

Razvoj i vrednovanje spektrofotometrijske metode određivanja N-acetil - L-cistein etil estera slijednom analizom injektiranjem

Perić, Ivana

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:167:587812>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**RAZVOJ I VREDNOVANJE
SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE
ODREĐIVANJA *N*-ACETIL-*L*-CISTEIN ETIL ESTERA
SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM**

DIPLOMSKI RAD

Ivana Perić

49

Split, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
Diplomski studij kemije
Smjer: Organska kemija i biokemija

RAZVOJ I VREDNOVANJE
SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE
ODREĐIVANJA *N*-ACETIL-*L*-CISTEIN ETIL ESTERA
SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM

DIPLOMSKI RAD

Ivana Perić

49

Split, srpanj 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
Graduate study of Chemistry
Orientation: Organic Chemistry and Biochemistry

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF
SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF DETERMINATION
OF *N*-ACETYL-L-CYSTEINE ETHYL ESTER
USING SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS**

DIPLOMA THESIS

Ivana Perić

49

Split, July 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Pomoć pri izradi: Maja Biočić, mag. ing. chem. ing.

RAZVOJ I VREDNOVANJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA N-ACETIL-L-CISTEIN ETIL ESTERA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM

Ivana Perić, 49

Sažetak: Korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cistein etil estera (NACET). Temelji se na redoks reakciji u kojoj NACET sudjeluje kao reducens pri čemu nastaje ljubičasto obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ kompleks koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 562 \text{ nm}$. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni parametri protočnog sustava koji omogućuju pouzdano određivanje NACET-a uz jednostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ te uz dvostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linearno dinamičko područje je uz jednostrano injektiranje reagensa definirano jednadžbom: $y = 3483,4x + 0,0063$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9900$, dok je uz dvostrano injektiranje reagensa definirano jednadžbom: $y = 3879,8x - 0,0045$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9994$. Određene su granica dokazivanja ($2,22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) i granica određivanja ($7,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) za određivanje NACET-a uz jednostrano te granica dokazivanja ($1,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) i granica određivanja ($5,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) za određivanje NACET-a uz dvostrano injektiranje reagensa. Ponovljivost signala ima relativno standardno odstupanje od 2,51 % uz jednostrano injektiran reagens te 1,66 % uz dvostrano injektiran reagens. Utvrđeno je i da naizmjeničnim injektiranjem otopina standarda koje su sadržavale različite koncentracije NACET-a ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije NACET-a. Navedeno se odnosi na određivanje NACET-a uz jednostrano te uz dvostrano injektiranje reagensa. Tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju.

Glavne riječi: slijedna analiza injektiranjem, NACET, spektrofotometrijsko određivanje

Rad sadrži: 61 stranicu, 43 slike, 6 tablica, 2 priloga, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Renato Tomaš - predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivica Blažević - član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član-mentor

Datum obrane: 05.07.2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

Mentor: PhD Lea Kukoč Modun, assistant professor

Technical assistance: Maja Biočić, mag. ing. chem. ing.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF DETERMINATION OF *N*-ACETYL-L-CYSTEINE ETHYL ESTER USING SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS

Ivana Perić, 49

Abstract: A novel sequential injection spectrophotometric method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine ethyl ester (NACET) was developed and validated. The method is based on a redox reaction in which the reduction of $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ complex by NACET occurs forming a violet $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ complex with absorption maximum at $\lambda = 562$ nm. Univariate method was used to select optimal parameters of the flow system for a successful and reliable determination of NACET by standard sampling in the concentration range of the selected analyte of $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and by sandwich sampling in the concentration range of the selected analyte of $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linear dynamic range obtained by standard and sandwich sampling was $y = 3483.4x + 0.0063$ ($R^2 = 0.9900$) and $y = 3879.8x - 0.0045$ ($R^2 = 0.9994$) respectively. Limit of detection and limit of quantification were found to be $2.22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $7.46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for standard sampling. For sandwich sampling limit of detection and limit of quantification were found to be $1.60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $5.34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The reproducibility or precision of the method was evaluated by examining the relative standard deviation which was 2.51 % for standard and 1.66 % for sandwich sampling. The obtained results are considered to be satisfactory. Injection of standard solutions containing different concentrations of NACET did not cause signal carryover for standard and sandwich sampling. Commonly present compounds that accompany similar thiols in their pharmaceutical preparations did not show an interfering effect.

Keywords: sequential injection analysis, NACET, spectrophotometric determination

Thesis contains: 61 pages, 43 figures, 6 tables, 2 supplements, 25 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. PhD Renato Tomaš, associate professor - chair person
2. PhD Ivica Blažević, assistant professor - member
3. PhD Lea Kukoč Modun, assistant professor - supervisor

Defence date: July 05 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad izrađen je pod mentorstvom doc. dr. sc. Lee Kukoč Modun, Zavod za analitičku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, uz neposredno voditeljstvo Maje Biočić, mag. ing. chem. ing. u razdoblju od veljače do travnja 2016.

*All our dreams can come true, if we have
the courage to pursue them.*

Walt Disney

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je optimizacija i vrednovanje spektrofotometrijske metode određivanja *N*-acetil-L-cistein etil estera primjenom slijedne analize injektiranjem.

Optimizacija metode uključuje optimizaciju parametara protočnog sustava i optimizaciju kemijskih parametara:

1. redoslijeda injektiranja analita i reagensa
2. brzine protoka osnovne otopine
3. volumena injektiranja reagensa i analita
4. volumena petlje zadržavanja i duljine reakcijske petlje
5. koncentracije reagensa.

Korištenjem optimiziranih parametara protočnog sustava i optimiziranih kemijskih parametara potrebno je odrediti analitičke karakteristike razvijene metode:

- a) područje djelovanja Beerovog zakona (linearno dinamičko područje)
- b) jednadžbu regresijskog pravca (nagib i odsječak)
- c) koeficijent linearne regresije R^2
- d) granicu dokazivanja
- e) granicu određivanja
- f) ponovljivost (relativno standardno odstupanje)
- g) prenošenje signala
- h) utjecaj interferencija.

SAŽETAK

Korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor optimizirana je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cistein etil estera (NACET). Temelji se na redoks reakciji u kojoj NACET sudjeluje kao reducens pri čemu nastaje ljubičasto obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ kompleks koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 562 \text{ nm}$. Univarijantnom metodom odabrani su optimalni parametri protočnog sustava koji omogućuju pouzdano određivanje NACET-a uz jednostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ te uz dvostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linearno dinamičko područje je uz jednostrano injektiranje reagensa definirano jednadžbom: $y = 3483,4x + 0,0063$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9900$, dok je uz dvostrano injektiranje reagensa definirano jednadžbom: $y = 3879,8x - 0,0045$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9994$. Određene su granica dokazivanja ($2,22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) i granica određivanja ($7,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) za određivanje NACET-a uz jednostrano te granica dokazivanja ($1,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) i granica određivanja ($5,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) za određivanje NACET-a uz dvostrano injektiranje reagensa. Ponovljivost signala ima relativno standardno odstupanje od 2,51 % uz jednostrano injektiran reagens te 1,66 % uz dvostrano injektiran reagens. Utvrđeno je i da naizmjeničnim injektiranjem otopina standarda koje su sadržavale različite koncentracije NACET-a ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije NACET-a. Navedeno se odnosi na određivanje NACET-a uz jednostrano te uz dvostrano injektiranje reagensa. Tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka ne interferiraju.

Ključne riječi: NACET, spektrofotometrijsko određivanje, slijedna analiza injektiranjem

SUMMARY

A novel sequential injection spectrophotometric method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine ethyl ester (NACET) was developed and validated. The method is based on a redox reaction in which the reduction of $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ complex by NACET occurs forming a violet $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ complex with absorption maximum at $\lambda = 562 \text{ nm}$. Univariate method was used to select optimal parameters of the flow system for a successful and reliable determination of NACET by standard sampling in the concentration range of the selected analyte of $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and by sandwich sampling in the concentration range of the selected analyte of $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linear dynamic range obtained by standard and sandwich sampling was $y = 3483.4x + 0.0063$ ($R^2 = 0,9900$) and $y = 3879.8x - 0.0045$ ($R^2 = 0,9994$) respectively. Limit of detection and limit of quantification were found to be $2.22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $7.46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for standard sampling. For sandwich sampling limit of detection and limit of quantification were found to be $1.60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $5.34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The reproducibility or precision of the method was evaluated by examining the relative standard deviation which was 2.51 % for standard and 1.66 % for sandwich sampling. The obtained results are considered to be satisfactory. Injection of standard solutions containing different concentrations of NACET did not cause signal carryover for standard and sandwich sampling. Commonly present compounds that accompany similar thiols in their pharmaceutical preparations did not show an interfering effect.

Keywords: NACET, spectrophotometric determination, sequential injection analysis

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Kinetičke metode mjerenja.....	2
1.2. Protočne metode analize	3
1.2.1. Injektiranje u protok.....	4
1.2.2. Slijedno injektiranje	5
1.2.2.1. Formiranje zone.....	6
1.2.3. Injektiranje u suspenziju čestica.....	7
1.2.4. Slijedna injekcijska kromatografija.....	8
1.3. Spektroskopija.....	9
1.3.1. Elektromagnetski spektar	9
1.3.2. Apsorpcija zračenja.....	10
1.3.3. Beerov zakon: odnos između apsorbancije i koncentracije	11
1.3.3.1. Ograničenja Beerovog zakona.....	12
1.3.4. Molekulska apsorpcijska spektroskopija	13
1.3.4.1. Spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo zračenje.....	13
1.4. <i>N</i> -acetil-L-cistein etil ester (NACET)	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO	16
2.1. Materijali	16
2.1.1. Priprava otopina	16
2.2. Instrumenti i uređaji.....	18
2.2.1. Instrumenti za provedbu slijedne analize injektiranjem	18
2.2.2. Ostali uređaji i oprema	19
2.3. Metode rada.....	20
3. REZULTATI I RASPRAVA	22
3.1. Optimizacija parametara protočnog sustava	24
3.1.1. Optimizacija brzine protoka	25
3.1.2. Optimizacija parametara protočnog sustava uz jednostrano injektiranje reagensa	26
3.1.2.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja	26
3.1.2.2. Optimizacija volumena injektiranja otopine reagensa	27
3.1.2.3. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita.....	28
3.1.2.4. Optimizacija volumena petlje zadržavanja	29
3.1.2.5. Optimizacija duljine reakcijske petlje.....	29
3.1.3. Optimizacija parametara protočnog sustava uz dvostrano injektiranje reagensa	31
3.1.3.1. Optimizacija volumena injektiranja otopine reagensa	31
3.1.3.2. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita.....	32
3.1.3.3. Optimizacija volumena petlje zadržavanja	33
3.1.3.4. Optimizacija duljine reakcijske petlje.....	34
3.1.4. Odabrani optimalni parametri	35

3.2. Optimizacija kemijskih parametara	36
3.2.1. Optimizacija komponenti otopine reagensa.....	36
3.2.1.1. Optimizacija komponenti otopine reagensa uz jednostrano injektiranje reagensa	37
3.2.1.2. Optimizacija komponenti otopine reagensa uz dvostrano injektiranje reagensa	39
3.3. Analitičke karakteristike metode	41
3.3.1. Linearno dinamičko područje.....	41
3.3.2. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	44
3.3.3. Ponovljivost - relativno standardno odstupanje.....	45
3.3.4. Prenosjenje signala.....	46
3.4. Utjecaj interferencija	48
3.4.1. Utjecaj interferencija ispitan uz jednostrano injektiranje reagensa.....	48
3.4.2. Utjecaj interferencija ispitan uz dvostrano injektiranje reagensa.....	52
3.4.3. Usporedba utjecaja interferirajućih tvari uz jednostrano i dvostrano injektiranje reagensa	55
4. ZAKLJUČAK.....	57
5. LITERATURA	59
6. PRILOZI.....	61

UVOD

Razvoj metoda analize temeljenih na analizi u protoku ubrzao je prihvaćanje koncepta automatizacije i razvoj kompjuterskih mikro sustava koji su omogućili razvoj sustava za slijednu analizu injektiranjem. Slijedna analiza injektiranjem (SIA) spada u kinetičke analitičke metode jer se signal uzorkuje pod fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim neravnotežnim uvjetima, tj. u trenutku kad reakcija nije ušla u stanje termodinamičke ravnoteže.

U fokusu ovog istraživanja je sintetski tiolni spoj *N*-acetil-L-cistein etil ester (NACET) koji ima reduksijsko djelovanje te pokazuje potencijal za djelovanje kao mukolitik i antidot kod predoziranja paracetamolom, odnosno kao zamjena za *N*-acetil-L-cistein (NAC) budući je NAC, uz cistein (Cys), produkt hidrolize NACET-a.¹

Osnovni cilj ovog istraživanja je razvoj nove, jednostavne i osjetljive spektrofotometrijske metode određivanja NACET-a uporabom SIA sustava. Opisana metoda temelji se reakciji nastajanja stabilnog ljubičastog kompleksa $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ koji apsorbira pri valnoj duljini $\lambda = 562 \text{ nm}$. U postupku razvoja ove metode optimizirane su osnovne značajke protočnog sustava kojim se, uz minimalnu potrošnju otopina uzorka i reagensa, ostvarila dobra osjetljivost metode i učestalost mjerenja.

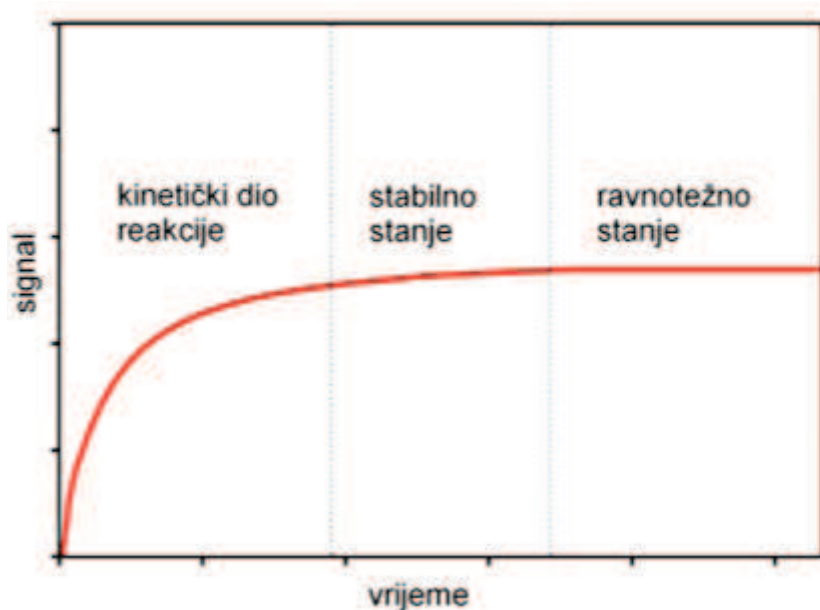
Ovaj rad izrađen je u suradnji s Tomislavom Kraljevićem, mag. chem. et info. koji se u svom doktorskom istraživanju bavi razvojem kinetičkih metoda određivanja NACET-a uz spektrofotometrijski detektor.

1. OPĆI DIO

1.1. Kinetičke metode mjerenja

Osnovne vrste reakcija koje se koriste u svrhu određivanja obuhvaćaju mjerenja u ravnotežnom stanju: kiselo-bazne reakcije (izmjena protona), redoks reakcije (izmjena elektrona), reakcija nastajanja kompleksa (izmjena liganada) i taloženje (izmjena iona). Ova četiri osnovna tipa homogenih, heterogenih ravnoteža iskoristiva su i kod kinetičkih mjerenja.²

Kinetičke analitičke metode se razlikuju od ravnotežnih ili termodinamičkih. Mjerenja u kinetičkim analitičkim metodama obavljaju se pod dinamičkim uvjetima, a analitički signal je pojavljivanje produkata ili nestajanje reaktanata. Kinetičke metode upotrebljavaju se u vremenskom intervalu u kojem se koncentracije reaktanata i produkata konstantno mijenjaju, a brzina nestajanja reaktanata i nastajanja produkata se mjeri na odgovarajući način.³ Signal se, kod sustava pod kinetičkom kontrolom, mijenja s vremenom (slika 1-1).



Slika 1-1 Ovisnost signala o proteklom vremenu kod sustava pod kinetičkom kontrolom.¹

Mjerenja se kod termodinamičkih metoda obavljaju u reakcijskim sustavima koji se nalaze u ravnotežnom ili barem stabilnom stanju te su koncentracije prihvatljivo konstantne. Signal se bilježi nakon što kemijski sustav uđe u stanje ravnoteže te koncentracije reaktanata i produkata postanu stalne, a samim time i signal konstantan (slika 1-1).

Kinetičke metode određivanja omogućavaju primjenu reakcija koje su prespore ili nepotpune za postupke temeljene na termodinamičkim uvjetima.³ Izrazito su pogodne za analizu jer omogućavaju osjetljivo i selektivno određivanje u svega nekoliko minuta uz upotrebu odgovarajućeg detektora bez predobrade uzorka.⁴

Odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razliku u brzinama kojima reagiraju analit i moguće interferencije postiže se selektivnost određivanja.³ Ukoliko je razlika brzina reakcija analita i drugih vrsta u smjesi dovoljno velika, moguće je i određivanje analita u smjesi.² Uvjeti koji moraju biti zadovoljeni da bi se neka kemijska reakcija mogla koristiti prilikom kinetičkog određivanja su brzina, red reakcije i mogućnost praćenja promjene koncentracija reaktanata ili produkata. Kemijska reakcija mora biti dovoljno brza da se završi u razumnom vremenu, a dovoljno spora da se stanje ravnoteže ne postigne dok se reagensi miješaju.³ Brzina je važna i kod određivanja analita u smjesi, jer su kinetičke metode određivanja moguće samo kada je razlika brzina reakcija analita i drugih vrsta u smjesi dovoljno velika.² Red reakcije mora biti poznat, čime je omogućeno određivanje kinetičkih parametara, kao što su brzina reakcije i koncentracija. Posljednji uvjet je mogućnost praćenja odvijanja reakcije, prateći promjenu koncentracije jednog od reaktanata ili produkata kao funkciju vremena.³

1.2. Protočne metode analize

Analiza injektiranjem u protok (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA) je skupina tehnika koja je tijekom posljednjih 30 godina doprinijela automatizaciji, učestalosti analiza te smanjenju volumena uzoraka i reagensa, a ostvarila je i nižu cijenu analiza. U samim počecima razvoja protočne analize injektiranjem većina instrumentacije sastavljena je od komponenti koje se inače koriste u analitičkom laboratoriju, dok je danas moguće kupiti gotove FIA sustave, za različite namjene.⁵

Protočne metode analize spadaju u kinetičke analitičke metode, jer se signal uzrokuje pod fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim neravnotežnim uvjetima odnosno kada reakcija nije ušla u stanje termodinamičke ravnoteže.⁶

Protočne metode analize dijele se u četiri kategorije: injektiranje u protok (engl. *Flow Injection*, FI), slijedno injektiranje (engl. *Sequential Injection*, SI), injektiranje u suspenziju čestica (engl. *Bead Injection*, BI) i slijedna injekcijska kromatografija (engl. *Sequential Injection Chromatography*, SIC).⁵

1.2.1. Injektiranje u protok

Ružička i Hansen su 1975. prvi opisali koncept analize u protoku primjenom protočne analize injektiranjem (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA).⁷

Ključne karakteristike protočne analize injektiranjem omogućile su njeno brzo prihvaćanje: lako razumljiva temeljna načela i jednostavna izvedba, mjerni sustav lako može biti sastavljen od jednostavnih i dostupnih komponenti te pruža jednostavan način za automatizaciju mnogih analitičkih postupaka.

Osnovne komponente sustava za protočnu analizu injektiranjem su: peristaltička crpka koja osigurava protok osnovne otopine, injekcijski ventil kojim se mikrolitarski volumeni uzorka injektiraju u struju osnovne otopine te detektor za određivanje sastava struje otopine koja kroz njega prolazi. Navedene komponente povezane su prijenosnim sustavom koji omogućava spajanje struja različitih otopina i miješanje uzorka s osnovnom otopinom (slika 1-2).⁸



Slika 1-2 Shematski prikaz sustava za protočnu analizu injektiranjem.⁹

Primjena protočne analize injektiranjem omogućava injektiranje točno određenog volumena otopine uzorka u struju osnovne otopine koja može biti inertna ili je i sama reagens. Injektirani uzorak formira zonu koja se dalje prenosi prema detektoru. U sustavu se simultano odvijaju dva kinetička procesa: fizikalni proces raspršenja (disperzije) zone uzorka i kemijski proces formiranja detektibilne vrste. Na granici zona reagensa i uzorka formira se produkt kemijske reakcije koji se može odrediti protočnim detektorom.

Osnovne prednosti analize u protoku su jednostavan mjerni sustav, osigurana ponovljivost injektiranja točnih volumena uzorka, kontrolirana disperzija, ponovljivi signali i velik broj analiza u jedinici vremena.⁸

1.2.2. Slijedno injektiranje

Slijedna analiza injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA) je druga generacija FIA sustava, a opisali su je Ružička i Marshall 1990. godine.¹⁰

Sastoji se od: dvosmjernе crpke koja usisava osnovnu otopinu u sustav, više-pozicijskog selekcijskog ventila koji omogućuje slijedno injektiranje nekoliko različitih otopina uzorka ili reagensa, petlje zadržavanja, reaktora i detektora (slika 1-3).¹¹



Slika 1-3 Shematski prikaz sustava za slijednu analizu injektiranjem.¹²

Ovaj sustav temelji se na injektiranju slijeda uzoraka i reagensa u struju otopine nositelja. Zona uzorka i zona reagensa injektiraju se jedna pored druge u struju nositelja te se tijekom procesa raspršuju jedna u drugoj i na njihovom sučelju se formira produkt reakcije. Protokom kroz detektor bilježe se promjene u odabranom fizikalnom parametru.

Odziv SIA sustava je, kao i kod FIA sustava, rezultat dvaju istovremenih kinetičkih procesa: fizikalnog procesa disperzije zone uzorka i kemijskog procesa formiranja detektibilne vrste. Na granici zona reagensa i uzorka formira se produkt kemijske reakcije čijim je prolaskom kroz protočnu kivetu odziv detektora zabilježen kao koncentracijski gradijent (zbrojni vremenski signal, pik).

Prednost sustava SIA u odnosu na sustav FIA je mnogo manja potrošnja reagensa i stvaranje manje količine otpadnih kemikalija. Napredak u SIA tehnici je korištenje programiranja protoka za optimizaciju pojedinih koraka analitičkog postupka. To je zajedno s tehnološkim napretkom u dizajnu ventila i crpke te kontroli temperature omogućilo postizanje podjednake učestalosti analiza kao kod FIA sustava.

Posebnost sustava SIA je poboljšana kontrolirana disperzija zona uzorka i reagensa uzrokovana promjenom smjera protoka u petlji zadržavanja.

Tehnika razdvajanja omogućuje različite analize odabrane količine određenog uzorka, što omogućava dobivanje višestrukih informacija.

Glavne karakteristike SIA sustava su: visoka učestalost analiza, širok raspon područja koncentracija i visoka osjetljivost. SIA sustav odlikuju i konstantan protok, niska potrošnja reagensa, mala količina otpada, robusnost te ponovljivost.

SIA je originalno projektirana za praćenje industrijskih procesa te nije bilo potrebe za minijaturizacijom aparature jer su robusnost i pouzdanost bile važnije karakteristike od velike učestalosti analiza i niske potrošnje otopina uzorka i reagensa. No, napretkom u razvoju spektrofotometrijskih detektora, optički put se smanjio i integrirao u protočnu kivetu s monolitnom strukturom smještenom na vrhu više-pozicijskog ventila te je nastao laboratorij na ventilu (engl. *Lab-On-Valve*, LOV) koji je poslužio kao platforma za treću generaciju FIA sustava, injektiranje u suspenziju čestica (engl. *Bead Injection*, BI).

1.2.2.1. Formiranje zone

U uvjetima protoka zona uzorka se prenosi do detektora i pri tome se miješa s osnovnom otopinom i zonom reagensa. Miješanjem zona dolazi do kontinuiranog razrjeđenja i nastajanja produkta reakcije. Ovaj proces se naziva disperzija ili kontrolirana disperzija.

Disperzija (raspršenje) je složen proces koji možemo opisati kao dinamično, ali ponovljivo miješanje zone uzorka sa zonom reagensa i (ili) nositelja uzrokovano dinamikom fluida u protoku kroz savijene cjevčice (reakcijska petlja ili petlja zadržavanja). Smanjenjem disperzije uzorka, povećava se visina i smanjuje se širina signala (pika), čime se povećava osjetljivost, snižava granica određivanja te pospješuje dinamika mjerenja. Osnovni pojam u definiranju disperzije je ponovljivost. Disperzija je ponovljiva u vremenu trajanja protočne analize, ako su varijable protočnog sustava o kojima ovisi konstantne.

Na slici 1-4 prikazana je disperzija u SIA sustavu. Injektiranjem uzorka (A) te zatim reagensa (B) u struju osnovne otopine, reagens prodire u područje uzorka zbog aksijalne disperzije. Zatim se kao formirana zona premješta dalje uzvodno (C). Nakon promjene smjera toka (D) dolazi do turbulentnog strujanja uzrokovanog ubrzanjem radijalne i aksijalne disperzije. Kada reakcijska smjesa dođe do detektora (E) radijalna disperzija je završena.¹¹



Slika 1-4 Formiranje zone koja se prenosi do detektora (zona uzorka miješa se s osnovnom otopinom i zonom reagensa pri čemu nastaje produkt reakcije).¹³

Disperziji uzorka doprinosi difuzija zbog koncentracijskog gradijenta između uzorka i osnovne otopine. Kao što je prikazano na slici 1-5, difuzija se javlja paralelno (aksijalno) i okomito (radijalno) na smjer gibanja fluida. U slijednoj analizi injektiranjem važna je samo radijalna difuzija. Radijalna difuzija smanjuje linearnu brzinu uzorka u sredini cijevi, dok povećava linearnu brzinu prema stijenci cijevi.¹¹



Slika 1-5 Aksijalna i radijalna difuzija.¹⁴

1.2.3. Injektiranje u suspenziju čestica

Injektiranje u suspenziju čestica (engl. *Bead Injection*, BI) je treća generacija protočnih sustava.

Temelji se, kao i SIA, na slijednom injektiranju uzorka i reagensa u struju otopine nositelja, nakon čega slijedi promjena smjera protoka koja promiče uzajamno disperziju injektiranih zona. Protok struje nositelja također kontrolira računalni program. BI koristi suspenzije prikladnih materijala u obliku okruglih čestice koje se koriste za formiranje kolone sa čvrstim reagensima ili prikladnim ligandima.

U najjednostavnijem obliku, određeni volumen suspenzije mikročestica se injektira u cijev gdje se čestice zarobljavaju na odabranim mjestima. Zona uzorka se injektira i propušta kroz sloj čestica dok komponente uzorka reagiraju s funkcionalnim skupinama na površini čestica. Zadržane molekule analita detektirane su spektroskopski u izvornom obliku ili su reagirale *in situ* s odgovarajućom bojom ili fluorescentnim reagensom. Ciljane molekule za detekciju mogu biti eluirane nizvodno. Na kraju procesa, čestice se transportiraju obrnutim protokom na drugu lokaciju ili se odbacuju.

Jedinstvena prednost BI je automatska obnova reaktivne krute faze. Razvijene su dvije različite metode BI, spektroskopsko injektiranje u suspenziju čestica (engl. *Bead Injection Spectroscopy*, BIS) i obnovljiva kolonska kromatografija. U jednoj metodi reagens je imobiliziran na česticama, dok je u drugoj analit zarobljen na površini čestica.

Prednosti BI tehnike su jednostavna izvedba i ponovljivost, dok su potencijalni problemi: kontroliranje količine injektiranih čestica, ponovljivost gustoće pakiranja čestica kroz kolonu, neravnomjeran protok uzorka kroz kolonu, uklanjanje čestica iz protočne kivete te razlika u apsorpciji zbog prisutnosti čestica.¹⁵

1.2.4. Slijedna injekcijska kromatografija

Kromatografija slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Chromatography*, SIC) je kombinacija dviju tehnika, tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i slijedne analize injektiranjem. Koristi mogućnosti programiranog protoka za odvajanje komponenti, na temelju razlike u vremenu zadržavanja, na kratkim kolonama.

Provodi se na monolitnoj koloni koristeći srednji tlak pumpe ili na mikrokoloni koristeći konvencionalnu niskotlačnu crpku. Može se izvesti u obrnutoj fazi, ionskoj izmjeni ili kromatografskom formatu. Prednosti SIC-a su: raznolikost operacija, softverski određeni volumeni, ubrzanje osnovnih operacija (kondicioniranje i ispiranje kolone) te je cijena višestruko niža od cijene HPLC-a.¹⁶

1.3. Spektroskopija

Izraz spektroskopija se, s povijesnog gledišta, odnosio na granu znanosti koja se bavila vidljivim zračenjem razlučenim na komponente, valne duljine, koje tvore spektar.¹⁷ Spektrofotometrijske tehnike se često koriste zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti budući da se nalaze u skoro svim analitičkim laboratorijima.²

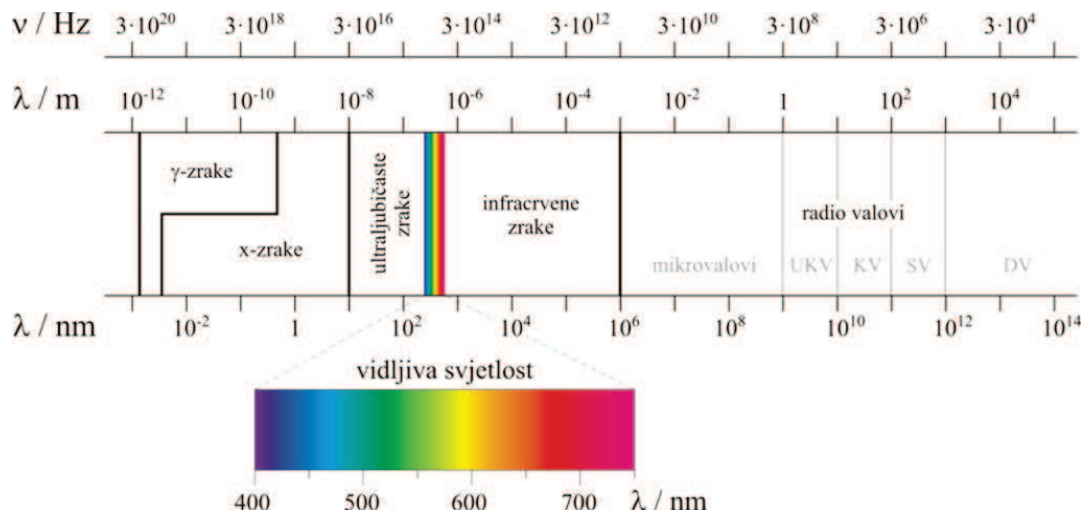
1.3.1. Elektromagnetski spektar

Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja velikom brzinom prolazi prostorom. Svojstva elektromagnetskog zračenja opisuju se valnom duljinom, brzinom, frekvencijom i amplitudom. Budući da valni model ne može opisati pojave vezane s apsorpcijom zračenja, elektromagnetsko zračenje se promatra kao struja pojedinačnih, (diskretnih) čestica energije koji se nazivaju fotonima. Energija fotona E je pritom razmjerna frekvenciji zračenja ν te je prikazana jednačbom:

$$E = h \cdot \nu \quad (1-1)$$

u kojoj je h Planckova konstanta koja iznosi $6,63 \times 10^{-34}$ Js.

Elektromagnetski spektar obuhvaća široko područje valnih duljina (slika1-6).



Slika 1-6 Osnovna podjela elektromagnetskog spektra.¹⁸

Područje valnih duljina od 190 do 1100 nm primjenjivo je u analitičkoj spektroskopiji jer posjeduje energiju koja odgovara elektronskim prijelazima.¹⁷

1.3.2. Apsorpcija zračenja

Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta, prisutna u propusnoj sredini, selektivno prigušuje frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica (atom, ion, molekula) ima jedinstven skup i raspored energijskih stanja, pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu prevodeći je u više energijsko, pobuđeno stanje. Pobuđivanje vrste M u ekscitiranu vrstu M* može se opisati jednačicom:



Nakon vrlo kratkog vremenskog razdoblja ($10^{-6} - 10^{-9}$ s) pobuđena se vrsta relaksira do stanja niže energije prenoseći pritom suvišak energije drugim atomima ili molekulama u okolini. Taj proces uzrokuje malo povišenje temperature okoliša i može se izraziti jednačicom:

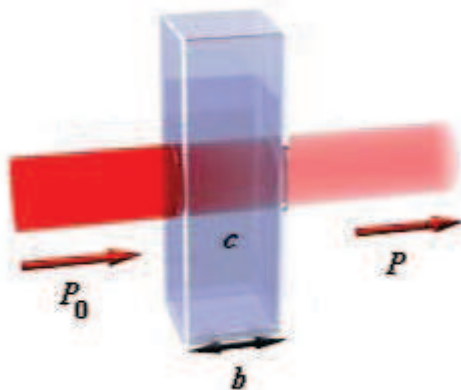


Vrijeme života pobuđenih čestica je toliko kratko da je njihova koncentracija u bilo kojem trenutku zanemariva. Količina toplinske energije otpuštene tijekom relaksacije toliko je mala da se ne može ni detektirati. Stoga se apsorpcijskim mjerenjima najmanje moguće remeti energija promatranog sustava.

Apsorpcijske značajke pojedine vrste opisuju se grafičkim prikazom neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, valnog broja ili frekvencije koji se naziva apsorpcijskim spektrom. Kod takvih prikaza vertikalna os može biti apsorbancija ili propusnost (transmitancija) izražena u postotcima.

Snaga zračenja (P) je energija zračenja koja u jednoj sekundi pada na 1 cm^2 površine detektora. Snaga zračenja snopa se smanjuje kada apsorbirajuća vrsta apsorbira svjetlost.

Snop svjetlosti, snage zračenja P_0 , prolazi kroz sloj otopine, debljine b (izraženo u cm) i koncentracije c , vrste koja apsorbira što za posljedicu ima smanjenje snage snopa s P_0 na P (slika 1-7).¹⁹



Slika 1-7 Snop paralelnog zračenja prije i poslije prolaza kroz sloj otopine debljine b (cm) i koncentracije c vrste koja apsorbira.²⁰

Transmitancija T (propusnost) otopine je dio upadnog zračenja koje je prošlo kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1-4)$$

Apsorbancija A otopine je definirana izrazom:

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P} \quad (1-5)$$

Apsorbancija otopine se povećava s prigušenjem osnovnog snopa, za razliku od transmitancije koja se smanjuje. Kad zračenje nije apsorbirano vrijedi $A = 0$ i $P = P_0$.¹⁹

1.3.3. Beerov zakon: odnos između apsorbancije i koncentracije

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

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c \quad (1-6)$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti (apsorptivnost), a b je duljina puta zračenja kroz uzorak.

Jedinice za apsorptivnost određuju se iz jednadžbe (1-6), jer je apsorbancija bezdimenzijska veličina.

Ako je koncentracija izražena u mol L^{-1} , a duljina puta b u cm, konstanta proporcionalnosti je molarna apsorptivnost ε i izražava se u $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Jednažba (1-6) tada poprima oblik:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1-7)$$

Molarna apsorptivnost je broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbancija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 10,0 mm.

Uzorak kojem se određuje apsorbancija mora biti smješten u posudicu. Međudjelovanje zračenja i stijenki posudice je neizbježno te uzrokuje gubitak refleksijom, ali i apsorpcijom. Uz refleksijske gubitke, raspršenjem na velikim molekulama ili nehomogenostima u otapalu može se smanjiti snaga snopa pri prolasku kroz otopinu. Zbog navedenog se uspoređuju snage zračenja snopa koji je propušten kroz mjernu posudicu punjenu otopinom sa snagom snopa koji prolazi kroz istu posudu punjenu samo otapalom.

Jednadžba (1-8) prikazuje eksperimentalnu apsorbanciju u skladu s Beerovim zakonom.

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P} \quad (1-8)$$

Beerov zakon se, uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta, može primjeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju. Ukupna apsorbancija:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (1-9)$$

1.3.3.1. Ograničenja Beerovog zakona

Prema Beerovom zakonu, apsorbancija je proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste. Kemijska odstupanja posljedica su asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorbira s otapalom, pri čemu nastaju produkti čije se apsorpcijske značajke razlikuju od značajki analita.

Beerov zakon vrijedi za monokromatska zračenja u razrijeđenim otopinama ($c \leq 0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Kad su koncentracije vrste od interesa veće od $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ smanjuju se udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. To za posljedicu ima odstupanje od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji.

Ako se u razrijeđenim otopinama tvari koja apsorbira nalaze visoke koncentracije drugih vrsta pojavljuje se sličan učinak, jer blizina stranih iona i tvari koje apsorbiraju mijenja molarnu apsorptivnost ove druge što uzrokuje odstupanje od Beerovog zakona.¹⁷

1.3.4. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

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

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.

1.3.4.1. Spektrofotometar za ultraljubičasto i vidljivo zračenje

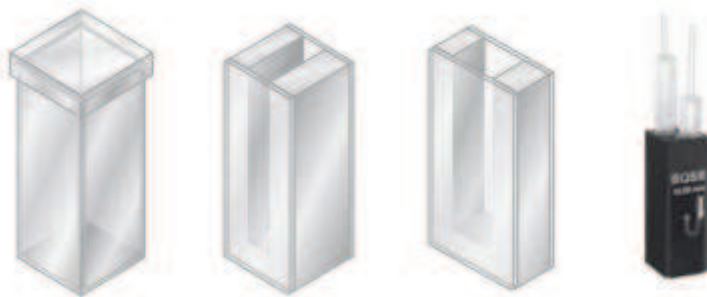
Osnovni dijelovi spektroskopskih uređaja su:

1. izvor zračenja
2. selektor valnih duljina
3. spremnik za uzorke
4. detektor zračenja
5. procesor signala i uređaj za njegovo očitavanje.

Izvor zračenja mora biti stabilnog i snažnog zračenja koji omogućava jednostavnu detekciju i mjerenje. Žarulja s volframovom niti je izvrstan izvor za područje valnih duljina od 350 do 2500 nm, dok vodikova i deuterijeva žarulja emitiraju zračenje u području valnih duljina od 160 do 400 nm.¹⁹

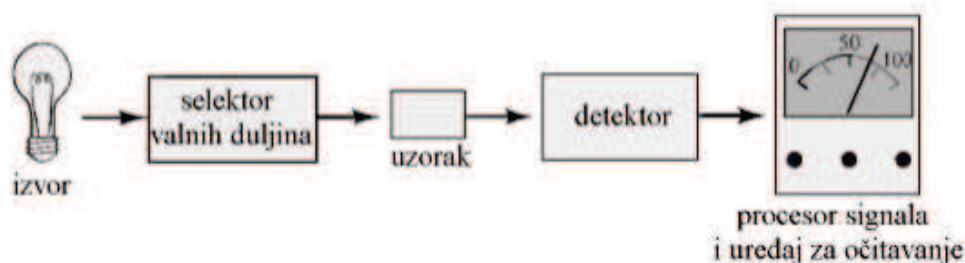
Selektor valnih duljina izdvaja određeno valno područje, skupinu susjednih valnih duljina koja se naziva vrpca. Te valne duljine raspoređene su oko nominalne valne duljine. Širina vrpce selektora je širina vrpce koja odgovara širini maksimuma u polovici njegove visine, a izražava se u jednicama valne duljine. Za proizvodnju uskih vrpca koriste se monokromatori i filtri. Kod monokromatora se izlazne valne duljine mogu kontinuirano mijenjati u relativno širokom spektralnom području, a filtri apsorbiraju sve valne duljine kontinuiranog izvora, osim jedne ograničene vrpce.¹⁷

Spremnici za uzorke imaju prozore izrađene od materijala koji je proziran u određenom spektralnom području. Kvarc se upotrebljava između 190 i 3000 nm, silikatno staklo između 375 i 2000 nm, a plastika između 400 i 760 nm. Za rad u ultraljubičastom i infracrvenom području najčešće se koriste kivete čiji je optički put 10,0 mm (slika 1-8).¹⁹

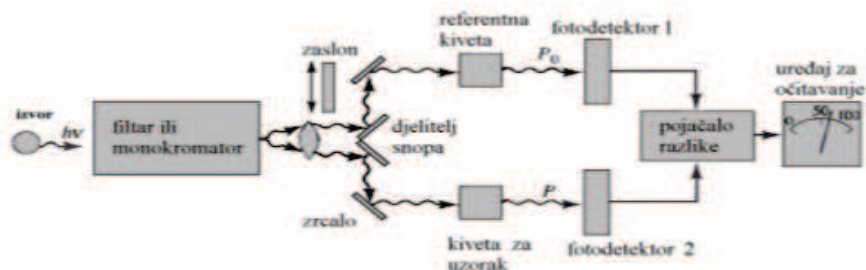


Slika 1-8 Kivete za spektrofotometrijska mjerenja.²¹

Detektor pokazuje postojanje fizičke promjene. Naime, detektor proizvodi električni signal kada u njega udare fotoni, a odgovor detektora je funkcija valne duljine upadnog zračenja. Postoje jednosnopni (slika 1-9) i dvosnopni (slika 1-10) instrumenti za spektrofotometrijska mjerenja. Kod jednosnopnih se instrumenata kiveta s uzorkom i kiveta s referentnom otopinom naizmjenično smještaju u snop zračenja pa nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorbancija kao funkcija proteklog vremena. Kod dvosnopnih instrumenata jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, a drugi istovremeno prolazi kroz uzorak prema drugom, sparenom, fotodetektoru. Oba izlazna signala se pojačavaju, a njihov omjer se određuje elektronički i prikazuje na uređaju za očitavanje.¹⁹



Slika 1-9 Shematski prikaz jednosnopnog spektrofotometra.²²

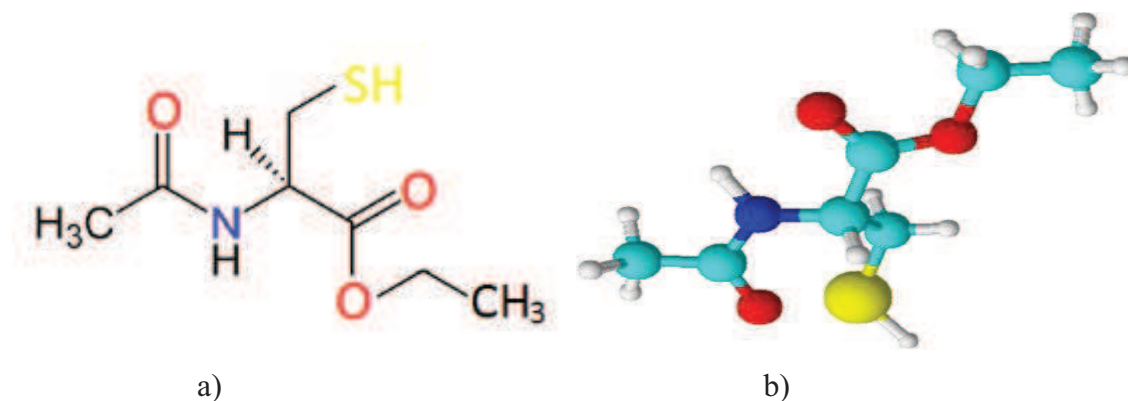


Slika 1-10 Shematski prikaz dvosnopnog spektrofotometra s prostorno razdvojenim snopovima.²²

Procesor signala pojačava električni signal iz detektora, a može i diferencirati, logaritmirati te integrirati signal.¹⁹

1.4. *N*-acetil-L-cistein etil ester (NACET)

Esterifikacijom karboksilne skupine *N*-acetil-L-cisteina (NAC) sintetiziran je tiolni spoj *N*-acetil-L-cistein etil ester (NACET).¹ Naziv ovog spoja prema IUPAC nomenklaturi je etil-2-acetamido-3-sulfanil etil propanoat, a molekulska formula je $C_7H_{13}NO_3S$. Njegova molekulska masa iznosi $191,2 \text{ g mol}^{-1}$.²³



Slika 1-11 *N*-acetil-L-cistein etil ester (NACET); a) strukturna formula, b) kalotni model.

Dobiva se *N*-acetiliranjem L-cistein etil estera u diklormetanu s ekvimolarnom količinom acetanhidrida u atmosferi argona.

Pri sobnoj temperaturi NACET je bijeli prah s točkom taljenja pri 44 °C. Topljiv je u vodi i organskim otapalima. Tiolna skupina je izuzetno reaktivna. Esterifikacijom karboksilne skupine *N*-acetil-L-cisteina povećana je lipofilnost molekule.

NACET se brzo apsorbira nakon oralne upotrebe, ali je njegova koncentracija u plazmi niska što je posljedica brzog ulaska u stanice. Produkti hidrolize NACET-a su *N*-acetil-L-cistein (NAC) i cistein (Cys). Oralnom upotrebom značajno se podiže razina glutationa, koji služi za inaktivaciju štetnog metabolita nastalog u slučajevima predoziranja acetaminofenom (paracetamol) u svim tkivima, čak i u mozgu. Jedinstvena karakteristika je da se akumulira u eritrocitima gdje služi kao potencijalna zaštita od oksidacijskih oštećenja izazvanih peroksidima. Također, NACET se pokazuje i kao dobar kandidat za oralnu upotrebu kao izvor sumporovodika (H₂S) koji ima regulacijsko i zaštitno djelovanje.

NACET ima redukcijska svojstva te pokazuje potencijal za djelovanje kao mukolitik i kao antidot kod predoziranja paracetamolom, odnosno kao zamjena za NAC.¹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijali

2.1.1. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljenje su od kemikalija čistoće stupnja analitičkog reagensa. Za pripravu krivulje umjeravanja sve standardne otopine bile su svježe pripravljane.

Deionizirana voda

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

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 2,0)

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera $\{c = 4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je otapanjem 4,946 g borne kiseline (H_3BO_3) u malo deionizirane vode uz dodatak 4,6 mL ledene octene kiseline i 3,2 mL fosforne kiseline nakon čega se nadopuni deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 2000 mL. Pufer otopina pH vrijednosti 2,0 pripravljena je dodatkom otopine natrijeva hidroksida $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ osnovnoj otopini pufera što se kontrolira korištenjem mV-metra opremljenog kombiniranom staklenom elektrodom za pH mjerenja (Mettler Toledo SevenMulti).

Otopina fosfatnog pufera (pH = 6,8)

Otopina fosfatnog pufera $\{c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je otapanjem 6,8 g K_2HPO_4 i 8,7 g KH_2PO_4 u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena od 1000 mL. Pufer otopina pH vrijednosti 6,8 pripravljena je dodatkom otopine kalijeva hidroksida $\{c(\text{KOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ osnovnoj otopini pufera $\{c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}\}$ što se kontrolira korištenjem mV-metra opremljenog kombiniranom staklenom elektrodom za pH mjerenja (Mettler Toledo SevenMulti).

Otopina N-acetil-L-cistein etil estera

Temeljna standardna otopina *N*-acetil-L-cistein etil estera $\{c(\text{NACET}) = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je otapanjem 0,1912 g čiste tvari u acetatno-borarno-fosfatnom puferu ($\text{pH} = 2,0$) do ukupnog volumena od 100 mL. *N*-acetil-L-cistein etil ester je sintetizirani spoj koji je ustupio profesor Dimitrios Tsikas, Hannover Medical School, Institute for Clinical Pharmacology, Niedersachsen, Germany, na čemu smo zahvalni. Temeljna standardna otopina čuvana je na 4 °C. Radne standardne otopine nižih koncentracija pripravljane su dnevno odgovarajućim razrjeđenjem temeljne standardne otopine fosfatnim puferom ($\text{pH} = 6,8$).

Otopina reagensa $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$

Otopina $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ pripravljena je otapanjem kao smjesa otopina bakrovih (II) iona (bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska) i bicinkoninske kiseline (4,4'-dikarboksi-2,2'-dikinolin, BCA, Alfa Aesar GmbH&Co, Karlsruhe, Germany) u molarnom omjeru 1:2. Otopina je pripravljena otapanjem 0,0240 g tartarata, 0,0200 g Cu^{2+} i 0,0621 g BCA u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,8$) do ukupnog volumena od 100 mL. Tartarat je dodan zbog stabilnosti otopine reagensa (spriječava taloženje bakra). Koncentracija bakrovih (II) iona u ovoj otopini iznosila je $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a tartarata i BCA $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Otopina NaOH

Otopina natrijevog hidroksida $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je otapanjem 8 g natrijevog hidroksida u 100 mL deionizirane vode.

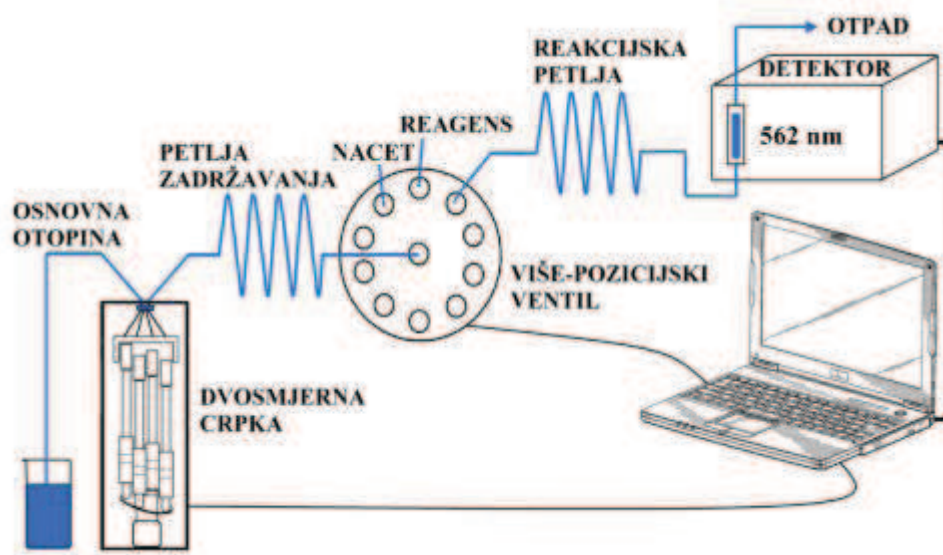
Otopina KOH

Otopina kalijevog hidroksida $\{c(\text{KOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ pripravljena je otapanjem 11,2 g kalijevog hidroksida u 100 mL deionizirane vode.

2.2. Instrumenti i uređaji

2.2.1. Instrumenti za provedbu slijedne analize injektiranjem

Sustav za slijednu analizu injektiranjem (slika 2-1) sastojao se od dvosmjerne crpke (M50 VICI Valco Instruments) te više-pozicijskog selekcijskog ventila (CHEMINERT C25-3180EMH Valco Instruments) povezanih petljom zadržavanja. Crpka usisava u sustav osnovnu otopinu, potom se u petlju zadržavanja slijedno injektiraju određeni volumeni otopina uzorka i reagensa kroz odabrane otvore selekcijskog ventila. U zadnjem koraku protok osnovne otopine tjera zonu uzorka i reagensa kroz određeni otvor selekcijskog ventila koji je reakcijskom petljom povezan s detektorom.



Slika 2-1 Shematski prikaz sustava za slijednu analizu injektiranjem korištenog za određivanje NACET-a.²⁴

Miješanjem zona uzorka i reagensa uzrokovanih disperzijom nastaje vrsta čijim je prolaskom kroz protočnu kivetu odziv detektora zabilježen kao koncentracijski gradijent (zbrojni vremenski signal, pik).

Kao detektor korišten je dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) s protočnom kvarcnom kivetom spojen na osobno računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan) zbog prikupljanja i obrade podataka.

Korišteni spektrofotometar temelji se na radu s dva snopa zračenja koji nastaju u prostoru pomoću djelitelja snopa. Širina snopa elektromagnetskog zračenja od svega 1 mm omogućava mjerenja i najmanjih količina uzorka s velikom preciznošću. Unutarnji

volumen korištene kvarcne kivete je 80 μL , a dužina optičkog puta 10,0 mm. Uređaj ima deuterijski i volframov izvor zračenja, refleksijsku rešetku kao disperzno sredstvo monokromatora te fotomultiplikator kao detekcijsko sredstvo. Spektrofotometar je za sva mjerenja bio podešen na valnu duljinu od 562 nm.

Rad SIA sustava (brzina protoka, redoslijed injektiranja i volumeni injektiranja) u potpunosti je programski kontroliran. Pojedini koraci protočne metode moraju biti planirani i uneseni u programski slijed. Promjenom osnovne kemijske reakcije na kojoj se metoda temelji, ili primjenom nove metode, sastavnice sustava SIA se ne mijenjaju, mijenja se samo programski slijed.

2.2.2. Ostali uređaji i oprema

Za mjerenje pH-vrijednosti otopina korišten je milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab[®] 413 (slika 2-2).



Slika 2-2 Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti opremljen kombiniranom staklenom elektrodom.⁶

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 2-3).



Slika 2-3 Mikropipete s ručnim držačem.²⁵

2.3. Metode rada

Razvijen i optimiziran sustav za protočnu analizu injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor prikazan je na slici 2-3, a opisan je u poglavlju 2.2.1.

Programiranje protoka

Prije početka mjerenja potrebno je cijeli sustav napuniti otopinama kako bi se uklonio zrak. Navedeni program prikazan je na slici 2-4.

System Settings
Pump:625 Gearbox:CP-DSM2 uL/Rev:603.000 Backlash(uL):disabled

Method: baseline
Status: Idle

Run Reset
☐ Repeat

Ready ☒ Wait ☐
Dispense ☐ Aspirate ☐
Wash ☐ Valve ☐

Event

Edit
Close

#	Action	uL.	uL./min.	Wait (sec)	Event
1	Multi Valve	pos.= 1	dir.= Short		
2	Aspirate	200.0000	3000		
3	Multi Valve	pos.= 2	dir.= Short		
4	Aspirate	200.0000	3000		
5	Multi Valve	pos.= 10	dir.= Short		
6	Dispense	3500.0000	3000		

Slika 2-4 Programski slijed punjenja sustava.

Potrebno je odabrati otvor selekcijskog ventila (1–10) te smjer protoka otopine (*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 1 (reagens) i 2 (analit) prema crpki napune se cjevčice sustava otopinama reagensa i analita te se potom suprotnim smjerom protoka guraju osnovnom otopinom prema otvoru 10 koji je povezan s protočnom kivetom u optičkom putu spektrofotometra.

Mjerenje se provodi tako da se podešavanjem toka određeni volumeni analita i reagensa uvuku u petlju zadržavanja te se zatim kao zajednička zona, uz pomoć osnovne otopine suprotnog toka, pošalju prema detektoru. Kao osnovna otopina (nositelj) korištena je deionizirana voda.

Prilikom optimizacije protočnog sustava razmatrani su slijedeći parametri: redosljed injektiranja reagensa i analita, brzina protoka (1000 do $10\,000\ \mu\text{L min}^{-1}$), volumeni injektiranja reagensa i analita, volumen petlje zadržavanja koji je testiran u rasponu od 500 do $1000\ \mu\text{L}$ te duljina (30 do $120\ \text{cm}$), odnosno volumen reakcijske petlje (120 do $500\ \mu\text{L}$). Nakon optimizacije sustava optimizirana je koncentracija reagensa.

Određene su analitičke karakteristike razvijene metode: linearno dinamičko područje, jednadžba regresijskog pravca (nagib pravca i odsječak na osi y), koeficijent linearne regresije R^2 , granica dokazivanja i granica određivanja, ponovljivost te prenošenje signala. Također, ispitan je utjecaj stranih iona.

Prikupljanje i obrada podataka

Podaci spektrofotometrijskog eksperimenta su kontinuirano bilježeni te pretvarani u oblik pogodan za obradu u programu GraphPad Prism, verzija 4,03 (GraphPad software, San Diego California, USA). U navedenom programu izrađene su krivulje umjeravanja, radila se statistička obrada podataka mjerenja i regresijska analiza krivulja umjeravanja.

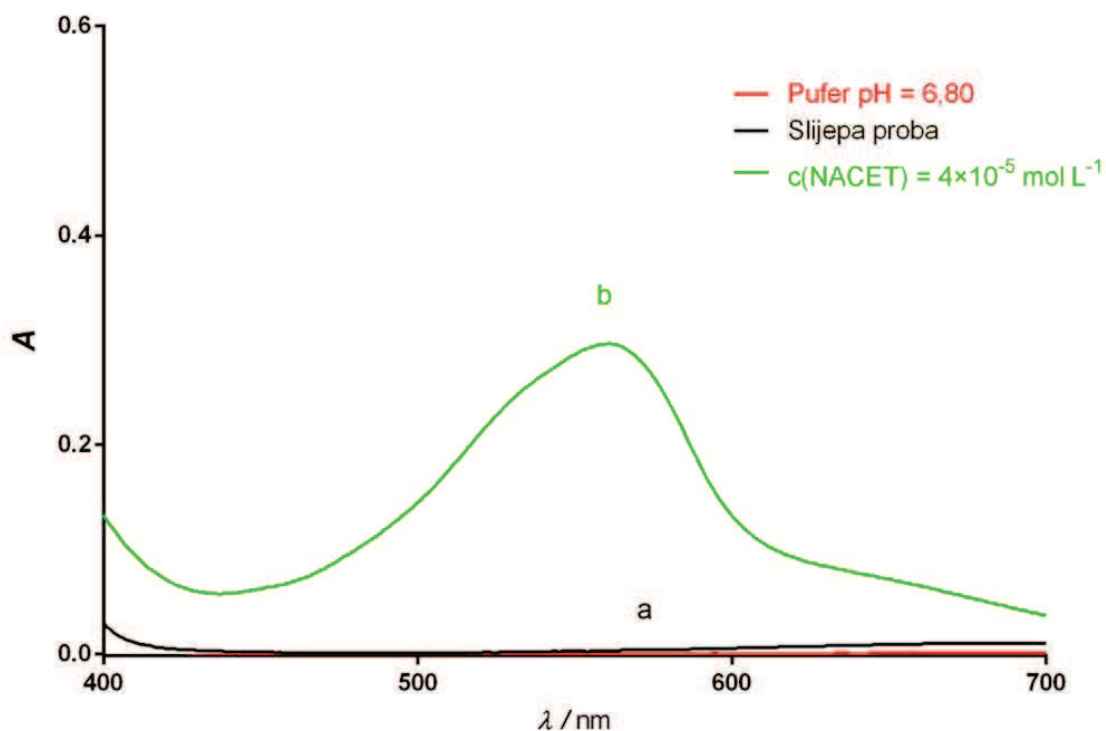
3. REZULTATI I RASPRAVA

Spektrofotometrijska metoda slijednom analizom injektiranjem opisana je u poglavlju 2.3., a shematski prikaz mjerne instrumentacije nalazi se na slici 2-1.

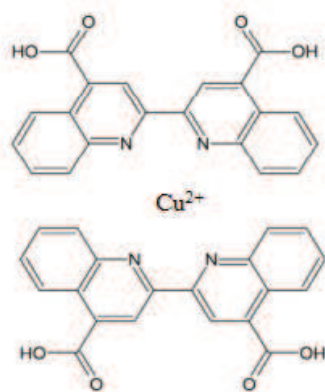
Razvijena metoda slijedne analize injektiranjem sa spektrofotometrijskim detektorom zasniva se na redoks reakciji u kojoj NACET (RSH spoj) reducira zeleno obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ kompleks u ljubičasto obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ kompleks.



Nastali kompleks apsorbira elektromagnetsko zračenje pri valnoj duljini $\lambda = 562$ nm. Snimljeni spektri kompleksa (a) $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ i (b) $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ prikazani su na slici 3-1. Kompleks Cu(II) s BCA $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ (slika 3-2) ne apsorbira pri valnoj duljini $\lambda = 562$ nm, gdje kompleks Cu(I) s BCA $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ ima apsorpcijski maksimum.



Slika 3-1 Spektar: (a) $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ i (b) $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$. Spektar (b) nastaje redukcijom $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ s NACET-om koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Slika 3-2 Kemijska struktura kompleksa bakrovog iona i bicinkoninske kiseline $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$

U dijelu optimizacije kemijskih parametara (pH-vrijednosti, temperatura i molarni omjer komponenti otopine reagensa) ispitani su kemijski parametri koji su rezultat prethodnog istraživanja, razvoja kinetičke spektrofotometrijske metode analize NACET-a s $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$. Optimalni parametri kemijske reakcije prikazani su u tablici 3.1., a objašnjeni su u poglavlju 3.3.

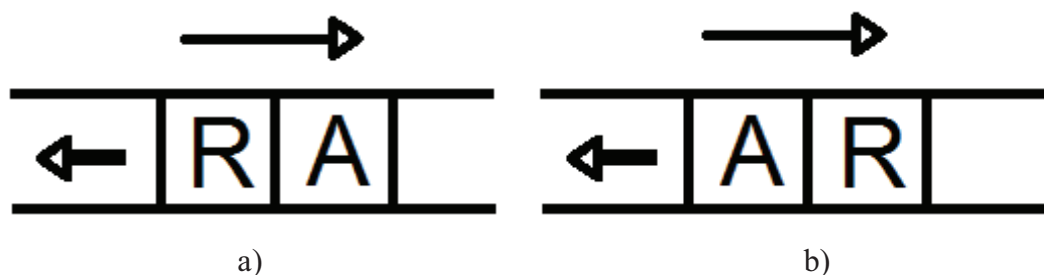
Tablica 3.1. Prikaz optimalnih kemijskih parametara

Optimalni kemijski parametri
pH = 6,8
$t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$
$\text{Cu}^{2+} : \text{BCA} = 1:1$

3.1. Optimizacija parametara protočnog sustava

Optimizacija sustava za slijednu analizu injektiranjem predstavlja postizanje kompromisa između ostvarene osjetljivosti metode i brzine, odnosno učestalosti analize. Parametri protočnog sustava optimizirani su univarijantnom metodom u kojoj se ispituje utjecaj jednog, nasumice odabranog parametra, dok se svi ostali parametri održavaju konstantnima. Nakon što je odabrani parametar optimiziran njegova vrijednost se održava konstantnom, a optimizira se novi parametar uz konstantnost ostalih parametara. Postupak se ponavlja za sve parametre. U protočnim sustavima optimiziraju se: redoslijed injektiranja otopine analita i otopine reagensa, brzina protoka, volumen injektiranja analita te reagensa, volumen petlje zadržavanja te duljina reakcijske petlje s ciljem postizanja što veće osjetljivosti uz što veću učestalost analiza.

Parametri su optimizirani uz jednostrano (slika 3-3) i dvostrano (slika 3-4) injektiranje reagensa da bi se postigla veća osjetljivost i ponovljivost. Naime, postoji mogućnost da pri jednostranom injektiranju reagensa, zona reagensa neće prodrijeti u zonu uzorka.



Slika 3-3 Shematski prikaz određivanja uz jednostrano injektiranje reagensa: a) injektira se otopina reagensa, a potom otopina analita; b) injektira se otopina analita, a potom otopina reagensa.



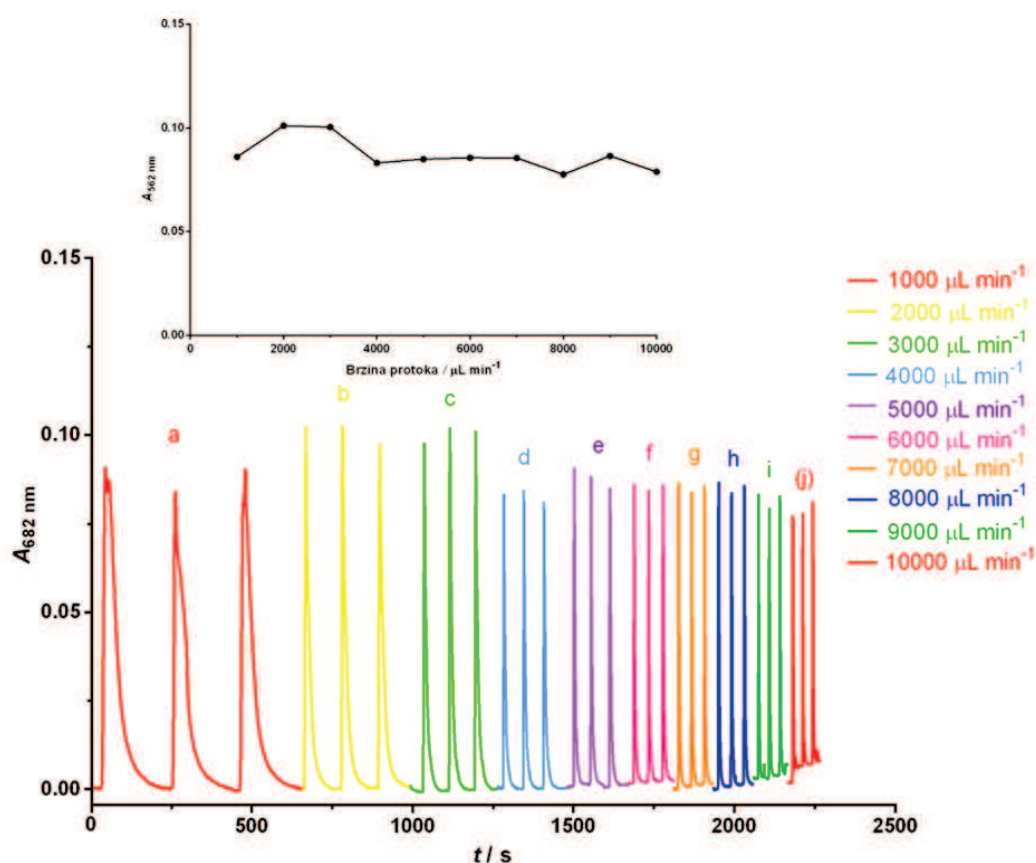
Slika 3-4 Shematski prikaz određivanja uz dvostrano injektiranje reagensa. Injektira se otopina reagensa, potom otopina analita te otopina reagensa.

Područja vrijednosti unutar kojih su ispitivani parametri sustava i odabrani optimalni uvjeti prikazani su u tablici 3.2.

3.1.1. Optimizacija brzine protoka

Podešavanjem brzine protoka može se kontrolirati disperzija te poboljšati osjetljivost metode. Povećanjem brzine protoka smanjuje se disperzija zona reagensa i analita što se očituje promjenom oblika koncentracijskog gradijenta zone (pika). Odabir optimalne brzine protoka određuje učestalost mjerenja tj. broj mjerenja koji se može napraviti određenom metodom u određenom vremenskom razdoblju.

Rezultati dobiveni eksperimentalnim mjerenjima (slika 3-5) pokazuju da se povećanjem brzine protoka očitavaju signali užih osnovica. Povećavanjem brzine protoka povećava se visina signala. Pri optimalnom protoku ($3000 \mu\text{L min}^{-1}$) zabilježena je maksimalna apsorbancija. Zbog utjecaja kinetike reakcije pri protocima većim od optimalnog dolazi do smanjenja zabilježenih apsorbancija.

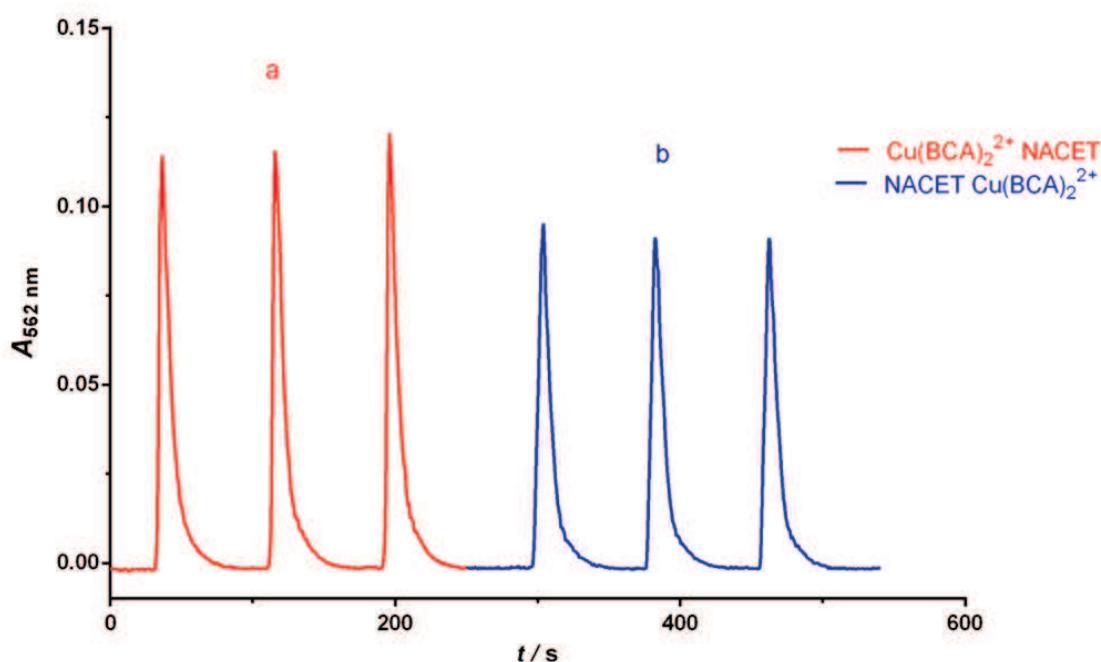


Slika 3-5 Siagram i grafički prikaz utjecaja brzine protoka na zabilježeni signal. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: (a) $1000 \mu\text{L min}^{-1}$, (b) $2000 \mu\text{L min}^{-1}$, (c) $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, (d) $4000 \mu\text{L min}^{-1}$, (e) $5000 \mu\text{L min}^{-1}$, (f) $6000 \mu\text{L min}^{-1}$, (g) $7000 \mu\text{L min}^{-1}$, (h) $8000 \mu\text{L min}^{-1}$, (i) $9000 \mu\text{L min}^{-1}$, (j) $10\,000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $1000 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $280 \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $200 \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $200 \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.1.2. Optimizacija parametara protočnog sustava uz jednostrano injektiranje reagensa

3.1.2.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja

U postupku optimizacije SIA sustava ispitan je utjecaj redoslijeda injektiranja otopina analita i reagensa. S obzirom na redoks reakciju ispitana su dva različita redoslijeda injektiranja (slika 3-3). Rezultati su prikazani na slici 3-6. Injektirani su isti volumeni otopine reagensa i otopine analita. Pikovi označeni slovom (a) predstavljaju vrijednosti apsorbancije dobivene kada je injektirana otopina reagensa te potom otopina analita, dok pikovi označeni slovom (b) predstavljaju vrijednosti apsorbancije kada je injektirana otopina analita, a potom otopina reagensa.

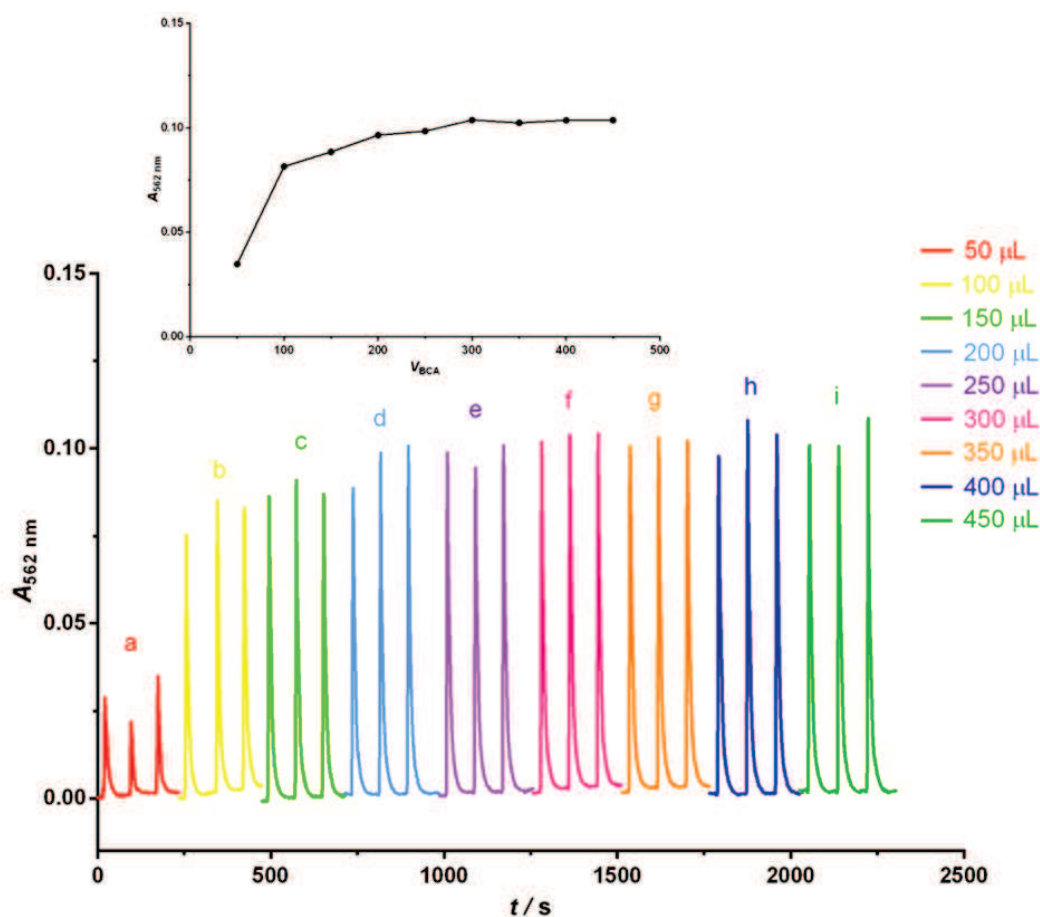


Slika 3-6 Siagram utjecaja redoslijeda injektiranja otopina reagensa i analita. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $1000 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $280 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $200 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $200 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Veća vrijednost apsorbancije zabilježena je kada se injektira otopina reagensa $\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$ te potom otopina analita (NACET). Taj redoslijed injektiranja korišten je za ostale optimizacije.

3.1.2.2. Optimizacija volumena injektiranja otopine reagensa

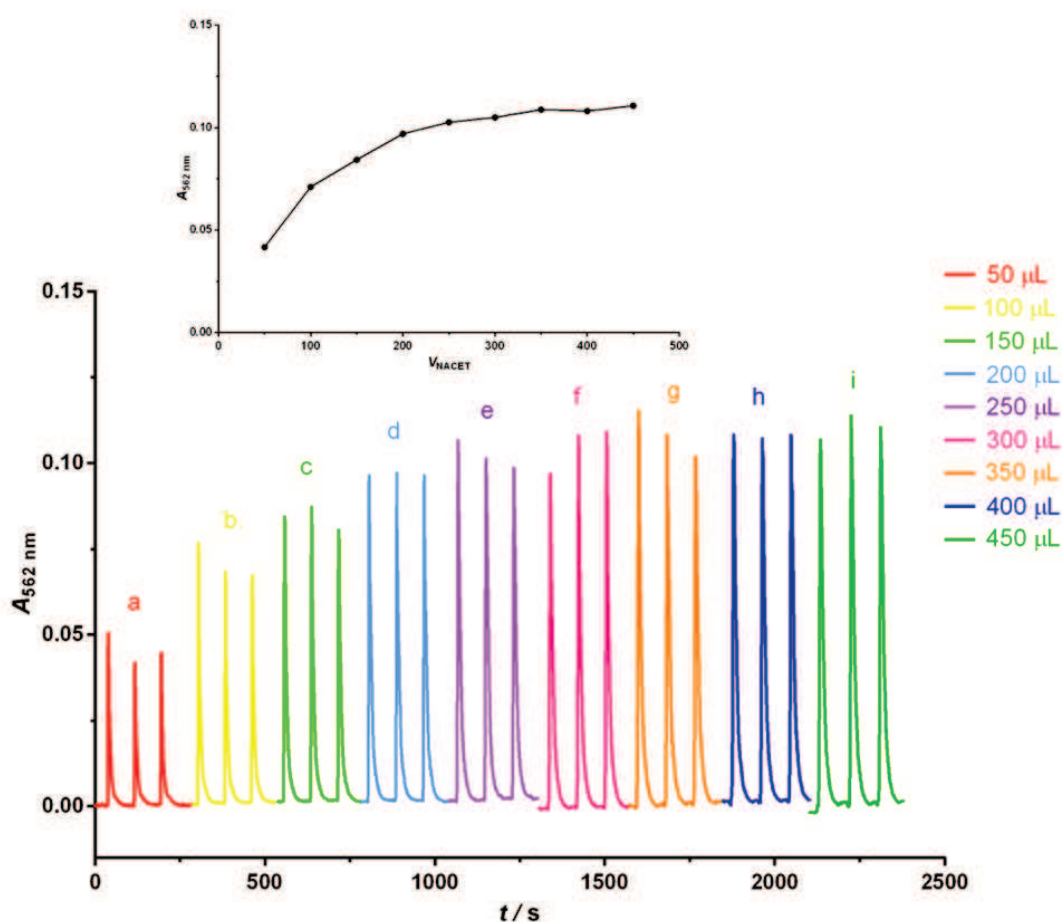
Utjecaj volumena injektiranja otopine reagensa na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je pri određivanju NACET-a koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Pritom je koncentracija otopine reagensa bila: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1$). Rezultati su prikazani na slici 3-7. Ispitani su volumeni injektiranog reagensa u rasponu od 50 do 450 μL . Volumen injektiranja reagensa od 250 μL odabran je kao kompromis osjetljivosti metode i visoke učestalosti analiza. Omjer visine i širine signala odabranog volumena je zadovoljavajući, što za posljedicu ima veliku osjetljivost i zadovoljavajuću brzinu određivanja. Također, odabrani volumen smanjuje potrošnju otopine reagensa te je korišten za daljnja mjerenja.



Slika 3-7 Diagram i grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja otopine reagensa na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: 1000 μL ; volumen reakcijske petlje: 120 μL ; volumen injektiranja otopine 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 ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): 200 μL ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.1.2.3. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita

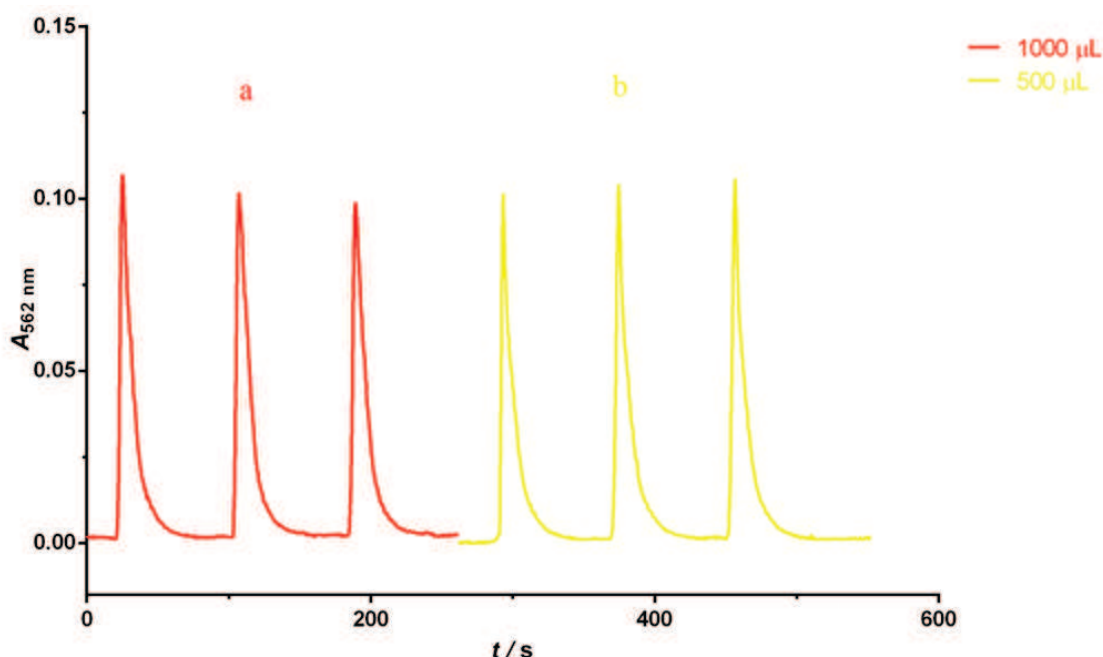
Utjecaj volumena injektiranja otopine analita na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je korištenjem otopine NACET-a koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Rezultati su prikazani na slici 3-8. Ispitani su volumeni injektiranog analita u rasponu od 50 do 450 μL . U pravilu, povećanjem volumena otopine analita povećava se analitički signal. Povećanjem volumena injektirane otopine analita do 250 μL značajno se povećavao analitički signal, dok su volumeni veći od 250 μL vrlo malo utjecali na daljnje povećanje analitičkog signala. Odabran je volumen analita od 250 μL . Navedeni volumen ima zadovoljavajući omjer visine i širine signala što za posljedicu ima veliku osjetljivost i zadovoljavajuću brzinu određivanja. Odabrani volumen od 250 μL smanjuje potrošnju otopine analita te je korišten za daljnja mjerenja.



Slika 3-8 Diagram i grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja otopine analita (NACET) na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: 1000 μL ; volumen reakcijske petlje: 280 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa = 250 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): (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 ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.1.2.4. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

Utjecaj volumena petlje zadržavanja na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je korištenjem otopine analita koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ i otopine reagensa $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$. Za optimizaciju su korištene petlje volumena 500 i 1000 μL . Rezultati su prikazani na slici 3-9.



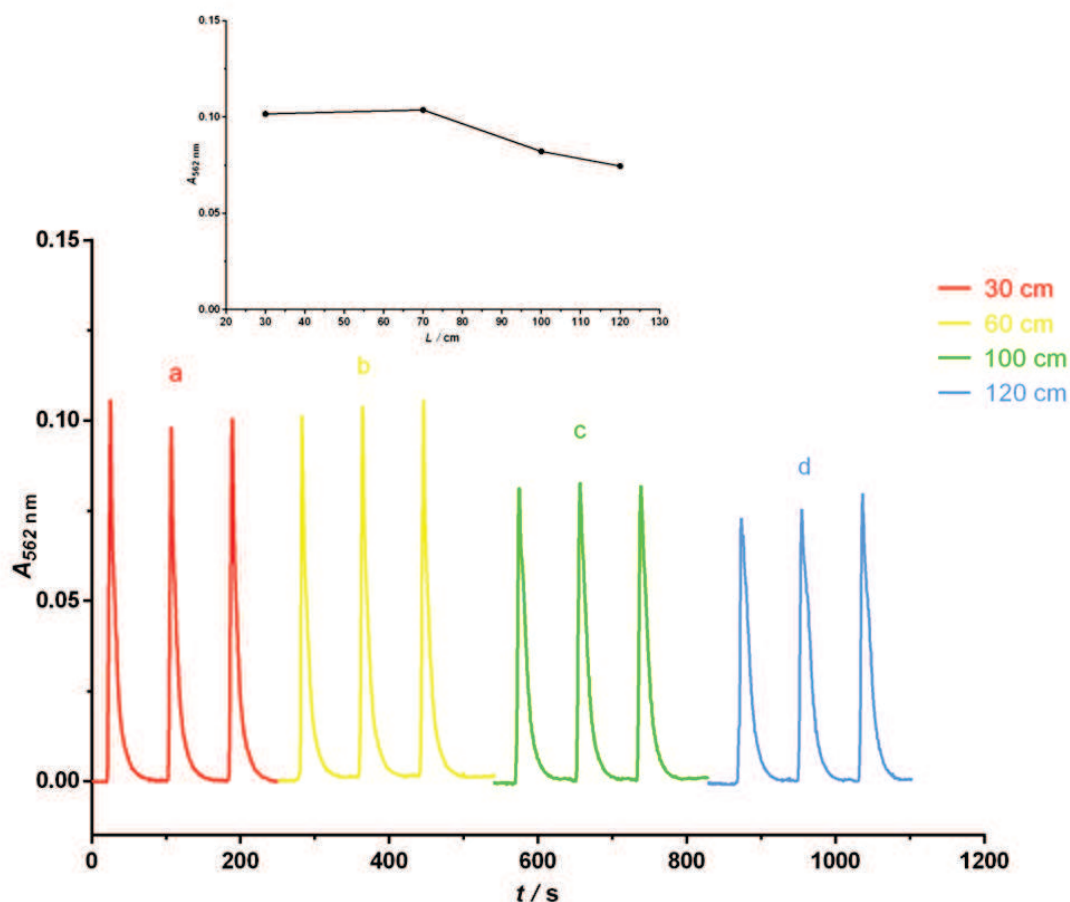
Slika 3-9 Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: (a) 1000 μL , (b) 500 μL ; volumen reakcijske petlje: 280 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa: 250 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): 250 μL ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Petlja zadržavanja od 500 μL odabrana je kao optimalna budući da je razlika u apsorbanciji zanemariva. Odabrana petlja ima volumen koji može zaprimiti odabrane optimalne volumene reagensa (250 μL) i analita (250 μL). Navedena petlja smanjuje ukupni volumen protočnog sustava, a time i potrošnju osnovne otopine.

3.1.2.5. Optimizacija duljine (volumena) reakcijske petlje

Utjecaj duljine reakcijske petlje na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je korištenjem otopine analita koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ i otopine reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

$\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$. Reakcijsku petlju možemo promatrati s obzirom na volumen ili duljinu. Za optimizaciju su korištene petlje duljina od 30 do 120 cm. Duljina 30 cm odgovara volumenu 120 μL , duljina 60 cm odgovara volumenu 280 μL , duljina 100 cm odgovara volumenu 400 μL , dok duljina 120 cm odgovara volumenu 500 μL . Rezultati su prikazani na slici 3-10.



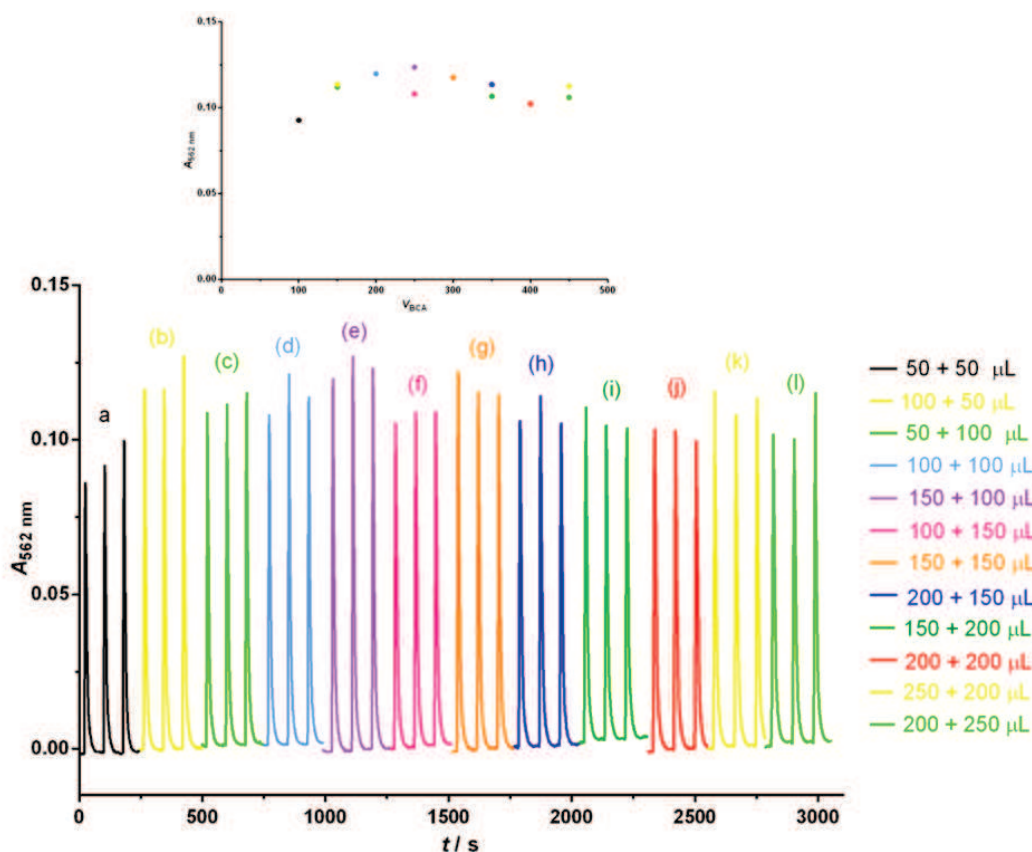
Slika 3-10 Siagram i grafički prikaz utjecaja volumena reakcijske petlje na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $1000 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: (a) $120 \text{ } \mu\text{L}$, (b) $280 \text{ } \mu\text{L}$, (c) $400 \text{ } \mu\text{L}$, (d) $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

S obzirom da je razlika vrijednosti apsorbancija za reakcijske petlje duljine 30 i 60 cm zanemariva, kao optimalna odabrana je reakcijska petlja duljine 30 cm, odnosno volumena $120 \text{ } \mu\text{L}$, jer smanjuje ukupni volumen protočnog sustava, a time i potrošnju osnovne otopine te smanjuje vrijeme trajanja analize.

3.1.3. Optimizacija parametara protočnog sustava uz dvostrano injektiranje reagensa

3.1.3.1. Optimizacija volumena injektiranja otopine reagensa

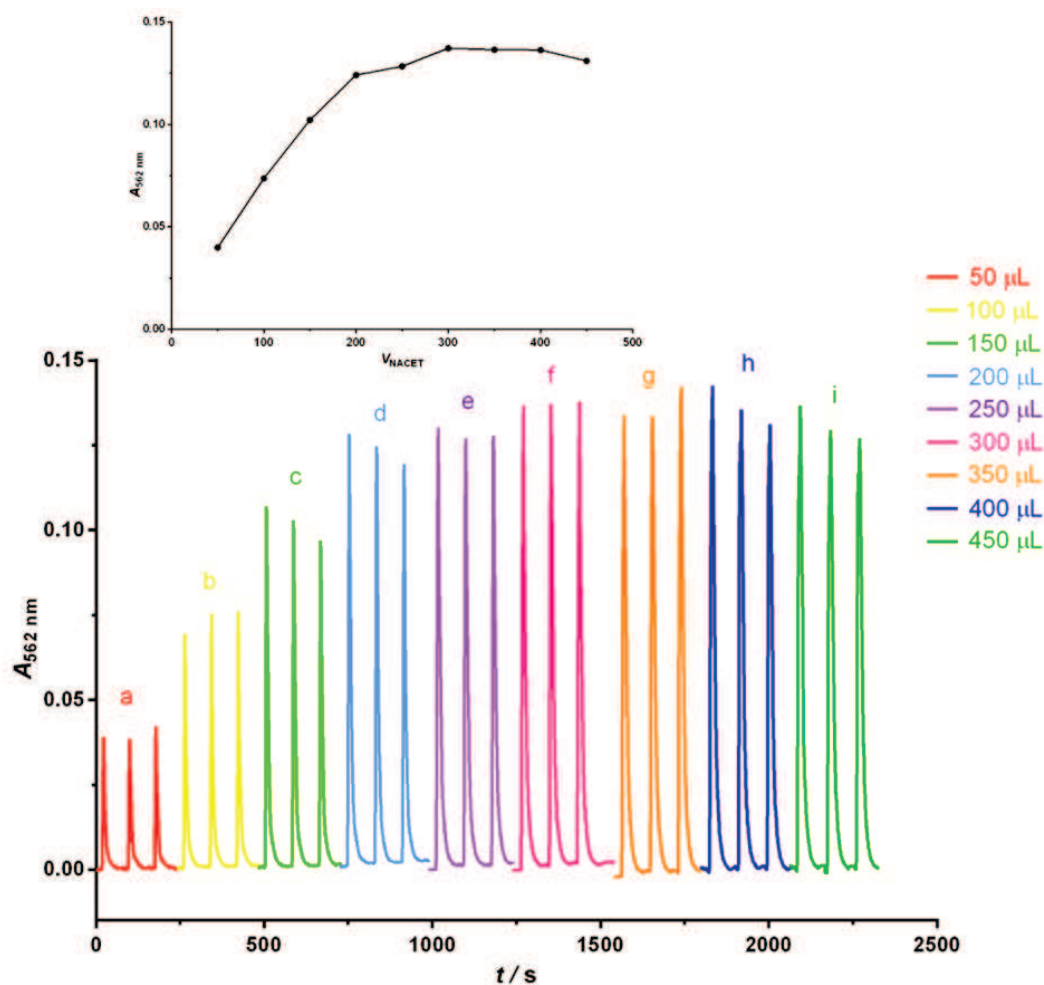
Utjecaj volumena injektiranja otopine reagensa na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je pri određivanju NACET-a u otopini koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Pritom je koncentracija otopine reagensa bila: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$. Rezultati su prikazani na slici 3-11. Ukupni ispitani volumeni injektiranog reagensa bili su u rasponu od 100 do 450 μL . Apsorbancija je maksimalna kada je volumen injektiranja 150 + 100 μL te je taj volumen odabran kao optimalan i korišten je za daljnja mjerenja.



Slika 3-11 Siagram i grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja otopine reagensa na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: 1000 μL ; volumen reakcijske petlje: 280 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa: (a) 50 + 50 μL , (b) 100 + 50 μL , (c) 50 + 100 μL , (d) 100 + 100 μL , (e) 150 + 100 μL , (f) 100 + 150 μL , (g) 150 + 150 μL , (h) 200 + 150 μL , (i) 150 + 200 μL , (j) 200 + 200 μL , (k) 250 + 200 μL , (l) 200 + 250 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): 200 μL ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.1.3.2. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita

Utjecaj volumena injektiranja otopine analita na osjetljivost i ponovljivost metode ispitan je korištenjem otopine NACET-a koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Rezultati su prikazani na slici 3-12. Volumeni injektiranja analita korišteni za optimizaciju bili su u rasponu od 50 do 450 μL . U pravilu, povećanjem volumena analita povećava se analitički signal. Povećanjem volumena injektiranog analita do 250 μL značajno se povećavao analitički signal, dok su volumeni veći od 250 μL vrlo malo utjecali na daljnje povećanje analitičkog signala.

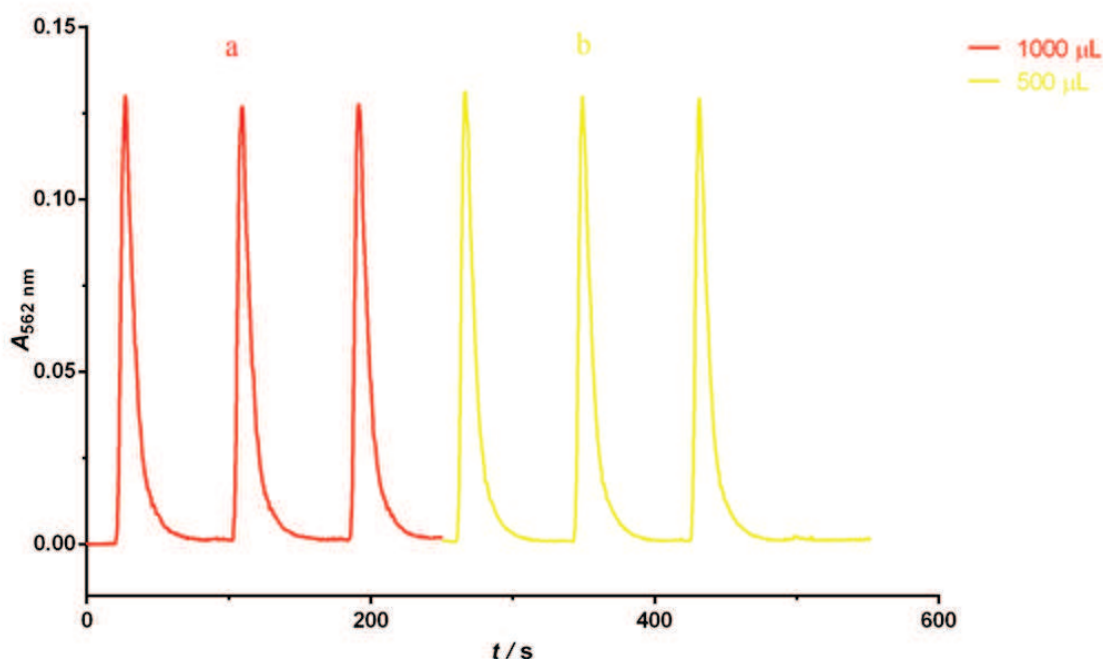


Slika 3-12 Siagram i grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja otopine analita (NACET) na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: 1000 μL ; volumen reakcijske petlje: 280 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa: 150 + 100 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): (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 ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Odabran je volumen otopine analita od 250 μL jer je omjer visine i širine signala odabranog volumena zadovoljavajući, što za posljedicu ima veliku osjetljivost i zadovoljavajuću brzinu određivanja. Odabirom volumena od 250 μL smanjena je potrošnja otopine analita te je navedeni volumen korišten za daljnja mjerenja.

3.1.3.3. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

Utjecaj volumena petlje zadržavanja na osjetljivost metode ispitan je korištenjem otopine analita koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ i otopine reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$. Rezultati su prikazani na slici 3-13. Ispitane su petlje volumena 500 i 1000 μL .

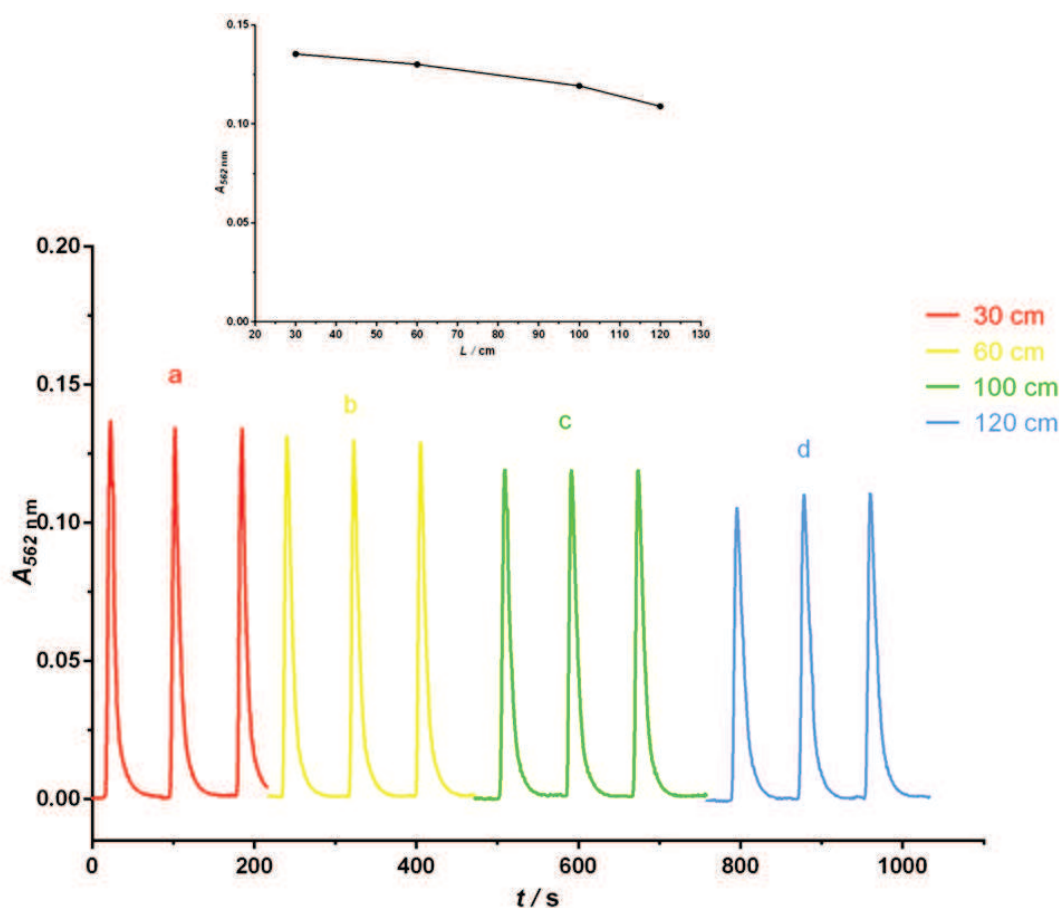


Slika 3-13 Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,8$; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: (a) 500 μL , (b) 1000 μL ; volumen reakcijske petlje: 280 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa: 150 + 100 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): 250 μL ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Petlja zadržavanja od 500 μL odabrana je kao optimalna budući da je razlika u apsorbanciji zanemariva. Odabrana petlja ima volumen koji može zaprimiti odabrane optimalne volumene reagensa (150 + 100 μL) i analita (250 μL). Korištenjem navedene petlje smanjuje se ukupni volumen protočnog sustava, a time i potrošnja osnovne otopine.

3.1.3.4. Optimizacija duljine (volumena) reakcijske petlje

Utjecaj duljine reakcijske petlje na osjetljivost metode ispitan je korištenjem otopine analita koncentracije $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ i otopine reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\{c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{BCA}) = 1:1\}$. Reakcijsku petlju možemo promatrati s obzirom na volumen ili duljinu. Za optimizaciju su korištene petlje duljina od 30 do 120 cm. Duljina 30 cm odgovara volumenu 120 μL , duljina 70 cm odgovara volumenu 280 μL , duljina 100 cm odgovara volumenu 400 μL te duljina 120 cm odgovara volumenu 500 μL . Rezultati su prikazani na slici 3-14. Najveća vrijednost apsorbancije i stabilnost signala zabilježeni su kod reakcijske petlje duljine 30 cm, odnosno volumena 120 μL te je ta reakcijska petlja odabrana kao optimalna.



Slika 3-14 Siagram i grafički prikaz utjecaja volumena reakcijske petlje na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: 500 μL ; volumen reakcijske petlje: (a) 120 μL , (b) 280 μL , (c) 400 μL , (d) 500 μL ; volumen injektiranja otopine reagensa: 150 + 100 μL ; volumen injektiranja otopine analita (NACET): 250 μL ; volumen osnovne otopine: 3500 μL ; volumen protočne kivete: 80 μL ; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.1.4. Odabrani optimalni parametri

U tablici 3.2. prikazana su ispitivana područja za optimizirane parametre protočnog sustava te su navedeni odabrani optimalni uvjeti.

Tablica 3.2. Odabrani optimalni parametri

Parametri		Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
Brzina protoka		1000 - 10 000 μL	3000 μL
Jednostrano injektiran reagens	Redoslijed injektiranja	1. $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ 2. NACET 1. NACET 2. $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$	1. $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ 2. NACET
	Volumen injektiranja $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$	50 - 450 μL	250 μL
	Volumen injektiranja NACET-a	50 - 450 μL	250 μL
	Volumen petlje zadržavanja	500 - 1000 μL	500 μL
	Duljina reakcijske petlje	30 - 120 cm	30cm
Dvostrano injektiran reagens	Volumen injektiranja $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$	100 - 450 μL	150 + 100 μL
	Volumen injektiranja NACET-a	50 - 450 μL	250 μL
	Volumen petlje zadržavanja	500 - 1000 μL	500 μL
	Volumen reakcijske petlje	120 – 500 μL	120 μL

3.2. Optimizacija kemijskih parametara

Ispitani su kemijski parametri koji su rezultat prethodnog istraživanja, razvoja kinetičke spektrofotometrijske metode analize NACET-a s $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$. Rezultati su pokazali izvrsna slaganja parametara kemijske reakcije s istim parametrima optimiziranim kod kinetičke spektrofotometrijske metode, izuzev molarnog omjera komponenata otopine reagensa.

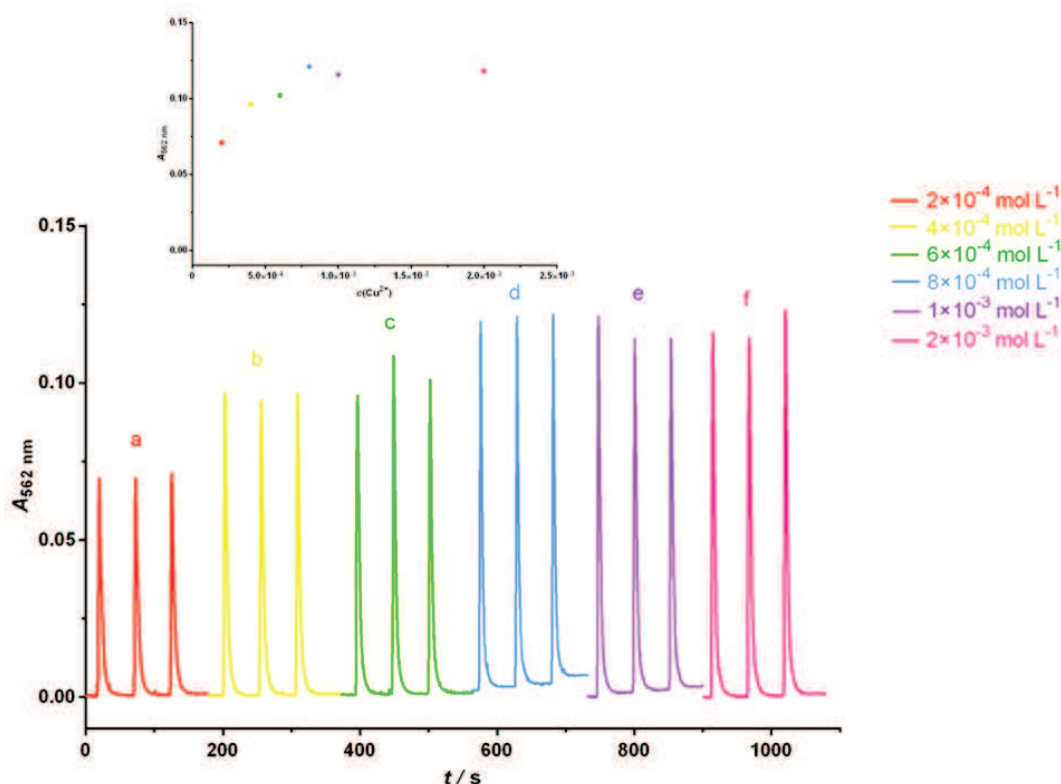
3.2.1. Optimizacija komponenti otopine reagensa

Utjecaj koncentracije Cu^{2+} kao komponente otopine reagensa na određivanje NACET-a $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$ ispitivan je u području koncentracija bakrovih (II) iona od $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pri čemu je molarni omjer Cu^{2+} : tartarat bio 1:2.

Utjecaj koncentracije liganda BCA na određivanje NACET-a $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$ ispitivan je u području koncentracija BCA od $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pri čemu se omjer Cu^{2+} : BCA kretao od 1:1 do 1:4.

3.2.1.1. Optimizacija komponenti otopine reagensa uz jednostrano injektiranje reagensa

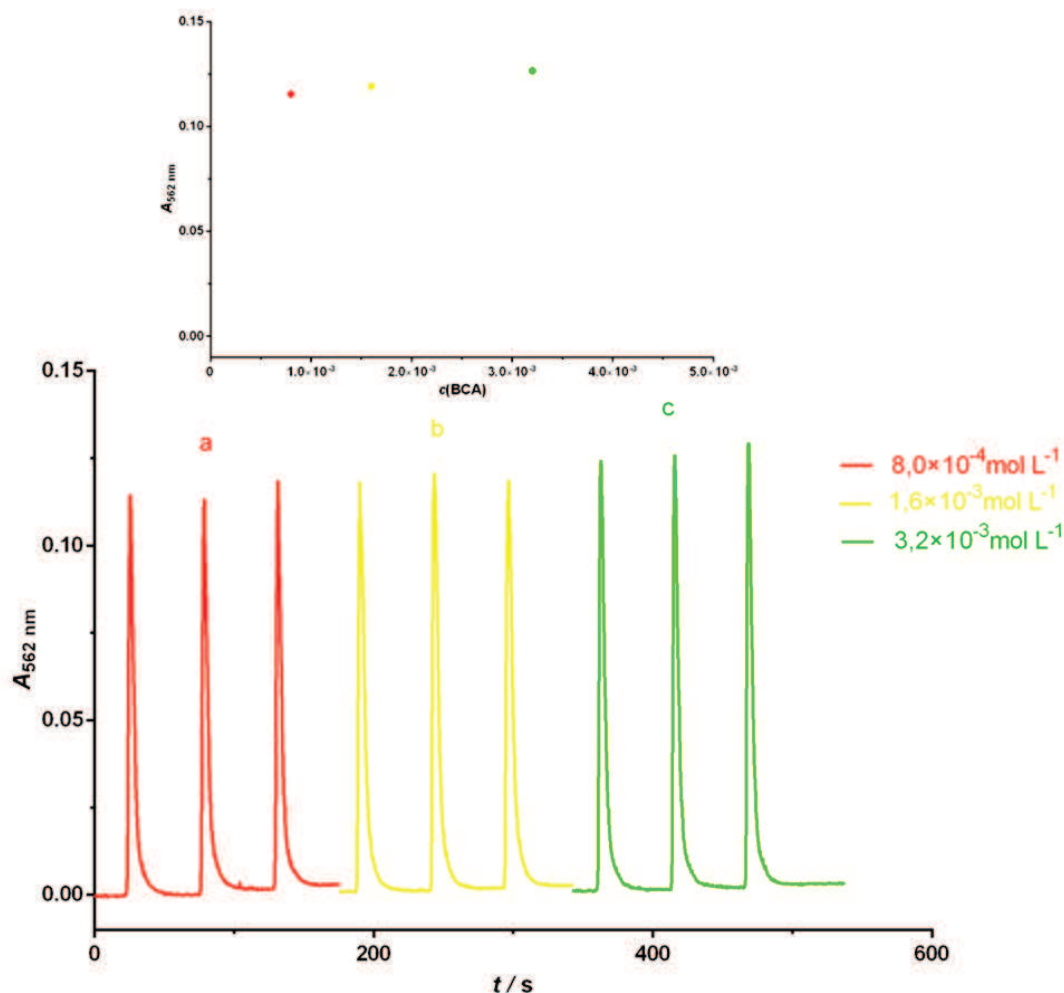
Pri koncentraciji Cu^{2+} većoj od $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dolazi do taloženja otopine reagensa. Najveća apsorbancija očitana je pri koncentraciji Cu^{2+} $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (slika 3-15) te je navedena koncentracija odabrana kao optimalna.



Slika 3-15 Diagram i grafički prikaz utjecaja koncentracije bakra na apsorbanciju.

Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: (a) $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{Cu}^{2+}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{Cu}^{2+}) = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

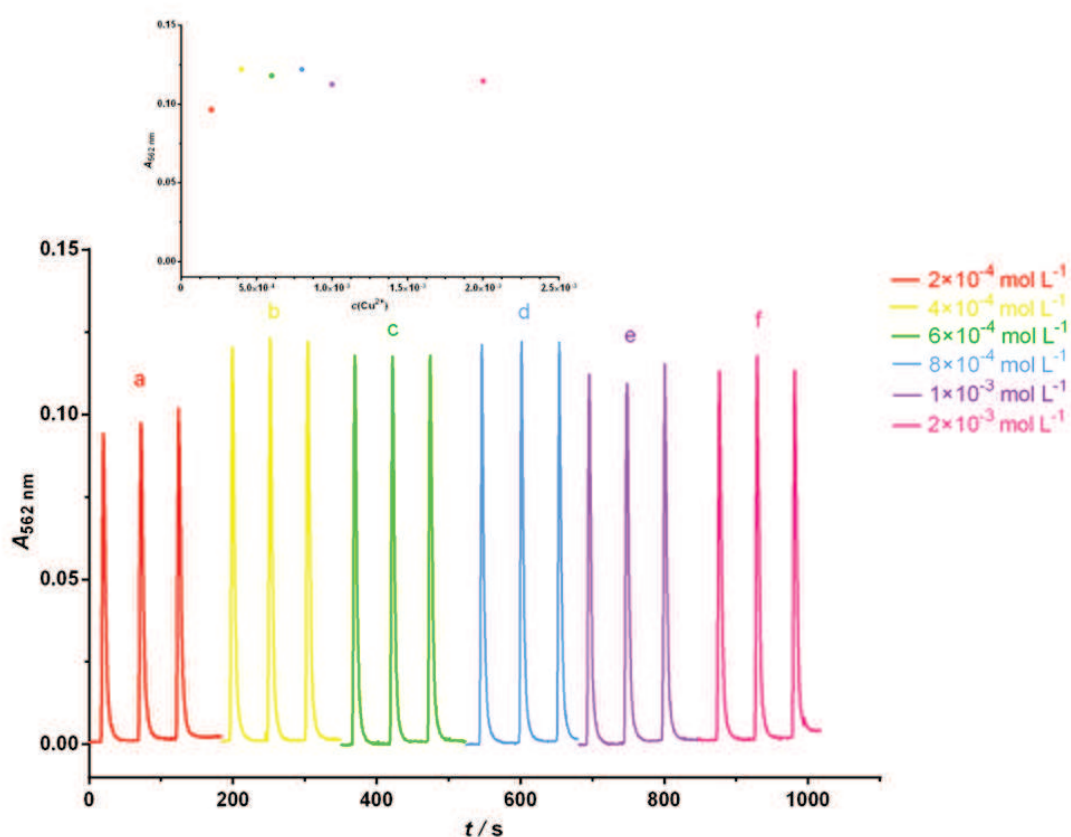
Iako je najveća apsorbancija očitana pri koncentraciji BCA $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (slika 3-16), ista nije odabrana kao optimalna zbog stabilnosti otopine reagensa. Naime, pri navedenoj koncentraciji BCA dolazi do taloženja otopine reagensa. Zbog navedenog je kao optimalna koncentracija odabrana $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ budući je to najveća koncentracija BCA pri kojoj je otopina reagensa stabilna.



Slika 3-16 Siagram i grafički prikaz utjecaja koncentracije BCA na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{BCA})$: (a) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,8$; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.2.1.2. Optimizacija komponenti otopine reagensa uz dvostrano injektiranje reagensa

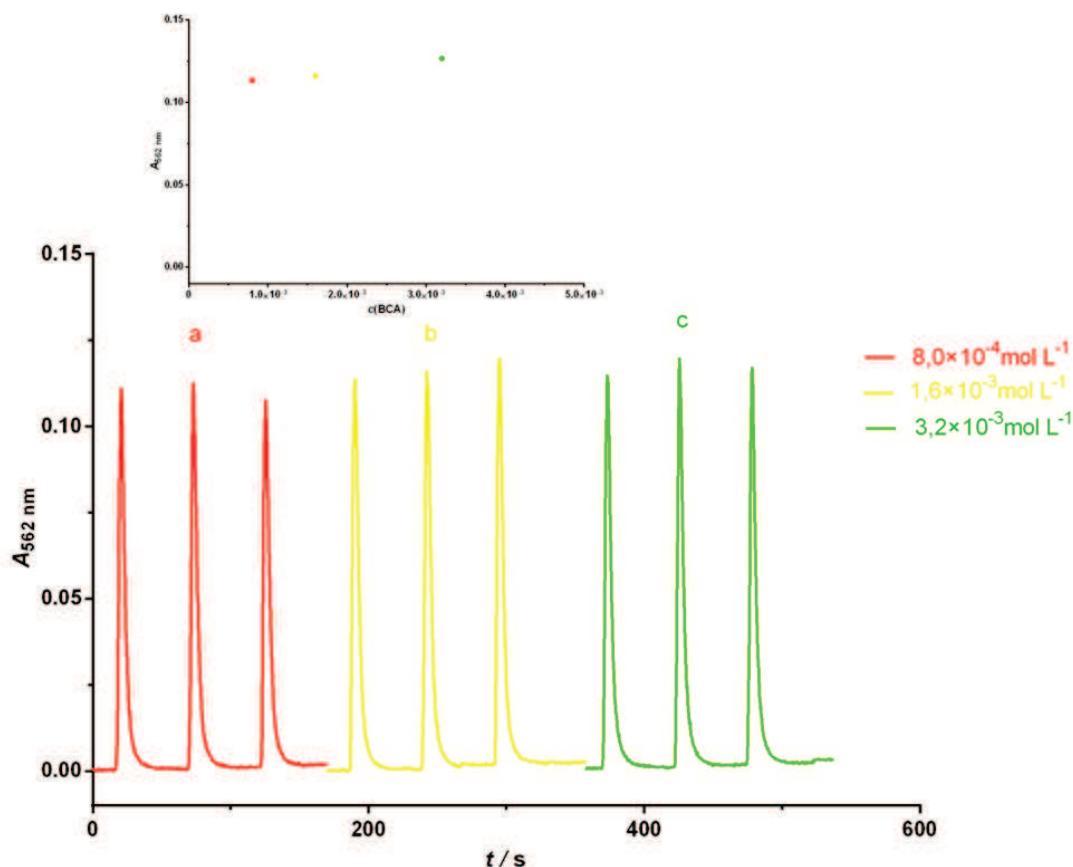
Pri koncentraciji Cu^{2+} većoj od $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ otopina reagensa nije stabilna, odnosno dolazi do taloženja. Iako je ista vrijednost apsorbancije očitana pri koncentracijama Cu^{2+} $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ i $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (slika 3-17), kao optimalna koncentracija odabrana je $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ jer bi veća koncentracija otopine reagensa trebala osigurati linearnost do gornje granice LDP-a (linearno dinamičko područje).



Slika 3-17 Siagram i grafički prikaz utjecaja koncentracije bakra na apsorbanciju.

Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: (a) $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $c(\text{Cu}^{2+}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $c(\text{Cu}^{2+}) = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $c(\text{Cu}^{2+}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ \text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $150 + 100 \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Najveća apsorbancija očitana je pri koncentraciji BCA $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (slika 3-18), no ista nije odabrana kao optimalna jer dolazi do taloženja otopine reagensa. Kao optimalna koncentracija odabrana je $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, najveća koncentracija BCA pri kojoj je reagens stabilan, odnos pri kojoj ne dolazi do taloženja.

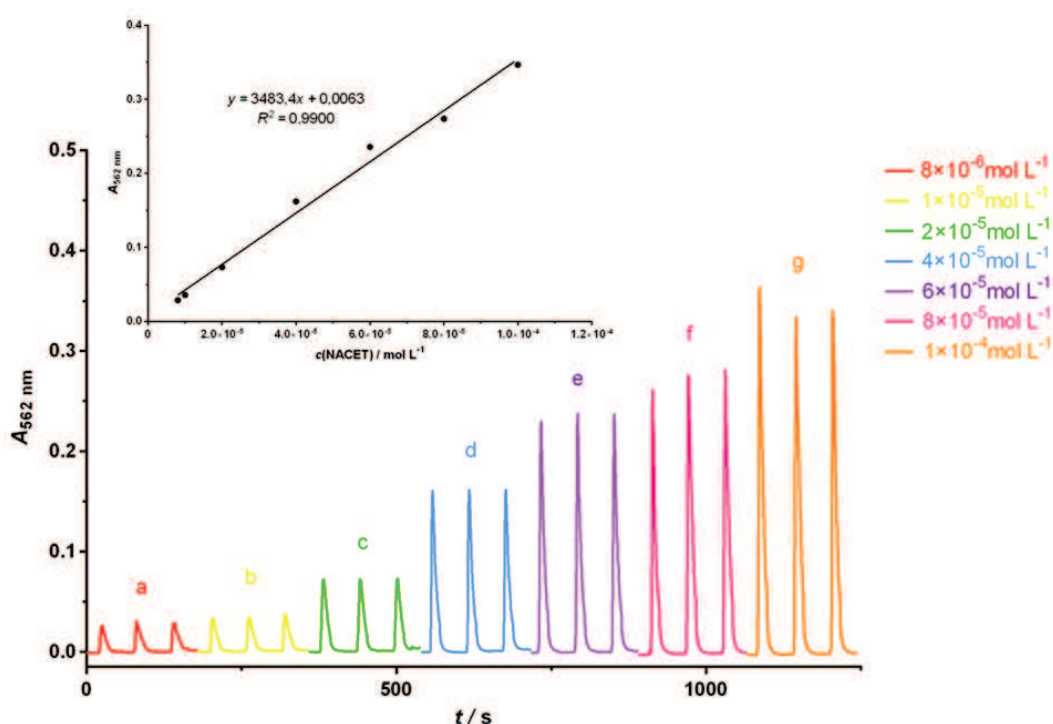


Slika 3-18 Siagram i grafički prikaz utjecaja koncentracije BCA na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{BCA})$: (a) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,8$; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $150 + 100 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.3. Analitičke karakteristike metode

3.3.1. Linearno dinamičko područje

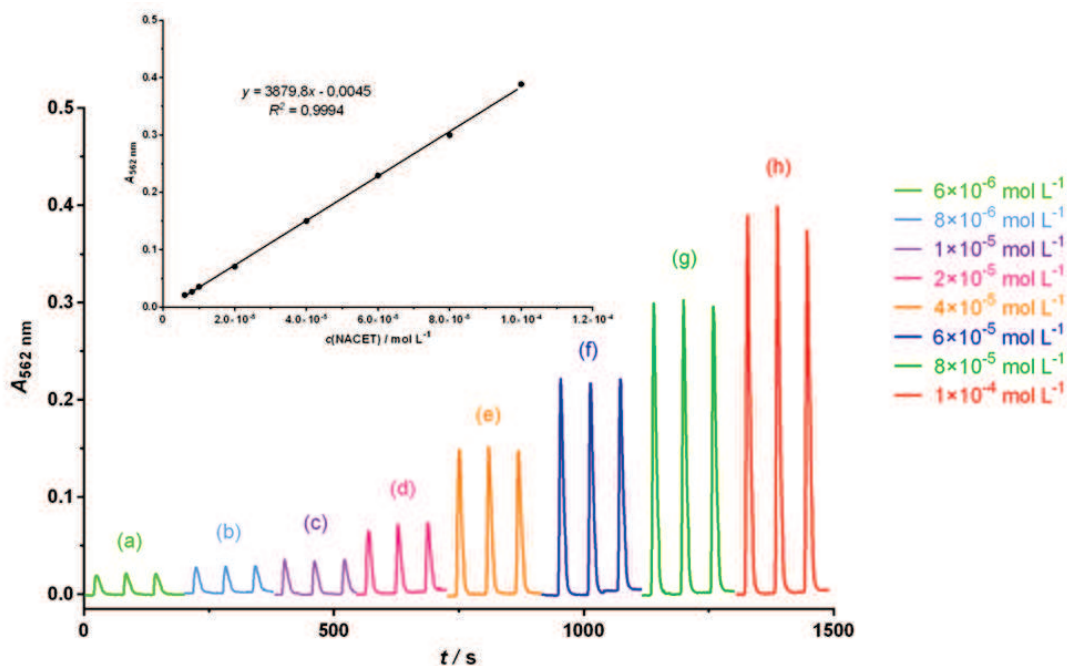
Optimiziranom metodom slijedne analize injektiranjem uz jednostrano injektiran reagens konstruirana je krivulja umjeravanja za područje koncentracija od $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ analita *N*-acetil-L-cistein etil estera (NACET). U ovom koncentracijskom području linearnom regresijskom analizom odnosa visine vrha signala nasuprot koncentraciji analita (za 7 vrijednosti koncentracija) dobivena je jednadžba pravca: $y = 3483,4x + 0,0063$, s korelacijskim koeficijentom $R^2 = 0,9900$, gdje je y visina vrha apsorbancije, a x je koncentracija analita (NACET) izražena u mol L^{-1} (slika 3-19).



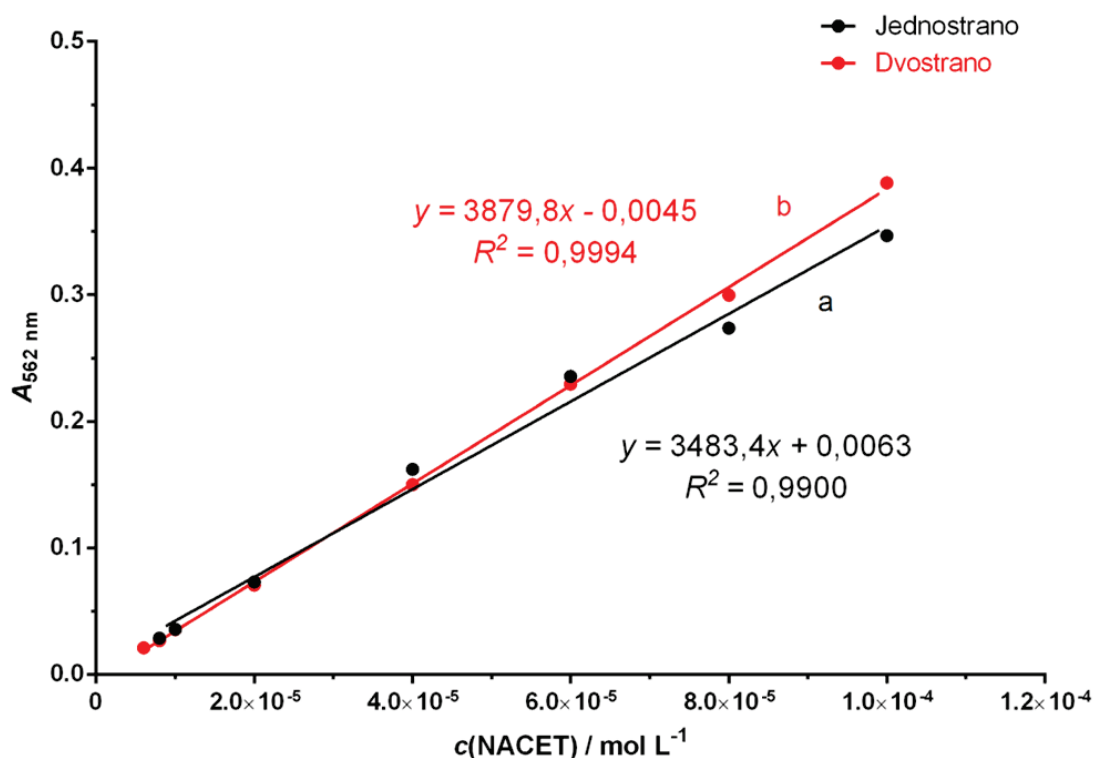
Slika 3-19 Diagram i krivulja umjeravanja za spektrofotometrijsko određivanje NACET-a.

Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET})$: (a) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Također, optimiziranom metodom slijedne analize injektiranjem uz dvostrano injektiran reagens konstruirana je krivulja umjeravanja za određivanje *N*-acetil-L-cistein etil estera u koncentracijskom području NACET-a od $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linearnom regresijskom analizom odnosa visine vrha signala nasuprot koncentraciji analita (za 8 vrijednosti koncentracija) dobivena je jednadžba pravca: $y = 3879,8x - 0,0045$, s korelacijskim koeficijentom $R^2 = 0,9994$, gdje je y visina vrha apsorbancije, a x je koncentracija NACET-a izražena u mol L^{-1} (slika 3-20).



Slika 3-20 Siagram i krivulja umjeravanja za spektrofotometrijsko određivanje NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET})$: (a) $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (h) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: $150 + 100 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.



Slika 3-21 Usporedba krivulja umjeravanja dviju razvijenih SIA metoda određivanja NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET})$: (a) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine reagensa: (a) $250 \text{ } \mu\text{L}$, (b) $150 + 100 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja otopine analita (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.3.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

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

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

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

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

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

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

Standardna devijacija slijepe probe uz jednostrano injektiran reagens iznosi 0,002583, dok nagib krivulje umjeravanja iznosi 3483,4. Granica dokazivanja izračunata je na temelju jednadžbe (3-3) i iznosi $2,22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, dok je granica određivanja izračunata korištenjem jednadžbe (3-4) i iznosi $7,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

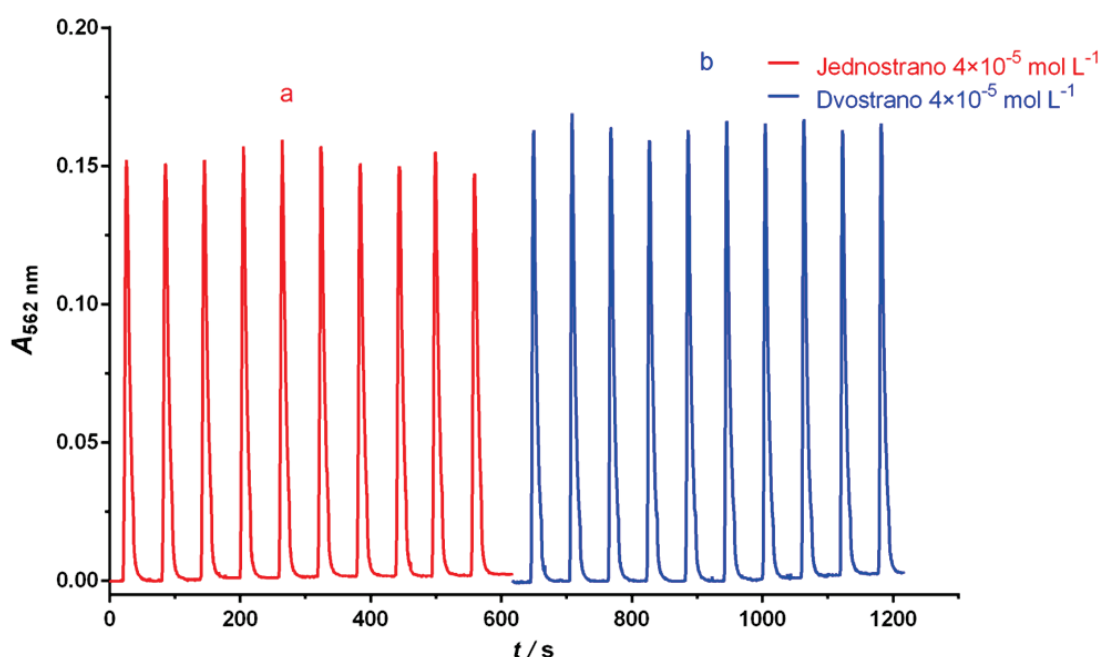
Standardna devijacija slijepe probe pri dvostranom injektiranju reagensa iznosi 0,002072, dok nagib krivulje umjeravanja iznosi 3879,8. Granica dokazivanja izračunata je na temelju jednadžbe (3-3) i iznosi $1,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, dok je granica određivanja izračunata korištenjem jednadžbe (3-4) i iznosi $5,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.3. Ponovljivost - relativno standardno odstupanje

Ponovljivost signala otopine analita $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$ ispitana je kroz deset uzastopnih injektiranja (slika 3-22). Postignuto je relativno standardno odstupanje (engl. *Relative standard deviation*, RSD) od 2,51 % uz jednostrano injektiran reagens te 1,66 % uz dvostrano injektiran reagens što se može smatrati zadovoljavajućim. Relativno standardno odstupanje izračunato je korištenjem izraza:

$$\text{RSO} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3-4)$$

gdje je s standardno odstupanje, a $\bar{x}$ sredina skupa podataka.

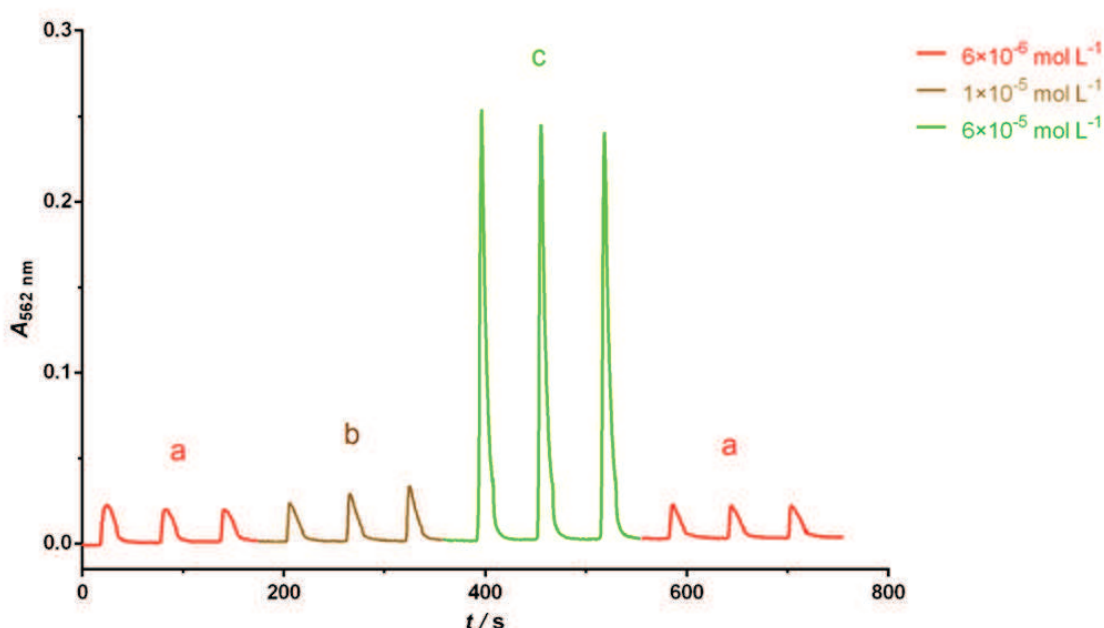


Slika 3-22 Siagram određivanja NACET-a $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$ za deset uzastopnih mjerenja. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ\text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: (a) = $250 \mu\text{L}$, (b) $150 + 100 \mu\text{L}$; volumen injektiranja NACET-a: $250 \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.3.4. Prenosjenje signala

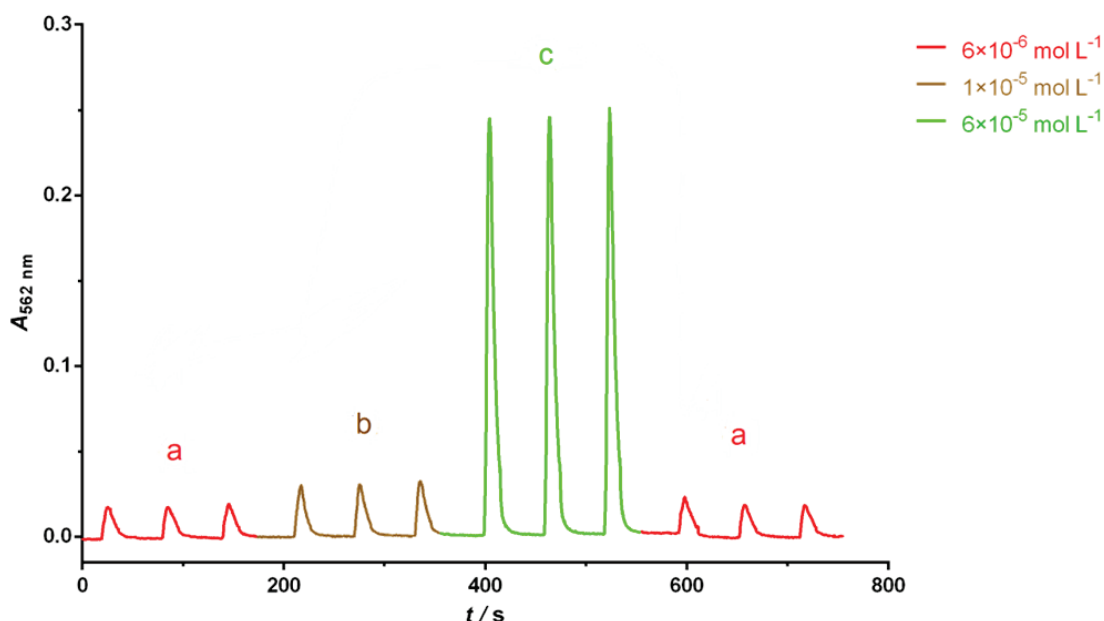
Prenosjenje signala ispitano je naizmjeničnim injektiranjem otopina koje su sadržavale različite koncentracije analita (NACET). Svaka otopina analita injektirana je po tri puta. Praćen je povratak signala na osnovnu liniju te utjecaj naglih promjena koncentracija na visinu vrha signala.

Primjenom optimizirane metode pri jednostranom injektiranju reagensu, bez obzira na analizirane koncentracije, ne dolazi do prenošenja signala kao ni do pomaka bazne linije (slika 3-23).



Slika 3-23 Siagram određivanja NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET})$: (a) $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina analita: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,8$; $t = 25^\circ \text{C}$; brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $250 \mu\text{L}$; volumen injektiranja NACET-a: $250 \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Utvrđeno je da ni primjenom optimizirane metode pri dvostranom injektiranju reagensa (slika 3-24) ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije NACET-a. Također, nije primijećen ni pomak osnovne linije.



Slika 3-24 Siagram određivanja NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: $c(\text{NACET})$: (a) $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{BCA}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,8$; $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $150 + 100 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja NACET-a: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$; $\lambda = 562 \text{ nm}$.

3.4. Utjecaj interferencija

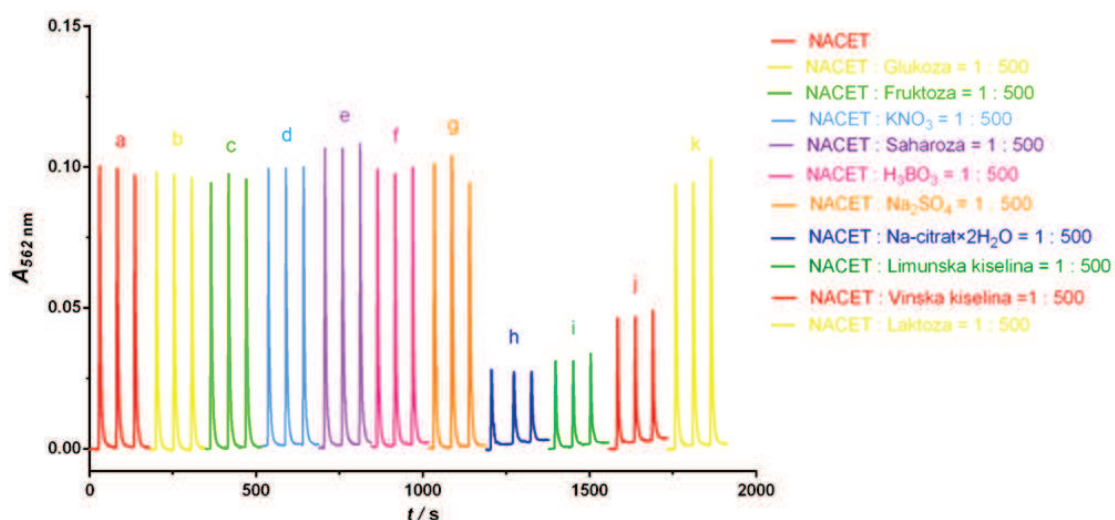
Ispitan je utjecaj odabranih stranih iona na određivanje analita $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$. Granica tolerancije definirana je kao koncentracija stranog iona ili tvari koja će prilikom mjerenja izazvati pogrešku manju od $\pm 5 \%$.

Relativna pogreška izračunata je korištenjem izmjerene apsorbancije standardne otopine analita koja iznosi 0,0992 uz jednostrano injektiran reagens, odnosno 0,1185 uz dvostrano injektiran reagens. Izraz za izračunavanje relativne pogreške glasi:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{A_{\text{interferencija}} - A_{\text{NACET}}}{A_{\text{NACET}}} \times 100 \quad (3-5)$$

3.4.1. Utjecaj interferencija ispitan uz jednostrano injektiranje reagensa

Ispitan je utjecaj određenih interferirajućih tvari u 500 puta većoj koncentraciji u odnosu na koncentraciju NACET-a (slika 3-25).



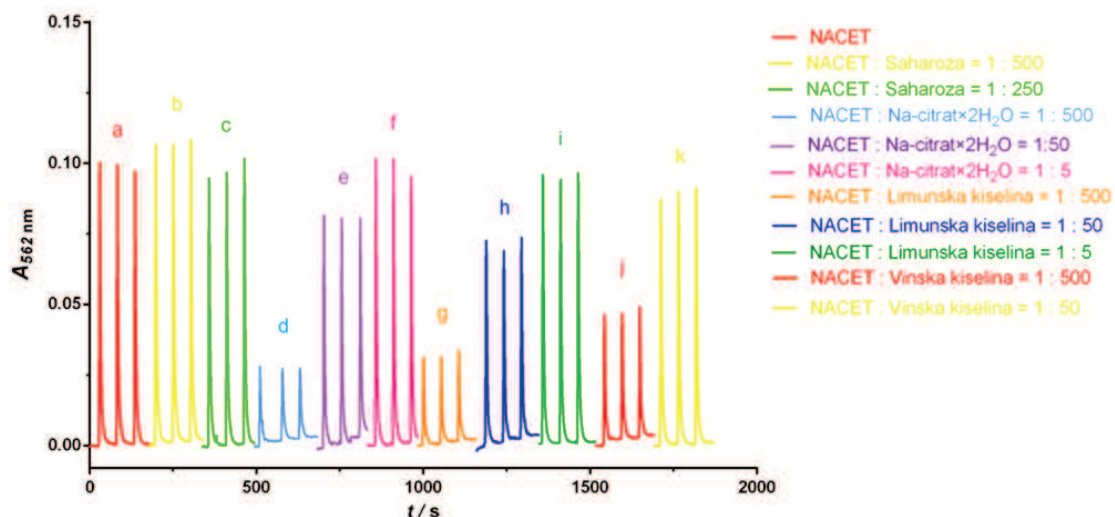
Slika 3-25 Siagram utjecaja interferencija na određivanje NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: (a) – (k): $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $c(\text{glukoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $c(\text{fruktoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $c(\text{KNO}_3) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (h) $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (i) $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (j) $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (k) $c(\text{laktoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, brzina protoka: $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ } \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen injektiranja (NACET): $250 \text{ } \mu\text{L}$; volumen osnovne otopine: $3500 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete: $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 562 \text{ nm}$.

U tablici 3.3. navode se srednje vrijednosti apsorbancije tri provedena mjerenja te relativna pogreška.

Tablica 3.3. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari, omjer NACET:interferirajuća tvar 1:500.

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija NACET:interferirajuća tvar	$\bar{A}_{562}$, nm	Relativna pogreška, %
glukoza	1:500	0,0973	– 1,92
fruktoza	1:500	0,0961	– 3,13
KNO ₃	1:500	0,0999	+ 0,71
saharoza	1:500	0,1075	+ 8,37
H ₃ BO ₃	1:500	0,0991	– 0,10
Na ₂ SO ₄	1:500	0,1009	+ 1,71
Na-citrat dihidrat	1:500	0,0277	– 72,08
limunska kiselina	1:500	0,0323	– 67,44
vinska kiselina	1:500	0,0476	– 52,02
laktoza	1:500	0,0997	– 1,92

Koncentracije glukoze, fruktoze, kalijeva nitrata, borne kiseline, natrijeva sulfata i laktoze tolerantne su do koncentracije od $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:500. Kalijev nitrat i natrijev sulfat su elektroliti ionske jakosti $\mu = 0,1$, odnosno $\mu = 0,3$ te nemaju značajan utjecaj na potpunost reakcije. Uočava se odstupanje saharoze, Na-citrat dihidrata te limunske i vinske kiseline. Budući da se radi o značajno većoj koncentraciji navedenih tvari od one koji se uobičajeno nalazi u farmaceutskim pripravcima, mjerenje je ponovljeno uz smanjene vrijednosti interferirajućih tvari. Dobiveni su rezultati prikazani na slici 3-26 te su navedeni u tablici 3.4.



Slika 3-26 Siagram utjecaja interferencija na određivanje NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: (a) – (k): $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (b): $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (c): $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (d): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (e): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (f): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (g): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (h): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (i): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (j): $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (k): $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ\text{C}$, brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $150 + 100 \mu\text{L}$; volumen injektiranja (NACET): $250 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 562 \text{ nm}$.

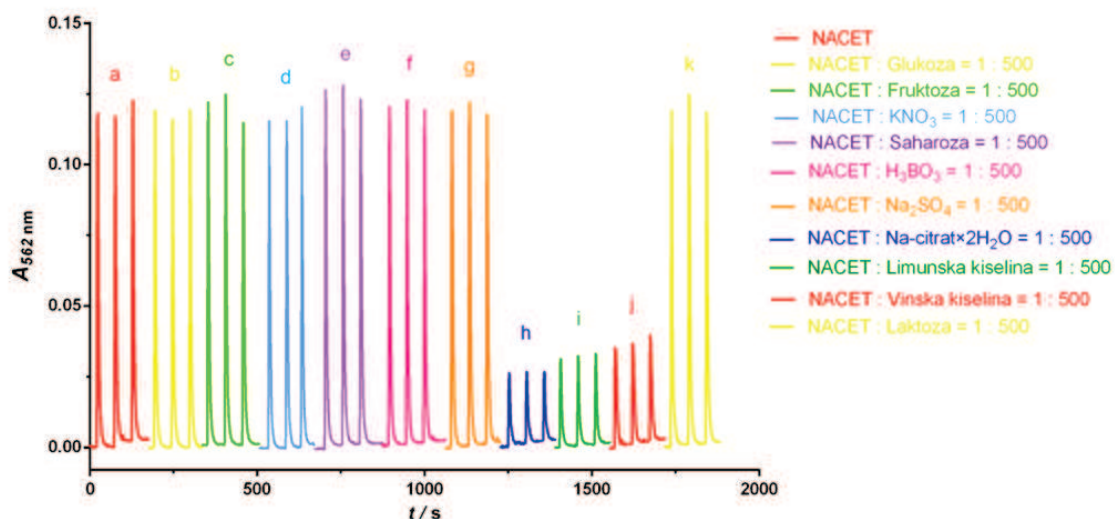
Tablica 3.4. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari nižih koncentracija.

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija NACET:interferirajuća tvar	$\bar{A}_{562}$, nm	Relativna pogreška, %
saharoza	1:500	0,1075	+ 8,37
saharoza	1:250	0,0980	– 1,21
Na-citrat dihidrat	1:500	0,0277	– 72,08
Na-citrat dihidrat	1:50	0,0811	– 18,25
Na-citrat dihidrat	1:5	0,0997	+ 0,50
limunska kiselina	1:500	0,0323	– 67,44
limunska kiselina	1:50	0,0721	– 27,32
limunska kiselina	1:5	0,0958	– 3,43
vinska kiselina	1:500	0,0476	– 52,02
vinska kiselina	1:50	0,0972	– 2,02

Saharoza je tolerantna do koncentracije $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:250. Limunska kiselina i Na-citrat dihidrat su tolerantni do koncentracije $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, dok je vinska kiselina tolerantna do koncentracije $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:5, odnosno 1:50.

3.4.2. Utjecaj interferencija ispitan uz dvostrano injektiranje reagensa

Ispitan je utjecaj određenih interferirajućih tvari u 500 puta većoj koncentraciji u odnosu na koncentraciju NACET-a (slika 3-27).



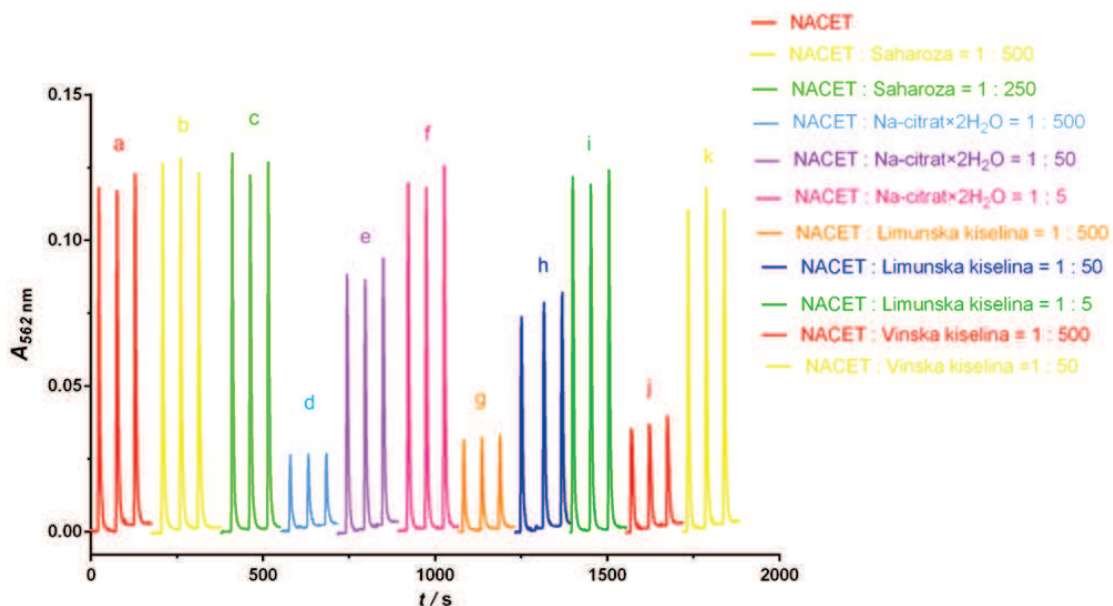
Slika 3-27 Siagram utjecaja interferencija na određivanje NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: (a) – (k): $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $c(\text{glukoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $c(\text{fruktoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $c(\text{KNO}_3) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (h) $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (i) $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (j) $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (k) $c(\text{laktoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8; $t = 25^\circ \text{C}$, brzina protoka: $3000 \mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $250 \mu\text{L}$; volumen injektiranja (NACET): $250 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine: $3500 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete: $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 562 \text{ nm}$.

U tablici 3.5. nalaze se srednje vrijednosti apsorbancije tri provedena mjerenja te relativna pogreška

Tablica 3.5. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari, omjer NACET:interferirajuća tvar 1:500.

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija NACET:interferirajuća tvar	$\bar{A}_{562}$, nm	Relativna pogreška, %
glukoza	1:500	0,1183	– 0,17
fruktoza	1:500	0,1224	+ 3,29
KNO ₃	1:500	0,1173	– 1,01
saharoza	1:500	0,1261	+ 6,41
H ₃ BO ₃	1:500	0,1210	+ 2,11
Na ₂ SO ₄	1:500	0,1197	+ 1,01
Na-citrat dihidrat	1:500	0,0269	– 77,30
limunska kiselina	1:500	0,0325	– 75,57
vinska kiselina	1:500	0,0374	– 68,44
laktoza	1:500	0,1210	+ 2,11

Koncentracije glukoze, fruktoze, kalijeva nitrata, borne kiseline, natrijeva sulfata i laktoze tolerantne su do koncentracije $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:500. Kalijev nitrat i natrijev sulfat su elektroliti ionske jakosti $\mu = 0,1$, odnosno $\mu = 0,3$ te nemaju značajan utjecaj na potpunost reakcije. Uočava se odstupanje saharoze, Na-citrat dihidrata te limunske i vinske kiseline. Budući da se radi o značajno većoj koncentraciji navedenih tvari od one koji se uobičajeno nalazi u farmaceutskim pripravcima, mjerenje je ponovljeno uz smanjene vrijednosti interferirajućih tvari. Dobiveni su rezultati prikazani na slici 3-28 te su navedeni u tablici 3.6.



Slika 3-28 Siagram utjecaja interferencija na određivanje NACET-a. Eksperimentalni uvjeti: osnovna otopina je deionizirana voda; otopina analita: (a) – (k): $c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (b): $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (c): $c(\text{saharoza}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (d): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (e): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (f): $c(\text{Na-citrat dihidrat}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (g): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (h): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (i): $c(\text{limunska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (j): $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (k): $c(\text{vinska kiselina}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; otopina reagensa: $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{BCA}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{tartarat}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 6,8, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, brzina protoka: $3000 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; volumen petlje zadržavanja: $500 \text{ }\mu\text{L}$; volumen reakcijske petlje: $120 \text{ }\mu\text{L}$; volumen injektiranja reagensa: $250 \text{ }\mu\text{L}$; volumen injektiranja (NACET): $250 \text{ }\mu\text{L}$, volumen osnovne otopine: $3500 \text{ }\mu\text{L}$, volumen protočne kivete: $80 \text{ }\mu\text{L}$, $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Tablica 3.6. Prikaz utjecaja interferirajućih tvari nižih koncentracija.

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija NACET:interferirajuća tvar	$\bar{A}_{562}$, nm	Relativna pogreška, %
saharoza	1:500	0,1261	+ 6,41
saharoza	1:250	0,1243	+ 4,89
Na-citrat dihidrat	1:500	0,0270	– 77,30
Na-citrat dihidrat	1:50	0,0898	– 24,22
Na-citrat dihidrat	1:5	0,1214	+ 2,45
limunska kiselina	1:500	0,0325	– 72,57
limunska kiselina	1:50	0,0784	– 33,84
limunska kiselina	1:5	0,1220	+ 2,95
vinska kiselina	1:500	0,0374	– 68,44
vinska kiselina	1:50	0,1132	+ 4,47

Saharoza je tolerantna do koncentracije $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:250. Limunska kiselina i Na-citrat dihidrat su tolerantni do koncentracije $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, dok je vinska kiselina tolerantna do koncentracije $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:5, odnosno 1:50.

3.4.3. Usporedba utjecaja interferirajućih tvari uz jednostrano i dvostrano injektiranje reagensa

Utjecaj interferirajućih tvari ispitan uz jednostrano i dvostrano injektiranje reagensa se neznatno razlikuje. Sve interferirajuće tvari tolerantne su u istim molarnim omjerima NACET-a prema interferirajućoj tvari, neovisno o načinu injektiranja

reagensa. Naime, elektroliti kalijev nitrat ionske jakosti $\mu = 0,1$ i natrijev sulfat $\mu = 0,3$ nemaju značajan utjecaj na potpunost reakcije i tolerantni su u molarnom omjeru 1:500 baš kao i glukoza, fruktoze, borna kiselina te laktoza, dok je saharoza je tolerantna do molarnog omjera 1:250. Limunska kiselina i Na-citrat dihidrat su tolerantni do omjera 1:50, a vinska kiselina je tolerantna do omjera 1:5.

4. ZAKLJUČAK

Osnovne prednosti sustava za slijednu analizu injektiranjem (SIA) iskorištene su za razvoj jednostavne, brze i osjetljive spektrofotometrijske metode određivanja NACET-a koja se zasniva na redoks reakciji u kojoj NACET (RSH spoj) reducira zeleno obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{2+}$ kompleks u ljubičasto obojeni $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ kompleks koji apsorpcijski maksimum postiže pri valnoj duljini $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Univarijantnom metodom optimizirane su osnovne značajke sustava SIA koje omogućuju pouzdano određivanje NACET-a uz jednostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ te uz dvostrano injektiranje reagensa u koncentracijskom području od $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Linearno dinamičko područje uz jednostrano injektiranje reagensa definirano je jednadžbom: $y = 3483,4x + 0,0063$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9900$, dok je uz dvostrano injektiranje reagensa definirano jednadžbom: $y = 3879,8x - 0,0045$, uz koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9994$. Određene su granica dokazivanja i granica određivanja uz jednostrano injektiranje reagensa te iznose $2,22 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, odnosno $7,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Granica dokazivanja i granica određivanja određene su i uz dvostrano injektiranje reagensa te iznose $1,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, odnosno $5,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Ponovljivost signala ima relativno standardno odstupanje od 2,51 % uz jednostrano injektiran reagens te 1,66 % uz dvostrano injektiran reagens što se može smatrati zadovoljavajućim.

Utvrđeno je i da naizmjeničnim injektiranjem otopina analita koje su sadržavale različite koncentracije NACET-a ne dolazi do prenošenja signala, bez obzira na analizirane koncentracije NACET-a. Navedeno se odnosi na određivanje NACET-a uz jednostrano te uz dvostrano injektiranje reagensa.

Ispitan je utjecaj odabranih stranih iona na određivanje NACET-a $\{c(\text{NACET}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}\}$. Koncentracije glukoze, fruktoze, laktoze, kalijeva nitrata, borne kiseline i natrijeva sulfata tolerantne su do koncentracije $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:500. Saharoza je tolerantna do koncentracije $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:250. Limunska kiselina i Na-citrat dihidrat su tolerantni do koncentracije $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, dok je vinska kiselina tolerantna do koncentracije $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ što odgovara molarnom omjeru NACET-a prema stranim ionima 1:5,

odnosno 1:50. Navedene vrijednosti odnose se na određivanje NACET-a uz jednostrano, kao i uz dvostrano injektiranje reagensa.

Razvijena metoda određivanja slijednom analizom injektiranjem omogućuje pouzdano određivanje NACET-a uz nisku potrošnju otopina analita i reagensa, kao i osnovne otopine. Određivanjem NACET-a slijednom analizom injektiranjem uz dvostrano injektiranje reagensa, u odnosu na jednostrano, nastaje potpunija kemijska reakcija, veća je apsorbancija, a time i osjetljivost. Također, određivanjem NACET-a uz dvostrano injektiranje reagensa postiže se bolja linearnost, kao i ponovljivost.

5. LITERATURA

1. *D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, D. Tsikas, 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. *Nj. Radić, L. Kukoc Modun*, Kinetic methods of analysis with potentiometric and spectrophotometric detectors-our laboratory experiences, *Analytical Chemistry*, INTECH (2012) 71-92
3. *D. Harvey*, Modern analytical chemistry, McGraw-Hill Companies Inc., Boston, 2000.
4. *Nj. Radić, L. Kukoc Modun, M. Biocic*, Kinetic spectrophotometric determination of N-acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent, *Croatica Chemica Acta* **86** (1) (2013) 65–71
5. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html> (16.04.2016.)
6. *L. Kukoc Modun*, Razvoj metoda spektrofotometrijskog i potencijometrijskog određivanja tiopronina u farmaceutskim pripravcima, Disertacija, Zagreb, 2009.
7. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.1.%20Introduction%20-%20Continuous%20and%20Programmed%20Flow%20Injection.html> (16.04.2016)
8. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.0%20Flow%20Injection.html> (16.04.2016)
9. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.4.%20Flow%20Injection%20System.html> (16.04. 2016)
10. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.1.%20INTRODUCTION.html> (16.04. 2016)
11. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.0%20Sequential%20Injection.html> (16.04.2016.)
12. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Introduction%20I.8.%20Miniaturization%20for%20Flow%20Analysis.html> (16.04. 2016)
13. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html> (16.04. 2016)
14. URL: http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/13_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis (09.05.2016.)
15. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%203.0%20Bead%20Injection>

- [html](#) (16.04.2016)
16. URL: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%204.0%20SI%20Chromatography.html> (16.04.2016)
17. *D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler*, Osnove analitičke kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
18. URL: <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja> (17.04.2016.)
19. *D. C. Harris*, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.
20. URL: <http://media.biocompare.com/m/37/article/o/130997B.jpg> (09.05.2016.)
21. *G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K.A. Schug*, Analytical Chemistry, elektronska verzija, 2014, 16. poglavlje
22. *D.A. Skoog, D. M. West, F. M. Holler, S.R. Crouch*, Fundamentals of Analytical Chemistry, elektronsko izdanje, 2013., 25. poglavlje
23. *D. Tsikas, S. Dehnert, K. Urban, A. Surdacki, H.H. Meyer*, GC-MS analysis of *S*-nitrosothiols after conversion to *S*-nitroso-*N*-acetyl cysteine ethyl ester and in-injector nitrosation of ethyl acetate, Journal of Chromatografy B, **877** (2009) 3442-3455
24. *L. Kukoc-Modun, D. Tsikas, M. Biocic, T. Kraljevic, Nj. Radić*, Segquential injection analysis of the novel lipophilic amino acid thiol *N*-acetylcysteine ethyl ester (NACET) with spektrophotometric detection, Flow Analysis XIII Book of Abstracts, (2015.) 110
25. URL: https://www.pipettes.com/media/catalog/product/e/p/eppendorf_researchplus_fixed_pipettes.jpg (09.05.2016)

6. PRILOZI

System Settings
Pump:625 Gearbox:CP-DSM2 uL/Rev:603.000 Backlash(uL):disabled

Method: petlje jednostrano
Status: Idle

Run Reset
☐ Repeat

Ready ☒ Wait ☐
Dispense ☐ Aspirate ☐
Wash ☐ Valve ☐

Event Edit Close

#	Action	uL.	uL./min.	Wait (sec)	Event
1	Multi Valve	pos.= 1	dir.= Short		
2	Aspirate	250.0000	3000		
3	Multi Valve	pos.= 2	dir.= Short		
4	Aspirate	250.0000	3000		
5	Multi Valve	pos.= 10	dir.= Short		
6	Dispense	3500.0000	3000		

Prilog 1 Programski slijed određivanja NACET-a uz jednostrano injektiranje reagensa.

System Settings
Pump:625 Gearbox:CP-DSM2 uL/Rev:603.000 Backlash(uL):disabled

Method: petlje sandwich
Status: Idle

Run Reset
☐ Repeat

Ready ☒ Wait ☐
Dispense ☐ Aspirate ☐
Wash ☐ Valve ☐

Event Edit Close

#	Action	uL.	uL./min.	Wait (sec)	Event
1	Multi Valve	pos.= 1	dir.= Short		
2	Aspirate	150.0000	3000		
3	Multi Valve	pos.= 2	dir.= Short		
4	Aspirate	250.0000	3000		
5	Multi Valve	pos.= 1	dir.= Short		
6	Aspirate	100.0000	3000		
7	Multi Valve	pos.= 10	dir.= Short		
8	Dispense	3500.0000	3000		

Prilog 2 Programski slijed određivanja NACET-a uz dvostrano injektiranje reagensa.