

Priprava ionskog senzora na bazi paste od grafita za određivanje acebutolola uz tetrafenilborat i fosfomolibdat kao anionski dio IAC-a

Škutin, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:066729>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-10**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PRIPRAVA IONSKOG SENZORA NA BAZI PASTE OD
GRAFITA ZA ODREĐIVANJE ACEBUTOLOLA UZ
TETRAFENILBORAT I FOSFOMOLIBDAT KAO ANIONI
DIO IONSKO-ASOCIJACIJSKOG KOMPLEKSA**

DIPLOMSKI RAD

LANA ŠKUTIN

Matični broj: 153

Split, srpanj 2022.

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

**PRIPRAVA IONSKOG SENZORA NA BAZI PASTE OD
GRAFITA ZA ODREĐIVANJE ACEBUTOLOLA UZ
TETRAFENILBORAT I FOSFOMOLIBDAT KAO ANIONI
SKO DIO IONSKO-ASOCIJACIJSKOG KOMPLEKSA**

DIPLOMSKI RAD

LANA ŠKUTIN

Matični broj: 153

Split, srpanj 2022.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORIENTATION: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**PREPARATION OF ION SENSOR BASED ON GRAPHITE
PASTE FOR DETERMINATION OF ACEBUTOLOL WITH
TETRAPHENYLBORATE AND PHOSPHOMOLYBDATE AS
ANIONIC PART OF IONIC-ASSOCIATION COMPLEX**

GRADUATE THESIS

LANA ŠKUTIN

Parent number: 153

Split, July 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Tema rada: je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Marija Bralić

PRIPRAVA IONSKOG SENZORA NA BAZI PASTE OD GRAFITA ZA ODREĐIVANJE ACEBUTOLOLA UZ TETRAFENILBORAT I FOSFOMOLIBDAT KAO ANIONIJSKI DIO IONSKO-ASOCIJACIJSKOG KOMPLEKSA

Lana Škutin, 153

Sažetak: Elektrode na bazi paste od ugljika (CPE) su posebne heterogene ugljikove elektrode koje čini smjesa ugljikovih pasti pripremljenih s različitim udjelima grafita, veziva, ionsko-asocijacijskog kompleksa, soli. CPE imaju široku primjenu u određivanju elektrokemijski aktivnih spojeva.

U ovom radu pripremljen je potenciometrijski senzor na bazi paste od grafita uz PMA i TPB kao anionskog dijela IAC-a za određivanje acebutolola u realnim uzorcima.

Pripremljene su i testirane 22 paste s različitim udjelima grafita, tekućih veziva (TEPh, DEHA, NPOE) i IAC-a (ACBTPB, ACBPMA) pri pH vrijednosti 5. U paste s najboljim odzivnim karakteristikama dodana je mala količina soli NaTPB-a. Najbolje odzivne karakteristike pokazala je pasta 16 pripremljena od 54,8% grafita, 44,8% TEPh-a, 0,3% IAC-a ACB PMA i 0,1% NaTPB. Promjena potencijala po koncentracijskoj dekadi je u rasponu od -36,3 mV do -51,8 mV. Elektroda je drugi dan mjerenja nakon prvog poliranja pokazala najbolju promjenu potencijala po koncentracijskoj dekadi od -51,0 mV odnosno -51,8 mV u području linearnosti od $3,16 \times 10^{-6}$ M do $3,16 \times 10^{-3}$ M. Vrijeme uspostave stabilnog odziva je 60 s.

Ključne riječi: elektroda na bazi ugljikove paste (CPE), acebutolol, IAC, potenciometrija, ISE

Rad sadrži: 80 stranica, 29 slika, 23 tablice, 42 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu: 1. Prof.dr.sc. Josipa Giljanović

2. Izv.prof.dr.sc. Ante Prkić

3. Prof.dr.sc. Marija Bralić

Datum obrane: 14.07.2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved at the 25th session of the Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology

Mentor: Full professor PhD. Marija Bralić

PREPARATION OF ION SENSOR BASED ON GRAPHITE PASTE FOR DETERMINATION OF ACEBUTOLOL WITH TETRAPHENYLBORATE AND PHOSPHOMOLYBDATE AS ANIONIC PART OF IONIC-ASSOCIATION COMPLEX

Lana Škutin, 153

Abstract: Carbon paste electrodes are special group of heterogeneous carbon electrodes mixture of carbon pastes are prepared with different parts of graphite, binder, ion-association complex and salt. CPE are widely used as working electrodes for the determination of electrochemically active compounds.

In this experiment are prepared the potentiometric sensor based on graphite paste with tetraphenylborate and phosphomolybdate as anionic part of ionic-association complex for determination of acebutolol in real samples.

22 pastes with different proportions of graphite, liquid binders (TEPh, DEHA, NPOE) and IAC (ACBTPB, ACBPMA) were prepared and tested at pH 5. A small amount of NaTPB salt was added to the pastes with the best response characteristics. The best response characteristics were shown by paste 16 prepared from 54.8% graphite, 44.8% TEPh, 0.3% IAC ACB PMA and 0.1% NaTPB. The change in potential per concentration decade ranges from -36.3 mV to -51.8 mV. On the 2nd day of measurement after the 1st polish, the electrode showed the best potential change per concentration decade from -51.0 mV and -51.8 mV in the linearity range from 3.16×10^{-6} M to 3.16×10^{-3} M. The time to establish a stable response is 60 s.

Keywords: carbon paste electrode (CPE), acebutolol, IAC, potentiometry, ISE

Thesis contains: 80 pages, 29 figures, 23 tables, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee: 1. Full prof. PhD Josipa Giljanović
2. Associate prof. PhD Ante Prkić
3. Full prof. PhD Marija Bralić

Defence date: 14.07.2022.

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

Diplomski rad je izrađen na Zavodu za kemiju okoliša, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof.dr.sc. Marije Bralić u razdoblju od ožujka do lipnja 2022.godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc.Mariji Bralić na strpljenju, pomoći, savjetima, iskazanom povjerenju i безусловnoj podršci prilikom izrade diplomskog rada. Hvala Vam što ste vjerovali u mene, prepoznali moj trud i rad i nesebično izdvajali svoje vrijeme da budete uz mene i motivirali me iz dana u dan. Hvala Vam što nikada niste odustali od mene i što ste mi pokazali koliko vrijedim. Hvala Vam što ste mi olakšali i uljepšali ovaj trnoviti put.

Zahvaljujem se laborantici Marici Mijić, osobi velikog srca koja mi je svojom pozitivnom energijom, savjetima, beskrajnom podrškom i vjerom uljepšala svaki provedeni dan u laboratoriju. Hvala Vam za svaki osmijeh, savjet i kritiku. Hvala Vam što ste mi svaki dan u laboratoriju učinili posebnim.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima koji su vjerovali u mene, pružali mi neizmjernu ljubav, snagu, podršku i motivaciju tijekom studija. Hvala Vam što ste vjerovali u mene i onda kada ja nisam. Hvala Vam što ste mi uljepšali ovaj težak životni period i bili tu uz mene u svakom trenutku. Hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili da ostvarim svoje snove! Moj uspjeh je i Vaš uspjeh i hvala Vam na tome!

"We must believe that we are gifted for something, and that this thing, at whatever cost, must be attained."-M.Curie

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA:

1. Priprava ionskog senzora na bazi paste od grafita sa tekućim vezivima NPOE, TEPH, DEHA i TPB-om i PMA-om kao anionskim dijelom ionsko-asocijacijskog kompleksa.
2. Ispitati odzivne karakteristike pripremljenih membrana.

Sažetak

Elektrode na bazi paste od ugljika (CPE) su posebne heterogene ugljikove elektrode koje čini smjesa ugljikovih pasti pripremljenih s različitim udjelima grafita, veziva, ionsko-asocijacijskog kompleksa, soli. CPE imaju široku primjenu u određivanju elektrokemijski aktivnih spojeva.

U ovom radu pripremljen je potenciometrijski senzor na bazi paste od grafita uz PMA i TPB kao anionski dio IAC-a za određivanje acebutolola u realnim uzorcima.

Pripremljene su i testirane 22 paste s različitim udjelima grafita, tekućih veziva (TEPh, DEHA, NPOE) i IAC-a (ACBTPB, ACBPMA) pri pH vrijednosti 5. U paste s najboljim odzivnim karakteristikama dodana je mala količina soli NaTPB-a.

Najbolje odzivne karakteristike pokazala je pasta 16 pripremljena od 54,8% grafita, 44,8% TEPh-a, 0,3% IAC-a ACB PMA i 0,1% NaTPB. Promjena potencijala po koncentracijskoj dekadi je u rasponu od -36,3 mV do -51,8 mV. Elektroda je drugog dan mjerenja nakon prvog poliranja pokazala najbolju promjenu potencijala po koncentracijskoj dekadi od -51,0 mV odnosno -51,8 mV u području linearnosti od $3,16 \times 10^{-6}$ M do $3,16 \times 10^{-3}$ M. Vrijeme uspostave stabilnog odziva je 60 s.

Summary

Carbon paste electrodes are special group of heterogeneous carbon electrodes mixture of carbon pastes are prepared with different parts of graphite, binder, ion-association complex and salt. CPE are widely used as working electrodes for the determination of electrochemically active compounds.

In this experiment are prepared the potentiometric sensor based on graphite paste with tetraphenylborate and phosphomolybdate as anionic part of ionic-association complex for determination of acebutolol in real samples.

22 pastes with different proportions of graphite, liquid binders (TEPh, DEHA, NPOE) and IAC (ACBTPB, ACBPMA) were prepared and tested at pH 5. A small amount of NaTPB salt was added to the pastes with the best response characteristics.

The best response characteristics were shown by paste 16 prepared from 54.8% graphite, 44.8% TEPh, 0.3% IAC ACB PMA and 0.1% NaTPB. The change in potential per concentration decade ranges from -36.3 mV to -51.8 mV. On the 2nd day of measurement after the 1st polish, the electrode showed the best potential change per concentration decade from -51.0 mV and -51.8 mV in the linearity range from $3,16 \times 10^{-6}$ M to $3,16 \times 10^{-3}$ M. The time to establish a stable response is 60 s.

POPIS KRATICA:

DME- dimetil-eter

PyGE- pirolitička grafitna elektroda

GCE- staklena ugljikova elektroda

CPE- elektroda na bazi ugljikove paste

AB- crni acetilen

GC- staklasti ugljik

GCPE- elektroda na bazi paste od staklastog ugljika

GC prah- staklasti ugljikov prah

CNT- ugljikove nanocijevi

CNH- ugljikovi "nanorogovi"

OMC- uređeni mezoporozni ugljik

OMCPE- elektroda na bazi paste od uređenog mezoporoznog ugljika

CNF- ugljikova nanovlakna

CVD- kemijsko taloženje parom (postupak kemijskog presvlačenja u parnoj fazi)

GR- grafen

CPEE- elektroaktivna elektroda na bazi ugljikove paste

TCP- trikrezil-fosfat

CMCPE- kemijski modificirana elektroda na bazi ugljikove paste

BPE- elektroda na bazi vezivne paste

RT(IL)- ionska tekućina sobne temperature

CILE- ugljikova ionska tekuća elektroda

STM- skenirajuća tunelska mikroskopija

OM- optička mikroskopija

SEM- skenirajuća elektronska mikroskopija

AFM- mikroskopija atomske sile

GI- gastrointestinalni trakt

COMT-katekol-O-metiltransferaza

MAO-monoaminoooksidaza

TPB- tetrafenilborat

TBATPB- tetrabutylamonijev tetrafenilborat

NaTPB- natrijev tetrafenilborat

TDATpCIPB- tetradodecilamonijtettrakis(4-klorofenil)borat

KTpCIPB- kalijev tettrakis(4-klorofenil)borat

ACB- acebutolol

NPOE- 2-nitrofenil-oktil-eter

DEHA- bis(2-etilheksil) adipat

T(2EH)Ph- tris(2-etilheksil) fosfat

PMA- fosfomolibdenska kiselina hidrat

PTA- fosfovolframova kiselina hidrat

REIN- amonijev reinekati

Trip- triprolidin

Dc- doksiciklin

BC.HCl- butenafin hidroklorid

VER- verapamil

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Potencimetrija	2
2.2. Ion-selektivne elektrode	4
2.3. Podjela ion-selektivnih elektroda	6
2.3.1. Elektrode s kristalnom membranom	6
2.3.1.1. Homogene membrane.....	6
2.3.1.2. Heterogene membrane.....	7
2.3.2. Elektrode s nekristalnom membranom	7
2.3.2.1. Elektrode sa staklenom membranom.....	7
2.3.2.2. Elektrode sa mobilnim prenosiocem.....	7
2.3.3. Specijalne ion-selektivne elektrode	8
2.4. Mehanizam rada ISE	8
2.5. Ugljikove paste i elektrode na bazi ugljikove paste	10
2.5.1. Definicija ugljikove paste i elektrode na bazi ugljikove paste	10
2.5.1.1. Grafit (ugljkov prah).....	11
2.5.1.2. Ostali ugljikovi materijali.....	13
2.5.1.3. Novi oblici ugljika.....	13
2.5.2. Veziva/ Tekućine za lijepljenje	15
2.5.3. Priprema ugljikove paste	16
2.5.4. Čuvanje i pohrana ugljikove paste	18
2.6. Ugljikova pasta kao elektrodni materijal	18
2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva ugljikove paste.....	18
2.6.2. Elektrokemijska svojstva ugljikove paste.....	20
2.7. Podjela elektroda na bazi ugljikove paste	22

2.7.1. Tradicionalne vrste CPE.....	22
2.7.2. Specijalne vrste CPE.....	23
2.7.3. Nove vrste CPE.....	24
2.8. β -blokatori.....	25
2.8.1. β -blokatori kao kardiovaskularni lijekovi	26
2.8.2. Acebutolol.....	28
2.8.2.1. Osnovne karakteristike acebutolola.....	28
2.8.2.2. Sinteza acebutolola.....	32
2.9. Pregled literature općenito o CPE.....	33
2.9.1. Pregled literature o ACB-u.....	35
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	37
3.1. Priprava otopina.....	37
3.1.1. Priprema ionsko-asocijacijskih kompleksa (IAC)- taloženje.....	37
3.1.1.1. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB TPB.....	38
3.1.1.2. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB REIN.....	38
3.1.1.3. Priprema ionsko-ascocijacijskog kompleksa ACB PMA.....	38
3.1.1.4. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB PTA.....	39
3.1.2. Priprema acetatnog pufera.....	39
3.1.3. Priprema standarda.....	40
3.2. Miješanje i priprema membrana.....	41
4. REZULTATI.....	45
5. RASPRAVA.....	73
6. ZAKLJUČAK.....	76
7. LITERATURA.....	77

1. UVOD

Ion-selektivne elektrode (ISE) su membranske elektrode koje selektivno reagiraju na jednu ili nekoliko ionskih vrsta u prisutnosti drugih čime je omogućeno potenciometrijsko određivanje sufraktanata. Zbog jednostavne uporabe i dizajna jedne su od najvažnijih skupina kemijskih senzora. Za razliku od drugih analitičkih metoda, ISE reagiraju na ionsku aktivnost, a ne na koncentraciju. Selektivnost ISE određena je sastavom membrane.

Primjena ISE-a evoluirala je u dobro razvijenu svakodnevnu analitičku tehniku u kliničkoj analizi i analizi okoliša, fiziologiji te kontroli procesa.

Glavne značajke ISE su selektivnost i brza reakcija, čak i uz male promjene u koncentraciji ispitivane otopine. Promjenom pH vrijednosti može se uočiti negativan utjecaj na točnost rezultata dobivenih mjerenjima pomoću ion-selektivne elektrode. Ispitivanja su pokazala da prisutnost interferirajućih ionskih vrsta u otopini može negativno utjecati na točnost, brzinu odziva i vijek trajanja same elektrode.

Elektrode na bazi ugljikove paste razvijene su iz pokušaja pripreme tekućine suspendiranih čestica ugljika koje su namijenjene za postizanje padajućeg potencijala elektrode kod anodne oksidacije. Takva smjesa se može pripremati i ispuštati iz unutrašnjeg otvora kapilare koji je nešto veći od kapilare dimetil-etera (DME). Prva ugljikova pasta bila je smjesa 1 g ugljikovog praha i 7 mL bromoforma čija su svojstva dokazana oksidacijom jodida u otopini koja je sadržavala 1×10^{-4} M jodida i 1 M H_2SO_4 . Druga ugljikova pasta koja je bila testirana je smjesa ugljika i ugljikovog tetraklorida.

Ugljikove paste različitih konzistencija mogu se dobiti na 3 načina:

- Umjereno gusta ugljikova pasta može se dobiti miješanjem ugljika i organske tekućine dok ne nastane jednolična mokra smjesa (prva ugljikova pasta dobivena je u omjeru 7:1). Ova pasta pogodna je za primjenu u bazenima.
- Ugljikova pasta konzistencije maslaca od kikirikija može se dobiti miješanjem ugljika s organskom tekućinom i pogodna je za korištenje kod anodne voltametrije.
- Standardna ugljikova pasta se može dobiti jednostavnim ručnim miješanjem ugljika s bilo kojom tekućinom koja se dovoljno ne miješa s vodom da ne dođe do otapanja matrice elektrode kada je uronjena u otopinu.

2. OPĆI DIO

2.1. Potencimetrija

Potencimetrija je elektroanalitička metoda u kojoj se mjeri razlika potencijala između dviju elektroda (indikatorske i referentne) u elektrokemijskoj ćeliji uz ravnotežne uvjete. Ta razlika potencijala predstavlja signal. Mjerenje napona ćelije provodi se tako da kroz ćeliju ne teče struja odnosno teče tako mala struja da ona ne utječe na mjerljivo stanje ravnoteže na elektrodama. Ukoliko se na elektrodama odvijaju reverzibilne reakcije potencijetrijom možemo odrediti promjenu slobodne entalpije, konstantu ravnoteže kemijskih reakcija, aktivitet odnosno koncentraciju i koeficijent aktiviteta. Potencimetrija se može primjenjivati za tvari čije se koncentracijsko područje nalazi u rasponu $10^{-5} - 10^{-1}$ M.^{1,2}

Potencimetrijska mjerenja provodimo uporabom dviju elektroda (referentne i indikatorske) uronjenih u elektrolitnu otopinu kako bi se spriječilo njihovo međusobno miješanje. Električna struja se iz jedne otopine u drugu provodi pomoću elektrolitnog mosta koji predstavlja vodljivu otopinu. Kontaktni potencijal (E_{kon}) nastaje na granici između dviju tekućina koje stvaraju elektrolitni most.³

Shematski prikaz elektrokemijskog članka:

referentna elektroda | elektrolitni most | otopina analita | indikatorska elektroda¹⁸

Napon članka prikazuje se navedenom jednadžbom:

$$E_{\text{članka}} = E_{\text{ind}} - E_{\text{ref}} + E_{\text{kon}}$$

Razlika potencijala između elektroda ćelije mjeri se pomoću osjetljivih mjernih uređaja potencijometra i voltmetra s velikom ulaznom impedancijom pH-metra odnosno pIon-metra.^{2,3,11}

Standardne (referentne) elektrode su elektrode koje imaju stalan potencijal i koriste se kao standard prema kojem mjerimo potencijal druge elektrode (radne ili indikatorske).^{1,2}

Vrste standardne elektrode:

- Ag/AgCl elektroda
- Standardna vodikova elektroda
- Zasićena kalomelova elektroda

Najčešće korištene referentne elektrode (anode) su: srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) i zasićena kalomelova elektroda (ZKE).^{1,2}

Dvije su temeljne vrste indikatorskih elektroda: kovinske (metalne) elektrode i selektivne (membranske) elektrode. Kod kovinskih elektroda razlika potencijala na dodirnoj granici elektroda-otopina posljedica je redoks reakcije na elektrodi. Kod membranskih elektroda potencijal elektrode proizlazi iz promjene slobodne entalpije reakcije prijelaza iona, ionskom izmjenom, adsorpcijom, ekstrakcijom ili drugim načinom, kroz međusloj membrana-ispitivana otopina.^{1,2}

Na temelju razlike u načinu nastajanja potencijala indikatorske elektrode potenciometriju možemo podijeliti na:

- redoks-potenciometriju, u kojoj potencijal indikatorske elektrode ovisi o aktivitetima oksidiranog i reduciranog oblika redoks-sustava i
- pH-potenciometriju, pA-potenciometriju odnosno pM-potenciometriju u kojoj primjenjujemo selektivne elektrode za mjerenje aktiviteta (koncentracije) vodikovih iona (pH), aktiviteta aniona (pA) odnosno aktiviteta metalnih iona (pM).^{1,2}

Potencijal reverzibilne metalne elektrode na čijoj aktivnoj površini je uspostavljena dinamička ravnoteža između metala i iona u otopini opisan je Nernstovom jednačinom. Za redoks sustav metala prikazan općenitom relacijom $M^{z+} + ze^- \leftrightarrow M$, potencijal elektrode pri 25°C dan je izrazom:

$$E = E_{M^{z+}/M}^0 + \frac{0,059V}{z} \cdot \log \frac{a_{M^{z+}}}{a_M}$$

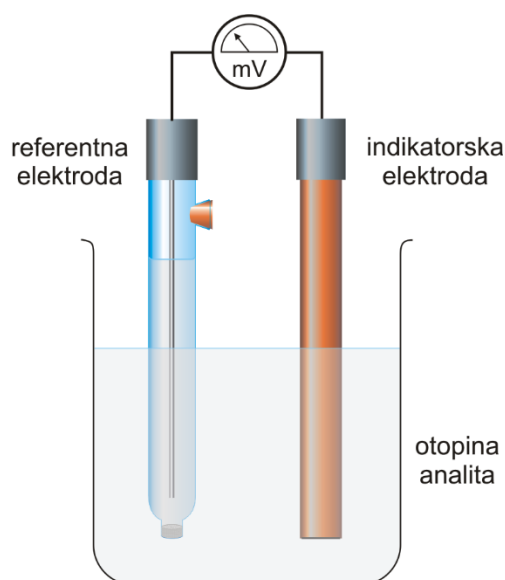
gdje E^0 predstavlja standardni redoks potencijal, $a_{M^{z+}}$ i a_M aktivitet oksidiranog odnosno reduciranog oblika redoks sustava metala. Kada je aktivitet čistog metala jednak 1, potencijal kovinskih elektroda ovisi samo o aktivitetu iona metala u otopini i takve elektrode nazivamo kovinskim elektrodama I. reda.^{1,2}

Kovinske elektrode koje se koriste za određivanje aktiviteta aniona s kojima metalni ion elektrode tvori stabilni, topljivi kompleks i pripadaju elektrodama II. reda. Npr. srebrna elektroda uronjena u zasićenu otopinu teško topljivog taloga srebrovog klorida i živa koja može poslužiti kao indikatorska elektroda drugog reda za anion EDTA (Y^{4-}).⁴

Kovinske elektrode III. reda su vrlo nestabilne i trome elektrode koje nastaju kao posljedica uspostavljanja uzastopnih ravnoteža prije postizanja stabilnog potencijala. Potencijal ovih elektroda čija je koncentracija kontrolirana koncentracijom zajedničkog aniona i ovisi o koncentraciji njihovog kationa u otopini. Npr. živina elektroda koja može poslužiti i kao

elektroda trećeg reda za mjerenje aktiviteta (koncentracije) kationa koji s Y^{4-} anionom tvore stabilne komplekse.⁴

Razlikujemo direktno i indirektno potenciometrijsko mjerenje. Direktna potenciometrija iz podataka o potencijalu indikatorske elektrode određuje koncentraciju iona u ispitivanoj otopini. Indirektna potenciometrija određuje koncentraciju i predstavlja samo procjenu aktivnosti ili slobodne molarne koncentracije.⁵



Slika 1. *Elektrokemijski članak*²

2.2. Ion-selektivne elektrode

Ion-selektivne elektrode (ISE) su kemijski potenciometrijski senzori koji se koriste za selektivno određivanje samo jedne molekulske ili ionske vrste prisutne u otopini. U većini membranskih elektroda razlika potencijala na dodirnoj površini elektroda-otopina posljedica je izmjene iona iz otopine i iona na površini membrane. Osim ovog načina, potencijal selektivne elektrode može se uspostaviti i na druge načine (npr. kroz međusloj membrana-ispitivana otopina). Mjerljiva razlika potencijala na membrani iskazana je Nernstovom jednačinom:

$$E = \text{konst.} + \frac{RT}{z_i F} \ln a_A$$

gdje je a_A aktivitet aktivnog iona (A) koji sudjeluje u uspostavljanju stanja termodinamičke ravnoteže reakcije ionske izmjene na površini membrane. Učinak druge ionske vrste ovisi o termodinamičkim karakteristikama reakcije ionske izmjene i te druge ionske vrste tj. o

odnosu gustoće struje izmjene jedne i druge ionske vrste. Učinak se iskazuje koeficijentom selektivnosti.^{1,2}

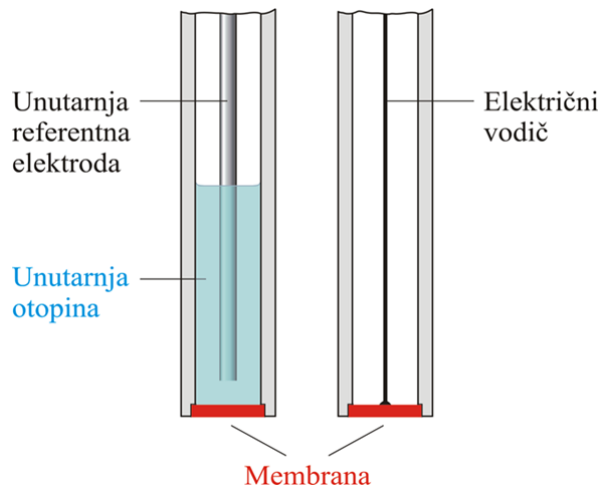
Prema prirodi veznih mjesta putem kojih se uspostavlja interakcija ionske vrste prisutne u otopini s površinom membrane, membrane se mogu podijeliti na:

- membrane koje imaju nepomična vezna mjesta
- membrane s pomičnim veznim mjestima

Membrane s pomičnim veznim mjestima imaju vezna mjesta na molekulskim vrstama koje nazivamo ionofori. To mogu biti električki nabijene čestice (tzv. tekući ionski izmjenjivači) i električki nenabijeni stvaraoči kompleksa. Ionofori su prisutni u otopini i pomični su u slobodnom stanju i u stanju kompleksa. Na membrani postavljenoj između dvije elektrolitne otopine dolazi do izmjene iona s obje strane membrane što dovodi do pojave razlika potencijala na svakoj strani membrane. U materijalu same membrane moraju postojati pokretljivi nosioci električnog naboja koji prenose električnu struju kroz membranu kako bi se membrana mogla koristiti kao električno osjetilo.²

Ion-selektivna membrana je najčešće izrađena od stakla ili polimernog materijala i uz referentnu elektrodu omogućuje pretvaranje kemijske reakcije u električni potencijal i služi za detekciju ispitivanog analita.^{2,11}

U odnosu na druge analitičke senzore, ISE imaju mnogobrojne prednosti kao što su brzi odziv, jednostavna upotreba, laka dostupnost, relativno niska cijena nabave, rad bez utjecaja boje i mutnoće, mogućnost primjene u vrlo širokom koncentracijskom području koje ih svrstava u jedne od najrasprostranjenijih kemijskih senzora u medicini, ekologiji i industriji. ISE su najpraktičnije za analizu onih kemijskih vrsta kojima je potrebna točnost veća od $\pm 2\%$ u odnosu na koncentraciju (elektrolita: Na, K, Ca, Li, I, Mg, Cl, F, glukoze, uree, plinske analize arterijske krvi: pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^-). U industrijskim sustavima gdje su temperaturne razlike vrlo izražene postiže se točnost od $\pm 5\%$ do $\pm 10\%$.^{6,9}



Slika 2. Ion-selektivna elektroda¹⁰

2.3. Podjela ion-selektivnih elektroda

Ion-selektivne elektrode pripadaju skupini membranskih elektroda i dijele se na: *elektrode s kristalnom membranom i elektrode s nekristalnom membranom*.^{7,11}

2.3.1. Elektrode s kristalnom membranom

Elektrode s kristalnom membranom imaju membranu koja sadrži teško topljivu sol metala kao aktivnu komponentu. Selektivnost ovih membrana ovisi o konstanti produkta topljivosti teško topljive soli. Potencijal kristalnih membranskih elektroda posljedica je stanja ravnoteže reakcije zamjene iona u otopini i u čvrstoj fazi membrane. Ove elektrode su selektivne na ione sadržane u membrani i mogu imati homogene i heterogene membrane.^{6,7,11}

2.3.1.1. Homogene membrane

Homogene membrane sadrže kristalnu supstancu jednog spoja i homogene smjese spojeva ili mogu biti monokristalne pločice (npr. LaF_3). Često se izrađuju membrane od smjese dviju kristalnih tvari od kojih je samo jedna elektrokemijski aktivna tvar membrane. Površina elektrode je selektivna i na druge molekulske vrste koji s ionima membrane tvore teško topljive soli ili stabilne topljive komplekse. Tako je membrana izrađena od Ag_2S selektivna za ione Ag^+ , Cl^- , I^- , Hg_2^{2+} i druge ione koji tvore teško topljive sulfide. U vodljivim membranama (sa Ag solima) električni se kontakt može ostvariti izravno preko metalnog vodiča s unutarnjom stranom membrane.^{6,7,11}

2.3.1.2. Heterogene membrane

Kod heterogenih membrana aktivna tvar je dispergirana u čvrstom, elektrokemijski inaktivnom nosivom materijalu. Kao nosivi materijala najčešće se koristi silikonska guma ili polimerni materijali na bazi poli(vinil-klorida), polietilena i poli(dimetil-silokana). Heterogene membrane se pripremaju prešanjem aktivnog materijala pomiješanog sa silikonskom gumom. Nakon stvrdnjavanja membrane se lijepe na otvor staklenog ili plastičnog nosača. Električni kontakt se ostvaruje preko unutrašnje elektrolitne otopine i unutrašnje referentne elektrode. Ove elektrode se moraju prije upotrebe kondicionirati u otopini iona za koje su selektivne. Membrana je mehanički osjetljivija od homogenih čvrstih membrana i zahtjeva pažljiviji rad.^{6,7,11}

2.3.2. Elektrode s nekrystalnom membranom

Elektrode s nekrystalnom membranom sadrže ionske ili nenabijene tvari kao aktivne komponente membrana. Inaktivni nosač membrane može biti porozan (npr. mikroporozni filter) ili neporozan (npr. staklo, PVC).^{6,7,11}

2.3.2.1. Elektrode sa staklenom membranom

Staklena membrana je tanki komadić stakla specifičnog kemijskog sastava. Pouzdana je do pH=12 (membrane od litijevog stakla i kod pH>12). pH vrijednost ne utječe na suha stakla pa se staklena membrana prije mjerenja mora umočiti u vodu. Uranjanjem u vodenu otopinu na površini membrane se formira tanki sloj gela (površina membrane se hidratizira) pri čemu dolazi do izmjene jednovalentnih kationa stakla s protonima iz otopine. Ovaj proces za posljedicu ima pojavu potencijala membrane koji ovisi o konstanti ravnoteže reakcije izmjene. Ovisno o sastavu stakla može se postići selektivnost za monovalentne katione kao što su Na⁺, K⁺, Ag⁺, NH₄⁺, a selektivnost ovih membrana je ovisna o konstanti izmjene iona staklo/otopina i pokretljivosti iona u membrani.^{6,7,11}

2.3.2.2. Elektrode sa mobilnim prenosiocem

Ove elektrode se još nazivaju i elektrode s tekućom membranom, a mogu se svrstati u tri skupine:

- membrane koje sadrže pozitivno nabijeni mobilni prenosioc otopljen u prikladnom organskom otapalu, osjetljive su na promjenu aktiviteta aniona.

- membrane koje sadrže negativno nabijeni mobilni prenosioč otopljen u prikladnom organskom otapalu, osjetljive su na promjenu aktiviteta kationa.
- membrane koje sadrže nenabijeni mobilni prenosioč otopljen u prikladnom otapalu kao aktivnu komponentu membrane. Ovakve membrane osjetljive su na promjenu aktiviteta kationa.^{6,7,11}

2.3.3. Specijalne ion-selektivne elektrode

Ove elektrode sadrže dvije membrane odvojene tankim slojem elektrolitne otopine. U ovu skupinu elektroda ubrajaju se elektrode osjetljive na plin i enzimske elektrode.^{6,7,11}

2.4. Mehanizam rada ISE

Potencijal ionsko-selektivnih elektroda ovisi o aktivitetu samo jedne molekulske ili ionske vrste prisutne u potenciometrijskoj ćeliji. Razlika potencijala kod ISE-a najčešće nastaje na dodirnoj površini elektroda-otopina i posljedica je zamjene iona iz otopine i iona u površinskom dijelu membrane.^{2,12}

Potencijal selektivnih elektroda može se uspostaviti i na druge načine. Na dodirnoj površini između dviju elektrolitnih faza različitih sastava može nastati difuzijski potencijal koji je posljedica razlike u brzini difuzije iona elektrolita kroz graničnu površinu između dviju faza.²

Membrane nisu dvodimenzionalna sita koja propuštaju samo jednu vrstu iona već tijela određene debljine što dovodi do izmjene iona na obje strane membrane između dva elektrolita i za posljedicu ima nastanak razlike potencijala. Nastala razlika potencijala ovisi o broju prelaza iz faze u kojoj im je aktivitet veći u fazu u kojoj im je aktivitet manji. Kada je razlika potencijala tolika da uzrokuje jednake brzine prijelaza iona uspostavlja se dinamička ravnoteža.¹²

Ako pretpostavimo da je selektivno ponašanje granične površine ostvareno pomoću idealne membrane, razlika potencijala na membrani pri kojoj se uspostavlja dinamička ravnoteža iskazuje se sljedećom relacijom:

$$E_m = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{a_j}{a_{j,r}}$$

gdje je a_j – aktivitet aktivnih iona na jednoj strani membrane,

$a_{j,r}$ – aktivitet istih iona na drugoj strani membrane,

z_j – naboj aktivnih iona

F – Faradayeva konstanta

R – opća plinska konstanta

T – temperatura

Dakle prikazujemo ga istom relacijom kao i za redoks-sustav iako je način uspostavljanja potencijala različiti (na membrani izmjena iona, na kovini redoks-reakcija). Za membranske elektrode kojima se potencijal mijenja u skladu s gornjom relacijom kaže se da imaju Nernstov odziv.^{2,12}

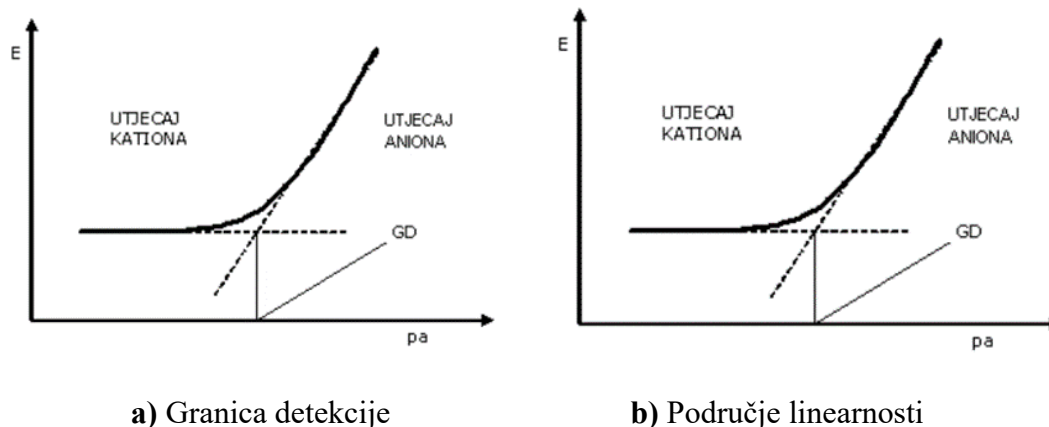
U idealnom slučaju ISE su selektivne samo za jednu određenu ionsku vrstu. Međutim, u praksi ne postoje idealne ISE, pa na njihov potencijal utječu i druge ionske vrste prisutne u otopini. U slučaju kad je omjer interferirajućih iona relativno nizak u odnosu na ione koji se određuju, utjecaj drugih ionskih vrsta se može zanemariti. Mogući su također ekstremni slučajevi kod kojih je ISE više osjetljivija na interferirajuće ione, nego na ione koji se određuju.²

Takve elektrode se mogu upotrijebiti samo ako su interferirajući ioni prisutni u tragovima ili ako uopće nisu prisutni. Takvi ioni iz otopine se mogu ukloniti kompleksiranjem ili taloženjem.

Sposobnost ISE-a da razlikuju različite vrste iona u istoj otopini koje određuju izražava se koeficijentom selektivnosti. On opisuje selektivnost elektrode za ion (i) u odnosu a ion (j) i izražava se Nickolsky-Eisenman jednadžbom:

$$E = \text{konst.} \pm 2.303 \frac{RT}{z_j F} \log(a_j + \sum K_{ij}^{Pot} a_j^{z_i/z_j})$$

Ion selektivne elektrode imaju svoju granicu detekcije. Granica detekcije (LOD) predstavlja najmanju količina analita u uzorku koju možemo detektirati odnosno koncentraciju određivanih iona kod koje elektroda pri određenim uvjetima više ne može pratiti promjenu potencijala. Definirana je sjecištem ekstrapoliranih linearnih pravaca kalibracijske krivulje zbog čega se još naziva i granični aktivitet (slika 3.a). U praksi za većinu ISE-a ona iznosi $10^{-5} - 10^{-6}$ M.^{2,4,12}



Slika 3. Ovisnost potencijala o logaritmu aktiviteta ⁴

Područje linearnosti je raspon koncentracija odnosno količine analita u kojem potencijal elektrode linearno raste s promjenom koncentracije ($\log c$). Nagib pravca (S) u području linearnosti predstavlja promjenu potencijala po $\log c$:

$$\frac{dE}{d \log c} = \frac{0,059}{z_j} = S$$

Za ione koji imaju $z=1$, nagib pravca iznosi $S=0,059$ (slika 3.b).^{2,4}

2.5. Ugljikova pasta i elektrode na bazi ugljikove paste

2.5.1. Definicija ugljikove paste i elektrode na bazi ugljikove paste

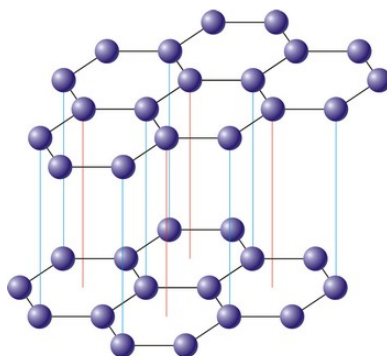
Čvrste ugljikove elektrode definiraju se kao smjesa ugljikovog praha (grafita) i prikladnog veziva ("tekućine za lijepljenje"). Kod elektrokemijskih i elektroanalitičkih mjerenja najčešće se koriste pirolitička grafitna elektroda (PyGE) i staklena ugljikova elektroda (GCE).⁷ Novije definicije, elektrode na bazi ugljikove paste (eng. Carbon paste electrode, CPE) svrstavaju u heterogene ugljikove elektrode. Klasične ugljikove paste sastoje se od 2 glavne komponente, vodljivog ugljika odnosno grafita koji predstavlja materijal elektrode i tekućeg veziva, izolatora koji djeluje kao inertni medij povezujući pojedine čestice grafita u kompaktnu smjesu. Pri izradi ugljikove paste treba obratiti pozornost na obje komponente.⁷

Ugljikove paste različitih konzistencija mogu se dobiti na 3 načina:

- Umjereno gusta ugljikova pasta- dobiva se miješanjem ugljika i organske tekućine do nastanka jednolične mokre smjese. Prva ugljikova pasta dobivena je u omjeru 7:1. Ova pasta pogodna je za primjenu u bazenima.
- Ugljikova pasta konzistencije maslaca od kikirikija- dobiva se miješanjem ugljika i organske tekućine. Pogodna je za korištenje kod anodne voltametrije.
- Standardna ugljikova pasta- dobiva se jednostavnim ručnim miješanjem ugljika s bilo kojom tekućinom koja se dovoljno ne miješa s vodom da bi se spriječilo otapanje matrice elektrode uronjene u otopinu.⁷

2.5.1.1. Grafit (ugljkov prah)

Grafit je mekana, sivocrna, lomljiva tvar masnog opipa koja dobro provodi toplinu i električnu struju. Kristali grafita sastoje se od slojeva, a u svakom sloju atomi su poredani kao šesteročlani prstenovi. Atomi između slojeva međusobno su povezani slabom Van der Waalsovom silom koja omogućuje lakše odvajanje slojeva grafita ili klizanje jedan uz drugi dok su atomi u ravnini povezani kovalentom vezom. Grafit je sp^2 -hibridiziran.^{14,15}

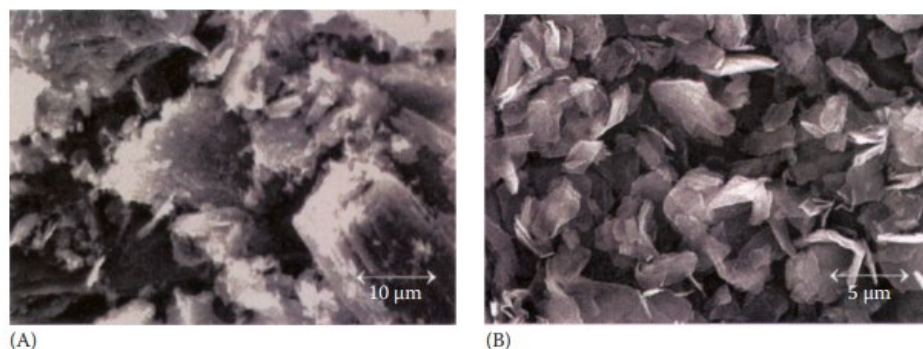


Slika 4. Kristalna struktura grafita¹⁶

Većina binarnih (nemodificiranih) ugljikovih pasta priprema se od komercijalno dostupnih grafitnih prahova. Kriteriji koje mora zadovoljavati odabrani ugljikov materijal za izradu ugljikove paste:

- Veličina i raspodjela čestica- Uobičajena veličina čestica spektroskopskog grafita kreće se u mikrometrima. Pouzdane informacije o prosječnoj raspodjeli čestica mogu se dobiti samostalno uz pomoć mikroskopa. Veličina i raspodjela čestica u prahu grafita mora biti što ujednačenija. Raspodjela čestica standardnih spektralnih prahova je u rasponu 5-20 μm . Spektroskopski grafiti nemaju karakterističnu strukturu, ali njihova površina izgleda poput klupka geometrijski nepravilnih oblika oštih rubova

i prilično izgrebane površine (slika 5.). Smjese ugljikove paste mogu sadržavati grafit veličine čestica od oko 100 nm ili čak 30 nm. Fini ugljikov prah može se kupiti ili proizvesti u laboratoriju mljevenjem u mini mlinu.



Slika 5. Mikrostruktura 2 tipična spektroskopska grafitna praha ⁸

- Niska sposobnost adsorpcije- Grafitni prah koji se koristi za pripremu ugljikove paste pokazuje visoku adsorpcijsku aktivnost. Ovo nepoželjno svojstvo grafitnog praha može se identificirati povećanim sadržajem kisika zarobljenog u porama grafita ili dodatno apsorbiranog tijekom mehaničke homogenizacije paste. Korištenje tako pripremljene CPE u Faradeyevim mjerenjima pokazuje povišenu koncentraciju kisika.
- Visoka čistoća- Grafitni prah ne smije sadržavati nikakve nečistoće koje na bilo koji način mogu ometati mjerenje. Čak i zanemarivi tragovi elektroaktivnih nečistoća mogu uzrokovati neželjene i preklapajuće signale.⁸



Slika 6. *Grafitni prah*¹³

2.5.1.2. Ostali ugljikovi materijali

Ugljikove paste mogu se izrađivati i od manje uobičajenih grafitnih prahova.

Prvi primjer je crni acilen (AB) koji se dobiva kontroliranim izgaranjem acetilena u inertnoj atmosferi ili kemijskom razgradnjom. AB zbog svoje kristalinične strukture ima izražene sposobnosti adsorpcije i doprinosi reproducibilnijem ponašanju ugljikove paste.⁸

Amorfni materijali dobiveni nepotpunim izgaranjem teških naftnih frakcija (čađa) i koloidni grafit su predstavnici atipičnih oblika ugljika koji se također koriste za izradu pasta. Sličan ugljikov materijal je i aktivni ugljen koji se primjenjuje u medicinske svrhe protiv nadutosti ili u filterima gas maski.⁸

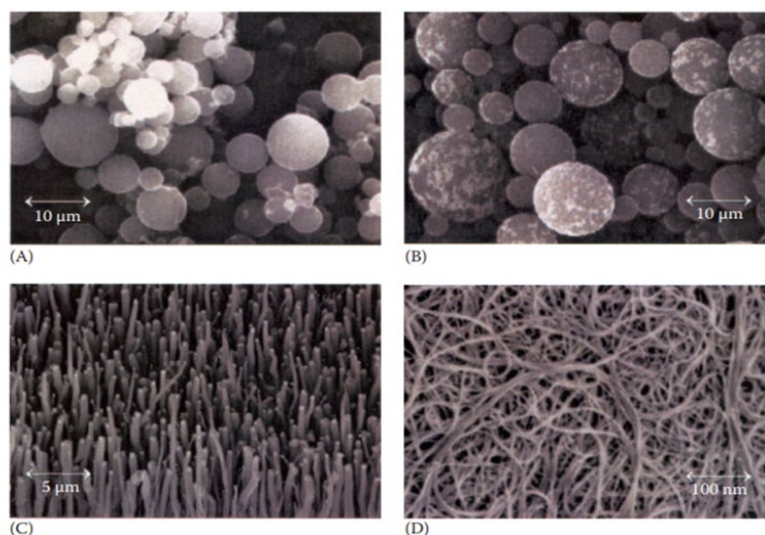
Ugljikove paste pripravljene od navedenih ugljikovih materijala pokazale su se neuspješnim zbog ekstremne sposobnosti adsorpcije i nedovoljne čistoće. Unatoč tome, u kvantitativnoj kliničkoj analizi za izradu CPE uspješno se koristi komercijalno dostupan i relativno jeftin aktivni ugljen. Crni i smeđi ugljen (lignit) su predstavnici prirodnih oblika ugljika koji se upotrebljavaju u konfiguracijama CPE i kao modifikatori ugljikove paste.⁸

2.5.1.3. Novi oblici ugljika

Većina fizikalno-kemijskih svojstava različite katalitičke sposobnosti je posljedica specifične mikrostrukture karakteristične za svaki od ugljika.⁸

Jedan od prvih predstavnika materijala novih oblika ugljika je prah staklastog ugljika (GC) koji je prvi put testiran sredinom 1990-ih i kasnije uspješno korišten u raznim konfiguracijama elektroda na bazi paste od staklastog ugljika (GCPE) uključujući kemijski i biološki

modificirane GCPE. GC prah je posebno obrađeni grafit sa sfernim česticama dobivenim pirolitičkom razgradnjom visokomolekularnih smola. Dva GC praha "Sigradur K" i "Sigradur G" (slika 7. "A" i "B") međusobno se razlikuju po završnoj površinskoj obradi.⁸



Slika 7. Mikrostruktura novih ugljikovih i grafitnih materijala. (A) Staklasti ugljikov prah s neobrađenom površinom; (B) s obrađenom površinom; (C) ugljikova nanovlakna; (D) jednozidne ugljikove nanocijevi⁸

Sljedeći novi materijal je fuleren "C-60", predstavnik molekularnih ugljika koji zajedno s "ugljikovim nanocijevima" (CNTs) i "ugljikovim nanorogovima" (CNH) čini tri glavne skupine ugljikovih nanomaterijala. Fuleren "C-60" koji ima strukturu šuplje kugle i građevnih jedinica sastavljenih od šesterokutnih aromatičnih prstena koji podsjećaju na nogometnu loptu, prvi je put korišten u smjesama ugljikove paste u Kini. Fuleren "C-60" s izraženim elektrokatalitičkim svojstvima primjenjen je kao dodatni modifikator. Ugljikove nanocijevi su često korištene među novim oblicima ugljika dok su ugljikovi nanorogovi primjenjeni samo u jednom znanstvenom radu.⁸

Nossol i Zarbin su predložili tri nova ugljikova materijala, šablonski ugljik, poroznu ugljikovu pjenu te porozne ugljikove mikrosfere (zajedno s GC prahom). Ovi materijali sintetizirani su pirolizom različitih prekursora na bazi poli(furfurilalkohola). Primjenjuju se u odgovarajućim binarnim smjesama CP sa Nujol uljem kao standardnim vezivom. Uređeni mezoporozni ugljik (OMC) koji se upotrebljava pri izradi OMCPE značajno poboljšava kinetiku prijenosa elektrona i katalitičku mogućnost u transformacijama elektrode odabranih redoks sustava. OMCPE u usporedbi s uobičajenim CPE pruža bolju osjetljivost kod anodne voltametrije iona teških metala.⁸

Kasne 2000-te su obilježile početak korištenja ugljikovih nanomaterijala. Prvi nanomaterijali su se pojavili u obliku ugljikovih nanočestica (promjera oko 30 nm) u mikroelektrodi na bazi ugljikove paste (nC μ PE) koja je podvrgnuta rutinskoj karakterizaciji. Nakon primjene nanočestica započela je primjena ugljikovih nanovlakna (CNF) dobivena strojno kontroliranim rastom tijekom „elektrospininga“ ili kemijskim taloženjem pare (CVD) i grafena (GR). Kasnije se pojavio još jedan alotrop ugljika, grafen čija je struktura u slojevima debljine jednog atoma sa strukturom poput saća i predstavlja granični slučaj neodređenog poliaromata. GR je posljednji iz skupine alternativnih ugljika koji su testirani u konfiguracijama ugljikove paste. CNT (slika 6. "D") nazivaju se "ugljikom novog tisućljeća" i zajedno s CPE svrstavaju se u posebnu skupinu elektroda na bazi ugljikove paste s CNT.⁸

2.5.2. Tekućine za lijepljenje (veziva)

Uloga veziva je mehaničko povezivanje pojedinačnih čestica ugljika u jednoličnu smjesu. Vezivo ("tekućina za lijepljenje") utječe na fizikalno-kemijska i elektrokemijska svojstva svih vrsta elektroda na bazi ugljikovih pasti.⁸

Tipična svojstva tekućih veziva:

- Kemijska inertnost i elektroinaktivnost- Tekuća veziva koja se koriste za pripremu ugljikovih pasti su vrlo stabilna i njihove interakcije u masi ili na površini elektrode obično su fizičke prirode. Pojedina veziva aktivnim sudjelovanjem u kiselo-baznim ravnotežama mogu kemijski interagirati. Primjeri takvih vrsta tekućih veziva su neki od organofosfatnih estera, elektroinaktivni i netopljivi u vodi koji tvore voluminozne protonirane katione s visokim afinitetom ionskog sparivanja. Elektrokemijska inertnost veziva važna je za izvođenje eksperimenata koji se temelje na Faradayevim mjerenjima (protoku struje) kao što su voltometrija, amperometrija, kronopotenciometrija konstantne struje ili kulometrija. Kod elektroaktivnih elektroda na bazi ugljikove paste (CPEEs), primjerice elektroda na bazi ugljikove paste s elektrolitičkim vezivom i drugih elektroda na bazi ugljikove paste s elektroaktivnim vezivom ukoliko sastojci ne ometaju analitički signal od interesa, kemijska interakcija veziva je zanemariva. Elektrokemijska aktivnost nije od iznimne važnosti u potenciometrijskoj indikaciji kada smjesa ugljikove paste sadržava visoko reaktivne spojeve kao što su organski nitro esteri, 2-nitrofenil-oktil-eter (NPOE) ili u potenciometriji "uklanjanja" kemijskom oksidacijom.

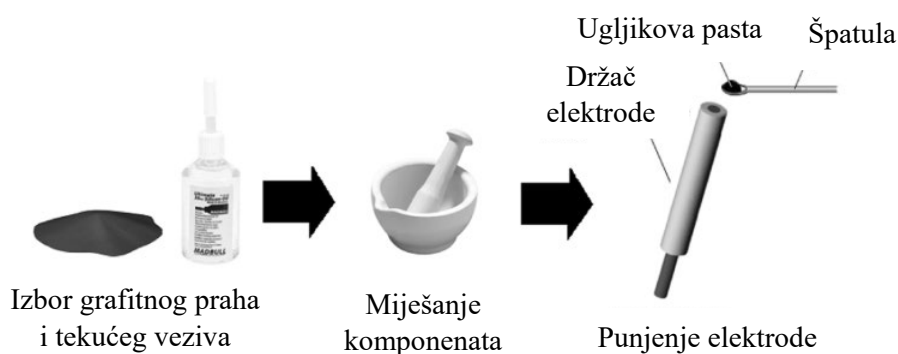
- Niska isparljivost- Unatoč izravnom fizičkom kontaktu sa potencijalno štetnim parama, stabilnost i životni vijek trajanja CPE pripremljenih od hlapljivih tekućih veziva su ograničeni. Sporo isparavanje tekućeg veziva dovodi do isušivanja smjese ugljikove paste, promjene u konzistencije same paste te nepovratnim promjenama fizikalno-kemijskih i elektrokemijskih svojstava paste. CPE s tekućim vezivom relativno visoke viskoznosti trikrezil-fosfatom (TCP) isparava iz smjese tijekom 1-2 tjedna. Većina uobičajenih tekućih veziva ispunjava uvjete minimalne hlapljivosti.
- Minimalna topljivost u vodi- CPE i CMCPE su senzori konstruirani za vodene otopine. Ugljikove paste moraju biti dovoljno stabilne u vodi kako ne bi došlo do neželjenog otapanja i raspada uslijed miješanja veziva s vodom ili drugim vodenim otopinama.
- Kontrolirano miješanje s organskim otapalima- Tekuće vezivo mora biti dovoljno hidrofobno da odbija molekule vode u vodenim otopinama, takvo vezivo se može miješati sa svim otapalima istog karaktera. Ugljikove paste su neprimjenjive u nepolarnim otapalima i miješanim otopinama. CPE mogu se ozbiljno oštetiti u polarnim otapalima kao što su metanol, etanol, acetonitril, dimetil-sulfoksid i dimetilformamid. Upotreba CPE u prisutstvu organskih otapala koja se mogu unijeti u uzorak otopine putem *in situ* modifikatora zahtijeva posebne mjere opreza i/ili održavanje.⁸

Nijedno tekuće vezivo ne ispunjava kriterije idealnog veziva, ali postoji široki raspon organskih spojeva i smjesa koje mogu osigurati ugljikove paste zadovoljavajuće kvalitete kao što su parafinska (mineralna) ulja, alifatski i aromatični ugljikovodici, silikonska ulja i masti, halogenirani ugljikovodici i slični derivati te ostale tekućine za lijepljenje i miješana veziva.⁸

2.5.3. Priprema ugljikove paste

CPE se pripremaju miješanjem različitih udjela grafitnog praha i tekućine za lijepljenje koji se određuju prema empirijskom iskustvu ili preporukama iz literature. Omjer ugljika i tekućine za lijepljenje varira u intervalu od 1,0 g: 0,4-1,0 mL. Omjer dviju glavnih komponenti ovisi o njihovom međusobnom povezivanju stoga pojedine smjese mogu sadržavati i veći postotak tekućeg veziva. Za svaku pojedinačnu smjesu ugljikove paste pripravljene od identičnih komponenata preporučljivo je eksperimentalno pronaći optimalan omjer oba sastojka.⁸

Ugljikova pasta kao binarna smjesa dviju glavnih komponenti grafitnog praha i tekućine za lijepljenje izrađuje se ručno pomoću laboratorijske opreme koja se sastoji od alata za doziranje i punjenje tijela elektrode, strugača (špatule i tanke staklene cijevi za viskoznije tekućine) i porculanskog tarionka s tučkom. Pasta se intenzivno homogenizira ručnim miješanjem dviju glavnih komponenti otprilike 3 min. kružnim pokretima tučka u tarioniku, zatim se špatulom sastružu ostaci paste s površine tarionka i još 2 min. pažljivo promiješa nakon čega slijedi punjenje tijela elektrode. Homogenizacija paste važna je za dobivanje kompaktne smjese. Držać elektrode koji se puni pripremljenom pastom može biti polietilenska štrcaljka, staklena cijev ili teflonska šipka električno spojena vodljivom žicom.⁸



Slika 8. Laboratorijski pribor za pripravu CPE¹⁷

Ugljikova pasta može se pripremiti kao smjesa različite vrste ugljikovih materijala (grafit, dijamant, fuleren, grafen, AB...) i veziva. Miješanjem grafitnog praha s tekućinom za lijepljenje dobiva se heterogena smjesa poznata kao ugljikova pasta. Veziva koja se najčešće koriste kod pripreme paste su Nujol ulje, heksadekan, alifatski ugljikovodici kraćeg lanca (C₁₀-C₁₄), SO, SG, SO u kombinaciji sa dimom silicija kao zgušnjivačem, bromoform, ugljikov tetraklorid, α -bromonaftalen, smjesa TCP-a, DOP-a, DINP-a, NPOE-a, difenil-etera, ricinusovo ulje, vazelinsko ulje. Veziva ili "tekućine za lijepljenje" (RT(ILs)) smanjuju električni otpor paste.⁸

Za modifikaciju CPE često se kao modifikatori koriste kompleksi prijelaznih metala i IAC-i, organski ligandi, nanočestice te ionski aditivi (TBATPB, TDATpClPB, NaTPB, KTpClPB). Kada u sastavu nema modifikatora rezultirajuća kalibracijska krivulja ima mali nagib i ograničen linearni raspon. Modifikatori poboljšavaju odzivne karakteristike senzora (linearni raspon, selektivnost, granica detekcije, Nernstov nagib), povećavaju brzinu prijenosa elektrona i pružaju značajnu sposobnost adsorpcije koja omogućuje prethodnu koncentraciju uzorka na površini elektrode što rezultira povećanjem osjetljivosti elektrode.^{19,20}

Lipofilni ionski aditivi kao što je NaTPB dodaju se u pastu zbog stabilizacije naboja kompleksa, poboljšanja odziva i selektivnosti elektrode, kataliziranja reakcije izmjene iona na kontaktnoj površini između uzorka i elektrode, povećanja neto razlike u koncentraciji kationa lijeka u interfazi između paste i uzorka. Prisutnost lipofilnih aniona (TPB-a) smanjuje i usporava prodiranje protuiona lijeka u pastu što dovodi do učinkovite neutralizacije kationa u površinskom sloju paste.^{21,22}

2.5.4. Čuvanje i pohrana ugljikove paste

Ugljikove paste se mogu čuvati i pohranjivati u prikladnim spremnicima ili u tijelu elektrode (holderu). Pojedine vrste ugljikovih pasta nisu praktične za dugotrajno pohranjivanje zbog njihovog ograničenog životnog vijeka. Paste napravljene od tradicionalnih komponenti mogu opstati mjesecima ukoliko se pravilno pohrane i čuvaju u dobro zatvorenim posudama na prikladnom mjestu. Punjenje od 1 cm³ svježe napravljene ugljikove paste u pravilno dizajnirano tijelo elektrode dovoljno je za nekoliko tjedana intenzivnog mjerenja.⁸

2.6. Ugljikova pasta kao elektrodni materijal

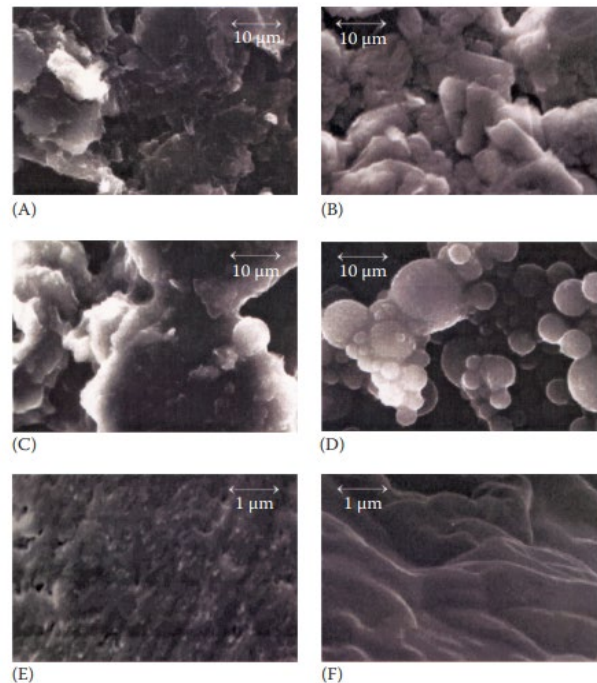
Mehanička, fizikalno-kemijska i elektrokemijska svojstva ugljikove paste imaju utjecaj na rezultirajuće ponašanje elektroda na bazi ugljikove paste (CPEs), kemijski modificiranih elektroda na bazi ugljikove paste (CMCPEs), biosenzora i senzora na bazi ugljikove paste.⁸

2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva ugljikove paste

- **Mikrostrukture ugljikovih pasta**

Ugljikova pasta je višekomponentni materijal koji pokazuje prilično jedinstvenu mikrostrukturu, zbog prisutnosti tekućeg veziva. Uvid u mikrostrukturu ugljikovih pasta dobiven je tek nešto kasnije suvremenim mikroskopskim tehnikama kao što su skenirajuća tunelska mikroskopija (STM), optička mikroskopija (OM), skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i mikroskopija atomskom silom (AFM). SEM se može koristiti za određivanje hrapavosti površine ugljikove paste pomoću rendgenske analize ili profilometra, te za karakterizaciju novih vrsta elektroda i novih vrsta ugljikovih pasta izrađenih od ugljikovih nanocijevi ili ionskih tekućina sobne temperature.⁸

Na slici 9. prikazane su tipične strukture seksteta različitih smjesa ugljikovih pasti pripremljenih od novih vrsta ugljika, staklastog ugljikovog praha sa sfernim česticama, ugljikovih nanocijevi i ionskih tekućina sobne temperature.⁸



Slika 9. Mikrostrukture i morfologija površine 6 različitih smjesa ugljikovih pasta⁸

- **Omski otpor**

Prilikom elektrokemijskih mjerenja visoka vodljivost, stabilan i brzi odziv utječu na svojstva ugljikove paste. Smjese s parafinskim ili silikonskim uljima pokazuju otpor oko 10 Ω ili čak i manji, dok manje kompaktne ugljikove paste pripravljene od trikrezil-fosfata (TCP) ili na bazi staklastog ugljikovog praha pokazuju otpor oko 50-200 Ω . U eksperimentima s analitičkim koncentracijama, promjene otpora mogu se zanemariti. Kvaliteta grafitnog praha bez prisutnosti tekućeg veziva utječe na povećanje otpornosti ugljikovih pasta na ukupni omski otpor.

- **Nestabilnost ugljikovih pasta u organskim otapalima**

Ugljikove paste se stabiliziraju dodatnim sredstvima ili izborom sastojaka koji su otporniji na ugljikove paste kao što su viskozna silikonska ulja, klorotrifluoroetilen (polimer sličan vosku) ili srodni materijali slični krutini i staklastom ugljikovom prahu.

- **Životni vijek ugljikove paste**

Svježe izrađene ugljikove paste imaju relativno stabilan signal u vremenskom razdoblju 2-3 tjedna ili čak nekoliko mjeseci koji uslijed procesa isušivanja postaje nestabilan. Životni vijek CPE završava u trenutku kada dosegne kritičnu granicu tj. kada se smjesa osuši i postane nekompaktna. Životni vijek povezan je s kvalitetom grafita i kompleksa te stabilnošću tekućeg veziva. U ekstremnim slučajevima, životni vijek CPE može doseći nekoliko mjeseci ili čak godina.

- **Hidrofobnost ugljikove paste**

Lipofilni karakter materijala ugljikove paste je najvažnije fizikalno-kemijsko svojstvo koje ima važan utjecaj na elektrokemijske i elektroanalitičke karakteristike CPE. Hidrofobnost se očituje u "efektu odbijanja" na površini ugljikove paste prema hidrofilnim ionima i molekulama kao i u specifičnim interakcijama s pojedinim tvarima u unutrašnjosti smjese ugljikove paste. Hidrofobni karakter ugljikovih pasta pri mjerenju određuje sve elektrokemijske karakteristike CPE i njihovo rezultatno ponašanje.⁸

2.6.2. Elektrokemijska svojstva ugljikove paste

- **Vrlo niska pozadina**

U Faradayevim mjerenjima, niske pozadinske struje (signalne, šumne, rezidualne, parazitske...) su od iznimne važnosti, zato što izravno utječu (pozitivno ili negativno) na analitički signal, pa se intenzitet struje može izraziti sljedećom relacijom:

$$I_{\Sigma} = I_{ANAL} \pm I_{res}$$

Rezultirajući intenzitet struje tada ovisi o međusobnom polaritetu analitičkih i rezidualnih signala koji predstavljaju fizičku varijablu (električnu struju) izraženu u mikroamperima ili nanoamperima. Nepoželjna pozadina kod elektroda na bazi ugljikove paste je signal redukcije kisika otopljenog u ugljikovim pastama. Kisik može ući u smjesu ugljikove paste tijekom ručne pripreme i homogenizacije kao molekula adsorbirana u porama čestica ugljika ili kao zrak zarobljen u smjesi ugljikove paste. Pojava signala kisika je nepoželjna zbog mogućih deformacija odgovarajućeg analitičkog signala ili krivulje. Ugljikove paste pokazuju zadovoljavajuće nisku pozadinu pomoću mjernih tehnika "nulte struje" kao što su ravnotežna potencijometrija (titracijom) i računalno upravljana potencijometrija uklanjanja

zahvaljujući visoko selektivnom karakteru potencijala elektrode (E_i) što čini tehnike pouzdanim i učinkovitim pri izuzetno niskim koncentracijama.

- **Individualna polarizibilnost ugljikovih pasti**

Polarizacijske karakteristike elektroda na bazi ugljikove paste definiraju operativnost i primjenjivost elektroda u mjerenjima s protokom struje ili sličnim analitičkim signalima. Granice katodne i anodne polarizacije ugljikovih pasta izrađenih od spektroskopskih grafita i parafinskih ili silikonskih ulja usporedive su s drugim ugljikovim elektrodama. Raspon rezultirajućeg potencijala CPE-a ovisi o sastavu elektrolita i kiselosti korištene otopine.

Polarizacijske karakteristike ugljikovih pasta mogu se modificirati i poboljšati površinskim obradama elektroda ili senzora. Svaka ugljikova pasta pokazuje specifične karakteristike polarizacije. Nužno je ispitati polariziranost pojedinih elektroda na bazi ugljikovih pasta eksperimentalnim pokusima iako su razlike u granicama katodnog i anodnog potencijala male i gotovo zanemarive. S obzirom na vrstu korištenog veziva, uloga tekućina za lijepljenje u polarizaciji elektroda na bazi ugljikovih pasta nije u potpunosti poznata i razjašnjena.

- **Specifična kinetička reakcija ugljikovih pasta**

Na svojstva ugljikovih pasta utječu karakteristike lipofilnih tekućih veziva koje imaju izravan utjecaj na reakcije elektroda povezane s prijenosom naboja kao i prijenosom mase. Redoks procesi reverzibilni ili gotovo reverzibilni odvijaju se na kompaktnim elektrodama poput GC, Pt ili Au i pretvaraju u "pseudoreverzibilne" elektrode na bazi ugljikovih pasta. Reakcije koje se odvijaju na uobičajenim čvrstim CPE su sporije ili potpuno nepovratne.

Na površini ugljikove paste hidrofobne molekule veziva tvore brojna hidrofobna mjesta. Što je površina ugljikove paste hidrofobnija i što je više hidrofilnih vrsta uključenih u reakciju to je proces elektrode umjereniji. Stupanj hidrofobnosti (lipofilnosti) određuje hoće li se reakcija na elektrodi odvijati reverzibilno, "pseudoreverzibilno" ili nepovratno. Obradom površine ugljikove paste pomoću posebnih kemijskih ili elektrolitičkih postupaka može hidrofobnu površinu CPE pretvoriti u hidrofilnije površinsko stanje i ubrzati nepovratne reakcije na elektrodi. Redoks reakcije pokazuju slične ili gotovo identične brzine reakcija koje se odvijaju na običnim čvrstim elektrodama.

Kao posljedica umjerene kinetike reakcije i odgovarajućeg prekomjernog potencijala (prenapona, ΔE), reakcije oksidacije različitih organskih tvari pojavljuju se u područjima izrazito pozitivnih potencijala, blizu anodne granice s početkom raspada elektrolita. Signali tada imaju vrlo visoke pozadine i pogoršavaju kvalitetu mjerenja s obzirom na nepovoljan omjer signal-šum što rezultira manjom selektivnošću i osjetljivošću. Zbog promijenjene kinetike reakcije na hidrofiliziranim elektrodama na bazi ugljikovih pasta, signali se preusmjeravaju prema manje pozitivnim potencijalima u blizini anodne granice što dovodi do značajnog poboljšanja ukupnog signala.

Najčešći elektrolitički tretman je anodizacija, kada se primjenjuju visoko pozitivni potencijali (od +1,25 V do +1,75 V u odnosu na SCE) u vremenu od 30 do 120 s. Nakon anodne oksidacije, površina paste s aktivnim ugljenom može se "uravnotežiti" kratkom katodizacijom (pri -1,0 V tijekom 15 s). Povremeno se površina ugljikove paste obrađuje samo katodizacijom što je korisno kod mjerenja koja zahtijevaju negativno nabijenu aktivnu površinu ili nižu pozadinu.⁸

Za smanjenje nepoželjnog prekomjernog potencijala ugljikova pasta se može obraditi dodavanjem modifikatora ili prikladnog elektrokatalizatora. Takav učinak se može postići organo-kompleksima sa središnjim atomom metala platine. Modifikatori mogu sniziti prekomjerni potencijal na 400 mV, 500 mV ili 6000 mV. Upotreba modificiranih ugljikovih pasta uklanja 2 glavna nedostatka elektrolitskih aktivacija: prilično dugotrajne postupke, te preopterećenje aparata, posebice starijih instrumenata koji nemaju odgovarajuću zaštitu od naglih strujnih promjena odnosno velikih protoka struje.⁸

2.7. Podjela elektroda na bazi ugljikove paste

2.7.1. Tradicionalne vrste CPE

Podjela tradicionalne vrste CPE prema:

- fizikalno-kemijskim svojstvima veziva:
 - klasične CPE- binarna smjesa spektralnog grafitnog praha i tekućeg veziva koje predstavlja kemijsku i elektroinaktivnu organsku tvar kao što je parafin. Ova vrsta CPE pripada dvokomponentnom sustavu i najčešće se koristi u 80-90% elektroda, senzora, detektora na bazi ugljikove paste.⁸
- konzistenciji paste:
 - "suhe" ili "mokre" CPE- smjesa ugljikove paste koja se značajno razlikuje od sadržaja veziva, odnosno korištenog omjera "ugljik-tekućina za lijepljenje".

Presuhe smjese mogu dati nepovoljan omjer signala i šuma. Ova vrsta elektroda može se povremeno pronaći u istraživačkim radovima ili nekim posebnim studijama.

- meke ili tvrde (isušene) CPE- vrlo rijetko se pojavljuju u literaturi i njihova podjela je neuobičajena. Ponekad se koriste u kontekstu s opisom učinka starenja.⁸

➤ modifikaciji CPE:

- Najčešća podjela elektroda, senzora i detektora na bazi ugljikove paste u dvije temeljne kategorije:
 1. nemodificirane CPE- sadrže binarnu ugljikovu pastu koja se sastoji isključivo od dvije komponente, grafitnog praha i veziva. Takve vrste CPE nazivaju se još "gole", "nativne" ili "djevičanske" CPE.
 2. modificirane CPE- izvorne binarne smjese koje u svom sastavu sadrže dodatnu komponentu, modifikator. CPE ovisno o vrsti korištenog modifikatora mogu se podijeliti na kemijski modificirane elektrode na bazi ugljikove paste (CMCPE), biološki modificirane CPE koje pripadaju skupini biosenzora ugljikove paste, te fizikalno modificirane CPE.⁸

Za dobivanje modificiranih CPE primjenjuju se različite vrste modifikatora: kemijski modifikatori organski i anorganski spojevi, te elementi I. i II. skupine koji se dodaju u legure (Al-Si legure), biološki modifikatori biljna tkiva ili supstrati (alge, lišajevi, mahovina, duhan), tkiva iz voća i povrća kao prirodni izvori enzima (banana, avokado, korijen hrena, jabuka...), gljive, makromolekule (hitin, keratin) ili živi mikroorganizmi (bakterije i virusi), fizikalni modifikatori koji preuzimaju djelomično ili u cjelosti ulogu modifikatora kao što su dnevno svjetlo za pokretanje fotoreakcije ili funkcioniranje solarne ćelije, UV zračenje za aktivaciju skrućene površine CP-SPE, povišena temperatura (zagrijavanje radi poboljšanja interakcija s DNA, difuzijski transport analita ili prijenos mase u otopini), kratko "šok" zamrzavanje kao način sušenja ugljikove paste sa željenom ponovljivošću, ultrazvuk za aktivaciju površine CPE "erozijom", magnetsko polje promjena smjera makromolekula npr. DNA zbog lakše oksidacije, ponovnog povećanja transporta mase ili izvršenja imunotesta.⁸

2.7.2. Specijalne vrste CPE

U specijalne vrste CPE ubrajaju se elektroaktivne elektrode ugljikove paste u kojima se kemijski inertna tekućina za lijepljenje zamjenjuje jakim anorganskim elektrolitom poput

koncentriranih otopina mineralnih kiselina ili alkalnih hidroksida, te elektrode s čvrstom, polučvrstom i "pseudo" ugljikovom pastom koje sadržavaju grafitni prah i visokomolekularni PVC, kloroprenske ili butadienske gume i alkil-fenil smole u omjeru 1:1, parafinski vosak, cerezinski vosak. Najčešće korištene elektrode su CPE impregnirane voskom.⁸

Kod p-CPE tekući dio se zamjenjuje polimerom i takve elektrode čini smjesa grafitnog praha, monomera pirola koji tvori smjesu nalik pasti i šablona polisitirenske mikrosfere. Ove elektrode se lako i jednostavno pripremaju, čuvaju, obnavljaju i pokazuju afinitet za selektivno nakupljanje lipofilnih organskih spojeva.⁸

2.7.3. Nove vrste CPE

Skupinu novih vrsta CPE čine sve CPE pripravljene od materijala koji su ranije otkriveni kao novi oblici ugljika ili nova veziva (elektrode tankih filmova ugljikove paste, GCE), elektrode na bazi dijamantne paste i elektrode na bazi ugljikove paste i ugljikove nanocijevi. Dijamant je najtvrdi poznati mineral, proziran, vrlo tvrd i skup. Izvrstan je električni izolator i kubični alotrop ugljika.⁸

Elektrode na bazi dijamantne paste se temelje na dijamantnim filmovima poboljšanim borom koje su dovele do razvoja dijamantnih elektroda poboljšanih borom (BDDE). U ovoj skupini elektroda se umjesto grafita koriste novi ugljikovi materijali poput dijamanta, dijamanta poboljšanog borom i borovog karbida (B_4C) zadovoljavajuće vodljivosti. Paste koje sadrže mješavinu prirodnog ili sintetičkog dijamantnog praha i PO pokazuju visoku osjetljivost u Faradayevim mjerenjima što dovodi do pojave visokih struja prilikom određivanja analita u uobičajenim koncentracijama. Danas se DPE primjenjuju za određivanje pojedinačnih anorganskih iona (Fe^{2+} i Fe^{3+} , Cr^{3+} i Cr^{6+} , Pb^{2+} , Ag^+ i I^-), analita organske i biološke prirode (pipekolna kiselina, kreatin, kreatinin, azidotimidin, sildenafil citrat).⁸

Razvoj nove elektrode ugljikovih nanocijevi potaknulo je korištenje novog cilindričnog oblika ugljika, ugljikove nanocijevi u elektrokemiji i elektroanalizi. Dva osnovna oblika CNT su jednoslojne i višeslojne ugljikove nanocijevi (SW-CNT i MW-CNT) koje se razlikuju po električnim karakteristikama i otpornosti na agresivne kemikalije. Najvažnije svojstvo CNT je elektrokatalitička aktivnost i mogućnost proizvodnje u sličnim veličinama. CNT se mogu koristiti kao zamjena za grafitni prah u elektrodama na bazi ugljikovih nanocijevi (CNTPE) i modificiranim elektrodama na bazi ugljikove paste s ugljikovim nanocijevima (CNT-CPE). CNTPE čini smjesa dviju komponenti CNT i tekućeg veziva. Prilikom pripreme takvih vrsta elektroda CNT se miješa s mineralnim uljima, SO, bromoformom, elektroaktivnim vezivom

(N, N-didodecil-N',N'- dietilfenilendiamin) ili RT(IL). CNT-CPE čini smjesa triju komponenti tradicionalnog grafitnog praha i CNT koje imaju ulogu elektrokatalitičkog sredstva tj. dodatnog sastojka te mineralnog ulja. Većina CNTPE uspješno se primjenjuje u elektroanalizi različitih anorganskih iona i molekula (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zr^{4+} , SO_3^{2-} , BrO_3^- , H_2O_2 , N_2H_4 ...), organskih tvari i biološki važnih spojeva (etanol, fenol i njegovi derivati, kinoni, tiolni derivati, glukoza, mokraćna kiselina, folna kiselina, askorbinska kiselina, norepinefrin, dopamin, NAD, DNA...), farmaceutika (acetaminofen, kofein, levodopa, oksitetraciklin...), zagađivača okoliša (organofosfatni insekticidi; acefat, dimetoat i herbicidi; amitrol(3-amino-1,2,4-triazol)).⁸

2.8. β -blokatori

Noradrenergični neuroni su važna meta za djelovanje lijekova. Oliver i Shafer su 1896.g. dokazali da ubrizgavanje ekstrakata nadbubrežne žijezde uzrokuje povišenje arterijskog tlaka. Dale je 1913.g.. izolirao adrenalin kao aktivni sastojak i pokazao njegov dvojak učinak, vazokonstrikciju (koja normalno prevladava i uzrokuje povišenje arterijskog tlaka) i vazodilataciju. Pokazao je također nestajanje vazokonstriktornog učinka ako se životinji ubrizga najprije neki derivat ergota te je primijetio da adrenalin tada umjesto porasta uzrokuje pad arterijskog tlaka. Izbjegavao je objašnjenje da je zapravo riječ o različitim vrstama receptora, ali kasnijim farmakološkim istraživanjima Ahlquiste 1948.g. dokazao je postojanje nekoliko vrsta adrenoreceptora.²³

Ahlquist je otkrio da su djelovanja različitih kateholamina uključujući adrenalin, noradrenalin i izoprenalin (sintetski kateholamin) raspoređeni prema jačini na 2 različita načina, ovisno o tome koja se reakcija mjeri. Pretpostavio je da postoje dvije vrste receptora α i β koji su definirani prema potenciji agonističkog djelovanja:

- α : noradrenalin>adrenalin>izoprenalin
- β : izoprenalin>adrenalin>noradrenalin

Selektivni antagonisti β -adrenoreceptora nisu bili poznati do 1955.g. Glavna farmakološka klasifikacija u α -adrenoreceptore i β -adrenoreceptore temelji se na razlikama u potenciji i selektivnosti među agonistima. Svi adrenoreceptori su tipični G-proteinski receptori koji su kloniranjem otkrili da α_1 - i α_2 -adrenoreceptori tvore još 3 dodatna podtipa koja se pojavljuju na različitim lokacijama. Svaki od tih tipova povezan je sa specifičnim sustavom sekundarnih glasnika:

- α_1 -adrenoreceptori aktiviraju fosfolipazu C i proizvode inozitol trifosfat i diacilglicerol.
- α_2 -adrenoreceptori- inhibiraju adenilat ciklazu i na taj način slabe stvaranje cAMP-a
Sva tri tipa β -adrenoreceptora stimuliraju adenilat ciklazu.
- β_1 - adrenoreceptori se bitno razlikuju od β_2 -adrenoreceptora, jer β_1 -adrenoreceptore uglavnom nalazimo u srcu i odgovorni su za pozitivne inotropne i kronotropne učinke kateholamina.
- β_2 - adrenoreceptori su odgovorni za relaksaciju glatkih mišića u brojnim organima. Selektivnost tih lijekova je relativna. Spojevi koji se rabe kao β_1 -antagonisti djelomično djeluju i na β_2 -adrenoreceptore što može dovesti do nepoželjnih učinaka poput bronhokonstrikcije. Podtipove oba adrenoreceptora, α i β nalazimo u stanicama glatkih mišića, živčanim završecima i ednotelnim stanicama, ali njihova uloga u fiziološkoj regulaciji i farmakološkim odgovorima srca i krvožilnog sustava još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.²³

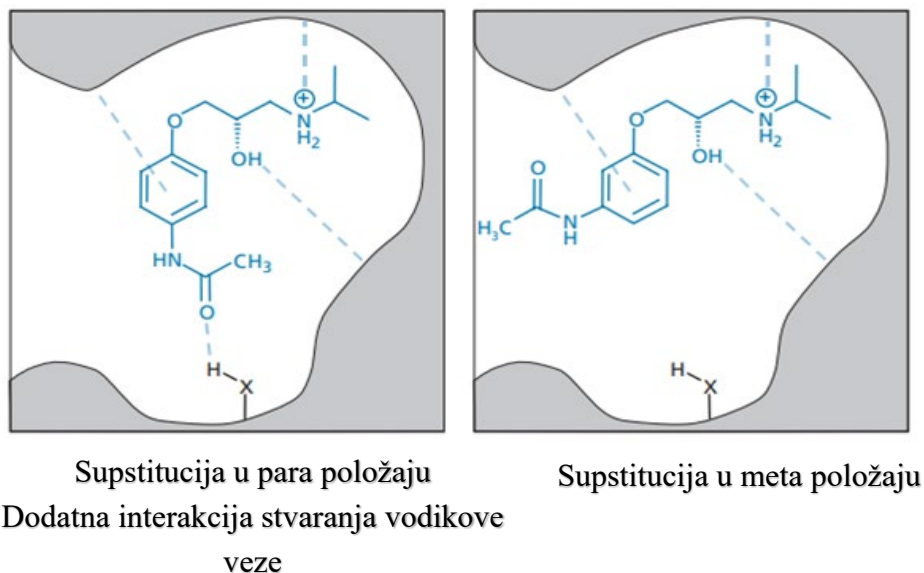
Glavni učinci aktivacije β -receptora:

- β_1 -adrenoreceptori: pojačani otkucaji srca i snaga
- β_2 -adrenoreceptori: bronhodilatacija, vazodilatacija, relaksacija glatkih unutrašnjih mišića, jetrena glikogenoliza i mišićni tremor
- β_3 -adrenoreceptori: lipoliza²³

2.8.1. β -blokatori kao kardiovaskularni lijekovi

Antagonisti β -adrenoreceptora, poznati kao β -blokatori su važna skupina lijekova otkrivena 1958.g., 10 godina nakon što je Ahlquist postavio tvrdnju o postojanju β -adrenoreceptora. Prvi spoj, diklorizoprenalin je imao prilično nisku potenciju i bio je parcijalni agonist. Većina antagonista β -adrenoreceptora nije aktivna na β_3 -adrenoreceptorima, pa ne utječe na lipolizu. Postoje 3 generacije β -blokatora (prva, druga i treća generacija). Drugoj generaciji β -blokatora (selektivni β_1 -blokatori) pripadaju propranolol, praktolol, acebutolol, atenolol, metoprolol i betaksolol. Praktolol je bio na tržištu kao prvi kardioselektivni β_1 -blokator za liječenje angine i hipertenzije, no nakon nekoliko godina morao je biti povučen zbog neočekivane, ali ozbiljne nuspojave u vrlo malog broja pacijenata. Te nuspojave uključivale su osip na koži, probleme s očima i peritonitis. Provedena su daljnja istraživanja koja su pokazala da amidna skupina mora biti u para poziciji aromatskog prstena, a ne u orto ili meta poziciji kako bi struktura

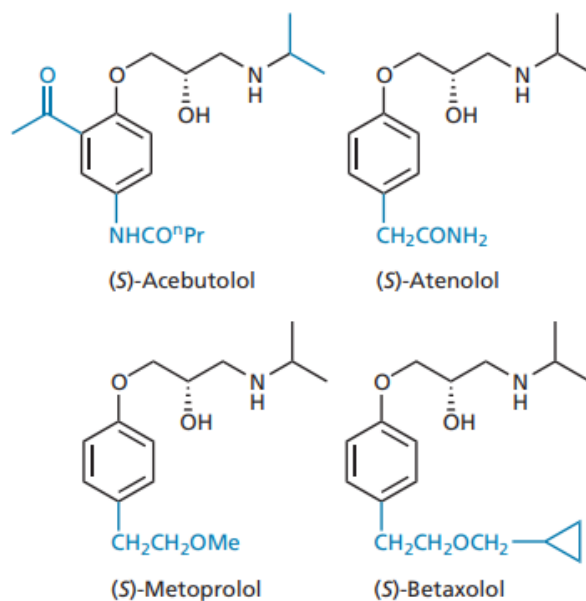
zadržala selektivnost za srčane β_1 -receptore. To je podrazumijevalo dodatne interakcije stvaranja vodikove veze sa β_1 -receptorima (slika 10.), a ne sa β_2 -receptorima.²⁴



Slika 10. Stvaranje interakcija antagonista sa β_1 -receptorima²⁴

Zamjena acetamidne skupine s drugim skupinama sposobnim za stvaranje vodikove veze dovela je do razvoja niza kardioselektivnih β_1 -blokatora koji su uključivali acebutolol, atenolol, metoprolol i betaksolol (slika 11.).²⁴

β -blokatori druge generacije pokazuju selektivnost za β_1 -receptore u odnosu na β_2 -receptore. Ariloksipropanolamini koji imaju vodikovu vezu u para položaju aromatskog prstena pokazuju β_1 -selektivnost. Neki β -blokatori kao što su metoprolol, acebutolol i bisoprolol vežu se s većim afinitetom na srčane β_1 -receptore (kardioselektivnost), a s manjim afinitetom i na β_2 -receptore.²⁴



Slika 11. Druga generacija β -blokatora²⁴

2.8.2. Acebutolol

Acetobutolol je kardioselektivni, lipofilni blokator β -adrenoreceptora s blagim intrizičnim simpatomimetskim djelovanjem. Brojne analitičke tehnike kao što su HPLC, HPLC-MS, GC-MS, CE, TLC bavile su se razvojem brzih i osjetljivih metoda za odvajanje, identifikaciju ili određivanje ACB-a i drugih β -blokatora u realnim uzorcima. Provedena istraživanja za određivanje ACB-a u farmaceutskim pripravcima temeljila su se na spektrofotometriji, spektrofluorimetriji, TLC, HPLC, GC i CE. Do 2012.g. objavljena su samo 2 rada za određivanje ACB-a elektrokemijskom metodom temeljenom na potenciometriji. U jednom od radova metoda se temeljila na korištenju obložene žičane elektrode, a u drugom na korištenju IAC-a (ACBTPB, ACBPMA) u membrani elektrode PVC-a. 2012.g. razvijena je elektroanalitička tehnika adsorptivna katodna "striping" voltometrija koja se pokazala kao vrlo osjetljiva, jednostavna, brza i točna metoda s niskim granicama detekcije za određivanje ACB-a u ljudskoj plazmi i urinu.²⁵

2.8.2.1. Osnovne karakteristike acebutolola

Ime po IUPACU: (RS)-N- {3-acetil-4-[2-hidroksi-3-(propan-2-ilamino)propoksi]fenil} butanamid

Generičko ime: Acebutolol

Zaštićeno ime: Sectral, Prent

Kemijska formula: $C_{18}H_{28}N_2O_4$

Molarna masa: 336,432 g/mol

Talište: 121°C

Vrijeme polueliminacije: 3-4 sata (osnovni lijek), 8-13 sati (aktivni metabolit)

Bioraspoloživost: 40% (raspon 35% do 50%)

Izlučivanje: bubrezi (30%), žuč (60%)

Vežanje na proteine: 26%

Toksičnost: Simptomi predoziranja uključuju ekstremnu bradikardiju, uznapredovali atrioventrikularni blok, hipotenziju, teško kongestivno zatajenje srca, napadaje, a kod osjetljivih bolesnika bronhospazam i hipoglikemiju.

Kemijska taksonomija: Spoj pripada klasi organskih spojeva poznatih kao alkil-fenilketoni. To su aromatski spojevi koji sadrže keton supstituiran jednom alkilnom skupinom i jednom fenilnom skupinom.

Medicinska primjena: liječenje hipertenzije, ventrikularne i atrijske srčane aritmije, akutni infarkt miokarda u visokorizičnih bolesnika, Smith-Magenisov sindrom

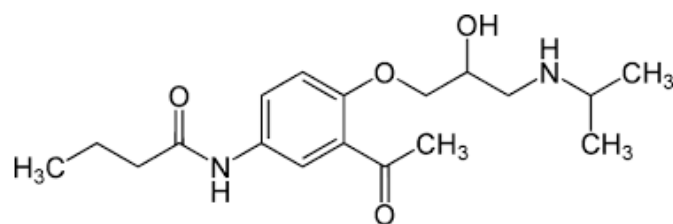
Kontraindikacije: stabilna ili nestabilna angina pectoris (zbog djelomičnog agonista ili aktivnosti ISA)

Nuspojave: razvoj antinuklearnih antitijela (ANA) u 10 do 30% bolesnika, sistemska bolest s artralgičnom boli i mijalgijama (1%). Zabilježeno je nekoliko slučajeva hepatotoksičnosti s povišenim jetrenim enzimima (ALT, AST). Sveukupno 5 do 6% svih liječenih pacijenata mora prekinuti liječenje acebutololom zbog nepodnošljivih nuspojava. Liječenje treba postupno prekidati kako bi se izbjegla precipitacija infarkta miokarda.

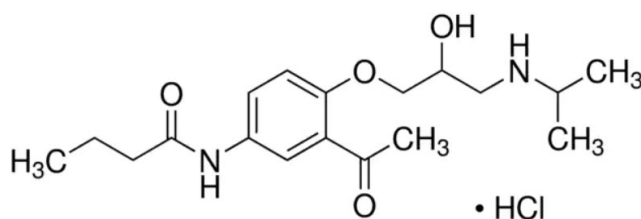
Mehanizam djelovanja: aktivacija β_1 -receptora epinefrinom povećava broj otkucaja srca i povisuje krvni tlak. ACB blokira te receptore snižavajući otkucaje srca i krvni tlak. Ovaj lijek tada ima obrnuti učinak od epinefrina. β -blokatori sprječavaju oslobađanje renina, hormona koji proizvode bubrezi i koji dovodi do sužavanja krvnih žila.

Farmakologija: ACB je kardioselektivni β_1 -blokator koji se smatra djelomičnim agonistom zbog svoje intrinzične simpatomimetičke aktivnosti (ISA). Pruža nisku β -stimulaciju u mirovanju, ali djeluje kao tipični β -blokator kada je simpatička aktivnost visoka. Zbog svoje

kardioselektivnosti, acebutolol je prikladniji od nekardioselektivnih β -blokatora u bolesnika s astmom ili kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB) kojem je potrebno liječenje β -blokatorom. Eksperimentalno je dokazano da se kardioselektivna svojstva smanjuju pri dozama od 800 mg/dan ili više. Lijek ima lipofilna svojstva i stoga prolazi krvno-moždanu barijeru. Nema negativan utjecaj na serumske lipide (kolesterol i trigliceride). Djeluje u hipertenzivnih bolesnika s visokim, normalnim ili niskim koncentracijama renina u plazmi, iako može biti učinkovitiji u bolesnika s visokim ili normalnim koncentracijama renina u plazmi.²⁶



Slika 12. *Struktura acebutolola*²⁷



Slika 13. *Struktura acebutolol hidroklorida*²⁸



Slika 14. *Pakiranje tableta acebutolola 200 mg i prikaz izgleda tableta od 200 mg*^{29,30}



Slika 15. *Pakiranje kapsula acebutolol hidroklorida 400 mg i prikaz izgleda kapsula od 400 mg*^{31,32}

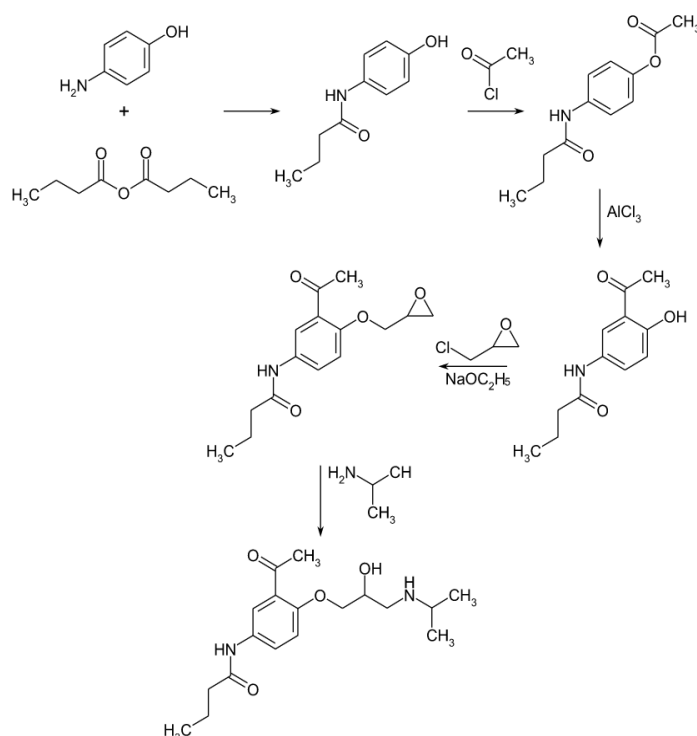
Odnos strukture i djelovanja lijekova koji djeluju na adrenoreceptore: Potencija i receptorska specifičnost lijekova koji djeluju na adrenoreceptore ovisi o afinitetu i učinkovitosti za adrenoreceptore, interakciji s neuronskim unosnim sustavima, interakciji s MAO-om i COMT-om. Odnos između čimbenika i kemijske strukture je složen, ali se molekula noradrenalina može modificirati na nekoliko različitih načina kako bi dala spojeve koji djeluju na adrenoreceptore:

- Povećanjem mase supstituenata na N-atomu nastaju spojevi (adrenalin, izoprenalin i salbutamol) koji su kao β -agonisti razmjerno veće potencije i manje osjetljivi na prvi unos i MAO-u.
- Dodavanjem α -metilne skupine (α -metilnoradrenalin, metaraminol) povećava selektivnost α_2 -adrenoreceptora, a spojevi postaju otporni na MAO iako su još uvijek osjetljivi na prvi unos
- Uklanjanjem bočnog lanca $-OH$ skupine (dopamin) smanjuje se interakcija s α -adrenoreceptorima i β -adrenoreceptorima.
- Modifikacijom katehol $-OH$ skupina, spojevi postaju otporni na COMT i prvi unos (salbutamol i brojni agonisti β -adrenoreceptora), ali i nadalje zadržavaju receptorsku aktivnost.
- Uklanjanjem jedne ili obje $-OH$ skupine (tiramin, amfetamin, efedrin) ukida se afinitet za receptore, iako su ti spojevi simpatomimetički amini s neizravnim djelovanjem, jer su supstrati za prvi unos.

- Produljenjem alkilnog bočnog lanca supstitucijom izopropila na N-atomu i modifikacijom katehol –OH skupina (propranolol, oksprenolol...) nastaju potentni antagonisti β -adrenoreceptora.²³

2.8.2.2. Sinteza acebutolola

Acebutolol se sintetizira iz 4-aminofenola acetilacijom, Friesovom preraspodjelom, hidrolizom, butirilacijom, reakcijom s epiklorohidrinom i kondenzacijom s izopropil-aminom. Postupak za sintezu lijeka za liječenje kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti uključuje reakciju između 5-butilamido-2-hidroksifenil-ketona i epoksi-kloropropana na temp. 10-30°C u alkalnoj otopini za dobivanje 5-butilamido-2-(2,3-epoksipropoksi)fenil ketona koji dalje reagira s izopropanom u organskom otapalu na temp. 60-90°C. Prednosti njegove sinteze su visoki prinos (60,5%) i niska cijena.³³



Slika 16. Sinteza acebutolola³⁴

2.9. Pregled literature o CPE

Početak upotrebe CPE bio je 1958.g. kada je Ralph N. Adams objavio prvi rad o CPE. Pripravio je 7 pasta umjereno guste vlažne konzistencije miješanjem 1g ugljika i 7 mL organske tekućine za oksidaciju 10^{-7} M jodninih iona u 1 M sumpornoj kiselini. Napravio je 7 mjerenja bez prethodne obrade i čišćenja elektrode između mjerenja. 4 mjerenja s organskim spojem N,N' dimetil-p-fenilendiamin dala su prosječna odstupanje od 1,6% za i_p i $\pm 0,5\%$ za $E_{1/2}$. Uvjeti elektrolize nisu bili idealni, ali dobiveni rezultati su izvrsni u usporedbi s postojećim podacima o čvrstoj elektrodi. CPE-e su se pokazale vrlo korisne u anodnoj polarografiji zbog brze pripreme oko 5 minuta i mogućnosti korištenja više puta s preciznim rezultatima. S odgovarajućom organskom tekućinom moguće je otopiti i koncentrirati produkte reakcije elektroza za proučavanje mehanizama pod uvjetom da medij nije elektroaktivan i da se ne miješa s vodom- paste ugljik tetraklorida.³⁵

S.I.M. Zayed je pripravio 3 vrste triprolidin (Trip) ion-selektivnih elektroda na bazi triprolidin hidroklorida i natrijevog tetrafenilborata (elektrodu s konvencionalnom polimernom membranom (PVC) (I), elektrodu presvučenu grafitom (II) i elektrodu na bazi ugljikove paste (III)) za određivanje Trip-a. Ugljikova pasta je pripremljena kao homogenizirana vlažna smjesa triprolidin hidroklorida, spektroskopskog grafitnog praha (Aldrich, 1-2 mikrona) i tekućeg veziva, DBP-a u masenom omjeru grafitnog praha i tekućeg veziva 60:40. Ispitivan je sastav 4 različitih vrsta membrana konvencionalnih i CP elektroda prethodno kalibriranih 30 min. u 10^{-3} M otopini TripCl-a pri temp. 25°C. Najbolje odzivne karakteristike Trip senzora kod konvencionalnih i CP elektroda pokazala je membrana II sa 5%-tnim udjelom IAC-a, Trip-TPB-a (konvencionalna elektroda u koncentracijskom području 1.96×10^{-5} M- 1.00×10^{-2} M TripCl po promjeni potencijala s koncentracijskom dekadom od 56,12 mV te granicom detekcije $1.13 \pm 0.13 \times 10^{-5}$ M i vremenom odziva ≤ 10 s, te CPE u koncentracijskom području 3.84×10^{-5} M- 1×10^{-2} M TripCl po promjeni potencijala s koncentracijskom dekadom od 54,32 mV s granicom detekcije $1.78 \pm 0.05 \times 10^{-5}$ M i vremenom odziva ≤ 10 s). Elektrode s konvencionalnom PVC membranom, presvučene grafitom i na bazi ugljikove paste pripravljene od Trip-TPB-a mogu se uspješno koristiti za određivanje TripCl metodom standardnog dodatka u čistim otopinama, farmaceutskim pripravcima i uzorcima urina.³⁶

12 godina kasnije Yousry M. Issa i suradnici su predložili i validirali potenciometrijsku metodu za mikro-određivanje doksiciklina u čistim i farmaceutskim otopinama. Pripravili su nove senzore, kemijski modificirane elektrode na bazi ugljikove paste od fosfomolibdenske kiseline (Dc-PM), fosfovolframove kiseline (Dc-PT) i silikovolframove kiseline (Dc-ST). Nakon 2-3

mjeseca korištenja, površinu pripremljenih elektroda osvježili su istiskivanjem male količine paste ili odstranjivanjem viška na običan bijeli papir i poliranjem elektrode na glatkom papiru kako bi se ponovno dobila sjajna, glatka površina. Kao modifikatore su ispitali i testirali elektrode na bazi paste pripremljene od IAC-a, Dc-PM-e, Dc-PT-e, Dc-ST-e. Novi senzori s IAC-ima su pokazali izuzetnu selektivnost kationa doksiciklina. Koristili su 6 otapala različite polarosti, DBP, DOP, TCP, EHA, DNP i kukuruzno ulje. Priroda otapala imaju veliki utjecaj na pokretljivost iona i osiguravaju odgovarajuće uvjete za ugradnju Dc^+ iona u pastu prije izmjene s IAC-om. Osim prirode i količine tekućih veziva kao otapala u pripremi Dc-CMCPE brojni parametri kao što je prisutnost lipofilnih aniona mogu imati značajan utjecaj na potencijalni odgovor Dc-CMCPE-e. Prisutnost lipofilnih anionskih mjesta u kation-selektivnim elektrodama smanjuju omski otpor i poboljšavaju odzivne karakteristike (selektivnost) elektrode te u slučajevima kada je sposobnost ionske izmjene slaba, povećavaju osjetljivost elektrode. Upotrijebili su 2 izvrsna lipofilna aniona, NaTPB i KTPB kako bi istražili utjecaj anionskih mjesta u pripremljenim pastama na Dc-CMCPE-e. Dodatkom aditiva, 0,5% β -ciklodekstrina poboljšali su Nernstov nagib sa širokim linearnim rasponom i niskom granicom detekcije u usporedbi s pastom bez ionskih aditiva. Najbolje odzivne karakteristike pokazale su 3 paste s udjelima od 48,5% grafita, 48,5% DBP-a, 3% Dc-PT-e, 49,0% grafita, 49,0% TCP-a, 2% Dc-PM-e te 49,0% grafita, 49,0% TCP-a i 2% Dc-ST-e.³⁷

2017.g. Salwa Fares Rassi razvio je dvije kemijski modificirane elektrode na bazi ugljikove paste za određivanje atorvastatin kalcija u farmaceutskim pripravcima. Pripravio je dva senzora, jedan temeljen na ionskom paru atorvastatina i 5,6-diaminouracil hidroklorida (ATS-DAUH) i drugi temeljen na ionskom paru atorvastatina i pikrinske kiseline (ATS-PC). Koristio je 3 tekuća veziva različite dielektrične konstante dioktitalat (5,1), dibutilfitalat (6,4) i 3-n-butyl-fosfat (8,0). Najbolje odzivne karakteristike pokazao je DOPH, zatim DBPH, a najlošije TBP (DOPH>DBPH>TBP). CMCPE-e temeljene na ionskim izmjenjivačima (ATS-DAUH i ATS-PC) kao elektroaktivnim materijalima pokazali su se kao uspješni detektori za određivanje ATS-a u realnim uzorcima.³⁸

Tri godine kasnije razvijene su elektrode in situ sa sitotiskom (ISPE) i elektrode na bazi in situ ugljikove paste (ICPE) za selektivno određivanje butenafin hidroklorida (BF.HCl) u farmaceutskom pripravku (Eman Y. Frag i sur.). Elektroda na bazi ugljikove paste pripravljena je miješanjem 250 mg grafitnog praha, 0,1 mL plastifikatora (TCP-a) i 3,0-15,0 mg različitih sredstava za sparivanje iona. Razvijeni senzor ICPE sa 9 mg modifikatora, PTA se pokazao uspješan za selektivno određivanje BF.HCl-a u farmaceutskim pripravcima. ICPE se može

primjenjivati u koncentracijskom području $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-2}$ M po promjeni potencijala s koncentracijskom dekadom $59,80 \pm 0,96$ mV, u širokom pH području 2,5–7,0 s vremenom odziva 7–8 s. Razvijeni senzori pokazali su izvrsnu selektivnost s visokom točnošću i preciznošću.³⁹

Iste godine Alaa Abd el-hadi Ahmed i suradnici razvili su potenciometrijske senzore ugljikove paste na bazi ugljikovih nanocijevi/TiO₂ nanokompozita za određivanje verapamil hidroklorida u uzorcima urina i površinske vode. Pažljivo su razmotrili ponašanje ionofora, lipofilnog anionskog dodatka i plastifikatora. U svom istraživanju su koristili 3 reagensa, DOP, dimetilftalat (DMP) i DBP. Kako bi ispitali karakteristike pripremljenih senzora dodavali su različite udjele NaTPB-a, CNT-a i TiO₂ nanocijevi. Pasta β-CDCPE pripravljena je od 31% grafita, 51% DBP-a, 0,7% β-CD-a, 0,3% NaTPB-a, 10% MWCNT, 7% TiO₂ dok je modificirane VER-PTCPE pripravljena od 34% grafita, 51% DBP-a, 5% ionskog para, 7% MWCNT-i i 3% TiO₂. Uspješno su konstruirali nove, brze, selektivne i osjetljive modificirane senzore na bazi nanokompozita za određivanje verapamil HCl-a. Jedinствена svojstva CNT-a i velika aktivna površina TiO₂ nanocijevi značajno je poboljšala odzivne karakteristike VER-a. Priprava senzora pokazala se jednostavnom i isplativom.⁴⁰

2.9.1. Pregled literature o acebutololu

Hongliang Jiang, Christopher Randlett i suradnici razvili su osjetljivu i enantioselektivnu bioanalitičku metodu visokog učinka LC-MS/MS za istovremeno određivanje pojedinačnih enantiomera acebutolola (ACB) i njegovog aktivnog metabolita-diacetolola (DC) u ljudskoj plazmi pomoću kiralne stacionarne faze (CSP) celobiohidrolaze (CBH). Provedena je sustavna optimizacija kromatografskih uvjeta (organski sadržaj, koncentracija pufera i pH vrijednost mobilnih faza) kako bi se poboljšala propusnost za izravnu separaciju ACB-a i DC-a na CBH stupcu tijekom razvoja metode. Nakon validacije metode, potpuna separacija enantiomerna ACB-a i DC-a postignuta je unutar 1,5 minute uz brzinu protoka LC od 0,9 mL/min. Zbog dodatnog poboljšanja propusnosti testa za ekstrakciju uzorka korištena je potpomognuta tekuća ekstrakcija (SLE) u formatu ploče sa 96 jažica. Validacija metode provedena je u rasponu krivulje od 0,0500–50,0 ng/mL za svaki enantiomer ACB-a i DC-a korištenjem 0,100 mL uzorka plazme. Preciznost i točnost uzoraka kontrole kvalitete na niskim, srednjim i visokim razinama koncentracije pokazala je relativnu standardnu devijaciju $\leq 4,5\%$ i $-8,7$ do $5,6\%$ relativne pogreške za pojedinačne enantiomere ACB-a i DC-a.⁴¹

U najnovijem radu koji je objavljen ove godine, znanstvenik Subash Vetri Selvi sa svojim je suradnicima razvio učinkoviti jednokratni elektrokemijski senzor baziran na CeO₂/GNS/SPCE za praćenje acebutolola, kardiovaskularnog lijeka u uzorcima iz okoliša i biološkim tekućinama kako bi riješio problem zagađenja okoliša medicinskim otpadom i nemetaboliziranim lijekovima. Fizikalno-kemijska analiza započeta je XRD, XPS, FESEM i Raman analizom. Linearni raspon bio je od 0,039 μM do 486,6 μM s donjom granicom detekcije od 0,007 μM i osjetljivošću oko 27,3 μAμ^{M-1}cm⁻². Uzorci riječne vode i urina analizirani su u stvarnom vremenu. Proizvedena elektroda pokazala je izvrsnu selektivnost i u budućnosti se može uspješno primjenjivati za određivanje ACB-a u ekološkim i biološkim uzorcima.⁴²

3. EKSPERIMENTALNI DIO

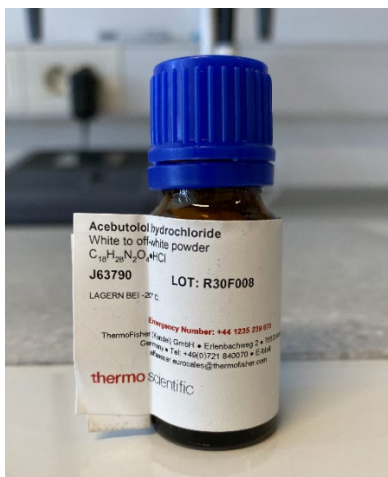
Tijekom eksperimentalnog rada korištene su sljedeće kemikalije za pripremu otopina:

- Ledena octena kiselina (CH_3COOH , $M= 60,05 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Kemika, Zagreb
- Natrijev acetat bezvodni ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, $M= 82,035 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Gram-mol, Zagreb
- Srebrov nitrat (AgNO_3), p.a., Kemika, Zagreb
- Timrex KS 44 Graphite, p.a., Imerys Graphite & Carbon, Switzerland
- Natrijev tetrafenilborat ($\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$, $M= 342,22 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Merck, Germany
- Acebutolol hidroklorid ($\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4 \times \text{HCl}$, $M= 372,89 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., ThermoFischer (Kandel) GmbH, Germany
- 2-nitrofenil-oktil-eter ($\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$, $M= 251,32 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Fluka Chemika, Switzerland
- Bis(2-etilheksil) adipat ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_4$, $M= 370,57 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Acros Organics, Germany
- Tris(2-etilheksil) fosfat ($\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{O}_4\text{P}$, $M= 434,63 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Merck, Germany
- Fosfomolibdenska kiselina hidrat ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \times \text{H}_2\text{O}$, $M= 1843,41 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., VWR International BVBA, Belgium
- Fosfovolframova kiselina hidrat ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \times \text{H}_2\text{O}$, $M= 2898,09 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Sigma-Aldrich, Germany
- Amonijev reinekati ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{CrN}_7\text{OS}_4$, $M= 354,44 \text{ g mol}^{-1}$), p.a., Acros Organics BVBA, China

3.1. Priprava otopina

3.1.1. Priprema ionsko-asocijacijskih kompleksa (IAC)- taloženje

Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa važna je za održavanje konstantne koncentracije ACE-a na površini membrane senzora koji je prethodno napunjen ugljikovom pastom. Za pripremu ionsko-asocijacijskog kompleksa potrebno je pripremiti otopinu acebutolola. U čašici od 50 mL otopi se 93,2 mg ACE hidroklorida u 25 mL destilirane vode, koncentracija pripremljene otopine je 0,01 M.



Slika 17. *Acetubolol hidroklorid*

3.1.1.1. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB TPB

U čašici od 50 mL otopi se 86,9 mg natrijevog tetrafenilborata u 25 mL destilirane vode (NaTPB, $c = 0,01$ M). Dobiveni taloženi reagens dodavao se u prethodno pripremljenu otopinu ACB-a kako bi došlo do taloženja. Dobivene otopine se ostavi stajati preko noći u tamnoj prostoriji (da ne bi došlo do fotoreakcije ili promjene farmakokinetičkih svojstava ispitivanog lijeka ACB-a) kako bi pripravljeni IAC percipitirao. Nastao je bijeli pahuljasti talog koji se sljedeći dan filtrira preko filter papira bijela vrpca te ispire destiliranom vodom do negativne reakcije na kloride koja se provjerava pomoću 0,01 M otopine AgNO_3 . Dobiveni IAC se ostavi sušiti na tamnom mjestu nekoliko dana (2-3 dana).

3.1.1.2. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB REIN

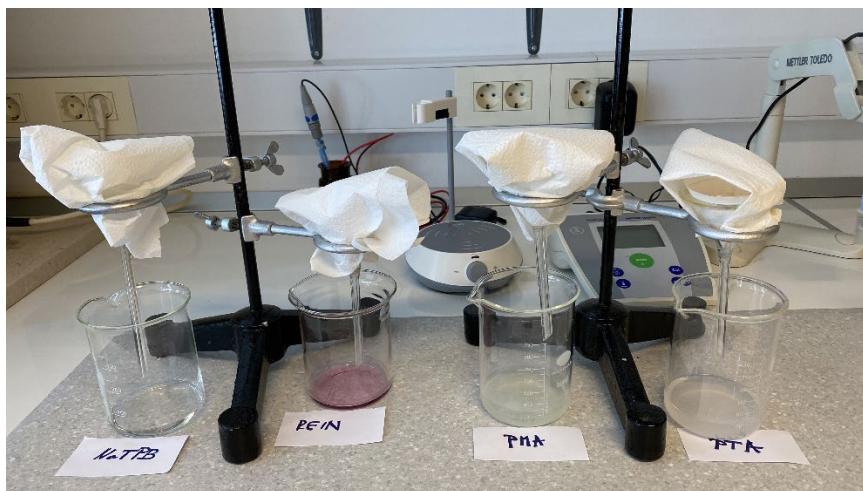
U čašici od 50 mL otopi se 45,2 mg amonijevog reinekata u 25 mL destilirane vode. Dobiveni taložni reagens dodavao se u prethodno pripremljenu otopinu ACB-a. Preko noći nastao je ružičasti talog koji se filtrira preko filter papira bijela vrpca te ispire destiliranom vodom do negativne reakcije na kloride. Dobiveni IAC se ostavi sušiti na tamnom mjestu nekoliko dana.

3.1.1.3. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB PMA

U čašici od 50 mL otopi se 152,1 mg fosfomolibdenske kiseline u 25 mL destilirane vode. Dobiveni taložni reagens dodavao se u otopinu ACB-a. Preko noći nastao je zelenkasto-žuti talog koji se filtrira preko filter papira plava vrpca te ispire destiliranom vodom do negativne reakcije na kloride. Dobiveni IAC se ostavi sušiti na tamnom mjestu nekoliko dana.

3.1.1.4. Priprema ionsko-asocijacijskog kompleksa ACB PTA

U čašici od 50 mL otopi se 240,0 mg fosfovolframove kiseline u 25 mL destilirane vode. Dobiveni taložni reagens dodavao se u otopinu ACB-a. Preko noći nastao je svijetlo-rozkasti talog koji se filtrira preko filter papira plava vrpca te ispire destiliranom vodom do negativne reakcije na kloride. Dobiveni IAC se ostavi sušiti na tamnom mjestu nekoliko dana.



Slika 18. Sušenje dobivenih taloga nakon filtracije



Slika 19. Dobiveni talozi IAC-a

3.1.2. Priprema acetatnog pufera

U čašicu od 50 mL odvagano je 452 mg NaAc ($M = 82,035 \text{ g mol}^{-1}$) te je dodano 570 μL ledene octene kiseline $\{w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 99,5\%, \rho = 1,05 \text{ kg L}^{-1}\}$. Sadržaj iz čašice prebačen je u

veliku okruglu tikvicu s ravnim dnom volumena 1 L te nadopunjen do oznake destiliranom vodom. pH vrijednost pufera iznosi 4,5.

3.1.3. Priprema standarda

Za pripremu standarda izvagano je u čašici od 50 mL na analitičkoj vagi 29,5 mg čiste aktivne tvari acebutolol hidroklorida (ACB HCl) i otopljeno u 25 mL pufera. Otopina je prebačena u tikvicu od 25 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Dobivena je otopina koncentracije $3,16 \times 10^{-3}$ M pri pH=5,0.

$$V_{\text{pufer}} = 25 \text{ mL}$$

$$c(\text{ACB}) = 3,16 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M \times V}$$

$$m_{\text{ACB}} = 29,5 \text{ mg}$$

Iz dobivenog standarda otpipetirano je 6,3 mL i preneseno u novu tikvicu od 25 mL te nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Postupak je ponovljen 5 puta i dobivene su otopine koncentracije od $3,16 \times 10^{-6}$ M do $3,16 \times 10^{-3}$ M.

$$V_2 = 25 \text{ mL}$$

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$$3,16 \times 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 7,94 \times 10^{-4} \text{ M} \cdot 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6,3 \text{ mL}$$

$$c_1 = 3,16 \times 10^{-3} \text{ M}$$

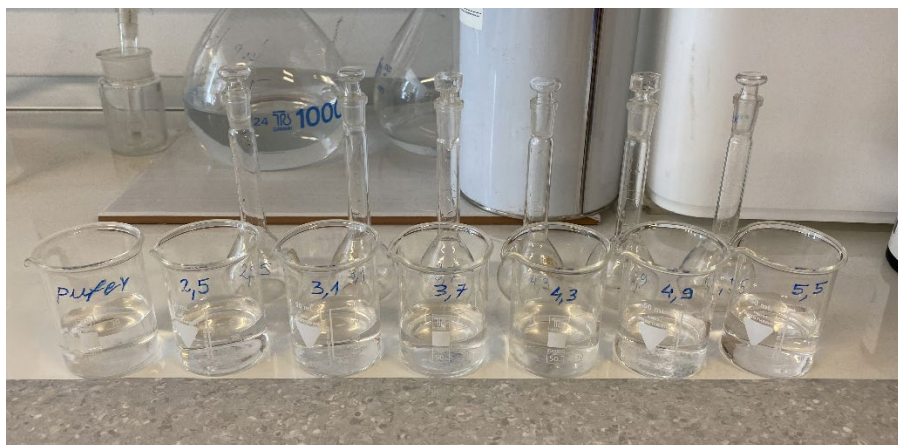
$$c_2 = 7,94 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$c_3 = 1,99 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$c_4 = 5,01 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$c_5 = 1,26 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$c_6 = 3,16 \times 10^{-6} \text{ M}$$



Slika 20. *Prpripremljene razrijeđene otopine*

3.2. Miješanje i priprema membrana

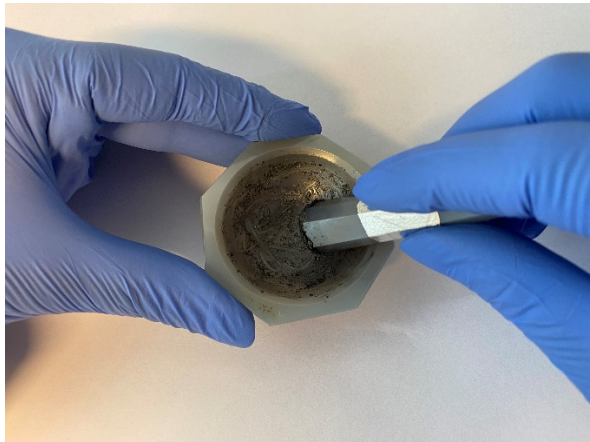
Pripremljene su 22 paste miješanjem IAC-a (ACBTPB, ACBPMA) s grafitnim prahom i tekućim vezivima (NPOE, TEPH, DEHA). Omjer grafitnog praha i tekućeg veziva određen je prema empirijskom iskustvu (55:45, (w/w)). Omjer komponenti ugljika i tekućeg veziva ovisi o njihovom međusobnom spajanju. Prije pripreme ugljikove paste poželjno je eksperimentalno pronaći odgovarajući omjer oba sastojaka kako bi se dobila kompaktna smjesa i izbjegle moguće posljedice kao što su pucanje, propusnost membrane te pojava mjehurića zraka, površinske reakcije grafita i IAC-a, ulazak veziva u pore membrane i blokiranje aktivnih mjesta.

Ugljikova pasta je pripravljena u 5 koraka:

- 1. korak: Na analitičkoj vagi u tarioniku izvagana je određena količina ugljika, tekućeg veziva (NPOE, TEPH, DEHA), ionsko-aktivne tvari (ACBPMA, ACBPTA) u odgovarajućem omjeru.
- 2. korak: Petminutno homogeniziranje smjese kružnim pokretima tučka kako bi se dobila kompaktna smjesa, pasta.
- 3. korak: Punjenje tijela elektrode ("holder") pripremljenom smjesom pomoću špatulice.
- 4. korak: Istiskivanje djelića paste pri dnu elektrode.
- 5. korak: Poliranje površine membrane na parafilmu uz kap destilirane vode.



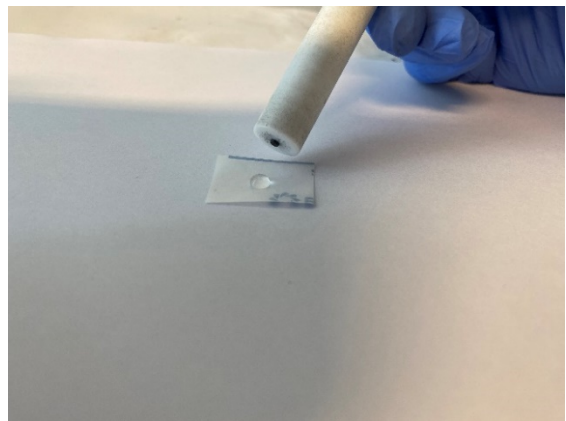
1.korak: Vaganje komponenata na analitičkoj vagi



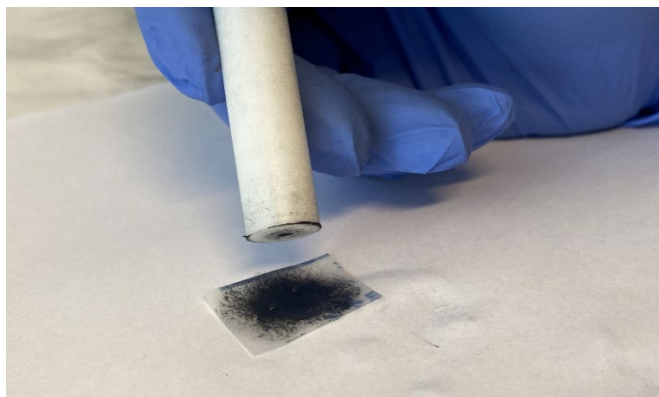
2.korak: Homogeniziranje paste



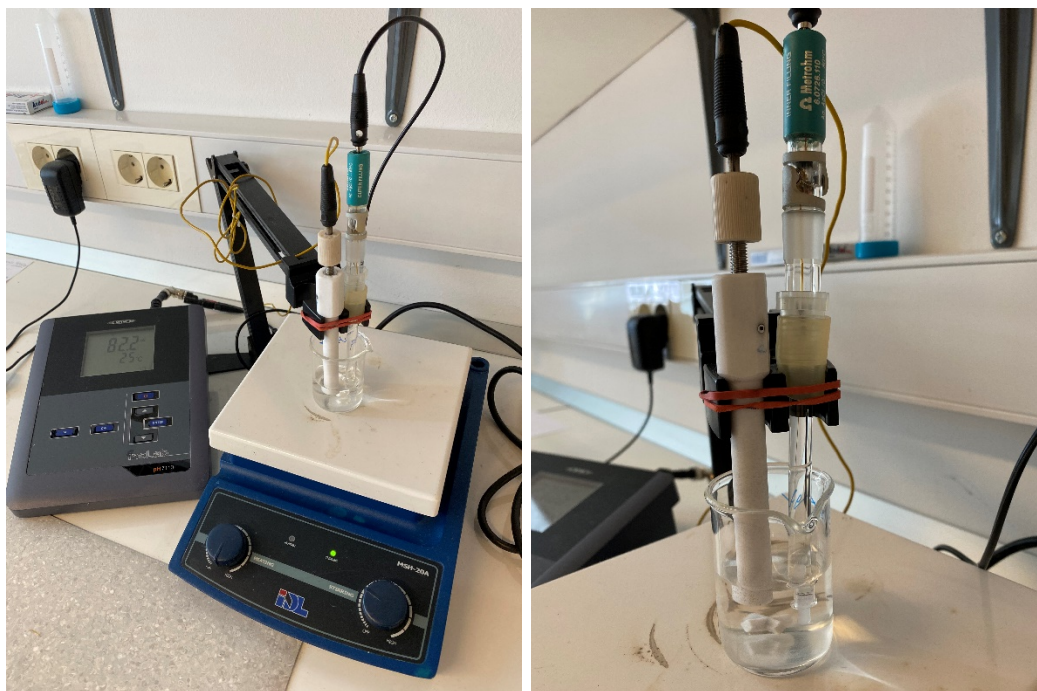
3.korak: Punjenje holdera pastom pomoću špatulice



4.korak: Istiskivanje djelića paste



5.korak: Poliranje površine holdera na parafilmu



Slika 21. *Mjerenje potencijala*

Pripravljene su paste s membranama od grafita, veziva (NPOE, TEP_h, DEHA) i ionsko-asocijacijskog kompleksa (ACBPMA, ACBTPB) kao aktivne tvari. Elektrodi s najboljim membranama dodane su vrlo male količine soli radi poboljšanja odzivnih karakteristika.

Tablica 1. Prikaz mase i udjela komponenti u pripremljenim membranama

Br.paste	$\omega(\text{grafit}) / \%$	$\omega(\text{vezivo}) / \%$	$\omega(\text{IAC}) / \%$	$\omega(\text{sol}) / \%$
Pasta 1	55,5	44,5	0,0	0,0
Pasta 2	54,9	44,8	0,3	0,0
Pasta 3	54,6	44,5	0,9	0,0
Pasta 4	54,2	44,3	1,5	0,0
Pasta 5	53,4	43,7	2,9	0,0
Pasta 6	52,4	42,9	4,8	0,0
Pasta 7	52,3	42,8	4,8	0,1
Pasta 8	54,8	44,9	0,3	0,0
Pasta 9	54,2	45,3	0,5	0,0
Pasta 10	54,3	44,4	1,3	0,0
Pasta 11	53,9	44,1	2,0	0,0
Pasta 12	54,9	45,0	0,0	0,1
Pasta 13	54,8	44,9	0,3	0,0
Pasta 14	54,4	45,3	0,3	0,0
Pasta 15	52,2	43,0	4,8	0,0
Pasta 16	54,8	44,8	0,3	0,1
Pasta 17	54,8	44,8	0,3	0,1
Pasta 18	54,8	44,9	0,3	0,0
Pasta 19	54,8	44,8	0,3	0,1
Pasta 20	53,9	44,1	2,0	0,0
Pasta 21	54,8	44,8	0,3	0,1
Pasta 22	54,7	44,7	0,3	0,3

4. REZULTATI

Pripravljene su 22 paste u kojima je količina grafitnog praha bila 55 mg i količina veziva 45 mg. U tablici 1. prikazan je sastav svih pripremljenih membrana. Prva pasta je pripravljena samo s grafitom i vezivom (NPOE) bez ionsko-asocijacijskog kompleksa. Preostale paste (2-22) su pripravljene s ionsko-asocijacijskim kompleksima (ACBTPB, ACBPMA). U paste 7, 16, 17, 19, 21, 22 dodana je vrlo mala količina ionskog aditiva (NaTPB) radi poboljšanja odzivnih karakteristika. Elektrode su kondicionirane 10 minuta u puferu. Potencijal je zabilježen nakon prve i treće minute u koncentracijskom području od $3,16 \times 10^{-6}$ do $3,16 \times 10^{-3}$ M.

Tablica 2. Rezultati mjerenja za elektrodu 1 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)					
		1.DAN MJERENJA					
pACB	1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		
	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	
5,5	321,0	324,5	355,5	355,9	346,2	349,0	
4,9	331,2	329,2	354,3	353,6	340,7	344,8	
4,3	335,6	337,3	357,3	357,6	340,2	345,4	
3,7	346,4	342,3	360,9	361,5	344,1	347,4	
3,1	362,1	358,5	368,4	368,0	351,5	354,6	
2,5	381,7	375,4	376,3	378,2	363,0	365,4	
nagib	-19,4	-16,5	-7,1	-7,6	-5,7	-5,4	
faktor regresije	0,9521	0,9362	0,8671	0,8465	0,5604	0,5984	

Tablica 3. Rezultati mjerenja za elektrodu 2 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

pACB		E (mV)															
		1. DAN MJERENJA						2. DAN MJERENJA									
		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja			
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s		
5,5		169,4	173,4	206,6	204,7	203,9	204,2	232,1	231,3	229,5	228,6	226,7	226,1	223,5	224,2	222,3	223,1
4,9		186,6	187,7	205,5	206,0	207,5	208,0	233,6	233,5	229,6	230,2	227,2	227,3	225,6	225,7	224,7	225,0
4,3		197,0	198,7	213,0	213,0	214,3	214,2	238,3	237,7	235,7	235,7	231,4	232,8	230,4	232,1	231,8	231,8
3,7		210,9	211,4	224,8	223,2	228,5	226,8	249,5	248,0	245,8	244,2	245,3	243,4	248,8	248,8	247,3	247,3
3,1		236,3	235,6	249,2	247,3	252,6	251,5	272,4	271,7	269,2	268,1	268,1	266,8	272,1	272,1	272,8	272,8
2,5		264,0	264,3	275,0	274,0	278,8	278,1	299,5	298,5	297,1	295,3	294,2	293,4	298,5	298,5	299,2	299,2
nagib		-30,3	-29,1	-23,1	-22,9	-25,0	-24,4	-22,1	-21,9	-22,2	-21,7	-22,6	-22,2	-25,4	-25,1	-25,9	-25,7
faktor regresije		0,9678	0,9606	0,8721	0,8768	0,9073	0,8971	0,8635	0,8600	0,8561	0,8556	0,8670	0,8664	0,8968	0,8993	0,9032	0,8982

Tablica 4. Rezultati mjerenja za elektrodu 3 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)									
		1.DAN MJERENJA					2.DAN MJERENJA				
		1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem	1.mjerenje bez poliranja	1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem	1.mjerenje s poliranjem	3.mjerenje s poliranjem	1.mjerenje bez poliranja	2.mjerenje bez poliranja	2.mjerenje nakon 60 s
pACB		nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s
5,5		261,9	262,3	264,6	278,8	272,2	274,6	269,6	269,6	269,6	269,6
4,9		260,1	262,9	266,0	277,6	272,6	272,8	269,4	269,4	270,5	270,5
4,3		264,2	266,1	270,3	279,2	275,3	274,6	272,7	272,7	274,4	274,4
3,7		273,0	278,7	281,7	291,4	286,1	284,1	286,1	286,1	287,3	287,3
3,1		299,3	305,3	306,3	318,3	311,7	311,0	313,4	313,4	315,3	315,3
2,5		328,3	337,2	335,9	348,8	342,7	340,1	341,9	341,9	344,1	344,1
nagib		-21,8	-24,5	-23,3	-23,1	-22,9	-21,5	-24,1	-24,1	-24,8	-24,8
faktor regresije		0,8070	0,8329	0,8507	0,8038	0,8191	0,7860	0,8404	0,8404	0,8504	0,8504

Tablica 5. Rezultati mjerenja za elektrodu 4 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)											
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA					
pACB		1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem	1.mjerenje bez poliranja	1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem	3.mjerenje s poliranjem	1.mjerenje bez poliranja	1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem	3.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje bez poliranja	
		nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	nakon 60 s	
5,5		278,8	237,4	232,1	250,7	245,2	249,4	245,0	245,2	245,2	249,4	241,3	
4,9		277,6	238,6	233,7	247,6	247,5	248,6	246,8	247,5	247,5	248,6	245,1	
4,3		279,2	242,2	240,8	254,4	252,0	252,8	251,1	252,0	252,0	252,8	249,3	
3,7		291,4	251,7	253,1	264,8	262,6	262,0	263,2	262,6	262,6	262,0	263,3	
3,1		318,3	277,0	277,5	288,9	286,6	285,7	288,2	286,6	286,6	285,7	287,9	
2,5		348,8	305,1	305,6	316,8	314,4	313,6	315,1	314,4	314,4	313,6	315,0	
nagib		-22,9	-22,1	-24,3	-22,1	-22,6	-21,0	-23,2	-22,6	-22,6	-21,0	-24,3	
faktor regresije		0,8468	0,8359	0,8841	0,8363	0,8615	0,8240	0,8651	0,8615	0,8615	0,8240	0,8861	

Tablica 6. Rezultati mjerenja za elektrodu 5 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)										
		1.DAN MJERENJA					2.DAN MJERENJA					
		1.mjerenje s poliranjem	2.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1.mjerenje bez poliranja nakon 60 s	1.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	2.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	3.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1.mjerenje bez poliranja nakon 60 s	1.mjerenje bez poliranja nakon 60 s	2.mjerenje bez poliranja nakon 60 s		
pACB												
5,5		258,0	256,8	256,5	267,9	267,1	268,5	262,9	262,9	262,9		
4,9		260,3	259,2	258,0	266,4	267,4	268,5	263,8	263,8	265,5		
4,3		262,1	261,5	262,3	271,4	269,3	269,1	268,6	268,6	268,4		
3,7		268,8	272,6	274,2	282,8	281,5	281,7	283,2	283,2	285,1		
3,1		293,6	299,0	300,2	307,0	306,0	306,3	309,4	309,4	311,1		
2,5		323,1	328,3	328,0	336,8	335,6	336,1	338,6	338,6	340,3		
nagib		-20,6	-23,2	-23,6	-22,7	-22,4	-22,1	-25,2	-25,2	-25,7		
faktor regresije		0,8016	0,8378	0,8582	0,8332	0,8230	0,8083	0,8658	0,8658	0,8707		

Tablica 7. Rezultati mjerenja za elektrodu 6 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)											
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA					
		1. mjerenje s poliranjem	2. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1. mjerenje bez poliranja nakon 60 s	1. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	2. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	2. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	3. mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1. mjerenje bez poliranja nakon 60 s	1. mjerenje bez poliranja nakon 60 s	2. mjerenje bez poliranja nakon 60 s	
pACB													
5,5		271,6	275,2	274,4	268,5	277,1	282,1	282,6	283,5				
4,9		273,0	273,4	277,6	276,5	278,2	278,5	283,3	287,0				
4,3		274,5	276,7	279,1	281,2	283,8	283,3	288,5	290,6				
3,7		285,9	290,6	293,4	292,0	299,7	298,9	304,4	307,3				
3,1		311,7	317,0	319,3	319,7	326,3	324,4	329,1	333,3				
2,5		341,0	347,6	349,0	351,7	356,5	354,0	358,8	363,1				
nagib		-22,6	-24,1	-24,4	-26,5	-26,5	-24,4	-25,4	-26,4				
faktor regresije		0,8238	0,8251	0,8520	0,8836	0,8751	0,8349	0,8725	0,8803				

Tablica 8. Rezultati mjerenja za elektrodu 7 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

E (mV)			
1.DAN MJERENJA			
	1.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	2.mjerenje s poliranjem nakon 60 s	1.mjerenje bez poliranja nakon 60 s
pACB			
5,5	180,8	177,9	178,9
4,9	179,2	178,4	179,9
4,3	177,1	177,8	179,6
3,7	175,6	177,1	178,6
3,1	174,7	175,2	177,3
2,5	174,8	174,8	176,4
nagib	2,1	1,2	1,0
faktor regresije	0,9221	0,8346	0,7064

Tablica 9. Rezultati mjerenja za elektrodu 8 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)														
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA								
pACB	nakon 60 s	1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja		
		nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
5,5	287,0	281,9	315,0	314,1	315,1	312,4	258,3	253,5	261,3	255,9	263,8	261,8	229,1	233,0	234,3	239,8
4,9	294,2	292,8	324,6	319,9	289,1	296,7	258,8	262,0	260,6	260,8	246,4	252,2	251,4	250,7	238,8	244,5
4,3	286,6	260,8	331,5	332,2	282,7	292,0	270,0	270,7	269,7	268,6	245,9	252,2	249,2	253,7	240,6	246,1
3,7	242,0	245,7	320,6	318,5	281,8	286,4	274,6	278,9	256,9	263,7	257,8	262,8	256,5	254,4	262,2	262,4
3,1	257,4	255,0	333,2	329,1	293,3	296,7	291,2	293,0	272,2	274,8	287,4	287,8	280,2	280,5	264,5	267,5
2,5	272,3	270,3	339,6	336,0	302,3	302,4	302,4	301,9	287,9	287,5	293,0	291,4	303,2	301,0	292,5	292,2
nagib	10,9	8,9	-6,6	-5,9	2,5	2,6	-15,3	-16,3	-7,4	-9,3	-13,4	-12,6	-22,1	-20,5	-18,6	-16,5
faktor regresije	0,3665	0,3245	0,6673	0,5775	0,0479	0,1103	0,9422	0,9922	0,5368	0,8473	0,5507	0,6689	0,9010	0,8933	0,8872	0,8923

Tablica 10. Rezultati mjerenja za elektrodu 9 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

pACB		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja	
nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
86,5	90,2	81,0	83,8	80,5	83,4	44,2	46,8	47,5	49,9	52,5	54,1	52,7	55,6	50,4	56,1
91,1	92,8	86,1	89,3	81,9	82,7	46,3	48,2	51,5	53,1	55,7	57,3	55,9	57,7	56,8	57,7
94,5	94,2	89,0	89,5	83,8	84,6	51,5	52,3	53,5	57,3	53,5	55,2	55,9	59,0	59,2	60,0
102,6	103,0	97,7	98,1	92,5	93,5	57,6	60,0	66,0	68,5	66,0	66,4	68,1	69,3	69,7	72,1
128,4	127,3	123,0	122,4	122,1	121,2	89,2	88,0	93,7	91,9	94,9	94,5	100,6	99,2	105,0	104,0
168,1	167,5	163,3	162,9	161,6	160,9	127,7	127,3	133,3	133,2	134,8	134,6	139,7	139,5	142,5	142,1
-25,1	-23,8	-25,3	-24,0	-25,5	-24,4	-26,3	-25,2	-27,0	-25,9	-25,8	-25,0	-27,7	-26,4	-29,3	-25,7
0,8132	0,7804	0,8137	0,7876	0,7819	0,7644	0,8041	0,7961	0,8238	0,8235	0,7782	0,7693	0,8007	0,7899	0,8352	0,8119

Tablica 11. Rezultati mjerenja za elektrodu 10 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

pACB		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja	
nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
81,9	83,4	78,7	80,0	76,8	78,1	53,2	57,4	49,7	53,4	49,4	52,8	50,1	54,0	50,9	54,0
89,5	91,1	81,3	82,7	78,6	79,2	56,6	57,9	52,3	54,6	43,8	48,9	48,1	53,3	56,1	58,6
83,2	86,0	81,5	82,8	79,7	80,0	58,2	59,2	43,4	48,0	53,5	55,8	54,0	55,7	57,2	59,1
89,3	91,1	88,7	89,7	86,0	85,7	60,4	61,0	56,4	59,6	60,0	62,0	63,8	65,0	62,4	64,1
115,2	115,0	112,4	111,4	111,0	109,8	84,3	84,6	83,0	82,4	82,5	83,1	88,2	87,7	90,2	89,3
154,8	154,7	151,1	150,8	149,9	149,3	122,3	122,4	121,5	122,0	123,0	123,3	124,4	125,5	127,8	128,2
-21,3	-20,6	-22,0	-21,3	-22,3	-21,6	-20,5	-19,4	-22,1	-20,9	-23,4	-22,0	-23,9	-22,4	-23,4	-22,3
0,7094	0,7112	0,7579	0,7490	0,7551	0,7364	0,7374	0,7003	0,6981	0,6916	0,7747	0,7574	0,8080	0,7729	0,7810	0,7608

Tablica 12. Rezultati mjerenja za elektrodu 11 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)																					
		1.DAN MJERENJA									2.DAN MJERENJA												
pACB		1.mjerenje s poliranjem			2.mjerenje s poliranjem			1.mjerenje bez poliranja			1.mjerenje s poliranjem			2.mjerenje s poliranjem			1.mjerenje bez poliranja			2.mjerenje bez poliranja			
		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		
5,5		93,3	96,3	90,7	95,1	85,8	89,0	95,6	101,2	88,6	93,1	100,4	105,9	95,6	101,6	84,7	88,2						
4,9		96,6	98,0	94,9	97,1	88,6	90,6	101,1	105,9	102,0	104,1	106,3	108,4	98,8	102,7	90,0	91,7						
4,3		100,4	100,5	96,0	97,5	87,9	91,2	107,4	109,5	107,8	109,6	108,9	111,0	100,7	103,3	92,2	93,4						
3,7		105,7	106,8	102,1	103,6	96,8	98,0	117,5	119,1	114,7	114,8	119,0	118,2	104,1	105,5	98,5	98,9						
3,1		128,2	128,4	126,8	127,2	117,3	118,8	138,5	138,1	133,7	133,3	125,5	129,1	126,2	125,9	122,5	121,7						
2,5		167,4	167,2	164,8	164,6	160,1	160,1	154,4	156,7	154,8	156,1	158,0	157,8	156,3	155,8	153,1	152,7						
nagib		-22,4	-21,5	-22,5	-21,1	-22,2	-21,3	-19,8	-18,3	-20,6	-19,4	-16,9	-15,7	-18,5	-16,3	-21,2	-19,9						
faktor regresije		0,7853	0,7657	0,7763	0,7491	0,7442	0,7359	0,9385	0,9068	0,9467	0,9215	0,8330	0,8081	0,7775	0,7181	0,8246	0,7951						

Tablica 13. Rezultati mjerenja za elektrodu 12 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
pACB	nakon 60 s	1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja	
		nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s
5,5	131,0	135,1	113,4	116,5	107,8	112,6	85,4	90,1	85,4	90,9	90,4	95,0	90,8	91,1	98,4
4,9	126,3	130,8	119,3	120,4	112,3	114,8	88,0	90,1	91,7	93,9	97,0	99,2	99,1	99,4	100,2
4,3	131,0	132,4	122,0	123,6	116,6	117,6	97,4	99,5	95,6	96,9	98,5	99,8	102,2	100,3	100,5
3,7	136,2	136,8	127,3	126,9	120,4	121,8	87,4	94,2	102,2	102,5	103,6	105,8	109,1	105,2	105,7
3,1	158,4	157,9	146,9	146,7	143,6	142,8	120,6	119,6	121,6	121,0	125,2	124,6	128,5	126,8	127,0
2,5	190,4	189,8	179,1	179,0	176,2	175,4	147,7	147,6	150,7	150,5	153,6	153,6	155,8	154,4	155,2
nagib	-19,0	-17,1	-19,8	-18,8	-20,9	-19,1	-19,0	-17,6	-20,1	-18,3	-19,3	-17,9	-20,0	-19,2	-17,6
faktor regresije	0,7418	0,6899	0,8191	0,7886	0,8134	0,7766	0,7335	0,7555	0,8593	0,8109	0,8259	0,7970	0,8752	0,8338	0,7653

Tablica 14. Rezultati mjerenja za elektrodu 13 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)															
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA									
pACB		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja			
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s		
5,5		-57,7	-51,2	-42,6	-41,7	-69,2	-61,6	-52,5	-39,4	-93,8	-81,0	-60,0	-55,0	-27,9	-22,9	-5,2	-1,8
4,9		-40,5	-49,0	-33,2	-33,1	-62,0	-62,0	-30,3	-26,2	-77,6	-70,0	-56,5	-53,3	-16,9	-18,8	-10,3	-7,6
4,3		-42,4	-41,1	-23,8	-23,7	-67,7	-67,6	-31,3	-23,9	-57,7	-51,1	-50,6	-44,4	-16,2	-12,1	-7,5	-6,6
3,7		-34,6	-27,9	-26,4	-26,3	-56,5	-56,4	-43,0	-30,7	-57,0	-38,3	-41,6	-41,1	-7,3	-5,5	-18,8	-16,9
3,1		-10,0	1,7	-6,6	-6,4	37,7	-37,6	-23,9	-2,6	-41,0	-22,0	-26,5	-5,3	-5,3	6,4	-0,1	12,3
2,5		72,4	74,4	66,0	67,2	49,6	49,5	56,1	66,2	63,2	66,7	52,4	54,9	67,7	66,0	61,6	60,6
nagib		-35,7	-37,8	-29,5	-29,6	-32,3	-30,5	-26,2	-28,2	-42,6	-42,6	-31,5	-33,1	-24,8	-25,1	-16,8	-17,2
faktor regresije		0,7180	0,7761	0,7008	0,6942	0,6312	0,5853	0,5680	0,6581	0,7407	0,8128	0,6965	0,7604	0,6496	0,7308	0,4173	0,4727

Tablica 15. Rezultati mjerenja za elektrodu 14 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

pACB		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		3.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja	
nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
5,5	193,6	195,1	191,4	188,2	197,8	194,4	225,8	232,5	247,4	249,5	240,9	243,5	235,8	234,0	234,3
4,9	200,2	199,0	186,1	186,6	196,5	197,1	239,8	240,7	253,6	253,9	241,3	242,8	232,6	231,4	239,2
4,3	198,9	197,2	190,3	188,5	185,7	187,8	243,6	245,0	256,7	256,2	233,5	237,0	229,2	231,2	237,2
3,7	204,4	202,0	196,5	194,3	198,7	198,5	250,3	249,5	257,3	255,9	238,0	238,4	236,5	236,0	242,2
3,1	226,2	224,8	224,2	220,9	226,2	223,7	268,9	268,8	287,4	285,7	269,6	268,8	269,9	268,7	271,8
2,5	263,3	262,0	259,4	257,2	259,8	259,0	305,8	304,5	323,2	321,4	308,1	306,4	302,9	303,3	309,0
2nagib	-20,6	-19,8	-21,9	-21,6	-19,6	-19,7	-23,5	-21,3	-22,9	-21,6	-20,3	-18,8	-21,7	-22,1	-22,7
faktor regresije	0,7606	0,7239	0,7380	0,7390	0,6405	0,6741	0,8701	0,8313	0,7785	0,7463	0,6199	0,5982	0,6860	0,7065	0,7487

Tablica 16. Rezultati mjerenja za elektrodu 15 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)																										
		1.DAN MJERENJA									2.DAN MJERENJA																	
pACB		1.mjerenje s poliranjem			2.mjerenje s poliranjem			1.mjerenje bez poliranja			1.mjerenje s poliranjem			2.mjerenje s poliranjem			1.mjerenje bez poliranja			2.mjerenje bez poliranja								
		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s		nakon 60 s	nakon 180 s							
5,5		192,5	192,1	195,7	195,9	198,2	197,2	212,3	213,0	210,4	209,2	213,6	208,6	200,9	207,8	206,7	239,5	237,9	241,8	239,8	265,0	263,2	261,8	258,6	266,0	271,2	270,7	
4,9		192,8	192,6	201,9	199,0	199,8	198,7	220,0	219,4	211,9	210,3	210,8	209,0	209,1	213,6	212,2	200,1	200,1	199,3	198,7	224,5	227,5	227,2	223,9	222,7	231,6	231,1	236,8
4,3		193,1	190,3	197,4	195,6	201,9	199,2	219,9	218,6	212,9	210,9	213,2	211,2	205,2	214,0	210,5	200,1	199,0	199,3	209,3	218,4	216,4	211,8	210,0	211,2	209,9	215,8	214,3
3,7		200,1	199,0	199,3	198,7	203,1	200,8	218,4	216,4	212,3	211,8	210,0	206,6	211,2	214,0	210,5	200,1	199,0	199,3	209,3	224,5	227,5	227,2	223,9	222,7	231,6	231,1	236,8
3,1		212,5	208,7	210,3	209,3	219,5	217,0	224,5	227,5	228,0	227,2	223,9	222,7	231,6	236,8	235,7	239,5	237,9	241,8	239,8	265,0	263,2	261,8	258,6	266,0	271,2	270,7	
2,5		-14,3	-13,6	-12,3	-12,1	-15,6	-15,2	-13,1	-13,0	-14,8	-15,0	-12,4	-13,4	-19,0	-18,4	-18,8	-14,3	-13,6	-12,3	-12,1	-13,1	-13,0	-12,4	-13,4	-19,0	-18,2	-18,4	
faktor regresije		0,7542	0,7066	0,6221	0,6267	0,7133	0,6872	0,5896	0,6106	0,6487	0,6610	0,5533	0,5875	0,7511	0,7416	0,7339	0,7542	0,7066	0,6221	0,6267	0,5896	0,6106	0,6487	0,6610	0,5533	0,5875	0,7511	0,7416

Tablica 17. Rezultati mjerenja za elektrodu 16 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)														
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA								
pACB		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja		
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	
5,5		72,4	71,0	62,9	60,4	66,3	62,2	36,0	40,2	51,8	54,6	61,1	59,3	58,3	60,9	58,7
4,9		61,1	59,5	53,6	55,8	54,7	55,2	29,6	36,0	46,2	49,9	55,0	51,7	49,3	53,3	51,8
4,3		57,4	61,1	50,3	52,3	53,1	56,1	40,0	44,7	41,7	42,9	42,3	48,4	37,8	40,5	42,0
3,7		47,9	50,3	41,1	47,0	45,5	48,1	38,5	42,0	42,8	47,8	43,4	47,6	43,4	42,6	47,2
3,1		81,5	104,6	103,1	120,4	82,3	101,3	118,7	136,9	61,0	83,7	70,2	96,1	83,1	115,0	144,3
2,5		221,1	220,9	204,9	207,4	204,8	205,7	197,2	197,7	209,5	207,2	204,4	204,9	203,0	201,8	202,0
nagib		-37,9	-41,6	-40,4	-44,0	-36,6	-40,4	-51,0	-51,8	-39,7	-41,4	-36,3	-41,0	-39,5	-42,5	-47,6
faktor regresije		0,4253	0,5215	0,5338	0,6085	0,4625	0,5586	0,7146	0,7267	0,4558	0,5357	0,4309	0,5564	0,5010	0,5770	0,6465

Tablica 18. Rezultati mjerenja za elektrodu 17 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)														
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA								
pACB	1. mjerenje s poliranjem	2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		3. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja		
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 180 s
5,5	-31,9	-26,3	-14,4	-11,7	8,5	23,3	-24,7	-19,0	-40,6	-35,2	-14,2	-2,2	0,3	10,0	-2,5	17,4
4,9	-31,0	-20,8	-9,4	-2,9	15,7	15,0	-18,4	-13,6	-18,5	-13,0	1,8	3,4	12,3	16,7	21,6	25,3
4,3	-20,6	-14,2	-17,3	-13,5	11,5	17,2	-26,6	-12,7	-17,2	-17,1	-12,8	-0,8	4,9	11,0	20,8	22,6
3,7	-24,7	-8,8	-5,4	-3,4	19,8	19,5	-4,4	5,3	-11,2	-5,8	0,1	6,8	16,6	28,1	4,5	13,6
3,1	38,8	44,3	14,0	30,4	57,1	59,5	49,4	53,4	20,8	33,8	43,7	60,2	58,6	57,9	68,0	68,4
2,5	120,8	116,6	115,9	116,2	115,5	113,6	105,9	104,7	103,4	104,1	114,7	113,9	115,7	113,8	117,0	114,9
nagib	-46,1	-43,6	-34,9	-35,7	-31,8	-28,0	-41,8	-39,9	-40,2	-40,4	-37,3	-36,1	-34,6	-31,4	-34,3	-28,9
faktor regresije	0,7181	0,7676	0,5872	0,6390	0,7256	0,6458	0,7749	0,8197	0,7643	0,7924	0,7024	0,7350	0,7538	0,7590	0,7082	0,6547

Tablica 19. Rezultati mjerenja za elektrodu 18 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
pACB	nakon 60 s	1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja	
		nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s
5,5	93,5	92,9	86,4	89,3	88,2	85,9	58,7	62,1	54,3	60,6	60,3	50,3	55,1	55,5	59,6
4,9	94,5	94,7	91,2	92,4	90,1	90,2	63,6	64,7	62,9	64,7	64,2	58,9	60,7	62,3	63,6
4,3	93,7	93,9	93,8	95,1	90,7	92,0	64,5	65,1	64,5	66,3	65,1	61,9	63,5	64,8	66,3
3,7	103,0	106,0	99,5	101,5	95,4	97,9	73,4	75,3	72,1	75,0	73,4	71,2	74,2	71,2	74,4
3,1	142,0	143,3	141,8	142,2	138,8	140,3	112,6	113,7	111,7	114,4	114,0	109,8	111,9	113,3	115,4
2,5	188,7	188,8	185,4	185,0	180,4	180,0	152,7	152,6	153,3	153,1	152,0	153,8	153,5	153,6	155,7
nagib	-29,9	-30,3	-31,1	-30,2	-29,1	-29,8	-29,8	-29,0	-30,9	-29,5	-29,3	-32,4	-31,2	-30,9	-30,7
faktor regresije	0,7474	0,7710	0,7861	0,7821	0,7480	0,7851	0,7984	0,7893	0,8151	0,8010	0,7927	0,8292	0,8242	0,8075	0,8024

Tablica 20. Rezultati mjerenja za elektrodu 19 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)															
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA									
pACB		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja			
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s		
5,5		-57,3	-56,2	-50,0	-48,3	-50,9	-42,6	-38,1	-30,6	-22,3	-13,5	-62,0	-55,5	-33,7	-29,4	-27,4	-23,9
4,9		-50,1	-46,3	-53,3	-47,9	-43,8	-31,6	-35,8	-27,8	-14,9	-9,4	-43,3	-38,0	-13,0	-11,0	-13,0	-7,9
4,3		-48,8	-41,9	-47,4	-48,5	-52,2	-38,0	-45,8	-26,3	-7,9	-5,1	-30,9	-29,1	-30,6	-20,4	-13,2	-18,0
3,7		-37,8	-36,1	-40,9	-34,8	-41,9	-37,7	-34,7	-36,4	-22,8	-12,3	-32,6	-20,7	-7,4	-13,5	-19,7	-13,3
3,1		-11,1	-2,3	-23,0	-7,4	-26,5	-14,6	-2,4	6,9	18,2	28,8	-6,0	1,4	9,5	19,8	5,6	12,6
2,5		61,5	66,7	58,0	68,8	67,3	70,9	71,8	73,6	78,8	83,3	81,9	78,8	84,4	84,7	92,2	90,7
nagib		-34,4	-35,8	-30,3	-34,3	-31,1	-29,5	-31,5	-29,3	-28,1	-28,2	-39,5	-38,0	-32,4	-31,9	-30,8	-30,4
faktor regresije		0,7393	0,7650	0,6402	0,6964	0,5766	0,5783	0,6243	0,6060	0,6455	0,6791	0,7541	0,8019	0,6981	0,7123	0,6037	0,6310

Tablica 21. Rezultati mjerenja za elektrodu 20 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)														
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA								
pACB	1. mjerenje s poliranjem	2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja				
		nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s			
5,5	106,2	101,9	90,6	92,4	97,0	88,0	77,4	87,0	76,5	85,8	82,4	88,2	93,2	92,5	87,0	90,0
4,9	107,7	109,7	97,2	100,2	92,4	93,1	94,3	94,8	92,0	93,3	95,0	94,4	93,5	94,4	94,1	94,5
4,3	108,5	109,7	98,8	100,4	94,3	95,9	95,2	96,2	93,8	96,2	94,6	95,8	97,1	97,6	96,6	97,5
3,7	116,2	118,2	104,8	108,1	102,3	104,9	108,3	110,0	106,4	108,5	99,4	102,4	104,9	106,2	104,4	105,7
3,1	157,7	160,5	146,9	148,1	144,1	145,7	147,6	147,0	141,3	143,6	139,1	141,9	140,3	143,0	141,2	142,5
2,5	199,2	198,7	190,7	189,5	185,0	184,1	175,5	173,8	174,8	174,2	172,9	171,9	174,5	173,3	173,6	172,4
nagib	-29,7	-30,7	-31,2	-30,3	-28,7	-30,8	-31,6	-28,8	-31,0	-28,8	-28,0	-27,0	-26,4	-26,6	-27,7	-26,9
faktor regresije	0,7659	0,8089	0,7899	0,8003	0,7353	0,8184	0,8996	0,8708	0,8933	0,8692	0,8211	0,8178	0,7978	0,8180	0,8369	0,8325

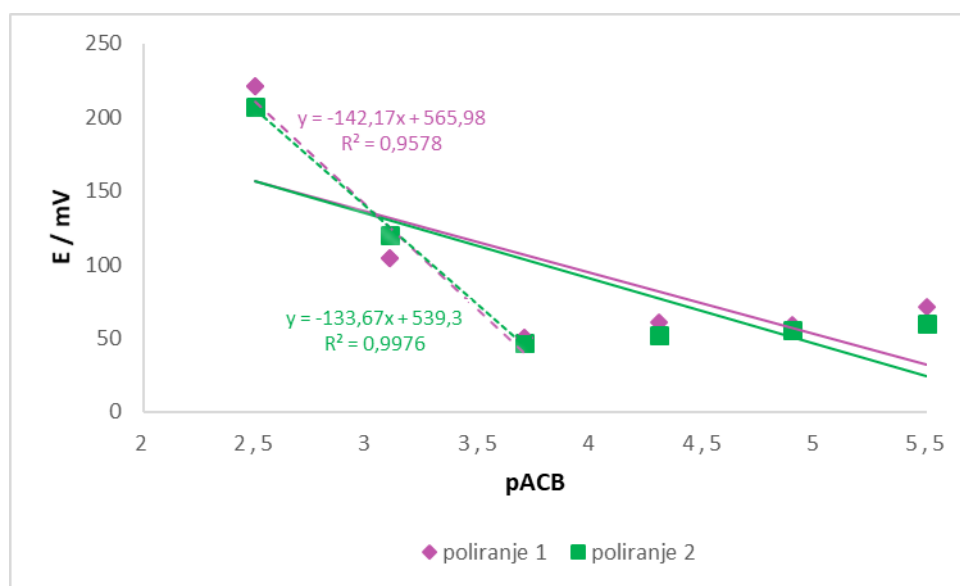
Tablica 22. Rezultati mjerenja za elektrodu 21 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

		E (mV)														
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA								
pACB	nakon 60 s	1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		1. mjerenje s poliranjem		2. mjerenje s poliranjem		1. mjerenje bez poliranja		2. mjerenje bez poliranja		
		nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
5,5	46,1	52,2	39,5	44,4	40,1	42,2	12,0	20,7	26,1	33,7	26,2	32,6	31,1	37,3	27,5	33,5
4,9	46,2	49,2	39,0	39,0	45,2	46,6	19,6	22,4	33,1	35,5	31,1	35,3	28,2	27,0	31,6	34,2
4,3	44,9	47,7	36,7	39,6	36,3	37,5	22,4	27,1	32,0	35,4	24,4	27,5	28,4	33,5	31,7	34,4
3,7	42,5	43,3	34,6	36,4	37,6	38,3	16,3	19,9	28,3	33,6	21,2	23,9	25,2	31,5	23,3	30,4
3,1	42,6	41,8	37,8	43,9	45,4	47,7	21,3	28,9	32,6	38,6	33,6	38,3	24,4	36,8	27,4	27,5
2,5	141,8	183,0	152,0	188,1	166,1	182,5	156,4	165,9	129,1	179,5	168,0	175,8	155,4	169,2	169,6	174,3
nagib	-22,2	-29,9	-26,5	-34,8	-30,1	-33,6	-34,3	-35,2	-24,3	-35,1	-34,0	-34,3	-28,9	-32,7	-32,8	-32,4
faktor regresije	0,3911	0,3623	0,4050	0,4192	0,4344	0,4329	0,4653	0,4610	0,4554	0,4471	0,4379	0,4252	0,3849	0,4354	0,4070	0,3905

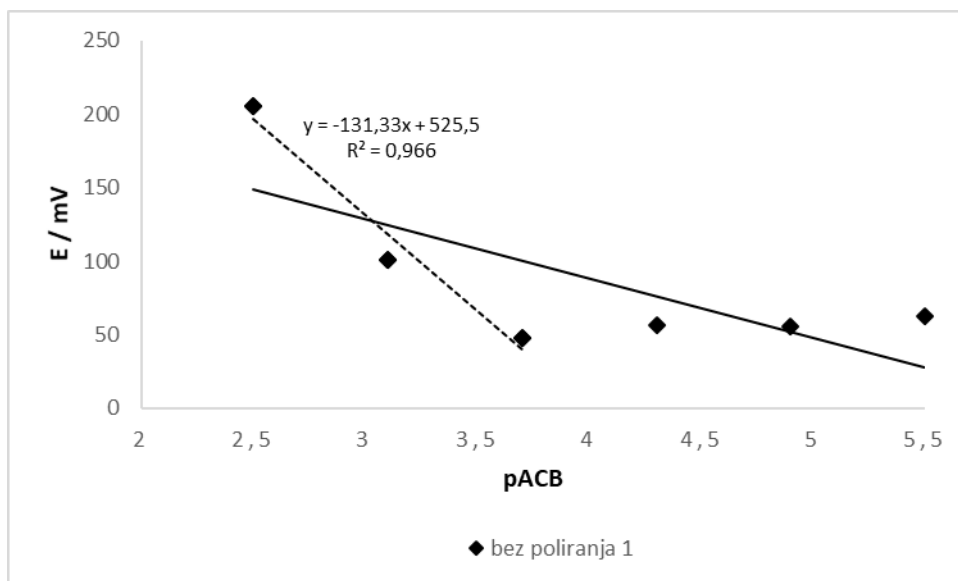
Tablica 23. Rezultati mjerenja za elektrodu 22 s izračunatim nagibom i faktorom regresije krivulje umjeravanja

pACB		E (mV)													
		1.DAN MJERENJA						2.DAN MJERENJA							
		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		1.mjerenje s poliranjem		2.mjerenje s poliranjem		1.mjerenje bez poliranja		2.mjerenje bez poliranja	
nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s	nakon 60 s	nakon 180 s
24,8	33,6	27,1	36,9	52,9	59,6	36,9	53,1	0,6	20,0	36,5	47,0	50,0	58,6	52,0	61,2
31,7	39,3	40,3	46,1	42,4	50,7	37,5	36,7	21,2	30,7	45,0	47,6	52,5	56,2	53,4	58,8
33,0	41,0	50,4	54,6	56,8	60,6	58,6	60,2	34,4	40,0	27,1	33,6	61,7	62,6	64,9	64,9
23,5	41,4	36,0	39,9	34,5	54,3	4,3	26,5	25,6	31,0	41,0	51,6	58,6	62,8	56,3	64,4
59,0	70,9	57,9	68,2	96,6	94,0	82,9	84,5	58,4	73,9	86,0	88,6	94,4	102,3	99,4	103,6
139,3	138,0	145,6	142,7	139,9	138,7	134,9	133,7	130,8	130,1	138,8	137,0	142,0	139,8	140,8	138,9
-30,7	-29,4	-30,0	-27,6	-27,4	-24,7	-27,2	-24,4	-35,9	-32,0	-30,9	-28,1	-27,7	-25,9	-27,3	-24,9
0,5944	0,6775	0,6005	0,6071	0,5851	0,6556	0,4547	0,4978	0,7681	0,7472	0,6621	0,6659	0,7543	0,7436	0,7426	0,7388

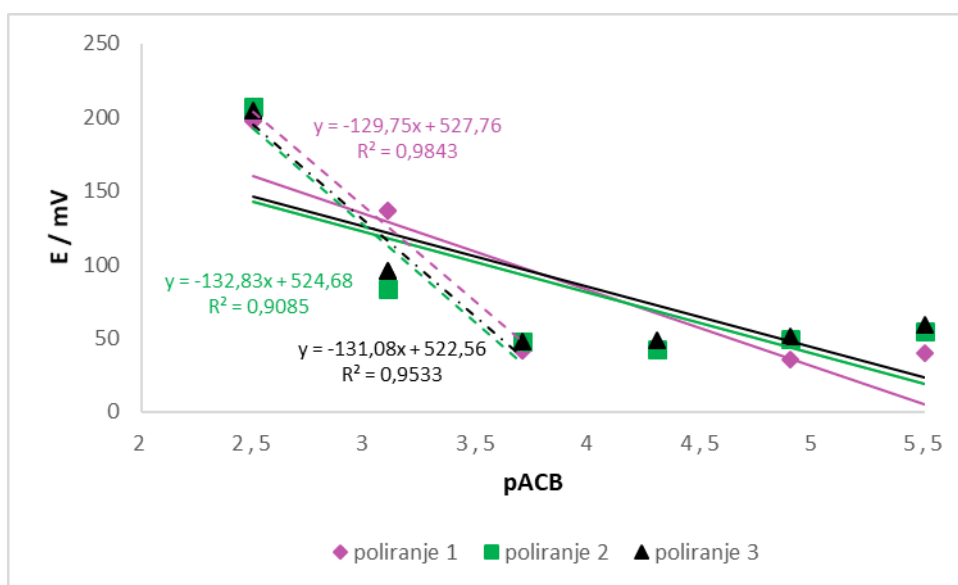
Na sljedećim grafovima (slika 22.-29.) prikazana je ovisnost promjene potencijala elektroda o negativnom logaritmu koncentracija radnih otopina za elektrode 16 i 17 koje su pokazale najbolje odzivne karakteristike. Isprekidanim linijama je prikazano linearno područje odziva testiranih membrana. Vidljivo je da elektroda s opisanim membranama slijedi linearnu promjenu potencijala u uskom koncentracijskom području ($3,16 \times 10^{-3}$ do $1,99 \times 10^{-4}$ M) te da je promjena potencijala znatno viša od teoretske.



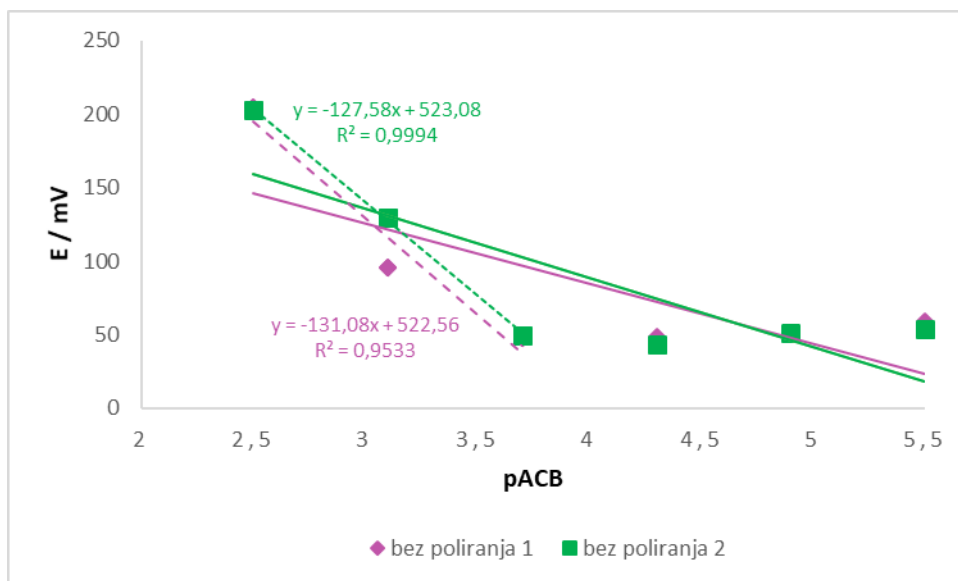
Slika 22. Ovisnost promjene potencijala elektrode 16 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola (pACB) odmah nakon priprave paste



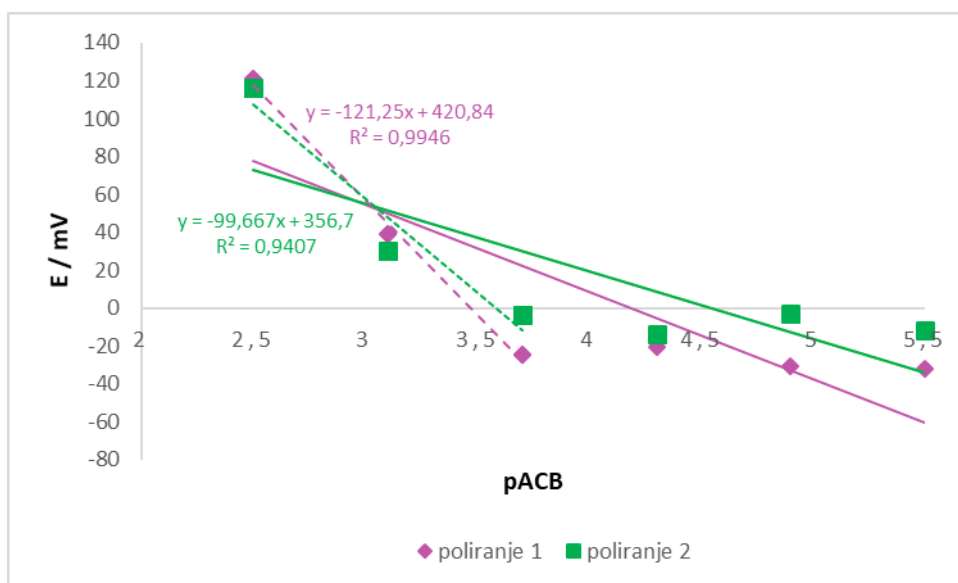
Slika 23. Ovisnost promjene potencijala elektrode 16 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) odmah nakon priprave paste



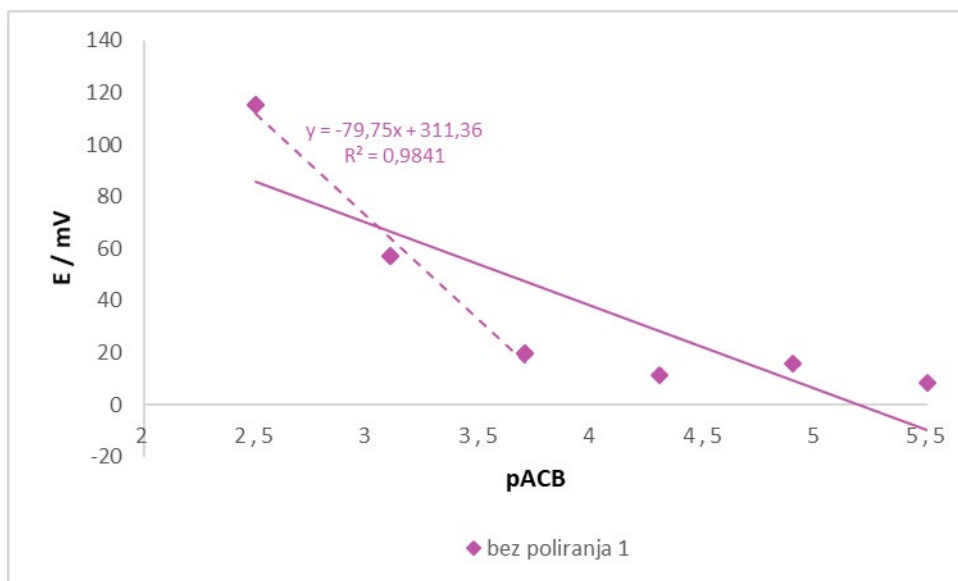
Slika 24. Ovisnost promjene potencijala elektrode 16 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) drugi dan nakon priprave paste



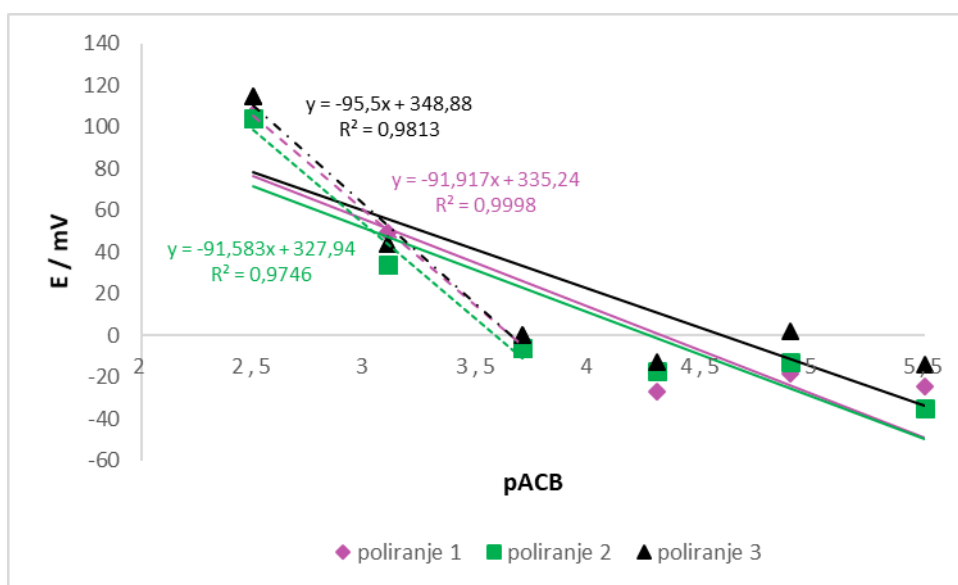
Slika 25. Ovisnost promjene potencijala elektrode 16 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) drugi dan nakon priprave paste



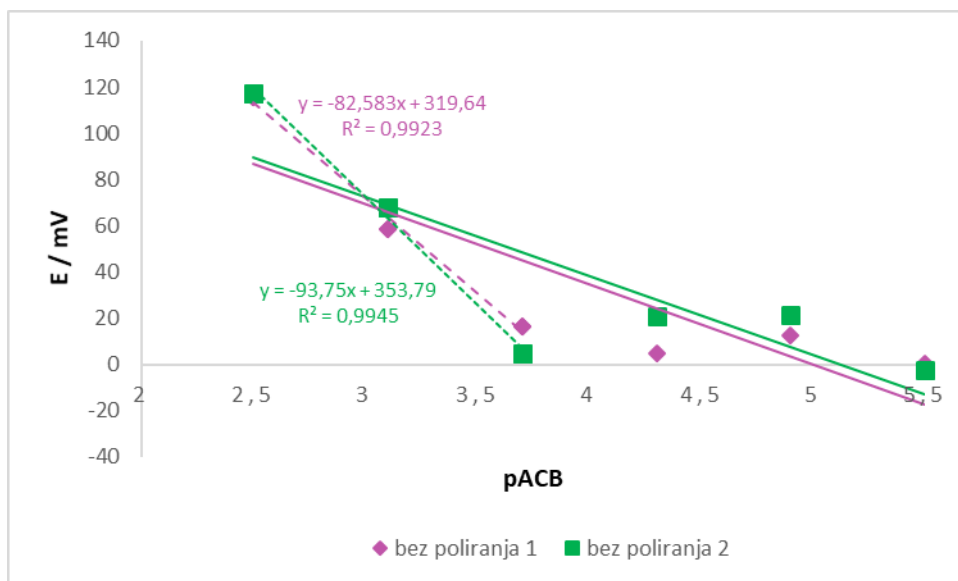
Slika 26. Ovisnost promjene potencijala elektrode 17 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) odmah nakon priprave paste



Slika 27. Ovisnost promjene potencijala elektrode 17 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) odmah nakon priprave paste



Slika 28. Ovisnost promjene potencijala elektrode 17 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) drugi dan nakon priprave paste



Slika 29. Ovisnost promjene potencijala elektrode 17 o negativnom logaritmu koncentracije radnih otopina acebutolola ($pACB$) drugi dan nakon priprave paste

5. RASPRAVA

Cilj provedenog istraživanja bio je pripremiti elektrodu na bazi paste od grafita za kvantitativno određivanje ciljanog analita, acebutolola (ACB-a) u realnim uzorcima. Acebutolol je kardiovaskularni lijek koji unazad 10-tak godina privlači pažnju sve većeg broja znanstvenika.

U dosadašnjim objavljenim znanstvenim radovima o acebutololu, PMA i TPB su se pokazali kao dobri IAC-i. ACBPM se pokazao nešto boljim od ACBTPB-a. Oba membranska senzora su pokazala visoku točnost, dobru selektivnost i jednostavnu upotrebu.

Pripravljene su i testirane 22 paste s različitim udjelima grafita, tekućeg veziva, IAC-a i ionskog aditiva (soli). Provedena su ukupno 176 mjerenja dva uzastopna dana s poliranjem i bez poliranja elektrode. Prva pripravljena pasta sadržavala je binarnu smjesu grafita i tekućeg veziva, NPOE-a (55,5:44,5) i pokazala je iznimno loše odzivne karakteristike prvi dan mjerenja.

U paste 3 - 7 je uz grafit i NPOE dodavan IAC, PMA u različitim količinama (0,3; 0,9; 1,5; 2,9; 4,8). U pastu 7 koja je pokazala najbolji odziv dodana je mala količina ionskog aditiva, NaTPB-a radi poboljšanja odzivnih karakteristika elektrode. Nakon dodatka soli, odzivne karakteristike pripravljene elektrode nisu dale zadovoljavajuće rezultate.

U pastu 8 je umjesto NPOE-a dodan DEHA koja je oba dana mjerenja dala nezadovoljavajuće rezultate.

S obzirom da je NPOE pokazao bolje karakteristike od DEHA, paste su nastavljene s pripravom pomoću tekućeg veziva, NPOE-a.

Nakon dobivenih loših rezultata, donešena je odluka o promjeni IAC-a i umjesto PMA u pastu je dodavan TPB kao IAC.

Paste 9 - 12 sadržavale su smjesu grafita, NPOE-a, TPB-a u različitim omjerima. Ove paste pokazale su loše odzivne karakteristike i prvog i drugog dana mjerenja. U pastu 13 je dodana sol NaTPB-a bez IAC-a (TPB-a) koji je zaboravljen. 13. pasta je drugi dan mjerenja pokazala zadovoljavajuće odzivne karakteristike.

Nakon nezadovoljavajućih rezultata promijenjeno je tekuće vezivo i IAC. Pripravljene su 3 paste s grafitom, TEPH-om i PMA-om (14-16 pasta). PMA je dodan u najmanjoj i najvećoj količini i na temelju dobivenih rezultata odlučeno je dodavanje male količine ionskog aditiva, NaTPB-a pasti 14 koja je sadržavala najmanju količinu PMA. Pasta 16 s 54,8% grafita, 44,8% TEPH-a, 0,3% PMA i 0,1% NaTPB-a dala je najbolje odzivne karakteristike elektrode u koncentracijskom području $3,16 \times 10^{-6}$ - $3,16 \times 10^{-3}$ M s promjenom potencijala po

koncentracijskoj dekadi od -41,4 mV do -51,8 mV. Eksperimentalno dobivena vrijednost Nernstovog nagiba -51,8 mV dobivena je drugi dan mjerenja nakon prvog poliranja elektrode i najbliža je teorijskoj vrijednosti koja iznosi -59,0 mV.

U pastu 17 dodano je 54,8% grafita, 44,8% NPOE, 0,3% PMA i 0,1% NaTPB-a. Ova pasta pokazala je dobre odzivne karakteristike elektrode u koncentracijskom području $3,16 \times 10^{-6}$ - $3,16 \times 10^{-3}$ M s promjenom potencijala po koncentracijskoj dekadi od -31,8 mV do -46,1 mV. Ovakvo pripravljena elektroda pokazala je obećavajuće rezultate.

Na grafovima (slika 22.-29.) isprekidanim linijama je prikazano linearno područje odziva testiranih membrana. Vidljivo je da elektroda s opisanim membrana slijedi linearnu promjenu potencijala u uskom koncentracijskom području ($3,16 \times 10^{-3}$ do $1,99 \times 10^{-4}$ M) te da je promjena potencijala znatno viša od teoretske. Dobiveni rezultati elektrode s opisanim membranama 16 i 17 upućuju na potrebu daljnjih modifikacija same membrane kako bi dobili poboljšane odzivne karakteristike koje bi omogućile primjenu na određivanje ACB-a u širem koncentracijskom području. Ovakvi rezultati mogu biti i posljedica umetanja paste u holder zbog moguće pojave mjehurića u samoj pasti (vidi poglavlje 2.5.3.) kao i odnos u sastavu komponenata same paste.

U paste 18 i 20 dodan je grafit, TEPH i TPB u najmanjoj i najvećoj količini. Obje paste nisu pokazale zadovoljavajuće rezultate.

Pasta 19 pripravljena je od grafita, NPOE-a, TPB-a i NaTPB-a. S obzirom da je zaboravljen IAC u pasti 13, ponovljena je priprava paste u koju je dodan IAC, TPB. Pasta nije dala očekivane rezultate.

Pasta 21 pripravljena je od grafita, TEPH-a, najmanje količine TPB-a i NaTPB-a. Nažalost, dodatak soli je vrlo malo poboljšao odzivne karakteristike elektrode.

Posljednja pasta, pasta 22 pripravljena je od grafita, NPOE-a, jednakih udjela PMA i NaTPB-a koja je također dala nezadovoljavajuće rezultate.

S obzirom na upotrebu različitih tekućih veziva može se zaključiti da vezivo nije inertno. Tekuća veziva imaju različite strukture, vrijednosti dielektrične konstante i utječu na odzivne karakteristike pripravljene elektrode. Prilikom reakcija koje se događaju unutar paste i izmjenom iona iz otopine i s membrane dolazi do nepoželjnih reakcija određivanog kationa ACB-a i tekućeg veziva što dovodi do nestabilnosti pripravljene paste i nepoželjnih promjena fizikalno-kemijskih i elektrokemijskih svojstva paste.

ACB je 2007.g. određivan elektrodom na bazi PVC-a upotrebom istih IAC-a kao i kod opisane elektrode u diplomskom radu, te je pokazano da elektroda u koncentracijskom području 1×10^{-3} - 1×10^{-6} M slijedi linearnu promjenu potencijala po koncentracijskoj dekadi od -51,5 odnosno -53,0 mV što ukazuje na to da je elektroda na bazi PVC-a bolja od ispitivane elektrode na bazi paste od grafita koja je pokazala selektivnost u užem koncentracijskom području $3,16 \times 10^{-3}$ - $1,99 \times 10^{-4}$ M s promjenom potencijala po koncentracijskoj dekadi od -82,6 odnosno -142,2 mV.

6. ZAKLJUČAK

Potenciometrijska metoda određivanja farmaceutika ACB-a je vrlo jednostavna, brza, jeftina, lako dostupna i selektivna metoda.

Veziva TEPH i NPOE u elektrodama na bazi paste od grafita utječu na odzivne karakteristike (nagib i linearni odziv) te pri malim količinama TPB i PMA kao anionskog dijela IAC-a i NaTPB-a, lipofilnog aniona unutar paste pokazuju zadovoljavajuće rezultate, dok vezivo DEHA u elektrodi na bazi paste od grafita pri maloj količini PMA kao anionskog dijela IAC-a unutar paste pokazuje jako loše odzivne karakteristike i nezadovoljavajuće rezultate. Nezadovoljavajući rezultati i loše odzivne karakteristike mogu biti posljedica nedovoljne homogenizacije paste, nepravilnog punjenja holdera elektrode što može dovesti do nepoželjne pojave mjehurića zraka, mogućnost odvijanja nepoželjne reakcije između grafita i IAC-a na samoj površini membrane, pojava interferencija (npr. prašine) u pasti ili pripremljenoj otopini, niska dielektrična konstanta veziva, nepravilno rukovanje tijekom izvođenja eksperimenta.

Kod većine pripremljenih membrana stabilan potencijal se uspostavlja vrlo brzo, nakon 1 minute, dok se kod membrana koje sadrže ionski aditiv (sol, NaTPB) uspostavlja nakon 2 minute.

Najbolje rezultate pokazuje CPE 16 s udjelima od: 54,8% grafita, 44,8% veziva (TEPh-a), 0,3% IAC-a (ACBPMA) i 0,1% ionskog aditiva (NaTPB-a) u koncentracijskom području $3,16 \times 10^{-6}$ M do $3,16 \times 10^{-3}$ M s promjenom potencijala po koncentracijskoj dekadi od -51,8 mV.

U budućnosti kod pripreme ionskog senzora na bazi paste od grafita za određivanje ACB-a i drugih farmaceutika trebalo bi promijeniti sastav paste, napraviti smjesu različitih omjera grafita i veziva, koristiti različite vrste veziva (npr. DBP i DOP) te različite IAC-e (kombinirati 2 ili više različitih IAC-a).

7. LITERATURA

- [1] *N.Đonlagić*, Elektroanalitičke metode, Tuzla (2004.)
- [2] *Piljac, I.*, Elektroanalitičke metode: teorijske osnove, mjerne naprave i primjena, PMC, Zagreb, (1995.), str.101-131
- [3] *Kanis, L.*, Ispitivanje odzivnih karakteristika ionsko-selektivne elektrode modificirane nanočesticama, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, (2017.)
- [4] *M. S. Frant, J. W. Ross*, Electrode for sensing fluoride ion activity in solution, *Science*, **154**, (1966), 1553-1555
- [5] *D. A. Skoog., D. H. West, F. J. Holler*, Osnove Analitičke Kemije, Školska knjiga, Zagreb, (1999.), str. 400
- [6] *R. Graovac*, Priprava i analitička primjena fosfat ionsko-selektivne elektrode, Diplomski rad, KTF, Split (2002.)
- [7] *Arthur K. Covington*, Ion-Selective Electrode Methodology: Volume 1, CRC Press; 1st Edition (1979), 1-12
- [8] *I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytras*, Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes, CRP Press; 1st Edition (2012), 11-32
- [9] URL: <https://slideplayer.com/slide/13037850/> (04.06.2022.)
- [10] URL: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=ion+selektivne+elektrode> (04.06.2022.)
- [11] *Richard A. Durst*, Ion-selective electrodes, *Nat.Bur.Stand.(U.S.)*, **314**, (1969), 1-94, 349-350, 376
- [12] *E.M.Enemchukwu*, Fabrication and use of new solid state phosphate ion selective electrode for monitoring phosphorylation and dephosphorylation reactions, Doktorski rad, Sveučilište Južna Afrika (2012), 64
- [13] URL: <https://www.reade.com/products/graphite-powder-natural-synthetic> (06.06.2022.)
- [14] URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Graphite> (06.06.2022.)
- [15] URL: <https://sites.google.com/site/ugljik3/home/alotropske-modifikacije-ugljika-i-njihova-svojstva> (06.06.2022.)

- [16] URL: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=grafit> (06.06.2022.)
- [17] *Milan Sýs, Amir Shaaban Farag, Ivan Švancara*, Extractive stripping voltammetry at carbon paste electrodes for determination of biologically active organic compounds, *Chem.Month.*, **150**, (2019), 373
- [18] URL: https://www.periodni.com/enig/potenciometrijski_senzori.html (06.06.2022.)
- [19] *M. Rouhani, A. Soleymanpour*, A new selective carbon paste electrode for potentiometric analysis of olanzapine, *Measurement* **140**, (2019), str. 472-478
- [20] *Darroudi, Abolfazl, Eshghi, Hossein, Haghbeen, Kamahldin, Hosseiny, Akram*, A Novel Carbon Paste Electrode for Potentiometric Determination of Vanadyl Ion, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **34**, (2015), 90-91
- [21] *Iyad Darweesh Al-Kashef, Salman Mostafa Saadeh, Khalid Ibrahim Abed Almonem, Hazem Mohammed Abu Shawish, Nasser Mohammed Abu Ghalwa*, Improvement of performance of anti-cancer (dacarbazine) drug sensor utilizing tetraphenylborate anion, *GSC Bio. and Pharma.Sciences*, **11**, (2020), 93-101
- [22] *Hazem M. Abu Shawish, Nasser Abu Ghalwa, Mazen Hamada, Abdel-Hakem Basheer*, Modified carbon paste electrode for potentiometric determination of diquat dibromide pesticide in water and urine samples, *Mat.Sci. and Eng. C*, **32**, (2012), 142
- [23] *H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter*, *Farmakologija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, (2006.), str. 161-175
- [24] *Graham L. Patrick*, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, OU Press; 5th Edition (2013), 621-626
- [25] *Ali F Al-Ghamdi, Mohamed M Hefnawy, Abdulrahman A Al-Majed, Fatallah F Belal*, Development of square-wave adsorptive stripping voltammetric method for determination of acebutolol in pharmaceutical formulations and biological fluids, *Chem.Cent.Jour*, **6**, (2012), 1-8
- [26] URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01193> (08.06.2022.)
- [27] URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Acebutolol_structure.svg (08.06.2022.)
- [28] URL: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/a3669> (08.06.2022.)
- [29] URL: <https://nhathuoclongchau.com/thuoc/sectral-200mg-2296.html> (08.06.2022.)

- [30] URL: <https://www.brunet.ca/en/health/medication-dictionary/acebutolol-tablet-200mg/02164418/> (08.06.2022.)
- [31] URL: <https://greenpharmacyonline.com/rx-products/acebutolol-400mg.html> (08.06.2022.)
- [32] URL: https://www.pillsync.com/drug/Acebutolol-Hydrochloride-200-MG-Oral-Capsule/CAPSULE_Amneal-669/ndc/cee9d238-be0f-f1ed-0002-2e990075fda4 (08.06.2022.)
- [33] *Wang Naixing, Liu Wei*, Acebutolol Synthesis, Europe PMC, **CN1510026 (A)**, (2002), 1
- [34] URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acebutolol_synthesis_01.svg (08.06.2022.)
- [35] *Ralph N. Adams*, Carbon Pastes Electrodes, *Scien.Comm.*, (1958), 1576-1576
- [36] *S.I.M. Zayed*, New Plastic Membrane and Carbon Paste Ion Selective Electrodes for the Determination of Triprolidine, *Analy.Sc.*, **20**, (2004), 1043-1047
- [37] *Yousry M.Issa, Hussein M.Abdel-Fattah, Nahla B.Abdel-Moniem*, Chemically Modified Carbon Pastes Sensors for Micro-Determination of Doxycycline Based on Heteropolyacids, *Liter.J.*, **02**, (2016), 13-21
- [38] *Salwa Fares Rassi*, Chemically modified carbon paste ion-selective electrodes for determination of atorvastatin calcium in pharmaceutical preparations, *Analy.Chem.R.*, **12**, (2017), 65-72
- [39] *Eman Y. Frag, Marwa El badry Mohamed, Gehad G. Mohamed, Mona Shehatta Ebrahim*, Selective potentiometric sensors for the determination of butenafine hydrochloride in a cream formulation, *Microchem.J.*, **157**, (2020), 1-6
- [40] *Alaa Abd el-hadi Ahmed, Mohamed Ali Korany, Mohamed Magdy Khalil*, Electrochemical determination of verapamil hydrochloride using carbon nanotubes/TiO₂ nanocomposite based potentiometric sensors in surface water and urine samples, *Microchem.J.*, **157**, (2020), 1-4
- [41] *Hongliang Jiang, Christopher Randlett, Heiko Junga, Xiangyu Jiang, Qin C.Ji*, Using supported liquid extraction together with cellobiohydrolase chiral stationary phases-based liquid chromatography with tandem mass spectrometry for enantioselective determination of

acebutolol and its active metabolite diacetolol in spiked human plasma, *J.of Chrom.B.*, **877**, (2009), 173

[42] *Subash Vetri Selvi, Nandini Nataraj, Tse-Wei Chen, Shen-Ming Chen, Prakash Balu, Xiaoheng Liu*, Disposable cerium oxide/graphene nanosheets based sensor for monitoring acebutolol in environmental samples and bio-fluids, *J.of Env.Chem.Eng.*, **10**, (2022), 1