

Određivanje fenicilamina u farmaceutskim pripravcima kinetičkom metodom analize uz spektrofotometrijski detektor

Dugeč, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:167:738380>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-08**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ODREĐIVANJE PENICILAMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA
KINETIČKOM METODOM ANALIZE UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI
DETEKTOR**

DIPLOMSKI RAD

JOSIPA DUJEČ

Matični broj: 154

Split, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ODREĐIVANJE PENICILAMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA
KINETIČKOM METODOM ANALIZE UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI
DETEKTOR

DIPLOMSKI RAD

JOSIPA DUGEČ

Matični broj: 154

Split, srpanj 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY PROGRAMME IN CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**DETERMINATION OF PENICILLAMINE IN PHARMACEUTICAL
FORMULATIONS USING KINETIC METHOD WITH
SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR**

MASTER THESIS

JOSIPA DUJEČ

Parent number: 154

Split, July 2022.

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Studij: Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta održanoj 18. ožujka 2022. godine

Mentor: izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Biočić

**ODREĐIVANJE PENICILAMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA KINETIČKOM
METODOM ANALIZE UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR**

Josipa Dugeč, 154

Sažetak:

Korištenjem kinetičke spektrofotometrije razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja penicilamina (PEN) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks reakciji između bis batokuproin bakrov(II) kompleksa i penicilamina pri čemu nastaje stabilan kompleks narančaste boje, bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm. Optimizirani su parametri koji utječu na kemijsku reakciju. Kod izrade krivulja umjeravanja korištene su metoda početne brzine i metoda odabranog vremena. Krivulja umjeravanja metodom početne brzine linearna je u području koncentracija od $6,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, s granicom dokazivanja od $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Nagib krivulje umjeravanja dobiven metodom početne brzine (1,0448) potvrđuje reakciju pseudoprvog reda. Krivulja umjeravanja metodom odabranog vremena (prva minuta) linearna je u području koncentracija od $2,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, s granicom dokazivanja od $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima što je uspoređeno s rezultatima dobivenim preporučenom metodom po farmakopeji.

Ključne riječi: penicilamin, kinetička spektrofotometrija, redoks reakcija

Rad sadrži: 57 strana, 22 slike, 7 tablica, 19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek
3. Izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Datum obrane: 19. srpnja 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

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

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject: Analytical chemistry
Mentor: Lea Kukoč Modun, PhD, Associate Professor
Technical assistance: Maja Biočić, PhD

DETERMINATION OF PENICILLAMINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS USING KINETIC METHOD WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR

Josipa Dugeč, 154

Summary:

Kinetic spectrophotometry was employed for development and validation of new method for determination of penicillamine (PEN) in pharmaceutical formulation. The method is based on a redox reaction in which the reduction of copper(II) – neocuproine by penicillamine occurs, with formation of stable coloured, yellow-orange complex of copper(I) – neocuproine. The resulting complex exhibits an absorption maximum at $\lambda = 483$ nm. The parameters of chemical reaction have been optimized. The initial rate and fixed time methods were utilized for constructing the calibration graphs. The graph for initial rate method was linear in concentration range from $6,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ with the limit of detection $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. The slope of the initial method calibration curve (1.0448) confirmed the first order reaction. The graph for fixed time method (1 min) was linear in concentration range from $2,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ with the limit of detection $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations. The proposed method was successfully applied for the determination of PEN in its commercial pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the recommended method in Pharmacopoeia.

Key words: penicillamine, kinetic spectrophotometry, redox reaction

Thesis contains: 57 pages, 22 figures, 7 tables, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul- PhD, assistant prof. chair person
2. Mario Nikola Mužek- PhD, assistant prof. member
3. Lea Kukoč Modun - PhD associate prof. supervisor

Defence date: July 19, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Lee Kukoč Modun, uz neposredno vodstvo dr. sc. Maje Biočić, u razdoblju od veljače do svibnja 2022. godine.

Zahvala

Posebnu zahvalnost izražavam svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lei Kukoč Modun na pruženoj pomoći, prenesenom znanju i stručnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Srdačno zahvaljujem Maji Biočić, dr. sc. što me strpljivo svojim savjetima i velikodušnom pomoći vodila tijekom izrade ovog rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su studiranje učinili nezaboravnim.

I na samom kraju, najveće hvala mojoj obitelji koji su mi bili najveća podrška.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razvoj i vrednovanje metode određivanja pencilamina (PEN-a) kinetičkom analizom uz spektrofotometrijski detektor pri valnoj duljini od 483 nm. Optimizacija metode uključuje optimizaciju reakcijskih uvjeta koji bi mogli utjecati na kemijsku reakciju:

1. pH vrijednosti
2. omjera koncentracija reagensa, BCS i Cu^{2+}
3. omjera koncentracije reagensa i analita, Cu^{2+} i PEN-a
4. temperature sustava

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

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

Metoda je vrednovana ispitivanjem točnosti i preciznosti na osnovu ponovljivosti metode i iskoristivosti metode (engl. *recovery*), te ispitivanjem utjecaja interferencija na zabilježeni signal.

SAŽETAK

Korištenjem kinetičke spektrofotometrije razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja penicilamina (PEN) u farmaceutskim pripravcima. Metoda se temelji na redoks reakciji između bis batokuproin bakrov(II) kompleksa i PEN-a pri čemu nastaje stabilan kompleks narančaste boje, bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm.

Optimizirani su parametri koji utječu na kemijsku reakciju. Kod izrade krivulja umjeravanja korištene su metoda početne brzine i metoda odabranog vremena. Krivulja umjeravanja metodom početne brzine linearna je u području koncentracija od $6,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, s granicom dokazivanja od $1,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Nagib krivulje umjeravanja dobiven metodom početne brzine (1,0448) potvrđuje reakciju pseudoprvog reda. Krivulja umjeravanja metodom odabranog vremena (prva minuta) linearna je u području koncentracija od $2,0 \times 10^{-7}$ do $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, s granicom dokazivanja od $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Predložena metoda uspješno je primijenjena kod određivanja penicilamina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima što je uspoređeno s rezultatima dobivenim preporučenom metodom po farmakopeji.

Ključne riječi: penicilamin, kinetička spektrofotometrija, redoks reakcija

SUMMARY

Kinetic spectrophotometry was employed for development and validation of new method for determination of penicillamine (PEN) in pharmaceutical formulation. The method is based on a redox reaction in which the reduction of copper(II) – neocuproine by penicillamine occurs, with formation of stable coloured, yellow-orange complex of copper(I) – neocuproine. The resulting complex exhibits an absorption maximum at $\lambda = 483$ nm.

The parameters of chemical reaction have been optimized. The initial rate and fixed time methods were utilized for constructing the calibration graphs. The graph for initial rate method was linear in concentration range from $6,0 \times 10^{-7}$ to $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ with the limit of detection $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. The slope of the initial method calibration curve (1.0448) confirmed the first order reaction. The graph for fixed time method (first minute) was linear in concentration range from $2,0 \times 10^{-7}$ to $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ with the limit of detection $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. No interferences were observed from the excipients that are commonly present in the pharmaceutical formulations.

The proposed method was successfully applied for the determination of PEN in its commercial pharmaceutical formulation, which is compared to the results obtained by the recommended method in Pharmacopoeia.

Key words: penicillamine, kinetic spectrophotometry, redox reaction

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Penicilamin.....	3
1.1.1. Kemijska svojstva	3
1.1.2. Biokemijska svojstva	4
1.2. Kinetičke metode analize	5
1.2.1. Brzina kemijske reakcije	6
1.2.1.1. Zakoni brzine, red reakcije	7
1.2.1.1.1. Zakoni brzine za reakcije prvog reda	7
1.2.1.1.2. Zakoni brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda.....	8
1.3. Kontinuirano praćenje kemijske reakcije.....	9
1.4. Vrste kinetičkih metoda	12
1.4.1. Diferencijalne metode	12
1.4.1.1. Metoda početne brzine	13
1.4.2. Integralne metode.....	13
1.4.2.1. Metoda određenog vremena.....	14
1.5. Praćenje napredovanja reakcije	14
1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda.....	15
1.7. Spektroskopija	16
1.7.1. Svojstva elektromagnetskog zračenja	17
1.7.2. Apsorpcija zračenja.....	17
1.7.2.1. Odnos između apsorbancije i koncentracije: Beerov zakon.....	21
1.7.2.2. Ograničenja Beerovog zakona	22
1.7.3. Molekulska apsorpcijska spektroskopija.....	23
1.8. Potencijometrija.....	25
1.8.1. Izravna potencijometrija.....	26

1.8.2. Potenciometrijska titracija	27
2. EKSPERIMENTALNI DIO	28
2.1. Materijali	29
2.1.1. Priprava otopina	29
2.1.1.1. Deionizirana voda	29
2.1.1.2. Otopina pencilamina (PEN).....	29
2.1.1.3. Otopine reagensa	29
2.1.1.4. Otopina acetatno – boratno – fosfatnog pufera.....	29
2.1.1.5. Otopina acetatnog pufera	30
2.1.1.6. Otopina natrijeva hidroksida.....	30
2.1.1.7. Otopine realnog uzoraka.....	30
2.1.1.8. Otopine za određivanje PEN-a prema metodi koju propisuje Farmakopeja	31
2.2. Instrumenti i uređaji.....	31
2.2.2. Ostali uređaji i oprema	32
2.3. Metode rada.....	33
2.3.1. Kinetička spektrofotometrija	33
2.3.1.1. Prikupljanje i obrada podataka.....	34
2.3.2.1.1. Određivanje PEN-a metodom koju propisuje Farmakopeja	35
3. REZULTATI I RASPRAVA	36
3.1. Optimizacija sustava	37
3.1.1. Optimizacija pH-vrijednosti	37
3.1.2. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i BCS	38
3.1.3. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i PEN.....	39
3.1.4. Optimizacija temperature	41
3.2. Linerano dinamičko područje (LDP).....	43
3.2.1. Metoda određenog vremena	43

3.2.2. Metoda početne brzine	45
3.3. Utjecaj interferencija.....	46
3.4. Točnost metode	48
5. ZAKLJUČAK	52
6. LITERATURA.....	54

UVOD

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

Za analizu penicilamina, Britanska farmakopeja preporučuje potenciometrijsku titraciju otopinom perklorne kiseline u nevodenom mediju. [1]

Za određivanje PEN-a u farmaceutskim pripravcima te u biološkim uzorcima primjenjuju se različite analitičke metode koje uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, voltometriju, potenciometriju, kolorimetriju, fluorimetriju i spektrofotometriju. Neke od navedenih metoda nisu dovoljno osjetljive i selektivne, dok druge pak zahtijevaju skupe instrumente te su preskupe za svakodnevne rutinske analize. [2]

Spektrofotometrija je odabrana zbog svoje jednostavnosti, široke raspoloživosti u kontrolnim laboratorijima te ekonomske prihvatljivosti. Najčešće je korištena tehnika u farmaceutskoj analizi.

Primjena kinetičkih spektrofotometrijskih metoda nudi brojne prednosti u odnosu na klasičnu spektrofotometriju. U većini slučajeva ne zahtijeva prethodnu obradu uzoraka, u nekoliko minuta uz pomoć pristupačnog detektora, uz dovoljnu selektivnost i osjetljivost omogućava analizu lijeka. [2]

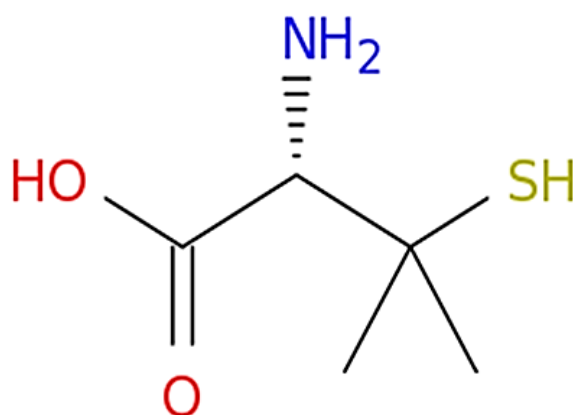
1. OPÍDIO

1.1. Penicilamin

D-penicilamin (PEN) ili prema IUPAC-u (2S)-2-amino-3-metil-3-sulfanilbutanska kiselina prirodni je izvor sumpora u organizmu budući da sadrži aminokiselinu koja pripada amino-tiolnoj obitelji. PEN pripada skupini tiolnih lijekova koji se koriste u liječenju prvenstveno djelujući kao kelatirajuća sredstva za uklanjanje iona teških metala. [3] Koristi se čisti oblik D (ili S) lijeka, jer su L (ili R) oblik i DL (RS)-racemična smjesa mnogo otrovniji, pokazuju teške nuspojave. [4] Penicilamin je α -aminokiselinski metabolit penicilina, ali nema antibiotska svojstva.

1.1.1. Kemijska svojstva

PEN je pri sobnoj temperaturi bijeli ili gotovo bijeli kristalinični prah, molekulske formule $C_5H_{11}NO_2S$. Molna masa iznosi $149,21 \text{ g mol}^{-1}$. Karakterističnog je mirisa i kiselog okusa. Osim naziva spoja prema IUPAC-u, česti sinonimi naziva penicilamina su 3-merkapt-D-valin i D- β , β -dimetilcistein. Potpuno je topljiv u vodi, a neznatno topljiv u alkoholu. 1 %-tna vodena otopina ima pH-vrijednost od 4,5 do 5,5. Ima talište na temperaturi 202-206 °C. [3]



Slika 1. Molekulska struktura D-penicilamina [5]

1.1.2. Biokemijska svojstva

PEN je tiolni lijek koji se koristi u liječenju Wilsonove bolesti tako što djeluje kao kelatirajuće sredstvo za uklanjanje bakra. Primjenjuje se i u liječenju nekoliko poremećaja kao što su: reumatoidni artritis, primarna bilijarna ciroza, cistinurija, retinopatija u nedonoščadi te progresivna sistematska skleroza. [3]

S obzirom na kelatirajuće svojstvo, PEN potpomaže eliminaciju određenih iona teških metala iz tijela, uključujući bakar, živu i olovo formirajući s njima stabilne topljive komplekse koji se lako izlučuju putem bubrega. Navedeno svojstvo osobito je izraženo prilikom trovanja ionima teških metala, posebice kod trovanja olovom. [6]

Učinkovitost PEN-a dokazana je kod liječenja Wilsonove bolesti, autosomnog recesivnog poremećaja transporta bakra koji dovodi do prekomjernog nakupljanja tog metala u eritrocitima, jetri, bubrezima i mozgu. Time je narušena homeostaza bakra u stanicama. [7] Učinkovito liječenje uključuje uzimanje lijekova koji smanjuju koncentraciju bakra. Primjena PEN-a smanjuje koncentraciju bakra na nekoliko načina. Glavni učinak PEN-a je stvaranje kelata s cirkulirajućim bakrom, koji se potom izlučuju putem urina. Nadalje, PEN smanjuje afinitet proteina i polipeptida prema bakru i na taj način omogućuje uklanjanje bakra iz tkiva.

Penicilamin se primjenjuje za liječenje cistinurije, genetskog poremećaja metabolizma koji dovodi do povećanog izlučivanja aminokiseline cistina, kao i strukturno sličnih aminokiselina arginina, lizina i histidina preko urina te spada u poremećaje transporta aminokiselina. Liječenje cistinurije PEN-om temelji se na smanjenju koncentracije urinarnog cistina pri čemu PEN pospješuje postupno otapanje postojećih kamenaca i sprječava daljnje stvaranje kamenaca. Penicilamin formira kompleks sa cistinom u obliku topljivog disulfida (PEN-cistin disulfid), koji je znatno topljiviji od cistina i lakše se izlučuje iz organizma te je stoga učinkovit u liječenju cistinurije. [8,9]

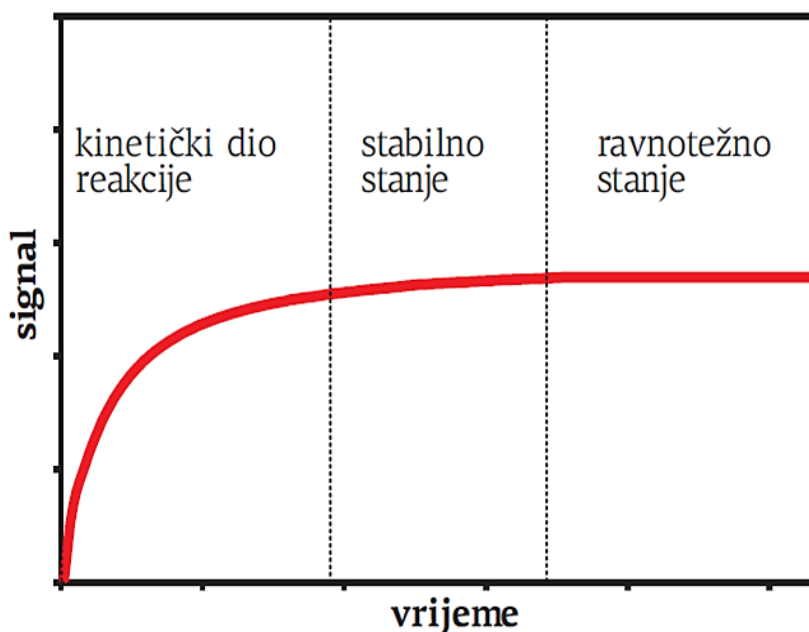
Penicilamin djeluje i kao antireumatski lijek te se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa. To je teška, kronična, upalna bolest vezivnog tkiva koja se najviše očituje upalom ili oticanjem zglobova. U ovom poremećaju imunološki sustav napada hrskavično tkivo, kosti, a ponekad i unutarnje organe. [8,10]

1.2. Kinetičke metode analize

Kinetičke metode analize razlikuju se od ravnotežnih, odnosno termodinamičkih metoda zato što se kod ravnotežnih metoda analitički signal uzorkuje u trenucima ravnotežnog ili bar prihvatljivog stabilnog stanja kemijske reakcije, a kod kinetičkih metoda signal se bilježi u kinetičkom dijelu kemijske reakcije.

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

Najraširenija je primjena kinetičkih metoda u kliničkim i biokemijskim laboratorijima gdje broj analiza temeljen na kinetici prelazi onaj temeljen na termodinamici. [11]



Slika 2. Razdoblja odabrane kemijske reakcije: kinetički dio, stabilno stanje, ravnotežno stanje [12]

U kinetičkim metodama kao analitički parametar služi ili nastajanje produkata ili nestajanje reaktanata. Analize se temelje na činjenici da se za većinu reakcija brzina reakcije i analitički signal povećavaju povećavanjem koncentracije analita. Suprotno tome, u termodinamičkim metodama mjerenja se obavljaju u sustavima koji se nalaze u ravnoteži. U tom slučaju koncentracije su statične, mjeri se apsolutna koncentracija i signal je konstantan. [12]

Selektivnost se u kinetičkim metodama postiže odabirom uvjeta i reagensa koji pojačavaju razlike u brzinama kojima uzorak i moguće interferencije reagiraju, dok se u termodinamičkim metodama selektivnost postiže odabirom uvjeta i reagensa koji povećavaju razlike u ravnotežnim konstantama. [11]

Kemijska reakcija koja se odvija prihvatljivom brzinom može poslužiti kao osnova za kinetička mjerenja. Da bi odabrana kemijska reakcija poslužila razvoju pouzdane kinetičke metode mora zadovoljiti sljedeća tri uvjeta:

- 1.) brzina reakcije ne smije biti ni prebrza ni prespora
- 2.) treba biti poznat zakon brzine
- 3.) treba postojati način kontinuiranog praćenja koncentracije barem jedne vrste iz odabrane reakcije. [13]

Kod razvoja i primjene kinetičkih metoda nužno je da brzinu odabrane reakcije određuje koncentracija analita. Stoga, kod kinetičkog eksperimenta treba ostvariti brzo miješanje reaktanata te primijeniti pouzdan način praćenja napredovanja reakcije s vremenom. Čest postupak praćenja kinetike kemijske reakcije u analitičkom laboratoriju jest primjena potenciometrijskih ili spektrofotometrijskih detektora. [12]

1.2.1. Brzina kemijske reakcije

Brzina kemijske reakcije izražava se kao količina reaktanta koja se troši u jedinici vremena ili količina produkta koja nastaje u jedinici vremena. Reakcija treba biti dovoljno brza kako bi se mjerenja izvršila u razumnom vremenu, a dovoljno spora da se ne postigne stanje ravnoteže dok se reagensi miješaju. [13]

1.2.1.1. Zakoni brzine, red reakcije

Kemijska reakcija koja se odvija u određenom vremenu može se općenito prikazati:



gdje A označava analit, R reagens i P produkt.

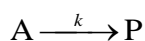
Empirijski oblik zakona brzine za navedenu općenitu reakciju ima oblik

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

gdje je brzina derivacija koncentracije A, R, ili P po vremenu t . Budući da se A i R troše tijekom odvijanja kemijske reakcije, brzine promjene [A] i [R] u odnosu prema vremenu su negativne. Nadalje, k je konstanta, m je red reakcije s obzirom na analit A, dok je n red reakcije s obzirom na reagens R. Ukupni red reakcije je $p = m + n$. Primjerice, ako je $m = 1$ i $n = 2$, reakcija će biti prvog reda s obzirom na A, a drugog reda s obzirom na R, pa je ukupno reakcija trećeg reda.

1.2.1.1.1. Zakoni brzine za reakcije prvog reda

Najjednostavnija kemijska reakcija koja se matematički može prikazati je spontano nepovratno nestajanje vrste A



Reakcija je prvog reda s obzirom na A, te je

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

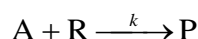
Reakcije prvog reda nisu iskoristive u analitičkoj kemiji budući da se većina analiza temelji na reakcijama između najmanje dvije kemijske vrste, analita i reagensa. Zakoni brzine za reakcije koje uključuju dvije vrste najčešće su vrlo složeni i neupotrebljivi u analitičke svrhe. Stoga, navedene reakcije potrebno je provoditi u uvjetima koji

dopuštaju pojednostavnjenje složenih zakona kako bi takve kemijske reakcije bile analitički iskoristive. [11]

1.2.1.1.2. Zakoni brzine za reakcije drugog i pseudoprvog reda

U analitičkoj kemiji kemijske reakcije uključuju barem dvije kemijske vrste, analit i reagens. Zakon brzine za reakciju koja uključuje dvije vrste najčešće je složen i nepogodan za kvantitativno korištenje. Jedine upotrebljive kinetičke metode su one koje omogućuju pojednostavnjenje složenog zakona brzina u oblik analogan za reakciju prvog reda. Reakcija višeg reda koja se izvodi na način da omogućuje pojednostavnjenje zakona naziva se reakcijom pseudoprvog reda.

Za nepovratnu analitičku reakciju



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

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

Ako je [R] znatno veća od [A], koncentracija R se za vrijeme reakcije jako malo promijeni, pa se može pisati da je

$$k[R] = \text{konstanta} = k'$$

Pošto u zadanim eksperimentalnim uvjetima brzina ovisi samo o koncentraciji jednog reaktanta (analita), može se reći da je reakcija pseudoprvog reda obzirom na analit.

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

Reakcije su malokad potpuno nepovratne, a strogi opis kinetike reakcije drugog reda koja se odvija u jednom koraku uzima u obzir i povratnu reakciju.

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

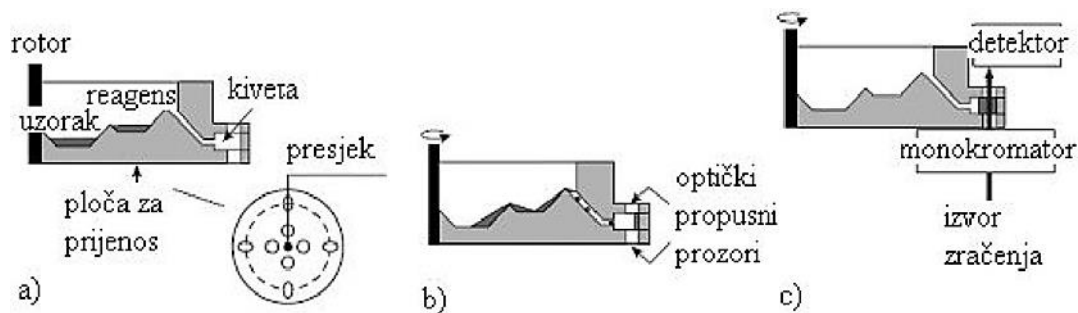
U navedenoj jednadžbi k_1 označava konstantu brzine drugog reda za polaznu reakciju, a k_{-1} konstanta brzine prvog reda za povratnu reakciju. Pretpostavljeno je nastajanje jednoga produkta. Vrijednosti k_{-1} i/ili $[P]$ mogu se održavati relativno malima, te je tada brzina povratne reakcije zanemariva. [11]

1.3. Kontinuirano praćenje kemijske reakcije

Jedan od uvjeta koji odabrana kemijska reakcija treba zadovoljiti da bi poslužila razvoju pouzdane kinetičke metode zahtjeva mogućnost praćenja napretka reakcije pomoću promjena koncentracije barem jedne tvari iz reakcije, pri tome nije bitno da li se radi o analitu, reagensu koji reagira sa analitom ili produktom. [13]

Pri kinetičkom mjerenju važno je utvrditi vrijeme miješanja to jest vrijeme dodavanja analita u reakcijsku otopinu do prvog pouzdanog mjerenja koncentracije odabrane vrste. Za kvantitativnu analitičku iskoristivost bitan je izbor mjernih tehnika koje pružaju mogućnost praćenja koncentracije analita ili produkta kemijske reakcije s vremenom. Kao mjerne tehnike najčešće se primjenjuju potenciometrija te apsorpcijska i emisijska spektrometrija. [14]

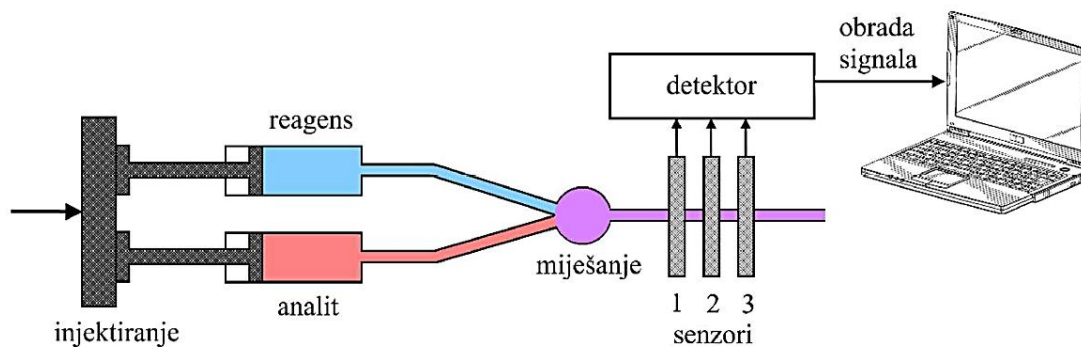
Za provedbu prve automatske kinetičke analize korišten je centrifugalni analizator, prikazan na slici 3, koji omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.



Slika 3. Shematski prikaz centrifugalnog analizatora: a) posudice za uzorak i reagens; b) miješanje uzorka i reagensa; c) konfiguracija spektrofotometrijskog detektora [13]

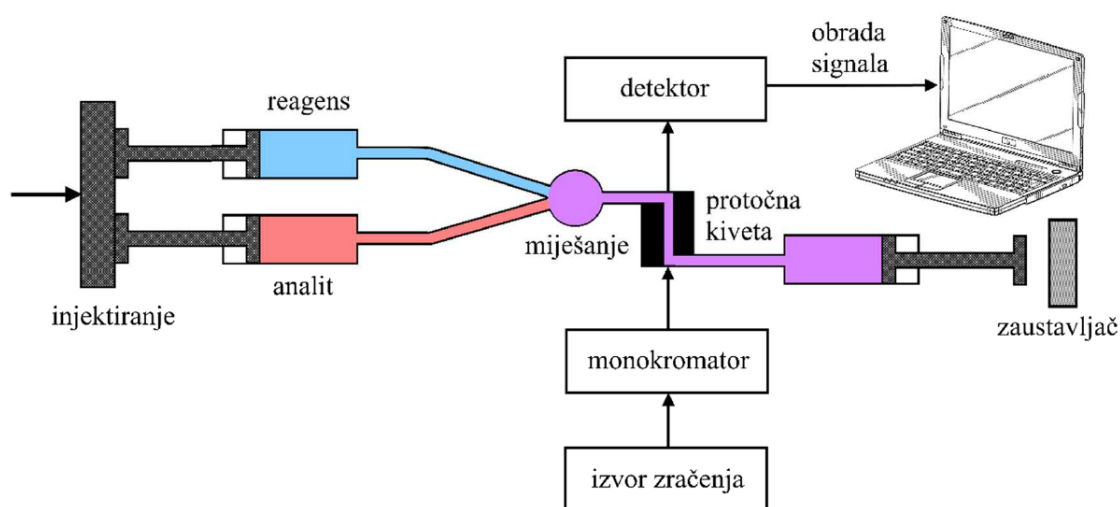
Uzorak i reagens se nalaze u odvojenim posudicama na ploči za prijenos koja je pričvršćena na rotor centrifuge, a okretanjem centrifuge centrifugalna sila prebacuje uzorak i reagens u kivetu u kojoj se otopine miješaju. Jednostavni optički sustav nalazi se sa vanjske strane ploče, a sastoji se od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Apsoorbancija se mjeri prolaskom reakcijske smjese kroz optički put i ovakav sustav omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. [14]

Kod metode kontinuiranog protoka analit i reagens odabranom brzinom ulaze u prostor za miješanje i nastavljaju put prema detektoru te se kemijska reakcija odvija na putu prema detektoru. Povećanje udaljenosti detektora od mjesta miješanja rezultira smanjenjem koncentracije analita odnosno dolazi do porasta koncentracije produkta kemijske reakcije. Ukoliko je protok kroz sustav konstantan, koncentracije analita i produkta kemijske reakcije imat će stabilne vrijednosti na svakoj točki uzduž izlazne cjevčice. [14]



Slika 4. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom kontinuiranog protoka [14]

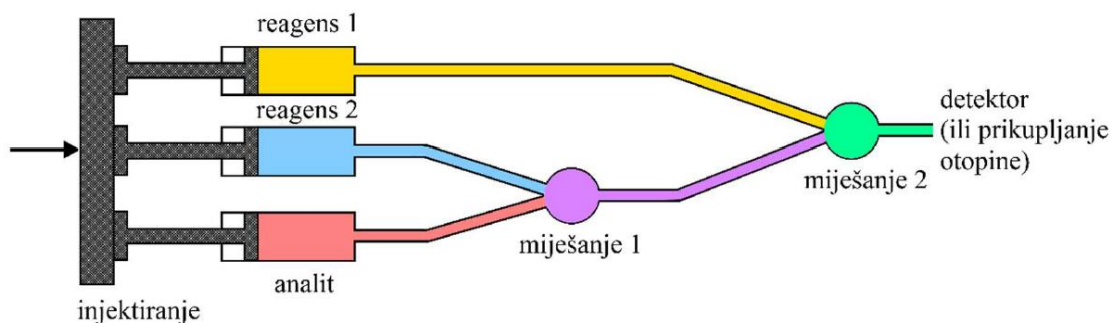
Instrumentacija kod metode zaustavljenog protoka slična je napravi za kinetička mjerenja metodom kontinuiranog protoka, samo što kod zaustavljenog protoka postoji i treći injektor koji služi za zaustavljanje protoka. Kod ove metode nakon potpunog miješanja i uspostavljanja homogenog stanja s pomoću trećeg injektora zaustavlja se protok, a detektor prati daljnje napredovanje reakcije mjerenjem promjene koncentracije analita ili produkta kemijske reakcije. Osim toga, treći injektor može poslužiti i za prikupljanje reakcijske otopine u svrhu dodatne analize produkata. [14]



Slika 5. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom zaustavljenog protoka [14]

U slučaju brzih reakcija, ako se u vremenu potrebnom za dobivanje analitičkog signala, koncentracija praćene vrste ne mijenja, za određivanje brzine kemijske reakcije te analitičke primjene kinetičkog eksperimenta, potrebno je primijeniti metodu zaustavljene reakcije.

Kinetički eksperiment započinje istovremenim potiskivanjem klipova na sva tri injektora. Miješanjem analita i reagensa 2 pokreće se reakcija. Daljnjim miješanjem reakcijske otopine s reagensom 1 dolazi do promjene reakcijskih uvjeta i prekida napredovanja reakcije. Prikupljena otopina sadrži u sebi kinetičku informaciju i može se analizirati s vremenskom odgodom koristeći različite analitičke tehnike. [14]



Slika 6. Prikaz aparature za kinetička mjerenja metodom zaustavljene reakcije [14]

1.4. Vrste kinetičkih metoda

Kinetičke metode podijeljene su prema vrsti odnosa koji postoji između mjerene veličine i koncentracije uzorka na diferencijalne i integralne metode.

1.4.1. Diferencijalne metode

U diferencijalnoj metodi koncentracije se računaju iz brzina reakcija pomoću diferencijalnog oblika izraza za brzinu

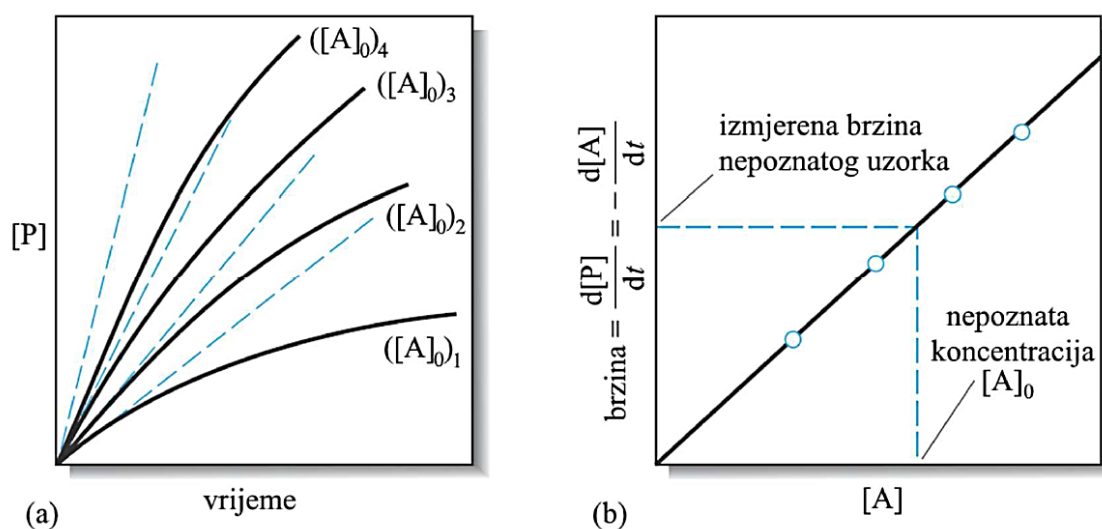
$$\ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0$$

Brzine se određuju mjerenjem nagiba krivulje koja opisuje koncentraciju analita ili produkta kao funkciju vremena reakcije.

Isto tako može se izraziti pomoću koncentracije produkta:

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

Faktor ke^{-kt} je konstanta u bilo kojoj vrijednosti t , a brzina je razmjerna koncentraciji analita. Često je brzinu pogodno mjeriti u blizini vremena $t = 0$, jer se u tom dijelu eksponencijalne krivulje postiže linearnost, pa je lako moguće odrediti nagib iz tangente na krivulju. Kako je nagib na početku najveći, relativna pogreška određivanja nagiba u početku reakcije bit će minimalna. Kod reakcije pseudoprvo reda, utrošak suviška reagensa bit će toliko malen da ne dolazi do pogreške zbog promjene k , koja bi se pojavila promjenom koncentracije reagensa. [11]



Slika 7. Određivanje koncentracije tvari A diferencijalnom metodom. (a) Pune linije su koncentracije produkta kao funkcije vremena. Isprekidane crte su tangente na krivulje za $t \rightarrow 0$. (b) Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji tvari A. [11]

1.4.1.1. Metoda početne brzine

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

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

gdje je K brzina reakcije, k' uvjetna konstanta brzine reakcije, c je analitička koncentracija analita te n (nagib regresijskog pravca) red reakcije. [14]

1.4.2. Integralne metode

Integralne metode primjenjuju integralne oblike jednadžbi brzina prvog reda:

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

Grafičke metode temelje se na jednadžbi:

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

Grafički prikaz prirodnog logaritma eksperimentalno mjerene koncentracije A (ili P) kao funkcije vremena je pravac nagiba $-k$ i odsječka $\ln[A]_0$ na osi y. [11]

1.4.2.1. Metoda određenog vremena

Metoda određenog vremena temelji se na sljedećoj jednadžbi:

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

Postupak umjeravanja provodi se standardnom otopinom poznate koncentracije $[A]_0$. $[A]_t$ se određuje u precizno određenom vremenu reakcije (t), a potom se računa e^{-kt} . Uzorci nepoznate koncentracije analiziraju se mjerenjem $[A]_t$ u istom reakcijskom vremenu te se koncentracije analita računaju pomoću navedenog izraza. [12]

1.5. Praćenje napredovanja reakcije

Kako bi se pouzdano mogla odrediti koncentracija analita kod kinetičkih mjerenja, nužno je ostvariti uvjete potrebne za mjerenje početne brzine razmatrane reakcije. Kada je postignuta konstantna koncentracija reagensa tijekom kinetičkog mjerenja, za računanje brzine reakcije, nakon miješanja analita i reagensa, potrebno je mjeriti promjenu (smanjenje) koncentracije analita ili promjenu (rast) koncentracije produkta. [15]

Kod mjerenja kinetičkih sporih reakcija, ne odvijaju se bitne promjene koncentracija za vrijeme bilježenja signala. Ukoliko se zanemare promjene koncentracija kod brzih kemijskih reakcija unijet će se velika pogreška u mjerenje. Zato je razvijeno više pristupa mjerenju kinetički brzih reakcija, od samog zaustavljanja ili prigušivanja reakcije do kontinuiranog praćenja korištenjem različitih vrsta spektrometrijskih i elektrokemijskih detektora.

Signal se u mnogim kinetičkim metodama određivanja bilježi u prvim trenucima reakcije, milisekundama ili sekundama, dok su još uvijek zadovoljeni uvjeti za odvijanje

reakcije pseudoprvog reda. Prednost ovog pristupa je brza, automatska analiza koja omogućava obradu velikog broja uzoraka u vrlo kratkom vremenu. Nedostatak je u potrebi za automatizacijom sustava jer prijenos uzorka i reagensa u reakcijsku posudu mora biti vrlo brzo proveden te njihovo miješanje mora biti provedeno vrlo brzo i ponovljivo. To obično zahtijeva uvođenje dodatne instrumentacije što poskupljuje analizu. [16]

1.6. Vrednovanje kinetičkih metoda

Granica određivanja je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Za kinetičke metode određena je brzinom reakcije i instrumentalnom tehnikom kojom se prati brzina reakcije. Reakcije koje su brže imaju niže granice određivanja, jer je signal proporcionalan brzini reakcije. Za praćenje kemijskih reakcija uglavnom se koriste spektrofotometrijske i potencijometrijske tehnike koje svojim ograničenjima utječu na dostignutu granicu određivanja. Kemijske kinetičke metode su potencijalno podložne pogreškama zbog djelovanja nekontroliranih ili slabo kontroliranih parametara kao što su pH-vrijednost i temperatura. Iako izravnim računanjem, kinetičke metode mogu postići umjereno točne rezultate, točnost je manja u odnosu na ravnotežne metode. Preciznost kinetičkih metoda određena je šumom u signalu instrumenta kojim se prati odvijanje reakcije. [13]

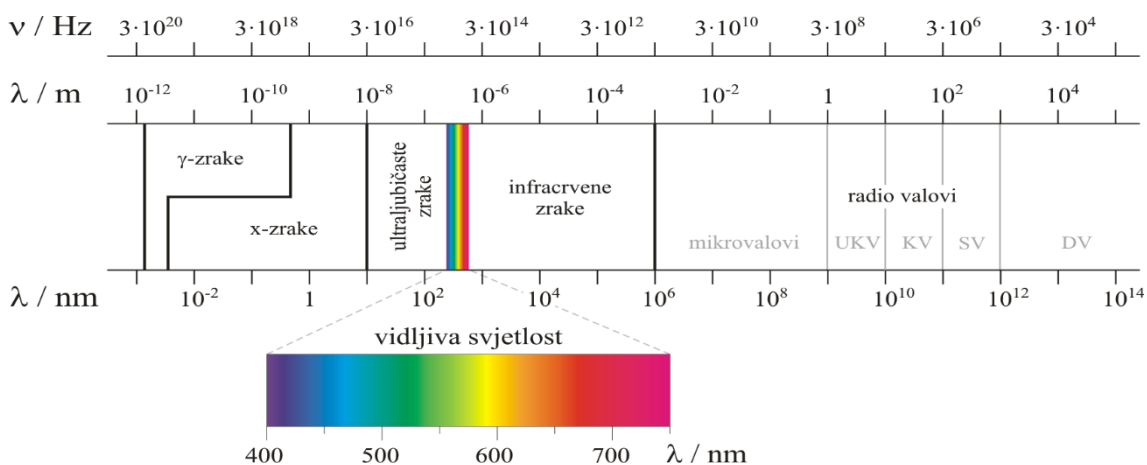
Kod integralnih metoda preciznost je moguća od 1-2 % dok je kod diferencijalnih metoda preciznost nešto manja. Kod metode određenog vremena osjetljivost se može povećati provođenjem mjerenja u uvjetima kada je koncentracija promatrane vrste visoka. Ako je promatrana vrsta analit ili neka reagirajuća vrsta, mjerenja se provode na početku reakcije jer su tada koncentracije reagirajućih vrsta visoke. Suprotno tome, ako je promatrana vrsta produkt, mjerenja se provode nakon određenog vremena od početka reakcije. [13]

Selektivnost kinetičkih metoda temelji se na prilagođavanju uvjeta odvijanja reakcije. Time se postiže razlika u brzini reakcije analita i interferirajućih vrsta tzv. kinetička diskriminacija. [13]

1.7. Spektroskopija

Spektroskopija je grana fizike koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari. Mjerenja koja se temelje na svjetlosti i drugim oblicima elektromagnetskog zračenja uvelike se upotrebljavaju u analitičkoj kemiji jer se koriste za određivanje strukture molekule, jačine kemijske veze ili strukture biomolekula. S povijesnog stajališta, izraz spektroskopija odnosio se na granu znanosti koja se bavila svjetlošću, odnosno vidljivim zračenjem, razlučenom u komponente, odnosno valne duljine, koje tvore spektar. [11]

Spektroskopske metode mogu se klasificirati obzirom na elektromagnetsko zračenje koje se primjenjuje, a to su: X-zrake, ultraljubičasto (UV), vidljivo, infracrveno (IR), mikrovalno i radiofrekvencijsko (RF) zračenje. [11]



Slika 8. Osnovna podjela elektromagnetskog spektra [17]

Spektroskopija se može koristiti i za identificiranje nepoznatih spojeva, otkrivanje poznatih spojeva i mjerenje koncentracije poznatih spojeva u uzorcima. Mnoge analitičke metode u kemiji, biokemiji i farmaciji temelje se na korištenju spektroskopije zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti. [11]

1.7.1. Svojstva elektromagnetskog zračenja

Elektromagnetsko zračenje je oblik energije koji ogromnom brzinom prolazi prostorom ($3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ u vakuumu). Može se opisati pomoću klasičnog valnog modela čiji su osnovni parametri valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda. [11]

Valna duljina (λ) je udaljenost između dvaju vrhova valova. Frekvencija (ν) je broj titraja koje stvara val svake sekunde.

Međutim, valni model ne obuhvaća pojave povezane uz apsorpciju i emisiju zračenja i ne može ih razjasniti. Zato se elektromagnetsko zračenje može promatrati čestičnim modelom kao struja pojedinačnih (diskretnih) čestica energije, nazvanih fotonima. Na taj način svjetlost se može promatrati i kao val i kao čestica. [11]

Foton je kvant elektromagnetskoga zračenja, elementarna čestica bez mase i energije mirovanja. Energija fotona (E) jednaka je umnošku Planckove konstante (h) i frekvencije elektromagnetskog zračenja (ν)

$$E = h\nu$$

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

Energija se može prikazati izrazom:

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

gdje je vrijednost valnog broja $\bar{\nu}$ jednaka $1/\lambda$.

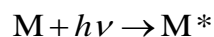
Dakle, energija je proporcionalna valnom broju, te obrnuto proporcionalna valnoj duljini. [18] Dvostruka gledišta zračenja kao valova i čestica nisu međusobno isključiva, već su komplementarna. [11]

1.7.2. Apsorpcija zračenja

U spektroskopskom smislu apsorpcija predstavlja proces u kojemu neka kemijska vrsta prisutna u propusnoj sredini selektivno prigušuje odnosno smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica bilo da je riječ o atomu, ionu ili molekulama ima jedinstven skup i raspored

energijskih stanja, pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Proces apsorpcije fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekoga od viših energijskih stanja čestice. Pritom kemijska vrsta apsorbira toplinsku, električnu ili energiju zračenja i prelazi u više energijsko stanje - pobuđeno (ekscitirano) stanje. [16]

Prelazak iz osnovnog u pobuđeno stanje čestice M može se opisati jednadžbom



Nakon kratkog vremenskog razdoblja pobuđena vrsta se relaksira. Relaksacija je proces u kojem se pobuđena vrsta relaksira do svoga prethodnog ili osnovnog stanja prenoseći pritom suvišak energije drugim atomima ili molekulama u istoj okolini što rezultira malim povišenjem temperature u okolini. Navedeni se proces opisuje jednadžbom



Vijek trajanja M^* je toliko kratak da se koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku može zanemariti. Isto tako, količina otpuštene toplinske energije tijekom relaksacije je najčešće toliko mala da se ne može ni detektirati. [11]

Uzorci koji se koriste za apsorpcijsku analizu u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja najčešće su ili plinovi ili razrijeđene otopine pripremljene u propusnom (prozirnom, transparentnom) otapalu. Apsorpcijske značajke pojedine vrste opisuju se apsorpcijskim spektrom odnosno grafičkim prikazom neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, valnog broja ili frekvencije. Kod takvih prikaza vertikalna os može biti apsorbancija ili propusnost (transmitancija) koja se izražava u postotcima. [11]

Tablica 1. Pojmovi i nazivlje u apsorpcijskoj spektroskopiji

Naziv i symbol	Definicija
snaga zračenja P, P_0	energija zračenja koja u 1 sekundi pada na 1 cm ² površine detektora
apsorbancija A	$\log \frac{P_0}{P}$
transmitancija T	$\frac{P_0}{P}$
apsorptivnost a (ako se c izrazi u g L ⁻¹)	$\frac{A}{bc}$
molarna apsorptivnost ε (ako se c izrazi u mol L ⁻¹)	$\frac{\varepsilon}{bc}$

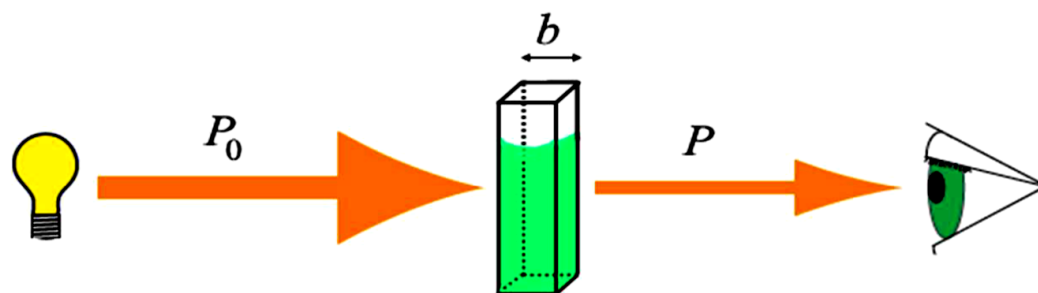
b - duljina puta zračenja

Transmitancija T ili propusnost je dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu

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

gdje je P_0 ulazna snaga snopa svjetlosti, a P je snaga snopa nakon apsorpcije. Transmitancija se često izražava u postocima.

Na slici 9 prikazan je snop svjetlosti, snage P_0 , koji prolazi kroz sloj otopine debljine b u cm i koncentracije c vrste koja apsorpira što za posljedicu ima smanjenje snage snopa s P_0 na P .

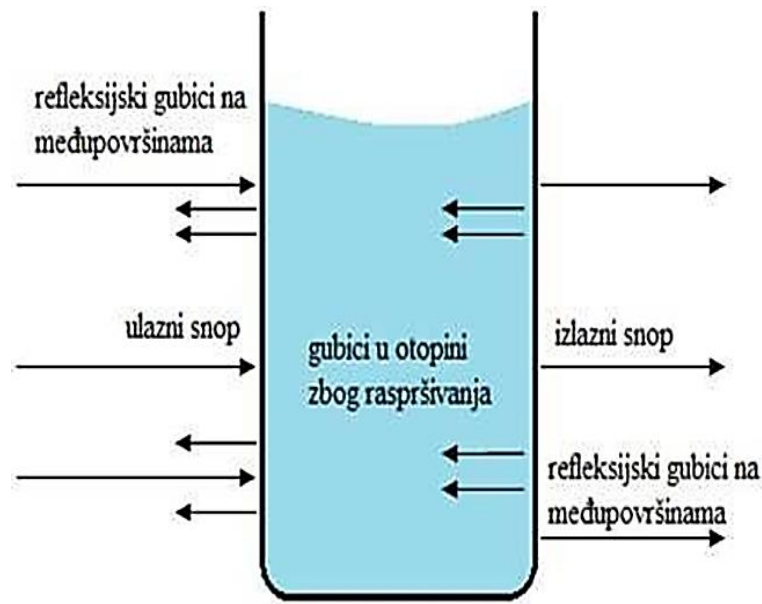


Slika 9. Prigušivanje snopa zračenja kao posljedica apsorpcije u otopini

Apsorbancija otopine je logaritam omjera snage upadnog zračenja P_0 i propuštenog zračenja P kroz otopinu. Za razliku od transmitancije, apsorbancija se povećava prigušenjem osnovnog snopa.

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

Transmitanciju i apsorbanciju nije moguće eksperimentalno odrediti u laboratoriju pomoću gore navedenih jednadžbi jer uzorak kojem se određuje apsorbancija mora biti smješten u posudicu. Budući da se uzorak nalazi u posudici, gubitak se neizbježno javlja zbog međudjelovanja zračenja i stjenki posudice refleksijom i apsorpcijom. [11]



Slika 10. Gubici koji se javljaju zbog refleksije i raspršenja [11]

Kako bi se kompenzirali navedeni učinci, uspoređuju se snage snopa koji je propušten kroz mjernu posudicu punjenu otopinom sa snagom snopa koji prolazi kroz istu posudu punjenu samo otapalom i primjenjuje se jednačba:

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

1.7.2.1. Odnos između apsorpcije i koncentracije: Beerov zakon

Beerov zakon pokazuje funkcijsku ovisnost između veličine mjerene apsorpcijskom metodom, A i veličine koja se određuje, koncentracije, c .

Prikazuje se sljedećom jednačbom:

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

gdje je a konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), a b duljina puta zračenja kroz uzorak. Budući da je apsorpcija veličina bez dimenzija,

jedinica za apsorptivnost se određuje uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. [11]

Ako je koncentracija izražena u molovima po litri, a b u centimentrima, konstanta proporcionalnosti naziva se molarnom apsorptivnošću s uobičajenim simbolom ε . Tada je

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

gdje se ε izražava u $\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$. [11]

Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta.

Ukupna apsorbancija višekomponentnog sustava iznosi

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

gdje indeks n označuje komponente 1,2,... n koje apsorbiraju. [11]

1.7.2.2. Ograničenja Beerovog zakona

Postoje dvije vrste ograničenja primjenjivosti Beerovog zakona. Pri višim koncentracijama analita dolazi do smanjenja prosječne udaljenosti među česticama pri kojem svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice što uzrokuje odstupanje od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji. Sličan učinak pojavljuje se u razrijeđenim otopinama tvari koja apsorbira u kojoj se nalaze visoke koncentracije drugih vrsta. Blizina stranih iona i tvari koje apsorbiraju mijenja molarnu apsorptivnost i dovodi do odstupanja od Beerovog zakona.

Druga odstupanja od Beerovog zakona nastaju kao posljedica kemijskih promjena vezanih s koncentracijskim promjenama, kada vrste koje apsorbiraju sudjeluju u koncentracijski ovisnim ravnotežama kao što su reakcije disocijacije ili asocijacije ili, instrumentna odstupanja vezana s načinom mjerenja apsorbancije. [11]

1.7.3. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

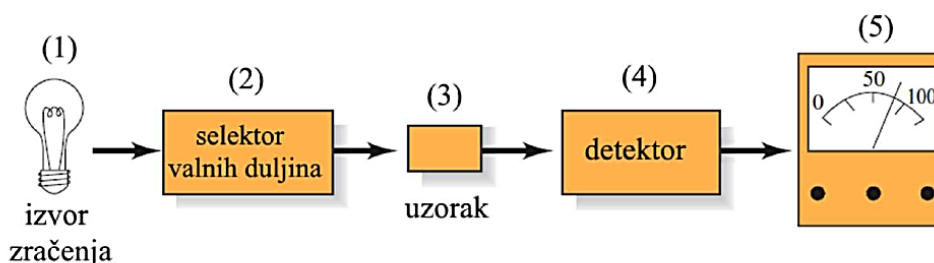
Molekulska apsorpcijska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju najčešće je korištena instrumentna tehnika u kemijskim laboratorijima koja se primjenjuje za kvantitativnu analizu.

Metoda se primjenjuje za analizu velikog broja anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta. To je vidljivo iz činjenice da više od 90 % analiza koje se provode u kliničkim laboratorijima temelje se na apsorpcijskoj spektroskopiji ultraljubičastog i vidljivog zračenja. Tipične granice dokazivanja za apsorpcijsku spektroskopiju nalaze se u području od 10^{-4} do 10^{-5} M. Različitim postupcima i modifikacijama može se proširiti od 10^{-6} do 10^{-7} M. Metoda je jednostavna i prikladna za korištenje te ima mogućnost automatizacije.

Većina se spektrofotometrijskih uređaja sastoji od pet osnovnih dijelova, a to su:

1. stabilan izvor energije zračenja;
2. selektor valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja;
3. jedan ili više spremnika za uzorke;
4. detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljivi signal;
5. procesor signala i uređaj za očitavanje.

Poredak komponenata mjernog instrumenta ovisi o kojoj se vrsti spektroskopije radi. U slučaju apsorpcijske spektroskopije snop koji dolazi iz izvora prolazi kroz selektor valnih duljina, do uzorka, a zatim do detektora. [11]



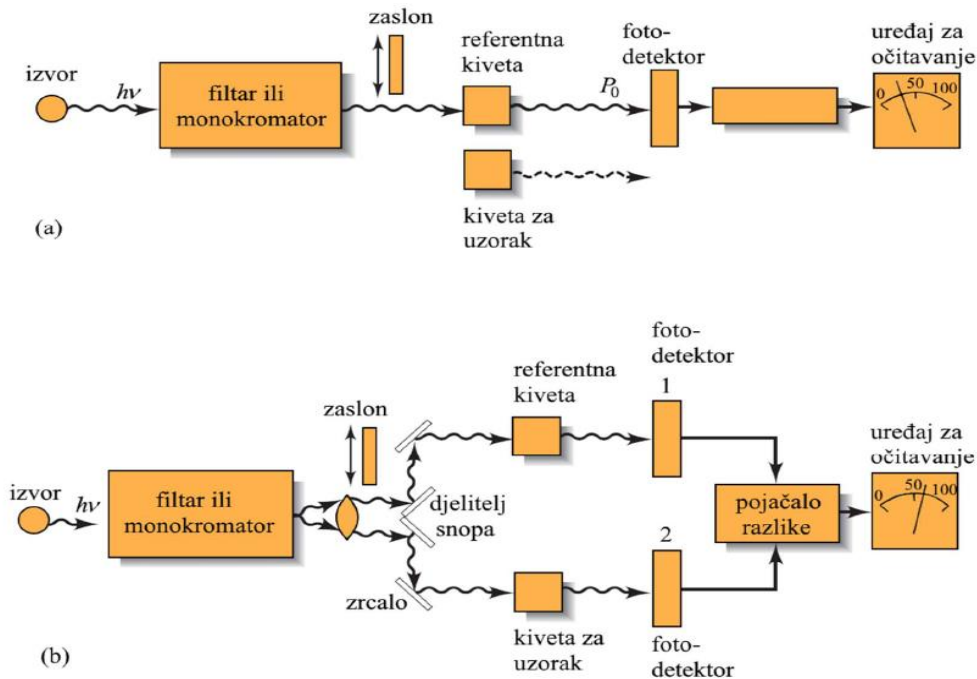
Slika 11. Osnovni dijelovi instrumenta za apsorpcijsku spektroskopiju [11]

Apsorpcijska spektroskopija zahtjeva vanjski izvor snažnog i kontinuiranog zračenja koji omogućuje jednostavnu detekciju i mjerenje. Žarulja s volframovom ili halogenom niti je prikladan izvor zračenja za područje valnih duljina od 350 do 2500 nm, dok vodikova ili deuterijeva žarulja emitira zračenje u području valnih duljina od 160 do 400 nm. Selektori valnih duljina su uređaji koji sužavaju mjerno zračenje do uske vrpce, odnosno skupine susjednih valnih duljina, budući da ne mogu izdvojiti zračenje samo jedne valne duljine. Time utječu na osjetljivost, selektivnost i povećavaju vjerojatnost slaganja s Beerovim zakonom. [11]

Spremnici za uzorke (ćelije ili kivete) moraju imati stijenke načinjene od materijala prozirnog u određenom spektralnom području. Ovisno o valnoj duljini na kojoj se provode mjerenja, mogu biti načinjene od kvarca (350 – 3000 nm), silikatnog stakla (375 – 2000 nm) ili plastike (390 – 750 nm). Za rad u ultraljubičastom i vidljivom području najčešće se primjenjuju kivete širine 1 cm.

Detektori u spektroskopiji su fotonski i toplinski detektori koji pokazuju postojanje fizikalne promjene. Procesori signala pojačavaju električni signal iz detektora i izvode matematičke operacije na signalu, kao što su diferenciranje, integriranje ili logaritmiranje. [11]

Postoje dvije izvedbe spektrofotometra kao instrumenta: jednosnopni i dvosnopni spektrofotometri. Jednosnopni instrumenti su mnogo jednostavniji i nemaju široku primjenu jer se kiveta s uzorkom i kiveta s referentnom otopinom moraju naizmjenice smještati u snop zračenja. Stoga, nisu pogodni za kinetička mjerenja kod kojih se prati apsorpcija kao funkcija proteklog vremena. Kod složenijih dvosnopnih instrumenata dva snopa nastaju u prostoru pomoću zrcala koje se naziva djeliteljem snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, dok drugi istodobno prolazi kroz uzorak prema drugome fotodetektoru. Dva izlazna signala se pojačavaju. Elektronički se određuje njihov omjer i prikazuje se na uređaju za očitavanje. [18]



Slika 12. Shematski prikaz instrumentacije za jednosnopni (a) i dvosnopni (b) spektrofotometar [11]

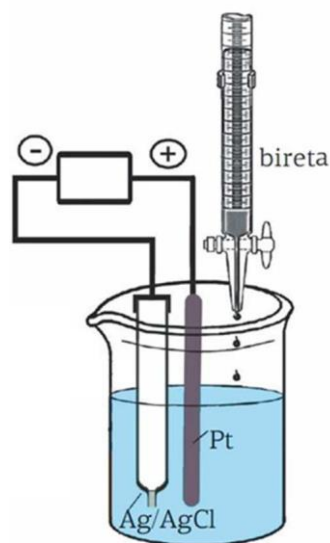
1.8. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju razlike potencijala između dviju elektroda elektrokemijskog članka. Ta razlika predstavlja analitički signal.

Elektrokemijski članak sastoji se od dvije elektrode (polučlanka): referentne i indikatorske elektrode. Referentna elektroda, E_{RE} je elektroda čiji je potencijal neovisan o aktivitetu (koncentraciji) analita ili o nekoj drugoj ionskoj vrsti u ispitivanoj otopini. Indikatorska elektroda, E_{IE} je elektroda uronjena u otopinu analita čiji potencijal ovisi o aktivitetu (koncentraciji) analita. [14]

Potencijal članka mjeri se eksperimentalno, u cilju određivanja koncentracije analita u otopini. Potencijal članka prikazan je jednačbom:

$$E_{\check{c}} = E_{IE} - E_{RE}$$



1.8.1. Izravna potenciometrija

Izravna potenciometrija temelji se na linearnom odnosu između potencijala indikatorske elektrode i logaritma aktiviteta mjerenog iona ili omjera aktiviteta elektroaktivnih iona koji se nalaze u otopini. Taj odnos dan je Nernstovim izrazom:

$$E_{IE} = E^{\circ} - \frac{2,303 \times R \times T}{n \times F} \log \frac{a(A_{red})}{a(A_{oks})}$$

gdje je:

E_{IE} – elektrodni potencijal redoks-para izražen u V;

E° – standardni elektrodni potencijal redoks-para u V;

R – plinska konstanta koja iznosi: $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

T – temperatura izražena u K;

F – Faradayeva konstanta koja iznosi: $9,648670 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$;

n – broj elektrona koji sudjeluje u polureakciji;

$a(A_{red})$ – aktivitet reduciranog oblika redoks-para;

$a(A_{\text{oks}})$ – aktivitet oksidiranog oblika redoks-para.

1.8.2. Potencimetrijska titracija

Kod viših koncentracija veća je točnost određivanja primjenom potencimetrijske titracije nego primjenom izravne potencimetrije, dok kod nižih koncentracija analita primjena potencimetrijskih titracija nije primjenjiva.

Potencimetrijska titracija temelji se na mjerenju potencijala odgovarajuće indikatorske elektrode, odnosno elektrokemijskog članka, indikatorska-referentna elektroda, kao funkcije volumena dodanog titranta. Mjerenjem promjene indikatorske elektrode prati se tijek titracije. Neposredno u blizini točke ekvivalencije dolazi do nagle promjene potencijala indikatorske elektrode, a ta promjena potencijala slijedi iz Nernstove jednadžbe. Na visinu skoka potencijala i oblika potencimetrijske S-krivulje utječu svojstva kemijske reakcije na kojoj se temelji potencimetrijska titracija. Tako je skok, kod reakcija nastajanja kompleksa viši što je veća koncentracija analita i što je stabilnost nastalog kompleksa veća. Određivanjem završne točke titracije, iz koncentracije titranta i volumena u završnoj točki titracije moguće je izračunati koncentraciju analita u ispitivanom uzorku.

Točnije, matematičkim metodama prve i druge derivacije mogu se odrediti vrijednosti volumena titranata u završnoj točki titracije. Promjene potencijala po jedinici volumena titranta (dE / dV), metoda prve derivacije pokazuje maksimum u završnoj točki potencimetrijske titracije i tada je nagib titracijske krivulje najveći u točki infleksije. Metodom druge derivacije (d^2E / d^2V) može se još točnije odrediti završna točka titracije, u kojoj dolazi do promjene predznaka te će druga derivacija tada imati vrijednost 0.

U ovom radu za određivanje PEN-a primjenjena je potencimetrijska titracija kao standardna metoda prema protokolu Britanske farmakopeje. Računske metode prve i druge derivacije korištene su s ciljem što točnijeg određivanja završne točke potencimetrijske titracije. [1]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijali

2.1.1. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljene su od kemikalija analitičkog stupnja čistoće. Deionizirana voda korištena je kao otapalo.

2.1.1.1. 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 anionski i kationski izmjenjivač, filtraciju kroz membranski filter s porama 0,22 µm (zbog uklanjanja mikroorganizama).

2.1.1.2. Otopina pencilamina (PEN)

Standardna otopina PEN-a, koncentracije $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ priprema se otapanjem 89,50 mg PEN-a (PEN, Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, $M = 149, 20 \text{ g mol}^{-1}$) u 100 mL acetatno- boratno-fosfatnog pufera pH vrijednosti 2. Radna otopina niže koncentracije priprema se razrjeđenjem standardne otopine destiliranom vodom.

2.1.1.3. Otopine reagensa

Otopina bakra(II), Cu^{2+} , koncentracije $8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, priprema se otapanjem 99,99 mg bakrovog(II) sulfat pentahidrata, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska, $M = 249,68 \text{ g mol}^{-1}$) u 50 mL destilirane vode.

Otopina batokuproin disulfonske kiseline (BCS), koncentracije $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ priprema se otapanjem 56,50 mg batokuproin disulfonske kiseline dinatrijeve soli hidrata (Sigma – Aldrich, Njemačka, $M = 564,54 \text{ g mol}^{-1}$) u 50 mL destilirane vode.

2.1.1.4. Otopina acetatno – boratno – fosfatnog pufera

Acetatno-boratno-fosfatni pufer koncentracije $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ priprema se otapanjem 4,95 g borne kiseline (H_3BO_3 , Alkaloid, Skopje, Makedonija, $M = 61,84 \text{ g mol}^{-1}$), 4,80 g octene kiseline (CH_3COOH , VWR Chemicals, Francuska, $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$) i 5,46 g fosfatne kiseline (H_3PO_4 , Kemika, Zagreb, Hrvatska, $M = 97,99 \text{ g mol}^{-1}$) te se nadopuni destiliranom vodom do 2,0 L. Pripravljena otopina pufera ima $\text{pH} = 2$. Korištenjem pH-metra regulira se pH - vrijednost uz dodatak otopine NaOH

koncentracije $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

2.1.1.5. Otopina acetatnog pufera

Otopina acetatnog pufera koncentracije $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ priprema se otapanjem i miješanjem $3,15 \text{ g}$ natrijevog acetata bezvodnog ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$, Kemika, Zagreb, Hrvatska, $M = 82,03 \text{ g mol}^{-1}$) i $1,04 \text{ mL}$ octene kiseline (CH_3COOH , VWR Chemicals, Francuska, $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$) u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 1000 mL . Pripremljena otopina pufera ima $\text{pH} = 5,0$.

2.1.1.6. Otopina natrijeva hidroksida

Otopina natrijeva hidroksida koncentracije $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ priprema se otapanjem $8,00 \text{ g}$ natrijeva hidroksida (NaOH , GRAM – MOL, Hrvatska, $M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$) u 100 mL destilirane vode.

2.1.1.7. Otopine realnog uzorka

METALCAPTASE 150 mg tablete, Heyl Chemisch- Pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Njemačka)

Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži jedna tableta sadrži 150 mg PEN-a. Otopina realnog uzorka priprema se otapanjem prosječne mase jedne tablete u 500 mL destilirane vode. Masena koncentracija tako pripremljene otopine iznosi $0,3 \text{ g L}^{-1}$.

$$\gamma = \frac{m(\text{PEN})}{V_{ot}} = \frac{150 \text{ mg}}{500 \text{ mL}} = 0,3 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripremljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{PEN})}{M(\text{PEN})} = \frac{0,3 \text{ g L}^{-1}}{149,2 \text{ g mol}^{-1}} = 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodaje se 1 mL tako pripremljene otopine. Pri tome, nova množinska koncentracija iznosi $c_2 = 2,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Dodavanjem 1 mL ovako pripremljene otopine PEN-a u reakcijsku smjesu od 15 mL dobiva se nova koncentracija $c_3 = 1,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

2.1.1.8. Otopine za određivanje PEN-a prema metodi koju propisuje Farmakopeja

Otopina octene kiseline

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

Otopina perklorne kiseline

Otopina perklorne kiseline HClO_4 koncentracije $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ potrebna je za određivanje PEN-a potenciometrijskom titracijom koju propisuje farmakopeja. Otopina je pripravljena dodavanjem 8,5 mL HClO_4 $\{w(\text{HClO}_4) = 71,0 - 73,0 \% \text{ m/m}; M = 100,45 \text{ g mol}^{-1}\}$ u odmjernu tikvicu od 1000 mL, koja već sadrži 900 mL ledene (glacialne) octene kiseline $\{M(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 60,01 \text{ g mol}^{-1}\}$. Otopina se promiješa te se doda 30 mL acetatnog anhidrida $\{w(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3) = 97,0 \% \text{ m/m}; M = 102,1 \text{ g mol}^{-1}\}$ te razrijedi do oznake ledenom octenom kiselinom. Pripravljenu otopinu je potrebno ostaviti da odstoji 24 sata. [19]

2.2. Instrumenti i uređaji

Sustav za spektrofotometrijsko praćenje kemijske reakcije sastojao se od peristaltičke crpke, teflonskih cjevčica i spektrofotometra za ultraljubičasto i vidljivo područje (190 do 1100 nm) Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) s protočnom kvarcnom kivetom. Unutarnji volumen korištene kvarcne kivete bio je 160 μL , a dužina optičkog puta iznosila je 10,0 mm.



Slika 14. Sustav za spektrofotometrijsko praćenje kemijske reakcije

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

Spektrofotometar ima deuterijski i volframov izvor zračenja. Disperzno sredstvo monokromatora je refrakcijska rešetka, a detektor je fotomultiplikator. Promjena apsorbancije s vremenom bilježena je pri valnoj duljini od 483 nm te su izlazni signali prenošeni na računalo koje je povezano sa spektrofotometrom.

Reakcijsku otopinu iz reakcijske posude crpila je peristaltička crpka Ismatec IPC (Ismatec, Zurich, Švicarska) koja je prenosila kroz protočnu kivetu, a potom ponovno vraćala u reakcijsku posudu. Korištenjem elektromagnetske miješalice Tehnica Rotamix 550 MMH (Tehnica, Železniki, Slovenija) s magnetskim mješalom ostvareno je konstantno miješanje. Spektrofotometar je spojen na računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji služi za obradu podataka.

2.2.2. Ostali uređaji i oprema

Za mjerenje pH vrijednosti korišten je Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti

(Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®413.



Slika 15. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti sa kombiniranom staklenom elektrodom

2.3. Metode rada

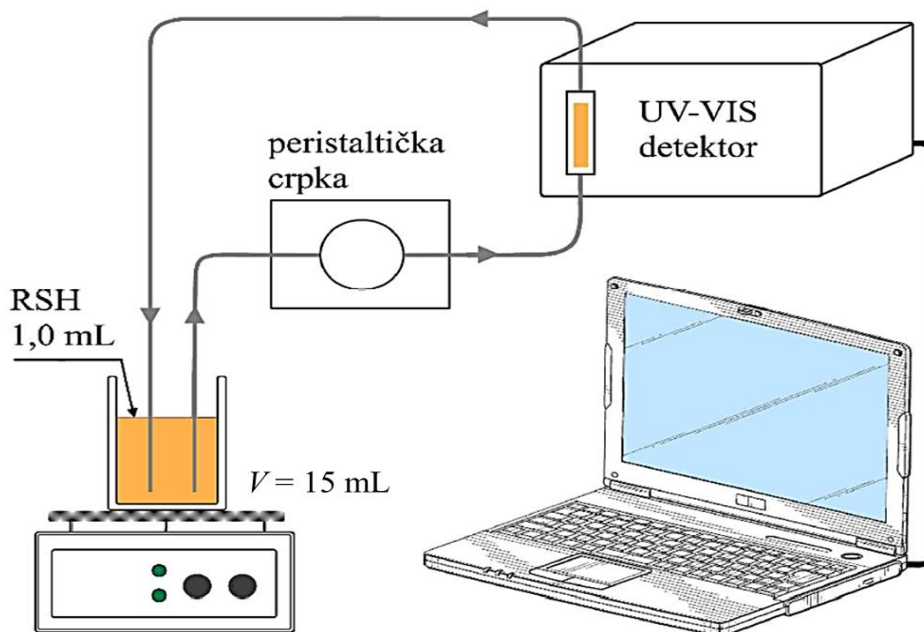
2.3.1. Kinetička spektrofotometrija

Spektrofotometrijska analitička metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj se odvija redukcija bis batokuproin bakrov(II) kompleksa uz prisutnost PEN-a, tiolnog spoja (RSH), pri čemu nastaje stabilan, narančasto obojeni kompleks bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm. Navedena redoks reakcija može se prikazati sljedećom jednačbom:



Reakcijska otopina sastojala se od 10 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera ($c = 0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 5,00$), 0,6 mL Cu^{2+} ($c = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 2,4 mL BCS ($c = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) i 1,0 mL destilirane vode. U reakcijsku otopinu jednu minutu nakon početka eksperimenta injektira se 1,0 mL analita PEN-a ($c = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) čime započinje kemijska reakcija. Sveukupan volumen reakcijske otopine iznosio je 15,0 mL. Volumen protočne kivete i cjevčica koje čine protočni sustav iznosio je ukupno 2,0 mL, stalna brzina protoka iznosila je 6 mL min^{-1} . Kontinuirano je bilježena

apsorbancija kao funkcija proteklog vremena pri valnoj duljini od $\lambda = 483 \text{ nm}$.



Slika 16. Shematski prikaz jednostavne aparature za kinetička mjerenja [15]

2.3.1.1. Prikupljanje i obrada podataka

Podaci kinetičkog spektrofotometrijskog mjerenja bilježeni su kontinuirano. Korišten je program GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA) za crtanje krivulja umjeravanja, statističku obradu podataka mjerenja i analizu krivulja umjeravanja. Krivulje umjeravanja izrađene su u ovisnosti izmjerene apsorbancije u točno određenom vremenu prema koncentraciji analita $c(\text{PEN})$ uz učestalost bilježenja podataka od 1 s.

2.3.2.1.1. Određivanje PEN-a metodom koju propisuje Farmakopeja

Britanska farmakopeja za određivanje PEN-a u farmaceutskim pripravcima preporučuje kiselo-baznu titraciju u nevodenom mediju. [20]

Prema protokolu otopi se 0,1 g penicilamina u 30 mL anhidrida octene kiseline $\{w(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 99,6 \text{ \% m/m; } M = 102,1 \text{ g mol}^{-1}\}$ te se titrira sa otopinom perklorne kiseline $\{c(\text{HClO}_4) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$. Završna točka titracije odredi se potenciometrijski. [20]

Ovom metodom utvrđeno je da se za 14,92 mg $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ utroši 1 mL perklorne kiseline $\{c = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}\}$.

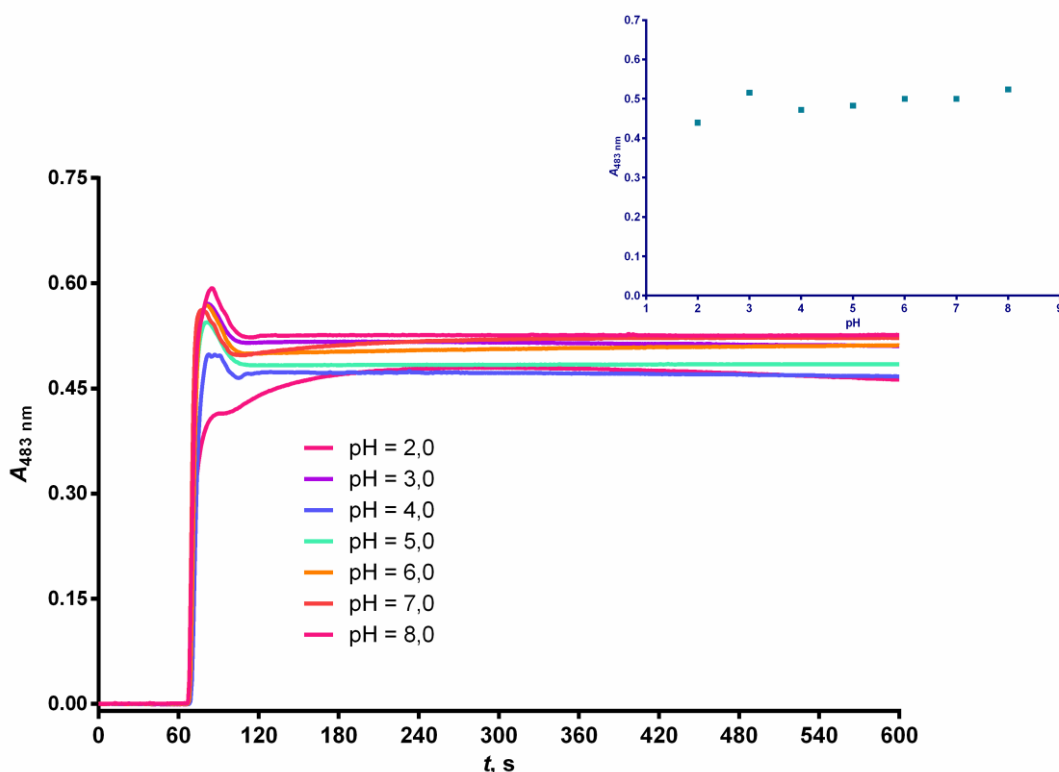
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Optimizacija sustava

Prilikom razvoja metode provedena je optimizacija parametara koji bi mogli utjecati na kemijsku reakciju, a to su: pH-vrijednost, utjecaj molnih omjera komponenti otopine reagensa i analita te utjecaj temperature.

3.1.1. Optimizacija pH-vrijednosti

Utjecaj pH-vrijednosti reakcijske otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-boratno-fosfatnog pufera. Ukupan volumen reakcijske otopine iznosio je 15 mL, a ona se sastojala od 0,6 mL otopine Cu^{2+} , $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 2,4 mL otopine BCS-a, $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 10 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera i 1 ml vode. Prilikom ispitivanja volumen otopine uzorka, $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL.



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje PEN-a pri različitim pH-vrijednostima

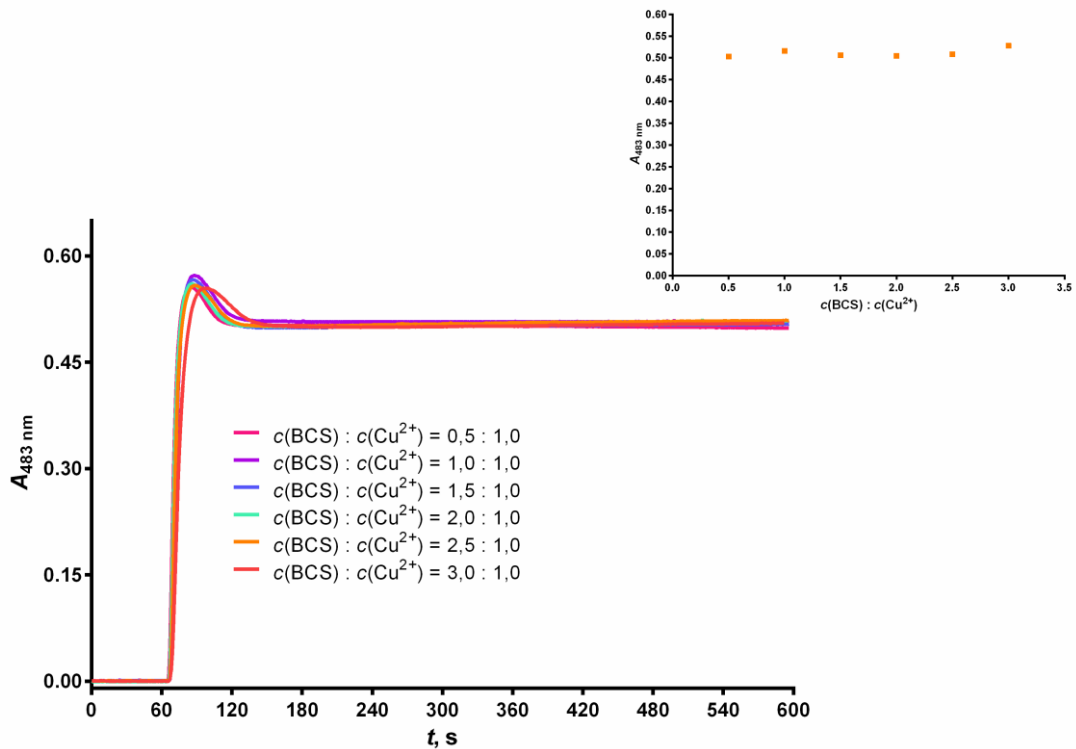
Pri višim vrijednostima pH nije zabilježen porast signala niti brzine kemijske reakcije. Budući da PEN pripada skupini tiolnih spojeva, koji pokazuju veću stabilnost u kiselom mediju, odabrana vrijednost pH iznosila je 5. Za daljnja provedena ispitivanja korišten je acetatni pufer pH-vrijednosti 5 kako bi se izbjegla mogućnost interferiranja borata kao tvari koji se obično nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka. Pri nižim pH-vrijednostima i nakon uspostave ravnoteže bilježi se blagi porast signala.

3.1.2. Optimizacija omjera koncentracija Cu^{2+} i BCS

Molni omjer Cu^{2+} i BCS u reakcijskoj smjesi ispitan je pripremljanjem pojedinačnih otopina Cu^{2+} i BCS-a. Tijekom provedbe optimizacije, dodavao se stalno jednaki volumen Cu^{2+} , $c = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, dok su se volumen i koncentracija BCS-a mijenjali. Molni omjer koncentracija BCS i Cu^{2+} mijenjao se u rasponu od 0,5:1,0 do 3,0:1,0. Volumen otopine uzorka, $c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL. Volumen pufera i vode prilagođavao se s obzirom na dodavanu količinu reagensa BCS-a kako bi se postigao ukupni volumen od 15 mL.

Tablica 2. Prikaz omjera koncentracija BCS i Cu^{2+} , volumeni i koncentracije korištenih otopina. Volumen otopine uzorka, $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL.

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



Slika 18. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje PEN-a pri različitim omjerima BCS i Cu^{2+}

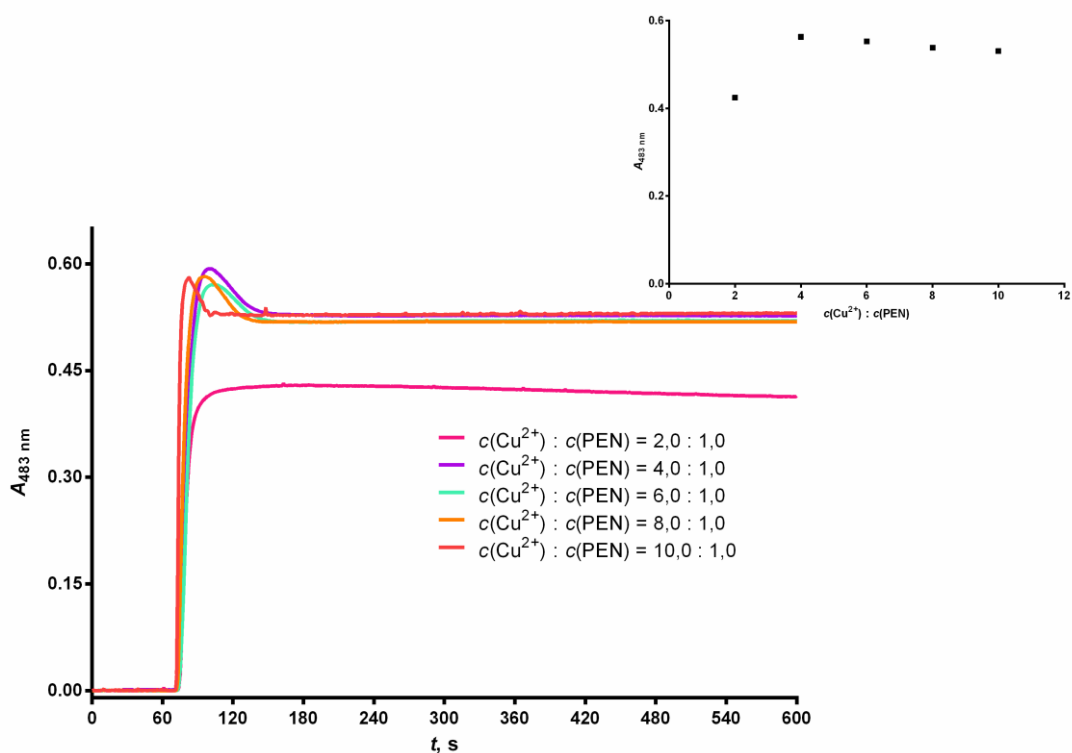
Prilikom optimizacije omjera koncentracija reagensa, BCS i Cu^{2+} , odnos se mijenjao u rasponu od 0,5:1,0 do 3,0:1,0. Rezultati su pokazali da povećanjem koncentracije BCS, uz stalnu koncentraciju iona metala bakra(II), brzina reakcije i apsorbancija rastu do omjera 1,0:1,0 nakon čega postižu konstantnu vrijednost.

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

Odnos reagensa i analita promatrao se na način da su se koncentracije Cu^{2+} i PEN mijenjale. Tijekom optimizacije provedeno je pet mjerenja u kojima se omjer koncentracija BCS i Cu^{2+} održavao u omjeru 1,0:1,0. Volumen otopine uzorka, $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL. Volumen pufera i vode prilagođavao se prilikom svakog mjerenja kako bi se postigao ukupni volumen od 15 mL.

Tablica 3. Prikaz omjera koncentracija Cu^{2+} i PEN-a, volumeni i koncentracije korištenih otopina. Volumen otopine uzorka, $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL. Omjer reagensa je $c(\text{BCS}):c(\text{Cu}^{2+}) = 1,0:1,0$.

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

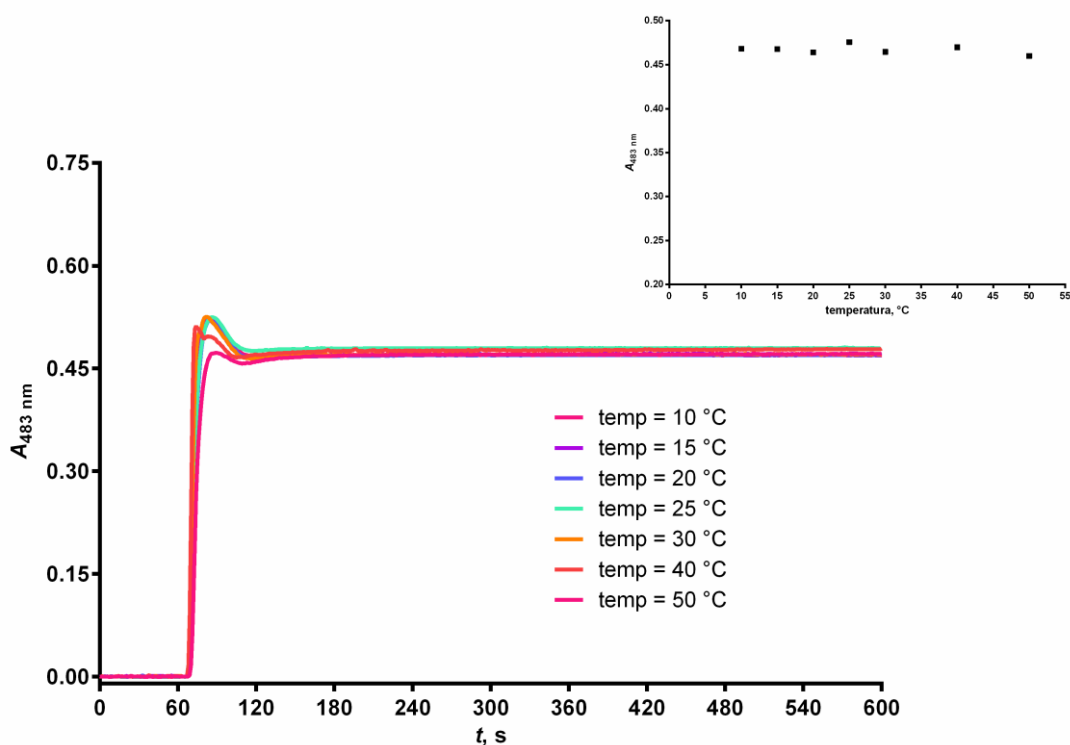


Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje PEN-a pri različitim omjerima Cu^{2+} i PEN-a

Prilikom optimizacije omjera koncentracija Cu^{2+} i PEN-a, odabran je omjer 6,0:1,0. Veće razlike u omjerima nisu pokazale nikakav utjecaj na vrijednost signala.

3.1.4. Optimizacija temperature

Utjecaj temperature otopine uzorka na intenzitet signala ispitan je u temperaturnom rasponu od 10 °C do 40 °C. Ukupan volumen reakcijske otopine iznosio je 15 mL, a ona se sastojala od 0,6 mL otopine Cu^{2+} , $c = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 2,4 mL otopine BCS-a, $c = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 10 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera i 1 ml vode. Prilikom ispitivanja volumen otopine uzorka, $c(\text{PEN}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ je 1 mL.



Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje PEN-a pri različitim temperaturama

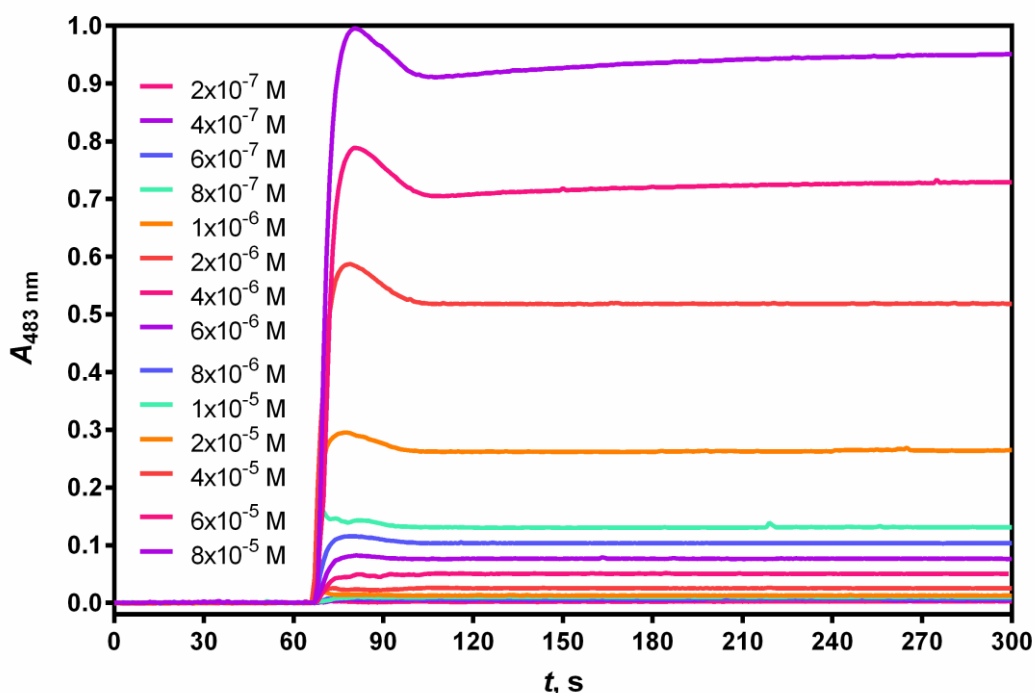
Učinak temperature na kinetiku predloženih reakcija ispitan je promjenom temperature termostatisane reakcijske posude u rasponu od 10 °C do 40 °C. Rezultati su pokazali da je predložena redoks reakcija temperaturno neovisna u navedenom rasponu temperatura, te su stabilnost signala i brzina kemijske reakcije ostali isti u širem temperaturnom području. Iz praktičnih razloga provedbe eksperimenta, kao radna temperatura odabrana je laboratorijska temperatura od 25 °C.

Tablica 4. Optimizacija kemijskih parametara za kinetičko spektrofotometrijsko određivanje PEN-a

Reakcijski parametri	Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
pH-vrijednost	2,0 – 8,0	5,0
$c(\text{BCS}) : c(\text{Cu}^{2+})$	0,5:1,0 – 3,0:1,0	1,0:1,0
$c(\text{Cu}^{2+}) : c(\text{PEN})$	2,0:1,0 – 10,0:1,0	6,0:1,0
temperatura	10 °C – 40 °C	25 °C

3.2. Linerano dinamičko područje (LDP)

Primjenom prethodno optimiziranih uvjeta, proveden je niz kinetičkih mjerenja za različite koncentracije PEN-a u rasponu od $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Kinetički zapisi mjerenja prikazani su na slici 21 u obliku kinetičke krivulje umjeravanja.



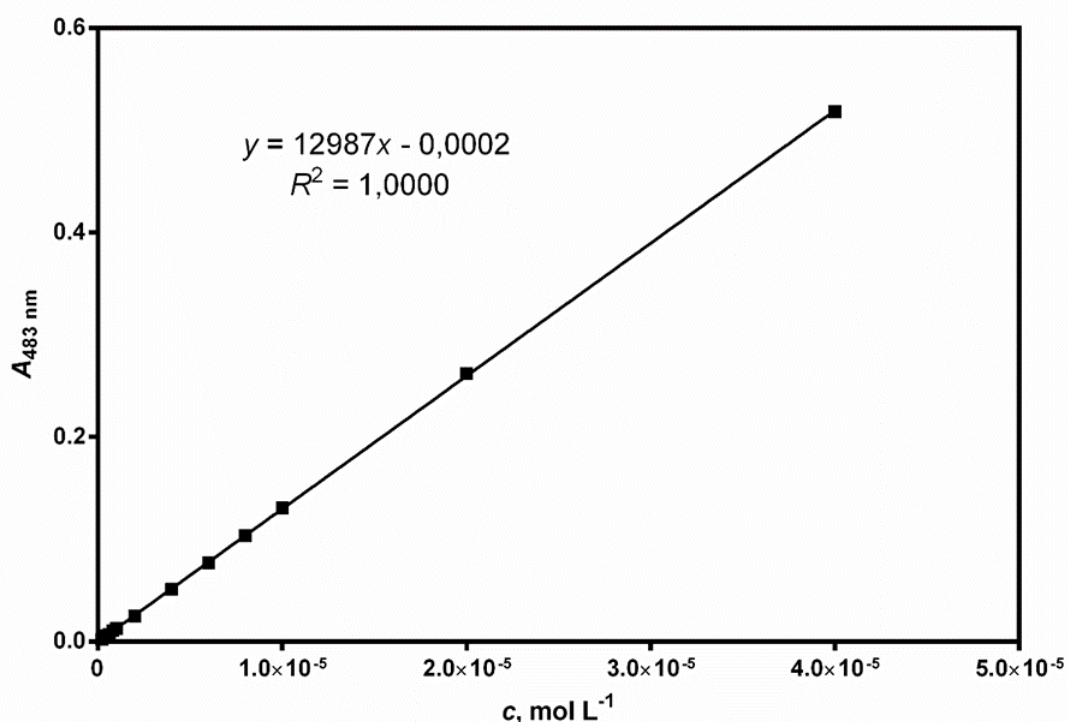
Slika 21. Apsorbancija kao funkcija proteklog vremena pri različitim koncentracijama PEN-a. Eksperimentalni uvjeti: koncentracijsko područje PEN-a od $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; reakcijska otopina: otopina Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) volumena 0,45 mL; otopina BCS ($c(\text{BCS}) = 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) volumena 1,80 mL; otopina pufera volumena 10,0 mL

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

3.2.1. Metoda određenog vremena

Kod metode određenog vremena mjerene su apsorbancije reakcijskih otopina koje su sadržavale različite koncentracije PEN-a u prethodno određenom vremenu koje je

odabrano s obzirom na osjetljivost, koncentracijski raspon i vrijeme analize. Apsorbancija je bilježena tijekom pet minuta, a analitički parametri izračunati su svakih 30 sekundi, počevši od 90 sekunde. Obzirom na osjetljivost i koncentracijski raspon, prva minuta nakon početka kemijske reakcije (120 s) odabrana je za daljnja mjerenja. Konstruirana je krivulja umjeravanja koja u međusobni odnos postavlja apsorbanciju mjerenu u 120 sekundi i koncentraciju PEN-a. Jednadžba pravca glasi: $y = 12987x - 0,0002$, a koeficijent linearne regresije R^2 je 1,0000.



Slika 22. Krivulja umjeravanja za metodu određenog vremena. Apsorbancija je očitana u prvoj minuti nakon početka kemijske reakcije (120 s mjerenja), koncentracija PEN-a u rasponu od $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Granica dokazivanja (*Limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može dokazati uz odgovarajuću preciznost i točnost, ali ne nužno i odrediti. Izraz za izračunavanje LOD glasi:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s_b}{m}$$

gdje je s_b standardno odstupanje slijepe probe, m nagib krivulje umjeravanja. [21]

Granica dokazivanja dobivena metodom određenog vremena iznosi $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

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

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s_b}{m}$$

gdje je s_b standardno odstupanje slijepe probe, m nagib krivulje umjeravanja. [21]

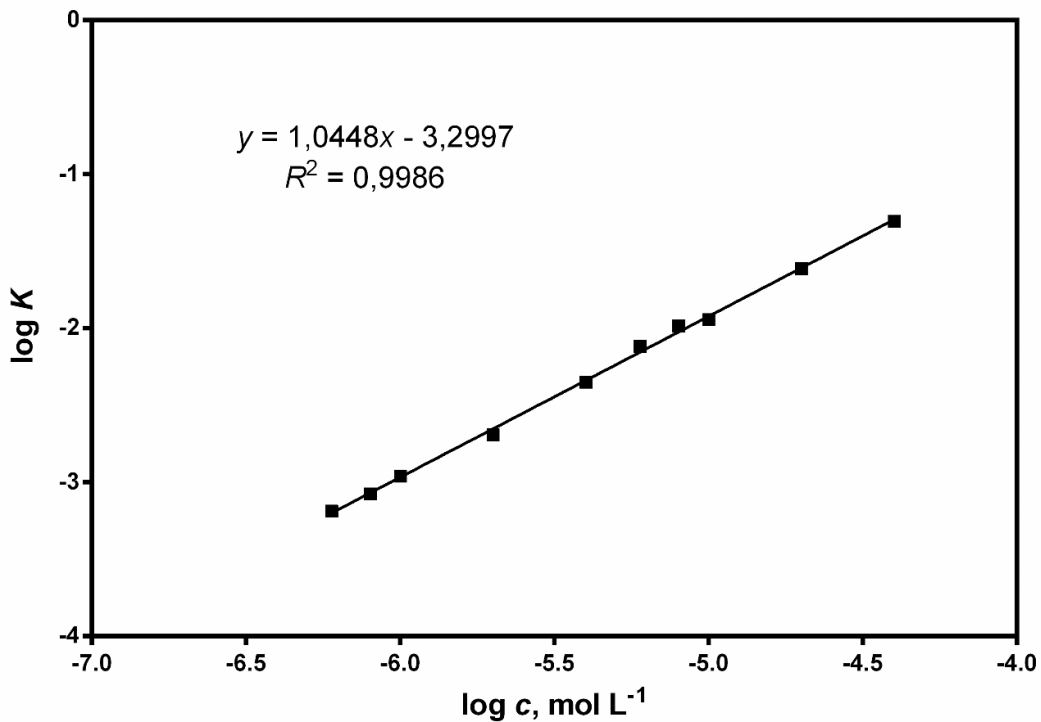
Granica dokazivanja dobivena metodom određenog vremena iznosi $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.2. Metoda početne brzine

Metodom početne brzine određene su početne brzine kemijskih reakcija (K) iz nagiba tangenti na početni, strmi dio kinetičke krivulje. Logaritamski zapis brzine reakcije ($\log K$) prikazuje se kao funkcija logaritma koncentracije analita ($\log c$). Uvrštavanjem vrijednosti u sljedeću jednadžbu provedena je regresijska analiza:

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

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



Slika 23. Krivulja umjeravanja za metodu početne brzine. Koncentracija PEN-a u rasponu od $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Regresijskom analizom dobiven je pravac nagiba 1,0448. To potvrđuje da su postignuti uvjeti za odvijanje reakcije pseudoprvog reda. Granica dokazivanja iznosi $1,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, dok je granica određivanja $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Utjecaj interferencija

Pri koncentraciji PEN-a od $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ispitan je utjecaj stranih iona i tvari koje se obično nalaze kao pomoćne tvari komercijalnih farmaceutskih pripravaka. Ispitani omjeri interferencija / analit mnogo su veći nego što se nalaze u farmaceutskim pripravcima. Dopuštena granica odstupanja definirana je kao koncentracija interferirajućih vrsta koja će prilikom mjerenja izazvati pogrešku manju od $\pm 5 \%$.

Tablica 5. Prikaz utjecaja interferirajućih vrsta na određivanje PEN-a

Strane tvari	Dopuštena koncentracija (mol L ⁻¹)	Dopušten omjer [tvar] : [PEN]	Reativna pogreška (%)
Glukoza	$2,0 \times 10^{-2}$	500 : 1	- 0,14
Fruktoza	$2,0 \times 10^{-2}$	500 : 1	+ 1,02
KNO ₃	$2,0 \times 10^{-2}$	500 : 1	+ 1,80
Laktoza	$2,0 \times 10^{-3}$	100 : 1	+ 3,27
Borna kiselina	$2,0 \times 10^{-3}$	50 : 1	+ 0,43
Limunska kiselina	$2,0 \times 10^{-3}$	100 : 1	+ 2,86
Vinska kiselina	$2,0 \times 10^{-3}$	50 : 1	- 4,15
Na ₂ SO ₄	$2,0 \times 10^{-3}$	100 : 1	+ 2,68
Na – citrat dihidrat	$2,0 \times 10^{-3}$	100 : 1	+ 2,55
Acetilsalicilna	$4,0 \times 10^{-5}$	1 : 1	+ 2,33

Prilikom ispitivanja utjecaja odabranih aniona i kationa te pomoćnih tvari maksimalan molni omjer prema PEN-u, u kojem je utvrđena tolerantnost, iznosio je 500:1. To odgovara koncentraciji glukoze, fruktoze, kalijeva nitrata koncentracije do $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Koncentracija laktoze, limunske kiseline, Na₂SO₄ i Na-citrat dihidrata tolerantna je do koncentracije $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, što odgovara molnom omjeru prema PEN-u 100:1. Koncentracija borne kiseline i vinske kiseline tolerantna je do $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ što odgovara molnom omjeru prema PEN-u 50:1. Najmanji molni omjer strane tvari prema PEN-u uočen je kod aspirina tolerantne granice koncentracije do $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Prilikom mjerenja uočeno je da ukoliko se koriste koncentracije $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ odnosno omjer 500:1 postoje odstupanja za laktozu, bornu kiselinu, vinsku kiselinu, Na₂SO₄ i Na-citrat dihidrat. Stoga je mjerenje ponovljeno na način da su pripravljene otopine smanjenih udjela interferirajućih tvari, odnosno otopine sa 100 puta većim i 50 puta većim koncentracijama u odnosu na PEN. Iz rezultata prikazanih u

tablici 4. uočeno je da niti jedna od navedenih tvari neće utjecati na određivanje PEN-a.

3.4. Točnost metode

Optimizirana metoda korištena je za određivanje PEN-a u realnim uzorcima. Prilikom ispitivanja korištene su tablete Metalcaptase od 150 mg.

Priprava otopina realnih uzoraka:

METALCAPTASE 150 mg (Heyl Chemisch- Pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Njemačka)

Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži jedna tableta sadrži 150 mg PEN-a. Otopina realnog uzorka pripravlja se otapanjem prosječne mase jedne tablete u 500 mL destilirane vode. Masena koncentracija tako pripravljene otopine iznosi $0,3 \text{ g L}^{-1}$.

$$\gamma = \frac{m(\text{PEN})}{V_{ot}} = \frac{150 \text{ mg}}{500 \text{ mL}} = 0,3 \text{ g L}^{-1}$$

Pri tome, množinska koncentracija pripravljene otopine iznosi:

$$c_1 = \frac{\gamma(\text{PEN})}{M(\text{PEN})} = \frac{0,3 \text{ g L}^{-1}}{149,2 \text{ g mol}^{-1}} = 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Iz tako pripravljene otopine napravi se 6 novih otopina koje će se analizirati:

A_{mix} sadrži 1 mL otopljenih tableta u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2A_{mix}} = 2,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2A_{mix}} = \frac{1 \text{ mL} \times 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 2,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

B_{mix} sadrži 1 mL otopljenih tableta i 0,5 mL standardne otopine PEN * ($c(\text{PEN}) = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2B_{mix}} = 2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2Bmix} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (0,5 \text{ mL} \times 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

C_{mix} sadrži 1 mL otopljene tablete i 1,0 mL standardne otopine PEN * ($c(\text{PEN}) = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2Cmix} = 3,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2Cmix} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1 \text{ mL} \times 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 3,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

D_{mix} sadrži 1 mL otopljene tablete i 1,5 mL standardne otopine PEN * ($c(\text{PEN}) = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2Dmix} = 4,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2Dmix} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (1,5 \text{ mL} \times 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

E_{mix} sadrži 1 mL otopljene tablete i 2 mL standardne otopine PEN * ($c(\text{PEN}) = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2Emix} = 4,69 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2Emix} = \frac{(1 \text{ mL} \times 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) + (2 \text{ mL} \times 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{10 \text{ mL}} = 4,69 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

F_{mix} sadrži 1,5 mL standardne otopine PEN * ($c(\text{PEN}) = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernoj tikvici od 10 mL, a tako pripravljena otopina ima koncentraciju $c_{2Fmix} = 2,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$c_{2Fmix} = \frac{1,5 \text{ mL} \times 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = 2,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

* standardna otopina PEN-a pripravlja se otapanjem 10 mg u 50 mL acetatnom puferu, pH = 2.

Iskoristivost metode ispitivala se dodajući poznate količine standardne otopine PEN-a u otopinu uzorka tablete. U tablicama 6 i 7 prikazani su rezultati ispitivanja iskoristivosti metode. Koristeći jednadžbu pravca, koja je dobivena iz pravca umjeravanja, pripremljenim pomoću standardnih otopina PEN-a, izračunata je stvarna koncentracija PEN-a u farmaceutskim pripravcima. Iz izračunate koncentracije određena je masa PEN-a, koja je zatim uspoređena s teorijskom masom.

Iskoristivost izražena u postotcima kretala se u rasponu između 99,4 % i 101,5 %. Rezultati podržavaju točnost razvijene kinetičke metode kao i odsutnost interferirajućih tvari u korištenim uzorcima. Bez prethodne složene obrade realnog uzorka, razvijena metoda se može uspješno primijeniti za određivanje PEN-a u farmaceutskim pripravcima.

Tablica 6. Određivanje PEN-a u farmaceutskom pripravku i ispitivanje iskoristivosti

Uzorak	Količina u uzorku, mg	Količina dodana, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
Metalcaptase tablete od 150 mg	150,0	–	149,0	99,4
		50	199,5	99,8
		100	253,4	101,4
		150	304,3	101,5
		200	355,1	101,5

Tablica 7. Određivanje PEN-a u realnom uzorku razvijenom kinetičkom metodom analize uz spektrofotometrijski detektor i standardnom metodom koju propisuje Britanska farmakopeja

Uzorak	Količina u uzorku, mg	Metoda početne brzine, mg	Metoda određenog vremena, mg	Standardna metoda prema farmakopeji, mg
Metalcaptase tablete od 150 mg	150,0	148,2	152,5	147,2

5. ZAKLJUČAK

- Cilj istraživanja bio je razvoj i vrednovanje kinetičke metode analize PEN-a uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks reakciji gdje analit, PEN, reducira bis batokuproin bakrov(II) kompleks u narančasto obojeni bis batokuproin bakrov(I) kompleks. Pri valnoj duljini od 483 nm postiže se apsorpcijski maksimum.
- Optimizacijom reakcijskih uvjeta odabrani su slijedeći parametri reakcije: pH 5,0; omjer koncentracija BCS i $\text{Cu}^{2+} = 1$; omjer Cu^{2+} i PEN = 6 te temperatura sustava 25 °C. Parametri kemijske reakcije optimizirani su s ciljem bržeg, preciznijeg i selektivnijeg određivanja analita.
- Prednost ove metode je brza, automatska analiza kojom se može odrediti veliki broj uzoraka u kratkom vremenskom razdoblju.
- Bilježenjem signala u kinetičkom dijelu reakcije postiže se visoka ponovljivost koja omogućava visoku preciznost primijenjene metode. Razvijena metoda omogućava postizanje širokog linarnog dinamičkog područja te određivanje izrazito niskih koncentracija PEN-a (5 ppb) bez korištenja skupe opreme.

6. LITERATURA

- [1] British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia* 2009, The Stationery Office, London, **2008**, 4572.
- [2] Nj. Radić, L. Kukoč-Modun, M. Biočić, *Kinetic spectrophotometric determination of N-Acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(II)-neocuproine reagent. Croatica Chemica Acta*, **2013**, 65-71.
- [3] Martindale: *The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, 1456.
- [4] W. F. Kean, C. J. L. Lock, H. E. Howard-Lock, *J.-Lancet*. **1991**, 338, 1565.
- [5] URL: <https://www.molinstincts.com/structure/D-Penicillamine-cstr>
- [6] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, 1459.
- [7] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. P. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, **2010**, 574.
- [8] *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**, 1459.
- [9] T. Knoll, A. Zollner, G. Wendt-Nordahl, M. S. Michel, P. Alken, *Pediatr. Nephrol.* **2005**, 20, 19.
- [10] D. Schorn, A. G. Mowat, *Rheumatology Rehabil.* **1977**, 16, 223-230.
- [11] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, **1999**.
- [12] Nj. Radić, L. Kukoč-Modun, *Kinetic Methods of Analysis with Potentiometric and Spectrophotometric Detectors - Our Laboratory Experiences, Chapter 3*, Intech, **2012**, 71-92.
- [13] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0*, Print Version, **2009**, 885.
- [14] Nj. Radić, L. Kukoč-Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, **2016**.
- [15] L. Kukoč-Modun, D. Tsikas, T. Kraljević, M. Biočić, Nj. Radić, *Kinetic Spectrophotometric Determination of N-Acetyl-L-cysteine Ethyl Ester (NACET) Generating Chromogenic Copper(I)Ln Complexes with Different Ligands*, *Croat. Chem. Acta*, **2017**, 263-27.
- [16] Interna skripta za pripremu vježbe: *Kinetičke metode analize* (Skripta je sačinjena od materijala preuzetog iz doktorske disertacije: L. Kukoč-Modun (**2009**) *Razvoj*

metoda spektrofotometrijskog i potenciometrijskog određivanja tiopronina u farmaceutskim preparatima-disertacija, Zagreb, 48-57.)

[17] URL: https://www.periodni.com/gallery/spektar_elektromagnetskog_zracenja.png

[18] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition*, W. H. Freeman and Company, New York, **2010**, 393.

[19] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 6th Edition, Volume 1*, Council of Europe, Strasbourg, **2007**, 516.