnja koji pritišću cjevčice i na taj način potiču protok sadržaja cjevčica u smjeru rotacije. Moguće je ostvariti

brzine protoka od  $0,0005 \text{ mL min}^{-1}$  do  $40 \text{ mL min}^{-1}$  što zadovoljava potrebe FIA sustava čiji je raspon protoka najčešće od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  do  $6 \text{ mL min}^{-1}$  [36].

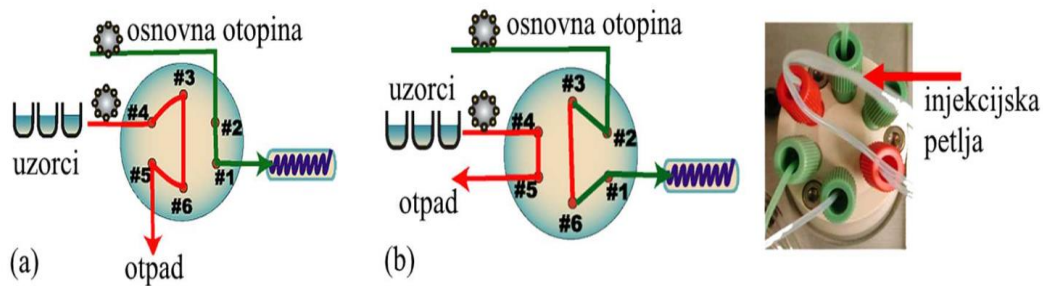
Glavni nedostatak ovakve izvedbe crpke jest potrošnost cjevčica koje s vremenom gube elastičnost pa se smanjuje brzina protoka fluida. Pri većim brzinama protoka moguće su i pulsacije zbog kojih signal oscilira. Postoje i novije izvedbe crpki, tzv. dvosmjerne crpke s injektiranjem (engl. *syringe pump*) i dvosmjerne crpke bez injektiranja (engl. *syringe free pump*) [37].



**Slika 8.** Prikaz crpki FIA sustava: a) peristaltička crpka i shematski prikaz [37].

### 1.3.3.2. Injekcijski ventil

Volumen uzorka (najčešće od 50 do  $1000 \mu\text{L}$ ) injektira se brzo poput hica u struju osnovne otopine pomoću dvosmjernog injekcijskog ventila s ručnim upravljanjem u izvedbi sa šest kanala i injekcijskom petljom. Zbog automatizacije i praktičnosti pri analizi velikog broja uzoraka koristi se ventil sličan onome kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Ventil se može automatski ili ručno zakretanjem za  $90$  stupnjeva prebaciti iz pozicije punjena u poziciju injektiranja uzorka. Injekcijska petlja (na Slici 9. pozicija 3-6) može se puniti automatski pomoću crpke ili ručno putem štrcaljke. Između uzoraka moguće je uvoditi zrak i ispirati cjevčice [37].



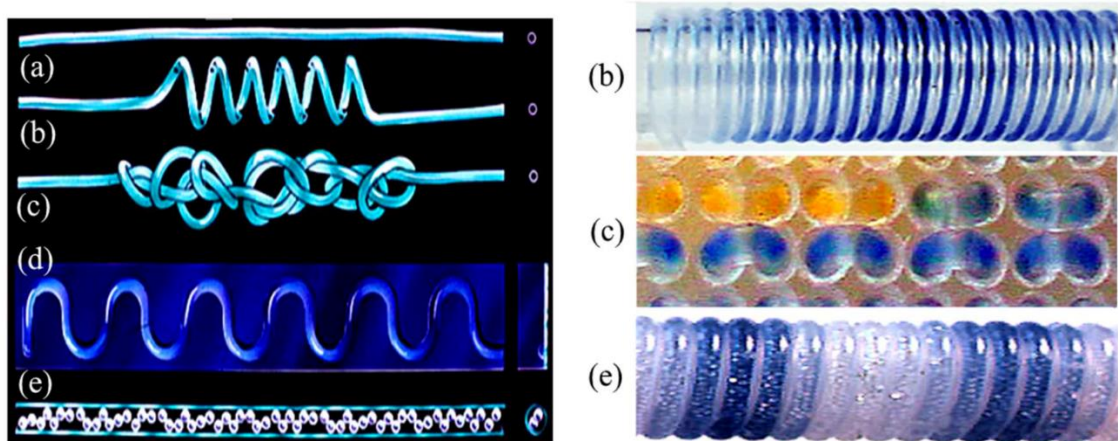
**Slika 9.** Prikaz inekcijskog ventila sa šest kanala i inekcijskom petljom (pozicija 3-6) a) pozicija punjenja ventila b) pozicija inekcijiranja uzorka [37].

### 1.3.3.3. Prijenosni sustav

Prijenosni sustav ključan je dio FIA sustava jer omogućuje da se struje otopina nosioca, inekcijiranog uzorka i reagensa spoje u stjencištu i da unutar reaktora njihovim miješanjem dođe do željene kemijske reakcije i puta konačne ujedinjene struje prema detektoru. Sustav se sastoji od kemijski inertnih cjevčica unutarnjeg promjera od 0,5 do 0,8 mm izrađenih od polimernih materijala poput poli(tetrafluoroetilena) i poli(eter-eter-ketona) ili nehrđajućeg čelika dodatno povezanih i učvršćenih vijcima i maticama. U samom stjencištu koje može biti izvedbe slova Y ili T sastaju se struje nosioca i reagensa te se omogućuje daljnji tok otopine kroz reaktor. U samom reaktoru dolazi do miješanja otopina i odvija se konačna kemijska reakcija. Reaktor može biti različitih izvedbi ovisno o veličini i izgledu (Slika 10.) :

- Ravna cijev (Slika 10.a) - uobičajeni tip reaktora, ali manje učinkovit zbog nemogućnosti postizanja adekvatnog miješanja otopina;
- Reakcijska uzvojnica (Slika 10.b) - dobivena namatanjem cijevi što omogućuje bolje miješanje;
- Spleteni reaktor (Slika 10.c) - dodatno namatanje cjevčica u čvorove omogućuje bolje miješanje uz upitnu ponovljivost mjerenja;
- Sinusoidni tip (Slika 10.d) - utiskivanjem cjevčica u sinusoidne ostavljaju se mjesta koja se slabo ispiru;
- Punjeni reaktor (Slika 10.e) - ravna cijev ispunjena kuglicama inertnog materijala, rijetko korištena jer prolaskom struje otopine može doći do neželjene adsorpcije analita [38].





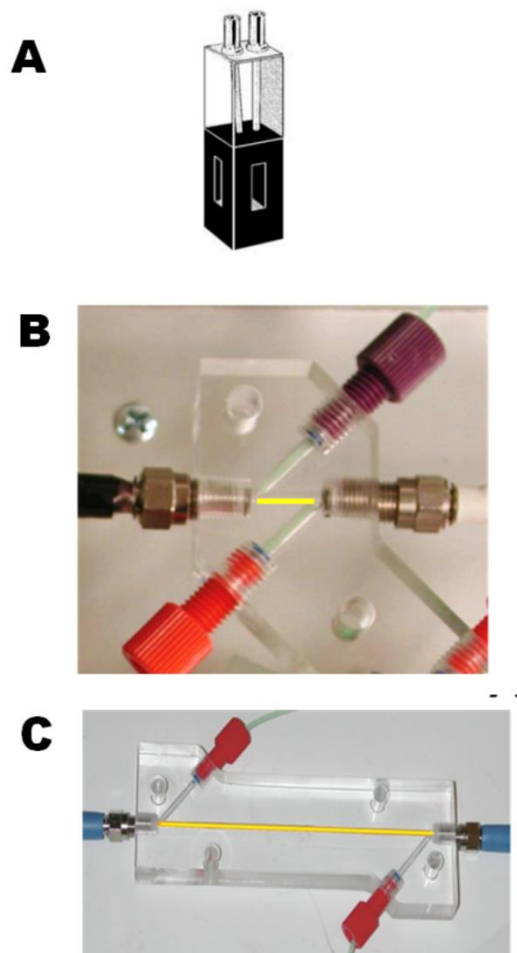
**Slika 10.** Prikaz različitih geometrijskih izvedbi reaktora FIA sustava a) ravna cijev b) reakcijska uzvojnica c) spleteni reaktor d) sinusoidni tip reaktora e) punjeni reaktor [39].

#### 1.3.3.4. Detektor

Najčešće korišteni detektori u protočnoj analizi injektiranjem su elektrokemijski ili spektrofotometrijski detektori. Napredak u instrumentaciji uvela je primjena optičkih vlakana koja su omogućila postavljanje protočnih ćelija izvan samog detektora i smanjenje njihovog optičkog puta s klasičnih 1 cm do čak 0,01 cm. Ovisno o izvedbi razlikujemo protočne kivete (Slika 11.) :

- Standardne slobodne protočne kivete (kompatibilne s bilo kojim analizatorom)
- Integrirane protočne kivete (u izvedbi engl. *lab-on-valve*) koje omogućuju definirani put uzorka od mjesta injektiranja do detektora i smanjenje njegovog volumena [40].

Danas se koriste i Z-kivete koje su optičkim vlaknima povezane s izvorom svjetlosti i spektrofotometrijskim detektorom [40].



**Slika 11.** Različite izvedbe protočnih kiveta  
 a) Standardna protočna kiveta b) Z – kiveta  
 c) kiveta u *lab-on-valve* izvedbi [40].

#### 1.3.4. Izvedbe modela FIA sustava

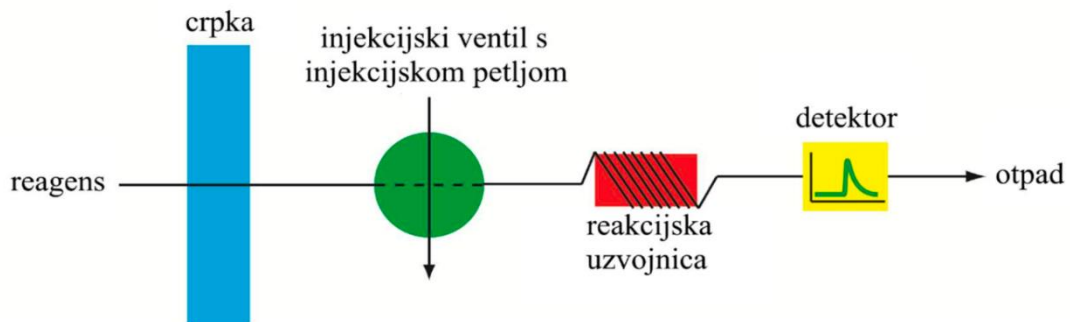
FIA sustavi mogu biti jednostavne izvedbe kao jednokanalni sustavi ili složeniji s dva ili više kanala koji omogućuju miješanje jednog ili više reagensa s otopinom uzorka [41].

Kod jednokanalnih sustava otopina nosioc služi samo kako bi brzo i ponovljivo prenijela uzorak do detektora, a ponekad može i doći do reakcije s uzorkom odnosno analitom pa je u tom slučaju otopina nosioc ujedno i reagens (Slika 12.) [41].

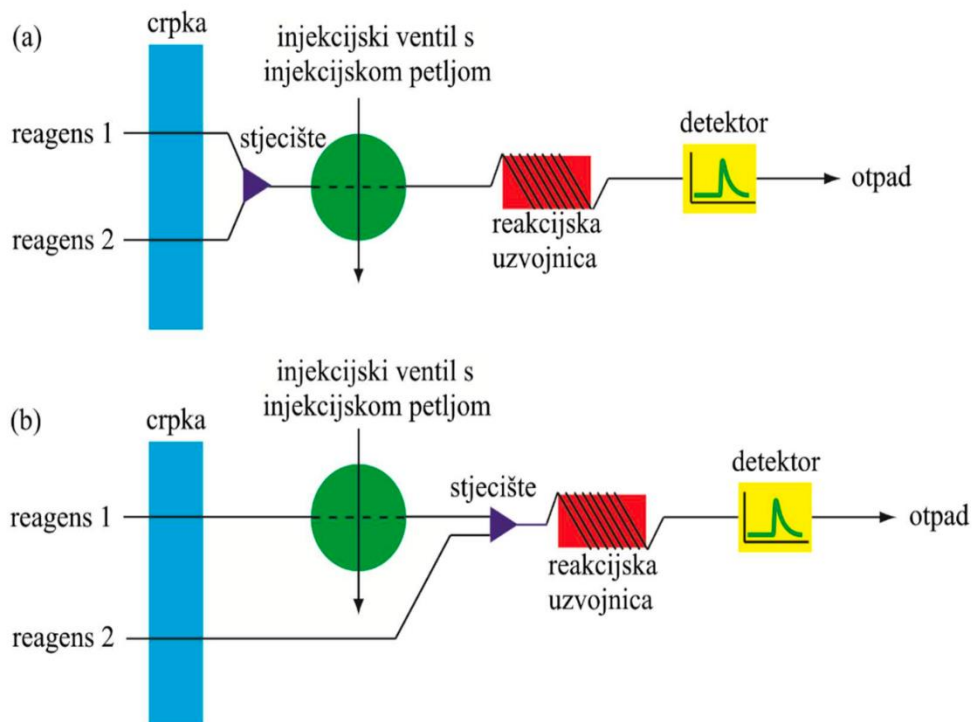
Dvokanalni sustavi imaju dvije moguće izvedbe ovisno o mjestu injektiranja uzorka (Slika 13.). Prva izvedba (Slika 13.a) prikazuje reakciju između nestabilnih reagensa koji se miješaju neposredno prije injektiranja uzorka pomoću injekcijskog ventila. Druga moguća izvedba (Slika 13.b) prikazuje sustav gdje injektiranje uzorka u struju jednog od reagensa

prethodi miješanju sa strujom drugog reagensa. Na ovaj se način kvantitativno određuju mnogi analiti [41].

Trokanalni sustavi također se koriste u praksi, ali su kompleksni za prikaz svih mogućih kombinacija izvedbi.



**Slika 12.** Prikaz jednokanalnog FIA sustava [42].



**Slika 13.** Prikaz dvokanalnih FIA sustava a) miješanje dvaju struja reagensa prije injektiranja uzorka b) injektiranje uzorka u struju otopine nosioca nakon čega dolazi do miješanja s drugim reagensom [42].

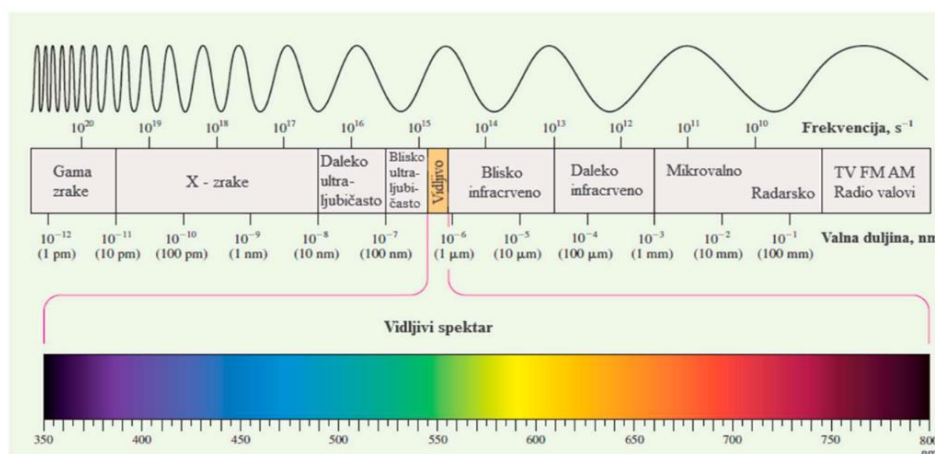
### 1.3.5. Primjena i značaj protočno injekcijske analize

Zbog ekonomičnosti, jednostavnosti primjene, automatizacije i minijaturizacije sustava te lake dostupnosti opreme analitičkim laboratorijima, protočno injekcijska analiza nalazi primjenu u širokom spektru područja: kemijskoj i poljoprivrednoj industriji, analizi okoliša, bioanalizama te farmaceutskoj industriji [43].

FIA metode naslanjaju se na principe "zelene analitičke kemije" (engl. *Green Analytical Chemistry*, GAC) koja zagovara razvoj održivih analitičkih metoda u skladu s ekološkom osviještenosti te manjom upotrebom kemikalija kao i redukcijom stvaranja toksičnog otpada. Protočno injekcijska analiza omogućuje manju potrošnju reagensa kao i njihovo recikliranje, manje stvaranje otpada uz izravno zbrinjavanje istog, jednostavnu predobradu uzorka te manju mogućnost onečišćenja analita u zatvorenom sustavu [44,45].

### 1.4. Spektrofotometrija

Koncentracija tvari u uzorku može se odrediti mjerenjem apsorbirane svjetlosti metodom spektrofotometrije. Spektrofotometrijska tehnika se rutinski koristi u farmaceutskoj analizi za kontrolu kvalitete, zbog svoje jednostavnosti, dostupnosti i niske cijene. Primjena kinetičkih spektrofotometrijskih metoda nudi prednost u odnosu na klasičnu spektrofotometriju, kao što je poboljšana selektivnost i kraće vrijeme analize [20].



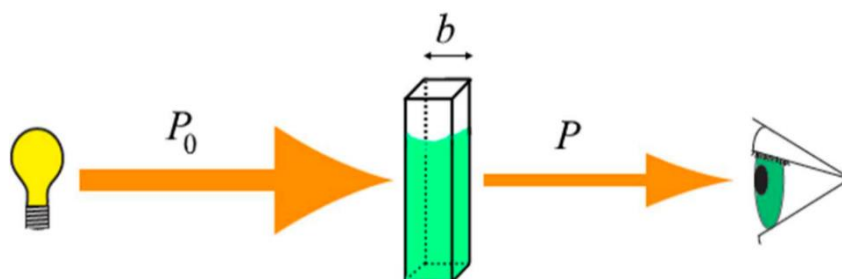
**Slika 14.** Elektromagnetski spektar zračenja s izdvojenim područjem vidljivog spektra koji se proteže od ultraljubičastog područja (UV) do infracrvenog područja (IR) [46].

### 1.4.1. Beerov zakon i njegova ograničenja

Odnos između apsorbancije mjerene spektrofotometrijskim detektorom i koncentracije kemijske vrste od interesa opisan je Beerovim zakonom:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \times b \times c \quad (1-3)$$

gdje  $a$  predstavlja konstantu proporcionalnosti (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljinu puta uzorka kroz koji zračenje prolazi, a  $c$  koncentraciju vrste od interesa u uzorku. Mjerna jedinica za apsorpcijski koeficijent određuje se uzimajući u obzir da je apsorbancija bezdimenzijska fizikalna veličina.



Slika 15. Prigušenje osnovnog snopa zračenja zbog procesa apsorpcije [47].

Veličinu  $a$  možemo zamijeniti simbolom za molarni apsorpcijski koeficijent, odnosno  $\epsilon$ , kada se koncentracija u Beerovom izrazu izražava u molovima po litri, a duljina puta u centimetrima.

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (1-4)$$

pri čemu je mjerna jedinica molarnog apsorpcijskog koeficijenta izražena u  $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  [48].

Izraz za Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju pri istoj valnoj duljini. Ukupna apsorbancija jednaka je zbroju apsorbancija pojedinačnih komponenti:

$$A_{uk} = A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (1-5)$$

pri čemu su brojevi 1,2... $n$  u indeksu pojedine komponente sustava koje apsorbiraju zračenje pri određenoj valnoj duljini [48].

U određenim situacijama javlja se odstupanje od Beerovog zakona pri čemu ne vrijedi linearna korelacija između apsorbancije i koncentracije. Kada su koncentracije analita veće od  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, oni se više ne ponašaju kao zasebna jedinka već stupaju u međusobnu interakciju mijenjajući raspodjelu naboja, a samim time i molarnu apsorptivnost. Stoga Beerov zakon vrijedi prvenstveno za razrijeđene otopine ( $c < 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>). Prisustvom stranih iona i tvari u većim koncentracijama u otopini od samog analita javlja se sličan učinak [47].

#### 1.4.2. Dijelovi spektrofotometra

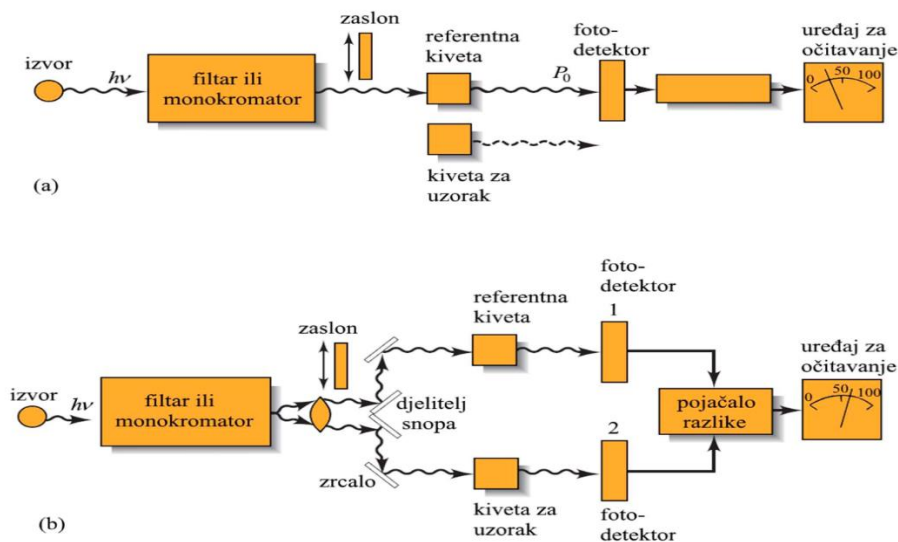
Osnovni dijelovi spektrofotometra imaju sljedeće uloge (prikazano na slici 16.):

- **Izvor zračenja**- osigurava izvor kontinuiranog i snažnog elektromagnetskog zračenja u željenom dijelu spektra. Kao izvor ultraljubičastog zračenja koriste se vodikove i deuterijeve žarulje (160 - 380 nm), a za vidljivi i bliski infracrveni dio spektra u upotrebi su volframove i halogen žarulje (240 - 2500 nm);
- **Selektor valnih duljina** - iz snopa zračenja izdvaja željene valne duljine za potrebe kvantitativnog mjerenja. Dije se na apsorpcijske i interferencijske filtre te na monokromatore koji su praktičniji jer mogu mijenjati izlazne valne duljine širokog područja spektra. Najčešće su im izvedbe u obliku difrakcijske rešetke ili prizme;
- **Spremnik za uzorke** - omogućuje prolazak svjetlosti određene valne duljine kroz otopinu uzorka i referentnu otopinu (slijepu probu koja sadrži sve komponente otopine izuzev analita). Najčešća duljina optičkog puta kivete, odnosno njezina unutarnja širina za mjerenja u UV-VIS području je 1 cm. Izrađene su od materijala prozirnih u spektralnom području u kojem se vrši mjerenje. Kivete od kvarca pogodne su za mjerenja u ultraljubičastom području ( $< 350$  nm), a mogu se primijeniti i za valne duljine do 3000 nm (blisko infracrveno zračenje). Kivete od silikatnog stakla koriste se za mjerenja u području od 375 nm do 2000 nm. Prilikom rada s kivetama potrebno je paziti na nečistoće, mjehuriće zraka i ostatke otapala s vanjske strane prozora kivete koji mogu interferirati s mjerenim signalom;
- **Detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljiv signal** - mjeri intenzitet svjetla koje prolazi kroz otopine u spremniku za uzorke. Udarom fotona o detektor, svjetlosna energija pretvara se u električni signal;

- **Procesor signala** - pojačava električni signal detektora i pretvara ga u digitalni zapis te ga može filtrirati i izvoditi matematičke operacije integriranja, diferenciranja i logaritmiranja signala [49,50,51].

### 1.4.3. Izvedbe spektrofotometara

Moguće izvedbe instrumenata su jednosnopni i dvosnopni spektrofotometar od kojih je dvosnopni pogodniji za kinetička mjerenja. Nedostatak jednosnopnog spektrofotometra je potreba za naizmjeničnim mijenjanjem kivete s uzorkom i kivete s referentnom otopinom pri mjerenju. Dvosnopni uređaji su kompleksniji, ali pogodniji za praćenja apsorbancije kao funkcije vremena. Pomoću V-zrcala, tzv. djelitelja snopa osnovni snop zračenja dijeli se na dva snopa od kojih jedan prolazi kroz kivetu s uzorkom, a drugi kroz kivetu s referentnom otopinom formirajući tako dva odvojena signala koja se na izlazu pojačavaju. Njihov omjer ili logaritam tog omjera određuje se elektronički i prikazuje na uređaju za očitavanje (Slika 16.) [51].



**Slika 16.** Shematski prikaz izvedbe spektrofotometara a) jednosnopni b) dvosnopni [51].

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj istraživanja ovog diplomskog rada jest razvoj i vrednovanje metode određivanja *N*-2-merkaptopropionil-glicina (tiopronina, MPG) protočno injekcijskom tehnikom (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA) uz detekciju signala pri valnoj duljini od 483 nm korištenjem spektrofotometrijskog detektora.

Tijekom razvoja metode optimizirani su parametri:

- pH-vrijednost
- Molni omjer reagensa,  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$
- Volumen protočne kivete ( $V_{\lambda}$ )
- Volumni protok osnovne otopine ( $Q_{CS}$ )
- Volumni protok otopine reagensa ( $Q_{RS}$ )
- Volumen injektiranja otopine analita ( $V_i$ )
- Duljina reakcijske uzvojnice ( $l$ )

Optimizaciju parametara FIA sustava slijedi određivanje analitičkih karakteristika metode:

- Linearno dinamičko područje (LDP)
- Jednadžba pravca (vrijednosti odsječka i nagiba pravca)
- Koeficijent linearne regresije  $R^2$
- Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD)
- Granica određivanja (engl. *Limit of quantification*, LOQ)

Metoda je konačno vrednovana (validirana) na način da su se odredili parametri:

- Točnost (iskoristivost)
- Interferirajuće vrste
- Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala)
- Doseg reakcije

Ovako razvijenu i vrednovanu metodu određivanja *N*-2-merkaptopropionil-glicina moguće je primijeniti na određivanje tiopronina u uzorcima farmaceutskih pripravaka. Istu je potrebno usporediti sa standardnom metodom određivanja tiopronina koju propisuje Farmakopeja.

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

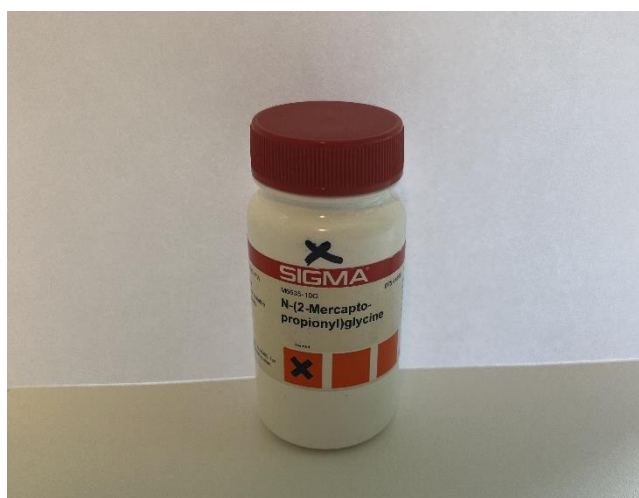
### 3.1. Priprava otopina

Otopine korištene za potrebe eksperimentalnog rada pripravljene su korištenjem ultračiste, deionizirane vode kao otapala te kemikalija analitičkog stupnja čistoće. Deionizirana voda pripravlja se postupcima reverzne osmoze, filtracije kroz aktivni ugljen koja uklanja organska onečišćenja, deionizacije ionskim izmjenjivačima i filtracije kroz pore veličine 0,22  $\mu\text{m}$  membranskog filtra za uklanjanje mikroorganizama.

#### 3.1.1. Otopina standarda tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicin, MPG)

Standardna otopina tiopronina, MPG koncentracije  $c = 1,0 \times 10^{-2}$  dobivena je otapanjem 0,0816 g tiopronina (Sigma Adrich Inc., St. Louis, USA,  $M = 163,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) u acetatno-borato-fosfatnom puferu  $\text{pH} = 2$  do 50 mL u odmjernoj tikvici (tiolni spojevi stabilni su pri nižim  $\text{pH}$  vrijednostima, a sam acetatno-fosfatno-borati pufer omogućuje širok raspon vrijednosti  $\text{pH}$  od 2 do 8).

Pripravljena standardna otopina čuvana je u hladnjaku pri  $4^\circ\text{C}$ , a za potrebe dnevnih mjerenja pripravljane su odgovarajuće otopine tiopronina nižih koncentracija razrjeđenjem s deioniziranom vodom.



Slika 17. MPG, kemijski spoj za pripravu standardne otopine

#### 3.1.2. Otopina reagensa, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II)

- Otopina bakrovih(II) iona

Otopina bakra(II) koncentracije  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  dobivena je 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 deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici volumena 50 mL.

- **Otopina batokuproindisulfonske kiseline, BCS**

Otopina BCS koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  dobivena je otapanjem 0,05825 g dinatrijeve soli batokuproin disulfonat hidrata (Sigma-Aldrich, Njemačka,  $M = 564,54 \text{ g mol}^{-1}$ ) u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici volumena 50 mL.

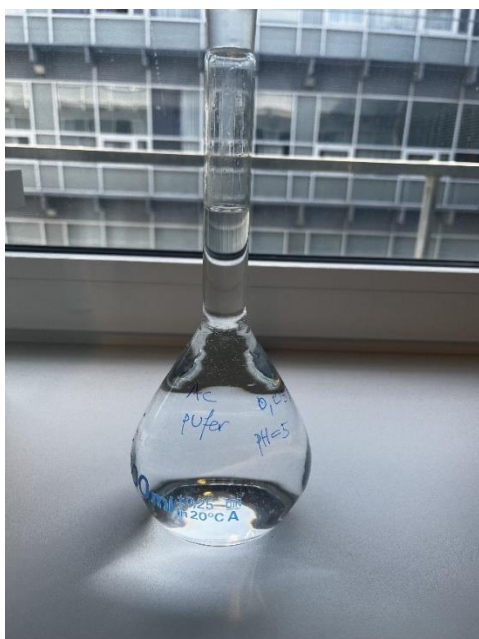
Otopine za pripremu reagensa čuvane su u hladnjaku pri 4°C. Ovisno o dnevnim potrebama reagens bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) je pripravljan uz molni omjer  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$  i dodatak acetatnog pufera pH-vrijednosti 5.

### **3.1.3. Otopina acetatno-fosfatno-boratnog pufera**

Pufer je pripravljen otapanjem 4,9464 g borne kiseline,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Alkaloid, Skopje, Makedonija,  $M = 61,83 \text{ g mol}^{-1}$ ) u malom volumenu deionizirane vode, uz dodatak 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,  $\text{HPO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ ). Deioniziranom vodom se dopunjava do oznake na odmjernoj tikvici volumena 2 L. pH vrijednost ove otopine približno je 2. Za potrebe procesa optimizacije reakcijskog medija odgovarajuće pH-vrijednosti otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera pripremane su podešavanjem uz dodatak otopine natrijevog hidroksida, NaOH koncentracije  $c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$  uz korištenje pH-metra.

### **3.1.4. Otopina acetatnog pufera**

Acetatni pufer pripremljen je otapanjem 1,5750 g bezvodnog natrijevog acetata,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 82,03 \text{ g mol}^{-1}$ ) u malom volumenu deionizirane vode nakon čega je mikropipetom dodano 0,52 mL octene kiseline,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (VWR Chemicals, Francuska,  $M = 60,05 \text{ g}$ ) i konačno nadopunjeno deioniziranom vodom do oznake na odmjernoj tikvici volumena 500 mL. Ovako pripremljen pufer pH vrijednosti 5 koristio se u pripremi reagensa bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II).



**Slika 18.** Otopina acetatnog pufera pH = 5

### **3.1.5. Otopina natrijevog hidroksida**

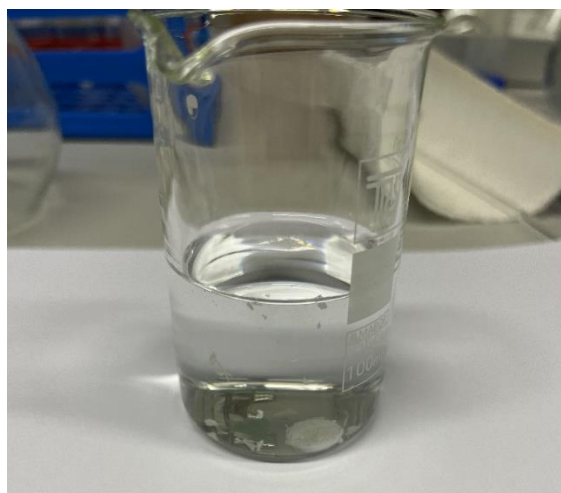
Otopina je pripremljena dodavanjem 8,00 g natrijevog hidroksida, NaOH (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska,  $M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$ ) u tikvicu od 100 mL dopunjavanjem deioniziranom vodom do oznake na tikvici. Koncentracija ovako pripremljene otopine iznosi  $c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Otopina je korištena za podešavanje pH vrijednosti otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera.

### **3.1.6. Otopina realnog uzorka tiopronina**

Realni uzorak pripremljen je otapanjem jedne tablete iz pakiranja od 50 Captimer® tableta od kojih svaka sadrži 100 mg djelatne tvari tiopronina. Jedna Captimer® tableta mase 0,4860 g otopljena je u 100 mL acetatno-fosfatno-boratnog pufera, pH = 2. Deioniziranom vodom dopunjena je otopina do oznake na tikvici 500 mL.



**Slika 19.** CAPTIMER® tablete od 100 mg korištene za pripravu realnog uzorka

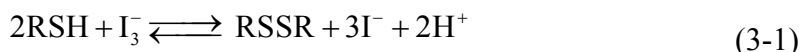


**Slika 20.** Otapanje CAPTIMER® tablete u acetatno-fosfatno-boratnom puferu, pH = 2

### **3.1.7. Otopine za određivanje tiopronina metodom koju propisuje Farmakopeja**

S obzirom da farmakopeja ne sadrži monografiju za tiopronin, za njegovo određivanje može poslužiti opisana metoda iz monografije za sličan tiolni spoj iste molekularne mase, *N*-acetil cistein, NAC. U navedenom protokolu otopi se 0,140 g uzorka analita u 60 mL deionizirane vode uz dodatak 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline. Otopina se ohladi u ledenoj vodi i zatim se doda 10 mL kalijevog jodida nakon čega se vrši titracija s otopinom joda koncentracije  $c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Kao indikator u reakciji koristi se otopina škroba.

Budući da su tiopronin i NAC redoks aktivni tiolni spojevi, farmakopeja propisuje redoks reakciju standardnom otopinom joda kao oksidansa:



U navedenoj reakciji tiolni spojevi MPG ili NAC (RSH spojevi) reduciraju jod u jodid pri čemu se sami oksidiraju. U završnoj točki titracije otopina se oboji u intenzivno modru boju zbog prisustva škroba kao indikatora, jer njegova komponenta amiloza s jodom stvara obojeni produkt [54,55].

Eksperimentalno je utvrđeno da za 16,32 mg NAC-a treba utrošiti 1 mL otopine joda  $c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Pretpostavka je da opisani protokol vrijedi i za tiopronin s obzirom na njegovo slično redukcijsko djelovanje, kao i istu molekulsku masu. [52].

#### **3.1.7.1. Otopina kalijevog jodida, KI**

Standardna otopina KI masene koncentracije  $\gamma = 166 \text{ g L}^{-1}$  dobije se otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode [52].

#### **3.1.7.2. Otopina joda, I<sub>2</sub>**

Za pripremu otopine joda množinske koncentracije  $c = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  otopi se 12,7 g joda i 20 g kalijevog jodida, KI u deioniziranoj vodi nakon čega se otopina razrjeđuje do volumena od 1000 mL u odmjernoj tikvici. Kalijev jodid prvo je otopljen u malom volumenu deionizirane vode nakon čega je dodan jod zbog njegove veće topljivosti u otopini jodida. Nakon potpunog otapanja joda dodaje se ostatak volumena deionizirane vode. Tako pripremljenu otopinu potrebno je zaštititi od utjecaja svjetla [52].

#### **3.1.7.3. Otopina octene kiseline, HAc**

Razrijeđena otopina octene kiseline množinske koncentracije  $c(\text{HAc}) = 4,76 \text{ mol L}^{-1}$  pripravlja se miješanjem 28,6 mL ledene octene kiseline s deioniziranom vodom do volumena od 100 mL u odmjernoj tikvici [52].

#### **3.1.7.4. Otopina klorovodične kiseline, HCl**

Razrijeđena otopina HCl koncentracije  $c(\text{HCl}) = 1,63 \text{ mol L}^{-1}$  pripravlja se miješanjem 17 mL 35 % HCl-a s deioniziranom vodom do volumena od 100 mL u odmjernoj tikvici [52].

### 3.1.7.5. Otopina škroba

2 g škroba otopi se u 100 mL vruće deionizirane vode i hlađenjem se otopina izbistri  $\{w(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n = 20 \% \text{ m/m}\}$  [52].

### 3.1.7.6. Standardizacija otopine joda, I<sub>2</sub>

Standardizacija se temelji na sljedećoj redoks-reakciji:



Otopina joda priprema se na način da se u 20 mL otopine I<sub>2</sub>  $\{c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}\}$  dodaje 1 mL razrijeđene HAc i 30 mL destilirane vode. Vršiti se titracija tako pripremljene otopine sa standardnom otopinom tiosulfata  $\{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}\}$ . 1 mL otopine škroba koristi se kao indikator završne točke titracije [52].

### 3.1.8. Uređaji i instrumenti korišteni tijekom laboratorijskog rada

FIA sustav sastavljen je od sljedećih dijelova:

- Peristaltička crpka s osam provodnih kanala Ismatec IPC (Ismatec, Zurich, Švicarska);
- Politetrafluoretilenske cjevčice za prijenos otopina (promjera 1,30 mm), stjecište i petlja;
- Protočna kvarcna kiveta volumena 30 μL i optičkog puta 1 cm;
- Dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan); izvor zračenja spektrofotometra je volframova žarulja koja pokriva spektar vidljivog područja elektromagnetskog zračenja, selektor valnih duljina je monokromator izveden kao difrakcijska rešetka, a detektor je fotomultiplikator;
- osobno računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 483 nm.

Podaci mjerenja su praćeni, bilježeni i obrađivani u programu GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) u kojem su izrađene krivulje umjeravanja i provedena je analiza podataka i rezultata mjerenja. Također je korišten i Microsoft Office Excel za izradu grafova i obradu podataka.



Za podešavanje pH vrijednosti otopina pufera uz dodatak natrijevog hidroksida korišten je Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) sa staklenom elektrodom Mettler Toledo InLab®.

Za dodavanje preciznih volumena otopinama analita i reagensa korištene su mikropipete (Sartorius, Gottingen, Njemačka) (Slika 21.)



Slika 21. Pipete korištene tijekom laboratorijskog rada

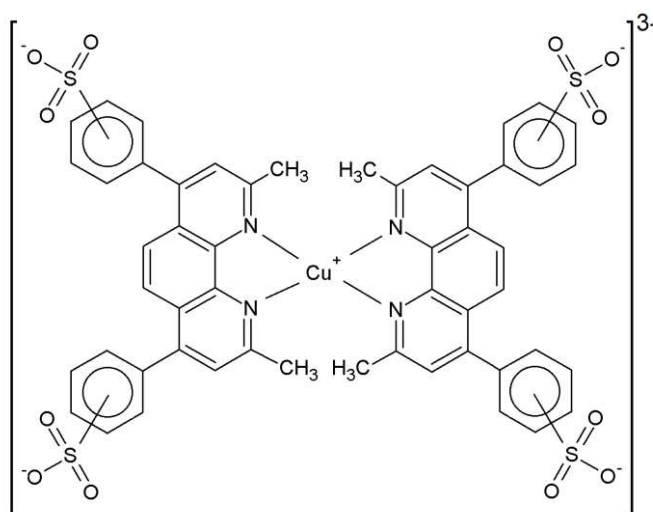
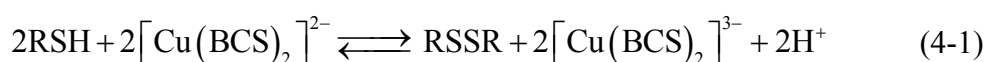


Slika 22. Laboratorijska oprema i instrumentacija FIA sustava za metodu određivanja tiopronina

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Reakcija na kojoj se temelji metoda

Predložena metoda analize injektiranjem u protok za određivanje tiopronina zasniva se na redoks reakciji u kojoj tiopronin (MPG) reducira kompleks bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) (žućkaste boje) pri čemu nastaje produkt bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) (žuto-narančaste boje), pri čemu se MPG oksidira. Apsorpcijski maksimum nastalog produkta bis(batokuproindisulfonato)kuprata(I) mjereno je pri valnoj duljini od 483 nm korištenjem spektrofotometrijskog detektora. Reakcija je prikazana sljedećom jednačinom:



Slika 23. Prikaz strukture bis(batokuproindisulfonato)kuprata(I)

#### 4.2. Optimizacija parametara FIA sustava

Tijekom razvoja metode optimizirani su sljedeći kemijski parametri: pH-vrijednost reakcijskog medija i molni omjer reagensa  $c(\text{BCS}) : c(\text{Cu}^{2+})$ . Parametri protočnog sustava optimizirani su sljedećim redoslijedom: volumen protočne kivete ( $V_\lambda$ ), volumni protok osnovne otopine ( $Q_{CS}$ ), volumni protok otopine reagensa ( $Q_{RS}$ ), volumen injektiranja otopine analita ( $V_i$ ), duljina reakcijske uzvojnice ( $l$ ).

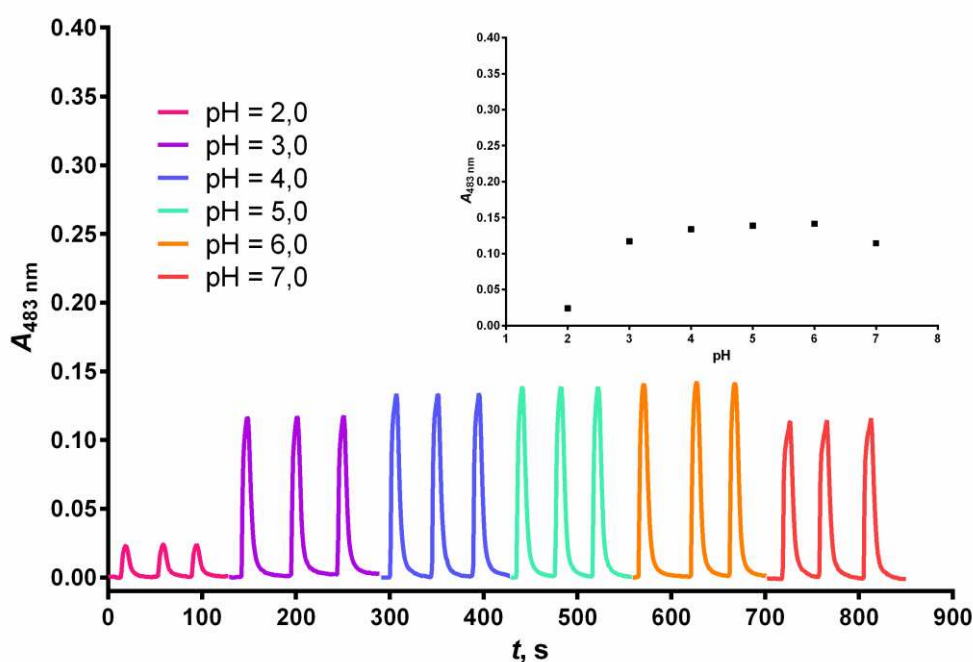
Korištena je univarijantna metoda optimizacije pri čemu se tijekom jednog ciklusa mjerenja iskustveno odabire varijabla koju se optimizira, dok se ostale drže konstantnima. Zatim se u sljedećim ciklusima mjerenja optimiziranu varijablu drži pri optimiziranoj vrijednosti dok se ostale jedna po jedna optimiziraju jednakim principom. Cilj optimizacije

jest postizanje kompromisa između osjetljivosti metode i učestalosti analiza. Izabrane optimalne vrijednosti varijabli morale bi omogućiti zadovoljavajuću: ponovljivost analitičkog signala, osjetljivost metode, povrat signala na baznu liniju te učestalost analiza [53].

Varijabla čiji utjecaj tijekom metode nije ispitivan te nije optimizirana jest temperatura sustava pri kojoj se reakcija izvodi. Termostatiranje FIA sustava nije jednostavno izvedivo budući da bi se svi dijelovi sustava trebali zasebno temperirati, a povišenje temperature u protočnom sustavu može izazvati isplinjavanje, te bi nastali mjehurići remetili signal, stoga je radi praktičnosti eksperiment proveden pri sobnoj temperaturi od 25 °C [53].

#### 4.2.1 Optimizacija pH-vrijednosti

Kao analit korištena je standardna otopina MPG,  $c(\text{MPG}) = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Reagens je pripremljen miješanjem otopine bakra  $V(\text{Cu}^{2+}; c = 8 \times 10^{-3} \text{ M}) = 1,0 \text{ mL}$ , BCS-a  $V(\text{BCS}; c = 2 \times 10^{-3} \text{ M}) = 4,0 \text{ mL}$  i acetatno-boratno-fosfatnog pufera volumena 20 mL raspona pH vrijednosti od 2 do 7. Kao osnovna otopina u svim mjerenjima korištena je deionizirana voda.



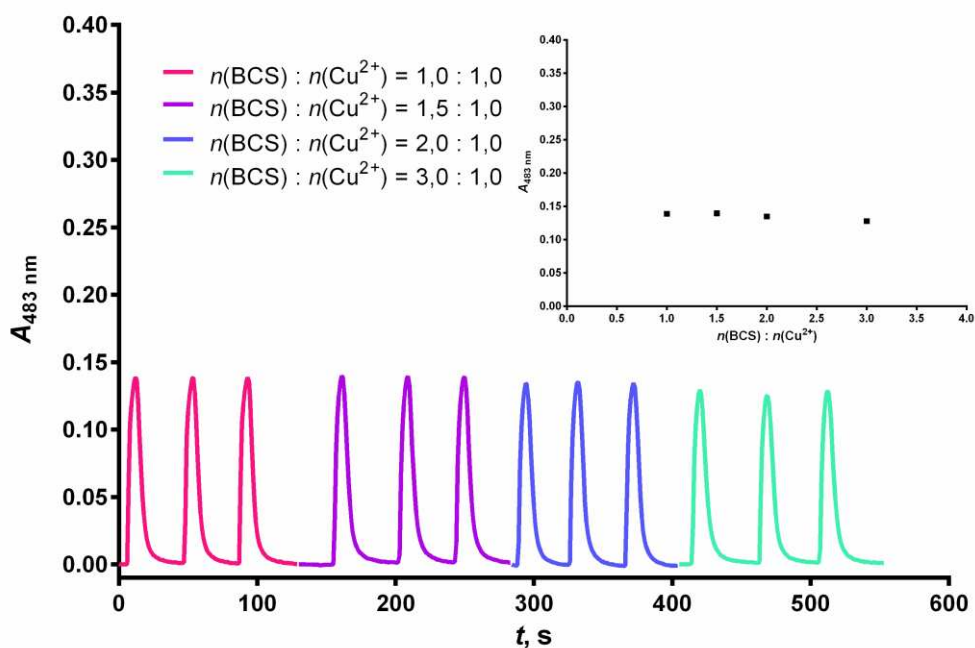
**Slika 24.** Fiagram optimizacije pH-vrijednosti. pH-vrijednosti: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete = 160  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o pH-vrijednosti.

#### 4.2.2. Optimizacija molnog omjera reagensa BCS i Cu<sup>2+</sup>

Kao analit korištena je standardna otopina MPG,  $c(\text{MPG}) = 4 \times 10^{-5}$  M. Otopina reagensa pripravljena je na način da je koncentracija Cu<sup>2+</sup> održavana stalnom, a koncentracija BCS-a se mijenjala kao i volumen pufera kako bi ukupan volumen otopine reagensa bio 25 mL. Otopine odgovarajućih omjera BCS i Cu<sup>2+</sup> pripravljene su iz polaznih otopina BCS i Cu<sup>2+</sup> koncentracija  $c(\text{BCS}) = 2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> i  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Korišten je acetatni pufer pH-vrijednosti 5 odabran optimizacijom pH-vrijednosti opisanom u dijelu 4.2.1.

**Tablica 1.** Optimizacije molnog omjera BCS i Cu<sup>2+</sup> te volumeni i koncentracije korištenih otopina (M = mol L<sup>-1</sup>).

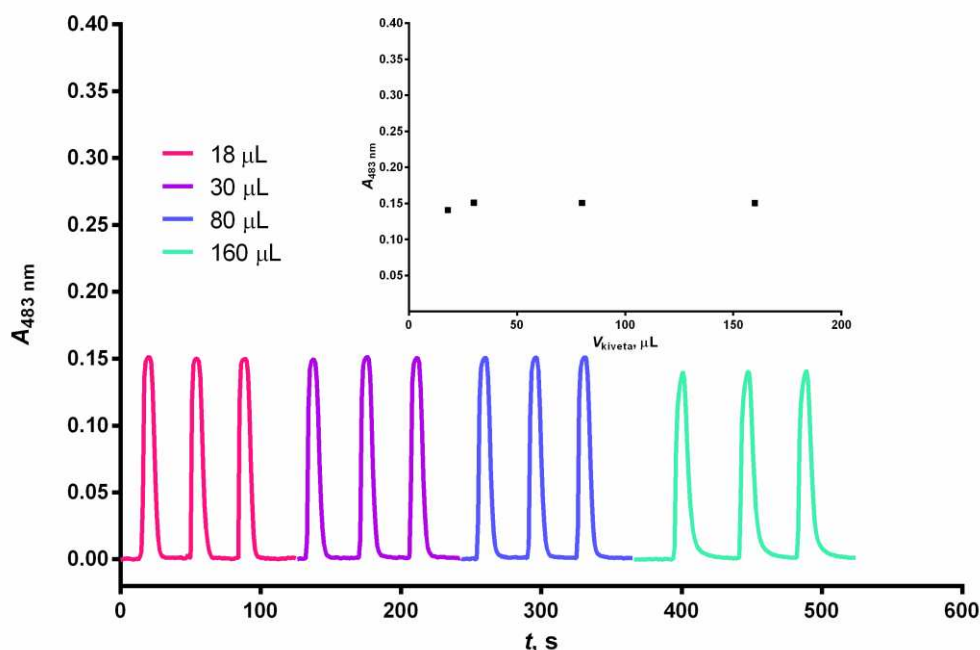
omjer	$c(\text{BCS}), \text{M}$	$c(\text{Cu}^{2+}), \text{M}$	$V(\text{Cu}^{2+}), \text{mL}$	$V(\text{BCS}), \text{mL}$	$V(\text{Ac-pufer}), \text{mL}$
1,0 : 1,0	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	4,0	20,0
1,5 : 1,0	$4,8 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	6,0	18,0
2,0 : 1,0	$6,4 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	8,0	16,0
3,0 : 1,0	$9,6 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	12,0	12,0



**Slika 25.** Fiagram optimizacije molnog omjera BCS i Cu<sup>2+</sup>. Molni omjer,  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1,0:1,0; 1,5:1,0; 2,0:1,0; 3,0:1,0$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>;  $Q_{\text{CS}} = 6,0$  mL min<sup>-1</sup>;  $Q_{\text{RS}} = 6,0$  mL min<sup>-1</sup>;  $V_i = 500$   $\mu\text{L}$ ;  $l = 40$  cm; volumen protočne kivete = 160  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483$  nm;  $t = 25$  °C; pH = 5,0. Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o molnom omjeru Cu<sup>2+</sup> i BCS.

### 4.2.3. Optimizacija volumena protočne kivete; $V_\lambda$

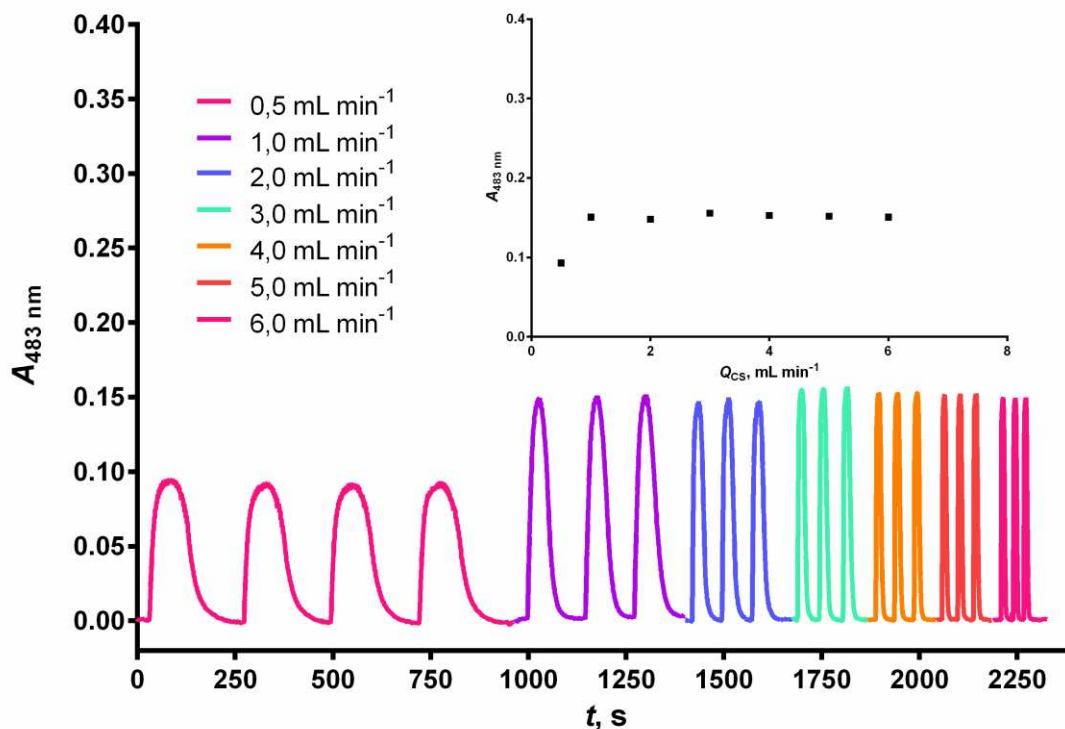
Kao analit korištena je standardna otopina MPG,  $c(\text{MPG}) = 4 \times 10^{-5}$  M. Ukupni volumen otopine reagensa od 25 mL dobiven je miješanjem 1 mL  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \times 10^{-3}$  M i 4 mL BCS,  $c(\text{BCS}) = 2 \times 10^{-3}$  M (molni omjer  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ) uz dodatak 20 mL acetatnog pufera pH-vrijednosti 5. Ispitani su slijedeći volumeni protočnih kiveta: 18, 30, 80, 160  $\mu\text{L}$ .



**Slika 26.** Diagram optimizacije volumena protočne kivete kod određivanja MPG-a. Volumen protočne kivete: 18, 30, 80, 160  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0$  mL  $\text{min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0$  mL  $\text{min}^{-1}$ ;  $V_i = 500$   $\mu\text{L}$ ;  $l = 40$  cm;  $\lambda = 483$  nm;  $t = 25$  °C; pH = 5,0. Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumenu protočne kivete.

### 4.2.4. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine; $Q_{\text{CS}}$

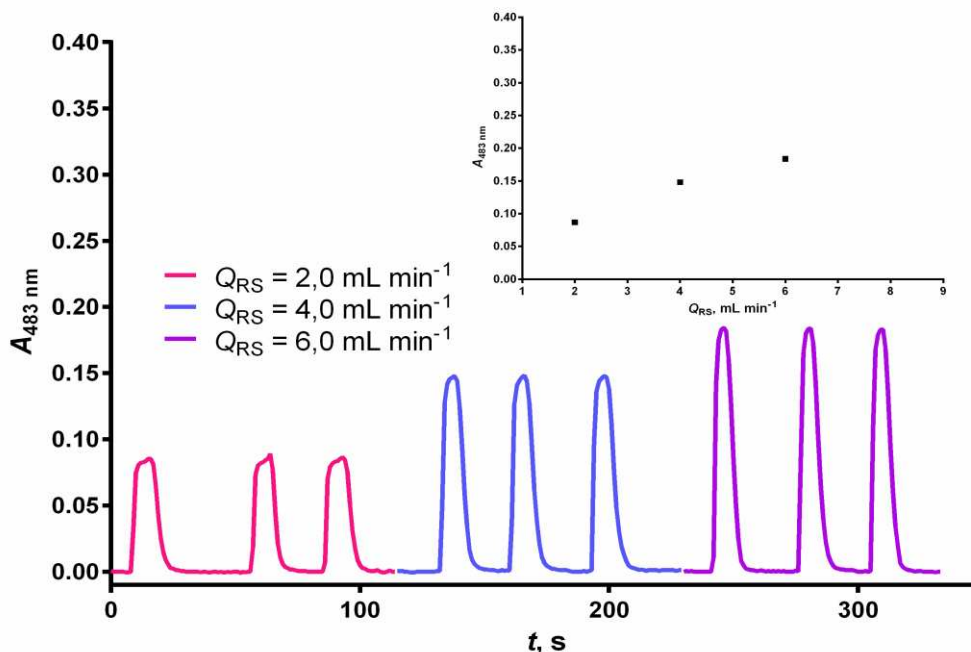
Otopine reagensa i analita pripravljene su na jednak način kao u poglavlju 4.2.3. Za osnovnu otopinu korištena je deionizirana voda. Volumni protok otopine ispitan je u rasponu od 0,5 do 6,0 mL  $\text{min}^{-1}$ .



**Slika 27.** Diagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine. Volumni protok osnovne otopine,  $Q_{CS}$ : 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{RS} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5,0$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumnom protoku osnovne otopine.

#### 4.2.5. Optimizacija volumnog protoka otopine reagensa; $Q_{RS}$

Za osnovnu otopinu korištena je deionizirana voda. Utjecaj volumnog protoka otopine reagensa,  $Q_{RS}$  ispitan je u području od 2,0 do 6,0  $\text{mL min}^{-1}$  pomoću cjevčica različitog unutarnjeg promjera: *orange / white* 0,64 mm, *white / white* 1,02 mm te *gray / gray* 1,30 mm pri konstantnoj brzini crpke 6  $\text{mL min}^{-1}$ . Time su postignuta tri različita volumna protoka otopine reagensa: 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  (uz cijev *orange / white*), 4,0  $\text{mL min}^{-1}$  (uz cijev *white / white*) te 6,0  $\text{mL min}^{-1}$  (uz cijev *gray / gray*).

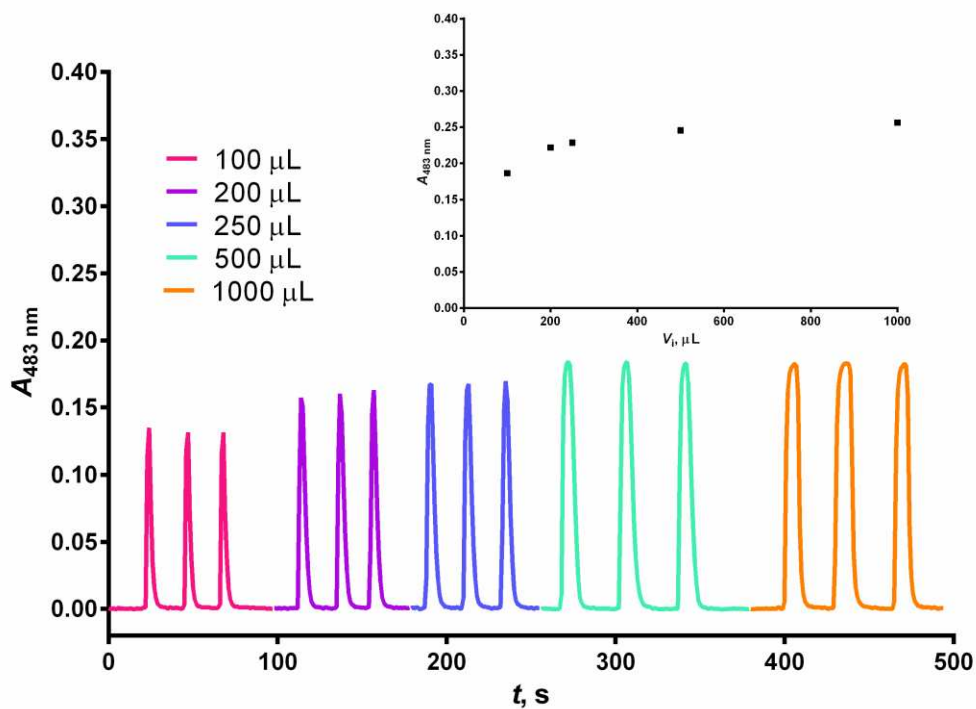


**Slika 28.** Diagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa. Volumni protok osnovne otopine,  $Q_{RS}$ : 2,0, 4,0, 6,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{CS} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5,0$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumnom protoku otopine reagensa.

#### 4.2.6. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita; $V_i$

Za osnovnu otopinu korištena je deionizirana voda. Volumen injektiranja otopine analita ispitan je u području od 100 do 1000  $\mu\text{L}$ . Većim volumenom injektiranog analita nastoji se postići viši signal, ali ujedno može doći i do smanjenja broja analiza zbog duljeg vremena povratka na baznu liniju, pa je potrebno ostvariti kompromis pri odabiru optimalne veličine ovog parametra. Nadalje, nakon određenog volumena analita dolazi do zasićenja, a može doći i do tzv. dvostrukih pikova zbog nemogućnosti difuzije zone reagensa u zonu uzorka.

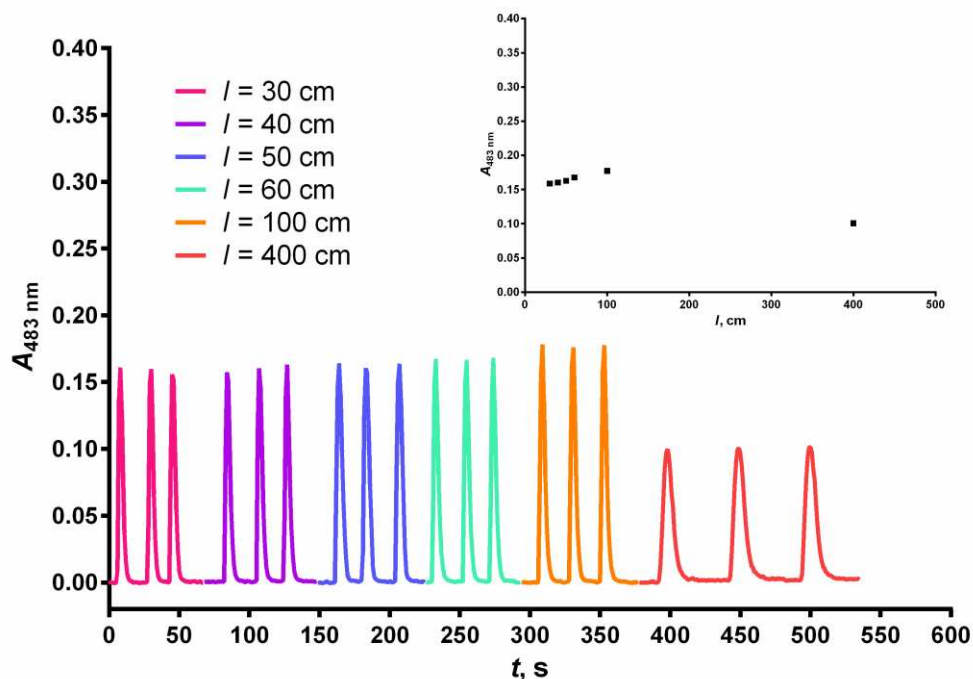




**Slika 29.** Diagram optimizacije volumena injektiranja otopine analita. Volumen injektiranja,  $V_i$ : 100, 200, 250, 500, 1000  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5,0$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumenu injektiranja otopine analita.

#### 4.2.7. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice; $l$

Za osnovnu otopinu korištena je deionizirana voda. Parametar je ispitan reaktorima raspona dužina od 30 do 400 cm. Dulja uzvojnica omogućuje veću potpunost odvijanja reakcije, ali može dovesti do raspršenja zone uzorka i snižavanja signala.



**Slika 30.** Fiagram optimizacije duljine reaktorske uzvojnice. Duljina reaktorske uzvojnice,  $l$ : 30, 40, 50, 60, 100, 400 cm. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{MPG}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 200 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5,0$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o duljini reaktorske uzvojnice

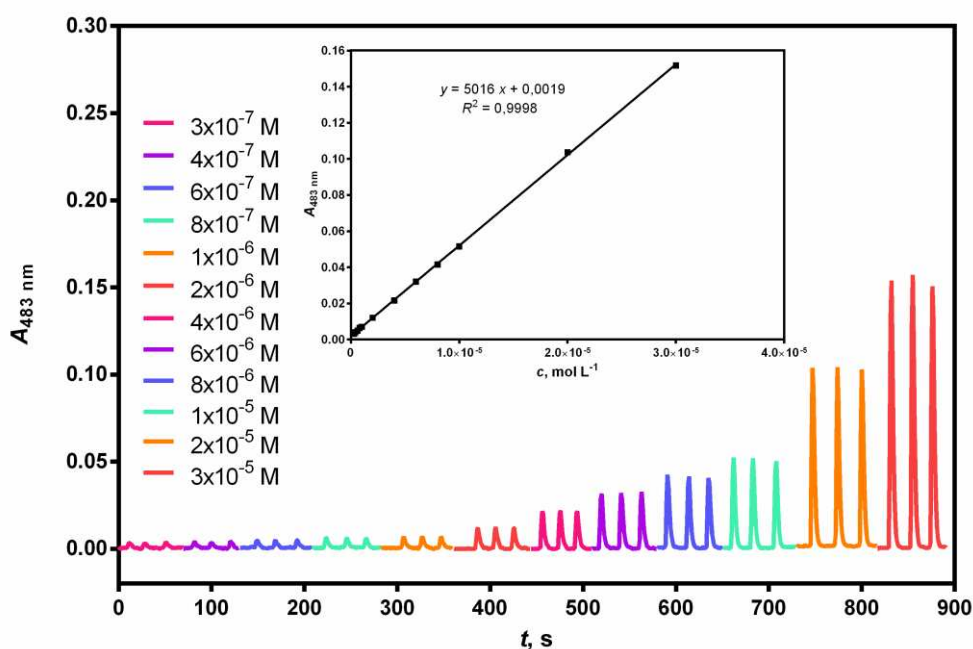
**Tablica 2.** Raspon ispitanih parametara i izbor optimalnih uvjeta

Parametri	Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
pH-vrijednost	2,0-7,0	5,0
Molni omjer BCS i $\text{Cu}^{2+}$ , $n(\text{BCS})$ : $n(\text{Cu}^{2+})$	1,0 : 1,0 – 3,0 : 1,0	1,0 : 1,0
Volumen protočne kivete	18 – 160 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
Volumni protok osnovne otopine, $Q_{\text{CS}}$	0,5 – 6,0 $\text{mL min}^{-1}$	6,0 $\text{mL min}^{-1}$
Volumni protok otopine reagensa, $Q_{\text{RS}}$	2,0 – 6,0 $\text{mL min}^{-1}$	6,0 $\text{mL min}^{-1}$
Volumen injektiranja otopine analita, $V_i$	100 – 1000 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Duljina reaktorske uzvojnice, $l$	30 – 400 cm	60 cm

### 4.3. Analitičke karakteristike metode

#### 4.3.1. Linearno dinamičko područje (LDP) i krivulja umjeravanja

Na temelju prethodno optimiziranih parametara (Tablica 2.) provedena su mjerenja niza standardnih otopina tiopronina točno poznatog raspona koncentracija. Svaki uzorak otopine mjeren je u triplikatu i zabilježene su pojedinačne apsorbancije te je iz njih izračunata srednja vrijednost apsorbancije za svaki pojedini uzorak. Na temelju dobivenih rezultata u Microsoft Office Excelu izrađena je krivulja umjeravanja. Linearan raspon koncentracija je  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  uz koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9998$  i jednadžbu pravca  $y = 5016 x + 0,0019$  (Slika 31.).



**Slika 31.** Fiagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a. Koncentracijski raspon MPG-a u LDP-u: od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 200 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $l = 60 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5,0$ . Umetak: Grafički prikaz linearnog dinamičkog područja određivanja MPG-a.

#### 4.3.2. Granica određivanja i granica dokazivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) najniža je koncentracija analita koja se može kvalitativno dokazati u određenom uzorku [54]. Računski se dobiva na sljedeći način:

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

Granica određivanja (engl. *Limit of quantification*, LOQ) najniža je koncentracija analita čija se vrijednost može kvantitativno odrediti, a ujedno je i donja granica LDP-a [54]. Računski se dobiva sljedećim izrazom:

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

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

Standardna devijacija slijepe probe u ovom eksperimentalnom radu iznosi 0,000219, a nagib pravca je 5016. Posljedično tome, izračunane su LOD i LOQ navedene metode. LOD =  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> i LOQ =  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, što odgovara eksperimentalno određenoj najnižoj točki linearnog dinamičkog područja.

#### 4.4 Točnost metode

Točnost metode upućuje na slaganje između rezultata i prave vrijednosti [55]. Točnost (iskoristivost) metode ispitana je pomoću pet radnih otopina koje su pripravljene dodavanjem određene koncentracije standardne otopine MPG-a u otopinu realnog uzorka. Prilikom ispitivanja korištene su tablete CAPTIMER® 100 mg. Izmjerena apsorbancija uvrštena je u jednadžbu pravca i izračunata je koncentracija, a zatim i masa MPG-a u otopinama, koja je potom uspoređena s teorijskom masom.

Otopina realnog uzorka pripravljena je otapanjem jedne CAPTIMER® tablete u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera uz dodavanje deionizirane vode u odmjernu tikvicu do oznake od 500 mL. Dobivena je koncentracija otopine  $c = 1,23 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Razrjeđenje otopine postignuto je na način da je alikvot od 1 mL prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL uz dodatak deionizirane vode do oznake. Konačno dobivena koncentracija otopine realnog uzorka iznosila je  $1,23 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

Otopina standarda pripravljena je otapanjem 10 mg standarda tiopronina u 10 mL acetatno-fosfatno-boratnog pufera uz dodavanje deionizirane vode u odmjernu tikvicu do oznake od 50 mL. Dobivena je koncentracija otopine  $c = 1,23 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Konačno dobivena koncentracija otopine standarda,  $c = 1,23 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, dobivena je razrjeđenjem uz jednak postupak kao i pri pripravi prethodno opisane otopine realnog uzorka.

Pet radnih otopina ( $A_{\text{mix}}$  -  $E_{\text{mix}}$ ) pripravljene su kako slijedi u Tablici 3. uz dodatak deionizirane vode do 10 mL.

**Tablica 3.** Pripravljjanje radnih otopina

Radna otopina	$V(\text{uzorka}),$ mL	$c(\text{uzorak}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$V(\text{otopine}$ $\text{standarda}),$ mL	$c(\text{otopine}$ $\text{standarda}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$V(\text{ukupni}),$ mL	$c(\text{ukupni}),$ mL
$A_{\text{mix}}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	-	-	10,0	$1,23 \times 10^{-6}$
$B_{\text{mix}}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	0,5	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$1,85 \times 10^{-6}$
$C_{\text{mix}}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$2,46 \times 10^{-6}$
$D_{\text{mix}}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	1,5	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$3,08 \times 10^{-6}$
$E_{\text{mix}}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	2,0	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$3,69 \times 10^{-6}$

Iskoristivost metode ispitana je na način da je svaka otopina mjerena u triplikatu pri čemu su zabilježene pojedinačne apsorbancije te je iz njih izračunana srednja vrijednost apsorbancije za pojedinu radnu otopinu. Uvrštavanjem iznosa apsorbancije u jednadžbu pravca  $y = 5016x + 0,0019$ , izračunane su stvarna koncentracija MPG-a te eksperimentalna masa koja je uspoređena sa teorijskom masom MPG-a.

**Tablica 4.** Ispitivanje iskoristivosti metode

Radna otopina	Masa analita (realni uzorak), mg	Dodana masa analita (standard), mg	Ukupna teorijska masa, mg	Izračunata masa, mg	Iskoristivost, %
$A_{\text{mix}}$	100	-	100	100,40	-
$B_{\text{mix}}$	100	50	150	151,11	100,74
$C_{\text{mix}}$	100	100	200	192,12	96,06
$D_{\text{mix}}$	100	150	250	244,45	97,78
$E_{\text{mix}}$	100	200	300	289,26	96,42

#### 4.5. Utjecaj interferencija

Pri koncentraciji tiopronina od  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> provedeno je ispitivanje utjecaja interferirajućih vrsta od kojih su mnoge česte kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Ispitivane tvari su pripravljene u početnim koncentracijama 500 puta većima od koncentracije tiopronina, izuzev acetilsalicilne kiseline koja je pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i tiopronin.

Granica tolerancije definira se kao koncentracija interferencije koja će prilikom mjerenja pokazati pogrešku manju od  $\pm 5$  %. Računa se prema navedenom izrazu:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4-4)$$

Apsorbancija tiopronina pri 483 nm iznosi 0,1030.

Mjerenja su ponovljena u manjem omjeru prema analitu za one tvari koje su pokazale pogrešku veću od  $\pm 5\%$ . Čak i pri smanjenju koncentracija interferirajućih tvari, one su i dalje mnogo veće od onih koje su prisutne u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

**Tablica 5.** Utjecaj interferirajućih tvari

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija [Tvar] : [MPG]	Apsorbancija pri 483 nm	Relativna pogreška, %
Glukoza	500 : 1	0,0998	-3,11
Fruktoza	500 : 1	0,1024	-0,58
KNO <sub>3</sub>	500 : 1	0,1046	1,55
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500 : 1	0,1045	1,46
Laktoza	10 : 1	0,1244	20,78
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 : 1	0,1075	4,37
Saharoza	10 : 1	0,1243	20,70
Vinska kiselina	500 : 1	0,0916	-11,07
Limunska kiselina	500 : 1	0,086	-16,50
Natrijev citrat	500 : 1	0,1003	-2,62
Acetilsalicilna kiselina	1 : 1	0,0929	-9,81

#### 4.6. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala) i doseg reakcije

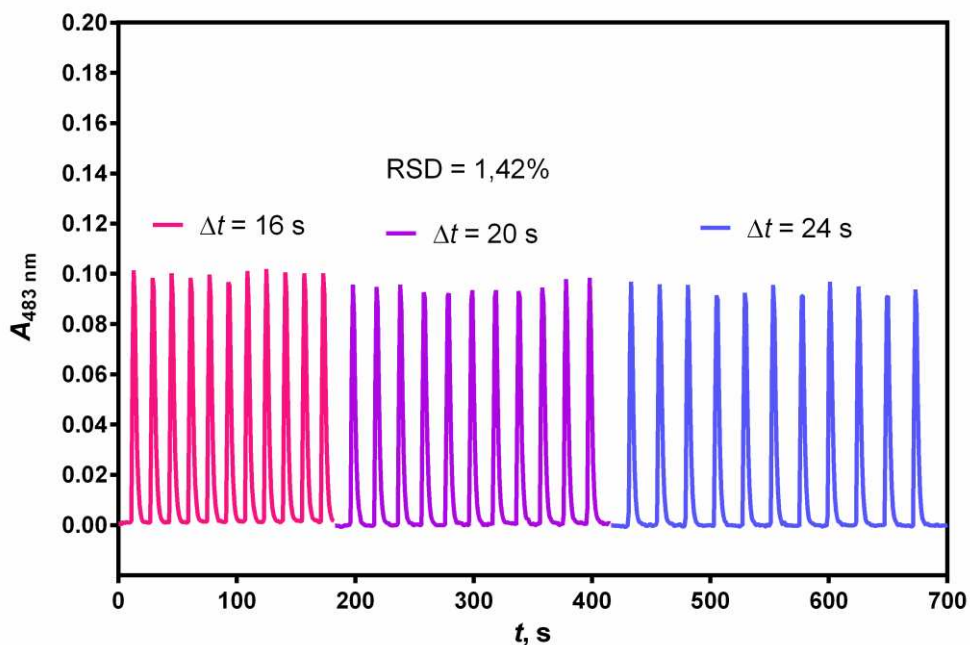
Preciznost opisuje slaganje više eksperimentalnih rezultata dobivenih jednakim postupkom analize (isti uzorak, sustav, uvjeti rada i analitičar) [55]. U svrhu određivanja preciznosti razvijene FIA metode ispitane su njezina ponovljivost, učestalost analize i prenošenje signala.

Ponovljivost je ispitana uzastopnim injektiranjem standardne otopine MPG-a ( $c(\text{MPG}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), a izražava se relativnim standardnim odstupanjem (RSD). Pomoću standardnog odstupanja svih visina signala i medijana visina signala određeno je relativno standardno odstupanje (RSD) koje iznosi 1,42 %.

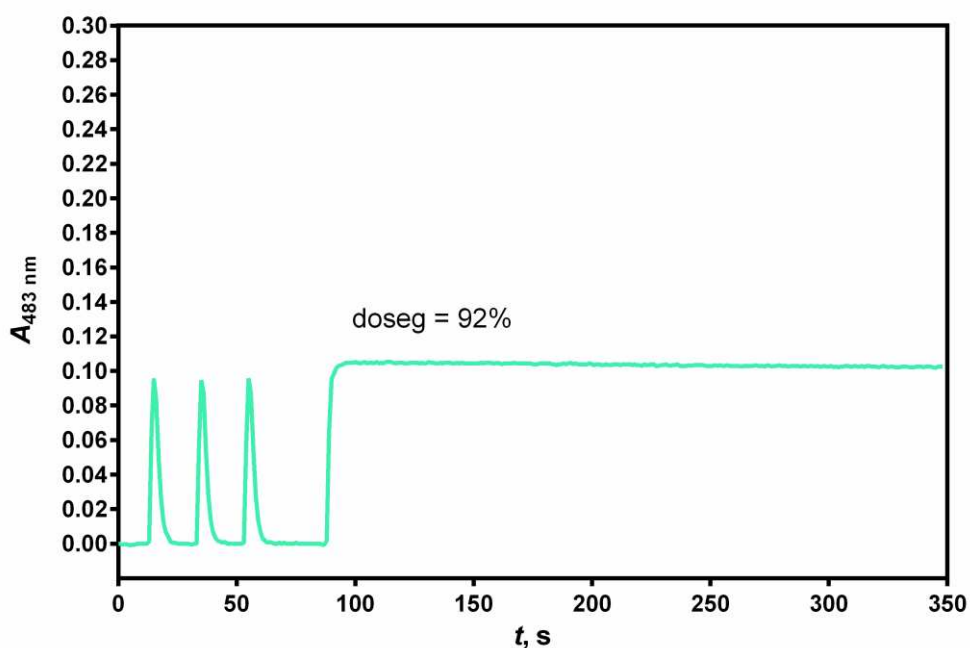
Na temelju ponovljivosti signala razvijene FIA metode, ispitana je i učestalost analiza unutar sat vremena. Injektiranjem standardne otopine MPG-a ( $c(\text{MPG}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u različitom vremenu, (svakih 16, 20 i 24 sekundi) pratila se visina signala i njegov povratak na baznu liniju. Potrebno je prosječno 60 sekundi ( $\Delta t = 20 \text{ s}$ ) za analizu jednog uzorka (tri mjerenja). Stoga, moguće je 60 analiza u triplicatu za vrijeme od jednog sata (3600 sekundi), odnosno 180 analiza na sat.

Doseg (potpunost) reakcije ispitan je zaustavljanjem protoka  $Q$  u trenutku kada je visina signala postigla maksimalnu vrijednost (engl. *Stop Flow*). Na ovaj način zaustavljen je prijenos tvari konvekcijom i ukupni proces disperzije zone uzorka, uz još uvijek prisutan, ali neznatan proces difuzije između molekula [56]. Doseg ove reakcije iznosi 92 %.

Ponovljivost, učestalost i doseg reakcije ispitani su pri optimiziranim kemijskim i protočnim parametrima (Tablica 2).



**Slika 32.** Fiagram ispitivanja ponovljivosti i učestalosti analize

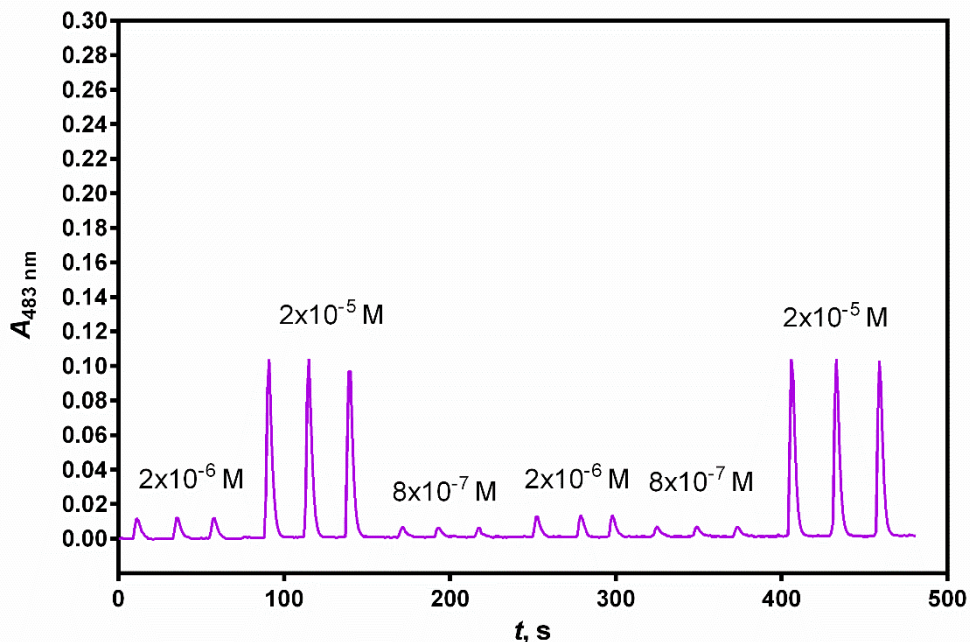


**Slika 33.** Fiagram ispitivanja dosega reakcije

Prenošenje signala (engl. *Carryover*) ispitano je naizmjeničnim injektiranjem različitih koncentracija MPG-a u triplikatu. Provjeravano je utječe li prethodna koncentracija analita na visinu signala sljedećeg uzorka, ima li naglih promjena u rezultatima i vraća li se signal uredno na baznu liniju.



Koncentracije injektiranih uzoraka tiopronina bile su kako slijedi:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  i  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (M = mol L<sup>-1</sup>). Prenošenje signala ispitano je pri optimiziranim kemijskim i protočnim parametrima (Tablica 2).



Slika 34. Fiagram ispitivanja prenošenja signala

#### 4.7. Analiza realnog uzorka

Za pripremu otopine realnog uzorka korištene su tablete Captimer® od 100 mg. Otopina koncentracije  $c = 1,23 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> pripravljena je kako je opisano u poglavlju 4.4. Izmjerene su apsorbancije uzorka injektiranjem u triplicatu.

Tablica 6. Apsorbancije pripremljenih otopina realnog uzorka

Uzorak	A
1.	0,0646
2.	0,0632
3.	0,0625

Izračunata je srednja vrijednost apsorbancija koja iznosi 0,0634. U daljnjem proračunu srednja vrijednost apsorbancije uvrštena je u jednadžbu pravca  $y = 5016 x + 0,0019$  čime je izračunata koncentracija MPG-a.

$$y = 5016 x + 0,0019 \quad (4-5)$$

$$0,0634 = 5016 \times c_2(\text{MPG}) + 0,0019$$

$$c_2(\text{MPG}) = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

Koncentracija MPG-a u 100 mL iznosi:

$$c_l(\text{MPG}) \times 1 \text{ mL} = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 100 \text{ mL}$$

$$c_l(\text{MPG}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Masa MPG-a izračunata je na sljedeći način:

$$n = c \times V = \frac{m}{M} \quad (4-6)$$

$$m(\text{MPG}) = c_l(\text{MPG}) \times V \times M(\text{MPG})$$

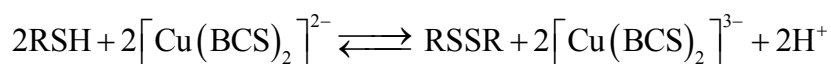
$$m(\text{MPG}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 0,5 \text{ L} \times 163,20 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(\text{MPG}) = 0,1004 \text{ g} = 100,4 \text{ mg}$$

U CAPTIMER® tabletama deklarirana masa tiopronina je 100 mg, a pomoću razvijene i optimizirane FIA metode dobivena vrijednost mase tiopronina realnog uzorka CAPTIMER® tablete je 100,4 mg.

## **5. RASPRAVA**

Ciljevi eksperimentalnog dijela ovog rada bili su razvoj i vrednovanje metode određivanja tiopronina analizom injektiranjem u protok (FIA) uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj tiopronin reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) u žuto-narančasto obojeni spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) pri čemu se sam oksidira. Apsorbancija nastalog spoja bilježena je uz pomoć spektrofotometrijskog detektora pri valnoj duljini od 483 nm.



Tijekom razvoja metode optimizirani su kemijski parametri pH-vrijednost i molni omjer reagensa  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$  kao i protočni parametri sustava: volumen protočne kivete, volumni protok osnovne otopine, volumni protok otopine reagensa, volumen injektiranja otopine analita i duljina reakcijske uzvojnice. Za optimizaciju parametara korištena je univarijantna metoda pri čemu je u jednom ciklusu mjerenja optimiziran pojedini parametar uz održavanje ostalih pri konstantnim vrijednostima. Za temperaturne uvjete izvođenja reakcije radi praktičnosti odabrana je sobna temperatura od 25°C.

Utjecaj pH-vrijednosti ispitan je u rasponu od 2,0 do 7,0 korištenjem acetatno-boratno-fosfatnog pufera za pripremu otopina reagensa. Iako tiolni spojevi pokazuju veću stabilnost pri nižim pH-vrijednostima, kao optimalna vrijednost izabrana je pH vrijednost 5,0 jer je signal pokazao višu i stabilniju vrijednost u odnosu na signale nižih pH-vrijednosti te je postignuta zadovoljavajuća osjetljivost.

Molni omjer reagensa ispitan je na način da su pripravljene otopine reagensa sadržavale BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  u omjerima 1,0:1,0, 1,5:1,0, 2,0:1,0 i 3,0:1,0. Koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  bila je konstantna dok se koncentracija BCS-a mijenjala od  $3,2 \times 10^{-4}$  do  $9,6 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Za pripremu otopina reagensa korišten je acetatni pufer pH-vrijednosti 5, jer za razliku od trokomponentnog acetatno-boratno-fosfatnog pufera ima manje mogućnosti interferencija. Mjerenjem signala dobivene su najviše vrijednosti pri omjeru BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  1,0:1,0 i 1,5:1,0 pa je zbog neznatnih razlika u visini signala i zbog manjeg utroška volumena reagensa odabran omjer 1,0:1,0 kao optimalan.

Od protočnih parametara FIA sustava prvo je optimiziran volumen protočne kivete raspoloživih volumena: 18, 30, 80 i 160 µL. Zbog neznatnih razlika u visini signala odabran je volumen protočne kivete od 30 µL čime se dodatno doprinosi i minijaturizaciji FIA sustava.

Volumni protok osnovne otopine ispitan je u području od 0,5 do 6 mL min<sup>-1</sup>. Povećanje brzine protoka može povećati broj analiza, ali ujedno i smanjiti osjetljivost metode pa je pri izboru optimalne vrijednosti navedenog parametra potrebno postići kompromis između zadovoljavajuće osjetljivosti i broja analiza. Odabrana vrijednost volumnog protoka osnovne otopine je 6,0 mL min<sup>-1</sup> jer je postignut veći broj analiza uz uže osnovice koncentracijskih gradijenata (pikova), a pri tom je ostala očuvana i osjetljivost metode.

Sljedeći optimizirani parametar bio je volumni protok otopine reagensa. Pomoću cijevčica različitog unutarnjeg promjera postignuta su tri različita protoka: 2,0, 4,0 i 6,0 mL min<sup>-1</sup>. Uz porast volumnog protoka otopine reagensa zabilježen je značajni porast apsorbancije pa je zbog najvećeg i najstabilnijeg signala izabran protok od 6,0 mL min<sup>-1</sup> uz cijevčice *gray/gray* kao optimalni parametar.

Volumen injektiranja standardne otopine analita ispitan je u području od 100 do 1000 μL pomoću različitih volumena petlje injekcijskog ventila. Uzimajući u obzir da veći volumeni injektiranja povećavaju visinu signala i osjetljivost metode, ali također smanjuju broj analiza, kompromis je postignut odabirom volumena od 200 μL. Pri većim volumenima injektiranja signal je bio nešto viši, ali je i njegov povratak na baznu liniju bio znatno sporiji zbog čega odabrani parametar od 200 μL omogućuje optimalan broj analiza uz manji utrošak volumena analita i zadovoljavajuću osjetljivost metode.

Utjecaj duljine reakcijske uzvojnice ispitan je reaktorima raspona dužina od 30 do 400 cm. Duža uzvojnica omogućuje veću potpunost reakcije, ali može dovesti i do raspršenja zone uzorka i opadanja signala. Zbog neznačajnih razlika u promjeni visine signala uzvojnica od 30 do 60 cm, odabrana je optimalna vrijednost uzvojnice od 60 cm čime je postignut stabilni signal zadovoljavajuće visine i dodatno se doprinosi minijaturizaciji sustava u odnosu na izbor uzvojnica većih duljina.

Nakon optimizacije navedenih parametara FIA sustava mjerenjem apsorbancije niza standardnih otopina određeno je linearno dinamičko područje (LDP). Raspon koncentracija pri kojima je zabilježena linearna ovisnost signala o koncentraciji analita iznosio je od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Određena je i jednadžba pravca  $y = 5016 x + 0,0019$  gdje je  $y$  vrijednost apsorbancije čijim se uvrštavanjem može odrediti vrijednost  $x$ , odnosno koncentracija tiopronina (MPG) u uzorku. Koeficijent linearne regresije ovako razvijene metode iznosi  $R^2 = 0,9998$ . Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) izračunane su pomoću vrijednosti standardne devijacije slijepe probe i nagiba pravca. Granica

određivanja u skladu je s donjom granicom linearnog dinamičkog područja i iznosi  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, dok granica dokazivanja iznosi  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

Nakon optimizacije parametara razvijene FIA metode provedeno je njezino vrednovanje ispitivanjem točnosti, utjecaja interferencija, preciznosti i dosega reakcije.

Točnost metode ispitana je određivanjem iskoristivosti na način da je pripremljeno pet radnih otopina miješanjem određenih volumena otopina realnog uzorka tiopronina i standardne otopine tiopronina. Raspon koncentracija tako pripremljenih radnih otopina kretao se od  $1,23 \times 10^{-6}$  do  $3,69 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Mjerenjem apsorbancije svih otopina i njihovim uvrštavanjem u jednadžbu pravca izračunane su stvarna koncentracija MPG-a i eksperimentalna masa koja je uspoređena sa teorijskom masom MPG-a. Iskoristivost se kretala od 96,06 do 100,74 % čime je postignuta zadovoljavajuća točnost metode.

Utjecaj stranih tvari i iona ispitan je pripravom otopina interferirajućih vrsta koje mogu ometati određivanje MPG-a, a često se koriste kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Početne koncentracije tvari ispitane su u 500 puta većoj koncentraciji od koncentracije analita, dok je acetilsalicilna kiselina pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i analit. Granica tolerancije definirana je kao koncentracija interferencije koja će prilikom mjerenja pokazati pogrešku manju od  $\pm 5$  %. Za one tvari koje su pokazale pogrešku veću od  $\pm 5$  %, mjerenja su ponovljena u manjem omjeru prema analitu. No, unatoč smanjenju koncentracija, one su i dalje mnogo veće od onih koje su prisutne u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Od navedenih mogućih interferirajućih tvari i iona, laktoza, saharoza, limunska i vinska kiselina su pokazale relativnu pogrešku veću od dopuštene kao i acetilsalicilna kiselina, pa njihov utjecaj nije zanemariv ukoliko se MPG određuje u smjesi.

Preciznost metode ispitana je preko parametara ponovljivosti, učestalosti analiza i prenošenja signala. Uzastopnim injektiranjem standardne otopine MPG-a postignuta je zadovoljavajuća preciznost metode na što upućuje relativno standardno odstupanje (RSD) koje je iznosilo 1,42 %. Razvijena FIA metoda omogućuje velik broj analiza uzoraka ukoliko se uzorak injektira u intervalima od 20 sekundi. Za analizu jednog uzorka u triplikatu potrebno je 60 sekundi pa je prema tome moguće izvesti 60 analiza u triplikatu za vrijeme od jednog sata, odnosno 180 analiza na sat. Provjeren je i utjecaj nasumično injektiranih koncentracija tiopronina na prenošenje signala. Injektiranjem otopina koncentracija  $8 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  i  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> uzastopno bez ispiranja sustava pokazano je da nagle promjene u

koncentraciji ne mijenjaju visinu signala niti utječu na njegovu stabilnost i povratak na baznu liniju.

Doseg reakcije ispitan je zaustavljanjem protoka u trenutku kada je visina signala postigla maksimalnu vrijednost apsorbancije i iznosi 92 %.

Konačno, razvijena i optimizirana FIA metoda određivanja tiopronina uz spektrofotometrijski detektor primjenjena je za određivanje MPG-a u otopini realnog uzorka korištenjem CAPTIMER® tableta od 100 mg. U triplikatu je injektirana otopina koncentracije  $c = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  i izmjerene su pojedinačne apsorbancije nakon čega je određena srednja vrijednost apsorbancije koja iznosi 0,0634. Uvrštavanjem apsorbancije u jednadžbu pravca izračunan je iznos koncentracije MPG-a te je daljnjim proračunom dobivena masa MPG-a u otopini realnog uzorka. Dobivena vrijednost od 100,4 mg slaže se s deklariranom vrijednosti od 100 mg u CAPTIMER® tabletama čime je dokazana usporedivost razvijene metode s jodometrijskom titracijom koju propisuje Farmakopeja u monografiji za određivanje *N*-acetil-cisteina budući da je riječ o spojevima iste molekularne mase.

## **6. ZAKLJUČCI**



Ciljevi ovog rada bili su razvoj i vrednovanje metode određivanja tiopronina (MPG) analizom injektiranjem u protok (FIA) uz korištenje spektrofotometrijskog detektora. U redoks reakciji na kojoj se zasniva razvoj metode tiopronin sudjeluje kao reducens pri čemu se sam oksidira. Dolazi do redukcije bis(batokuproin-disulfonato)kuprata(II) u žuto-narančasti spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I) koji apsorbira pri valnoj duljini od 483 nm što se kao signal reakcije prati uz pomoć spektrofotometrijskog detektora.

Univarijantnom metodom optimizacije kemijskih parametara i protočnih parametara FIA sustava odabrani su sljedeći uvjeti: temperatura 25°C, pH-vrijednost 5, molni omjer reagensa  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1:1$ , volumen protočne kivete 30  $\mu\text{L}$ , volumni protok osnovne otopine 6,0  $\text{mL min}^{-1}$ , volumni protok otopine reagensa 6,0  $\text{mL min}^{-1}$ , volumen injektiranja otopine analita 200  $\mu\text{L}$ , duljina reakcijske uzvojnice 60 cm.

Nakon optimizacije parametara određene su analitičke karakteristike. Postignuta je linearna ovisnost signala o koncentraciji analita za široko koncentracijsko područje od  $3 \times 10^{-7}$   $\text{mol L}^{-1}$  do  $3 \times 10^{-5}$   $\text{mol L}^{-1}$ . Određeni su i jednadžba pravca  $y = 5016x + 0,0019$  te koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9998$ . Granica određivanja (LOQ) u skladu je s donjom granicom linearnog dinamičkog područja i iznosi  $3 \times 10^{-7}$   $\text{mol L}^{-1}$ , dok granica dokazivanja (LOD) iznosi  $9 \times 10^{-8}$   $\text{mol L}^{-1}$ .

Vrednovanjem metode ustanovljeno je da je postignuta iskoristivost u rasponu od 96,06 do 100,74 % čime je zadovoljena točnost metode. Od interferirajućih vrsta laktoza, saharoza, limunska, vinska kiselina i acetilsalicilna kiselina pokazale su relativnu pogrešku veću od dopuštene zbog čega može doći do ometanja signala ukoliko se tiopronin određuje u smjesi. Ostale tvari ni pri koncentracijama većima od onih u komercijalnim farmaceutskim pripravcima nisu dovele do ometanja signala. Metoda ima zadovoljavajuću preciznost uz relativno standardno odstupanje koje iznosi 1,42 %. Omogućeno je čak 60 analiza u triplikatu za vrijeme od jednog sata, odnosno 180 analiza na sat. Ne dolazi do prenošenja signala nasumičnim injektiranjem različitih koncentracija analita, a doseg reakcije iznosi 92 %.

Razvijena i vrednovana FIA metoda može se uspješno koristiti za određivanje tiopronina u farmaceutskim pripravcima. Određivanje sadržaja tiopronina u farmaceutskom pripravku uz razvijenu i vrednovanu metodu usporedivo je sa standardnom jodometrijskom titracijom koju propisuje Farmakopeja, uz dodatne prednosti FIA metode kao što su minijaturizacija sustava, automatizirana analiza velikog broja uzoraka, mala potrošnja analita

i reagensa, ekonomičnost metode, kratko vrijeme analize i jednostavnost primjene uz opremu standardnog analitičkog laboratorija.

## **7. LITERATURA**

- [1] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tiopronin>
- [2] Pfaff AR, Beltz J, King E, Ercal N. Medicinal thiols: current status and new perspectives. *Mini Rev Med Chem.* 2020;20:513-29.
- [3] Kuśmierk K, Bald E. Simultaneous determination of tiopronin and d-penicillamine in human urine by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Chim Acta.* 2007 2;590:132-7.
- [4] Drug Bank [Internet]. Drug & Drug Target Database; Canada [citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06823>
- [5] The Merck Indeks [Internet]. Merck Research Laboratories; New York; 1996. Dostupno na: <https://merckindex.rsc.org/monographs/m10879>
- [6] Sugiura Y, Hirayama Y. Structural and electronic effects on complex formation of copper(II) and nickel(II) with sulfhydryl-containing peptides. *Inorg Chem.* 1976;15:679-82.
- [7] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5483>
- [8] Carlsson MS, Denneberg T, Emanuelsson BM, Kågedal B, Lindgren S. Pharmacokinetics of oral tiopronin. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45:79-84.
- [9] Drugs.com [Internet]. [citirano 5.9.2023.] Dostupno na: <https://www.drugs.com/mtm/tiopronin.html>
- [10] Prot-Bertoye C, Daudon M, Tostivint I, Dousseaux MP, Defazio J, Traxer O, Knebelmann B, Courbebaisse M. Cystinurie [Cystinuria]. *Nephrol Ther.* 2021;17:100-107.
- [11] Domingo J L. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 1995;9:105-13.
- [12] Beltz J, Chernatynskaya A, Pfaff A, Ercal N. Protective effects of tiopronin on oxidatively challenged human lung carcinoma cells (A549). *Free Radic Res.* 2020;54:319-29.
- [13] Kim GH, Kellner CP, Hickman ZL, Zacharia BE, Starke RM, Hwang BY. A phase I clinical trial of tiopronin, a putative neuroprotective agent, in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2010;67:182-5.

- [14] Medscape [Internet]. [citirano: 6.9.2023.] Dostupno na: <https://reference.medscape.com/drug/thiola-thiola-ec-tiopronin-342857>
- [15] Thiola®(tiopronin) tablets [Internet]. Traverre therapeutics Inc: USA; 2021; Mission Pharmacal Company. Dostupno na: <https://thiolaec.com/>
- [16] Chillarón J, Font-Llitjós M, Fort J, Zorzano A, Goldfarb DS, Nunes V, Palacín M. Pathophysiology and treatment of cystinuria. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6:424-34.
- [17] Pak C Y, Fuller C, Sakhaee K, Zerwekh JE, Adams BV. Management of cystine nephrolithiasis with alpha-mercaptopyropionylglycine. *J Urol.* 1986;136:1003-8.
- [18] Drugs.com [Internet] [citirano: 7.9.2023.] Dostupno na: <https://thiolaec.com/>  
Dostupno na: <https://www.drugs.com/sfx/tiopronin-side-effects.html>
- [19] Miehle W. Aktuelles zu D-Penicillamin und Schwangerschaft [Current aspects of D-penicillamine and pregnancy]. *Z Rheumatol.* 1988;471:20-3.
- [20] Kukoc-Modun L, Biocic M, Radić N. Determination of penicillamine, tiopronin and glutathione in pharmaceutical formulations by kinetic spectrophotometry. *Acta Pharmaceutica.* 2021;71:619-30.
- [21] Beltz J, Pfaff A, Ercal N. Simultaneous determination of tiopronin and its primary metabolite in plasma and ocular tissues by HPLC. *Biomed Chromatogr.* 2019;33:e4375.
- [22] Xu J, Cai R, Wang J, Liu Z, Wu X. Fluorometric assay of tiopronin based on inhibition of multienzyme redox system. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39:334-8.
- [23] Lu J, Lau C, Yagisawa S, Ohta K, Kai M. A simple and sensitive chemiluminescence method for the determination of tiopronin for a pharmaceutical formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;33:1033-8.
- [24] Pérez-Ruiz R, Martínez-Lozano C, Baeyens WR, Sanz A, San-Miguel MT. Determination of tiopronin in pharmaceuticals using a chemiluminescent flow-injection method. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17:823-8.
- [25] Garcia M S, Sanchez-Pedreño C, Albero M I, Rodenas V. Determination of penicillamine or tiopronin in pharmaceutical preparations by flow injection analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 1993;11:633-8.

- [26] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 680.
- [27] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0 – Flow Injection Analysis (e-knjiga) str. 887-89. [Internet]. Ontario: LibreTexts; 2010 [citirano 8.9.2023.] Dostupno na: <https://openlibrary-repo.ecampusontario.ca/jspui/handle/123456789/320>.
- [28] Biočić M. Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tloinskih spojeva (*N*-acetil-*L*-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutaciona) kao čistih tvari te u farmaceutsim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 42-3.
- [29] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 688-93.
- [30] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0 – Flow Injection Analysis (e-knjiga) str. 920. [Internet]. Ontario: LibreTexts; 2010 [citirano 8.9.2023.] Dostupno na: <https://openlibrary-repo.ecampusontario.ca/jspui/handle/123456789/320>.
- [31] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 1-2.
- [32] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 4.
- [33] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 8. 9.2023.] Dostupno na: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html>
- [34] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 5-6.
- [35] Flow Injection Tutorial: Methods – Flow Injection [Internet] [citirano 8.9.2023.] Dostupno na: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.4.10.%20Optical%20Flowcells.html>
- [36] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0 – Flow Injection Analysis (e-knjiga) str. 924-25. [Internet]. Ontario: LibreTexts; 2010 [citirano 8.9.2023.] Dostupno na: <https://open library-repo.ecampusontario.ca/jspui/handle/123456789/320>.

- [37] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 62-3.
- [38] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 10-2.
- [39] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 65.
- [40] Flow Injection Tutorial: Methods – Flow Injection [Internet] [citirano 9. 9.2023.]  
Dostupno na:  
<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.4.10.%20Optical%20Flowcells.html>
- [41] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 12-3.
- [42] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 67-8.
- [43] McKelvie I D, Kolev D S. Advances in flow injection analysis and related techniques. 1. izdanje. Australija: Elsevier Science; 2008. str. 19.
- [44] Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: principles and practice. Chem Soc Rev. 2010; 39 :301-12.
- [45] Rocha F R., Nóbrega J. A., Fatibello Filho O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. *Green Chemistry*. 2001;3:216-220.
- [46] Radić Nj., Kukoč-Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003. str 6.
- [47] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 75-8.

[48] Radić Nj, Kukoč-Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003. str 9-10.

[49] Vitha M F. Spectroscopy: principles and instrumentation 1.izdanje. New Jersey: John Wiley & Sons; 2018. str 52-79.

[50] Radić Nj, Kukoč-Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003. str 11-2.

[51] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019. str. 80-2.

[52] Council of Europe, European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1, Council of Europe: Strasbourg; 2007. str. 516.

[53] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Protočna analiza injektiranjem. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 14.

[54] Radić Nj, Kukoč Modun L. Interna skripta za nastavne potrebe: Instrumentne metode analize u farmaciji. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 14-5.

[55] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. Str.21.

[56] 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 [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 169.



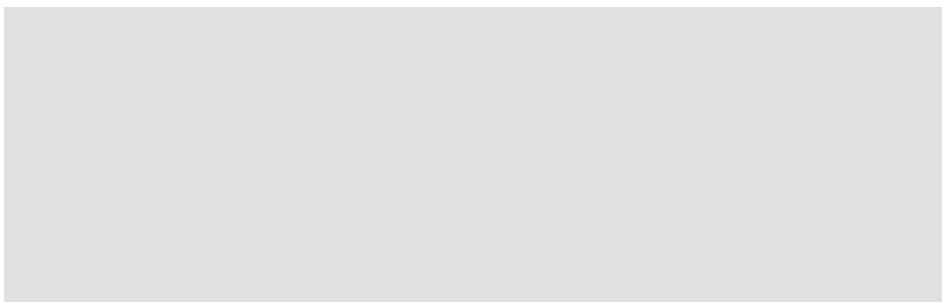
## **8. SAŽETAK**

Upotrebom protočno injekcijske analize uz spektrofotometrijski detektor razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicin) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj tiopronin sudjeluje kao reducens, a bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) se reducira u žuto-narančasti spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorbancija nastalog spoja mjerena je pri 483 nm. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni kemijski parametri i parametri protočnog sustava pri kojima je izvršeno određivanje linearnog dinamičkog područja u rasponu koncentracija od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Linearnom regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca  $y = 5016 x + 0,0019$  uz koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9998$  te granicu određivanja (LOQ) od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> i granicu dokazivanja (LOD) od  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Vrednovanjem metode ustanovljena je njezina točnost uz raspon iskoristivosti od 91,07 do 103,55 %. Osim laktoze, saharoze, limunske, vinske kiseline i acetilsalicilne kiseline, ostale pomoćne tvari farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Metoda je pokazala zadovoljavajuću ponovljivost uz relativno standardno odstupanje od 1,42 % i tijekom jednog sata omogućuje 60 analiza u triplicatu, odnosno ukupno 180 analiza. Primjenom metode nije došlo do prenošenja signala, a utvrđeni doseg reakcije iznosi 92 %. Razvijena metoda uspoređena je sa standardnom metodom po Farmakopeji i može se uspješno primijeniti za određivanje tiopronina u farmaceutskim pripravcima.

## **9. SUMMARY**

A new method for determining tiopronin (N-2-mercaptopropionyl-glycine) in pharmaceutical formulations was developed and evaluated using flow injection analysis with a spectrophotometric detector. The method is based on a redox reaction in which tiopronin participates as a reductant, where bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) is reduced to the yellow-orange compound bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I). The absorbance of the resulting compound was measured at 483 nm. The univariate method was used to select optimal chemical parameters and parameters of the flow system, the linear dynamic range was determined in the concentration range from  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Using linear regression analysis, the equation  $y = 5016x + 0.0019$  was obtained with the correlation coefficient  $R^2 = 0.9998$  and the limit of quantification (LOQ) of  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> and the limit of detection (LOD) of  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Performing the evaluation of the method its accuracy was established within a range of recovery from 91.07 to 103.55 %. Aside from lactose, sucrose, citric acid, tartaric acid and acetylsalicylic acid, other excipients of pharmaceutical preparations do not interfere when measuring the tiopronin signal. The method showed satisfactory reproducibility with a relative standard deviation of 1.42 % and allows for 60 analyses in triplicate, or a total of 180 analyses, during one hour. The application of the method did not result in the carryover of a signal, and the determined reach of the reaction is 92 %. The developed method was compared to the standard method according to the Pharmacopoeia and can be successfully applied for the determination of tiopronin in pharmaceutical formulations.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:****Obrazovanje:**

- 2006. - 2014. Osnovna škola Kman - Kocunar
- 2014. - 2018. III. gimnazija Split
- 2018. - 2023. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko - tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

**Radno iskustvo:**

- 20.2.2023. - 25.8.2023. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko - dalmatinske županije, ljekarna Lučac i u Galenskom i Analitičkom laboratoriju Ljekarni Splitsko - dalmatinske županije

**Nagrade i priznanja:**

- Dekanova nagrada za izvrstan uspjeh za akademsku godinu 2021./2022.

**Posebne vještine:**

- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000
- Vozačka dozvola - B kategorija
- Strani jezici - engleski C2, talijanski - B2