

Analitičke primene oscilatornih hemijskih reakcija: određivanje nekih farmaceutskih i biološki važnih jedinjenja

Nataša D. Pejić¹, Slobodan R. Anić², Ljiljana Z. Kolar-Anić³

¹Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²IHTM – Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Izvod

U poslednjih dvadesetak godina razvijene su brojne analitičke primene oscilatornih hemijskih reakcija realizovanih u otvorenom reaktoru. Predložene kinetičke metode se zasnivaju na sposobnosti analiziranih supstancija da menjaju kinetičke parametre hemijskih reakcija, pri čemu eksperimentalno dobijeni signal odražava reakcionu brzinu koja zavisi od koncentracije ispitivanog analita. Razvoju ovih metoda poklanja se sve veća pažnja zbog jednostavne eksperimentalne procedure, velikog linearnog opsega regresione jednačine (10^{-7} – 10^{-4} mol L⁻¹) i niskog limita detekcije (10^{-6} – 10^{-8} mol L⁻¹, u nekim slučajevima, $\leq 10^{-12}$ mol L⁻¹), a njihovo korišćenje je vrlo pogodno za rutinske analize različitih neorganskih i organskih jedinjenja, kao i gasova. Ovaj rad ima za cilj da da kratki pregled primene takozvane pulsne perturbacione tehnike za kvantitativna određivanja nekih farmaceutskih i biološki važnih jedinjenja u periodu od druge polovine 2005. godine do prve polovine 2011. godine.

Ključne reči: oscilatorna reakcija, analitna pulsna perturbaciona tehnika, protočni reaktor, farmaceutski preparati.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Sve do 20-tih godina dvadesetog veka, smatrano je da se kod složenih hemijskih reakcija koje se odvijaju preko niza intermedijernih vrsta, koncentracije reaktanata, produkata i intermedijera, osim eksplozivnih reakcija, jedino mogu u vremenu menjati monotono [1–5]. T. Fecher je 1828. godine opisao elektrohemijsku ćeliju u kojoj je nastajala periodična struja [6], a W. Ostwald je 1899. godine zapazio da brzina rastvaranja hroma u kiselj sredini, spontano naizmenično raste i opada [7]. Kako su navedeni reakcioni sistemi heterogeni, dugo je smatrano da uočene periodičnosti potiču upravo od heterogenosti sistema i da periodični, ili oscilatorni procesi, odnosno reakcije, nisu moguće u homogenim reakcionim sistemima. Međutim, Bray je uočio nemonotono nastajanje gasovitog kiseonika pri homogenom* razlaganju vodonik-peroksida u kiselj sredini u prisustvu jodata (slika 1) [8], odnosno otkrio prvu oscilatornu hemijsku reakciju**. Promena koncentracija reakcionih vrsta pomenute reakcije razlaganja vodonik-

Prepiska: N. Pejić, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd.

E-pošta: nata@pharmacy.bg.ac.rs

Rad primljen: 12. septembar, 2011.

Rad prihvaćen: 7. oktobar, 2011.

*Reakcija je samo „prividno“ homogena, jer u toku ove reakcije dolazi do izdvajanja elementarnog kiseonika i joda, koji u pojedinim momentima reakcije formiraju zasebne faze u sistemu.

**Opisana reakcija je u literaturi poznata kao Bray-Liebafsky (BL) oscilatorna reakcija.

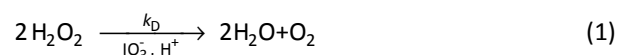
PREGLEDNI RAD

UDK 661.12:544.1:66

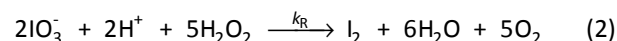
Hem. Ind. 66 (2) 153–164 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND110912081P

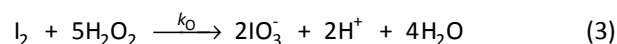
-peroksida može se opisati sledećom jednačinom ukupne reakcije [8]:



koja je zbir dve reakcije, reakcije redukcije jodata do joda:



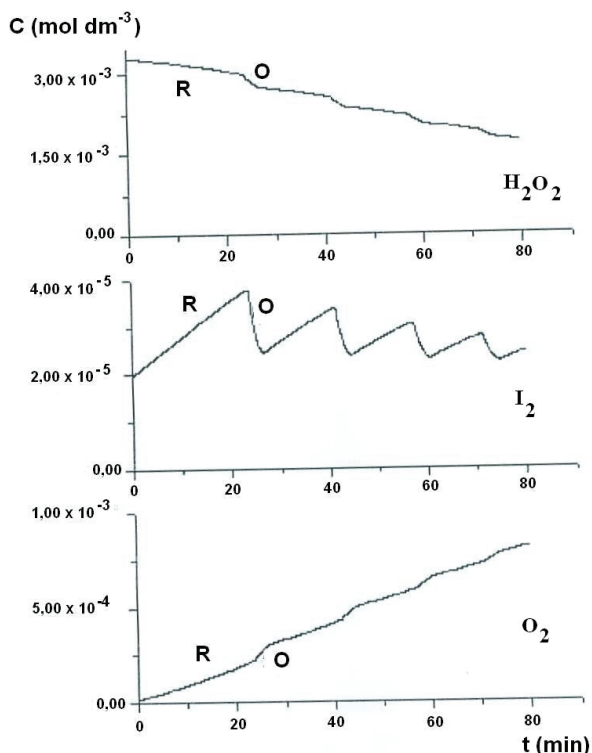
i oksidacije joda do jodata [8]:



Kao i prethodno pomenuta BL oscilatorna reakcija, sve oscilatorne hemijske reakcije predstavljaju kompleksne dinamičke sisteme u kojima se koncentracije reaktanata i produkata menjaju kaskadno (slika 1), a koncentracije intermedijera oscilatorno (slika 1), što dovodi do periodične promene njihovih brzina [2,4,5,9,10]. Slične pojave se javljaju i u biohemijским sistemima. U suštini, većina procesa u živim organizmima mogu pri određenim uslovima ispoljiti neku vrstu periodičnosti [11–15]. Takođe, oscilatorni procesi su mogući i u drugim složenim sistemima kao što su ekološki, socijalni, ekonomski, pravni poredak [9,16–18], itd.

Najpoznatije oscilatorne reakcije su Bray-Liebafsky (BL) [8,19], Belousov-Zhabotinskii (BŽ)* [20,21] i Briggs-

*Reakcija razlaganja malonske kiseline u prisustvu bromata u kiselj sredini i u prisustvu metalnog katalizatora (jona cerijuma, mangana ili gvožđa).



Slika 1. Evolucija koncentracije vodonikperoksida, joda i kiseonika u BL reakciji u uslovima izotermnog dobromešajućeg reaktora. R i O označavaju periode dominancija reakcija (2) i (3) koje se naizmenično smenjuju tokom reakcije (1) razlaganja vodonikperoksida. Slika je preuzeta iz reference [10].

Figure 1. Evolution of hydrogen peroxide, iodine and oxygen concentrations in the BL reaction under isothermal conditions of the well stirred closed reactor. R and O denote the domination period of both reaction (2) and (3), which alternately turns during hydrogen peroxide decomposition in reaction (1). The figure is taken from the reference [10].

-Rausher (BR) reakcija* [22], koje pripadaju grupi oksihalogenidnih oscilatora [23], bakarni oscilatori** (Cu(II) katalizovani oscilatori) [24], kao i peroksidaza-oksizaza (PO) biohemijski oscilatori*** [25]. Pored ovih, poznate su i različite varijante i modifikacije drugih oscilatornih reakcija [26–36].

Šta je zajedničko za pomenute složene hemijske sisteme (oscilatore) koje ih čini oscilatornim? U uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže, ovi nelinearni sistemi^{4*}, u zavisnosti od početnih eksperimentalnih uslova, mogu se nalaziti u različitim dinamičkim stanjima, kao što su stabilna neravnotežna stacionarna

*Reakcija razlaganja malonske kiseline u prisustvu vodonik-peroksida i jodata u kiselj sredini, i u prisustvu Mn^{2+} kao katalizatora (kombinacija BL i BŽ oscilatorne reakcije).

**Npr., reakcija između vodonik-peroksida i kalijum-tiocijanata u alkalanoj sredini katalizovana Cu(II) jonima.

***Oksidacija različitih organskih jedinjenja molekularnim kiseonikom katalizovane peroksidazom.

^{4*}Nelinearnost je izvedena iz nelinearnosti analitičkih izraza za brzine intermedijera za uslov reakcije u ustaljenom, stacionarnom stanju.

stanja (slika 2A(a)), oscilatorna stanja (slike 2A(b)–2A(d)) [37], itd., koja se ostvaruju u uslovima otvorenog reakcionog sistema^{5*} (eng. *continuously fed well stirred tank reactor – CSTR*) [38]. Otvoren sistem se realizuje u protočnom reaktoru u kome je omogućen protok mase (uticanje reaktanata i oticanje reaktanata, intermedijera i produkata reakcije). Pri konstantnoj brzini protoka, koncentracija reaktanata se, u prvoj aproksimaciji, može smatrati konstantnom tokom posmatrane reakcije. U zavisnosti od zadatih eksperimentalnih uslova nastaju različite dinamičke strukture koje se mogu održavati nepromenjenim sve dotle dok se dati eksperimentalni uslovi ne promene, ili se kontrolisano menjati promenom nekog kontrolnog parametra (temperature, specifične brzine protoka, ili koncentracije reaktanta) [39].

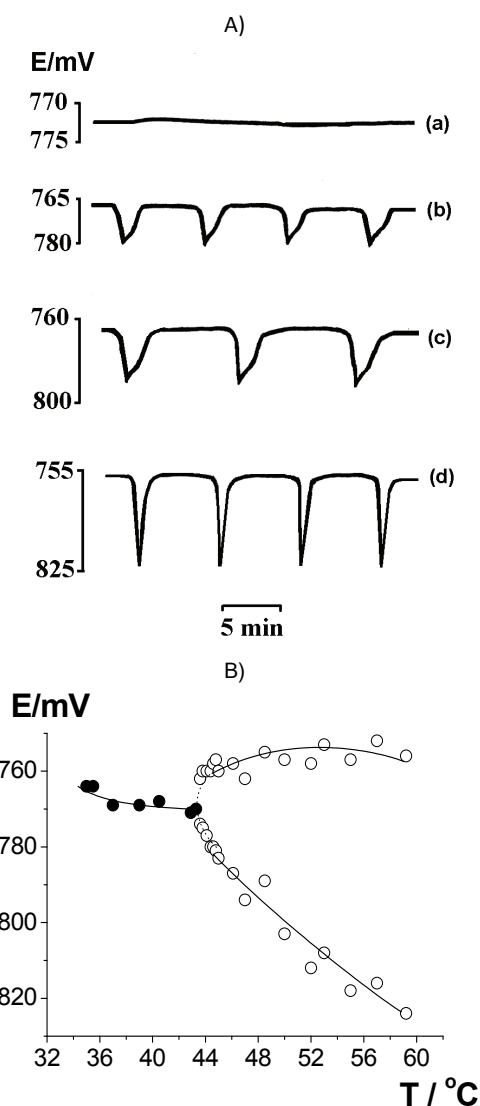
Pošto su izuzetno osetljivi na spoljašnje perturbacije, hemijski oscilatori mogu se koristiti kao matrice za kinetička određivanja onih supstancija koje hemijski reaguju sa intermedijernim vrstama. Pojam „perturbacija sistema“ podrazumeva sve namerno izazvane poremećaje u sistemu do kojih dolazi kada se na sistem deluje nekim spoljašnjim faktorom (najčešće je pobuđivanje sistema trenutnim unošenjem analita u sistem (koncentracione perturbacije)).

Od 1978. godine kada su Tihonova i autori [40] primenili BŽ reakciju [20,21] 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. god. do 1998. god. [41], kao i period od 1999. god. do prve polovine 2005. god [42], pri čemu su u ovim radovima prikazani rezultati korišćenja BŽ matrice i njenih varijanti [41,42], Cu(II) katalizovanih oscilatora [41,42], kao i PO biohemijskog oscilatora [41] u analitičke svrhe. U spomenutim radovima se daju podaci o analitičkim određivanjima preko trideset različitih analita. Rezultati primene Bray–Liebhafsky (BL) matrice naše istraživačke grupe, koji obuhvataju period od 1999. do 2009. godine sumarno su prikazani u radu [43] i odnose se na kvantitativnu analizu četrnaest analita.

Prava mera značaja neke analitičke tehnike, pa i ovde navedenih, može se isključivo sagledati tek nakon provere njenih analitičkih osobina u analizi realnih uzoraka, a potom, njenoj validaciji u skladu sa postojećim testovima standardizacije. Pokazalo se da je primena oscilatornih reakcija svrsishodna, kao i da je pogodna za

^{5*}Ove reakcije se mogu generisati i ispitivati i u uslovima zatvorenog reakcionog sistema. Tada se sistem ne može naći u ustaljenom, već u nizu periodično promenljivih pseudoustaljenih stanja koja su poznata pod nazivom tranzijentna stanja. Ova stanja su konačnog trajanja zbog potrošnje reaktanata koji se jednokratno uvode u reakcionu ćeliju, za razliku od slučaja protočnog reaktora kada se reaktanti uvode u ćeliju željeno dugo.

rutinske kvantitativne analize različitih jona [41–43, 58, 76–79], neorganskih i organskih jedinjenja [41–43], kao i gasova [80].



Slika 2. A) Stabilne dinamičke strukture dobijene pri eksperimentalnim uslovima: $[H_2SO_4]_0 = 5,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[KIO_3]_0 = 5,90 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-3}$, $[H_2O_2]_0 = 2,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, specifičnoj brzini protoka, $j_0 = 2,96 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, brzini mešanja reakcionog rastvora, 900 rpm i temperaturama: a) 35,0, b) 44,6, c) 50,0 i d) 59,2 °C. B) Bifurkacioni dijagram prikazuje prelaz iz stabilnog stacionarnog stanja (kružići) u oscilatorno stanje (otvoreni kružići) sa porastom temperature. Slika je preuzeta iz rada [37].

Figure 2. A) Stable dynamic structures obtained for the experimental conditions: $[H_2SO_4]_0 = 5.50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[KIO_3]_0 = 5.90 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-3}$, $[H_2O_2]_0 = 2.00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, specific flow rate, $j_0 = 2.96 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, stirring rate, 900 rpm and temperatures: a) 35.0, b) 44.6, c) 50.0 and d) 59.2 °C. B) Bifurcation diagram showing transition from the stable stationary state (solid circles) to the oscillatory states (open circles) for increasing temperature. The figure is taken from the reference [37].

Ovaj rad se odnosi na primenu pulsne perturbacione metode za kvantitativno određivanje farmaceutski i biološki važnih jedinjenja, kao i Co^{2+} , kako u čistom obliku, tako i različitim kompleksnim uzorcima, uz primenu različitih matrica: BL oscilatora, BŽ oscilatora i njegovih varijanti, Cu(II) katalizovanih oscilatora, kao i PO biohemijskog oscilatora.

Pulsna perturbaciona tehnika

Primene hemijskih oscilatora i perturbacione tehnike za kvantitativna određivanja analita zasnivaju se na postojanju funkcionalne veze između količine analita i odziva matričnog sistema. Tako, iz kalibracione krive dobijene za niz standardnih rastvora, koja pokazuje zavisnost odgovarajuće veličine (koja odražava pobudu sistema) u funkciji koncentracije analita može se odrediti njegova nepoznata koncentracija. Opisani postupak je generalan i uobičajen u kvantitativnoj analizi.

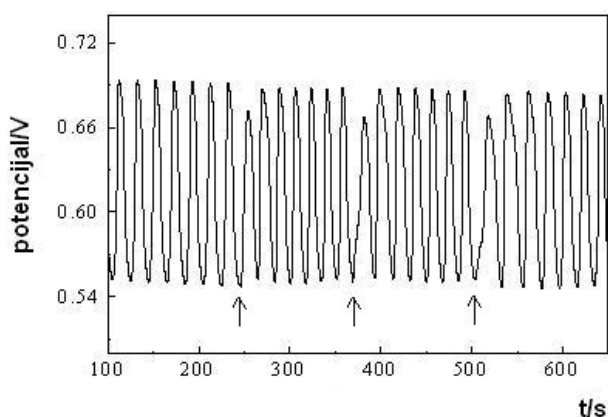
U tom smislu, predložena su dva različita metoda. Perez-Bendito istraživačka grupa je prva koja je razvila i primenila metodološki pristup pod nazivom "analitna pulsna perturbaciona" tehnika (eng. *analyte pulse perturbation (APP) technique*) [44], korišćenjem Cu(II) oscilatora kao matrice. Ovaj metod se bazira na praćenju efekata izazvanih brzim pulsirajućim perturbacijama matričnog sistema koji se nalazi u režimu prostih regularnih oscilacija (slika 3); injektiranje analita u matricu dovodi do promena u amplitudi, ili periodu regularnih oscilacija koje su proporcionalne injektiranoj koncentraciji perturbatora. Korišćenje otvorenog sistema realizovanog u protočnom reaktoru (CSTR), za primenu APP tehnike, otvorilo je nove perspektive za korišćenje oscilatornih hemijskih reakcija u rutinskim kvantitativnim analizama.

Sa druge strane, Vukojević, i Pejić u saradnji sa drugim autorima su razvili novi pristup u primeni nelinearnih hemijskih sistema u uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže [45]. U ovom pristupu iskorišćena su neravnotežna stabilna stacionarna stanja i njihova izuzetna osetljivost na perturbacije koje se izvode u blizini bifurkacione tačke*. Predloženi kinetički metod (pulsna perturbacija oscilatornog reakcionog sistema koji se nalazi u neravnotežnom stabilnom stacionarnom stanju, PPOSSS) za kvantitativno određivanje različitih analita, zasniva se na potenciometrijskom praćenju odgovora na perturbacije izvršene različitim količinama analita.

Eksperimentalna postavka za implementaciju pulsne perturbacione tehnike je vrlo jednostavna. Ona se sastoji iz dobro mešajućeg protočnog reaktora (CSTR), ter-

*Bifurkaciona tačka odgovara kritičnoj vrednosti kontrolnog parametra (temperatura, specifična brzina protoka ili koncentracija reaktanta) pri kojoj dolazi do prelaza iz jedne dinamičke strukture u drugu (npr. stabilnog neravnotežnog stacionarnog stanja u oscilatorno stanje).

mostata, indikatorske elektrode (obično Pt elektrode)* i referentne elektrode (obično Ag/AgCl elektrode ili Hg/Hg₂SO₄/K₂SO₄ elektrode) koje su povezane sa računom preko analognog interfejsa** (za potenciometrijsko praćenje dinamičkih stanja matrice, kao i odgovora matrice nakon izvršenih perturbacija)***, peristaltičke pumpe (obebeđuje kontinualan protok reaktanata i podešavanje specifične brzine protoka) i autobirete ili mikropipete (za injektiranje mikrozapremina ispitivanog analita). Perturbacije sistema se izvode injektiranjem mikrozapremina ispitivanog analita direktno u reakcioni sistem. Shematski prikazi aparature i detaljne procedure za izvođenje APP tehnike date su u radovima [43–48,51–67,69–71,73–79].



Slika 3. Tipičan oscilatorni profil dobijen u odsustvu i prisustvu perturbatora (sulfanilamida), pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [51]. Strelice označavaju trenutak injektiranja analita. Slika je preuzeta iz rada [51].

Figure 3. Typical oscillation profile obtained in the absence and presence of perturbator (sulfanilamide) obtained for the experimental conditions given in reference [51]. Arrows indicate the moment at which analyte was injected. The figure is taken from the reference [51].

Izbor analita za perturbacionu analizu je veliki i zavisi od rezultata koji se žele postići. Tako, analizirana jedinjenja mogu biti ona koja su esencijalna za dobijanje oscilacija i postoje kao reaktanti, intermedijeri, ili produkti u matrici, ali se na ovaj način mogu analizirati i supstancije koje nisu direktni učesnici reakcija koje čine mehanizam oscilatorne reakcije, ali isti moraju reagovati sa nekom od reakcionih vrsta matrice.

ANALITIČKA PRIMENA OSCILATORNIH REAKCIJA

Korišćenje oscilatornih reakcija kao matrica za određivanje analita, pretpostavlja definisanje strukture i

*U nekim slučajevima se kao indikatorska elektroda koristila kiseonična elektroda [46], odnosno jon-osetljiva membranska elektroda [47].

**Potencijal merne elektrode može se beležiti i milivotskim pisačem.

***Pored potenciometrijske detekcije, korišćena je i hemiluminiscentna detekcija [48], tehnika rezonantnog rasejavanja svetlosti [49], konduktometrija [50] i druge.

osobina faznog prostora (ili dela faznog prostora) kojem matrica pripada (slika 2). Zbog toga je potrebno ispitati uticaj različitih parametara, odnosno nezavisnih promenljivih (temperature, specifična brzina protoka, koncentracije reaktanata, itd.) na dinamiku matričnog sistema. Ispitivanje uticaja parametara na dinamiku neke oscilatorne reakcije naziva se bifurkaciona analiza. Ovakvom analizom se utvrđuju i uslovi tj. vrednosti parametara pri kojima dolazi do prelaza sistema iz jedne dinamičke strukture u drugu (bifurkaciona tačka). Poznavanje položaja bifurkacionih tačaka je važno s obzirom na to da je matrični sistem u njihovoj okolini ekstremno osetljiv na perturbacije, što sa praktičnog stanovišta znači da se radom u okolini ovih tačaka može poboljšati osetljivost metode, tj. poboljšati limit detekcije za ispitivani analit.

Optimizacija reakcionih uslova, koja prethodi primeni PPOSS metode je detaljno opisana u radovima [37,43,45,60–65]. Ona obuhvata bifurkacionu analizu^{4*} (izbor odgovarajućih dinamičkih stanja matrice koje će biti perturbovana) i perturbacionu analizu (ispitivanje uticaja izabranih dinamičkih stanja na osetljivost matričnog sistema i perturbaciju izabranog dinamičkog stanja različitim koncentracijama ispitivanog analita).

Tako, u slučaju BL matrice realizovane u protočnom reaktoru, se za $[KIO_3]_0 = 5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2SO_4]_0 = 5,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2]_0 = 0,20 \text{ mol L}^{-1}$, pri specifičnoj brzini protoka, $j_0 = 2,96 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ i variranjem temperature^{5*} u intervalu od 35,0 do 59,2 °C [37]), dobijaju stabilne dinamičke strukture (neke od dobijenih su prikazane na slici 2A). Odgovarajući bifurkacioni dijagram^{6*} prikazan je na slici 2B, gde su tačkama označeni potencijali koji odgovaraju stabilnim stacionarnim stanjima, dok su kružićima predstavljene ekstremne vrednosti potencijala koje se ostvaruju tokom prostih periodičnih oscilacija. Na osnovu bifurkacionog dijagrama određuju se bifurkacione tačke, i nakon toga, matrica perturbuje analitom u okolini nađenih bifurkacionih tačaka.

Sa druge strane, optimizacija reakcionih uslova, koja prethodi primeni APP tehnike je detaljno opisana u radovima [44,47,48,50–59,66,67,69–71,73–79] i ona obuhvata:

^{4*}Jednom dobijeni bifurkacioni dijagram može se koristiti za svako sledeće analitičko određivanje. Tako, za kvantitativno određivanje nekog analita pri eksperimentalnim uslovima za koje je dobijen dati bifurkacioni dijagram, vrši se samo perturbaciona analiza. Ipak, zbog sistematskih odstupanja detekcionog sistema, korišćenih hemikalija, rastvora, itd., s vremena na vreme treba ponoviti eksperimente u kojima se ispituju uticaji parametara na dinamiku matrice (bifurkaciona analiza) i ispitati repetabilnost dobijenih rezultata.

^{5*}Temperatura je bila kontrolni parametar u radovima [45] i [61–64], specifična brzina protoka u radu [64], a koncentracija protoka sumporne kiseline u radu [60].

^{6*}Bifurkacioni dijagram predstavlja grafik koji prikazuje skup stabilnih stanja sistema u funkciji kontrolnog parametra.

1. eksperimentate koji se izvode bez prisustva ispitivanog analita (slika 3) radi dobijanja stabilnih i ponovljivih oscilacija u vremenu (suštinski važan uslov za dobijanje repetabilnih, odnosno ponovljivih rezultata) i

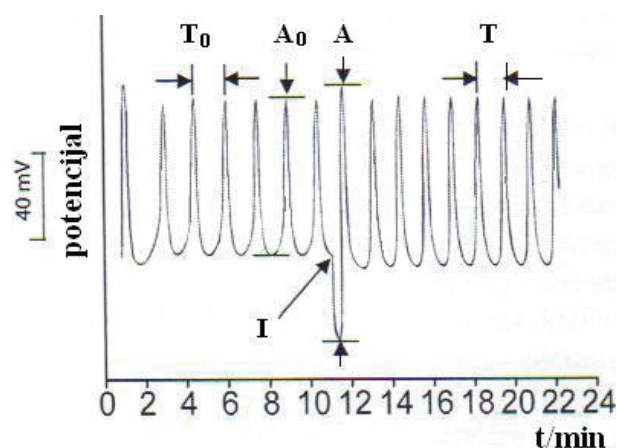
2. eksperimente u kojima se analit dodaje u matični sistem (slika 3) koji se nalazi u stanju regularnih oscilacija u cilju obezbeđivanja najveće osetljivosti i tačnosti metode, kao i uslova za izvođenja velikog broja određivanja. U vezi sa tim testiraju se različiti trenutci (faze) tokom oscilatorne evolucije matrice, odnosno injekcione tačke tokom oscilatornog ciklusa [55], sa ciljem dobijanja maksimalnog inteziteta odgovora matrice na perturbacije.

Na primer, u slučaju BŽ matrice realizovane u protičnom reaktoru, pri određenim eksperimentalnim uslovima ($[\text{malonska kiselina}]_0 = 0,260 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4]_0 = 1,000 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Mn}^{2+}]_0 = 0,060 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{BrO}_3^-]_0 = 0,195 \text{ mol L}^{-1}$) i variranjem temperature (od 25,0 do 40,0 °C), kao i brzine protoka, nalaze se uslovi za dobijanje stabilnih i ponovljivih oscilacija (slika 3) [51]. Nakon toga se matrica perturbuje sulfanilamidom u datim injekcionim tačkama posmatranih oscilacija (slika 3). Ispitane injekcione tačke, generalno, odgovaraju maksimumu, ili minimumu amplitude dobijenog regularnog oscilatornog profila, a repetabilno dodavanje analita uvek u istoj tački (slika 3) omogućava dobijanje tačnih i preciznih rezultata. Ispitivanje različitih injekcionih tačkaka na tačnost i ponovljivost određivanja analita (α -naftola) detaljno je opisano u radu [55]. Nakon izbora optimalne injekcione tačke, matični sistem se perturbuje ispitivanim analitom određene koncentracije. Njegovo injektiranje u matricu dovodi do promene neke karakteristične osobine oscilatorne evolucije matrice, npr. amplitude oscilovanja ($\Delta A = A - A_0$, slika 4 [57]), ili perioda oscilovanja ($\Delta T = T - T_0$, slika 4 [57]); ove promene se mogu korelirati sa injektiranjem količinom analita. Nakon toga se ispituje i uticaj svih drugih parametara (koncentracije svakog od reaktanata) na ove veličine.

Kod korišćenja matrice koje se nalaze u oscilatornom režimu, pored ispitivanja uticaja koncentracije svakog od reaktanata [47,50–59,69–71,73–79] na osetljivost određivanja ispitivanih analita, analizirani su i uticaj specifične brzine protoka [52,54,55,70,74], temperature [47,52–58,70,71,73,74,76–78], brzine mešanja [73,75,77], jonske jačine [55,59,74], kao i izbor indikatorske elektrode [47] na njihovo određivanje.

Od nedavno, optimizacija reakcionih uslova se vrši pomoću statističkog eksperimentalnog dizajna (*Box-Behnken* dizajn) [68,72]. Pokazano je da se primenom ovog statističkog programa, brzo i jednostavno utvrđuju optimalni eksperimentalni uslovi za izvođenje perturbacione analize. Tako, u radu [68] se ispituje i procenjuje uticaj različitih promenljivih (koncentracije KBr, KBrO_3 , Ce(IV), sumporne kiseline i malonske kiseline) na

analitički signal (promena perioda oscilovanja), odnosno optimizuju eksperimentalni uslovi za kvantitativno određivanje L-penicilamina, korišćenjem BŽ oscilatorne reakcije koja se nalazi u oscilatornom režimu. Nakon izbora optimalnih reakcionih uslova, matični sistem se perturbuje različitim količinama ispitivanog analita. Eksperimentalno dobijeni rezultati određivanja L-penicilamina pri optimalnim eksperimentalnim uslovima (dobijenim korišćenjem *Box-Behnken* dizajna), dati su u tabeli 1.



Slika 4. Tipični odgovor matičnog sistema dobijen injektiranjem $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Alizarin Red S, pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [57]. Period i amplituda oscilovanja pre injektiranja analita su označeni sa T_0 i A_0 , dok su sa T i A označeni period i amplituda oscilovanja nakon njegovog injektiranja u matricu; I označava moment (minimum potencijala) perturbovanja matrice. Slika je preuzeta iz rada [57].

Figure 4. Typical signal profile of matrix system provided by addition of $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Alizarin Red S, obtained for the experimental conditions given in reference [57]. Period and amplitude of oscillation before injection of analyte are denoted as T_0 and A_0 , while period and amplitude of oscillation after its injection in matrix are denoted as T and A ; I denotes the moment (minimum of potential) at which matrix was perturbed. The figure is taken from the reference [57].

Slično, u radu [72] se prethodno pomenuti statistički postupak koristi za optimizaciju eksperimentalnih uslova za kvantitativno određivanje L-cisteina. *Box-Behnken* dizajn se pokazao kao koristan metod za ispitivanje uticaja različitih faktora na analitički signal. S obzirom na to da se na ovaj način dobijaju optimalni eksperimentalni uslovi pri kojima je efekat analita na matični sistem najveći (najveća osetljivost metode), ne moraju se testirati različite injekcione tačke za dobijanje najboljeg odgovora, što značajno skraćuje vreme ukupne analize. U spomenutim radovima [68,72] ispitana je i specifičnost (selektivnost) primenjene metode, ali nisu analizirani realni uzorci, tj. nije sagledana realna primenljivost predložene tehnike. Na kraju, najznačajnija prednost primene ovog metoda je pojednostavljenje primenjene tehnike i postavke eksperimenta. Eksperimentalno dobijeni rezultati kvantitativnog određi-

Tabela 1. Statistički parametri određivanja ispitivanih jedinjenja
Table 1. Statistic parameters of determinations of different compounds.

Analit	Literatura	Linearni opseg ^a	Regresiona jednačina	R	LOD ^b	RSD ^c %	RCV ^d %
Peroksinitrit	[46]	$2,5 \times 10^{-8}$ – $1,56 \times 10^{-6}$	$I(\%)^e = 26,71 + 4,58 c$	0,9946	–	–	–
Dopamin	[47]	$2,4 \times 10^{-7}$ – $4,9 \times 10^{-5}$	$\Delta A = 0,00585 + 1729 c$	0,9987	$9,80 \times 10^{-8}$	3,26	101,3
L-Cistein	[50]	$3,25 \times 10^{-5}$ – $2,35 \times 10^{-4}$	$P_r^f = 1,0204 + 2268 c$	0,9859	$2,55 \times 10^{-5}$	–	–
Metionin	[50]	$2,6 \times 10^{-4}$ – $1,1 \times 10^{-3}$	$P_r^f = 0,9893 + 521,24 c$	0,9846	$8,90 \times 10^{-5}$	–	–
Sulfanilamid	[51]	$9,33 \times 10^{-8}$ – $3,02 \times 10^{-6}$ $4,27 \times 10^{-8}$ – $7,41 \times 10^{-6}$	$\Delta A = 151 + 20,9 \log c$ $\Delta P = 81,7 + 10,9 \log c$	0,9978 0,9981	$6,03 \times 10^{-8}$ $2,69 \times 10^{-8}$	1,1 0,85	– 101,2
Penicilin	[52]	$2,97 \times 10^{-6}$ – $5,50 \times 10^{-5}$ $2,97 \times 10^{-7}$ – $5,50 \times 10^{-4}$	$\Delta A_r^g = 0,492 - 0,071 (-\log c)$ $\Delta P_r^g = 2,030 - 0,301 (-\log c)$	0,9985 0,9981	– $5,94 \times 10^{-8}$	– –	– –
Ribavirin	[53]	$1,5 \times 10^{-7}$ – $6,3 \times 10^{-5}$	$\Delta A = 0,00826 - 928,3652 c$	0,9964	$3,20 \times 10^{-8}$	2,34	99,1
Furfural	[54]	$3,1 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ $3,1 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-5}$	$\Delta A = 121,6094 + 16,2051 \log c$ $\Delta P = 491,12566 + 64,8900 \log c$	0,9930 0,9991	$3,0 \times 10^{-9}$	4,2 –	99,7 –
α -Naftol	[55]	$3,4 \times 10^{-8}$ – $5,3 \times 10^{-4}$	$\Delta A = 2,91 + 5,275 c$	0,9991	–	0,87	96,5
Katehol	[56]	$2,1 \times 10^{-6}$ – $2,1 \times 10^{-4}$	$\Delta A = 873,91 + 148,54 \log c$	0,9976	$1,37 \times 10^{-6}$	3,8	–
Alizarin Red	[57]	$1,5 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-3}$	$\Delta A = 659 + 184,2 \log c + 12,9 (\log c)^2$	0,9989	$1,00 \times 10^{-7}$	4,4	–
Co ²⁺	[58]	$5,37 \times 10^{-12}$ – $5,27 \times 10^{-8}$	$\Delta P = 170,3 - 14,23 (-\log c)$	0,9995	$5,2 \times 10^{-13}$	3,70	100,1
L-Asparaginska kiselina	[59]	$7,10 \times 10^{-8}$ – $1,17 \times 10^{-5}$	$\Delta P = 27,6 + 2,94 \log c$	0,9990	$5,58 \times 10^{-8}$	2,75	100,45
Vitamin B ₁	[60]	0,01–1,0	$\Delta E = 17,6 + 8,4 \log c$	0,9986	0,01	4,4	102,0
Vitamin B ₃	[60]	5,0–50,0	$\Delta E = -0,91 - 0,43 c$	0,9988	2,60	1,2	101,9
<i>p</i> -Fenilendiamin	[66]	$4,68 \times 10^{-7}$ – $1,95 \times 10^{-5}$	$\Delta E_m^h = 311,85 - 47,92 (-\log c)$	0,9981	$9,5 \times 10^{-8}$	2,35	99,7
<i>p</i> -Nitroanilin	[67]	$2,5 \times 10^{-7}$ – $3,75 \times 10^{-5}$	$\Delta E^h = 353,585 - 52,918 (-\log c)$	0,9995	$2,5 \times 10^{-8}$	–	99,6
L-Penicilamin	[68]	$9,0 \times 10^{-7}$ – $9,0 \times 10^{-5}$	$\Delta P = 59,84 - 9,0291 c$	0,9947	$8,7 \times 10^{-7}$	4,0	–
Ampicilin	[69]	$5,0 \times 10^{-9}$ – $1,0 \times 10^{-7}$	$\Delta A = -10,3 + 2,42 c$	0,9995	$3,30 \times 10^{-11}$	0,8	–
Kalcijum-pantotenat	[70]	$5,0 \times 10^{-6}$ – $2,5 \times 10^{-3}$ $1,5 \times 10^{-5}$ – $2,5 \times 10^{-3}$	$\Delta A = 3,09 - 23680,65 c$ $\Delta P = -0,24 - 520 c + 71687,97 c^2$	0,9982 0,9966	$2,50 \times 10^{-6}$	2,6 0,3	100,5
Triptofan	[71]	$6,44 \times 10^{-7}$ – $5,50 \times 10^{-4}$ $2,55 \times 10^{-6}$ – $2,55 \times 10^{-4}$ $4,97 \times 10^{-5}$ – $8,24 \times 10^{-4}$	$\Delta A = 0,295 - 0,046 (-\log c)$ $\Delta P = 0,973 - 0,170 (-\log c)$ $\Delta P = 48,057 - 10,192 (-\log c)$	0,9980 0,9987 0,9994	$6,50 \times 10^{-8}$	–	–
L-Cistein	[72]	$4,0 \times 10^{-7}$ – $3,0 \times 10^{-5}$	$\Delta P = 45,811 - 2,6762 \ln c$	0,9965	$4,0 \times 10^{-7}$	3,4	–
Pirogalol	[73]	$1,5 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-4}$	$\Delta A = 830,153 + 141,017 \log c$	0,9959	$1,34 \times 10^{-6}$	1,6	–
1-Naftilamin	[74]	$1,0 \times 10^{-6}$ – $7,08 \times 10^{-5}$ $7,08 \times 10^{-6}$ – $7,08 \times 10^{-5}$	$\Delta A = 504,02 + 83,39 \log c$ $\Delta P = 763,67 + 145,35 \log c$	0,9955 0,9922	$5,64 \times 10^{-9}$	–	11,9
<i>p</i> -Nitrobenzenazonaftol	[75]	$5,2 \times 10^{-7}$ – $3,3 \times 10^{-3}$	$\Delta A = 1,87141 + 7,22114 c$ $\Delta P = 9,64723 + 20,83665 c$	0,9998 0,9995	0,45 0,48	–	–

^aKoncentracija je data u mol L⁻¹, osim u radu [60], gde je data u μ mol; ^blimit detekcije definisan kao koncentracija analita za koju je odnos signal–šum = 3; ^crelativna standardna devijacija; ^d„Recovery“ (odnos nađene i stvarne koncentracije analita izražen u procentima); ^e*I* je procentni odnos amplituda (A/A_0); ^f P_r je bezdimenzioni odnos perioda (P/P_0). U ovom slučaju je korišćena konduktometrijska detekcija; ^g ΔA_r i ΔP_r je relativna promena amplituda ($(A-A_0)/A_0$) i perioda oscilovanja ($(P-P_0)/P_0$), respektivno; ^h ΔE_m je maksimalna promena potencijala ($E_p - E_s$)

vanja L-cisteina pri optimalnim eksperimentalnim uslovima (dobijenim korišćenjem *Box-Behnken* dizajna), dati su u tabeli 1.

Analitički signal

Nakon optimizovanja reakcionih uslova, izabrano dinamičko stanje se perturbuje analiziranim analitom i potencijometrijski prate odgovori matričnog sistema na pobudu. Indukovani odgovori (potencijometrijski, kon-

duktometrijski ili hemiluminiscentni analitički signali*) mogu se kvantifikovati na različite načine.

Kod APP tehnike, koja se primenjuje na oscilatorne reakcije koje se nalaze u režimu prostih regularnih oscilacija (slika 3), analitički signal može biti promena amplitude oscilacija (ΔA) [47,51, 53–57,69–71,73–75]:

$$\Delta A = A_0 - A \quad (4)$$

*Odgovori matrice na pobudu izazvanu ispitivanim analitom mogu se pratiti različitim metodama [48,50].

gde su A_0 i A amplitude oscilacija* pre i nakon dodatka analita u matricu (slika 3).

Takođe, analitički signal može biti promena perioda oscilovanja, (ΔP) [51,54,58,59, 68,70–72,74,75]:

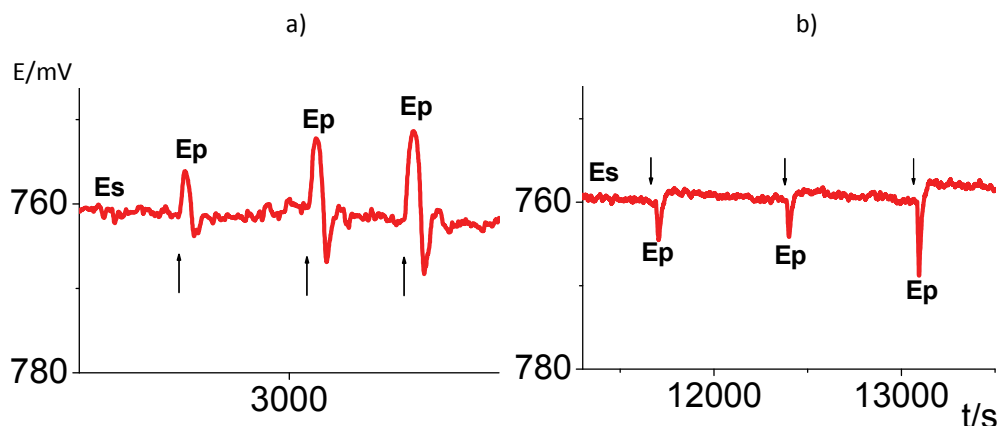
$$\Delta P = P_0 - P \quad (5)$$

gde su P_0 i P periodi** oscilovanja pre i nakon dodatka analita u matricu.

Iz navedenih signala su, kao kvantitativna karakteristika matrica, izvedeni bezdimenzioni parametri, kao što su relativna promena amplitude oscilovanja,

bilnom stacionarnom stanju pre izvršene perturbacije (slika 5) [60].

Osim primene PPOSS tehnike korišćenjem BL matrice, istu tehniku su nedavno primenili Gao i drugi autori za određivanje mikrokoličina *p*-fenilendiamina i *p*-nitroanilina, korišćenjem BŽ matrica, realizovanih u otvorenom [66] i zatvorenom reaktoru*** [67]. Promenom bifurkacionog parametra, specifične brzine protoka (u radu [66]) i temperature (u radu [67]), utvrđeni su položaji bifurkacionih tačaka, a perturbacije su izvođene u okolini bifurkacionih tačaka. Tako, injektiranje analita u



Slika 5. Tipični odgovori BL matrice dobijeni nakon perturbacije sistema (koji se nalazi u stabilnom stacionarnom stanju) različitim koncentracijama vitamina B-grupe, pri eksperimentalnim uslovima datim u radu [60]. Ukupne injektirane količine analita u alikvotima od 50 μL standardnih uzoraka su (sa leva na desno): (a) $[B_3] = 10, 17$ i $20 \mu\text{mol}$ (b) dva uzastopna injektiranja $[B_6] = 0,07 \mu\text{mol}$ i $[B_6] = 0,50 \mu\text{mol}$. Strelice označavaju momenat perturbovanja stacionarnog stanja. Slika je preuzeta iz rada [60].

Figure 5. Typical potentiometric responses of the BL matrix obtained after perturbations of the system being in the stable stationary state with different concentrations of vitamins B-group, under experimental conditions given in reference [60]. The total amounts of analyte injected in the 50 μL aliquots of standard samples are (from left to right): (a) $[B_3] = 10, 17$ and $20 \mu\text{mol}$ (b) two successive injection of $[B_6] = 0.07 \mu\text{mol}$ and $[B_6] = 0.50 \mu\text{mol}$. Arrows indicate the moments at which stationary states were perturbed. The figure is taken from the reference [60].

$$\Delta A_R = \frac{A - A_0}{A_0},$$

i perioda oscilovanja,

$$\Delta P_R = \frac{P - P_0}{P_0} \quad [52] \quad \text{i} \quad P_r = \frac{P}{P_0} \quad [50],$$

kao i odnos oscilatornih amplituda izražen u % [46].

Kod PPOSS tehnike, koja je razvijena korišćenjem BL matrice u stabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju (slika 5), analitički signal je indukovana maksimalna promena potencijala (ΔE_m) [43,60–65]:

$$\Delta E_m = E_p - E_s \quad (6)$$

gde je E_p ekstremna vrednost potencijala nakon izvršene perturbacije, a E_s je potencijal koji odgovara sta-

maticu koja se nalazi u stabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju, dovodi do promene potencijala (jednačina (3)) koja je linearno zavisna od logaritma koncentracije analita. Pokazano je da se predloženim metodom mogu određivati vrlo niske koncentracije* navedenih analita (LOD reda veličine $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, Tabela 1) u širokom opsegu koncentracija (dva reda veličine, tabela 1). Ova metoda, zbog svoje jednostavnosti i niske cene, može biti alternativa drugim instrumentalnim metodama za rutinsko određivanje *p*-fenilendiamina i *p*-nitroanilina u uzorcima otpadnih voda. Generalno, APP tehnika primenjena korišćenjem vrlo osetljivih matrica, koji se nalaze bilo u oscilatornom, bilo u stabilnom stacionarnom stanju u okolini bifurkacione

*Amplituda oscilacija je jednaka razlici potencijala u minimumu i maksimumu oscilacija ($A = E_{\text{max}} - E_{\text{min}}$).

**Period oscilovanja predstavlja vremenski interval između dve uzastopne oscilacije.

***U uslovima zatvorenog reakcionog sistema gde nema protoka mase, svako uspostavljeno stanje (stacionarno stanje, periodične oscilacije, itd.) je tranzijentno, dok se u uslovima otvorenog sistema može, stalnim dotokom reaktanata, održavati željeno dugo.

*Ispitivane koncentracije su koncentracije analita koje su injektirane u matricu; injektirana zapremina analita je 200 μL [66], odnosno 100 μL [67].

tačke, je korisni analitički pristup, 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 jedinjenja koja mogu biti od značaja za prirodne nauke u budućnosti. U tabeli 2 je dat pregled (od druge polovine 2005. god. do prve polovine 2011. god.) ispitivanih analita, korišćenih matrica i analiziranih realnih uzoraka koji očigledno ilustruje primenljivost razmatrane perturbacione tehnike.

Određivanje niskih koncentracija analita primenom pulsne perturbacione tehnike

U slučaju korišćenja oscilatornih reakcija kao matri- ca za analitička određivanja, postoji stroga kauzalnost između kvantitativnih (i kvalitativnih) karakteristika izazvane perturbacije i količine perturbatora. Tako, analitički signal (izrazi (4)–(6)) je proporcionalan količini dodatog analita, pri čemu dobijena zavisnost može biti linearna [46,47,50–56,58–60,66–75], ili polinomijalna [57,70]. Validacija predloženih metoda vrši se u skladu sa ICH (*International Conference on Harmonization Gui-*

Tabela 2. Analizirana jedinjenja, realni uzorci i korišćene matrice za primenu pulsne perturbacione tehnike
Table 2. Compounds analyzed, the real samples and matrices used for the application of pulse perturbation technique

Ispitivano jedinjenje	Realni uzorak	Korišćeni hemijski oscilator (matrica)	Literatura
Peroksininitrit	–	NADH-O ₂ -H ⁺ -HRP (PO oscilator)	[46]
Dopamin	Injekcije dopamin hidrohlorida	Malonska kiselina -BrO ₃ ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[47]
Cistein	–	H ₂ O ₂ -KSCN-CuSO ₄ -NaOH (Cu(II) oscilator)	[50]
Metionin	–	H ₂ O ₂ -KSCN-CuSO ₄ -NaOH (Cu(II) oscilator)	[50]
Sulfanilamid	Tablete	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Mn ²⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ reakcija)	[51]
Penicilin	–	Mlečna kiselina-aceton-BrO ₃ ⁻ -Mn ²⁺ -H ₂ SO ₄	[52]
Ribavirin	Injekcije	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Mn ²⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ reakcija)	[53]
Furfural	Uzorci vode	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Mn ²⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[54]
α-Naftol	Karbaril	H ₂ O ₂ -KSCN-CuSO ₄ -NaOH (Cu(II) oscilator)	[55]
Katehol	–	Jabučna kiselina-BrO ₃ ⁻ -H ₂ SO ₄ -[CuL] (ClO ₄) ₂ (hemijski oscilator sa makrocikličnim kompleksom)	[56]
Alizarin Red S	–	Jabučna kiselina-BrO ₃ ⁻ -H ₂ SO ₄ -[CuL] (ClO ₄) ₂ (hemijski oscilator sa makrocikličnim kompleksom)	[57]
Co ²⁺	Injekcije vitamina B ₁₂	Jabučna kiselina-malonska kiselina -BrO ₃ ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (jabučna kiselina + BŽ oscilator)	[58]
L-Asparaginska kiselina	Injekcije kalijum i magnezijum aspartata; rastvori kalijum i magnezijum aspartata za oralnu upotrebu	H ₂ O ₂ -KSCN-CuSO ₄ -NaOH (Cu(II) oscilator)	[59]
Vitamin B ₃ (niacin)	Tablete	H ₂ O ₂ -IO ₃ ⁻ -H ⁺ (BL oscilator)	[60]
Paracetamol	Tablete	H ₂ O ₂ -IO ₃ ⁻ -H ⁺ (BL oscilator)	[62]
Askorbinska kiselina	Tablete i urin	H ₂ O ₂ -IO ₃ ⁻ -H ⁺ (BL oscilator)	[63]
Morfin	Injekcije	H ₂ O ₂ -IO ₃ ⁻ -H ⁺ (BL oscilator)	[64]
Vitamin B ₁ (tiamin)	Vitaminske tablete (kompleks B vitamina)	H ₂ O ₂ -IO ₃ ⁻ -H ⁺ (BL oscilator)	[65]
p-Fenilendiamin	Uzorci vode	Malonska kiselina -BrO ₃ ⁻ -[Fe(phen) ₃] ²⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[66]
p-Nitoanilin	Otpadne vode	Vinska kiselina-Aceton- Mn ²⁺ -BrO ₃ ⁻ -H ₂ SO ₄	[67]
L-Penicilamin	–	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Br ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[68]
Ampicilin	–	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ -hinon (BŽ oscilator + hinon)	[69]
Kalcijum pantotenat	Uzorci vode	Jabučna kiselina-BrO ₃ ⁻ -H ₂ SO ₄ -[CuL] (ClO ₄) ₂ (hemijski oscilator sa makrocikličnim kompleksom)	[70]
Triptofan	–	Malonska kiselina -BrO ₃ ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[71]
L-Cistein	–	Malonska kiselina-BrO ₃ ⁻ -Br ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[72]
Pirogalol	–	Jabučna kiselina-BrO ₃ ⁻ -H ₂ SO ₄ -[CuL] (ClO ₄) ₂ (hemijski oscilator sa makrocikličnim kompleksom)	[73]
1-Naftilamin	Uzorci vode	Malonska kiselina -BrO ₃ ⁻ -Ce ⁴⁺ -H ₂ SO ₄ (BŽ oscilator)	[74]
p-Nitrobenzenazonaftol	–	H ₂ O ₂ -KSCN-CuSO ₄ -NaOH (Cu(II) oscilator)	[75]

delines). U vezi sa tim određuju se analitički parametri validacije, kao što su: linearnost, koncentracioni opseg, granica detekcije, granica kvantifikacije, tačnost, preciznost i specifičnost (selektivnost)*. Detaljna procedura za ispitivanje specifičnosti PPOSSS metode je data u radovima [43,62–65]. Kod PPOSSS tehnike, posebno važan aspekt ispitivanja jeste analiza oblika odgovora matrice u prisutvu interferenta (supstancija koje utiču na signal). Ovo je veoma značajno jer se može iskoristiti za identifikaciju ispitivanih analita u analizi kontrole kvaliteta nekog kompleksnog uzorka.

Metoda kalibracione krive primenjena je za određivanje dvadeset pet različitih analita. U tabeli 1 sumarno su prikazani parametri određivanja koji obuhvataju oblasti koncentracija i statističke podatke dobijene regresionom analizom**. Dobri korelacioni koeficijenti ($r \geq 0,99$) ukazuju na linearnost kalibracionih dijagrama u širokom opsegu koncentracija (dva [46,47,51,53,56,60,66–69,71–73] i tri reda veličine [52,54,57,59,70]), a u nekim slučajevima i četiri [55,58,75]). Može se videti da je metoda izuzetno osetljiva*** (LOD vrednosti su od $\approx 10^{-9}$ mol L⁻¹ do 10^{-6} mol L⁻¹, ali i 5×10^{-13} mol L⁻¹ [58]), precizna⁴* ($RSD \leq 5\%$) i tačna⁵* ($RCV < 102\%$).

Važno je istaći da za praktičnu analitičku primenu predložene metode, nije potrebno poznavati mehanizam reagovanja analita i matrice. Ipak, kao što je gore već pomenuto, poznavanje mehanizma može bitno doprineti obimu eksperimentalnih istraživanja za razvoj razmatrane perturbacione analize. Sa druge strane, uporedna analiza simuliranih i eksperimentalni rezultata je put validacije modela reakcije koja se odigrava u matrici, odnosno dubljeg razumevanja perturbacione analize. Naime, vrlo često se pretpostavljeni modeli mehanizma interakcije analita i matrice testiraju u numeričkim simulacijama, a dobijeni rezultati poredi se eksperimentalno dobijenim, kao što je detaljno objašnjeno u radovima [63,64]. To je razlog što se u nekim od navedenih radova analiziraju mogući mehanizmi reagovanja ispitivanog analita i matrice⁶* na osnovu

pretpostavljenih modela mehanizama reakcija u korišćenim matricama⁷*, kao i dodatnih eksperimentalnih istraživanja (npr. korišćenjem stop-flow tehnike [46], ciklične voltametrije [52,56,57,69,73], ili potenciometrije [47,53,54,59,60,70]).

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja primene oscilatornih reakcija u analitičke svrhe, pokazuju da takozvana pulsna perturbaciona tehnika i korišćenje vrlo osetljivih oscilatornih hemijskih sistema, kao matrica, dovodi do analitičkih metoda koje imaju očigledno dobre osobine: linearnost u širokom opsegu koncentracija (dva i tri reda veličine, a u nekim slučajevima i četiri), veoma veliku osetljivost (LOD vrednosti od $\approx 10^{-9}$ mol L⁻¹ do $\approx 10^{-6}$ mol L⁻¹, ali i 5×10^{-13} mol L⁻¹), zadovoljavajuću preciznost ($RSD \leq 5\%$) i tačnost ($RCV \leq 105\%$).

Objavljeni rezultati iz ove oblasti u poslednjih šest godina, kao i ranijih, nedvosmisleno pokazuju svrsishodnost korišćenja oscilatornih reakcija za analitička određivanja različitih jedinjenja, kako u čistim, tako i u složenim uzorcima od značaja za farmaciju, ali i šire, za različite oblasti istraživanja. Ono što predstavlja poseban doprinos opisanih metoda su njihova jednostavnost primene i niska cena, kao i činjenica da za analizu analita često nije potreban nikakav predtretman uzorka, osim njegovog rastvaranja. Poboljšanja postignuta primenom APP tehnike 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.

Zahvalnica

Autori su zahvalni Ministarstvu za nauku i prosvetu Republike Srbije (projekti br. 172015 i 45001) na finansijskoj podršci.

LITERATURA

- [1] S. Veljković, Hemijska kinetika, Naučna knjiga, Beograd, 1969.
- [2] G. Nicolis, I. Prigogine, Self-organization in Non-equilibrium Systems, John Wiley, New York, 1977.
- [3] H. Eyring, S.H. Lin, S.M. Lin, Basic Chemical Kinetics, John Wiley&Sons, New York, 1980.
- [4] Oscillation and Traveling Waves in Chemical Systems, R.J. Field, M. Burger (Eds.), John Wiley, New York, 1985.

*S obzirom na to da su oscilatorne reakcije izuzetno osetljive na prisustvo eksternih supstancija (perturbacije), izuzetno je važno ispitati uticaj drugih supstancija (interferenta) koji mogu biti prisutni u složenim uzorcima koji se analiziraju predloženom tehnikom.

**Ovi parametri za uzorke koje je analizirala naša istraživačka grupa u periodu od 1999. do 2009. god. su prikazani u radu [43].

***Osetljivost metode je izražena preko limita detekcije (LOD) koji predstavlja koncentraciju analita za koju je odnos signal–šum = 3.

⁴*Preciznost metode se obično izražava kao relativna standardna devijacija (RSD).

⁵*Tačnost analitičke metode se izražava kao „recovery” (RCV), odnosno kao odnos nađene i poznate koncentracije analita izražen u procentima.

⁶*Rasvetljavanje mehanizma njihovog reagovanja, može biti vrlo korisno istraživačima koji se bave matematičkim modeliranjem reakcija, kao vodič u sistematskom nalaženju uslova pri kojima se, primenom

metode, dobijaju najniži detekcioni limiti, ili najveće osetljivosti metode.

⁷*Međutim, ovo nije lak posao, s obzirom da su mehanizmi po kojima se odvijaju oscilatorne reakcije vrlo složeni i nedovoljno jasni. Ipak, za većinu hemijskih oscilatora, modeli mehanizama, iako složeni, su predloženi i detaljno ispitani.

- [5] I.R. Epstein, J.A. Pojman, *An Introduction to Nonlinear Chemical Dynamics, Oscillations, Waves, Patterns, and Chaos*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [6] A.T. Fecher, Ueber Umkehrungen der Polarität der einfachen Kette, *Schweingg. J.* **53** (1828) 61–76.
- [7] W. Ostwald, Periodisch veränderliche Reaktionsgeschwindigkeiten, *Phys. Zeitsch.* **8** (1899) 87–88.
- [8] W. C. Bray, A periodic reaction in homogeneous solution and its relation to catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* **43** (1921) 1262–1267.
- [9] Lj. Kolar-Anić, Ž. Čupić, V. Vukojević, S. Anić, *Dinamika nelinearnih procesa*, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2011.
- [10] Lj. Kolar-Anić, S. Anić, V. Vukojević, Neravnotežni sistemi i samoorganizacija. Nelinearni fizički, fizičko-hemijski i biosistemi, *Nauka, tehnika, bezbednost* **13**(2) (2003) 11–25.
- [11] B. Chance, R.W. Eastbrook, A. Gosh, Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmic reduced pyridine nucleotide in yeast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51** (1964) 1244–1251.
- [12] Č. Radenović, *Bioelektrične pojave biljnih sistema*, Nolit, Beograd, 1974.
- [13] О.Р. Ко́льс, Г.В. Макси́мов, Ч.Н. Раде́нович, *Биофизика ритмического возбуждения*, Издательство Московского университета, Москва, 1993.
- [14] A. Goldbeter, *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms*, Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [15] S. Donø, P.G. Sørensen, F. Hynne, Sustained oscillations in living cells, *Nature* **402** (1999) 320–322.
- [16] E.C. Zeeman, Catastrophe theory, *Sci. Am.* **234** (1976) 65–83.
- [17] D.M. Mitrović, Lj.V. Stanojević, *Teorija haosa i pravna teorija. Modelovanje i računarska simulacija u pravu*, Službeni list SRJ, Beograd, 1996.
- [18] *Experimental chaos*, aip Conference Proceedings, S. Boccaletti, B.J. Gluckman, J. Kurths, L.M. Pecora, R. Meucci, O. Yordanov (Eds.), American Institute of Physics, New York, Melville, 2004.
- [19] W.C. Bray, H.A. Liebafsky, Reactions involving hydrogen peroxide, iodine and iodate ion, *J. Am. Chem. Soc.* **53** (1931) 38–44.
- [20] B.P. Belousov, A Periodic Reaction and Its Mechanism, in *Collections of Abstracts on Radiation Medicine*, Medgiz-Moscow, 1958, pp. 145–147.
- [21] A.M. Zhabotinskii, Periodic kinetics of oxidation of malonic acid in solution (study of the Belousov reaction kinetics), *Biofiz.* **9** (1964) 306–311.
- [22] T. S. Briggs, W.C. Rauscher, An Oscillatory Iodine Clock, *J. Chem. Education* **50** (1973) 496–499.
- [23] S.D. Furrow, Chemical Oscillators Based on Iodate Ion and Hydrogen Peroxide, in: *Oscillations and Traveling Waves in Chemical Systems*, R.J. Field, M. Burger (Eds.), John Wiley, New York, 1985, pp. 171–192.
- [24] M. Orban, Oscillations and bistability in the Cu(II)-catalyzed reaction between H₂O₂ and KSCN, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 6893–6898.
- [25] C.G. Steinmetz, T. Geest, R. Larter, Universality, period-three window in peroxidase-oxidase reaction, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 5649–5653.
- [26] K.B. Yatsimirskii, L.P. Tikhonova, L.N. Zakrevskaya, Ya. D. Lampeka, A.G. Kolchinskii, New oscillating chemical reactions involving copper and nickel tetraazamacrocyclic complexes, *React. Kinet. Catal. Lett.* **21** (1982) 381–386.
- [27] G. Rábai, M.T. Beck, Oxidation of thiourea by iodate: a new type of oligo-oscillatory reaction, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1985) 1669–1672.
- [28] M. Orbán, E. Körös, R.M. Noyes, Chemical oscillations during the uncatalyzed reaction of aromatic compound with bromate. 2. A plausible skeleton mechanism, *J. Phys. Chem.* **83** (1979) 3056–3057.
- [29] I. Szalai, E. Körös, The 1,4 cyclohexanedione-bromate-acid oscillatory system. 3. Detailed mechanism, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 6892–6897.
- [30] Z.D. Zhang, L. Hu, J.M. Song, A new oscillating reaction of the Belousov-Zhabotinskii type with a macrocyclic copper(II) complex as catalyst, *Trans. Metal. Chem.* **30** (2005) 856–860.
- [31] L. Hu, G. Hu, H.H. Xu, Kinetic Determination of Ag⁺ using a novel Belousov-Zhabotinskii oscillating system catalyzed by a macrocyclic complex, *J. Anal. Chem.* **61** (2006) 1021–1026.
- [32] W. Yang, J. Ren, J. Z. Gao, H. Yang, D.Y. Lu, X. H. Liu, A novel chemical oscillator with tyrosine as the substrate, *Chin. Chem. Lett.* **14** (2003) 1281–1284.
- [33] R.P. Rastogi, A. Kumar, Oscillatory chemical reactions. 4. Cerium ion catalyzed reaction between malic acid and potassium bromate in sulfuric acid medium, *J. Phys. Chem.* **80** (1976) 2548–2552.
- [34] V. Jayalakshmi, R. Ramaswamy, Novel experimental findings in the B-Z system employing mixed substrates, *Can. J. Chem.* **74** (1996) 64–68.
- [35] M.H. Sorouraddin, M. Iranifam, Oscillating chemiluminescence with thiosemicarbazide in a bath reactor, *Luminescence* **23** (2008) 303–308.
- [36] J. Jensen, A New type of oscillating reaction: air oxidation of benzaldehyde, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 2639–2641.
- [37] N. Pejić, B. Perišić, Mikrokvantitativno određivanje kvercetina u čistom i farmaceutski doziranom obliku korišćenjem pulsne perturbacione tehnike, *Nauka, tehnika, bezbednost* **14**(1) (2004) 37–48.
- [38] P. Gray, S. Scott, *Chemical Oscillations and Instabilities: Nonlinear Chemical Kinetics*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- [39] N. Pejić, J. Maksimović, D. Ribič, Lj. Kolar-Anić, Dynamic states of the Bray-Liebafsky reaction when sulfuric acid is the control parameter, *R. J. Phys. Chem.* **83** (2009) 1666–1671.
- [40] L.P. Tikhonova, L.N. Zakrevskaya, K.B. Yatsimirskii, Catalytic determination of ruthenium based on an oscillating chemical reaction, *J. Anal. Chem.* **33** (1978) 1991–1998.

- [41] R. Jimenez–Prieto, M. Silva, D. Perez-Bendito, approaching the use of oscillating reactions for analytical monitoring, *Analyst* **23** (1998) 1R–8R.
- [42] J. Gao, Application of Oscillating Chemical Reaction to Analytical Chemistry: Recent Development, *J. Biol. Sci.* **8** (2005) 512–519.
- [43] N. Pejić, Analitičke primene metode pulsne perturbacije Bray-Liebhafsky oscilatorne reakcije realizovane u otvorenom reaktoru, *Hem. Ind.* **63** (5a) (2009) 455–466.
- [44] R. Jiménez–Prieto, M. Silva, D. Pérez-Bendito, Analyte pulse perturbation technique: a tool for analytical determinations in far-from-equilibrium dynamic system, *Anal. Chem.* **67** (1995) 729–734.
- [45] V. Vukojević, N. Pejić, D. Stanisavljev, S. Anić, Lj. Kolar–Anić, Determination of Cl^- , Br^- , I^- , Mn^{2+} , malonic acid and quercetin by perturbation of a non-equilibrium stationary state in the Bray-Liebhafsky reaction, *Analyst* **124** (1999) 147–152.
- [46] H. Wang, R. Cai, Z. Lin, Study and application of perturbation of peroxydinitrite on peroxidase-oxidase oscillation, *Talanta* **69** (2006) 509–514.
- [47] J. Gao, G. Zhao, Z. Zhang, J. Zhao, W. Yang, Nanoscale ceria ion-selective membrane electrode for the determination of dopamine by the Belousov-Zhabotinsky oscillating reaction using the analyte pulse perturbation technique, *Microchim. Acta* **157** (2007) 35–40.
- [48] R. Jiménez–Prieto, M. Silva, D. Pérez-Bendito, analytical assessment of the oscillating chemical reactions by use of hemiluminescence detection, *Talanta* **44** (1997) 1463–1472.
- [49] P. Yan, Y.F. Li, C.Z. Huang, A Detection method for oscillating chemical reactions by resonance light scattering technique, *Chem. Lett.* **36** (2007) 1178–1180.
- [50] A. Samadi-Maybodi, K. Abolfazli, determination of cysteine and methionine by oscillating chemical reaction using conductometry technique, *Int. J. Electrochem. Sci.* **4** (2009) 684–693.
- [51] J. Gao, D. Lv, W. Yang, X. Wei, J. Qu, H. Chen, H. Dai, J. Ren, Determination of sulfanilamide based on the Mn(II)-catalyzed oscillating chemical reaction, *Cent. Eur. J. Chem.* **5** (2007) 581–589.
- [52] J. Z. Gao, J. Qu, X. Wei, M. Guo, J. Ren, W. Yang, disturbance of penicillin by lactic acid-acetone- KBrO_3 - Mn^{2+} - H_2SO_4 oscillating system with analyte pulse perturbation technique, *Ch. J. Anal. Chem.* **36** (2008) 735–739.
- [53] J. Gao, H. Dai, H. Chen, D. Lv, W. Yang, X. Wei, J. Qu, kinetic determination of ribavirin by using the B-Z oscillating chemical reaction, *J. Chil. Chem. Soc.* **52** (2007) 1150–1154.
- [54] J. Gao, H. Dai, W. Yang, H. Chen, D. Lv, J. Ren, L. Wang, Determination of furfural in an oscillating chemical reaction using an analyte pulse perturbation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006) 1438–1443.
- [55] W. Yang, K. Sun, W. Lv, L. Bo, X. He, N. Suo, J. Gao, determination of alfa-naphthol by an oscillating chemical reaction using the analyte pulse perturbation technique, *Anal. Chim. Acta* **554** (2005) 218–223.
- [56] P. Chen, G. Hu, W. Wang, J. Song, L. Qiu, H. Wang, L. Chen, L. Hu, determination of catechol based on an oscillating chemical reaction involving a macrocyclic complex as catalyst, *J. Appl. Electrochem.* **38** (2008) 1779–1783.
- [57] G. Hu, L. Chen, J. Zhang, P. Chen, W. Wang, J. Song, L. Qiu, J. Song, L. Hu, Determination of alizarin Red S using a novel B-Z oscillation system catalyzed by a tetra azamacrocyclic complex, *Cent. Eur. J. Chem.* **7** (2009) 291–297.
- [58] J. Wang, W. Yang, J. Ren, M. Guo, X. Chen, W. Wang, J.Z. Gao, Trace determination of cobalt ion by using malic acid-malonic acid double substrate oscillating chemical system, *Ch. Chem. Lett.* **19** (2008) 1103–1107.
- [59] J. Gao, D. Lv, H. Sun, W. Yang, Determination of L-aspartic acid by using the Cu(II)-catalyzed oscillating reaction, *J. Braz. Chem. Soc.* **10** (2009) 1827–1832.
- [60] J. Maksimović, Lj. Kolar–Anić, S. Anić, D. Ribić, N. Pejić, Quantitative determination of some water-soluble vitamins by kinetic analytical method based on the perturbation of an oscillatory reaction, *J. Braz. Chem. Soc.* **22** (2011) 38–48.
- [61] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, V. Vukojević, Lj. Kolar–Anić, Microquantitative determination of hesperidin by pulse perturbation of the oscillatory reaction system, *Anal. Bioanal. Chem.* **381** (2005) 775–780.
- [62] N. Pejić, Lj. Kolar–Anić, S. Anić, D. Stanisavljev, determination of paracetamol in pure and pharmaceutical dosage forms by pulse perturbation technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 610–615.
- [63] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, Lj. Kolar–Anić, determination of ascorbic acid in pharmaceutical dosage forms and urine by means of an oscillatory reaction system using the pulse perturbation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007) 2009–2017.
- [64] N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, V. Vukojević, M. Mijatović, J. Ćirić, Z. Marković, S. Marković, Lj. Kolar–Anić, Kinetic determination of morphine by means of bray-liebhafsky oscillatory reaction system using analyte pulse perturbation technique, *Anal. Chim. Acta* **582** (2007) 367–374.
- [65] J. Maksimović, N. Pejić, D. Ribić, Lj. Kolar–Anić, Pulse perturbation technique for determination of thiamine in pharmaceuticals using an oscillatory reaction system, in: *Physical Chemistry 2008*, A. Antić-Jovanović (Ed.), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, 2008, 232–234.
- [66] J. Gao, X. Chen, J. Ren, W. Yang, Determination of p-phenylenediamine by perturbation of a non-equilibrium stationary state in the B-Z reaction, *J. Braz. Chem. Soc.* **22** (2011) 648–651.
- [67] J. Gao, J. Liu, J. Ren, X. Niu, Y. Zhang, W. Yang, Determination of p-nitroaniline by the tartarate-acetone- Mn^{2+} - KBrO_3 - H_2SO_4 double organic substrate oscillating system using non-equilibrium stationary state, *Cent. Eur. J. Chem.* **7** (2009) 298–302.
- [68] J. B. Raoof, A. Kiani, R. Ojani, F. Sakhavi, A.S. Hamidi, Potentiometric effects of L-penicillamine on a Belousov-Zhabotinskii oscillating reaction: application to deter-

- mination of L-penicillamine, *Anal. Bioanal. Electrochem.* **2** (2010) 189–201.
- [69] Y. Dong, K. Gai, Determination of ampicillin using the Belousov-Zhabotinskii oscillating system, *Mendeleev Comm.* **15** (2005) 256–259.
- [70] L. Chen, G. Hu, J. Zhang, L. Hu, Kinetic Determination of calcium pantothenate by a $[\text{CuL}](\text{ClO}_4)_2$ -catalysed oscillating system, *Mendeleev Comm.* **19** (2009) 224–226.
- [71] J. Gao, J. Qu, W. Yang, X. Wei, H. Dai, D. Lv, J. Ren, H. Chen, Kinetic determination of tryptohan by using B-Z oscillating chemical System, *Amino Acids* **36** (2009) 391–397.
- [72] J.B. Raoof, A. Kiani, R. Ojani, F. Sakhavi, A. Hamidi, Determination of L-cysteine based on its potentiometric effect on a Belousov-Zhabotinskii oscillating chemical reaction, *Int. J. Electrochem. Sci.* **6** (2011) 1760–1771.
- [73] G. Hu, P. Chen, W. Wang, L. Hu, J. Song, L. Qiu, J. Song, Kinetic determination of pyrogallol by a novel oscillating chemical reaction catalyzed by a tetraazamacrocyclic complex, *Electrochim. Acta* **28** (2007) 7996–8002.
- [74] J. Gao, X. Wei, W. Yang, D. Lv, J. Qu, H. Chen, H. Dai, Determination of 1-naphthylamine by using oscillating chemical reaction, *J. Hazard. Materials* **144** (2007) 67–72.
- [75] J. Gao, K. Sun, W. Yang, H. Zhou, Determination of *p*-nitrobenzene-azo-naphtol by an oscillating chemical reaction using the analyte pulse perturbation technique, *C. Eur. Sci. J.* **3** (2005) 502–510.
- [76] J. Gao, H. Chen, H. Dai, D. Lv, J. Ren, L. Wang, W. Yang, Improved sensitivity for transient metal ions by use of ssulfide in the Belousov-Zhabotinskii oscillating Reaction, *Anal. Chim. Acta* **571** (2006) 150–155.
- [77] J. Gao, J. Chen, H. Dai, W. Yang, J. Ren, D. Lv, J. Qu, X. Wei, H. Guo, Determination of S^{2-} ion by using the B-Z oscillating reaction chemical reaction, *J. Sulfur Chem.* **27** (2006) 537–544.
- [78] J. Gao, L. Wang, W. Yang, F. Yang, Kinetic Determination of indium ion based on B-Z oscillating chemical system, *J. Braz. Chem. Soc.* **17** (2006) 458–462.
- [79] H. Chen, W. Yang, H. Dai, X. Wei, J. Qu, J. Gao, determination of same heavy-metal-ions using a sulfur ion modified BZ oscillating system, *Ch. Chem. Lett.* **17** (2006) 1221–1224.
- [80] P.E. Strizhak, V. Khavrus, Determination of gases (NO , CO , Cl_2) using mixed-mode regimes in the Belousov-Zhabotinskii oscillating chemical reaction, *Talanta* **51** (2000) 935–947.

SUMMARY

ANALYTICAL APPLICATIONS OF OSCILLATORY CHEMICAL REACTIONS: DETERMINATION OF SOME PHARMACEUTICALLY AND BIOLOGICALLY IMPORTANT COMPOUNDS

Nataša D. Pejić¹, Slobodan R. Anić², Ljiljana Z. Kolar-Anić³

¹*Department of Physical Chemistry and Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

²*IHTM – Department of Catalysis and Chemical Engineering,, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

³*Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

(Review paper)

Novel analytical methods for quantitative determination of analytes based on perturbations of oscillatory chemical reactions realized under open reactor conditions (continuously fed well stirred tank reactor, CSTR), have been developed in the past twenty years. The proposed kinetic methods are generally based on the ability of the analyzed substances to change the kinetics of the chemical reactions matrix. The unambiguous correlation of quantitative characteristics of perturbations, and the amount (concentration) of analyte expressed as a regression equation, or its graphics (calibration curve), enable the determination of the unknown analyte concentration. Attention is given to the development of these methods because of their simple experimental procedures, broad range of linear regression (10^{-7} – 10^{-4} mol L⁻¹) and low limits of detection of analytes (10^{-6} – 10^{-8} mol L⁻¹, in some cases even lower than 10^{-12} mol L⁻¹). Therefore, their application is very convenient for routine analysis of various inorganic and organic compounds as well as gases. This review summarizes progress made in the past 5 years on quantitative determination of pharmaceutically and biologically important compounds.

Keywords: Oscillatory reaction • Analyte pulse perturbation technique • Flow reactor • Pharmaceutical preparations