Razvoj i vrednovanje spektrofotometrijske metode određivanja tiopronina u farmaceutskim pripravcima slijednom analizom injektiranjem

Leskur, Željana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:388437

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Željana Leskur

RAZVOJ I VREDNOVANJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA TIOPRONINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Split, listopad 2016.

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:	Instrumentalne metode analize
Tema rada	je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Pomoć pri izradi:	mag. ing. chem. ing. Maja Biočić

RAZVOJ I VREDNOVANJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA TIOPRONINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM

Željana Leskur, broj indeksa: 45

Sažetak:
Korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicina, MPG) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks-reakciji između bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa i tiopronina pri čemu nastaje bis neokuproin bakrov(I) obojeni kompleks, žuto-narančaste boje. Nastali kompleks pokazuje apsorpcijski maksimum pri λ = 458 nm. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni parametri protočnog sustava te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja čijom je regresijskom analizom utvrđena jednadžba pravca: y = 3413,1x + 0,0007. Postignuta je linearnost u području koncentracija analita od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1}. Određene su granica dokazivanja (2×10^{-7} mol L^{-1}) i granica određivanja (6×10^{-7} mol L^{-1}). Provedeno je vrednovanje metode te je provjereno prenošenje signala, ponovljivost signala, točnost i iskoristivost metode. Osim acetilsalicilne kiseline i visokih koncentracija vinske kiseline i laktoze, tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja tiopronina u farmaceutskom pripravku što je uspoređeno s rezultatima dobivenim farmakopejskom metodom.

Ključne riječi: slijedna analiza injektiranjem, tiopronin, molekulska apsorpcijska spektrofotometrija.

Rad sadrži: 69 stranica, 35 slika, 6 tablica, 60 literaturnih referenci.

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. prof. dr. sc. Zoran Grubač - predsjednik
2. prof. dr. sc. Nenad Kuzmanić - član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član - mentor

Datum obrane: 27. listopada 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ul. Matice hrvatske 35 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:	Instrumental methods of analysis
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, and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor:	doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Technical assistence:	mag. ing. chem. ing. Maja Biočić

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SEQUENTIAL INJECTION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TIOPRONIN IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

Željana Leskur, index number: 45

Summary:
By using sequetial injection analysis with spectrophotometric detector a novel procedure was optimized and validated for the determination of tiopronin (*N*-2-Mercaptopropionyl-glycine, MPG) in pharmaceutical formulations. The method is based on a redox reaction in which the reduction of copper(II) - neocuproine by MPG occurs, with formation of colored, yellow-orange complex of copper(I) - neocuproine. The resulting complex exhibits an absorption maximum at λ = 458 nm. Univariate method was used to select optimal parameters of the flow system. As a result the calibration curve was plotted and using the regression analysis the equation: y = 3413,1x + 0,0007 was determined. The linearity in the concentration range of the analyte from 6×10^{-7} mol L^{-1} to 8×10^{-5} mol L^{-1} was achieved with that. The calculated limit of detection is 2×10^{-7} mol L^{-1} and the limit of quantification is 6×10^{-7} mol L^{-1}. Validation of the method included evaluating carryover, signal repeatability and recovery (accuracy and efficiency of the method). Besides aspirin, and high concentrations of lactose and tartaric acid, substances that are normally present in the composition of the pharmaceutical formulations do not interfere. The proposed method was successfully applied for the determination of MPG in its pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the pharmacopoeia method.

Key words: sequential injection analysis, tiopronin, molecular absorption spectrometry.

Thesis contains: 69 pages, 35 figures, 6 tables, 60 references.

Original in: Croatian

Defence committee:

1. prof. dr. sc. Zoran Grubač — chair person
2. prof. dr. sc. Nenad Kuzmanić — member
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun — supervisor

Defence date: October 27 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Matice hrvatske 35 St, and Library of School of Medicine, Šoltanska 1 St.

Sadržaj

1. Uvod 1

1. 1. Tiopronin, *N*-2-merkaptopropionil-glicin (MPG) 3

1.1.1. Kemijska svojstva 3

1.1.2. Farmakodinamika 4

1.1.3. Farmakokinetika 5

1.1.4. Doziranje 5

1.1.5. Nuspojave 5

1.1.6. Interakcije 6

1.1.7. Kontraindikacije i mjere opreza 6

1.1.8. Predoziranje 7

1.1.9. Analitičke metode određivanja tiopronina 8

2. Cilj istraživanja 9

3. Materijali i metode 10

3.1. Priprava otopina 10

3.2. Određivanje MPG-a metodom koju propisuje farmakopeja 14

3.3. Slijedna analiza injektiranjem 16

3.3.1. Formiranje zone 18

3.3.2. Programiranje sustava 21

3.3.3. Prikupljanje i obrada podataka 22

3.4. Spektroskopska analitička metoda; molekulska apsorpcijska spektrofotometrija 23

3.4.1. Molekulska apsorpcijska spektroskopija 23

3.4.2. Apsorpcija zračenja 23

3.4.3. Transmitancija 24

3.4.4. Apsorbancija 25

3.4.5. Odnos između apsorbancije i koncentracije: Beerov zakon 25

3.4.6. Ograničenja Beerovog zakona 26

3.4.7. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji 27
3.5. Ostali uređaji i oprema 30
4. Rezultati 31
4.1. Osnovna reakcija na kojoj se temelji metoda..... 31
4.2. Optimizacija kemijskih parametara 32
4.3. Optimizacija parametara protočnog sustava 34
4.3.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja 35
4.3.2. Optimizacija protoka 36
4.3.3. Optimizacija volumena injektiranja reagensa 38
4.3.4. Optimizacija volumena injektiranja standarda 40
4.3.5. Optimizacija volumena petlje zadržavanja..... 41
4.3.6. Optimizacija duljine reakcijske petlje 43
4.3.7. Odabrani optimalni parametri 45
4.4. Linearno dinamičko područje..... 46
4.5. Granica dokazivanja i granica određivanja..... 48
4.6. Vrednovanje metode..... 49
4.6.1. Utjecaj interferencija 49
4.6.2. Prenošenje signala …..... 52
4.6.3. Ponovljivost 53
4.6.4. Točnost i iskoristivost 54
4.7. Analize farmaceutskih pripravaka 57
5. Rasprava..... 59
6. Zaključak..... 63
7. Popis citirane literature..... 64
8. Sažetak..... 68
9. Summary..... 69

Zahvala

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici i voditeljici diplomskog rada doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun te neposrednoj voditeljici Maji Biočić, mag. ing. chem. ing. koje su mi omogućile svu potrebnu opremu i pomogle u izradi ovog diplomskog rada znanstvenim i stručnim savjetima i uputama. Zahvaljujem im se i na strpljenju i vremenu koje su odvojile za moje upite.

Želim se zahvaliti i svim djelatnicima Kemijsko-tehnološkog i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu koji su svojim radom pomogli u stjecanju moga znanja o farmaceutskoj znanosti te životu u struci i oko nje.

Dragim roditeljima Vesni i Željku, bratu i sestri, kao i cijeloj obitelji, od srca zahvaljujem na potpori i razumijevanju koje su mi pružili u cjelokupnom školovanju.

Zahvaljujem se i kolegama i prijateljima koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram lijepim dijelom svoga života.

1. Uvod

1. Uvod

U novijim farmaceutskim analizama povećana je potražnja za brzim, jeftinim, preciznim, lako primjenjivim instrumentalnim metodama analize s malom potrošnjom reagensa i uzorka. Jednako je važna i sigurnost pri rukovanju uzorcima te sigurnost za okoliš. Protočne metode analize dobro udovoljavaju uvjetima moderne farmaceutske analize i stalno su u razvoju. Prvu metodu uveli su Ruzicka i Hansen 1975. Godine. Bila je to protočna analiza injektiranjem (FIA) [1]. 1990. Godine Ruzicka i Marshall počeli su razvijati slijednu analizu injektiranjem (SIA) koja u odnosu na FIA-u ima neke promjene [2]. Unatoč brojnim prednostima, kao što su potpuna automatizacija, minijaturizacija i svestranost, FIA još uvijek dominira nad SIA-om. Razlog tome može biti to što je instrumentacija za FIA-u jednostavnija i dostupnija.

Određivanja sadržaja farmaceutskih pripravaka prema monografijama često zahtijevaju korištenje metoda koje se temelje na korištenju odgovarajućeg reagensa uz spektrofotometrijsku detekciju. Za mnoge rutinske i istraživačke postupke u farmaceutskim laboratorijima neophodna je automatizacija i minijaturizacija takvih metoda. U idealnom slučaju instrumentalne tehnike trebaju biti široko primjenjive, odnosno omogućiti određivanje različitih tvari bez potrebe za rekonfiguracijom sustava [3].

Do sada su opisane različite metode određivanja tiopronina. U literaturi su predložene metode određivanja korištenjem slijednih tehnika: spektrofotometrije, potenciometrije, kemiluminescencije, fluorescencije, katalitičke titracije te protočne analize injektiranjem uz različite detektore. O tome će biti više rečeno u poglavlju 1.1.9.

Slijedna analiza injektiranjem je jednostavna i svestrana analitička metoda, pogodna za automatizaciju, koja se temelji na fizikalnoj i kemijskoj manipulaciji dispergirane zone uzorka koja je formirana injektiranjem uzorka i reagensa u protok osnovne otopine te detekciji produkta. Slijedna analiza injektiranjem spada u kinetičke analitičke metode, jer se signal bilježi pod fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim neravnotežnim uvjetima, odnosno u trenutku kad reakcija nije ušla u stanje termodinamičke ravnoteže. Zbog svojih korisnih mogućnosti, SIA metoda je dobila posebnu pozornost u farmaceutskim analizama za različite namjene kao što su ispitivanje otapanja lijeka te određivanje aktivnih komponenti lijeka kod kontrole kvalitete u postupku razvoja i proizvodnje farmaceutskih pripravaka. Kako bi se razvila nova analitička metoda potrebna je optimizacija eksperimentalnih uvjeta analize. Univarijantna metoda optimizira eksperimentalne uvjete jedan po jedan, mijenjajući jedan uvjet dok se ostali uvjeti održavaju konstantnima [4].

U ovom istraživanju analit je tiopronin (*N*-2-merkaptopropionil-glicin, MPG) o kojem je opširnije prikazano u poglavlju 1.1. Cilj istraživanja je razvoj, optimizacija i vrednovanje spektrofotometrijske metode određivanja tiopronina slijednom analizom injektiranjem. Kemijska reakcija na kojoj se temelji metoda je redoks reakcija između tiopronina i bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa. Tiopronin reducira kompleks pri čemu se on sam oksidira te kao produkt nastaje narančasto-žuti bis neokuproin bakrov(I) kompleks koji apsorbira elektromagnetsko zračenje pri valnoj duljini 458 nm. Procesor signala daje

informaciju o apsorbanciji mjerenog kompleksa čija je vrijednost ekvivalentna koncentraciji tiopronina u uzorku. Svrha razvoja, optimizacije osnovnih značajki protočnog sustava i vrednovanja ove metode je postizanje dobre osjetljivosti analiza i učestalosti mjerenja uz minimalnu potrošnju otopina reagensa i uzorka.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za farmaciju Zavoda za farmaciju Medicinskog fakulteta u Splitu, korištenjem SIA sustava uz spektrofotometrijski detektor. Znanstveni tim s Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, predvođen prof. dr. sc. Njegomirom Radićem i doc. dr. sc. Leom Kukoč-Modun dugi niz godina izučava kinetičke metode analize pa tako i analize u protoku; protočnu analizu injektiranjem i slijednu analizu injektiranjem[1]. Rad je napravljen i u suradnji s neposrednom voditeljicom Majom Biočić, mag. ing. chem. ing.

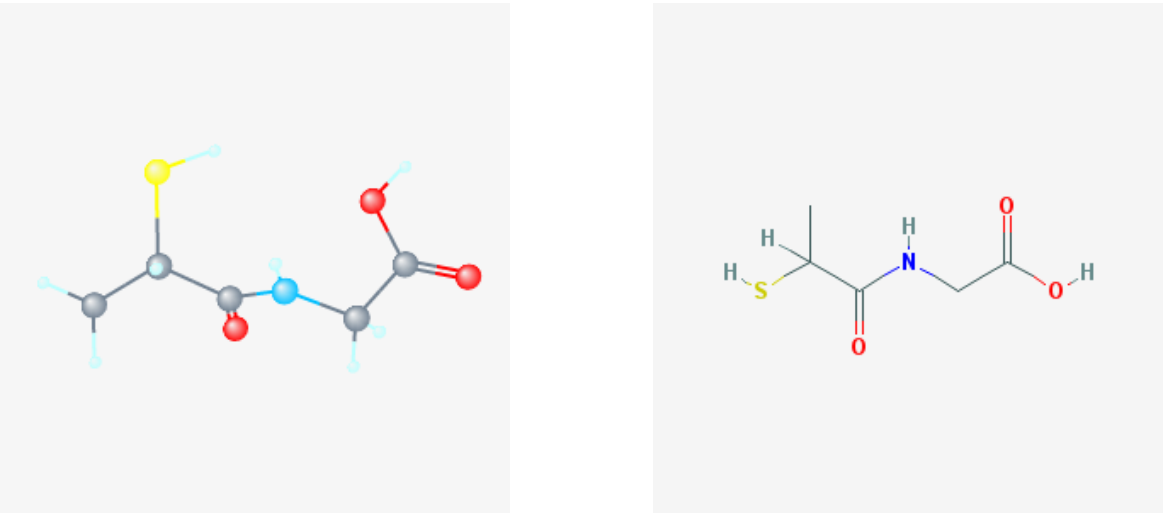
[1] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Sveučilište u Splitu; 2015. Poglavlje 19.

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

N-2-merkaptopropionil-glicin (sa skraćenicom MPG), također poznat kao tiopronin, 2-(2-sulfanoilpropanoilamino) octena kiselina (prema IUPAC-u), *N*-(2-merkapto-1-oksopropil) glicin, akadion, kapen, epatiol, meprin, mukolizin, sutilan, thiola, tiosol, vincol, kemijskog broja 1953-02-2 korišten je kao analit u ovom istraživanju. MPG je sintetski spoj, sulfhidril acetil derivat aminokiseline glicina, te sadrži tri elektron-donorske funkcionalne skupine: amidnu skupinu, karboksilnu skupinu i tiolnu skupinu zbog koje spada u obitelj tiolnih spojeva. Tioli su sumporni analozi alkohola budući da je kisik sa hidroksilne skupine zamijenjen sumporom. Tradicionalan im je naziv merkaptani (lat. Mercurium captans, „hvatači žive“) jer se tiolna skupina čvrsto veže za živu. Zbog pojednostavljenja pri pisanju kemijskih reakcija tioli se označavaju skraćenicom RSH. MPG se koristi se za liječenje cistinurije, reumatoidnog artritisa, Wilsonove bolesti, kao mukolitik, antioksidans i protuotrov kod trovanja teškim metalima, pogotovo živom, a istražuje se i njegova svrha kao neuroprotektiva kod aneurizme uzrokovane subarahnoidalnim krvarenjem [5]. Tiopronin se, zbog svoje sposobnosti kompleksiranja metala, može koristiti kao protuotrov pri trovanju teškim metalima, posebice živom [6]. Liječenje cistinurije tioproninom zasniva se na razaranju disulfidne veze cistina, pri čemu nastaje cistein koji je 50 puta topljiviji [7]. Antioksidacijsko djelovanje tiopronina smatra se glavnim mehanizmom njegovog zaštitnog učinka [8]. Tiopronin se može koristiti i kao mukolitik odnosno lijek za olakšavanje iskašljavanja jer razbija disulfidne veze u bronhijalnoj sluzi i time je razrjeđuje [9].

1.1.1. Kemijska svojstva

MPG je bijeli kristalinični prašak kemijske formule $C_5H_9NO_3S$ s točkom tališta 95 °C do 97 °C te molekularne mase 163,20 g mol^{-1} [10]. Karakterističnog je mirisa te nije higroskopan. Tiopronin je slaba kiselina koja disocira u dva stupnja. U prvom stupnju disocira karboksilna skupina (COOH) s konstantom disocijacije $K_{a1} = 2{,}51 \times 10^{-4}$, a u drugom stupnju disocira tiolna skupina (SH) s konstantom disocijacije $K_{a2} = 1{,}82 \times 10^{-9}$ [11].



Slika 1.1. 3D i 2D struktura MPG-a [12].

1.1.2. Farmakodinamika

Tiopronin je sulfhidril acetil derivat aminokiseline glicina. Reducirajući i kompleksirajući je agens te kida disulfidne veze amino kiseline cistin i tvori tiopronin-cisteinski kompleks koji je topljiv u tjelesnim tekućinama. To svojstvo se koristi kako bi se spriječilo izlučivanje cistina urinom kod rijetke genetske bolesti cistinurije gdje mutacija uzrokuje nemogućnost reapsorpcije bazičnih i pozitivno nabijenih amino kiselina (cistina, ornitina, lizina i arginina) iz proksimalnog zavijenog bubrežnog tubula. Premda se u urinu nakupljaju sve aminokiseline u visokim koncentracijama, jedino cistin, dibazična aminokiselina s disulfidnom vezom, zbog svoje niske topljivosti stvara kristale uzrokujući bubrežni kamenac te time i nefrolitijazu i urinarnu opstrukciju. Kristali se počinju formirati kada koncentracija cistina poraste iznad 250 mg po litri urina (dosegne se zasićenje). Cistinurija je uzrok pojavljivanja 1-2 % bubrežnih kamenaca kod odraslih osoba i otprilike 10 % bubrežnih kamenaca kod djece. Liječenje cistinurije tioproninom zasniva se na razaranju disulfidne veze cistina, pri čemu nastaje amino kiselina cistein koja je 50 puta topljivija. Tiopronin se koristi u slučajevima teške homozigotne cistinurije kada je urinarni cistin veći od 500 mg/dan, a ostali načini liječenja nisu dali željene rezultate (ne-farmakološki pristup liječenju; povećan unos tekućine, smanjen unos soli i proteina, alkaliziranje urina, ili farmakološki pristup; liječenje penicilaminom). S obzirom na to da je ova bolest rijetka (jedan bolesnik na 10 000 zdravih), tiopronin se svrstava u *"orphan drugs"*, odnosno lijek za rijetke i teške bolesti [7, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

Svojstvo kidanja disulfidnih veza pokazalo se korisno i kod bronhijalne hipersekrecije, zbog kidanja mukopolisaharidnih lanaca u dišnom sustavu te depolimerizacije lanaca DNK u gnojnoj sluzi smanjuje se viskoznost bronhalnog sekreta i postiže mukolitički i mukoregulatorni učinak [9, 19, 20].

Koristi se i kod reumatoidnog artritisa gdje ima protuupalno djelovanje, posebice u slučajevima nedjelotvornosti penicilamina ili nuspojava uzrokovanih penicilaminom [21, 22, 23].

Još jedan mehanizam djelovanja MPG-a temelji se na sposobnosti njegovih reaktivnih SH-skupina da vežu kemijske radikale. Zbog toga se u organizmu može koristiti u svrhu detoksikacije. Pošto je reducirajući agens on se sam oksidira te ima antioksidativno djelovanje u tijelu [8]. Zbog sposobnosti kompleksiranja metala koristi se kod Wilsonove bolesti jer veže nanočestice bakra u tijelu. Tako se može koristiti i kao protuotrov kod trovanja teškim metalima, posebice živom [6].

U eksperimentalnim uvjetima, tiopronin je pokazao zaštitni učinak na oštećenja izazvana ionizirajućim zračenjem [24, 25] te na ishemijsko-reperfuzijska oštećenja (prekid i ponovno uspostavljanje krvnog optoka) različitih organa, poput srca, pluća i jetre [26 – 29]. Tiopronin je trenutno i u fazi istraživanja njegovog povoljnog utjecaja kao neuroprotektiva kod aneurizme uzrokovane subarahnoidalnim krvarenjem. Zbog oštećenja i smrti stanica stvara se neurotoksični aldehid 3-aminopropanal. Nakupljanje 3-aminopropanala može uzrokovati cerebralni vazospazam i ishemiju te daljnja neurološka oštećenja, pa i smrt. Tiopronin potencijalno može neutralizirati 3-aminopropanal te tako spriječiti daljnja oštećenja. Faza I kliničkog istraživanja je već provedena, a faza II je u tijeku [30].

1.1.3. Farmakokinetika

Tiopronin se nakon oralne primjene gotovo potpuno apsorbira iz gastrointestinalnog trakta kad je uzet 1 h prije ili 2 h nakon obroka. Do 48 % doze izlučuje se urinom tokom prva 4 sata i do 78 % tokom 72 sata [14]. U istraživanjima se pokazalo da MPG doseže maksimalnu koncentraciju u krvi 3 do 6 sati nakon oralne primjene i ima vrijeme poluživota 53 sata. Dio koji nije bio vezan za proteine plazme imao je vrijeme poluživota 1,8 sata. Vrijeme zadržavanja vezanog je bilo 58h, a nevezanog 6h te volumen distribucije vezanog 455 L a nevezanog 41 L. To ukazuje na visok stupanj vezanja za proteine plazme i tkiva. Apsolutna bioraspoloživost (*f*) je 63 %, a bioraspoloživost izračunana preko urinarne ekskrecije 47 %. Najviše lijeka se izlučilo urinom u prvih 6 sati; 74 %, a u 12 sati 98 % [13, 31].

1.1.4. Doziranje

Doza tiopronina za liječenje cistinurije ne smije biti samovoljna te se treba temeljiti na količini koja je potrebna za smanjenje mokraćne koncentracije cistina ispod njegove granice topljivosti (obično < 250 mg / L). Zbog rane bubrežne ekskrecije najbolje ga je uzimati u najmanje dvije razdvojene doze. Početna doza može biti 800 mg na dan u odraslih bolesnika, a ukupna dnevna doza obično je u rasponu od 0,8 g do 2 g. Kod djece starije od 9 godina početna ukupna dnevna doza treba biti 15 mg po kilogramu tjelesne mase. Doza se prilagođava prema koncentraciji urinarnog cistina koja se kontrolira mjesec dana nakon početka uzimanja lijeka te nakon toga svaka 3 mjeseca. Kad god je moguće tiopronin treba uzimati u odvojenim dozama, preporučuje se 3 puta na dan, barem jedan sat prije ili dva sata poslije obroka. Kod pacijenata koji su razvili teške nuspojave na D-penicilamin, tiopronin se može početi davati u nižim dozama. Adherencija je bitna kod uzimanja ovog lijeka kako bi se spriječilo daljnje formiranje bubrežnih kamenaca. Način izdavanja je na recept [32].

1.1.5. Nuspojave

Tijekom prvih mjesec dana uzimanja tiopronina moguća je pojava vrućice. Ona nestaje prestankom uzimanja lijeka, a može se spriječiti davanjem male doze na početku koja se postepeno povisuje. Ostale manje česte nuspojave javljaju se tokom prvih nekoliko mjeseci uzimanja, a to su osip (eritematozni ili makulopapularni), reakcija slična lupusu (vrućica, artralgija, limfadenopatija), smanjenje osjeta okusa zbog keliranja metala te manjak vitamina B_6. Nakon duljeg uzimanja kod nekih pacijenata javljaju se naboranost i trošnost kože zbog učinka tiopronina na kolagen [32]. Zabilježeni su i izolirani slučajevi agranulocitoze [33] te aplazije koštane srži [34].

U tretmanu cistinurije tiopronin je pokazao manje nuspojava od D-penicilamina iako se sve nuspojave D-penicilamina pojavljuju i kod tiopronina [32]:

- Gastrointestinalne nuspojave (mučnina, povraćanje, proljev, anoreksija, bol u trbuhu, nadutost) u oko 1 od 6 pacijenata.
- Umanjenje okusa i mirisa u oko 1 od 25 bolesnika.
- Dermatološke komplikacije (faringitis, oralni čirevi, osip, ekhimoza, pruritus, uritkarija, obojenje kože i bjeloočnica u žutu boju, bradavice, boranje i trošnost kože, pemfigus, elastosis perforans serpiginosa) u oko 1 od 6 bolesnika [35-37].
- Reakcije preosjetljivosti (edem larinksa, dispneja, respiratorni distres, vrućica, artralgija, slabost, umor, bol u mišićima, adenopatija) u oko 1 od 25 bolesnika.
- Hematološki poremećaji (povećana krvarenja i modrice, anemija, leukopenija, trombocitopenija, eozinofilija) u oko 1 od 25 bolesnika.
- Bubrežne komplikacije (proteinurija, nefrotski sindrom, hematurija, membranozni glomerulonefritis) u oko 1 od 20 bolesnika [38].
- Plućne manifestacije (bronhiolitis, hemoptiza, plućni infiltrati, dispneja) u oko 1 od 50 bolesnika.
- Neurološke komplikacije (miastenijski sindrom) u oko 1 od 5 bolesnika.
- Tokom terapije necistinuričnih stanja zabilježene su i pojave žutice te abnormalne jetrene funkcije.

Kod pacijenata koji su razvili nuspojave na D-penicilamin veća je vjerojatnost da će ih razviti i na tiopronin od onih koji su terapiju započeli tioproninom [32]. Zbog navedenih nuspojava, od kojih neke ozbiljno ugrožavaju ljudsko zdravlje, nužan je razvoj osjetljivih i pouzdanih metoda određivanja tiopronina u biološkim uzorcima i farmaceutskim preparatima.

1.1.6. Interakcije

Istovremenom primjenom tiopronina s antidijabeticima, protuupalnim lijekovima (antireumaticima) i mukoliticima može se pojačati učinak tih lijekova, a antagonizirati učinak preparata koji sadrže željezo.

Istodobna primjena s tioproninom može pojačati nuspojave slijedećih lijekova:

- Sredstva za liječenje virusnih bolesti (aciklovir (sistemski)) - poznate nuspojave mogu biti pojačane.
- Sredstva za snižavanje krvnog tlaka (ACE inhibitori), sredstva za liječenje zaraznih bolesti (aminoglikozidi (sistemski), pentamidin), sredstva za liječenje gljivičnih infekcija (amfotericin B), sredstva za liječenje virusnih bolesti (cidofovir, foskarnet, ganciklovir), sredstva za liječenje malignih oboljenja tumora (cisplatin, tenipozid) - postoji povećan rizik od oštećenja bubrega.
- Sredstva za liječenje malignih oboljenja tumora (alemtuzumab, amsakrin, epirubicin, temozolomid, vindezin) - postoji povećan rizik od promjene u krvnoj slici.

- Sredstva za liječenje zaraznih bolesti (aminoglikozidi (sistemski)) i sredstva za liječenje malignih oboljenja tumora (cisplatin) - postoji povećana opasnost od oštećenja unutarnjeg uha.

Tiopronin se ne smije uzimati zajedno s alkoholom [32].

1.1.7. Kontraindikacije, mjere opreza i upozorenja

Tiopronin je u trudnoći kontraindiciran (kategorija C), osim u slučajevima teške cistinurije kada moguća korist od liječenja prevladava potencijalne opasnosti od lijeka. Majke koje uzimaju tiopronin ne bi smjele dojiti djecu. Osobe koje su u prijašnjim liječenjima razvile alergiju, agranulocitozu, aplastičnu anemiju ili trombocitopeniju ne smiju nastaviti liječenje tioproninom. Sigurnost i učinkovitost liječenja djece mlađe od 9 godina još nije utvrđena [32].

Kako bi se umanjio nastanak komplikacija preporučuju se slijedeći testovi: analiza mokraćnog cisteina, hemoglobin, broj trombocita, serumski albumin, funkcionalni testovi jetre, 24-satni mokraćni protein, i rutinska analiza urina u intervalima od 3 do 6 mjeseci, te rendgenski pregled abdomena jednom godišnje [32].

1.1.8. Predoziranje

Unatoč nižoj toksičnosti od D-penicilamina, sve ozbiljne nuspojave koje su prijavljene za D-penicilamin moguće su i kod tiopronina, kao što su aplastična anemija, agranulocitoza, trombocitopenija, Goodpastureov sindrom ili mijastenija gravis. Leukopenija se može pojaviti bez eozinofilija. Trombocitopenija može biti imunološka ili idiosinkratska. Ako dođe do smanjenja perifernih bijelih krvnih stanica na manje od 3500 po mm^3 krvi, ili trombocita na manje od 100 000 po mm^3 krvi, terapiju treba prekinuti. Bolesnici trebaju odmah prijaviti ako dođe do pojave groznice, grlobolje, zimice, krvarenja ili modrica. Iz membranske glomerulopatije može se javiti proteinurija koja može izazvati nefrotski sindrom. U tom slučaju je potrebno blisko promatranje pacijenta. Kada abnormalan urinarni nalaz, hemoptiza i plućni infiltrat ukazuju na mogući Goodpastureov sindrom liječenje treba odmah prekinuti. Pojava mijastenijskog sindorma ili mijastenije gravis također zahtjeva prekid terapije. Kod pojave pemfigusa liječenje treba prekinuti, a može biti potreban i steroidni tretman [32].

1.1.9. Analitičke metode određivanja tiopronina

Do sada su opisane različite metode određivanja tiopronina. U literaturi su predložena određivanja korištenjem tehnika spektrofotometrije, potenciometrije, kemiluminescencije, fluorescencije, katalitičke titracije te protočne analize injektiranjem uz različite detektore.

Jedine objavljene potenciometrijske metode određivanja tiopronina rezultat su rada istraživačkog tima prof. dr. sc. Njegomira Radića i doc. dr. sc. Lee Kukoč-Modun. Osim potenciometrijskog radili su i na određivanju tiopronina protočnom analizom injektiranjem te atomskom apsorpcijskom spektroskopijom s elektrotoplinskim atomizatorom. U potenciometrijskoj metodi određivanja koristila se komercijalna indikatorska elektroda s membranom na osnovi AgI. Izravnim potenciometrijskim mjerenjem su zabilježeni ravnotežni potencijali pri uzastopnim dodatcima standardne otopine MPG-a u 0,1 mol L^{-1} otopinu $HClO_4$ [39].

Najstarija objavljena metoda određivanja tiopronina je spektrofotometrijska metoda temeljena na oksidaciji tiopronina željezovim(III) ionima pri čemu nastaje kompleks čija se apsorbancija mjeri pri 515 nm [40]. Slijedeća vrlo jednostavna i izravna metoda zasniva se na činjenici da tiopronin s $(NH_4)_2PdCl_4$ tvori stabilan obojeni kompleks. Apsorbancija kompleksa, poznate stehiometrije, mjeri se pri 415 nm [41]. U slijedećoj metodi određivanja tiopronin katalizira reakciju natrijeva 1,2-naftokinon-4-sulfonata i hidroksidnog iona. Navedena činjenica iskorištena je za određivanje koncentracije tiopronina mjereći apsorbanciju produkta reakcije pri valnoj duljini od 445 nm [42]. Neizravno određivanje tiopronina sa spektrofotometrijskim detektorom temelji se na redukciji Cu(II) tioproninom. Nastali Cu(I) reagira s tiocijanatnim ionom te formira bijeli talog CuSCN. U prisutnosti $(NH_4)_2SO_4$, smjesa propilnog alkohola i vode može se razdvojiti u dvije faze. U procesu razdvajanja faza, istaloženi CuSCN se ekstrahira i ostaje na granici propilnog alkohola i vode. Količina tiopronina određuje se mjerenjem udjela Cu(II) iz lakše faze nakon ekstrakcije [43]. Katalitička titracija tiopronina sa srebrovim nitratom za indiciranje završne točke titracije koristi spektrofotometrijski detektor. Metoda se zasniva na inhibitorskom djelovanju tiopronina na reakciju između floksina i persulfata koju katalizira srebro [44]. Protočna analiza injektiranjem sa spektrofotometrijskim detektorom korištena za određivanje tiopronina temeljena je na formiranju žutog kompleksa Pd(II) s tioproninom [45]. Provedena je i protočna analiza injektiranjem s amperometrijskom hidrodinamičkom voltametrijom uz elektrodu s dijamantnim filmom [46]. Metoda protočne analize injektiranjem s fluorescencijskim detektorom pokazala je učestalost analize od 45 uzoraka po satu [47]. Protočne metode injektiranjem uz kemiluminescencijski detektor imaju vrlo visoku osjetljivost, upravo zahvaljujući karakteristikama detektora, te je ovim metodama omogućena velika učestalost analiza [48]. Tiopronin se u složenijim matricama kao što su, krv, plazma i/ili urin, određuje korištenjem kromatografskih tehnika spregnutim s različitim detektorima. Objavljeno je tridesetak znanstvenih radova koji se bave navedenom problematikom.

2. Cilj istraživanja

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je optimizacija i vrednovanje metode određivanja *N*-2-merkaptopropionil-glicina (tiopronina) primjenom slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor.

Parametri sustava koji se optimiziraju su:

1. Redoslijed injektiranja analita i reagensa
2. Protok osnovne otopine
3. Volumen injektiranja reagensa
4. Volumen injektiranja analita
5. Volumen petlje zadržavanja
6. Duljina reakcijske petlje

Nakon optimizacije sustava trebaju se postaviti analitičke karakteristike metode:

1. Linearno dinamičko područje (područje djelovanja Beerovog zakona)
2. Jednadžba regresijskog pravca, odnosno njegov nagib i odsječak
3. Koeficijent linearne regresije R^2
4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Zatim slijedi vrednovanje metode pri čemu se ispituju:

1. Utjecaj interferencija
2. Prenošenje signala
3. Ponovljivost
4. Točnost i iskoristivost

Nakon što je metoda slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor razvijena i optimizirana za određivanje tiopronina može se primijeniti na određivanje tiopronina kao aktivne tvari iz farmaceutskih pripravaka.

3. Materijali i metode

3. Materijali i metode

3.1. Priprava otopina

Sve otopine su pripravljane korištenjem deionizirane vode i kemikalija čistoće stupnja analitičkog reagensa.

a) Deionizirana voda

Deionizirana voda pripravlja se nizom postupaka preko uređaja Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska): reverzna osmoza, filtracija kroz aktivni ugljen kako bi se uklonila organska onečišćenja, deionizacija preko anionskog i kationskog izmjenjivača te filtracija kroz membranski filtar veličine pora 0,22 μm kako bi se uklonili mikroorganizmi. Izmjeren joj je otpor 18,2 MΩ.

b) Otopina standarda tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicin; MPG)

Standardna otopina MPG-a, {c(MPG) = $1{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}}, pripravljena je otapanjem 81,6 mg MPG-a (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA) u acetatno-fosfatno-boratnom puferu, pH = 2, (pufer potpomaže brže otapanje i stabilizira ravnotežu formiranog kompleksa), koji je dodan do oznake 50 mL na odmjernoj tikvici. Ovako pripravljena standardna otopina, čuvana na 4 °C u tamnom prostoru, stabilna je najmanje 30 dana. Radne otopine nižih koncentracija pripravljane su dnevno razrjeđenjem standardne otopine acetatno-fosfatno-boratnim puferom, pH = 3. Na taj je način dobivena i standardna otopina tiopronina, koncentracije {c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}}.

c) Otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa

Standardna otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa, {$c[Cu(Nc)_2]^{2+}= 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}}, dobiva se otapanjem 0,0250 g bakrovog(II) sulfata pentahidrata ($CuSO_4\times5H_2O$, Kemika, Zagreb, Hrvatska, M = 249,68 g mol^{-1}) u malom volumenu acetatno–boratno–fosfatnog pufera, pH = 3. Zatim se doda 0,0500 g neokuproin hidrata ($C_{14}H_{12}N_2\times H_2O$, Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA, M = 208,26 g mol^{-1}), te se nadopuni otopinom acetatno-boratno-fosfatnog pufera, pH = 3, do oznake 100 mL na odmjernoj tikvici.
Topljivost neokuproina je veća kada je pomješan sa Cu(II) u omjeru 2,4 : 1 jer dolazi do formiranja kompleksa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$. Ovako pripravljena standardna otopina, čuvana na 4 °C, stabilna je najmanje 30 dana.
Optimalne koncentracije Cu(II) i neokuproina rezultat su optimizacije prikazane u poglavlju 4.1.

d) Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera, {c = 0,04 mol L^{-1}}, pH = 2

Priprema pufera započinje otapanjem 2,4732 g boratne kiseline (H_3BO_3, Alkaloid-Skopje, M = 61,83 g mol^{-1}) u malo destilirane vode. Zatim se doda 2,399 g octene kiseline

(CH_3COOH, M = 60,05 g mol^{-1}) i 2,729 g fosforne kiseline (H_3PO_4, M = 98,0 g mol^{-1}) te se nadopuni destiliranom vodom do oznake 1 L na odmjernoj tikvici. Ova otopina ima pH vrijednost oko 2. Podešavanje pH vrijednosti na pH = 3 postiže se dodatkom otopine NaOH, c(NaOH) = 2,0 mol L^{-1}, što se kontrolira korištenjem pH-metra.

e) Otopina natrijeva hidroksida

Otopina natrijeva hidroksida koncentracije 2,0 mol L^{-1} dobiva se otapanjem 8 g natrijeva hidroksida (NaOH, Sv. Nedjelja, Hrvatska, M = 40,00 g mol^{-1}) u 100 mL deionizirane vode.

f) Otopina realnog uzorka; Captimer tablete 50×100 mg

Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži Captimer® 100 mg tableta, pakiranje sadrži ukupno 5 blistera te svaki blister sadrži po 10 tableta. Svaka tableta sadrži po 100 mg MPG-a.



Slika 3.1. Captimer® 100 mg, tablete iz kojih je određivana koncentracija tiopronina.

Realni uzorak pripremljen je otapanjem jedne tablete mase 0,4860 g u 100 mL acetatno-fosfatno-boratnog pufera, pH = 2, te deioniziranoj vodi koja se dodaje do oznake u odmjernoj tikvici od 500 mL. Masa (m) aktivne komponente u jednoj tableti (tiopronina) iznosi 100 mg, odnosno 0,1 g. Izračunata je masena koncentracija dobivene otopine (γ) te iznosi 0,2 g L^{-1}.

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

Molarna masa (M) MPG-a iznosi 163,20 g mol^{-1}, a množinska koncentracija (c) pripravljene otopine iznosi:

$$c = \frac{\gamma}{M} = \frac{0,2\ \text{g L}^{-1}}{163,20\ \text{g mol}^{-1}} = 1,23\times10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$$

Ova otopina se zatim razrjeđuje tako da se alikvot volumena 1 mL prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te se nadopuni do oznake acetatno-fosfatno-boratnim puferom, pH = 3. Na taj je način dobivena otopina molarne koncentracije $1{,}23\times10^{-5}$ mol L^{-1}.

$c_1 = 1{,}23\times10^{-3}\,\text{mol L}^{-1}$

$V_1 = 1\,\text{mL}$

$V_2 = 100\,\text{mL}$

$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$

$$c_2 = \frac{c_1 \times V_1}{V_2}$$

$$c_2 = \frac{1{,}23\times10^{-3}\,\text{mol L}^{-1}\times\ 0{,}001\,\text{L}}{0{,}1\,\text{L}} = 1{,}23\times10^{-5}\,\text{mol L}^{-1}$$

g) Otopine za određivanje prema metodi koji propisuje farmakopeja [49]

1. Otopina kalijeva jodida (KI), γ(KI) = 166 g L^{-1}

Standardna otopina kalijeva jodida, {γ(KI) = 166 g L^{-1}} dobiva se otapanjem 8,3 g KI u 50 mL deionizirane vode.

2. Otopina joda, *c*(I_2) = 0,05 mol L^{-1}

Da bi se dobila otopina joda koncentracije *c*, {*c*(I_2) = 0,05 mol L^{-1}}, potrebno je otopiti 6,35 g I_2 i 10 g KI u destiliranoj vodi te razrijediti do oznake od 500 mL. Jod je topljiviji u otopini jodida nego u čistoj vodi. Zato je potrebno prvo otopiti KI u maloj količini deionizirane vode te zatim dodati I_2, a kada se I_2 u potpunosti otopi dodaje se preostala količina vode, do oznake od 500 mL.

3. Otopina octene kiseline (HAc), *c*(HAc) = 4,76 mol L^{-1}

Miješanjem 28,6 mL glacijalne octene kiseline sa deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL dobije se razrijeđena otopina octene kiseline (HAc).

4. Otopina klorovodične kiseline (HCl), c(HCl) = 1,63 mol L^{-1}

Razrijeđena otopina klorovodične kiseline dobiva se tako da se 17 mL 35 % HCl-a pomiješa sa deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL.

5. Standardizacija otopine I_2, $c(I_2)$ = 0,05 mol L^{-1}

U 20 mL otopine I_2 dodaje se 1mL razrijeđene HAc u 30 mL destilirane vode. Pripravljena otopina titrira se sa standardnom otopinom tiosulfata, {$c(Na_2S_2O_3)$ = 0,1 mol L^{-1}}, čiji je faktor f = 0,9872 prethodno određen standardizacijom otopine, uz 1 mL otopine škroba kao indikator.
U ovoj standardizaciji dolazi do redoks-reakcije prema jednadžbi:

$$2\ S_2O_3^{2-} + I_2 + \rightleftarrows S_4O_6^{2-} + 2\ I^-$$

U dvije provedene titracije utrošak $Na_2S_2O_3$ je bio 19,80 i 19,90 mL. Za daljnji proračun koristi se njihova srednja vrijednost, 19,85 mL.

Slijedi računanje eksperimentalne koncentracije joda preko stehiometrije reakcije i poznatih podataka:

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

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

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

$$f(I_2) = \frac{1}{2} \times \frac{0{,}1\ \text{mol L}^{-1} \times 19{,}85\ \text{mL} \times 0{,}9872}{0{,}05\ \text{mol L}^{-1} \times 20\ \text{mL}} = 0{,}9798$$

$$f = \frac{c_{\text{stvarna}}(I_2)}{c_{\text{nazivna}}(I_2)} \Rightarrow c_{\text{stvarna}}(I_2) = f \times c_{\text{nazivna}}(I_2)$$

$$c_{\text{stvarna}} = 0{,}9798 \times 0{,}05\ \text{mol L}^{-1} = 0{,}0490\ \text{mol L}^{-1}$$

3.2. Određivanje MPG-a metodom koju propisuje farmakopeja

Budući da nijedna farmakopeja ne sadrži monografiju za tiopronin, ispitivao se prema monografiji za njemu sličan tiolni spoj iste molekulske mase, *N*-acetil-cistein, NAC. Europska farmakopeja preporučuje jodometrijsku titraciju za određivanje sadržaja NAC–a u farmaceutskim pripravcima [49].

Otopina joda se koristi kao standardna otopina za određivanje tiolnih reducirajućih tvari zbog toga što od svih razmatranih oksidansa jod ima najniži standardni potencijal, što ograničava njegovu izravnu primjenu kod određenih redoks titracija [50].

Farmakopejski propis za određivanje NAC-a glasi: 0,140 g uzorka otopi se u 60 mL deionizirane vode te se doda 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline. Nakon hlađenja u ledenoj vodi doda se 10 mL kalijevog jodida te se titrira sa 0,05 mol L^{-1} otopinom joda do pojave intenzivno modre boje. Kao indikator koristi se škrob [49]. Taj postupak proveden je i sa tioproninom.

Ova metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj MPG ili NAC (RSH spojevi) reduciraju 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 te je to znak da se reakcija odvila do kraja.

$$2\ \mathrm{RSH} + \mathrm{I_3^-} \rightleftarrows \mathrm{RSSR} + 3\ \mathrm{I^-} + 2\ \mathrm{H^+}$$

Utvrđeno je da je za 16,32 mg NAC–a potrebno utrošiti 1 mL 0,05 mol L^{-1} otopine joda [49]. Naša je pretpostavka da su te vrijednosti jednake i za tiopronin. Pod točkom 3.1. izračunato je da je pripravljena otopina joda koncentracije 0,0490 mol L^{-1}. Iz toga slijedi da je za određivanje 16,32 mg MPG–a potrebno utrošiti 1,0204 mL otopine koncentracije 0,0490 mol L^{-1}. Proračun:

$$c(\mathrm{I_2})_{\text{teoretska}} \times V(\mathrm{I_2})_{\text{teoretska}} = c(\mathrm{I_2})_{\text{eksperimentalna}} \times V(\mathrm{I_2})_{\text{eksperimentalna}}$$

$$V(\mathrm{I_2})_{\text{eksperimentalna}} = \frac{c(\mathrm{I_2})_{\text{teoretska}} \times V(\mathrm{I_2})_{\text{teoretska}}}{c(\mathrm{I_2})_{\text{eksperimentalna}}} = \frac{0,05\ \text{mol L}^{-1} \times 1\ \text{mL}}{0,0490\ \text{mol L}^{-1}} = 1,0204\ \text{mL}$$

Captimer® 100 mg tablete

$\bar{m}$ (tablete) = 0,4952 g

$\bar{m}$ (odvage) = 0,1401 g

➡Titracija s otopinom joda:

$\bar{V}$ (I_2) = 1,77 mL

1 mL × 0,05 mol L^{-1} = x mL × 0,0490 mol L^{-1}

x = 1,02 mL

Za 16,32 mg MPG–a potrebno je utrošiti 1,02 mL 0,0490 mol L^{-1} otopine joda.

$$m(\text{tiopronin}) = \frac{16,32 \text{ mg} \times 1,77 \text{ mL}}{1,02 \text{ mL}} = 28,32 \text{ mg}$$

U 0,1401 g $\bar{m}$ (odvage) ima 28,32 mg tiopronina.

$$m(\text{tiopronina u tableti}) = \frac{28,60 \text{ mg} \times 0,4952 \text{ g}}{0,1401 \text{ g}} = 100,10 \text{ mg}$$

U prosječnoj masi tablete sadržaj tiopronina (MPG-a) je 100,10 mg.

3.3. Slijedna analiza injektiranjem

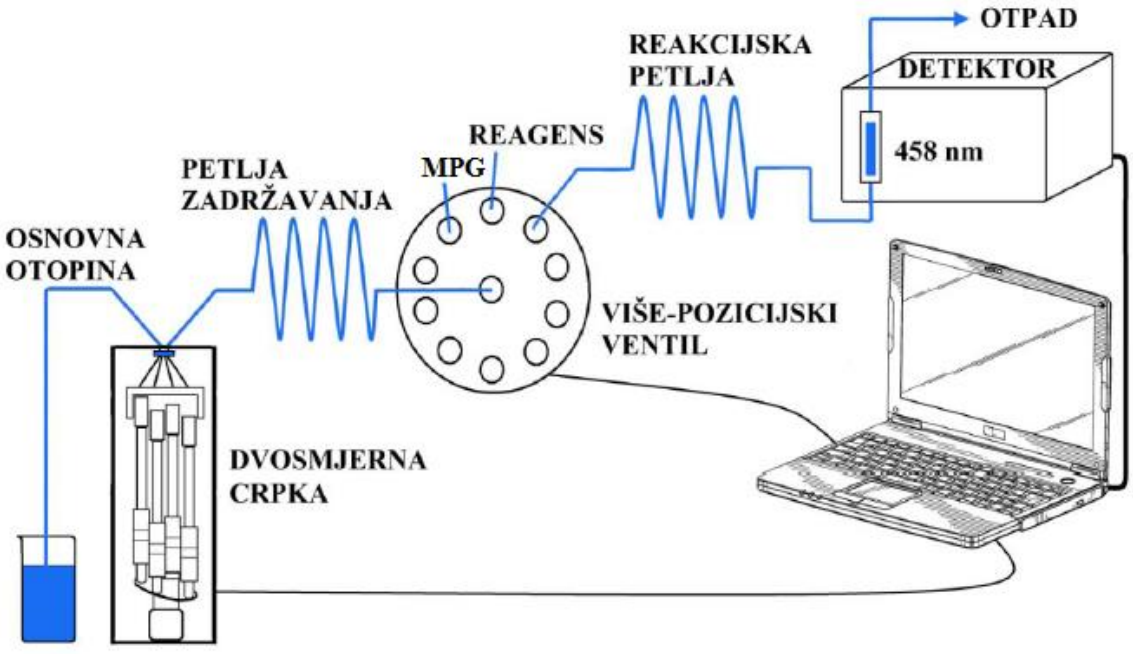
Slijedna analiza injektiranjem (*Sequential injection analysis*, SIA) je kinetička analitička metoda koju su razvili Ruzicka i Marshall 1991. godine. Kinetičke metode bitno povećavaju broj kemijskih reakcija upotrebljivih u analitičke svrhe, jer dopuštaju primjenu reakcija koje su ili prespore ili previše nepotpune za postupke temeljene na termodinamičkim uvjetima. U kinetičkim metodama mjerenja se obavljaju pod dinamičkim uvjetima u kojima se koncentracije reaktanata i produkata neprekidno mijenjaju te se i signal mijenja s vremenom. Kao analitički parametar služi ili pojavljivanje produkta ili nestajanje reaktanta. Da bi se reakcija mogla pratiti kinetičkom metodom određivanja mora biti dovoljno brza da se završi u razumnom vremenu, ali i dovoljno spora da ne postigne stanje ravnoteže dok se reagensi još miješaju. Red reakcije mora biti poznat jer tako možemo odrediti kinetičke parametre kao što su brzina reakcije i koncentracija te mogućnost praćenja odvijanja reakcije, promjenom koncentracije jednog od reaktanata ili produkata kao funkcije vremena. Selektivnost ovih mjerenja može se povećati odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razliku u brzinama kojima analit i moguće interferencije reagiraju [2, 51, 52].

SIA je druga generacija protočnih analiza jer omogućuje automatizaciju postupaka rukovanja uzorcima u analizama na brz, precizan i učinkovit način. Iako dijeli mnoge karakteristike s protočnom analizom injektiranjem (FIA), a glavna je da obje ovise o disperziji uzorka u linearnom protoku, u mnogo stvari se i razlikuju. Glavna razlika je to što u FIA-i postoji kontinuirani jednosmjerni protok, a u SIA-i je protok programiran i prilagođen specifičnoj reakciji kako bi se omogućila optimizacija pojedine analize. U usporedbi s FIA-om više je ekonomična, koristi manje volumene analita i reagensa te samim time proizvodi i manje otpada. Zbog dvosmjernog i diskontinuiranog protoka znatne su uštede reagensa onda kada je sustav u praznom hodu i kada se priprema uzorak jer se protok može zaustaviti, što je prednost pri upravljanju sustavom. Ima i jednostavnije dijelove sustava (jedna crpka, jedan ventil, jedna struja protoka) koji se mogu upotrijebiti za veći raspon analitičkih metoda, bez mijenjanja fizičke konfiguracije sustava, jednostavno mijenjajući program. Selekcijski ventil zamjenjuje injekcijski ventil kod FIA-e te omogućuje jednostavan odabir i slijedno injektiranje različitih uzoraka, reagensa i standarda, što omogućava automatizaciju procesa umjeravanja. Posebnost sustava SIA je poboljšana kontrolirana disperzija zona uzorka i reagensa uzrokovana promjenom smjera protoka u petlji zadržavanja. Nedostaci SIA-e u odnosu na FIA-u su manja frekvencija analiza (obično jedan uzorak po minuti) te nemogućnost miješanja više od tri reagensa s uzorkom [53, 54, 55].

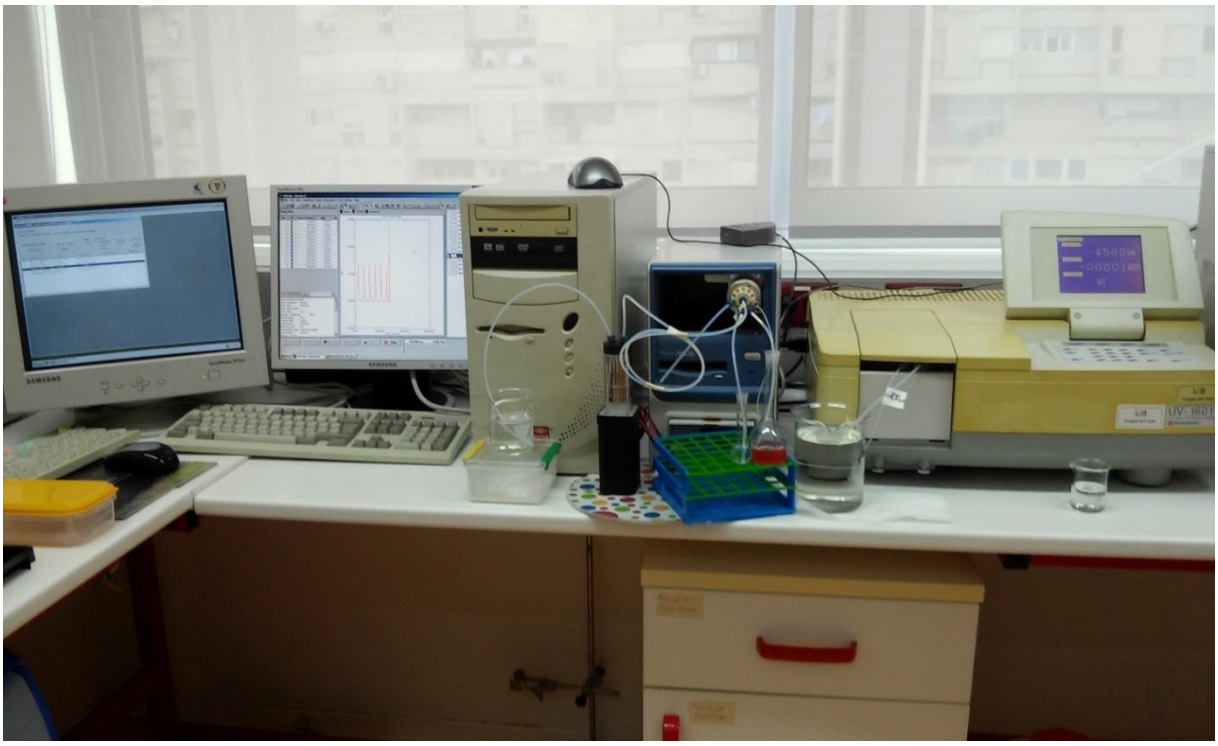
SIA se temelji na injektiranju određenog volumena analita i reagensa u struju nosioca jedno do drugoga pri čemu dolazi do stvaranja produkta reakcije na mjestu njihovog miješanja. Dolaskom produkta na detektor bilježi se analitički signal.

Dijelovi SIA sustava su: (Slika 3.2.)

1. Dvosmjerna crpka (M6 VICI Valco Instruments) – Služi za usisavanje osnovne otopine, uzorka i reagensa u petlju zadržavanja. Zbog toga što ne pumpa uzorke nego ih usisava, crpka ne dolazi u kontakt s otapalima koja često mogu biti ne-vodena te se na taj način puno manje oštećuje. Crpka je u izravnom kontaktu samo s nosačem, koji je deionizirana voda.
2. Petlja zadržavanja – Nakon što crpka usisa u sustav osnovnu otopinu, u petlju zadržavanja slijedno se injektiraju određeni volumeni otopina uzorka i reagensa kroz odabrane ulaze selekcijskog ventila.
3. Višepozicijski selekcijski ventil (CHEMINERT C25-3180EMH Valco Instruments) – Mora omogućiti nasumični pristup otvorima te ne smije biti unakrsne kontaminacije između njih.
4. Reakcijska petlja – Nakon što uzorak i reagens stignu u petlju zadržavanja mijenja se smjer protoka osnovne otopine, crpka tjera zonu uzorka i reagensa kroz određeni ulaz selekcijskog ventila koji je preko reakcijske petlje povezan s detektorom.
5. Detektor – Dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Mjerenje se vrši pri valnoj duljini, λ = 458 nm, jer pri toj vrijednosti valne duljine kompleks koji nastaje kao produkt reakcije ima apsorpcijski maksimum. Odziv detektora zabilježen je kao koncentracijski gradijent (zbrojni vremenski signal, kojeg uobičajeno nazivamo „pik“).
6. Računalo (zadavanje programskog slijeda) – M6-LHS.



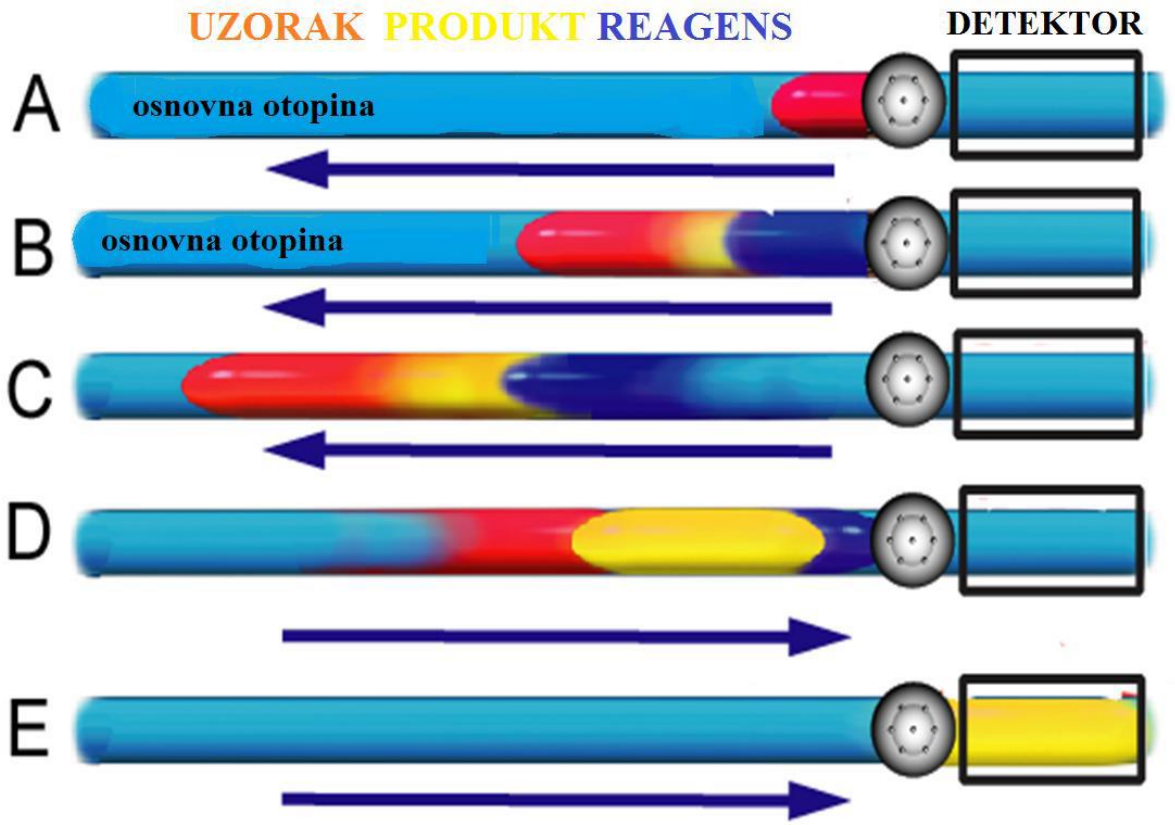
Slika 3.2. Shematski prikaz SIA sustava korištenog za određivanje MPG–a.



Slika 3.3. Aparatura za određivanje MPG primjenom SIA sustava sa spektrofotometrijskim detektorom.

3.3.1. Formiranje zone

Na slici 3.4. prikazana je disperzija zona uzorka i reagensa u sustavu SIA. Ubrizgavanje uzorka postiže se usisavanjem točne količine analita (crveno) preko ventila u petlju zadržavanja (A), nakon čega se odabrani volumen reagensa (plavo) usisava uzastopno (B). Kako se dvije zone pomiču uzvodno zbog aksijalne disperzije počinju se međusobno raspršivati jedna u drugoj, te se proizvod reakcije (žuto) počinje formirati (C). Nakon obrata toka zona uzorka i reagensa nastavljaju se miješati i reagirati i dolazi do turbulentnog strujanja uzrokovanog ubrzanjem radijalne i aksijalne disperzije (D). Zatim reakcijska smjesa dostigne reakcijsku petlju u kojoj se nastavlja stvarati produkt reakcije. Kada reakcijska smjesa dođe do detektora (E) radijalna disperzija je završena. Produkt reakcije kontinuirano se mjeri kroz detektor dajući pik visine proporcionalne koncentraciji analita. Na ovaj način mjerenja svi uzorci su obrađeni na isti način, omogućujući usporedbu standarda s nepoznatim uzorcima. Na kraju ciklusa ispitivanja sustav se ispire brzim protokom osnovne otopine koja odlazi u otpad [55, 56].



Slika 3.4. Disperzija u sustavu SIA [56].

Disperzija je dinamično, ali ponovljivo miješanje zone uzorka sa zonom reagensa i / ili nosača uzrokovano protočnom dinamikom fluida kroz uske cijevi. Dok je disperzija dinamična pojava i nikad ne dostiže ravnotežno stanje prije dolaska zone uzorka do detektora, ponovljiva je u bilo kojem vremenu ako su čimbenici koji utječu na sustav konstantni (protok, vrsta i duljina cijevi, ventili, detektor, priključci). Ona povećava miješanje analita i reagensa što povećava stvaranje produkta i osjetljivost metode (povećava se visina i smanjuje se širina „pika“, čime se snižava granica određivanja te povećava dinamika mjerenja), ali s druge strane uzrokuje razrjeđivanje uzorka osnovnom otopinom te smanjenje osjetljivosti, na taj način se povećava duljina osnovice „pikova“ [54].

Protok u SIA sustavu ima dvije svrhe. Prva je dovođenje zone uzorka do detektora. Druga je miješanje uzorka s osnovnom otopinom i reagensom te formiranje mjerljivog produkta. Tek što je uzorak injektiran u sustav na njegovu disperziju utječe nekoliko čimbenika. Prvi je konvekcija koja se događa zbog laminarnog kretanja osnovne otopine. Linearna brzina otopine na stjenkama cjevčica jednaka je nuli a u sredini cijevi dvostruko je brža nego uz rubove. 100 milisekundi nakon injektiranja na disperziju zajedno utječu konvekcija i difuzija. Difuzija se javlja zbog koncentracijskog gradijenta između uzorka i osnovne otopine te smanjuje linearnu brzinu uzorka u sredini cjevčice, a povećava je uz

rubove. 25 sekundi nakon injektiranja disperzija je samo pod utjecajem difuzije. Difuzija (pa tako i disperzija) događa se u dva smjera, aksijalno (paralelno sa smjerom protoka osnovne otopine) i radijalno (okomito na smjer protoka osnovne otopine), Slika 3.5. Za protočne analize bitna je samo radijalna difuzija, jer se zbog nje smanjuje linearna brzina protoka uzorka u sredini cijevi i pomaže u održavanju cjelovitosti profila toka uzorka. Ona svodi razrjeđenje uzorka na minimum te sužava širinu osnovice „pikova“. Aksijalna difuzija razrjeđuje uzorak osnovnom otopinom i uzrokuje proširenje duljine osnovice „pikova“. Ona više prevladava pri korištenju ravnih cijevi. Nakon promjene smjera protoka mijenja se i smjer radijalne difuzije. To povećava miješanje uzorka s reagensom uz minimalno razrjeđenje osnovnom otopinom. Zbog ubrzane disperzije laminarno strujanje prelazi u turbulentno te se smanjuje razlika u brzini strujanja uzorka uz rubove i u sredini cijevi što omogućava održavanje cjelovitosti zone od interesa [52, 54].

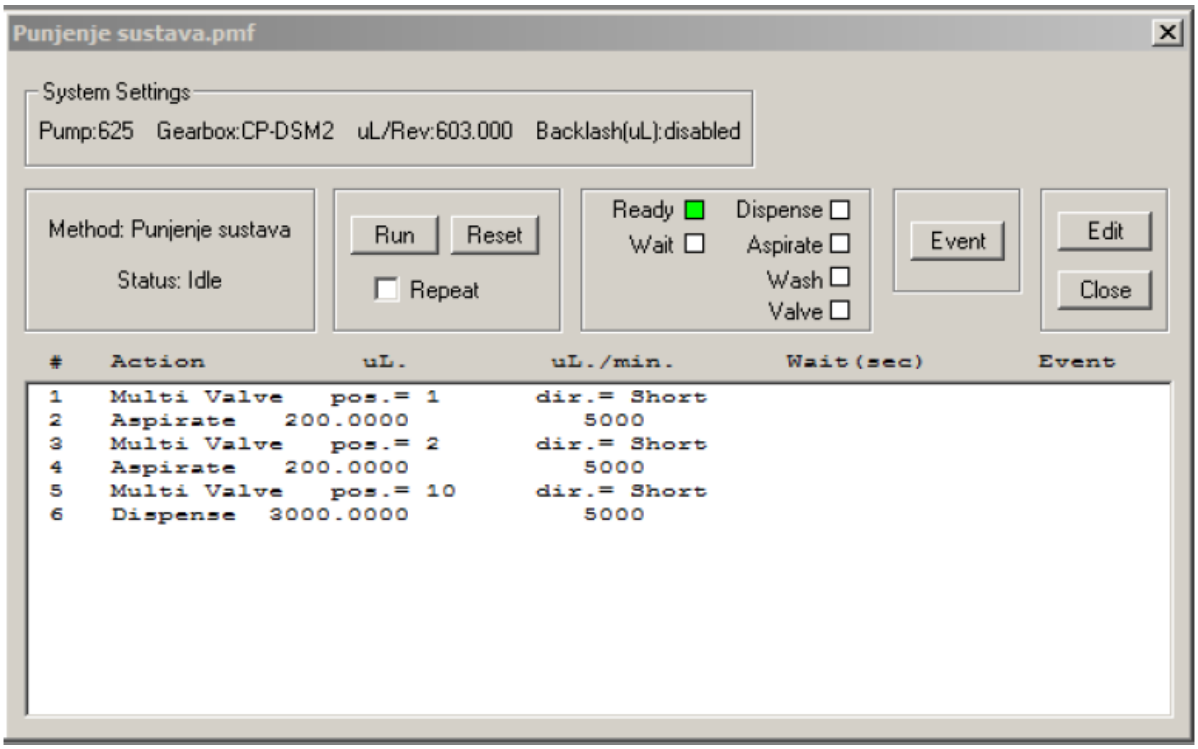
Kad je uzorak tek injektiran u sustav kemijski učinak dominira te povećanje disperzije povećava i osjetljivost. Nakon nekog vremena učinak razrjeđenja dominira te osjetljivost pada. Zato se pri razvijanju metode moraju pronaći najbolji uvjeti koji uravnotežuju kemijske uvjete za odvijanje reakcije i razrjeđenje produkta. To je koncept kontrolirane disperzije koji je bitan za razvitak slijedne analize injektiranjem [54].



Slika 3.5. Aksijalna i radijalna disperzija (i difuzija) [52].

3.3.2. Programiranje sustava

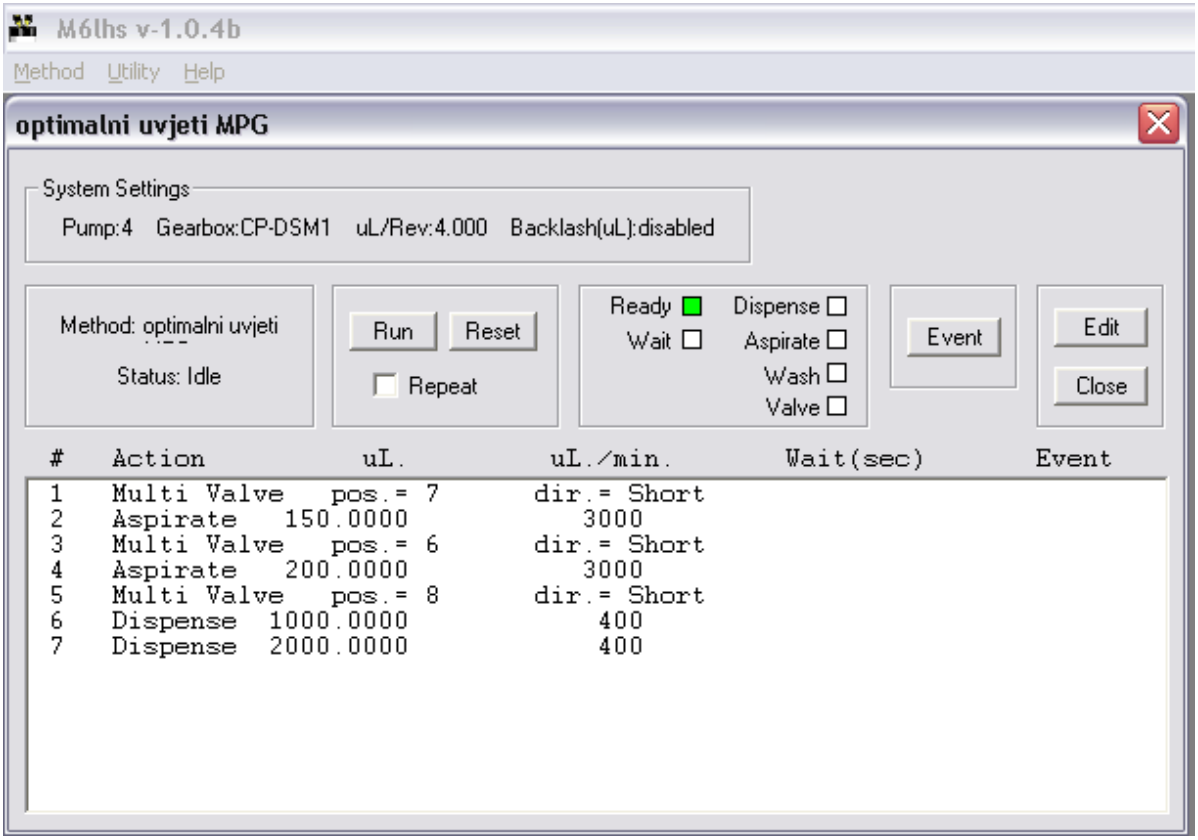
Preko programa M6-LHS podešavaju se svi uvjeti pri kojima će se obavljati analize te se daju naredbe o programskom slijedu. Prije početka mjerenja potrebno je cijeli sustav ispuniti osnovnom otopinom (deionizirana voda) te eliminirati mjehuriće zraka. Da bi se to postiglo program se namjesti kako je prikazano na slici 3.6.



Slika 3.6. Programski slijed punjenja sustava.

Prvo se odabire otvor selekcijskog ventila (1–10). Zatim se određuje smjer protoka otopine. Postoje dvije moguće naredbe: *aspirate* – usisavanje (usis) odnosno protok usmjeren od otvora na selekcijskom ventilu prema crpki, te *dispense* – isisavanje (isis) odnosno protok usmjeren od crpke prema selekcijskom ventilu. Protokom usmjerenim od otvora prema crpki napune se cjevčice sustava osnovnom otopinom te se potom suprotnim smjerom protoka ona tjera prema otvoru 10 koji je povezan s protočnom kivetom u optičkom putu spektrofotometra te se izlijeva u otpad. Na taj način sustav je ispran, oslobođen mjehurića zraka, i napunjen osnovnom otopinom, slika 3.5.

Na slici 3.7. prikazan je optimizirani programski slijed za određivanje MPG-a. Otvor 7 priključen je na otopinu reagensa, a otvor 6 na otopinu uzorka. Protokom usmjerenim od otvora 7 selekcijskog ventila prema crpki uvlači se 150 µL reagensa u petlju zadržavanja. Zatim se protokom usmjerenim od otvora 6 selekcijskog ventila prema crpki uvlači 200 µL uzorka u petlju zadržavanja. Potom se mijenja smjer protoka i izbacuje se 3000 µL osnovne otopine protokom usmjerenim od crpke prema otvoru 8 selekcijskog ventila. Na taj način se formirana „zona“ produkta tjera osnovnom otopinom od smjera crpke prema otvoru 8 koji je povezan s reakcijskom petljom. Nakon što prođe kroz reakcijsku petlju produkt dolazi do protočne kivete u optičkom putu spektrofotometra gdje se vrši mjerenje.



Slika 3.7. Programski slijed određivanja MPG-a.

3.3.3. Prikupljanje i obrada podataka

Podaci dobiveni eksperimentalnim mjerenjem su kontinuirano bilježeni te unešeni u program GraphPad Prism, verzija 4,03 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) preko kojega su crtani svi grafički prikazi rezultata pa tako i krivulja umjeravanja. Napravljena je i statistička obrada podataka te regresijska analiza.

3.4. Spektroskopska analitička metoda; molekulska apsorpcijska spektrofotometrija

Izraz spektroskopija se kroz povijest odnosio na granu znanosti koja se bavila svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučenom na komponente, valne duljine, koje tvore spektar. Spektrofotometrijske metode temelje se na mjerenju količine svjetla koju je uzorak odbio ili apsorbirao te se preko toga određuje koncentracija materijala u uzorku. Takve metode se često koriste u svrhu detekcije zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti te su postale nezaobilazne u kvalitativnoj i kvantitativnoj analitičkoj kemiji. Molekulska spektroskopija tako upućuje na kvalitativne i kvantitativne podatke o molekulama u uzorku [51].

3.4.1. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

Molekulska apsorpcijska spektroskopija je najčešće korištena tehnika analize u kemijskim laboratorijima. Temelji se na ultraljubičastom i vidljivom zračenju te se primjenjuje za kvantitativnu analizu. Ultraljubičasto i vidljivo zračenje pobuđuju elektrone koji prebivaju u molekulskoj orbitali niske energije u orbitalu više energije. Prijelaz elektrona između dviju orbitala je elektronski prijelaz, dok je apsorpcijski proces elektronska apsorpcija. Za apsorpciju ultraljubičastog i vidljivog zračenja u organskim molekulama odgovorne su dvije vrste elektrona: zajednički elektroni koji izravno sudjeluju u stvaranju veze i nepodijeljeni vanjski elektroni koji se uglavnom nalaze oko atoma kao što su kisik, halogeni elementi, sumpor i dušik. Jakost kojom su vezani elektroni utječe na valnu duljinu pri kojoj organska molekula apsorbira. Elektroni jednostrukih veza su čvrsto povezani te njihovo pobuđivanje zahtijeva energije koje odgovaraju valnim duljinama u vakuumskom ultraljubičastom području. Kvarc i dijelovi atmosfere apsorbiraju zračenje ispod 180 nm što za posljedicu ima neiskoristivost spektra jednostrukih veza u analitičke svrhe zbog eksperimentalnih poteškoća pri radu u tom području, dok organski spojevi s dvostrukim i trostrukim vezama imaju upotrebljive apsorpcijske maksimume u lako dostupnom utraljubičastom području, jer su elektroni u nezasićenim vezama relativno slabo vezani te se lako pobuđuju [51].

3.4.2. Apsorpcija zračenja

U spektroskopskom nazivlju apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta prisutna u propusnoj (prozirnoj) sredini selektivno prigušuje, odnosno smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica (atom, ion, molekula) ima jedinstven skup i raspored energetskih stanja, pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energetskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energetsko, *pobuđeno (ekscitirano) stanje* [51].

Pobuđivanje vrste M u ekscitiranu vrstu M* može se opisati jednadžbom:

$$M + h\nu \rightarrow M^* \qquad (1)$$

Nakon kratkog vremenskog razdoblja pobuđena se vrsta opet vraća u prvotno stanje tako da se *relaksira* do svoga prethodnog ili osnovnog stanja prenoseći pritom suvišak energije drugim atomima ili molekulama u istoj okolini [51]. Taj proces, koji uzrokuje malo povišenje temperature okoliša, opisuje se jednadžbom:

$$M^* \rightarrow M + \text{toplina} \qquad (2)$$

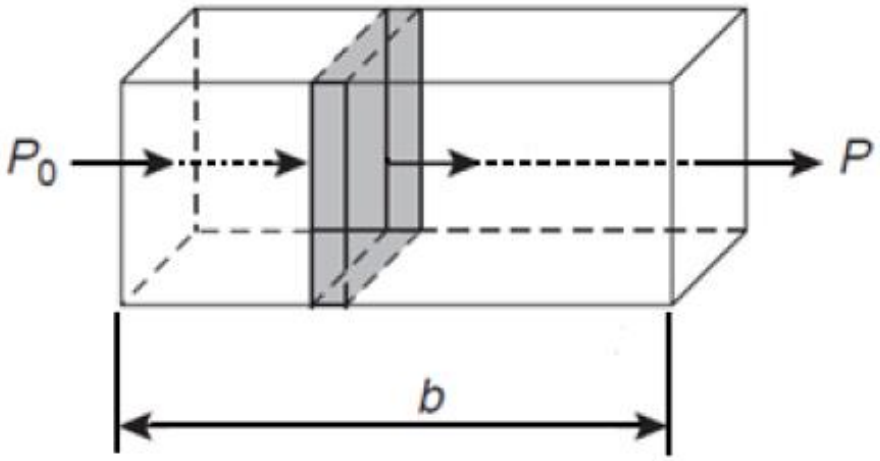
Vrijeme trajanja stanja u kojem su čestice pobuđene toliko je kratko da je koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku zanemariva. Također, količina toplinske energije otpuštene tijekom relaksacije najčešće je tako mala da se ne može ni detektirati. U tome je prednost apsorpcijskih mjerenja, njima se što je najmanje moguće remeti energija proučavanog sustava. Značajke pojedine vrste u apsorpcijskom smislu 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. Uzorci za apsorpcijsku analizu u ultraljubičastom i vidljivu području elektromagnetskog zračenja najčešće su ili plinoviti ili su razrijeđene otopine pripremljene u propusnom otapalu. Vertikalna os takvih prikaza može biti propusnost (transmitancija) izražena u postotcima, apsorbancija ili logaritamska vrijednost apsorbancije [51].

3.4.3. Transmitancija

Transmitancija T otopine definira se kao udio upadnog zračenja koje je prošlo kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad (3)$$

Instrumenti zapravo mjere količinu neapsorbirane svjetlosti. Kad apsorbirajuća vrsta apsorbira svjetlost, snaga zračenja snopa svjetlosti se smanjuje. Snaga zračenja, P, je energija zračenja koja u 1 sekundi pada na 1 cm² površine detektora. Snop svjetlosti, snage zračenja P_0 prolazi kroz sloj otopine debljine b cm i koncentracije c vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju je smanjenje snage snopa sa P_0 na P, slika 3.8. [51, 57].



Slika 3.8. Prigušivanje snopa zračenja početne snage P_0 otopinom koncentracije c (mol L^{-1}), tvari koja apsorbira i duljine puta b (cm), ($P < P_0$).

3.4.4. Apsorbancija

Apsorbancija A otopine definira se jednadžbom:

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P} \qquad (4)$$

Za razliku od transmitancije, apsorbancija otopine povećava se prigušenjem osnovnog snopa. Jednadžba (4) zahtjeva da apsorbancijska ljestvica u spektrofotometrima bude logaritamska. Kad svjetlost nije apsorbirana vrijedi: $P = P_0$ i $A = 0$ [51].

3.4.5. Odnos između apsorbancije i koncentracije: Beerov zakon

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

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \times b \times c \qquad (5)$$

gdje je a – konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), te b – duljina puta zračenja kroz uzorak. Kada se koncentracija u jednadžbi (5) izražava u molovima po litri, a b u centimetrima, konstanta proporcionalnosti naziva se molarnom apsorptivnošću (molarni apsorpcijski koeficijent) s uobičajenim simbolom ε ($A = \varepsilon \times b \times c$, gdje se ε izražava u L cm^{-1} mol^{-1}) [51].

Molarna apsorptivnost je broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbancija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 1 cm. Apsorbancija jednaka jedinici postiže se kada je 90% upadnog zračenja apsorbirano. Apsorptivnost i molarna apsorptivnost daju vjerojatnost da će analit apsorbirati foton određene energije. Kao posljedica toga vrijednosti a i ε ovise o valnoj duljini elektromagnetskog zračenja [51].

Apsorbancija i transmitacija, kako su prikazane jednadžbama (4) i (3), ne mogu se mjeriti u laboratoriju, jer uzorak kojemu se apsorbancija određuje mora biti smješten u neku posudicu. Pritom je neizbježno međudjelovanje zračenja i stjenki posudice, te uzrokuje gubitak refleksijom i apsorpcijom. Uz refleksijske gubitke, raspršenjem na velikim molekulama ili nehomogenostima u otapalu može se smanjiti snaga snopa pri prolazu kroz otopinu. Kako bi se kompenzirali ti učinci najčešće se uspoređuje snaga zračenja snopa propuštenoga kroz mjernu posudicu punjenu otopinom koja apsorbira, sa snagom snopa koji prolazi identičnom posudicom punjenom samo otapalom (slijepa proba) [51]. Eksperimentalna apsorbancija tada se definira jednadžbom:

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina analita}}} = \log \frac{P_0}{P} \qquad (6)$$

Takve eksperimentalne apsorbancije u skladu su s Beerovim zakonom i predstavljaju dobre aproksimacije istinskih apsorbancija [51].

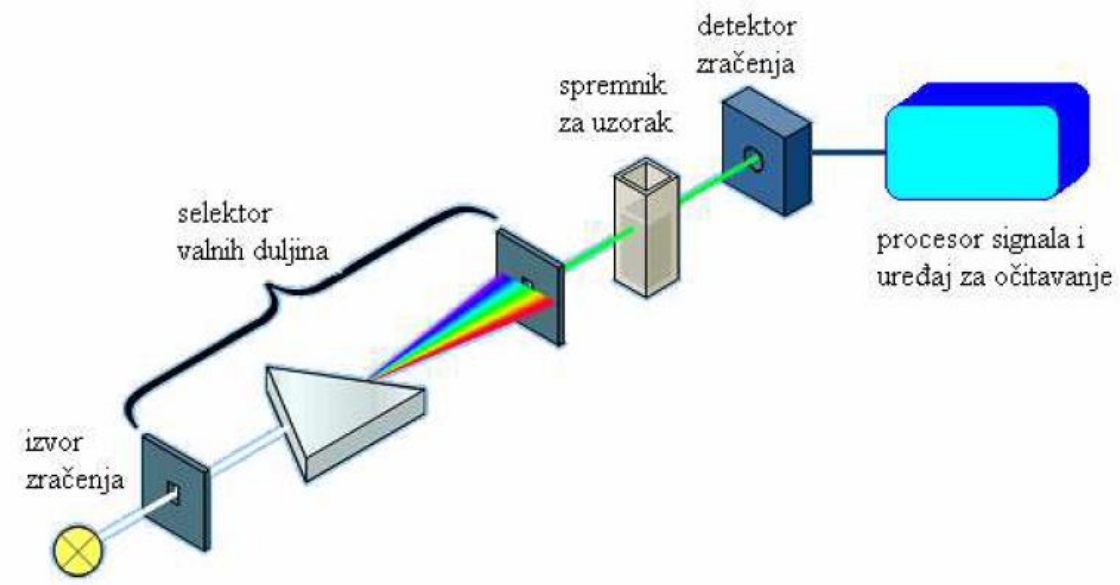
3.4.6. Ograničenja Beerovog zakona

Beerov zakon vrijedi za monokromatska zračenja u razrijeđenim otopinama {$c < 10^{-2}$ mol L^{-1}} te predstavlja granični zakon. Kad su koncentracije vrste od interesa veće od 10^{-2} mol L^{-1}, smanjuju se udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. Posljedica toga je odstupanje od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji. Ako se u razrijeđenim otopinama tvari koja apsorbira nalaze visoke koncentracije drugih vrsta (interferencije), pojavljuje se sličan učinak, jer blizina stranih iona i tvari koje apsorbiraju mijenja molarnu apsorptivnost uzorka čime uzrokuje odstupanje od Beerovog zakona. Kemijska odstupanja od Beerova zakona posljedica su asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorbira s otapalom. Posljedica kemijskih odstupanja je nastanak produkata apsorpcijskih značajki različitih od značajki analita [51].

3.4.7. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji

Većina spektroskopskih uređaja sastavljena je od pet osnovnih dijelova:

1. Stabilnog izvora energije zračenja,
2. Selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja,
3. Jednoga ili više spremnika za uzorke,
4. Detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal (najčešće električni),
5. Procesora signala i uređaja za njegovo očitanje. U apsorpcijskim mjerenjima snop koji dolazi iz izvora prolazi uzorkom tek nakon izlaza iz selektora valnih duljina, Slika 3.9. [51].



Slika 3.9. Shematski prikaz jednosnopnog spektrofotometra.

Apsorpcijska spektroskopija zahtjeva vanjski izvor konstantnog i dovoljno snažnog zračenja koje omogućuje jednostavnu detekciju i mjerenje. Za emitiranje ultraljubičastog zračenja koriste se vodikove i deuterijeve žarulje (160 – 380 nm). Za vidljivi i bliski infracrveni dio spektra (240 – 3000 nm) koristi se volfram / halogen žarulja [51]. U ovom eksperimentu korišten je spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo područje (190 – 1100 nm) UV-1601 Shimadzu (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) koji ima deuterijski i volframov izvor zračenja. Širina snopa elektromagnetskog zračenja je 1 mm te je tako omogućeno mjerenje i najmanjih koncentracija uzorka s velikom preciznošću. U ovom eksperimentu mjerenje apsorbancije je izvršavano pri valnoj duljini od 458 nm.

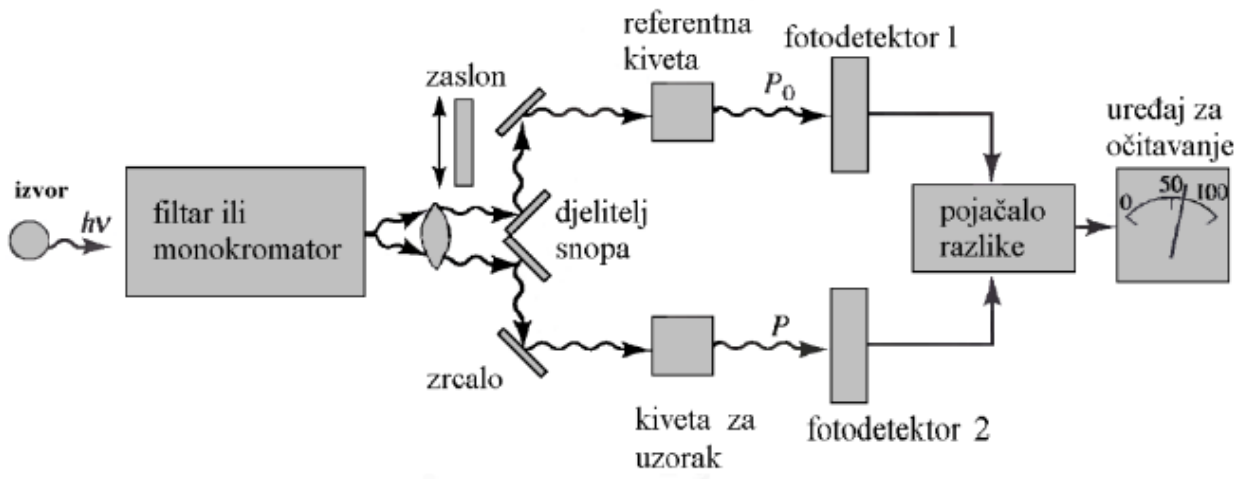
Spektroskopski uređaji uglavnom sadrže uređaj koji sužava mjereno zračenje do uske vrpce koju uzorak apsorbira. Takva sredstva često bitno utječu na selektivnost i osjetljivost instrumenta. Nema selektora koji bi mogao izdvojiti zračenje samo jedne valne duljine. Umjesto toga, izdvaja se skupina susjednih valnih duljina, koja se naziva vrpcom. Te su valne duljine raspoređene oko središnje, nominalne (nazivne) valne duljine. Svjetlost iz stabilnog izvora kontinuiranog zračenja prolazi kroz monokromator (selektor valnih duljina), koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja. Monokromatska svjetlost prolazi kroz apsorpcijski sloj debljine *b*, i snaga izlazne svjetlost se na detektoru pretvara u mjerljiv signal [51]. Disperzno sredstvo monokromatora u spektrofotometru korištenom u ovom eksperimentu je refleksijska rešetka.

Spremnici za uzorke, nazivani ćelijama ili kivetama moraju biti napravljeni od materijala prozirnog u određenom spektralnom području. Kvarc se upotrebljava za rad u ultraljubičastom i vidljivom području. Silikatno staklo je upotrebljivo samo za vidljivo područje, jer apsorbira u ultraljubičastom području. Plastične kivete mogu se upotrebljavati u vidljivom dijelu spektra. Najčešći materijal za kivete u infracrvenom dijelu spektra jest kristalni natrijev klorid ili kalijev bromid. Najčešća unutarnja širina kiveta za rad u ultraljubičastom i vidljivom području iznosi 1 cm. [51]. U ovom eksperimentu korištene su kvarcne kivete unutarnjeg volumena 160 μL te dužine optičkog puta 10 mm.

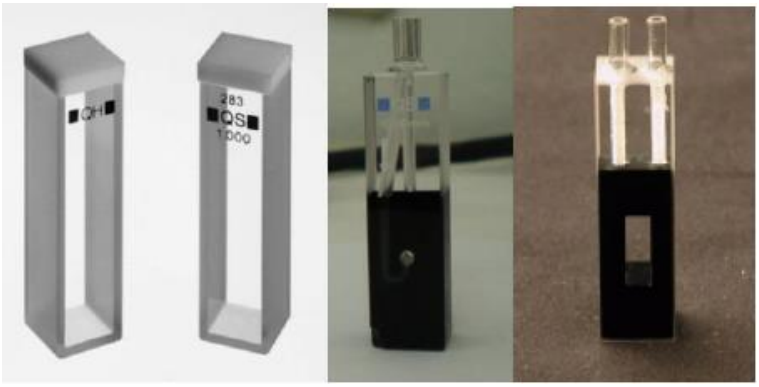
Detektor je naprava koja pokazuje postojanje neke fizičke pojave. Detektor proizvodi električni signal kada u njega udare fotoni. Odgovor detektora je funkcija valne duljine upadnog zračenja. Detektor u korištenom spektrofotometru je fotomultiplikator. Električni signal koji nastaje na fotosjetljivom sloju pojačava se do 100 milijuna puta, što omogućava registriranje pojedinačnih fotona te pretvaranje u signal.

Procesor signala je elektronička naprava koja pojačava električni signal iz detektora, a može i provoditi neke matematičke operacije na signalu (diferenciranje, logaritmiranje ili integriranje). U ovom eksperimentu je to računalna programska podrška Hyper UV-VIS software (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). Spektrofotometar je spojen na osobno računalo s instaliranim programom koji služi za prikupljanje i obradu podataka.

Postoje jednosnopni i dvosnopni instrumenti. Jednosnopni instrumenti su jednostavniji, te nemaju široku primjenu, jer je potrebno kivetu s uzorkom i kivetu s referentnom otopinom naizmjence smještati u snop zračenja. Nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorbancija kao funkcija proteklog vremena. Mnogi suvremeni spektrofotometri temelje se na radu s dva snopa zračenja koji nastaju pomoću zrcala, u obliku slova V, koje se naziva djeliteljem snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu (slijepu probu) prema fotodetektoru, a drugi istodobno prolazi kroz uzorak prema drugom, sparenom fotodetektoru. Dva se izlazna signala pojačavaju, a njihov omjer, ili logaritam njihovih omjera, određuje se elektronički i pokazuje na uređaju za očitavanje, slika 3.10. [51].



Slika 3.10. Shematski prikaz dvosnopnog spektrofotometra s prostorno razdvojenim snopovima.



Slika 3.11. Kivete za spektrofotometrijska mjerenja.



Slika 3.12. Korišteni spektrofotometar UV-1601 Shimadzu Co., UV-vidljivi spektrofotometar.

3.5. Ostali uređaji i oprema

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



Slika 3.13. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab® 413.

Za precizno dodavanje različitih mikrolitarskih volumena tekućina korištene su mikropipete po Eppendorfu s ručnim držačem, *Nichiryo* (Nichiryo, Tokyo, Japan), za raspone volumena od 10 do 100 µL te od 100 do 1000 µL.



Slika 3.14. Mikropipete s ručnim držačem.

4. Rezultati

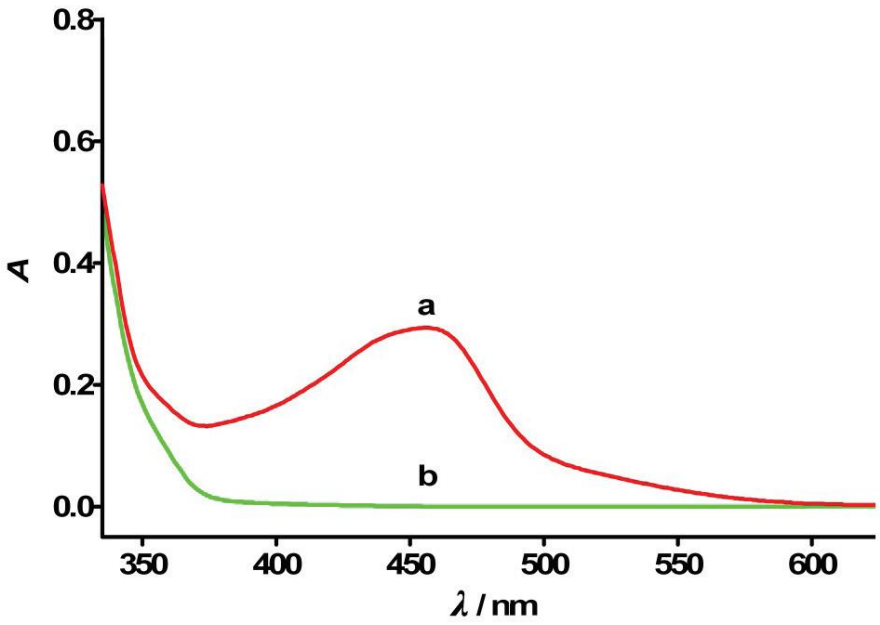
4. Rezultati

4.1. Osnovna reakcija na kojoj se temelji metoda

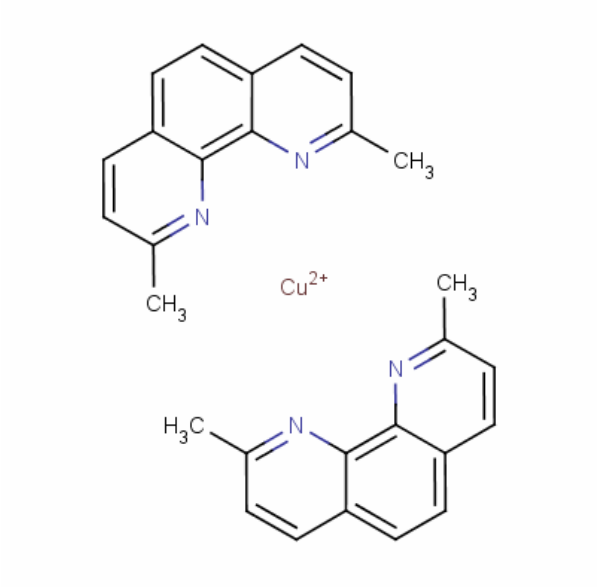
Reakcija na kojoj se temelji ovo istraživanje je redoks reakcija između MPG-a i kompleksa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$. MPG (RSH spoj) reducira zeleni $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kompleks, a on se oksidira te nastaje narančasto-žuti $[Cu(Nc)_2]^{+}$ kompleks:

$$2\ RSH + 2\ \left[Cu(Nc)_2\right]^{2+} \rightleftarrows RSSR + 2\ \left[Cu(Nc)_2\right]^{+} + 2\ H^{+}$$

Kemijski spoj koji nastaje, bis neokuproin bakrov(I) kompleks; $[Cu(Nc)_2]^{+}$, apsorbira elektromagnetsko zračenje pri valnoj duljini $\lambda = 458$ nm gdje ima apsorpcijski maksimum. Za razliku od njega, bis neokuproin bakrov(II) kompleks; $[Cu(Nc)_2]^{2+}$, ne apsorbira elektromagnetsko zračenje pri $\lambda = 458$ nm. Na slici 4.1. prikazani su snimljeni spektri kompleksa a – $[Cu(Nc)_2]^{+}$ i b – $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kinetičkom spektrofotometrijskom metodom pri 458 nm [58].



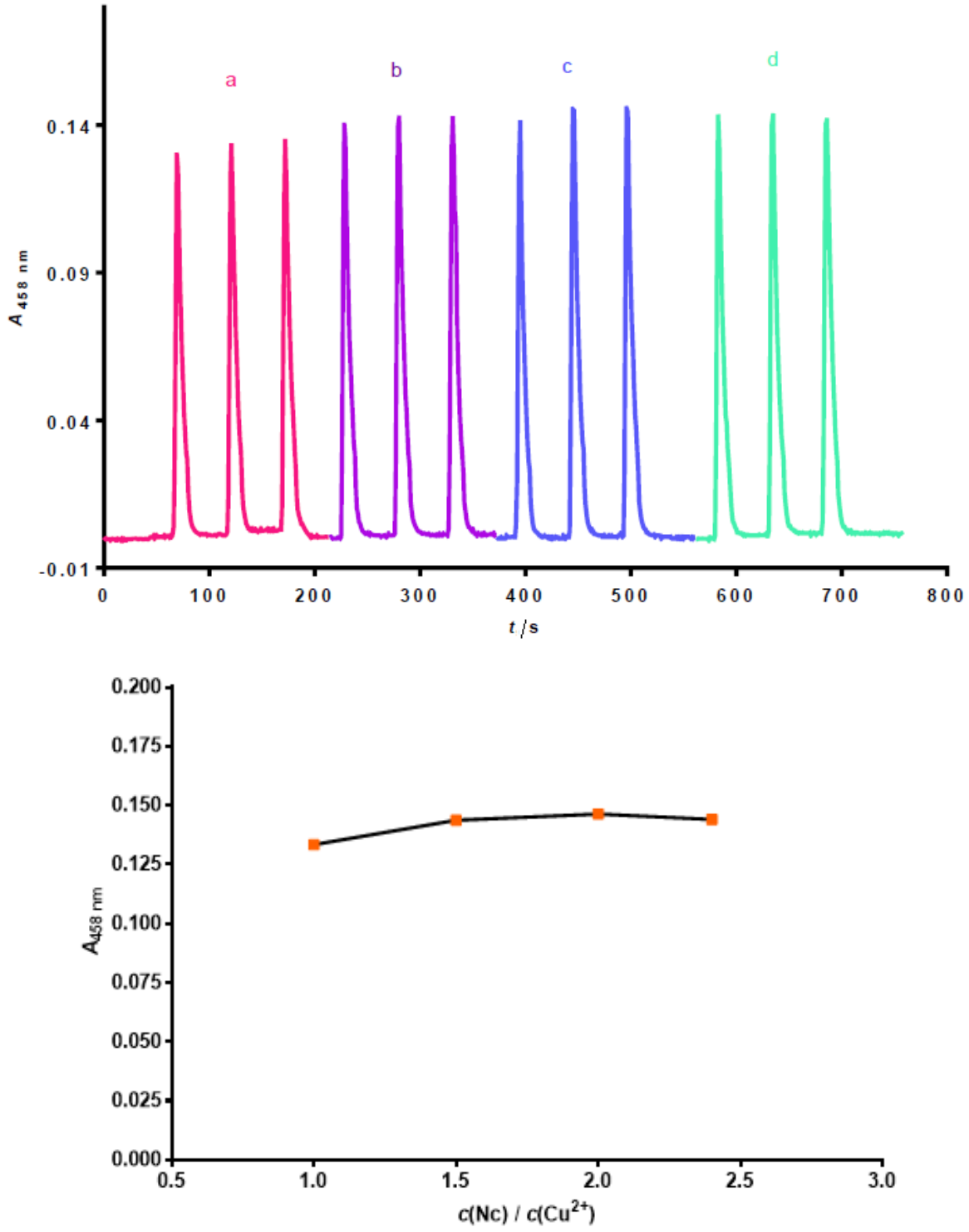
Slika 4.1. Spektrofotometrijski izmjeren spektar: (a) $[Cu(Nc)_2]^{+}$ i (b) $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ pri $\lambda = 458$ nm [58].



Slika 4.2. Kemijska struktura bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa [59].

4.2. Optimizacija kemijskih parametara

Razvoj metode određivanja tiopronina slijednom analizom injektiranjem uključuje i optimizaciju kemijskih parametara reakcije odnosno uvjeta pod kojima će se postići najveća potpunost reakcije. Što se tiče reagensa ispitivan je molarni omjer bakra(II) i neokuproina. Pripravljene su otopine različitih omjera pri čemu je koncentracija bakra(II) bila konstantna te iznosila $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, a koncentracija neokuproina se mijenjala u rasponu koncentracije od $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1} do $2{,}4\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Tako su i molarni omjeri imali vrijednost od 1 do 2,4. Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da je optimalan omjer *c* (bakar(II)) : *c* (neokuproin) = 1 : 2,4 jer je povećanjem koncentracije neokuproina postignuta veća apsorbancija i bolja ponovljivost mjerenja, slika 4.3.



Slika 4.3. Optimizacija omjera bakra i bis neokuproina, siagram i grafički prikaz. Omjeri c(Nc)/c(Cu^{2+}): a = 1,0, b = 1,5, c = 2,0 , d = 2,4. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$= 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

Optimizacija ostalih kemijskih parametara kinetičkih metoda određivanja tiolnih spojeva provedena je u prethodnom istraživanju te su se isti parametri koristili za sva daljnja mjerenja na SIA sustavu, tablica 4.1 [58].

λ = 458 nm
c (Cu^{2+}) : c (neokuproin) = 1 : 2,4
pH = 3
t = 25 °C

Tablica 4.1. Prikaz optimalnih kemijskih parametara.

4.3. Optimizacija parametara protočnog sustava

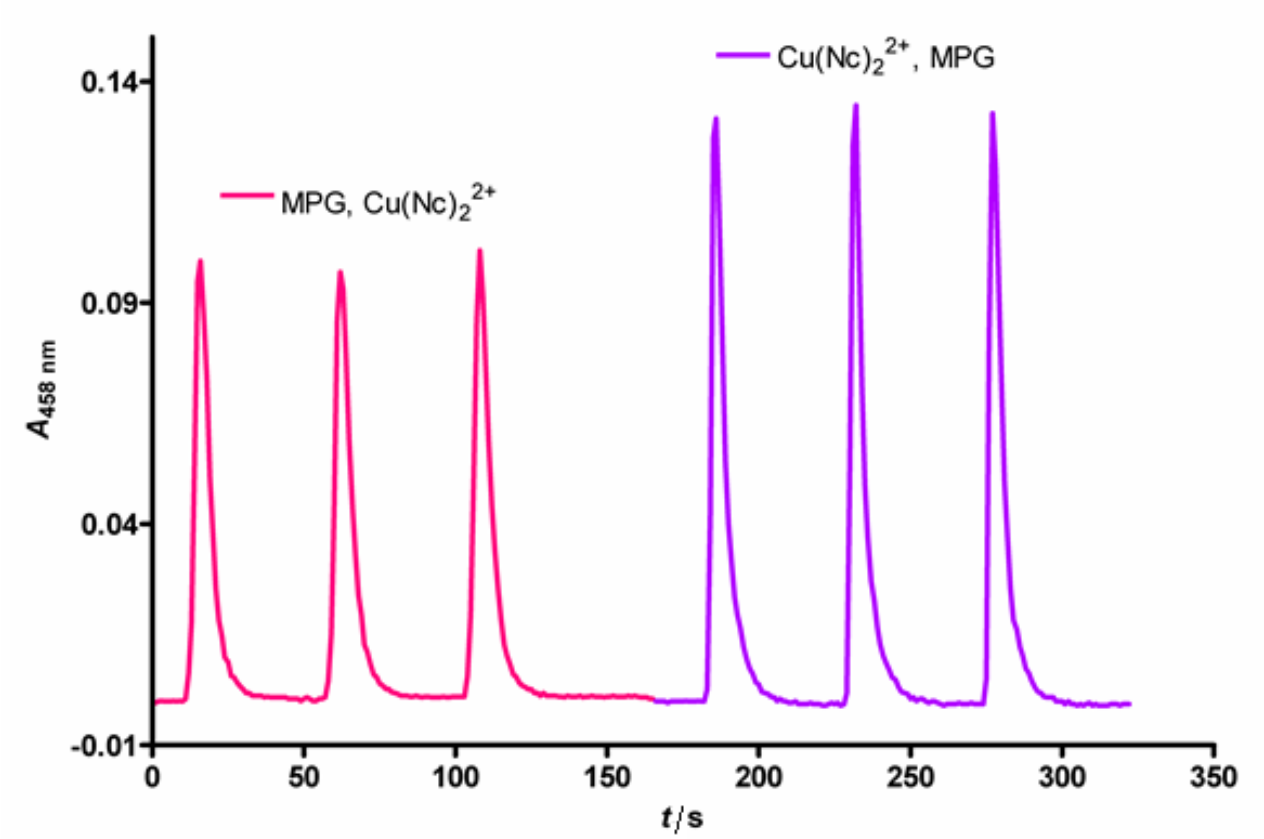
Parametri protočnog sustava analitičke metode slijedne analize injektiranjem optimiziraju se kako bi se postigli najpovoljniji uvjeti za određivanje tiopronina. Cilj je postići najbolji kompromis između osjetljivosti metode i brzine odnosno učestalosti analiza. Optimizacija se vrši univarijantnom metodom, mijenja se samo jedan parametar analize dok su ostali parametri konstantni. Pri mjerenju kao analit koristi se standardna otopina tiopronina, c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}. Reagens je standardna otopina bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa, $c[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 1×10^{-3} mol L^{-1}. Priprava ovih otopina opisana je u poglavlju 3. Materijali i metode. Ostali konstantni uvjeti sustava: pH = 3, t = 25 °C, λ = 458 nm. Nakon što je jedan parametar optimiziran njegova vrijednost ostaje konstantna, a optimizira se novi parametar. Ostali parametri opet ostaju konstantni. Postupak se ponavlja za sve parametre.

U ovom sustavu optimiziraju se: redoslijed injektiranja analita i reagensa, protok, volumen injektiranja reagensa, volumen injektiranja analita, volumen petlje zadržavanja i duljina reakcijske petlje.

Nakon što je metoda optimizirana određuje se linearno dinamičko područje, granica dokazivanja i granica određivanja. Zatim se razvijena metoda vrednuje ispitivanjem utjecaja interferencija, prenošenja signala, ponovljivosti te točnosti i iskoristivosti. Na kraju se metoda analize primjenjuje na ispitivanje realnog uzorka.

4.3.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja

Prvi od postupaka optimizacije SIA sustava bila je optimizacija redoslijeda injektiranja otopina reagensa i analita. Ispitivalo se hoće li se viši signal (veća vrijednost apsorbancije) zabilježiti kada se prvo u sustav injektira otopina reagensa pa zatim analita ili kada je obrnut redoslijed injektiranja. Nakon provedenog mjerenja zaključilo se da je optimalan redoslijed injektiranje otopine reagensa, kompleksa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ te potom otopine analita, standarda MPG-a; slika 4.4. Ovaj redoslijed injektiranja korišten je za daljnja mjerenja i ostale eksperimente optimizacije.

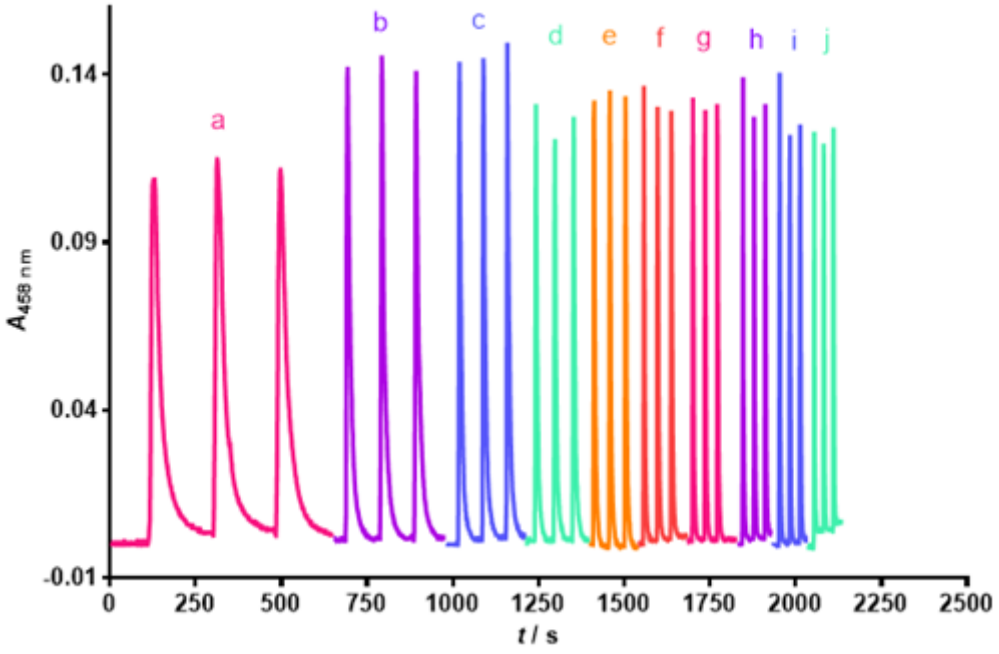


Slika 4.4. Siagram utjecaja redoslijeda injektiranja otopina reagensa i standarda. Eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}, c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0×10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3, t = 25°C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

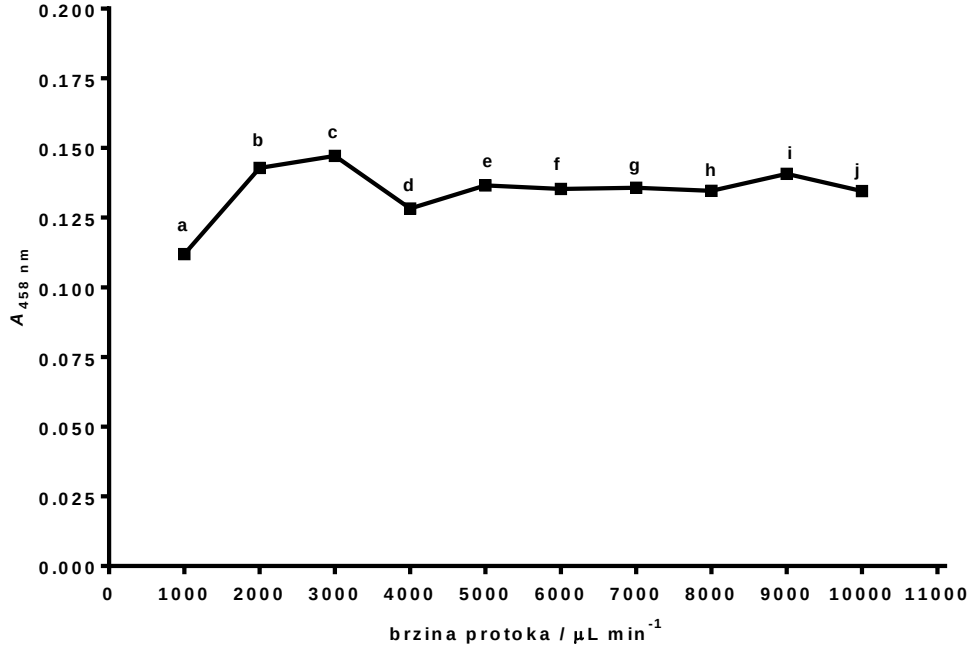
Prva tri „pika“ predstavljaju vrijednosti apsorbancije dobivene kada je injektirano 200 µL otopine standarda te potom 200 µL otopine reagensa, dok „pikovi“ nakon trećeg predstavljaju vrijednosti apsorbancije kada je prvo injektirano 200 µL otopine reagensa i potom jednak volumen otopine standarda.

4.3.2. Optimizacija protoka

Brzina protoka se optimizira jer se njenim podešavanjem može kontrolirati disperzija i poboljšati osjetljivost metode. Protok osnovne otopine utječe na vrijeme odvijanja reakcije i razrjeđenje zone uzorka, a time i na visinu analitičkog signala. Ako je protok prespor disperzija će biti premala, neće se postići potpuna reakcija, jer se zona reagensa i analita neće dobro izmiješati te neće biti ponovljivosti signala. O disperziji ovisi oblik koncentracijskog gradijenta zone, „pika“. Ako je brzina strujanja veća biti će bolja ponovljivost i bolji povrat na baznu liniju ali pri prevelikoj brzini neće se ostvarivati povratak na baznu liniju te će se prikazivati „pikovi“ preuskih osnovica. Potrebno je napraviti kompromis između osjetljivosti i brzine analize te odabrati protok koji će omogućavati povratak signala na osnovnu liniju. Zato su eksperimentalno ispitane različite brzine protoka (od 1000 µL min^{-1} do 10000 µL min^{-1}), kako bi se ustanovilo koja je brzina optimalna za reakciju između tiopronina i bakar-neokuproin kompleksa u SIA sustavu. Nakon što je ustanovljena optimalna brzina ona postaje ograničavajući čimbenik za učestalost analiza, tj. broj mjerenja koji se može napraviti ovom metodom u određenom vremenskom razdoblju. Za ovu reakciju maksimalna vrijednost apsorbancije zabilježena je pri protoku od 3000 µL min^{-1} (slika 4.5. i slika 4.6.) te je taj protok korišten za sva daljnja mjerenja.



Slika 4.5. Siagram utjecaja brzine protoka na zabilježeni signal. Vrijednosti protoka: a = 1000 µL min^{-1}, b = 2000 µL min^{-1}, c = 3000 µL min^{-1}, d = 4000 µL min^{-1}, e = 5000 µL min^{-1}, f = 6000 µL min^{-1}, g = 7000 µL min^{-1}, h = 8000 µL min^{-1}, i = 9000 µL min^{-1}, j = 10000 µL min^{-1}. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.



Slika 4.6. Grafički prikaz utjecaja protoka na zabilježeni signal. Vrijednosti protoka: a = 1000 µL min^{-1}, b = 2000 µL min^{-1}, c = 3000 µL min^{-1}, d = 4000 µL min^{-1}, e = 5000 µL min^{-1}, f = 6000 µL min^{-1}, g = 7000 µL min^{-1}, h = 8000 µL min^{-1}, i = 9000 µL min^{-1}, j = 10000 µL min^{-1}. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

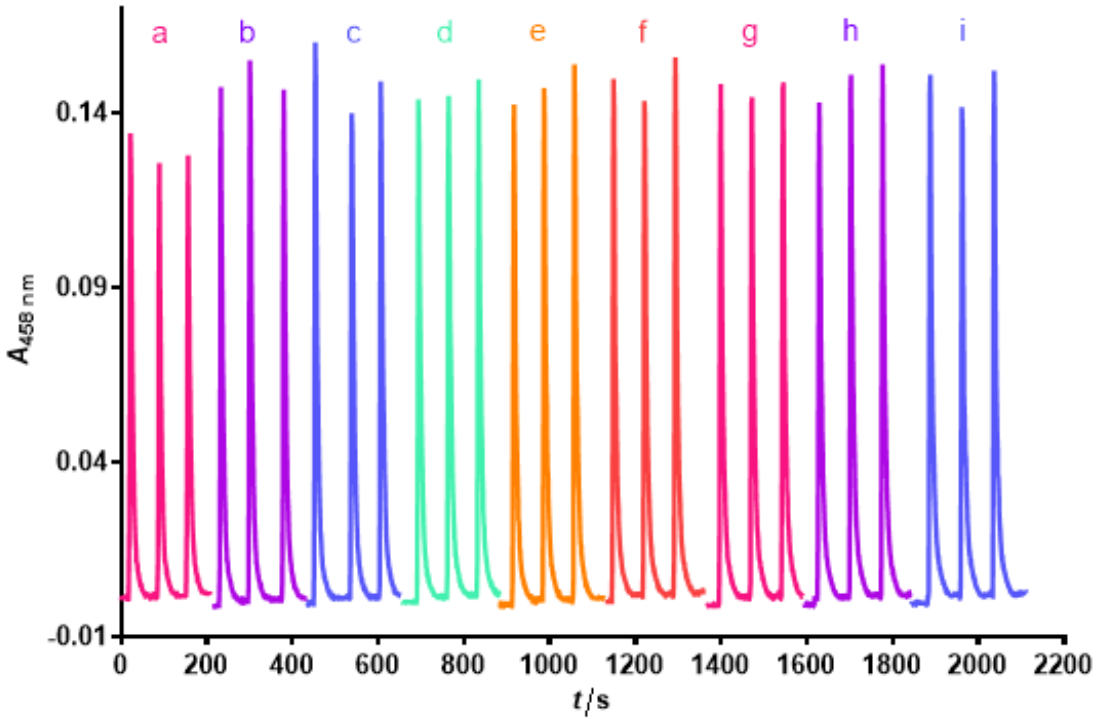
- **<u>Učestalost analiza</u>**

Na temelju odabrane brzine protoka može se odrediti i učestalost analiza. To je bitan parametar za procjenjivanje ekonomičnosti metode. S obzirom na to da je za mjerenje apsorbancije jednog uzorka u triplikatu potrebno oko 150 sekundi izračunato je da je pri protoku od 3000 µL min^{-1} učestalost analiza oko 24 analize u satu (za vrijednost apsorbancije uzorka uzima se srednja vrijednost tri izmjerene apsorbancije tog uzorka).

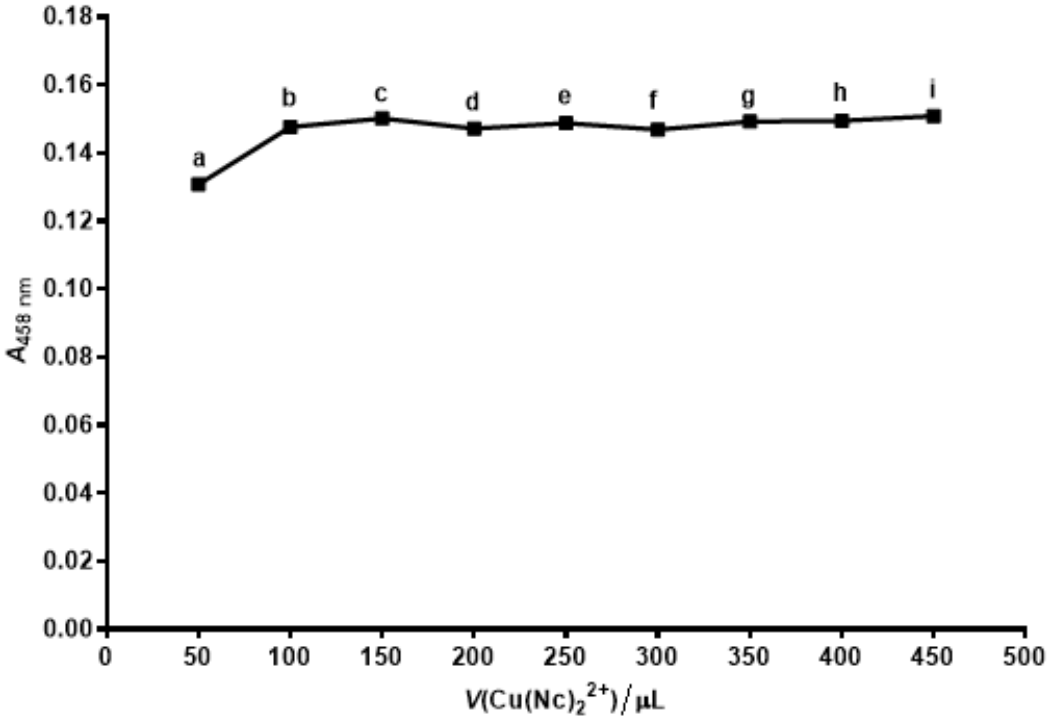
4.3.3. Optimizacija volumena injektiranja reagensa

Ispitan je utjecaj volumena injektiranja reagensa na visinu signala. Reagensa mora biti dovoljno kako bi sav analit izreagirao. Povećanjem volumena injektiranja reagensa povećava se i vrijednost izmjerene apsorbancije i ostvaruje se bolji povrat na baznu liniju. Daljnjim povećavanjem volumena ne ostvaruje se povrat na baznu liniju, a višak reagensa se uzalud troši. Zato je ispitan utjecaj volumena injektiranja reagensa, otopine kompleksa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ koncentracije $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, na određivanje MPG-a u otopini standarda koncentracije $c(MPG) = 4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}. Volumeni injektiranja reagensa su bili u rasponu od 50 do 450 µL, slika 4.7. i 4.8.

Maksimalna apsorbancija zabilježena je pri volumenu injektiranja reagensa od 150 µL te je taj volumen odabran i korišten za sva daljnja mjerenja.



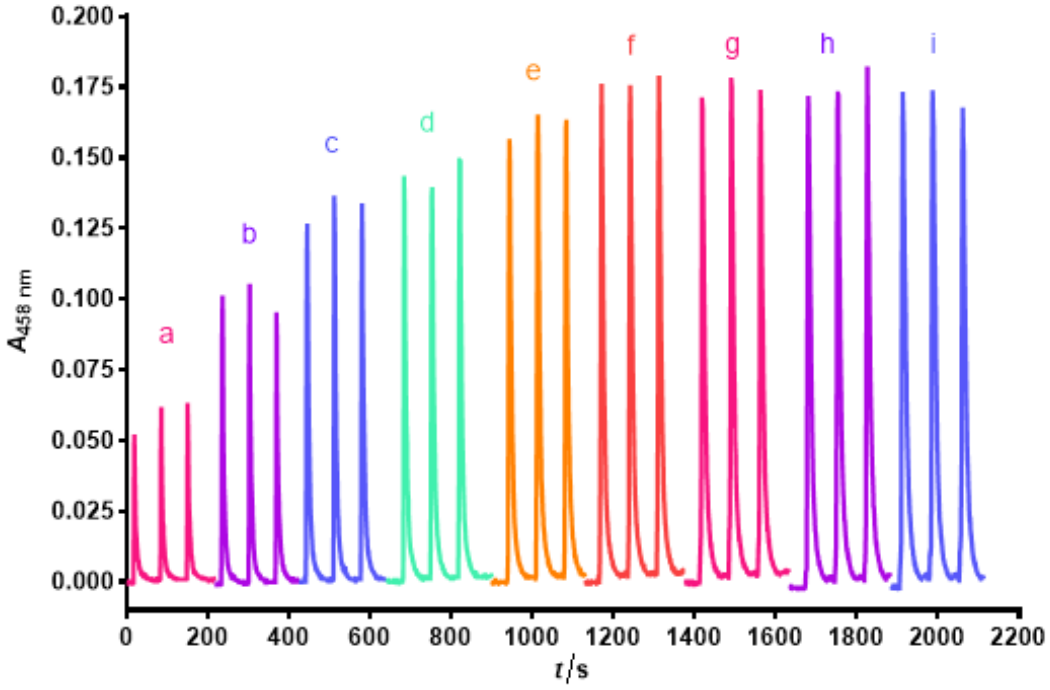
Slika 4.7. Siagram ispitivanja utjecaja volumena injektiranja otopine $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ na apsorbanciju. Volumeni injektiranja reagensa: a = 50 µL, b = 100 µL, c =150 µL, d = 200 µL, e = 250 µL, f = 300 µL, g = 350 µL, h = 400 µL, i = 450 µL. Ostali eksperimentalni uvjeti: $c(MPG) = 4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.



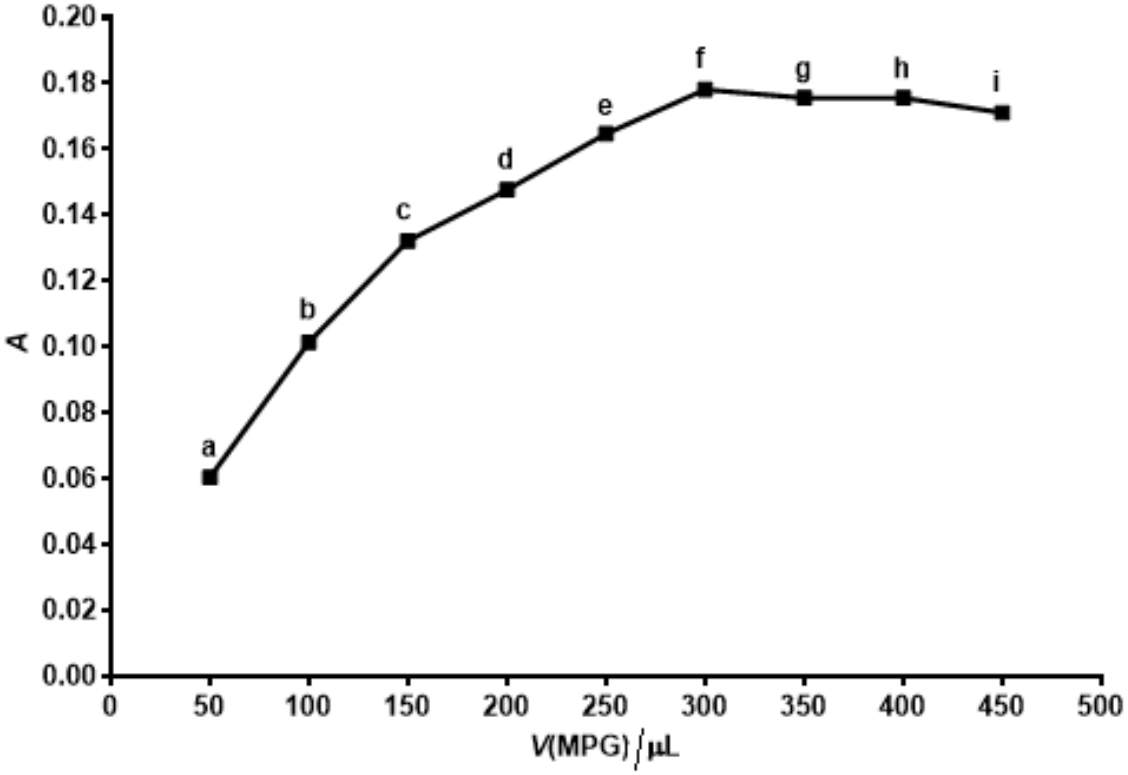
Slika 4.8. Ovisnost visine signala o volumenu injektiranja reagensa. Volumeni injektiranja reagensa: a = 50 μL, b = 100 μL, c =150 μL, d = 200 μL, e = 250 μL, f = 300 μL, g = 350 μL, h = 400 μL, i = 450 μL. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 μL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 μL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 μL, volumen injektiranja (MPG) = 200 μL, volumen osnovne otopine = 3000 μL, protočna kiveta volumena = 80 μL, λ = 458 nm.

4.3.4. Optimizacija volumena injektiranja standarda

Optimizacija volumena injektiranja standardne otopine MPG-a mora se izvršiti kako bi se ustanovio maksimalan volumen uzorka pri kojem se ovom metodom može detektirati kompleks koji nastaje reakcijom tiopronina s bis neokuproin bakrovim(II) kompleksom. Povećavanjem volumena injektiranja standarda u pravilu se povećava i analitički signal. Volumeni injektiranja standarda korišteni za optimizaciju bili su u rasponu od 50 do 450 µL, a koncentracija otopine standarda je bila c(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}, slika 4.9. i 4.10. Povećavanjem volumena značajno se povećavao i analitički signal, ali s vrijednostima iznad 200 µL bilo je potrebno više vremena za povratak na baznu liniju što smanjuje učestalost analiza. Također nije bio ostvaren potpuni povratak na baznu liniju. Zbog toga je volumen standarda od 200 µL odabran kao optimalan, kako bi se postigla maksimalna učestalost mjerenja. Taj volumen korišten je za sve daljnje analize.



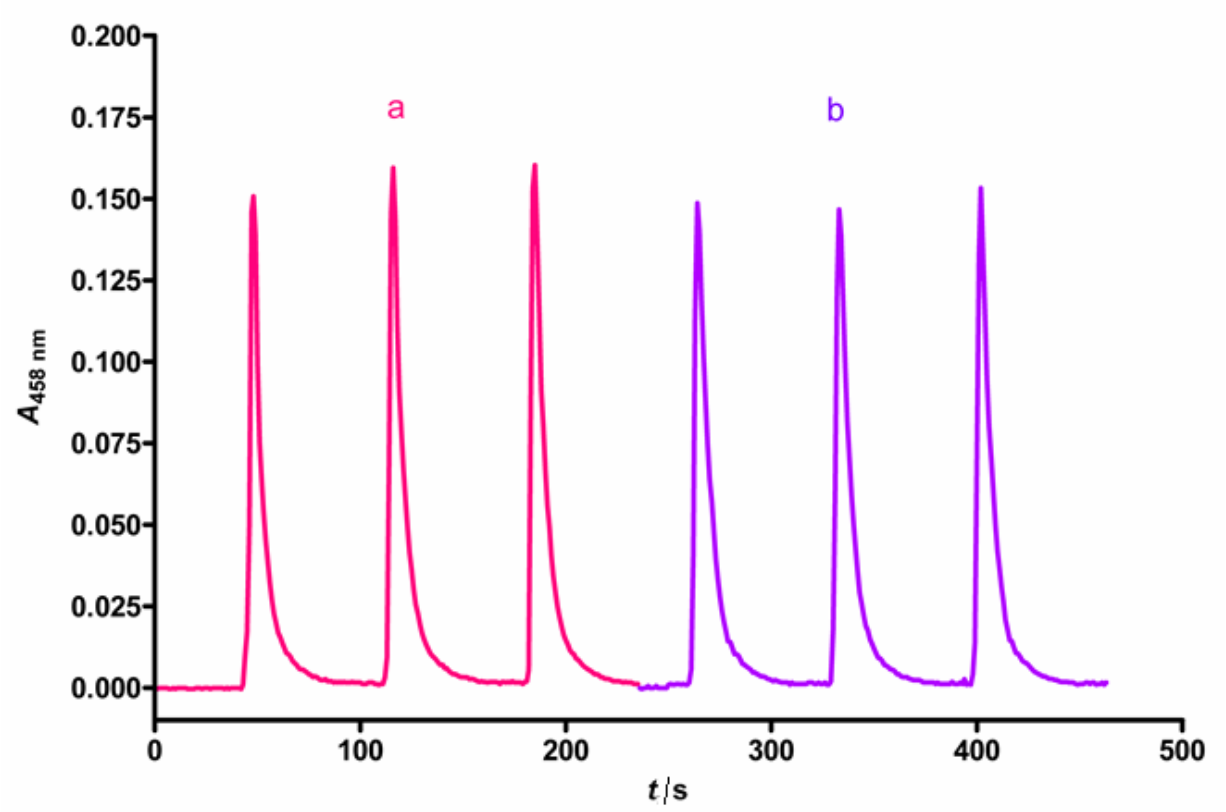
Slika 4.9. Siagram utjecaja volumena injektiranja standardne otopine MPG-a na apsorbanciju. Volumeni injektiranja standarda: a = 50 µL, b = 100 µL, c =150 µL, d = 200 µL, e = 250 µL, f = 300 µL, g = 350 µL, h = 400 µL, i = 450 µL. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}, c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0×10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$ = 150 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.



Slika 4.10. Ovisnost visine signala o volumenu injektiranja standarda. Volumeni injektiranja standarda: a = 50 µL, b = 100 µL, c =150 µL, d = 200 µL, e = 250 µL, f = 300 µL, g = 350 µL, h = 400 µL, i = 450 µL. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 1000 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

4.3.5. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

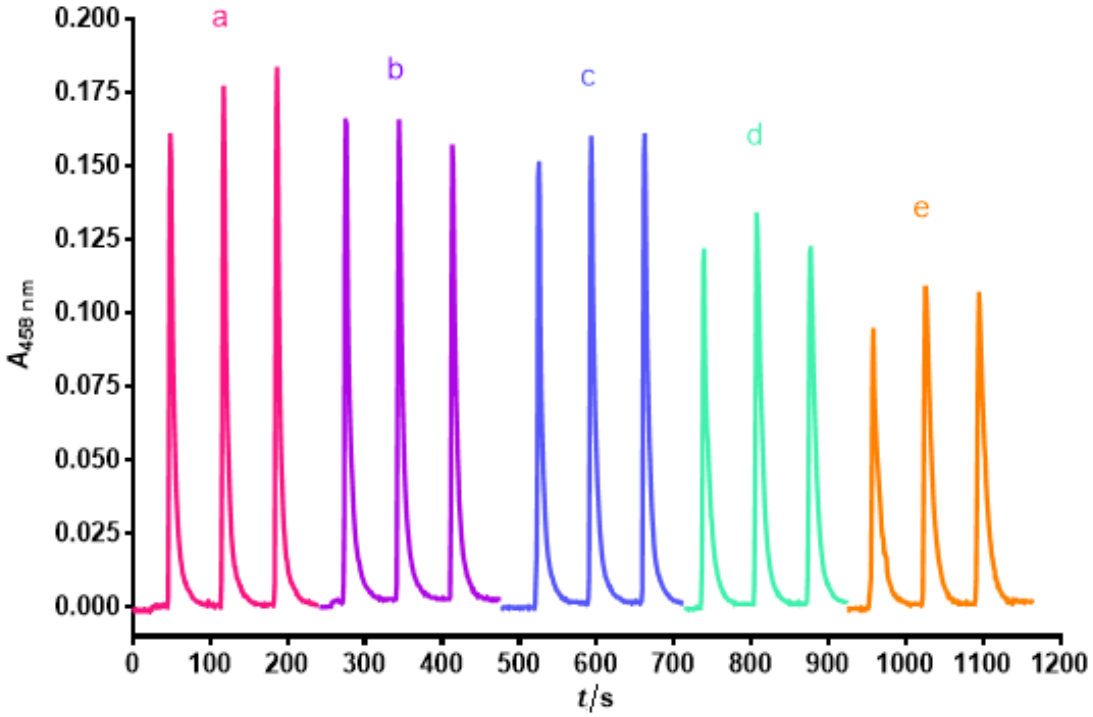
Ispitan je utjecaj volumena petlje zadržavanja na osjetljivost metode korištenjem otopine standarda koncentracije $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1} i otopine kompleksa ($[Cu(Nc)_2]^{2+}$) koncentracije $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Korištene su petlje volumena 500 i 1000 µL, slika 4.11. Zbroj volumena injektiranja standarda i reagensa ne smije biti veći od volumena petlje zadržavanja kako ne bi došlo do izlijevanja iz sustava u otpad. U ovom slučaju taj zbroj iznosi 350 µL (150 µL + 200 µL). Pri volumenu petlje zadržavanja od 500 µL zabilježena je veća vrijednost apsorbancije te je ona odabrana kao optimalna i korištena za daljnja mjerenja.



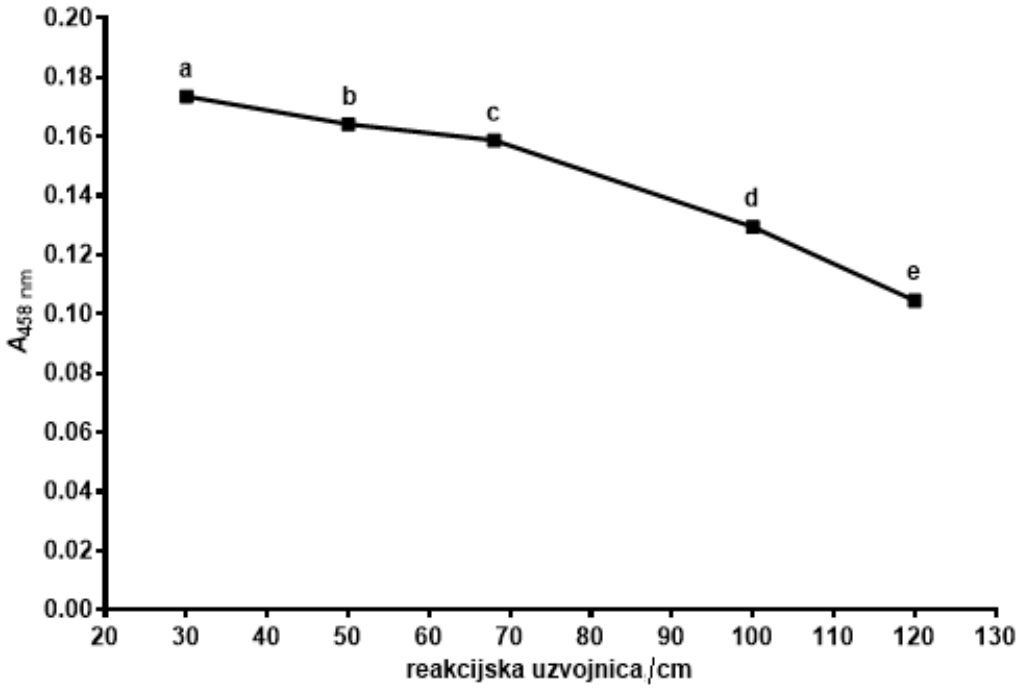
Slika 4.11. Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja na apsorbanciju. Volumen petlje zadržavanja: a = 500 µL, b = 1000 µL. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

4.3.6. Optimizacija duljine reakcijske petlje

Duljina reakcijske petlje utječe na vrijeme odvijanja reakcije između analita i reagensa. Što je reakcijska petlja duža to se povećava i vrijeme kontakta između analita i reagensa te se postiže veća potpunost reakcije, a time i veća osjetljivost metode. Ako je njena duljina premala reakcija se neće odviti do kraja i zone se neće u potpunosti izmiješati te će ponovljivost biti lošija. S druge strane, ako je duljina petlje prevelika reakcija će se odviti prije nego dođe do detektora te će doći do prevelikog raspršenja (disperzije) i razrjeđenja produkta. Korištene su otopina standarda koncentracije $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1} i otopina kompleksa ($[Cu(Nc)_2]^{2+}$) koncentracije $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Optimizacija se ispitivala na petljama duljine 30, 50, 70, 100 i 120 cm, slike 4.12. i 4.13. Petlji duljine 30 cm volumen iznosi 120 µL, onoj duljine 50 cm iznosi 200 µL, petlji duljine 70 cm iznosi 280 µL, onoj duljine 100 cm iznosi 400 µL te petlji duljine 120 cm iznosi 500 µL. Najbolji odnos između ponovljivosti i visine signala pokazao se kod reakcijske uzvojnice duljine 70 cm te je ona izabrana kao optimalna te korištena za daljnja mjerenja.



Slika 4.12. Siagram utjecaja duljine reakcijske petlje na apsorbanciju. Duljina reakcijske petlje: a = 30 cm, b = 50 cm, c = 70 cm, d = 100 cm, e = 120 cm. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.



Slika 4.13. Ovisnost visine signala o duljini reakcijske petlje. Duljina reakcijske petlje: a = 30 cm, b = 50 cm, c = 70 cm, d = 100 cm, e = 120 cm. Ostali eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

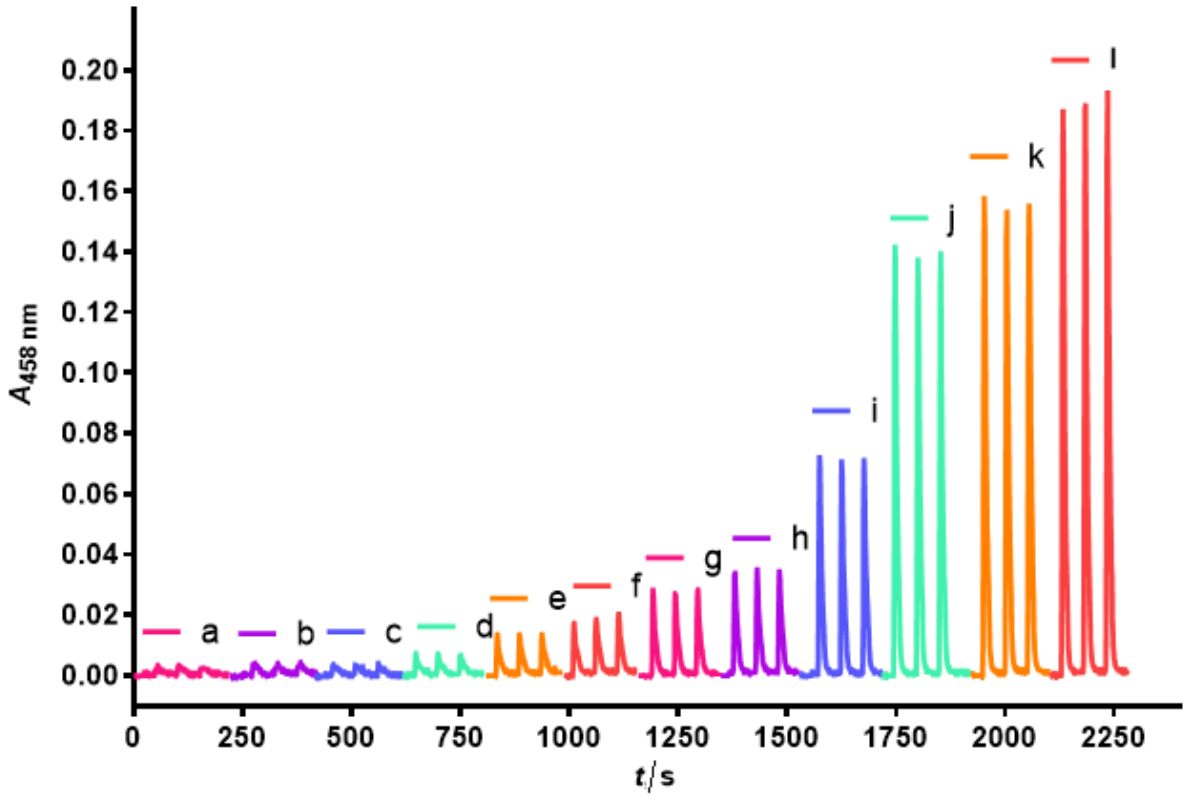
4.3.7. Odabrani optimalni parametri

Parametri	Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
Redoslijed injektiranja	1. MPG 2. $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ 1. $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ 2. MPG	1. $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ 2. MPG
Protok	1000 - 10000 μL min^{-1}	3000 μL min^{-1}
Volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$	50 - 450 μL	150 μL
Volumen injektiranja MPG	50 - 450 μL	200 μL
Volumen petlje zadržavanja	500 - 1000 μL	500 μL
Duljina reakcijske petlje	30, 50, 70, 100 i 120 cm (120, 200, 280, 400 i 500 μL)	70 cm (280 μL)

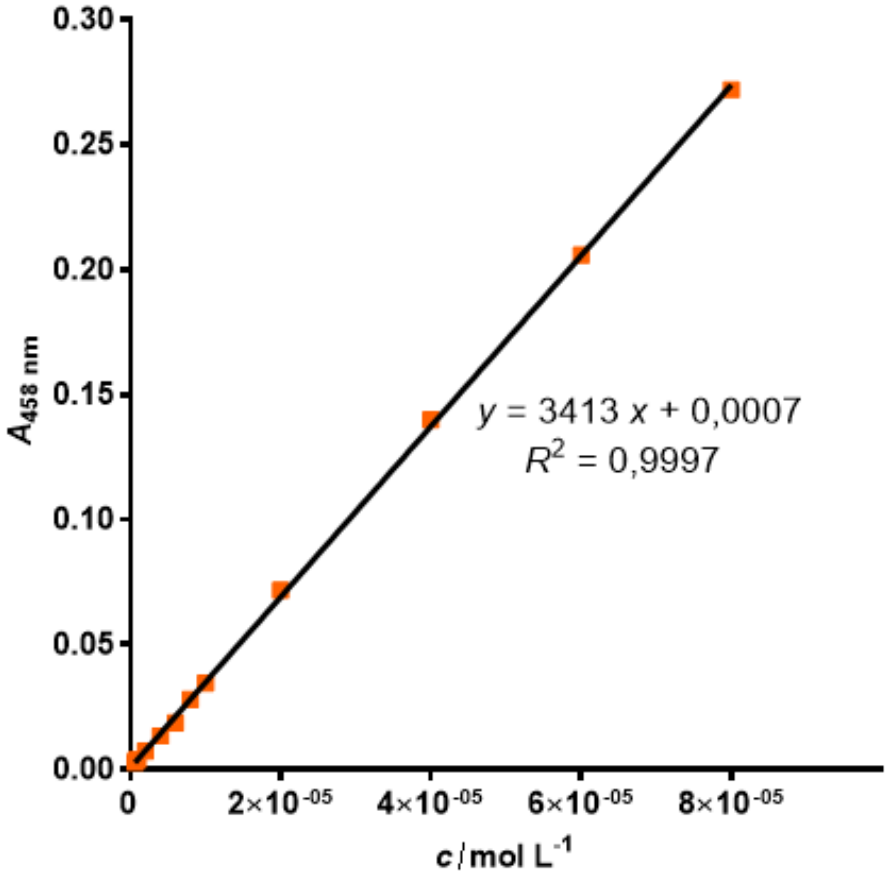
Tablica 4.2. Prikaz odabranih optimalnih parametara protočnog sustava.

4.4. Linearno dinamičko područje

Nakon optimizacije metode slijedne analize injektiranjem izrađena je krivulja umjeravanja za područje koncentracija MPG-a od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1}. Zatim je linearnom regresijskom analizom odnosa visine vrha (apsorbancije) i koncentracije MPG-a, za 12 vrijednosti apsorbancije i koncentracije, dobivena jednadžba pravca: y = 3413,1x + 0,0007, s linearnošću (R^2 = 0,9997). Vrijednost y predstavlja visinu vrha (apsorbanciju), a vrijednost x koncentraciju MPG-a izraženu u mol L^{-1}, slike 4.14. i 4.15.



Slika 4.14. Siagram spektrofotometrijskog određivanja MPG-a. Eksperimentalni uvjeti: c(MPG): a = 6×10^{-7} mol L^{-1}, b = 8×10^{-7} mol L^{-1}, c = 1×10^{-6} mol L^{-1}, d = 2×10^{-6} mol L^{-1}, e = 4×10^{-6} mol L^{-1}, f = 6×10^{-6} mol L^{-1}, g = 8×10^{-6} mol L^{-1}, h = 1×10^{-5} mol L^{-1}, i = 2×10^{-5} mol L^{-1}, j = 4×10^{-5} mol L^{-1}, k = 6×10^{-5} mol L^{-1}, l = 8×10^{-5} mol L^{-1}. $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.



Slika 4.15. Krivulja umjeravanja za određivanje MPG-a slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Eksperimentalni uvjeti: c(MPG)= od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

4.5. Granica dokazivanja i granica određivanja

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

$$D_L = \frac{3 \times s_b}{m} \qquad (7)$$

S_b predstavlja standardnu devijaciju slijepe probe, a m predstavlja nagib krivulje umjeravanja.

Granica određivanja (*Limit of quantification,* LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuju je brzina kemijske reakcije i metoda mjerenja. Brže reakcije imaju nižu granicu određivanja. Jednadžba za njeno izračunavanje glasi:

$$Q_L = \frac{10 \times s_b}{m} \qquad (8)$$

I ovdje s_b predstavlja standardnu devijaciju slijepe probe, a m predstavlja nagib krivulje umjeravanja [60].

Standardna devijacija slijepe probe u ovom slučaju iznosi 0,0002, dok je nagib krivulje jednak 3413,1.

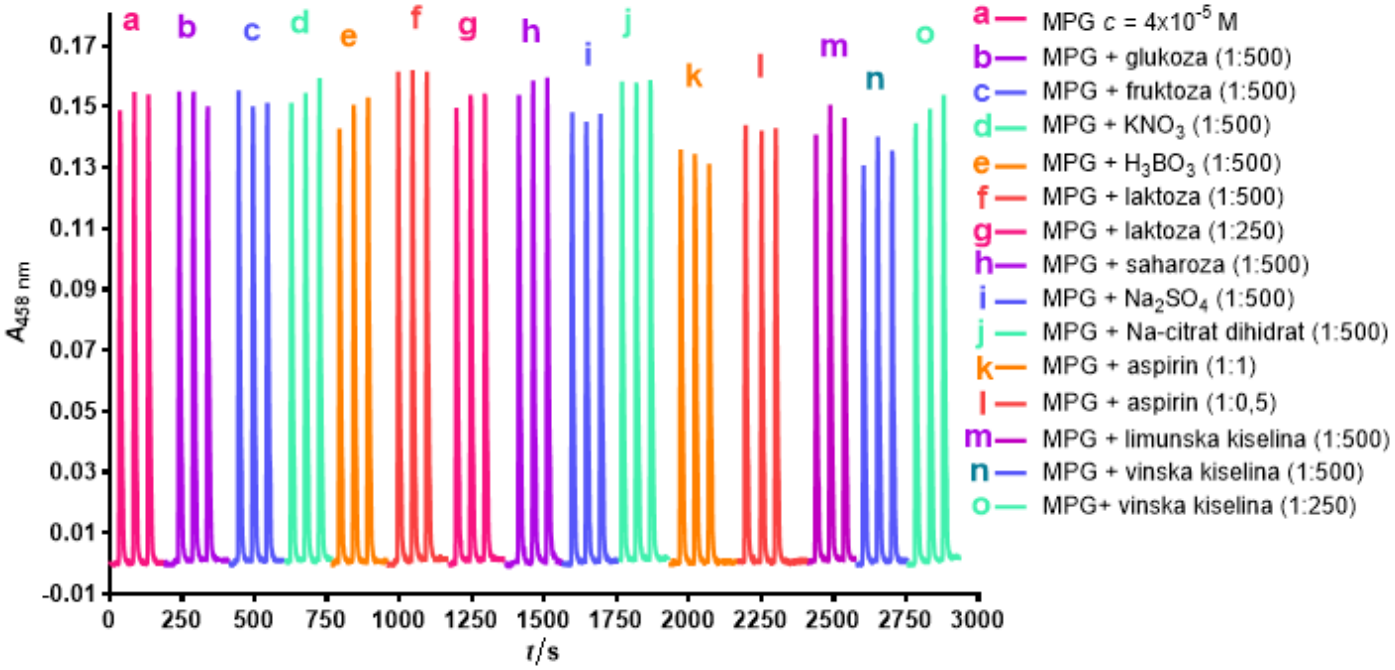
Granica dokazivanja izračunata na temelju jednadžbe (7) iznosi 2×10^{-7} mol L^{-1}. Granica određivanja izračunata korištenjem jednadžbe (8) iznosi 6×10^{-7} mol L^{-1}, što odgovara eksperimentalno određenoj najnižoj točki linearnog dinamičkog područja.

4.6. Vrednovanje metode

Nakon optimizacije parametara protočnog sustava potrebno je vrednovati (validirati) korištenu metodu. Svrha vrednovanja je osiguravanje pouzdanosti i točnosti analitičkih podataka dobivenih mjerenjem. To je postupak kojim se dokazuje prikladnost metode za točno određenu svrhu, u ovom slučaju to je određivanje koncentracije tiopronina iz farmaceutskih pripravaka. Tako se u svrhu vrednovanja ispituje utjecaj interferencija, prenošenje signala, ponovljivost te točnost i iskoristivost.

4.6.1. Utjecaj interferencija

Ispitivan je utjecaj stranog iona ili tvari na visinu signala uzorka standarda koji sadrži $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1} MPG-a i različite koncentracije stranih tvari koje mogu izazivati pogreške kod određivanja MPG-a ovom metodom. Granica tolerancije definirana je kao koncentracija stranog iona ili tvari koja će izazvati pogrešku manju od ±5 % kod određivanja MPG-a. Uglavnom su se pripravljale otopine sa 500 puta većom koncentracijom interferirajuće tvari u odnosu na koncentraciju analita, slika 4.16. Tvari koje su pokazale preveliku pogrešku ponovno su pripravljene, ovaj put sa 250 puta većom koncentracijom. Aspirin (acetilsalicilna kiselina) ispitivan je u koncentraciji jednakoj analitu i u upola manjoj od analita, ali unatoč tome pokazao je preveliku pogrešku u oba slučaja. Značajno će interferirati sve tvari s izraženim redukcijskim svojstvima (tiolni spojevi, askorbinska kiselina). Ispitivani omjer interferirajuće tvari i analita mnogo je veći od onog koji se uobičajeno nalazi u farmaceutskim pripravcima. U tablici 4.3. se nalaze podaci dobiveni mjerenjem apsorbancije, odnosno srednja vrijednost tri provedena mjerenja te izračunata relativna pogreška.



Slika 4.16. Siagram utjecaja interferencija na određivanje MPG–a, omjer koncentracija MPG-a i većine interferirajućih vrsta je 1:500. Laktoza i vinska kiselina izmjerene su i sa omjerom koncentracija 1:250, a aspirin je mjeren u omjerima 1:1 i 1:0,5. Eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija MPG:interferirajuća tvar	$\bar{A}_{458\ nm}$	Relativna pogreška, %
Glukoza	1:500	0,1545	0,52
Fruktoza	1: 500	0,1525	-0,76
KNO_3	1: 500	0,1547	0,67
H_3BO_3	1: 500	0,1493	-2,86
Laktoza	**1: 500**	**0,1621**	**5,49**
Laktoza	1:250	0,1560	1,47
Saharoza	1: 500	0,1584	3,08
Na_2SO_4	1: 500	0,1481	-3,67
Na-citrat dihidrat	1: 500	0,1594	3,69
Aspirin	**1: 1**	**0,1334**	**-13,19**
Aspirin	**1:0,5**	**0,1428**	**-7,11**
Limunska kiselina	1:500	0,1468	-4,47
Vinska kiselina	**1:500**	**0,1363**	**-11,30**
Vinska kiselina	1:250	0,1500	-2,39

Tablica 4.3. Prikaz interferirajućih tvari.

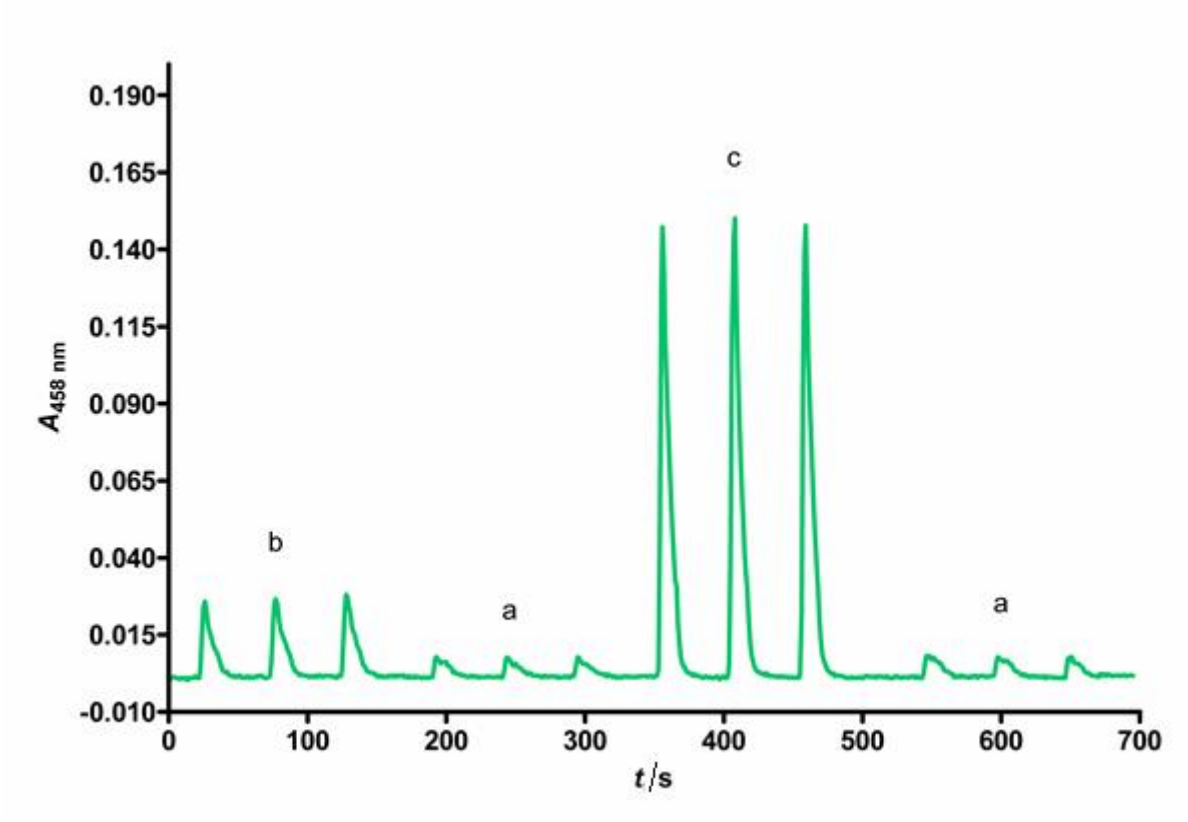
Relativna pogreška izračunata je preko izmjerene apsorbancije standardne otopine MPG-a koja iznosi 0,1537. Izraz za izračunavanje relativne pogreške glasi:

$$\mathrm{Rp}(\%) = \frac{A_{\mathrm{interferencije}} - A_{\mathrm{MPG}}}{A_{\mathrm{MPG}}} \times 100 \qquad (9)$$

4.6.2. Prenošenje signala

Ispitivan je utjecaj promjene koncentracije analita na visinu signala i povratak na baznu liniju u svrhu vrednovanja korištene metode. Injektirane su različite koncentracije analita jedna za drugom, bez ispiranja sustava između svakog injektiranja. Korištene su koncentracije analita c_1(MPG) = 2,0×10^{-6} mol L^{-1}, c_2(MPG) = 8,0×10^{-6} mol L^{-1}, c_3(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}, slika 4.17.

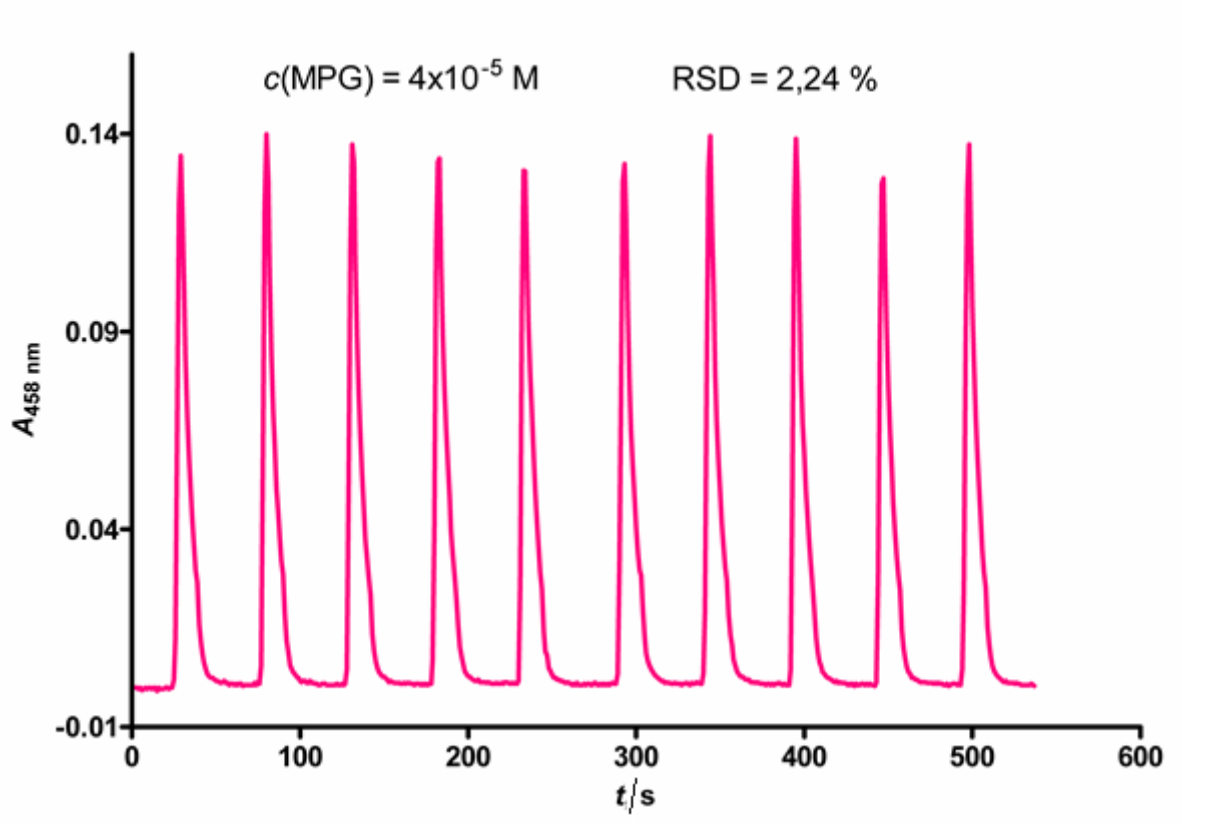
Primjenom optimizirane metode ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije tiopronina. Uz to nije primijećen ni pomak bazne linije.



Slika 4.17. Siagram utvrđivanja prenošenja signala. Koncentracije analita: c(MPG): a = 2,0×10^{-6} mol L^{-1}, b = 8,0×10^{-6} mol L^{-1}, c = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}. Ostali eksperimentalni uvjeti: c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0×10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 μL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 μL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 μL, volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$ = 150 μL, volumen injektiranja (MPG) = 200 μL, volumen osnovne otopine = 3000 μL, protočna kiveta volumena = 80 μL, λ = 458 nm.

4.6.3. Ponovljivost

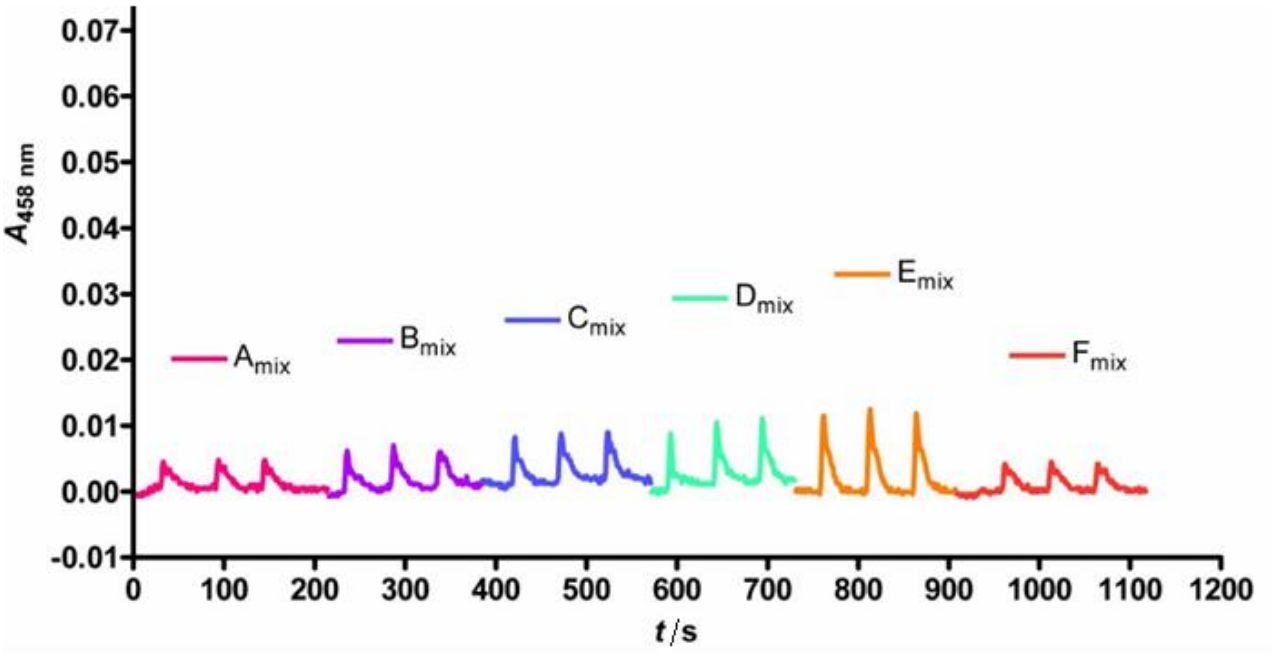
U sustav je uzastopno injektirano 10 uzoraka standardne otopine tiopronina koncentracije c(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1} kako bi se ispitala ponovljivost u uvjetima – isti analitičar, isti uzorak, isti mjerni sustav, isti radni uvjeti i kratko vremensko razdoblje. Na temelju izmjerenih apsorbancija izračunato je relativno standardno odstupanje (*Relative standard deviation*, RSD), RSD = 2,24 %, slika 4.18. Na temelju toga zaključuje se da je postignuta zadovoljavajuća ponovljivost metode.



Slika 4.18. Siagram utvrđivanja ponovljivosti signala. Eksperimentalni uvjeti: c(MPG) = 4,0×10^{-5} mol L^{-1}, c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0×10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 µL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 µL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 µL, volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$ = 150 µL, volumen injektiranja (MPG) = 200 µL, volumen osnovne otopine = 3000 µL, protočna kiveta volumena = 80 µL, λ = 458 nm.

4.6.4. Točnost i iskoristivost

U svrhu vrednovanja korištene metode ispitivana je njena točnost. Točnost metode provjerena je ispitivanjem iskoristivosti (iscrpka), dodajući poznate količine tiopronina u otopinu uzorka tablete prije analize. Iskoristivost (iscrpak) je svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita u uzorku. Zbog toga je iskoristivost u direktnoj vezi sa točnošću metode i može se koristiti za procjenu njene primjenjivosti, posebno u situacijama kada nema odgovarajuće referentne metode ili referentnog uzorka. Pripravljen je realni uzorak otopine Captimer® tablete izračunane koncentracije c(MPG) = $1{,}23\times10^{-6}$ mol L^{-1} te je analiziran u SIA sustavu. Zatim su realnom uzorku dodavani različiti obroci standardne otopine tiopronina, kako bi se dobile različite izračunane koncentracije otopina uzorka, slika 4.19. Dodavanjem otopine standarda apsorbancija bi se trebala proporcionalno povećavati. Vrijednosti koncentracija izračunatih iz izmjerenih apsorbancija trebale bi se poklapati s teoretskim koncentracijama. Uspoređivanjem dviju koncentracija računa se postotak iskoristivosti. Između svakog mjerenja sustav se ispirao s 5%-tnom HCl kako ne bi došlo do prenošenja signala.



Slika 4.19. Siagram ispitivanja točnosti metode. Teoretske koncentracije analita, c(MPG):

- A_{mix} = 1 mL otopine tablete = $1{,}230\times10^{-6}$ mol L^{-1},
- B_{mix} = 1 mL otopine tablete + 0,5 mL standardne otopine = $1{,}845\times10^{-6}$ mol L^{-1},
- C_{mix} = 1 mL otopine tablete + 1 mL standardne otopine = $2{,}460\times10^{-6}$ mol L^{-1},
- D_{mix} = 1 mL otopine tablete + 1,5 mL standardne otopine = $3{,}075\times10^{-6}$ mol L^{-1},
- E_{mix} = 1 mL otopine tablete + 2 mL standardne otopine = $3{,}690\times10^{-6}$ mol L^{-1},
- F_{mix} = 1 mL standardne otopine = $1{,}230\times10^{-6}$ mol L^{-1}.

Ostali eksperimentalni uvjeti: $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, pH = 3, t = 25 °C, protok = 3000 μL min^{-1}, volumen petlje zadržavanja = 500 μL, duljina reakcijske petlje = 70 cm, volumen reakcijske petlje = 280 μL, volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL, volumen injektiranja (MPG) = 200 μL, volumen osnovne otopine = 3000 μL, protočna kiveta volumena = 80 μL, λ = 458 nm.

Primjer proračuna teoretske koncentracije:

B_{mix}:

$c_1 = 1{,}23\times10^{-5}\,\text{mol}\,\text{L}^{-1}$

$V_1 = 1\text{ mL} + 0{,}5\text{ mL} = 1{,}5\text{ mL}$

$V_2 = 10\text{ mL}$

$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$

$$c_{2,\text{teoretska}} = \frac{c_1 \times V_1}{V_2}$$

$$c_2 = \frac{1{,}23\times10^{-5}\,\text{mol L}^{-1}\times1{,}5\text{ mL}}{10\text{ mL}} = 1{,}845\times10^{-6}\,\text{mol L}^{-1}$$

Zatim se iz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancija računa eksperimentalna koncentracija. Na temelju pravca umjeravanja dobiven je izraz za jednadžbu pravca:

$A = 3413{,}1c + 0{,}0007$

Primjer proračuna eksperimentalne koncentracije:

B_{mix}:

$\bar{A}_{458\text{ nm}} = 0{,}0065$

$$c_{\text{eksperimentalna}} = \frac{A - 0{,}0007}{3413{,}1} = \frac{0{,}0065 - 0{,}0007}{3413{,}1} = 1{,}700\times10^{-6}\,\text{mol L}^{-1}$$

Zatim slijedi izračun iskorištenja:

$$iskorištenje = \frac{c_{\text{eksperimentalna}}}{c_{\text{teorijska}}} \times 100\%$$

Bmix:

$$iskorištenje_{\text{Bmix}} = \frac{1,700 \times 10^{-6}\,\text{mol L}^{-1}}{1,845 \times 10^{-6}\,\text{mol L}^{-1}} \times 100\ \% = 92,1\ \%$$

Podaci za sve ostale uzorke također su izračunati na prethodno prikazan način, tablica 4.4.

	$\bar{A}_{458\ \text{nm}}$	c(MPG)teorijska, mol L^{-1}	c(MPG)eksperimentalna, mol L^{-1}	iskorištenje, %
Amix	0,0048	$1,230 \times 10^{-6}$	$1,190 \times 10^{-6}$	96,9
Bmix	0,0065	$1,845 \times 10^{-6}$	$1,700 \times 10^{-6}$	92,1
Cmix	0,0091	$2,460 \times 10^{-6}$	$2,450 \times 10^{-6}$	99,6
Dmix	0,0106	$3,075 \times 10^{-6}$	$2,890 \times 10^{-6}$	94,0
Emix	0,0120	$3,690 \times 10^{-6}$	$3,320 \times 10^{-6}$	90,0
Fmix	0,0048	$1,230 \times 10^{-6}$	$1,190 \times 10^{-6}$	96,9

Tablica 4.4. Prikaz rezultata ispitivanja točnosti i iskoristivosti metode.

Na temelju dobivenih rezultata vidi se da se dodavanjem otopine standarda u otopinu tablete apsorbancije i izračunate koncentracije proporcionalno povećavaju. Vrijednosti eksperimentalnih koncentracija nisu identične kao i teorijske, ali odstupanja nisu dovoljno velika da razlika bude analitički značajna. Izračunati postotci iskorištenja su analitički zadovoljavajući te ukazuju na točnost i pouzdanost korištene metode pri određivanju tiopronina iz farmaceutskih pripravaka.

4.7. Analize farmaceutskih pripravaka

Metoda slijedne analize injektiranjem korištena je za određivanje tiopronina koji je aktivna tvar u Captimer® tabletama. Priprava otopina realnih uzoraka opisana je u poglavlju 3.1. Priprava otopina.

Captimer® 100 mg tablete

Mjerenjem uzorka slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor dobivene su slijedeće vrijednosti:

Uzorak broj	A_{458nm}	$\bar{A}_{458nm}$
1.	0,0045	0,0048
2.	0,0049	
3.	0,0049	

Na temelju pravca umjeravanja dobiven je izraz za jednadžbu pravca:

$A = 3413{,}1c + 0{,}0007$

Uvrštavanjem srednje vrijednosti apsorbancije u jednadžbu pravca izračuna se koncentracija analita u uzorku:

$$c = \frac{\bar{A} - 0{,}0007}{3413{,}1} = \frac{0{,}0048 - 0{,}0007}{3413{,}1} = 1{,}201 \times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1}$$

Budući da je radna otopina pripremana razrjeđivanjem početne otopine, potrebno je izračunati koncentraciju u početnoj pripremljenoj otopini dobivenoj otapanjem jedne tablete u acetatno-fosfatno-boratnom puferu, pH = 2, i deioniziranoj vodi, ukupnog volumena 500 mL. Iz izračunate koncentracije i molarne mase tiopronina računa se masa tiopronina u jednoj tableti.

$c_2 = 1{,}201 \times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1}$

$V_2 = 10\ \text{mL}$

$V_1 = 1\ \text{mL}$

$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$

$$c_1 = \frac{c_2 \times V_2}{V_1}$$

$$c_1 = \frac{1{,}201 \times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1} \times 0{,}01\ \text{L}}{0{,}001\ \text{L}} = 1{,}201 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$$

$V'_1 = 100 \text{ mL}$

$V'_2 = 1 \text{ mL}$

$$c'_2 = \frac{c_1 \times V'_1}{V'_2}$$

$$c'_2 = \frac{1,201 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 0,1 \text{ L}}{0,001 \text{ L}} = 1,201 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$n = \frac{m}{M}$$

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

$$m = 1,201 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 0,5 \text{ L} \times 163,2 \text{ g mol}^{-1} = 0,09788 \text{ g} = 97,88 \text{ mg}$$

Uzorak	Navedeno (mg)	Korištena metoda (mg)	Standardna metoda prema farmakopeji (mg)
Captimer® tablete	100	97,88	100,10

Tablica 4.5. Prikaz rezultata

5. Rasprava

5. Rasprava

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada razvijena je analitička metoda određivanja tiopronina slijednom analizom injektiranjem (SIA) sa spektrofotometrijskim detektorom. U to spada optimizacija metode, vrednovanje metode te analiza farmaceutskog pripravka s tioproninom.

U postupku optimizacije sustava SIA optimizirani su kemijski parametri te parametri protočnog sustava: redoslijed injektiranja, protok osnovne otopine, volumen injektiranja analita, volumen injektiranja reagensa, volumen petlje zadržavanje te duljina reakcijske petlje.

Kinetička spektrofotometrijska metoda određivanja MPG-a temelji se na redoks-reakciji u kojoj MPG sudjeluje kao reducens pri čemu nastaje obojeni kompleks $[Cu(Nc)_2]^+$ čija se apsorbancija bilježi na detektoru pri 458 nm. Pri tome se kao reagens koristi kompleks bakra(II) i neokuproina. U prvoj optimizaciji ispitivalo se pri kojem omjeru bakra(II) i neokuproina se postiže najveća potpunost kemijske reakcije. Omjeri su pripravljani tako da je koncentracija bakra(II) bila konstantna te iznosila $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, a koncentracija neokuproina se mijenjala u rasponu koncentracije od $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1} do $2{,}4\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Na temelju dobivenih rezultata odabran je optimalan omjer *c* (bakar(II)) : *c* (neokuproin) = 1 : 2,4 jer je povećanjem koncentracije neokuproina postignuta veća apsorbancija i bolja ponovljivost mjerenja.

Zatim su ispitana dva različita redoslijeda injektiranja analita i reagensa. Uočeno je da se veće vrijednosti apsorbancije ostvaruju ukoliko se prvo injektira otopina reagensa (kompleks $[Cu(Nc)_2]^{2+}$), a zatim otopina analita (otopina MPG-a).

Brzina protoka osnovne otopine utječe na vrijeme odvijanja reakcije i razrjeđenje zone uzorka, a time i na visinu analitičkog signala. Optimizacijom protoka može se kontrolirati disperzija te poboljšati osjetljivost metode. Povećanjem brzine protoka osjetljivost metode se smanjuje, ali se povećava učestalost analiza te se dobivaju koncentracijski gradijenti (pikovi) užih osnovica. Potrebno je napraviti kompromis između osjetljivosti i brzine analize te odabrati protok koji će omogućavati povratak signala na osnovnu liniju. Maksimalna apsorbancija zabilježena je pri protoku 3000 μL min^{-1} koji je i odabran kao optimalan. Zbog kinetike predložene reakcije pri protocima većim od optimalnog dolazi do smanjenja zabilježenih apsorbancija. Na temelju odabrane brzine protoka može se odrediti i učestalost analiza. To je bitan parametar za procjenjivanje ekonomičnosti metode. S obzirom na to da je za mjerenje apsorbancije jednog uzorka u triplikatu potrebno oko 150 sekundi izračunato je da je pri protoku od 3000 μL min^{-1} učestalost analiza oko 24 analize u satu (za vrijednost apsorbancije uzorka uzima se srednja vrijednost tri izmjerene apsorbancije tog uzorka).

Slijedeći je ispitivan optimalan volumen injektiranja reagensa. Za odabir optimalnog volumena injektiranja otopine reagensa ispitivani su volumeni u rasponu od 50 do 450 μL te je uočen porast apsorbancije s povećavanjem volumena injektiranja. Apsorbancija je maksimalna kada je volumen injektiranja 150 μL, te je taj volumen odabran kao optimalan.

Optimizacija volumena injektiranja standardne otopine MPG-a kontrolira udio analita koji ulazi u kemijsku reakciju. Povećavanjem volumena injektiranja standardne otopine u pravilu se povećava i analitički signal. Utjecaj volumena injektiranja otopine analita (MPG-a) ispitan je korištenjem volumena u rasponu od 50 do 450 μL. Povećavanjem volumena značajno se povećavao i analitički signal, ali za vrijednosti iznad 200 μL bilo je potrebno više vremena za povratak na baznu liniju što smanjuje učestalost analiza. Također nije bio ostvaren potpuni povratak na baznu liniju. Stoga je volumen od 200 μL odabran kao optimalan.

Zatim je uspoređen utjecaj dvaju volumena petlje zadržavanja (500 μL i 1000 μL) na osjetljivost metode. Zbroj volumena injektiranja standarda i reagensa ne smije biti veći od volumena petlje zadržavanja kako ne bi došlo do izlijevanja iz sustava u otpad. U ovom slučaju taj zbroj iznosi 350 μL (150 μL + 200 μL). Pri volumenu petlje zadržavanja 500 μL zabilježena je veća vrijednost apsorbancije te je ona odabrana kao optimalna i korištena za daljnja mjerenja.

Duljina reakcijske petlje utječe na vrijeme odvijanja reakcije između analita i reagensa. Što je reakcijska petlja duža to je veća potpunost reakcije i veća osjetljivost metode. Ako je petlja prekratka, reakcija se neće odviti do kraja i zone se neće u potpunosti izmiješati te će ponovljivost biti lošija. Ako je reakcijska petlja preduga, reakcija će se odviti prije nego dođe do detektora te će doći do prevelikog raspršenja i razrjeđenja produkta. Za optimizaciju duljine reakcijske petlje korištene su petlje duljina 30, 50, 70, 100 i 120 cm, odnosno volumeni 120, 200, 280, 400 i 500 μL. Najveća vrijedost apsorbancije zabilježena je kod reakcijske petlje duljine 70 cm (volumena 280 μL). Vrijednost apsorbancije opada kako se povećava duljina reakcijske petlje. Stoga je kao optimalna odabrana reakcijska petlja duljine 70 cm.

Nakon optimizacije protočnog sustava mjerenjem signala niza standardnih otopina analita izrađena je krivulja umjeravanja za područje koncentracija MPG-a od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1} te je utvrđeno linearno dinamičko područje. Zatim je linearnom regresijskom analizom odnosa visine vrha (apsorbancije) i koncentracije MPG-a, za 12 vrijednosti apsorbancije i koncentracije, dobivena jednadžba pravca: $y = 3413{,}1\ x + 0{,}0007$, s vrijednosti koeficijenta linearne regresije $R^2 = 0{,}9997$.

Na temelju vrijednosti standardne devijacije slijepe probe te nagiba krivulje preko jednadžbi (7) i (8) izračunate su granica dokazivanja koja iznosi 2×10^{-7} mol L^{-1} i granica određivanja koja iznosi 6×10^{-7} mol L^{-1}. Donja granica linearnog dinamičkog područja (6×10^{-7} mol L^{-1}) u skladu je s granicom određivanja.

Prilikom postupka vrednovanja metode ispitan je utjecaj interferencija, prenošenje signala, ponovljivost te točnost.

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija određenih interferirajućih tvari; glukoze, fruktoze, KNO_3, H_3BO_3, laktoze, saharoze, Na_2SO_4, Na-citrat dihidrata, aspirina, limunske kiseline i vinske kiseline. Granica tolerancije interferirajućih tvari definirana je kao koncentracija stranog iona ili tvari koja će izazvati pogrešku manju od ±5 % pri određivanju MPG-a. Interferirajuće tvari ispitane su u omjeru koncentracije 500 puta veće u odnosu na koncentraciju MPG-a pri čemu su samo laktoza i vinska kiselina uzrokovale pogrešku veću od ±5 % te postaju tolerantne tek u molarnom omjeru prema MPG-u 250 : 1. Aspirin (acetilsalicilna kiselina) je jedini pripravljen u omjerima koncentracije 1 : 1 i 0,5 : 1 te je u obje koncentracije pokazao odstupanja od granice tolerancije. Važno je napomenuti da su ispitivane koncentracije interferirajućih vrsta značajno veće od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima. Nadalje, vrlo niska granica određivanja omogućuje smanjenje utjecaja interferencija već samim znatnim razrjeđenjem otopine uzorka.

Zatim je promatrano prenošenje signala. Ispitivan je utjecaj injektiranja uzoraka različitih koncentracija analita (c_1(MPG) = $2{,}0\times10^{-6}$ mol L^{-1}, c_2(MPG) = $8{,}0\times10^{-6}$ mol L^{-1}, c_3(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}) jednog za drugim (bez ispiranja između) na visinu signala i povratak na baznu liniju. Primjenom optimizirane metode ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije tiopronina. Uz to nije primijećen ni pomak bazne linije.

Ponovljivost signala promatra se kako bi se utvrdila preciznost metode u uvjetima – isti analitičar, isti uzorak, isti mjerni sustav, isti radni uvjeti i kratko vremensko razdoblje. Uzastopno je injektirano 10 uzoraka standardne otopine tiopronina koncentracije c(MPG) = $4{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}. Dobiveni signali imaju relativno standardno odstupanje 2,24 % što ukazuje na to da je preciznost metode zadovoljavajuća.

Točnost metode provjerena je ispitivanjem iskoristivosti (iscrpka), dodajući poznate količine tiopronina u otopinu uzorka tablete prije analize. Na taj način pripravljene su otopine teoretskih koncentracija tiopronina od $1{,}230\times10^{-6}$ mol L^{-1} do $3{,}690\times10^{-6}$ mol L^{-1} te im je izmjerena apsorbancija. Vrijednosti koncentracija izračunatih iz izmjerenih apsorbancija uspoređene su s teoretskim koncentracijama računanjem postotka iskoristivosti. Izmjerene apsorbancije, teorijske i eksperimentalne koncentracije, kao i izračunata iskorištenja, prikazani su u tablici 4.4. Uočljivo je da se dodavanjem otopine standarda apsorbancije i izračunate koncentracije proporcionalno povećavaju. Izračunati postotci iskorištenja su analitički zadovoljavajući te ukazuju na točnost i pouzdanost korištene metode.

Razvijena metoda primijenjena je na određivanje količine MPG-a u farmaceutskom pripravku Captimer® 100 mg tablete. Nakon 3 mjerenja dobivena je srednja vrijednost apsorbancije 0,0048. Iz vrijednosti apsorbancije preko jednadžbe pravca izračunata je koncentracija MPG-a u uzorku te je iznosila $1{,}201\times10^{-6}$ mol L^{-1}. Zatim je preko nje izračunata koncentracija MPG-a u početnoj pripremljenoj otopini dobivenoj otapanjem jedne Captimer® tablete, te je preko molarne mase MPG-a dobivena masa MPG-a u jednoj tableti, 97,88 mg. Za usporedbu dobivenih rezultata potrebno je odrediti masu MPG-a u tableti i poredbenom metodom. Budući da nijedna farmakopeja ne sadrži monografiju za tiopronin ispitivao se po monografiji za njemu sličan tiolni spoj iste molekulske mase, N-acetil-cistein, NAC, jodometrijskom titracijom. Priprava otopina i postupak opisani su u poglavljima 3.1. i 3.2. te je dobivena masa MPG-a u jednoj tableti 100,10 mg. Rezultati prikazani u tablici 4.5. pokazuju dobro slaganje rezultata mjerenja predloženom slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor sa jodometrijskom metodom. Vrijeme potrebno za jednu analizu slijednom analizom injektiranjem je oko 1 minutu po analizi, a utrošak analita je 200 μL te reagensa 150 μL po analizi. Kod jodometrijske titracije vrijeme potrebno za analizu je oko 5 minuta po titraciji, a utrošak reagensa te analita je oko 20 mL. Na temelju toga može se zaključiti da je metoda korištena u ovom istraživanju ekonomski isplativija od farmakopejske. Nadalje, jodometrijska titracija nije osjetljiva te se uzorak neznatno razrjeđuje. Stoga interferencije zaostaju u ispitivanoj otopini u značajnim koncentracijama te mogu utjecati na rezultate, što je nedostatak farmakopejskog određivanja.

6. Zaključak

6. Zaključak

Cilj istraživanja prikazanog u ovom radu je razvoj i vrednovanje analitičke metode određivanja *N*-2-merkaptopropionil-glicina (tiopronina, MPG) u farmaceutskom pripravku. U tu svrhu korištena je analitička tehnika slijedna analiza injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Predložena metoda zasniva se na redoks-reakciji u kojoj RSH spoj tiopronin reducira zeleni $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kompleks u narančasto-žuti $[Cu(Nc)_2]^{+}$ kompleks, koji apsorpcijski maksimum postiže pri valnoj duljini λ = 458 nm te se njegova apsorbancija mjeri na spektrofotometrijskom detektoru.

Prvi dio optimizacije bio je određivanje optimalnog omjera bakra(II) i neokuproina u reagensu. Odabran je optimalan omjer *c* (bakar(II)) : *c* (neokuproin) = 1 : 2,4. Zatim su optimizirani parametri protočnog sustava i odabrane optimalne vrijednosti: redoslijed injektiranja (prvo se injektira reagens, potom analit), protok osnovne otopine (3000 μL min^{-1}), volumen injektiranja reagensa (150 μL), volumen injektiranja analita (200 μL), duljina odnosno volumen reakcijske petlje (70 cm, 280 μL) te volumen petlje zadržavanje (500 μL).

Pripravljeno je 12 različitih koncentracija standarda te određeno linearno dinamičko područje u rasponu od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1} koje je definirano jednadžbom pravca $y = 3413{,}1x + 0{,}0007$ uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0{,}9997$ te ostvarena izvrsna linearnost.

Granica dokazivanja iznosila je 2×10^{-7} mol L^{-1}, dok je granica određivanja iznosila 6×10^{-7} mol L^{-1}.

Prilikom vrednovanja metode ispitan je utjecaj interferencija. Uobičajene interferirajuće tvari, osim acetilsalicilne kiseline, ne moraju se uklanjati jer ne predstavljaju smetnju kod određivanja MPG-a predstavljenom metodom. Vinska kiselina i laktoza zbog mogućeg snažnog redukcijskog djelovanja postaju tolerantne tek u molarnom omjeru prema MPG-u 250 : 1. Acetilsalicilna kiselina je pokazala interferirajuća svojstva u svim ispitanim omjerima.

U svrhu vrednovanja još je ispitano i prenošenje signala (nema prenošenja), ponovljivost signala (RSD = 2,24 %) te točnost i iskoristivost metode (zadovoljavajuća). Učestalost analiza je oko 24 uzorka u triplikatu po satu (za vrijednost apsorbancije uzorka uzima se srednja vrijednost tri izmjerene apsorbancije tog uzorka).

Optimizirana metoda uspješno se može primjenjivati za određivanje sadržaja MPG-a u farmaceutskim pripravcima, pri čemu pokazuje zadovoljavajuće rezultate.

7. Popis citirane literature

7. Popis citirane literature

[1] Ruzicka J, Hansen EH. Flow injection analysis: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Anal Chim Acta 1975;78:145-157.

[2] Ruzicka J, Marshall GD. Sequential injection: A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. Anal Chim Acta 1990;237:329-343.

[3] Solich P, Polašek M, Klimundova J, Ruzicka J. Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. Trends Analyt Chem 2003;22:7.

[4] Assubaie FN. Employing sequential injection analysis technique and chemometric optimization approach for developing diltiazem assay method. Food Drug Analys J 2009;17:408-414.

[5] Drug Bank [Internet]. Drug & Drug Target Database; Canada [citirano 17.8.2016.]. Dostupno na: http://www.drugbank.ca/drugs/DB06823.

[6] Domingo JL. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. Reprod Toxicol 1995;9:105-113.

[7] Knoll T, Zöllner A, Wendt-Nordahl G, Michel MS, Alken P. Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up. Pediatr Nephrol 2005;20:19-24.

[8] Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Med J 2004;45:776-788.

[9] Carratù L. Clinico-functional and rheological research on mucolytic activity of thiopronine in chronic broncho-pneumopathies. Curr Ther Res 1982;32:529-43.

[10] The Merck Indeks [Internet], Merck Research Laboratories; New York; 1996. Dostupno na: https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10879/tiopronin?q=unauthorize.

[11] Sugiura Y, Hirayama Y. Structural and electronic effects on complex formation of copper(II) and nickel(II) with sulfhydryl-containing peptides. Inorg Chem 1976;15:679-682.

[12] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 10.9.2016.]. Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5483.

[13] Carlsson MS. Pharmacokinetics of oral tiopronin. Eur J Clin Pharmacol 1993;45:79-84.

[14] Brayfield A. Martindale: The Complete Drug Reference. 38th ed. London: Pharmaceutical Press; 2014.

[15] Drugs.com [Internet]. The Drugside Trust; Auckland; New Zealand [citirano 8.8.2016.]. Dostupno na: https://www.drugs.com/cdi/tiopronin.html.

[16] Pak CYC. Management of cystine nephrolithiasis with alpha- mercaptopropionylglycine. J Urol 1986;136:1003-8.

[17] Genetics Home Reference [Internet]. U.S. National Library of Medicine [citirano 13.9.2016.]. Dostupno na: http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cystinuria.

[18] Lindell A, Denneberg T. Clinical course and cystine stone formation during tiopronin treatment. Urol Res 1995;23:111-117.

[19] Costantini D. Evaluation of the therapeutic effectiveness of thiopronine in children with cystic fibrosis. Curr Ther Res 1982; 31:714-17.

[20] Shale DJ, Ionescu AA. Mucus hypersecretion: a common symptom, a common mechanism? Eur Respir J 2004;23:797-798.

[21] Delecoeuillerie G. Tolerability and therapeutic maintenance of tiopronin, new basic treatment of rheumatoid arthritis. Apropos of long-term follow-up of 268 cases. Rev Rhum Mal Osteoartic 1989;56:38-42.

[22] Ferraccioli GF. Long-term outcome with gold thiosulphate and tiopronin in 200 rheumatoid patients. Clin Exp Rheumatol 1989;7:577-81.

[23] Pasero G, Pellegrini P. Controlled multicenter trial of tiopronin and d-penicillamine for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1982;25:923-9.

[24] Garner A, Jamal Z, Slater TF. Effects of 2-mercaptopropionyl glycine on radiation-induced lipid peroxidation in liposomes and in rat liver microsomal suspensions. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1986;50:323-335.

[25] Ayene SI, Kale RK, Srivastava PN. Radioprotective effect of 2-mercaptopropionyl glycine on radiation induced lipid peroxidation and enzyme release of erythrocytes. Internat J Radiat Biol 1988;53:629-639.

[26] Tanonaka K, Iwai T, Motegi K, Takeo S. Effects of *N*-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic–reperfused heart. Cardiovasc Res 2003;57:416-425.

[27] Fuchs J, Zimmer G. NMR spectroscopic studies and mitochondrial investigations on the cardioprotective efficiency of 2-mercaptopropionyl glycine. Biochem Pharmacol 1986;35:4381-4385.

[28] Ayene IS, Al-Mehdi AB, Fisher AB. Inhibition of lung tissue oxidation during ischemia/reperfusion by 2-mercaptopropionylglycine. Arch Biochem Biophys 1993;303:307-312.

[29] Abdo EE, Cunha JEM, Deluca P, Coelho AMM, Bacchella T, Machado MCC. Protective effect of *N*-2-mercaptopropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. Arq Gastroenterol 2003;40:177-180.

[30] Kim GH, Kellner CP. A phase I clinical trial of tiopronin, a putative neuroprotective agent, in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery 2010;67:182-186.

[31] Carlsson MS. Pharmacokinetics of intravenous 2-mercaptopropionylglycine in man. Eur J Clin Pharmacol 1990;38:499-503.

[32] Thiola® (tiopronin) tablets [Internet]. Retrophin Inc: USA; 2016; Mission Pharmacal Company. Dostupno na: http://www.thiola.com.

[33] Corda C. Thiopronin-induced agranulocytosis. Therapie 1990;45:161.

[34] Taillan B. Aplasie médullaire au cours d'une polyarthrite rhumatoïde traitée par tiopronine. Rev Rhum 1990;57:443-4.

[35] Kurumaji Y, Miyazaki K. Tiopronin-induced lichenoid eruption in a patient with liver disease and positive patch test reaction to drugs with sulfhydryl group. J Dermatol 1990;17:176-81.

[36] Trotta F. Thiopronine-induced pemphigus vulgaris in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1984;13:93-5.

[37] Verdier-Sevrain S. Thiopronine-induced herpetiform pemphigus: report of a case studied by immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. Br J Dermatol 1994;130:238-40.

[38] Lindell A. Membranous glomerulonephritis induced by 2-mercaptopropionylglycine (2-MPG). Clin Nephrol 1990;4:108-15.

[39] Kukoč Modun L, Radić Nj. Potentiometric determination of *N*-(2–Mercaptopropionyl)-glycine using an electrode with AgI-based membrane. Croat Chem Acta 2006;79:533-539.

[40] Raggi MA, Cavrini V, Di Pietra AM. Colorimetric determination of acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms. J Pharm Sci 1982;71:1384-1386.

[41] Raggi MA, Nobile L, Cavrini V, Di Pietra AM. Spectrophotometric analysis of D-penicillamine and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical formulations with ammonium tetrachloropalladate. Boll Chim Farm 1986;125:295-297.

[42] Li Q, Gao L. Spectrophotometric determination of tiopronin using its catalytic reaction between sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and hydroxyl ion. Anal Sci 2009;25:89-93.

[43] Zhang YP, Li QM, Zhao XH, Liu GG. The study of indirect determination of tiopronin by extraction flotation copper(II) with an ammonium sulfate-water-n-propyl alcohol system. J Chinese Chem Soc 2007;54:743-748.

[44] Vinas P, Cordoba MH, Sanchez-Pedrenot C. Catalytic titration of *N*-penicillamine, *N*-acetylcysteine, cysteine and 2-mercaptopropionylglycine. Analyst 1990;115:757-760.

[45] Garcia MS, Sanchez-Pedreno C, Albero MI, Rodenas V. Determination of penicillamine or tiopronin in pharmaceutical preparations by flow injection analysis. J Pharm Biomed Anal 1993;11:633-638.

[46] Siangproh W, Wangfuengkanagul N, Chailapakul O. Electrochemical oxidation of tiopronin at diamond film electrodes and its determination by amperometric flow injection analysis. Anal Chim Acta 2003;499:183-189.

[47] Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Tomas V, Sidrach-de-Cardona C. Flow-injection fluorimetric determination of penicillamine and tiopronin in pharmaceutical preparations. J Pharm Biomed Anal 1996;15:33-38.

[48] Viñas P, Lopez Garcia I, Martinez Gil JA. Determination of thiol-containing drugs by chemiluminescence-flow injection analysis. J Pharm Biomed Anal 1993;11:15-20.

[49] European Pharmacopoeia. 6th ed. Nordlingen: Council of Europe; 2008: 1100-1101.

[50] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. 1st ed. Zagreb: Školska knjiga; 2016.

[51] Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb: Školska knjiga; 1999.

[52] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0. USA: The McGraw-Hill Companies; 2009.

[53] Tzanavaras PD. Sequential injection analysis: A useful analytical tool in drug dissolution testing. Pharmaceut Anal Acta 2012;3:5.

[54] Global FIA, Inc [Internet]. Fox Island: Washington [citirano 1.9.2016.]. Dostupno na: http://www.globalfia.com/tutorials/lesson-7-sequential-injection-analysis-.

[55] FIAlab® [Internet]. FIAlab Instruments Inc: Seattle; USA [citirano 1.9.2016.]. Dostupno na: http://flowinjection.com.

[56] Flow injection analysis [Internet]. Database by Hansen EH. [citirano 1.9.2016.]
Dostupno na:
http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.0%20Sequential%20Injection.html.

[57] Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. New York: W. H. Freeman and Company; 2003.

[58] 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;86:65-71.

[59] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; US [citirano 17.9.2016.]. Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65236.

[60] Beitollahi H, Raoof JB, Hosseinzadeh R. Fabrication of a nanostructure-based electrochemical sensor for simultaneous determination of *N*-acetylcysteine and acetaminophen. Talanta 2011;85:2128-2134.

8. Sažetak

8. Sažetak

RAZVOJ I VREDNOVANJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA TIOPRONINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM

Korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja tiopronina (*N*-2-merkaptopropionil-glicina) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks-reakciji između bis neokuproin bakrovog(II) kompleksa i tiopronina pri čemu nastaje bis neokuproin bakrov(I) obojeni kompleks, žuto-narančaste boje. Nastali kompleks pokazuje apsorpcijski maksimum pri λ = 458 nm. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni parametri protočnog sustava te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja čijom je regresijskom analizom utvrđena jednadžba pravca: y = 3413,1 x + 0,0007. Postignuta je linearnost u području koncentracija analita od 6×10^{-7} mol L^{-1} do 8×10^{-5} mol L^{-1}. Određene su granica dokazivanja (2×10^{-7} mol L^{-1}) i granica određivanja (6×10^{-7} mol L^{-1}). Provedeno je vrednovanje metode te je provjereno prenošenje signala, ponovljivost signala, točnost i iskoristivost metode. Osim acetilsalicilne kiseline i visokih koncentracija vinske kiseline i laktoze, tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju. Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja tiopronina u farmaceutskom pripravku što je uspoređeno s rezultatima dobivenim farmakopejskom metodom.

9. Summary

9. Summary

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SEQUENTIAL INJECTION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TIOPRONIN IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

By using sequetial injection analysis with spectrophotometric detector a novel procedure was optimized and validated for the determination of tiopronin (*N*-2-Mercaptopropionyl-glycine, MPG) in pharmaceutical formulations. The method is based on a redox reaction in which the reduction of copper(II) - neocuproine by MPG occurs, with formation of colored, yellow-orange complex of copper(I) - neocuproine. The resulting complex exhibits an absorption maximum at λ = 458 nm. Univariate method was used to select optimal parameters of the flow system. As a result the calibration curve was plotted and using the regression analysis the equation: $y = 3413{,}1\ x + 0{,}0007$ was determined. The linearity in the concentration range of the analyte from 6×10^{-7} mol L^{-1} to 8×10^{-5} mol L^{-1} was achieved with that. The calculated limit of detection is 2×10^{-7} mol L^{-1} and the limit of quantification is 6×10^{-7} mol L^{-1}. Validation of the method included evaluating carryover, signal repeatability and recovery (accuracy and efficiency of the method). Besides aspirin, and high concentrations of lactose and tartaric acid, substances that are normally present in the composition of the pharmaceutical formulations do not interfere. The proposed method was successfully applied for the determination of MPG in its pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the pharmacopoeia method.

Životopis

Željana Leskur rođena je 6. srpnja 1992. u Splitu. U lipnju 2007. godine s odličnim uspjehom završila je osnovnu školu „Vjekoslav Parać“ u Solinu, a u lipnju 2011. godine s odličnim uspjehom završila je opću gimnaziju „Marko Marulić“ u Splitu.

Od 2011. godine do 2016. godine studentica je na sveučilištu u Splitu, pri Kemijsko-tehnološkom i Medicinskom fakultetu, gdje pohađa integrirani studij farmacije. 2016. godine radi na fakultetu kao demonstrator laboratorijskih vježbi iz predmeta „Biokemija lijekova“. Od ožujka 2016. do rujna 2016. obavlja stručno osposobljavanje koje obuhvaća rad u javnoj ljekarni, analitičkom laboratoriju, bolničkoj ljekarni i galenskom laboratoriju, te polaže stručni ispit.

U lipnju 2016. godine dospjela je među finaliste natjecanja u kliničkim vještinama koje se održavalo na Medicinskom fakultetu. Tijekom studiranja sudjelovala je u brojnim aktivnostima humanitarnog i edukacijskog karaktera u sklopu Hrvatske udruge studenata farmacije (CPSA). Također je bila sudionik organizacijskog tima na konferenciji "Life-long learning experience" te u Ljetnoj školi kliničke farmacije koje su se održavale u Splitu 2016. godine.