

NATAŠA D. PEJIĆ

Farmaceutski fakultet, Institut za
fizičku hemiju, Univerzitet u
Beogradu, Beograd

PREGLEDNI RAD

UDK 543.554:543.06

DOI: 10.2298/HEMIND0905455P

ANALITIČKE PRIMENE METODE PULSNE PERTURBACIJE BRAY-LIEBHAFSKY OSCILATORNE REAKCIJE REALIZOVANE U OTVORENOM REAKTORU*

U ovom radu se prikazuju dosadašnji rezultati naše istraživačke grupe vezani za primenu Bray–Liebhafsky (BL) oscilatorne reakcije u analitičke svrhe. Predloženi kinetički metod (pulsna perturbacija oscilatornog reakcionog sistema koji se nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju, PPOSSS) za kvantitativno određivanje različitih analita, bazira se na potencijometrijskom praćenju odgovora BL matrice, koja se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju u blizini bifurkacione tačke, na perturbacije izvršene različitim koncentracijama analita. Indukovana maksimalna promena potencijala, ΔE_m , proporcionalna je količini analita, a njegova nepoznata količina može se jednostavno odrediti na osnovu prethodno konstruisanog kalibracionog dijagrama. Korišćenje PPOSSS metode je vrlo pogodno za rutinske analize različitih farmaceutski i biološki važnih jedinjenja.

Oscilatorne hemijske reakcije su kompleksni dinamički sistemi u kojima se koncentracije reaktanata i produkata, pri oscilatornoj promeni koncentracije intermedijera, kaskadno menjaju odražavajući periodične promene brzina njihovih nestajanja, odnosno nastajanja [1,2]. Ovi nelinearni oscilatorni reakcioni sistemi koji nastaju u uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže, do skoro su uglavnom ispitivani sa fizičko-hemijskog stanovišta, s ciljem pojašnjavanja njihovog složenog mehanizma. Međutim, zbog ekstremne osetljivosti nelinearnih hemijskih sistema na male promene spoljašnjih faktora (temperatura, pritisak, protoci, mešanje, osvetljenje), javljaju se novi pravci istraživanja oscilatornih reakcija koji omogućavaju njihovu primenu u analitičke svrhe. Tako se oscilatorni reakcioni sistemi mogu generalno koristiti kao matrice za kinetičko određivanje različitih supstancija.

Od 1978. godine, kada su Tihonova i saradnici [3] primenili Belousov–Žabotinski reakciju [4] u režimu prostih periodičnih oscilacija za kvantitativno određivanje rutenijuma (III), do danas, razvijene su brojne analitičke primene hemijskih oscilatora; radovi publikovani iz ove oblasti sumarno su prikazani u dva revijalna rada i obuhvataju period od 1986. do 2004. godine [5,6]. Primene hemijskih oscilatora za kvantitativna određivanja analita zasnivaju se na eksperimentalnom praćenju odgovora oscilatornog sistema (instrumentalni signal) na eksterne perturbacije. Za konstruisanje kalibracionog dijagrama koristi se kauzalna veza između koncentracije perturbatora i karakterističnih oscilatornih veličina (period, amplituda, Ljapunovljev eksponent, itd.) [5–23].

Generalno, široki opseg različitih tipova dinamičkih režima [24–27] (stacionarna stanja, regularne osci-

lacije, oscilacije udvojenog perioda, kvazi-periodičnost i deterministički kaos) oscilatornih reakcionih sistema, i njihova pomenuta ekstremna osetljivost na spoljašnje perturbacije, čine ove sisteme, kao matrice, posebno interesantnim u dizajniranju kinetičkih metoda [28] analize. U tom smislu, predložena su dva različita metoda. Perez-Bendito istraživačka grupa je bila prva koja je razvila i primenila metodološki pristup pod nazivom „analitna pulsna perturbaciona“ tehnika (eng. *analyte pulse perturbation* (APP) technique) [7] za kvantitativno određivanje različitih analita [5,7–12], korišćenjem nehalogenidnog oscilatora, H_2O_2 –NaSCN–CuSO₄, kao matrice. Ovaj metod se bazira na praćenju efekata izazvanih brzim pulsanim perturbacijama matričnog sistema koji se nalazi u režimu prostih regularnih oscilacija; injektiranje analita u matricu dovodi do promena u amplitudi, ili periodu regularnih oscilacija proporcionalno injektiranoj koncentraciji perturbatora. Korišćenje otvorenog sistema koji se realizuje u protočnom reaktoru (eng. *continuously fed well stirred tank reactor* (CSTR)) [26,29–32], za primenu APP tehnike [5–23,33,35–52], otvorilo je nove perspektive za korišćenje oscilatornih hemijskih reakcija u rutinskim analizama.

S druge strane, Vukojević i autori [33], razvili su novi pristup u primeni nelinearnih hemijskih sistema u uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže. U ovom pristupu iskorišćena su neravnotežna stabilna stacionarna stanja i njihova izuzetna osetljivost na perturbacije koje se izvode u blizini bifurkacione tačke. Kao pogodna analitička matrica, po prvi put, korišćena je reakcija katalitičkog razlaganja vodonik-peroksida u prisustvu H^+ i IO_3^- , poznata pod nazivom Bray–Liebhafsky (BL) oscilatorna reakcija [34,35]. Predloženi kinetički metod (pulsna perturbacija oscilatornog reakcionog sistema koji se nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju, PPOSSS) za kvantitativno određivanje različitih analita, bazira se na potencijometrijskom praćenju odgovora BL oscilatorne reakcije kao matrice, koja se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju u blizini bifur-

Adresa autora: N. Pejić, Farmaceutski fakultet, Institut za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd.
E-pošta: bimesel@eunet.rs

Rad primljen: 4. oktobar 2009.

Rad prihvaćen: 13. oktobar 2009.

*Rad po pozivu povodom 20 godina od osnivanja Društva fiziko-hemičara Srbije.

kacione tačke, na perturbacije izvršene različitim koncentracijama analita. Indukovana maksimalna promena potencijala, ΔE_m , proporcionalna je količini analita, a njegova nepoznata količina može se jednostavno odrediti na osnovu prethodno konstruisanog kalibracionog dijagrama. Korišćenjem matrice koja se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju, nije potrebno testirati oscilatorne faze, niti perturbovati uvek iste izabrane oscilatorne faze. U poređenju sa matricom koja se nalazi u oscilatornom stanju, regeneracija matrice koja se nalazi u stabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju je značajno skraćena. Takođe, perturbacije matrice koja se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju su mnogo pogodnije, jer se, nakon izvršene perturbacije, bilo koja promena u dinamičkoj strukturi lakše opaža i prepoznaje, što je naročito značajno za generalno korišćenje PPOSSS metoda i za istraživače koji imaju malo iskustva u radu sa nelinearnim sistemima; perturbacije kompleksnijih struktura (npr. regularnih oscilacija), mogu biti praćene rafiniranijim promenama, kao što su promene u dinamičkoj strukturi i periodu oscilovanja, ili faznom pomeraju [36,7,10,37], koje su lako uočljive i prepoznatljive jedino eksperimentatorima koji imaju mnogo iskustva u radu sa nelinearnim sistemima.

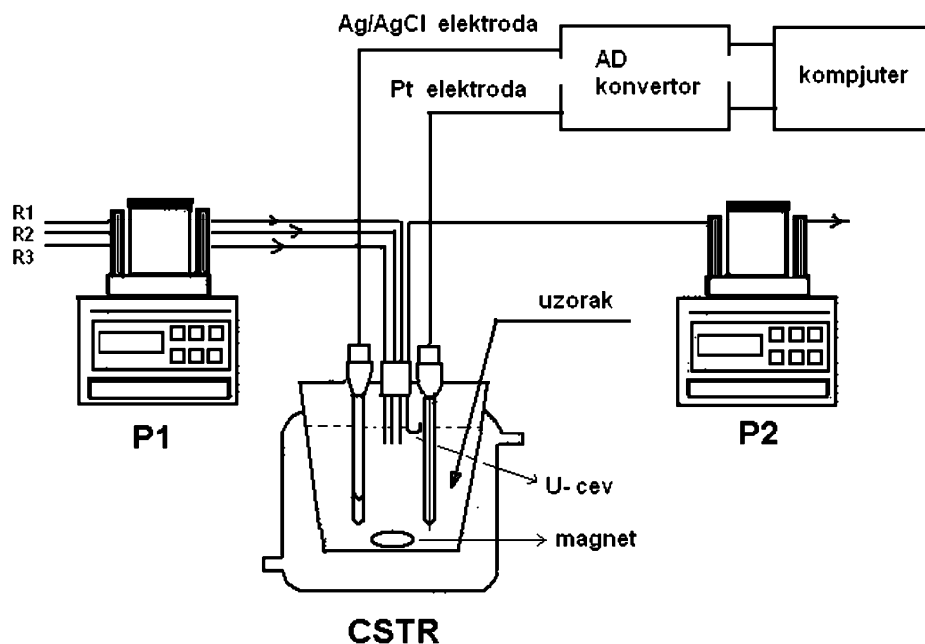
Bez obzira na navedene prednosti korišćenja matrice koja se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju, APP tehnika primenjena na vrlo osetljive oscilatorne reakcione sisteme, koji se nalaze bilo u oscilatornom [5–23], bilo u stabilnom stacionarnom stanju u okolini bifurkacione tačke [33,38–54], korisna je analitička alatka s obzirom na to da koristi vrlo jednostavnu aparaturu i

kao takva može biti deo bilo koje analitičke laboratorije; pokazalo se da je njeno korišćenje vrlo pogodno u rutinskim analizama različitih biološki i farmaceutski važnih jedinjenja [33,38,40–54] koja mogu biti od značaja za prirodne nauke u budućnosti.

Cilj ovoga rada je da prikaže naš doprinos razvoju oblasti primene oscilatornih reakcija u analitičke svrhe kroz retrospektivnu evaluaciju sopstvenih istraživanja koja obuhvataju kvantitativna određivanja četrnaest različitih analita u čistim [33,38–54] i farmaceutski doziranim oblicima [41,43–47,49,52–54], kao i složenim uzorcima (urin, sok, vino, zaplenjeni ulični uzorci) [41,45,48,49]. Takođe, u radu će biti data dosadašnja istraživanja koja se odnose na razvoj (koncept, instrumentacija i tehnika) i validaciju PPOSSS analitičke metode.

EKSPERIMENTALNI DEO

U radu su prikazani eksperimentalni podaci dobijeni u našoj laboratoriji [33,38–54] i oni se odnose na primenu BL oscilatorne reakcije kao matrice realizovane u dobro mešajućem protočnom reaktoru (CSTR) (slika 1) [48]. Reaktanti su uvođeni odvojeno u zatvorenu staklenu reakcionu posudu koja je zaštićena od spoljašnjeg svetla neprovidnom folijom, pomoću peristaltičke pumpe u obliku tri rastvora: R1 – vodeni rastvor KIO_3 , R2 – vodeni rastvor H_2SO_4 i R3 – vodeni rastvor H_2O_2 . Reakcioni rastvori R1 i R2 su dovođeni u reakcioni sud kroz Viton creva (Deutsch & Neuman, Berlin, Germany), a R3 kroz Tygon creva (Ismatec, Glat-



Slika 1. Šematski prikaz aparature; P1 i P2 su peristaltičke pumpe kojima se generiše protok reaktanata iz rezervoara u reakcionu posudu i odvodi višak reakcionog rastvora; R1, R2 i R3 su oznake za reaktante (KIO_3 , H_2SO_4 i H_2O_2).

Figure 1. Schematic diagram of the instrumental assembly; P1 and P2 stands for peristaltic pumps used to generate inflows of reactants from reservoirs into reaction vessel and outflow surplus of reaction mixture; R1, R2 i R3 denote reactants (KIO_3 ; H_2SO_4 and H_2O_2).

tbrugg, Zurich, Switzerland) sa debelim spoljašnjim zidovima. Ovi rastvori uvođeni su u reakcionu posudu kroz teflonska creva (Varian GMBH, Darmstadt, Deutschland) koja su tokom eksperimenta uronjena u reakcioni rastvor. Kontinualan protok reaktanata obezbeđuje peristaltička pumpa (Manuel/RS 232 Controlled Peristaltic Pump, Type 110) kojom se podešava specifična brzina protoka, j_0 . Protok reaktanata može se kontrolisati pojedinačno što omogućava pretraživanje parametarskog prostora i ispitivanje dinamike BL oscilatorne reakcije, kao i pronalaženje bifurkacionih tačaka. Reaktanti se uvode u reakcioni sud identično, pri maksimalnoj brzini obrtanja peristaltičke pumpe. Ukupna zapremina reakcionog rastvora iznosila je $22,2 \pm 0,1$ mL što je proveravano posle završetka svake serije eksperimenata. Zapremina reakcionog rastvora održava se konstantnom odvođenjem viška reakcionog rastvora kroz staklenu lulu koja je silikonskim crevom povezana sa drugom peristaltičkom pumpom (brzina odvođenja viška reakcionog rastvora ne menja se tokom trajanja eksperimenata i iznosi $1,5$ o min^{-1}). Fluktuacije u zapremini iznose $5,00\%$ (tehnička karakteristika peristaltičke pumpe).

Temperatura je održavana konstantnom sa tačnošću $\pm 0,2$ °C, pomoću termostata (Serie U, MLW Freital, Germany). Vremenska evolucija matrice praćena je potencijometrijski (MA 5730 potentiometer, Iskra, Hojru, Slovenia), korišćenjem Pt elektrode (Metrohm Model 6.0301.100) [39–54], ili Ag_2S [33] elektroda kao radnih i Ag/AgCl (Metrohm Model 6.0726.100) kao referentne elektrode sa dvostrukim elektrolitičkim mostom. Unutrašnji rastvor referentne elektrode je 3 mol L^{-1} KCl , a spoljašnji zasićeni rastvor K_2SO_4 . Potencijal radne elektrode beležen je milivoltskim pisačem (Riedel-deHaën, Deisenhofen, Germany) [33,38–46,50–53], ili je beležen PC-AT 12 MHz kompatibilnim računarom, povezivanjem elektroda i računara preko analognog interfejsa (PC-Multilab EH4 16-bit ADC) [47–49,54].

Perturbacije su izvođene dodavanjem mikrozapremina ispitivanog analita (20 do 100 μL) pomoću mikropipete. Injektiranje analita se izvodilo ručno, a vreme potrebno da se izvrši ubrizgavanje iznosilo je $0,5$ s. Intenziteti perturbacija, u našim radovima, odgovaraju: dinamičkim koncentracijama analita (koncentracija analita u BL matrici) [33,38,39,43,44] i injektiranim koncentracijama [45,48] ili apsolutnim količinama analita [46,47,49,54].

Pregled eksperimentalnih uslova koji su korišćeni za analitička određivanja različitih supstancija, naše istraživačke grupe dat je u tabeli 1. Detaljne eksperimentalne procedure za analitičke primene PPOSSS procedure date su u radovima [33,41–49].

REZULTATA I DISKUSIJA

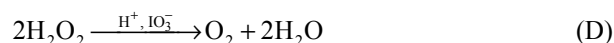
Koncept i razvoj analitičke metode koja se bazira na pulsanim perturbacijama oscilatornog reakcionog sis-

tema koji se nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju (PPOSSS), uključuje nekoliko neophodnih koraka (optimizacija eksperimentalnih uslova i validacija PPOSSS procedure) koje treba preduzeti da bi se primenila ova metoda u analitičke svrhe.

Minimalni neophodni koraci za primenu PPOSSS procedure

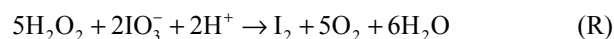
Izbor matice

Prvi korak u PPOSSS proceduri je izbor pogodnog matričnog sistema koji će biti perturbovan analitom. Izbor BL oscilatorne reakcije, kao matrice, proističe iz relativno dobrog poznavanja njenog složenog mehanizma [34,35,55–63], kao i prethodnih pozitivnih iskustava [33,38–54]. Bray–Liebhafsky (BL) oscilatorna reakcija, otkrivena 20-tih godina dvadesetog veka, reakcija je katalitičkog razlaganja vodonik-peroksida u prisustvu H^+ i IO_3^- [34,35]:

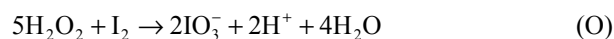


Dobila je naziv po pronalazaču Brayu [34] i istraživaču koji se dugo vremena bavio njenim proučavanjem, Liebhafskom [35].

Reakcija (D) je rezultat dva vodeća kinetička reakciona puta [34,35], redukcionog:



duž koga jodat biva redukovao vodonik-peroksidom do joda, i oksidacionog:



duž koga jod biva oksidovan vodonik-peroksidom do jodata. Stehiometrijske jednačine (R) i (O), čijim sabiranjem se dobija reakcija (D), predstavljaju sumarne reakcije više mogućih alternativnih puteva. Naime, mehanizam razlaganja vodonik-peroksida je veoma složen i uključuje nastanak brojnih intermedijernih vrsta kao što su Γ , I_2 , HOI i HIO_2 [25,34,35,55–65]. Njihove koncentracije, koje su za nekoliko redova veličine niže u odnosu na koncentracije reaktanata, strogo su izbalansirane reakcionim mehanizmom. Dodatak mikrokoličina reakcione vrste (analita) koja se analizira, remeti ovaj delikatni balans što se može iskoristiti za njegovo kvantitativno određivanje [33,38–54]. S druge strane, BL reakcija kao matrica može se koristiti i za utvrđivanje kinetičkih karakteristika [66] kao i mehanizma reakcije same matrice [30].

Bifurkaciona analiza

Drugi korak u PPOSSS proceduri je izbor odgovarajućeg dinamičkog stanja koje će biti perturbovano. Kako se u PPOSSS proceduri perturbuju neravnotežna stabilna stacionarna stanja u blizini bifurkacione tačke, potrebno je locirati položaj aktuelne bifurkacione tačke u faznom prostoru (bifurkaciona analiza), kada se BL ma-

Tabela 1. Pregled eksperimentalnih uslova koji su korišteni za analitička određivanja različitih analita u našoj laboratoriji [33,38–41,43–52,54]

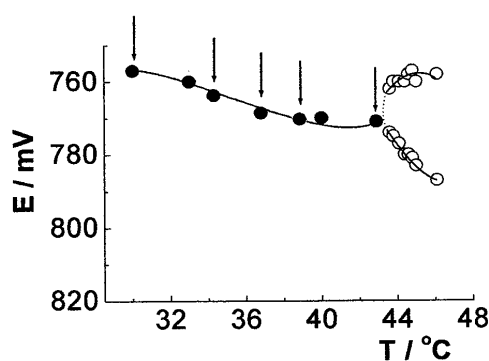
Table 1. Review of experimental conditions used for analytical determinations of different analyte in our laboratory [33,38–41,43–52,54]

Eksperimentalni uslovi	Analit(i)	Literatura
$[\text{KIO}_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 2,96 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ $t = 46,4 \text{ }^\circ\text{C}$	Cl^- , Br^- , I^- , Mn^{2+} , malonska kiselina kvercetin	33 33, 38
$[\text{KIO}_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 2,95 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $t = 42,9 \text{ }^\circ\text{C}$	morfin 6-O-acetilmorfin hesperidin paracetamol askorbinska kiselina kvercetin	47 48 41, 45 46, 52 49, 53 44
$[\text{KIO}_3]_0 = 7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 4,50 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $t = 37,8 \text{ }^\circ\text{C}$	Fe^{3+}	39
$[\text{KIO}_3]_0 = 4,74 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 4,79 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 2,80 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ $t = 60,0 \text{ }^\circ\text{C}$	morfin	47
$[\text{KIO}_3]_0 = 7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 4,48 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $t = 37,0 \text{ }^\circ\text{C}$	morfin	47
$[\text{KIO}_3]_0 = 7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 4,48 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $t = 37,0 \text{ }^\circ\text{C}$	rutin kvercetin morin morfin 6-O-acetilmorfin	43 51 51 40,50 50
$[\text{KIO}_3]_0 = 7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 4,48 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $t = 39,0 \text{ }^\circ\text{C}$	askorbinska kiselina	49
$[\text{KIO}_3]_0 = 5,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 8,16 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,50 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ $i_0 = 2,95 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ $t = 56,0 \text{ }^\circ\text{C}$	vitamin B1 (tiamin)	54

trica realizuje u dobromešajućem protočnom reaktoru (slika 1). Naime, BL reakcija pokazuje nelinearne osobine i različite vremenski uređene (samoorganizovane) dinamičke strukture (neravnotežno stacionarno stanje, jednostavne i složene oscilacije) [30–32,67], kada se izvodi u uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže, a njeno korišćenje kao matrice za kvantitativno određivanje analita, predpostavlja definisanje strukture i osobina faznog prostora (ili dela faznog prostora) kojima se definiše matrica. Zbog toga je potrebno ispitati uticaj spo-

ljašnjih parametara na dinamiku BL reakcije, odrediti kritične vrednosti parametara pri kojima se menja dinamika sistema i utvrditi način na koji se ista menja. Ovakva analiza zove se bifurkaciona analiza, a skup podaka (bifurkacioni dijagram, slika 2) dobijenih primenom ovakve analize odražava dinamičku strukturu matrice pri ispitivanim uslovima. Različite dinamičke strukture koje nastaju u reakciji su stabilne i mogu se održavati u nekom konačnom vremenskom intervalu, ili se mogu trenutno menjati promenom nekog kontrolnog (bifurka-

cionog) parametra (temperatura, specifična brzina protoka ili koncentracija reaktanata). Do prelaza iz jedne dinamičke strukture u drugu dolazi za određenu, kritičnu vrednost bifurkacionog parametra (bifurkaciona tačka) kao kontrolnog parametra. U blizini bifurkacione tačke sistem je ekstremno osetljiv na različite perturbacije s obzirom na to da se nalazi u okolini dva bliska atraktora. Kao posledica toga, dodatak analita može poremetiti kreirani, ekstremno delikatan balans i indukovati merljive promene u dinamici sistema. Upravo ova karakteristika dinamičkih sistema može biti iskorišćena u analitičke svrhe, a razvoj senzitivnih analitičkih metoda dodatno povećava interesovanje za nelinearne sisteme.



Slika 2. Bifurkacioni dijagram dobijen variranjem temperature pri sledećim eksperimentalnim uslovima: $[KIO_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2SO_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2]_0 = 2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ i specifičnoj brzini protoka $j_0 = 2,95 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Tačkama su označene vrednosti potencijala u stacionarnom stanju, a kružićima ekstremne vrednosti potencijala u oscilatornom režimu. Bifurkaciona tačka se javlja pri vrednosti bifurkacionog parametra, $t = 43,2 \text{ } ^\circ\text{C}$. Strelicama su označena dinamička stanja koja se perturbuju analitom [47].

Figure 2. Bifurcation diagrams obtained by varying temperature for experimental conditions: $[KIO_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2SO_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2]_0 = 2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ and specific flow rate, $j_0 = 2,95 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Solid circles denote potential values of stationary states while open circles denote extreme values of potential in oscillations. Bifurcation point is obtained for value of bifurcation parameter of $t = 43,2 \text{ } ^\circ\text{C}$. Dynamic states that are perturbed are indicated by arrows [47].

Primer jednog bifurkacionog dijagrama prikazan je na slici 2. U ovom slučaju [49], dinamičko ponašanje BL matrice, realizovane u protočnom reaktoru, ispitano je variranjem temperature kao bifurkacionog (kontrolnog) parametra u intervalu od 30,0 do 46,0 $^\circ\text{C}$, dok su ostali parametri konstantni: $[KIO_3] = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2SO_4] = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, i $[H_2O_2] = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ i $j_0 = 2,95 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ [49]. Tačke na bifurkacionom dijagramu (slika 2), označavaju stacionarna stanja sistema (za temperaturski interval, $30,0 \leq t \leq 43,3 \text{ } ^\circ\text{C}$, dok su kružićima predstavljene ekstremne vrednosti potencijala koje se ostvaruju tokom prostih periodičnih oscilacija (za $t \geq 44,6 \text{ } ^\circ\text{C}$). Za date eksperimentalne uslove, bifurkaciona tačka odgovara temperaturi, $t = 43,2 \text{ } ^\circ\text{C}$,

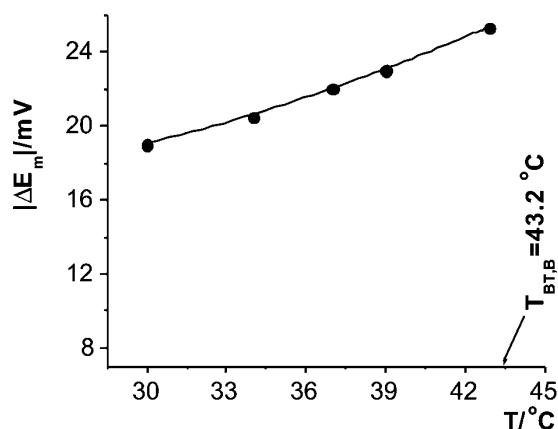
tako da se za dalju analizu biraju neravnotežna stabilna stacionarna stanja u neposrednoj okolini nađene bifurkacione tačke, što u konkretnom slučaju odgovara temperaturama, 30,0, 34,0, 37,0, 39,0 i 42,9 $^\circ\text{C}$ [49].

Za analitičku proceduru nije neophodno odrediti tip nađenih bifurkacionih tačaka; ipak, takva vrsta analize je značajna, kako sa naučne tačke gledišta, tako i s obzirom na činjenicu da osetljivost matričnog sistema zavisi od karakteristika nađenih bifurkacija i tipova bifurkacionih tačaka [32].

Perturbaciona analiza

Pojam „perturbacije sistema“ podrazumeva sve poremećaje u sistemu do kojih dolazi kada se na sistem deluje nekim spoljašnjim faktorom. Najčešći i najjednostavniji način perturbacija je pobuđivanje sistema trenutnim unošenjem analita u sistem (koncentraciona perturbacija). Perturbacije matričnog sistema mogu se vršiti na različite načine (u zavisnosti od dužine trajanja koncentracionih perturbacija) i u različitim dinamičkim stanjima matričnog sistema. U našem metodu, vrše se pulsne perturbacije (pobuđivanje matričnog sistema vrši se impulsivno, kratkotrajnim dejstvom perturbatora) matričnog sistema koji se nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju, u okolini bifurkacione tačke.

Sledeći korak u PPOSSS proceduri je ispitivanje uticaja izabranih dinamičkih stanja na osetljivost matričnog sistema. Ova dinamička stanja se testiraju s ciljem nalaženja maksimalnog odgovora matrice na ispitivani analit, odnosno nalaženja optimalne injektirajuće tačke. Pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [49], neravnotežna stabilna stacionarna stanja dobijena na temperaturama 30,0, 34,0, 37,0, 39,0 i 42,9 $^\circ\text{C}$, koja se perturbuju analitom određene koncentracije, prikazana su strelicama na slici 2. Eksperimentalno je utvrđeno da se sa udaljavanjem od bifurkacione tačke smanjuje osetljivost matričnog sistema na prisustvo analita (slika 3), što se pokazalo kao pravilo i pri drugim eksperimental-



Slika 3. Uticaj temperature na analitički signal. Injektirana koncentracija askorbinske kiseline je 0,3 μmol [47].
Figure 3. Influence of temperature on the analytical signal. Injected concentration of ascorbic acid is 0.3 μmol [47].

nim uslovima [33,41–49]. Na primer, pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [49], optimalna injektirajuća tačka odgovara temperaturi, $t = 42, 9^\circ\text{C}$. Na ovoj temperature matični sistem je dovoljno blizu bifurkacione tačke ($t = 43,2^\circ\text{C}$) tako da su sve pomenute prednosti ispitivanja u njenoj okolini sačuvane; s druge strane, matični sistem je i dovoljno udaljen od bifurkacione tačke, tako da male spontane fluktuacije ne dovode do prelaza matičnog sistema u oscilatorni režim.

Nakon izabrane optimalne injektirajuće tačke, matični sistem, koji se nalazi u odgovarajućem neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju u blizini bifurkacione tačke, perturbuje se različitim koncentracijama ispitivanog analita. Tako su na slici 4 dati tipični odzivi matičnog sistema pri optimizovanim uslovima [49], na pulsne perturbacije različitim količinama askorbinske kiseline. Odgovor matrice je ispitivan injektiranjem različitih količina askorbinske kiseline, kada se matrica nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju (slika 4, oblasti II i III). Na slici 4, oblast I odgovara tranzijentnim oscilacijama matičnog sistema koje se dobijaju pri određenim eksperimentalnim uslovima: $[\text{KIO}_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-3}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ i $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-3}$, $j_0 = 2,95 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ i $t = 60^\circ\text{C}$ (procedura pripreme BL matrice za kvantitativna određivanja); snižavanjem temperature (na $t = 42,9^\circ\text{C}$) i pri istim ostalim eksperimentalnim uslovima, oscilacije se gube (nakon $\approx 20 \text{ min}$) i matični sistem se nalazi u željenom stabilnom stacionarnom stanju (oblast II) koje se ispituje. Na ovaj način se, pre svakog eksperimenta (tj. perturbacije ispitivanog stabilnog stacionarnog stanja), verifikuje valjanost pripremne procedure, kao i ko-

rišćenih hemikalija (detaljno opisane eksperimentalne procedure date su u radovima [33,41–49]).

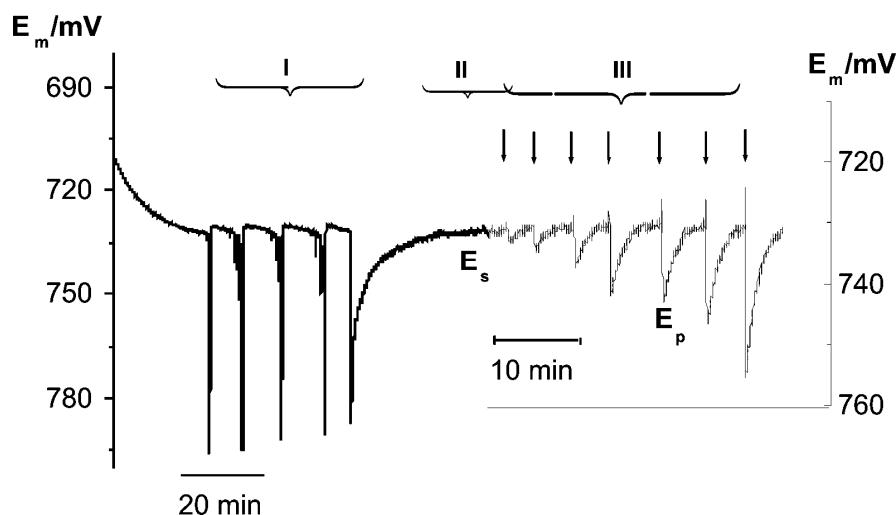
Kvantitativno određivanje analita

Primena perturbacione tehnike za kvantitativno određivanje nepoznatih koncentracija analita zasnovano je na postojanju funkcionalne veze između količine (ili koncentracije) analita i veličine, ili oblika pobude matičnog sistema. Tako, iz kalibracione krive dobijene za niz standardnih rastvora, koja pokazuje zavisnost odgovarajućih veličina koje odražavaju pobudu sistema u funkciji koncentracije analita, može se odrediti njegova nepoznata koncentracija. Opisani postupak je uobičajen i generalan u kvantitativnoj analizi.

Analitički signal u PPOSSS metodi je maksimalna promena potencijala (u mV) koja je definisana kao razlika potencijala: $\Delta E_m = E_p - E_s$, gde je E_p ekstremna vrednost potencijala nakon izvršene perturbacije, a E_s je potencijal koji odgovara stabilnom stacionarnom stanju pre izvršene perturbacije (slika 4). Maksimalna promena potencijala (analitički signal) proporcionalna je dodatnoj količini ispitivanog analita. Zavisnost ΔE_m od logaritma koncentracije ispitivanog analita se linearizuje metodom najmanjih kvadrata, pri čemu se dobija linearni opseg koncentracije ispitivanog analita, regresiona jednačina i korelacioni koeficijent. Analitički najbolje vrednosti, dobijene primenom PPOSSS procedure, za analite koji su ispitivani u našoj laboratoriji dati su u tabeli 2.

Validacija predložene metode

Validnost predloženog metoda se vrši u skladu sa ICH (International Conference on Harmonization guide-



Slika 4. Tranzijentne oscilacije (zona I) i stabilno stacionarno stanje (zona II) dobijene pri eksperimentalnim uslovima datim u radu 47, kao i tipični potenciometrijski zabeleženi odgovori matičnog BL sistema dobijeni nakon njegove perturbacije askorbinskom kiselinom (zona III). Strelice označavaju momente u kojima se u matični sistem injektira (sa leva na desno) 0,008, 0,01, 0,014, 0,034, 0,04, 0,075 i 0,3 μmol askorbinske kiseline, respektivno.

Figure 4. Transition oscillations (zone I) and stable stationary state (zone II) obtained for the experimental conditions given in reference 47, as well as typical potentiometric responses of the BL matrix, obtained after its perturbing with ascorbic acid (zone III). Arrows indicate the moments at which (from left to right) 0.008, 0.01, 0.014, 0.034, 0.04, 0.075 and 0.3 μmol of ascorbic acid were injected, respectively.

Tabela 2. Karakteristični parametri kalibracionih dijagrama i analitički najbolje vrednosti određivanja nekih analita primenom PPOSSS metoda [33,38,39, 43–49,54]

Table 2. Characteristic parameters of calibration plots and analytical figures of merit for determination of some analytes by means of PPOSSS method [33,38,39, 43–49,54]

Analit	Literatura	Linearni opseg	Regresiona jednačina ^a			LOD ^d	LOQ ^e	RSD ^f %	ST ^g uzoraka/h
			$Y = A + B^b \log X$						
			A	B	r ^c				
Cl ⁻	33 ^h	1,3×10 ⁻⁶ –1,6×10 ⁻⁴	–	–	–	1,3 × 10 ⁻⁶	–	–	–
Br ⁻	33 ^h	1,0×10 ⁻⁶ –8,3×10 ⁻⁵	–	–	–	1,0 × 10 ⁻⁶	–	–	–
I ⁻	33 ^h	2,0×10 ⁻⁶ –1,0×10 ⁻⁴	–	–	–	2,0 × 10 ⁻⁶	–	–	–
Mn ²⁺	33 ^h	8,4×10 ⁻⁷ –8,3×10 ⁻⁵	–	–	–	8,4 × 10 ⁻⁷	–	–	–
Malonska kiselina	33 ^h	3,8×10 ⁻⁷ –2,1×10 ⁻⁵	–	–	–	3,8 × 10 ⁻⁷	–	–	–
Kvercetin	33 ^h , 38 ^h	1,5×10 ⁻⁸ –3,7×10 ⁻⁵	–80	–9	0,980	1,5 × 10 ⁻⁸	–	3,7	–
	44 ^h	6,7×10 ⁻⁹ –2,7×10 ⁻⁵	–71,7	–8,4	0,998	6,7 × 10 ⁻⁹	–	–	–
Fe ³⁺	39 ^h	1,3×10 ⁻⁸ –6,0×10 ⁻⁶	78,0	10,0	0,993	3,2 × 10 ⁻⁸	–	–	–
Rutin	43 ^h	7,8×10 ⁻⁸ –9,1×10 ⁻⁶	–117	–16,0	0,997	3,6 × 10 ⁻⁸	–	3,4	–
Paracetamol	46 ⁱ	0,0085–1,5	–100,5	–11,4	0,999	0,003	0,008	2,4	–
Asorbinska kiselina	49 ⁱ	0,01–1,0	33,5	15,1	0,998	0,009	0,016	5,2	30
		0,01–0,40	17,3	6,0	0,999	0,008	0,017	5,4	25
Hesperidin	45 ^j	7,5–599,4	4,5	–9,9	0,998	0,65	–	3,1	12
Morfin	47 ⁱ	0,004–0,18	50,0	23,8	0,999	0,007	0,015	1,5	45
		0,087–0,58	38,5	28,5	0,999	0,03	0,09	1,2	15
		0,01–0,45	45,0	22,1	0,998	0,007	0,015	2,1	35
6- <i>O</i> -Acetilmorfin	48 ^j	2,3–153,0	0,1	–12,2	0,999	0,9	2,5	1,8	40
Tiamin	54 ⁱ	0,01–1,0	17,6	8,4	0,999	0,01	5,1	1,8	30

^aY, maksimalna promena potencijala (u mV) i X, koncentracija analita; ^binstrumentalna osetljivost (mV/dekadi); ^cKorelacioni koeficijent; ^dlimit detekcije definisan kao koncentracija analita za koju je odnos signal–šum = 3; ^elimit kvantifikacije definisan kao koncentracija analita za koju je odnos signal–šum = 10; ^frelativna standardna devijacija (srednja vrednost); ^gbroj određivanja u jedinici vremena definisan kao broj uzoraka koji se može analizirati analitičkom metodom za određeno vreme (uzorci h⁻¹); ^hdinamička koncentracija (u mol L⁻¹); ⁱinjektirana ukupna količina analita u promenljivim zapreminama standarda (u μmol); ^jdinamička koncentracija (u μg mL⁻¹)

^aY, maximal potential shift (mV) and X, analyte concentration; ^binstrumental sensitivity (mV decade⁻¹); ^ccorrelation coefficient; ^dlimit of detection established at a signal-to-noise ratio of 3; ^elimit of quantification established at a signal-to-noise ratio of 10; ^frelative standard deviation (average value); ^gsample throughput is defined as number of samples that can be analyzed using the analytical method for specific time; ^hdynamic concentrations of analytes (in mol L⁻¹); ⁱinjected total amount of analyte in the variable aliquots of standard samples (in μmol); ^jdynamic concentration (in μg mL⁻¹)

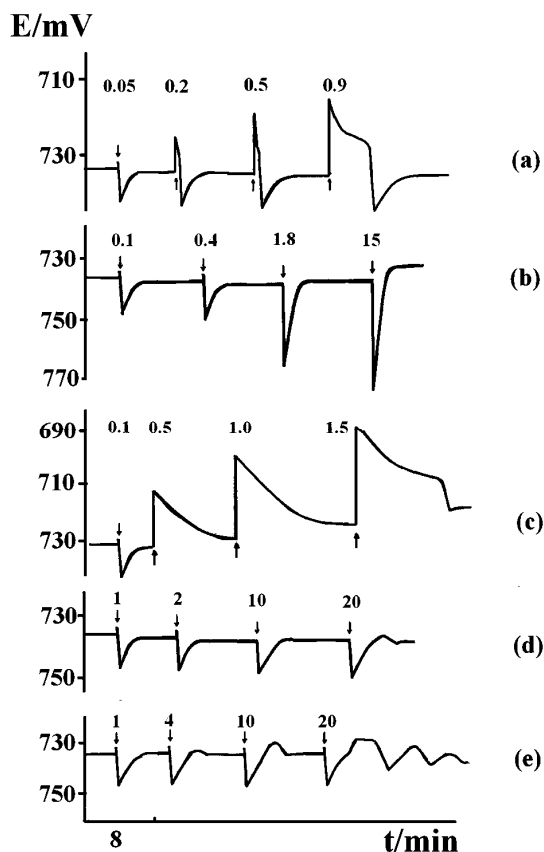
lines). U vezi sa tim, određuju se analitički parametri validacije, kao što su: linearnost, opseg, granica detekcije, granica kvantifikacije, tačnost, preciznost i specifičnost (selektivnost).

S obzirom na to da su oscilatorne reakcije izuzetno osetljive na prisustvo eksternih supstancija (perturbacije), izuzetno je važno ispitati uticaj drugih supstancija (interferenata) koji mogu biti prisutni u složenim uzorcima koji se analiziraju predloženom PPOSSS tehnikom. Zbog toga se matični sistem perturbuje smešom koja sadrži ispitivani analit konstantne koncentracije i interferent čija se koncentracija sukcesivno povećava, i poredi analitički signal dobijen injektiranjem ispitivanog analita sa analitičkim signalom koji je dobijen injektiranjem pomenute smeše. Ako promene u analitičkom signalu nisu veće od ±5%, može se smatrati da dati interferent nema uticaja na analitičko određivanje ispitivanog analita. Na slici 5 prikazani su rezultati ovakve analize pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [49]. Vrlo je važno uočiti da se u nekim slučajevima

(slike 5a, 5c i 5e), u prisustvu drugih supstancija menja i oblik odgovora matrice, bez promene vrednosti analitičkog signala, tj. ΔE_m . Ovo može biti jako važno za moguće identifikacije ispitivanih supstancija u bilo kom kompleksnom uzorku. Za ilustraciju prethodnog mogu da posluže rezultati prikazani na slici 6, dobijeni perturbovanjem neravnotežnog stacionarnog stanja BL matrice urinom i čistom mokraćnom kiselinom, pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [49].

U slučaju analize askorbinske kiseline u uzorku urina, odgovor matrice je kompleksan (slika 6, kriva a) i po obliku odgovara onom koji je dobijen kada se BL matrica perturbuje smešom askorbinske kiseline i mokraćne kiseline (slika 5, kriva a). Očigledno, početni nagli pad potencijala do neke minimalne vrednosti i naknadni porast potencijala do vrednosti E_p koji predstavlja maksimalnu dostignutu vrednost potencijala, odgovara mokraćnoj kiselini (slika 6, kriva b) i askorbinskoj kiselini, redom. Šta više, dok analitički signal mokraćne kiseline raste sa porastom njene koncentracije do $TR = 0,8$,

analitički signal askorbinske kiseline je skoro konstantan (slika 5, kriva a). Na osnovu ovoga se može zaključiti da su matrični odgovori mokraćne kiseline i askorbinske kiseline nezavisni, tj. odgovori matrice na perturbacije urinom, kao kompleksnim uzorkom, mogu se razdvojiti. Ovo je takođe važno za razvijanje metoda za simultano određivanje mokraćne kiseline i askorbinske kiseline u bilo kom kompleksnom uzorku, što će biti naš predmet ispitivanja u budućem radu.



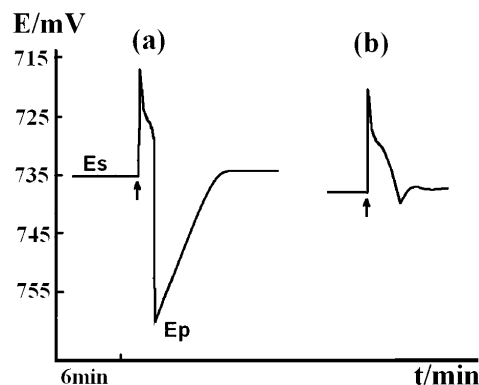
Slika 5. Tipični potenciometrijski zabeleženi odgovori matričnog sistema dobijeni injektiranjem $0.025 \mu\text{mol}$ askorbinske kiseline u prisustvu nekih interferenata: mokraćne kiseline (a), tijamina (b), paracetamola (c), HIO_3 (d) i limunske kiseline (e). Tolerišući odnos, TR (odnos koncentracije interferenta i koncentracije askorbinske kiseline), raste sa leva na desno. Strelice označavaju momente injektiranja smeše interferenta i askorbinske kiseline u matricu [47].

Figure 5. Typical signal profile of matrix system provided by addition of $0.025 \mu\text{mol}$ ascorbic acid in the presence of some interferents: (a) uric acid, (b) vitamin B1, (c) paracetamol, (d) HIO_3 and (e) citric acid. The tolerable [interferent]/[AA] (M/M) ratios, denote as TR, are increased from left to right. The arrows indicate moments at which the mixture of AA and interferent were injected in the matrix.

Primena predloženog analitičkog metoda

Pokazalo se da predloženi PPOSSS metod može biti korisna analitička alatka za određivanje različitih supstancija kako u čistim uzorcima, tako i u smešama

[33,38–54], ali i mnogo kompleksnijim uzorcima kao što su lekovi [41,43,44–47,49,52–54], hrana (sok, vino) [41,45], biološke tečnosti (urin) [49], kao i zaplenjeni ulični uzorci [48].



Slika 6. Tipične krive odgovora dobijene nakon perturbacija stacionarnog stanja BL izvršenih dodavanjem urina (a) i $0.0044 \mu\text{mol}$ čiste mokraćne kiseline, pri eksperimentalnim uslovima datim u referenci 47. Strelice označavaju moment injektiranja.

Figure 6. Typical response curves obtained after perturbing the stationary state in the BL reaction by adding the human urine (a) and pure uric acid concentration of $0.0044 \mu\text{mol}$ (b), for the experimental conditions given in reference 47. Arrows indicate the moment at which ascorbic acid was injected.

Naši rezultati pokazuju da se dobija zadovoljavajuća tačnost predloženog analitičkog metoda („rikaveri“ vrednosti, RCV, su u granicama $\pm 5\%$ (Ph EUR 97). Neki od dobijenih rezultata koji se odnose na analizu askorbinske kiseline [49], hesperidina [45] i 6-O-acetilmorfina [48] u složenim uzorcima dati su u tabeli 3.

Interakcija ispitivanog analita sa BL matricom

Predloženim PPOSSS metodom mogu se analizirati različite supstancije. Ispitivani analiti mogu biti oni koji su esencijalni za dobijanje oscilacija i postoje kao reaktanti, intermedijeri, ili produkti u matrici. S druge strane, PPOSSS procedurom mogu se analizirati i supstancije koje nisu direktni učesnici reakcija koje čine mehanizam oscilatornog razlaganja vodonik-peroksida, ali isti moraju reagovati sa nekom od komponenti matrice.

Za praktičnu analitičku primenu predloženog metoda nije potrebno poznavati mehanizam reagovanja analita i matrice. Ipak, rasvetljavanje mehanizma njihovog reagovanja može biti vrlo korisno istraživačima koji se bave matematičkim modeliranjem reakcija kao vodič u sistematskom nalaženju ulova pri kojima se, primenom PPOSSS metoda, dobijaju najniži detekcioni limiti, ili najveće osetljivosti metode. Međutim, ovo nije lak posao s obzirom na to da su mehanizmi po kojima se odvijaju oscilatorne reakcije vrlo složeni i nedovoljno jasni. Ipak, iako složen, model mehanizma BL oscilatorne reakcije je predložen i detaljno ispitan [56,61]. Model mehanizma BL matrice koji se sastoji iz osam reakcija

[61], predstavlja osnovnu formu za matematičko modelovanje interakcije ispitivanog analita i BL matrice. Na osnovu literaturnih podataka, kao i dodatnih eksperimentalnih istraživanja [45,47–49], najpre se pretpostavlja sa kojim ingredijentom matrice može da reaguje ispitivani analit, a zatim se set reakcija koje čine model BL matrice, proširuje pretpostavljenom reakcijom. Validnost ovog novog modela reagovanja ispitivanog analita sa BL matricom se testira u numeričkim simulacijama, a dobijeni rezultati porede sa eksperimentalno dobijenim, kao što je detaljno objašnjeno u literaturi [47,49]. Rezultati naših istraživanja pokazuju da se ovim pristupom dobijaju odlična kvalitativna i kvantitativna slaganja između eksperimentalno dobijenih i simuliranih rezultata: oblik odgovora matrice, kao i relaksaciona vremena su skoro identična, i analitički parametri metode su uporedivi sa eksperimentalno određenim. U vezi sa ovim, na slici 7 prikazani su rezultati numeričke simulacije pri eksperimentalnim uslovima datim u referenci [49]. Ovakva slaganja između numerički i eksperimentalno dobijenih rezultata [47,49], ukazuju na to da predloženi modeli mehanizma, iako vrlo uprošćeni, odlično opisuju dinamiku interakcije ispitivanih analita (askorbinske kiseline i morfina) sa BL matricom, tako

da mogu biti polazna tačka za dalju optimizaciju PPOSSS metode.

ZAKLJUČAK

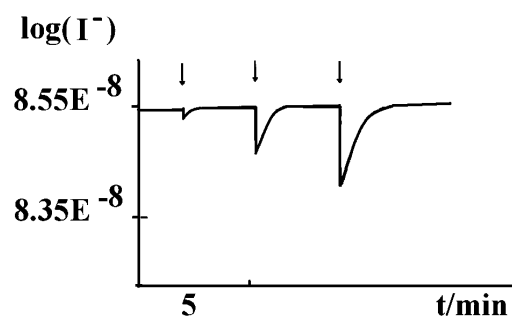
Rezultati istraživanja primene oscilatornih reakcija u analitičke svrhe, objavljeni u poslednjih desetak godina, pokazuju da APP tehnika i korišćenje vrlo osetljivih oscilatornih hemijskih sistema, kao matrica, dovodi do skoro perfektnih analitičkih metoda koje se sve više priznaju kao vrlo korisne i pogodne za kvantitativna određivanja različitih analita.

Dosadašnji objavljeni rezultati naše istraživačke grupe nedvosmisleno pokazuju svrsishodnost korišćenja BL oscilatorne matrice, koja se nalazi u stabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju u blizini bifurkacione tačke, za analitička određivanja različitih analita, kako u čistim, tako i u složenim uzorcima (farmaceutski doziranim, hrani, biološkim tečnostima). Razvijeni analitički metod je jednostavan i jeftin; rezultati su tačni i precizni, a poboljšanja postignuta primenom ovog metoda su vezana za skraćivanje vremena potrebnog za kompletnu analizu uzorka. PPOSSS metod je prihvatljivo selektivan, a vodeće ograničenje metode, u nekim slučajevima,

Tabela 3. Određivanje nekih analita u različitim kompleksnim uzorcima (farmaceutski dozirani oblici, urin i sakupljeni ulični uzorak) [43,45,47–49,54]

Table 3. Determination of some analytes in different complex samples (pharmaceutical preparation, urine and seized street drug samples) by means of PPOSSS method [43,45,47–49,54]

Analit	Uzorak	Nađena količina	$RCV \pm RSD / \%$	Literatura
Askorbinska kiselina	Urin	$(146,1 \pm 8,6) \text{ mg}$ 100mL	$103,8 \pm 7,5$	49
	Farmaceutski dozirani oblik, efervete (Hemofarm, Vršac, Srbija)	$(996,5 \pm 62,2) \text{ mg}$	$101,7 \pm 5,7$	49
Hesperidin	Sok (industrijski)	$(166,3 \pm 6,2) \mu\text{g mL}^{-1}$	$101,2 \pm 3,9$	45
	Sok (ručno ceđen)	$(223,5 \pm 73,9) \mu\text{g mL}^{-1}$	$99,5 \pm 3,2$	45
	Belo vino	$(10,1 \pm 0,4) \mu\text{g mL}^{-1}$	$101,8 \pm 4,1$	45
6-O-Acetilmorfin	Zaplenjeni ulični uzorak	$(9,6 \pm 0,5) \mu\text{g mL}^{-1}$	$98,1 \pm 1,8$	48
Morfin	Farmaceutski doziran oblik, injekcije (Alkaloid, Skoplje, FYR Makedonija)	$(19,7 \pm 0,3) \mu\text{g mL}^{-1}$	$102,3 \pm 1,1$	47
Rutin	Farmaceutski dozirani oblik, tablete (Rutinon forte)	$(98,4 \pm 2,3) \text{ mg}$	$98,4 \pm 2,5$	43
Vitamin B1 (tiamin)	Farmaceutski dozirani oblik, tablete (Srbolek, Beograd, Srbija)	$(12,7 \pm 0,6) \text{ mg}$	$103,2 \pm 4,8$	54



Slika 7. Numerički simulirana vremenska evolucija jodidne koncentracije pri eksperimentalnim uslovima datim u referenci 47. Strelice označavaju momente u kojima je (sa leve strane na desnu) 0,05, 0,4 i 1,0 μmol askorbinske kiseline injektirano u matricu, respektivno.

Figure 7. Numerically simulated time evolution of the iodide concentration under the experimental conditions that are given in reference 47. The arrows indicate moments at which (from left to right) 0.05, 0.4 and 1.0 μmol ascorbic acid was injected, respectively.

su izražene interferencije nekih supstancija koje su zajedno sa analitom prisutne u uzorku. Ipak, naši rezultati pokazuju da je predloženi PPOSSS metod vrlo pogodan za rutinske analize farmaceutski doziranih oblika, pri čemu nije potreban nikakav predtretman uzorka, osim njegovog rastvaranja.

Prednosti opisanih pristupa u našim radovima u odnosu na korišćenje matrice koja se nalazi u oscilatornom režimu su pojednostavljivanje procedure i značajno skraćivanje vremena koje je potrebno za izvođenje cele analize, s obzirom na to da nije potrebno testirati oscilatorne faze za najbolji odgovor na perturbacije, niti meriti njihove frekvencije. Takođe, pored mogućnosti određivanja mikrokoličina analita prisutnih u mikrozapreminama uzorka, granice detekcije mernih senzora su pomerene za nekoliko redova veličine. Pored ovoga, proširena je primenljivost mernih elektroda za određivanje koncentracija i onih reakcionih vrsta na koje nisu direktno osetljive.

Poboljšanja postignuta primenom PPOSSS procedure su posebno značajna s obzirom na široku rasprostranjenost primene potenciometrijskih merenja u svakodnevnim rutinskim analizama, kao na primer u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, laboratorijama za kontrolu kvaliteta, istraživačkim laboratorijama, itd.

Svaki do sada objavljeni rad otvara nove mogućnosti za buduća naučna, ali i primenjena istraživanja. Svakako da će buduća istraživanja iz ove oblasti omogućiti nalaženje novih, optimalnijih eksperimentalnih uslova za izvođenje PPOSSS procedure, novih analita kao i realnih uzoraka koji se mogu analizirati ovom metodom, omogućiti razvijanje novih procedura za simultano određivanje više analita, doprineti potpunijem razumevanju mehanizma po kome ispitivani analit reaguje sa matricom, kao i usmeriti teorijsku analizu predloženih modela.

Zahvalnost

Autor se zahvaljuje Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (projekat br. 142025) na finansijskoj podršci.

LITERATURA

- [1] Lj. Kolar-Anić, S. Anić, *Dinamika nelinearnih procesa*, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2004.
- [2] Lj. Kolar-Anić, S. Anić, V. Vukojević, *Nauka Tehnika Bezbednost* **2** (2003) 11–25.
- [3] L.P. Tichonova, L.N. Zakrevskaya, K.B. Yatsimirskii, *J. Anal. Chem. USSR* **33** (1978) 1991–1998.
- [4] B.P. Belousov, *Sbornik referatov po Radiatsionni Meditsine*, Medgiz, Moscow, 1958, p. 145.
- [5] R. Jimenez-Prieto, M. Silva, D. Perez-Bendito, *Analyst* **23** (1998) 1R–8R.
- [6] J. Gao, *Pakistan J. Biol. Sci.* **8** (2005) 512–519.
- [7] R. Jiménez-Prieto, M. Silva, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* **67** (1995) 729–734.
- [8] R. Jiménez-Prieto, M. Silva, D. Pérez-Bendito, *Analyst* **122** (1997) 287–292.
- [9] R. Jiménez-Prieto, M. Silva, D. Pérez-Bendito, *Talanta* **44** (1997) 1463–1472.
- [10] R. Jimenez-Prieto, M. Silva, D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* **321** (1996) 53–60.
- [11] R. Jimenez-Prieto, M. Silva, D. Perez-Bendito, *Analyst* **121** (1996) 563–570.
- [12] R. Jimenez-Prieto, M. Silva, D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* **334** (1996) 323–330.
- [13] Y. Ke, M. Wanhong, C. Ruxiu, L. Yhixin, G. Nanqin, *Anal. Chim. Acta* **413** (2000) 115–123.
- [14] N. Gan, R. Cai, Z. Lin, *Anal. Chim. Acta* **466** (2002) 257–260.
- [15] Z. Gao, J. Ren, W. Yang, H. Liu, H. Jang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003) 393–400.
- [16] J. Wang, S. Yang, R. Cai, Z. Lin, Z. Liu, *Talanta* **65** (2005) 799–805.
- [17] J. Gao, G. Zhao, Z. Zhang, J. Zhao, W. Yang, *Microchim. Acta* **157** (2007) 35–40.
- [18] J. Gao, H. Chen, H. Dai, D. Lv, J. Ren, L. Wang, W. Yang, *Anal. Chim. Acta* **571** (2006) 150–155.
- [19] J. Gao, L. Wang, W. Yang, F. Yang, *J. Braz. Chem. Soc.* **17** (2006) 458–462.
- [20] G. Hu, P. Chen, W. Wang, L. Hu, J. Song, L. Qiu, J. Song, *Electrochim. Acta* **52** (2007) 7996–8002.
- [21] J. Gao, J. Ren, W. Yang, X. Liu, H. Zang, Q. Li, H. Deng, *J. Electroanal. Chem.* **520** (2002) 157–161.
- [22] P.E. Strizhak, O.Z. Didenko, T.S. Ivashchenko, *Anal. Chim. Acta* **428** (2001) 15–21.
- [23] P. Chen, G. Hu, W. Wang, J. Song, L. Qiu, H. Wang, L. Chen, J. Zhang, L. Hu, *J. Appl. Electrochem.* **38** (2008) 1779–1783.
- [24] G. Nicolis, I. Prigogine, *Self-Organization in Nonequilibrium System*, Wiley, New York, 1977.
- [25] R.J. Field, M. Burger, (Eds.) *Oscillations and Traveling Waves in Chemical System*, Wiley, New York, 1985.
- [26] P. Gray, S. Scott, *Chemical Oscillations and Instabilities: Nonlinear Chemical Kinetics*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- [27] S. Scott, *Chemical Chaos*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
- [28] D. Perez-Bendito, M. Silva, *Kinetic Methods of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 1988.
- [29] J. Chopin-Dumas, *Acad. Sc. Paris C* **287** (1978) 553–556.
- [30] V. Vukojević, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *J. Phys. Chem.* **104** (2000) 10731–10739.
- [31] M. Milošević, N. Pejić, Ž. Čupić, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *Mater. Sci. Forum* **494** (2005) 369–374.
- [32] N. Pejić, J. Maksimović, D. Ribić, Lj. Kolar-Anić, *Russ. J. Phys. Chem.* **83** (2009) 1666–1671.
- [33] V. Vukojević, N. Pejić, D. Stanisavljev, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *Analyst* **124** (1999), 147–152.
- [34] W.C. Bray, *J. Am. Chem. Soc.* **43** (1921) 1262–1267.
- [35] W.C. Bray, H.A. Liebhafsky, *J. Am. Chem. Soc.* **53** (1931) 38–44.
- [36] P. Graae Sørensen, F. Hynne, K. Nielsen, *React. Kinet. Catal. Lett.* **42** (1990) 309–315.

- [37] V. Vukojević, P. Graae Sørense, F. Hynne, J. Phys. Chem. **97** (1993) 4091–4100.
- [38] V. Vukojević, N. Pejić, D. Stanisavljev, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *Pharmacie* **56** (2001) 1.
- [39] N. Pejić, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, D. Stanisavljev, M. Kuzmanović, J. Čirić, *Environ. Sci. Pollut. Res., Special Issue*, **3** (2002) 300.
- [40] J. Čirić, N. Pejić, S. Milenković, M. Erceg, *Expertus Forensis* **1** (2003) 76–81.
- [41] N. Pejić, S. Blagojević, *Nauka Tehnika Bezbednost* **2** (2003) 81–88.
- [42] N. Pejić, S. Anić, M. Mijatović, S. Milenković, J. Čirić, T. Grozdić, *Nauka Tehnika Bezbednost* **1** (2003) 67–74.
- [43] N. Pejić, S. Anić, V. Kuntić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, *Micro. Chim. Acta* **143** (2003) 261–267.
- [44] N. Pejić, B. Perišić, *Nauka Tehnika Bezbednost* **1** (2004) 37–48.
- [45] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, *Anal. Bioanal. Chem.* **381** (2005) 775–780.
- [46] N. Pejić, Lj. Kolar-Anić, S. Anić, D. Stanisavljev, J. Pharm. Biomed. Anal. **41** (2006) 610–615.
- [47] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, V. Vukojević, M. Mijatović, J. Čirić, Z. Marković, S. Marković, Lj. Kolar-Anić, *Anal. Chim. Acta* **582** (2007) 367–374.
- [48] N. Pejić, S. Blagojević, J. Vukelić, Lj. Kolar-Anić, S. Anić, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **80** (2007) 1942–1948.
- [49] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007) 2009–2017.
- [50] N. Pejić, J. Čirić, S. Milenković, M. Mijatović, T. Grozdić, B. Janković, S. Anić, In: *Physical Chemistry 2002*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2002, p. 233.
- [51] N. Pejić, S. Anić, M. Mijatović, V. Vukojević, In: *Physical Chemistry 2002*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2002, p. 236.
- [52] N. Pejić, M. Milošević, V. Vukojević, In: *Selforganization in Nonequilibrium Systems 2004*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2004, p. 194.
- [53] N. Pejić, Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, M. Milošević, in *Selforganization in Nonequilibrium Systems 2004*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2004, p. 119.
- [54] J. Maksimović, N. Pejić, D. Ribić, Lj. Kolar-Anić, in *Physical Chemistry 2008*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2008, p. 232.
- [55] G. Schmitz, *J. Chim. Phys.* **84** (1987) 957–965.
- [56] Lj. Kolar-Anić, G. Schmitz, *J. Chem. Faraday Trans.* **88** (1992) 2343–2349.
- [57] Lj. Kolar-Anić, Ž. Čupić, S. Anić, G. Schmitz, *J. Chem. Faraday Trans.* **93** (1997) 2147–2152.
- [58] G. Schmitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2** (2000) 4041–4044.
- [59] S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *J. Chem. Faraday Trans.* **84** (1988) 3413–3421.
- [60] S. Anić, Lj. Kolar-Anić, D. Stanisavljev, N. Begović, D. Mitić, *React. Kinet. Catal. Lett.* **43** (1991) 155–162.
- [61] Lj. Kolar-Anić, Đ. Mišljenović, S. Anić, G. Nicolis, *React. Kinet. Catal. Lett.* **54** (1995) 35–41.
- [62] D. Edelson, R. Noyes, *J. Phys. Chem.* **83** (1979) 212–220.
- [63] P. Ševčík, Lj. Adamčíková, *Chem. Phys. Lett.* **267** (1997) 307–312.
- [64] S. Anić, Lj. Kolar-Anić, *Ber. Bunsen-ges. Phys. Chem.* **90** (1987) 1084–1086.
- [65] L. Treindl, R. Noyes, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 11354–11362.
- [66] N. Pejić, Ž. Čupić, S. Anić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, *Sci. Sint.* **33** (2001) 107–115.
- [67] Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, N. Pejić, T. Grozdić, S. Anić, in: *Experimental Chaos*, S. Boccaletti, B.J. Gluckman, J. Kurths, L. Pecora, R. Meucci, Q. Yordanov (Eds.), American Institute of Physics, AIP Conference Proceedings, Melville, New York, 2004.

SUMMARY**ANALYTICAL APPLICATIONS OF PULSE PERTURBATION METHOD OF BRAY-LIEBHAFSKY OSCILLATORY REACTION REALIZED IN THE OPEN REACTOR**

Nataša D. Pejić

Faculty of Pharmacy, Institute for Physical Chemistry, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade

(Review paper)

This paper gives some recently published data of our research group related to application of the Bray-Liebhafsky (BL) oscillatory reaction (the reaction of catalytic decomposition of hydrogen peroxide in presence of both H^+ i IO_3^-) in analytical purposes. Regarding the extreme sensitivity of nonlinear chemical systems on small changes of external factors, such as temperature, inflows, light, etc., the oscillatory reaction systems, can be generally used as the matrix reaction systems for kinetic determination of different substances. Our research group, proposed the kinetic method (the pulse perturbation of the oscillatory reaction system being in a stable steady state, PPOSSS) for quantitative determination of various analytes, which is based on potentiometric monitoring of concentration perturbations of the matrix reaction system being in a stable non-equilibrium stationary state close to the bifurcation point. The inducted maximal potential shift (ΔE_m) is proportional to the amount of analyte added, and its unknown amount can be simple determined on the bases of previously constructed calibration diagram. It was shown that the proposed method is very useful analytical tool regarding the fact that it uses very simple, modular equipment and thus it can be a part of any analytical laboratory. Up to now, the usefulness of the PPOSSS procedure has been demonstrated with various pure substances as well as with substances from different sources (pharmaceutical dosage forms, beverages, biologicaly liquid (urine) and seized drug samples); it was shown that its applying is very suitable in routine analysis of different biologically and pharmaceutically important compounds.

Ključne reči: Analitički metod • Pulsne perturbacije • Bray-Liebhafsky oscilatorna reakcija • Kinetička određivanja • Farmaceutski dozirani oblici • Urin

Key words: Analytical method • Pulse perturbations • Bray-Liebhafsky oscillatory reaction • Kinetic determinations • Pharmaceutical dosage forms • Urine