

# Razvoj i vrednovanje metode analize slijednim injektiranjem za određivanje penicilamina u farmaceutskim pripravcima

---

**Pranjić, Mara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:171:084588>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Mara Pranjić**

**RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ANALIZE SLIJEDNIM INJEKTIRANJEM  
ZA ODREĐIVANJE PENICILAMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

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

**Split, listopad 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
SCHOOL OF MEDICINE  
INTEGRATED UNDERGRADUATE AND GRADUATE STUDIES IN PHARMACY**

**Mara Pranjić**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE SEQUENTIAL INJECTION  
ANALYSIS METHOD FOR THE DETERMINATION OF PENICILLAMINE IN  
PHARMACEUTICAL PREPARATIONS**

**MASTER'S THESIS**

**Academic year:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**associate professor Ph.D. Lea Kukoč Modun**

**Split, October 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

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

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

#### **RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ANALIZE SLIJEDNIM INJEKTIRANJEM ZA ODREĐIVANJE PENICILAMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA**

Mara Pranjić, broj indeksa 201822

**Sažetak:** Korištenjem analize slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA), u ovom radu je razvijena i vrednovana nova metoda određivanja penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Temelj razvijene metode je redoks reakcija u kojoj penicilamin sudjeluje kao reducens. Penicilamin reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) u narančasto obojeni spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Nastali spoj postiže maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od 483 nm. Pri optimiziranim kemijskim uvjetima i uvjetima SIA sustava je ostvareno linearno dinamičko područje u rasponu koncentracija od  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $6,0 \times 10^{-5}$  M. Linearnom regresijskom analizom je dobivena krivulja umjeravanja, čija je jednačba pravca  $y = 7182x + 0,0073$ . Izračunane su granica dokazivanja,  $LOD = 6,0 \times 10^{-7}$  M i granica određivanja,  $LOQ = 2,0 \times 10^{-6}$  M. Vrednovanjem metode su utvrđene i njene analitičke karakteristike: točnost uz iskoristivost u rasponu od 88,24 % do 99,07%, doseg reakcije od 99,30%, učestalost analize od 24 analize u triplikatu unutar jednog sata, tj. 72 analize/h, ponovljivost uz relativno standardno odstupanje od 3,53%. Osim acetilsalicilne kiseline,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SO_4$ , natrijeva citrata, saharoze, laktoze, tartaradne kiseline i limunske kiseline, ostale pomoćne tvari u 500 puta većoj koncentraciji ne interferiraju prilikom određivanja penicilamina u realnom uzorku. Vrednovana i razvijena metoda je uspoređena sa standardnom metodom koju propisuje Britanska farmakopeja te se pokazala kao prikladna metoda za određivanje penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

**Ključne riječi:** penicilamin, analiza slijednim injektiranjem, spektrofotometrijski detektor

**Rad sadrži:** 78 stranica, 6 tablica, 33 slika i 69 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:** 3. listopada 2024.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### MASTER'S 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  
**Co-supervisor:** Postdoctoral researcher Maja Biočić Šormaz, PhD

### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS METHOD FOR THE DETERMINATION OF PENICILLAMINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

Mara Pranjić, index number 201822

**Summary:** Using sequential injection analysis (SIA), a new method for the determination of penicillamine in commercial pharmaceutical preparations was developed and evaluated. The method is based on the redox reaction in which penicillamine participates as a reducing agent. Penicillamine reduces bis(bathocuproindisulfonato)cuprate(II) to the orange colored compound bis(bathocuproindisulfonato)cuprate(I). This compound achieves maximum absorbance at a wavelength of 483 nm. Using optimized chemical parameters and parameters of the SIA system, a linear dynamic range was achieved in the concentration range from  $2.0 \times 10^{-6}$  M to  $6.0 \times 10^{-5}$  M. A linear regression analysis was used to obtain a calibration curve, whose equation is the  $y = 7182x + 0.0073$ . The LOD and LOQ of the developed method were calculated, where LOD was  $6.0 \times 10^{-7}$  M and LOQ was  $2.0 \times 10^{-6}$  M. The validation of this method also determined its analytical characteristics, such as accuracy with a range of recovery from 88.24 % to 99.07%, reach of the reaction 99.30%, analysis frequency of 24 analyses in triplicate within one hour, 72 analyses/h, reproducibility with a relative standard deviation of 3.53%. Apart from acetylsalicylic acid,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SO_4$ , sodium citrate, sucrose, lactose, tartaric acid and citric acid, other excipients in a more concentrated amount do not interfere with the determination of penicillamine in a real sample of a pharmaceutical preparation. The evaluated and developed method was compared with the standard method prescribed by the British Pharmacopoeia and proved to be a suitable method for the determination of penicillamine in commercial pharmaceutical preparations.

**Keywords:** penicillamine, sequential injection analysis (SIA), spectrophotometric detector

**Thesis contain:** 78 pages, 6 tables, 33 figures and 69 references

**Original in:** Croatian

<b>Defence committee:</b>	Associate professor, Franko Burčul, PhD	president
	Associate professor, Ivana Škugor Rončević, PhD	member
	Associate professor, Lea Kukoč Modun, PhD	mentor

**Defence date:** 3th October 2024.

**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.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Lee Kukoč Modun, uz neposredno vodstvo dr. sc. Maje Biočić Šormaz, u razdoblju od rujna do listopada 2023. godine.*

## ZAHVALA

*Zahvalna sam prije svega svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Lei Kukoč Modun na njenoj potpori za vrijeme mog studiranja, ali isto tako i na potpori koju mi pruža nakon samog studija te što sam zbog njene ljubavi prema analitičkoj kemiji prepoznala koliko je kemija moj prvi poziv. Hvala joj na stručnom vodstvu, savjetima tijekom izvedbe diplomskog rada, ali prije svega zahvaljujem joj se na nesebičnom strpljenju kroz cijelu ovu apsolventsku godinu i što sam kroz to vrijeme mogla biti uz svog bolesnog oca, kako bih sad na ponos svojih roditelja i brata obranila ovaj diplomski rad i stekla titulu magistricice farmacije.*

*Jedno veliko hvala dajem asistentici dr. sc. Maja Biočić Šormaz na uloženom trudu i koja mi je bila ogromna potpora i pomoć tijekom provođenja istraživanja i pisanja diplomskog rada.*

*Ovim putem se zahvaljujem svim svojim kolegicama, ujedno i prijateljicama kroz život. Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su me pratili tijekom mog studiranja i ako budu čitali ovu zahvalu, znat će da se to odnosi baš na njih.*

*Naposljetku, hvala mami, tati i bratu što su ne samo moj oslonac tijekom studija bili, nego što su od samog početka vjerovali da sam za mnoga velika djela stvorena.*

*„Ako ne mi, tko? Ako ne sad, kada?“*

*Kako je bivši američki predsjednik Kennedy to na jednostavan način rekao, tako se isto u meni snažno urezala ova krilatica, kroz ovih ipak ne pet, nego šest godina mog studiranja i naučila me jednu životnu lekciju. Ono što je tvoje, nitko ti ne može oduzeti, zato uspori i uzmi sve što ti život nudi kako bi od toga napravila ono najbolje što znaš.*

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

1.1.	D-penicilamin.....	2
1.1.1.	Kemijska svojstva.....	2
1.1.2.	Farmakokinetika.....	3
1.1.3.	Farmakodinamika.....	3
1.1.4.	Terapijske indikacije.....	4
1.1.5.	Farmaceutski oblici .....	5
1.1.6.	Doziranje i način primjene .....	5
1.1.7.	Nuspojave.....	7
1.1.8.	Interakcije.....	8
1.1.9.	Trudnoća i dojenje.....	8
1.1.10.	Kontraindikacije i mjere opreza .....	9
1.1.11.	Analitičke metode određivanja penicilamina .....	9
1.2.	Kinetičke metode analize .....	11
1.3.	Slijedna analiza injektiranjem (SIA) .....	12
1.3.1.	Povijesni pregled .....	12
1.3.2.	Formiranje zona.....	13
1.3.3.	Instrumentacija SIA sustava .....	14
1.3.4.	Izvedbe modela SIA sustava.....	17
1.4.	Spektrofotometrija u farmaceutskoj analizi.....	18
1.4.1.	Beerov zakon i njegova ograničenja.....	19
1.4.2.	Dijelovi spektrofotometra.....	20
1.4.3.	Izvedbe spektrofotometra .....	21

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

## 3. MATERIJALI I METODE

3.1.	Priprava otopina .....	26
3.1.1.	Deionizirana voda.....	26
3.1.2.	Otopina penicilamina.....	26
3.1.3.	Otopine reagensa .....	27
3.1.4.	Otopina acetatno – boratno – fosfornog pufera .....	27
3.1.5.	Otopina acetatnog pufera.....	27
3.1.6.	Otopina natrijeva hidroksida .....	28
3.1.7.	Otopina realnog uzorka .....	28
3.1.8.	Priprava otopina za određivanje PEN-a prema metodi koju propisuje Farmakopeja30	
3.2.	Instrumenti.....	30



3.2.1.	Programiranje protoka .....	32
3.2.2.	Ostala instrumentacija i laboratorijska oprema .....	33
4.REZULTATI		
4.1.	Reakcija na kojoj se temelji metoda .....	35
4.2.	Optimizacija kemijskih parametara u SIA sustavu.....	35
4.2.1.	Optimizacija pH-vrijednosti .....	35
4.2.2.	Optimizacija molnog omjera reagensa .....	37
4.3.	Optimizacija SIA sustava .....	39
4.3.1.	Optimizacija redoslijeda injektiranja.....	39
4.3.2.	Optimizacija volumena protočne kivete .....	40
4.3.3.	Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine.....	41
4.3.4.	Optimizacija volumena injektiranja reagensa .....	42
4.3.5.	Optimizacija volumena injektiranja analita.....	43
4.3.6.	Optimizacija volumena petlje zadržavanja.....	44
4.3.7.	Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice (reaktora).....	45
4.4.	Odabrani optimalni parametri.....	46
4.5.	Analitičke karakteristike metode.....	47
4.5.1.	Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje (LDP).....	47
4.5.2.	Granica dokazivanja i granica određivanja .....	48
4.5.3.	Interferencije .....	48
4.5.4.	Točnost (iskoristivost) .....	50
4.5.5.	Ponovljivost.....	53
4.5.6.	Učestalost analize .....	54
4.5.7.	Doseg reakcije .....	54
4.6.	Primjena razvijene metode na analizu realnog uzorka .....	55
4.7.	Usporedba razvijene metode određivanja penicilamina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja .....	56
5.RASPRAVA		
6.ZAKLJUČAK		
7.LITERATURA		
8.SAŽETAK		
9.SUMMARY		
10.ŽIVOTOPIS		

## KRATICE

PEN – penicilamin

g/mol – mjerna jedinica za molarnu masu; gram po molu

ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija

$t_{1/2}$  – poluvrijeme eliminacije

RA – reumatoidni artritis

INN – nezaštićeno / generičko ime

ATK – anatomsko terapijsko kemijska klasifikacija

h – mjerna jedinica za sat

mL/min – mjerna jedinica koja se koristi za opisivanje klirensa, farmakokinetičke mjere volumena krvne plazme iz koje se tvar potpuno ukloni iz organizma po jedinici vremena

mg/dan – oznaka za doziranje; miligram po danu

mg/dan/kg – oznaka za doziranje izražena po kilogramu tjelesne mase pacijenta

FDA – američka uprava za hranu i lijekove

SIA – analiza slijednim injektiranjem

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

NMR spektroskopija – magnetno-rezonantna spektroskopija

MBB – monobromobiman

FL – flureskamin

$\lambda_{em}$  – valna duljina

FIA – protočna injekcijska analiza

MPV – višepozicijski ventil (engl. *a Multiposition Valve*)

PEEK – polieter eter keton

PTFE – poli(tetrafluoroetilen)

LOV – laboratorij na ventilu

$h\nu$  – energija fotona

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

M – mol/L

°C – mjerna jedinica za temperaturu

LDP – predstavlja raspon koncentracija unutar kojeg je signal proporcionalan koncentraciji analita u uzorku

RSD – ponovljivost, slaganje mjerenja izvedenih pri istim uvjetima (jedan laboratorij, isti analitičar, jednaki radni uvjeti) u kratkom vremenskom razdoblju

## **1. UVOD**

## 1.1. D-penicilamin

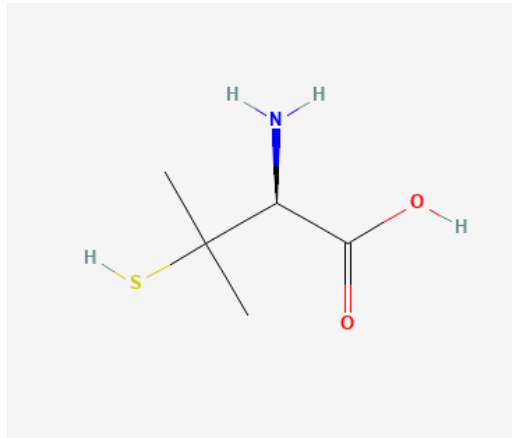
Penicilamin ( $C_5H_{11}NO_2S$ ), lijek iz skupine kelatora, točnije stereoizomer D-penicilamin, njegov farmaceutski aktivni oblik, predmet je interesa ovog istraživanja (kasnije se u tekstu koristi sinonim penicilamin ili kratica PEN). Drugi stereoizomer, L-penicilamin djeluje toksično (dovodi do inhibicije djelovanja piridoksina). Osim naziva penicilamin, uz ovaj spoj koriste se još sinonimi (S)-2-amino-3-merkaptio-3-metilbutanska kiselina (IUPAC), (S)-3,3-dimetilcistein, 3-merkaptio-D-valin, D- $\beta,\beta$ -dimetilcistein. Iako je penicilamin  $\alpha$ -aminokiselinski metabolit, on nema antibiotska svojstva niti djelovanja [1].

Učinkovit je kelator mnogih metala poput bakra, cinka, olova i žive te isto tako pospješuje izlučivanje ovih metala mokraćom. Terapijska indikacija penicilamina je njegova primjena u osoba koje boluju od Wilsonove bolesti (tijelo je opterećeno bakrom zbog njegovog smanjenog izlučivanja) i koristi se kod drugih stanja intoksikacije teškim metalima, ali je penicilamin toksičniji, manje potentan i manje selektivan kad se koristi kao kelator teških metala u odnosu na druge dostupne lijekove koji se upotrebljavaju za keliranje. Zbog navedenog, penicilamin nije lijek prve linije za stanja akutnih trovanja arsenom, olovom ili živom. Međutim, s obzirom da nije skup i oralno je dobro bioraspoloživ, često se daje u prilično niskim dozama nakon tretmana sa  $CaNa_2EDTA$  ili dimerkaprolom kako bi se osiguralo da koncentracija metala u krvi ostane niska prilikom otpusta pacijenata iz bolnice [2].

### 1.1.1. Kemijska svojstva

Kristalni prah bijele boje, blagog karakterističnog mirisa, malo gorkog okusa te dobro topljiv u vodi, slabo topljiv u alkoholu i netopljiv u eteru. 1% otopina u vodi ima pH-vrijednost od 4,5 do 5,5 [3, 4]. Molekulska masa penicilamina je 149,21 g/mol. Talište penicilamina je 202 - 206 °C, a gustoća je 111g/L pri 20 °C. Zagrijavanjem penicilamina sve do njegovog raspadanja (201 °C), dolazi do ispuštanja vrlo otrovnih para dušikovih i sumporovih oksida [4].

Ovaj spoj pripada klasi organskih spojeva koji su poznati kao valin i njegovi derivati, a pod derivatom se misli na spojeve koji nastaju reakcijom valina na amino skupinu ili karboksi skupinu ili zamjenom bilo kojeg vodika sa aminokiseline glicina [1].



Slika 1. 2D struktura penicilamina [5].

### 1.1.2. Farmakokinetika

Osim što ćemo kasnije pogledati utjecaj i djelovanje penicilamina na organizam kroz farmakodinamiku, bitno je znati kako i sam organizam utječe i djeluje na penicilamin kroz ADME. Apsorpcija penicilamina u gastrointestinalnom traktu je vrlo dobra (40 % - 70 %), brza, ali i promjenjiva. Do smanjene apsorpcije penicilamina dolazi ukoliko se neposredno prije ili poslije uzimaju hrana, antacidi i željezo. Vršne koncentracije u krvi su dobivene 1 - 3 sata nakon njegove primjene te je penicilamin relativno stabilan u *in vivo* u odnosu na njegov nemetilirani roditeljski spoj cistein. Što se tiče bioraspoloživosti penicilamina, u literaturi je pronađeno kako je više od 80 % penicilamina vezan za proteine plazme, što posljedično ostavlja mali postotak slobodne frakcije lijeka u krvi. Prilikom biotransformacije koja se događa u jetri, nastaje S-metilpenicilamin koji se primarno eliminira preko urina uglavnom u obliku disulfida, ali i kao S-metilpenicilamin te nešto i u obliku nepromijenjenog lijeka. Mala količina se može izlučiti i preko izmeta. Eliminacija je bifazna sa inicijalnim poluvremenom eliminacije ( $t_{1/2}$ ) od 1 - 3 sata, nakon čega slijedi sporija faza, postupno oslobađanje iz tkiva [2, 6].

### 1.1.3. Farmakodinamika

Kod osoba koje boluju od Wilsonove bolesti, penicilamin ispoljava svoje djelovanje kao kelator koji uklanja višak bakra iz organizma [7, 9]. Iz *in vitro* studija je vidljivo kako se jedan atom bakra (Cu) spaja sa dvije molekule penicilamina i prema tome bi jedan gram penicilamina

trebao biti praćen izlučivanjem oko 200 miligram Cu, ali međutim, stvarna količina Cu koja se izlučuje je tek oko 1 % od toga [7].

Penicilamin ima i svoju primjenu kod cistinurije (u sljedećem poglavlju biti će navedene terapijske indikacije penicilamina), gdje se smanjuje prekomjerno izlučivanje cistina. To se postiže, barem djelomično, izmjenom disulfida između penicilamina i cistina, što rezultira stvaranjem penicilamin-cistein disulfida, spoja koji je puno topljiviji od samog cisteina i na taj način se lakše izlučuje [7].

Dugotrajnim liječenjem visokim dozama penicilamina (kod bolesnika s Wilsonovom bolesti ili sa cistinurijom) dolazi do njegovog utjecaja na elastin i proizvodnju kolagena što dovodi do veće lomljivosti kože, hemoragijskih lezija [6]. Penicilamin ometa stvaranje poprečnih veza između molekula tropokolagena te ih cijepa kada se tek formiraju [7].

Mehanizam djelovanja (engl. *mechanisam of action*) penicilamina kod liječenja reumatoidnog artritisa (RA) je još nepoznat, iako se čini da suzbija samu aktivnost bolesti [7, 9]. U usporedbi sa drugim citotoksičnim imunosupresivima koji se koriste za liječenje RA, penicilamin značajno snižava IgM reumatoidni faktor, ali ne dovodi do značajne depresije apsolutnih razina serumskih imunoglobulina. Isto tako, za razliku od spomenutih citotoksičnih imunosupresiva koji djeluju na obje aktivnosti, penicilamin *in vitro* deprimira samo aktivnost T-stanica, ali ne i aktivnost B-stanica [7].

#### **1.1.4. Terapijske indikacije**

Odobrene terapijske indikacije penicilamina su:

1. Wilsonova bolest;
2. Cistinurija;
3. Intoksikacija teškim metalima;
4. Refraktorni RA;
5. Teški RA [10].

### 1.1.5. Farmaceutski oblici

U Hrvatskoj se penicilamin (INN) nalazi na bolničkoj listi lijekova. ATK penicilamina na spomenutoj listi je M01CC01 161, pripada skupini: Specifični lijekovi s djelovanjem na koštano-mišićni sustav. Zaštićeno ime (*brand name*) je Trolovol u obliku film tableta 50×300mg, a proizvođač je Asta Medica, dok se penicilamin u javnim ljekarnama ne može kupiti [11]. Farmaceutski oblici penicilamina nalaze se u obliku:

- Kapsula 125 mg;
- Kapsula 250 mg;
- Filmom obložena tableta 125 mg;
- Filmom obložena tableta 250 mg;
- Želučanorezistentna tableta 150 mg;
- Želučanorezistentna tableta 300 mg [10, 12].

### 1.1.6. Doziranje i način primjene

Penicilamin se uzima oralnim putem na prazan želudac i to najmanje 1 h prije jela ili 2 h nakon jela. Neki protokoli preporučuju uzimanje lijeka najmanje 2 h prije jela u slučajevima trovanja olovom (Pb). Također uzimanje penicilamina je preporučljivo razdvojiti najmanje 1 h od uzimanja drugih lijekova ili proizvoda koji sadrže cink (Zn) te od konzumacije mlijeka ili antacida. Pacijentu se strogo preporučuje uzimanje dodatka prehrani, vitamin B6 tj. piridoksin. Osobama koje boluju od Wilsonove bolesti se savjetuje 25 - 50 mg/dan piridoksina. Jedna od opcija je i multivitaminski režim bez bakra. Oni pacijenti, koji pak boluju od RA ili cistinurije se preporučuje uzimanje 25 mg/dan piridoksina. Posljednu dozu piridoksina u danu se treba uzeti najmanje 3 h nakon večere. Preporuča se primjena penicilamina s piridoksinom u dozi od 25 mg/dan i za odrasle, i za djecu, pogotovo pacijentima koji imaju nutritivni nedostatak [9]. Ako pacijent ima operaciju, dozu penicilamina treba smanjiti i održavati smanjenu dozu do potpunog zacjeljivanja rane. Što se tiče doziranja kod osoba koje imaju oštećenje bubrega ili jetre, za bolesnike s RA je primjena penicilamina kontraindicirana ukoliko bolesnik ima oštećenje bubrega. Za ostale indikacije u bolesnika s oštećenjem bubrega, ako je klirens (engl. *clearance*) kreatinina veći od 50 mL/min, savjetuje se oprez, ako je klirens kreatinina manji od 50 mL/min, treba izbjegavati primjenu penicilamina. Lijek se također ne smije uzimati u slučajevima peritonealne dijalize ili hemodijalize. Doziranje za jetru nije definirano.



Odrasli, adolescenti i djeca koji boluju od Wilsonove bolesti uzimaju 10 - 20 mg/dan/kg penicilamina [13]. Doza, a to je najčešće ona između 0,75 g i 1,5 g, koja daje početno 24-satno izlučivanje bakra više od 2 mg/dan putem mokraće treba održavati konstantnom tijekom najmanje tri mjeseca. Doza se prilagođava na temelju 24-satnog izlučivanja bakra u urinu i razine slobodnog serumskog bakra. Doza održavanja kod adekvatno liječenih pacijenata bi trebala dati razinu slobodnog bakra u serumu manju od 10 µg/dL [7, 9]. Rijetko je potrebno prekoračiti dozu od 2 g/dan. U slučaju da pacijent ne podnosi terapiju penicilaminom, alternativno liječenje je sa trientin hidrokloridom. Kod onih pacijenata koji u početku ne podnose dozu od 1 g/dan, započinjanje sa dozom od 250 mg/dan i zatim postupno povećanje do potrebne količine omogućuje bolju kontrolu učinka lijeka i tako može pomoći u smanjenju učestalosti nuspojava [7].

Kod cistinurije se penicilamin uzima 1200 - 1800 mg/dan razdijeljeno na 4 puta dnevno, ovisno o količini izlučenog cistina [13]. Maksimalna doza i za odrasle, i za djecu je 4000 mg/dan. Početna doza je obično 150 - 250 mg/dan te se postupno povećava kako bi se smanjio rizik od nuspojava [7, 9]. Ako nuspojave zahtijevaju smanjenje doze, važno je zadržati dozu prije spavanja [7]. Cilj je ograničiti brzinu izlučivanja cistina na 100 - 200 mg/dan [7, 9]. Smanjenjem cistina u mokraći, smanjuje se kristalurija i stvaranje kamenaca. U nekim je pak slučajevima zabilježeno i smanjenje veličine pa čak dolazi i do otapanja već formiranih kamenaca. Kod uzimanja penicilamina, pacijenti koji boluju od cistinurije trebaju obilno piti. Posebno je važno popiti oko pola litre tekućine prije spavanja i još jednu litru jednom tijekom noći kada je urin koncentriraniji i kiseliji nego tijekom dana. Razlog leži u tome što je veći unos tekućine, to je niža potrebna doza penicilamina [7].

Kod liječenja RA penicilaminom, glavno pravilo je strpljenje jer je početak terapijskog odgovora obično odgođen i mogu proći dva ili tri mjeseca prije nego što se uoče prvi klinički odgovori. Kod početne terapije vlada režim doziranja takav da se ide sa najnižom dozom od 125 - 250 mg/dan i onda ovisno o odgovoru pacijenta i njegovoj toleranciji se ta doza lagano povećava kroz interval od jednog do tri mjeseca. Ako se postigla remisija bolesti onda se ta doza koristi u terapiji održavanja, a ako nema poboljšanja, onda slijedi daljnje povišenje doze (paziti na znakove moguće pojave ozbiljne toksičnosti, u tom se slučaju prekida sa liječenjem) sve do 500 - 750 mg/dan. Ponovno, ako ne dođe do poboljšanja simptoma bolesti, ide se sa povećanjem do 1000 - 1500 mg/dan i ako pacijent ponovo nema vidljivih znakova poboljšanja, može se pretpostaviti da pacijent neće reagirati na liječenje i da to isto liječenje penicilaminom treba prekinuti. Tijekom liječenja se mogu pojaviti egzacerbacije nakon uspješnog početnog

odgovora, ali se one mogu povući unutar dvanaest tjedana. Optimalno trajanje terapije penicilaminom kod RA nije utvrđeno. Ako je pacijent bio u remisiji već 6 mjeseci ili možda više, može se tada pokušati postupno smanjivati doza od 125 - 250 mg/dan u ponovno istim intervalima od približno tri mjeseca [7].

### 1.1.7. Nuspojave

Neželjeni učinci penicilamina su česti. Utječe na sve organske sustave pa su tako od gastrointestinalnih poremećaja prisutni anoreksija, mučnina i može doći do povraćanja. Također, može doći i do oralnih ulceracija i stomatitisa, a zabilježena je i uobičajena oslabljena osjetljivost okusa. Od kožnih poremećaja su česti kožni osipi koji se javljaju na početku liječenja, alergijskog tipa u obliku svrbeža, urtikarije [3]. Penicilamin izaziva kožne lezije, makularnu ili papularne reakcije, pemfigoidne lezije, eritematozni lupus te isto tako i suhoću i ljuškanje [2]. Može se pojaviti i vrućica koja je obično prolazna, privremena i tada dolazi do prekida uzimanja lijeka, pacijentu se daju kortikosteroidi, antihistamnici i antipiretici. U jednom od prethodnih poglavlja spomenuto je da penicilamin utječe na kolagen i elastin te da dugotrajnom uporabom visokih doza lijeka može doći do povećane lomljivosti kože, erupcija nalik *elastois perforans serpigiosa* ili stečene bulozne epidermolize (penicilaminska dermatopatija) koja pritom može zahtijevati smanjenje doze ili čak i prekid [2]. Kod hematoloških štetnih učinaka ubrajamo trombocitopeniju i, rjeđe, leukopeniju koje su obično reverzibilne, ali kod pojave agranulocitoze i aplastične anemije su zabilježeni i smrtni slučajevi. Također, javlja se i hemolitička anemija [2, 3]. Bubrežna toksičnost izazvana penicilaminom se obično manifestira kao reverzibilna proteinurija i hematurija, ali može napredovati do nefrotskog sindroma sa membranskom glomerulopatijom [2]. Proteinurija se javlja često kod nekih bolesnika koja zna progresirati u glomerulonefritis ili nefrotski sindrom. Hematurija izazvana penicilaminom je rijetka, ali zahtijeva trenutni prekid uzimanja penicilamina. Od ostalih nuspojava tu su još Goodpasturov sindrom, bronhiolitis, miastenia gravis, polimiozitis (rijetko sa zahvaćenim srcem), intrahepatična kolestaza [3].

### 1.1.8. Interakcije

Penicilamin dolazi u interakciju s mnogim lijekovima, dodacima prehrani, hranom i alkoholom. Neke od tih interakcija su od kliničkog značaja pa je potreban poseban oprez i njihovo poznavanje. Prema različitoj literaturi postoji različit broj interakcija penicilamina sa drugim aktivnim tvarima, a neki od primjera su:

Kod liječenja RA treba izbjegavati istovremenu uporabu penicilamina i azatioprina. Istodobna primjena može dovesti do hematološke toksičnosti, a budući da je azatioprin sporo djelujući lijek, može doći do odgođene mijelosupresije [14]. Neki nesteroidni protuupalni lijekovi poput indometacina mogu dovesti do povišene razine penicilamina u krvi [15]. Do smanjene apsorpcije penicilamina dolazi ukoliko se neposredno prije ili poslije uzimaju hrana, antacidi i željezo [2, 6]. Nikako se ne preporučuje primjena klozapina i penicilamina jer klozapin poput penicilamina može utjecati na funkciju koštane srži i tako dolazi do povećanog rizika od granulocitopenije, neutropenije ili agranulocitoze [16].

### 1.1.9. Trudnoća i dojenje

Ograničene informacije pokazuju kako se penicilamin ne može otkriti u majčinom mlijeku, ali isto tako nisu zabilježeni nikakvi štetni učinci kod dojene djece čije su majke uzimale lijek. Primijećeno je jedino da su razine bakra (Cu) i cinka (Zn) u majčinom mlijeku smanjene. Na temelju dostupnih podataka, čini se kako je penicilamin prihvatljiv tijekom dojenja [17]. Trudnoća je kontraindikacija za uzimanje penicilamina. Penicilamin se treba koristiti tijekom trudnoće samo ako je korist od penicilamina veća od rizika (*FDA category D*). Ovaj lijek može uzrokovati *cutis laxa-u* u fetusu kada se daje trudnici. Kontinuirano liječenje penicilaminom tijekom trudnoće štiti majku od recidiva Wilsonove bolesti, a prekid terapije ima štetne učinke na majku, zato se tim trudnicama preporuča da se dnevna doza ograniči na 1 gram te ako se planira carski rez, onda dnevnu dozu treba ograničiti na 250 mg tijekom zadnjih 6 tjedana trudnoće i postoperativno do potpunog zacjeljivanja rane. Ako je moguće, penicilamin se ne smije davati ženama koje boluju od cistinurije jer postoje izvješća o ženama s cistinurijom koje su bile na terapiji gdje su se njihova dojenčad rodila s generaliziranim defektima vezivnog tkiva koja su umrla nakon abdominalne operacije [18].

### 1.1.10. Kontraindikacije i mjere opreza

Penicilamin je kontraindiciran u sljedećim navedenim stanjima:

- Bolesnici sa poviješću aplastične anemije povezane s penicilaminom;
- Alergija na penicilamin i odmah prekinuti ako dođe do imunološke reakcije;
- Insuficijentija bubrega kod RA;
- Trudnoća (FDA kategorija D);
- Istodobna primjena s lijekovima protiv malarije, imunosupresivima [9].

### 1.1.11. Analitičke metode određivanja penicilamina

Zbog svoje iznimne medicinske i biološke važnosti, određivanje penicilamina u čistom obliku, kao i u farmaceutskim pripravcima je od velike javne važnosti. Nakon pregleda dostupne literature, prikupljen je velik broj metoda koje su korištene za određivanje, penicilamina u čistim, a također i u farmaceutskim pripravcima, tkivu i serumu. Korištene su navedene analitičke tehnike:

- Spektrofotometrija [19, 20, 21, 22];
- Spektrofluorimetrija [26, 27];
- Kinetička potencijometrija [28];
- Protočna analiza injektiranjem [19, 24, 29, 30];
- Kemiluminiscencija [31];
- Voltometrija [19, 23, 24];
- HPLC [19, 32, 33];
- NMR spektroskopija [34].

Od velike je važnosti poznavati kemijsku strukturu penicilamina. Prisutnost ne samo tiolne, nego i amino te karboksilne skupine u penicilaminu omogućuje različite načine interakcije sa organskim i anorganskim vrstama, u različitim kompleksima i redoks reakcijama koje pritom daju pojedine spektrofotometrijski aktivne produkte [20]. Glavni nedostaci kod navedenih metoda su visoka cijena korištene instrumentacije, visoki troškovi analize po uzorku, uporaba analitičkih instrumentnih tehnika koje zahtijevaju educiranog operatera, reagensi koji uglavnom nisu dostupni u laboratorijima za kontrolu kvalitete ili imaju ograničenje zbog svoje

toksičnosti itd. [20, 21]. Upravo zbog tih razloga je velika potreba za brzom, osjetljivom, jednostavnom i selektivnom metodom, posebice za rutinskim analizama kontrole kvalitete farmaceutskih proizvoda koji sadrže penicilamin [22].

Najveći broj objavljenih metoda određivanja penicilamina su one metode koje uključuju spektrofotometrijski detektor. Takve se metode uglavnom temelje na redoks reakcijama u jednom koraku ili na redoks i kompleksometrijskim reakcijama u dva združena koraka, a pri čemu je uloga analita u reakciji da djeluje kao reducens kako bi nastao obojen produkt koji će biti detektibilan u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra [35, 36].

Zbog velike učestalosti analiza koje farmaceutska industrija tijekom proizvodnje zahtijeva, potreban je razvoj automatskih metoda analize. Pregledom literature, pronađen je manji broj kinetičkih metoda određivanja penicilamina slijednim injektiranjem u protok koji umjesto spektrofotometrijskog detektora mogu imati neku drugu vrstu detektora, kao što je fluorescencijski ili kemiluminiscencijski.

Opisana je slijedna analiza injektiranjem kao metoda za određivanje tiolnih skupina u farmaceutskim formulacijama (kaptopril, *N*-acetil-cistein, penicilamin) pomoću fluorimetra, a temelji se na tiol-specifičnom derivatizacijskom reagensu monobromobimananu (MBB). Predložena analitička metoda prikladna je za fluorimetrijsko određivanje tiola pri brzini uzorkovanja od 36 h<sup>-1</sup> [37].

Opisana je kinetička metoda koja se temelji na stvaranju kompleksa kao rezultat reakcije penicilamina sa otopinom željeza(III) u kiselom mediju uz prisutnost klorovodične kiseline. Nastali kompleks između penicilamina i Fe(III) ima tamnoplavo obojenje, a analitički signal u kinetičkom području reakcije izmjeren je pri 458 nm. Učestalost injektiranja je od 50 h<sup>-1</sup> sa relativnom standardnom devijacijom manjom od 0,98 % [38].

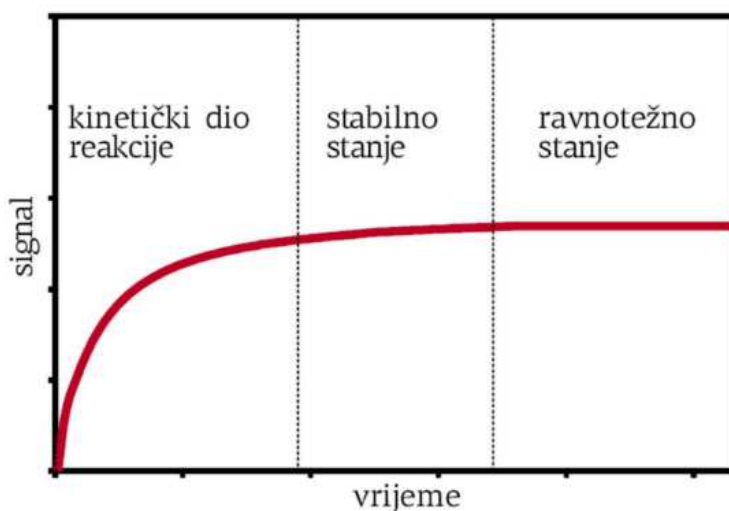
Opisana je metoda slijedne injekcijske analize koja se temelji na stvaranju visoko fluorescentnog derivata u reakciji penicilamina sa fluoreskaminom (FL) u boratnom puferu pH-vrijednosti 9,3. Fluorescencija regulirajućeg kompleksa FL-penicilamina prati se pri  $\lambda_{em} = 495$  nm. Vrijeme potrebno za analizu jednog uzorka je približno 70 sekundi [39].

## 1.2. Kinetičke metode analize

S obzirom na način određivanja koncentracije analita, analitičke tehnike i metode možemo podijeliti u dvije osnovne grupe, a to su:

- one koje se temelje na ravnoteži kemijske reakcije, i
- one koje se temelje na kinetici kemijske reakcije/fizikalnog procesa.

Analitički signal, koji mjerimo kod kinetičkih metoda, je određen brzinom reakcije u kojoj sudjeluje analit [40]. Bitna razlika između kinetičkih metoda i ravnotežnih tj. termodinamičkih metoda je trenutak uzorkovanja analitičkog signala. Kod kinetičkih metoda se signal uzorkuje u kinetičkom dijelu reakcije, a dok se kod ravnotežnih metoda uzorkuje u ravnotežnom tj. stabilnom stanju kemijske reakcije [41].



**Slika 2.** Razdoblja kemijske reakcije: kinetički dio, stabilno stanje, ravnotežni dio [40].

Kinetičke metode analize se zasnivaju na činjenici da koncentracija analita određuje brzinu navedenih kemijskih reakcija, i to većinom porastom koncentracije analita dolazi ujedno i do veće brzine odvijanja same kemijske reakcije. Budući da su spore kemijske reakcije neprihvatljive za razvoj ravnotežnih metoda određivanja, onda tu posebnu ulogu imaju kinetičke metode analize radi velike analitičke iskoristivosti takvih reakcija. Postoje i drugi uvjeti koji se moraju zadovoljiti kako bi se razvila određena kinetička metoda analize, osim one

nužne da koncentracija analita određuje brzinu kemijske reakcije, a to su ostvarivanje brzog miješanja reaktanata kao i pouzdan način praćenja napredovanja reakcije sa vremenom [40]. Najčešći izbor postupka praćenja kinetike kemijske reakcije su naprava za potenciometrijska ili spektrofotometrijska mjerenja [40, 41]. Kako bi razvili pouzdanu kinetičku metodu, odabrana kemijska reakcija treba ispunjavati sljedeće uvjete, a to su:

- brzina reakcije koja ne smije biti niti prespora niti prebrza;
- zakon brzine reakcije treba biti poznat;
- način kontinuiranog praćenja koncentracije sudionika (reaktanta, reagensa, produkta) iz te odabrane reakcije mora biti poznat [40, 41, 42].

Bez prethodne predobrade uzorka i uz odgovarajući detektor, kinetičke metode omogućuju ne samo osjetljivo, već i selektivno određivanje u svega nekoliko minuta. Selektivnost se ovih metoda postiže odabirom reagensa i drugih uvjeta koji povećavaju bitnu razliku u brzinama reakcije kojima analit i moguće interferencije reagiraju [41].

Počeci uvođenja kinetičkih metoda u analitičke laboratorije se podudaraju sa razvojem nove generacije automatske, računalno kontrolirane instrumentacije. Iz svega navedenog se da zaključiti kako ovakve vrste analiza, koje koriste kinetičke metode određivanja, zauzimaju sve više prostora i pozornosti u analitičkoj kemiji te bilježe značajan razvoj [40].

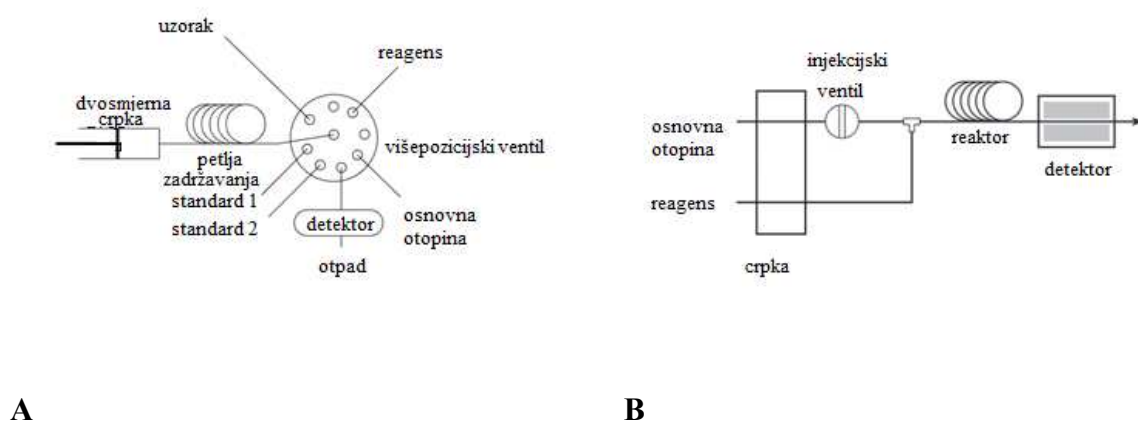
### **1.3. Slijedna analiza injektiranjem (SIA)**

#### **1.3.1. Povijesni pregled**

Zbog pooštavanja zahtjeva vezanih uz kontrolu kvalitete lijekova koja propisuju međunarodne farmakopeje, zahtijevajući od suvremenih farmaceutskih analiza brzinu, pouzdanost i ekonomičnost, došlo je do automatizacije kemijskih postupaka u analitičkim laboratorijima u drugoj polovici 20. stoljeća. Ružička i Hansen su u Danskoj 1975. godine, razvili i opisali jednu od prvih tehnika za automatizaciju kemijskih postupaka, analizu injektiranjem u protok (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA) [43]. Analitička tehnika u kojoj se uzorci injektiraju u struju otopine nosioca (koji može biti i reagens) s kojim se miješaju i prenose do detektora [44]. FIA je doživjela značajan uspjeh jer je omogućila automatizaciju rutinskih postupaka na način koji je jednostavan te ujedno i pristupačan laboratorijima koji su oskudni sa ekonomskim resursima, uz veliko smanjenje potrošnje uzoraka, pružajući pritom visoku stopu uzorkovanja. Ova tehnika je primijenjena i u nekim drugim područjima kemijskih analiza, u proučavanju

kinetičkog, kao i mehaničkog koncepta kemijskih reakcija s ciljem poboljšanja selektivnosti kod analitičkog određivanja, ali i kod razvoja novih kemijskih, enzimskih i imunoloških postupaka. Dolazi do eksponencijalnog porasta znanstvenih publikacija, da bi 2004. godine bilo zabilježeno oko 15 000 znanstvenih članaka temeljenih na ovoj tehnici [43].

Ružička i Marshall su već 1990. godine razvili drugu generaciju analize protoka, imenovana analiza slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA) [43]. SIA je tehnika koja koristi programski kontroliran dvosmjerni diskontinuirani protok koji je precizno programiran računalnim upravljanjem [45, 47]. Na taj način je SIA obilježila jednu novu eru u razvoju analiza protoka i eliminirala neka od ograničenja koja su povezana sa FIA-om [43]. Kao nova varijacija FIA-e, SIA ima određene prednosti, a neke od njih su jednostavnija i kompaktnija instrumentacija kao i stvaranje manje količine otpada [46].



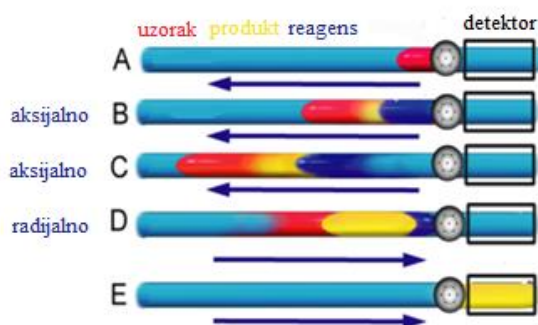
**Slika 3.** Usporedba SIA-e i FIA-e a) prikaz SIA sustava b) prikaz dijagrama dvokanalnog FIA sustava [46].

### 1.3.2. Formiranje zona

Odziv analize slijednim injektiranjem je rezultat nastao od dva procesa, a oba su kinetičke prirode. To je fizički proces disperzije zona uzorka i reagensa te kemijskog procesa nastanka produkta na granici zona. Zbog navedenoga je SIA konstruirana tako da radijalna disperzija bude maksimalna, a aksijalna disperzija, koja određuje međusobno prodiranje uzorka sa zonama reagensa, optimizirana [48].



Prvo se injektira uzorak (A), a zatim reagens (B). Reagens prodire u zonu uzorka zbog aksijalne disperzije, dok se kombinirane zone pomiču dalje uzvodno (C). Zatim zbog izmjene toka (D) reakcijska smjesa protječe prema protočnoj kivetu, uslijed čega dolazi do nastanka turbulentnog toka koji potiče aksijalnu i radijalnu disperziju. Radijalno miješanje je završeno onog trenutka kada reakcijska smjesa dosegne protočnu kivetu (E). Cijeli ovaj opisani proces prikazuje Slika 4. [49].



**Slika 4.** Miješanje disperzijom [49].

Od posebnog značaja je početno formiranje paraboličnog profila zone uzorka jer se na taj način povećava kontaktna površina kroz koju se odvija kemijska reakcija između uzorka i otopine reagensa, a naknadna izmjena smjera protoka poboljšava njihovo radijalno miješanje [50].

### 1.3.3. Instrumentacija SIA sustava

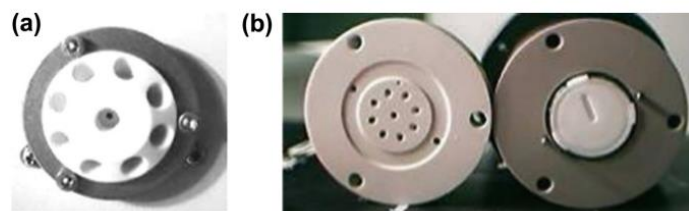
Osnovni dijelovi SIA sustava su:

- Višepozicijski (seleksijski) ventil (engl. a *Multiposition Valve*, MPV);
- Crpka (engl. *Syringe Pump*);
- Petlja zadržavanja (engl.  *Holding Coil*);
- Reaktor (reakcijska uzvojnica);
- Detektor;
- Računalo [43, 46, 47, 51].

U sljedećim poglavljima su detaljnije opisani pojedini dijelovi instrumentacije SIA sustava.

### 1.3.3.1. Višepozicijski ventil

U odnosu na FIA sustav, SIA sustav ne zahtijeva injekcijski ventil, umjesto toga, SIA koristi višepozicijski ventil [45]. Srce SIA sustava je upravo višepozicijski selekcijski ventil koji je najčešće izrađen od kemijskih otpornih polimera, stator od PEEK-a (polieter eter keton) i rotor od PTFE-a (poli(tetrafluoroetilen)). Središnji priključak selekcijskog ventila je povezan sa dvosmjernom crpkom preko petlje zadržavanja, dok su periferni priključci MPV-a spojeni na kratke cjevčice/cijevi za slijedno injektiranje uzoraka i različitih reagensa, kao i na detektor preko glavne središnje cijevi. Ostali bočni otvori MPV-a se koriste za ispuštanje otpada ili za dodatno povezivanje s drugim uređajima, npr. sa mikrovalnom pećnicom, foto oksidacijskim sustavom ili sa komorom za sušenje [52].



**Slika 5.** Višepozicijski selekcijski ventil a) vanjski izgled b) unutarnji dijelovi ventila [52].

### 1.3.3.2. Crpka

U usporedbi sa drugim analizama u protoku koje u svojoj instrumentaciji koriste peristaltičke crpke, SIA sustav koristi dvosmjernu klipnu crpku, koja omogućava veću robusnost. Peristaltičke crpke se brže i lakše oštećuju nego klipne jer sadrže cijevi čiji materijal ne podnosi određene tekućine, tj. kiseline, baze i neka otapala. Dvosmjerna crpka je izgrađena od stakla i sadrži teflonske cijevi (vrlo inertan materijal) koje omogućuju dulji radni vijek. Uzorak, reagensi i druga otapala rijetko dolaze do pogonskog sustava, jer on drži najviše samo otopinu nosioca [52]. Funkcija dvosmjerne crpke je aspiracija dobro definiranih volumena otopina uzorka i reagensa u petlju zadržavanja [53]. Potrošnja količine uzorka i reagensa je uvelike smanjena jer crpka radi samo za vrijeme aspiracije točno određenih volumena uzorka i reagensa. Ukoliko se radi određivanje više od jednog uzorka, onda se prethodni uzorak treba potpuno isprati iz aspiracijske cijevi kako bi se izbjeglo prenošenje, te je to jedini slučaj kada se koristi dodatna aspirirajuća količina novoga uzorka zbog ispiranja starog uzorka [52]. Zone

se zatim pomiču kroz ventil, a onda i u detektor izmjenom smjera protoka radi praćenja napredovanja nastanka produkta kemijske reakcije. Budući da se uglavnom koristi deionizirana voda kao struja nosioca, sustav se temeljito ispiru na kraju svakog ciklusa mjerenja. MiliGAT crpka omogućuje ovakav način rada jer može isporučiti precizne brzine protoka unutar raspona od 1 - 1000  $\mu\text{L/s}$  tijekom neograničenog vremenskog perioda, s obzirom da se crpka sinkronizirano puni istom brzinom, dok isporučuje struju nosioca [53]. Ova crpka sadrži četiri mikro injektora koja se pomiču oko kosog diska koji je smješten na osovini te brzinu rotacije kontrolira sama brzina protoka i stupanj rotacije prenesenog volumena [54].

### 1.3.3.3. Detektor

Kod protočnih tehnika najčešće se koriste spektrofotometrijski i elektrokemijski detektori. Također, pojavom optičkih vlakana, došlo je do revolucije u izvedbi instrumenata za analizu injektiranjem u protok, pritom olakšavajući postavljanje protočnih kiveta za najbolju poziciju putanje protoka. Danas, kod UV-VIS spektrofotometrije osim protočnih kiveta volumena od 80  $\mu\text{L}$  i optičkog puta dugog 1 cm, dostupne su i protočne kivete manjeg volumena koje nude raspon optičkog puta od 0,01 cm do 25 cm. Zbog toga se odziv može prilagoditi koncentraciji analita unutar gotovo tri reda veličine [55].



**Slika 6.** Protočna kiveta optičkog puta 1 cm [55].

Postoje i izvedbe protočnih sustava sa dva ili više različitih detektora u istom sustavu. Povezani su serijski ili paralelno, ovisno o svrsi analize. Cilj takvog načina povezivanja detektora je višekomponentna analiza [56].

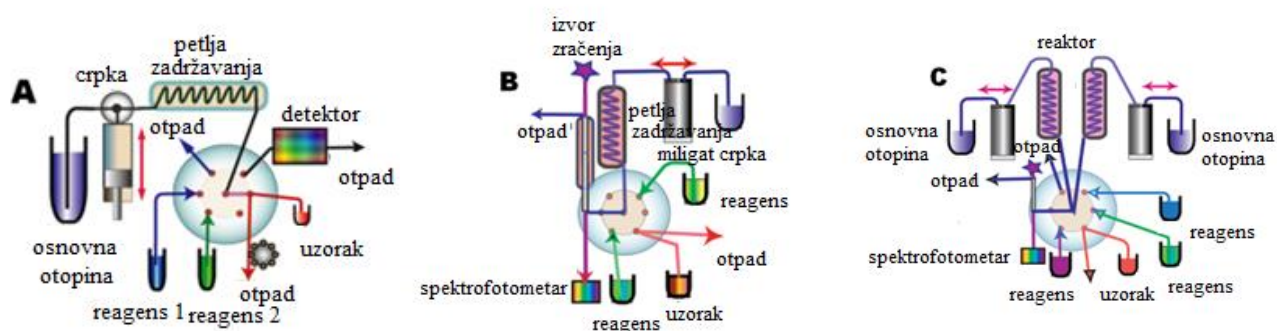
#### 1.3.4. Izvedbe modela SIA sustava

Postoje jednostavne i složenije izvedbe SIA sustava s obzirom na višepozicijski ventil koji je središte SIA sustava. Jednokanalni sustav (Slika 7. a) i b)) u kojem je središnji priključak ventila povezan sa dvosmjernom crpkom koja se koristi za aspiraciju određenih volumena otopine uzorka i reagensa u petlju zadržavanja [57].

Postoje dvije glavne konfiguracije SIA instrumenta. Prva od njih je konvencionalna SIA konfiguracija (Slika 7. a)) gdje cijevi malog promjera (0,8 mm I.D.) povezuju višepozicijski ventil sa perifernim cjevčicama koje služe za odvajanje otpada ili se povezuju sa detektorom. Kod minijaturiziranih SIA sustav-a (Slika 7. b)), višepozicijski ventil je redizajniran na način da integrira protok kroz otvor za uzorak s protokom kroz ćelije i mikrokolone unutar mikrofluidnog razvodnika koji je postavljen na vrhu ventila *lab-on-valve* izvedbe (*LOV*, laboratorij na ventilu). Ovakva konstrukcija smanjuje unutarnji volumen uzorka potrebnog za obradu na manje od 200  $\mu\text{L}$  zbog čega su volumeni otopine uzorka i reagensa koji se koriste za jednu analizu svedeni na svega 20  $\mu\text{L}$  do 200  $\mu\text{L}$ . Druga konfiguracija je nedavno razvijeni dvokanalni minijaturizirani SIA-2 sustav (Slika 7. c)) koji umjesto jedne, koristi dvije miliGAT crpke koje su spojene na središnji priključak *lab-on-valve* izvedbe. U odnosu na prvu konfiguraciju, minijaturizirani SIA-1 sustav, ova druga konfiguracija SIA sustava omogućuje:

- Razdvajanje zone uzorka za dvokomponentni test;
- Neravnomjerno dijeljenje zone uzorka za proširenje raspona umjeravanja;
- Korištenje središnjeg priključka višepozicijskog ventila analogno izvedbi FIA sustavu [57].

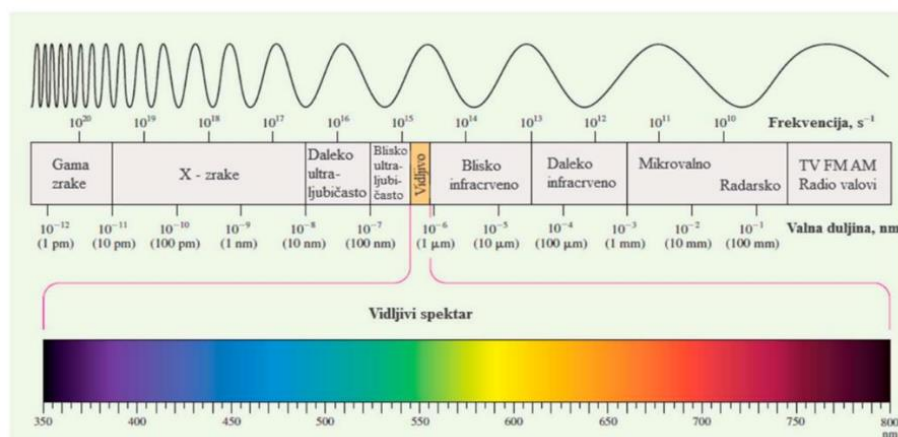
Ispod teksta se nalaze vizualni prikazi navedenih konfiguracija SIA instrumenata gdje su opremljeni sa protočnom kivetom dugog puta svjetlosti za spektrofotometriju, najčešće korištenog detektora za sustave analize protoka [57].



Slika 7. Konfiguracija SIA sustava a) konvencionalna SIA konfiguracija b) miniSIA-1 c) miniSIA-2 [57].

#### 1.4. Spektrofotometrija u farmaceutskoj analizi

Prednosti spektrofotometrijske tehnike poput njene jednostavnosti, dostupnosti i niske cijene je rezultiralo time da se rutinski koristi u mnogim farmaceutskim analizama. Također, primjenom kinetičkih spektrofotometrijskih metoda u odnosu na klasičnu spektrofotometriju je dovelo do poboljšanja selektivnosti i kraćeg vremena analize [58].



Slika 8. Elektromagnetski spektar zračenja s izdvojenim područjem vidljivog spektra (350 nm - 800 nm) [59].

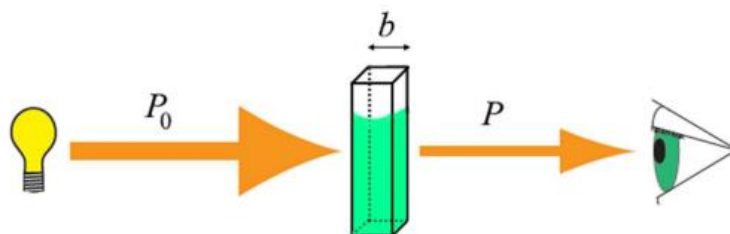
### 1.4.1. Beerov zakon i njegova ograničenja

Kako bi došlo do apsorpcije zračenja tj. do apsorpcije elektromagnetskog zračenja od strane analita, potrebno je zadovoljiti dva važna uvjeta. Prvi među njima je uvjet da postoji mehanizam prema kojem električno i magnetsko polje zračenja ostvaruju međudjelovanje sa analitom, a drugi je da energija fotona,  $h\nu$ , mora biti jednaka razlici energije,  $\Delta E$ , između dva kvantna stanja analita [60].

Beerovim zakonom opisujemo odnos između izmjerene apsorpcije,  $A$  i koncentracije apsorberajuće tvari,  $c$  [60].

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

gdje  $a$  označava konstantu proporcionalnosti (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljinu puta uzorka kroz koji zračenje prolazi, a  $c$  koncentraciju apsorberajuće vrste.  $P_0$  je snaga upadnog zračenja i  $P$  je snaga propuštenog zračenja kroz uzorak. Kako je apsorpcija bezdimenzijska fizikalna veličina, onda se mjerna jedinica za apsorpcijski koeficijent određuje iz izraza (1 - 1) [60].



**Slika 9.** Apсорpcija kao rezultat prigušenja snopa zračenja [61].

Ako koncentraciju apsorberajuće vrste izrazimo u  $M$  (mol/L), a duljinu puta zračenja u  $cm$ , tada će konstanta proporcionalnosti biti izražena u  $L/cm/mol$  i nazivat će se molarna apsorptivnost,  $\epsilon$  [60].

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1 - 2)$$

Ako otopine koje sadrže više različitih tvari zadovoljavaju uvjet gdje ne postoji međudjelovanje između njih, tada se Beerov zakon može i na takve sustave primijeniti. Pri istoj

valnoj duljini, ukupna apsorbanacija navedenog sustava je jednaka zbroju pojedinačnih apsorbanacija komponenata toga sustava:

$$A_{uk} = A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (1 - 3)$$

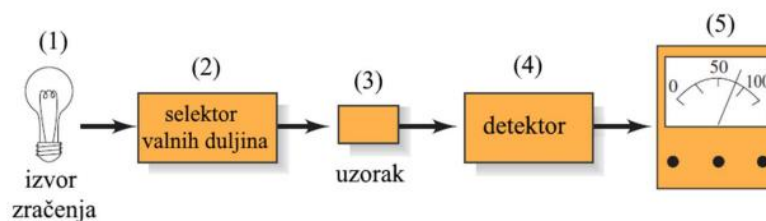
gdje indeksirani brojevi 1,2...n označavaju pojedine komponente sustava koje apsorbiraju zračenje pri određenoj valnoj duljini [60].

Međutim, postoje slučajevi kada Beerov zakon ne vrijedi jer postoje određena odstupanja i tada ne postoji linearan odnos između izmjerene apsorbanacije i koncentracije, kao npr. kod viših koncentracija analita (dolazi do međudjelovanja čestica). Posljedično, Beerov zakon vrijedi za razrijeđene otopine gdje koncentracija ne prelazi  $10^{-2}$  M. Slično odstupanje se javlja ukoliko se u sustavu razrijeđene otopine nalaze visoke koncentracije stranih iona i tvari [60].

#### 1.4.2. Dijelovi spektrofotometra

Spektrofotometar čine sljedeći dijelovi:

1. Izvor zračenja
2. Selektor valnih duljina
3. Spremnik/spremnici za uzorke
4. Detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljivi signal
5. Procesor zračenja [60].



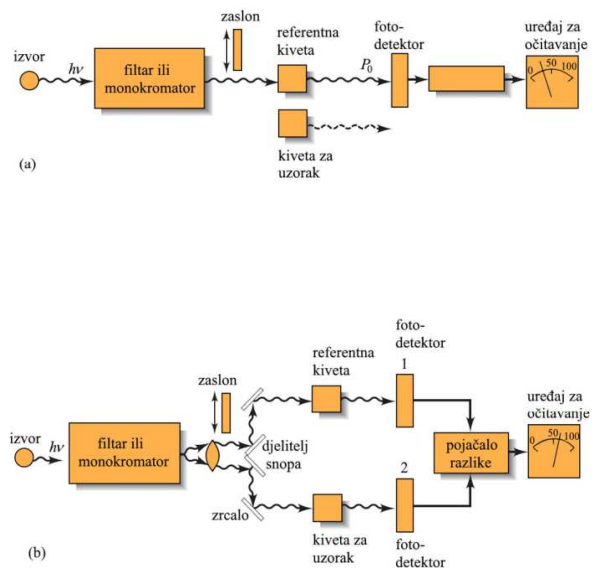
**Slika 10.** Shematski prikaz spektrofotometra [61].

Uloga izvora zračenja je osigurati izvor kontinuiranog i snažnog elektromagnetskog zračenja u onom dijelu spektra koji je od interesa pa tako npr. za izvor UV zračenja se upotrebljavaju vodikove i deuterijeve žarulje (160 nm – 380 nm), dok su za vidljivo i blisko infracrveno zračenje u upotrebi volframove i halogen žarulje (240 nm – 2500 nm). Selektor valnih duljina izdvaja iz snopa zračenja željenu valnu duljinu koja je potrebna za spektrofotometrijsko mjerenje, a pritom razlikujemo apsorpcijske i interferencijske filtre te monokromatore. Spremnik za uzorak (kiveta) omogućuje prolaz svjetlosti određene valne duljine kroz otopinu uzorka i referentnu otopinu (sadrži sve komponente osim analita). U praksi se koriste najčešće kivete sa duljinom optičkog puta (unutarnje širine kivete) od 1 cm. Treba pripaziti prilikom rada sa kivetama tijekom spektrofotometrijskih mjerenja na razne nečistoće, mjehuriće zraka i ostatke otapala s vanjske strane prozora kivete, kako ne bi interferirali sa dobivenim signalom. Detektor zračenja mjeri intenzitet svjetla koje prolazi kroz kivetu koja sadrži otopinu uzorka. Kako snop svjetlosti pada na detektor, tako dolazi do udara fotona o detektor i pretvorbe svjetlosne energije u električni signal. Zadnji dio spektrofotometra, procesor signala, pojačava električni signal detektora i pretvara ga u digitalni zapis koji se dalje može obrađivati uz razne matematičke operacije [62].

### **1.4.3. Izvedbe spektrofotometra**

Dvije su izvedbe spektrofotometra kao instrumenta: jednosnopni i dvosnopni. Razlika u njihovoj izvedbi leži u tome da se kod jednosnopnog spektrofotometra kiveta sa otopinom uzorka i kiveta sa referentnom otopinom moraju naizmjenice mijenjati, dok se kod dvosnopnog spektrofotometra koristi V-zrcalo koje dijeli osnovni snop svjetlosti na dva snopa od kojih jedan prolazi kroz kivetu sa otopinom uzorka, a drugi kroz kivetu sa referentnom otopinom, naposljetku stvarajući dva odvojena signala koja se na izlazu pojačavaju (Slika 11.) [60].





**Slika 11.** Shematski prikaz izvedbe a) jednosnognog spektrofotometra  
b) dvosnognog spektrofotometra [63].

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja jest razvoj i vrednovanje metode analize slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA) za određivanje penicilamina u farmaceutskim pripravcima.

Prilikom razvoja metode, optimizirani su sljedeći parametri:

- 1.) kemijski parametri
  - 1.1. pH-vrijednost
  - 1.2. molni omjer reagensa,  $n(\text{Cu}^{2+}) : n(\text{BCS})$
- 2.) parametri SIA sustava
  - 2.1. redosljed injektiranja reagensa i analita
  - 2.2. volumen protočne kivete
  - 2.3. volumni protok osnovne otopine ( $Q_{\text{CS}}$ )
  - 2.4. volumen injektiranja otopine reagensa ( $V_{\text{RS}}$ )
  - 2.5. volumen injektiranja otopine analita ( $V_{\text{a}}$ )
  - 2.6. volumen petlje zadržavanja ( $V_{\text{HC}}$ )
  - 2.7. duljina reakcijske uzvojnice ( $l$ )

Naposljetku, korištenjem optimiziranih parametara SIA sustava, odredit će se analitičke karakteristike metode:

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

Metoda će biti vrednovana određivanjem sljedećih parametara:

- Utjecaja interferencija
- Točnosti (iskoristivosti)
- Ponovljivosti (RSD), učestalosti analize
- Dosega (potpunosti) reakcije

Nakon razvoja i vrednovanja metode određivanja D-penicilamina, potrebno je ispitati mogućnost primijene na određivanje analita u realnim uzorcima, farmaceutskim pripravcima. Dobiveni rezultati se trebaju usporediti sa rezultatima dobivenim standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja.

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

### 3.1. Priprava otopina

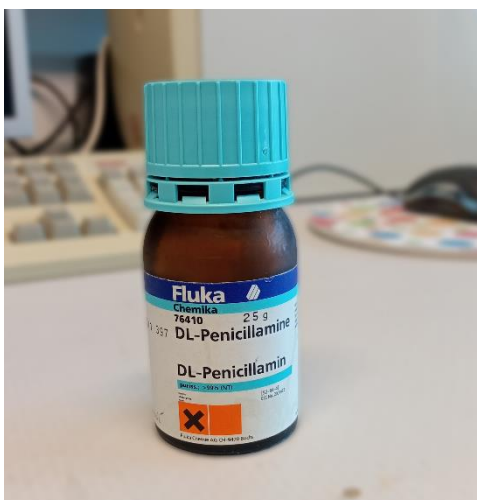
Sve otopine koje su korištene prilikom razvoja i vrednovanja metode su pripravljene od kemikalija analitičkog stupnja čistoće. Za otopinu nosioca je korištena deionizirana voda.

#### 3.1.1. Deionizirana voda

Deionizirana voda je pripravljena pomoću uređaja Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska) na sljedeći način: reverznu osmozu, filtraciju kroz aktivni ugljen, deionizaciju kroz anionski i kationski izmjenjivač, filtraciju kroz membranski filter s porama 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.2. Otopina penicilamina

Standardna otopina PEN-a, koncentracije  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L, pripravljena je otapanjem 74,6 mg PEN-a (PEN, Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs,  $M = 149,21$  g/mol) u 100 mL acetatno – boratno – fosfornog pufera pH-vrijednosti 2. Ova otopina je čuvana u hladnjaku pri 4 °C, a za potrebe dnevnih mjerenja su pripravljene, razrjeđivanjem standardne otopine deioniziranom vodom, radne otopine niže koncentracije ( $c = 4 \times 10^{-5}$  mol/L).



**Slika 12.** PEN, kemijski spoj korišten za pripravu standardne otopine.

### 3.1.3. Otopine reagensa

Otopina bakrovih(II) iona,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c = 8,0 \times 10^{-3}$  M (mol/L), pripravljena je otapanjem 99,99 mg bakrovog(II) sulfat pentahidrata  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 249,68$  g/mol) u 50 mL deionizirane vode u odmjernoj tikvici.

Otopina batokuproin disulfonske kiseline (BCS),  $c = 2,0 \times 10^{-3}$  M, pripravljena je otapanjem 56,50 mg batokuproin disulfonske kiseline dinatrijeve soli hidrata (Sigma – Aldrich, Njemačka,  $M = 564,54$  g/mol) u 50 mL deionizirane vode u odmjernoj tikvici.

Pripremljene otopine reagensa su čuvane u hladnjaku pri 4 °C. Za dnevno mjerenje je pripravljan reagens bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) prema molnom omjeru njihovih koncentracija  $n(\text{Cu}^{2+}) : n(\text{BCS}) = 1 : 2,0$  uz dodatak acetatnog pufera pH-vrijednosti 5.

### 3.1.4. Otopina acetatno – boratno – fosfornog pufera

Acetatno – boratno – fosforni pufer,  $c = 4,0 \times 10^{-2}$  M, pripravljen je otapanjem 4,95 g borne kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Alkaloid, Skopje, Makedonija,  $M = 61,84$  g/mol), 4,80 g octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , VWR Chemicals, Francuska,  $M = 60,05$  g/mol) i 5,46 g fosforne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 97,99$  g/mol) i kasnijom nadopunom deioniziranom vodom do oznake na odmjernoj tikvici volumena 2000 mL. Ovako pripravljena otopina ima pH-vrijednost 2. pH-metrom se regulira pH-vrijednost uz dodatak otopine natrijeva hidroksida,  $c = 2,0$  M.

### 3.1.5. Otopina acetatnog pufera

Otopina acetatnog pufera,  $c = 0,05$  M, pripravljena je otapanjem i miješanjem 3,15 g natrijevog acetata ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 82,03$  g/mol) i 1,04 mL octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , VWR Chemicals, Francuska,  $M = 60,05$  g/mol) u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL. Odmjerna tikvica je nadopunjena deioniziranom vodom. Ovako pripravljena otopina pufera, koja je imala pH vrijednost 5, koristila se u pripremi otopine reagensa bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II) kod određivanja penicilamina SIA metodom.



**Slika 13.** Otopina acetatnog pufera pH vrijednosti 5.

### **3.1.6. Otopina natrijeva hidroksida**

Otopina natrijeva hidroksida,  $c = 2,0 \text{ M}$ , pripravljena je otapanjem 8,00 g natrijeva hidroksida (NaOH, GRAM – MOL, Hrvatska,  $M = 40,00 \text{ g/mol}$ ) u 100 mL destilirane vode. Otopina je korištena za reguliranje pH-vrijednosti otopine acetatno – boratno – fosfornog pufera.

### **3.1.7. Otopina realnog uzorka**

Otopina realnog uzorka pripravljena je otapanjem tablete iz pakiranja farmaceutskog pripravka METALCAPTASE<sup>®</sup> tableta (Heyl Chemisch- Pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Njemačka), od kojih svaka prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži sadrži 300 mg djelatne tvari PEN-a. Izvagana masa jedne tablete od 534,40 mg je potom otopljena u 100 mL acetatno – boratno – fosforni pufer, čija je pH-vrijednost 2. Tako pripravljena otopina nadopunjena je deioniziranom vodom do oznake na odmjernoj tikvici volumena 500 mL.



**Slika 14.** METALCAPTASE<sup>®</sup> tablete 300 mg za pripremu otopine realnog uzorka.

Masena koncentracija ovako pripremljene otopine iznosi 0,6 g/L.

$$\gamma = \frac{m(\text{PEN})}{V_{\text{ot}}} = \frac{300 \text{ mg}}{500 \text{ mL}} = 0,6 \text{ g/L} \quad (3 - 1)$$

Iz navedenog slijedi da je množinska koncentracija otopine PEN-a:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{PEN})}{M(\text{PEN})} = \frac{0,6 \text{ g/L}}{149,2 \text{ g/L}} = 4,02 \times 10^{-3} \text{ M} \quad (3 - 2)$$

U novu odmjernu tikvicu volumena 100 mL se mikropipetira alikvot od 1 mL prethodne pripremljene otopine realnog uzorka. Zbog toga je nova množinska koncentracija,  $c_2 = 4,02 \times 10^{-5} \text{ M}$ .



### 3.1.8. Priprava otopina za određivanje PEN-a prema metodi koju propisuje Farmakopeja

Britanska farmakopeja preporučuje nevodenu titrimetrijsku metodu određivanja penicilamina kao čiste djelatne tvari [64]. Nevodena titrimetrijska metoda je potenciometrijska titracija gdje se 100 mg djelatne tvari otopi u 30 mL bezvodne octene kiseline i zatim se titrira sa 0,1 M perklornom kiselinom. Svaki mL perklorne kiseline,  $c = 0,1$  M, ekvivalentan je 14,92 mg  $C_6H_{11}NO_2S$  [64, 65].

#### Otopina octene kiseline

Glacijalna ili ledena octena kiselina, volumena 28,6 mL se pomiješa sa deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL [66].

#### Otopina perklorne kiseline

Perklorna kiselina ( $HClO_4$ ),  $c = 0,1$  M, se pripravlja dodavanjem 8,5 mL  $HClO_4$   $\{w(HClO_4) = 71,0 - 73,0 \% \text{ m/m}; M = 100,45 \text{ g/mol}\}$  u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL, koja sadrži 900 mL glacijalne octene kiseline  $\{M(C_2H_4O_2) = 60,01 \text{ g/mol}\}$ . Nakon što se otopina promiješa, doda se još 30 mL acetatnog anhidrida  $\{w(C_4H_6O_3) = 97,0 \% \text{ m/m}; M = 102,1 \text{ g/mol}\}$  i razrijedi do oznake sa ledenom octenom kiselinom. Tako pripremljenu otopinu je potrebno ostaviti da odstoji minimalno 24 sata [66].

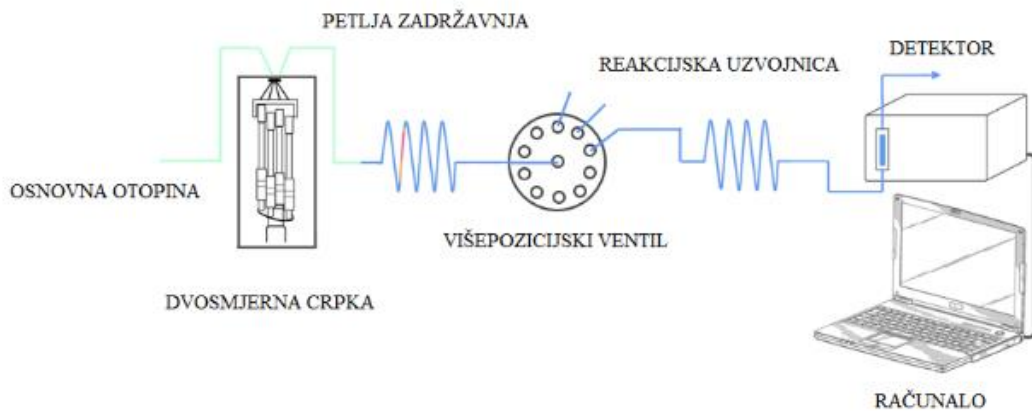
## 3.2. Instrumenti

SIA sustav koji se koristio za analizu penicilamina, sastojao se od navedenih dijelova:

1. Crpka (Valco Instruments, Švicarska);
2. Višepozicijski selekcijski ventil (Valco Instruments, Švicarska);
3. Petlja zadržavanja;
4. Reaktor (reakcijska uzvojnica);
5. Detektor, dvosnopni spektrofotometar (Shimadzu UV – 1601, Kyoto, Japan);
6. Računalo.



**Slika 15.** Laboratorijska oprema i SIA sustav za metodu određivanje PEN-a.



**Slika 16.** Laboratorijska oprema i SIA sustav za metodu određivanje PEN-a.

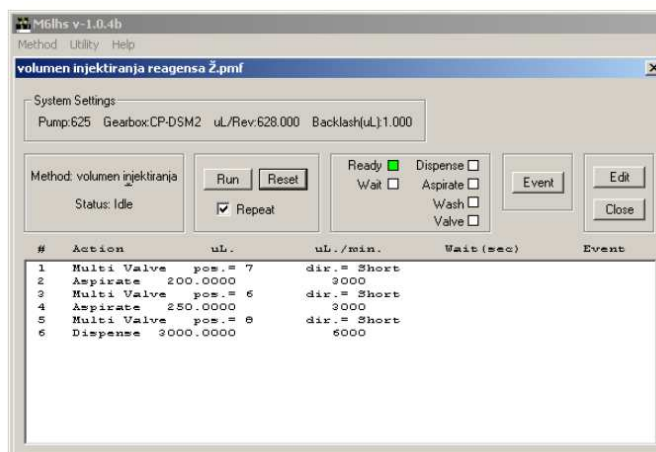
### 3.2.1. Programiranje protoka

M6LHS, računalni program korišten je za programiranje uvjeta i radnji tijekom analize. Na početku samog rada potrebno je cijeli SIA sustav napuniti otopinom nosioca, koji je zapravo osnovna otopina sustava (deionizirana voda) kako bi se uklonili svi mjehurići zraka u sustavu i tako izbjegle moguće pogreške prilikom analize i obrade dobivenih podataka i rezultata.

Mjerenje se provodi pravilnim odabirom otvora selekcijskog ventila i smjera protoka otopine. Postoje dvije moguće radnje, a to su:

- usis (engl. *aspirate*) – smjer protoka usmjeren od otvora selekcijskog ventila prema dvosmjernoj crpki;
- isis (engl. *dispense*) – smjer protoka usmjeren od dvosmjerne crpke prema selekcijskom ventilu.

Usisom se napune cjevčice sustava otopinom nosioca te se zatim suprotnim smjerom protoka ta ista otopina gura prema otvoru 8 na selekcijskom ventilu, koji je povezan sa protočnom kivetom u optičkom putu spektrofotometra i onda se naposljetku izlijeva u otpad. Ovaj opisani način osigurava da sustav bude ispran, oslobođen mjehurića zraka i napunjen otopinom nosioca.



Slika 17. M6LHS, primjer programiranja radnji kod SIA sustava.

GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA), program korišten za obradu podataka koji su se kontinuirano bilježili tijekom spektrofotometrijskog mjerenja. Pomoću njega su izrađene krivulje umjeravanja i provedena je njihova analiza kao i statistička obrada podataka.

### 3.2.2. Ostala instrumentacija i laboratorijska oprema

1. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) sa staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413. Korišten za mjerenje pH-vrijednosti prilikom pripravljanja potrebnih otopina.



**Slika 18.** Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti u analitičkom laboratoriju.

2. Mikropipete (Sartorius, Gottingen, Njemačka). Korištene za precizno dodavanje mikrolitarskih volumena otopina analita i reagensa.

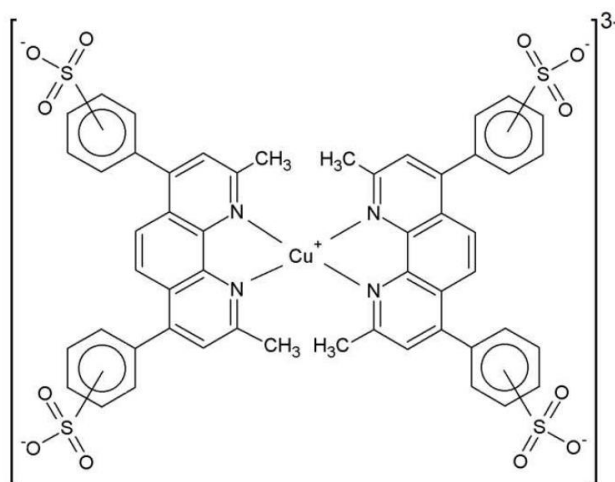


**Slika 19.** Mikropipete u analitičkom laboratoriju.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Reakcija na kojoj se temelji metoda

Razvijena metoda analize PEN-a temelji se na redoks reakciji gdje se odvija redukcija bis(batokuproin)kuprat(II) kompleksa uz prisutnost PEN-a, pri čemu nastaje narančasto obojeni kompleks bis(batokuproin)kuprat(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum nastalog kompleksa se postiže pri valnoj duljini od 483 nm. Redoks reakcija prikazana je sljedećom jednačinom:

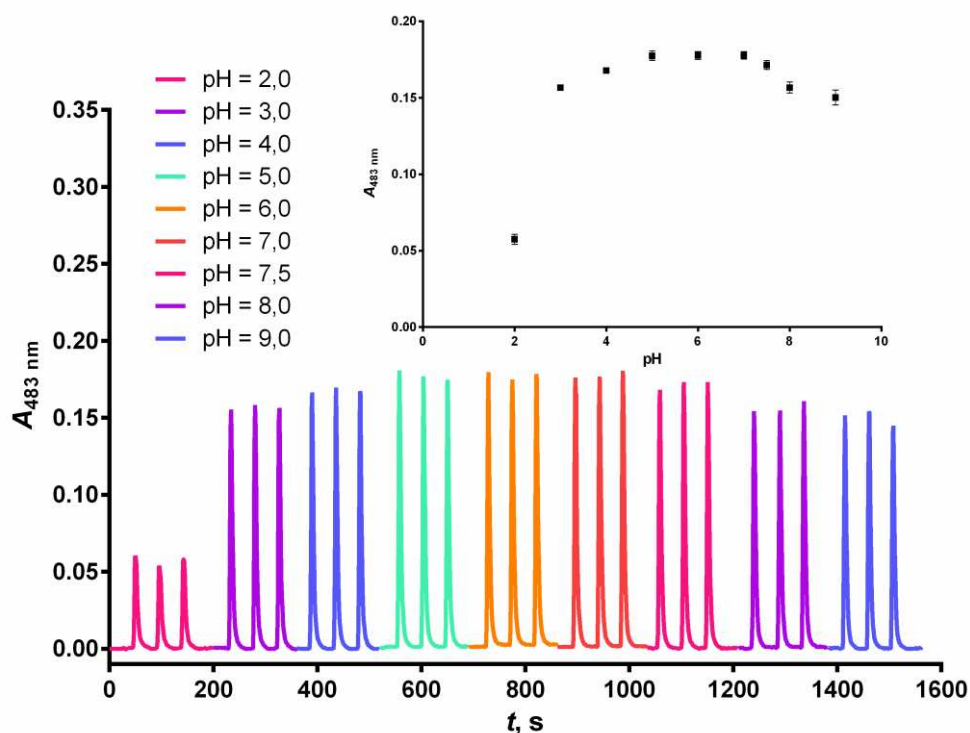


**Slika 20.** Strukturni prikaz bis(batokuproindisulfonato)kuprata(I) [67].

## 4.2. Optimizacija kemijskih parametara u SIA sustavu

### 4.2.1. Optimizacija pH-vrijednosti

Utjecaj pH-vrijednosti pripremljene otopine je ispitan u rasponu od 2,0 do 9,0 pomoću acetatno-boratno-fosfornog pufera. Ukupan volumen pripremljene otopine iznosio je 10 mL, a sastojao se od 0,2 mL standardne otopine analita PEN-a,  $c = 4 \times 10^{-5}$  M, reagensa koji se sastojao od 0,4 mL otopine bakra(II),  $c = 8 \times 10^{-3}$  M i 1,6 mL otopine bisbatokuproin disulfonske kiseline,  $c = 2 \times 10^{-3}$  M i 8,0 mL acetatno-boratno-fosfornog pufera. Kao otopina nosioca u svim mjerenjima je korištena deionizirana voda.



**Slika 21.** Siagram optimizacije pH-vrijednosti. pH-vrijednosti: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $n(\text{Cu}^{2+}) : n(\text{BCS}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 3000 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_a = 200 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{RS}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 1000 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \text{ } \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije PEN-a o pH-vrijednosti.

Pri pH-vrijednosti 2,0 je zabilježena jako mala visina signala i zapravo tako jako niska pH-vrijednost ne pogoduje nastanku kompleksa. Budući da PEN pokazuje najveću stabilnost pri niskim pH-vrijednostima jer pripada skupini tiolnih spojeva, odabrana pH-vrijednost za daljnja ispitivanja bila je od 5,0, iako je visina analitičkih signala slična u rasponu ispitivanja pH-vrijednosti od 5,0 do 7,0. Maksimalna visina analitičkog signala pri navedenim uvjetima je postignuta pri pH 5,0, a iznosila je  $A = 0,1807$ . Za provedbu daljnjih ispitivanja je korišten acetatni pufer pH-vrijednosti od 5,0 umjesto acetatno-borato-fosfornog pufera.

#### 4.2.2. Optimizacija molnog omjera reagensa

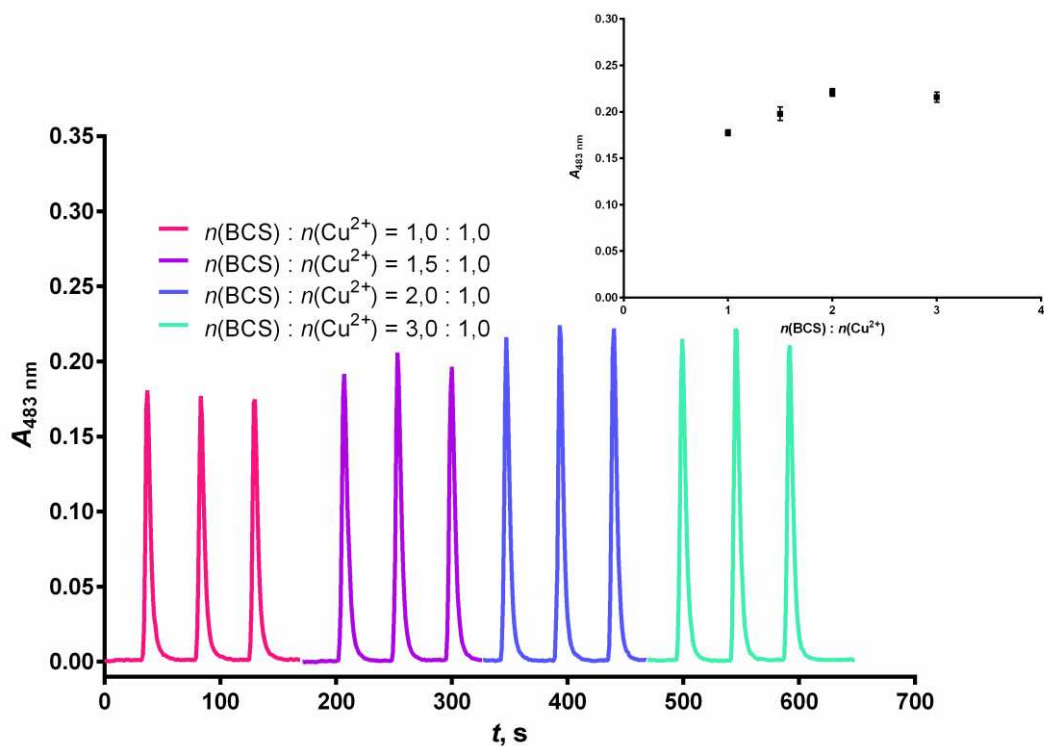
Prilikom optimizacije molnog omjera reagensa  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a, korištena je standardna otopina PEN-a,  $c = 4,0 \times 10^{-5}$  M, kao analit. Otopina reagensa je pripravljena na sljedeći način. Koncentracija iona bakra(II) ( $\text{Cu}^{2+}$ ) održavana je stalnom, dok je koncentracija BCS-a mijenjana kao i sami volumen pufera kako bi ukupan volumen otopine pripremljenog reagensa iznosio 500  $\mu\text{L}$  (5 mL). Otopine odgovarajućih molnih omjera  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a su pripravljene iz njihovih polaznih otopina koncentracija,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3}$  M i  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3}$  M. Za osiguravanje stabilne pH-vrijednosti reakcijske otopine je korišten acetatni pufer pH = 5,0.

**Tablica 1.** Optimizacija molnog omjera  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a. Navedeni su volumeni i koncentracije korištenih otopina.

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

Dobiveni rezultati su pokazali kako uz stalnu koncentraciju bakrovih(II) iona, povećanjem koncentracije BCS-a apsorbancija postiže svoj maksimum kao i sama brzina reakcije pri njihovom omjeru od 1 : 2,0 te se daljnjim povećanjem postižu konstantne vrijednosti.



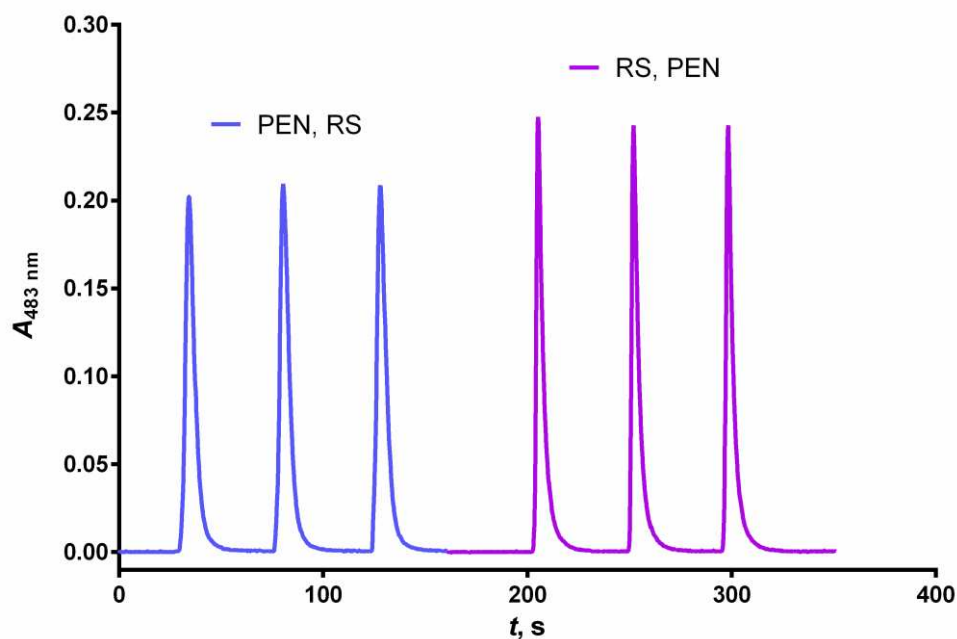


**Slika 22.** Siagram optimizacije molnog omjera reagensa  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a. Molni omjeri  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a: 1 : 1,0; 1 : 1,5; 1 : 2,0; 1 : 3,0. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 4,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 9,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 3000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{RS}} = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o molnom omjeru reagensa  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a za određivanje PEN-a.

### 4.3. Optimizacija SIA sustava

#### 4.3.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja

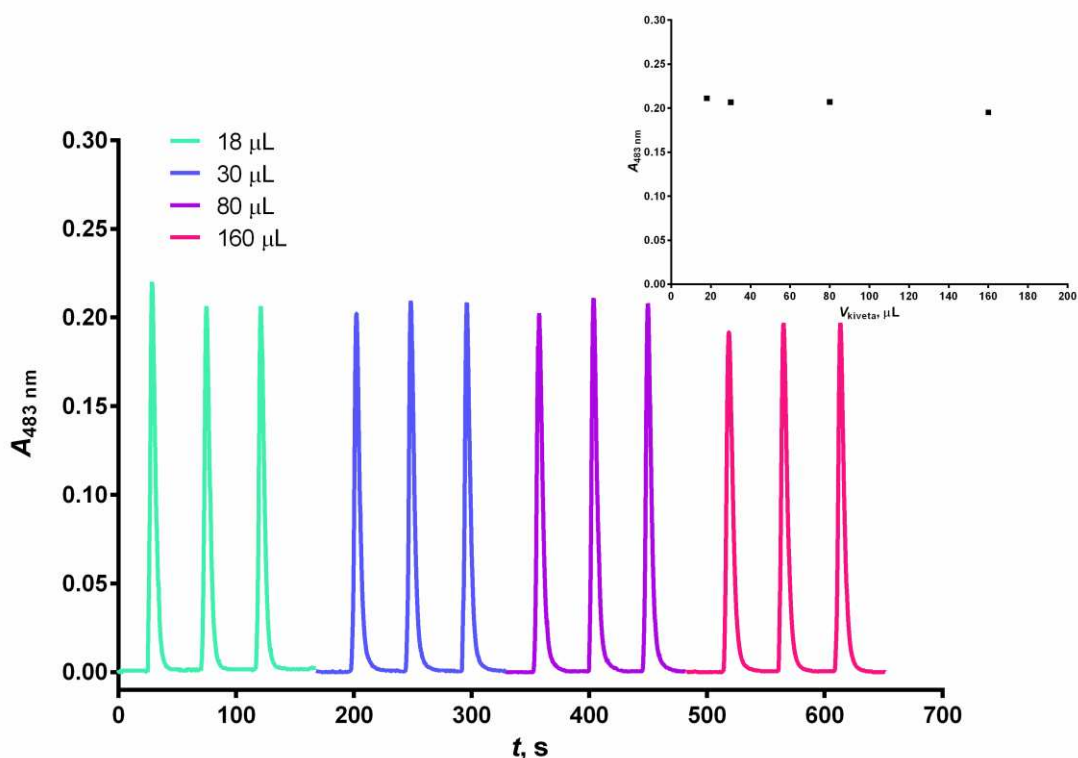
Kako bi se ispitaio utjecaj redoslijeda injektiranja otopine reagensa i otopine analita, napravljena su dva mjerenja, gdje se u prvom mjerenju, u petlji zadržavanja prvo injektirala otopina analita (pozicija 5 na selekcijskom ventilu), a potom otopina reagensa (pozicija 6 na selekcijskom ventilu). U drugom mjerenju je redoslijed injektiranja bio obrnut. Vrijednosti dobivenih analitičkih signala su bile manje u prvom mjerenju (PEN, RS), u odnosu na vrijednosti koje su dobivene u drugom mjerenju (RS, PEN). Za daljnja mjerenja je korišten redoslijed injektiranja u kojem se prvo injektira reagens, a potom analit (redoslijed iz drugog mjerenja).



**Slika 23.** Siagram optimizacije redoslijeda injektiranja otopine analita i otopine reagensa. Redoslijed injektiranja: 1. analit (PEN) / reagens (RS); 2. reagens (RS) / analit (PEN). Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 3000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{RS}} = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $80 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.3.2. Optimizacija volumena protočne kivete

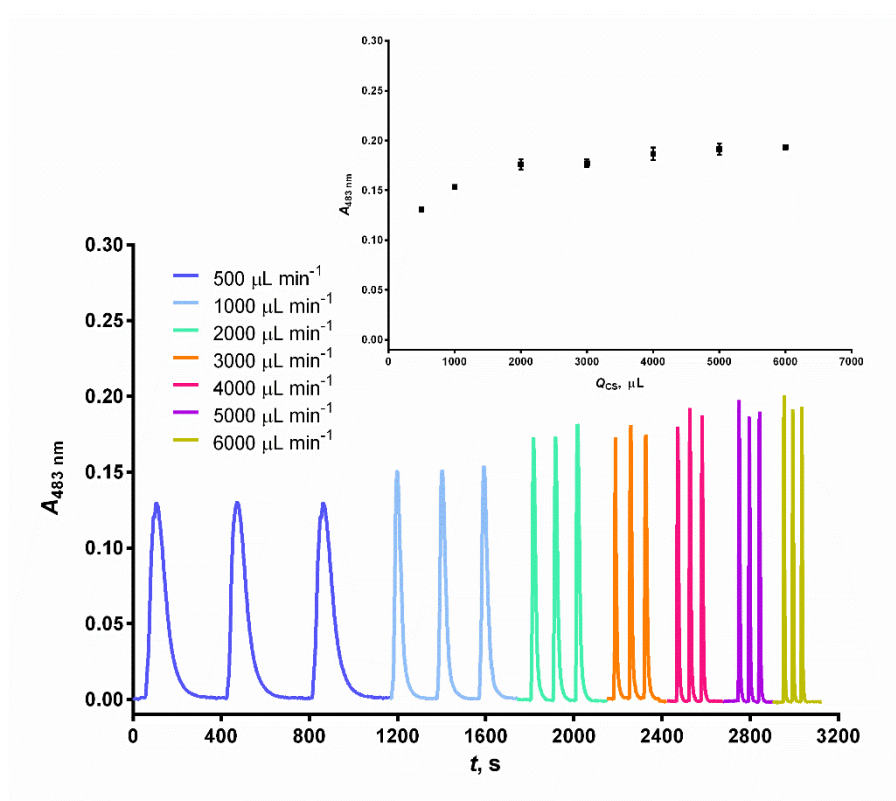
Prilikom optimizacije volumena protočne kivete u mjerenjima su korištene kivete volumena: 18  $\mu\text{L}$ ; 30  $\mu\text{L}$ ; 80  $\mu\text{L}$ ; 160  $\mu\text{L}$ . Promjena volumena protočne kivete nije imala značajan utjecaj, ali je zbog što manje disperzije zone odabrana protočna kiveta volumena 30  $\mu\text{L}$ .



**Slika 24.** Siagram optimizacije volumena protočne kivete. Volumen protočne kivete: 18  $\mu\text{L}$ ; 30  $\mu\text{L}$ ; 80  $\mu\text{L}$ ; 160  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{RS}} = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu protočne kivete.

### 4.3.3. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine

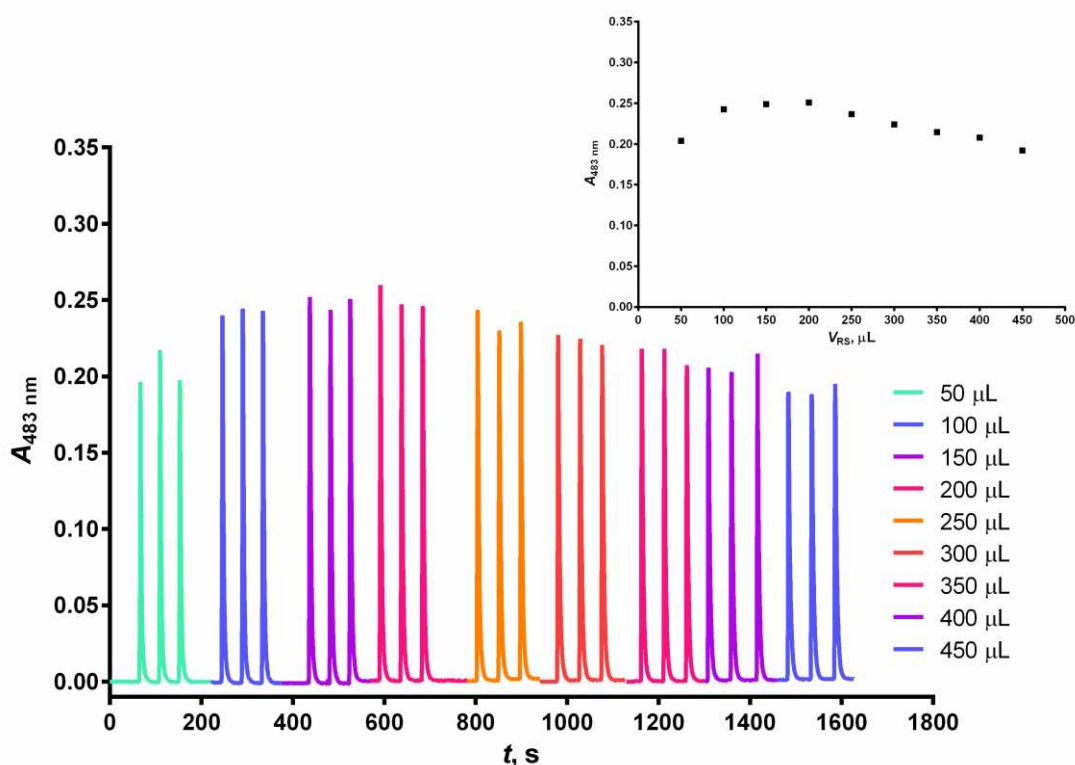
Upravo odabirom optimalnog volumena protoka otopine nosioca (osnovne otopine) se određuje učestalost mjerenja. Prilikom mjerenja u razmatranje se uzimaju širine pikova i povrat na baznu liniju. Volumen protoka osnovne otopine je ispitan u rasponu od 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  do 6000  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Podešavanjem volumnog protoka se može omogućiti bolja osjetljivost metode. Nakon provedenih mjerenja, odabran je volumni protok od 5000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  gdje je signal najviši uz zadovoljavajuću ponovljivost. Iako viši protok osigurava isto, zbog pritiska u mjernom sustavu odabrana je niža vrijednost protoka.



**Slika 25.** Siagram optimizacije volumnog protoka otopine nosioca. Volumni protok otopine nosioca ( $Q_{CS}$ ): a) 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; b) 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; c) 2000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; d) 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; e) 4000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; f) 5000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; g) 6000  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ;  $V_{RS} = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete = 30  $\mu\text{L}$ ;  $V_{HC} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumnom protoku otopine nosioca za određivanje PEN-a.

#### 4.3.4. Optimizacija volumena injektiranja reagensa

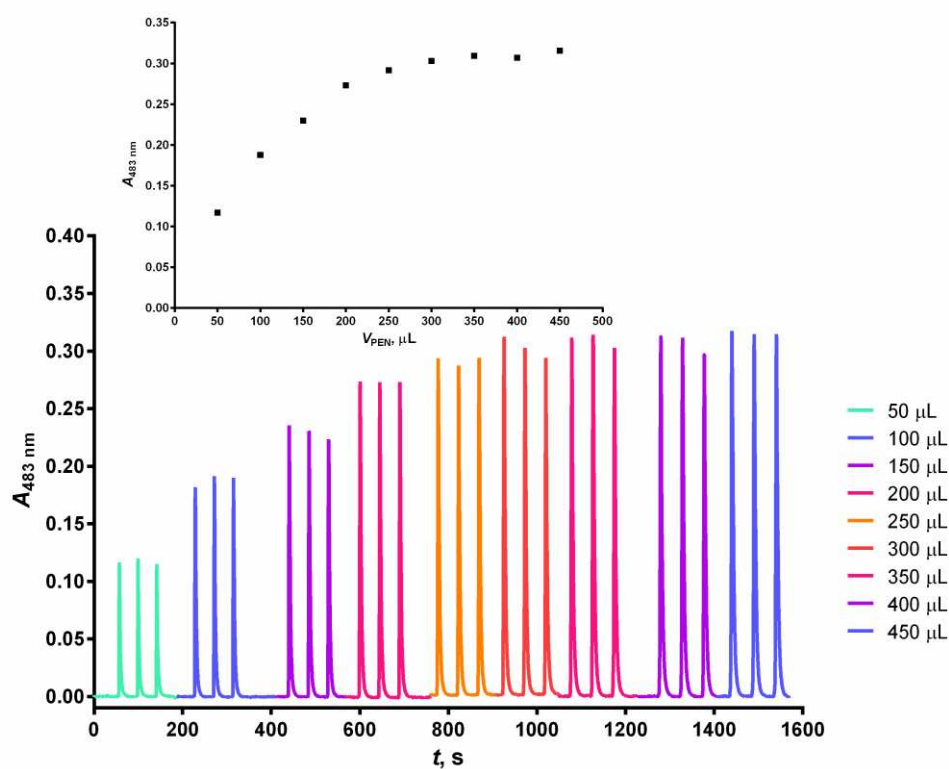
Optimizacija volumena injektiranja reagensa se provodi kako bi odredili optimalni volumen otopine reagensa s kojim se ostvaruje potpunost reakcije uz viši signal i brzi povrat na baznu liniju. Veći volumen otopine reagensa ne znači nužno i viši signal, a rezultira širom zonom, širim signalom i sporijim povratkom na baznu liniju. Nadalje, veća brzina protoka struje reagensa znači i veću potrošnju istog, te povećanje količine otpada što dovodi do smanjenja ekonomičnosti analize. Volumeni otopine reagensa ispitivani su u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Razmatrajući ponovljivost rezultata i visinu analitičkog signala, za optimalni volumen injektiranja reagensa je odabran volumen od 150  $\mu\text{L}$ . Odabrani volumen reagensa je korišten u sljedećim mjerenjima optimizacije ostalih parametara.



**Slika 26.** Siagram optimizacije volumena injektiranja otopine reagensa. Volumen injektiranja reagensa ( $V_{RS}$ ): a) 30  $\mu\text{L}$ ; b) 100  $\mu\text{L}$ ; c) 150  $\mu\text{L}$ ; d) 200  $\mu\text{L}$ ; e) 250  $\mu\text{L}$ ; f) 300  $\mu\text{L}$ ; g) 350  $\mu\text{L}$ ; h) 400  $\mu\text{L}$ ; i) 450  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{CS} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete = 30  $\mu\text{L}$ ;  $V_{HC} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranja otopine reagensa za određivanje PEN-a.

### 4.3.5. Optimizacija volumena injektiranja analita

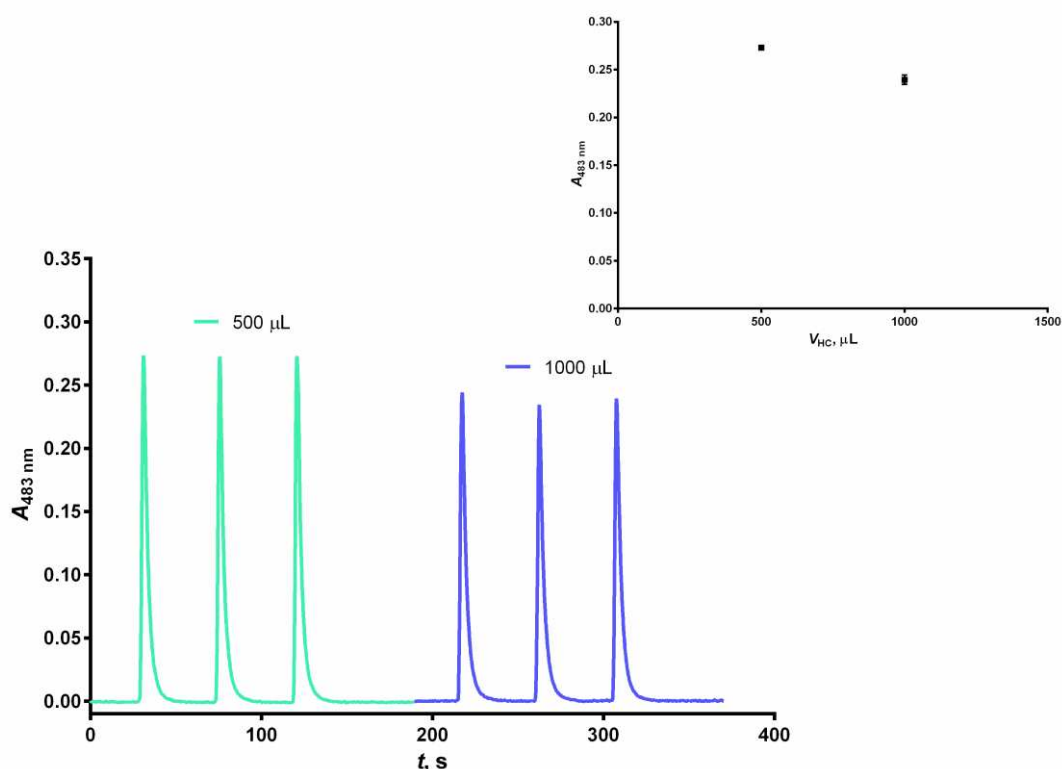
Veći volumen injektiranja otopine analita dovodi do povećanja analitičkog signala. Veliki volumen injektiranja otopine analita također dovodi i do dužeg vremena povratka na baznu liniju što rezultira smanjenjem učestalosti analize. Ispitivani su volumeni u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Rezultati pokazuju kako do značajnijeg povećanja analitičkog signala dolazi u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 200  $\mu\text{L}$ , dok daljnje povećanje volumena injektiranja analita iznad 200  $\mu\text{L}$  nema značajnijeg utjecaja na visinu analitičkog signala (plato). Odabran je volumen injektiranja analita od 200  $\mu\text{L}$  (zadovoljena osjetljivost i učestalost metode) te je isti korišten u sljedećim mjerenjima optimizacije ostalih parametara.



**Slika 27.** Siagram optimizacije volumena injektiranja otopine analita. Volumen injektiranja analita ( $V_a$ ): a) 30  $\mu\text{L}$ ; b) 100  $\mu\text{L}$ ; c) 150  $\mu\text{L}$ ; d) 200  $\mu\text{L}$ ; e) 250  $\mu\text{L}$ ; f) 300  $\mu\text{L}$ ; g) 350  $\mu\text{L}$ ; h) 400  $\mu\text{L}$ ; i) 450  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{\text{RS}} = 150 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete = 30  $\mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 1000 \mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu injektiranja otopine analita za određivanje PEN-a.

#### 4.3.6. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

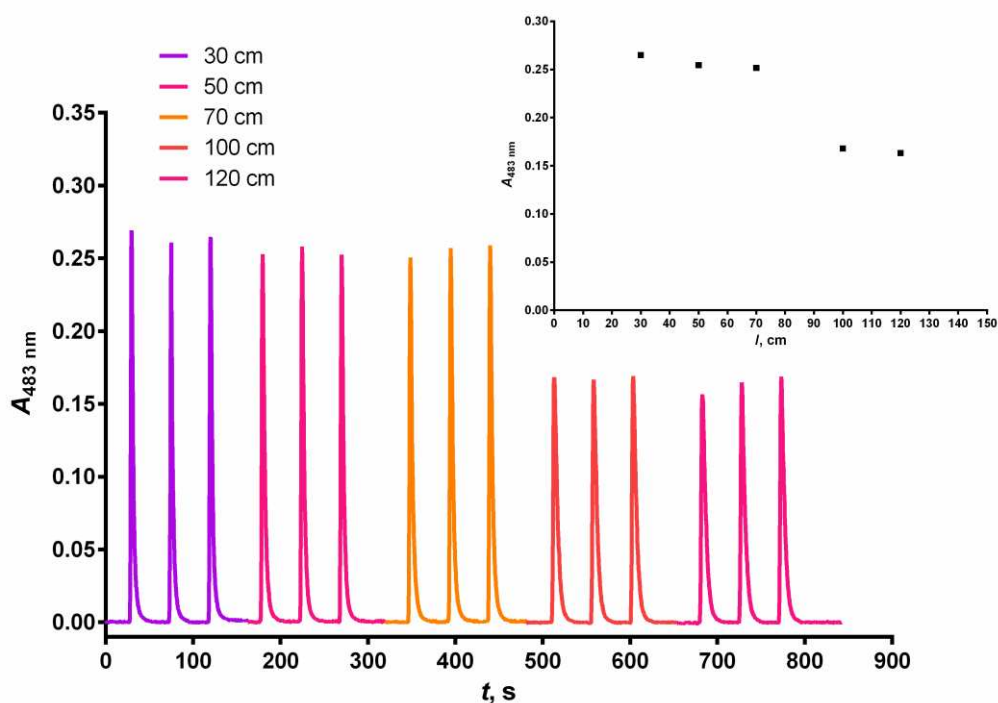
Prilikom optimizacije volumena petlje zadržavanja su korištene petlje volumena od 500  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$ . Obje petlje zadržavanja su rezultirale sličnim visinama analitičkog signala, ali je odabrana petlja zadržavanja volumena od 500  $\mu\text{L}$  kao optimalna zbog ekonomičnosti analize i ponovljivosti signala.



**Slika 28.** Siagram optimizacije volumena petlje zadržavanja. Volumen petlje zadržavanja ( $V_{\text{HC}}$ ): a) 500  $\mu\text{L}$ ; b) 1000  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{\text{RS}} = 150 \mu\text{L}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete = 30  $\mu\text{L}$ ;  $l = 70 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o volumenu petlje zadržavanja za određivanje PEN-a.

#### 4.3.7. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice (reaktora)

Za optimizaciju reaktora su korištene uzvojnice duljina u rasponu od 30 cm do 120 cm. Potpunost reakcije ovisi o duljini reaktora. Ukoliko je uzvojnica prekratka, sporije kemijske reakcije mogu imati manji doseg, dok korištenjem predugih uzvojnica, visine analitičkog signala se smanjuju jer dolazi do većeg raspršenja zone uzorka. Prilikom optimizacije je uzvojnica duljine od 30 cm odabrana kao optimalna s obzirom na najveću vrijednost analitičkog signala i ponovljivost mjerenja.



**Slika 29.** Siagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice (reaktora). Duljina reaktora ( $l$ ): a) 30 cm; b) 40 cm; c) 50 cm; d) 60 cm; e) 70 cm; f) 100 cm; g) 120 cm. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{\text{RS}} = 150 \mu\text{L}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete =  $30 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 500 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije o duljini reaktora za određivanje PEN-a.



#### 4.4. Odabrani optimalni parametri

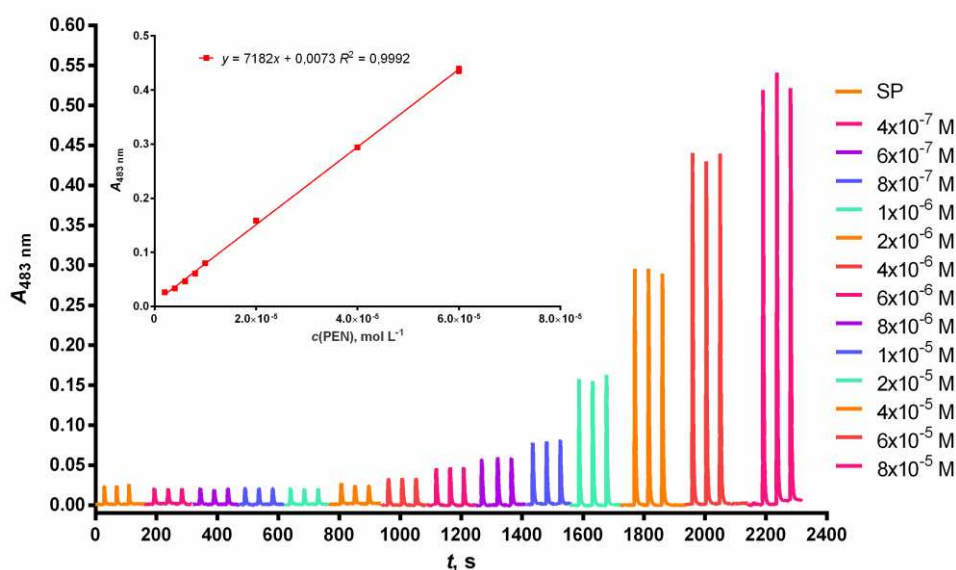
**Tablica 2.** Prikaz raspona ispitanih vrijednosti i odabranih optimalnih parametara

Parametar	Ispitane vrijednosti	Optimalna vrijednost
pH-vrijednost	2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0;9,0;	5,0
Molni omjer $\text{Cu}^{2+}$ i BCS-a	1 : 1,0; 1 : 1,5; 1 : 2,0; 1 : 3,0;	1 : 2,0
Redoslijed injektiranja	RS/PEN; PEN/RS;	RS/PEN
Volumen protočne kivete, $\mu\text{L}$	18; 30; 80; 160;	30
Volumen protoka otopine nosioca, $\mu\text{L}/\text{min}$	500; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000;	5000
Volumen injektiranja reagensa, $\mu\text{L}$	50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450;	150
Volumen injektiranja analita, $\mu\text{L}$	50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450;	200
Volumen petlje zadržavanja, $\mu\text{L}$	500; 1000;	500
Duljina reakcijske uzvojnice, cm	30; 40; 50; 60; 70; 100; 120;	30

## 4.5. Analitičke karakteristike metode

### 4.5.1. Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje (LDP)

Za potrebu određivanja analitičkih karakteristika metode, s obzirom na prethodno utvrđene i odabrane optimalne parametre, izveden je niz kinetičkih mjerenja za standardne otopine PEN-a točno poznatih raspona koncentracija, gdje je svaki uzorak otopine izmjeren u triplikatu. Pripremljene standardne otopine analita u koncentracijskom rasponu od  $4,0 \times 10^{-7}$  M do  $8,0 \times 10^{-5}$  M su injektirane uzastopno tri puta za svaku pojedinu koncentraciju. Iz pojedinačnih apsorbancija koje su zabilježene tijekom mjerenja za svaki triplikat je izračunana srednja vrijednost apsorbancije. Za ovu metodu je ostvaren LDP u koncentracijskom rasponu od  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $6,0 \times 10^{-5}$  M (Slika 30.) i pomoću Microsoft Office Excel-a je izrađena krivulja umjeravanja. Linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije ( $y$  = apsorbancija;  $x$  = koncentracija) je određena jednadžba pravca:  $y = 7182x + 0,0073$  uz koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9992$ .



**Slika 30.** Siagram spektrofotometrijskog određivanja PEN-a. Koncentracijski raspon PEN-a:  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $8,0 \times 10^{-5}$  M. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4}$  M;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4}$  M; pH = 5;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{\text{RS}} = 150 \mu\text{L}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete =  $30 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 30 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Umetak: Grafički prikaz LDP-a određivanja PEN-a.

#### 4.5.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se uz odgovarajuću točnost, kao i preciznost, može dokazati, ali ne i odrediti u nekom određenom uzorku [68]. Izračunava se na sljedeći način pomoću jednadžbe:

$$D_L = 3 \times s_b / m \quad (4 - 2)$$

Granica određivanja (engl. *Limit of quantification*, LOQ) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati i odrediti te je ujedno i donja granica linearnog dinamičkog područja. Izračunava se na sljedeći način pomoću jednadžbe:

$$Q_L = 10 \times s_b / m \quad (4 - 3)$$

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib pravca krivulje umjeravanja [68].

U skladu s opisanim, izračunane su LOD i LOQ ove metode, gdje je  $LOD = 6,0 \times 10^{-7}$  M i  $LOQ = 2 \times 10^{-6}$  M.

#### 4.5.3. Interferencije

S obzirom da se uz PEN redovito nalaze pomoćne tvari, koje se dodavaju tijekom proizvodnje komercijalno dostupnih farmaceutskih pripravaka, ispitan je njihov utjecaj na određivanje PEN-a. Uz pomoćne tvari postoje i druge tvari koje mogu imati interferirajući utjecaj prilikom određivanja PEN-a pa je ispitan i njihov utjecaj. Tijekom mjerenja je ispitan utjecaj spomenutih interferirajućih tvari pri koncentraciji PEN-a od  $2,0 \times 10^{-5}$  M, gdje su njihove koncentracije pripremljenih otopina bile 500 puta veće od same koncentracije analita (takve ne nalazimo u farmaceutskim pripravcima), izuzev acetilsalicilne kiseline čija je koncentracija bila jednaka onoj od PEN-a.

Granica tolerancije se definira kao koncentracija interferencije koja bi tijekom mjerenja pokazala pogrešku manju od  $\pm 5\%$ . Izračunava se na sljedeći način:

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

Srednja vrijednost apsorbancije PEN-a,  $c(\text{PEN}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  pri  $\lambda = 483 \text{ nm}$  iznosila je 0,1695.

**Tablica 3.** Utjecaj interferencija na određivanje PEN-a

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija; $c(\text{PEN}) / c(\text{interferirajuća tvar})$	Relativna pogreška; %
Glukoza	1 : 500	-4,52
Fruktoza	1 : 500	-1,49
KNO <sub>3</sub>	1 : 500	-3,36
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 : 250	2,30
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 : 100	-3,76
Natrijev citrat	1 : 100	-0,90
Saharoza	1 : 50	-1,47
Laktoza	1 : 10	-4,38
Tartaratna kiselina	1 : 5	-2,64
Limunska kiselina	1 : 0,5	4,52

Kod interferencija kod kojih je pogreška veća od  $\pm 5\%$ , ponovljena su mjerenja kako bi se utvrdile maksimalne koncentracije interferirajućih tvari uz koje je moguće određivanje PEN-a. Unatoč smanjenim koncentracijama interferirajućih tvari, one su i dalje mnogo veće u odnosu na one koje se nalaze u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

#### 4.5.4. Točnost (iskoristivost)

Točnost metode se odnosi na slaganje rezultata i prave vrijednosti [69]. Točnost ili iskoristivost metode je njena sposobnost da izmjeri poznatu količinu tvari, a ispitana je pomoću 6 radnih otopina koje su pripravljene na način da su se u otopinu realnog uzorka dodavale određene koncentracije standardne otopine PEN-a. Za otopinu realnog uzorka su korištene tablete METALCAPTASE<sup>®</sup> (vidi poglavlje 3.1.7. Otopina realnog uzorka). Dobivena apsorbancija je potom uvrštena u jednadžbu pravca te je izračunana stvarna koncentracija, a zatim i eksperimentalna masa PEN-a u otopinama, koja je onda uspoređivana sa teorijskom masom PEN-a.

Otopina standarda penicilamina je pripravljena otapanjem 10 mg penicilamina u 10 mL acetatno-boratno-fosfornom puferu pH-vrijednosti 2 te je nadopunjena deioniziranom vodom do mjerne oznake na odmjernoj tikvici od 50 mL. Masena koncentracija pripravljene otopine iznosi 0,2 g/L:

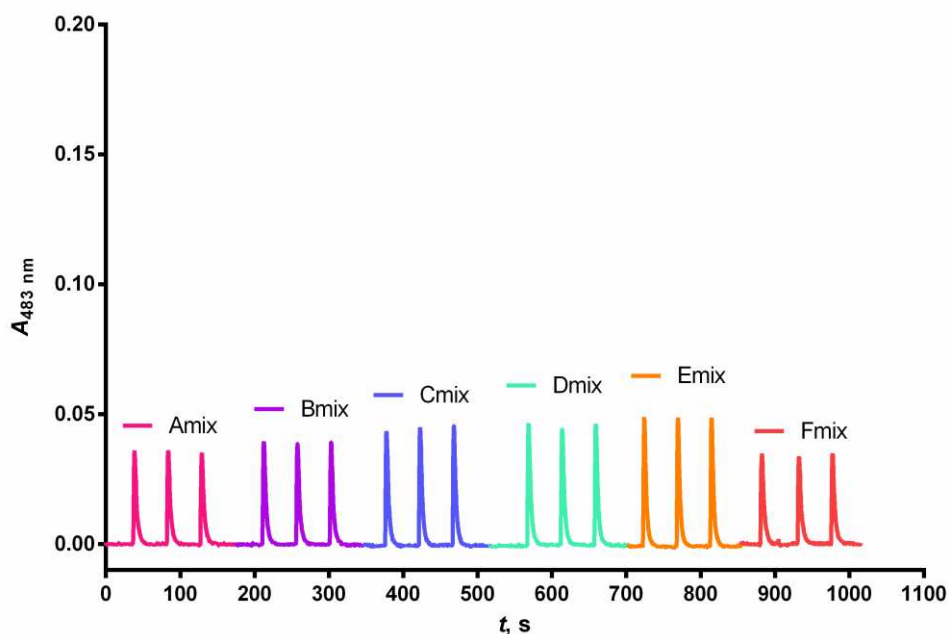
$$\gamma = \frac{m(\text{PEN})}{V_{\text{ot}}} = \frac{10 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} = 0,2 \text{ g/L} \quad (4 - 5)$$

Iz navedenog slijedi da je množinska koncentracija otopine PEN-a:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{PEN})}{M(\text{PEN})} = \frac{0,2 \text{ g/L}}{149,2 \text{ g/L}} = 1,34 \times 10^{-3} \text{ M} \quad (4 - 6)$$

Zatim slijedi razrjeđenje pripravljene otopine PEN-a,  $c = 1,34 \times 10^{-3} \text{ M}$ , gdje se prenosi alikvot od 1 mL u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopunjuje sa acetatno-boratno-fosfornim puferom pH-vrijednosti 2 do mjerne oznake. Množinska koncentracija dobivene otopine iznosi  $1,34 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

U novu odmjernu tikvicu volumena 10 mL se odpipetira alikvot od 3 mL prethodno pripremljene standardne otopine penicilamina. Zbog toga je nova množinska koncentracija,  $c_2 = 4,02 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $F_{\text{mix}}$ ).



**Slika 31.** Siagram određivanja PEN-a (teorijska koncentracija):  $c(A_{\text{mix}}) = 4,02 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $c(B_{\text{mix}}) = 4,69 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $c(C_{\text{mix}}) = 5,36 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $c(D_{\text{mix}}) = 6,03 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $c(E_{\text{mix}}) = 6,70 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $c(F_{\text{mix}}) = 4,02 \times 10^{-6} \text{ M}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 5$ ;  $Q_{\text{CS}} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{\text{RS}} = 150 \mu\text{L}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete =  $30 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{HC}} = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 30 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tablica 4.** Ispitivanje iskoristivosti

Radna otopina	Masa analita (realni uzorak), mg	Dodana masa analita (standard), mg	Ukupna teorijska masa, mg	Izračunana masa, mg	Iskoristivost, %
$A_{\text{mix}}$	300	-	300	302,14	-
$B_{\text{mix}}$	300	50	350	338,12	96,61
$C_{\text{mix}}$	300	100	400	396,27	99,07
$D_{\text{mix}}$	300	150	450	409,39	90,98
$E_{\text{mix}}$	300	200	500	441,22	88,24
$F_{\text{mix}}$	300	-	300	288,63	-

Iskoristivost (%) je bila u rasponu od 88,24 % do 99,07%. Ovakvi rezultati podržavaju zadovoljavajuću točnost razvijene kinetičke metode kao i odsutnost interferencija u uzorcima. Ovakva razvijena metoda, bez prethodne zahtjevne obrade realnog uzorka, može se primijeniti za određivanje PEN-a u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

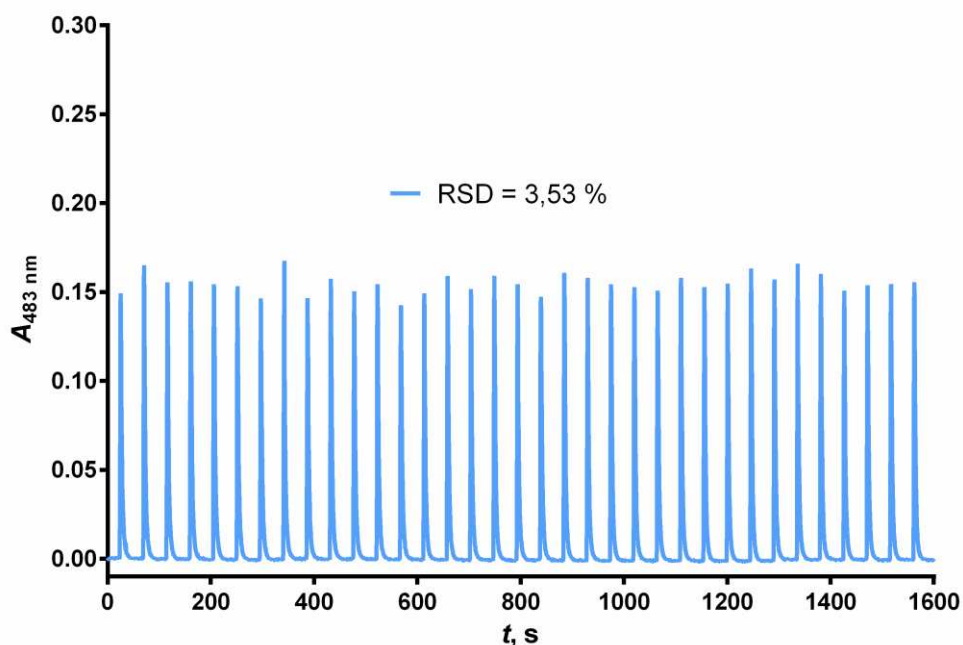
#### 4.5.5. Ponovljivost

Ponovljivost SIA metode je ispitana mjerenjem signala niza od 35 uzastopnih injektiranja standardne otopine PEN-a,  $c = 2,0 \times 10^{-5}$  M, a izražava se reativnim standardnim odstupanjem (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD):

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4 - 7)$$

gdje  $s$  predstavlja standardno odstupanje, a  $\bar{x}$  predstavlja sredinu skupa podataka.

Pomoću ovog matematičkog izraza (4 – 7) za ovu metodu je izračunan RSD i iznosila je 3,53 %.



**Slika 32.** Siagram ponovljivosti optimizirane metode. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{PEN}) = 2,0 \times 10^{-5}$  M;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4}$  M;  $c(\text{BCS}) = 6,4 \times 10^{-4}$  M; pH = 5;  $Q_{CS} = 5000 \mu\text{L}/\text{min}$ ;  $V_{RS} = 150 \mu\text{L}$ ;  $V_a = 200 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete =  $30 \mu\text{L}$ ;  $V_{HC} = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 30 \text{ cm}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ;  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

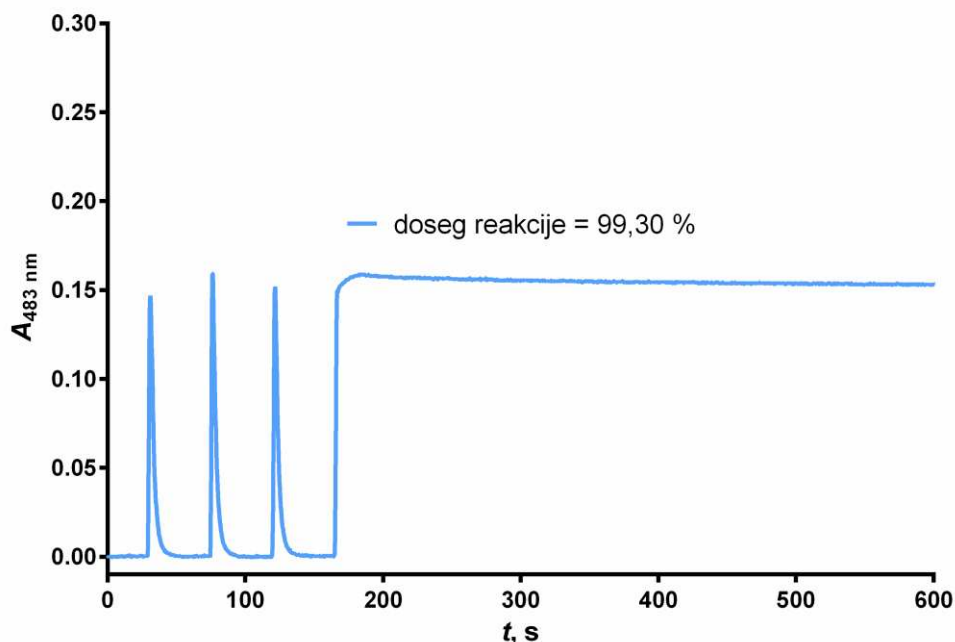


#### 4.5.6. Učestalost analize

S obzirom na ponovljivost analitičkog signala razvijene SIA metode, utvrđena je i učestalost analiza koja predstavlja broj uzoraka koji se mogu analizirati unutar sat vremena. Važnost ovog parametra je u ekonomičnosti samih analiza kad se radi o analizi većeg broja uzoraka. Injektiranjem standardne otopine PEN-a,  $c = 2,0 \times 10^{-5}$  M, u različitim vremenskim intervalima pratila se visina analitičkog signala kao i povratak na baznu liniju. Za analizu jednog uzorka (tri mjerenja, triplikata) je potrebno prosječno 150 sekundi ( $\Delta t = 50$  s). U skladu s navedenim, moguće su 24 analize u triplikatu unutar jednog sata (3600 sekundi), odnosno 72 analiza/h.

#### 4.5.7. Doseg reakcije

Doseg ili potpunost reakcije se ispituje metodom zaustavljenog protoka ( $Q$ ) u trenutku kad je postignuta maksimalna visina analitičkog signala (engl. *Stop Flow*). Kemijska reakcija postiže značajan doseg od 99,30 % u odnosu na onu koja bi se pri zadanim uvjetima mogla ostvariti za zaustavljeni protok.



Slika 33. Prikaz zaustavljenog protoka u trenutku kad je postignuta maksimalna visina signala.

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

Tablete METALCAPTASE<sup>®</sup> 300 mg su korištene za pripravu otopine realnog uzorka. Otopina realnog uzorka je pripravljena (vidi poglavlje 3.1.7. Otopina realnog uzorka ) te su izmjerene apsorbancije (triplikat).

**Tablica 5.** Izmjerene apsorbancije realnog uzorka

Uzorak, broj mjerenja	Apsorbancija, A
A1	0,2925
A2	0,2952
A3	0,2899

Srednja vrijednost apsorbancije iznosi 0,2925. Ova vrijednost apsorbancije je uvrštena u jednadžbu pravca  $y = 7182x + 0,0073$ , pomoću koje je izračunana koncentracija PEN-a.

$$y = 7182x + 0,0073$$

$$0,2925 = 7182 \times c_2(\text{PEN}) + 0,0073$$

$$c_2(\text{PEN}) = 3,971 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Koncentracija PEN-a u 100 mL iznosi:

$$c_1(\text{PEN}) \times 1 \text{ mL} = 3,971 \times 10^{-5} \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$c_1(\text{PEN}) = 3,971 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Masa PEN-a jednaka je:

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

$$m(\text{PEN}) = c_1 \times M(\text{PEN})$$

$$m(\text{PEN}) = 3,971 \times 10^{-3} \text{ M} \times 0,5 \text{ L} \times 149,21 \text{ g/mol}$$

$$m(\text{PEN}) = 0,29626 \text{ g} = 296,26 \text{ mg}$$

U METALCAPTASE<sup>®</sup> tabletama deklarirana masa penicilamina je 300 mg, a pomoću ove optimizirane i vrednovane SIA metode je dobivena vrijednost mase penicilamina realnog uzorka METALCAPTASE<sup>®</sup> tablete od 296,26 mg.

#### 4.7. Usporedba razvijene metode određivanja penicilamina sa standardnom metodom koju propisuje Farmakopeja

U preporučenoj metodi određivanja penicilamina kao čiste djelatne tvari, Britanska farmakopeja opisuje potenciometrijsku titrimetrijsku metodu u nevodenom mediju (vidi poglavlje 3.1.8.). U volumenu od 30 mL bezvodne octene kiseline se otopi 100 mg penicilamina i potom se titrira sa 0,1 M perklornom kiselinom. Metodom prve i druge derivacije se odredila završna točka titracije, gdje je volumen utrošenog titranta,  $V_{t.e.}$ , (perklorne kiseline) u točki ekvivalencije iznosio 3,84 mL.

Svaki mL utrošenog volumena titranta,  $c(\text{perklorna kiselina}) = 0,1 \text{ M}$ , je ekvivalentan 14,92 mg penicilamina:

$$1 \text{ mL} = 14,92 \text{ mg PEN-a}$$

$$\text{Prosječna masa 1 tablete} = 0,5344 \text{ g} = 534,4 \text{ mg}$$

$$\text{Masa odvage} = 0,1002 \text{ g} = 100,2 \text{ mg}$$

$$\text{Volumen titranta} = 3,84 \text{ mL}$$

$$m(\text{PEN}) = (14,92 \text{ mg} \times 3,84 \text{ mL}) / 1 \text{ mL} = 57,3 \text{ mg} \quad (\text{u } 100,2 \text{ mg odvage tablete})$$

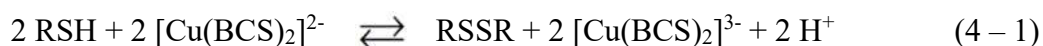
$$m(\text{PEN}) = (534,4 \text{ mg} \times 57,3 \text{ mg}) / 100,2 \text{ mg} = 305,6 \text{ mg} \quad (\text{u prosječnoj masi 1 tablete})$$

**Tablica 6.** Usporedba rezultata SIA metode i metode koju propisuje Britanska farmakopeja

Uzorak	Deklarirano, mg	Korištena SIA metoda, mg	Standardna metoda prema Farmakopeji, mg
METALCAPTASE <sup>®</sup>	300	296,26	305,6

## **5. RASPRAVA**

Cilj eksperimentalnog dijela je razvoj i vrednovanje metode određivanja penicilamina analizom slijednim injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj analit, PEN, reducira bis(batokuproin)kuprat(II) kompleks u narančasto obojeni bis(batokuproin)kuprat(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum nastalog narančasto obojenog kompleksa uz spektrofotometrijski detektor je zabilježen pri valnoj duljini od 483 nm.



Mjerene apsorbancije su bilježene u kinetičkom dijelu odvijanja reakcije, zbog čega je prilikom samog razvoja metode posebna pozornost posvećena optimizaciji parametara, kako kemijskih, tako i parametara SIA sustava, koji bi mogli uvelike utjecati na odvijanje redoks reakcije.

Utjecaj pH-vrijednosti pripremljene otopine je ispitan u rasponu od 2,0 do 9,0 pomoću acetatno-boratno-fosfornog pufera te je maksimalna apsorbancija zabilježena pri pH-vrijednosti 5,0. U daljnjim mjerenjima korišten je acetatni pufer, koji odgovara optimalnoj pH vrijednosti. Po visini analitičkog signala, triplikati mjereni pri pH-vrijednosti 5,0 i 6,0, su bili ponovljivi i skoro jednaki, ali je standardna devijacija (raspršenje) puno manja kod signala pri pH-vrijednosti 5,0 i budući da PEN pripada skupini tiolnih spojeva, veća je stabilnost i potpunost reakcije pri nižoj pH-vrijednosti.

Prilikom optimizacije molnog omjera  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a, molni omjer je mijenjan u rasponu od 1 : 1,0 do 1 : 3,0. Molni omjer 1 : 2,0 se pokazao optimalnim jer se kod tog omjera postiže najveća brzina reakcije i apsorbancija te daljnjim povećanjem koncentracije BCS-a ne postoji daljnje povećanje signala nego su ostvarene konstantne vrijednosti.

Tijekom optimizacije ispitani su slijedeći parametri protočnog sustava: redoslijed injektiranja, volumen protočne kivete, volumni protok otopine nosioca (osnovne otopine), volumen injektiranja reagensa, volumen injektiranja analita, volumen petlje zadržavanja i duljina reaktora tj. reakcijske uzvojnice.

Ispitana su dva različita redoslijeda injektiranja, gdje je viši analitički signal zabilježen ukoliko se prvo injektira reagens, a potom analit.

U postupku optimizacije volumena protočne kivete ispitani su volumeni u rasponu od 18  $\mu\text{L}$  do 160  $\mu\text{L}$ . Optimalni volumen protočne kivete, pri kojoj je zabilježen najviši signal, je 30  $\mu\text{L}$ .

Kod ispitivanja optimalnog volumena protoka otopine nosioca, ispitani su volumni protoci od 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  do 6000  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Odabirom 5000  $\mu\text{L}/\text{min}$  kao optimalne vrijednosti parametra je postignuta najbolja osjetljivost metode, učestalost mjerenja kao i dobra ponovljivost mjerenja.

Tijekom daljnjih ispitivanja, optimiziran je volumen injektiranja reagensa. Ispitani su volumeni u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Uzimajući u obzir ekonomičnost analize, ponovljivost analize kao i vrijednosti zabilježenih signala, volumen injektiranja reagensa od 150  $\mu\text{L}$  je odabran kao optimalan.

Također, optimiziran je i volumen injektiranja analita. Ispitani su volumeni u rasponu od 50  $\mu\text{L}$  do 450  $\mu\text{L}$ . Povećanjem volumena od 50  $\mu\text{L}$  do 200  $\mu\text{L}$  je primjećeno značajno povećanje analitičkog signala, gdje daljnjim povećanjem iznad 200  $\mu\text{L}$  nema razlike u visini signala (postignute su konstantne vrijednosti). Zbog zadovoljavajuće visine signala kao i zbog postignute osjetljivosti metode te učestalosti mjerenja, volumen injektiranja analita od 200  $\mu\text{L}$  je odabran kao optimalan.

Imajući u vidu prethodno optimizirane volumene injektiranja, kako reagensa, tako i analita, ispitan je utjecaj volumena petlje zadržavanja od 500  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$ . Odabrana je petlja zadržavanja od 500  $\mu\text{L}$  zbog zadovoljavajuće visine signala, potpunosti reakcije, učestalosti mjerenja.

Naposljetku je ispitan i utjecaj duljine reakcijske uzvojnice koristeći duljine uzvojnice od 30 cm do 120 cm. Pri odabranoj duljini od 30 cm je zabilježen najviši signal.

Nakon optimizacije svih gore prethodno navedenih parametara, određeno je linearno dinamičko područje za ovu razvijenu metodu. Mjerenjem niza pripremljenih standardnih otopina analita u koncentracijskom rasponu od  $4,0 \times 10^{-7}$  M do  $8,0 \times 10^{-5}$  M, utvrđeno je linearno dinamičko područje u rasponu koncentracija od  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $6,0 \times 10^{-5}$  M. Dobivena je krivulja umjeravanja  $y = 7182x + 0,0073$ , a koeficijent linearne regresije,  $R^2$ , iznosi 0,9992. Također, izračunane su granica određivanja,  $LOD = 6,0 \times 10^{-7}$  M i granica dokazivanja,  $LOQ = 2 \times 10^{-6}$  M.

Tijekom mjerenja je provjeren i utjecaj interferirajućih tvari koje se nalaze kao pomoćne tvari u komercijalno dostupnim pripravcima. Ispitan je njihov utjecaj u 500 puta većoj koncentraciji (u odnosu na PEN), puno većim koncentracijama i od koncentracija koje se nalaze u farmaceutskim pripravcima. Jedino je koncentracija aspirina (acetilsalicilna kiselina) bila jednaka koncentraciji PEN-a. Kod interferencija u omjeru od 500:1 ( $H_3BO_3$ ,  $Na_2SO_4$ , natrijev citrat, saharoza, laktoza, tartaralna kiselina i limunska kiselina) kod kojih je pogreška bila veća od  $\pm 5\%$ , su ponovljena mjerenja kod smanjenih koncentracija sve dok nisu utvrđene granice tolerancije (Tablica 3.).

Točnost metode je ispitana mjerenjem apsorbancije 6 radnih otopina koje su pripravljene na način da se u otopinu realnog uzorka dodavao određeni volumen standardne otopine. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije su izračunane njihove koncentracije ( $c_{\text{eksperiment}}$ ) koje su potom uspoređivane sa njihovim teoretskim koncentracijama ( $c_{\text{teorijska}}$ ). Za svaku koncentraciju je izračunana iskoristivost, koja je bila u rasponu od 88,24 % do 99,07%, što čini razvijenu metodu zadovoljavajuće točnom.

Ponovljivost metode je ispitana za niz od 35 uzastopnih injektiranja otopine PEN-a,  $c(\text{PEN}) = 2,0 \times 10^{-5}$  M. Izračunano je relativno standardno odstupanje (RSD) koje iznosi 3,53 %. Iz istih podataka je utvrđena i učestalost mjerenja. Unutar sat vremena, mogu se provesti 24 analize u triplikatu, odnosno 72 analiza/h.

Doseg reakcije je ispitivan zaustavljanjem protoka u trenutku kada je maksimalna visina analitičkog signala postignuta te je ona iznosila 99,30 %

Konačno je razvijena metoda primjenjena za analizu realnog uzorka, tj. za određivanje PEN-a u komercijalnim farmaceutskim pripravcima, METALCAPTASE<sup>®</sup> 300 mg tableta (Heyl Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Njemačka). Kao metoda za usporedbu je korištena metoda koju propisuje Britanska farmakopeja, potenciometrijska titrimetrijska metoda. Rezultati mjerenja dobiveni razvijenom SIA metodom slažu se sa rezultatima mjerenja standardne metode koju propisuje Farmakopeja.



## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj istraživanja u ovom radu je bila optimizacija i vrednovanje kinetičke metode analize slijednim injektiranjem za određivanje penicilamina. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj tiolna skupina penicilamina reducira bis(batokuproin)kuprat(II) kompleks u bis(batokuproin)kuprat(I) kompleks. Takav narančasto obojeni kompleks postiže svoj apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm.

Optimizacijom kemijskih parametara, kao i parametara SIA sustava, odabrani su sljedeći optimalni parametri: pH-vrijednost 5,0; molni omjer  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a = 1 : 2,0; volumen protočne kivete 30  $\mu\text{L}$ ; volumni protok otopine nosioca 5000  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; volumen injektiranja reagensa 150  $\mu\text{L}$ ; volumen injektiranja analita 200  $\mu\text{L}$ ; volumen petlje zadržavanja 500  $\mu\text{L}$  i duljina reakcijske uzvojnice 30 cm.

Zatim su određene analitičke karakteristike metode. Linearna ovisnost analitičkog signala o koncentraciji analita (PEN) je utvrđena za koncentracijsko područje od  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $6,0 \times 10^{-5}$  M. Jednadžba krivulje umjeravanja glasi:  $y = 7182x + 0,0073$ , a koeficijent linearne regresije,  $R^2$ , iznosi 0,9992. Izračunane su LOD i LOQ razvijene metode, gdje je  $\text{LOD} = 6,0 \times 10^{-7}$  M i  $\text{LOQ} = 2 \times 10^{-6}$  M.

Vrednovanje metode je ustanovljeno određivanjem mogućih interferencija, točnosti (iskoristivosti) metode, ponovljivosti (RSD) analiza, učestalosti analize, dosega (potpunosti) reakcije. Ispitan je utjecaj interferencija pratećih tvari i interferencija kemijskih vrsta koje mogu utjecati na ionsku jakost mjerne otopine ili kompleksirati reagens. Utvrđene su minimalne koncentracije koje izazivaju relativnu pogrešku manju od  $\pm 5\%$ . Sve utvrđene koncentracije značajno su više od moguće prisutnih u farmaceutskim pripravcima ili mjernoj otopini. Iskoristivost razvijene metode je utvrđena u rasponu od 88,24 % do 99,07%. Metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost uz RSD koje iznosi 3,53 %. Omogućene su 24 analize u triplikatu unutar sat vremena, odnosno 72 analize/h. Doseg redoks reakcije iznosi 99,30 %.

Zaključno, razvijena i vrednovana metoda analize slijednog injektiranja za određivanje penicilamina je primijenjena za analizu realnog uzorka te su naposljetku uspoređeni rezultati koji su izmjereni prethodno navedenom metodom sa rezultatima koji su dobiveni analizom metode koju propisuje Britanska farmakopeja. Ovime je dokazana prikladnost razvijene i vrednovane metode za određivanje penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

## **7. LITERATURA**

- [1] Drug Bank [Internet]. Drug & Drug Target Database; Canada [citirano 17.7.2024.]. Dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00859>
- [2] Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13. izdanje. USA: McGraw-Hill Education; 2018. 1312-13 str.
- [3] Sweetman SC. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London. 2009. 1456 str.
- [4] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 17.7.2024.].  
Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillamine>
- [5] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 18.7.2024.].  
Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillamine#section=2D-Structure>
- [6] Sweetman SC. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London. 2009. 1458 str.
- [7] Drugs.com [Internet]. [citirano 19.7.2024.]. Dostupno na: <https://www.drugs.com/pro/penicillamine-capsules.html>
- [8] Sweetman SC. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London. 2009. 1457 str.
- [9] StatPearls [Internet]. Penicillamine. USA: StatPearls Publishing LLC.; 2024. [citirano 19.7.2024.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513316/>
- [10] Drug Bank [Internet]. Drug & Drug Target Database; Canada [citirano 19.7.2024.]. Dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00859>
- [11] Narodne novine d. d. [Internet]. Zagreb; [citirano 19.7.2024.]. Dostupno na: <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/368452.htm>
- [12] Gelbe liste [Internet]; Germany; [citirano 19.7.2024.]. Dostupno na: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Penicillamin\\_450](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Penicillamin_450)

- [13] Gelbe liste [Internet]; Germany; [citirano 20.7.2024.]. Dostupno na: [https://www.gelbe-liste.de/produkte/Metalcaptase-150-mg-magensaftresistente-Tablette\\_522479](https://www.gelbe-liste.de/produkte/Metalcaptase-150-mg-magensaftresistente-Tablette_522479)
- [14] Drugs.com [Internet]. [citirano 23.7.2024.]. Dostupno na: <https://www.drugs.com/drug-interactions/azathioprine-with-penicillamine-296-0-1814-0.html?professional=1>
- [15] Gelbe liste [Internet]; Germany; [citirano 23.7.2024.]. Dostupno na: [https://www.gelbe-liste.de/produkte/Metalcaptase-150-mg-magensaftresistente-Tablette\\_522479](https://www.gelbe-liste.de/produkte/Metalcaptase-150-mg-magensaftresistente-Tablette_522479)
- [16] Drugs.com [Internet]. [citirano 23.7.2024.] Dostupno na: <https://www.drugs.com/drug-interactions/clozapine-with-penicillamine-709-0-1814-0.html?professional=1>
- [17] Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Penicillamine. USA: Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2023. [citirano 24.7.2024.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501059/>
- [18] Drugs.com [Internet]. [citirano 24.7.2024.]. Dostupno na: <https://www.drugs.com/pregnancy/penicillamine.html>
- [19] Al-Majed A, Belal F, Julkhuf S. Penicillamine: Analytical Profile. U: Florey K, A. Al-Badr A, Indrayanto G, urednici. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Prvo izdanje. London: Academic Press; 2005. str. 133-43.
- [20] M. Naik R. Prasad S. Kumar B. Chand V. Kinetic assay of D-Penicillamine in pure and pharmaceutical formulations based on ligand substitution reaction. Microchemical Journal. 2013. (111): str 97-102.
- [21] Agarwal A. Prasad S. Naik R. Inhibitory kinetic spectrophotometric method for the quantitative estimation of D-penicillamine at micro levels. Microchemical Journal. 2016. doi:10.1016/j.microc.2016.04.005.
- [22] Elbashir AA. Awad SF. A New Spectrophotometric Method for Determination of Penicillamine in Pharmaceutical Formulation Using 1, 2-naphthoquin-4-sulfonate (NQS). Pharmacovigilance Review. 2013. doi: 10.4172/jp.1000105.
- [23] Forsman U. The stripping voltammetric pattern of cysteine and penicillamine at the mercury electrode in the presence of Cu(II). J. Electroanal. Chem. 1983. doi: 10.1016/S0022-0728(83)80047-3.

- [24] N. Chailapakul O. Electrochemical analysis of d-penicillamine using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. *Talanta*. 2002. doi: 10.1016/s0039-9140(02)00412-5.
- [25] Amarnath V. Amarnath K. Specific determination of cysteine and penicillamine through cyclization to 2-thioxothiazolidine-4-carboxylic acids. *Talanta*. 2002. doi: 10.1016/s0039-9140(01)00631-2.
- [26] Al-Majed A.A. Specific spectrofluorometric quantification of d-penicillamine in bulk and dosage forms after derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Analytica Chimica Acta*. 2000. doi:10.1016/S0003-2670(99)00869-7.
- [27] A Shaalan Rasha. Improved spectrofluorimetric methods for determination of penicillamine in capsules. *Open Chemistry*. 2010. doi: 10.2478/s11532-010-0049-4.
- [28] Martinović Bevanda A. Radić N. Kinetic potentiometric determination of penicillamine and A-Acetyl-L-cysteine based on reaction with iodate. *Acta Chimica Slovenica*. 2008. 56(2):503-506.
- [29] Kukoc-Modun L. Biocic M. Radić N. Flow-injection Determination of Glutathione, Penicillamine and Tiopronin Based on the Reduction of Copper(II)-neocuproine Reagent. *Croat. Chem. Acta*. 2020. 10.5562/cca3688.
- [30] Kukoč-Modun L. Biočić M. Radić Nj. Determination of penicillamine, tiopronin and glutathione in pharmaceutical formulations by kinetic spectrophotometry. *Acta Pharm.* 2021;71:619-30.
- [31] O. Suliman F.E. Al-Hinai M.M. Al-Kindy S.M.Z. Salama S.B. Enhancement of the chemiluminescence of penicillamine and ephedrine after derivatization with aldehydes using tris(bipyridyl)ruthenium(II) peroxydisulfate system and its analytical application. *Talanta*. 2008. doi: 10.1016/j.talanta.2007.08.040.
- [32] Biffar S. Greely V. Tibbetts D. Determination of penicillamine in encapsulated formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1985. doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90706-X.

- [33] Nakashima K. Ishimaru T. Kuroda N. Akiyama S. High-performance liquid chromatographic separation of penicillamine enantiomers labelled with N-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl)phenyl] maleimide on a chiral stationary phase. *Biomed Chromatogr.* 1995. doi: 10.1002/bmc.1130090207.
- [34] Nelson J. Nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determination of penicillamine in capsules. *Journal - Association of Official Analytical Chemists.* 1981. doi: 10.1093/JAOAC/64.5.1174.
- [35] 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. 21.
- [36] Pimenta A.M. Montenegro M.C.B.S.M. Araujo A.A.N. Martínez Calatayud J. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2006;40:17.
- [37] Tzanavaras PD. Karakosta TD. Automated tagging of pharmaceutically active thiols under flow conditions using monobromobimane. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(4):882-5.
- [38] O. Suliman FE. Al-Lawati HAJ. Al-Kindy SMZ. Nour IEM. Salama S.B. A sequential injection spectrophotometric method for the determination of penicillamine in pharmaceutical products by complexation with iron(III) in acidic media. *Talanta.* 2003;61:221-31.
- [39] O. Suliman FE. Al-Lawati HZ. Al-Kindy SMZ. A Spectrofluorimetric Sequential Injection Method for the Determination of Penicillamine Using Fluorescamine in the Presence of  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Fluorescence* 2008;18:1131–38.
- [40] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 680-82.
- [41] 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. 42-3.
- [42] Harvey D. *Modern Analytical Chemistry.* 1. Izdanje. USA: The McGraw-Hill Companies; 2000. Str 624.

[43] Pimenta A.M. Montenegro M.C.B.S.M. Araujo A.N. Martínez Calatayud J. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006; 40: str.17-18.

[44] Harvey D. *Modern Analytical Chemistry*. 1. Izdanje. USA: The McGraw-Hill Companies; 2000. Str 649.

[45] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 8. 8.2024.]. Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html>

[46] Aldstadt J. Olson Don C. Wolcott D. Marshall G. Stieg S. W. Flow and Sequential Injection Analysis Techniques in Process Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006. doi: 10.1002/9780470027318.a2104.

[47] Sklenarova H. Svoboda A. Solich P. Polasek M. Karlíček R. Simple Laboratory-Made Automated Sequential Injection Analysis (sia) Device. II. Sia Operational Software Based on LABVIEW® Programming Language. *Instrumentation Science & Technology*. 2002; 30(3):354.

[48] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 8. 8.2024.]. Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.2.%20Homogeneous%20Mixing%20and%20Concentration%20Gradients.html>

[49] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 8. 8.2024.]. Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.3.%20Mixing%20by%20Dispersion.html>

[50] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 8. 8.2024.]. Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.2.11.%20Mixing%20by%20Dispersion%20in%20Programmable%20Flow.html>



[51] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 19. 8. 2024.].

Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html>

[52] Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A. Flow Analysis: A Practical Guide. Elsevier. 2014;1: str. 10-13.

[53] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 19. 8. 2024.].

Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.htm>

[54] 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 farmaceutsim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 64.

[55] 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 farmaceutsim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 66.

[56] Mantim T, Chaisiwamongkhol K, Uraisin K, Hauser PC, Wilairat P, Nacapricha D. Dual-Purpose Photometric-Conductivity Detector for Simultaneous and Sequential Measurements in Flow Analysis. *Molecules*. 2020 May 13;25(10):2284. doi: 10.3390/molecules25102284.

[57] Flow Injection Tutorial: Theory – Flow Injection [Internet]. [citirano 19. 8. 2024.].

Dostupno na:

<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html>

[58] 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.

- [59] Radić Nj., Kukoč-Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003. str 6.
- [60] Harvey D. Modern Analytical Chemistry. 1. Izdanje. USA: The McGraw-Hill Companies; 2000. Str 384-88.
- [61] 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 farmaceutsim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.str. 71-78.
- [62] Vitha M F. Spectroscopy: principles and instrumentation 1.izdanje. New Jersey: John Wiley & Sons; 2018. str 52-79.
- [63] 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.
- [64] Al-Majed A., Belal F, Julkhuf S. Penicillamine: Analytical Profile. U: Florey K, A. Al-Badr A, Indrayanto G, urednici. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Prvo izdanje. London: Academic Press; 2005. str. 131-47.
- [65] The British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia 2022, Volume II, The British Pharmacopoeia Commission: London; 2022., str. 558.
- [66] Council of Europe, European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1, Council of Europe, Strasbourg, 2007, 516.
- [67] Kraljević T. Razvoj kinetičkih spektrofotometrijskih metoda određivanja etilnog estera N-acetil-L-cisteina (NACET) temeljenih na formiranju kromogenih kompleksa bakra(I) s različitim ligandima primjenom protočnih tehnika. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.
- [68] Radić Nj, Kukoč Modun L. Interna skripta za nastavne potrebe: Instrumentne metode analize u farmaciji. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 14-5.
- [69] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. Str.21.

## **8. SAŽETAK**

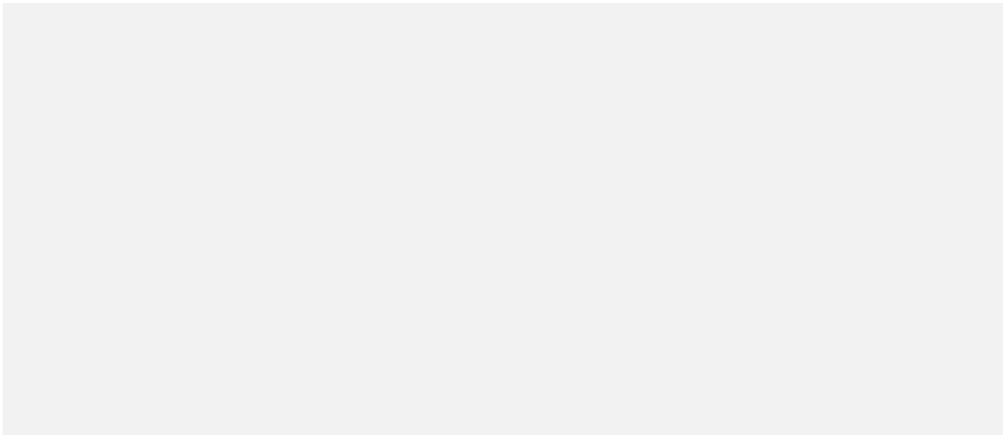
Korištenjem analize slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA), u ovom radu je razvijena i vrednovana nova metoda određivanja penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Temelj razvijene metode je redoks reakcija u kojoj penicilamin sudjeluje kao reducens. Penicilamin reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) u narančasto obojeni spoj bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Nastali spoj postiže maksimalnu apsorbciju pri valnoj duljini od 483 nm. Pri optimiziranim kemijskim uvjetima i uvjetima SIA sustava je ostvareno linearno dinamičko područje u rasponu koncentracija od  $2,0 \times 10^{-6}$  M do  $6,0 \times 10^{-5}$  M. Linearnom regresijskom analizom je dobivena krivulja umjeravanja, čija je jednadžba pravca  $y = 7182x + 0,0073$ . Izračunane su granica dokazivanja, LOD =  $6,0 \times 10^{-7}$  M i granica određivanja, LOQ =  $2 \times 10^{-6}$  M. Vrednovanjem metode su utvrđene i njene analitičke karakteristike: točnost uz iskoristivost u rasponu od 88,24 % do 99,07%, doseg reakcije od 99,30%, učestalost analize od 24 analize u triplikatu unutar jednog sata, tj. 72 analize/h, ponovljivost uz relativno standardno odstupanje od 3,53%. Osim acetilsalicilne kiseline,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SO_4$ , natrijeva citrata, saharoze, laktoze, tartaratne kiseline i limunske kiseline, ostale pomoćne tvari u 500 puta većoj koncentraciji ne interferiraju prilikom određivanja penicilamina u realnom uzorku. Vrednovana i razvijena metoda je uspoređena sa standardnom metodom koju propisuje Britanska farmakopeja te se pokazala kao prikladna metoda za određivanje penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima.

## **9. SUMMARY**

Using sequential injection analysis (SIA), a new method for the determination of penicillamine in commercial pharmaceutical preparations was developed and evaluated. The method is based on the redox reaction in which penicillamine participates as a reducing agent. Penicillamine reduces bis(bathocuproindisulfonato)cuprate(II) to the orange colored compound bis(bathocuproindisulfonato)cuprate(I). This compound achieves maximum absorbance at a wavelength of 483 nm. Using optimized chemical parameters and parameters of the SIA system, a linear dynamic range was achieved in the concentration range from  $2.0 \times 10^{-6}$  M to  $6.0 \times 10^{-5}$  M. A linear regression analysis was used to obtain a calibration curve, whose equation is the  $y = 7182x + 0.0073$ . The LOD and LOQ of the developed method were calculated, where LOD was  $6.0 \times 10^{-7}$  M and LOQ was  $2.0 \times 10^{-6}$  M. The validation of this method also determined its analytical characteristics, such as accuracy with a range of recovery from 88.24 % to 99.07%, reach of the reaction 99.30%, analysis frequency of 24 analyses in triplicate within one hour, 72 analyses/h, reproducibility with a relative standard deviation of 3.53%. Apart from acetylsalicylic acid,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SO_4$ , sodium citrate, sucrose, lactose, tartaric acid and citric acid, other excipients in a more concentrated amount do not interfere with the determination of penicillamine in a real sample of a pharmaceutical preparation. The evaluated and developed method was compared with the standard method prescribed by the British Pharmacopoeia and proved to be a suitable method for the determination of penicillamine in commercial pharmaceutical preparations.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNİ PODACI**



## **OBRAZOVANJE**

- 2014. – 2018., Gimnazija Marka Marulića, Tomislavgrad, BiH
- 2018. – 2024., Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

## **STRANI JEZICI**

- Engleski jezik (slušanje B2, čitanje B2, pisanje B1, govor B2, komunikacija sa govornikom B1)
- Njemački jezik (slušanje B1, čitanje B1, pisanje B1, govor B1, komunikacija sa govornikom B1)

## **NAGRADE I PRIZNANJA**

- Dobitnica Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh (težinski prosjek 4.7), 2022.
- Dobitnica Dekanove nagrade za doprinos ugledu Medicinskog fakulteta u Splitu, 2024.
- Dobitnica trećeg mjesta u likovnom natječaju (kategorija studenti) u sklopu projekta Prozori u svijetu umjetnosti 2024. „U librima Marulovim“, Sveučilište u Splitu



## **RADNO ISKUSTVO**

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

## **AKTIVNOSTI**

- predstavnik studenata farmacije, generacije 2018.
- članica studentskog zbora na Medicinskom fakultetu u Splitu (2022. – 2024.) i predstavnica studenata farmacije na Fakultetskom Vijeću (2022. – 2024.)
- članica Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA), podružnica Split (2021. – 2022.)
- PR CPSA, Split (2021. – 2022.)
- Koordinatorica CPSA natjecanja SPC (engl. *Scientific Poster Competiton*)
- Sudjelovanje na Plexus konferenciji, Split (2022.)
- Sponzor YISAC (engl. *Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry*) konferencije, Split 2024.
- 12.9.2024. otvorena moja prva samostalna izložba „Ps 23,1“ u Tomislavgradu
- Volontiranje (Mali volonteri OŠ Lučac) u obliku oslikavanja dječjeg dvorišta

## **VOZAČKA DOZVOLA**

- B kategorija