

# Elektroanalitička primjena koordinacijskog spoja Co(II) za određivanje adrenalina

---

Klišanin, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:167:151567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT**

**ELEKTROANALITIČKA PRIMJENA KOORDINACIJSKOG SPOJA  
Co(II) ZA ODREĐIVANJE ADRENALINA**

**DIPLOMSKI RAD**

**NIKOLINA KLIŠANIN**

**Matični broj: 422**

**Split, listopad 2024**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT  
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ELEKTROANALITIČKA PRIMJENA KOORDINACIJSKOG SPOJA  
Co(II) ZA ODREĐIVANJE ADRENALINA**

**DIPLOMSKI RAD**

**NIKOLINA KLIŠANIN**

**Matični broj: 422**

**Split, listopad 2024**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ELECTROANALYTIC APPLICATION OF THE COORDINATION  
COMPOUND Co(II) FOR DETERMINATION OF ADRENALINE**

**DIPLOMA THESIS**

**NIKOLINA KLIŠANIN**

**Parent number: 422**

**Split, October 2024**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Diplomski studij Kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević

### ELEKTROANALITIČKA PRIMJENA KOORDINACIJSKOG SPOJA Co(II) ZA ODREĐIVANJE ADRENALINA

Nikolina Klišanin, 422

**Sažetak:** Adrenalin ili epinefrin, hormon je i neurotransmiter kojeg luči nadbubrežna žlijezda. Važan je posrednik u stresnim situacijama, poput anksioznosti i depresije, te se koristi kao lijek za stanja poput anafilaksije, krvarenja i srčanog zastoja. U krvi regulira krvni tlak, broj otkucaja srca i metabolizam glikogena. Njegova prisutnost može ukazivati na zdravstvene probleme, a povišene razine javljaju se kod tjelesnih i emocionalnih trauma, te kod karcinoma i Parkinsonove bolesti. Elektrokemijske metode detekcije korištene su za praćenje neurotransmitera povezanih s bolestima zbog svoje brze reakcije, jednostavnosti uporabe i visoke osjetljivosti. Razvijen je novi elektrokemijski senzor za osjetljivo i selektivno određivanje adrenalina koji se temelji na korištenju elektrode od staklenog ugljika (Glassy carbon electrode - GCE) modificirane kobaltovim(II) kompleksom. Prilikom analize stvarnog uzorka, modificirana elektroda pokazala je dobru elektroanalitičku aktivnost (u smislu oksidacije adrenalina), stabilnost, ponovljivost i potencijalnu primjenjivost u komercijalnim farmaceutskim uzorcima. Dobra selektivnost prema adrenalinu također je dokazana i analizom potencijalnih smetnji, gdje na priređenoj elektrodi nisu zamijećene promjene u odzivu osim za vitamin C.

**Ključne riječi:** Adrenalin, elektrokemijski senzor, kobaltov(II) kompleks, elektrokemija

**Rad sadrži:** 52 stranice, 33 slika, 6 tablica, 26 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Nives Vladislavić - predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul - član
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević - član - mentor

**Datum obrane:** 10.10.2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, Split.

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

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Mentor** Associate professor, PhD Ivana Škugor Rončević

**ELECTROANALYTIC APPLICATION OF THE COORDINATION COMPOUND Co(II) FOR  
DETERMINATION OF ADRENALINE**

Nikolina Klišanin, 422

**Abstract:** Adrenaline, or epinephrine, is a hormone and neurotransmitter secreted by the adrenal gland. It plays an important role as a mediator in stressful situations, such as anxiety and depression, and is used as a medication for conditions like anaphylaxis, bleeding, and cardiac arrest. In the blood, it regulates blood pressure, heart rate, and glycogen metabolism. Its presence can indicate health issues, with elevated levels observed during physical and emotional trauma, as well as in cases of cancer and Parkinson's disease. Electrochemical detection is used to monitor neurotransmitters associated with diseases due to its fast response, ease of use, and high sensitivity. A newly developed electrochemical sensor was used for the sensitive and selective determination of adrenaline, based on a glassy carbon electrode (GCE) modified with a cobalt(II) complex. When analysing a real sample, the modified electrode demonstrated good electroanalytical performance (in terms of adrenaline oxidation), stability, reproducibility, and potential applicability in commercial pharmaceutical samples. The good selectivity towards adrenmaline was also demonstrated by analysing potential interferences, where no changes in response were observed on the prepared electrode, except for vitamin C.

**Keywords:** Adrenaline, electrochemical sensor, cobalt(II) complex, electrochemistry

**Thesis contains:** 52 pages, 33 figures, 6 tables, 26 literary references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Associate Professor, Nives Vladislavić , PhD - chair persion
2. Associate Professor, Franko Burčul, PhD - member
3. Associate professor, Ivana Škugor Rončević, PhD- supervisor

**Defence date:** 10th of october 2024

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijsko - tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Škugor Rončević u razdoblju od travnja do rujna 2024. godine.*

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Škugor Rončević na putokazima i vodstvu, na strpljivo razjašnjenim dilemama i brzim odgovorima. Beskrajno zahvala roditeljima, bratu i sestri kao i ostatku obitelji što su dali mojoj duši let, što su mirili sve moje zaraćene Nine i što su me držali kad sam ja odavno pustila. Hvala prijateljima što su vjerovali srčanije, bodrili glasnije, grlili snažnije. Neka ovo bude svojevrsni hommage svima koji su bili tu.*

*„Neka knjiga Zakona bude na ustima tvojim: razmišljaj o njoj danju i noću, kako bi vjerno držao sve što je u njoj napisano: samo ćeš tada biti sretan i uspjet ćeš u pothvatima. Nisam li ti zapovjedio odvaži se i budi hrabar? Ne boj se i ne strahuj, jer kuda god pođeš, s tobom je Jahve, Bog tvoj.“*

*Jš, 1,8-9*



## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Elektrokemijska karakterizacija koordinacijskog spoja, kompleksa Co(II).
- U svrhu određivanja adrenalina modificirati elektrodu od staklastog ugljika (GCE) koordinacijskim spojem Co(II)
- Spektrofotometrijski odrediti konstantu formiranja kompleksa Co(II) i adrenalina.

## SAŽETAK

Adrenalin, ili epinefrin, hormon je i neurotransmiter kojeg luči nadbubrežna žlijezda. Važan je posrednik u stresnim situacijama, poput anksioznosti i depresije, te se koristi kao lijek za stanja poput anafilaksije, krvarenja i srčanog zastoja. U krvi regulira krvni tlak, broj otkucaja srca i metabolizam glikogena. Njegova prisutnost može ukazivati na zdravstvene probleme, a povišene razine javljaju se kod tjelesnih i emocionalnih trauma, te kod karcinoma i Parkinsonove bolesti. Elektrokemijske metode detekcije korištene su za praćenje neurotransmitera povezanih s bolestima zbog svoje brze reakcije, jednostavnosti uporabe i visoke osjetljivosti. Razvijen je novi elektrokemijski senzor za osjetljivo i selektivno određivanje adrenalina koji se temelji na korištenju elektrode od staklenog ugljika (tzv. GCE) modificirane kobaltovim(II) kompleksom. Prilikom analize stvarnog uzorka, modificirana elektroda pokazala je dobru elektroanalitičku aktivnost (u smislu oksidacije adrenalina), stabilnost, ponovljivost i potencijalnu primjenjivost u komercijalnim farmaceutskim uzorcima. Dobra selektivnost prema adrenalinu također je dokazana i analizom potencijalnih smetnji, gdje na priređenoj elektrodi nisu zamijećene promjene u odzivu osim za vitamin C.

### **Ključne riječi:**

Adrenalin, elektrokemijski senzor, kobaltov(II) kompleks, elektrokemija

## SUMMARY

Adrenaline, or epinephrine, is a hormone and neurotransmitter secreted by the adrenal gland. It plays an important role as a mediator in stressful situations, such as anxiety and depression, and is used as a medication for conditions like anaphylaxis, bleeding, and cardiac arrest. In the blood, it regulates blood pressure, heart rate, and glycogen metabolism. Its presence can indicate health issues, with elevated levels observed during physical and emotional trauma, as well as in cases of cancer and Parkinson's disease. Electrochemical detection is used to monitor neurotransmitters associated with diseases due to its fast response, ease of use, and high sensitivity. A newly developed electrochemical sensor was used for the sensitive and selective determination of adrenaline, based on a glassy carbon electrode (GCE) modified with a cobalt(II) complex. When analyzing a real sample, the modified electrode demonstrated good electroanalytical performance (in terms of adrenaline oxidation), good interference resistance, stability, reproducibility, and potential applicability in commercial pharmaceutical samples. The good selectivity towards adrenmaline was also demonstrated by analysing potential interferences, where no changes in response were observed on the prepared electrode, except for vitamin C.

### **Keywords:**

Adrenaline, electrochemical sensor, cobalt(II) complex, electrochemistry

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| UVOD.....   | 1  |
| 1. OPĆI DIO .....   | 2  |
| 1.1. Koordinacijski spojevi kobalt(II) .....  | 2  |
| 1.2. Koordinacijski spojevi kobalta(II) i derivata nikotinske kiseline .....          | 4  |
| 1.3. Adrenalin.....   | 6  |
| 1.4. Tehnike .....  | 7  |
| 1.4.1. UV-Vis-NIR spektroskopija .....  | 7  |
| 1.4.2. TEM analiza.....   | 10 |
| 1.4.3. ELEKTROKEMIJSKE TEHNIKE - Elektrokemijska impedancijska<br>spektroskopija..... | 13 |
| 1.4.4. VOLTAMETRIJSKE TEHNIKE - ciklička voltometrija.....                            | 18 |
| 1.4.5. Diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) .....                                 | 20 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 21 |
| 2.1. Priprava otopina .....   | 21 |
| 2.2. Aparatura .....  | 21 |
| 2.2.1. Uređaj za elektrokemijska mjerenja .....                                       | 21 |
| 2.3. Priprava radne elektrode.....  | 23 |
| 2.4. Priprava modificirane elektrode .....  | 23 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 24 |
| 3.1. Karakterizacija koordinacijskog spoja Co(II) .....                               | 24 |
| 3.2. TEM analiza .....  | 25 |
| 3.3. Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS).....                          | 26 |
| 3.4. UV-Vis-NIR spektroskopija .....  | 29 |
| 3.5. Elektrokemijska analiza - Ciklička voltometrija .....                            | 31 |
| 3.6. Diferencijalna pulsna voltometrija (DPV).....                                    | 34 |
| 3.7. Interferencije .....   | 35 |
| 3.8. Određivanje adrenalina u realnom uzorku .....                                    | 36 |
| 4. ZAKLJUČAK.....   | 38 |
| 5. LITERATURA.....  | 39 |

## UVOD

Adrenalin, poznat i kao epinefrin, jedan je od ključnih hormona i neurotransmitera u ljudskom organizmu, odgovoran za brojne fiziološke funkcije. Njegova uloga u regulaciji krvnog tlaka, srčanih otkucaja i metabolizma glikogena čini ga esencijalnim u stresnim situacijama te povezan s anksioznošću, depresijom i fizičkim traumama. Osim u normalnim fiziološkim uvjetima, povišene razine adrenalina mogu biti pokazatelj ozbiljnih zdravstvenih stanja poput karcinoma i neurodegenerativnih bolesti, uključujući Parkinsonovu bolest. Precizna detekcija adrenalina stoga igra ključnu ulogu u medicinskoj dijagnostici i praćenju različitih patogenih stanja.

Elektrokemijske metode detekcije adrenalina posljednjih su godina privukle značajnu pažnju zbog visoke osjetljivosti, brzine odgovora i mogućnosti primjene kod složenih uzoraka. Jedna od najučinkovitijih strategija za poboljšanje selektivnosti i osjetljivosti elektrokemijskih senzora jest modifikacija elektrode koordinacijskim spojem metala. Koordinacijski spojevi metala, osobito kobaltovi(II) kompleksi, pokazali su izniman potencijal kao elektrokatalizatori, omogućujući lakšu oksidaciju bioloških molekula poput adrenalina.

Cilj ovog diplomskog rada jest istražiti elektrokemijsko ponašanje elektrode od staklastog ugljika (GCE) modificirane koordinacijskim spojem  $\text{Co(II)}$ ,  $(\text{Co}(1,2\text{-bpe})_2(\text{H}_2\text{O})_2](6\text{-NH}_2\text{nic})(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}\}_n$  u svrhu određivanja adrenalina. Istraživanjem se nastoji doprinijeti razvoju osjetljivog i selektivnog elektroanalitičkog senzora temeljenog na koordinacijskim spojem modificiranoj elektrodi od staklastog ugljika. Kroz elektrokemijsku karakterizaciju senzora analizira se katalitička aktivnost, odnosno sposobnost olakšavanja oksidacije adrenalina smanjenjem prenapona gole GCE, imobiliziracijom elektrodne površine  $\text{Co(II)}$  kompleksom.

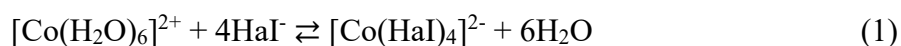
Osim elektrokemijske analize, rad obuhvaća i spektrofotometrijsko određivanje konstante kompleksa  $\text{Co(II)}$  i adrenalina, što omogućava bolje razumijevanje njihove interakcije u otopini i preciznije definiranje uvjeta za optimalnu analitičku primjenu. U ovom kontekstu, važno je odrediti i otpornost senzora na smetnje u stvarnim uzorcima. Ovaj rad pruža sveobuhvatan pristup analizi adrenalina, kombinirajući elektrokemijske i spektrofotometrijske tehnike, s posebnim naglaskom na primjenu koordinacijskog spoja  $\text{Co(II)}$  u elektroanalitičke svrhe. Razvijena metoda može imati široku primjenu u farmaceutskoj industriji, medicinskoj dijagnostici te istraživanju biokemijskih procesa povezanih s adrenalinskim odgovorom organizma.

# 1. OPĆI DIO

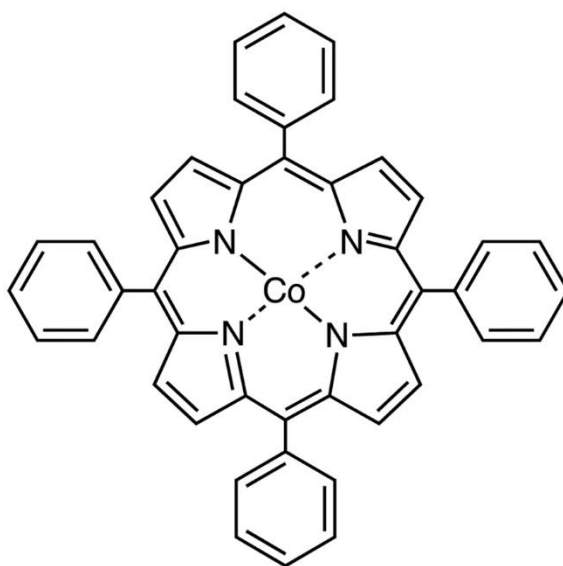
## 1.1. Koordinacijski spojevi kobalt(II)

Koordinacijski spojevi su spojevi koji se sastoje od centralnog metalnog atoma, na koji su vezani ligandi. Središnji atom uglavnom jest atom ili ion prijelaznog metala (Ni, Co, Fe, Cr, Cu), a ligandi su najčešće anioni ili male molekule ( $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}$ ). [1]

Brojčano su zastupljeniji kompleksi Co(III) u odnosu na Co(II) kod kojih razlikujemo koordinacijske spojeve s kvadratnom (niskospinskom), tetraedarskom (visokospinskom) i oktaedarskom (visoko- i niskospinskom) strukturom. Također, za razliku od kompleksa Co(III), Co(II) tvori jednostavnije komplekse. S halogenidnim i tiocianatnim ionima tvori tetraedarske komplekse:

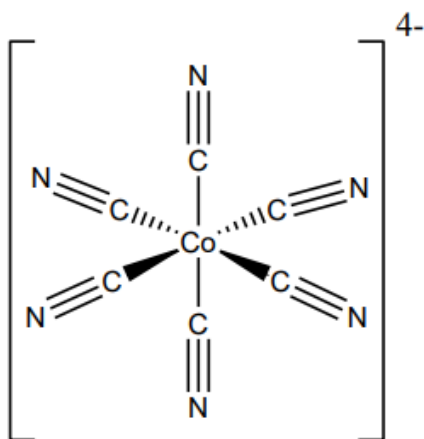


Nadalje, kao primjer niskospinskih kvadratnih kompleksa ističe se kobalt(II) tetrafenilporfirin prikazan na Slici 1.



Slika 1 Strukturni prikaz kobalt(II) tetrafenilporfirin [2]

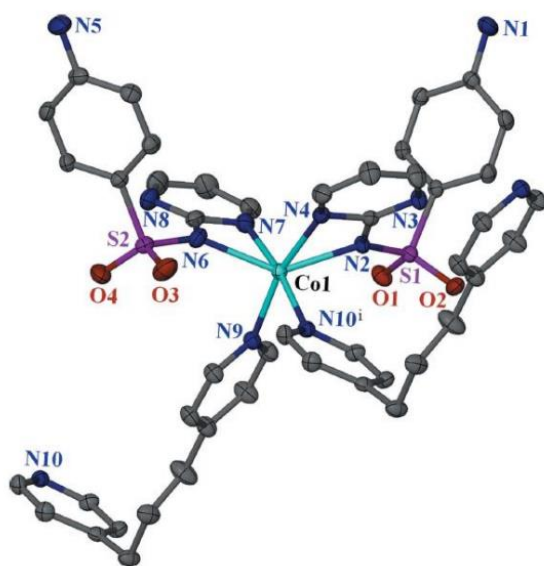
Zatim, za primjer visokospinskog i niskospinskog oktaedarskog Co(II) kompleksa nameću se heksaakvakobaltov(II) ion  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  ili heksacijanokobaltat(II) ion  $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{4-}$  prikazan na Slici 2.



Slika 2 Strukturni prikaz heksacijanokobaltat(II) iona. [3]

Komplekse Co(II) moguće je pripremiti miješanjem otopine Co(II) soli (u komercijalnoj primjeni) s pripadajućim ligandom u nekoordinirajućem otapalu. Također, koncentriranjem smjese i kristalizacijom moguće je izdvojiti komplekse. Kationski i anionski kompleksi ovog tipa mogu se izdvojiti dodavanjem prikladnog protuiona za taloženje produkta i kristalizacijom. [3]

Postoje i primjeri iskrivljenje oktaedarske geometrije (slika 3) koju susrećemo kod 1D koordinacijskog polimera  $[\text{Co}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2)_2(\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2)_n]$  gdje su na centralni kobaltov(II) ion vezana četiri atoma dušika iz četiri deprotonirana liganda sulfadiazina i dva atoma dušika iz dva premošćujuća 1,3–di(4–piridil)propan liganda.



Slika 3 Iskrivljena oktaedarska geometrija Co(II) u  $[\text{Co}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2)_2(\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2)_n]$  [4]

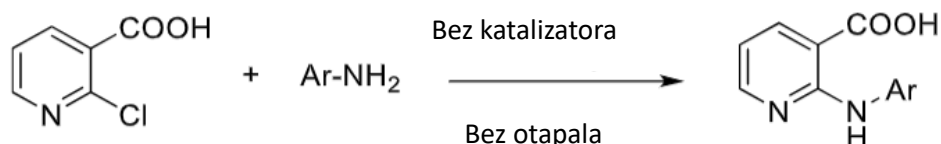
## 1.2. Koordinacijski spojevi kobalta(II) i derivata nikotinske kiseline

Nikotinska kiselina oblik je vitamina B<sub>3</sub> koji sudjeluje u mnogim vitalnim funkcijama u organizmu te njen nedostatak značajno narušava pravilnu funkciju organizma. Derivati nikotinske kiseline pokazali su visoku učinkovitost u liječenju mnogih bolesti poput upale pluća i bubrežnih bolesti, kao i protiv Alzheimerove bolesti i smanjenja visoke masnoće u krvi. Međutim, upotreba je ograničena zbog nuspojava kao što je osim na koži i slične alergijske reakcije. [5]

Schiffove baze izvedene iz nikotinske kiseline tvore komplekse s kationima prijelaznih metala (Co(II), Ni(II), Zn(II)). Schiffove baze djeluju kao deprotonirani tridentatni ligandi za kompleksiranje navedenih metalnih iona. Takvi kompleksi imaju oktaedarsku geometriju i opću formulu  $[M(L)_2]$  gdje je M = Co(II), Ni(II) ili Zn(II), a L = HL<sup>1</sup> – HL<sup>4</sup>. [6]

2-(arilamino)nikotinske kiseline poznate su i kao središnja jezgra za sintezu širokog spektra biološki aktivnih molekula s potencijalnim antibakterijskim, antivirusnim, antialergijskim, antitumorskim djelovanjem kao i nestereoidnih protuupalnih lijekova. 2-arilaminonikotinske kiseline sintetiziraju se uglavnom Ullmanovom reakcijom koja zahtjeva veću količinu bakra i duže vrijeme za sintezu. Alternativno, 2-(arilamino)nikotinske kiseline sintetizirane su aminacijom 2-kloronikotinske kiseline u prisutnosti piridina i para-toluensulfonske kiseline u vodi duže vrijeme pod uvjetima refluksa. Neke od metoda se provode u otapalima kao što su DMF ili ksilen koji su štetni za okoliš. [7]

Na Slici 4 prikazan je ekološki prihvatljiv i praktičan postupak za sintezu 2-(arilamino)nikotinske kiseline putem aminacije 2-kloronikotinske kiseline odgovarajućim aminom u uvjetima bez katalizatora i otapala gdje je prinos reakcije veći, a vrijeme sinteze skraćeno. U prvom koraku mehanizma odvija se nukleofilna adicija aril-amino skupine. U sljedećem koraku, klor kao dobra izlazna skupina napušta molekulu te se dobiva konačni produkt. [7]

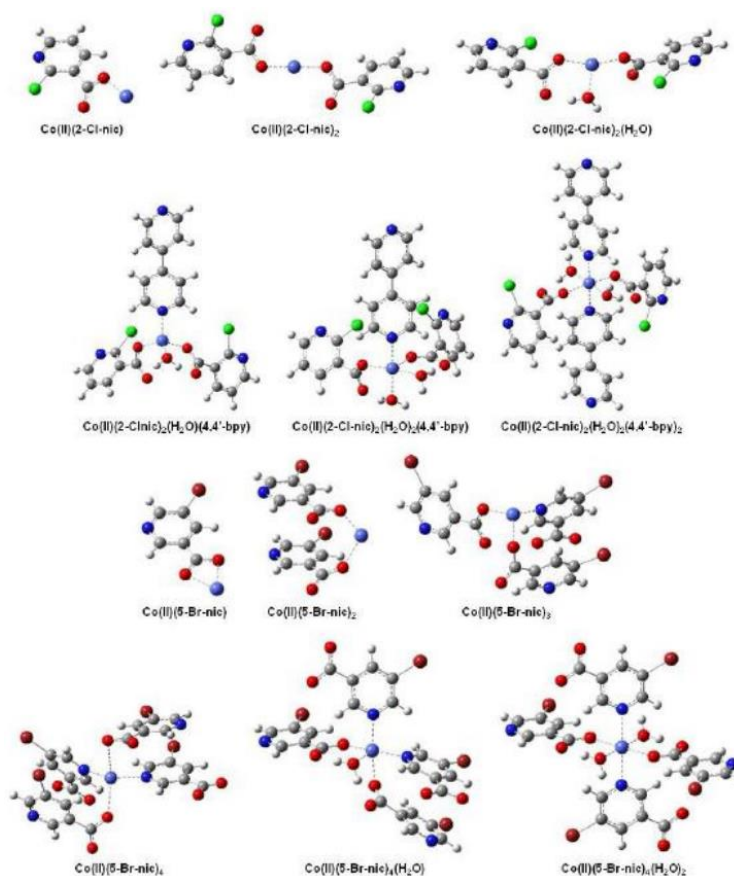


Slika 4 Aminacija 2-kloronikotinske kiseline u uvjetima bez otapala i bez katalizatora [7]



Piridinkarboksilne kiseline, kao što su piridin–2–karboksilne kiseline, piridin–3–karboksilne kiseline i piridin–4–karboksilne kiseline te njihovi derivati s donirajućim ili akceptorskim atomima supstituenata na različitim položajima na piridinskom prstenu, pogodni su za izradu devet koordinacijskih polimera različitih dimenzija (od 1D do 3D). Također, pogodni su za konstrukciju 3D supramolekulskih struktura 1D ili 2D polimera pomoću slabih interakcija (vodikove veze,  $\pi$ – $\pi$  interakcije). [8]

Kobalt(II) koordinacijski kompleksi pokazuju potencijal kao kandidati za elektrokemijske senzore zbog niske cijene, dostupnosti i izvrsne elektrokatalitičke učinkovitosti. Pripravljena su dva strukturno različita 1D Co(II) koordinacijska kompleksa s halogenim supstuentima, bromom i klorom;  $\{[\text{Co}(\text{2-Cl-nic})_2(4,4'\text{-bpy})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n$  i  $\{[\text{Co}(4,4'\text{-bpy})(\text{H}_2\text{O})_4][\text{Co}(5\text{-Br-nic})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4,4'\text{-bpy} \cdot 2\text{H}_2\text{O}\}_n$ . Bromidni i kloridni ioni su slični supstituenti i slabi elektron akceptori, pa se predviđa slična sposobnost koordinacije nakon uvođenja u strukturu. Primjeri koordinacije Co(II) s halogenim supstuentima prikazani su na Slici 5.



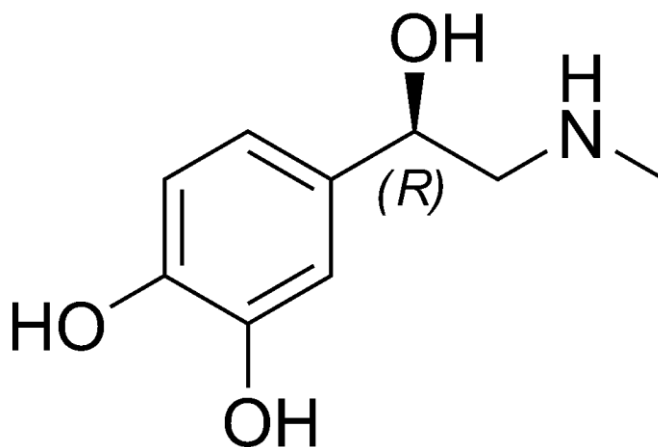
Slika 5 Prikaz strukture najstabilnijih kompleksa Co(II) s 2–Cl–nic i 5–Br–nic ligandom u vodenim otopinama koje sadrže 4,4'–bipiridin [9]

Upotrebom DFT izračuna proučavan je utjecaj vrste i položaja halogenog supstituenta na piridinskom prstenu nikotinata. Različite strukturne tipove koordinacijskih kompleksa treba pripisati isključivo različitim položajima uvedenih halogenida na piridinskom prstenu liganada, a ne vrsti atoma halogena. [9]

Strukturno gledano, haloderivati nikotinske kiseline kao što su klornikotinska kiselina i 5–bromnikotinska kiselina pokazuju slične načine koordinacije metalnih iona. Koordinacijske polimere kobalta(II) moguće je pripremiti s 4,4'–bipiridinom i 2–klornikotinskom kiselinom ili 5–bromnikotinskom kiselinom, gdje 4,4'–bipiridin premošćuje ione metala te tako osigurava nastanak analognih 1D polimera. [9]

### 1.3. Adrenalin

Adrenalin, također poznat kao i epinefrin, (Slika 6) hormon je neurotransmiter kao i lijek. Oslobađa ga nadbubrežna žlijezda. Igra važnu ulogu kao posrednik stresa uslijed anksioznosti i depresije. Adrenalin se koristi kao lijek za nekoliko stanja povezanih s anafilaksijom, krvarenjem i srčanim zastojem. U krvi utječe na regulaciju krvnog tlaka, broj otkucaja srca i metabolizam glikogena. Unatoč mnogim pozitivnim funkcijama, prisutnost adrenalina može ukazivati na probleme u organizmu. Luči se tijekom tjelesnih i emocionalnih trauma. Također javlja se u krvi kod dijagnoze karcinoma u koncentraciji od 0 do 5 nM, kao i u niskim koncentracijama kod Parkinsonove bolesti.



Slika 6 Kemijska struktura adrenalina (epinefrina) [10]

Postoji niz tehnika za detekciju adrenalina kao što su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), kapilarna elektroforeza i spektrofotometrija. Međutim, ove tehnike imaju visoku cijenu, zahtijevaju dugo vrijeme analize i predobradu uzorka.

Usprkos mnogim dostupnim metodama određivanja adrenalina, elektrokemijske metode prednjače zbog niske cijene, jednostavnosti, brzine određivanja, visoke osjetljivosti i niske granice detekcije. Mnogi elektrokemijski senzori razvijeni su za određivanje adrenalina, na temelju ugljikove elektrode modificirane različitim medijatorima prijenosa elektrona, kao što su poli(kafeinska kiselina), poli(*L*-asparaginska) kiselina, poli(indoloctena kiselina), poli(*L*-metionin), 2-(4-okso-3-fenil-3,4-dihidrokinazolinil)-*N*'-fenil-hidrazinkarbotioamid, valin, MnO<sub>2</sub>/Nafion i kompleks rutenija (rutenijev(III) oksid/ferocijanid). [11]

Elektrode prekrivene modifikatorima kao što su polimeri ugljikovih nanocjevčica, nanočestice platine i zlata, kao i mikrobn biosenzori najzastupljeniji su elektrokemijski alati za detekciju adrenalina. Shodno tome, može se zaključiti da je osjetljivost senzora proporcionalna dobroj sposobnosti prijenosa elektrona. Što se tiče nemodificirane ugljikove elektrode, koristi se ultramikroelektroda od ugljikovih vlakana i staklasta ugljikova elektroda. [12]

Kako je adrenalin katekolamin, elektrokemijski je aktivan i može se detektirati elektrokemijskim tehnikama. Glavni problem kod takvog određivanja je bliskost oksidacijskog potencijala adrenalina s drugim biološkim molekulama kao što su askorbinska kiselina i serotonin. U biološkim tekućinama poput krvi, koncentracija adrenalina u mikromolarnom je rasponu, a životni vijek ovih neurotransmitera u izvanstaničnom prostoru je kratak. Stoga je od ključne važnosti pronaći elektrokemijski senzor za detekciju adrenalina u tjelesnim tekućinama. Većina senzora temelji se na ugljikovim nanocijevima (eng. *Carbon Nanotube*, CNT), grafenu, grafitu ili nanougljikovim elektrodama. U novije vrijeme pojavila se nova izvedba visokoosjetljivog senzora temeljenog na elektrodi od MXene/grafit kompozitne paste, odnosno paste karbida ili nitrida prijelaznih metala s grafitom. MXene pruža stabilnost, vodljivost i veliku površinu, a grafit vodljivost. [13,14]

## **1.4. Tehnike**

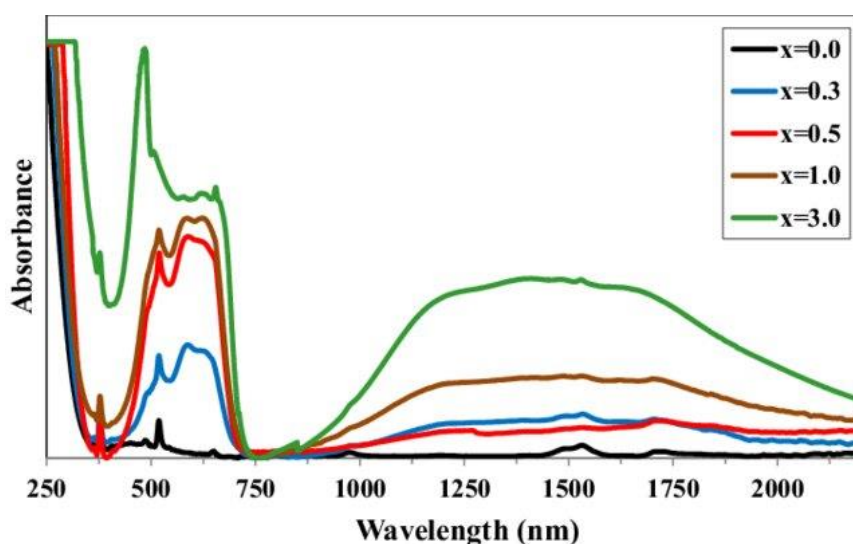
### **1.4.1. UV-Vis-NIR spektroskopija**

Spektroskopija jest analitička tehnika koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja s materijom kako bi se dobile informacije o strukturi, sastavu i svojstvima tvari.

Omogućava identifikaciju i kvantifikaciju različitih kemijskih spojeva te istraživanje njihovih fizičkih i kemijskih karakteristika.

U spektroskopiji, apsorpcija predstavlja proces u kojem kemijska vrsta prisutna u propusnoj sredini selektivno smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji, svaka elementarna čestica ima jedinstven skup i raspored energijskih stanja, pri čemu je najniže među njima *osnovno stanje*.

Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog stanja i nekog višeg stanja čestice. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko stanje, tzv. *pobuđeno stanje*. Nakon  $10^{-6} - 10^{-9}$  s, pobuđena vrsta se vraća u prethodno ili osnovno stanje prenoseći suvišak energije drugim atomima ili molekulama u svojoj okolini. [16]



Slika 7 Primjer UV-Vis-NIR spektra [15]

UV-Vis-NIR spektroskopija moćna je analitička tehnika koja se naširoko koristi u znanstvenom radu i istraživanju, ponajviše kada je riječ o proučavanju svojstava materijala i kemijskih spojeva. Ova metoda integrirana je s drugim spektroskopskim metodama i računalnim tehnikama kako bi se poboljšala njezina analitička moć i proširila primjena. Omogućava razumijevanje prijelaza elektrona u molekulama koji su temelji za analizu strukture, sastava i karakteristika materijala. To je analitička tehnika koja mjeri apsorpciju svjetlosti u rasponu od ultraljubičastog (UV), vidljivog (Vis) do bliskog infracrvenog (NIR) dijela spektra.

Glavni dijelovi ovog uređaja (Slika 8) su:

1. Izvor svjetlosti:

- Deuterijska lampa za UV raspon (oko 190-400 nm).
- Volfram-halogen svjetiljka za vidljivi (400-700 nm) i NIR raspon (do oko 1100 nm).

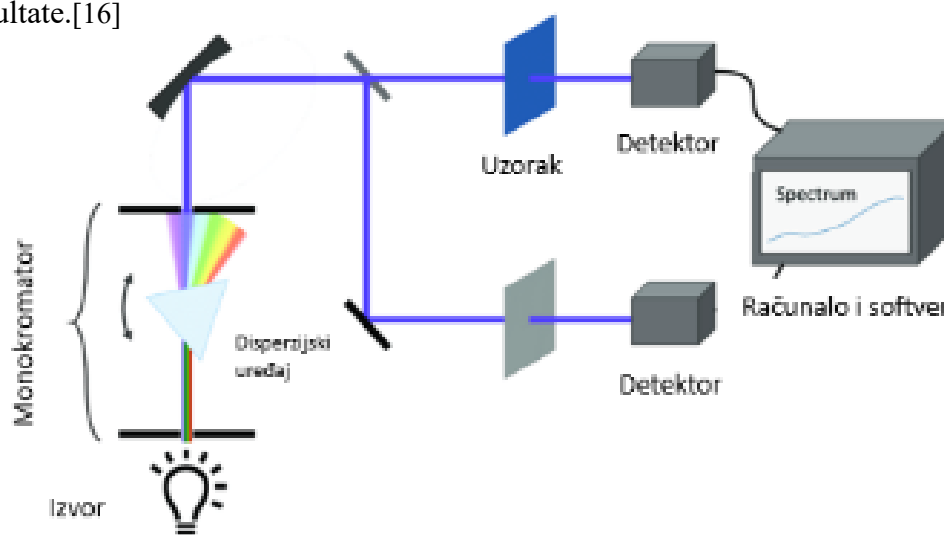
2. Monokromator je zadužen za raspršenje svjetlosti iz izvora na pojedinačne valne duljine. Sadrži difrakcijsku rešetku ili prizmu koja razdvaja svjetlost na spektar valnih duljina za dobivanje monokromatske svjetlosti iz volframove lampe, omogućujući odabir specifične valne duljine za mjerenje.

3. Čelije ili kivete su posude za uzorak. Izrađuju se od kvarca (UV), stakla (vidljivi dio spektra) ili plastike, ovisno o rasponu valnih duljina spektra i kemijskim svojstvima uzorka.

4. Detektor je dio uređaja koji pretvara svjetlost koja prolazi kroz uzorak u električni signal.

5. Optički sustav se sastoji od leća, zrcala i drugih optičkih komponenti koje usmjeravaju svjetlost unutar spektrofotometra. Optički sustav omogućava precizno usmjeravanje snopa svjetlosti kroz monokromator i na detektor.

6. Računalo i programska podrška: računalo povezano sa spektrofotometrom prikuplja, obrađuje i analizira podatke te upravlja radom instrumenta. programska podrška omogućuje korisniku da odabere valne duljine, kontrolira postupak mjerenja, te interpretira rezultate.[16]



Slika 8 Shematski prikaz uređaja [17]

#### 1.4.2. TEM analiza

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) moćna je tehnika za karakterizaciju složenih materijala na nano i mikrometarske veličine. TEM se rutinski koristi za morfološku, strukturnu i kemijsku informacija karakterizaciju uzorka. U transmisijskoj elektronskoj mikroskopiji, tanki uzorak, debljine manje od 200 nm, bombardira se visoko fokusiranim snopom monoenergetskih elektrona. Zraka ima dovoljno energije da se elektroni mogu prenijeti kroz uzorak, a odaslani elektronski signal znatno se povećava nizom elektromagnetskih leća. Transmisijski elektronski mikroskop (Prvi praktični TEM, Slika 9) u kombinaciji s tehnikom precesijske 3D elektronske difrakcijske tomografije proizvodi obećavajuće rezultate u području određivanja kristalne strukture i ima veliku prednost jer zahtijeva vrlo male pojedinačne kristale (od 25-500 nm) i vrlo malu količinu materijala. Kontrast u TEM slikama nastaje zbog raspršenja elektrona u uzorku. Elektroni koji prođu kroz uzorak sakupljaju se i koriste za formiranje slike na fluorescentnom ekranu ili detektoru. [18]



*Slika 9 Prvi praktični TEM, izvorno postavljen u IG Farben-Werke, a sada izložen u Deutsches Museumu Münchenu, Njemačka.*

Budući da koristi visokoenergetski elektronski snop u snažnoj interakciji s atomima, elektronsko zračenje je sklono izazvati promjene u stanju materijala, kao što su fazna transformacija, fazna razgradnja i kontaminacija uzorka. Stoga se mora voditi računa o

održavanju materijala u njegovom najprirodnijem stanju, stanje tijekom pripreme i studije TEM uzorka. [18]

TEM koristi izvor emisije elektrona, poput volframove niti ili monokristala lantanovog heksaborida ( $\text{LaB}_6$ ). Volfram se može oblikovati kao ukosnica ili mali šiljak, dok  $\text{LaB}_6$  izvori koriste male monokristale. Pri spajanju pištolja na visoki napon (100-300 kV) i dovoljno jake struje, pištolj emitira elektrone putem termioničke emisije ili emisije u polju, uz pomoć Wehneltovog cilindra.

Elektronski snop se formira pomoću elektronskog topa i leća TEM-a, a manipulacija snopom se vrši korištenjem elektromagnetskih i elektrostatskih polja, omogućujući precizno usmjeravanje snopa na uzorak. Usmjereni snop elektrona iz elektronskog topa prolazi kroz posebno pripremljen ultra tanki dio uzorka. Snop se fokusira na malu površinu uzorka pomoću elektromagnetske sabirne leće. Uzorak koji se promatra stavlja se na rešetku od bakrene mreže. Konačno, elektroni se fokusiraju pomoću leće elektromagnetskog projektora (umjesto okularne leće kao u svjetlosnom mikroskopu) na ekranu ili fotografskoj ploči.

Teoretski, maksimalna rezolucija,  $d$ , koju se može postići svjetlosnim mikroskopom ograničena je valnom duljinom fotona ( $\lambda$ ) koji se koriste za ispitivanje uzorka i numeričkom aperturom NA sustava ( $\text{NA} = n \cdot \sin \theta$ , parametar rezolucije slike). [19]

$$Dx = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \approx \frac{\lambda}{2 NA} \quad (3)$$

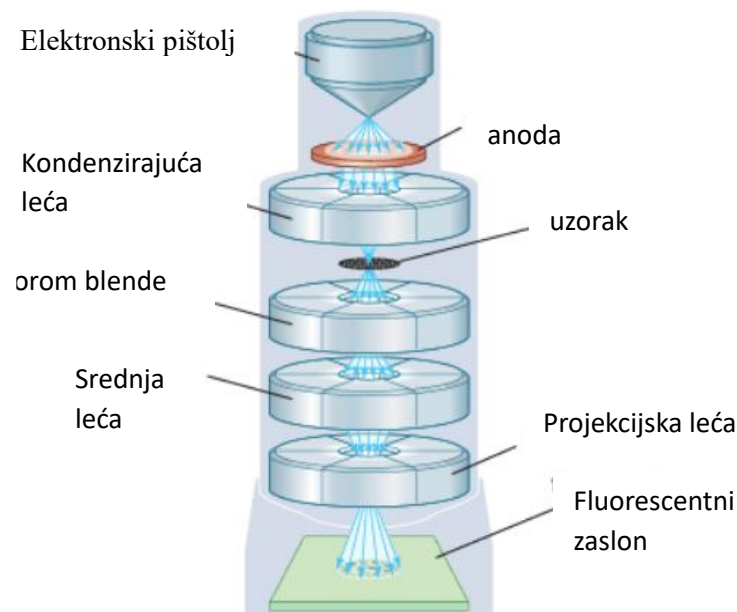
gdje je  $n$  indeks loma medija u kojem leća radi, a  $\alpha$  je maksimalni polukut konusa svjetlosti koji može ući u leću.

Elektroni imaju i valna i čestična svojstva, a njihova valna svojstva znače da se snop elektrona može fokusirati i difraktirati poput svjetlosti. Valna duljina elektrona povezana je s njihovom kinetičkom energijom preko de Broglieove jednadžbe, koja kaže da je valna duljina obrnuto proporcionalna količini gibanja. Uzimajući u obzir relativistički pristup (u TEMu brzina elektrona značajan je udio brzine svjetlosti  $c$ ), valna duljina je:

$$\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2m_0E\left(1 + \frac{E}{2m_0c^2}\right)}} \quad (4)$$

gdje je  $h$  Planckova konstanta ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  J s),  $m_0$  je masa elektrona u mirovanju, a  $E$  je kinetička energija ubrzanog elektrona.

Elektroni se obično generiraju u elektronskom mikroskopu procesom poznatim kao termoemisija iz žarne niti, obično volframove, na isti način kao i kod žarulje, ili alternativno poljem elektronske emisije. Elektroni se zatim ubrzavaju električnim potencijalom (mjenim u voltima) i fokusiraju elektrostatičkim i elektromagnetskim lećama na uzorak. Odsalani snop sadrži informacije o gustoći elektrona, fazi i periodičnosti. Također ova zraka se koristi za formiranje slike. Shema TEM uređaja dana je na Slici 10. [19]



*Slika 10 Shema TEM uređaja [19]*

Dijelovi TEM uređaja su:

- Izvor elektrona: elektronski pištolj; emitira elektrone.
- Kondenzatorske leće: fokusiraju snop elektrona prije udara u uzorak.
- Nosač uzorka i uzorak.



### 1.4.3. ELEKTROKEMIJSKE TEHNIKE - Elektrokemijska impedancijska spektroskopija

Elektrokemijske tehnike skup su analitičkih tehnika koje se koriste za proučavanje kemijskih reakcija koje uključuju prijenos elektrona, mjerenje električnih svojstava ili kontrolu kemijskih reakcija uz pomoć električne struje. Te metode su ključne u analizi i karakterizaciji materijala, istraživanju reakcijskih mehanizama, te razvoju novih tehnologija poput baterija, senzora i korozivskih sustava. [20]

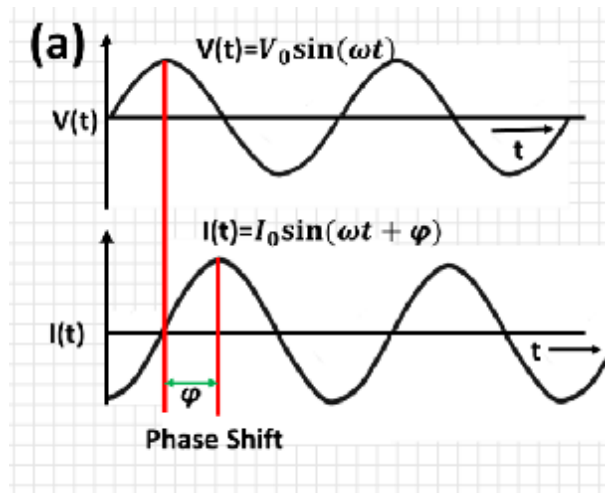
Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS) nedestruktivna je tehnika za karakterizaciju elektrokemijskih sustava. EIS pruža precizne informacije o kinetici i mehanizmima procesa, te se koristi u istraživanju korozije, baterija, poluvodiča, elektroplatinga i elektroorganskih sinteza. Također se primjenjuje za karakterizaciju materijala i kontrolu rada elektrokemijskih uređaja, poput gorivih članaka i senzora. EIS metoda omogućuje određivanje površinskih parametara kao što su brzina reakcije, kapacitet, vodljivost, dielektrična konstanta, te drugi ključni parametri koji utječu na performanse i stabilnost sustava. [20,21]

Osnovno načelo impedancijske spektroskopije je primjena sinusoidnog signala u obliku električnog napona ili struje, ovisno o vrsti uzorka, te praćenje odgovarajuće izlazne struje ili naponskog odziva pri različitim frekvencijama. Ova metoda također može uključivati promjene uvjeta, poput temperature ili prenapona. Otpor elektrokemijske ćelije definira se kao omjer napona i struje. Uobičajeno je da se sinusni izmjenični napon primijeni na elektrokemijsku ćeliju, a mjerenjem struje koja prolazi kroz ćeliju može se odrediti elektrokemijska impedancija ( $Z$ ).

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} \quad (5)$$

Obično se na ulazu primjenjuje izmjenični napon ( $V$ ), a zatim se mjeri odgovarajuća izlazna izmjenična struja ili obrnuto, kako bi se odredila impedancija sustava. Sinusoidalni izmjenični naponi i struje prikazani su na slici 11. Ulazni izmjenični napon primijenjen na sustav može se opisati kao:

$$V(t) = V_0 \sin(\omega t) \quad (6)$$



Slika 11 Sinusoidalna izmjenična struja i naponi (sinusoidalni strujni i naponski odziv u linearnom električnom sustavu) [20]

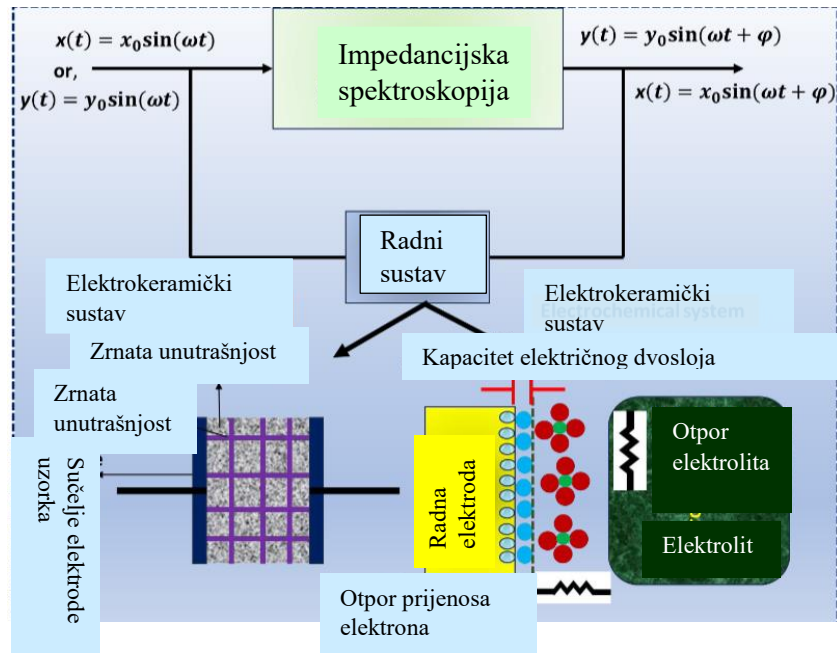
Odgovarajuća izlazna izmjenična struja s istom kutnom frekvencijom ( $\omega$ ) i dodatnom fazom ( $\varphi$ ) dana je izrazom:

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (7)$$

EIS se bazira na principu prijenosne funkcije, omjera vremenske funkcije „odgovora“ i „pobude“ nekog sustava kao što je onaj zadan u jednadžbi 5.

$$H(s) = \frac{L(u(t))}{L(x(t))} = \frac{U(s)}{X(s)} \quad (8)$$

EIS mjeri odziv sustava na niskoamplitudni sinusni pobudni signal, a prati odzivni sinusni (strujni ili potencijalni) signal. Samo mjerenje mora zadovoljiti linearnost, stabilnost, uzročnost, itd. Shematski prikaz radnog sustava elektrokemijske impedancijske spektroskopije prikazan je na slici 12.



Slika 12 Shematski prikaz radnog sustava elektrokemijske impedancijske spektroskopije [21]

Međudjelovanje materijal - elektroda u ćeliji ovisi o koncentraciji elektroaktivnih vrsta, prijenosu mase na površinu elektrode (konstantan otpor elektrolita) i elektrona. Spomenute značajke karakterizira električni krug sastavljen od kondenzatora, otpora i konstantno faznog elementa koji se mogu spojiti serijski ili paralelno za formiranje ekvivalentnog kruga.

Mali signal pobude koristi se za mjerenja odziva, a elektrokemijski odgovor ćelije je fazni pomak. Signal pobude je funkcija vremena:

$$E_t = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (9)$$

gdje je  $E_t$  potencijal u trenutku  $t$ ,  $E_0$  amplituda signala, a  $\omega$  radijalna frekvencija. Poveznica između radijalne ( $\omega$ ) i primijenjene ( $f$ ) frekvencije jest:

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot f \quad (10)$$

U linearnom sustavu signal je pomaknut u fazi ( $\Phi$ ) i amplituda se razlikuje od  $I_0$  te glasi:

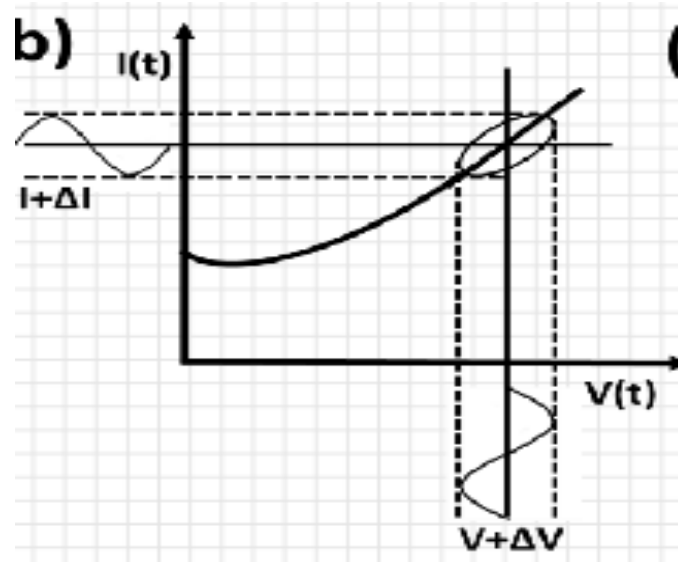
$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \Phi) \quad (11)$$

Impedancija cjelokupnog sustava dana je jednadžbom:

$$Z = E/I = Z_0 \exp(i\Phi) = Z_0 (\cos\Phi + i\sin\Phi) \quad (12)$$

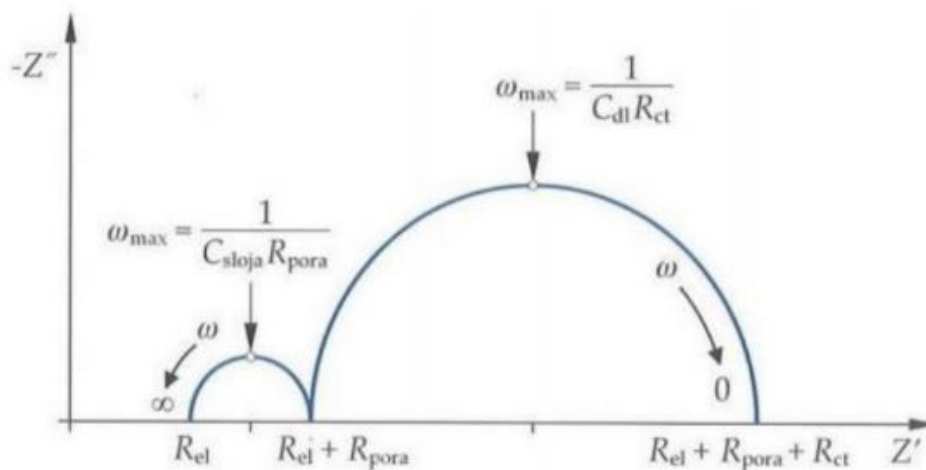
gdje je  $Z$  impedancija,  $E$  potencijal,  $I$  struja,  $\omega$  frekvencija,  $\Phi$  fazni pomak. Ako se u koordinatnom sustavu na x-os crta primijenjeni sinusoidni signal, a na y-os signal sinusoidnog

odgovora, dobije se „Lissajousov dijagram“ (Slika 13). Nekada je to bio jedini način mjerenja impedancije. [22]



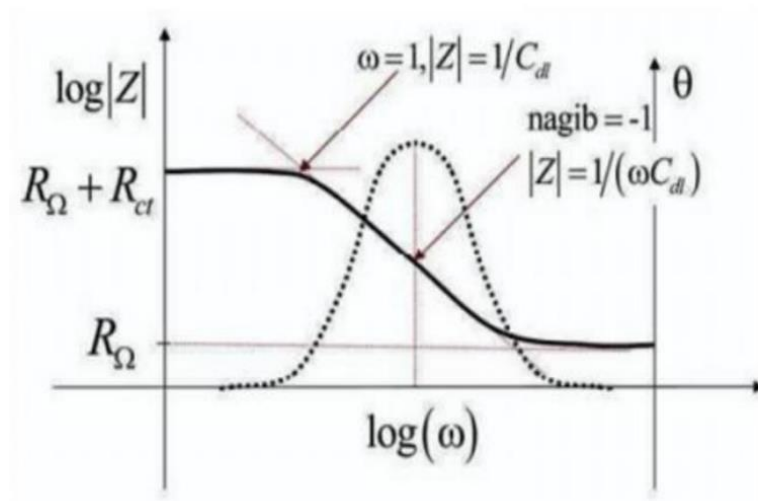
Slika 13 Lissajousov dijagram [22]

Rezultati dobiveni EIS-om prikazuju se Nyquistovim (Slika 14) i Bodeovim (Slika 15) dijagramom. Nyquistov dijagram predstavlja ovisnost imaginarne komponente impedancije o realnoj komponenti za svaku pobudnu frekvenciju.



Slika 14 Nyquistov dijagram [22]

Na Nyquistovom dijagramu odgovor sustava je polukružna kapacitivna petlja zbog prisutnosti jednog kondenzatora u Randlesovom strujnom krugu koji ga opisuje. Otpor elektrolita je vidljiv na najvišim frekvencijama gdje polukrug siječe realnu os impedancije, dok zbroj polarizacijskog otpora i otpora elektrolita odgovara sjecištu realne impedancijske osi za najnižu frekvenciju. Promjer polukruga odgovara polarizacijskom otporu. [22]



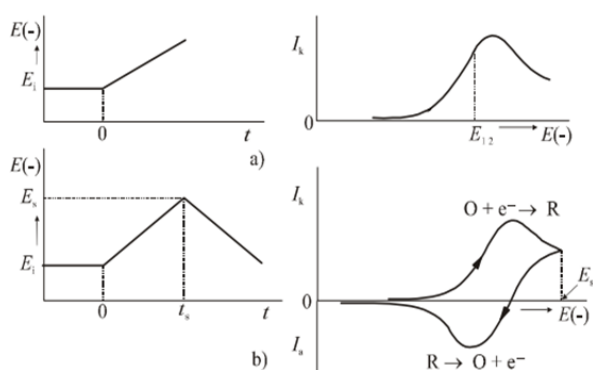
Slika 15 Bodeov dijagram [22]

#### 1.4.4. VOLTAMETRIJSKE TEHNIKE - Ciklička voltometrija

Voltametrijske tehnike spadaju u skupinu elektroanalitičkih postupaka u kojima je signal pobude električni napon. Voltometrija uključuje grupu elektrokemijskih metoda u kojoj informaciju o količini i vrsti analita saznajemo mjerenjem struje kao funkcije potencijala narinutog na elektrodu. [23]

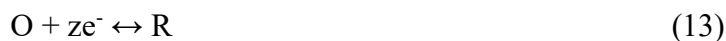
Voltometrija nosi naziv po skraćenici od pojma „volt-amper-metrija“; struja je prikazana kao funkcija narinutog napona. Oblik amplitude i vremenska ovisnost mogu se razlikovati kod nekog signala pobude. Voltamogram (Slika 16) grafički je prikaz signala odziva voltametrije. [24]

Ciklička voltometrija koristi se kao kvantitativna analiza za određivanje redoks potencijala različitih organskih i anorganskih tvari, s ciljem određivanja mehanizama kao i same kinetike reakcije. Instrument se sastoji od nekoliko osnovnih dijelova: potenciostat, računalo i elektrokemijski članak. Na potenciostatu se narine željeni potencijal te se mjeri jakost struje. [26]



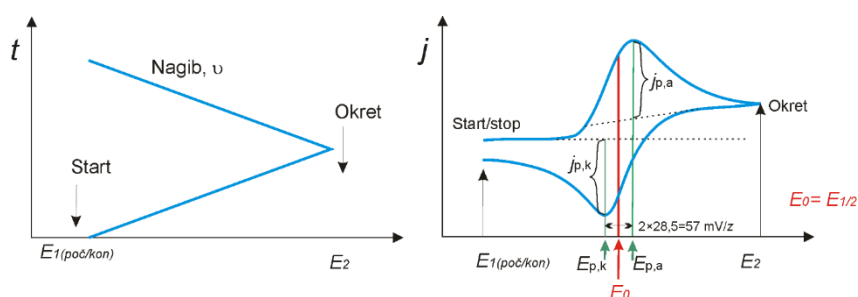
Slika 16 Signali pobude i odziva; voltametrije (a) i cikličke voltametrije (b). [24]

U cikličkoj voltametriji smjer signala pobude mijenja se tijekom mjerenja. Početni napon je negativan, a zatim postaje pozitivan nakon postizanja određenog potencijala ( $E_s$ ). Promjene potencijala, posmici, linearni su u oba smjera. Tijekom početne promjene potencijala, struja unutar elektrokemijske ćelije je katodna i odgovara redukcijskoj struji, sličnog oblika kao u standardnoj voltametriji. Elektrokemijski reverzibilna elektrodna reakcija redukcije može se opisati kao u jednadžbi 13:



Ovaj prikaz odnosi se na prijelaz oksidiranog oblika (O) u reducirani oblik (R) i obrnuto, ovisno o smjeru primijenjenog potencijala.

Na početku promjene smjera signala pobude, proces redukcije oksidiranog oblika (O) u reducirani oblik (R) se još uvijek odvija jer je potencijal elektrode znatno negativniji od formalnog potencijala sustava. Daljnjim povećanjem pozitivnog potencijala, potencijal elektrode približava se formalnom elektrodnom potencijalu redoks sustava. To dovodi do početka procesa oksidacije reduciranog oblika (R) koji je nastao tijekom redukcije. Tada se pojavljuje anodna struja, odnosno struja oksidacije. Struja ćelije je tada razlika između katodne (pozitivne) struje redukcije elektroreduktanda (O) i anodne (negativne) struje oksidacije elektrooksidanda (R). Mjerena struja, ili struja ćelije, predstavlja razliku između katodne i anodne struje na radnoj elektrodi. Kako potencijal elektrode postaje sve pozitivniji, struja redukcije opada, dok struja oksidacije raste, što uzrokuje da struja ćelije postane anodna. Pri određenom potencijalu, anodna struja dostiže svoju maksimalnu vrijednost. Daljnjim povećanjem potencijala, struja oksidacije kontinuirano opada zbog iscrpljivanja reduciranih vrsta (R) u otopini uz površinu elektrode. Postupno, struja ćelije opada na razinu osnovne struje. Grafički prikaz odziva cikličke voltametrije naziva se ciklički voltamogram. [24]



Slika 17 Reverzibilni ciklički voltamogram redoks para; pobuda (lijevo) i odziv (desno) elektrokemijskog sustava [24]

Karakteristične vrijednosti u voltametrijskom odzivu su potencijali katodnog i anodnog vrha ( $E_{p,k}$  i  $E_{p,a}$ ), visine strujnih odziva katodnog i anodnog vrha ( $j_{p,k}$  i  $j_{p,a}$ ), te razlika potencijala strujnih odziva ( $\Delta E_p$ ). Kod reverzibilne reakcije, brzina prijenosa naboja je dovoljno brza da koncentracije [O] i [R] slijede Nernstovu jednadžbu. U tom slučaju, struja ovisi o brzini difuzije reaktanta [O] prema površini elektrode i produkta [R] od elektrode prema otopini. U početku promjene potencijala, voltamogram pokazuje ravnu liniju, što ukazuje na polarizaciju elektrode

bez elektrodne reakcije. Kada se potencijal dovoljno promijeni da izazove elektrodnu reakciju, struja raste i formira anodni vrh, zatim se smanjuje zbog iscrpljivanja elektroaktivne vrste uz površinu elektrode. Postupno smanjenje struje odziva prikazuje se na voltamogramu (Slika 17). [24]

#### 1.4.5. Diferencijalna pulsna voltametrij (DPV)

Diferencijalna pulsna voltametrij potenciostatska je metoda koja nudi neke prednosti naspram uobičajenih tehnika kao što je ciklička voltametrij u tome što odziv vala serijski vezanih impulsa raste duž linearne osnovne linije. Način na koji se mjeri struja pri svakom impulsu pomaže u nuliranju pozadinske struje (struje punjenja). [26]

Razmotrimo reakciju:



gdje se O reducira u jednom koraku do R. Pri vrijednostima potencijala koje su dovoljno pozitivne u odnosu na  $E^0$ , ne teče struja prije skoka potencijala (do negativnije vrijednosti). Primjena skoka potencijala ne uzrokuje značajno povećanje struje; stoga je diferencijal vrlo nizak. Pri vrijednostima potencijala koje su značajno negativne u odnosu na  $E^0$ , osnovni potencijal smanjuje koncentraciju (O) maksimalnom brzinom. Primjena nižeg skoka potencijala (kao što je prema negativnijim vrijednostima) malo je vjerojatno da će povećati brzinu redukcije; stoga je diferencijalna struja ponovno mala. Samo pri potencijalima oko vrijednosti  $E^0$  diferencijalna struja će biti značajna. U razdoblju tijekom primjene osnovnog potencijala, (O) se reducira određenom brzinom. Potencijalni skok (do negativnije vrijednosti) povećava brzinu redukcije i stoga će diferencijalna struja biti značajna. U normalnim uvjetima (visina impulsa < 100 mV) visina vrha može se izraziti formulom:

$$(\delta t)_{max} = \frac{nFA D o^{\frac{1}{2}} c_0^*}{\pi^{\frac{1}{2}} (\tau - \tau')} \left( \frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right) \quad (15)$$

gdje je  $n$  broj elektrona,  $F$  je Faradayeva konstanta (96485 C/mol),  $A$  je površina elektrode (u  $cm^2$ ),  $D$  je koeficijent difuzije (u  $cm^2/s$ ),  $c_0^*$  je koncentracija elektroaktivne vrste (u  $mol/cm^3$ ), a  $\sigma$  je dan izrazom:

$$\sigma = \left( \frac{nF \Delta E}{RF} \right) \quad (16)$$



gdje je  $E$  visina pulsa,  $T$  je temperatura (K), a  $R$  je univerzalna plinska konstanta (8,314 J/molK). [26]

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Priprava otopina

#### *Suspenzija Co(II) kompleksa*

3 mg koordinacijskog spoja  $\text{Co(II), Co(1,2-bpe)}_2(\text{H}_2\text{O})_2[(6\text{-NH}_2\text{nic})(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}]_n$  uz sonikaciju dispergirano je u  $300\mu\text{L}$   $N,N$ -dimetilformamida (DMF).

#### *Adrenalin, AD*

Korištena je 1 mM otopina DL-adrenalin hidroklorid koja je pripravljena tako što je odvagano 2,2 mg adrenalina, prebačeno u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeno do oznake destiliranom vodom.

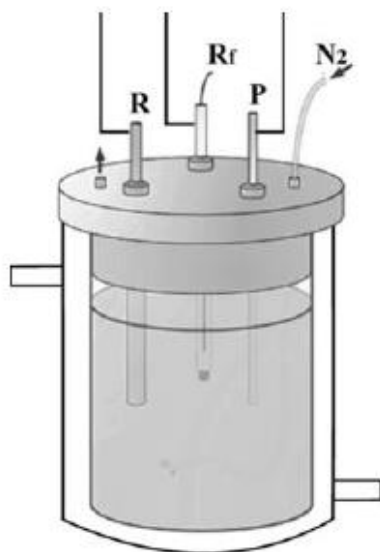
#### *Fosfatni pufer pH 7,4 (PBS)*

Korištena je 0,2 M otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,4 (na 100 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH= 4.5 dodano je 45 mL 0,2 M NaOH).

### 2.2. Aparatura

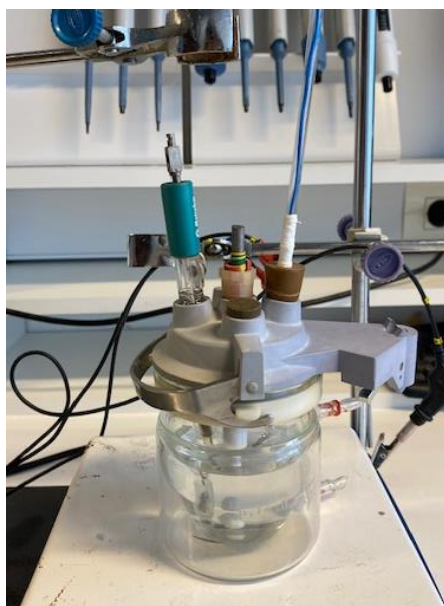
#### 2.2.1. Uredaj za elektrokemijska mjerenja

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su potencijostatom (Autolab PGSTAT 302N) povezanom s osobnim računalom (PC), kojim se upravlja putem softvera GPES 4.9 (Eco Chemie). Za elektrokemijska mjerenja korištena je troelektrodna elektrokemijska ćelija (Slika 18) prikazana. Oznaka R predstavlja radnu,  $R_f$  referentnu, a P protuelektrodu. Prije upotrebe, ćelija je ispirana redom konc. dušičnom kiselinom, vodovodnom vodom, destiliranom vodom te malom količinom korištenog osnovnog elektrolita.



*Slika 18 Troelektrodna ćelija*

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika. Kao protuelektroda korištena je platinasta žica koja je prije svakog mjerenja isprana konc.  $\text{HNO}_3$ . Za referentnu elektrodu korištena je Ag/AgCl elektroda, tzv. srebro/srebrov(I) klorid elektroda koja je ispirana vodovodnom i destiliranom vodom prije svakog mjerenja (Slika 19).



*Slika 19 Prikaz aparature za elektrokemijska mjerenja*

### 2.3. Priprava radne elektrode

Radna elektroda od staklastog ugljika (GCE - *glassy carbon electrode*) je valjak, s bazom geometrijske površine  $0,126 \text{ cm}^2$ , u tijelu od teflona. Prije svakog mjerenja GCE elektroda priprema se na sljedeći način:

- a) Mehanički - brušenje papirima propisane finoće (1200, 1500, 3000) kružnim pokretima uz vlaženje vodom  
Poliranje - pasta aluminijevog(III) oksida  $1 \mu\text{m}$  te  $0,05 \mu\text{m}$
- b) Odmašćivanje - etanol (96%) u ultrazvučnoj kupelji 3 minute

### 2.4. Priprava modificirane elektrode

Kako je navedeno u prethodnom odlomku, na pripremljenu GCEnanosi se suspenzija kompleksa. Suspenzija je pripremljena dispergiranjem 3 mg koordinacijskog spoja  $\text{Co(II), Co(1,2-bpe)}_2(\text{H}_2\text{O})_2[(6\text{-NH}_2\text{nic})(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}]_n$  u  $300 \mu\text{L}$  *N,N*-dimetilformamida (DMF) u ultrazvučnoj kupelji. Tako pripravljena suspenzija, nanosena je poluautomatskom pipetom ( $20 \mu\text{L}$ ) na površinu GCE kako je prikazano na Slici 20 te je sušena u sušioniku 30 minuta na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

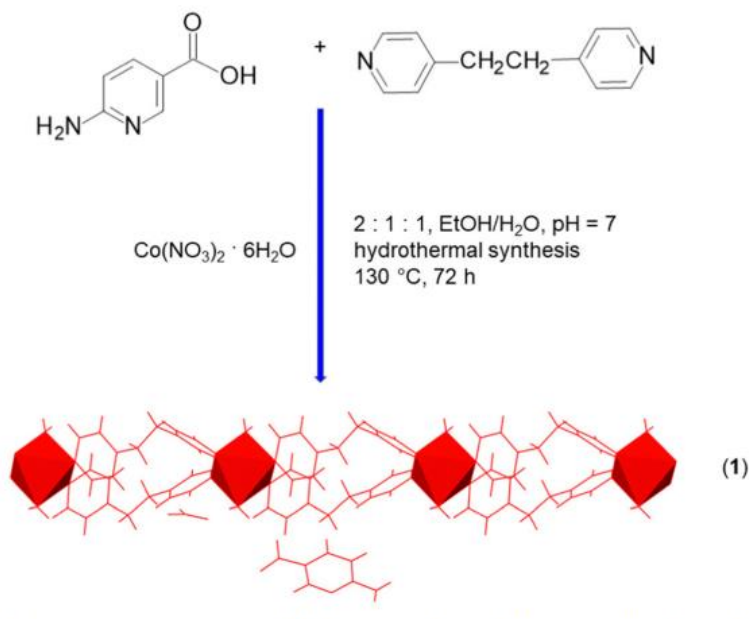


*Slika 20 Proces nanošenja kompleksa na GCE*

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

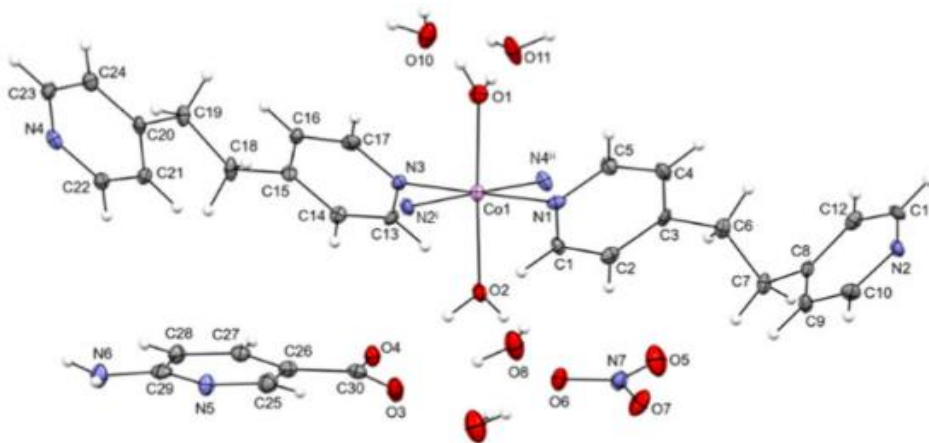
#### 3.1. Karakterizacija koordinacijskog spoja Co(II)

Koordinacijski spoj  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Co(1,2-bpe)}_2(\text{H}_2\text{O})_2[(6\text{-NH}_2\text{nic})(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}]_n$  može se pripremiti samo u hidrotermalnim uvjetima (Slika 21), jer reakcijom pri normalnom tlaku i sobnoj temperaturi nastaju kristali liganda.



Slika 21 Priprava koordinacijskog spoja Co(II) u hidrotermalnim uvjetima [28]

Asimetrična jedinica spoja sadrži ion kobalta(II), dva koordinirana liganda 1,2-bis(4-piridil)etana, dvije koordinirane molekule vode, 6-aminonikotinatni anion, nitratni ion i četiri kristalno vezane molekule vode (Slika 22).

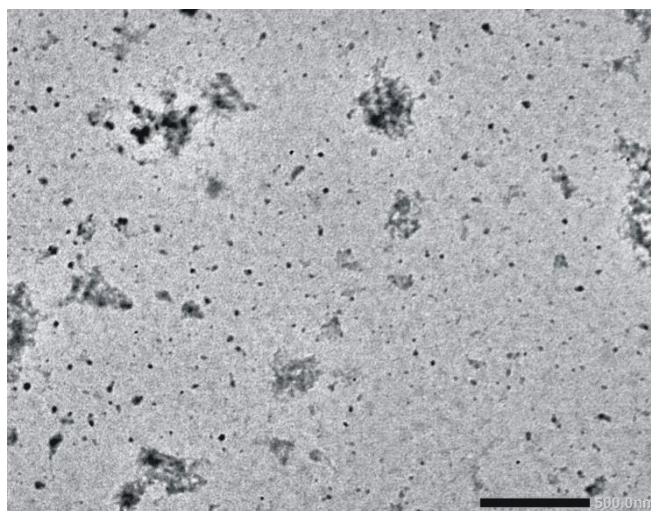


Slika 22 ORTEP prikaz  $\{[Co(1,2-bpe)_2(H_2O)_2](6-NH_2nic)(NO_3) \times 4H_2O\}_n$ , s označenom shemom atomskog broja (kodovi simetrije (i):  $x, y - 1, z$  i (ii):  $x, y + 1, z$ ). Toplinski elipsoidi nacrtani su za 50% razinu vjerojatnosti pri 100(2) K, a vodikovi atomi prikazani su kao sfere proizvoljnih radijusa. [28]

Ion kobalta(II) u  $\{[Co(1,2-bpe)_2(H_2O)_2]^{2+}\}_n$  kationu oktaedarski je koordiniran putem N1, N2<sup>i</sup>, N3 i N4<sup>ii</sup> atoma piridina iz zasebnih liganda 1,2-bis(4-piridil)etanskih liganada (kodovi simetrije (i):  $x, y - 1, z$  i (ii):  $x, y + 1, z$ ) te dvama kisikovim atomima molekula vode (O1 i O2) u trans položaju ( $O1-Co1-O2 = 177,6(1)^\circ$ ).

### 3.2. TEM analiza

Za morfološku karakterizaciju GCE modificirane koordinacijskim spojem Co(II),  $Co(1,2-bpe)_2(H_2O)_2[(6-NH_2nic)(NO_3)_4H_2O]_n$  korištena je transmisivska elektronska mikroskopija, TEM. (Slika 23)

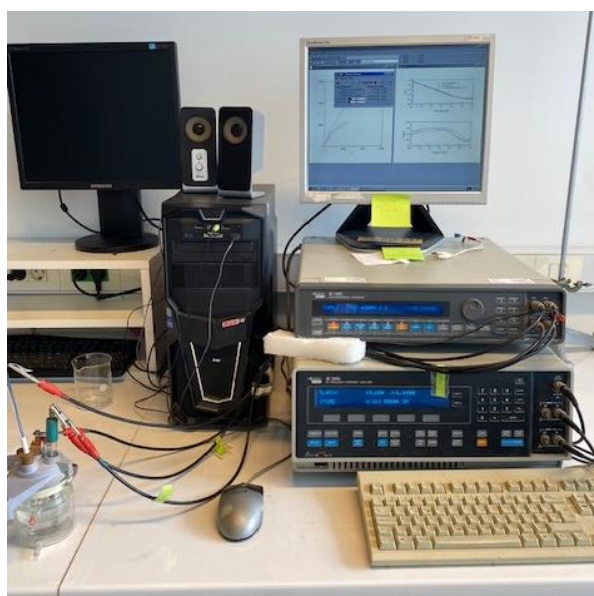


Slika 23 Morfološki prikaz modificirane GCE

Kao što je prikazano na Slici 23, čestice kompleksnog spoja Co(II) su voluminozne i uniformno aglomerirane, što rezultira jednoličnom površinom modificirane GCE.

### 3.3. Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS)

Mjerenja elektrokemijske impedancijske spektroskopije provedena su pomoću Solartron SI 1287 sučelja i Solartron SI 1255 analizatora frekvencijskog odziva (Slika 24).

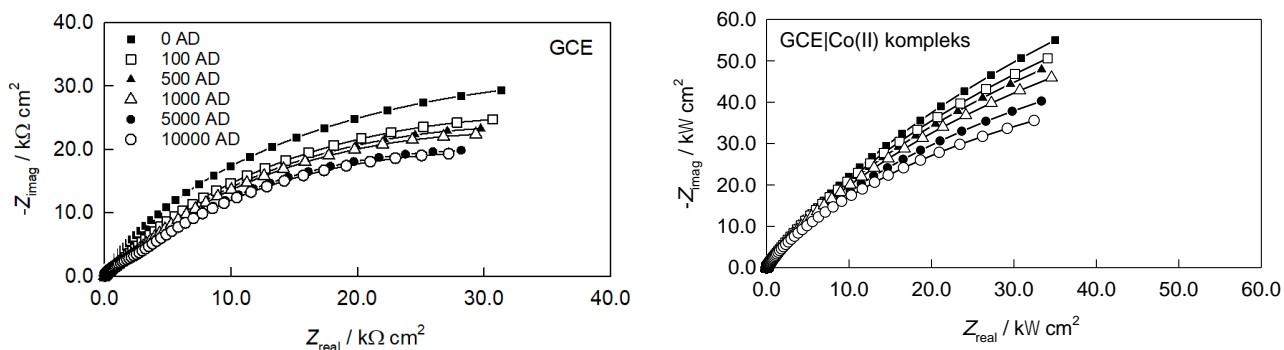


*Slika 23 Potenciostat/galvanostat „Solartron SI 1287“*

EIS mjerenja nemođificirane i Co(II) spojem modificirane GCE su provedena u frekvencijskom području od 0,1 do 100 000 Hz na potencijalu otvorenog strujnog kruga ( $E_{ocp}$ ). Rezultati su prikazani u obliku Nyquistovog dijagrama u kojem se može uočiti da se povećanjem koncentracije adrenalina smanjuje promjer kapacitivnog polukruga ).

Iz Nyquistovog prikaza (Slika 25- lijevo) vidljivo je opadanje promjera kapacitivnog polukruga povećanjem koncentracije adrenalina dodanog u osnovni elektrolit. To upućuje na činjenicu da dolazi do smanjenja ukupne impedancije odnosno polarizacijskog otpora nemođificirane GCE i da je reakcija oksidacije adrenalina olakšana (katalizirana). Na Slici 25-desno prikazan je impedancijski spektar GCE modificirane Co(II) kompleksom. Kao i kod lijevog Nyquistovog dijagrama, porastom koncentracije adrenalina vidljivo je smanjenje promjera kapacitivnog polukruga. Također u ovom slučaju EIS podaci su usklađivani drugim elementa ekvivalentnog električnog kruga (EEK) (Tablica 3b). Budući kako povećanje koncentracije adrenalina

značajno utječe na impedancijski odziv GCE modificirane Co(II) kompleksom odnosno na njene elektrokemijske karakteristike elektrode, može se pretpostaviti da na površini elektrode dolazi do formiranja kompleksa Co(II) i adrenalina.

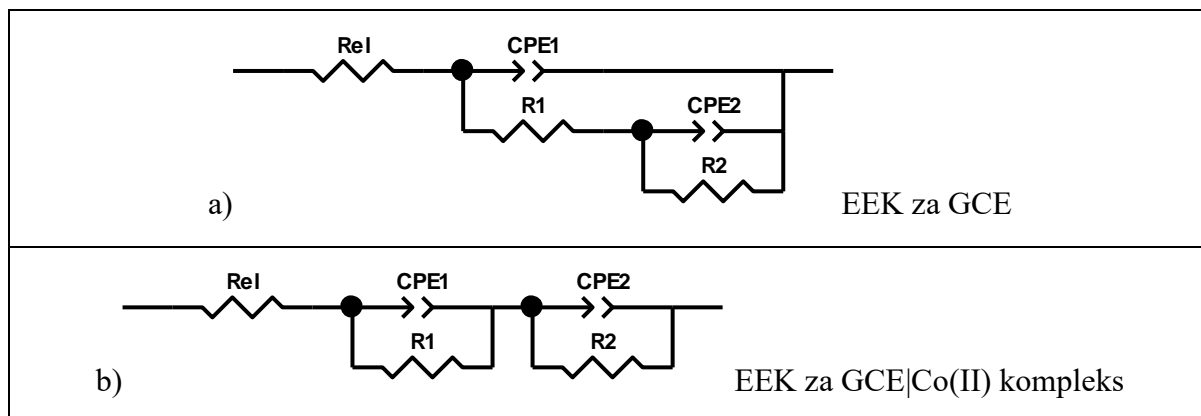


Slika 24 Nyquistov dijagram impedancijskog spektra nemodificirane GCE (lijevo) i Co(II) kompleksom modificirane GCE (desno) u 0,2 M PBS pH 7,4

U Tablici 3. dani su ekvivalentni električni krugovi korišteni za modeliranje impedancijskog odgovora istraživanih elektroda. Cilj je bio usporediti odziv različito pripremljene GCE na porast koncentracije adrenalina, kako bi se procijenila učinkovitost modifikacije na kinetiku reakcije oksidacije adrenalina.

EEK sadrže dva konstantno fazna elementa ( $CPE_1$  i  $CPE_2$ ), te otpornike ( $R_1$  i  $R_2$ ) koji predstavljaju različite komponente otpora u sustavu.  $R_{el}$  predstavlja otpor elektrolita.

Tablica 3. Ekvivalentni električni krugovi korišteni za EIS analizu



Tablica 4. pokazuje kako se pripadajuće vrijednosti elemenata ekvivalentnog električnog kruga (EEK) odnosno parametri poput otpora ( $R$ ) i kapacitivnosti ( $Q_1$  i  $Q_2$ ) mijenjaju s porastom

koncentracije adrenalina ( $AD$ ). Promjene u vrijednostima otpora ( $R_1$ ,  $R_2$ ) i kapacitivnih elemenata ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ) mogu ukazivati na promjene na površini elektrode, na nakupljanje slojeva ili na druge kemijske ili fizikalne procese koji utječu na impedancijski odgovor ispitivane elektrode. Zaključno, iz tablice jest zapaženo da porastom koncentracije opada  $R_2$ .

Tablica 4. Parametri ekvivalentnog kruga dobiveni usklađivanjem za nemodificiranu GCE u 0,2 M PBS pH 7,4

| $R_{el}/\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $10^5 \times Q_1/\Omega^{-1}$<br>cm <sup>-2</sup> s <sup>n</sup> | $n_1$ | $R_1/\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $10^6 \times Q_2/\Omega^{-1}$<br>cm <sup>-2</sup> s <sup>n</sup> | $n_2$ | $R_2/k\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $V(AD)/\mu L$ |
|------------------------------------|--|-------|---------------------------------|--|-------|----------------------------------|---------------|
| 11                                 | 1,16   | 0,886 | 6974                            | 9,46   | 0,637 | 314,8                            | 0             |
| 11                                 | 1,21   | 0,886 | 6192                            | 10,11  | 0,624 | 272,9                            | 100           |
| 11                                 | 1,28   | 0,881 | 5323                            | 10,26  | 0,590 | 269,8                            | 500           |
| 11                                 | 1,32   | 0,877 | 7967                            | 10,10  | 0,580 | 225,9                            | 1000          |
| 12                                 | 1,27   | 0,883 | 5002                            | 11,94  | 0,578 | 184,9                            | 5000          |
| 12                                 | 1,30   | 0,881 | 44569                           | 12,99  | 0,558 | 154,4                            | 10000         |

Tablica 5. također prikazuje parametre dobivene usklađivanjem EIS spektara, ali za impedancijski odgovor kobaltovim(II) kompleksom modificirane GCE na povećanje koncentracije adrenalina. Kao i u prethodnom slučaju, porastom koncentracije opada  $R_2$ .

Tablica 5. Parametri ekvivalentnog kruga dobiveni usklađivanjem za kobaltovim(II) kompleksom modificiranu GCE u 0,2 M PBS pH 7,4

| $R_{el}/\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $10^5 \times Q_1/\Omega^{-1}$<br>cm <sup>-2</sup> s <sup>n</sup> | $n_1$ | $R_1/\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $10^5 \times Q_2/\Omega^{-1}$<br>cm <sup>-2</sup> s <sup>n</sup> | $n_2$ | $R_2/k\Omega$<br>cm <sup>2</sup> | $V(AD)/\mu L$ |
|------------------------------------|--|-------|---------------------------------|--|-------|----------------------------------|---------------|
| 9                                  | 17,49  | 1,000 | 1796                            | 2,76   | 0,800 | 80,7                             | 0             |
| 7                                  | 3,27   | 0,848 | 805                             | 2,51   | 0,793 | 69,8                             | 100           |
| 7                                  | 3,05   | 0,832 | 1327                            | 2,63   | 0,798 | 64,9                             | 500           |
| 7                                  | 2,73   | 0,836 | 1570                            | 2,68   | 0,800 | 61,9                             | 1000          |
| 8                                  | 2,08   | 0,851 | 1576                            | 2,75   | 0,772 | 57,3                             | 5000          |
| 8                                  | 2,75   | 0,902 | 1580                            | 2,87   | 0,759 | 57,2                             | 10000         |



### 3.4. UV-Vis-NIR spektroskopija

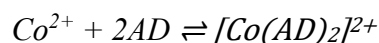
U kivetu je stavljeno  $400\mu\text{L}$  DMF i  $100\mu\text{L}$  suspenzije koja je pripravljena tako da je 3 mg koordinacijskog spoja  $\text{Co(II)}, \text{Co(1,2-bpe)}_2(\text{H}_2\text{O})_2[(6\text{-NH}_2\text{nic})(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}]_n$  dispergirano u  $300\mu\text{L}$  *N,N*-dimetilformamida (DMF). U kivetu je zatim u obrocima dodavana 1 mM otopina adrenalina do ukupnog volumena od 3 mL te je pri fiksnoj valnoj duljini od 350 nm snimana apsorbanacija. Na slici 25 prikazan je grafički prikaz ovisnosti apsorbanacije o molnom omjeru reaktanata. Iz sjecišta pravaca vidljivo je da je omjer 1 : 2 (jedan Co(II) iz Co(II) kompleksa na dvije molekule adrenalina).

Proračun:

Sjecište dvaju pravaca:

$$x = \frac{c_L}{c_m} \approx 2$$

$$c(\text{Co(II)komp}) : c(\text{AD}) = 1 : 2$$



- Kod  $A_{\max}$  sav  $\text{Co}^{2+}$  je ušao u novi kompleks

$$A(\text{u sjecištu}) = 1.05214$$

$$c(\text{očitano}) = 4.73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

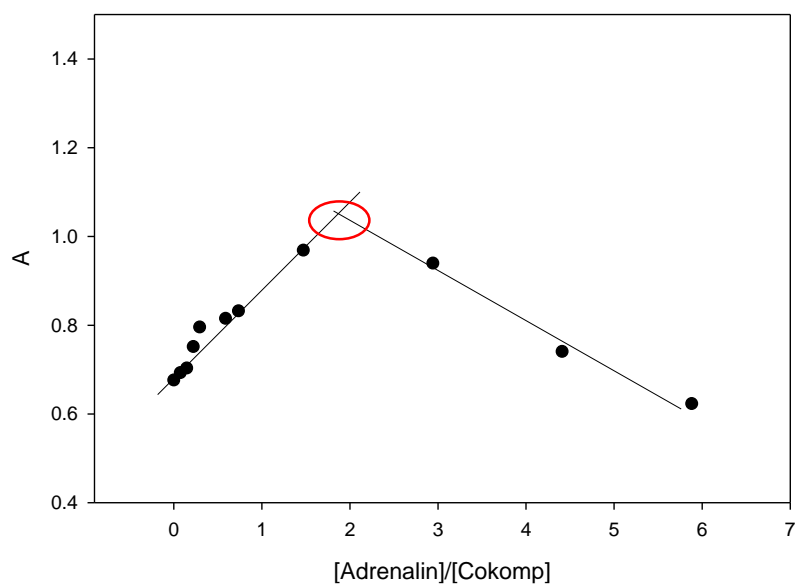
$$[\text{Co}(\text{AD})_2]^{2+} = \frac{A}{b \cdot \epsilon} = 4.73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$[\text{Co}^{2+}] = 0.0272 - 4.73 \cdot 10^{-4} = 0.02673 \text{ M}$$

$$K_f = \frac{[\text{Co}(\text{AD})_2]^{2+}}{[\text{Co}^{2+}][\text{AD}]^2} \quad [\text{AD}] = 1.6 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 4.73 \cdot 10^{-4} = 6.54 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$K_f = \frac{4.73 \cdot 10^{-4}}{0.02673 \cdot (6.54 \cdot 10^{-4})^2} = 41372.02 \text{ M}^{-2}$$

Graf pokazuje da do sjecišta apsorbanacija linearno raste, što ukazuje na stvaranje kompleksa između adrenalina i Co(II) iz Co(II) kompleksa. Nakon sjecišta, apsorbanacija opada što znači da se u toj točki postiglo najveće zasićenje veznih mjesta na kobalt(II) ionu. Daljnje dodavanje adrenalina ne dovodi do formiranja kompleksa, nego može izazvati promjene u otopini ili smanjiti stabilnost formiranog kompleksa.



Slika 25 Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o molnom omjeru reaktanata

Podaci prikazani u Tablici 6. predstavljaju apsorpciju pri 350 nm za različite koncentracije adrenalina dodane u sustav, što odgovara prethodno prikazanom grafu za UV-Vis analizu interakcije adrenalina i kobalta(II) iz Co(II) kompleksa.

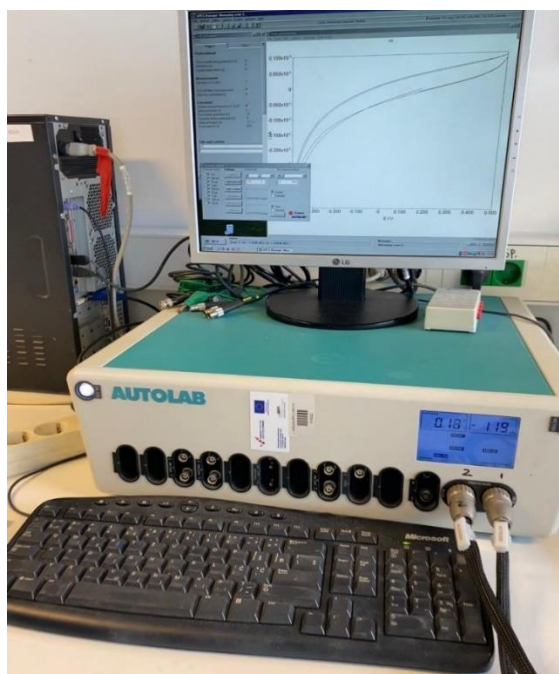
Tablica 6. Apsorpcija pri 350 nm za različite koncentracije adrenalina dodane u sustav (DMF + suspenzija Co(II) kompleksa u DMFu)

| $A$     | $c(\text{AD})/\text{M}$ |
|---------|-------------------------|
| 0,6762  | 0                       |
| 0,69318 | $2 \times 10^{-5}$      |
| 0,70341 | $4 \times 10^{-5}$      |
| 0,75175 | $6 \times 10^{-5}$      |
| 0,79596 | $8 \times 10^{-5}$      |
| 0,81540 | $1,6 \times 10^{-4}$    |
| 0,83239 | $2 \times 10^{-4}$      |
| 0,96907 | $4 \times 10^{-4}$      |
| 0,93979 | $8 \times 10^{-4}$      |
| 0,74083 | $1,2 \times 10^{-3}$    |
| 0,62316 | $1,6 \times 10^{-3}$    |

Prvi dio tablice (do  $A = 0.83239$ ) prikazuje kako apsorbancija postupno raste s povećanjem koncentracije adrenalina. Ovaj porast apsorbancije odgovara linearnom dijelu grafa do sjecišta što ukazuje na stvaranje kompleksa između kobalta(II) iz kobalt(II) kompleksa i adrenalina. Nakon maksimalne  $A = 0.96907$ , apsorbancija počinje opadati, što sugerira da je postignuto najveće zasićenje veznih mjesta te daljnje dodavanje adrenalina smanjuje stabilnost  $[\text{Co}(\text{AD})_2]^{2+}$  kompleksa, jer se formirani kompleks kobalta(II) i adrenalina raspada.

### 3.5. Elektrokemijska analiza - Ciklička voltametrija

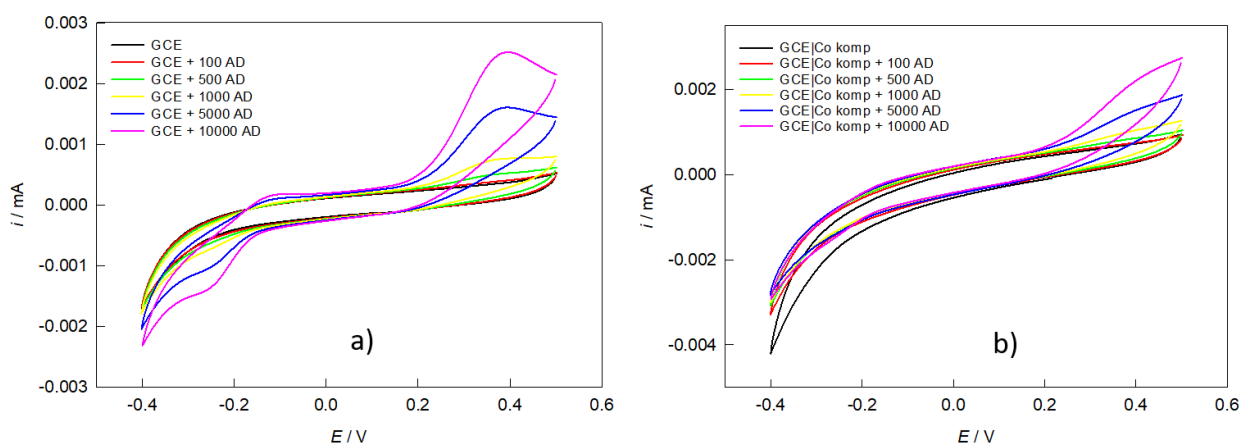
Sva mjerenja cikličke voltametrije provedena su korištenjem standardne troelektrodne ćelije. Aparatura se sastojala od potencijostata (Autolab PGSTAT 302N) spojenog na osobno računalo kojim se upravljalo pomoću GPES 4,9 Softwarea (Eco Chemie, Eco Utrecht, Nizozemska) (Slika 26). Snimljeni su ciklički voltamogrami nemodificirane i kobaltovim(II) kompleksom modificirane GCE s različitim koncentracijama adrenalina ( $0\ \mu\text{M}$  -  $100\ \mu\text{M}$ ) u  $0,2\ \text{M}$  PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) u području potencijala od  $-0,4\ \text{V}$  do  $0,5\ \text{V}$  vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  brzinom promjene potencijala od  $25\ \text{mV s}^{-1}$ . (Slika 27.)



Slika 26 Uređaj za voltametrijska mjerenja

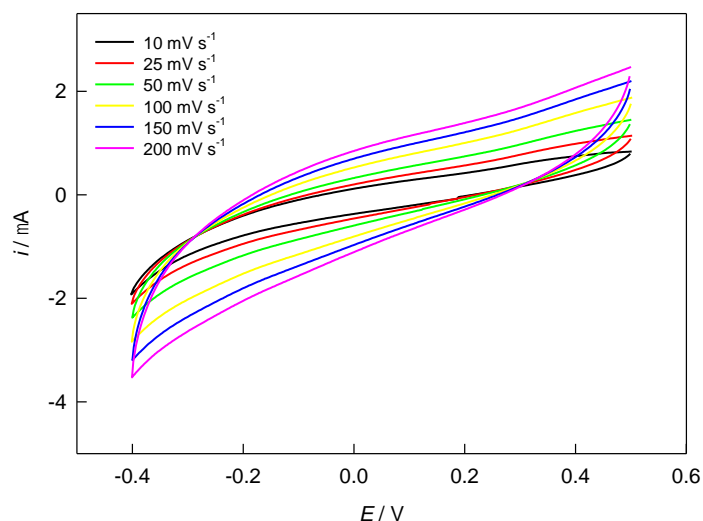
Također strujni maksimumi rastu s povećanjem koncentracije adrenalina. Prisutnost Co(II) kompleksa na površini uzrokuje adsorpciju adrenalina iz otopine i nastanak novog  $[\text{Co}(\text{AD})_2]^{2+}$  kompleksa.

Početak rasta struje koji se pripisuje oksidaciji adrenalina na modificiranoj elektrodi je za približno 20 mV pomaknut anodno u odnosu na nemodificiranu elektrodu. Strujni vrh oksidacije modificirane elektrode nije jasno definiran i sugerira promjenu u kinetici reakcije. Spora kinetika sugerira postojanje kompleksa na površini, odnosno vezanje adrenalina na Co(II) iz kompleksa prisutnog na površini. Sinergija Co(II) iz Co(II) kompleksa i adrenalina također ukazuje na potencijalnu selektivnost kompleksa prema analitu („princip brave i ključa“).



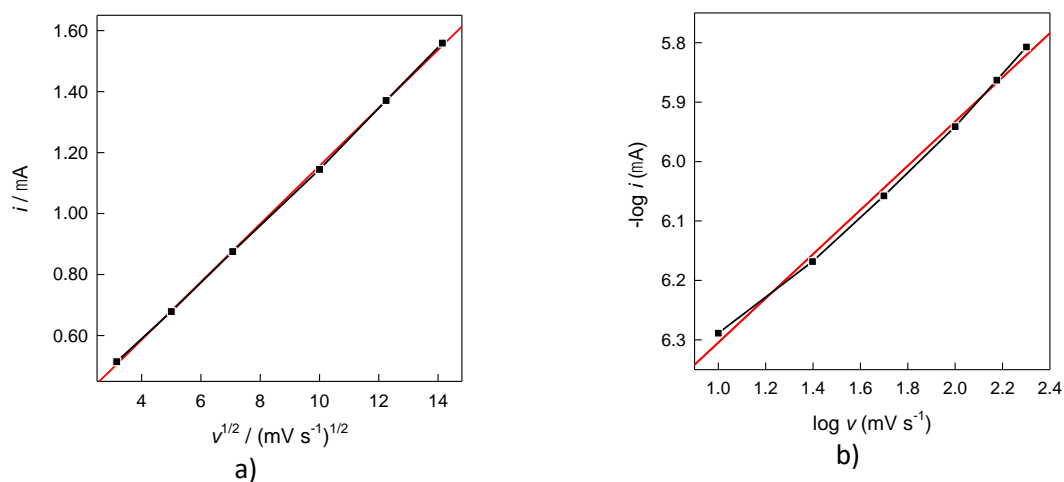
Slika 27 Ciklički voltamogrami snimljeni na GCE (a) i GCE|Cokomp (b) s različitim koncentracijom adrenalina dodanog u osnovni elektrolit. ( $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ )

Zbog procjene procesa koji se odvija na površini elektrode, istražen je utjecaj brzine skeniranja na strujne maksimume. Slika 28 prikazuje odgovor cikličke voltametrije (CV) GCE|Co(II)komp u osnovnom elektrolitu s analitom ( $1 \times 10^{-5} \text{ M AD}$ ) pri različitim brzinama skeniranja. Povećanje brzine skeniranja uzrokuje „širenje“ cikličkog voltamograma usljed porasta katodnih i anodnih gustoća struje.



Slika 28 Ciklički voltamogram GCE|Co(II)komp u osnovnom elektrolitu s analitom ( $1 \times 10^{-5}$  M AD) pri različitim brzinama skeniranja.

Na Slici 29 prikazana je ovisnost gustoće struje zabilježene za 258 mV vs. Ag|AgCl, o kojijenu brzine promjene potencijala. Ovisnost struje o brzini skeniranja može pomoći u određivanju je li proces na elektrodi difuzijski kontroliran odnosno je li brzina elektrokemijske reakcije ograničena brzinom kojom reaktant dolazi do površine elektrode. Na grafu je zapažena linearna ovisnost, što znači da je reakcija difuzijski kontrolirana. Razmatranjem se došlo do zaključka kako pravilno optimiranje parametara diferencijalne pulsne voltametrije možemo iskoristiti za selektivno vezanje adrenalina na Co(II) kompleks i modificiranu elektrodu primijeniti za određivanje koncentracije adrenalina u uzorku.

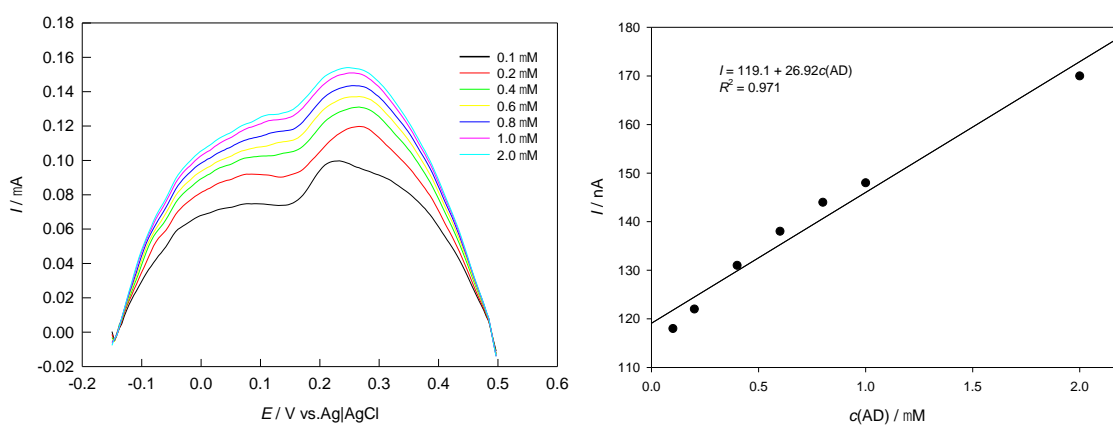


Slika 29. Ovisnost gustoće struje (pri  $E = 258$  mV) o kojijenu brzine promjene potencijala.

$v^{1/2}$

### 3.6. Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV)

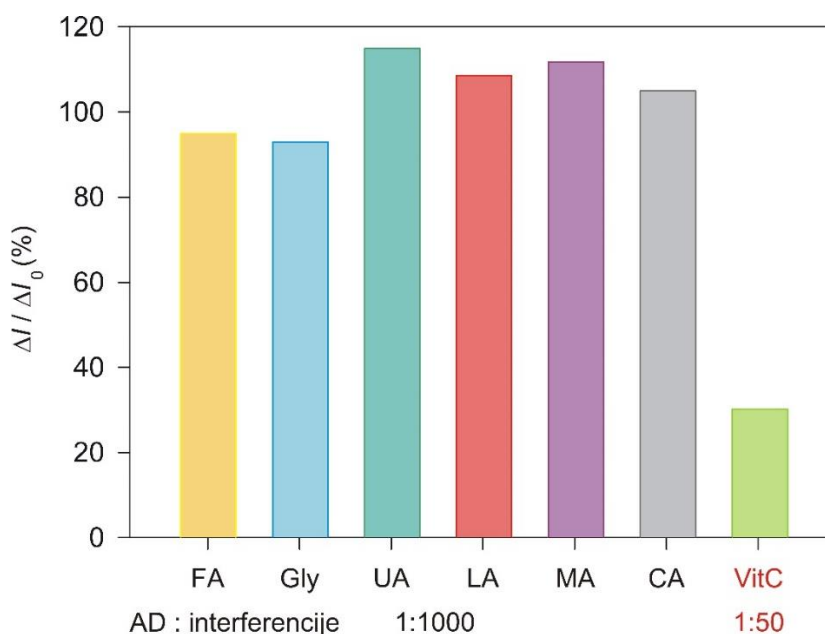
DPV metoda odabrana je za kvantitativnu analizu AD na Co(II) kompleksom modificiranoj GCE zbog bolje osjetljivosti i niže granice detekcije od CV. Različiti parametri (potencijal akumulacije,  $E_{akum}$ , vrijeme akumulacije,  $t_{akum}$ , amplituda impulsa,  $\Delta E_p$  i potencijal koraka,  $\Delta E_s$ .) optimizirani su kako bi se razvio elektrokemijski postupak za određivanje adrenalina. Svi eksperimenti su izvedeni od -150 do 500 mV,  $E_{akum} = -150$  mV,  $t_{akum} = 30$  s,  $\Delta E_p = 25$  mV i  $\Delta E_s = 4$  mV. Na Slici 30 lijevo su prikazani DPV rezultati dobiveni na Co(II) kompleksom modificiranoj GCE u 0,2 M PBS, pH 7,4 iz kojih je vidljivo da kontinuirano dodavanje adrenalina povećava anodnu vršnu struju što ukazuje na elektrokatalitičku aktivnost modificirane elektrode. Prikazani DPV voltamogrami korigirani su za struju Co(II) kompleksa (*eng. subtract disk file*) jer Co(II) stvara kompleks s adrenalinom što je dokazano spektrofotometrijski. Odgovarajuća krivulja umjeravanja prikazana na Slici 30 desno pokazala je linearni odnos između struje oksidacije adrenalina i koncentracije adrenalina s osjetljivošću od  $26,92$  nA ( $\mu\text{M}$ )<sup>-1</sup>.



Slika 30 DPV voltamogrami (uvjeti:  $E_{akum} = -150$  mV,  $t_{akum} = 30$  s,  $\Delta E_p = 25$  mV,  $\Delta E_s = 4$  mV) za oksidaciju adrenalina zabilježeni na GCE|Co(II)komp sa "subtract disk file" korekcijom u 0,2 M PBS pH=7,4 za ispitivane AD koncentracije.

### 3.7. Interferencije

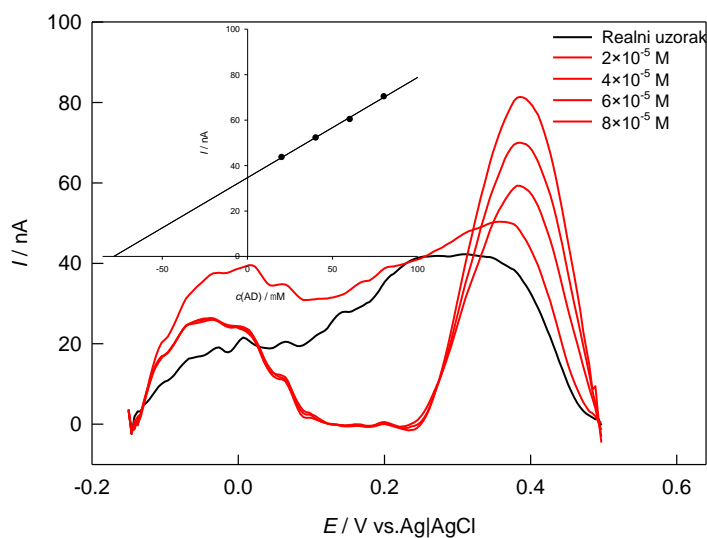
Proučavan je interferirajući utjecaj nekih tvari, kao što su folna kiselina, glicin, urea, laurinska kiselina, malonska kiselina, limunska kiselina i vitamin C u 1000-strukom suvišku prema 0,01 mM adrenalinu na odgovor GCE modificirane Co(II) kompleksom koristeći DPV, budući da su osjetljivost i selektivnost dva važna parametra u detekciji adrenalina (Slika 31). Strujni odzivi dobivni nakon dodavanja svih interferirajućih vrsti u elektrolit s GCE|Co(II) komp dodavanja je nešto drugačijeg oblika, s pojavom dodatnih promjena ali s zanemarivim utjecajem na strujni vrh oksidacije adrenalina. Veći utjecaj pokazao je vitamin C, blokirajući površinu modificirane elektrode. Zaključno, GCE|Co(II)komp je pokazala dobru selektivnost za određivanje adrenalina.



Slika 31 Odnos struje interferencija ( $\Delta I$ ) i struje adrenalina ( $\Delta I_0$ ) na GCE|Co(II)komp u osnovnom elektrolitu

### 3.8. Određivanje adrenalina u realnom uzorku

Realni uzorak bile su Adrenalin bitartarat ampule, dobavljača PARCOTIC, za infuziju koncentracije 1 mg/1 mL. Na Slici 32 prikazan je voltamogram za realni uzorak s četiri dodatka standardne otopine adrenalina korigiran za struju Co(II) kompleksa te pripadajuća krivulja umjeravanja u svrhu određivanja nepoznate koncentracije adrenalina u ampuli za infuziju. Analiza je provedena metodom standardnog dodatka, crna krivulja predstavlja realni uzorak, a crvene krivulje su dodaci 1mM otopine adrenalina. Ampula za infuziju razrijeđena je osnovnim elektrolitom (u 100 mL pufera dodano je 200  $\mu$ L realnog uzorka adrenalina nepoznate koncentracije). Odsječak na ordinati krivulje umjeravanja odgovara vrijednosti strujnog vrha oksidacije adrenalina, na osnovu koje je izračunata nepoznata koncentracija. Pomak struje oksidacije adrenalina dodatkom standardne otopine (u odnosu na sliku 30) može biti posljedica malih razlika u priređenom filmu, odnosno, posljedica korekcije za struju koja potječe od kompleksa.



Slika 32 DPV realnog uzorka adrenalina (korigiran za struju Co(II) kompleksa) zabilježen na  $GCE|Co(II)komp$  te pripadajuća krivulja umjeravanja

Na temelju voltamograma i krivulje umjeravanja prikazanih na Slici 32, može se izračunati koncentracija adrenalina u realnom uzorku:

$$I = 26,64 + 1,89c(AD)$$



gdje je:

- $I$  vršna struja (nA) koja je očitana iz krivulje realnog uzorka (Slika 33) te iznosi 37,6 nA.
- $c(\text{AD})$  koncentracija adrenalina.

Izračun koncentracije adrenalina ( $V = 100 \text{ mL}$ ) iz jednadžbe pravca:

$$\begin{aligned}I &= 37,6 \text{ nA} \\37,6 &= 26,64 + 1,89c(\text{AD}) \\37,6 - 26,64 &= 1,89c(\text{AD}) \\10,96 &= 1,89c(\text{AD}) \\c(\text{AD}) &= \frac{10,96}{1,89} = 5,8 \mu\text{M}\end{aligned}$$

Koncentracija adrenalina u ćeliji od 100 mL iznosi 5,8  $\mu\text{M}$ .

Budući da je volumen od 200  $\mu\text{L}$  realnog uzorka razrijeđen do 100 mL osnovnim elektrolitom, koncentracija adrenalina u ampuli preračunava se kao:

$$\begin{aligned}c_{AD} &= \frac{5,8 \mu\text{M} \times 100 \text{ mL}}{0,2 \text{ mL}} \\c_{AD} &= 0,00290 \text{ M}\end{aligned}$$

Koncentracija adrenalina u 200  $\mu\text{L}$  realnog uzorka je 0,0029 M. Masena koncentracija adrenalina u ampuli za infuziju je 0,967 mg/mL ( $M = 333,29 \text{ g/mol}$ )

Novi senzor, temeljen na kobaltovom(II) kompleksu dao je zadovoljavajuće rezultate i učinio navedeni spoj prikladnim za kvantitativna mjerenja adrenalina u farmaceutskom uzorku.

#### 4. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu istražena je elektroanalitička primjena koordinacijskog spoja kobalta(II),  $\{[Co(1,2-bpe)_2(H_2O)_2](6-NH_2nic)(NO_3)\times 4H_2O\}_n$  za određivanje adrenalina. Korištenjem modificirane staklaste ugljikove elektrode (GCE) te primjenom cikličkevoltometrije i elektrokemijske impedancijske spektroskopije (EIS), utvrđena je sposobnost ovog kompleksa da olakša oksidaciju adrenalina, što ga čini pogodnim za njegovu detekciju u različitim uzorcima. Modificirana elektroda pokazala je značajnu osjetljivost i selektivnost prema adrenalinu, s poboljšanim elektroanalitičkim karakteristikama u usporedbi s nemodificiranom elektrodom.

Spektrofotometrijska analiza, kojom je potvrđeno da dolazi do formiranja stabilnog kompleksa između adrenalina i Co(II) pridonijela je razumijevanju interakcije između kobalt(II) kompleksa i adrenalina. Linearni odnos između vršne struje i koncentracije adrenalina, dobiven na temelju krivulje umjeravanja, omogućio je precizno određivanje koncentracije adrenalina u realnom uzorku.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da koordinacijski spoj kobalta (Co(II)) ima veliki potencijal za primjenu u elektrokemijskom određivanju adrenalina, zbog svojih povoljnih kompleksirajućih i selektivnih svojstava i jednostavnosti primjene. Ovakav pristup mogao bi se dalje razvijati u svrhu stvaranja komercijalnih senzora za brzu i učinkovitu detekciju adrenalina u biološkim te farmaceutskim uzorcima, što otvara prostor za širu primjenu u kliničkoj dijagnostici i analitičkim laboratorijima.

## 5. LITERATURA

1. S. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija II*, Školska knjiga, Zagreb, 1991., str. 1036–1058.
2. <https://www.tcichemicals.com/AT/de/p/C3579> (posjećeno: 02. listopada 2024.).
3. A. G. Blackman, *Cobalt: Inorganic & Coordination Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., University of Otago, Dunedin, 2006. ( doi:10.1002/0470862106.ia046)
4. Y. Y. Zhao, X. H. Zhao, J. Zhang, J. G. Pan, i X. Li, Electrochemical properties of a cobalt(II) complex with sulfadiazine and 1,3-bis(pyridin-4-yl)propane, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 69 (2013) 1096–1099. (<https://doi.org/10.1107/s010827011302297x> )  
E. M. Jawad Mohsen, N. A. Salih, A. Wheed Radhi, i R. Atiya, Nicotinic acid derivatives: Application and uses, review, *J. Chem. Rev.* 15 (2021) 45–67 (doi:[10.22271/reschem](https://doi.org/10.22271/reschem))
5. Z. H. Chohan, A. Rauf, S. Noreen, A. Scozzafava, i C. T. Supuran, Antibacterial Cobalt(II), Nickel(II) and Zinc(II) Complexes of Nicotinic Acid-derived Schiff-bases, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17 (2002) 101–106. (<https://doi.org/10.1080/14756360290024209>)
6. S. Javad, F. Zarei, i R. Yousefi, Environmentally friendly catalyst- and solvent-free synthesis of 2-anilino nicotinic acid derivatives as potential lead COX inhibitors, *BMC Chem.* 17 (2023) 160.
7. L. Hok, E. Lluch Sanchez, R. Vianello, B. M. Kukovec, i Z. Popović, Self-Assembly of Cobalt(II) Coordination Polymers with Differently Halosubstituted Nicotinate Ligands and 4,4'-Bipyridine – The Effect of the Halosubstituent Positions on Polymer Types, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2021, 1470–1480. ( doi: <https://doi.org/10.1002/ejic.202100055>)
8. I. Škugor Rončević, N. Vladislavić, N. Chatterjee, V. Sokol, C. L. Oliver, i B.-M. Kukovec, Structural and Electrochemical Studies of Cobalt(II) and Nickel(II) Coordination Polymers with 6-Oxonicotinate and 4,4'-Bipyridine, *Chemosensors* 9 (2021) 352. (doi: <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120352>)
9. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fhr.wikipedia.org%2Fwiki%2FAdrenalin&psig=AOvVaw0zCigJ7XsLspKhWIKpruGq&ust=1724319901955000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBiQjRxqFwoTCLi036zmhYgDFQAAAAAdAAAAABAE> (pristupljeno 20.08.2024.)

10. S. Sharath Shankar, R. M. Shereema, i R. B. Rakhi, Electrochemical Determination of Adrenaline using MXene/Graphite Composite Paste Electrodes, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 50, 4515–4523. (doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b11741>)
11. J. Sochr, L. Švorc, M. Rievaj, i D. Bustin, Electrochemical determination of adrenaline in human urine using a boron-doped diamond film electrode, *Diamond Relat. Mater.* 43 (2014) 5–11. (doi: [10.1016/j.diamond.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.diamond.2014.01.005))
12. E. Turkušić, S. Redžić, E. Kahrović, i A. Zahirović, Electrochemical Determination of Adrenaline at Ru(III) Schiff Base Complex Modified Carbon Electrodes, *Croat. Chem. Acta* 90 (2017) 345–352. (doi: <https://doi.org/10.5562/cca3177>)
13. E. K. A. Karaberova, O. Bol'shakov, E. Bulatova, M. Golovin, A. Abramyan, i D. M. Stanković, Enhancing Adrenaline Sensing with Lanthanum Cuprate: A Promising Approach for a Novel Sensor, *J. Electrochem. Soc.* 171 (2024) 017513. (doi: [10.1149/1945-7111/ad1ecb](https://doi.org/10.1149/1945-7111/ad1ecb))
14. M. Farouk, F. Ahmad, i A. Samir, Ligand field and spectroscopic investigations of cobalt doped erbium–zinc borate glasses, *Opt. Quantum Electron.* 51 (2019) 292. (doi:10.1007/s11082-019-2009-3.)
15. N. Monarumit, T. Lhuaamporn, D. Schwarz, P. Wathanakul, i W. Wongkokua, An application of polychromatic UV-Vis-NIR spectroscopy on detection of beryllium treatment in ruby and yellow sapphire, *J. Phys.: Conf. Ser.* 2653 (2023) 012011. (doi: 10.1088/1742-6596/2653/1/012011)
16. Shaobo Han, *Thermoelectric polymer-cellulose composite aerogels*, Linköping Studies in Science and Technology, Dissertation No. 2028, Department of Science and Technology, Linköping University, Sweden, 2019. ISBN 978-91-7929-967-5, ISSN 0345-7524 ([https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-UV-Vis-NIR-spectrophotometer\\_fig24\\_337902862](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-UV-Vis-NIR-spectrophotometer_fig24_337902862))
17. R. Digigow, M. Burgert, M. Luechinger, A. Sologubenko, A. J. Rzeplia, S. Handschin, A. E. Barton Alston, B. Flühmann, Nano-scale characterization of iron-carbohydrate complexes by cryogenic scanning transmission electron microscopy: Building the bridge to biorelevant characterization, *Heliyon* 10 (2024) e36749. ISSN 2405-8440 (doi: [10.1016/j.heliyon.2024.e36749](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36749))
18. B. J. Ford, Savile Bradbury, i D. C. Joy, "Transmission Electron Microscope," *Encyclopedia Britannica*, 26. kolovoza 2024. <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>.

19. E. Barsoukov, i J. R. Macdonald (ur.), *Impedance Spectroscopy*, J. Wiley & Sons, New York, 2005. ISBN 978-0471647492, (doi: 10.1002/0471716243.)
20. J. Benavente, Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Tool for Electrical and Structural Characterizations of Membranes in Contact with Electrolyte Solutions, u *Recent Advances in Multidisciplinary Applied Physics*, A. Méndez-Vilas (ur.), Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, 2005; 463–471. (doi: [10.1016/B978-008044648-6.50074-4](https://doi.org/10.1016/B978-008044648-6.50074-4) )
21. E. B. Bahadır, i M. K. Sezgentürk, A review on impedimetric biosensors, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44 (2016) 248–262. (doi: [10.3109/21691401.2014.942456](https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456) )
22. V. F. Lvovich, Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Applications to Sensors and Diagnostics, *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, G. Kreysa, K.-i. Ota, i R. F. Savinell (ur.), Springer, New York, NY, USA, 2014; 485–507.
23. Š. Komorsky-Lovrić, i M. Lovrić, *Voltometrija*, Institut: ZIMO, 2007.
24. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Zagreb, 2010
25. K. F. Drake, R. P. Van Duyne, i A. M. Bond, Cyclic differential pulse voltammetry: A versatile instrumental approach using a computerized system, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 89 (1978) 231–246. (doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(78\)80187-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(78)80187-9) )
26. B.-M. Kukovec, I. Škugor Rončević, N. Vladislavić, N. Chatterjee, V. Sokol, i C. L. Oliver, A cobalt(II) coordination polymer with 6-aminonicotinate and 1,2-bis(4-pyridyl)ethane as a new electrochemical sensor for determination of dopamine, *New J. Chem.* 47 (2023) 15701–15710. (doi:10.1039/d3nj02486e.)