Razvoj i vrednovanje kinetičke metode određivanja cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor

Pauk, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:167:115672

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Renata Pauk

RAZVOJ I VREDNOVANJE KINETIČKE METODE ODREĐIVANJA CISTEINA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Split, listopad 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje:	Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje:	Farmacija
Nastavni predmet:	Analitička kemija
Tema rada	prihvaćena je na 44. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Pomoć pri izradi:	Maja Biočić mag. ing. chem. ing.

RAZVOJ I VREDNOVANJE KINETIČKE METODE ODREĐIVANJA CISTEINA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR

Renata Pauk, broj indeksa 77

Sažetak: Primjenom slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor razvijena je i vrednovana kinetička metoda određivanja cisteina. Kinetička metoda se temelji na redoks reakciji gdje cistein kao reducens, reducira zeleni bakar(II) neokuproin kompleks do bakar(I) neokuproin kompleksa. Formirani žuto-narančasti bakar(I) neokuproin kompleks pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 458 nm. Optimalni parametri protočnog sustava određeni su univarijantnom metodom te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja. Linearnost je postignuta u području koncentracija cisteina od $6{,}0 \times 10^{-7}$ do $8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} uz jednadžbu pravca: $y = 3690{,}4\ x + 0{,}0019$ i korelacijski koeficijent $R^2 = 0{,}9997$, te su određene granica dokazivanja od $1{,}8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} i granica određivanja od $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Provjeren je i utjecaj pratećih tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka te nije zabilježen njihov interferirajući učinak na određivanje analita. Vrednovanje metode provedeno je ispitivanjem ponovljivosti signala uz relativno standardno odstupanje od 3,35 % te zadovoljavajuće iskoristivosti, odnosno točnosti metode.

Ključne riječi: cistein, slijedna analiza injektiranjem, spektrofotometrija

Rad sadrži: 58 stranica, 32 slike, 5 tablica, 32 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 26. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	
Thesis subject	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 44, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19 and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor:	Lea Kukoč Modun, assistant prof. PhD
Technical assistence:	Maja Biočić, mag. ing. chem. ing.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE KINETIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CYSTEINE USING SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR

Renata Pauk, index number 77

Summary: Using the sequential injection analysis with the spectrophotometric detector, the kinetic method for the determination of cysteine was developed and validated. The kinetic method is based on redox reaction where cysteine as a reductant, reduces green copper(II) neocuproine complex to copper(I) neocuproine complex. The formated yellow-orange copper(I) neocuproine complex shows an absorption maximum at wavelength of 458 nm. The optimum parameters of the flow system were determined by a univariate method and as a result the calibration curve was constructed. Linearity was achieved for the concentration range from 6.0×10^{-7} mol L^{-1} to 8.0×10^{-5} mol L^{-1} and it was described with the equation $y = 3690.4\ x + 0.0019$ and correlation coefficient $R^2 = 0.9997$. The calculated limit of detection is 1.8×10^{-7} mol L^{-1} and the limit of quantification is 6.0×10^{-7} mol L^{-1}. The influence of foreign substances commonly found in the composition of the pharmaceutical preparations was also examined, and no interfering effect on the analyte was noted. Validation of the method was performed by examining the repeatability of the signal with a relative standard deviation of 3.35%, and satisfactory recovery of method, or accuracy of the method.

Key words: cysteine, sequential injection analysis, spctrophotometry

Thesis contains: 58 pages, 32 figures, 5 tables, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: October 26 2017.

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

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Aminokiseline i proteini 1
1.1.1. Građa aminokiselina 1
1.1.2. Podjela aminokiselina 1
1.1.3. Građa i struktura proteina 2
1.2. Cistein 3
1.2.1. Svojstva i struktura cisteina 3
1.2.2. Sinteza cisteina 4
1.2.3. Razgradnja cistina i cisteina 4
1.2.4. Produkti cisteina 5
1.2.5. Cistein u farmaceutskim pripravcima 5
1.2.6. Analitičke metode određivanja cisteina 6
1.3. Kinetičke metode 6
1.3.1. Reakcije prvog reda 7
1.3.2. Reakcije drugog reda 8
1.3.3. Reakcije pseudo prvog reda 9
1.3.4. Vrednovanje kinetičkih metoda 10
2. Cilj istraživanja 11
3. Materijali i metode 12
3.1. Priprava otopina 12
3.2. Slijedna analiza injektiranjem 14
3.2.1. Formiranje zone 16
3.2.2. Programiranje protoka 18
3.3. Molekulska apsorpcijska spektrometrija 20
3.3.1. Apsorpcija svjetlosti 20
3.3.2. Transmitancija 21
3.3.3. Apsorbancija 21
3.3.4. Lambert-Beerov zakon 22
3.3.5. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji 23
3.4. Ostali uređaji i oprema 25

4. Rezultati 26
4.1. Predložena kemijska reakcija 26
4.2. Optimizacija sustava 26
4.3. Optimizacija redoslijeda injektiranja 27
4.4. Optimizacija brzine protoka 28
4.5. Optimizacija volumena injektiranja reagensa 30
4.6. Optimizacija volumena injektiranja analita 32
4.7. Optimizacija volumena petlje zadržavanja 34
4.8. Optimizacija volumena (duljine) reakcijske petlje 35
4.9. Optimizacija omjera reagensa 37
4.10. Odabrani optimalni parametri 39
4.11. Linearno dinamičko područje (LDP) 40
4.12. Granica dokazivanja, granica određivanja i ponovljivost signala 42
4.13. Ispitivanje utjecaja interferencija na osjetljivost metode 44
4.14. Iskoristivost metode 47
5. Rasprava 48
6. Zaključak 51
7. Popis citirane literature 52
8. Sažetak 56
9. Summary 57
10. Životopis 58

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem, u prvom redu, mojoj mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun i neposrednoj voditeljici Maji Biočić, mag. ing. chem. ing. na pomoći u izradi diplomskog rada, uloženom trudu i vremenu, ali i na prijateljskom pristupu.

Želim zahvaliti i članovima Ispitnog povjerenstva, izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo i doc. dr. sc. Franku Burčulu na stručnim i korisnim savjetima, te na lijepim riječima.

Od srca hvala i svim kolegama i kolegicama, sada prijateljima i prijateljicama, koji su nesebično dijelili svoje znanje kada je trebalo, i učinili studiranje nezaboravnim.

Najveće hvala mojoj obitelji, prijateljima i prijateljicama koji su mi pružali ljubav i podršku, te bili puni razumijevanja tijekom cjelokupnog školovanja.

1. Uvod

1. Uvod

1.1. Aminokiseline i proteini

Aminokiseline su osnovna gradivna jedinica polipeptidnih lanaca. Osim što su izvor monomernih jedinica, aminokiseline sudjeluju u mnogim staničnim procesima poput prijenosa živčanih impulsa i biosinteze porfirina, purina, uree i pirimidina. Svakodnevan unos proteina jedan je od preduvjeta održavanja zdravlja jer se metaboliti aminokiselina ne zadržavaju u organizmu već izlučuju urinom [1]. Mikroorganizmi osim gradivnih L-α-aminokiselina proizvode i D-aminokiseline koje tvore polipeptide različitih farmakoloških učinaka. Najznačajniji su antibiotski učinci bacitracina, izoliranog iz *Bacillus subtilis* [2] i gramicidina A izoliranog iz *Bacillus brevis* [3] te antitumorski učinak bleomicina izoliranog iz *Streptomyces verticillus* [4].

Postoji 20 osnovnih L-α-aminokiselina određenih troslovnom genskom šifrom i „21. aminokiselina“ selenocistein. Selenocistein nastaje zamjenom atoma sumpora selenom u strukturnom analogu cisteinu u fazi translacije i nije određena troslovnim kodonom. Nalazi se u nekim peroksidazama i reduktazama gdje sudjeluje u enzimskim reakcijama katalize prijenosa elektrona [5].

1.1.1. Građa aminokiselina

Sve L-α-aminokiseline osim glicina imaju kiralan α-ugljik na koji su vezane karboksilna skupina, amino skupina, atom vodika i funkcionalna skupina karakteristična za pojedinu aminokiselinu. Funkcionalna skupina određuje svojstva cijele molekule pa ih prema bočnom ogranku možemo podijeliti na nepolarne i polarne aminokiseline sa ili bez naboja, odnosno netopljive i topljive u vodi. U krvnoj plazmi aminokiseline se najčešće nalaze u obliku izoelektrične čestice koja sadrži jednak broj pozitivnih i negativnih naboja - *zwitter* iona [6].

1.1.2. Podjela aminokiselina

Aminokiseline dijelimo na esencijalne i nesencijalne. Esencijalne ili nužne aminokiseline su one koje su potrebne organizmu, ali ih ne može sam sintetizirati. To su: histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin. Ukoliko dođe do manjka makar jedne od navedenih devet aminokiselina, bez obzira na unos proteina,

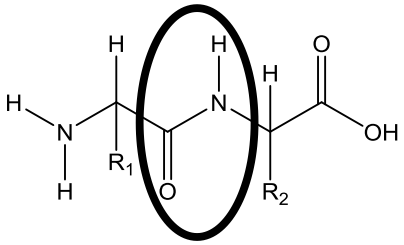
ravnoteža dušika biti će poremećena zbog nedovoljne količine nužnih aminokiselina za sintezu proteina.

Neesencijalne aminokiseline organizam može sintetizirati i njihov nedostatak neće utjecati na ravnotežu dušika. U tu skupinu spadaju: arginin, asparagin, glicin, glutamin, prolin i serin te alanin, aspartat i glutamat koje se jedine mogu smatrati pravim neesencijalnim aminokiselinama, jer se sintetiziraju iz zajedničkih metaboličkih intermedijera (piruvata, oksaloacetata i α-ketoglutarata).

Cistein i tirozin spadaju u posebnu skupinu aminokiselina koje se sintetiziraju iz esencijalnih preteča, koje se u organizam unose hranom, metionina (cistein) i fenilalanina (tirozin) [5].

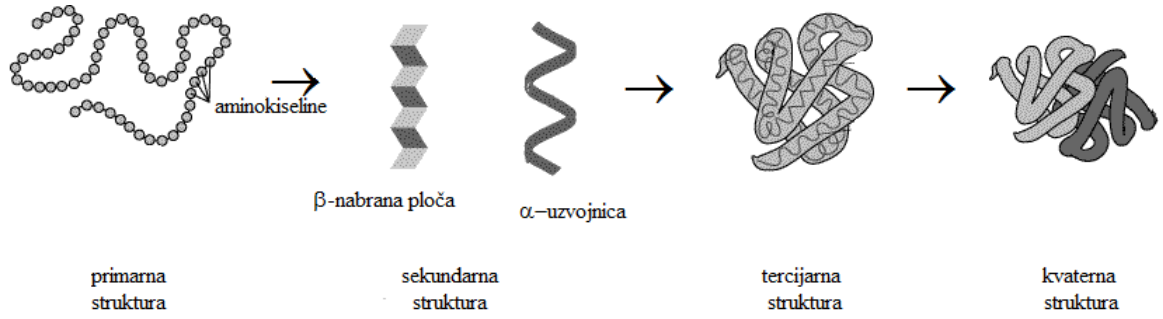
1.1.3. Građa i struktura proteina

Proteini nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom koja se ostvaruje između karboksilnih i amino skupina susjednih aminokiselina (slika 1.1.). Aminokiselinski slijed genetski je uvjetovan i određuje konformaciju i funkciju proteina.



Slika 1.1. Prikaz peptidne veze

Postoje četiri razine strukture proteina (slika 1.2.): primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna. Primarna struktura predstavlja slijed aminokiselina i genetski je uvjetovana. Međusobni položaj bliskih ogranaka predstavlja sekundarnu, a udaljenih ogranaka tercijarnu strukturu. Kvaterna struktura odnosi se na oligomerne proteine i predstavlja međusobni odnos pojedinih podjedinica ovih proteina. Ukupan naboj proteina određen je udjelom pozitivno i negativno nabijenih bočnih ogranaka [7].

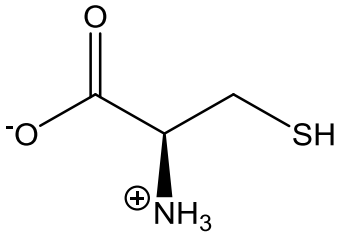


Slika 1.2. Prikaz primarne, sekundarne, tercijarne i kvaterne strukture proteina

1.2. Cistein

1.2.1. Svojstva i struktura cisteina

Cistein je polarna neesencijalna aminokiselina, bez naboja koja se sintetizira iz metionina i serina. Dobro je topljiv u polarnim otapalima poput vode i etanola, a netopljiv je u nepolarnim otapalima. Struktura cisteina prikazana je u obliku *zwitter* iona:

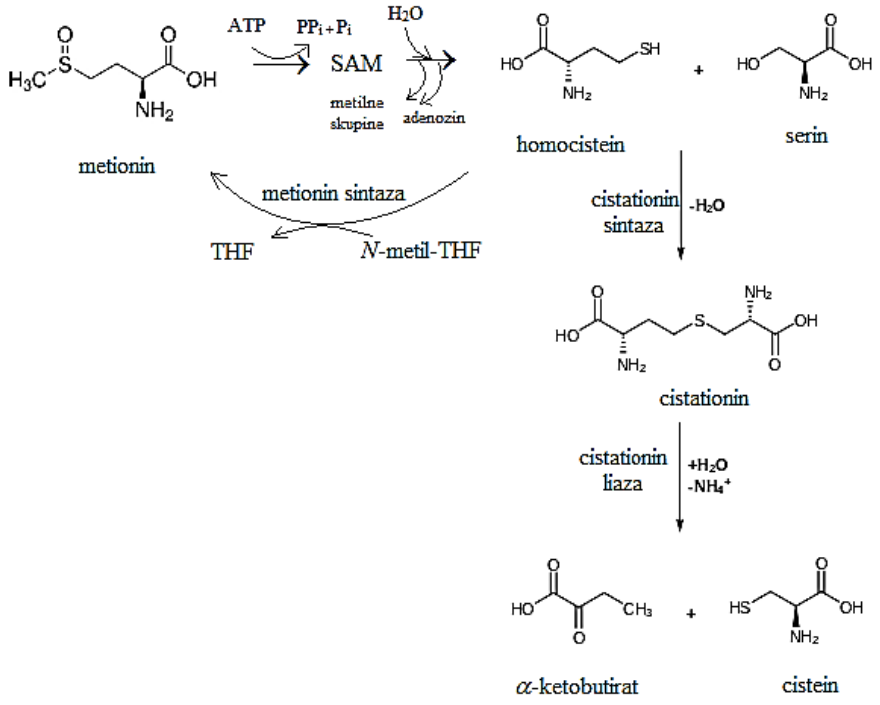


Slika 1.3. Strukura L-*α*-cisteina (*zwitter* ion)

Svojstva su određena tiolnom –SH skupinom acikličkog bočnog ogranka. Tiolna skupina zbog nukleofilnog svojstva može sudjelovati u enzimskoj katalizi i podliježe reakcijama oksidacije i esterifikacije. Oksidacijom dviju molekula cisteina i njihovim kovalentnim povezivanjem disulfidnom vezom preko atoma sumpora formira se cistin. Cistin sadrži hidrofobne ostatke i povećava stabilnost proteina uslijed nastanka disulfidnog mosta [5].

1.2.2. Sinteza cisteina

Cistein nije tipična neesencijalna aminokiselina jer se sintetizira iz esencijalne aminokiseline metionina koji je donor tiolne skupine i neesencijalne aminokiseline serina. Sinteza cisteina započinje konverzijom metionina u homocistein koji se reakcijom sa serinom pretvara u cistationin. U posljednjem koraku hidrolizom cistationina nastaju cistein i α-ketobutirat [5].



Slika 1.4. Sinteza cisteina

1.2.3. Razgradnja cistina i cisteina

Cistin se uz pomoć enzima cistin-reduktaze reducira u cistein koji se pretvara u piruvat putem cistein-sulfinata ili 3-merkaptopiruvata. Prvi metabolički put uključuje enzime cistein-deoksigenzu, transaminazu i desulfinazu, a drugi transaminazu i osim piruvata kao produkt nastaje i 3-merkaptolaktat.

Poremećaj razgradnje cisteina može dovesti do pojave cistinurije. Cistinurija je benigni genetski poremećaj reapsorpcije cisteina i strukturno sličnih aminokiselina (lizin, arginin, ornitin) čija je jedina komplikacija moguće stvaranje cistinskih kamenaca. Cistinuriju

liječimo alkalizacijom urina, npr. sodom bikarbonom i povećanim unosom tekućine ili D-penicilinaminom kao drugom linijom [8].

1.2.4. Produkti cisteina

Cistein reagira s pantotenatom i nastaje 4-fosfopantotenoil-cistein iz kojeg se daljnjim reakcijama sintetizira koenzim A. Koenzim A sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima uključujući sintezu aminokiselina koje se sintetiziraju transaminacijom (alanin, aspartat i glutamat). Cistein i koenzim A važni su faktori prvog koraka u reakcijama acetilacije kao reakcije druge faze metabolizma lijekova. Prvi korak biotransformacije acetilacijom uključuje prijenos acetilne skupine s acetil-CoA na aktivni centar enzima *N*-acetiltransferaze, tiolnu skupinu aminokiseline cisteina. Lijekovi koji se metaboliziraju acetilacijom su npr. antiaritmik prokainamid, antituberkulotici *p*-aminosalicilna kiselina i izoniazid, *β*-blokator propranolol, sulfonamidi i brojni drugi [9].

Iz cisteina u tri enzimski posredovane reakcije može nastati i taurin. Zamjenom koenzima A taurinom u molekuli kolil-CoA nastaje taurokolna kiselina, jedna od žučnih kiselina [5].

1.2.5. Cistein u farmaceutskim pripravcima

Stvarajući disulfidne veze cistein daje čvrstoću strukturnom proteinu kose - keratinu [10]. Zbog navedenog svojstva često se nalazi u oralnim dodacima prehrani za rast i čvrstoću kose u obliku cisteina ili dimera cistina, ali ne kao osnovna djelatna tvar već u kombinaciji s različitim vitaminima i mineralima. Cistein se nalazi u KAL Hair force kapsulama®, MERZ Spezial dražeje Koža/kosa/nokti®, a cistin možemo pronaći u Krka Fitoval kapsulama® i DUCRAY anacaps kapsulama® i MERZ Spezial Hair dražejama®.



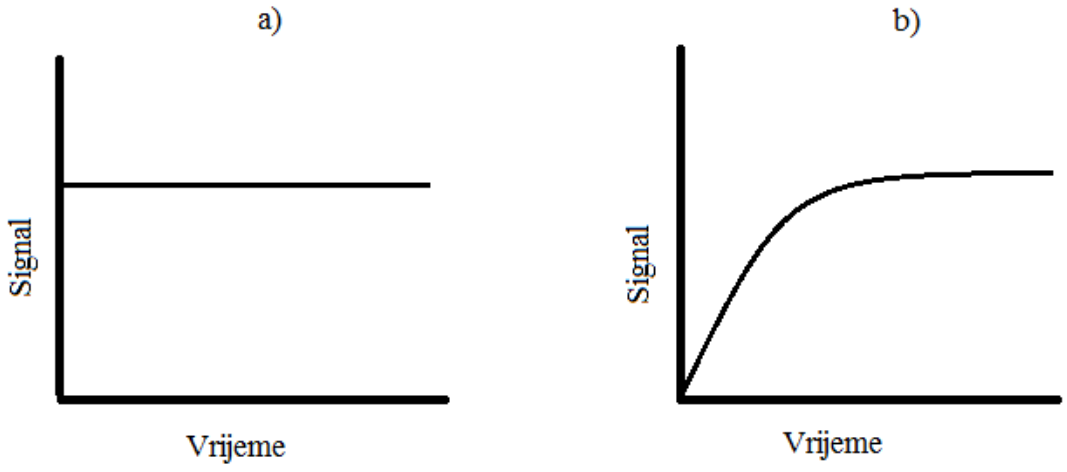
Slika 1.5. Farmaceutski pripravci koji sadrže cistein

1.2.6. Analitičke metode određivanja cisteina

Do sada razvijene metode za određivanje cisteina su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) sa kolorimetrijskim detektorom [11], HPLC na obrnutim fazama [12], fluorescentna spektroskopija [13], kolorimetrijske metode [14], Ramanova spektroskopija [15], voltametrijske [16] i kemiluminiscentne [17] metode. U nekim novijim radovima opisano je i spektrofotometrijsko određivanje cisteina uz primjenu nanočestica, čije su prednosti niska granica određivanja, dobra linearnost te prihvatljiva točnost i reproducibilnost [18-20]. Cilj ovog rada je razviti kinetičku metodu za određivanje cisteina, slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor, koja će omogućiti praćenje napredovanja reakcije i određivanje cisteina u dinamičkim uvjetima.

1.3. Kinetičke metode

Analitičke metode kojima određujemo željenu tvar možemo podijeliti u dvije skupine: termodinamičke i kinetičke. Osnovna razlika je što se u termodinamičkim uvjetima mjerenja izvode kada je reakcija dosegla stanje termodinamičke ravnoteže, dok se mjerenja kod kinetičkih metoda mogu obavljati u dinamičkim uvjetima dok reakcija nije postigla stanje termodinamičke ravnoteže [21].



Slika 1.6. Grafički prikaz ovisnosti signala o vremenu mjereno a) termodinamičkim metodama i b) kinetičkim metodama

Na slici 1.6. vidljivo je kako je kod termodinamičkog mjerenja signal konstatan, dok se kod kinetičkog mjerenja, pod utjecajem neprekidne promjene koncentracije reaktanata i produkata, signal mijenja s vremenom.

Na selektivnost metoda utječemo odabirom prikladnih uvjeta i reagensa. U termodinamičkim uvjetima cilj je povećati razliku u ravnotežnim konstantama reakcija analita, odnosno interferencija, dok se u kinetičkim metodama seletivnost postiže povećanjem razlike u brzinama regiranja analita i interferencija sa reagensom.

Prednost kinetičkih metoda je povećan broj kemijskih reakcija koje se mogu upotrijebiti u analitičke svrhe jer se mogu primjenjivati kod nedovoljno brzih ili nepotpunih reakcija kod kojih se sporo postiže stanje ravnoteže. Reakcije koje se koriste u kinetičkim metodama određivanja ne smiju biti ni previše brze ni previše spore, moraju završiti u razumnom vremenu, ali ne toliko brzo da završi dok se reagensi miješaju. Također mora biti poznat red reakcije kako bi se mogli odrediti brzina reakcije i koncentracija kao kinetički parametri. Treći, poslijednji uvjet, je mogućnost praćenja reakcije kroz promjenu koncentracije kao funkcije vremena [21].

1.3.1. Reakcije prvog reda

Reakcije prvog reda su reakcije kojima brzina ovisi o koncentraciji

$$\mathrm{A} \rightarrow \mathrm{P},$$

i tada je brzina reakcija jednaka brzini nestajanja tvari A i proporcionalna njezinoj koncentraciji. Diferencijalni izraz zakona brzine za reakcije prvog reda glasi:

$$-\frac{d[\mathrm{A}]}{dt} = k \cdot [\mathrm{A}] \tag{1}$$

gdje je [A] koncentracija reaktanta A, a k specifična brzina reakcije ili konstanta brzine reakcije. Minus ispred zagrade u jednadžbi ukazuje na smanjenje koncentracije tvari A s vremenom. Kod diferencijalnih metoda koncentracije se računaju iz brzina koje se određuju mjerenjem nagiba krivulje grafa koji opisuje koncentraciju reaktanta ili produkta kao funkciju vremena. Nagib krivulje se najčešće određuje u prvim trenutcima mjerenja kada je eksponencijalna krivulja približno linearna i nagib je najveći.

Brzinu reakcije možemo odrediti i integralnim metodama. Izraz za određivanje početne koncentracije reaktanta A iz koncentracije u određenom vremenu *t* glasi:

$$\log[\mathrm{A}]_t = \log[\mathrm{A}]_0 - \frac{k \cdot t}{2{,}303} \tag{2}$$

gdje je $[A]_t$ koncentracija reaktanta u vremenu *t*, $[A]_0$ koncentracija reaktanta na početku, *k* konstanta brzine reakcije i *t* vrijeme reakcije. Ukoliko grafički prikažemo logaritam eksperimentalno mjerene koncentracije reaktanta A kao funkcije vremena, dobijemo pravac nagiba $-\frac{k}{2{,}303}$, i odsječak na osi *y* koji je jednak $\log[A]_0$ [22].

1.3.2. Reakcije drugog reda

Reakcije drugog reda su reakcije kojima brzina ovisi o koncentraciji svakog od reaktanata. Analitičke reakcije najčešće su reakcije drugog reda u kojima analit predstavlja jedan reaktant, a reagens drugi. Uz pretpostavku da je reakcija nastajanja produkta nepovratna, možemo je predočiti kao:

$$\mathrm{A+B \rightarrow P.}$$

Brzina reakcija drugog reda ovisi o brzini nestajanja reaktanta A i reaktanta B, odnosno njihovoj koncentraciji. Zakon o brzini drugog reda prikazujemo izrazom:

$$-\frac{d[\mathrm{A}]}{dt} = -\frac{d[\mathrm{B}]}{dt} = k \cdot [\mathrm{A}] \cdot [\mathrm{B}] \tag{3}$$

gdje [A] predstavlja koncentraciju reaktanta A, [B] koncentraciju reaktanta B, a *k* konstantu brzine reakcije.

Integralni izraz za brzinu reakcije drugog reda u kojoj su početne koncentracije reaktanata jednake ($[A]_0=[B]_0$) glasi:

$$k \cdot t = \frac{[\mathrm{A}]_0 - [\mathrm{A}]_t}{[\mathrm{A}]_0 \cdot [\mathrm{A}]_t} \tag{4}$$

Kada početne koncentracije reaktanata A i B nisu jednake jednadžba poprima izgled:

$$k \cdot t = \frac{2{,}303}{[\mathrm{B}]_0 - [\mathrm{A}]_0} \cdot \log \frac{[\mathrm{A}]_0 \cdot [\mathrm{B}]_t}{[\mathrm{B}]_0 \cdot [\mathrm{A}]_t} \tag{5}$$

gdje je $[A]_t$ koncentracija reaktanta u vremenu *t*, $[A]_0$ koncentracija reaktanta na početku reakcije, $[B]_t$ koncentracija reaktanta B u vremenu *t*, $[B]_0$ koncentracija reaktanta B na početku reakcije, *k* konstanta brzine reakcije i *t* vrijeme reakcije [22].

1.3.3. Reakcije pseudo prvog reda

U reakcijama pseudo prvog reda jedan od reaktanata u značajnom je suvišku. Ukoliko je u izrazu za reakciju drugog reda

$$A+B \rightarrow C,$$

Koncentracija reaktanta B znatno veća od koncentracije reaktanta A, tj. [B]>>[A] koncentracija reaktanta B vrlo se malo mijenja tijekom reakcije i izraz za brzinu ove reakcije svodi se na izraz za zakon brzine reakcije prvog reda (1) i glasi:

$$-\frac{d[\mathrm{A}]}{dt} = k' \cdot [\mathrm{A}] \tag{6}$$

gdje [A] predstavlja koncentraciju reaktanta A, a *k'* konstantu koja je jednaka umnošku konstante brzine reakcije *k* i koncentracije reaktanta B ($k' = k \cdot [\mathrm{B}]$).

Brzinu reakcije možemo izraziti i integralnom metodom:

$$k \cdot t = \frac{2,303}{[\mathrm{B}]_0} \cdot \log \frac{[\mathrm{A}]_0}{[\mathrm{A}]_t} \tag{7}$$

gdje je $[A]_t$ izraz za koncentraciju reaktanta u vremenu *t*, $[A]_0$ koncentracija reaktanta na početku reakcije, $[B]_0$ koncenteacija reaktanta B na početku reakcije, *k* konstanta brzine reakcije i *t* vrijeme reakcije. Kod reakcija pseudo prvog reda vidljivo je iz diferencijalnog i integralnog izraza kako brzina reakcije ovisi o nestajanju tvari manje koncentracije (reaktant A).

Brzine nekih reakcija možemo povećati katalitičkim učinkom enzima specifičnih za tu reakciju [22].

1.3.4. Vrednovanje kinetičkih metoda

Uspješnost razvoja, proizvodnje i kontrole kvalitete farmaceutskih pripravaka zasniva se na brzim, selektivnim, osjetljivim i ekonomski isplativim metodama kvantitavne analize koje odgovaraju suvremenim strožim zahtjevima farmakopejskih monografija.

Kinetičke metode udovoljavaju zahtjevima farmaceutske industrije za automatizacijom i minijaturizacijom metoda za istraživačka i rutinska kvantitativna mjerenja. Kao najpovoljnija metoda pokazala se slijedna analiza injektiranjem zbog ekonomičnosti utroška uzorka i reagensa i velike brzine analiziranja uzoraka. Prednost kinetičkih metoda je i mogućnost povećanja selektivnosti metode optimizacijom uvjeta reakcije na način da se brzine reakcije interferencija i analita dovoljno razlikuju. Osjetljivost metode možemo povećati provođenjem mjerenja u uvjetima kada je koncentracija analita relativno velika. Ukoliko je analit jedan od reaktanata mjerenja bi se trebala provoditi na početku reakcije dok se za produkte mjerenja izvode na kraju.

Nedostatak kinetičkih metoda u odnosu na termodinamičke je smanjena točnost zbog utjecaja kontroliranih i nekontroliranih parametara poput temperature i pH otopine [23].

Osim parametrima selektivnosti, osjetljivosti, točnosti i preciznosti, metoda se vrednuje određivanjem linearnog dinamičkog područja, te granice određivanja i dokazivanja. Linearno dinamičko područje (LDP) je područje koncentracije analita u kojem signal linearno raste s porastom koncentracije. LDP prikazujemo pravcem na grafu ovisnosti apsorbancije o koncentraciji analita i određujemo ga na temelju najmanje pet različitih koncentracija. Izražava se jednadžbom $y = k\,x + l$, gdje y predstavlja vrijednost apsorbancije, a x koncentraciju analita izraženu u mol L^{-1}. Omeđeno je granicom određivanja i gornjom granicom LDP-a. Granica određivanja je najmanja koncentracija analita koja se može kvantitativno odrediti primjenom odgovarajuće metode ili tehnike. Granica dokazivanja izraz je za najnižu koncentraciju analita koja se može kvalitativno odrediti i koja daje signal tri puta veći od šuma primjenom određene tehnike ili metode [24].

Cilj istraživanja ovog rada je razvoj kinetičke metode za određivanje cisteina koja će se vrednovati ispitivanjem linearnog dinamičkog područja, granice određivanja, granice dokazivanja i ponovljivosti reakcije. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj zeleno obojani $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kompleks, reduciran L-cisteinom, prelazi u žuto obojani $[Cu(Nc)_2]^{+}$ kompleks koji apsorbira pri valnoj duljini od 458 nm .

2. Cilj istraživanja

2. Cilj istraživanja

Cilj diplomskog rada je razvoj i vrednovanje metode određivanja L-cisteina primjenom slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor.

Razvoju metode prethodi optimizacija slijedećih parametara protočnog sustava:

1. Redoslijed injektiranja analita i reagensa
2. Brzina protoka osnovne otopine
3. Volumen injektiranja reagensa i analita
4. Volumen petlje zadržavanja i reakcijske petlje
5. Koncentracija reagensa

Korištenjem optimiziranih parametara određene su analitičke karakteristike razvijene metode:

a) Područje djelovanja Beerovog zakona (linearno dinamičko područje - LDP)
b) Jednadžbu regresijskog pravca (nagib i odsječak)
c) Koeficijent linearne regresije R^2
d) Granicu dokazivanja
e) Granicu određivanja

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

3. Materijali i metode

3. Materijali i metode

3.1. Priprava otopina

a) Otopina standarda L-cisteina

Standardna otopina L-cisteina, {c(L-cistein) = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}} pripravlja se otapanjem 0,0606 g L-cisteina (Merck, Damstadt, Njemačka) u acetatno-boratno-fosfatnom puferu, pH = 3, nadopunom do oznake odmjerne tikvice od 50 mL. Otopina se čuva u tamnom prostoru pri temperaturi od 4 °C, i tako čuvana otopina stabilna je najmanje 30 dana. Radne otopine dnevno su pripravljane razrjeđivanjem standardne otopine.

b) Otopina bakar(II) neokuproin kompleksa

Standardna otopina bakrovog(II) neokuproin kompleksa {c[$Cu(Nc)_2$]$^{2+}$= 1×10^{-3} mol L^{-1}} pripravlja se iz bakrovog(II)sulfat-pentahidrata i neokuproin hidrata (omjer Cu : Nc = 1 : 2,4), u acetatno-boratno-fosfatnom puferu pH = 3. Prvo slijedi otapanje 0,0250 g bakrovog(II) sulfat-pentahidrata ($CuSO_4 \times 5H_2O$; Kemika, Zagreb, Hrvatska; M = 249,68 g mol^{-1}) u malom volumenu acetatno-boratno-fosfatnog pufera pH = 3. U tako pripravljenoj otopini bakra(II) se zatim otopi 0,0500 g neokuproina ($C_{14}H_{12}N_2 \times H_2O$; Sigma Aldrich, Steinheim, Austrija; M = 208,26 g mol^{-1}) i nadopuni acetatno-boratno-fosfatnim puferom pH = 3 do oznake 100 mL odmjerne tikvice. Neokuproin se pripravlja u otopini bakra(II), kako bi mu, stvaranjem kompleksa [$Cu(Nc)_2$]$^{2+}$, povećali topljivost. Pripravljena otopina čuva se na 4 °C i stabilna je najmanje 30 dana.

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

Pufer se pripravlja otapanjem 4,9464 g borne kiselina (H_3BO_3, Alkaloid, Skopje, Makedonija; M = 61,83 g mol^{-1}) u malo destilirane vode. Nakon otapanja borne kiseline doda se 4,60 mL octene kiseline (CH_3COOH, glacialna, VWR Chemicals, Francuska; M = 60,05 g mol^{-1}) i 3,20 mL fosforne kiseline (H_3PO_4, Kemika, Zagreb; M = 98,00 g mol^{-1}) te nadopuni destiliranom vodom do oznake na odmjernoj tikvici od 2,0 L. Pripravljena otopina približno ima vrijednost pH = 2. Željena vrijednost pH (pH = 3) podešava se dodatkom otopine NaOH {c(NaOH) = 2,0 mol L^{-1}} uz kontrolu pH-metrom.

d) Otopina natrijeva hidroksida

Otopina NaOH {c(NaOH) = 2,0 mol L^{-1}} pripravlja se otapanjem 8,0000 g natrijeva hidroksida (NaOH, Sv. Nedjelja, Hrvatska; M = 40,0 g mol^{-1}) u 100 mL deionizirane vode.

3.2. Slijedna analiza injektiranjem

Marshall i Ruzicka početkom 90.-ih godina prošlog stoljeća razvili su novu kinetičku tehniku koja čini drugu generaciju protočnih metoda - slijednu analizu injektiranjem. Slijedna analiza injektiranjem (SIA, engl. *Sequential injection analysis*) nastala je razvojem analize injektiranjem u protok (FIA, engl. *Flow injection analysis*). FIA se zasniva na injektiranju uzorka u kontinuirani protočni sustav struje nosioca i reagensa. Nakon što se uzorak raspršu u struji reagensa, dolazi do stvaranja produkta unutar injektirane zone kojeg detektor očitava na temelju promjene boje ili nekog drugog parametra. Sustav se sastoji od peristaltičke crpke koja regulira brzinu protoka, injekcijskog ili višepozicijskog ventila, reakcijske uzvojnice i detektora.

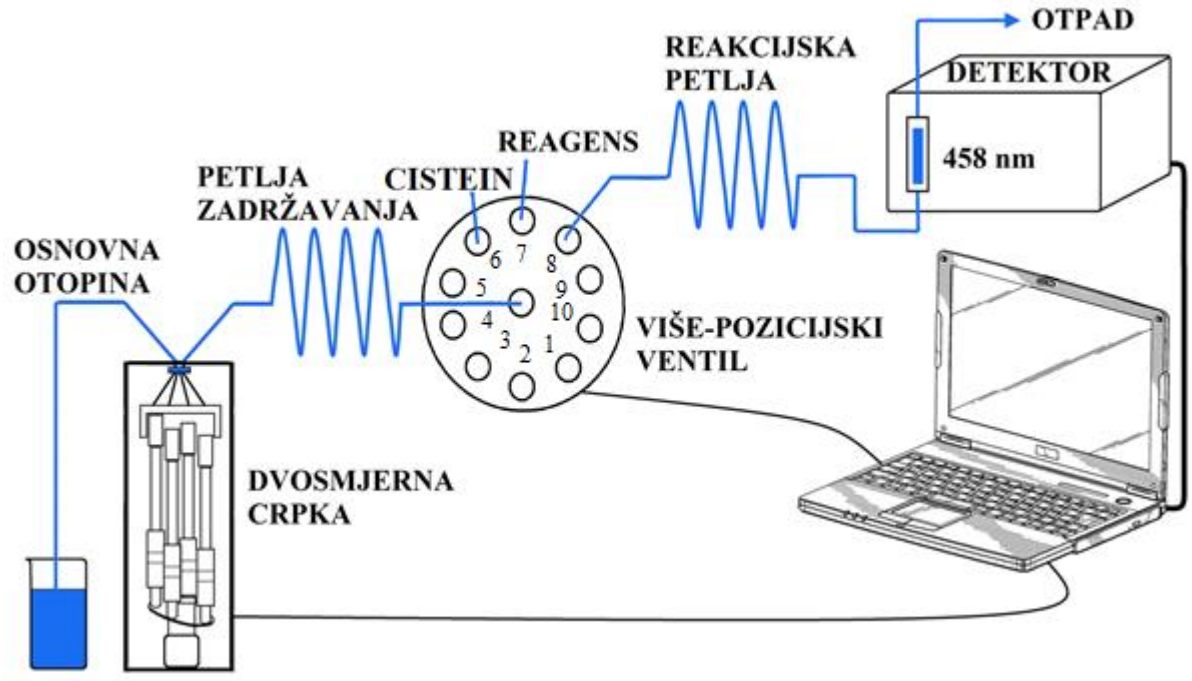
Suvremeni stroži zahtjevi za kvantitativnom analizom rezultirali su potrebom za razvojem ekonomičnije i funkcionalnije metode. Uštedom utroška reagensa i potpunom automatizacijom sustava slijedna analiza injektiranjem pokazala se kao izrazito pogodna. Apsolutna automatizacija sustava omogućava reproducibilan vremenski interval između injektiranja i detekcije što osigurava obradu svih uzoraka na isti način i mogućnost usporedbe nepoznatih uzoraka sa standardom. Ekonomski prihvatljiva metoda široku je primjenu pronašla i u farmaceutskoj industriji zbog mogućnosti analize uzoraka različite formulacije: masti, pasta, krema, emulzija, otopina i suspenzija [25].

Iako je SIA robusnija metoda kojom možemo analizirati uzorke manjih koncentracija, prednost FIA metode je mogućnost obrade većeg broja uzoraka.



Slika 3.1. Sustav korišten prilikom razvoja i validacije SIA metode za određivanje cisteina

Sustav se sastoji od dvosmjerne crpke (Valco Instruments, Švicarska), višepozicijskog selekcijskog ventila (Valco Instruments, Švicarska), petlje zadržavanja i detektora, u ovom slučaju dvosnopnog spektrofotometra Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan).



Slika 3.2. Shematski prikaz SIA sustava korištenog u razvoju i vrednovanju metode

Osnovne karakteristike SIA sustava su dvosmjeran tok kroz petlju zadržavanja i programsko upravljanje injektiranjem. Nakon što se dvosmjernom crpkom u sustav injektira

programski zadana količina analita, a potom reagensa, dolazi do promjene smjera kretanja u petlji zadržavanja. Daljnim protokom zona analita i reagensa međusobno se raspršuju i na granicama zona se stvara produkt. Detektor bilježi signal produkta kao pik na grafu čija visina ovisi o koncentraciji analita. Grafički prikaz odziva detektora kao funkcije vremena u slijednoj analizi injektiranjem naziva se siagram. Najčešće se koriste spektrofotometrijski i potenciometrijski detektor [26].

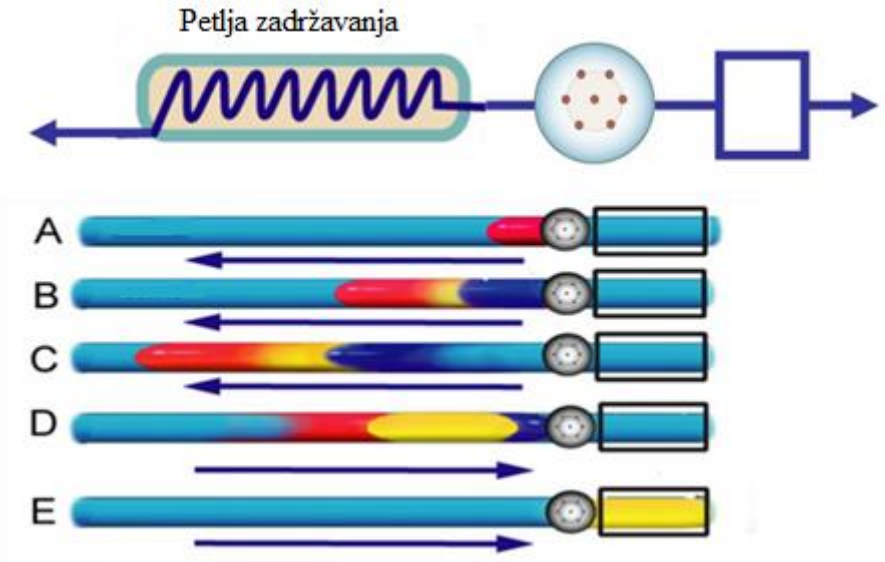
Sustavi prve generacije protočnih analiza (FIA) zahtjevaju veći broj cjevčica kako bi se injektirali svi potrebni reagensi (svaki zasebno) dok više-pozicijski selekcijski ventil SIA sustavu omogućuje slijedno injektiranje nekoliko različitih uzoraka, standarda ili reagensa [27].

Napredak u razvoju protočnih sustava vidljiv je i u pojednostavljenju predobrade uzoraka. Dvosmjerna crpka promjenom smjera protoka, ili njegovim zaustavljanjem, omogućava provođenje razrjeđivanja, ekstrakcije tekuće - tekuće i tekuće - plin, ekstrakcije iz čvrstih uzoraka, dijalize i enzimatskih reakcija kao postupaka predobrade uzoraka u reakcijskoj petlji [28].

3.2.1. Formiranje zone

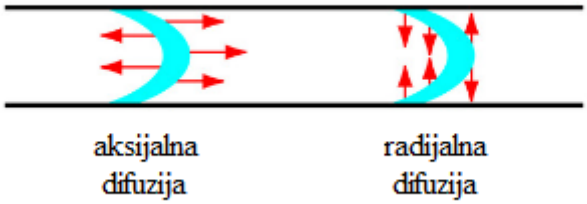
Analize injektiranjem temelje se na raspršenju analita u struji osnovne otopine i reagensa te nastanku koncentracijskog gradijenta, odnosno pika. Kod SIA metode odvijaju se dvije, po prirodi, kinetičke metode raspršenja, kemijska i fizikalna. Fizikalno dolazi do raspršenja zone analita u zoni reagensa, a kemijski na granicama faza dolazi do formiranja produkta koji je posljedica kemijske reakcije.

Raspršenje zone uzorka u otopini nositelja i zoni reagensa posljedica je aksijalne i radijalne difuzije, te koncentracijskog gradijenta između otopine nositelja i uzorka. Aksijalna (paralelna) difuzija uzrokuje laminarno gibanje i međusobno miješanje zona. Povećanjem laminarnog gibanja poveća se linearna brzina protoka što rezultira većim brojem analiza u određenom vremenu. Radijalna (okomita) difuzija je dominantan parametar u analizama injektiranjem koja uzrokuje gibanje uzorka prema stijenci petlje zadržavanja i na taj način smanjuje linearnu brzinu u sredini presjeka cjevčice, a povećava na stjenkama. Združenom aksijalnom i radijalnom difuzijom omogućeno je zadržavanje cjelovitosti zone uzorka.



Slika 3.3. Prikaz formiranja zone koja se prenosi do detektora. Crvenom bojom označena je zona uzorka, a plavom zona reagensa. Na granicama zona formira se produkt označen plavom bojom.

Ukoliko se prvo injektira uzorak, a potom reagens, reagens laminarnim strujanjem, koje je posljedica aksijalne difuzije, prodire u zonu uzorka i nastavljaju se uzvodno gibati (na slici 3.3. označeno slovima A, B i C). Nakon promjene smjera dolazi do turbulentnog gibanja koje je rezultat akceleracije i zbrojne aksijalne i radijalne difuzije (D). Radijalno gibanje završava nakon što reakcijska smjesa dođe do detektora (E) [29].



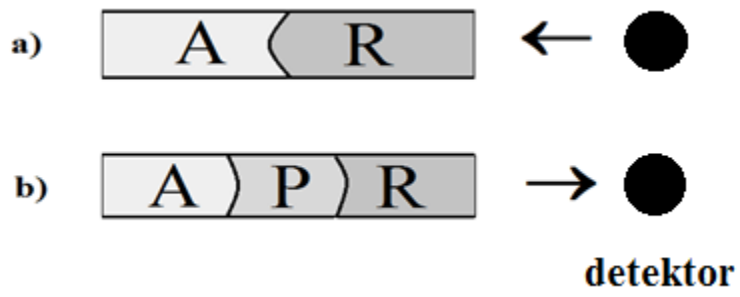
Slika 3.4. Prikaz aksijalne difuzije, koja uzrokuje laminarno gibanje, i radijalne difuzije, koja uzrokuje turbulentno gibanje

Kao rezultat opisanih gibanja, dolaskom zone na detektor, bilježi se signal u obliku pikova na siagramu. Smanjenjem raspršenja pikovi postaju viši i uži, i na taj se način povećava osjetljivost i dinamika mjerenja, a snižava granicu određivanja.

3.2.2. Programiranje protoka

Punjenje sustava otopinama reagensa i analita prethodi samom procesu analize, kako bi se uklonio zrak koji može interferirati sa zabilježenim signalom. Na početku analize odabiru se otvori više-pozicijskog ventila na koje se spajaju otopine (na slici 3.2. označeni brojevima 1-10; na slici 3.6. odabrani otvori označeni slovom „C“), i smjer protoka. Dva su moguća smjera: engl. *aspirate* - usis, gdje je protok usmjeren od otvora ventila prema crpki (na slici 3.6. označen slovom „A“), i engl. *dispense* - isis, gdje je protok usmjeren od crpke prema ventilu.

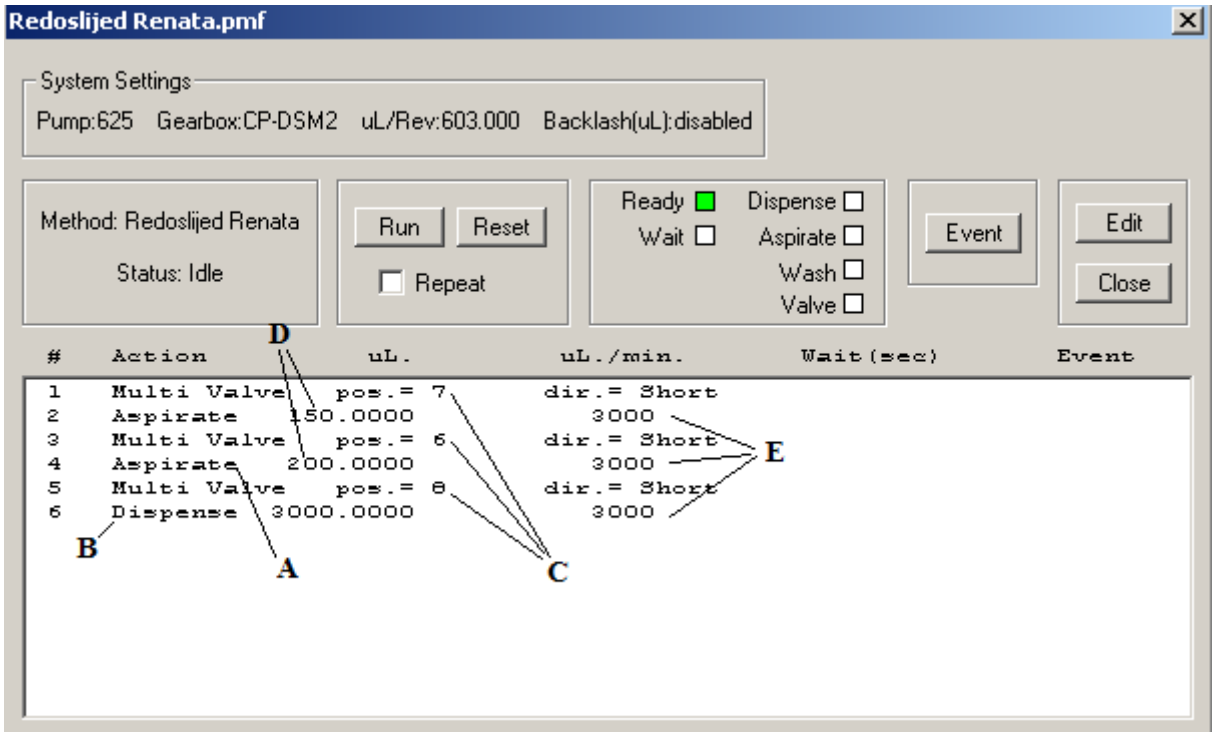
Prilikom usisa cjevčice se pune otopinama reagensa i analita (na slici 3.5. označeno slovom „a“), gdje se zadržavaju dok ne dođe do promjene smjera protoka isisavanjem. Kad se promijeni smjer, otopine reagensa i analita se osnovnom otopinom koz novi otvor tjeraju prema detektoru (na slici 3.5. označeno slovom „b“).



Slika 3.5. Prikaz punjenja cjevčica otopinama analita i reagensa. Na slici je zona reagensa označena slovom „R“, slovom „A“ struja analita i slovom „P“ stvaranje produkta na granici faza analita i reagensa.

Jedna od osnovnih prednosti slijedne analize injektiranjem u odnosu na protočnu analizu je mogućnost zaustavljanja protoka, čime se može izbjeći znatan utrošak reagensa i velika količina otpada. Programski se upravlja i volumenima injektiranja analita i reagensa (na slici 3.6. označeni slovom „D“).

Osim volumena otopina programski se određuje vrijeme usisa i isisa, te brzina protoka, te na taj način podešava učestalost analiza (na slici 3.6. označeno slovom „E“). Programsko upravljanje svim koracima analize rezultira je jednostavnošću uporabe metode bez potrebe za dodatnom ručnom izmjenom.



Slika 3.6. Programski slijed određivanja cisteina. U prvom koraku protokom usmjerenim od otvora 7 više-pozicijskog ventila uvlači se 150 μL otopine reagensa, a potom protokom usmjerenim od otvora 6 ventila uvlači se 200 μL otopine analita prema petlji zadržavanja. Promjenom smjera protoka u posljednjem koraku, 3000 μL osnovne otopine izbacuje se od crpke prema otvoru 8 više-pozicijskog ventila, i na taj se način formirana zona produkta šalje prema detektoru. Optimizirana brzina protoka je 3000 μL min^{-1}.

3.3. Molekulska apsorpcijska spektrometrija

Iako je spektroskopija u prošlosti opisivala granu znanosti koja se bavi isključivo svjetlošću, odnosno vidljivim zračenjem, danas ona obuhvaća i X-zračenje, ultraljubičasto (UV), infracrveno (IR), mikrovalno i radiofrekvencijsko zračenje. Spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih metoda u analitičkoj kemiji kojom se na temelju apsorpcije svjetlosti pri određenoj valnoj duljini određuje koncentrancija analita. Metoda je široko primjenjiva za vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja zbog mogućnosti selektivnog prevođenja velikog broja tvari u obojani produkt. Cijenom povoljnija mjerenja u ultraljubičastom i vidljivom spektru pogodnija su za kvantitativna, a u infracrvenom spektru za kvalitativna određivanja. Povezanost apsorpcije svjetlosti i koncentracije otopine objašnjena je Lambert-Beerovim zakonom [22].

3.3.1. Apsorpcija svjetlosti

Apsorpcija predstavlja proces u kojem tvar selektivno prigušuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja, odnosno njezinu valnu duljinu.

Apsorpciju dijelimo na atomsku i molekulsku, a osnovna razlika je u spektrima koji ih karakteriziraju. Apsorpcijski spektar je grafički prikaz slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. Vertikalna os takvog prikaza može biti transmitancija izražena u postotcima ili apsorbancija. Atomska apsorpcija karakterizirana je linijskim spektrima gdje atomi u slobodnom stanju emitiraju elektromagnetsko zračenje točno određene valne duljine. Molekule apsorbiraju elektromagnetsko zračenje bliskih valnih duljina, stoga se njihovo zračenje prikazuje vrpčastim spektrom u kojem svaka vrpca označava blisku valjnu duljinu [24].

Do apsorpcije može doći jedino ukoliko je energija fotona jednaka razlici između osnovnog, najnižeg energijskog stanja, i nekog od viših energijskih stanja čestice. Osim osnovnog i pobuđenih stanja na vrpčastim spektrima postoje i vibracijsko, translacijsko i rotacijsko stanje. Kada molekula primi energiju fotona prelazi u pobuđeno, više energijsko stanje gdje se zadrži kratak vremenski period (10^{-6} do 10^{-9} s). Prilikom relaksacije do prethodnog ili osnovnog stanja višak energije u obliku toplinske energije ili elektromagnetskog zračenja prenosi drugim molekulama u okolini. Otpuštena toplinska energija najčešće je toliko mala da se ne može ni detektirati [24].

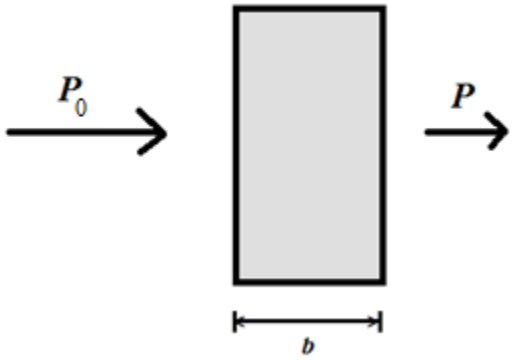
Količina apsorbirane svjetlosti ovisi o koncentraciji analita u uzorku. Što je veća koncentracija, uzorak će apsorbirati više energije i biti intenzivnije obojan [22].

3.3.2. Transmitancija

Transmitancija T je dio upadnog zračenja koji prođe kroz otopinu, i najčešće se izražava postotcima:

$$T = \frac{P}{P_0} \tag{8}$$

U izrazu (8) P predstavlja snagu zračenja nakon prolaska kroz medij, a P_0 snagu zračenja koja pada na apsorbirajući medij.



Slika 3.5. Apsorpcija elektromagnetskog zračenja. Na slici je snaga ulaznog zračenja označena s P_0 a izlazna, nakon prolaska apsorbirajućeg medija s P. Duljina puta, odnosno širina medija označena je slovom b.

Snaga zračenja (P) predstavlja energiju zračenja koja u jednoj sekundi pada na jedan cm^2 površine detektora. Prolaskom kroz medij debljine b i koncentracije c snaga zračenja se smanjuje ($P < P_0$) kao posljedica međudjelovanja fotona i apsorpcije [30].

3.3.3. Apsorbancija

Apsorbancija predstavlja logaritam omjera ulazne i prolazne snage elektromagnetskog zračenja i bezdimenzijska je veličina:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T \tag{9}$$

Kao što je vidljivo iz jednadžbe (9) prigušenjem snopa elektromagnetskog zračenja apsorbancija se, suprotno transmitanciji, povećava.

3.3.4. Lambert-Beerov zakon

Temelje Lambert-Beerovog zakona postavio je Lambert tezom koju je opisao u knjizi *Photometria*, koja kaže da je količina svjetlosti koju otopina apsorbira proporcionalna njenoj debljini (Lambertov zakon). Lambertov zakon nadopunio je 1852. godine Beer pretpostavkom da je apsorpcija proporcionalna množinskoj koncentraciji otopljene tvari. Navedeno je definirao provodeći eksperimente sa crvenim svjetlom i otopinama različitih soli. Primjetio je kako intenzitet transmitiranog svjetla eksponencijalno pada s duljinom optičkog puta i koncentracijom otopine [22].

Kombinacijom Lambertovog i Beerovog zakona dobivene su osnovne pretpostavke za razvoj analitičkih metoda spektrofotometrije i kolorimetrije.

Lambert-Beerov zakon može se iskazati sljedećom jednadžbom:

$$A = a \cdot b \cdot c \tag{10}$$

gdje je A apsorbancija, a konstanta proporcionalnosti (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta izražena u cm, i c koncentracija izražena u g L^{-1} [22].

Kada je koncentracija u jednadžbi (10) izražena u mol L^{-1}, a debljina sloja u cm i budući da je apsorbancija bezdimenzijska veličina dobijemo konstantu proporcionalnosti ε izraženu u L cm^{-1} mol^{-1} (molarni apsorpcijski koeficijent):

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \tag{11}$$

Molarna apsorptivnost definira se kao broj litara u kojim treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbancija bila 1 kada je duljina optičkog puta 1 cm.

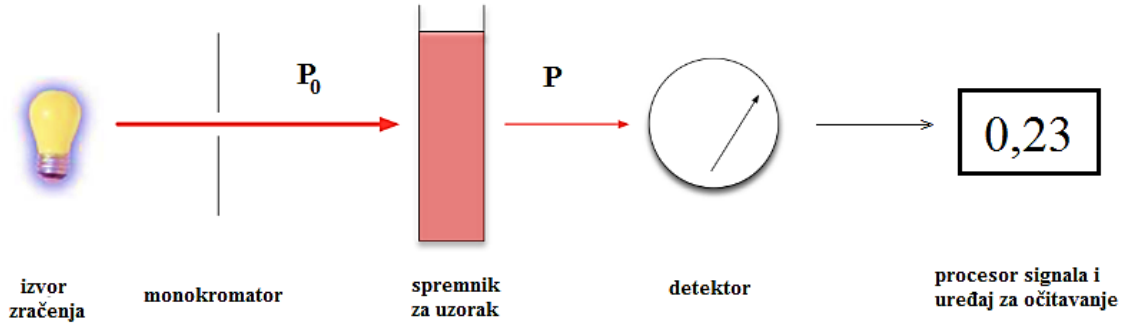
Lambert-Beerov zakon moguće je primjeniti i na otopinu koja sadržava više tvari koje apsorbiraju. U tom slučaju, uz pretpostavku da komponente međusobno ne reagiraju, poprima izraz:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \ldots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b_1 \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b_2 \cdot c_2 + \ldots + \varepsilon_n \cdot b_n \cdot c_n \tag{12}$$

gdje indeks n označuje broj komponenti koje apsorbiraju [22].

3.3.5. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji

Spektrofotometar je uređaj opremljen s monokromatorom ili polikromatorom, fotodetektorom i elektroničkim očitanjem koji pokazuje vrijednost proporcionalnu intenzitetu izolirane vrpce ili valne duljine. Osnovni dijelovi većine spektrometara su: izvor kontinuiranog zračenja, monokromator, spremnik za uzorke, detektor ili uređaj koji pretvara energiju zračenja u mjerljivi signal i uređaj koji očitava signal detektora.



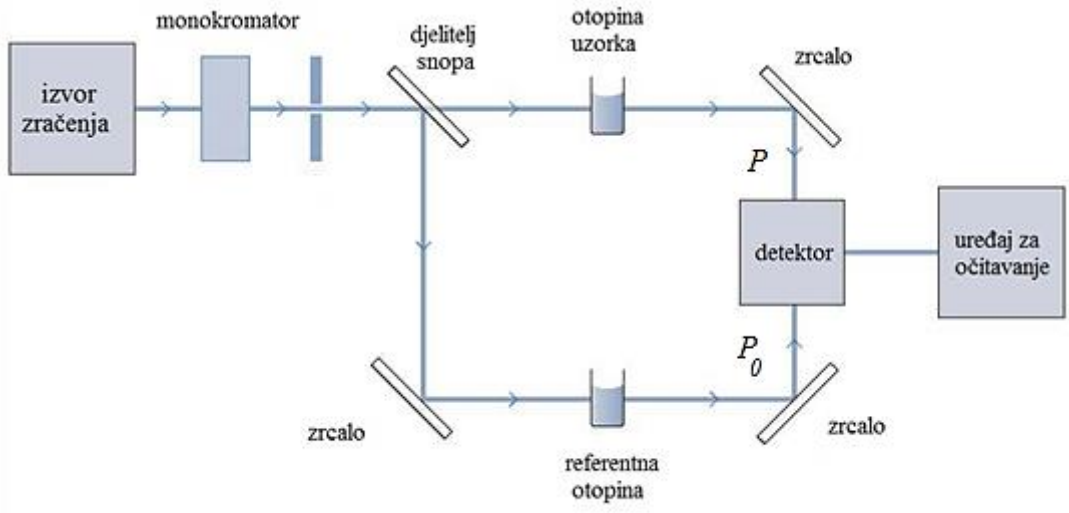
Slika 3.6. Shematski prikaz dijelova instrumenta za optičku spektroskopiju

Izvor zračenja treba biti stabilan, konstantan i dovoljno snažan kako bi se jednostavno detektirao i mjerio. Kako ni jedan izvor ne zrači dovoljno širok spektar da se pokrije i ultraljubičasto i infracrveno i vidljivo zračenje, izvori zračenja se razlikuju. Za emitiranje ultraljubičastog zračenja valne duljine od 160 nm do 380 nm koriste se vodikove i deuterijeve žarulje, a za vidljivo i infracrveno zračenje valne duljine od 240 nm do 2500 nm koriste se volfram/halogene žarulje [22].

Monokromator je uređaj sastavljen od leća i ogledala koji izdvajaju elektromagnetsko zračenje određene valne duljine. Kao monokromator koriste se optička prizma, povoljnija za izdvajanje elektromagnetskog zračenja kraće valne duljine, te optička rešetka koja se može koristiti u svim dijelovima spektra i različiti optički filteri.

Spremnici za uzorke (ili kivete) moraju biti transparentni za prolazak zračenja i najčešće su široki 1 cm. Kivete za mjerenje u ultraljubičastom spektru načinjene su od kvarca dok se za mjerenja u vidljivom spektru mogu koristiti i plastične i kivete od silikatnog stakla. Prije mjerenja važno je ukloniti sve nečistoće, masti i otiske prstiju sa prozirnog dijela kivete.

Suvremeni spektrofotometri temelje se na radu s dva snopa zračenja koja nastaju pomoću zrcala koje se naziva djelitelj snopa. Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu, a drugi kroz otopinu uzorka prema detektoru. Omjer izlaznih signala (P/P_0), ili logaritam omjera, određuje se elektronički i prikazuje na uređaju za očitavanje (slika 3.7.) [22].



Slika 3.7. Shematski prikaz dvosnopnog spektrofotometra

3.4. Ostali uređaji i oprema

pH vrijednost otopina podešavana je korištenjem milivoltmetra Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljenim staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®.



Slika 3.8. Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljenim staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab®

Eppendorf mikropipete s ručnim držačem, *Nichiryo* (Nichiryo, Tokyo, Japan) korištene su za dodavanje izrazito malih, mikrolitarskih volumena za pripravljanje otopina analita, reagensa i interferencija.



Slika 3.9. Mikropipete Eppendorf s ručnim držačem za dodavanje volumena od 10 do 100 μL (žuta) i 100 do 1000 μL (plava)

4. Rezultati

4. Rezultati

4.1. Predložena kemijska reakcija

Predložena metoda slijedne analize injektiranjem sa spektrofotometrijskim detektorom zasniva se na redoks reakciji u kojoj L-cistein (reducens) reducira zeleno obojani $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kompleks u žuto obojani $[Cu(Nc)_2]^{+}$ kompleks:

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

ZELENO ŽUTO

Nastali kompleks $[Cu(Nc)_2]^{+}$ ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini λ = 458 nm, dok oksidirani oblik kompleksa, $[Cu(Nc)_2]^{2+}$, ne apsorbira pri istoj valnoj duljini.

Prethodno optimizirani kemijski parametri predložene redoks-reakcije, provjereni su na SIA sustavu i korišteni za sva mjerenja.

Tablica 4.1. Prikaz optimalnih parametara

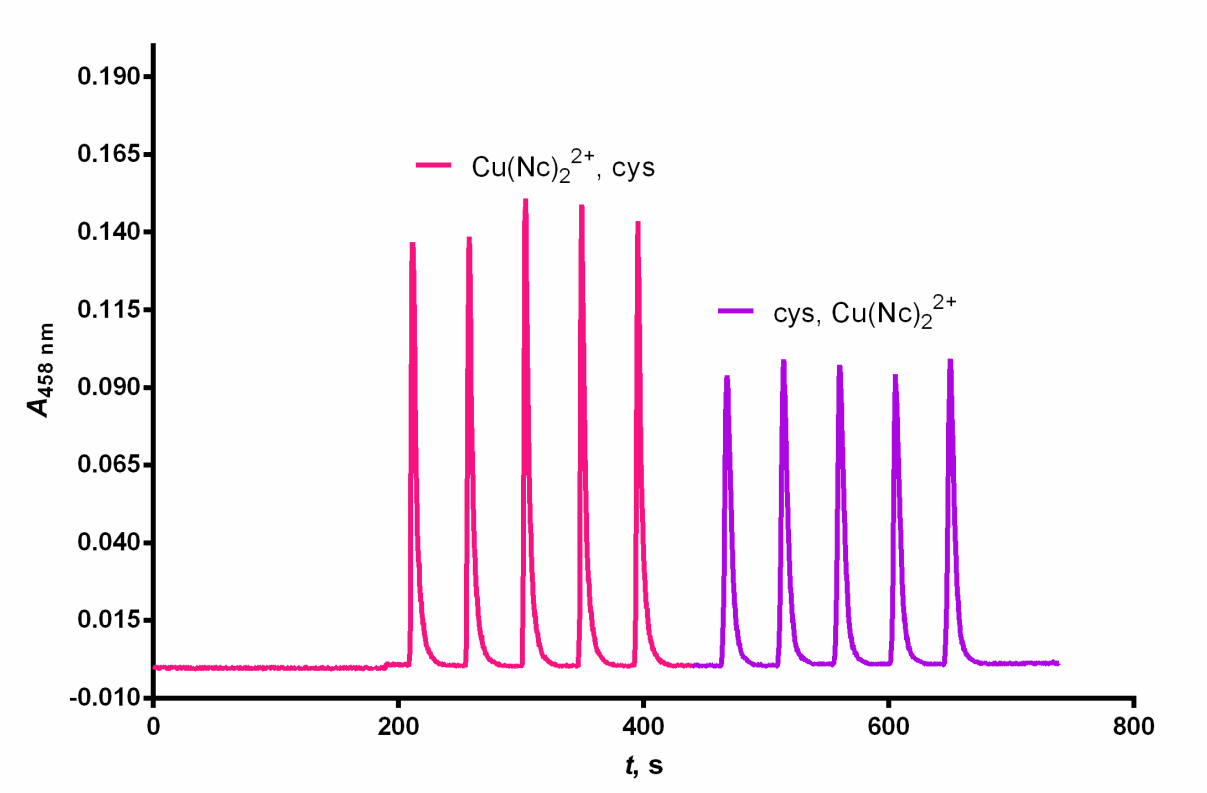
λ, nm	458
pH	3
T, °C	25
$c([Cu(Nc)_2]^{2+})$, mol L^{-1}	$1{,}0 \times 10^{-3}$

4.2. Optimizacija sustava

Sustav za slijednu analizu injektiranjem optimiziran je univarijantnom metodom. Univarijantna metoda predstavlja optimizaciju nasumično odabranog parametra, čija se vrijednost mijenja dok drugi parametri ostaju konstantni. Nakon što je optimiziran odabrani parametar zadržava se njegova optimalna vrijednost konstantnom kroz sva mjerenja. Na isti način optimiziraju se svi ostali parametri metode [31]. U protočnim sustavima optimizira se volumen injektiranog uzorka, volumen reagensa, duljina petlje zadržavanja i reakcijske petlje, protok i redoslijed injektiranja, sve s ciljem postizanja što veće osjetljivosti metode i učestalosti analiza.

4.3. Optimizacija redoslijeda injektiranja

Različitim slijedom injektiranja reagensa i analita optimiziran je redoslijed injektiranja. Prvo je ispitan slijed reagens-analit, a zatim analit-reagens. Povoljniji način injektiranja određen je analizom pikova koji predstavljaju vrijednost apsorbancije.



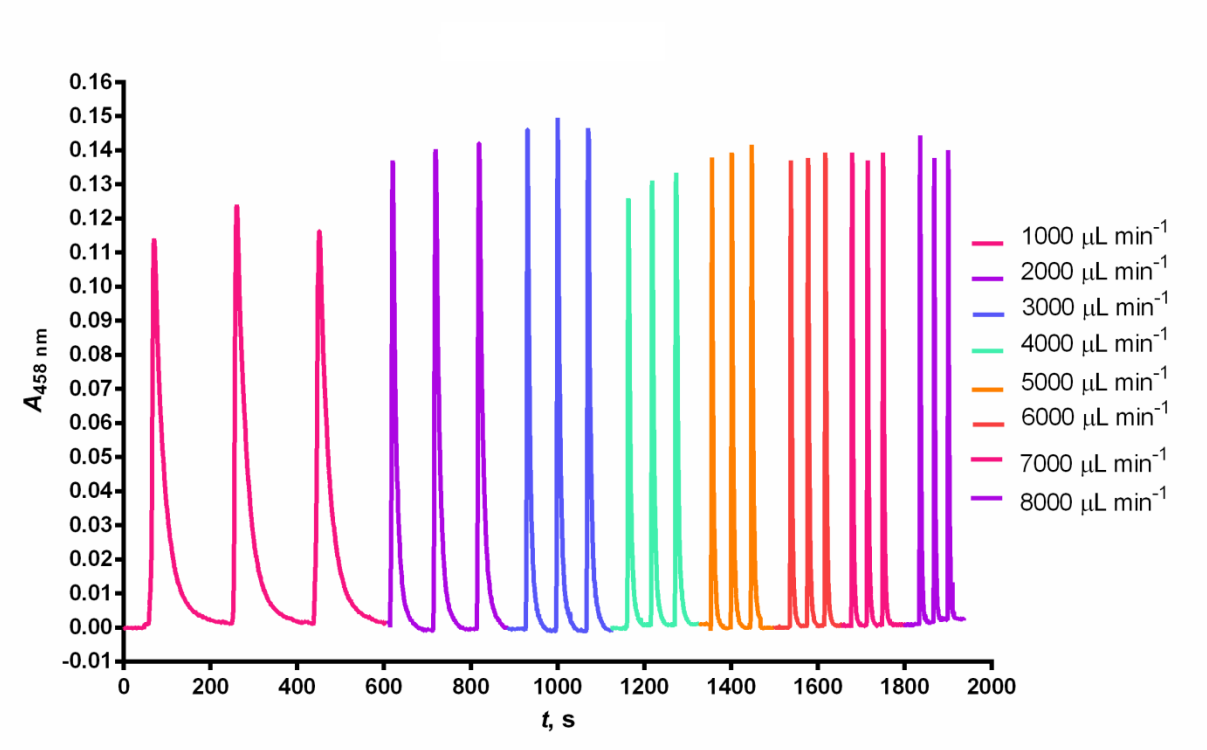
Slika 4.1. Siagram utjecaja redoslijeda injektiranja otopina $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ (reagens) i cisteina (analit) na signal u petlji zadržavanja. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; brzina protoka = 5000 μL min^{-1}; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja cisteina = 200 μL i volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm.

Na slici 4.1. slovom „a“ označen je redoslijed injektiranja reagensa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$, zatim cisteina u petlju zadržavanja, a slovom „b“ označeni su pikovi koji su zabilježeni injektiranjem cisteina, a potom reagensa $[Cu(Nc)_2]^{2+}$. Analizom visine pikova i njihove ponovljivosti vidljivo je kako je prvi slijed injektiranja optimalniji te je u sljedećim optimizacijama korišten redoslijed reagens-analit.

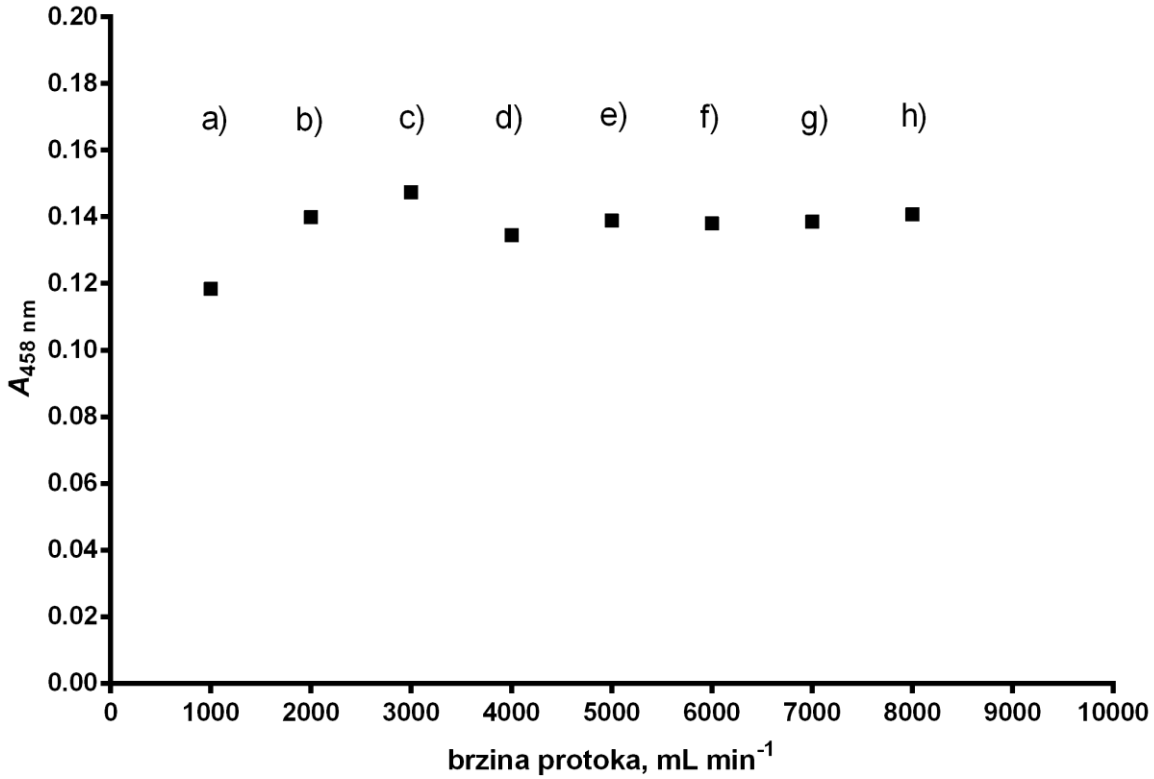
4.4. Optimizacija brzine protoka

Optimizacijom brzine protoka optimizira se učestalost analiza, odnosno broj analiza koje je moguće provesti u određenom vremenu. Podešavanjem brzine protoka može se poboljšati osjetljivost metode kontrolirajući raspršenje.

Brzina se optimizira mijenjanjem vrijednosti brzine protoka od 1000 μL min^{-1} do 8000 μL min^{-1} te analiziranjem dobivenih pikova.



Slika 4.2. Siagram utjecaja brzine protoka na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = $4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = $1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja cisteina = 200 μL i volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm; brzina protoka: a) = 1000 μL min^{-1}, b) = 2000 μL min^{-1}, c) = 3000 μL min^{-1}, d) = 4000 μL min^{-1}, e) = 5000 μL min^{-1}, f) = 6000 μL min^{-1}, g) = 7000 μL min^{-1}, h) = 8000 μL min^{-1}.



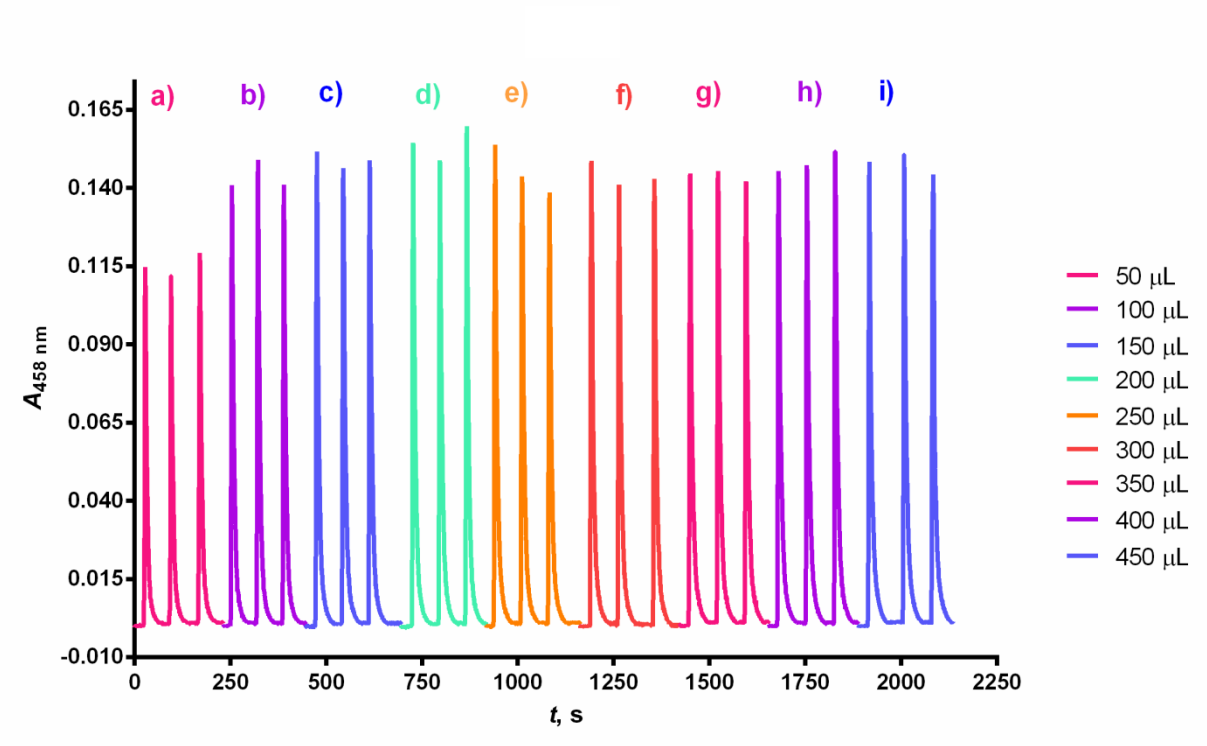
Slika 4.3. Graf ovisnosti apsorbancije o brzini protoka

Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja cisteina = 200 μL i volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm; brzina protoka: a) = 1000 μL min^{-1}, b) = 2000 μL min^{-1}, c) = 3000 μL min^{-1}, d) = 4000 μL min^{-1}, e) = 5000 μL min^{-1}, f) = 6000 μL min^{-1}, g) = 7000 μL min^{-1}, h) = 8000 μL min^{-1}.

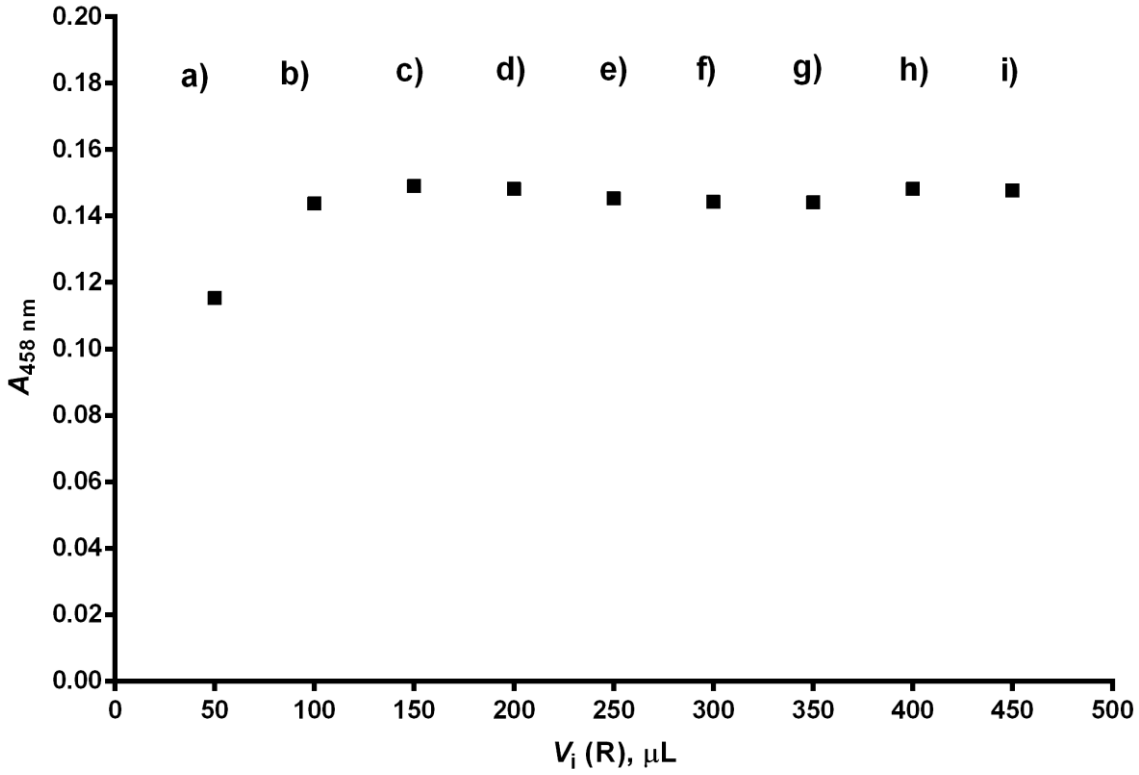
Na slikama 4.2. i 4.3. vidljivo je kako je maksimalna apsorbancija i najbolja ponovljivost zabilježena pri brzini protoka 3000 μL min^{-1} (pikovi označeni slovom „c“). Pri brzinama manjim od optimalne (manje od 3000 μL min^{-1}) zabilježeni pikovi su šire osnovice i manje visine, dok se pri brzinama većim od optimalne vrijednost apsorbancije i širina osnovice pikova smanjuje, te povrat na baznu liniju nije potpun. Uzrok promjenama vrijednosti apsorbancije i oblika pika pri većim brzinama je smanjenje raspršenja zone analita i reagensa.

4.5. Optimizacija volumena injektiranja reagensa

Utjecaj volumena injektiranog reagensa na osjetljivost metode ispitana je za koncentraciju $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Injektiranjem različitih vrijednosti volumena reagensa (od 50 μL do 450 μL) pri konstatnom volumenu analita od 200 μL koncentracije $c(\text{cys}) = 4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}, te analizom dobivenih rezultata određen je optimalan volumen injektiranja.



Slika 4.4. Siagram optimizacije volumena injektiranja reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{cys}) = 4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja cisteina = 200 μL ; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$: 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.

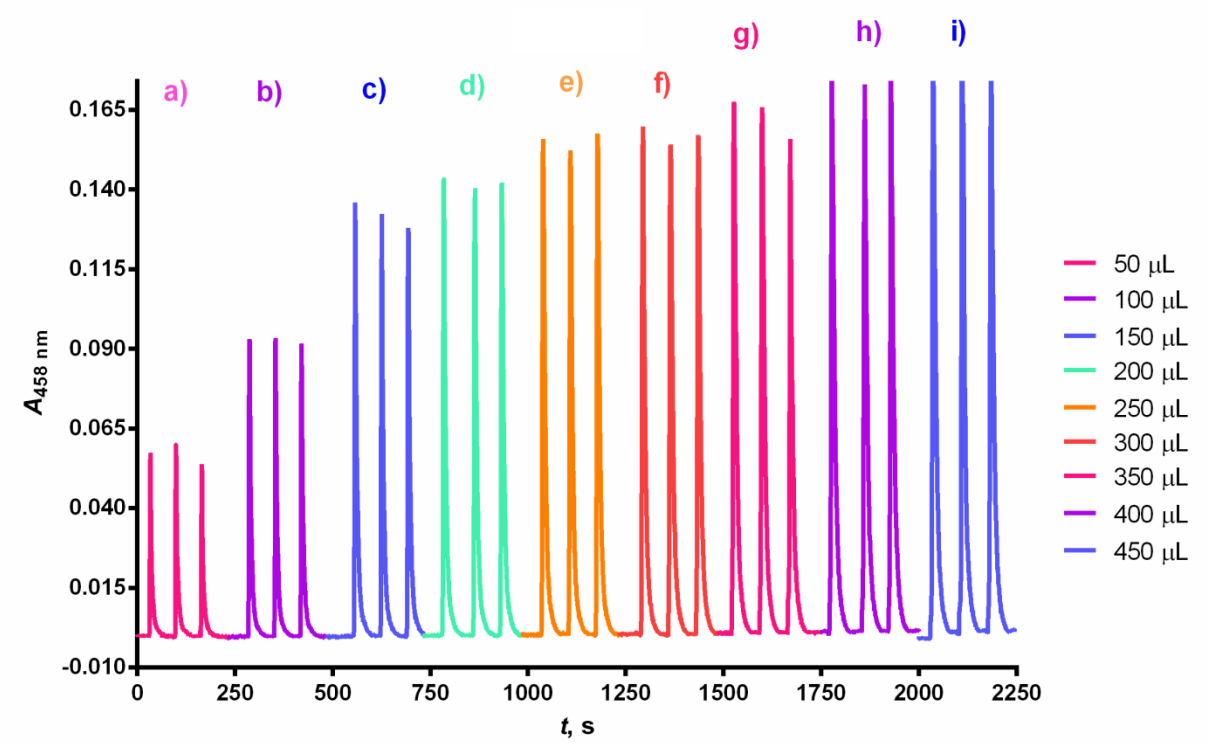


Slika 4.5. Graf vrijednosti apsorbancije ovisno o injektiranom volumenu reagensa. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 ×10^{-5} mol L^{-1}; c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja cisteina = 200 μL ; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$: 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.

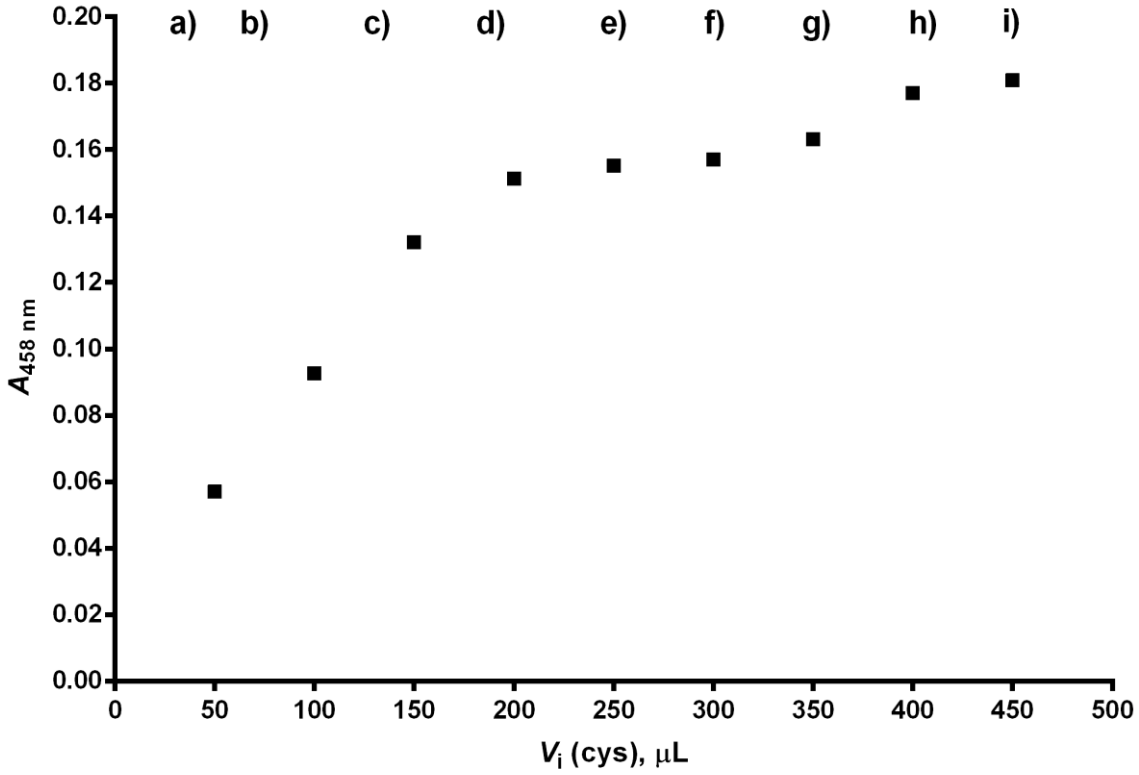
Iz slike 4.4. i slike 4.5. vidljivo je da vrijednost apsorbancije dostiže maksimalnu vrijednosti za volumen reagensa od 150 μL (na siagramu i grafu označeni slovom „c“). Daljnjim povećanjem volumena te vrijednosti su jednake ili nešto niže kao posljedica nemogućnosti potpunog raspršenja zone uzorka i zone reagensa. Volumen od 150 μL odabran je kao konstantna vrijednost za sljedeće korake optimizacije zbog ekonomičnih razloga manjeg utroška reagensa i smanjenja otpada reakcije.

4.6. Optimizacija volumena injektiranja analita

Utjecaj volumena injektiranja analita na osjetljivost metode ispitan je za koncentraciju cisteina c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}. U sustav su injektirani različiti volumeni cisteina (od 50 μL do 450 μL) te prethodno optimiziran volumen reagensa 150 μL koncentracije $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}.



Slika 4.6. Siagram optimizacije volumena injektiranja analita. Eksperimentalni uvjeti: Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; volumen injektiranja cisteina: 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.

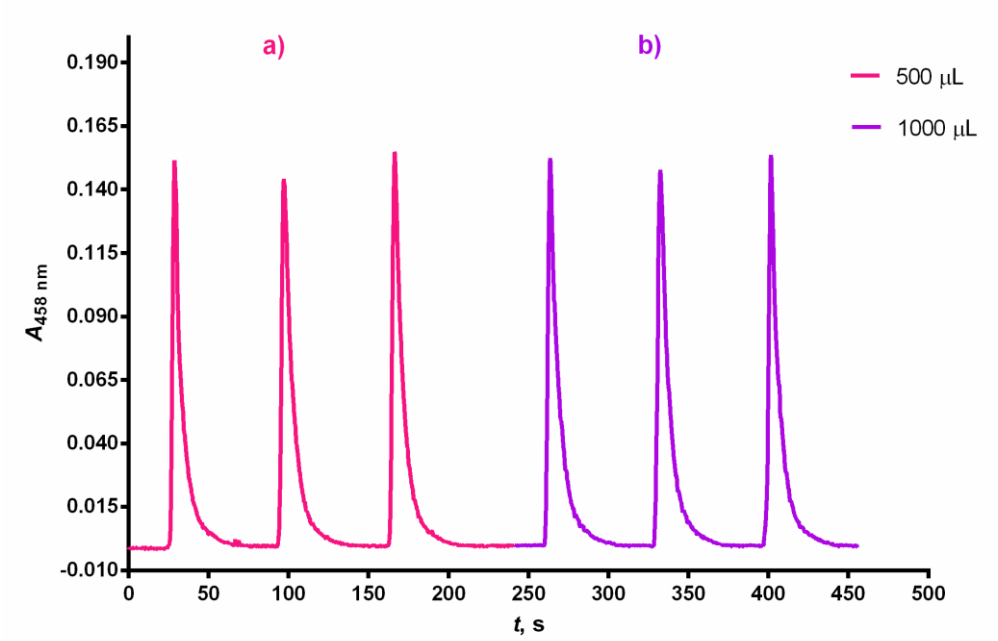


Slika 4.7. Graf utjecaja volumena injektiranja cisteina na osjetljivost metode. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 ×10^{-5} mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; volumen injektiranja cisteina: 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.

Iz dobivenih rezultata (slika 4.6. i slika 4.7.) vidljivo je da se povećanjem volumena injektiranja analita povećava i zabilježeni signal jer reagensa ima u dovoljnoj količini da se odvije kemijska reakcija. Signal prestaje značajnije rasti nakon injektiranog volumena od 200 μL (označen slovom „d“) te je taj volumen određen kao optimalan i korišten u daljnjim optimizacijama. Volumeni analita veći od 200 μL izazivaju zasićenje u predloženoj metodi.

4.7. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

Utjecaj volumena petlje zadržavanja na osjetljivost metode ispitan je korištenjem otopine cisteina koncentracije $c(\text{cys}) = 4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} i otopine neokuproin bakrovog(II) kompleksa koncentracije $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Optimizacija je provedena s dvjema različitim petljama zadržavanja volumena 500 μL i 1000 μL, te je analizom siagrama odabran optimalan parametar.

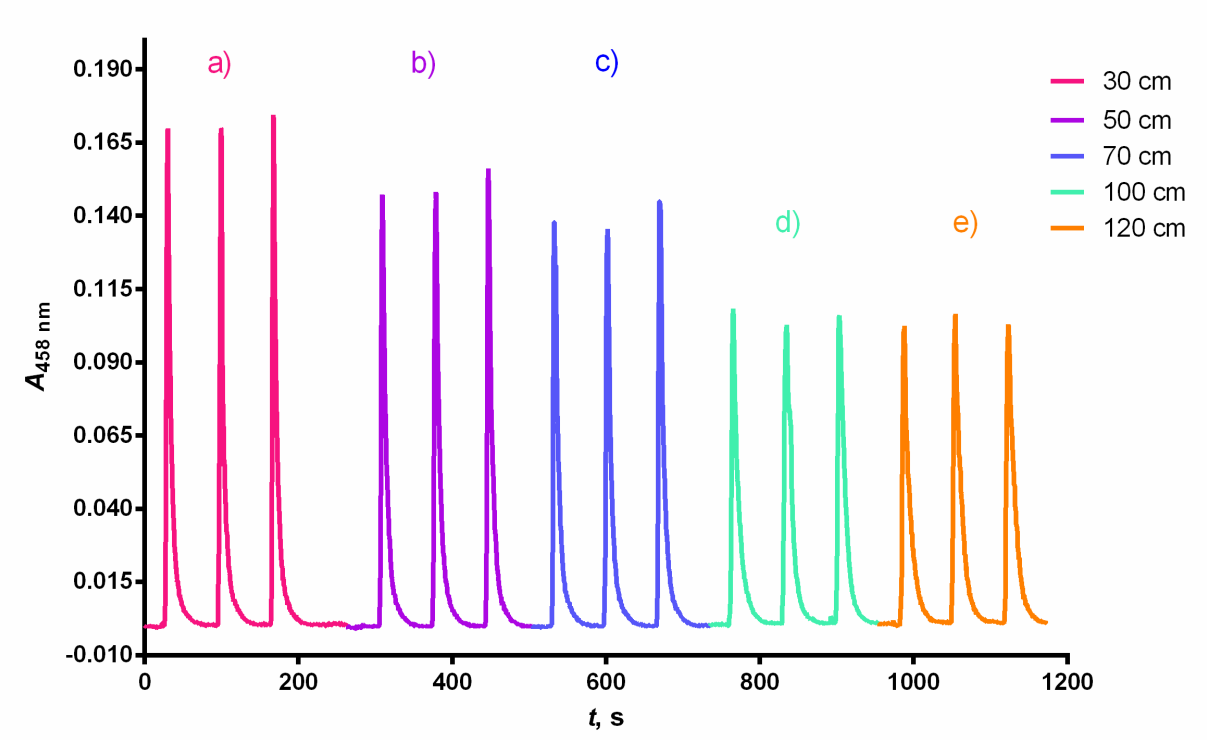


Slika 4.8. Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja na osjetljivost metode. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{cys}) = 4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; reakcijska petlja duljine 70 cm; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}. Slovom „a“ označeni su pikovi dobiveni korištenjem petlje zadržavanja volumena 500 μL, a slovom „b“ petlje zadržavanja volumena 1000 μL.

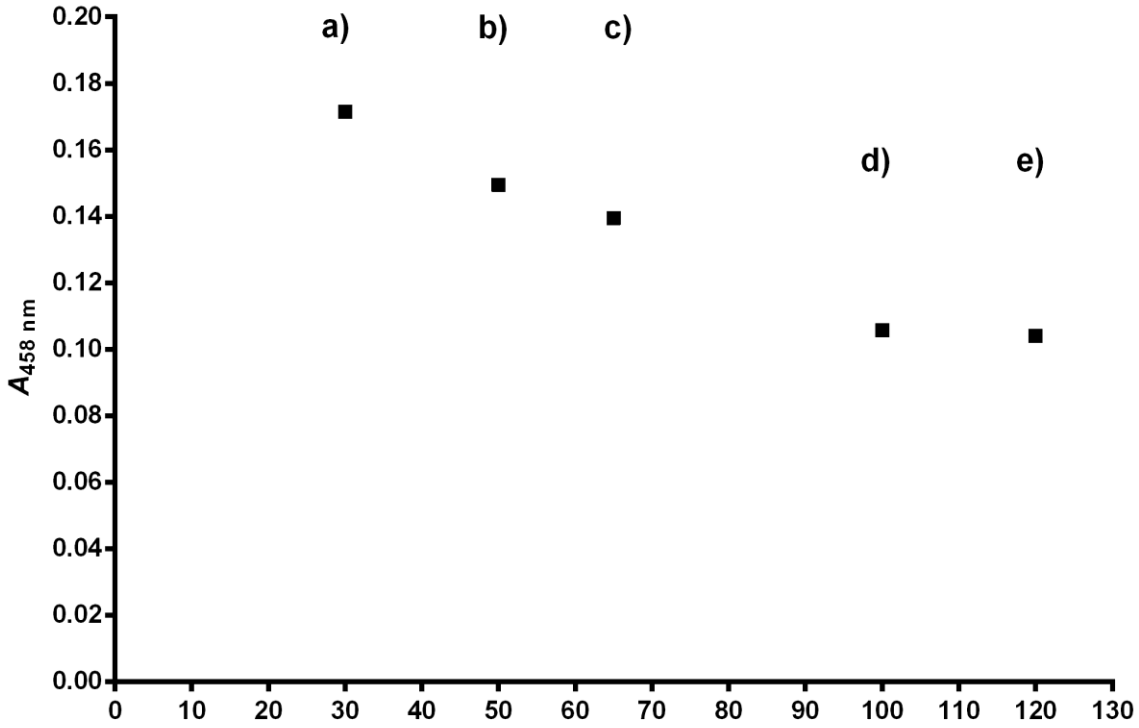
Analizom rezultata utvrđeno je kako se vrijednosti apsorbancije u oba slučaja neznatno razlikuju što ukazuje na to da je reakcija dovoljno brza i potpuna u oba slučaja. Petlja zadržavanja volumena 500 μL (200 μL analita i 150 μL reagensa) odabrana je kao optimalna jer je dovoljno dugačka da se reakcija odvije do kraja, a manji volumen omogućava da formiranoj zoni produkta brži dolazak do detektora.

4.8. Optimizacija volumena (duljine) reakcijske petlje

Utjecaj volumena reakcijske petlje na osjetljivost metode ispitivan je korištenjem otopine cisteina koncentracije c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1} i otopine neokuproin bakrovog(II) kompleksa koncentracije $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}. Korištene su reakcijske petlje različitih duljina u rasponu od 30 cm do 120 cm te je analizom dobivenih rezultata utvrđena optimalna duljina.



Slika 4.9. Siagram utjecaja duljine reakcijske petlje na osjetljivost reakcije. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 500 μL; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}. Slovima su označeni pikovi dobiveni korištenjem različitih duljina reakcijske petlje. Na slici pikovi označeni slovom „a“ predstavljaju rezultate dobivene korištenjem reakcijske petlje duljine 30 cm, „b“ - 50 cm, „c“ - 70 cm, „d“ - 100cm i „e“ -120 cm.

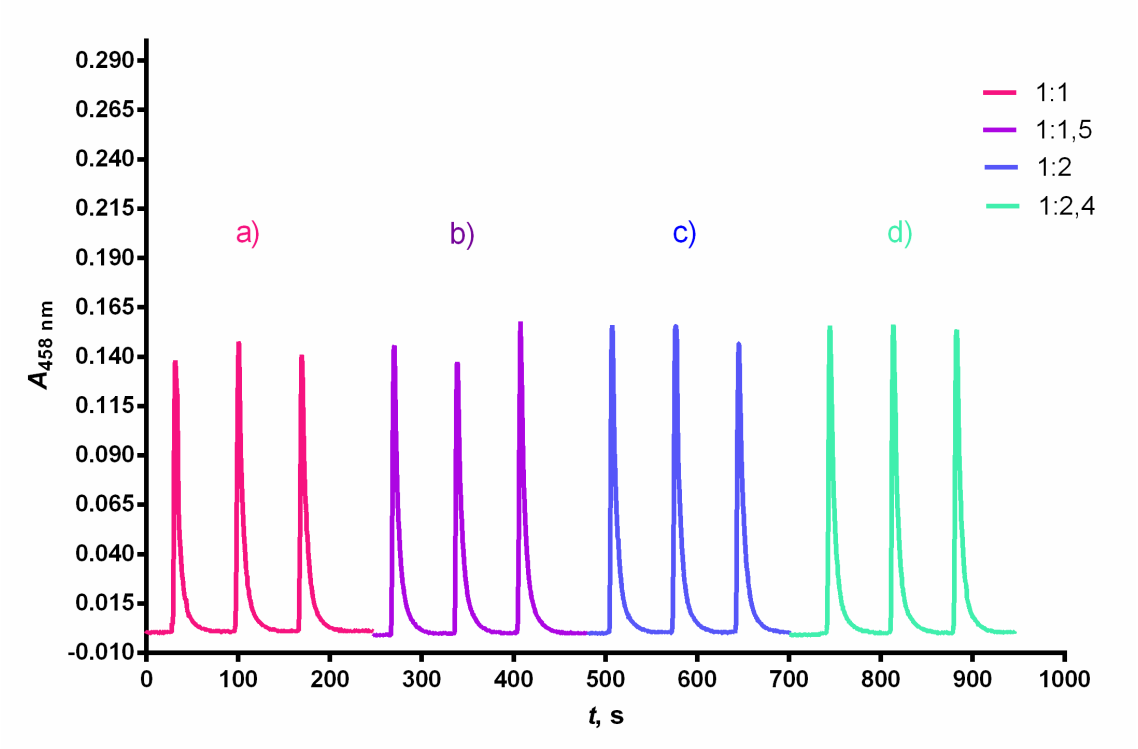


Slika 4.10. Graf utjecaja duljine reakcijske petlje na osjetljivost reakcije. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; c([$Cu(Nc)_2$]$^{2+}$) = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 500 μL; volumen injektiranja [$Cu(Nc)_2$]$^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}. Slovima su označeni pikovi dobiveni korištenjem različitih duljina reakcijske petlje. Na slici pikovi označeni slovom „a“ predstavljaju rezultate dobivene korištenjem reakcijske petlje duljine 30 cm, „b“ - 50 cm, „c“ - 70 cm, „d“ - 100cm i „e“ -120 cm.

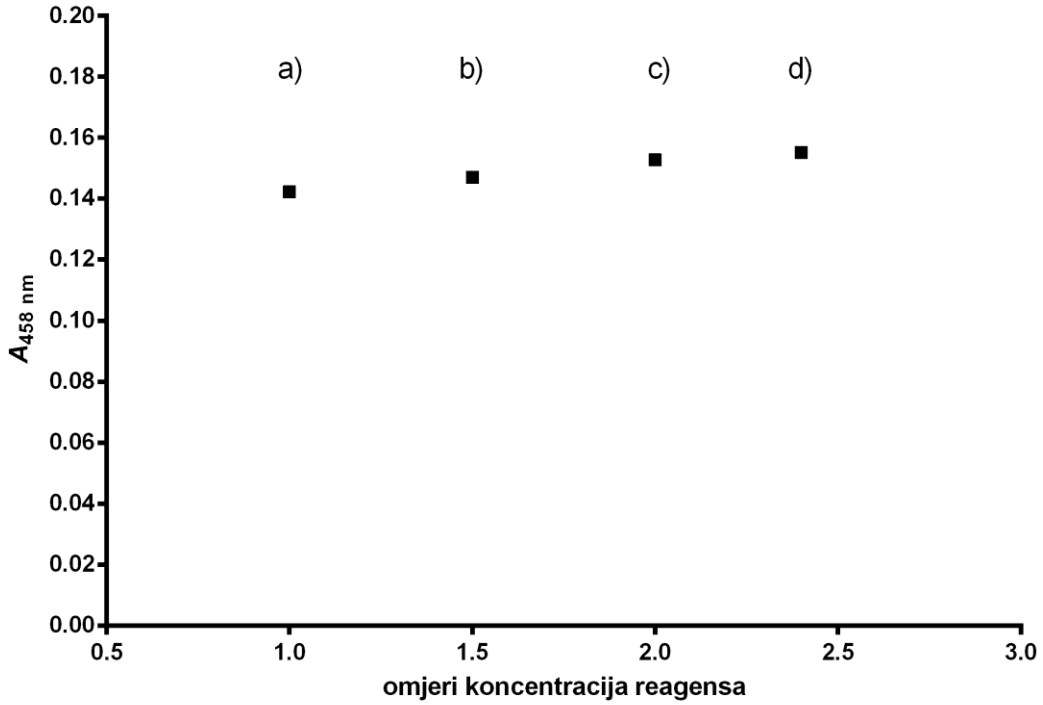
Na slikama 4.9. i 4.10. vidljivo je kako su u slučaju „a“ zabilježeni najviši pikovi, ali zbog osiguravanja dovoljno vremena za odvijanje reakcije odabrana je rekcijska petlja duljine 50 cm. Pikovi zabilježeni korištenjem reakcijske petlje duge 50 cm najboljeg su odnosa ponovljivosti i visine pika (na slici 4.9. označeni slovom „b“). Pri većim duljinama dolazi do opadanja visine signala zbog povećanog raspršenja zone uzorka.

4.9. Optimizacija omjera reagensa

U posljednjem koraku razvoja metode cilj je bio provjeriti i potvrditi najpovoljniji omjer bakar(II) sulfat-pentahidrata i neokuproin hidrata. Koncentracija Cu(II) bila je konstantna, dok se koncentracija neokuproin hidrata postupno povećavala.



Slika 4.11. Siagram utjecaja omjera reagensa na signal. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 500 μL; volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}, volumen reakcijske petlje = 50 cm. Slovima „a“ do „d“ označeni su pikovi dobiveni za različite omjere bakra(II) i neokuproina. „a“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 1; „b“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 1,5; „c“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 2; „d“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 2,4.



Slika 4.12 Grafički prikaz utjecaja omjera reagensa na apsorbanciju. Eksperimentalni uvjeti: c(cys) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}; c([Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$) = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}, pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 500 μL; volumen injektiranja [Cu(Nc)$_2$]$^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}, volumen reakcijske petlje = 50 cm. Slovima „a“ do „d“ označene su srednje vrijednosti apsorbancije dobivene za različite omjere bakra(II) i neokuproina. „a“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 1; „b“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 1,5; „c“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 2; „d“ – Cu^{2+} : Nc = 1 : 2,4.

Analizom dobivenih rezultata vidljivo je kako su za omjer bakar(II) : neokuproin = 1 : 2,4 (na slikama 4.11. i 4.12. označen slovima „d“) zabilježeni najviši signali dobre ponovljivosti, te je potvrđen kao optimalan.

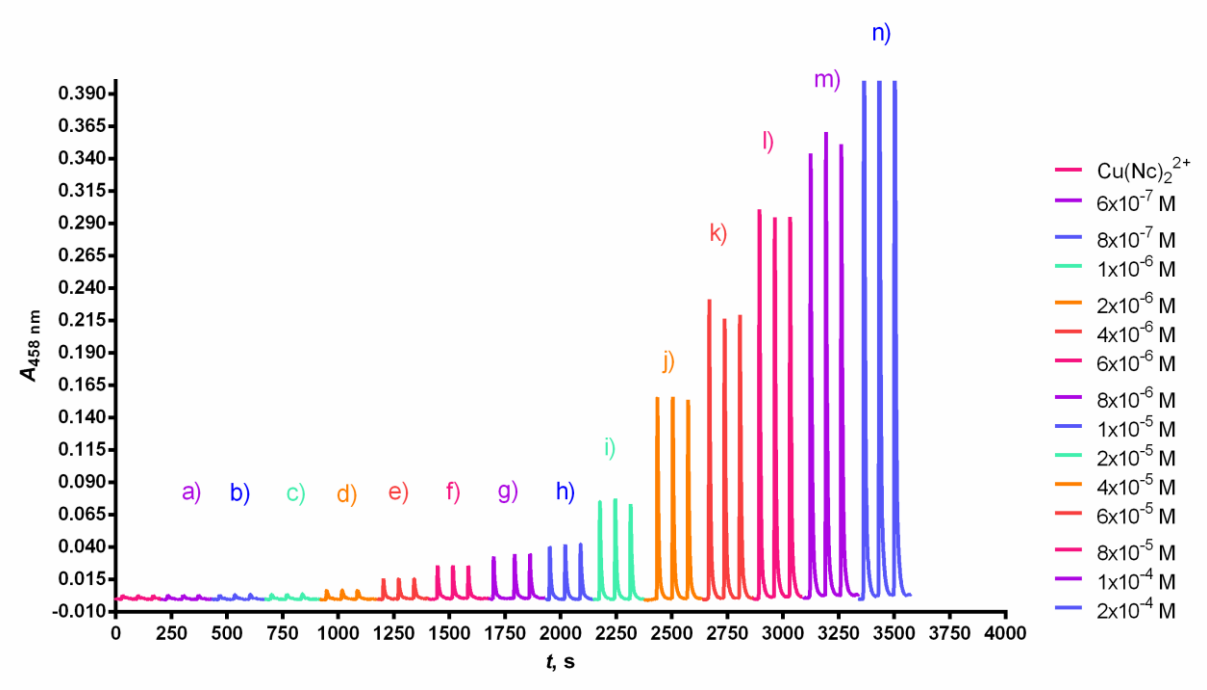
4.10. Odabrani optimalni parametri

Tablica 4.2. Tablica prikaza prethodno optimiziranih parametara za određivanje cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor

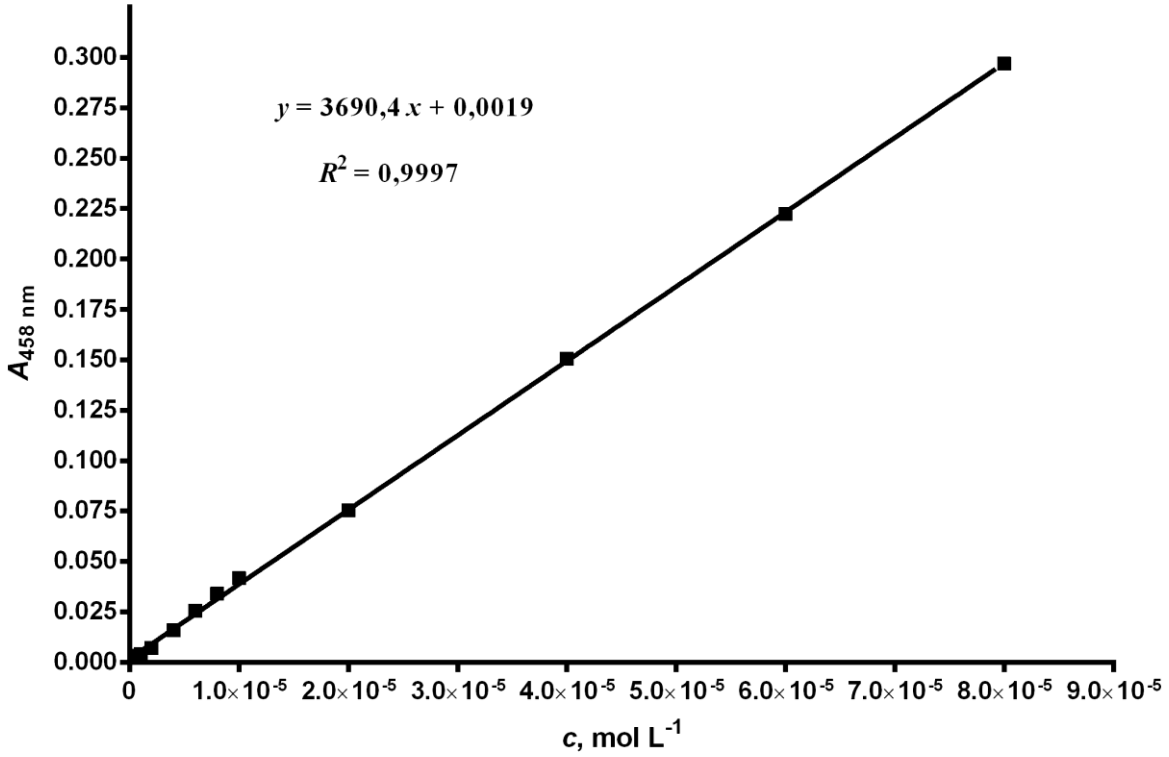
Parametar	Ispitivano područje	Optimalan uvjet
Redoslijed injektiranja	a) $[Cu(Nc)_2]^{2+}$, cys b) Cys, $[Cu(Nc)_2]^{2+}$	$[Cu(Nc)_2]^{2+}$, cys
Brzina protoka, μL min^{-1}	1000 – 8000	3000
Volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$, μL	50 – 450	150
Volumen injektiranja cisteina, μL	50 – 450	200
Volumen petlje zadržavanja, μL	500, 1000	500
Volumen (duljina) reakcijske petlje, cm	30 – 120	50
Omjer koncentracije reagensa	1 : 1 – 1 : 2,4	1 : 2,4

4.11. Linearno dinamičko područje (LDP)

Linearno dinamičko područje je područje koncentracija u kojem porastom koncentracije linearno raste i signal. LDP grafički se prikazuje pravcem umjeravanja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji analita. Krivulja umjeravanja za određivanje cisteina mjerena je za koncentracije cisteina od $2{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} do $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}.



Slika 4.13. Siagram spektrofotometrijskog određivanja različitih koncentracija cisteina. Eksperimentalni uvjeti: $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0$ x 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 µL; petlja zadržavanja od 500 µL; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 µL; volumen injektiranja cisteina = 200 µL; volumen osnovne otopine = 3000 µL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 µL min^{-1}; duljina reakcijske petlje = 50 cm. Na slici su slovima „a“ do „n“ označene izmjerene apsorbancije za različite koncentracije cisteina. Slovo „a“ predstavlja koncentraciju cisteina $c(cys) = 6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}, „b“ - $c(cys) = 8{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} , „c“ - $c(cys) = 1{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , „d“ - $c(cys) = 2{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , „e“ - $c(cys) = 4{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , „f“ - $c(cys) = 6{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , „g“ - $c(cys) = 8{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , „h“ - $c(cys) = 1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , „i“ - $c(cys) = 2{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , „j“ - $c(cys) = 4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , „k“ - $c(cys) = 6{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , „l“ - $c(cys) = 8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , „m“ - $c(cys) = 1{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , „n“ - $c(cys) = 2{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}.



Slika 4.14. Pravac umjeravanja za određivanje cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotmetrijski detektor. Eksperimentalni uvjeti: $c([Cu(Nc)_2]^{2+}) = 1{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; duljina reakcijske petlje = 50 cm. Na slici su slovima „a“ do „n“ označene izmjerene apsorbancije za različite koncentracije cisteina. Koncentracije cisteina: $c(cys) = 6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} do $8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}.

Na slici 4.12. prikazani su rezultati dobiveni linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije cisteina. Za 12 vrijednosti koncentracije (od „a“ do „l“) utvrđena je linearna ovisnosti apsorbancije o koncentraciji i dobivena je jednadžba y = 3690,4 x + 0,0019 (13) koja opisuje LDP područje, s koeficijentom linearne regresije R^2 = 0,9997. U jednadžbi (13) y predstavlja vrijednost apsorbancije, a x koncentraciju cisteina izraženu u mol L^{-1}.

4.12. Granica dokazivanja, granica određivanja i ponovljivost signala

Granica dokazivanja je najniža koncentracija analita čije se prisustvo može dokazati određenom tehnikom ili metodom i pri toj koncentraciji signal je trostruko veći od šuma. Računa se prema formuli:

$$D_{\mathrm{L}} = \frac{3 \times s_{\mathrm{b}}}{m} \tag{14}$$

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

Granica određivanja je najniža koncentracija analita koja se može kvantitativno odrediti primjenom određene tehnike ili metode. Predstavlja donju granicu linearnog dinamičkog područja, te je za tu koncentraciju signal desetorostruko veći od šuma. Računa se prema formuli:

$$Q_{\mathrm{L}} = \frac{10 \times s_{\mathrm{b}}}{m} \tag{15}$$

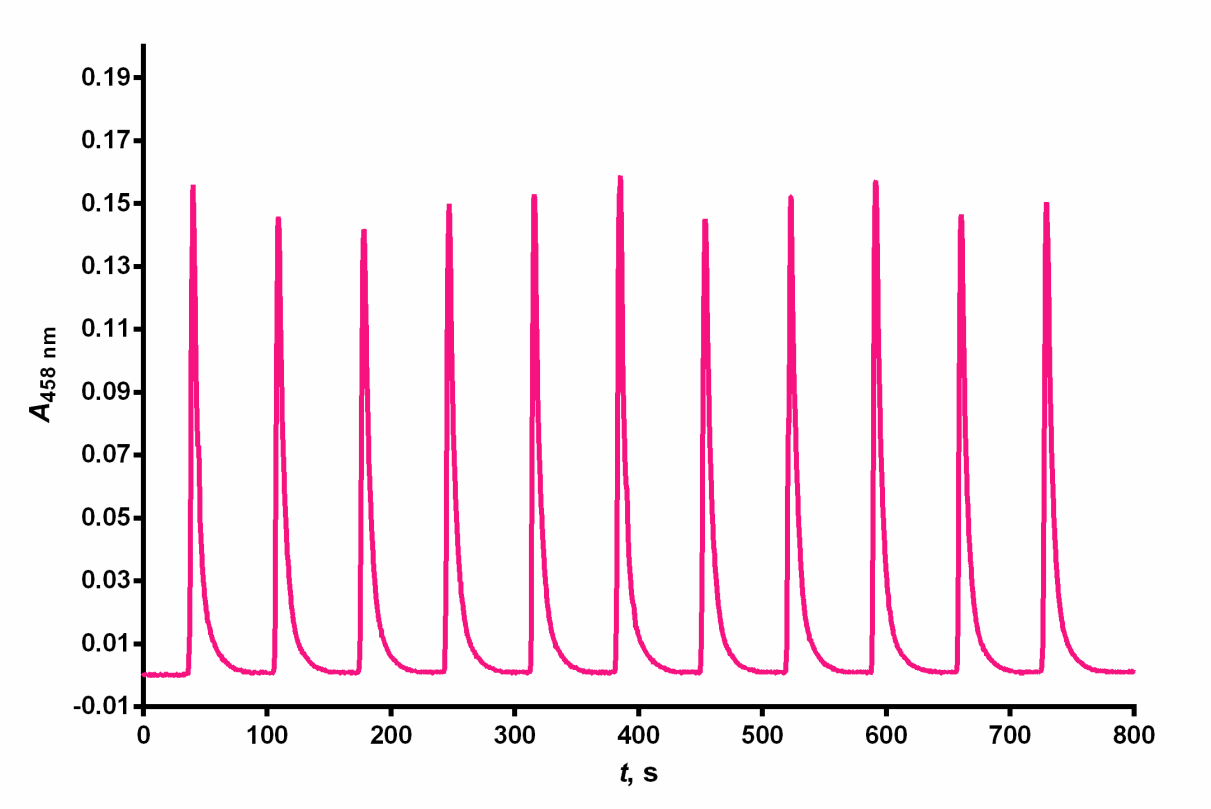
gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a m nagib krivulje umjeravanja.

Standardna devijacija slijepe probe s_{b} iznosi 0,0002309, a nagib krivulje umjeravanja m iznosi 3690,4. Uvrštavanjem podataka u izraz (14) izračunana je granica dokazivanja $1{,}8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Granica određivanja izračunana je uvrštavanjem vrijednosti u izraz (15) i iznosi $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}, što odgovara donjoj granici linearnog dinamičkog područja.

Ponovljivost signala, koja ukazuje na preciznost metode, ispitana je kroz deset uzastopnih injektiranja otopine analita koncentracije $4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} uz prethodno optimizirane parametre. Relativno standardno odstupanje izražava se u postotcima i računa se prema izrazu:

$$RSO(\%) = \frac{s}{\overline{x}} \times 100 \tag{16}$$

gdje s označava standardnu devijaciju, a $\overline{x}$ srednju vrijednost jakosti apsorbancije.



Slika 4.15. Siagram ponovljivosti signala za deset uzastopnih injektiranja analita. Eksperimentalni uvjeti: c(cistein) = 4,0 × 10^{-5} mol L^{-1}, $c([Cu(Nc)_2]^{2+})$ = 1,0 × 10^{-3} mol L^{-1}; pH = 3; protočna kiveta volumena 80 μL; petlja zadržavanja od 1000 μL; volumen injektiranja $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ = 150 μL; volumen injektiranja cisteina = 200 μL ; volumen osnovne otopine = 3000 μL; valna duljina pri kojoj je spektrofotometrijski bilježen signal iznosi λ = 458 nm, brzina protoka = 3000 μL min^{-1}; duljina reakcijske petlje = 50 cm.

Srednja vrijednost izmjerenih signala iznosi je 0,1502, a standardna devijacija 0,005029. Uvrštavanjem u jednadžbu (16) izračunano je relativno standardno odstupanje od 3,35 %.

4.13. Ispitivanje utjecaja interferencija na osjetljivost metode

Nakon što je metoda razvijena optimiziranjem parametara protočnog sustava, ispitivan je utjecaj najčešće prisutnih tvari i iona u farmaceutskim proizvodima na određivanje cisteina. Interferencije koje su ispitivane su: glukoza, fruktoza, kalijev nitrat (KNO_3), laktoza, natrijev sulfat, natrijev citrat (Na-citrat), boratna kiselina (H_3BO_3), limunska kiselina, vinska kiselina i acetilsalicilatna kiselina.

Pripravljene su otopine omjera cistein : reagens = 1 : 500. Prvo je određena apsorbancija samog analita kroz tri mjerenja, a prosječna vrijednost iznosila je 0,1497. Granična tolerancija predstavlja koncentraciju tvari ili iona koja vrijednost apsorbancije kod određivanja analita mijenja manje od ±5 %. Odstupanje od vrijednosti apsorbancije otopine analita pod utjecajem interferencije izražava se relativnom pogreškom. Računa se prema formuli:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{A_{\text{interferencija}} - A_{\text{cistein}}}{A_{\text{cistein}}} \times 100 \qquad (17)$$

Za glukozu, fruktozu, kalijev nitrat, laktozu, natrijev sulfat, natrijev citrat, boratna kiselina, limunsku kiselinu i vinsku kiselinu pripravljene su otopine omjera 1 : 500, a za acetilsalicilatnu kiselinu 1 : 1. Nakon što su iz tri mjerenja određene srednje vrijednosti apsorbancije, prema formuli (17) izračunana je relativna pogreška (prikazano u tablici 4.3. i tablici 4.4.).

Tablica 4.3. Prikaz interferirajućih tvari, omjer 1 : 500

Interferirajuća tvar	**Srednja vrijednost apsorbancije ($\bar{A}$)**	**Relativna pogreška, %**
Glukoza	0,1564	4,48
Fruktoza	0,1556	3,94
KNO_3	0,1435	-4,14
Laktoza	**0,1606**	**7,00**
Na_2SO_4	0,1517	1,34
Na-citrat dihidrat	**0,1576**	**5,28**
H_3BO_3	0,1478	1,27
Limunska kiselina	**0,1273**	**-14,96**
Vinska kiselina	**0,2678**	**78,49**

Tablica 4.4. Prikaz interferirajuće tvari, omjer 1 : 1

Interferirajuća tvar	**Srednja vrijednost apsorbancije ($\bar{A}$)**	**Relativna pogreška, %**
Acetilsalicilatna kiselina	**0,1210**	**19,17**

Analizom dobivenih podataka vidljivo je kako laktoza, Na-citrat dihidrat, limunska kiselina, vinska kiselina i acetilsalicilatna kiselina interferiraju pri ispitivanim omjerima cisteina i interferirajuće tvari (u tablici 4.3. i 4.4. označene zadebljanim slovima).

Pošto su interferirajuće tvari bile u značajno većoj koncentraciji, u sljedećim koracima ispitan je utjecaj postupnim smanjivanjem omjera analita i stranog iona.

Tablica 4.5. Prikaz interferirajućih tvari

Interferirajuća tvar	**Omjer**	**Srednja vrijednost apsorbancije ($\bar{A}$)**	**Relativna pogreška, %**
Laktoza	1 : 100	0,1554	3,81
Na–citrat dihidrat	1 : 250	0,1530	2,20
Limunska kiselina	1 : 5	0,1504	0,47
Vinska kiselina	1 : 10	0,1526	1,94

Iz tablice 4.5. vidljivo je kako pri nižim omjerima interferirajuće tvari i cisteina nisu zabilježena značajna odstupanja (veća od ±5 %) od apsorbancije izmjerene za otopinu analita.

4.14. Iskoristivost metode

Iskoristivost je svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita u uzorku te ukazuje na točnost metode [32].

Iskoristivost metode ispitana je na temelju tri različite koncentracije analita. Pripravljene su otopine analita koncentracije $2{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}; $6{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} i $3{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} i za svaku je provedeno pet mjerenja u triplikatima. Nakon što je izračunana srednja vrijednost jakosti apsorbancije za svaki triplikat uvrštena je u jednadžbu pravca za linearno dinamičko područje (14) i dobivena je koncentracija analita određena korištenjem prethodno optimizirane metode slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Iskoristivost je izračunana dijeljenjem dobivene koncentracije analita sa teorijskom koncentracijom analita za svako od pet mjerenja i izražena u postotcima. U posljednjem koraku određeno je relativno standardno odstupanje od medijana izračunanih vrijednosti za svaku od koncentracija. Rezultati su prikazani u tablici 4.6.

Tablica 4.6. Ispitivanje iskoristivosti metode slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor za određivanje cisteina za tri različite koncentracije

Molarna koncentracija analita, mol L^{-1}	**Masena koncentracija analita, mg L^{-1}**	**Iskoristivost metode (% ± RSO)**
$2{,}0 \times 10^{-6}$	0,24	107,0 ± 4,02
$6{,}0 \times 10^{-6}$	0,73	98,9 ± 0,98
$3{,}0 \times 10^{-5}$	3,6	102,5 ± 1,11

Analizom dobivenih podataka vidljivo je kako je iskoristivost metode zadovoljavajuća, osobito pri višim koncentracijama analita.

5. Rasprava

5. Rasprava

Cilj diplomskog rada bio je optimizacija parametara sustava za određivanje cisteina slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor, te korištenje optimiziranih parametara u određivanju analitičkih karakteristika razvijene metode.

Optimizirani parametri su: redoslijed injektiranja analita i reagensa, brzina protoka, volumen injektiranja reagensa, volumen injektiranja analita, volumen petlje zadržavanja i volumen reakcijske petlje te omjer reagensa. Parametri sa najpovoljnijim utjecajem na osjetljivost prikazani su u tablici 4.2.

Prvi korak optimizacije sustava bio je određivanje redoslijeda injektiranja otopina reagensa i analita s obzirom na redoks-reakciju. Zabilježeni signali bili su viši u slučaju kada je prvo injektirana otopina reagensa (kompleks $[Cu(Nc)_2]^{2+}$), zatim analita (cistein), te je taj slijed odabran kao optimalan.

Optimizacijom brzine protoka moguće je utjecati na osjetljivost metode mijenjajući raspršenje. Veća brzina protoka omogućuje analizu većeg broja uzoraka u određenom vremenu, pa je svrha optimizacije pronaći najpovoljniji omjer brzine i osjetljivosti metode. Mjerenjima je utvrđeno kako je brzina protoka od 3000 μL min^{-1} optimalna jer vrijednost apsorbancije opada i povećanjem i smanjenjem brzine.

Volumen injektiranja reagensa ispitan je za volumene od 50 μL do 450 μL. Analizom pikova na siagramu volumen od 150 μL određen je kao optimalan jer je za tu vrijednost izmjerena maksimalna apsorbancija i daljnjim povećanjem volumena vrijednost apsorbancije ostaje konstantna.

Utjecaj volumena injektiranja analita na osjetljivost metode ispitivan je za volumene otopine cisteina od 50 μL do 450 μL. Na siagramu je vidljivo da je za volumen od 200 μL izmjerena visoka vrijednost apsorbancije, te se značajno ne mijenja daljnjim povećanjem volumena.

Kod optimizacije volumena petlje zadržavanja nisu uočene znatne razlike u vrijednosti apsorbancije što ukazuje na to da je reakcija dovoljno brza i potpuna u oba slučaja. Petlja zadržavanja volumena 500 μL odabrana je kao optimalna jer je dovoljno dugačka da se reakcija odvije do kraja, a manji volumen omogućava formiranoj zoni produkta brže stizanje do detektora.

Kod optimizacije duljine reakcijske petlje korištene su petlje od 30 cm do 120 cm. Iako su najviši pikovi dobiveni za reakcijsku petlju duljine 30 cm, zbog osiguravanja dovoljno vremena za odvijanje reakcije odabrana je petlja duljine 50 cm.

Utjecaj različitih omjera bakra(II) i neokuproina na zabilježeni signal ispitan je za raspon omjera Cu^{2+} : Nc od 1 : 1 do 1 : 2,4. Analizom pikova potvrđeno je da je omjer 1 : 2,4, koji je korišten i u prethodnim optimizacijama, optimalan.

Nakon razvoja metode optimizacijom parametara protočnog sustava određene su analitičke karakteristike i ispitan utjecaj interferencija na signal analita.

Utjecaj interferencija ispitan je za koncentraciju 500 puta veću od koncentracije analita za glukozu, fruktozu, kalijev nitrat, laktozu, natrijev sulfat, natrijev citrat, boratnu kiselinu, limunsku kiselinu i vinsku kiselinu, odnosno za jednaku koncentraciju acetilsalicilatne kiseline. Pošto je ispitan utjecaj značajno veće koncentracije od one koja se nalazi u farmaceutskim pripravcima mjerenja su ponovljena za niže koncentracije. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako pri nižim koncentracijama jedino acetilsalicilatna kiselina jednake koncentracije kao analit utječe na jakost zabilježenog signala. Glukoza, fruktoza, kalijev nitrat, natrijev sulfat i boratna kiselina neće utjecati na jakost zabilježenog signala ni u koncentraciji 500 puta većoj od analita. U farmaceutskim pripravcima tolerira se prisutnost 250 puta veće koncentracije natrijevog citrata od koncentracije analita, 100 puta veće koncentracije laktoze, 10 puta vinske kiseline te 5 puta veće koncentracije limunske kiseline od koncentracije analita (rezultati prikazani u tablicama 4.3., 4.4. i 4.5.).

Linearno dinamičko područje ispitano je korištenjem optimiziranih parametara protočnog sustava za niz standardnih otopina koncentracije analita od $2{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} do $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Analizom podataka dobiveno je da signal linearno raste porastom koncentracije analita za područje koncentracija od $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} do $8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} uz koeficijent linearne regresije 0,9997. LDP područje je definirano jednadžbom $y = 3690{,}4\ x + 0{,}0019$.

Granica dokazivanja i granica određivanja izračunane su uvrštavanjem vrijednosti slijepe probe i nagiba krivulje u jednadžbe (14) i (15). Izračunane su vrijednosti koncentracije $1{,}8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} za granicu određivanja i $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} za granicu određivanja, što odgovara donjoj granici linearnog dinamičkog područja. Ponovljivost signala ima relativno

standardno odstupanje od 3,35 % izračunano prema izrazu (16) za 10 uzastopno injektiranih otopina analita koncentracije $4{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}.

Posljednji korak u validaciji metode bio je računanje iskoristivosti za procjenu točnosti na temelju tri različite koncentracije otopine cisteina. Za koncentraciju $2{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} dobivena je iskoristivnost 107,0 % uz standardno odstupanje 4,02 %. Za više koncentracije analita relativno standardno odstupanje bilo je znatno niže i iskoristivost povoljnija. Za koncentraciju cisteina $6{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} iskoristivnost je iznosila 98,9 % uz relativno standardno odstupanje 0,98 %, a za koncentraciju $3{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} iznosila je 102,5 % uz relativno standardno odstupanje 1,11 %, što ukazuje na zadovoljavajuću iskoristivost metode.

6. Zaključak

6. Zaključak

Cilj diplomskog rada je razvoj i vrednovanje jednostavne, osjetljive i brze metode slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor za određivanja L-cisteina.

Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj L-cistein (reducens) reducira zeleno obojani $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ kompleks u žuto obojani $[Cu(Nc)_2]^{+}$ kompleks koji postiže apsorpcijski maksimum elektromagnetskog zračenja pri valnoj duljini λ = 458 nm.

Univarijantnom metodom optimizirani su parametri protočnog sustava: redoslijed injektiranja (optimalni slijed je reagens zatim analit), brzina protoka (3000 μL min^{-1}), volumen injektiranja analita (200 μL), volumen injektiranja reagensa (150 μL), volumen petlje zadržavanja (500μL), volumen (duljina) reakcijske petlje (50 cm) i omjer reagensa (Cu^{2+} : Nc = 1 : 2,4).

Linearno dinamičko područje definirano je jednadžbom y = 3690,4 x + 0,0019 sa koeficijentom linearne regresije R^2 = 0,9997 za koncentraciju analita od $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} do $8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}.

Najmanja koncentracija analita koju možemo kvalitativno odrediti je $1{,}8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}, a kvantitativno $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Ponovljivost signala ima relativno standardno odstupanje od 3,35 %.

Analizom rezultata dobivenih za iskoristivost i ponovljivost zaključeno je kako je metoda zadovoljavajuće točna i precizna.

Prednosti slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor u odnosu na prethodno razvijene metode su praćenje napredovanja reakcije i određivanje niskih koncentracija cisteina u dinamičkim uvjetima uz zadovoljavajuću točnost i preciznost. Razvijena metoda, u kojoj se programski upravlja većinom parametara, omogućuje analizu velikog broja uzoraka u određenom vremenu uz znatno manje utroške otopina nosioca i reagensa. Pogodnost metode je i mogućnost analize pripravaka različite formulacije.

7. Popis citirane literature

7. Popis citirane literature

[1] Berg JM, Tymoczko J, Stryer L. Biokemija. 6. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2013.

[2] Block SS. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 5. izdanje. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2001. Poglavlje 21.

[3] Gurnev P, Nestorovich E. Channel-Forming Bacterial Toxins in Biosensing and Macromolecule Delivery. Toxins [Internet]. 2014;6(8):2483–540. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Channel-Forming+Bacterial+Toxins+in+Biosensing+and+Macromolecule+Delivery DOI: 10.3390/toxins6082483

[4] Matsuo H, Mochizuki H, Davies J i Sugiyama M. Production of bleomycin *N*-acetyltransferase in *Escherichia coli* and *Streptomyces verticillus*. FEMS Microbiol Lett. 1997;153: 83–88.

[5] Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil AP. Aminokiseline i peptidi. Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

[6] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4. izdanje. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 3.1, Hierarchical Structure of Proteins.

[7] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4. izdanje. New York: Garland Science; 2002. The Shape and Structure of Proteins.

[8] Penido MG, Tavares M de S. Pediatric primary urolithiasis: Symptoms, medical management and prevention strategies. World J Nephrol [Internet]. 2015;4(4):444-54. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pediatric+primary+urolithiasis%3A+Symptoms%2C+medical+management+and+prevention+strategies DOI: 10.5527/wjn.v4.i4.444

[9] Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. 196-206.

[10] Miniaci MC, Irace C, Capuozzo A, Piccolo M, Di Pascale A, Russo A, et al. Cysteine Prevents the Reduction in Keratin Synthesis Induced by Iron Deficiency in Human Keratinocytes. J Cell Biochem [Internet]. 2016;117(2):402-12. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cysteine+Prevents+the+Reduction+in+Keratin+Synthesis+Induced+by+Iron+Deficiency+in+Human+Keratinocytes.+J+Cell+Biochem DOI: 10.1002/jcb.25286

[11] Zhang L, Lu B, Lu C, Lin JM. Determination of cysteine, homocysteine, cystine, and homocystine in biological fluids by HPLC using fluorosurfactant-capped gold nanoparticles as postcolumn colorimetric reagents [Internet]. J Sep Sci. 2014; 37(1-2):30-6. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Determination+of+cysteine%2C+homocysteine%2C+cystine%2C+and+homocystine+in+biological+fluids+by+HPLC+using+fluorosurfactant-capped+gold+nanoparticles+as+postcolumn+colorimetric+reagents DOI: 10.1002/jssc.201300998

[12] Bronowicka-Adamska P, Zagajewski J, Czubak J, Wrobel M. RP-HPLC method for quantitative determination of cystathionine, cysteine and glutathione: An application for the study of the metabolism of cysteine in human brain. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2011;879(21):2005-9. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=RP-HPLC+method+for+quantitative+determination+of+cystathionine%2C+cysteine+and+glutathione%3A+An+application+for+the+study+of+the+metabolism+of+cysteine+in+human+brain. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.026

[13] Amjadi M, Abolghasemi-Fakhri Z, Hallaj T. Carbon dots-silver nanoparticles fluorescence resonance energy transfer system as a novel turn-on fluorescent probe for selective determination of cysteine. J Photochem Photobiol A Chem [Internet]. 2015;309(Supplement C):8-14. Dostupno na: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603015001434 DOI: https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.04.016

[14] Farhadi K, Forough M, Pourhossein A, Molaei R. Highly sensitive and selective colorimetric probe for determination of l-cysteine in aqueous media based on Ag/Pd bimetallic nanoparticles. Sens Actuators B Chem [Internet]. 2014;202(Supplement C):993-1001. Dostupno na: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400514006789 DOI: https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.129

[15] Cebi N, Dogan CE, Develioglu A, Yayla MEA, Sagdic O. Detection of l-Cysteine in wheat flour by Raman microspectroscopy combined chemometrics of HCA and PCA. Food Chem [Internet]. 2017;228(Supplement C):116-24. Dostupno na: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617301449 DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.132

[16] Ensafi AA, Dadkhah-Tehrani S, Karimi-Maleh H. A voltammetric sensor for the simultaneous determination of L-cysteine and tryptophan using a p-aminophenol-multiwall carbon nanotube paste electrode. Anal Sci [Internet]. 2011;27(4):409. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+voltammetric+sensor+for+the+simultaneous+determination+of+L-cysteine+and+tryptophan+using+a+p-aminophenol-multiwall+carbon+nanotube+paste+electrode

[17] Liu W, Luo J, Guo Y, Kou J, Li B, Zhang Z. Nanoparticle coated paper-based chemiluminescence device for the determination of l-cysteine. Talanta [Internet]. 2014;120(Supplement C):336-41. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nanoparticle+coated+paper-based+chemiluminescence+device+for+the+determination+of+l-cysteine DOI: 10.1016/j.talanta.2013.12.033

[18] Bamdad F, Khorram F, Samet M, Bamdad K, Sangi MR, Allahbakhshi F. Spectrophotometric determination of l-cysteine by using polyvinylpyrrolidone-stabilized silver nanoparticles in the presence of barium ions. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2016;161:52-7. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Spectrophotometric+determination+of+l-cysteine+by+using+polyvinylpyrrolidone-stabilized+silver+nanoparticles+in+the+presence+of+barium+ions DOI: 10.1016/j.saa.2016.02.030

[19] Wang Y, Wang J, Yang F, Yang X. Spectrophotometric determination of cysteine with gold nanoparticles stabilized with single-stranded oligonucleotides.Anal Sci [Internet]. 2010;26(5):545-9. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=spectrophotometric%20determination%20of%20cysteine%20with%20gold%20nanoparticle%20stabilized%20with%20single-stranded%20oligonucleotides&cmd=correctspelling

[20] Hormozi-Nezhad MR, Seyedhosseini E, Robatjazi H. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles. Sci Iran [Internet]. 2012;19(3):958-63. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1026309812000946 DOI: https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.04.018

[21] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016.

[22] Christian GD. Analytical Chemistry. 6. izdanje. New York: John Wiley and Sons Inc; 2004.

[23] Pimenta AM, Montenegro MC, Araujo AN, Calatayud JM. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2006;40(1):16-34. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505006539 DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.10.006

[24] Kukoč L. Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija (laboratorijske vježbe). Split. 2003; [interna skripta].

[25] Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. Arab J Chem [Internet]. 2017;10(Supplement 1):S1409-S21. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213001056 DOI: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016

[26] Kukoč-Modun L. Protočna analiza injektiranjem. Split. 2009; [interna skripta].

[27] Tzanavaras PD. Automated Determination of Pharmaceutically and Biologically Active Thiols by Sequential Injection Analysis: A Review. Open Chem Biomed Methods J. 2010;3:37-45.

[28] Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. Trends Analyt Chem [Internet]. 2005;24(5):416-25. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000579 DOI: https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.004

[29] Flow injection analysis [Internet]. Starzynski A; 2017 [citirano 23.9.2017] Dostupno na: http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.3.%20Mixing%20by%20Dispersion.html

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

[31] San Vicente A, Arranz A, Moreda JM, Arranz JF. Anal Chim Acta. 1994:87-90.

[32] Betz JM, Brown PN, Roman MC. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. Fitoterapia [Internet]. 2011;82(1):44-52. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X10002467 DOI: https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.011

8. Sažetak

8. Sažetak

Primjenom slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor razvijena je i vrednovana kinetička metoda određivanja cisteina. Kinetička metoda se temelji na redoks reakciji gdje cistein kao reducens, reducira zeleni bakar(II) neokuproin kompleks do bakar(I) neokuproin kompleksa. Formirani žuto-narančasti bakar(I) neokuproin kompleks pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 458 nm. Optimalni parametri protočnog sustava određeni su univarijantnom metodom te je temeljem toga konstruirana krivulja umjeravanja. Linearnost je postignuta u području koncentracija cisteina od $6{,}0 \times 10^{-7}$ do $8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} uz jednadžbu pravca: $y = 3690{,}4\ x + 0{,}0019$ i korelacijski koeficijent $R^2 = 0{,}9997$, te su određene granica dokazivanja od $1{,}8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} i granica određivanja od $6{,}0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}. Provjeren je i utjecaj pratećih tvari koje se uobičajeno nalaze u sastavu farmaceutskih pripravaka te nije zabilježen njihov interferirajući učinak na određivanje analita. Vrednovanje metode provedeno je ispitivanjem ponovljivosti signala uz relativno standardno odstupanje od 3,35 % te zadovoljavajuće iskoristivosti, odnosno točnosti metode.

9. Summary

9. Summary

Using the sequential injection analysis with the spectrophotometric detector, the kinetic method for the determination of cysteine was developed and validated. The kinetic method is based on redox reaction where cysteine as a reductant, reduces green copper(II) neocuproine complex to copper(I) neocuproine complex. The formated yellow-orange copper(I) neocuproine complex shows an absorption maximum at wavelength of 458 nm. The optimum parameters of the flow system were determined by a univariate method and as a result the calibration curve was constructed. Linearity was achieved for the concentration range from 6.0×10^{-7} mol L^{-1} to 8.0×10^{-5} mol L^{-1} and it was described with the equation $y = 3690.4\,x + 0.0019$ and correlation coefficient $R^2 = 0.9997$. The calculated limit of detection is 1.8×10^{-7} mol L^{-1} and the limit of quantification is 6.0×10^{-7} mol L^{-1}. The influence of foreign substances commonly found in the composition of the pharmaceutical preparations was also examined, and no interfering effect on the analyte was noted. Validation of the method was performed by examining the repeatability of the signal with a relative standard deviation of 3.35%, and satisfactory recovery of method, or accuracy of the method.

10. Životopis

10. Životopis

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Renata Pauk

Datum rođenja: 3.8.1993.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Alojza Stepinca 31

e-mail: renata.pauk@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2000. - 2008.** Osnovna škola "Gripe", Split, Republika Hrvastska
- **2008. - 2012.** Opća gimnazija "Marko Marulić", Split, Republika Hrvatska
- **2012. - 2017.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTVO:

III. 2017. – IX. 2017. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Plokite

CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija