

# Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje N-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji Cu(II)Ln kompleksa : razvoj i optimizacija metode

---

Stipišić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:171:683664>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**Martina Stipišić**

**Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji  
Cu(II)L<sub>n</sub> kompleksa. Razvoj i optimizacija metode**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./2018.**

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

**Split, listopad 2018.**

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

**Martina Stipišić**

**Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetyl-L-cisteina temeljeno na redukciji  
Cu(II)L<sub>n</sub> kompleksa. Razvoj i optimizacija metode**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./2018.**

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

**Split, listopad 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Analitička kemija  
**Tema rada** je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun  
**Pomoć pri izradi:** Maja Biočić mag. ing. chem. ing

### Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji Cu(II) $L_n$ kompleksa. Razvoj i optimizacija metode

Martina Stipišić, broj indeksa 94

**Sažetak:** Korištenjem kinetičke spektrofotometrije razvijena je nova metoda određivanja NAC-a u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj se odvija redukcija bis batokuproin bakrovog(II) kompleksa uz učešće NAC-a, pri čemu nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm. Optimizirani su parametri koji utječu na kemijsku reakciju. Metoda određenog vremena i metoda početne brzine korištene su za izradu krivulja umjeravanja. Krivulja umjeravanja za metodu određenog vremena linearna je u području koncentracija od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, uz granicu dokazivanja od  $8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Jednadžba pravca  $y = 13140x - 0,0005$ ; koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9999$ . Primjenom metode početne brzine postignuta je linearnost u koncentracijskom području od  $7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, uz granicu dokazivanja od  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Jednadžba pravca  $y = 1,040x + 3,220$ ; koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9991$ . Tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja NAC-a u komercijalnim farmaceutskim pripravcima što je uspoređeno s rezultatima dobivenim preporučenom metodom po farmakopeji.

**Ključne riječi:** *N*-acetil-L-cistein, kinetička spektrofotometrija, batokuproin

**Rad sadrži:** 64 stranice, 17 slika, 8 tablica, 16 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član-mentor

**Datum obrane:** 11. listopada 2018.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

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

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Analytical chemistry  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3 and Faculty Council of School of Medicine  
**Mentor:** doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun  
**Technical assistance:** Maja Biočić mag. ing. chem. ing.

### Development and validation of the kinetic spectrophotometric method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine based on the reduction of cooper(II)-bathocuproine

Martina Stipišić, index number 94

**Summary:** Kinetic spectrophotometry was employed for development of new method for determination NAC in pharmaceutical formulation. Method is based on the redox reaction in which the reduction of cooper(II)-bathocuproine by NAC occurs, with formation of colored, orange complex of cooper(I)-bathocuproine. The stable complex exhibits an absorption maximum at  $\lambda = 483$  nm. The parameters of chemical reaction have been optimized. Using kinetic spectrophotometric measurements the initial rate and fixed time methods were utilized for constructing the calibration graphs. For the fixed time method the graph is linear in concentration range from  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> with limit of detection  $8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>; equation  $y = 13140x - 0.0005$ ; correlation coefficient  $R^2 = 0.9999$ . For the initial rate method linearity the graph is linear in concentration range from  $7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> with limit of detection  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; equation  $y = 1.040x + 3.220$ ; correlation coefficient  $R^2 = 0.9991$ . No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations. The proposed methods was successfully applied for the determination of NAC in its commercial pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the recommended method.

**Key words:** *N*-acetyl-L-cysteine, kinetic spectrophotometry, bathocuproine

**Thesis contains:** 64 pages, 17 figures, 8 tables, 16 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Olivera Politeo – PhD, associate prof  | chair person |
| 2. Franko Burčul – PhD, assistant prof.   | member       |
| 3. Lea Kukoč Modun – PhD, assistant prof. | supervisor   |

**Defence date:** October 11, 2018

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 and Library of School of Medicine, Šoltanska 1.

## SADRŽAJ

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. UVOD</b> .....                                    | <b>1</b> |
| 1.1. <i>N</i> -acetil-L-cistein .....                   | 2        |
| 1.1.1. Kemijska svojstva .....                          | 2        |
| 1.1.2. Farmakokinetika.....                             | 2        |
| 1.1.3. Farmakodinamika.....                             | 3        |
| 1.1.4. Farmaceutski oblici .....                        | 4        |
| 1.1.5. Nuspojave.....                                   | 4        |
| 1.1.6. Predoziranje.....                                | 4        |
| 1.1.7. Interakcije.....                                 | 4        |
| 1.1.8. Kontraindikacije i mjere opreza .....            | 5        |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....                       | <b>6</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....                     | <b>8</b> |
| 3.1. Kinetičke metode analize.....                      | 9        |
| 3.1.1. Brzina kemijske reakcije.....                    | 10       |
| 3.1.2. Zakoni brzine .....                              | 10       |
| 3.1.3. Kontinuirano praćenje koncentracije .....        | 12       |
| 3.1.4. Vrste kinetičkih metoda .....                    | 12       |
| 3.1.5. Praćenje napredovanja reakcije.....              | 14       |
| 3.1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda .....              | 15       |
| 3.2. Spektroskopija .....                               | 16       |
| 3.2.1. Svojstva elektromagnetnog zračenja.....          | 17       |
| 3.2.2. Apsorpcija zračenja .....                        | 18       |
| 3.2.3. Molekulska apsorpcijska spektroskopija.....      | 22       |
| 3.3. Priprava otopina.....                              | 26       |
| 3.3.1. Otopina <i>N</i> - acetil-L-cisteina (NAC) ..... | 26       |
| 3.3.2. Otopine reagensa .....                           | 26       |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.3.3.     | Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera.....                             | 26        |
| 3.3.4.     | Otopina natrijeva hidroksida .....   | 27        |
| 3.3.5.     | Otopine realnih uzoraka .....  | 27        |
| 3.3.6.     | Otopine za određivanje NAC-a prema metodi koji propisuje farmakopeja ..... | 28        |
| 3.4.       | Instrumenti i uređaji.....   | 29        |
| 3.5.       | Metode rada .....  | 30        |
| 3.5.1.     | Kinetička spektrofotometrija.....  | 30        |
| 3.5.2.     | Prikupljanje i obrada podataka .....                                       | 31        |
| 3.5.3.     | Određivanje NAC-a metodom koju propisuje farmakopeja .....                 | 32        |
| <b>4.</b>  | <b>REZULTATI.....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1        | Optimizacija kemijskih parametara .....                                    | 34        |
| 4.1.1      | Optimizacija pH-vrijednosti .....  | 34        |
| 4.1.2.     | Optimizacija temperature .....   | 35        |
| 4.1.3      | Optimizacija omjera koncentracija $\text{Cu}^{2+}$ i BCS.....              | 36        |
| 4.1.4      | Optimizacija omjera koncentracija $\text{Cu}^{2+}$ i NAC.....              | 37        |
| 4.2        | Linearno dinamičko područje .....  | 40        |
| 4.2.1      | Metoda određenog vremena .....   | 41        |
| 4.2.2      | Metoda početne brzine .....  | 44        |
| 4.3.       | Utjecaj interferencija .....   | 45        |
| 4.4.       | Točnost metode.....  | 46        |
| <b>5.</b>  | <b>RASPRAVA.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>6.</b>  | <b>ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7.</b>  | <b>POPIS CITIRANE LITERATURE .....</b>                                     | <b>56</b> |
| <b>8.</b>  | <b>SAŽETAK .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>9.</b>  | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>10.</b> | <b>ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>63</b> |

*Izražavam zahvalnost mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun na pruženoj pomoći i stručnim savjetima kod izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se Maji Biočić, mag. ing. chem. ing. koja me strpljivo svojim savjetima i velikodušnom pomoći vodila tijekom izrade ovog rada.*

*Također zahvaljujem svima koji su mi, na bilo koji način, pomogli pri realizaciji ovog rada.*



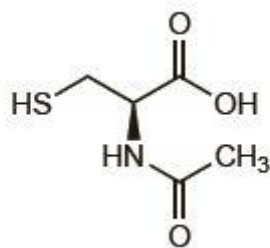
## **1. UVOD**

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

Osnovni cilj istraživanja ovoga rada je razvoj i optimizacija jednostavne i osjetljive spektrofotometrijske metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina.

Odabrani spoj komercijalno je dostupan dugi niz godina, te vrlo često korišten u farmaciji. To je sintetski *N*-acetilni derivat endogene aminokiseline L-cisteina, također poznat kao *N*-acetilcistein, acetilcistein ili 2-acetamido-3-sulfanilpropanska kiselina. [1]

Osnovno svojstvo *N*-acetil-L-cisteina je mukolitičko djelovanje. Razarajući disulfidne veze, razrjeđuje sluz i olakšava iskašljavanje. Također, djeluje kao prekursor glutationa. Povećavajući rezerve glutationa u jetri smanjuje toksičnost paracetamola, zbog čega se koristi kao antidot kod predoziranja paracetamolom.[2]



Slika 1.1. Struktura *N*-acetil-L-cisteina [3]

### 1.1.1. Kemijska svojstva

*N*-acetil-L-cistein (NAC) je bijeli kristalični prah, kemijske formule  $C_5H_9NO_3S$ . Molna masa iznosi  $163,2 \text{ g mol}^{-1}$ . Karakterističnog je mirisa i kiselog okusa. Topljiv je u vodi, alkoholu, vrućem izopropilnom alkoholu, metil-acetatu i etil-acetatu, dok je netopljiv u eteru i kloroformu. Talište je na temperaturi  $109,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stabilan je na dnevnom svjetlu i na temperaturi do  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nije higroskopan. Zbog karboksilne skupine konstanta disocijacije  $pK_a$  iznosi 3,24. Samo *N*-acetil-L-cistein je aktivni oblik koji se metabolizira do cisteina, a zatim do glutationa. [2]

### 1.1.2. Farmakokinetika

Nakon peroralne primjene, NAC se brzo i gotovo u potpunosti apsorbira. Zbog izraženog učinka prvog prolaska kroz jetru, bioraspoloživost oralno primijenjenog NAC je

vrlo mala (oko 10 %). U jetri se opsežno metabolizira u cistein, farmakološki aktivni metabolit, diacetilcistin, cistin i druge miješane disulfide. NAC i njegovi metaboliti prisutni su u organizmu u tri različita oblika: dijelom kao slobodni, dijelom vezani za bjelančevine labilnim disulfidnim vezama i dijelom ugrađeni u aminokiseline. Najviša koncentracija u plazmi ljudi postiže se nakon 1 do 3 sata. 50 % se veže za bjelančevine plazme. Prolazi kroz posteljicu i može se naći u krvi pupkovine. Nema dostupnih podataka o izlučivanju u majčino mlijeko, kao ni podataka o prolasku NAC ili metabolita kroz krvno-moždanu barijeru u ljudi. Vrijeme polueliminacije nakon intravenske primjene je 30 do 40 minuta, a izlučivanje se odvija trofaznom kinetikom (alfa, beta i završna gama-faza). Poluvrijeme eliminacije NAC oralno primijenjenog je približno 1 sat i prvenstveno je određeno brzom biotransformacijom u jetri. Smanjena funkcija jetre može dovesti do povećanja poluvremena eliminacije i do 8 sati. Gotovo u potpunosti se izlučuje bubrezima, i to u obliku neaktivnih metabolita (anorganski sulfati, diacetilcistin). [3, 4]

### **1.1.3. Farmakodinamika**

U dišnom sustavu NAC djeluje sekretolitički i sekretomotorički, razgrađujući disulfidne veze mukopolisaharidnih lanaca. Depolimerizacijskim učinkom na lance DNK u gnojnoj sluzi smanjuje viskoznost bronhalnog sekreta i olakšava njegovo iskašljavanje. Protektivni učinak profilaktičke primjene NAC-a na učestalost i težinu egzacerbacija bakterijskih infekcija primijećen je u bolesnika s kroničnim bronhitisom i cističnom fibrozom. [3]

Drugi učinak je antioksidacijski koji se postiže na dva načina. NAC se direktno veže na slobodne kisikove radikale, a indirektno povećava sintezu glutaciona, endogenog antioksidansa. NAC je derivat prirodne aminokiseline cisteina koji u tijelu služi kao supstrat za sintezu glutaciona. Pored činjenice da normalizira stanje smanjene količine glutaciona, on može konjugirati s različitim toksičnim spojevima, kao što je *N*-acetil-*p*-benzokinonimin, reaktivni metabolit paracetamola. Time se objašnjava učinak NAC-a kao antidota pri trovanju paracetamolom. [3]

Također, pokazuje djelotvornost u liječenju blage do umjerene traumatske ozljede mozga, u smanjenju gubitaka neurona, ublažavanju kognitivnih i neuroloških simptoma. Ograničeni dokazi ukazuju na korist u liječenju HIV-a, različitih neuropsihijatrijskih i

neurodegenerativnih poremećaja, uključujući ovisnost o pušenju, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest, autizam, shizofreniju, depresiju i bipolarni poremećaj. [5, 6]

#### **1.1.4. Farmaceutski oblici**

NAC je dostupan u različitim farmaceutskim oblicima, ovisno o indikaciji. Pri trovanju paracetamolom uglavnom se koriste parenteralni oblici dostupni na recept. Ako se primjenjuje kao mukolitik, nalazi se u bezreceptnom obliku kao oralne otopine, šumeće tablete ili tablete. Otopine za inhalaciju dostupne su samo na recept. [1-3]

#### **1.1.5. Nuspojave**

Manje česte nuspojave su: glavobolja, vrućica, tinitus, alergijske reakcije kao pruritus, urtikarija, osip, angioedem, tahikardija i hipotenzija. Zatim, poremećaji probavnog sustava kao što su bolovi u truhu, proljev, povraćanje, mučnina. Rijetko se javljaju dispneja, bronhospazam – uglavnom u bolesnika s hiperreaktivnim bronhalnim sustavom, praćen bronhalnom astmom. Vrlo rijetko dolazi do anafilaktičke reakcije uključujući anafilaktički šok. Takvu pojavu uglavnom povezujemo s intravenskom primjenom lijeka, ovisnom o primijenjenoj dozi. Postoje vrlo rijetka izvješća o pojavi krvarenja uzrokovana primjenom NAC-a. Različita ispitivanja potvrdila su da NAC smanjuje agregaciju trombocita, ali klinički značaj toga nije potvrđen. [3, 4]

#### **1.1.6. Predoziranje**

Simptomi predoziranja su gastrointestinalni poremećaji poput mučnine, povraćanja i proljeva. U djece može doći do hipersekrecije. NAC u krajnje visokim koncentracijama može uzrokovati djelomično ireverzibilne anafilaktičke reakcije, posebice pri brzom ubrizgavanju. [3]

#### **1.1.7. Interakcije**

Ne preporučuje se istodobna primjena NAC i antibiotika. Izvješća o inaktivaciji antibiotika uslijed djelovanja NAC dosad su vezana isključivo uz *in vitro* ispitivanja, u kojima

su ispitivane tvari bile izravno pomiješane. Ipak, iz sigurnosnih razloga, oralne antibiotike treba davati odvojeno i to u razmaku od najmanje 2 sata. Istodobna primjena NAC s antitusicima može uzrokovati opasan zastoj sekreta zbog smanjenog refleksa kašlja. Primjena aktivnog ugljena može smanjiti učinak NAC-a. U kombinaciji s gliceriltrinitratom (nitroglicerinom) povećava se učinak gliceriltrinitrata na vazodilataciju i inhibiciju agregacije trombocita. Ako se istodobna primjena smatra nužnom, bolesnike treba nadzirati kako bi se uočila eventualna pojava interakcije. NAC može utjecati na određivanje salicilata kolorimetrijskom metodom, kao i na rezultate određivanja ketonskih tijela u urinu. [3]

### **1.1.8. Kontraindikacije i mjere opreza**

Upotreba pripravaka koji sadrže NAC kontraindicirana je ako postoji preosjetljivost na djelatnu tvar ili neku od pomoćnih tvari. Bolesnici koji su netolerantni na histamin trebali bi izbjegavati dugotrajnu primjenu NAC-a. Budući da utječe na metabolizam histamina, njegova primjena može dovesti do pojave znakova netolerancije (npr. glavobolje, vazomotornog rinitisa, svrbeža). Poseban oprez potreban je kod osoba s ulkusom, osobito kada se uzima s drugim lijekovima za koje se zna da iritiraju sluznicu probavnog trakta, te bolesnika s bronhalnom astmom. Malo je kliničkih podataka o primjeni u trudnoći. Eksperimentalna ispitivanja na pokusnim životinjama ne upućuju na izravne ili posredne štetne učinke na trudnoću, embrionalni/fetalni razvoj, porođaj ili postnatalni razvoj. Nema dostupnih podataka vezanih uz izlučivanje NAC-a u majčino mlijeko. Tijekom trudnoće i dojenja može se primjenjivati samo, ako je prema mišljenju liječnika, očekivana korist za majku veća od mogućeg rizika za dijete. [3]

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj diplomskog rada je razvoj i optimizacija kinetičke metode određivanja *N*-acetyl-L-cisteina (NAC) spektrofotometrijskom metodom pri valnoj duljini od 483 nm. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj se uz učešće NAC-a odvija redukcija bis batokuproin bakrovog(II) kompleksa u narančasto obojeni, bis batokuproin bakrov(I) kompleks.

Za analizu farmaceutskih formulacija Europska farmakopeja preporučuje redoks titraciju jodom. [7]

U literaturi su opisane različite metode određivanja NAC u čistom obliku, različitim dozirnim oblicima i biološkim uzorcima. One obuhvaćaju volumetrijsku, spektrofotometrijsku, fluorimetrijsku metodu, kromatografiju i potenciometriju. Neke od navedenih metoda nisu dovoljno osjetljive i selektivne, dok druge zahtijevaju skupe instrumente, pa su preskupe za rutinske analize.

Spektrofotometrija je izabrana zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke raspoloživosti u kontrolnim laboratorijima. To je najčešće korištena tehnika u farmaceutskoj analizi.

Primjena kinetičkih spektrofotometrijskih metoda nudi brojne prednosti u odnosu na klasičnu spektrofotometriju. U većini slučajeva ne zahtijeva prethodnu obradu uzoraka, u roku od nekoliko minuta uz pomoć pristupačnog detektora, uz dovoljnu selektivnost i osjetljivost omogućava analizu lijeka. [8]

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

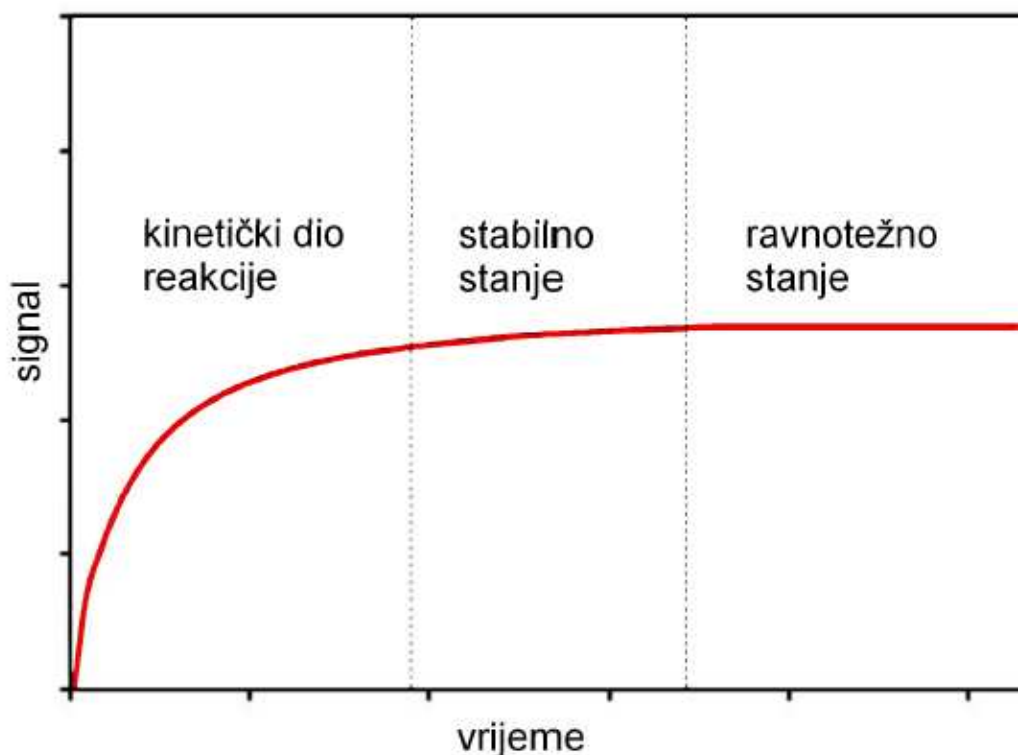


### 3.1. Kinetičke metode analize

Mjerenje analitičkog signala u kinetičkim metodama vrši se pod dinamičkim uvjetima u kojima se koncentracije reaktanata i produkata mijenjaju kao funkcija vremena. Time se omogućava iskorištavanje kemijskih reakcija koje su ili prespore ili previše nepotpune za postupke temeljene na termodinamičkim uvjetima. To rezultira povećanjem broja kemijskih reakcija koje su upotrebljive u analitičke svrhe.

Najraširenija primjena kinetičkih metoda je u biokemijskim i kliničkim laboratorijima, gdje broj analiza temeljen na kinetici prelazi onaj temeljen na termodinamici. [9]

U kinetičkim metodama kao analitički parametar služi ili pojavljivanje produkata ili nestajanje reaktanata. Analize se temelje na činjenici da se za većinu reakcija brzina reakcije i analitički signal povećavaju povećanjem koncentracije analita. Nasuprot tome, u termodinamičkim metodama mjerenja se obavljaju u sustavima koji se nalaze u ravnoteži. U tom slučaju koncentracije su statične, mjeri se apsolutna koncentracija, a samim time je i signal konstantan. [10]



Slika 3.1. Vremenska razdoblja odabrane kemijske reakcije: kinetički dio, stabilno stanje, ravnotežno stanje [10]

U kinetičkim metodama selektivnost se može postići odabirom reagensa i uvjeta koji pojačavaju razlike u brzinama kojima uzorak i moguće interferencije reagiraju. U termodinamičkim metodama selektivnost se postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razlike u ravnotežnim konstantama. [9]

Svaka kemijska reakcija koja se odvija prihvatljivom brzinom može poslužiti kao osnova za kinetička mjerenja. Postoje tri uvjeta koje odabrana kemijska reakcija treba zadovoljiti da bi poslužila razvoju pouzdane kinetičke metode:

- 1) brzina reakcije ne smije biti prebrza ni prespora
- 2) treba biti poznat zakon brzine reakcije
- 3) treba postojati način kontinuiranog praćenja koncentracije barem jedne vrste iz odabrane reakcije. [11]

### 3.1.1. Brzina kemijske reakcije

Brzina kemijske reakcije izražava količinu reaktanata koji se troše u jedinici vremena, odnosno količinu produkata koji nastaju u jedinici vremena. Reakcija treba biti dovoljno brza kako bi se mjerenja izvršila u razumnom periodu, ali također dovoljno spora da se ravnoteža ne bi postizala dok se reagensi još uvijek miješaju. [11]

### 3.1.2. Zakoni brzine

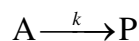
Drugi uvjet je poznavanje zakona brzine reakcije. To je algebarski izraz koji se sastoji od koncentracijskih izraza i konstanti. Određuje se eksperimentalno. Međusobno povezuje brzinu reakcije s koncentracijom reaktanata, produkata i međuprodukata u bilo kojem trenutku reakcije. Empirijski oblik zakona brzine prikazan za opću reakciju ima oblik

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

gdje je brzina jednaka derivaciji koncentracije A, R ili P po vremenu. Budući da se A i R troše, brzine promjene [A] i [R] u odnosu prema vremenu su negativne;  $k$  je konstanta brzine,

$m$  red reakcije u odnosu prema A, a  $n$  je red reakcije u odnosu prema R. Ukupni red reakcije je  $p = m + n$ .

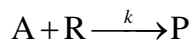
Najjednostavniji primjer u matematičkoj analizi reakcijske kinetike je spontano nepovratno nestajanje vrste A:



Reakcija je prvog reda u odnosu prema A, te je

$$\text{brzina} = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

Međutim, takve reakcije nisu upotrebljive u analitičkoj kemiji. Većina analiza temelji se na reakcijama koje uključuju barem dvije vrste, analit i reagens. Zakon brzine za reakciju koja uključuje dvije vrste najčešće je složen i neupotrebljiv u analitičke svrhe. Jedine upotrebljive kinetičke metode su one koje je moguće izvesti pod uvjetima koji dopuštaju pojednostavnjenje složenog zakona brzina u oblik analogan jednadžbi prvoga reda. Takve reakcije nazivaju se reakcijama pseudoprvog reda.



Brzina je razmjerna koncentraciji svakoga od reaktanata, ako se zbiva u jednom temeljnom koraku:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][R]$$

Ako za koncentraciju reaktanta R vrijedi da je  $[R] \gg [A]$ , koncentracija R se za vrijeme reakcije jako malo promijeni, pa se može pisati da je  $k[R] = \text{konstanta} = k'$ . Tada se može pisati

$$-\frac{d[A]}{dt} = k'[A]$$

Pogreška povezana s određivanjem brzine za reakciju pseudoprvog reda uz prisutnost suviška reagensa smatra se prihvatljivom. Međutim, reakcije su malokad potpuno nepovratne, zato je u određenim reakcijama potrebno poznavati i brzinu povratne reakcije:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A][R] - k_{-1}[P]$$

Tada je  $k_1$  konstanta brzine drugog reda za polaznu reakciju, a  $k_{-1}$  konstanta brzine prvog reda za povratnu reakciju. U navedenoj jednadžbi pretpostavljeno je nastajanje jednoga produkta. Vrijednosti  $k_{-1}$  i/ili  $[P]$  mogu se održavati relativno malima, pa je tada brzina povratne reakcije zanemariva. [9]

### 3.1.3. Kontinuirano praćenje koncentracije

Treći uvjet koji odabrana kemijska reakcija treba zadovoljiti da bi poslužila razvoju pouzdane kinetičke metode, zahtjeva mogućnost praćenja napretka reakcije pomoću promjena koncentracije barem jedne tvari iz reakcije. Nije važno radi li se o analitu, reagensu koji reagira s analitom ili produktom. [11]

### 3.1.4. Vrste kinetičkih metoda

Kinetičke metode podijeljene su s obzirom na vrstu odnosa koji postoji između mjerene veličine i koncentracije uzorka na diferencijalne i integralne metode.

#### 3.1.4.1. Diferencijalne metode

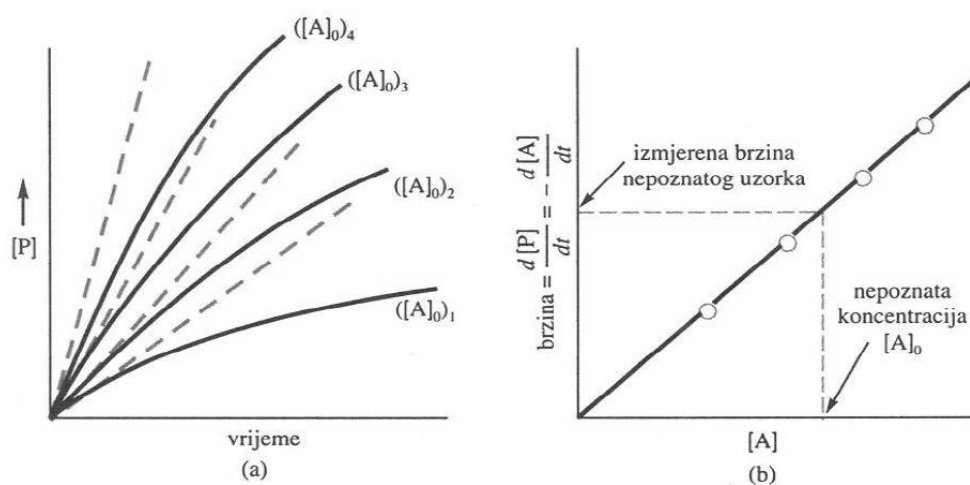
U diferencijalnoj metodi koncentracije se računaju iz brzina reakcija pomoću diferencijalnog oblika izraza za brzinu. Brzine se određuju mjerenjem nagiba krivulje koja opisuje koncentraciju analita ili produkta kao funkciju vremena reakcije. Tada vrijedi:

$$\text{brzina} = -\left(\frac{d[A]}{dt}\right)_t = k[A]_t = k[A]_0 e^{-kt}$$

Također se može izraziti pomoću koncentracije produkta:

$$\text{brzina} = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_t = k[A]_0 e^{-kt}$$

U bilo kojoj vrijednosti  $t$ , faktor  $ke^{-kt}$  je konstanta, a brzina je razmjerna početnoj koncentraciji analita. Često je pogodno mjeriti u blizini vremena  $t = 0$ , jer je taj dio eksponencijalne krivulje približno linearan, pa je lako moguće odrediti nagib pomoću tangente na krivulju. Budući da je nagib u početku najveći, relativna pogreška određivanja nagiba u početku reakcije bit će minimalna. Ako se radi o reakciji pseudoprvo reda, utrošak suviška reagensa bit će toliko malen da ne dolazi do pogreške zbog promjene  $k$ , koja bi se pojavila promjenom koncentracije reagensa. [9]



Slika 3.2. Određivanje koncentracije tvari A diferencijalnom metodom: (a) Pune crte su koncentracije produkta kao funkcije vremena, isprekidane crte su tangente na krivulje za  $t \rightarrow 0$ ; (b) Crtež nagiba dobivenih pomoću tangenti u (a) kao funkcija koncentracije analita [9]

### 3.1.4.1.1. Metoda početne brzine

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

$$\log K = \log \frac{\Delta A}{\Delta t} = \log k' + n \log c$$

gdje je  $K$  brzina reakcije,  $k'$  uvjetna konstanta brzine reakcije,  $c$  je analitička koncentracija NAC-a te  $n$  (nagib regresijskog pravca) red reakcije. [12]

### 3.1.4.2. Integralne metode

Integralne metode primjenjuju integralne oblike jednadžbi brzina prvog reda kao što je  $[A] = [A]_0 e^{-kt}$ . Grafičke metode temelje se na

$$\ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0$$

Grafički prikaz prirodnog logaritma eksperimentalno mjerene koncentracije A (ili P) kao funkcije vremena je pravac nagiba  $k'$  i odsječka  $\ln[A]_0$  na osi y. [9]

#### 3.1.4.2.1. Metoda određenog vremena

Metoda određenog vremena temelji se na jednadžbi:

$$[A]_0 = \frac{[A]_t}{e^{-kt}}$$

Postupak umjeravanja izvodi se standardnom otopinom poznate koncentracije  $[A]_0$ .  $[A]_t$  se određuje u precizno određenom vremenu reakcije ( $t$ ), a potom se računa  $e^{-kt}$ . Uzorci nepoznate koncentracije analiziraju se mjerenjem  $[A]_t$  u istom reakcijskom vremenu te se koncentracije analita računaju pomoću navedenog izraza. [9]

### 3.1.5. Praćenje napredovanja reakcije

Prilikom mjerenja kinetički sporih reakcija, ne događaju se znatne promjene koncentracija za vrijeme bilježenja signala. Ipak, ako se zanemare promjene koncentracija kod brzih kemijskih reakcija unijeti će se velika pogreška u mjerenje. Stoga je razvijeno više pristupa mjerenju kinetički brzih reakcija, od samog zaustavljanja ili prigušivanja reakcije do kontinuiranog praćenja korištenjem različitih vrsta spektrometrijskih i elektrokemijskih detektora. Mnoge kinetičke metode određivanja temelje se na bilježenju signala u prvim

trenucima reakcije, milisekundama ili sekundama, dok su još uvijek zadovoljeni uvjeti reakcije pseudoprvog reda. Nedostatak ovog pristupa je u potrebi za automatizacijom sustava. Naime, prijenos uzorka i reagensa u reakcijsku posudu, te njihovo miješanje mora biti provedeno vrlo brzo i ponovljivo. Navedeno obično zahtijeva uvođenje dodatne instrumentacije što poskupljuje analizu. [13]

U Laboratoriju za spektroskopiju i senzore razvijen je jednostavan i pristupačan sustav za kinetička mjerenja sa spektrofotometrijskim ili potenciometrijskim detektorom. Ovim sustavom omogućena je kontrola temperature i pH vrijednosti te je ostvareno konstantno i ponovljivo miješanje uz cirkulaciju reakcijske otopine. [13]

### **3.1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda**

Granica određivanja je najmanja koncentracija ispitivane tvari u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom preciznošću i točnošću. Za kinetičke metode ona je određena brzinom reakcije i instrumentalnom tehnikom kojom se prati brzina reakcije. Budući da je signal proporcionalan brzini reakcije, brže reakcije imaju niže granice određivanja. Drugi čimbenik koji utječe je instrumentalna tehnika koja se koristi za praćenje odvijanja reakcije. Uglavnom se koriste spektrofotometrijske i potenciometrijske tehnike koje svojim ograničenjima utječu na dostignutu granicu određivanja. Zbog djelovanja nekontroliranih ili slabo kontroliranih parametara kao što su pH i temperatura, kemijske kinetičke metode su potencijalno podložne pogreškama. Iako izravnim računanjem, kinetičke metode mogu postići umjereno točne rezultate, točnost je manja u odnosu na ravnotežne metode. Preciznost kinetičkih metoda određena je šumom u signalu instrumenta kojim se prati odvijanje reakcije. [11]

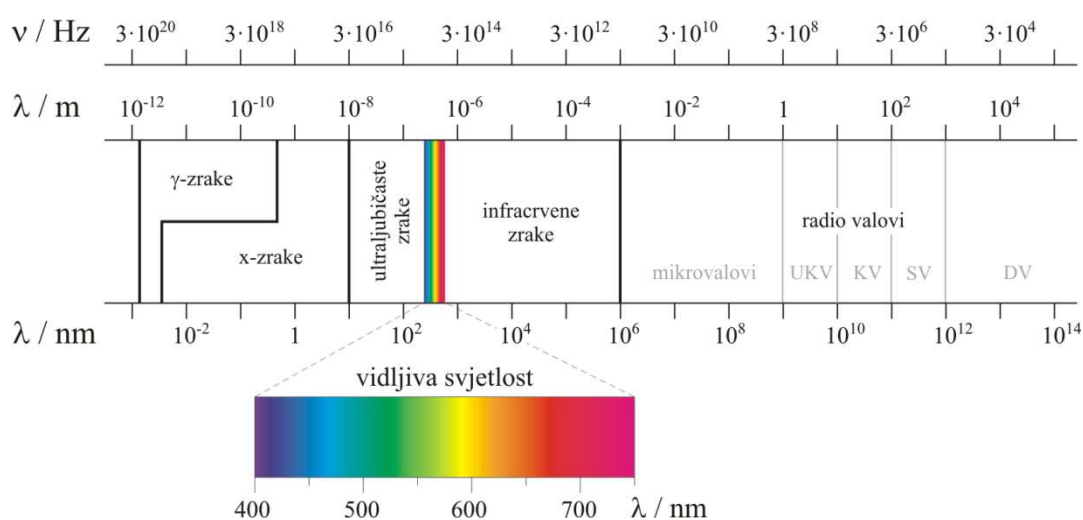
Kod integralnih metoda moguća je preciznost od 1 do 2 % dok je preciznost diferencijalnih metoda nešto manja. Osjetljivost se kod metode određenog vremena, može povećati provođenjem mjerenja u uvjetima kada je koncentracija promatrane vrste visoka. Ako je promatrana vrsta analit ili neka reagirajuća vrsta, mjerenja se provode na početku reakcije, budući da su tada koncentracije reagirajućih vrsta visoke. Nasuprot tome, ako je promatrana vrsta produkt, mjerenja se provode nakon određenog vremena od početka reakcije. [11]

Selektivnost kinetičkih metoda temelji se na prilagođavanju uvjeta odvijanja reakcije, jer se time postiže razlika u brzini reakcije analita i interferirajućih vrsta tzv. kinetička diskriminacija. [11]

### 3.2. Spektroskopija

Interakcije zračenja i materije osnova su znanosti pod nazivom spektroskopija. Mjerenja koja se temelje na svjetlosti i drugim oblicima elektromagnetskog zračenja naširoko se koriste u analitičkoj kemiji. S povijesnog gledišta, izraz spektroskopija odnosio se na granu znanosti koja se bavila svjetlošću, odnosno vidljivim zračenjem, razlučenom u komponente, odnosno valne duljine, koje tvore spektar. [9]

Spektroskopske metode mogu se klasificirati prema području elektromagnetskog zračenja koje se primjenjuje. To su X-zrake, ultraljubičasto (UV), vidljivo, infracrveno (IR), mikrovalno i radiofrekvencijsko (RF) zračenje. [9]



Slika 3.3. Spektar elektromagnetskog zračenja [14]

Današnja primjena pojma spektroskopskih metoda proširena je i na tehnike koje ne uključuju elektromagnetsko zračenje, primjerice masena i elektronska spektroskopija. [9]

Spektroskopske analitičke metode temelje se na mjerenju količine zračenja proizvedene ili apsorbirane molekularnim ili atomskim vrstama od interesa. [9]



Spektrofotometrija je način određivanja koncentracije materijala u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao. [11]

Spektrofotometrijske tehnike često se koriste zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti. [8]

### 3.2.1. Svojstva elektromagnetnog zračenja

Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja ogromnom brzinom prolazi prostorom. Brojna svojstva elektromagnetskog zračenja mogu se opisati pomoću klasičnog valnog modela, čiji su osnovni parametri valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda. [9] Valna duljina ( $\lambda$ ) je udaljenost od vrha do vrha između valova. Frekvencija ( $\nu$ ) je broj potpunih oscilacija koje stvara val svake sekunde. [15]

Ipak, valni model ne može objasniti pojave povezane s apsorpcijom i emisijom energije zračenja. Prikladno objašnjenje tih pojava može se pronaći u promatranju elektromagnetskog zračenja kao struje pojedinačnih (diskretnih) čestica energije, nazvanih fotonima. [9]

Foton je kvant energije elektromagnetnog zračenja. Energija fotona ( $E$ ) jednaka je umnošku Planckove konstante ( $h$ ) i frekvencije elektromagnetnog zračenja ( $\nu$ )

$$E = h\nu$$

$h$  je Planckova konstanta ( $6,626 \times 10^{-34}$  Js).

Energija je jednaka:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

pri čemu vrijednost valnog broja ( $\bar{\nu}$ ) jednaka  $1/\lambda$ .

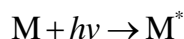
Dakle, energija je razmjerna valnome broju, te obrnuto razmjerna valnoj duljini. [15]

Dvostruka gledišta zračenja kao valova i čestica nisu međusobno isključiva. [9]

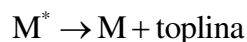
### 3.2.2. Apsorpcija zračenja

U apsorpcijskoj spektroskopiji mjerimo količinu apsorbirane svjetlosti kao funkciju valne duljine. Mjerenja apsorpcije mogu dati kvalitativne i kvantitativne podatke o uzorku. Svaka molekularna vrsta može apsorbirati sebi svojstvene, karakteristične frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prenosjenjem energije na molekulu dolazi do smanjenja intenziteta elektromagnetskog zračenja. [9]

Proces u kojem kemijska vrsta prisutna u propusnoj sredini selektivno prigušuje, odnosno smanjuje intenzitet frekvencije elektromagnetskog zračenja naziva se apsorpcija. Najniže energijsko stanje atoma ili molekule naziva se osnovnim stanjem. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice. Proces u kojem kemijska vrsta apsorbira toplinsku, električnu ili energiju zračenja, pri čemu prelazi u više energijsko stanje naziva se pobuđivanje. Pobuđivanje  $M$  u  $M^*$  može se opisati



Nakon kratkog razdoblja pobuđena vrsta se relaksira. Relaksacija je proces u kojem pobuđena vrsta otpušta suvišak energije, pri čemu se vraća u niže energijsko stanje. Suvišak energije prenosi se drugim atomima ili molekulama u istoj okolini, što rezultira malim povišenjem temperature u okolini. Taj se proces opisuje jednadžbom



Vijek trajanja  $M^*$  je toliko kratak da je koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku zanemariva. Također, količina toplinske energije otpuštene tijekom relaksacije je najčešće toliko mala da se ne može ni detektirati. [9]

Uzorci za apsorpcijsku analizu u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja najčešće su ili plinovi ili razrijeđene otopine pripremljene u propusnom (prozirnom, transparentnom) otapalu. Apsorpcijske značajke pojedine vrste uglavnom se opisuju apsorpcijskim spektrom. To je grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. [9]

Tablica 3.1. Nazivlje i simboli koji se primjenjuju u apsorpcijskim mjerenjima

| Naziv i simbol   | Definicija   |
|--|--|
| snaga zračenja $P, P_0$  | energija zračenja koja u 1 sekundi pada na $1 \text{ cm}^2$ površine detektora |
| apsorbancija $A$   | $\log \frac{P_0}{P}$   |
| transmitancija $T$   | $\frac{P_0}{P}$  |
| apsorptivnost $a$<br>(ako se $c$ izrazi u $\text{g L}^{-1}$ )                    | $\frac{A}{bc}$   |
| molarna apsortivnost $\varepsilon$<br>(ako se $c$ izrazi u $\text{mol L}^{-1}$ ) | $\frac{A}{bc}$   |

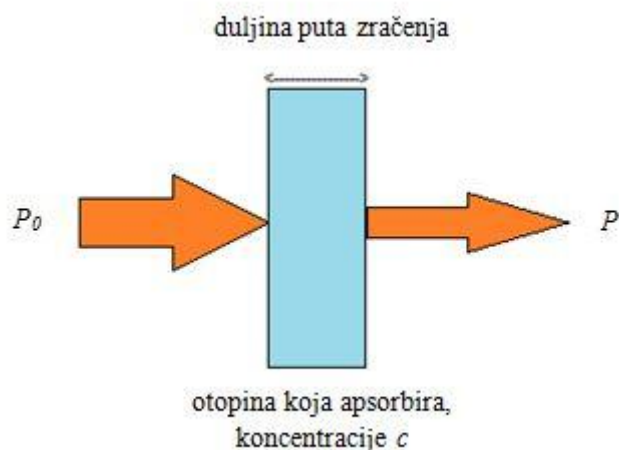
$b$  - duljina puta zračenja

Transmitancija je mjera količine neapsorbiranog zračenja, odnosno udio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu

$$T = \frac{P_0}{P}$$

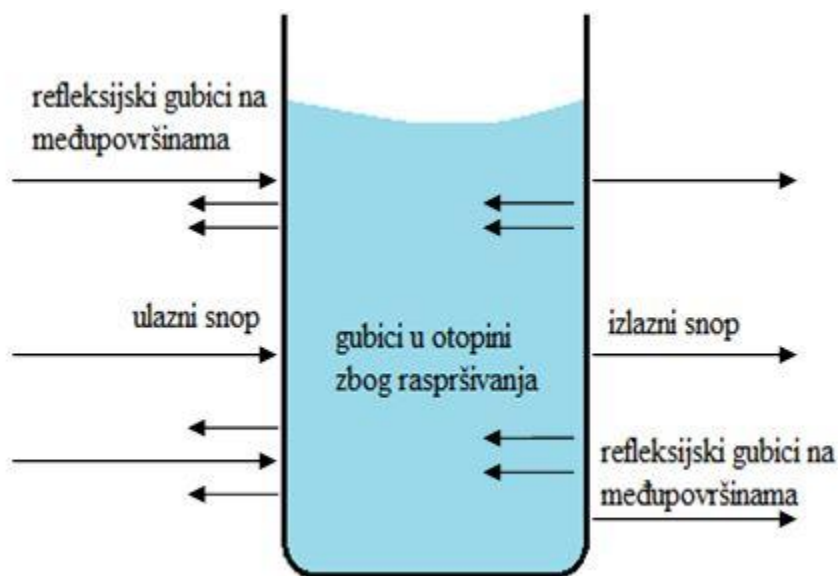
Nasuprot transmitanciji, apsorbcija otopine povećava se prigušenjem osnovnog snopa

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P}$$



Slika 3. 4. Prigušivanje snopa zračenja

Eksperimentalno određivanje apsorbancije i transmitancije u laboratoriju nije moguće izmjeriti navedenim jednadžbama. Budući da se uzorak nalazi u posudici, neizbježno se javlja međudjelovanje zračenja i stijenki posudice, što uzrokuje gubitak refleksijom i apsorpcijom. [9]



Slika 3.5. Gubici zbog refleksije i raspršenja

Za kompenzaciju tih učinaka primjenjuje se jednadžba

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P}$$

Pri tome  $P_0$  odgovara snazi zračenja nakon prolaza kroz posudicu s otapalom, dok je  $P$  snaga zračenja nakon prolaza kroz identičnu posudicu s otopinom analita. Takve eksperimentalne apsorbancije u skladu su s Beerovim zakonom i predstavljaju dobre aproksimacije istinskih apsorbancija. [9]

### 3.2.2.1. Odnos između apsorbancije i koncentracije – Beerov zakon

Beerov zakon govori kako količina prigušenja ovisi o koncentraciji apsorbirajućih molekula i dužini puta zračenja kroz uzorak. Prolaskom svjetlosti kroz medij koji sadrži apsorbirajući analit, intenzitet svjetlosti se mijenja kako se analit pobuđuje. Što su duljina puta svjetlosti i koncentracije analita veće, to je veće prigušenje. [9]

Beerov zakon je funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom ( $A$ ) i one koja se određuje (koncentracija  $c$ )

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \times b \times c$$

Gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti, apsorptivnosti, apsorpcijski koeficijent;  $b$  je duljina puta zračenja kroz uzorak. Apsorbancija je veličina bez dimenzija, pa se zato jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. [9]

Ako se koncentracija izrazi u molovima po litri, a  $b$  u centimetrima, konstanta proporcionalnosti naziva se molarnom apsorptivnošću s posebnim simbolom  $\varepsilon$ . Izražava se u  $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Tada je

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih supstancija koje apsorbiraju. Uvjet je da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta. [9]

Ukupna apsorbancija višekomponentnog sustava iznosi

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \times b \times c_1 + \varepsilon_2 \times b \times c_2 + \dots + \varepsilon_n \times b \times c_n$$

### 3.2.2.2. Ograničenja primjenjivosti Beerovog zakona

Postoje dvije vrste ograničenja Beerovog zakona. Istinska ograničenja zakona pojavljuju se kod relativno koncentriranih otopina uzoraka ili elektrolita. Granična vrijednost je koncentracija od  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Pri višim koncentracijama dolazi do smanjenja prosječne udaljenosti među česticama pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. To uzrokuje odstupanje od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji. Slična pojava javlja se u razrijeđenim otopinama supstancije koja apsorbira, ako se u otopini nalazi veća koncentracija neke druge vrste. Blizina stranih iona i supstancije koja apsorbira uzrokuje odstupanje od Beerovog zakona.

Druga odstupanja su posljedica kemijskih promjena vezanih s koncentracijskim promjenama ili instrumentna odstupanja vezana s načinom mjerenja apsorbancije. Kemijska odstupanja pojavljuju se kada vrste koje apsorbiraju sudjeluju u koncentracijski ovisnim ravnotežama kao što su reakcije disocijacije ili asocijacije. [9]

### 3.2.3. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

Molekulska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom, vidljivom i infracrvenom zračenju, široko se primjenjuje za identifikaciju i određivanje brojnih anorganskih i organskih vrsta. Molekulska ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija je najčešće korištena instrumentalna tehnika u kemijskim laboratorijima za kvantitativnu analizu. [9]

Glavne značajke metode su:

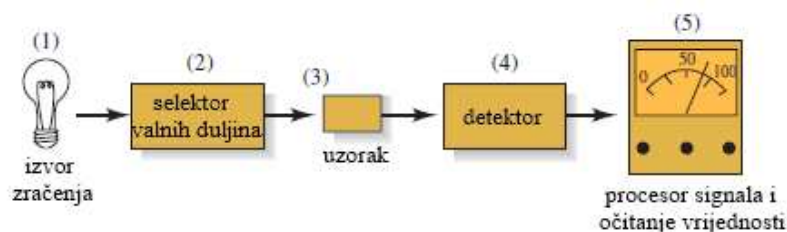
- primjenjivost za veliki broj anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta. Više od 90 % analiza koje se provode u kliničkim laboratorijima temelje se na apsorpcijskoj spektroskopiji ultraljubičastog i vidljivog zračenja;

- velika osjetljivost (Tipične granice dokazivanja za apsorpcijsku spektroskopiju nalaze se u području od  $10^{-4}$  do  $10^{-5}$  M; različitim postupcima i modifikacijama može se proširiti od  $10^{-6}$  do  $10^{-7}$  M);
- umjerena ili velika selektivnost;
- prihvatljiva točnost;
- jednostavnost i prikladnost;
- mogućnost automatizacije. [9]

Osnovni dijelovi analitičkih spektroskopskih instrumenata, bez obzira jesu li predviđeni za rad u ultraljubičastom, vidljivom ili infracrvenom dijelu spektra, vrlo su slični. Nazivaju se optičkim uređajima, čak i kada su namijenjeni području zračenja koje ljudsko oko ne opaža. Većina spektroskopskih uređaja ima pet osnovnih dijelova. To su:

- stabilni izvor energije zračenja;
- selektor valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja;
- jedan ili više spremnika za uzorke;
- detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljivi signal;
- procesor signala i uređaj za očitavanje.

Ovisno o kojoj se vrsti spektroskopije radi, sastavnice će biti različito poredane. U slučaju apsorpcijske spektroskopije snop koji dolazi iz izvora prolazi kroz selektor valnih duljina, do uzorka, a potom do detektora. [9]



Slika 3.6. Sastavni dijelovi instrumenta za apsorpcijsku spektroskopiju [9]

Apsorpcijska spektroskopija zahtjeva kontinuirano i snažno zračenje. Kontinuirano zračenje emitira zračenje svih valnih duljina u spektralnom području. Najčešći kontinuirani izvori su vodikova i deuterijeva žarulja, te žarulja s volframovom niti. Selektori su uređaji koji će suziti mjerno zračenje do uske vrpce, odnosno skupine susjednih valnih duljina,

budući da ne mogu izdvojiti zračenje samo jedne valne duljine. Time utječu na selektivnost, osjetljivost i povećavaju vjerojatnost slaganja s Beerovim zakonom. [9]

Za spektrofotometrijsku analizu važno je da se odabere valna duljina maksimalne apsorbcije. Osjetljivost analize je najveća pri maksimalnoj apsorbciji tj. dobiva se maksimalni odgovor za određenu koncentraciju analita, uz izvrsnu linearnost. [15]

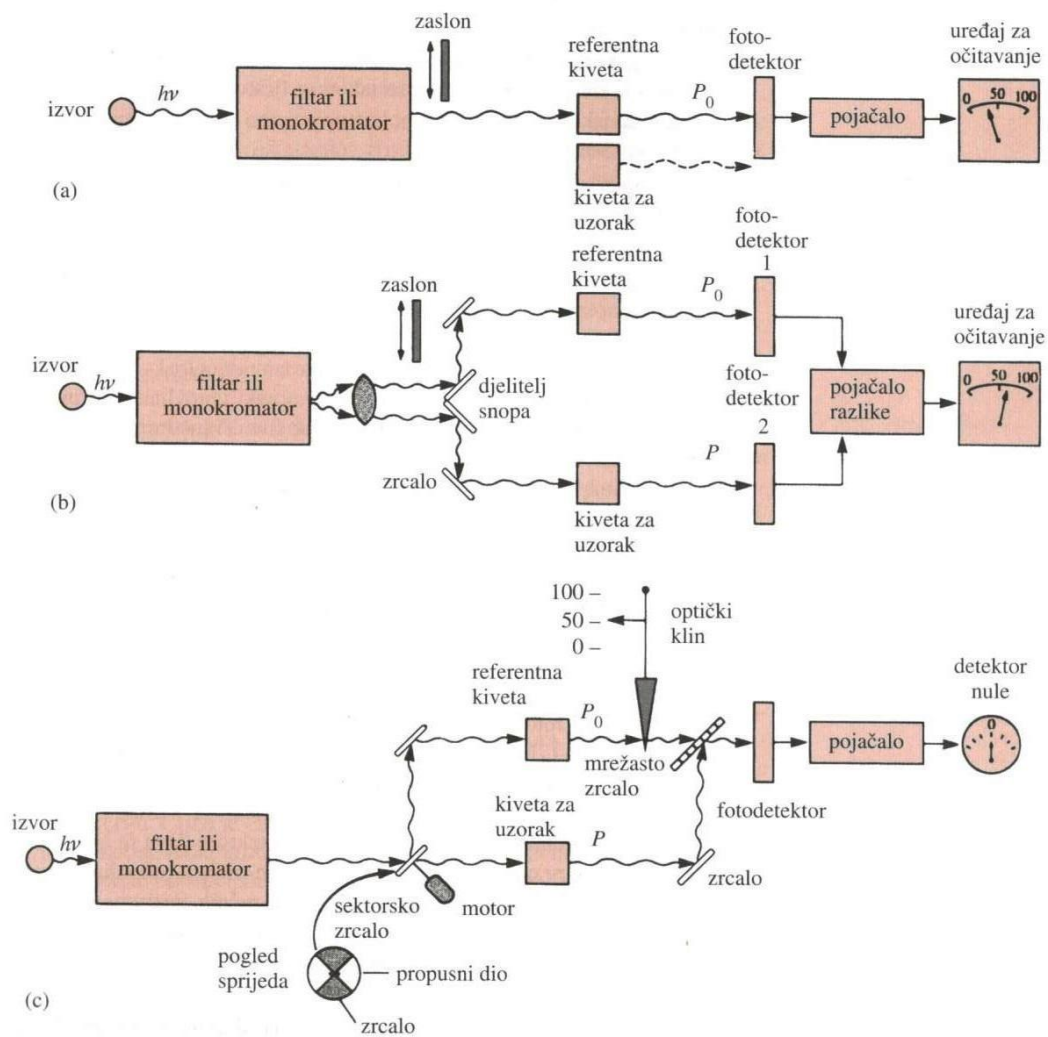
Spremnici za uzorke nazivaju se ćelijama ili kivetama. Ovisno o valnoj duljini na kojoj se provode mjerenja, mogu biti od kvarca (350 – 3000 nm), silikatnog stakla (375 – 2000 nm) ili plastike (390 – 750 nm).

Detektori u spektroskopiji su fotonski i toplinski detektori koji pokazuju postojanje fizičke pojave. Procesori pojačavaju električni signal iz detektora, izvode matematičke operacije na signalu, kao što su diferenciranje, integriranje ili logaritmiranje. [9]

Postoje jednostavni jednosnopni i nešto složeniji dvosnopni instrumenti. Jednosnopni instrumenti nemaju široku primjenu, jer se kiveta s uzorkom i kiveta s referentnom otopinom moraju naizmjenice smještati u snop zračenja. Zbog toga nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorbcija kao funkcija proteklog vremena. Kod dvosnopnih instrumenata dva snopa nastaju u prostoru pomoću zrcala koje se naziva djeljiteljem snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, dok drugi istodobno prolazi kroz uzorak prema drugome fotodetektoru. Dva izlazna signala se pojačavaju te se elektronički određuje njihov omjer i prikazuje se na uređaju za očitavanje. Kod dvosnopnih uređaja s vremenski odijeljenim snopovima, snopovi su odijeljeni u vremenu pomoću rotirajućeg selektorskog zrcala. [15]

Većina suvremenih instrumenata za snimanje u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra su s dvostrukim snopom. Takvi instrumenti imaju prednost, jer postojanje dvostrukog snopa omogućuje neprekidno snimanje spektra. [9]





Slika 3.7. Shematski prikaz fotometra i spektrofotometra: (a) jednosnopni instrument; (b) dvosnopni instrument s prostorno razdvojenim snopovima; (c) dvosnopni instrument s vremenski razdvojenim snopovima. [9]

### 3.3. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljene su od kemikalija analitičkog stupnja čistoće.

#### 3.3.1. Otopina *N*- acetil-L-cisteina (NAC)

Standardna otopina NAC-a, koncentracije  $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pripravlja se otapanjem 97,9 mg NAC-a (Acros Organics, New Jersey, USA,  $M_r = 163,19$ ) u 100 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera, pH-vrijednosti 2. Radna otopina niže koncentracije pripravlja se odgovarajućim razrjeđenjem standardne otopine destiliranom vodom.

#### 3.3.2. Otopine reagensa

Otopina bakra(II),  $\text{Cu}^{2+}$ , koncentracije  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pripravlja se otapanjem 124,8 mg bakrovog(II)sulfat pentahidrata,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M_r = 249,68$ ) u 50 mL destilirane vode.

Otopina batokuproin disulfonske kiseline (BCS), koncentracije  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pripravlja se otapanjem 56,5 mg dinatrijev batokuproin-disulfonat hidrat (Sigma – Aldrich, Njemačka,  $M_r = 564,54$ ) u 50 mL destilirane vode.

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

Acetatno-boratno-fosfatni pufer ( $c = 0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) priprema se otapanjem 4,9464 g borne kiseline  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Alkaloid, Skopje, Makedonija,  $M_r = 61,84$ ) u malo destilirane vode. Zatim se doda 4,60 mL octene kiseline,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (VWR CHEMICALS, Francuska,  $M_r = 60,05$ ) i 3,20 mL fosfatne kiseline,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M_r = 97,99$ ) te se nadopuni destiliranom vodom do 2,0 L. Ovako pripravljena otopina ima pH vrijednost 2. Korištenjem pH-metra kontrolira se pH-vrijednost uz dodatak otopine NaOH koncentracije  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.3.4. Otopina natrijeva hidroksida

Otapanjem 8,00 g natrijeva hidroksida, NaOH (GRAM – MOL, Hrvatska,  $M_r = 40,00$ ) u 100 mL destilirane vode dobiva se otopina koncentracije  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.3.5. Otopine realnih uzoraka

1. FLUIMUKAN 200 mg šumeće tablete, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži jedna šumeća tableta sadrži 200 mg NAC-a. Realni uzorak pripravlja se otapanjem jedne šumeće tablete u 250 mL destilirane vode. Masena koncentracija tako pripravljene otopine iznosi  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ .

$$\gamma = \frac{m(\text{NAC})}{V_{\text{ot}}} = \frac{0,2 \text{ g}}{0,250 \text{ L}} = 0,8 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripravljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{NAC})}{M(\text{NAC})} = \frac{0,8 \text{ g L}^{-1}}{163,2 \text{ g mol}^{-1}} = 4,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodaje se 1 mL tako pripravljene otopine. Pri tome, nova množinska koncentracija iznosi  $c_2 = 4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Dodavanjem 1 mL ovako pripravljene otopine NAC-a u reakcijsku smjesu (15 mL) dobiva se nova koncentracija  $c_3 = 3,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

2. FLUIMUKAN 600 mg šumeće tablete, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži jedna šumeća tableta sadrži 600 mg NAC-a. Realni uzorak pripravlja se otapanjem jedne šumeće tablete u 250 mL destilirane vode. Masena koncentracija iznosi  $2,4 \text{ g L}^{-1}$ .

$$\gamma = \frac{m(\text{NAC})}{V_{\text{ot}}} = \frac{0,6 \text{ g}}{0,25 \text{ L}} = 2,4 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripravljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{NAC})}{M(\text{NAC})} = \frac{2,4 \text{ g L}^{-1}}{163,2 \text{ g mol}^{-1}} = 0,0147 \text{ mol L}^{-1}$$

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodaje se 1 mL tako pripravljene otopine. Pri tome, nova množinska koncentracija iznosi  $c_2 = 1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Dodavanjem 1 mL ovako pripravljene otopine NAC-a u reakcijsku smjesu (15 mL) dobiva se nova koncentracija  $c_3 = 9,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.3.6. Otopine za određivanje NAC-a prema metodi koji propisuje farmakopeja

#### 1. Otopina kalijeve jodida (KI)

Standardna otopina  $166 \text{ g L}^{-1}$  KI dobiva se otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode.

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

Molekule joda slabo su topljive u vodi ( $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Topljivost se znatno povećava ako je u otopini prisutan jodid. [16] U skladu s reakcijom:



12,7 g joda,  $\text{I}_2$  i 20 g kalijeve jodida, KI je otopljeno u destiliranoj vodi i razrijeđeno do oznake od 1000 mL. Zbog veće topljivosti joda u otopini jodida prvo je otopljen KI u maloj količini destilirane vode te potom dodan  $\text{I}_2$ . Po njegovom potpunom otapanju dodana je preostala količina vode. Otopinu je bilo potrebno zaštititi od svjetla.

#### 3. Otopina octene kiseline

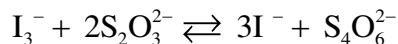
Razrijeđena otopina octene kiseline (HAc) priprema se tako da se 28,6 mL glacialne octene kiseline razrijedi s deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL.

#### 4. Standardizacija otopine joda, $c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

U 20 mL otopine joda,  $c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  dodan je volumen od 1 mL razrijeđene octene kiseline u 30 mL destilirane vode. Pripravljena se otopina titrira koristeći pripravljenu

standardnu otopinu natrijevog tiosulfata,  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $f = 0,9901$ . Kao indikator koristi se 1 mL otopine škroba.

U navedenoj standardizaciji dolazi do redoks reakcije prema jednadžbi:



Provedene su tri titracije. Utrošak  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  je 19,85 mL. Poznavajući stehiometriju reakcije moguće je odrediti koncentraciju joda u pripremljenoj otopini (eksperimentalna koncentracija).

$$n(\text{I}_2) = n(\text{I}_3^-) = \frac{1}{2} \times n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

$$c(\text{I}_2) \times f(\text{I}_2) \times V(\text{I}_2) = \frac{1}{2} \times c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times f(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

$$f(\text{I}_2) = \frac{\frac{1}{2} \times c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times f(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{c(\text{I}_2) \times V(\text{I}_2)}$$

$$f(\text{I}_2) = \frac{\frac{1}{2} \times 0,1 \text{ mol L}^{-1} \times 0,9901 \times 19,85 \text{ mL}}{0,05 \text{ mol L}^{-1} \times 20 \text{ mL}} = 0,9827$$

$$f(\text{I}_2) = \frac{c_{\text{eksperimentalna}}(\text{I}_2)}{c_{\text{teoretska}}(\text{I}_2)} \Rightarrow c_{\text{eksperimentalna}}(\text{I}_2) = f(\text{I}_2) \times c_{\text{teoretska}}(\text{I}_2)$$

$$c_{\text{eksperimentalna}}(\text{I}_2) = 0,9827 \times 0,05 \text{ mol L}^{-1} = 0,0491 \text{ mol L}^{-1}$$

### 3.4. Instrumenti i uređaji

Sustav za kinetička spektrofotometrijska mjerenja sastojao se od spektrofotometra za ultraljubičasto i vidljivo područje (190 do 1100 nm) Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) s protočnom kvarcnom kivetom. Spektrofotometar je spojen na osobno računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji služi za prikupljanje i obradu podataka.

Uređaj može snimati valne duljine ultraljubičastog i vidljivog područja elektromagnetskog spektra (od 190 do 1100 nm) uz razlučivost od 2 nm. Širina snopa

elektromagnetskog zračenja je svega 1 mm te omogućava mjerenja i najmanjih količina uzorka s velikom preciznošću. Unutarnji volumen korištene kvarcne kivete je 160  $\mu\text{L}$ , a dužina optičkog puta 10,0 mm. Uređaj ima deuterijski i volframov izvor zračenja. Disperzno sredstvo monokromatora je refleksijska rešetka, a detektor je fotomultiplikator. Promjena apsorpcije s vremenom bilježena je pri valnoj duljini od 483 nm te su izlazni signali prenošeni na osobno računalo povezano spektrofotometrom.

Reakcijsku otopinu iz reakcijske posude crpila je peristaltička crpka Ismatec IPC (Ismatec, Zurich, Švicarska) koja ju je prenosila kroz protočnu kivetu i ponovno vraćala u reakcijsku posudu. Konstantno miješanje ostvareno je korištenjem elektromagnetske miješalice Tehnica Rotamix 550 MMH (Tehnica, Železniki, Slovenija) s magnetskim štapićem prekrivenim teflonom.

Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413, korišten je za mjerenje pH-vrijednosti.

### 3.5. Metode rada

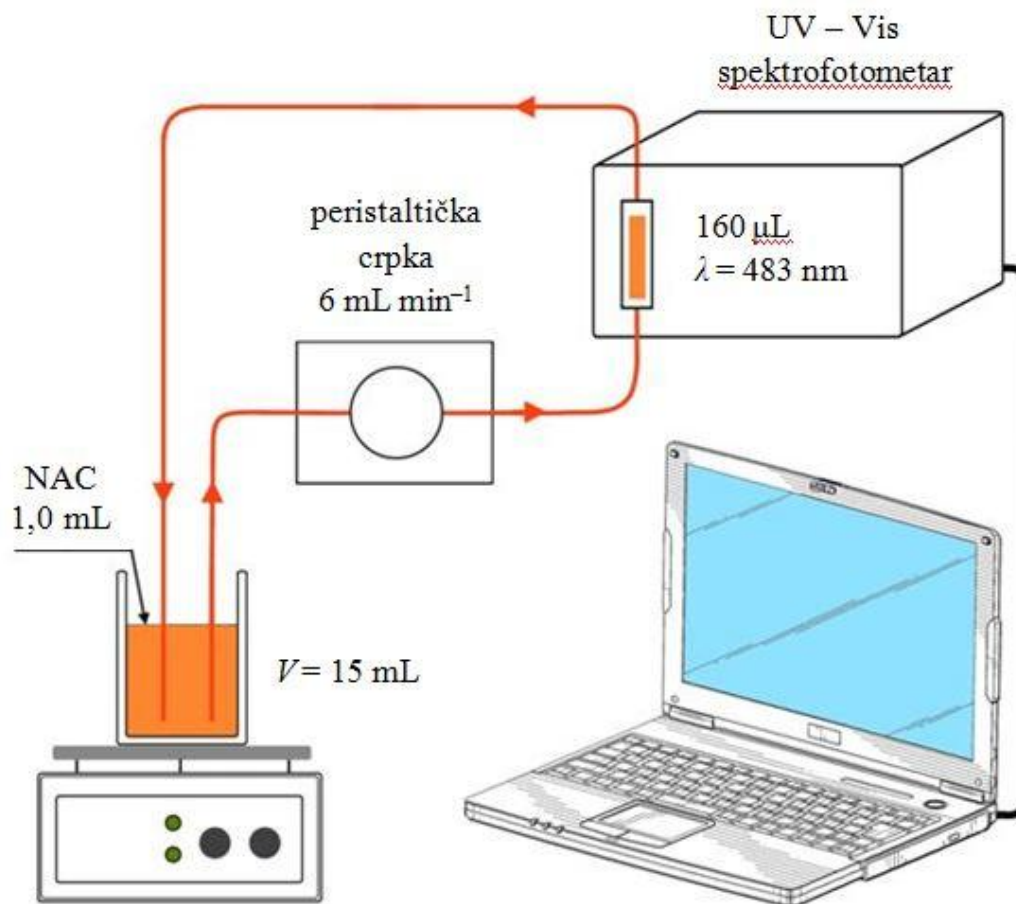
#### 3.5.1. Kinetička spektrofotometrija

Kinetička spektrofotometrijska metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj se odvija redukcija bis batokuproin bakrov(II) kompleksa uz učešće NAC-a, kao tiolnog spoja (RSH). Pri tome nastaje obojeni, stabilni bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže pri valnoj duljini od 483 nm.



Reakcijska otopina sastojala se od 10 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera ( $c = 0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 3,00); 0,6 mL  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c = 8 \times 10^{-3}$ ); 2,4 mL BCS ( $c = 2 \times 10^{-3}$ ); 1 mL destilirane vode. U jednoliko miješanu reakcijsku otopinu nakon jedne minute dodaje se 1,0 mL NAC-a ( $c = 6 \times 10^{-4}$ ). Dodatkom analita započinje reakcija. Ukupan volumen reakcijske otopine iznosio je 15 mL.

Ukupni volumen protočne kivete i cjevčica koje čine protočni sustav iznosio je 2,0 mL, stalna brzina protoka iznosila je  $6 \text{ mL min}^{-1}$ . Apsorbancija je kontinuirano bilježena kao funkcija proteklog vremena pri valnoj duljini od  $\lambda = 483 \text{ nm}$ .



Slika 3.8. Shematski prikaz mjernog instrumentarnog sustava za određivanje NAC-a kinetičkom spektrofotometrijskom metodom

### 3.5.2. Prikupljanje i obrada podataka

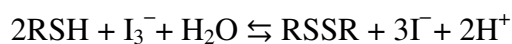
Podaci kinetičkog spektrofotometrijskog mjerenja kontinuirano su bilježeni. U programu GraphPad Prism, (GraphPad Software, San Diego California USA) crtane su krivulje umjeravanja, radila se statistička obrada podataka mjerenja i analiza krivulja umjeravanja. Krivulje umjeravanja konstruirane su u ovisnosti izmjerene apsorbancije u točno određenom vremenu prema koncentraciji analita,  $c(\text{NAC})$ , uz učestalost bilježenja podataka od  $1 \text{ s}^{-1}$ .

### 3.5.3. Određivanje NAC-a metodom koju propisuje farmakopeja

Britanska farmakopeja za određivanje sadržaja NAC-a u farmaceutskim pripravcima preporučuje jodimetrijsku metodu titracije.

Prema protokolu 0,140 g uzorka se otopi u 60 mL deionizirane vode, nakon čega se doda 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline. Nakon hlađenja u ledenoj vodi doda se 10 mL kalijevog jodida te se titrira sa 0,05 mol L<sup>-1</sup> otopinom joda do pojave intenzivno modre boje. Kao indikator koristi se škrob. [7]

Metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj NAC (RSH spoj) reducira jod u jodid. Zbog prisutnog škroba u otopini, odnosno njegove aktivne komponente amiloze, prva kap titranta u suvišku, u završnoj točki titracije, oboji otopinu intenzivno modrom bojom.



Ovom metodom utvrđeno je da se za 16,32 mg NAC-a utroši 1,0183 mL 0,0491 mol L<sup>-1</sup> otopine joda [7].



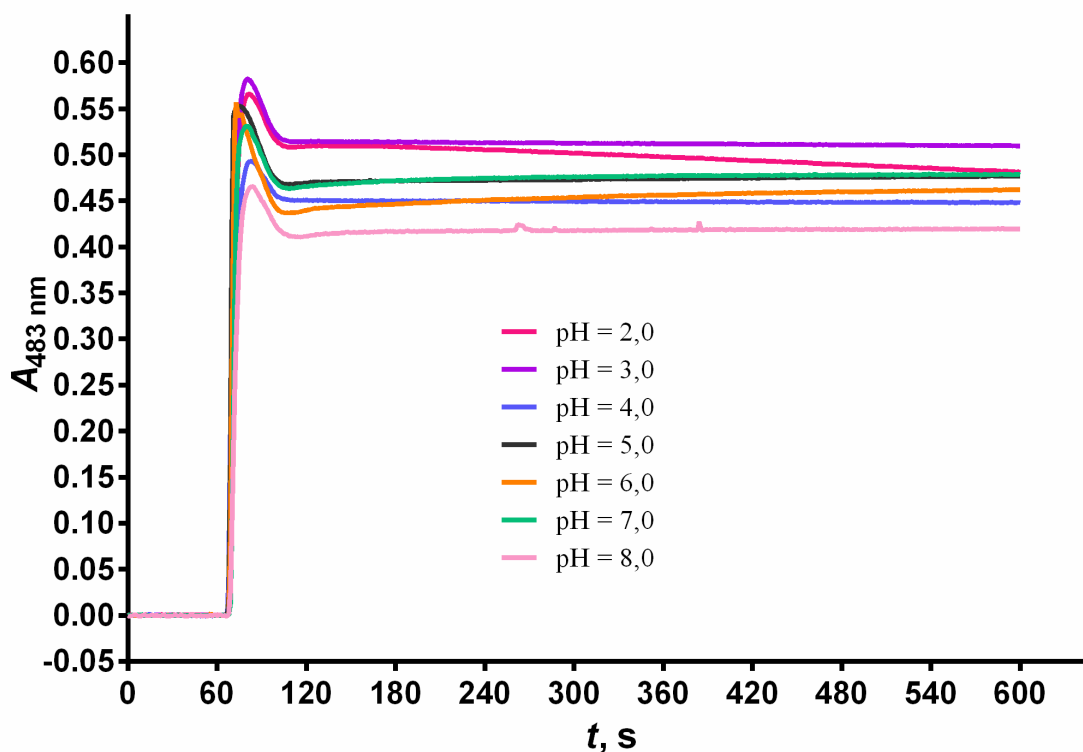
#### **4. REZULTATI**

## 4.1 Optimizacija kemijskih parametara

Prilikom razvoja metode provedena je optimizacija parametara koji bi mogli utjecati na kemijsku reakciju. To su pH vrijednost, temperatura, utjecaj molarnih omjera komponenti otopine reagensa i analita.

### 4.1.1 Optimizacija pH-vrijednosti

Utjecaj pH-vrijednosti otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-borato-fosfatnog pufera. Prilikom ispitivanja volumen otopine uzorka, koncentracije  $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  iznosio je 1 mL. Reakcijska otopina sastojala se od 0,6 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 2,4 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 10 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera i 1 mL vode.

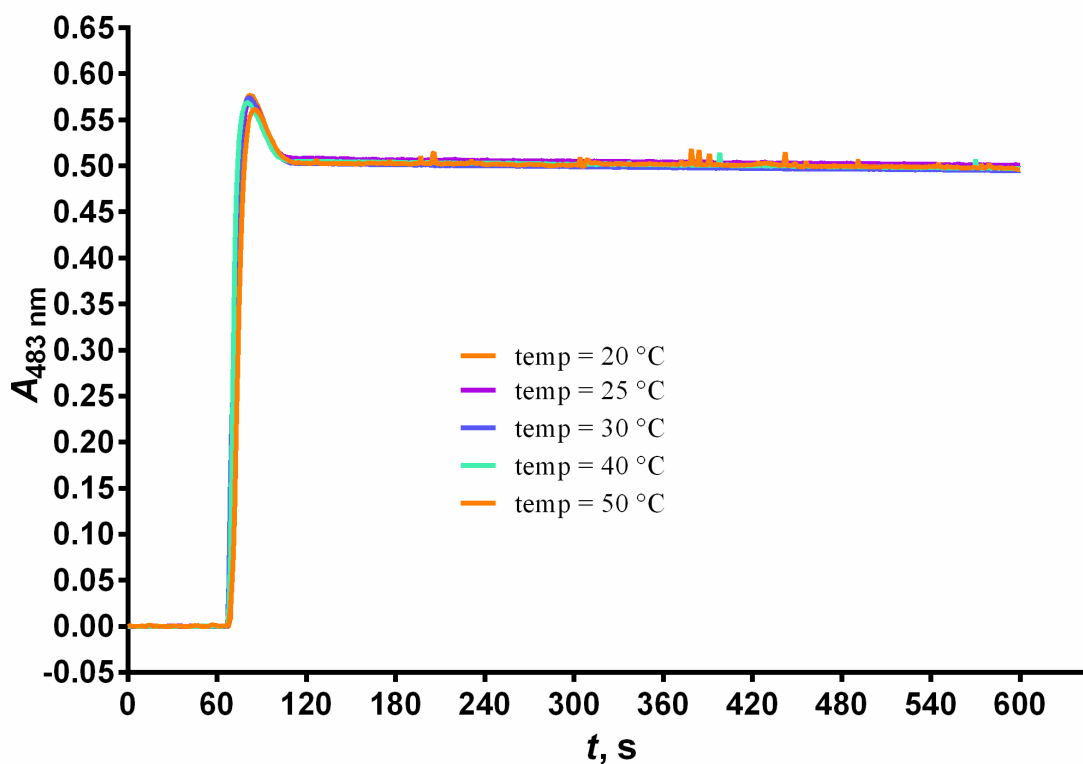


Slika 4.1. Grafički prikaz vremenske promjene apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje NAC-a, pri različitim pH vrijednostima

Pri višim pH-vrijednostima nije zabilježen porast signala ni brzine reakcije. Budući da NAC pripada skupini tiolnih spojeva, koji pokazuju veću stabilnost u kiselom mediju, odabrana pH-vrijednost iznosi 3,00.

#### 4.1.2. Optimizacija temperature

Utjecaj temperature reakcijske otopine na intenzitet signala ispitan je u temperaturnom rasponu od 20 °C do 50 °C. Prilikom ispitivanja volumen otopine uzorka, koncentracije  $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  iznosio je 1 mL. Reakcijska otopina sastojala se od 0,6 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 2,4 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 10 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera i 1 mL vode.



Slika 4.2. Grafički prikaz vremenske promjene apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje NAC-a pri različitim temperaturama

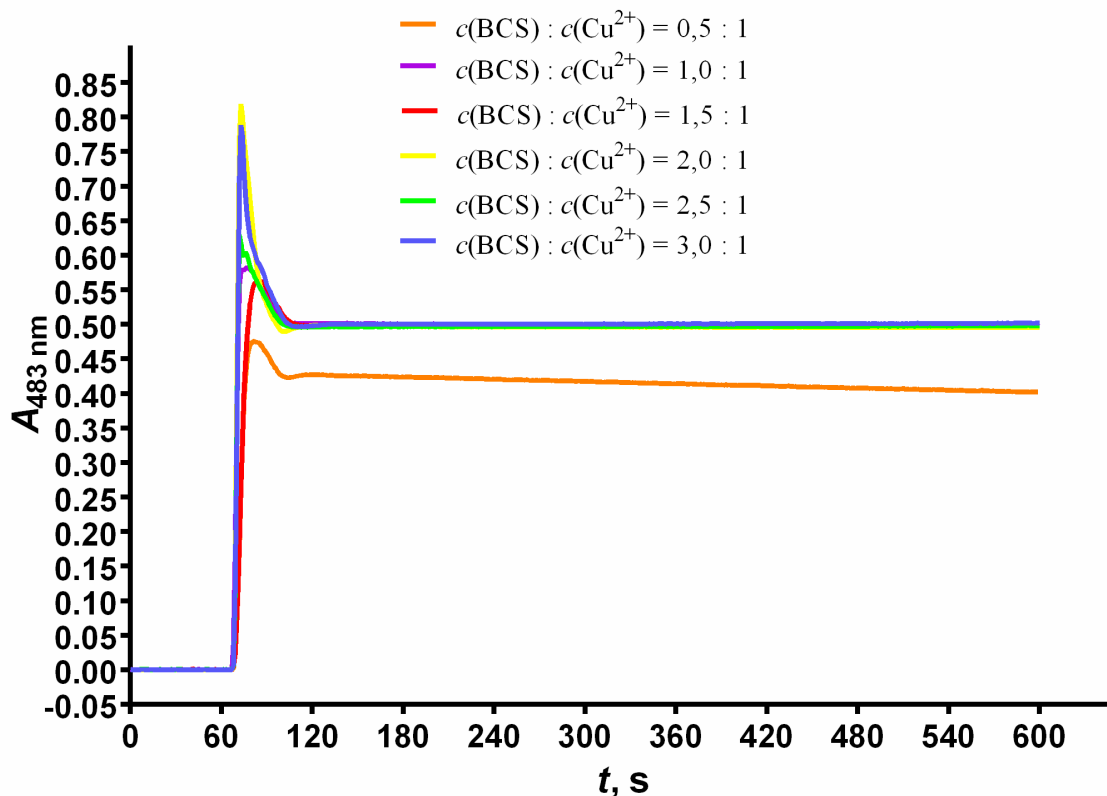
Brzina reakcije i stabilnost signala ostali su nepromijenjeni u širokom temperaturnom rasponu. Iz praktičnih razloga provedbe postupka kao radna temperatura odabrana je sobna temperatura od 25 °C.

#### 4.1.3 Optimizacija omjera koncentracija $\text{Cu}^{2+}$ i BCS

Kod razvoja kinetičke spektrofotometrijske metode određivanja NAC-a temeljenoj na redukciji bakarovog(II) batokuproina, ispitivan je molarni omjer reagensa  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS-a. Tijekom procesa optimizacije, dodavao se stalno jednaki volumen  $\text{Cu}^{2+}$ , ( $c = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), dok su se volumen i koncentracija BCS-a mijenjali. Molarni omjer koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  mijenjao se u rasponu od 0,5:1 do 3:1. (tablica 4.1.). Volumen otopine uzorka, koncentracije  $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  iznosio je 1 mL. Da bi se postigao ukupni volumen od 15 mL, volumen pufera i vode prilagođavao se s obzirom na dodavanu količinu BCS-a, kao što je prikazano u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Prikaz omjera koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ , volumeni i koncentracije korištenih otopina. Volumen otopine uzorka, ( $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) je 1 mL.

| $c(\text{BCS}):c(\text{Cu}^{2+})$ | $c(\text{BCS}),$<br>$\text{mol L}^{-1}$ | $V(\text{BCS}),$<br>$\text{mL}$ | $c(\text{Cu}^{2+}),$<br>$\text{mol L}^{-1}$ | $V(\text{Cu}^{2+}),$<br>$\text{mL}$ | $V(\text{H}_2\text{O}),$<br>$\text{mL}$ | $V(\text{pufer}),$<br>$\text{mL}$ |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|---|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| <b>0,5:1</b>                      | $1,6 \times 10^{-4}$                    | 1,13                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | 2,27                                    | 10,00                             |
| <b>1:1</b>                        | $3,2 \times 10^{-4}$                    | 2,25                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | 1,15                                    | 10,00                             |
| <b>1,5:1</b>                      | $4,8 \times 10^{-4}$                    | 3,60                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | /                                       | 9,80                              |
| <b>2:1</b>                        | $6,4 \times 10^{-4}$                    | 4,80                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | /                                       | 8,60                              |
| <b>2,5:1</b>                      | $8,0 \times 10^{-4}$                    | 6,00                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | /                                       | 7,40                              |
| <b>3:1</b>                        | $9,6 \times 10^{-4}$                    | 7,20                            | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | /                                       | 6,20                              |



Slika 4.3. Grafički prikaz vremenske promjene apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje NAC-a pri različitim omjerima  $\text{Cu}^{2+}$  i BCS

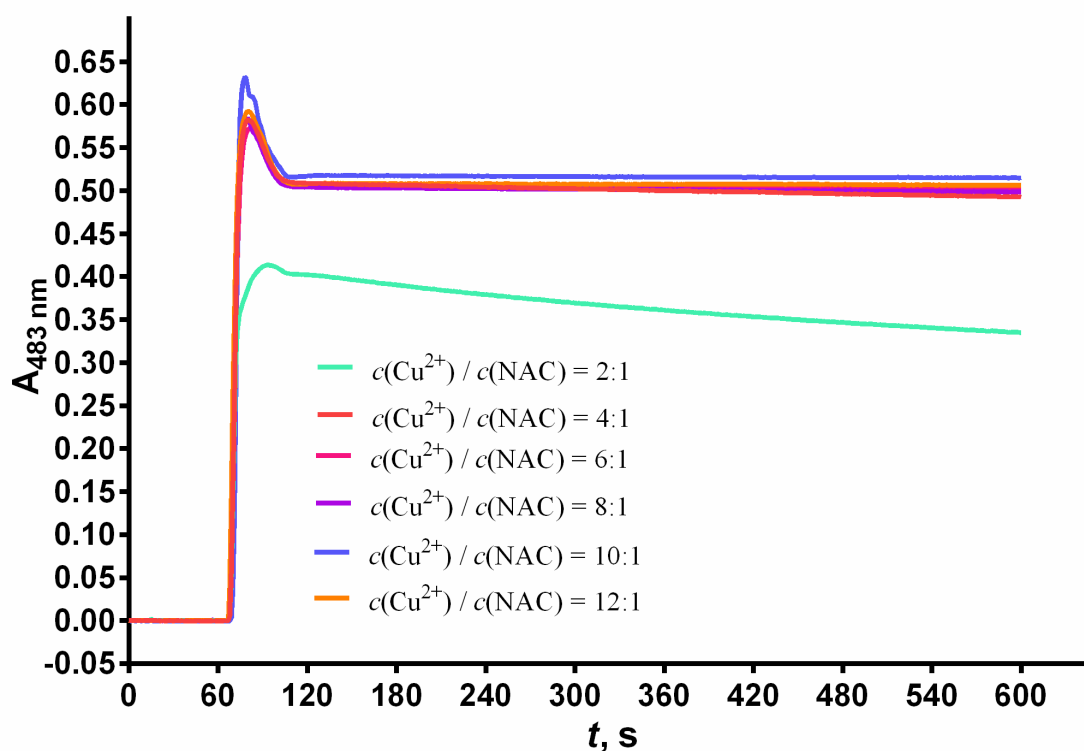
Rezultati su pokazali da povećanjem koncentracije BCS, brzina reakcije i apsorbancija rastu do omjera 1:1, nakon čega postižu konstantnu vrijednost.

#### 4.1.4 Optimizacija omjera koncentracija $\text{Cu}^{2+}$ i NAC

Mijenjajući omjer koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  i NAC promatrao se odnos reagensa i analita. Tijekom optimizacije omjer koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  održavao se prilikom šest mjerenja u omjeru 1:1. Zatim su provedena još tri mjerenja u kojima je koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  održavana u omjeru 1,5:1. Volumen otopine uzorka, ( $c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) je 1 mL. Da bi se postigao ukupni volumen od 15 mL, volumen pufera i vode prilagođavao se prilikom svakog mjerenja.

Tablica 4.2. Prikaz omjera koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  i NAC-a, volumeni i koncentracije korištenih otopina. Volumen otopine uzorka,  $\{c(\text{NAC}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$  je 1 mL, a omjer reagensa je  $c(\text{BCS}):c(\text{Cu}^{2+}) = 1:1$ .

| $c(\text{Cu}^{2+}):c(\text{NAC})$ | $c(\text{Cu}^{2+}),$<br>$\text{mol L}^{-1}$ | $V(\text{Cu}^{2+}),$<br>$\text{mL}$ | $c(\text{BCS}),$<br>$\text{mol L}^{-1}$ | $V(\text{BCS}),$<br>$\text{mL}$ | $V(\text{H}_2\text{O}),$<br>$\text{mL}$ | $V(\text{pufer}),$<br>$\text{mL}$ |
|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|---|-----------------------------------|
| <b>2:1</b>                        | $8,0 \times 10^{-5}$                        | 0,15                                | $8,0 \times 10^{-5}$                    | 0,60                            | 3,25                                    | 10,00                             |
| <b>4:1</b>                        | $1,6 \times 10^{-4}$                        | 0,30                                | $1,6 \times 10^{-4}$                    | 1,20                            | 2,50                                    | 10,00                             |
| <b>6:1</b>                        | $2,4 \times 10^{-4}$                        | 0,45                                | $2,4 \times 10^{-4}$                    | 1,80                            | 1,75                                    | 10,00                             |
| <b>8:1</b>                        | $3,2 \times 10^{-4}$                        | 0,60                                | $3,2 \times 10^{-4}$                    | 2,40                            | 1,00                                    | 10,00                             |
| <b>10:1</b>                       | $4,0 \times 10^{-4}$                        | 0,75                                | $4,0 \times 10^{-4}$                    | 3,00                            | 0,25                                    | 10,00                             |
| <b>12:1</b>                       | $4,8 \times 10^{-4}$                        | 0,90                                | $4,8 \times 10^{-4}$                    | 3,60                            | /                                       | 9,50                              |



Slika 4.4. Grafički prikaz vremenske promjene apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje NAC-a pri različitim omjerima  $\text{Cu}^{2+}$  i NAC-a

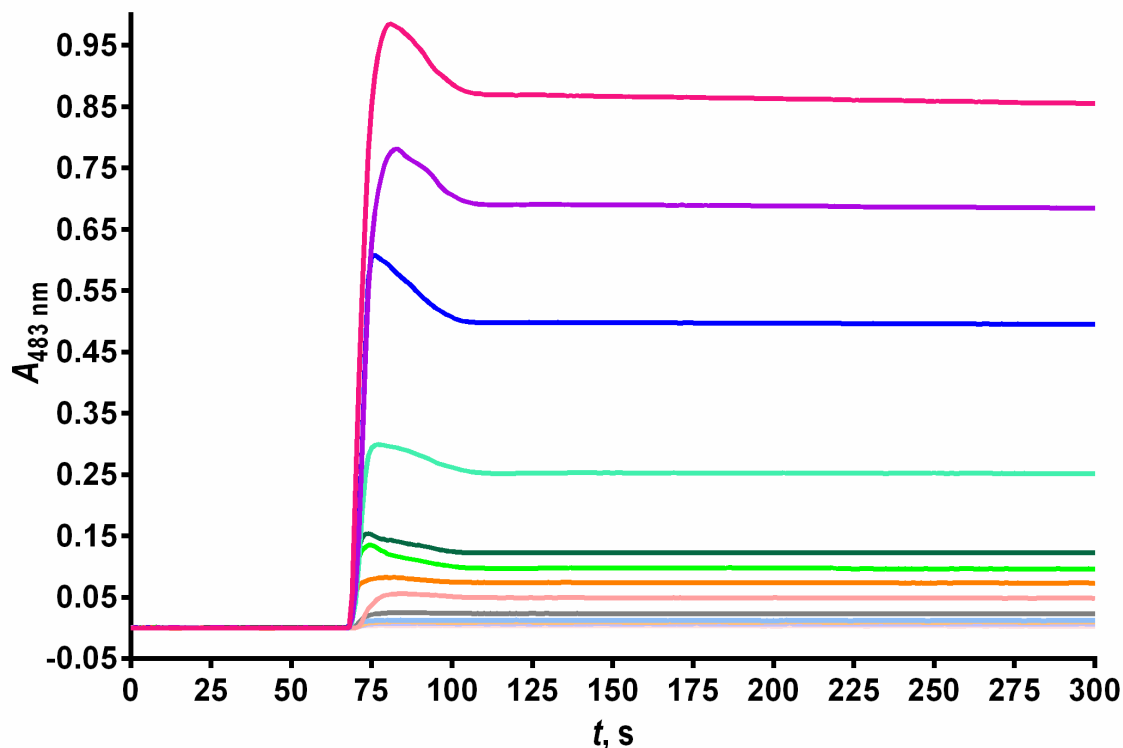
Odabran je omjer 6:1. Veće razlike u omjerima nisu pokazale utjecaj na vrijednost signala. Navedeni suvišak reagensa, osigurat će neovisnost visine signala o koncentraciji reagensa, odnosno odvijanje reakcije pseudoprvog reda.

Tablica 4.3. Optimizirani parametri za kinetičko spektrometrijsko određivanje NAC-a

| <b>Parametri</b>                    | <b>Ispitivano područje</b> | <b>Optimalni uvjeti</b> |
|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Temperatura                         | 20 °C – 50 °C              | 25 °C                   |
| pH vrijednost                       | 2,0 – 8,0                  | 3,0                     |
| $c(\text{BCS}) : c(\text{Cu}^{2+})$ | 0,5:1 do 3:1               | 1:1                     |
| $c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{NAC})$ | 2:1 do 12:1                | 6:1                     |

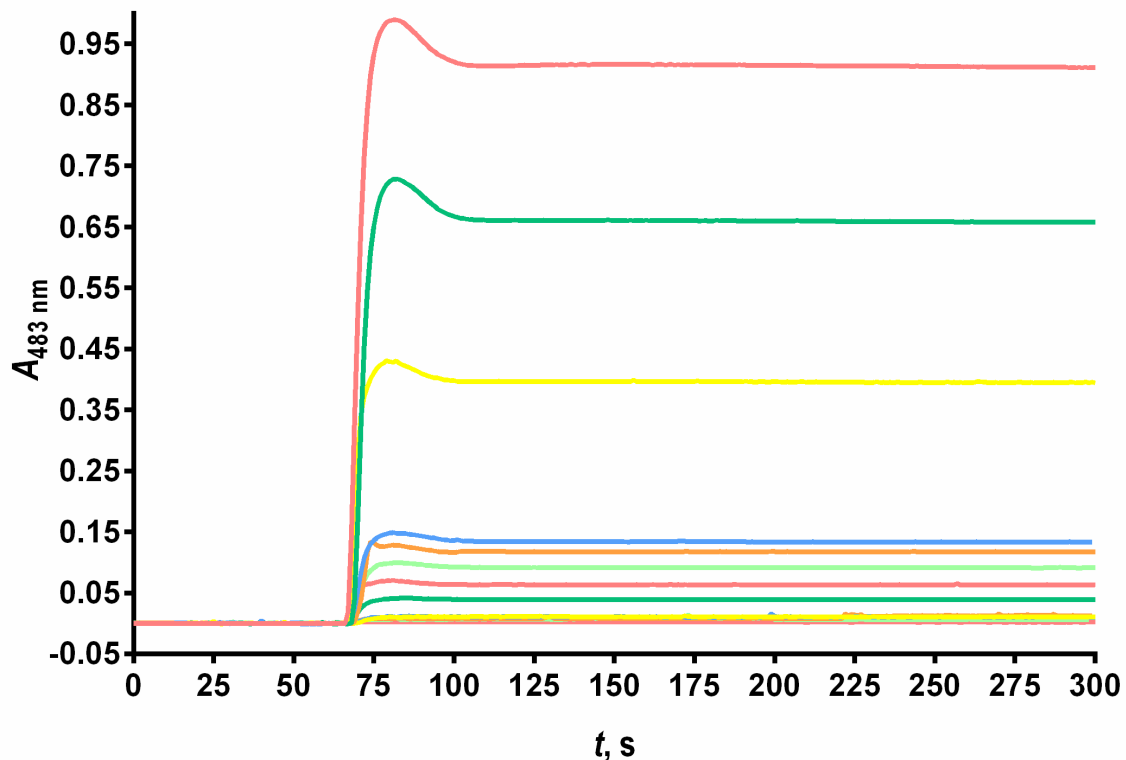
## 4.2 Linearno dinamičko područje

Koristeći navedene optimalne uvjete (tablica 4.3.), proveden je niz kinetičkih mjerenja za različite koncentracije NAC-a, u rasponu od  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Kinetički zapisi ovih mjerenja prikazani su na slikama 4.5. i 4.6. Prilikom drugog mjerenja, prikazanog na slici 4.6. obuhvaćen je širi raspon koncentracija.



Slika 4.5. Apsorbancija kao funkcija proteklog vremena pri različitim koncentracijama NAC-a. Eksperimentalni uvjeti: koncentracijsko područje NAC-a od  $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; reakcijska otopina: otopina  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) volumena 0,45 mL; otopina BCS ( $c(\text{BCS}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) volumena 1,80 mL; otopina pufera volumena 10,0 mL.





Slika 4.6. Apsorbancija kao funkcija proteklog vremena pri različitim koncentracijama NAC-a. Eksperimentalni uvjeti: koncentracijsko područje NAC-a od  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; reakcijska otopina: otopina  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) volumena 0,45 mL; otopina BCS ( $c(\text{BCS}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) volumena 1,80 mL; otopina pufera volumena 10,0 mL.

Zabilježeni eksperimentalni podatci obrađeni su korištenjem dviju kvantitativnih računskih metoda: metodom određenog vremena i metodom početne brzine.

#### 4.2.1 Metoda određenog vremena

Primjenom metode određenog vremena zabilježene su apsorbancije reakcijskih otopina koje su sadržavale različite koncentracije NAC-a u prethodno određenom vremenu. Točno određeno vrijeme odabrano je s obzirom na osjetljivost, koncentracijski raspon i vrijeme analize. Apsorpcija je bilježena tijekom 5 minuta. Analitički parametri izračunani su za svakih 30 sekundi, počevši od 90 sekunde od početka mjerenja. Budući da od 120 sekunde

nije bilo značajnih razlika s obzirom na osjetljivost i raspon koncentracije, određeno je vrijeme 120 sekundi za daljnja mjerenja. Za odabrano vrijeme od 120 sekundi na slici 4.7. prikazana je krivulja umjeravanja. Krivulja umjeravanja konstruirana je postavljajući u međusobni odnos izmjerenu apsorbanciju u 120 s i koncentraciju NAC-a. Jednadžba pravca je  $y = 13140x - 0,0005$ , a koeficijent linearne regresije  $R^2$  je 0,9999.

Tablica 4.4. Regresijska analiza metode određenog vremena za određivanje NAC-a.

| Varijable  | 90 s                                  | 120 s                                 | 150 s                                 | 180 s                                 | 210 s                                 | 240 s                                 |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Linearno dinamičko područje (mol L <sup>-1</sup> ) | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-5}$ |
| Nagib regresijskog pravca                          | 13790                                 | 13140                                 | 13150                                 | 13140                                 | 13140                                 | 13110                                 |
| Odsječak na osi y                                  | -0,0008                               | -0,0005                               | -0,0004                               | -0,0006                               | -0,0009                               | -0,0003                               |
| Korelacijski koeficijent, $R^2$                    | 0,9997                                | 0,9999                                | 0,9999                                | 0,9999                                | 1,000                                 | 0,9999                                |
| Granica dokazivanja, LOD (mol L <sup>-1</sup> )    | $8 \times 10^{-8}$                    | $8 \times 10^{-8}$                    | $8 \times 10^{-8}$                    | $8 \times 10^{-8}$                    | $8 \times 10^{-8}$                    | $8 \times 10^{-8}$                    |
| Granica određivanja, LOQ (mol L <sup>-1</sup> )    | $3 \times 10^{-7}$                    | $3 \times 10^{-7}$                    | $3 \times 10^{-7}$                    | $3 \times 10^{-7}$                    | $3 \times 10^{-7}$                    | $3 \times 10^{-7}$                    |

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

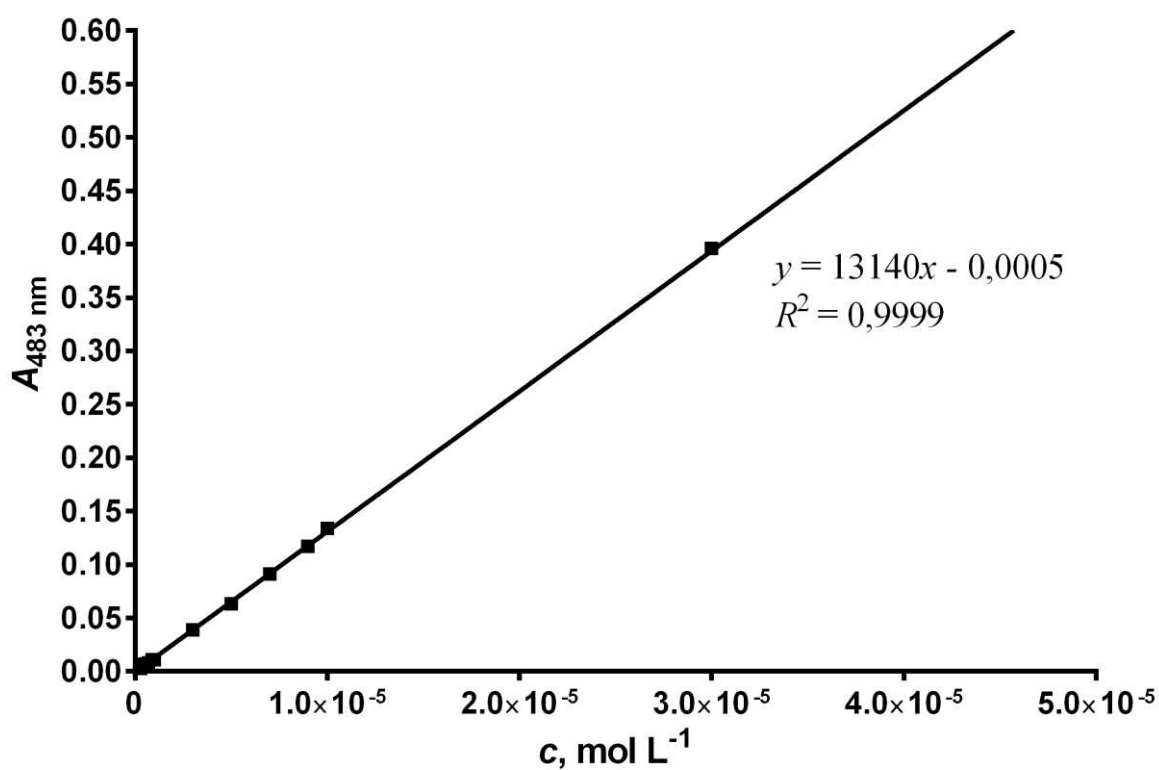
$$D_L = \frac{3 \times s_b}{m}$$

pri čemu je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe,  $m$  nagib krivulje umjeravanja.

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

$$Q_L = \frac{10 \times s_b}{m}$$

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



Slika 4.7. Krivulja umjeravanja za metodu određenog vremena. ApSORBANCija očitana u 120 s od početka reakcije; koncentracija NAC-a u rasponu od  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Metoda početne brzine

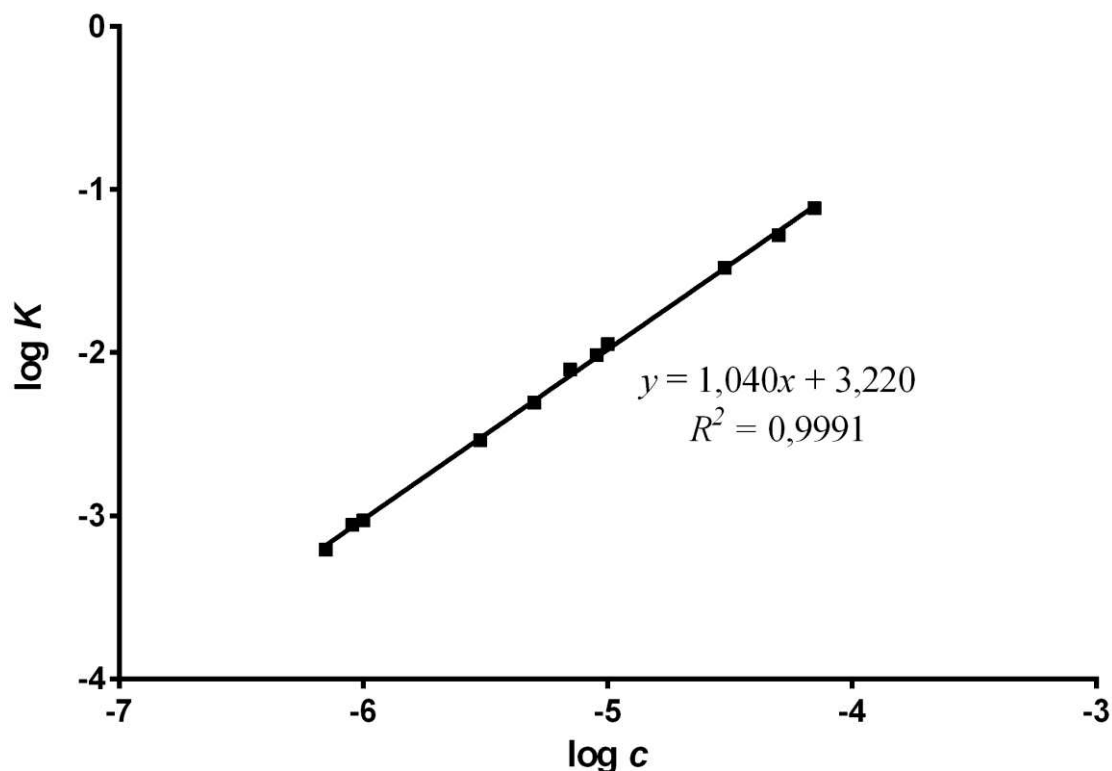
Iz podataka kinetičkih mjerenja ovisnosti signala o vremenu, potrebno je odrediti početnu brzinu reakcije,  $K$ . Početna brzina reakcije ( $K$ ) određuje se iz nagiba tangente na početni dio kinetičke krivulje. Logaritam početne brzine ( $\log K$ ) reakcije prikazuje se kao funkcija logaritma koncentracije analita ( $\log c$ ).

Regresijska analiza vrijednosti provedena je uvrštavanjem podataka u sljedeću jednadžbu:

$$\log K = \log k' + n \log c$$

gdje je  $K$  brzina reakcije,  $k'$  uvjetna konstanta brzine reakcije,  $c$  molarna koncentracija NAC-a,  $n$  (tj. nagib regresijskog pravca) je red reakcije.

Regresijskom analizom dobiven je pravac nagiba 1,040. To potvrđuje da su postignuti uvjeti za odvijanje reakcije prvog reda. Granica dokazivanja iznosi  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , dok je granica određivanja  $7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .



Slika 4.8. Krivulja umjeravanja za metodu početne brzine; koncentracija NAC-a u rasponu od  $7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

### 4.3. Utjecaj interferencija

Pri koncentraciji NAC-a od  $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ispitan je utjecaj stranih iona i tvari koje se često nalaze kao pomoćne tvari u sastavu tableta. Ispitani omjeri interferencija / analit mnogo su veći od onih što se uobičajeno nalaze u farmaceutskim pripravcima. Granica tolerancije definirana je kao koncentracija stranog iona ili tvari koja će prilikom mjerenja izazvati pogrešku manju od  $\pm 5 \%$ .

Tablica 4.5. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari.

| Strane tvari             | Dopuštena koncentracija ( $\text{mol L}^{-1}$ ) | Dopušten omjer [tvar] : [NAC] | Relativna pogreška (%) |
|--------------------------|---|-------------------------------|------------------------|
| Glukoza                  | $2 \times 10^{-2}$                              | 500 : 1                       | + 3,83                 |
| Fruktoza                 | $2 \times 10^{-2}$                              | 500 : 1                       | + 1,92                 |
| $\text{KNO}_3$           | $2 \times 10^{-2}$                              | 500 : 1                       | + 1,83                 |
| Laktoza                  | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | + 4,89                 |
| Borna kiselina           | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | - 0,51                 |
| Limunska kiselina        | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | - 1,01                 |
| Vinska kiselina          | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | - 1,56                 |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$ | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | + 0,11                 |
| Na – citrat dihidrat     | $2 \times 10^{-3}$                              | 50 : 1                        | + 0,88                 |
| Acetilsalicilna          | $4 \times 10^{-5}$                              | 1 : 1                         | - 2,94                 |

#### 4.4. Točnost metode

Točnost razvijene metode ispitana je određivanjem iskoristivosti metode. Pripravljene su sintetske otopine koje su sadržavale analit iz realnog uzorka uz dodatak točno poznate koncentracije analita (standarda). Prilikom ispitivanja korištene su Fluimukan šumeće tablete od 200 mg i 600 mg.

##### Priprava sintetskih otopina:

###### 1. FLUIMUKAN 200 mg šumeće tablete, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska

**A<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2A_{mix}} = 2,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2A_{mix}} = \frac{1 \text{ mL} \times 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 2,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**B<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 0,5 mL standardne otopine NAC \*\* ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2B_{mix}} = 3,065 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2B_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (0,5 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 3,065 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**C<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 1,0 mL standardne otopine NAC \*\* ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2C_{mix}} = 3,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2C_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 3,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**D<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 1,5 mL standardne otopine NAC \*\* ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2D_{mix}} = 4,295 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2D_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1,5 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,295 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**E<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 2 mL standardne otopine NAC \*\* ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2\text{E}_{\text{mix}}} = 4,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2\text{E}_{\text{mix}}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (2,0 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**F<sub>mix</sub>** sadrži 2 mL standardne otopine NAC \*\* ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjernoj tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2\text{F}_{\text{mix}}} = 3,065 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2\text{F}_{\text{mix}}} = \frac{2,0 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 2,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

\* pripravlja se otapanjem jedne šumeće tablete (200 mg) u 500 mL destilirane vode. Masena koncentracija iznosi  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ .

$$\gamma = \frac{m(\text{NAC})}{V_{\text{ot}}} = \frac{0,2 \text{ g}}{0,5 \text{ L}} = 0,4 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripravljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{NAC})}{M(\text{NAC})} = \frac{0,4 \text{ g L}^{-1}}{163,2 \text{ g mol}^{-1}} = 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

\*\* standardna otopina NAC pripravlja se otapanjem 10 mg u 50 mL acetano-boratno-fosfatnog pufera, pH = 3.

$$\gamma = \frac{m(\text{NAC})}{V_{\text{ot}}} = \frac{0,01 \text{ g}}{0,05 \text{ L}} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija iznosi:

$$c = \frac{\gamma}{M} = \frac{0,2 \text{ g L}^{-1}}{163,2 \text{ g mol}^{-1}} = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

## 2. FLUIMUKAN 600 mg šumeće tablete, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska

**A<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2A_{mix}} = 3,676 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2A_{mix}} = \frac{1,0 \text{ mL} \times 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 3,676 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**B<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 0,5 mL standardne otopine NAC ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2B_{mix}} = 4,291 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2B_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (0,5 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,291 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**C<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 1,0 mL standardne otopine NAC ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2C_{mix}} = 4,906 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2C_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1,0 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,906 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**D<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 1,5 mL standardne otopine NAC ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2D_{mix}} = 5,521 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2D_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1,5 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 5,521 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**E<sub>mix</sub>** sadrži 1 mL otopljene tablete \* i 2 mL standardne otopine NAC ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2E_{mix}} = 6,136 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

$$c_{2E_{mix}} = \frac{(1 \text{ mL} \times 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (2,0 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 6,136 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

**F<sub>mix</sub>** sadrži 3 mL standardne otopine NAC ( $c(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u odmjerneji tikvici od 10 mL. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju  $c_{2F_{mix}} = 3,69 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



$$c_{2Fmix} = \frac{3,0 \text{ mL} \times 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 3,69 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

\* pripravlja se otapanjem jedne šumeće tablete u 1000 mL destilirane vode. Masena koncentracija iznosi  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ .

$$\gamma = \frac{m(\text{NAC})}{V_{\text{ot}}} = \frac{0,6 \text{ g}}{1 \text{ L}} = 0,6 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripravljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{NAC})}{M(\text{NAC})} = \frac{0,6 \text{ g L}^{-1}}{163,2 \text{ g mol}^{-1}} = 3,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Za svaki uzorak određena je vrijednost apsorbancije. Koristeći jednadžbu pravca, koja je dobivena iz krivulje umjeravanja, pripremljenim pomoću standardnih otopina NAC-a, izračunana je stvarna koncentracija NAC-a u farmaceutskim pripravcima. Iz izračunane koncentracije određena je masa NAC-a, koja je zatim uspoređena s teoretskom masom.

Tablica 4.6. Određivanje NAC-a u farmaceutskim pripravcima i ispitivanje iskoristivosti.

| Uzorak                                | Količina u uzorku, mg | Količina dodana, mg | Izmjereno, mg | Iskoristivost, % |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|------------------|
| Fluimukan<br>šumeće tablete<br>600 mg | 600,0                 | –                   | 569,4         | 94,9             |
|                                       |                       | 50                  | 660,4         | 101,6            |
|                                       |                       | 100                 | 647,4         | 92,5             |
|                                       |                       | 150                 | 783,75        | 104,5            |
|                                       |                       | 200                 | 808,0         | 101,0            |
| Fluimukan<br>šumeće tablete<br>200 mg | 200,0                 | 50                  | 250,75        | 100,3            |
|                                       |                       | 100                 | 302,1         | 107,0            |
|                                       |                       | 150                 | 353,85        | 101,1            |
|                                       |                       | 200                 | 372,8         | 93,2             |

Primjena razvijene metode za određivanje NAC-a u realnim uzorcima prikazana je u tablici 4.7. Prilikom ispitivanja korištene su Fluimukan šumeće tablete od 200 mg i 600 mg. Priprava otopina realnih uzoraka opisana je u poglavlju 3.3.5. Količina NAC-a u realnim uzorcima određena je pomoću metode početne brzine, metode određenog vremena i standardnom metodom prema farmakopeji.

Tablica 4.7. Količina NAC-a u realnim uzorcima.

| <b>Uzorak</b>                      | <b>Količina u uzorku, mg</b> | <b>Metoda početne brzine, mg</b> | <b>Metoda određenog vremena, mg</b> | <b>Standardna metoda prema farmakopeji, mg</b> |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| Fluimukan šumeće tablete<br>600 mg | 600                          | 592,8                            | 574,7                               | 622,0  |
| Fluimukan šumeće tablete<br>200 mg | 200                          | 210                              | 225,4                               | 201,9  |

## **5. RASPRAVA**

Razvijena spektrofotometrijska analitička tehnika temelji se na redoks reakciji u kojoj se odvija redukcija bis batokuproin bakrovog(II) kompleksa uz učešće NAC-a, pri čemu nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis batokuproin bakarov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm.



Kinetička spektrofotometrijska metoda opisana je u poglavlju 3.5., dijelovi sustava navedeni su u poglavlju 3.4., a shematski prikaz na slici 3.8.

Budući da se apsorbancija bilježi u kinetičkom dijelu reakcije, prilikom razvoja metode posebna pažnja posvećena je optimizaciji parametara koji bi mogli utjecati na redoks reakciju. To su pH-vrijednost, temperatura, utjecaj molarnih omjera komponenti otopine reagensa i analita.

Utjecaj pH-vrijednosti otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-boratno-fosfatnog pufera. Pri višim pH vrijednostima nije zabilježen porast signala ni brzine reakcije. Budući da NAC pripada skupini tiolnih spojeva, koji pokazuju veću stabilnost u kiselom mediju, odabrana vrijednost pH iznosi 3,00. Pri pH vrijednosti 2,00 i nakon uspostave ravnoteže bilježi se blagi pad signala.

Utjecaj temperature otopine uzorka na intenzitet signala ispitan je u temperaturnom rasponu od 20 °C do 50 °C. Rezultati su pokazali kako je predložena redoks reakcija temperaturno neovisna. Brzina reakcije i stabilnost signala ostali su nepromijenjeni u širokom temperaturnom rasponu. Iz praktičnih razloga provedbe postupka kao radna temperatura odabrana je sobna temperatura od 25 °C.

Prilikom optimizacije omjera koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  odnos se mijenjao u rasponu od 0,5:1 do 3:1. Rezultati su pokazali da povećanjem koncentracije BCS, brzina reakcije i apsorbancija rastu do omjera 1:1, nakon čega postižu konstantnu vrijednost.

Prilikom optimizacije omjera koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  i NAC-a, odabran je omjer 6:1. Veće razlike u omjerima nisu pokazale utjecaj na vrijednost signala. Navedeni suvišak reagensa, osigurat će neovisnost visine signala o koncentraciji reagensa, odnosno odvijanje reakcije pseudoprvo reda.

Na temelju optimiziranog sustava mjerenjem niza standardnih otopina analita utvrđeno je linearno dinamičko područje u koncentracijskom rasponu od  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Dobiveni rezultati obrađeni su pomoću dvije kvantitativne računске metode: metoda određenog vremena i metoda početne brzine. Korištenjem metode određenog vremena dobivena je jednadžba regresijskog pravca  $y = 13140x - 0,0005$  te koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9999$ . Korištenjem metode početne brzine dobivena je jednadžba regresijskog pravca  $y = 1,040x + 3,220$  te koeficijent linearne regresije,  $R^2 = 0,9991$ . Budući da nagib pravca iznosi 1,040, postignuti su uvjeti za odvijanje reakcije prvog reda.

Primjenom stranih iona i tvari koje se često nalaze u sastavu tableta, ispitan je utjecaj interferencija na određivanje NAC-a. Prilikom ispitivanja utjecaja odabranih aniona i kationa te pomoćnih tvari, maksimalan molarni omjer prema NAC-u, u kojem je utvrđena tolerantnost, iznosio je 500:1. To odgovara koncentraciji glukoze, fruktoze, kalijeva nitrata do  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Koncentracija laktoze, borne kiseline, limunske i vinske kiseline,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i Na-citrat dihidrata tolerantna je do  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , što odgovara molarnom omjeru prema NAC-u, 50:1. Koncentracija aspirina tolerantna je do granice  $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , što odgovara najmanjem molarnom omjeru NAC-a prema stranim ionima, 1:1. Prilikom mjerenja uočena su odstupanja za laktozu, bornu kiselinu, limunsku i vinsku kiselinu,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i Na-citrat dihidrata ako se koriste koncentracije  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , odnosno omjer 500:1. Budući da se radi o značajno većoj koncentraciji navedenih tvari, mjerenje je ponovljeno tako da su pripravljene otopine smanjenih udjela interferirajućih tvari, odnosno otopine s 50 puta većim koncentracijama u odnosu na NAC. Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 4.4. uočljivo je da ni jedna od odabranih tvari neće utjecati na određivanje NAC-a.

Razvijena metoda primijenjena je za određivanje NAC-a u komercijalno dostupnim farmaceutskim pripravcima, Fluimukan šumećim tabletama od 200 mg i 600 mg. Ispitivanje iskoristivosti metode provedeno je dodajući poznate količine NAC-a u otopinu uzorka tablete. U tablicama 4.6. i 4.7. prikazani su rezultati ispitivanja iskoristivosti. Iskoristivost izražena u postotcima kretala se u rasponu od 93 % do 107 %. Razvijena metoda može se uspješno primijeniti za određivanje NAC-a u farmaceutskim pripravcima bez prethodne složene obrade realnog uzorka.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj istraživanja bio je razvoj i optimizacija, jednostavne i osjetljive kinetičke spektrofotometrijske metode određivanja NAC-a. Metoda se temelji na redoks reakciji gdje analit, NAC, reducira bis batokuproin bakrov(II) kompleks u narančasto obojeni bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm.

Optimizacijom reakcijskih uvjeta odabrani su slijedeći parametri reakcije: radna temperatura 25 °C; pH 3,0; omjer koncentracija BCS i  $\text{Cu}^{2+} = 1$ ; omjer  $\text{Cu}^{2+}$  i NAC = 6. Parametri kemijske reakcije optimizirani su s ciljem brzog, preciznog i selektivnog određivanja analita.

Budući da nije potrebna prethodna obrada uzorka, u kratkom vremenskom periodu može se analizirati velik broj uzoraka.

Bilježenjem signala u kinetičkom dijelu reakcije postiže se visoka ponovljivost koja omogućava visoku preciznost primijenjene metode.

Razvijena metoda omogućava postizanje širokog linearnog dinamičkog područja od  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , te određivanje jako niskih koncentracija NAC-a ( $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) bez korištenja skupe opreme. Također, vrlo niska granica određivanja NAC-a omogućava smanjenje utjecaja interferencija samim razrjeđenjem otopine uzorka.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**



- [1] URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06151>
- [2] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12035#section=Top>
- [3] Sweetman S.C. (Ed.), Martindale: The Complete Drug Reference, 36th ed., The Pharmaceutical Press, Chicago, USA, 2009
- [4] URL: [http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC\\_UP-I-530-09-14-02-354.pdf](http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-14-02-354.pdf)
- [5] Sansone R., Sansone L., Getting a Knack for NAC: N-Acetyl-Cysteine, *Innov Clin Neurosci.* 2011 Jan; 8(1): 10–14
- [6] Mokhtari V., Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar S M, and Moini A, A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine, *Cell J.* 2017 Apr-Jun; 19(1): 11–17.
- [7] European Pharmacopoeia; 6 ed.; Council of Europe: Nordlingen, 2008; Vol. 2., 1100-1101
- [8] Radić NJ, Kukoč Modun L, Biočić M., Kinetic spectrophotometric determination of N-Acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent. *Croat. Chem. Acta.* 2013; str.65-71.
- [9] Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.*
- [10] Radić Nj., Kukoč Modun L., Kinetic methods of analysis with potentiometric and spectrophotometric detectors - our laboratory experience, *Analytical Chemistry* 2012, 71-92
- [11] Harvey D. *Modern analytical chemistry, McGraw-Hill Companies Inc., Boston, 2000*
- [12] Kukoc-Modun L, Tsikas D., Kraljević T., Biocic M., Radić NJ., Kinetic Spectrophotometric Determination of N-Acetyl-L-cysteine Ethyl Ester (NACET) Generating Chromogenic Copper(I)Ln Complexes with Different Ligands, *Croat. Chem. Acta* 2017, 263–271
- [13] Interna skripta za pripremu vježbe: Kinetičke metode analize (Skripta je sačinjena od materijala preuzetog iz doktorske disertacije: Kukoč-Modun L. (2009) Razvoj metoda spektrofotometrijskog i potenciometrijskog određivanja tiopronina u farmaceutskim preparatima-disertacija, Zagreb, str. 48 – 57.)
- [14] Generalić, Eni. "Spektar elektromagnetskog zračenja." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar.* 29 Aug. 2017. KTF-Split. 11 May. 2018. <https://glossary.periodni.com>

[15] Harris DC. Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.

[16] Nj. Radić, L. Kukoč-Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2015.

## **8. SAŽETAK**

Korištenjem kinetičke spektrofotometrije razvijena je nova metoda određivanja NAC-a u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj se odvija redukcija bis batokuproin bakrovog(II) kompleksa uz učešće NAC-a, pri čemu nastaje vrlo stabilan kompleks narančaste boje, bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm. Optimizirani su parametri koji utječu na kemijsku reakciju. Metoda određenog vremena i metoda početne brzine korištene su za izradu krivulja umjeravanja. Krivulja umjeravanja za metodu određenog vremena linearna je u području koncentracija od  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , uz granicu dokazivanja od  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Jednadžba pravca  $y = 13140x - 0,0005$ ; koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9999$ . Primjenom metode početne brzine postignuta je linearnost u koncentracijskom području od  $7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , uz granicu dokazivanja od  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Jednadžba pravca  $y = 1,040x + 3,220$ ; koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9991$ . Tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja NAC-a u komercijalnim farmaceutskim pripravcima što je uspoređeno s rezultatima dobivenim preporučenom metodom po farmakopeji.

## **9. SUMMARY**

Kinetic spectrophotometry was employed for development of new method for determination NAC in pharmaceutical formulation. Method is based on the redox reaction in which the reduction of cooper(II)-bathocuproine by NAC occurs, with formation of colored, orange complex of cooper(I)-bathocuproine. The stable complex exhibits an absorption maximum at  $\lambda = 483$  nm. The parameters of chemical reaction have been optimized. Using kinetic spectrophotometric measurements the initial rate and fixed time methods were utilized for constructing the calibration graphs. For the fixed time method the graph is linear in concentration range from  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> with limit of detection  $8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>; equation  $y = 13140x - 0.0005$ ; correlation coefficient  $R^2 = 0.9999$ . For the initial rate method linearity the graph is linear in concentration range from  $7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> with limit of detection  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; equation  $y = 1.040x + 3.220$ ; correlation coefficient  $R^2 = 0.9991$ . No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations. The proposed methods was successfully applied for the determination of NAC in its commercial pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the recommended method.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Martina Stipišić rođena je 22. srpnja 1994. u Splitu. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu Mertojak. U Prirodoslovnoj-tehničkoj školi, smjer Prirodoslovna gimnazija maturira 2013. godine. Iste godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije Sveučilišta u Splitu. Od 1. ožujka do 1. rujna 2018. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Brda.