Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje N-acetil-L-cistein-etil estera: razvoj i vrednovanje metode

Bitanga, Ana

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:167:254235

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

KINETIČKO SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEIN-ETIL ESTERA. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE.

DIPLOMSKI RAD

ANA BITANGA

48

SPLIT, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

KINETIČKO SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEIN-ETIL ESTERA. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE.

DIPLOMSKI RAD

ANA BITANGA

48

SPLIT, srpanj 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY PROGRAMME IN CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

KINETIC SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF *N*-ACETYLCYSTEINE ETHYL ESTER. METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION.

MASTER THESIS

ANA BITANGA

48

SPLIT, July 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko–tehnološki fakultet u Splitu
Studij diplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjedinci Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Pomoć pri izradi: mag. ing. chem. ing. Maja Biočić

KINETIČKO SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEIN-ETIL ESTERA. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE.

Ana Bitanga
48

Sažetak:

Cilj istraživanja koje je prikazano u ovom radu je razvoj i vrednovanje kinetičke metode analize *N*-acetil-L-cistein-etil estera (NACET) uz spektrofotometrijski detektor. Opisana kinetička metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj NACET reducira $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ kompleks zelene boje u $[Cu(BCA)_2]^{+}$ ljubičasto obojan kompleks čiji se apsorpcijski maksimum bilježi na 562 nm. Optimizirani su parametri kemijske reakcije te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja čijom je regresijskom analizom utvrđena jednadžba pravca: $y = 5991{,}8\ x + 0{,}00235$. Postignuta je linearnost u području koncentracija od $6{,}0 \times 10^{-7}$ do $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}, te su određene granica dokazivanja $1{,}60 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} i granica određivanja $5{,}45 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Ispitan je i utjecaj pojedinih interferencija na NACET te nije zamijećen nikakav značajan utjecaj na određivanje analita.

Ključne riječi: kinetičko određivanje, spektrofotometrijski detektor, *N*-acetil-L-cistein-etil ester (NACET), bicikoninska kiselina (BCA)
Rad sadrži: 54 stranica, 30 slika, 5 tablica, 0 priloga, 12 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Mila Radan - predsjednica
2. doc.dr.sc. Maša Buljac- član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun -član-mentor

Datum obrane: 12.07.2016.
Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Nature Science
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.
Mentor: Lea Kukoč Modun, assistant prof. PhD
Technical assistance: Maja Biočić, mag. ing. chem. ing.

KINETIC SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF *N*-ACETYLCISTEINE ETHYL ESTER. METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION.

Ana Bitanga

48

Abstract:

The main goal of this research is development and validation of kinetic method for the determination of *N*-Acetylcysteine-ethyl ester (NACET) with spectrophotometric detector. Described kinetic method is based on the redox reaction where NACET reduced $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ green complex to the purple $[Cu(BCA)_2]^{+}$ complex with absorption maximum at 562 nm. The parameters of chemical reaction have been optimized and the calibration curve was constructed. Linear dynamic range was from 6,0 x 10^{-7} to 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, with equation direction $y = 5991{,}8\ x + 0{,}00235$. Limit of detection and limit of quantification were found to be 1,60 x 10^{-7} mol L^{-1} and 5,45 x 10^{-7} mol L^{-1}. Impact of certain interferences has been examined and any significant impact on the determination of an analyte has not been noticed.

Keywoeds:kinetic determinatuon, spectrophotometric detector, *N*-Acetylcysteine ethyl ester (NACET), Bicinchonic Acid (BCA)
Thesis contains: 54 pages, 30 figures, 5 tables, 0 supplements, 12 references
Original in: Croatian
Defence committee

1. Mila Radan, PhD, assistant prof. - chairperson
2. Maša Buljac, PhD, assistant prof. - member
3. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant prof. - supervisor

Defence date: July 12. 2016.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Lee Kukoč Modun, uz voditeljstvo mag. ing. chem. ing. Maje Biočić, u vremenskom razdoblju od listopada 2015. godine do siječnja 2016. godine.

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u realizaciji ovoga rada. Posebno hvala mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun i mag. ing. chem. ing. Maji Biočić na strpljenju, stručnoj pomoći i svim savjetima koje su mi pružile tokom izrade ovoga diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori i ohrabrenju.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razvoj i vrednovanje metode određivanja *N*-acetil-L-cistein-etil estera (NACET-a) kinetičkom analizom uz spektrofotometrijski detektor. Optimizacija metode uključuje optimizaciju reakcijskih uvjeta:

1. temperature sustava;
2. pH vrijednosti;
3. omjera koncentracija Cu^{2+} i NACET;
4. omjera koncentracija Cu^{2+} i BCA;
5. omjera koncentracija BCA i NACET.

Korištenjem optimiziranih parametara kemijske reakcije potrebno je odrediti i analitičke karakteristike razvijene metode:

a) područje djelovanja Beerovog zakona (linearno dinamičko područje-LDP);
b) jednadžbu regresijskog pravca (odsječak i nagib);
c) koeficijent linearne regresije R^2;
d) granicu dokazivanja;
e) granicu određivanja.

SAŽETAK:

Cilj istraživanja koje je prikazano u ovom radu je razvoj i vrednovanje kinetičke metode analize *N*-acetil-L-cistein-etil estera (NACET) uz spektrofotometrijski detektor. Opisana kinetička metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj NACET reducira $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ kompleks zelene boje u $[Cu(BCA)_2]^{+}$ ljubičasto obojan kompleks čiji se apsorpcijski maksimum bilježi na 562 nm. Optimizirani su parametri kemijske reakcije te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja čijom je regresijskom analizom utvrđena jednadžba pravca: $y = 5991{,}8\ x + 0{,}00235$. Postignuta je linearnost u području koncentracija od $6{,}0 \times 10^{-7}$ do $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}, te su određene granica dokazivanja $1{,}60 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} i granica određivanja $5{,}45 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Ispitan je i utjecaj pojedinih interferencija na NACET te nije zamijećen nikakav značajan utjecaj na određivanje analita.

Ključne riječi: kinetičko određivanje, spektrofotometrijski detektor, *N*- acetil-L-cistein-etil ester (NACET), Bicikoninska kiselina (BCA)

SUMMARY:

The main goal of this research is development and validation of kinetic method for the determination of *N*-Acetylcysteine-ethyl ester (NACET) with spectrophotometric detector. Described kinetic method is based on the redox reaction where NACET reduced $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ green complex to the purple $[Cu(BCA)_2]^{+}$ complex with absorption maximum at 562 nm. The parameters of chemical reaction have been optimized and the calibration curve was constructed. Linear dynamic range was from 6,0 x 10^{-7} to 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, with equation direction $y = 5991{,}8\ x + 0{,}00235$. Limit of detection and limit of quantification were found to be 1,60 x 10^{-7} mol L^{-1} and 5,45 x 10^{-7} mol L^{-1}. Impact of certain interferences has been examined and any significant impact on the determination of an analyte has not been noticed.

Keywords: kinetic determination, spectrophotometric detector, *N* -Acetylcysteine ethyl ester (NACET), Bicinchoninic Acid (BCA)

Sadržaj:

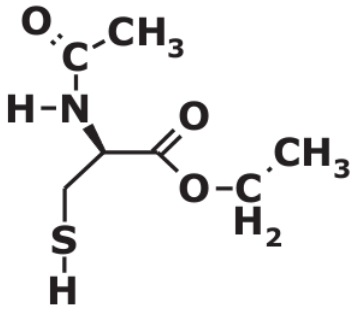
UVOD 1
1. OPĆI DIO 3
1.1. Kinetičke metode analize 3
1.1.1. Zakon brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda 5
1.1.2. Određivanje brzine reakcije 6
1.1.3. Vrste kinetičkih metoda 6
1.1.3.1. Diferencijalne metode 6
1.1.3.2. Integralne metode 8
1.1.3.2.1. Metoda određenog vremena 8
1.1.3.2.2. Metoda početne brzine 8
1.1.4. Instrumentacija kod kinetičkih određivanja 9
1.1.5. Vrednovanje kinetičkih metoda 13
1.2. Spektroskopija 15
1.2.1. Uvod u spektroskopske tehnike 15
1.2.1.1. Elektromagnetski spektar 15
1.2.2. Apsorpcija zračenja 16
1.2.2.1. Beerov zakon: odnos između apsorbancije i koncentracije 18
1.2.2.2. Ograničenja Beerovog zakona 20
1.2.3. Molekulska apsorpcijska spektrosokopija 21
1.2.3.1. Spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo zračenje 21
2. EKSPERIMENTALNI DIO 25
2.1. Materijali 25
2.1.1. Priprava otopina 25
2.1.1.1. Deionizirana voda 25
2.1.1.2. Otopina karbonatnog pufera 25
2.1.1.3. Otopina fosfatnog pufera 25
2.1.1.4. Otopina bicikoninske kiseline (BCA) 25
2.1.1.5. Otopina Cu^{2+} 26
2.1.1.6. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera 26
2.1.1.7. Otopina *N*-acetil-L-cistein-etil estera 26

2.2. Instrumenti i uređaji 27
2.2.1. Uređaji za spektrofotometrijsko mjerenje 27
2.2.2. Ostali uređaji i oprema 29
2.3. Metoda rada 30
2.3.1. Kinetička spektrofotometrija 30
3. REZULTATI I RASPRAVA 32
3.1. Optimizacija metode 32
3.1.1. Utjecaj temperature 33
3.1.2. Optimizacija pH vrijednosti 35
3.1.3. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i BCA 37
3.1.4. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i NACET 39
3.1.5. Optimizacija omjera koncentracija BCA i NACET 42
3.1.6. Optimizirani uvjeti 45
3.2. Linearno dinamičko područje 46
3.2.1. Granica dokazivanja i granica određivanja 47
3.3. Utjecaj interferencija 49
4. ZAKLJUČAK 51
5.LITERATURA 53

UVOD

N-acetil-L-cistein-etil ester (NACET) lipofilni je kemijski spoj sa izrazitim antioksidacijskim potencijalom. Njegova molekulska formula je $C_7H_{13}NO_3S$ i molarna masa $M = 191{,}20$ g mol^{-1}.

Strukturna formula NACET-a prikazana je na slici 1.

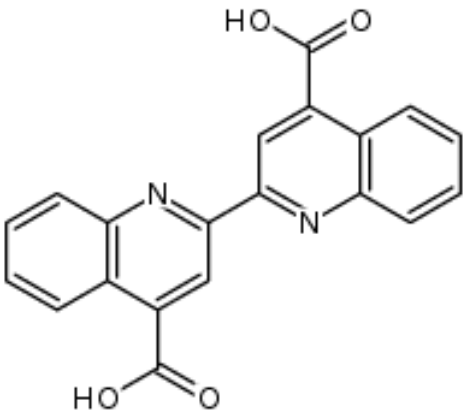


Slika 1. Molekulska struktura *N*-acetil-L-cistein-etil estera.

Etilni ester, *N*-acetil-L-cistein-etil ester, se brzo apsorbira u organizmu nakon oralnog uzimanja dok mu je koncentracija u plazmi jako niska. To je posljedica velike brzine ulaska u stanicu, gdje ostaje zarobljen nakon prevođenja u *N*-acetilcistein (NAC) i cistein (Cys). Nakon oralnog uzimanja NACET-a povećava se sadržaj glutationa u većini tkiva uključujući mozak. Glutation služi za inaktivaciju štetnog metabolita nastalog u slučajevima predoziranja paracetamolom, te zbog navedenog NACET štiti od trovanja paracetamolom. NACET također ima sposobnost akumulacije u eritrocitima gdje služi kao potencijalna zaštita od oksidativnih oštećenja izazvanih peroksidima.[1]

Reagens koji se u ovom radu koristi za određivanje NACET-a je bicikoninska kiselina (BCA). Molekulska formula BCA je $C_{20}H_{12}N_2O_4$ i molarna masa je $M = 344{,}33$ g mol^{-1}. Po IUPAC-u BCA je 4,4′-dikarboksi-2,2′-bikinolin.

Strukturna formula BCA je prikazana na slici 2.



Slika 2. Molekulska struktura bicikoninske kiseline.

BCA test je kolorimetrijska metoda koje se uobičajeno koristi za određivanje koncentracije proteina u uzorku. Razina proteina se mjeri pomoću stvaranja ljubičastog kompleksa, $[Cu(BCA)_2]^+$, čija se apsorbancija očitava pri valnoj duljini od 562 nm.[2]

Iako BCA pokazuje jedinstvenu značajku, njegovo korištenje kao kvantitativnog reagensa za određivanje bakra u biološkim uzorcima nije u potpunosti istraženo. Prvenstveno, BCA se koristi za analizu bakra u uzorcima rude ili za otkrivanje prisutnosti Cu^{2+} u tkivima i tekućim uzorcima.[3]

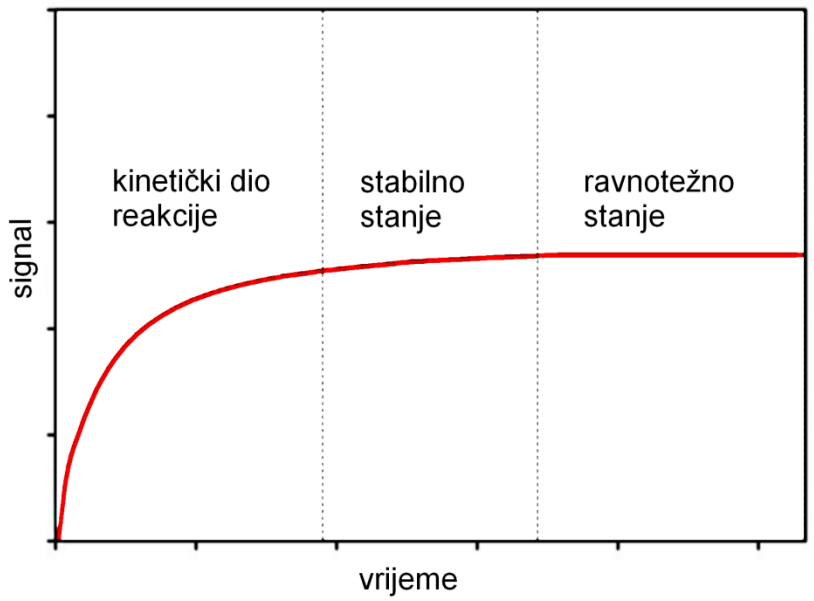
U ovom radu razvijena je i vrednovana kinetička metoda za određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera uz spektrofotometrijski detektor. Kod kinetičke spektrofotometrije u protočnom sustavu signal je bilježen u kinetičkom djelu reakcije te je korišten za daljnje analize. Ispitana je kinetika i određeni su optimalni uvjeti odvijanja kemijske reakcije.

1. OPĆI DIO

1.1. Kinetičke metode analize

Kinetičke metode se razlikuju od ravnotežnih ili termodinamičkih metoda zbog toga što se kod ravnotežnih metoda analitički signal uzorkuje u trenutcima ravnotežnog ili barem stabilnog stanja kemijske reakcije, a kod kinetičkih metoda analitički signal je određen brzinom reakcije.

Mjerenje se u kinetičkim metodama obavlja pod dinamičkim uvjetima dok kao analitički parametar služi ili nastajanje produkata ili nestajanje reaktanata. Kinetičke metode se upotrebljavaju u vremenskom intervalu u kojem se koncentracije produkata i reaktanata mijenjaju, a brzina nestajanja reaktanata i nastajanja produkata se mjeri na odgovarajući način.[4] Kod sustava pod kinetičkom kontrolom signal se mijenja s vremenom (slika 3.)



Slika 3. Ovisnost signala o proteklom vremenu za analitički sustav pod kinetičkom kontrolom.[5]

Mjerenja se u termodinamičkim metodama obavljaju u reakcijskim sustavima koji se nalaze u ravnoteži dok su tada koncentracije reaktanata i produkata konstantne s vremenom. Signal se bilježi tek nakon što kemijski sustav uđe u stanje ravnoteže te koncentracije reaktanata i produkata postanu stalne, a sukladno tome i signal postaje konstantan.[4]

Kinetičke metode su izuzetno pogodne za analizu jer mogućuju osjetljivo i selektivno određivanje u svega nekoliko minuta uz odgovarajući detektor. Velika prednost ovakvih metoda je mogućnost analiziranja uzorka bez prethodne obrade.

Selektivnost se u analitičkim metodama postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razliku u brzinama kojima analit reagira s mogućom interferencijom. U termodinamičkim metodama selektivnost se postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razlike u ravnotežnim konstantama.[6]

Svaka kemijska reakcija koja se odvija prihvatljivom brzinom može biti osnova za kinetička mjerenja. Odabrana kemijska reakcija mora zadovoljiti tri uvjeta da bi mogla poslužiti za razvoj kinetičke metode, a to su:
a) brzina kemijske reakcije - reakcija mora biti dovoljno brza da bi završila u razumnom vremenskom periodu, ali i dovoljno spora da se postigne stanje ravnoteže dok se reagensi još miješaju;
b) red reakcije - koji mora biti poznat da bi se omogućilo određivanje kinetičkih parametara kao što su brzina kemijske reakcije i koncentracija;
c) mogućnost praćenja odvijanja reakcije – treba biti ostvareno praćenjem promjene koncentracije jednog od reaktanata ili produkata kao funkcije vremena.[6]

Nužan uvjet, kod razvoja i primjene kinetičkih metoda, jest da koncentracija analita određuje brzinu odabrane reakcije.[7] Brzina reakcije je važan parametar jer reakcija mora biti dovoljno brza da se odvije u razumnom vremenskom roku ali i dovoljno spora da se stanje ravnoteže ne postigne za vrijeme miješanja reagensa.[4] Brzina je važna i kod određivanja pojedinih analita u smjesi jer je selektivno određivanje kinetičkim metodama moguće onda kada je razlika brzina reakcija analita i drugih vrsta u smjesi dovoljno velika.[8]

Tijekom kinetičkog eksperimenta treba primijeniti pouzdani način praćenja napredovanja reakcije s vremenom, odnosno praćenje promjene koncentracija reaktanata ili produkata s vremenom. Često se za taj postupak koriste potencijometrijske ili spektrofotometrijske naprave.[7]

1.1.1. Zakon brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda

Kemijske reakcije u analitici uključuju barem dvije vrste, analit i reagens. Zakon brzine za reakciju koja uključuje dvije vrste izrazito je složen i nezgodan za korištenje u kvantitativne svrhe. Jedine kemijske reakcije koje su upotrebljive su one koje omogućuju pojednostavljenje složenog zakona brzine u oblik za reakciju prvog reda.

Reakcija višeg reda koja se izvodi tako da omogućuje pojednostavljenje naziva se reakcijom pseudoprvog reda.[6]

Ako pretpostavimo da je jednostavna analitička reakcija nepovratna:

$$\mathrm{A} + \mathrm{B} \xrightarrow{k} \mathrm{P} \qquad (1)$$

te se reakcija odvija u jednom koraku uz jedinične stehiometrijske koeficijente, za pretpostaviti je da je reakcija prvog reda u odnosu na svaki od reaktanata, dok je ukupno drugog reda.[7]

Brzina je proporcionalna koncentraciji svakog reaktanta te zakon brzine glasi:

$$-\frac{\mathrm{d}[\mathrm{A}]}{\mathrm{d}t} = k \times [\mathrm{A}] \times [\mathrm{R}] \qquad (2)$$

Ako se koncentracija reaktanta R smatra puno većom od koncentracije komponente A, onda je koncentracija R praktički nepromijenjena tijekom reakcije te se izraz za brzinu reakcije može pisati:

$$k \times [R] = \mathrm{konstanta} = k' \qquad (3)$$

Kod navedenih uvjeta reakcija postaje reakcija pseudoprvog reda u odnosu na A te izraz (2) prelazi u oblik jednadžbe za reakciju prvog reda:

$$-\frac{\mathrm{dA}}{\mathrm{d}t} = k' \times [\mathrm{A}] \qquad (4)$$

Reakcije su rijetko potpuno nepovratne, a strogi opis kinetike reakcije drugog reda koja se odvija u jednom koraku uzima u obzir i povratnu reakciju. Uvjeti se moraju održavati takvima da je konstanta brzine za povratnu reakciju vrlo mala, a samim time je i brzina povratne reakcije zanemariva, čime se uvodi veoma mala pogreška pretpostavkom o ponašanju prema pseudoprvom redu.[6]

1.1.2. Određivanje brzine reakcije

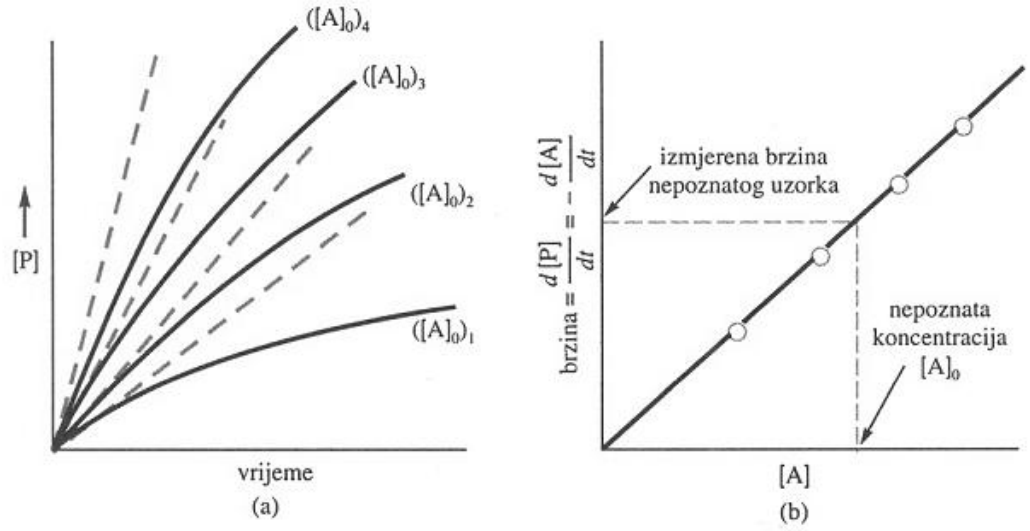
Najprikladniji način prikupljanja kinetičkih podataka je kontinuirano promatranje napredovanja reakcije pomoću spektrofotometrije, konduktometrije, potenciometrije ili neke druge instrumentne tehnike. Računalna i programska tehnologija omogućava automatsko snimanje očitanih podataka razmjerno koncentraciji reaktanata ili produkata kao funkcije vremena, te njihovo spremanje u memoriju računala i kasniju obradu.[6]

1.1.3. Vrste kinetičkih metoda

Kinetičke metode se prema vrsti odnosa koji postoji između mjerene veličine i koncentracija analita dijele na diferencijalne i integralne metode.

1.1.3.1. Diferencijalne metode

Kod diferencijalnih metoda koncentracije se računaju iz brzina reakcija pomoću diferencijalnog oblika izraza za brzinu reakcije. Brzina se određuje mjerenjem nagiba krivulje koja opisuje koncentraciju analita ili produkta kao funkciju vremena reakcije. Navedeni grafovi su prikazani na slici 4.



Slika 4. Prikaz podataka određivanja koncentracije tvari A diferencijalnom metodom: a) pune crte su prikazi promjene koncentracije produkta kao funkcije vremena za četiri početne koncentracije tvari A, isprekidane crte su tangente na krivulje kada $t \rightarrow 0$; b) grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji tvari A.[6]

Izbor vremena pri kojem se mjeri brzina reakcije temelji se na čimbenicima kao što su prikladnost, postojanje sporednih reakcija koje interferiraju te mogućnost i preciznost mjerenja u određenom vremenu. Često se brzina mjeri blizu vremena $t = 0$, zbog toga što se u tom dijelu eksponencijalne krivulje postiže linearnost, pa se može lako odrediti nagib pomoću tangente na krivulju.[6]

Kod reakcije pseudoprvog reda utroši se vrlo malo suviška reagensa tako da nema pogreške zbog promjene k koja bi se pojavila promjenom koncentracije reagensa. Relativna pogreška koncentracije reagensa je minimalna na početku reakcije, jer je u tom području nagib najveći.[6]

1.1.3.2. Integralne metode

Za razliku od diferencijalnih metoda, integralne metode primjenjuju integralni oblik jednadžbe za brzinu prvog reda:

$$[\mathrm{A}] = [\mathrm{A}]_0 \times e^{-k \times t} \qquad (5)$$

Grafičke metode su temeljene na jednadžbi:

$$\ln[\mathrm{A}] = -k \times t + \ln[\mathrm{A}]_0 \qquad (6)$$

Kod grafičkog prikaza prirodnog logaritma eksperimentalno mjerene koncentracije analita kao funkcije vremena *t* dobije se pravac nagiba - *k* i odsječak na osi *y*: -ln$[A]_0$.[6]

1.1.3.2.1. Metoda određenog vremena

Metoda određenog vremena se temelji na jednadžbi:

$$[\mathrm{A}]_0 = \frac{[\mathrm{A}]_t}{e^{-k \times t}} \qquad (7)$$

Postupak umjeravanja izvodi se pomoću standardne otopine poznate koncentracije $[A]_0$. $[A]_t$ se određuje u točno određenom vremenu reakcije *t*, te se tada računa e^{-kxt}. Analiza uzoraka nepoznate koncentracije provodi se mjerenjem $[A]_t$ u istom reakcijskom vremenu te se računaju koncentracije analita pomoću izraza (7).[6]

1.1.3.2.2. Metoda početne brzine

Na početnom dijelu krivulje iz nagiba tangente određuje se početna brzina reakcije. Logaritamske vrijednosti početnih brzina reakcije prikazuju se u ovisnosti o logaritamskim vrijednostima koncentracija analita za određivanje

uvjetne konstante brzine reakcije *k´* i reda reakcije *n*. Korištenjem slijedeće jednadžbe napravljena je regresijska analiza izračunatih vrijednosti:

$$\log b = \log(\Delta A/\Delta t) = \log k' + n \times \log c \qquad (8)$$

gdje je *k´* uvjetna konstanta brzine kemijske reakcije, *c* je analitička koncentracija BCA i *n* označava red reakcije odnosno nagib regresijskog pravca.

1.1.4. Instrumentacija kod kinetičkih određivanja

Kod kinetičkih mjerenja potrebno je ostvariti uvjete za mjerenje početne brzine određene kemijske reakcije zbog ostvarivanja dobre selektivnosti te pouzdano određivanje koncentracije analita. Kada se ostvare eksperimentalni uvjeti pri kojima je koncentracija reagensa tijekom kinetičkog mjerenja konstantna, nakon miješanja analita i reagensa, za izračun brzine kemijske reakcije nužno je mjeriti promjene koncentracija analita i produkta. Određeno vrijeme je potrebno za miješanje analita i reagensa, odnosno za pokretanje kemijske reakcije. Potrebno je, kod kinetičkih mjerenja, odrediti vrijeme miješanja, točnije vrijeme od dodavanja analita u reakcijsku smjesu do prvog točnog mjerenja koncentracije odabrane vrste.

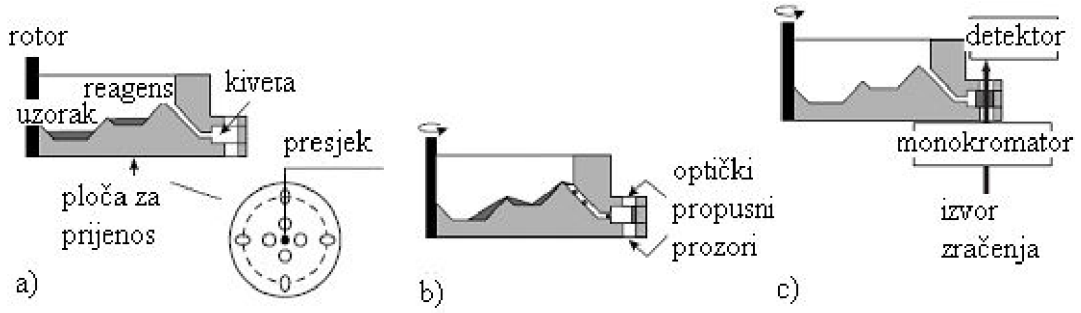
Za kvantitativnu analitičku iskoristivost kod kinetičkih metoda važan je izbor mjernih tehnika koje omogućuju praćenje koncentracije analita ili produkta u određenom vremenskom periodu. Mjerne tehnike koje se često koriste kod kinetičkih mjerenja su potenciometrija te apsorpcijska i emisijska spektrofotometrija.[7]

Zbog svoje jednostavnosti, široke dostupnosti i ekonomske isplativosti često se koriste spektrofotometrijske tehnike.[6]

U mnogim kinetičkim metodama signal se bilježi u prvim trenutcima reakcije dok su još uvijek zadovoljeni uvjeti reakcije pseudoprvog reda. Prednost ovakvog načina bilježenja signala je automatska analiza kojom se može odrediti veliki broj uzoraka dok je nedostatak potrebna automatizacija

sustava, jer prijenos uzorka i reagensa u reakcijsku posudu i njihovo miješanje mora biti vrlo brzo i ponovljivo. Ovaj postupak zahtjeva uvođenje dodatne instrumentacije što dovodi do poskupljenja analize.

Za provedbu prve automatske kinetičke analize korišten je centrifugalni analizator, prikazan na slici 5, koji omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.

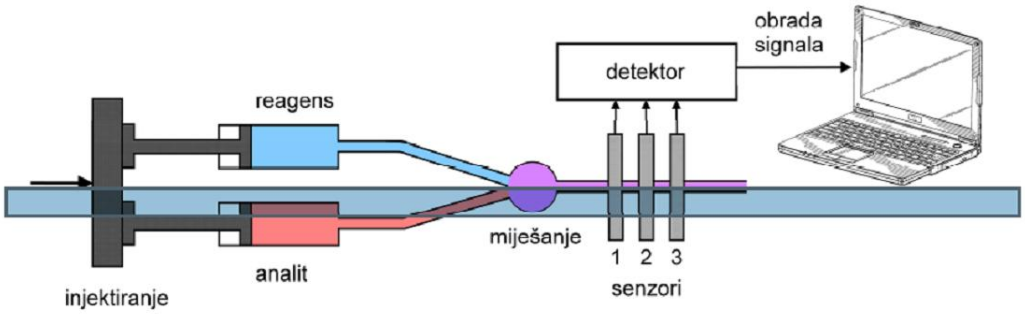


Slika 5. Shematski prikaz centrifugalnog analizatora: a) posudice za uzorak i reagens; b) miješanje uzorka i reagensa; c) konfiguracija spektrofotometrijskog detektora.[4]

Uzorak i reagens se nalaze u odvojenim posudicama na ploči za prijenos koja je pričvršćena na rotor centrifuge. Centrifugalna sila, okretanjem centrifuge, prebacuje uzorak i reagens u kivetu u kojoj se otopine miješaju. Jednostavni optički sustav, koji se nalazi sa vanjske strane ploče, sastoji se od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Apsorbancija se mjeri prolaskom reakcijske smjese kroz optički put. Ovakav sustav omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.[7]

Kod metode kontinuiranog protoka analit i reagens odabranom brzinom ulaze u prostor za miješanje i nastavljaju put prema detektoru. Kemijska reakcija se odvija na putu prema detektoru. Povećanje udaljenosti detektora od mjesta miješanja dovodi do smanjenja koncentracije analita odnosno porasta koncentracije produkta kemijske reakcije. Koncentracije analita i produkta kemijske reakcije imat će stabilne vrijednosti na svakoj točki uzduž izlazne cjevčice ako je protok kroz sustav konstantan.[7]

Na slici 6 prikazana je aparatura za navedenu metodu.

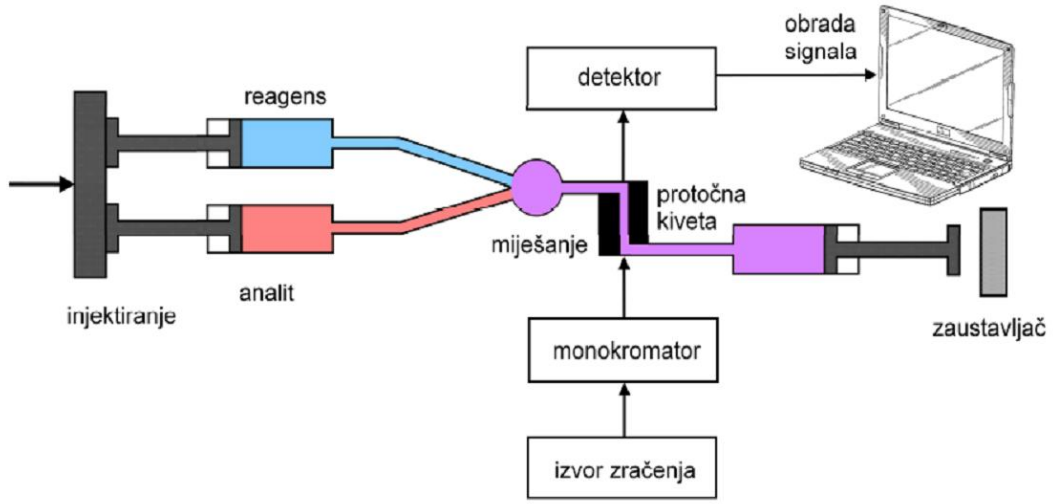


Slika 6. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom kontinuiranog protoka.[7]

Instrumentacija za zaustavljeni protok, koja je prikazana na slici 7, koristi se kod kinetičkog mjerenja vrlo brzih reakcija.

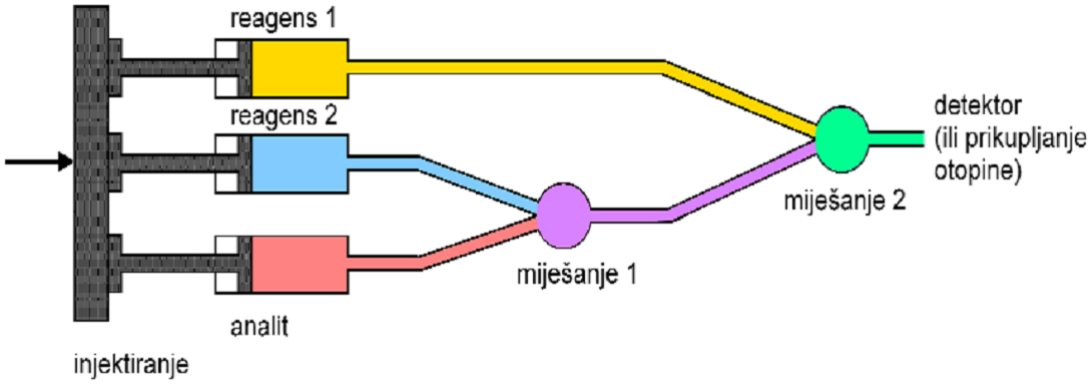
Precizno izmjereni volumeni otopina uzorka i reagensa se odvojenim štrcaljkama uvode u posudu za miješanje, dok se njihov protok zaustavlja pomoću povratnog tlaka štrcaljke za zaustavljanje. Povratni tlak dodatno miješa otopine u posudi za miješanje, otopine prolaze prema ćeliji u optičkom putu gdje se spektrofotometrijski prati odvijanje reakcije.

Instrumentacija za zaustavljeni protok omogućava završetak miješanja otopine i početak kinetičkog mjerenja u samo 0,5 milisekunde. Ako vežemo automatski uređaj za uzorkovanje na štrcaljku moguće je analizirati i do nekoliko stotina uzoraka po satu.[4]



Slika 7. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom zaustavljenog protoka.[7]

Ako se u vremenskom periodu potrebnom za dobivanje analitičkog signala, kod brzih reakcija, koncentracija praćene vrste ne mijenja, za određivanje brzine kemijske reakcije te analitičke primjene kinetičkog eksperimenta, potrebno je primijeniti metodu zaustavljene reakcije čija se shema nalazi na slici 8.



Slika 8. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom zaustavljene reakcije.[7]

Kada se istovremeno potiskuju klipovi na sva tri injektora započinje kinetički eksperiment. Miješanjem reagensa 2 i analita pokreće se reakcija i daljnim miješanjem s reagensom 1 dolazi do promjene reakcijskih uvjeta i

prekida napredovanja reakcije. Prikupljena otopina sadrži u sebi kinetičku informaciju i može se analizirati koristeći različite analitičke tehnike.[7]

Znanstveni tim profesora Radića razvio je jednostavan i pristupačan sustav za kinetička mjerenja sa spektrofotometrijskim ili potenciometrijskim detektorom. Ovakvim sustavom omogućena je kontrola temperature i pH vrijednosti te je ostvareno konstantno i ponovljivo miješanje uz cirkulaciju reakcijske otopine. Navedeni sustav opisan je u poglavlju 2.3.1.[5]

1.1.5. Vrednovanje kinetičkih metoda

Brzina kemijske reakcije i instrumentalna tehnika kojom se prati reakcija dva su faktora koji određuju granicu određivanja kinetičkih metoda. Pošto je signal proporcionalan brzini reakcije, brže reakcije imaju niže granice određivanja. Za praćenje odvijanja reakcije uglavnom se koriste spektrofotometrijske i potenciometrijske tehnike koje svojim ograničenjima utječu na dostignutu granicu određivanja.

Kemijske kinetičke metode su podložne većim pogreškama od ravnotežnih metoda, zbog utjecaja nekontroliranih ili kontroliranih parametara kao što su pH i temperatura.

Preciznost kinetičkih metoda je određena šumom u signalu instrumenta kojim se prati odvijanje reakcije. Preciznost od 1 do 2 % moguća je kod integralnih metoda, dok je kod diferencijalnih ta vrijednost nešto manja.[4]

Osjetljivost se kod metode određenog vremena može povećati provođenjem mjerenja u uvjetima kada je koncentracija promatrane vrste visoka. Ako je promatrana vrsta produkt, mjerenja se provode nakon određenog vremena od početka reakcije. Međutim ako je promatrana vrsta analit ili neka reagirajuća vrsta, mjerenja se provode na početku reakcije, jer su tada koncentracije reagirajućih vrsta visoke.

Selektivnost kinetičkih metoda temelji se na prilagođavanju uvjeta odvijanja reakcije čime se postiže razlika u brzini reakcije analita i interferirajućih vrsta.[4]

1.2. Spektroskopija

1.2.1. Uvod u spektroskopske tehnike

Spektroskopija se kao izraz s povijesnog gledišta odnosi na granu znanosti koja se bavila vidljivom svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučeno na komponente, valne duljine, koje tvore spektar.[6]

Zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti spektroskopske tehnike se često koriste te su postale nezaobilazne u kvalitativnoj i kvantitativnoj analitičkoj kemiji.

1.2.1.1. Elektromagnetski spektar

Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja velikom brzinom prolazi prostorom. Svojstva elektromagnetskog zračenja se uobičajeno opisuju pomoću klasičnog valnog modela, čiji su osnovni parametri: valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda. Budući da valni model ne može opisati pojave vezane uz apsorpciju zračenja, elektromagnetsko zračenje se promatra kao struja pojedinačnih čestica koji se nazivaju fotoni. To su čestice bez mase koje se gibaju brzinom svjetlosti i sadrže određenu količinu energije.[6]

Elektromagnetski valovi svrstani su u elektromagentski spektar koji se proteže od valova najmanje frekvencije i najveće valne duljine (radiofrekvencijsko zračenje) do valova najveće frekvencije i najmanje valne duljine (visinske gama zrake).[6] Energija fotona je razmjerna frekvenciji zračenja te je prikazana jednadžbom:

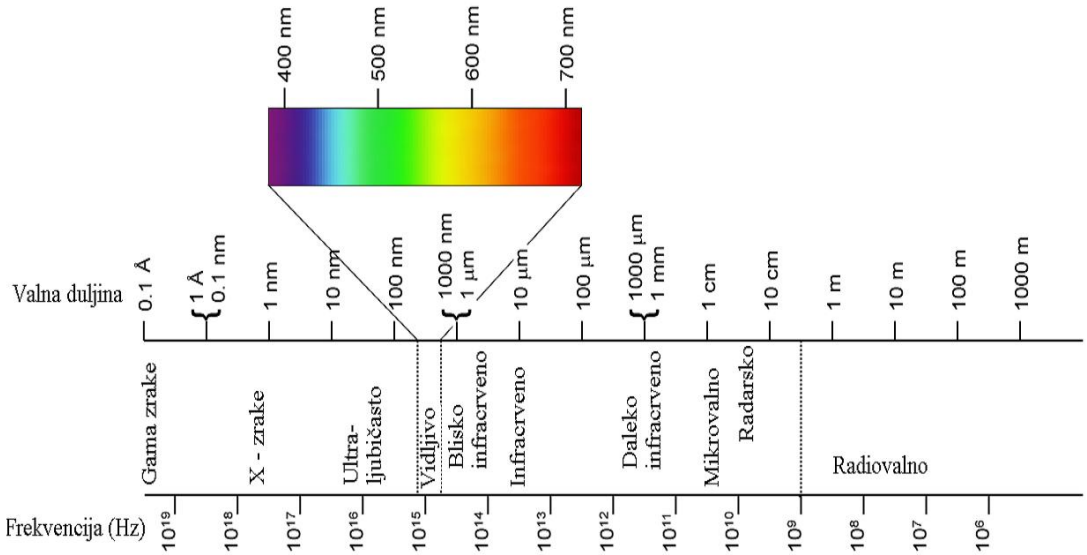
$$E = h \times \nu \tag{9}$$

gdje je *h* Planckova konstanta koja iznosi $6{,}33 \times 10^{-34}$ Js.[6]

Elektromagnetski spektar se dijeli na ionizirajuće i neionizirajuće zračenje. Valovi, odnosno zrake velike energije, mogu iz ljuske atoma izbaciti

elektrone i time ionizirati atome. Takve zrake se zovu ionizirajuće zrake, a to su rengenske (X-zrake) i gama zrake. Neionizirajuće zrake imaju manju energiju i nemaju dovoljno snage za ionizaciju, a to su: radiovalovi, mikrovalovi, vidljiva svjetlost, infracrvene i ultraljubičaste zrake.[9]

Osnovna podjela elektromagnetskog spektra prikazana je na slici 9 .



Slika 9. Osnovna podjela elektromagnetskog spektra.[9]

Područje valnih duljina od 190 do 1100 nm primjenjuje se u analitičkoj spektroskopiji jer posjeduje energiju koja odgovara molekulskim ili atomskim prijelazima.[6]

1.2.2. Apsorpcija zračenja

Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta prisutna u propusnoj sredini selektivno prigušuje, odnosno smanjuje snagu neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica ima jedinstven skup i raspored energijskih stanja, gdje je osnovno stanje najniže među njima.

Apsorpcija fotona nastaje samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekog od viših energijskih stanja čestice. Pri tome energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko, pobuđeno stanje. Pobuđivanje vrste M u ekscitiranu vrstu M* može se opisati slijedećom jednadžbom:

$$\mathrm{M} + h\nu \rightarrow \mathrm{M}^{*} \qquad (10)$$

Pobuđena vrsta se nakon veoma kratkog vremenskog razdoblja (10^{-6} do 10^{-9} s) relaksira do svog prethodnog ili osnovnog stanja prenoseći pri tome suvišak energije drugim atomima ili molekulama u okolini. Taj proces uzrokuje nezamjetno povišenje temperature i može se izraziti jednadžbom:

$$\mathrm{M}^{*} \rightarrow \mathrm{M} + \mathrm{toplina} \qquad (11)$$

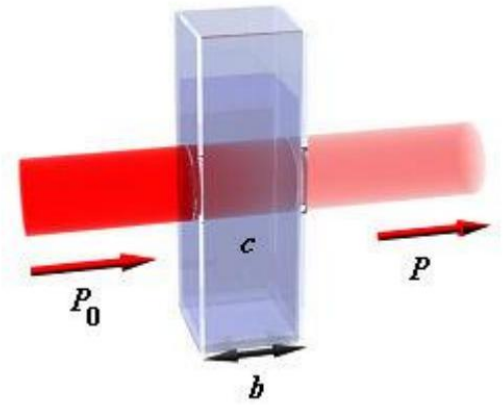
Toplinska energija koja je otpuštena tijekom relaksacije toliko je mala da se ne može detektirati zbog toga se apsorpcijskim mjerenjima najmanje moguće remeti energija proučavanog sustava.

Apsorpcijskim spektrom se opisuju apsorpcijske značajke neke vrste. To je grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, valnog broja ili frekvencije. Kod takvih prikaza vertikalna os može biti propusnost (transmitacija) ili apsorbancija koja je izražena u postotcima.[6]

Snaga zračenja snopa svjetlosti se smanjuje kada apsorbirajuća vrsta apsorbira svjetlost. Snaga zračenja, *P*, je energija zračenja koja u jednoj sekundi pada na 1 cm² površine detektora.

Snop svjetlosti, snage zračenja P_0, prolazi kroz sloj otopine debljine *b* (izražene u cm) i koncentracije *c*, vrste koja apsorbira. Posljedica toga je smanjenje snage snopa P_0 na *P*.[6]

Na slici 10 prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaska kroz otopinu.



Slika 10. Snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaska kroz sloj otopine debljine *b* (cm) i koncentracije *c* vrste koja apsorbira.[10]

Transmitancija, *T* , je dio upadnog zračenja koje je prošlo kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0} \tag{12}$$

gdje je P_0 snaga ulaznog snopa svjetlosti, dok je *P* snaga snopa nakon prolaska kroz otopinu.

Apsorbancija, *A*, se matematički definira kao negativan logaritam transmitancije, odnosno to je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja (P_0) i zračenja koje je prošlo kroz otopinu uzorka (*P*):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \tag{13}$$

Za razliku od transmitancije, apsorbancija se povećava s prigušenjem osnovnog snopa.

1.2.2.1. Beerov zakon: odnos između apsorbancije i koncentracije

Beerov zakon daje funkcijski odnos između veličine koja je mjerena apsorpcijskom metodom (*A*) i veličine koja se određuje (koncentracije, *c*).

Zakon se može prikazati:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \times b \times c \qquad (14)$$

gdje je *a* konstanta proporcionalnosti (apsorptivnost ili apsorpcijski koeficijent), a *b* je duljina puta zračenja kroz uzorak. Apsorbancija je veličina bez dimenzije, te se jedinica za apsorptivnost određuje iz jednadžbe (14).

Ukoliko se koncentracija izražava u mol L^{-1}, a duljina puta zračenja *b* u cm, konstanta proporcionalnosti se u ovom slučaju naziva molarna apsorptivnost ε. Tada jednadžba (14) mijenja oblik:

$$A = \varepsilon \times b \times c \qquad (15)$$

gdje se ε izražava u L $cm^{-1}mol^{-1}$.

Molarna apsorptivnost se definira kao broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbancija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 1 cm. Takva apsorbancija se postiže kada je 90 % upadnog zračenja apsorbirano.

Sandellova osjetljivost, za razliku od molarne apsorbancije, predstavlja količinu tvari, koja je izražena u miligramima, nužna za postizanje apsorbancije od 0,001. Apsorbancija od 0,001 se postiže kada je 0,23 % upadnog zračenja apsorbirano.[11]

Sandellova osjetljivost se računa koristeći izraz:

$$S = \frac{10^{-3}}{a} \ (\mu g\ cm^{-2}) \qquad (16)$$

gdje *a* označava apsorptivnost izraženu u L $g^{-1}cm^{-1}$.

Uzorak kojem se mjere apsorbancija i transmitacija mora biti smješten u nekoj posudici. Međudjelovanje stjenki posudice i zračenja je neizbježno stoga uzrokuje gubitak refleksijom i apsorpcijom koji mogu biti veliki. Raspršenjem na velikim molekulama ili nehomogenostima u otapalu može se smanjiti snaga snopa pri prolasku kroz otopinu. Zbog toga najčešće se uspoređuju snage

zračenja snopa koji prolazi kroz mjernu posudicu punjenu otopinom sa snagom snopa koji prolazi kroz istu posudicu punjenu samo otapalom.

Eksperimentalna apsorbancija se tada definira slijedećom jednadžbom:

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P} \qquad (17)$$

Uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta Beerov zakon se može primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju. Ukupna apsorbancija za višekomponentni sustav je:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + ... + A_n \qquad (18)$$

gdje indeks *n* označava komponentu 1, 2,…, *n* koje apsorbiraju.[6]

1.2.2.2. Ograničenja Beerovog zakona

Po Beerovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste. Ovaj zakon vrijedi za monokromatsko zračenje u razrijeđenim otopinama ($c \leq 10^{-2}$ mol L^{-1}) te predstavlja granični zakon. Pri koncentracijama većim od 10^{-2} mol L^{-1} smanjuje se prosječna udaljenost među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. Posljedica takvog međudjelovanja je odstupanje od linearnog odnosa između apsorbancije i koncentracije. Kada se u razrijeđenim otopinama tvari koja apsorbira nalaze visoke koncentracije druge vrste, pojavljuje se sličan učinak, zbog toga što blizina stranih iona i tvari koja apsorbira mijenja molarnu apsorptivnost ove druge tvari što dovodi do odstupanja od Beerovog zakona.

Kemijska odstupanja od Beerovog zakona su posljedica asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorbira s otapalom. Pri tim odstupanjima nastaju produkti apsorpcijskih značajki koji su različiti od značajki analita.[6]

1.2.3. Molekulska apsorpcijska spektrosokopija

Molekulska apsorpcijska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju primjenjuje se, u prvom redu, za kvantitativnu analizu te je najčešće korištena tehnika u kemijskim i kliničkim laboratorijima.

Ultraljubičasto i vidljivo zračenje pobuđuje elektrone koji prebivaju u molekulskoj ili atomskoj orbitali niže energije u orbitalu više energije. Prijelaz elektrona između dvije orbitale je elektronski prijelaz, a apsorpcijski proces je elektronska apsorpcija.[6]

Kod organskih molekula za apsorpciju ultraljubičastog i vidljivog zračenja odgovorne su dvije vrste elektrona: zajednički elektroni koji izravno sudjeluju u stvaranju veze i vanjski nepodjeljeni elektroni koji se uglavnom nalaze oko atoma kao što su kisik, sumpor, dušik i halogeni elementi.

Jakost veze kojom su vezani različiti elektroni utječe na valnu duljinu pri kojoj organska molekula apsorbira. Kod jednostrukih veza elektroni su čvrsto vezani tako da njihovo pobuđivanje zahtjeva energije koje odgovaraju valnim duljinama u vakuumskom ultraljubičastom području (ispod 180 nm). Sastavni djelovi atmosfere, kao i kvarc, apsorbiraju zračenje ispod 180 nm te zbog eksperimentalnih poteškoća spektri jednostrukih veza nisu iskoristivi u analitičke svrhe u tom području. Nasuprot tome organski spojevi s dvostrukim i trostrukim vezama imaju upotrebljive maksimume u lako dostupnom ultraljubičastom području zbog toga što su elektroni u nezasićenim vezama relativno slabo vezani te se lako mogu pobuditi.[6]

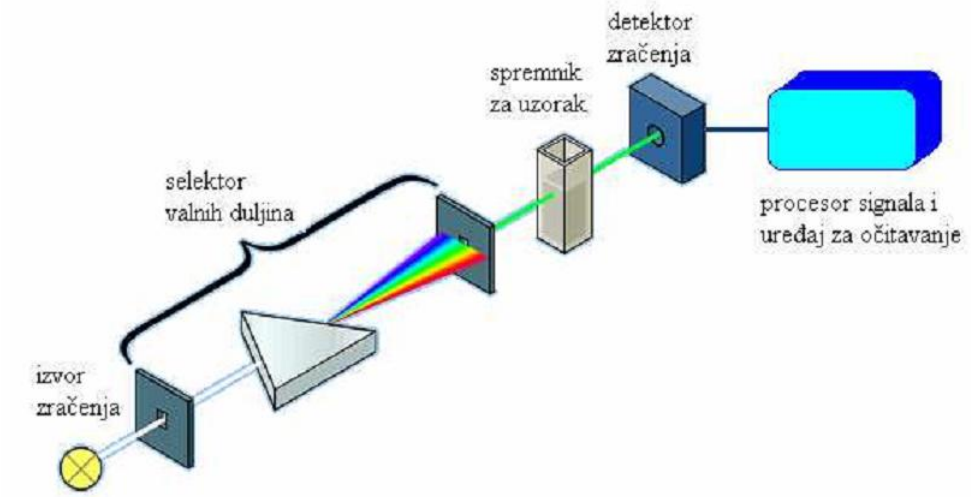
1.2.3.1. Spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo zračenje

Većina spektroskopskih uređaja je sastavljena od pet osnovnih djelova:

1. stabilan izvor zračenja
2. selektor valnih duljina koji omogućava izdvajanje određenog valnog područja

3. jedan ili više spremnika uzorka
4. detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljivi signal
5. procesor signala i uređaj za njegovo čitanje

Navedeni djelovi su prikazani na slici 11 .



Slika 11. Prikaz dijelova instrumenta za optičku spektroskopiju.

Izvor zračenja mora biti stabilan i snažan kako bi omogućio jednostavnu detekciju i mjerenje. Žarulje s volframovom ili halogenom niti izvrstan su izvor za područje valnih duljina od 350 nm do 2500 nm. Za razliku od njih vodikove i deuterijeve žarulje emitiraju zračenje u području valnih duljina od 160 nm do 400 nm.

Vrpca je skupina susjednih valnih duljina koju za određeno valno područje izdvaja selektor valnih duljina. Te su valne duljine raspoređene oko nominalne (središnje) valne duljine. Širina vrpce selektora je ona širina vrpce koja odgovara širini maksimuma u polovici njegove visine, te se izražava u jedinici valne duljine. Za proizvodnju uskih vrpca zračenja koriste se monokromatori i filtri. Kod monokromatora izlazne valne duljine se mogu kontinuirano mjeriti u relativno širokom području, dok filtri apsorbiraju sve valne duljine kontinuiranog izvora, osim jedne ograničene vrpce.[6]

Prozori spremnika za uzorke moraju biti načinjeni od materijala koji je proziran u određenom spektralnom području. Kvarc se upotrebljava u ultraljubičastom području (ispod 350 nm) te se može primijeniti preko vidljivog sve do 3000 nm u infracrvenom području. Silikatno staklo se primjenjuje u području između 375 i 2000 nm. Najčešća unutrašnja širina kivete za rad u ultraljubičastom i vidljivom području je 1 cm.

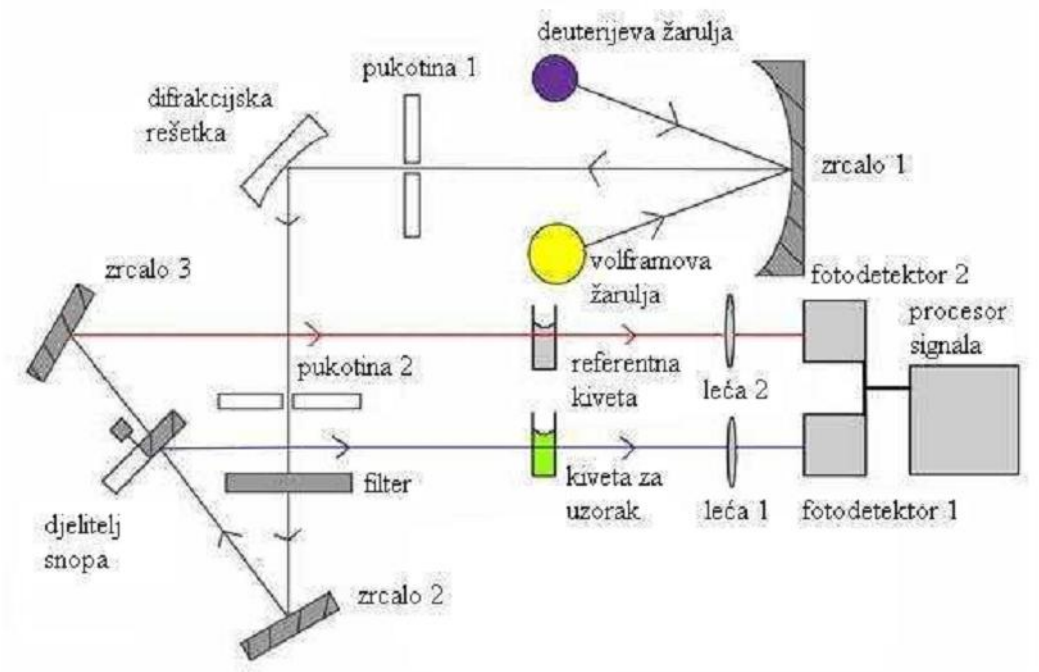
Detektor pokazuje postojanje neke fizičke pojave. Detektor proizvodi električni signal kada u njega udari foton, dok je njegov odgovor funkcija valne duljine upadnog zračenja. Vrste fotonskih detektora koje se koriste su: fotocijev, fotomultiplikator, silicijska fotodioda i fotonaponski članak.

Procesor signala pojačava električni signal iz detektora, te može logaritmirati, diferencirati i integrirati signal.[12]

Postoje jednostavni jednosnopni i nešto složeniji dvosnopni instrumenti. Jednosnopni instrumenti nemaju široku primjenu jer se kiveta s uzorkom i kiveta s referentnom otopinom moraju naizmjence smještati u snop zračenja. Zbog toga nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorbancija kao funkcija proteklog vremena.[12]

Kod dvosnopnih instrumenata dva snopa nastaju u prostoru pomoću zrcala koje se naziva djeljiteljem snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, dok drugi istodobno prolazi kroz uzorak prema drugome fotodetektoru. Dva izlazna signala se pojačavaju te se elektronički određuje njihov omjer i prikazuje se na uređaju za očitavanje. Kod dvosnopnih uređaja s vremenski odijeljenim snopovima, snopovi su odijeljeni u vremenu pomoću rotirajućeg selektorskog zrcala.[12]

Slika 12 prikazuje instrument u kojem dva snopa nastaju u prostoru pomoću djeljitelja snopa.



Slika 12. Shematski prikaz dvosnopnog spektrofotometra s prostorno razdvojenim snopovima.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijali

2.1.1. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljene su od kemikalija analitičkog stupnja čistoće. Kao otapalo korištena je deionizirana voda. Za pripravu krivulje umjeravanja sve standardne otopine bile su svježe pripravljene.

2.1.1.1. Deionizirana voda

Deionizirana voda je pripravljena korištenjem uređaja Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska) kroz slijedeće postupke: reverznu osmozu, filtraciju kroz aktivni ugljen (zbog uklanjanja organskih nečistoća), deionizaciju kroz anionski i kationski izmjenjivač, filtraciju kroz membranski filtar s porama 0,22 μm (zbog uklanjanja mikroorganizama).

2.1.1.2. Otopina karbonatnog pufera

Otopina karbonatnog pufera koncentracije 0,1 mol L^{-1} pripravljena je otapanjem 10,598 g natrijeva karbonata (Na_2CO_3) i 8,399 g natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$) u 1000 mL vode. Pufer otopina pH vrijednosti 10,3 pripravljena je dodatkom otopine natrijeva hidroksida (NaOH, c(NaOH) = 2,0 mol L^{-1}) osnovnoj otopini pufera.

2.1.1.3. Otopina fosfatnog pufera

Otopina fosfatnog pufera koncentracije 0,05 mol L^{-1} pripravljena je djelomičnom neutralizacijom 85 % - tne fosforne kiseline ($c(H_3PO_4)$ = 15,91 mol L^{-1}). Otpipetirano je 3,14 mL fosforne kiseline te je nadopunjeno deioniziranom vodom u tikvicu do oznake od 1000 mL. Pufer otopina pH vrijednosti 6,8 pripravljena je dodatkom otopine kalijeva hidroksida (KOH, c(KOH) = 2,0 mol L^{-1}) osnovnoj otopini pufera.

2.1.1.4. Otopina bicikoninske kiseline (BCA)

Otopinu bicikoninske kiseline koncentracije 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1} pripravljena je otapanjem 0,038829 g BCA u ultra čistoj vodi do volumena od 50 mL.

2.1.1.5. Otopina Cu^{2+}

Otopina Cu^{2+} koncentracije 1 x 10^{-3} mol L^{-1} pripravljena je otapanjem 0,01248 g bakrovog sulfata pentahidrata ($CuSO_4$ x $5H_2O$) u 50 mL ultračiste vode.

2.1.1.6. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera koncentracije 4,0 x 10^{-2} mol L^{-1} pripravljena je otapanjem 4,946 g borne kiseline (H_3BO_3) u malo deionozirane vode uz dodatak 4,6 mL ledene octene kiseline i 3,2 mL fosforne kiseline nakon čega se nadopuni deioniziranom vodom do volumena od 2000 mL. Pufer otopina pH vrijednosti 2 pripravljena je dodatkom otopine natrijeva hidroksida (c(NaOH) = 2,0 mol L^{-1}) osnovnoj otopini pufera što se kontrolira korištenjem pH – metra.

2.1.1.7. Otopina *N*-acetil-L-cistein-etil estera

Standardna otopina *N*-acetil-L-cistein-etil estera koncentracije 1 x 10^{-2} mol L^{-1} pripravljena je otapanjem 0,1912 g čiste tvari u acetatno-boratno-fosfarnom puferu (pH = 2). Standardna otopina je čuvana na 4 ºC.

2.2. Instrumenti i uređaji

2.2.1. Uređaji za spektrofotometrijsko mjerenje

Sustav za kinetičku spektrofotometriju sastoji se od spektrofotometra za ultraljubičasto i vidljivo područje Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) s protočnom kvarcnom kivetom. Spektrofotometar je spojen na osobno računalo, s programskom podrškom Hyper UV-Vis software (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji nam služi za prikupljanje i obradu podataka. Na slici 13 prikazan je navedeni spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo zračenje.

Uređaj može snimati valne duljine ultraljubičastog i vidljivog područje elektromagnetskog spektra (od 190 do 1100 nm) uz razlučivost od 2 nm. Širina snopa elektromagnetskog zračenja je svega 1 mm te stoga omogućava mjerenje i najmanjih količina uzorka s velikom preciznošću. Unutarnji volumen korištene kvarcne kivete je 160 μm dok je dužina optičkog puta 10,0 mm.



Slika 13 . Spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo područje Shimadzu UV-1601.

Spektrofotometar ima deuterijski i volframov izvor zračenja, disperzno sredstvo monokromatora je refleksijska rešetka, a detektor je fotomultiplikator. Promjena apsorbancije s vremenom bilježena je pri valnoj duljini od 562 nm te su izlazni signali prenošeni na izlazno računalo povezano s spektrofotometrom.

Reakcijska otopina se nalazila u termostatiranoj staklenoj posudi s dvostrukim stjenkama. Reakcijsku otopinu iz reakcijske posude crpila je peristaltička crpka Ismatec IPC (Ismatec, Zurich, Švicarska) koja ju je prenosila kroz protočnu kivetu i ponovo vraćala u reakcijsku posudu. Korištenjem magnetske mješalice Technica Rotamix 550 MNH (Technica, Železnik, Slovenija) s magnetskim štapićem prekrivenim teflonom ostvareno je konstantno miješanje tijekom mjerenja. Na slici 14 prikazan je sustav za provođenje kinetičke spektrofotometrije.



Slika 14. Sustav za provođenje kinetičkih spektrofotometrijskih mjerenja.

2.2.2. Ostali uređaji i oprema

Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413, korišten za mjerenje pH otopina prikazan je na slici 15.



Slika 15. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti sa staklenom elektrodom.

2.3. Metoda rada

2.3.1. Kinetička spektrofotometrija

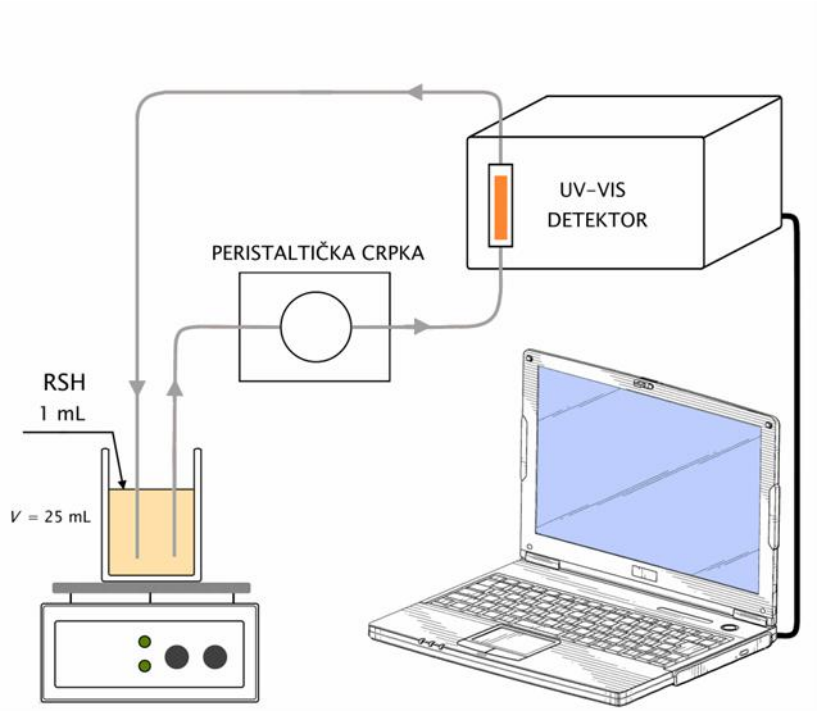
Razvijena kinetička spektrofotometrijska analitička metoda temelji se na redoks reakciji (18) u kojoj $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ kompleks koji je zelene boje u prisutnost analita NACET-a prelazi u stabilniji $[Cu(BCA)_2]^{+}$ ljubičasto obojan kompleks, koji apsorpcijski maksimum postiže pri valnoj duljini od 562 nm.

$$2\ RSH + 2\ [Cu(BCA)_2]^{2+} \rightarrow RSSR + 2\ [Cu(BCA)_2]^{+} + 2\ H^{+} \qquad (18)$$

U termostatiranu reakcijsku posudu dodavano je redom: 2,0 mL Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,3 x 10^{-4} mol L^{-1}), 2,0 mL BCA (c(BCA) = 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}), 10,0 mL fosfatnog pufera ($c(H_2PO_4^{-}/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}; pH = 6,8). U reakcijsku otopinu koja se jednoliko miješa jednu minutu nakon početka eksperimenta dodan je 1,0 mL NACET-a (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) čime je započela reakcija. Ukupan volumen reakcijske otopine je 15,0 mL.

Volumen protočnog sustava je 6,0 mL, dok je brzina protoka 6,0 mL min^{-1}. Apsorbancija je kontinuirano bilježena kao funkcija proteklog vremena pri valnoj duljini od 562 nm.

Sustav za izvođenje kinetičke spektrofotometrijske metode prikazan je na slici 16.



Slika 16. Shematski prikaz instrumentacije za određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera kinetičkom spektrofotometrijskom metodom

3. REZULTATI I RASPRAVA

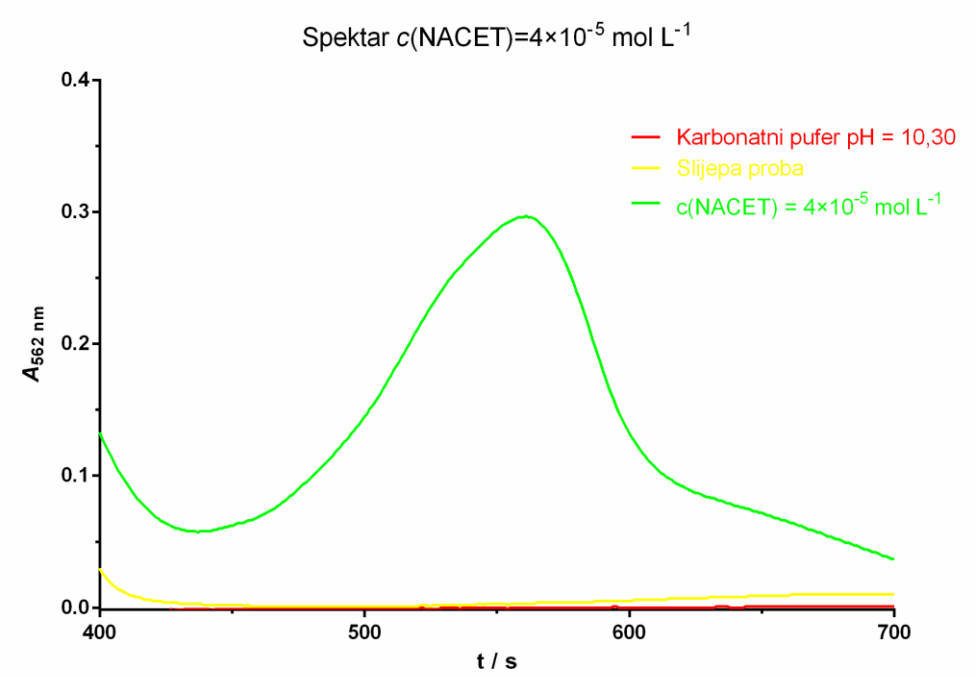
Razvijena kinetička spektrofotometrijska analitička metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ kompleks koji je zelene boje u prisutnost analita NACET-a prelazi u stabilniji $[Cu(BCA)_2]^{+}$ ljubičasto obojan kompleks, koji apsorpcijski maksimum postiže pri valnoj duljini od 562 nm.

$$2\ RSH + 2\ [Cu(BCA)_2]^{2+} \rightarrow RSSR + 2\ [Cu(BCA)_2]^{+} + 2\ H^{+} \quad (18)$$

Kinetička spektrofotometrijska metoda opisana je u poglavlju 2.3.1; a proveden je na jednostavnom protočnom sustavu čiji su djelovi opisani u poglavlju 2.2.1; dok je shematski prikaz dan na slici 16.

3.1. Optimizacija metode

Prije same optimizacije reakcijskih uvjeta snimljen je apsorpcijski spektar karbonatnog pufera (pH = 10,30), slijepe probe i nastalog kompleksa koji je prikazan na slici 17. Slijepa proba ukupnog volumena 10,0 mL sadrži: otopinu Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) volumena 1,0 mL, otopinu BCA (c(BCA) = 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) volumena 1,0 mL i otopinu karbonatnog pufera (pH = 10,3; $c(HCO_3^{-}/CO_3^{2-})$ = 0,1 mol L^{-1}) i volumena 8,0 mL. Spektar kompleksa $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ ukupnog volumena 10 mL sadrži otopinu Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) volumena 1,0 mL, otopinu BCA (c(BCA) = 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) volumena 1,0 mL i otopinu karbonatnog pufera (pH = 10,3; $c(HCO_3^{-}/CO_3^{2-})$ = 0,1 mol L^{-1}) volumena 7,6 mL te otopinu analita NACET-a (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5}) volumena 0,4 mL.

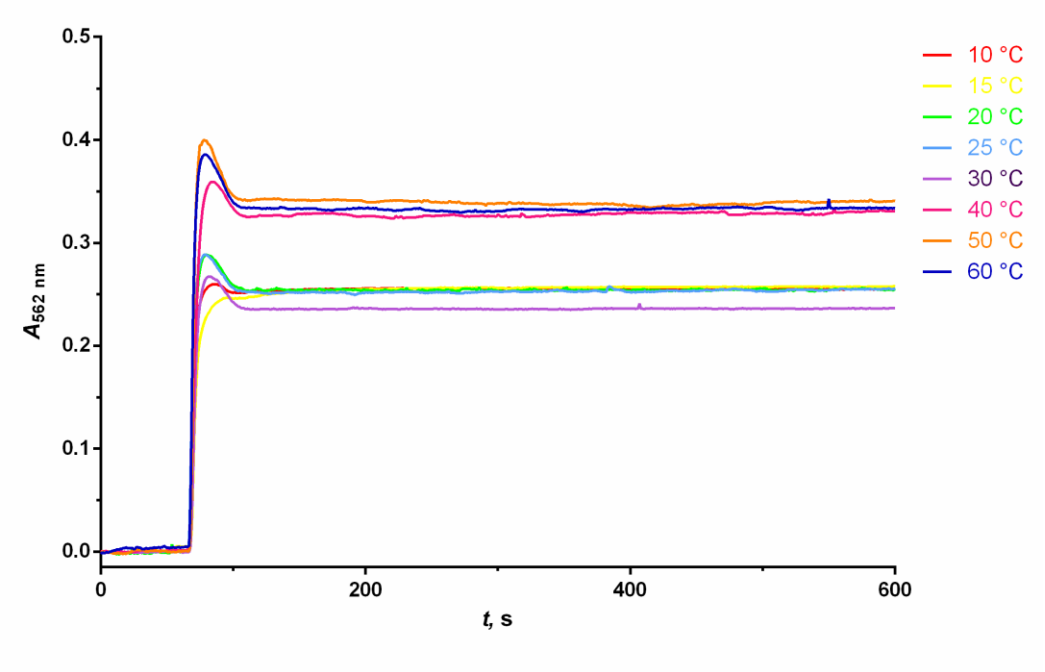


Slika 17. Spektar karbonatnog pufera (crvena krivulja), slijepe probe (žuta krivulja) i $[Cu(BCA)_2]^+$ kompleksa koji nastaje uslijed reakcije *N*-acetil-L-cistein-etil estera sa kompleksom $[Cu(BCA)_2]^{2+}$(zelena krivulja).

Iz provedenog eksperimenta vidljivo je da slijepa proba ne interferira određivanju analita.

3.1.1. Utjecaj temperature

Utjecaj temperature reakcijske otopine na intenzitet signala ispitan je u temperaturnom rasponu od 10 do 60° C koji je prikazan na slici 18.

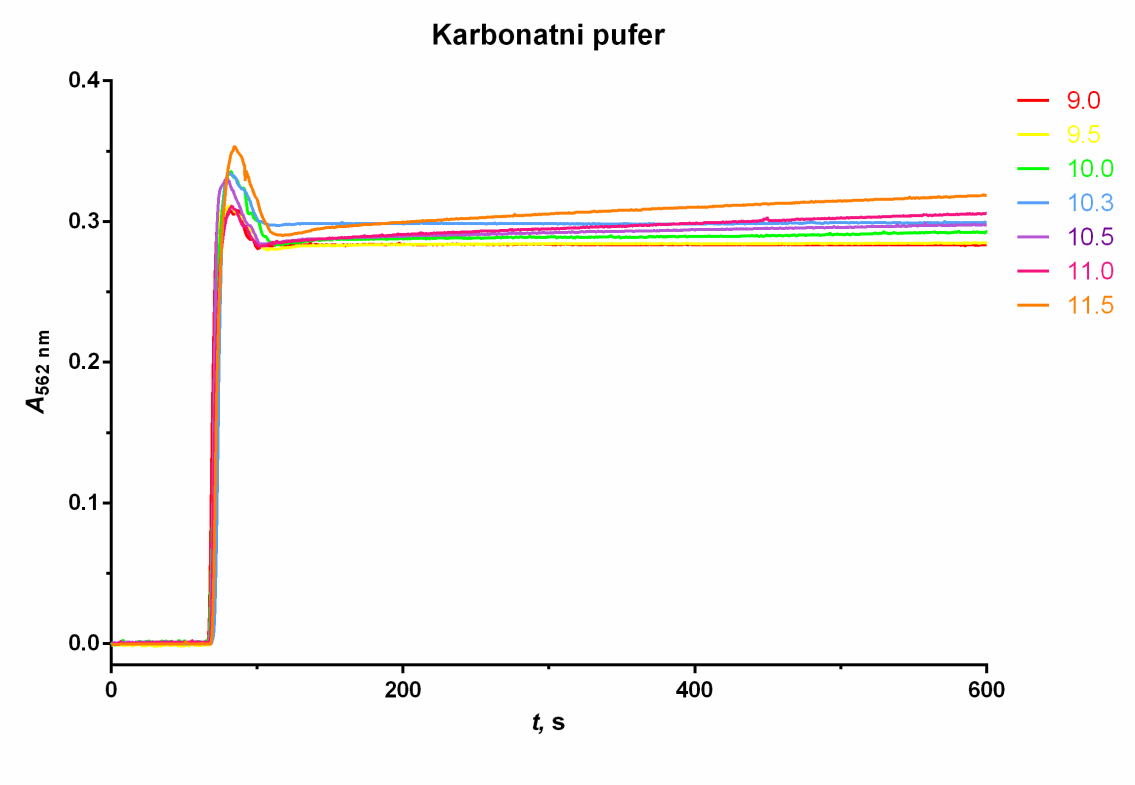


Slika 18 . Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje N-acetil-L-cistein-etil estera pri različitim temperaturama: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60 °C. Eksperimentalni uvjeti: otopina uzorka c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1} i volumena 1 mL ; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina BCA (c(BCA) = 2 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina fosfatnog pufera ($c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}; pH = 6,8) volumena 10,0 mL; brzina protoka je 6,0 mL min^{-1}; volumen protočnog sustava 6,0 mL.

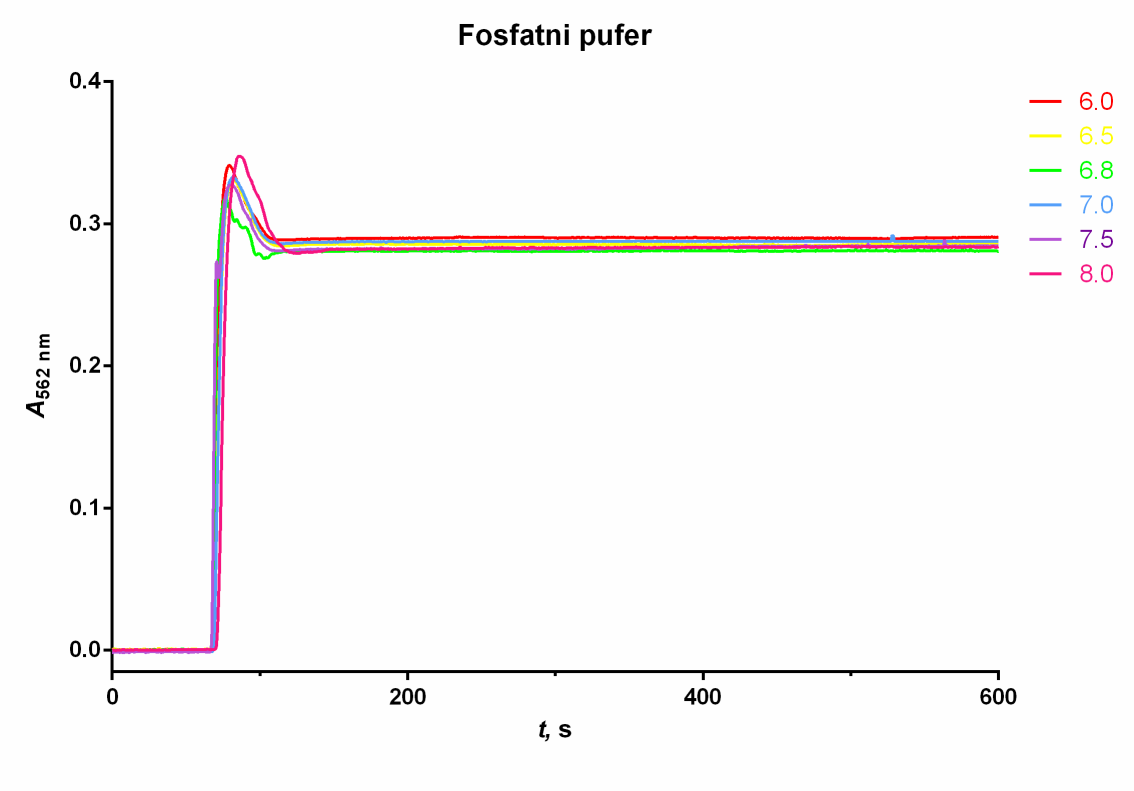
Zabilježeni signal je stabilniji i viši pri temperaturama od 10 ºC do 30 ºC. U navedenom temperaturnom području ne postoji značajna razlika u brzini reakcije i visini signala što omogućava mjerenje bez termostatiranja pri sobnoj temperaturi. Pri višim temperaturama (40 – 60 ºC) brzina reakcije i zabilježeni signal bili su znatno niži.

3.1.2. Optimizacija pH vrijednosti

Utjecaj pH vrijednosti ispitivan je za dva pufera: karbonatni i fosfatni pufer. pH vrijednosti za karbonatni pufer iznosile su: 9,0; 9,5; 10,0; 10,3; 10,5; 11,0; 11,5, a za fosfatni su iznosile: 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5; 8,0.



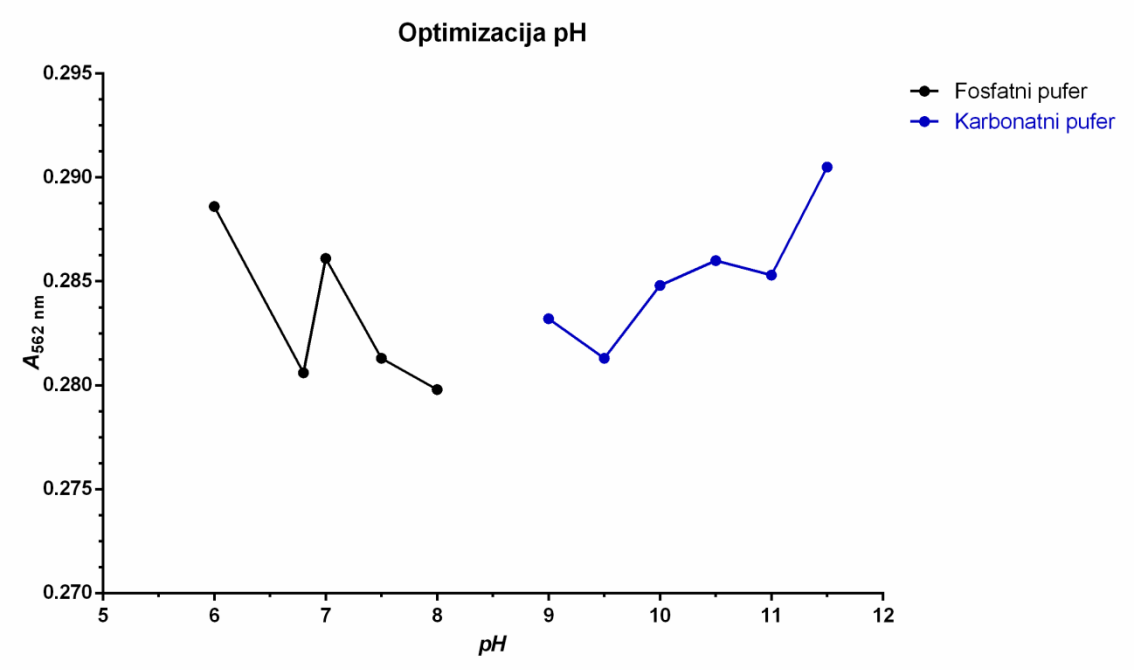
Slika 19 . Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera. Eksperimentalni uvjeti: otopina uzorka (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) volumena 1 mL ; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} (c(Cu^{2+}) = 1,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina BCA (c(BCA) = 2,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina karbonatnog pufera (c(HCO_3^-/CO_3^{2-}) = 0,1 mol L^{-1}) volumena 10,0 mL; pH vrijednosti 9,0; 9,5; 10,0; 10,3; 10,5; 11,0; 11,5. Brzina protoka je 6,0 mL min^{-1}; volumen protočnog sustava 6,0 mL.



Slika 20 . Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera. Eksperimentalni uvjeti ; otopina uzorka (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) volumena 1 mL ; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} (c(Cu^{2+}) = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) volumena 2,0 mL; otopina BCA (c(BCA) = 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) volumena 2,0 mL; otopina fosfatnog pufera (c($H_2PO_4^-$/HPO_4^{2-}) = 0,05 mol L^{-1}) volumena 10 mL; pH vrijednosti 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5; 8,0. Brzina protoka je 6,0 mL min^{-1}; volumen protočnog sustava 6,0 mL.

Optimizirana vrijednost pH za karbonatni pufer je 10,3, dok je za fosfatni pufer 6,8. S obzirom na željenu osjetljivost metode, analitičku stabilnost signala i činjenicu da je NACET stabilniji pri nižim pH vrijednostima, za daljnu analizu između ova dva pufera odabran je fosfatni pufer. Još jedan razlog ovog odabira je kapacitet pufera koji je najveći kada je pH $\approx$ pK_a, a to je upravo slučaj kod pH vrijednosti 6,8 za navedeni pufer.

Na slici 21 prikazana je usporedba pH vrijednosti između karbonatnog i fosfatnog pufera.



Slika 21. Usporedba pH vrijednosti za fosfatni i karbonatni pufer.

3.1.3. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i BCA

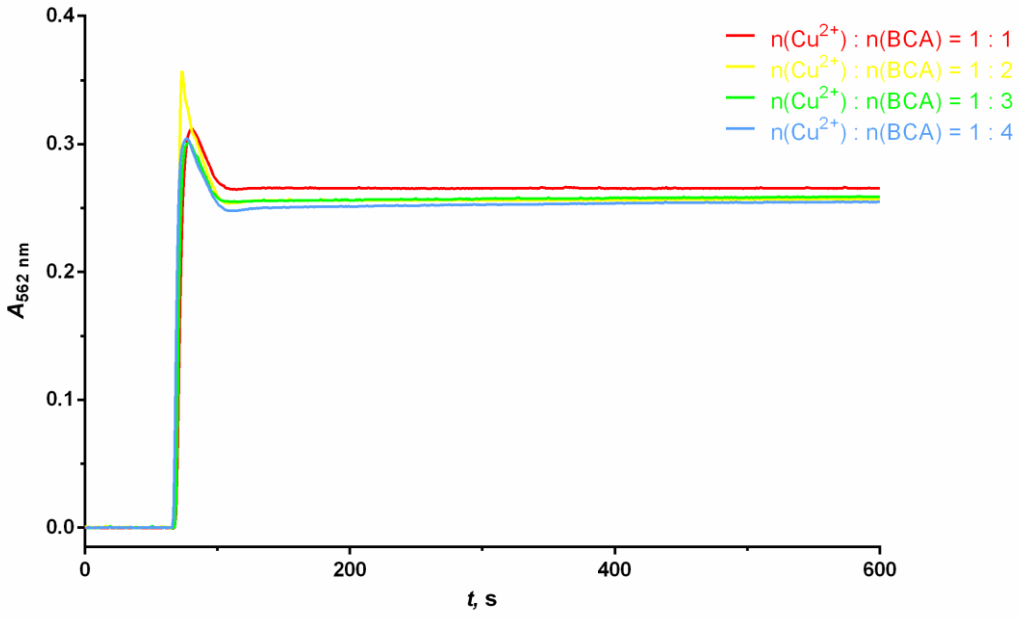
Kod ove optimizacije koncentracija i volumen Cu^{2+} su konstantni dok se ispitivanje koncentracije bicikoninske kiseline (BCA) provodilo u rasponu od 3,20 x 10^{-4} do 1,28 x 10^{-3} mol L^{-1} kao što je prikazano u tablici 1. Kao pufer korišten je fosfatni pufer pH = 6,8 i volumena 10,0 mL. Volumen otopine uzorka (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) je 1 mL, dok je ukupni volumen 15 mL.

Graf navedene optimizacije nalazi se na slici 22.

Tablica 1. Prikaz omjera koncentracija BCA i Cu^{2+}, te volumeni i koncentracije korištenih otopina. Ukupni volumen je 15 mL; volumen NACET-a (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) 1 mL i volumen fosfatnog pufera (pH = 6,8; $c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}) 10 mL.

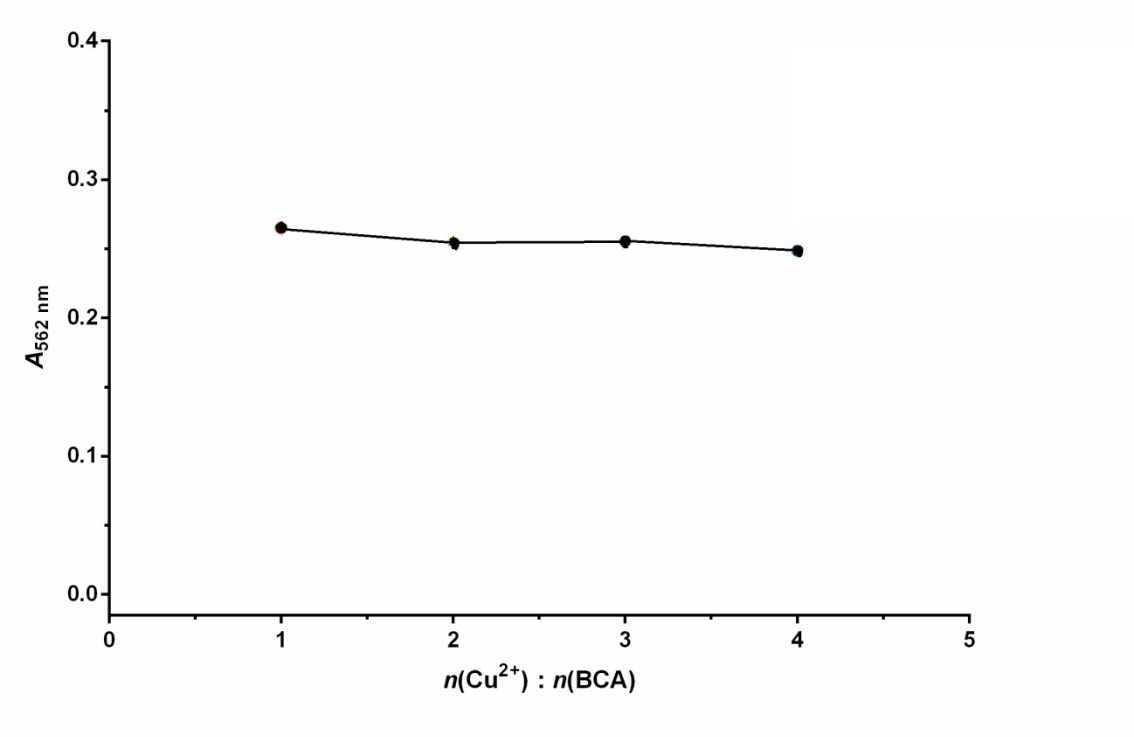
c(BCA)/c(Cu^{2+})	c(BCA) / mol L^{-1}	V(BCA) / mL	c(Cu^{2+}) / mol L^{-1}	V(Cu^{2+}) / mL	V(H_2O) / mL
1	3,2 x 10^{-4}	0,60	3,2 x 10^{-4}	0,60	2,80
2	6,4 x 10^{-4}	1,20	3,2 x 10^{-4}	0,60	2,20
3	9,6 x 10^{-4}	1,80	3,2 x 10^{-4}	0,60	1,60
4	1,28 x 10^{-3}	2,40	3,2 x 10^{-4}	0,60	1,00

Kod navedenih mjerenja ukupni volumen reakcijske otopine iznosio je uvijek 15 mL te je omjer koncentracija stoga moguće prikazati kroz molarni omjer n(Cu^{2+}) : n(BCA).



Slika 22. Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera pri različitim omjerima između Cu^{2+} i BCA.

Apsorbancija raste s povećavanjem omjera sve dok ne dostigne konstantnu vrijednost (slika 23.). Za optimalni omjer n(Cu^{2+}) : n(BCA) odabran je 1, što odgovara koncentracij BCA od 3,2 x 10^{-4} mol L^{-1}.



Slika 23. Grafički prikaz omjera koncentracije Cu^{2+} i BCA u ovisnosti o apsorbanciji.

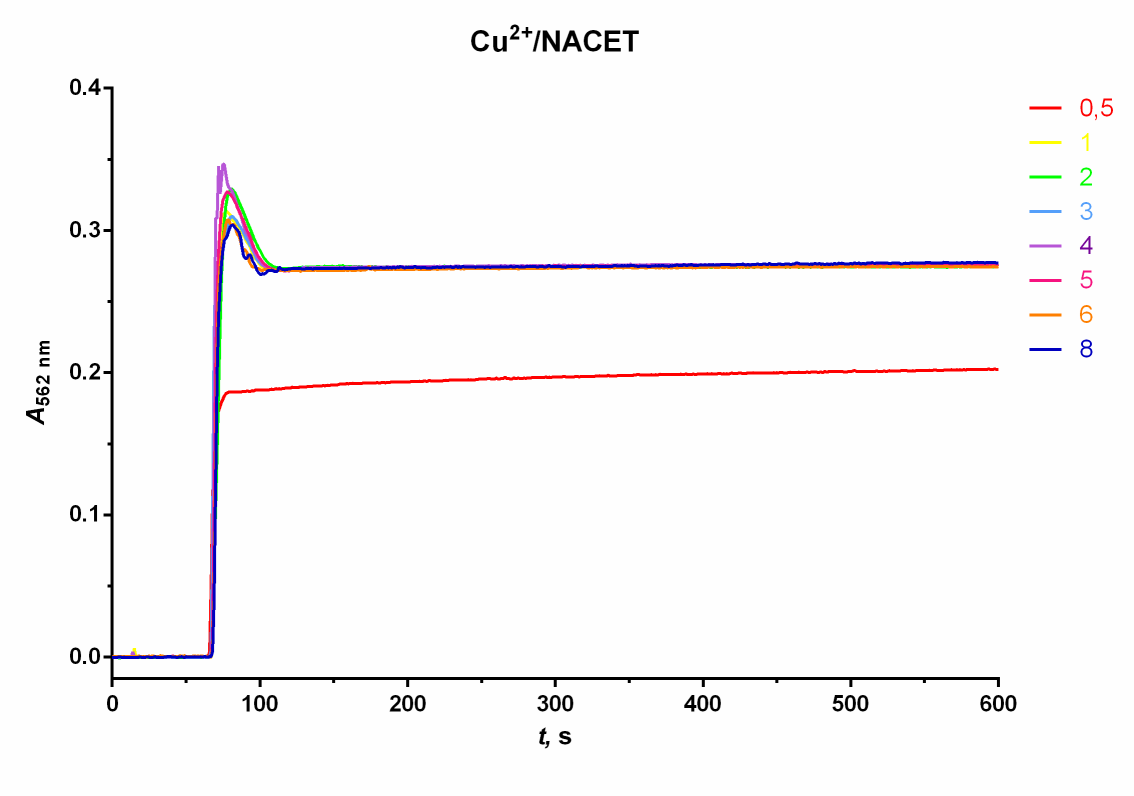
3.1.4. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i NACET

Kod ove optimizacije koncentracija i volumen bicikoninske kiseline (BCA) su konstantni dok se ispitivanje koncentracije Cu^{2+} provodilo u rasponu od 2,0 x 10^{-5} do 4,8 x 10^{-4} mol L^{-1} kao što je prikazano u tablici 2. Kao pufer korišten je fosfatni pufer pH = 6,8 i volumena 10,0 mL. Volumen otopine uzorka (*c*(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) je 1 mL, dok je ukupni volumen 15 mL.

Tablica 2. Prikaz omjera koncentracija Cu^{2+} i NACET-a, te volumeni i koncentracije korištenih otopina. Ukupni volumen je 15 mL; volumen NACET-a (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) 1 mL i volumen fosfatnog pufera (pH = 6,8; $c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 10,05 mol L^{-1}) 10 mL.

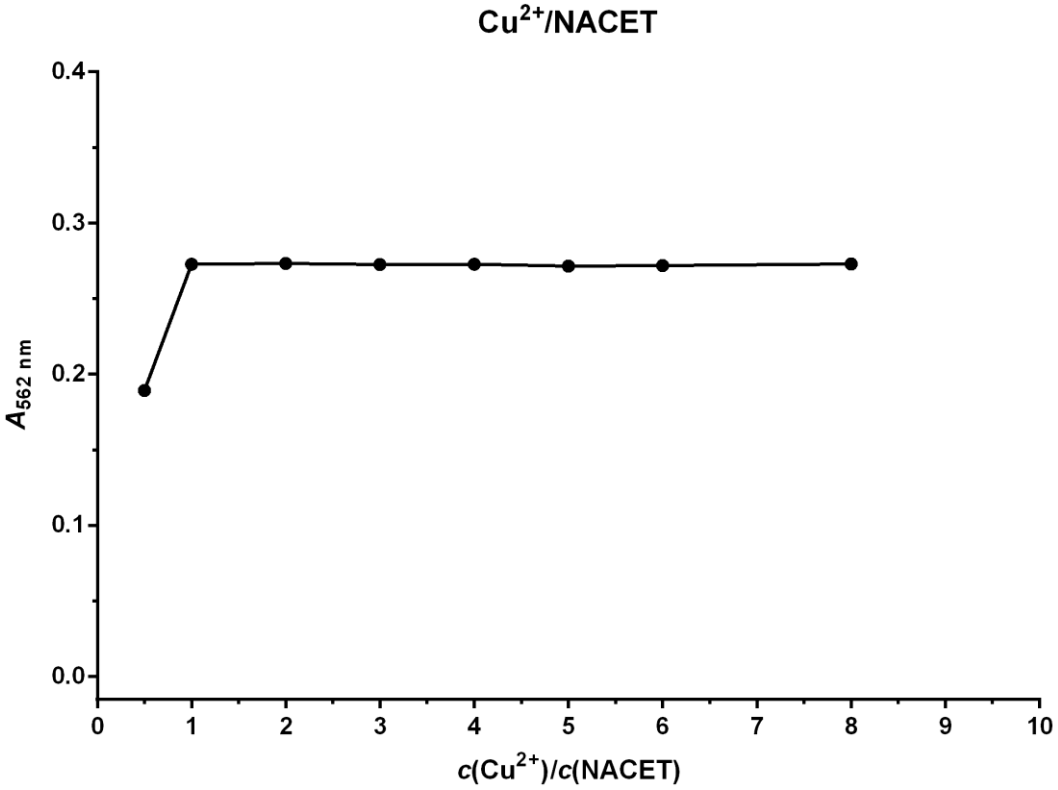
$c(Cu^{2+})/c$(NACET)	$c(Cu^{2+})$ / mol L^{-1}	$V(Cu^{2+})$/mL	c(BCA) / mol L^{-1}	V(BCA)/mL	$V(H_2O)$/mL
0,5	2,0 x 10^{-5}	0,04	4,0 x 10^{-4}	3	0,96
1	4,0 x 10^{-5}	0,08	4,0 x 10^{-4}	3	0,93
2	8,0 x 10^{-5}	0,15	4,0 x 10^{-4}	3	0,85
3	1,2 x 10^{-4}	0,23	4,0 x 10^{-4}	3	0,78
4	1,6 x 10^{-4}	0,30	4,0 x 10^{-4}	3	0,70
5	2,0 x 10^{-4}	0,38	4,0 x 10^{-4}	3	0,63
6	2,4 x 10^{-4}	0,45	4,0 x 10^{-4}	3	0,55
8	3,2 x 10^{-4}	0,60	4,0 x 10^{-4}	3	0,40
10	4,0 x 10^{-4}	0,75	4,0 x 10^{-4}	3	0,25
12	4,8 x 10^{-4}	0,90	4,0 x 10^{-4}	3	0,10

Prikaz rezultata mjerenja navedene optimizacije je na slici 24.



Slika 24. Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera pri različitim omjerima Cu^{2+} i NACET-a.

Apsorbancija raste s porastom omjera, kao što je prikazano na slici 25, a za optimalnu vrijednost odabrana je koncentracija Cu^{2+} od 3,2 x 10^{-4} mol L^{-1} odnosno omjer Cu^{2+} i NACET-a je 8. Ovako visoka koncentracija reagensa nužna je da bi se osiguralo izvođenje reakcije pseudoprvog reda.



Slika 25 . Grafički prikaz omjera koncentracije Cu ²⁺ i NACET-a u ovisnosti o apsorbanciji.

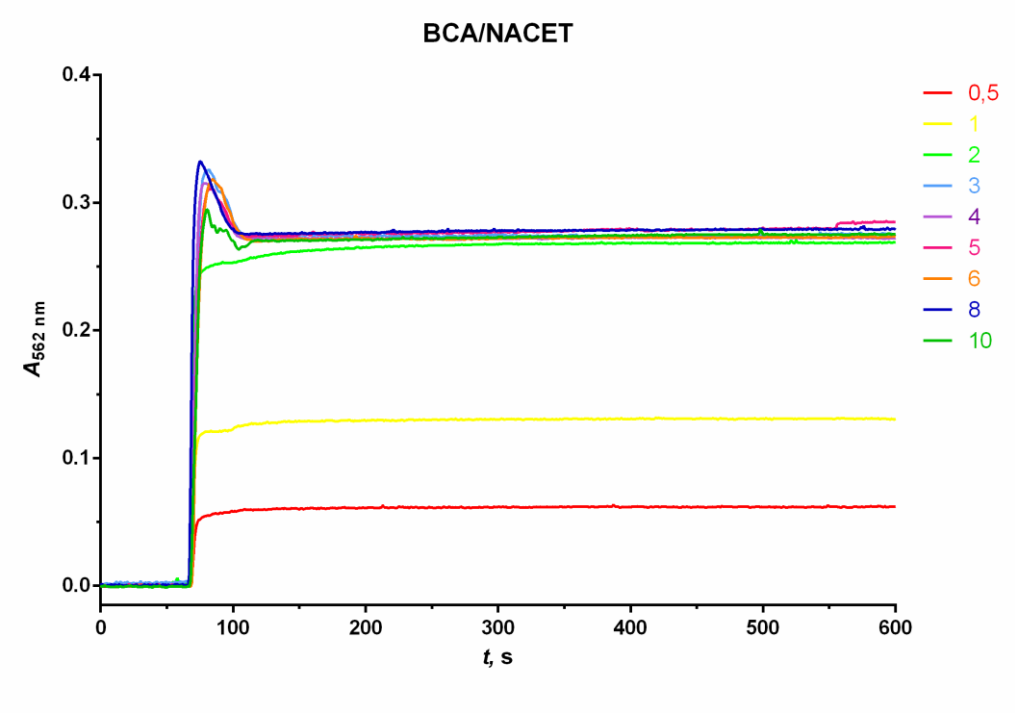
3.1.5. Optimizacija omjera koncentracija BCA i NACET

Kod navedene optimizacije konstantni su volumen i koncentracija Cu^{2+} iona dok su se ispitivane koncentracije bicikoninske kiseline (BCA) nalazile u području koncentracije od 2,0 x 10^{-5} do 4,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Ukupni volumen je 15 mL, od toga je volumen fosfatnog pufera ($c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1} ; pH = 6,8) 10 mL, a volumen analita (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) 1 mL. Tablica 3. prikazuje volumene i koncentracije korištenih otopina.

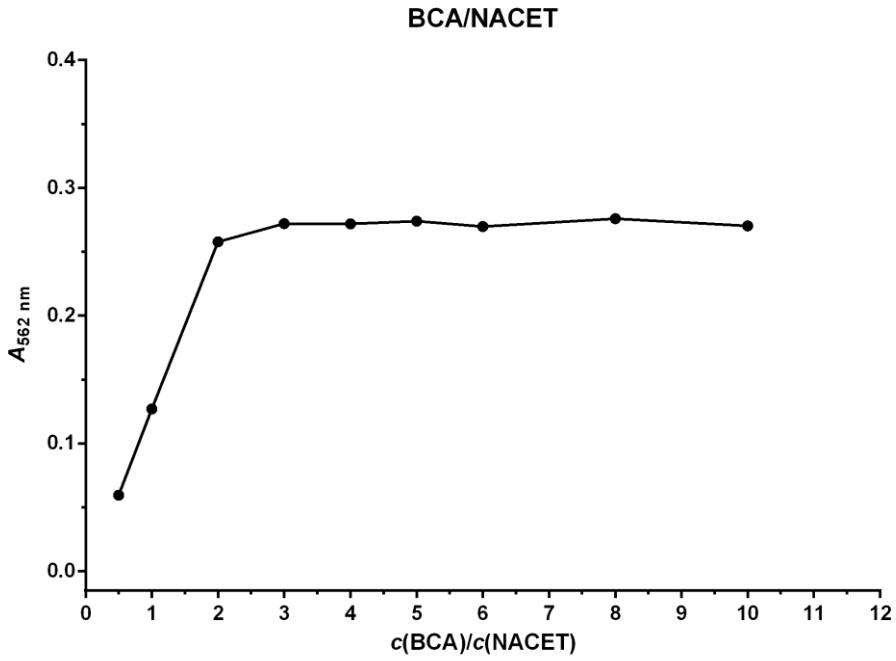
Tablica 3. Prikaz omjera koncentracija BCA i NACET-a, te volumeni i koncentracije korištenih otopina. Ukupni volumen je 15 mL; volumen NACET-a (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) 1 mL i volumen fosfatnog pufera (pH = 6,8; $c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}) 10 mL.

c(BCA)/c(NACET)	c(BCA)	V(BCA)	$c(Cu^{2+})$	$V(Cu^{2+})$	$V(H_2O)$
0,5	2,0 x 10^{-5}	0,15	4,0 x 10^{-4}	0,75	3,10
1	4,0 x 10^{-5}	0,30	4,0 x 10^{-4}	0,75	2,95
2	8,0 x 10^{-5}	0,60	4,0 x 10^{-4}	0,75	2,65
3	1,2 x 10^{-4}	0,90	4,0 x 10^{-4}	0,75	2,35
4	1,6 x 10^{-4}	1,20	4,0 x 10^{-4}	0,75	2,05
5	2,0 x 10^{-4}	1,50	4,0 x 10^{-4}	0,75	1,75
6	2,4 x 10^{-4}	1,80	4,0 x 10^{-4}	0,75	1,45
8	3,2 x 10^{-4}	2,40	4,0 x 10^{-4}	0,75	0,85
10	4,0 x 10^{-4}	3,00	4,0 x 10^{-4}	0,75	0,25

Prikaz navedene optimizacije je na slici 26, dok je na slici 27 prikazana ovisnost omjera koncentracija Cu^{2+} i NACET-a o apsorbanciji.



Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti temperature o apsorbanciji kod optimizacije omjera Cu^{2+} i NACET.



Slika 27. Graf ovisnosti omjera koncentracija BCA i NACET-a o apsorbanciji.

Krivulja prikazana na slici 27 pokazuje da apsorbancija raste s povećanjem omjera koncentracija BCA i NACET-a sve dok ne postigne konstantnu vrijednost pri omjeru 3. Kao optimalna vrijednost koncentracije odabrana je koncentracija BCA 3,2 x 10^{-4} mol L^{-1}. Navedena vrijednost je tri puta veća od najveće očekivane koncentracije linearnog dinamičkog područja, što znači da je optimalni omjer koncentracija BCA i NACET jednak 8, čime je omogućeno izvođenje reakcije pseudoprvog reda.

3.1.6. Optimizirani uvjeti

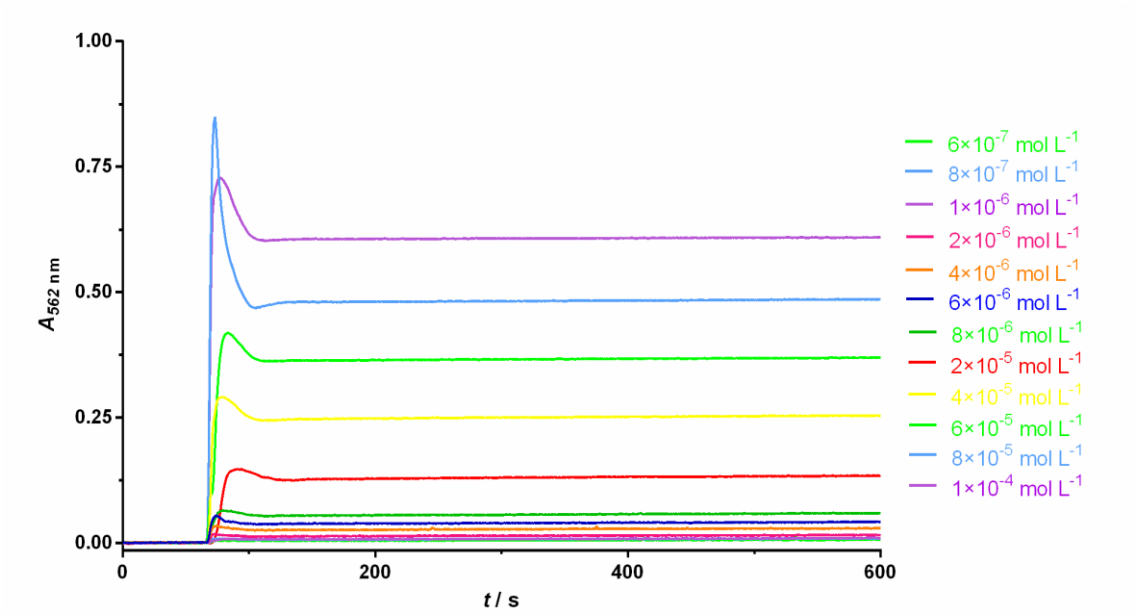
U tablici 4. prikazano je područje u kojem smo ispitivali različite parametre i optimalni uvjeti koji su odabrani za svaki pojedini parametar.

Tablica 4. Optimizacija parametara za kinetičko spektroskopsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera.

Parametri	Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
Temperatura	10 – 60 °C	25 °C
pH pufera	6,0 – 8,0	6,8
$c(Cu^{2+})/c$(BCA)	1 – 4	1
c(BCA)/c(NACET)	0,5 – 12	8
$c(Cu^{2+})/c$(NACET)	0,5 – 12	8

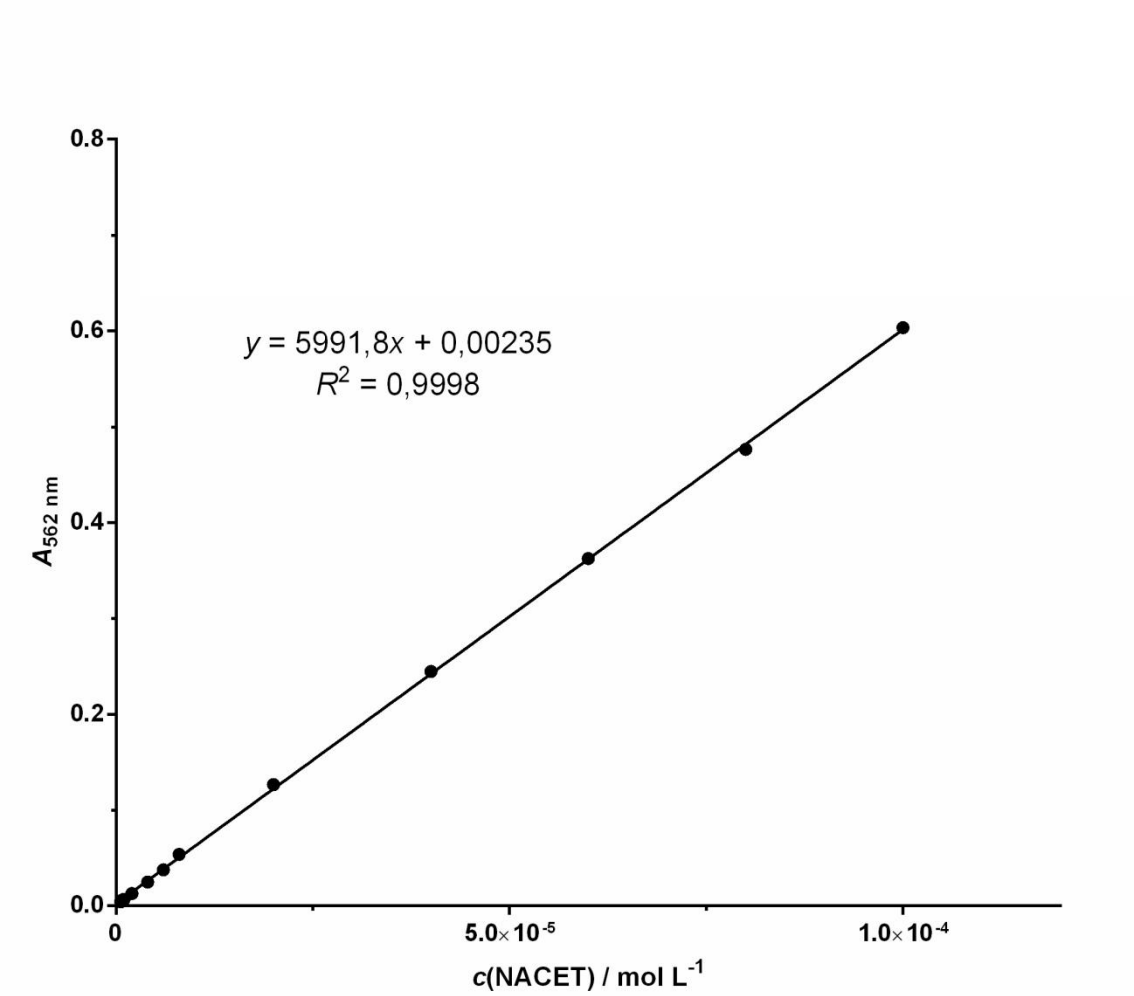
3.2. Linearno dinamičko područje

Primjenom prethodno optimiziranih uvjeta konstruirana je krivulja umjeravanja za područje koncentracija *N*-acetil-L-cistein-etil estera od 6,0 x 10^{-7} do 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Grafička ovisnost apsorbancije o vremenu za svaku od koncentracija u linearno dinamičkom području prikazana je na slici 28.



Slika 28. Apsorbancija kao funkcija proteklog vremena za 12 različitih koncentracija NACET-a u koncentracijskom području od 6,0 x 10^{-7} mol L^{-1} do 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Eksperimentalni uvjeti: otopina uzorka *c*(NACET) = 6,0 x 10^{-7} do 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} ; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} (*c*(Cu^{2+}) = 1,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina BCA (*c*(BCA) = 2,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina fosfatnog pufera (*c*($H_2PO_4^-$/HPO_4^{2-}) = 0,05 mol L^{-1}) volumena 10,0 mL; pH = 6,8 ; brzina protoka je 6,0 mL min^{-1}; volumen protočnog sustava 6,0 mL.

U navedenom koncentracijskom području linearnom regresijskom analizom odnosa izmjerene apsorbancije i koncentracije analita dobivena je jednadžba pravca $y = 5991{,}8\ x + 0{,}00235$ sa zadovoljavajućom linearnošću, $R^2 = 0{,}9998$, što je prikazano na slici 29.



Slika 29. Krivulja umjeravanja za kinetičko spektrofotometrijsko određivanja NACET-a u području koncentracije 6,0 x 10^{-7} do 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

3.2.1. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno dokazati. Izraz za izračunavanje granice dokazivanja može se napisati kako slijedi:

$$D_L = \frac{3 \mathrm{x} s_b}{m} \tag{19}$$

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

Granica određivanja je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Izraz za izračunavanje granice određivanja može se prikazati kako slijedi:

$$Q_L = \frac{10 x s_b}{m} \qquad (20)$$

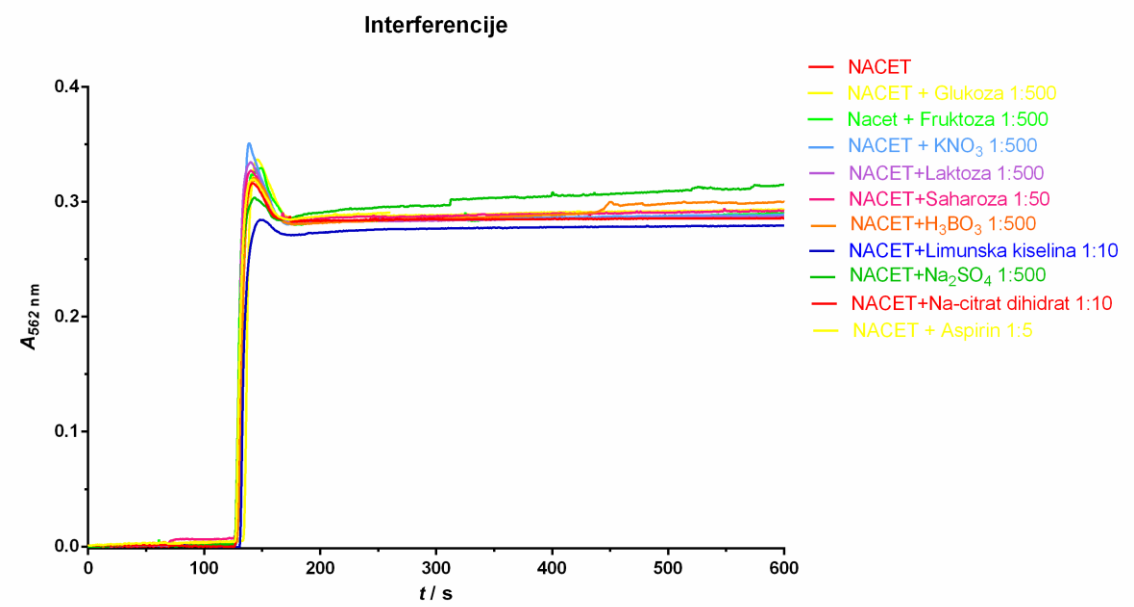
gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a *m* nagib krivulje umjeravanja.

Standardna devijacija iznosi 0,000328 dok je nagib krivulje umjeravanja 5991,8. Granica dokazivanja izračunata je pomoću jednadžbe (19) i iznosi 1,60 x 10^{-7} mol L^{-1}, dok granica određivanja izračunata korištenjem jednandžbe (20) iznosi 5,45 x 10^{-7} mol L^{-1}, što odgovara najnižoj točci linearno dinamičkog područja.

3.3. Utjecaj interferencija

Ispitan je utjecaj interferencija koje se mogu naći u uzorku prilikom određivanja *N*-acetil-L-cistein-etil estera (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}). Apsorbancija analita i interferirajućih vrsta mjeri se pri valnoj duljini od 562 nm kao što je i prikazano na slici 30.

Granica tolerancije definirana je kao koncentracija stranog iona ili tvari koja će prilikom mjerenja izazvati pogrešku manju od ±5 %. Svi rezultati su prikazani u tablici 5.



Slika 30. Grafički prikaz vremenske promjena apsorbancije za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cistein-etil estera u prisustvu različitih interferirajućih vrsta: glukoza, fruktoza, KNO_3, laktoza, saharoza, borna kiselina, limunska kiselina, natrijev sulfat, Na-citrat dihidrat i aspirin. Eksperimentalni uvjeti: otopina uzorka (c(NACET) = 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) volumena 1 mL ; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina BCA (c(BCA) = 2,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina fosfatnog pufera ($c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}; pH = 6,8) volumena 10,0 mL; brzina protoka je 6,0 mL min^{-1}; volumen protočnog sustava 6,0 mL.

Tablica 5. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari.

Vrsta	Dopušteni omjer	Pogreška / %
NACET	/	0,0
NACET+glukoza	1:500	0,56
NACET+fruktoza	1:500	-1,34
NACET+KNO_3	1:500	-1,13
NACET+laktoza	1:500	-0,74
NACET+saharoza	1:50	0,46
NACET+H_3BO_3	1:500	-1,30
NACET+limunska kiselina	1:10	-4,64
NACET+Na_2SO_4	1:500	1,20
NACET+Na-citrat dihidrat	1:10	-0,49
NACET+aspirin	1:5	0,42

Nije zabilježena interferencija *N*-acetil-L-cistein-etil estera s ni jednom od komponenti navedenih u tablici 5.

4. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja koje je prikazano u ovom radu je razvoj i vrednovanje kinetičke metode analize *N*-acetil-L-cistein-etil estera (NACET) uz spektrofotometrijski detektor. Optimizirani su parametri kemijske reakcije s ciljem brzog, preciznog i selektivnog određivanja analita.

Kinetičke analitičke metode omogućuju selektivnost i osjetljivost određivanja u svega nekoliko minuta uz upotrebu odgovarajućeg detektora bez prethodne predobrade uzorka.

Prednost ovog pristupa je brza, automatska analiza kojom se može odrediti veliki broj uzoraka u kratkom vremenskom razdoblju, dok je nedostatak u potrebi za automatizacijom sustava što donekle poskupljuje analizu.

Razvijena i vrednovana kinetička metoda određivanja *N*-acetil-L-cistein-etil estera temelji se na redoks reakciji u kojoj NACET reducira $[Cu(BCA)_2]^{2+}$ kompleks zelene boje u $[Cu(BCA)_2]^{+}$ ljubičasto obojan kompleks čiji se apsorpcijski maksimum bilježi na 562 nm.

Prilikom optimizacije parametara kemijske reakcije konstantnim su držani slijedeći parametri: valna duljina pri kojoj se bilježi apsorbancija (λ = 562 nm), volumen protočne kivete (V = 160 μL), brzina protoka (Q = 6,0 mL min^{-1}) te volumen protočnog sustava (V = 6,0 mL).

Optimizacijom reakcijskih uvjeta odabrani su slijedeći parametri: radna temperatura je 25 ºC, pH otopina fosfatnog pufera je 6,8, omjer koncentracija BCA i Cu^{2+} je 1, omjer Cu^{2+} i NACET je 8 kao i omjer koncentracija BCA i NACET.

Temeljem optimiziranih reakcijskih parametara za izradu krivulje umjeravanja korištena je reakcijska otopina koja ja sadržavala: Cu^{2+} ($c(Cu^{2+})$ = 1,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina bicikoninske kiseline (c(BCA) = 2,0 x 10^{-3}) volumena 2,0 mL; otopina fosfatnog pufera ($c(H_2PO_4^-/HPO_4^{2-})$ = 0,05 mol L^{-1}; pH = 6,8) volumena 10,0 mL.

Postignuto je široko linearno dinamičko područje od 6,0 x 10^{-7} mol L^{-1} do 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, te je određena jednadžba regresijskog pravca y = 5991,8 x + 0,00235. Određen je koeficijent linearne regresije (R^2 = 0,9998) što ukazuje na zadovoljavajuću linearnost, kao i granica dokazivanja (1,60 x 10^{-7} mol L^{-1}) te granica određivanja (5,45 x 10^{-7} mol L^{-1}). Ispitan je i utjecaj pojedinih interferencija na NACET te nije zamijećen nikakav značajan utjecaj na određivanje analita.

Primjena ove metode kod određivanja NACET-a ima nekoliko prednosti. Prije svega omogućuje postizanje širokog linearnog dinamičkog područja, visoku osjetljivost, selektivnost zbog bilježenja signala u kinetičkom dijelu reakcije i brzinu izvođenja analize. Bilježenjem signala u kinetičkom dijelu reakcije postiže se visoka ponovljivost koja omogućava visoku preciznost primijenjene metode. Također ova metoda omogućava određivanje jako niskih koncentracija NACET-a bez upotrebe skupe opreme što je čini i ekonomičnom.

5.LITERATURA

1 *D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, D. Tsikac, R. Rossi*,*N-Acetylcysteine ethyl ester* (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential, Biochemical Pharmacology **84** (2012) 1522-1533

2 *A. J. Brenner, E. D. Harris,* A quantitative test for copper using Bicinchoninic Acid, Analytical Biochemistry **226** (1995) 80-84

3 *A. Bainor, L. Chang, T. J. McQuade, B. Webb, J.E. Gestwicki*, Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume, Analytical Biochemistry **410** (2011) 310-312

4 *D. Harvey*, Modern analytical chemistry, McGraw-Hill Companies Inc., Boston, 2000.

5 *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Kinetic methods of analysis with potentiometric and spectrophotometric detectors - our laboratory experience, Analytical Chemistry (2012) 71-92

6 *D. A. Skoog, D. M. West, F.J. Holler,* Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

7 *Nj. Radić,L. Kukoč-Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2015.

8 *Nj. Radić, L. Kukoč Modun, M. Biočić*, Kinetic spectrophotometric determination of N-Acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent. Croat. Chem. Acta. 2013; str.65-71

9 *Z. Jakobović*, Ionizirajuće zračenje i čovjek, Školska knjiga, Zagreb,1991.

10 URL:http://media.biocompare.com/m/37/article/o/130997B.jpg (28.05.2016.)

11 *H. Bode, J. Fresenius*, Anal. Chem. 339, 898. (1991)

[12] *D. C. Harris*, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2003