

Određivanje anorganskih kationa elektroforezom na mikročipu sa $(C^{4}D)$ detektorom

Jakić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:706322>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marija Jakić

**ODREĐIVANJE ANORGANSKIH KATIONA ELEKTROFOREZOM NA
MIKROČIPU SA C⁴D DETEKTOROM**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Marija Jozanović

Komentor: doc.dr.sc. Brunislav Matasović

Osijek, 2020.

SAŽETAK

Kationi su atomi ili molekule koji su pozitivno nabijeni, a u električnom polju putuju prema negativno nabijenoj elektrodi, katodi. Velika rasprostranjenost anorganskih kationa u vodi, tjelesnim tekućinama, eksplozivima i mnogim lijekovima, privukla je pažnju znanstvenika za kreiranje precizne, efikasne te lako dostupne metode za njihovu detekciju.

Cilj ovog rada je prikazati mogućnosti primjene elektroforeze na mikročipu i prikazati rezultate određivanja anorganskih kationa pomoću ove metode.

Prilikom izvođenja minijaturizirane kapilarne elektroforeze, analiza se odvija u separacijskom kanalu mikročipa, a signal se dobiva uslijed promjene električne vodljivosti. Promjenom vodljivosti nastaje informacija koja se prikazuje u obliku izraženih pikova koji daju podatak o koncentracijama nabijenih specija.

Ključne riječi: anorganski kationi, elektroforeza na mikročipu, $C^{4}D$ detektor, realni uzorak

ABSTRACT

Cations are atoms or molecules that are positively charged and travel in an electric field to a negatively charged electrode, the cathode. The high prevalence of inorganic cations in water, body fluids, explosions, and many drugs has attracted the attention of scientists to create precise, efficient, and readily available methods for their detection.

The goal of this paper is to present the possibilities of applied electrophoresis on a microchip and to present the results of determination of inorganic cations using these methods.

During miniaturized capillary electrophoresis, the analysis takes place in the separation channel of the microchip, and the signal is obtained when the electrical conductivity changes. The change in conductivity produces information that is displayed in the form of pronounced peaks that give information about the concentration of charged species.

Keywords: inorganic cations, microchip electrophoresis, C⁴D detector, real sample

SADRŽAJ

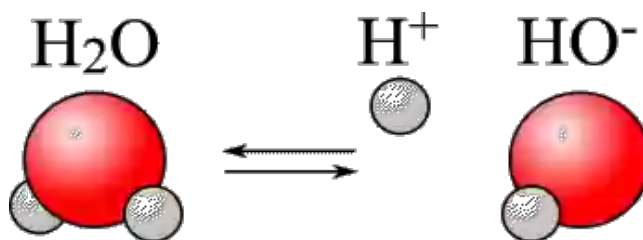
1	UVOD	5
2	ANORGANSKI KATIONI	6
3	METODE ODREĐIVANJA ANORGANSKIH KATIONA	7
3.1	Ionska kromatografija.....	7
3.2	Elektroforetske metode.....	9
3.2.1	Kapilarna elektroforeza	10
3.2.2	Elektroforeza na mikročipu	11
3.3	Spektroskopija	12
4	PRIMJENA ELEKTROFOREZE NA MIKROČIPU ZA SEPARACIJU I KVANTIFIKACIJU ANORGANSKIH KATIONA.....	13
4.1	Detekcijski sustavi.....	13
4.1.1	C ⁴ D detektor (engl. CCCCD, engl. <i>Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection</i> , C ⁴ D)	14
4.2	Optimiranje separacije anorganskih kationa.....	14
4.3	Primjena C ⁴ D detekcijskog sustava za detekciju anorganskih kationa.....	16
4.3.1	Analiza kvalitete vode	17
4.3.2	Medicinska dijagnostika.....	18
4.3.3	Farmaceutska primjena.....	19
4.3.4	Forenzičke aplikacije.....	19
5	MINIJATURIZACIJA KAPILARNE ELEKTROFOREZE.....	20
5.1	Prednosti elektroforeze na mikročipu.....	20
5.2	Nedostatci elektroforeze na mikročipu.....	21
6	ZAKLJUČAK	22
7	LITERATURA.....	23

1 UVOD

Elektroforeza je analitička metoda koja se danas brzo razvija, nadograđuje i usavršava te zato ima široku primjenu u analitičkoj kemiji, biokemiji i molekularnoj biologiji. Koristi se za separaciju nabijenih čestica i analizu makromolekula poput proteina i nukleinskih kiselina, te za analizu molekula manje molekulske mase kao što su šećeri, aminokiseline i druge. Znanost pa tako i kemija, danas teži razvoju minijaturiziranih, cjenovno dostupnijih i ekološki prihvatljivijih metoda istraživanja. Jedna od metoda koja ispunjava navedene kriterije je kapilarna elektroforeza, to jest elektroforeza na mikročipu. Elektroforeza na mikročipu je minijaturizirana verzija kapilarne elektroforeze, gdje se postupak separacije odvija u minijaturiziranoj kapilari.

2 ANORGANSKI KATIONI

Kationi su pozitivno nabijeni ioni koji u električnom polju odlaze ka negativno nabijenoj elektrodi katodi. Naboj im je pozitivan jer im nedostaje jedan ili više elektrona. Mogu biti molekule ili atomi. Prvi koji je proučavao prirodu iona bio je engleski fizičar Michael Faraday. On nije poznao njihovu prirodu, ali je uočio da su to čestice koje prenose materiju s jednog mjesta na drugo. Kasnije je Svante Arrhenius u svojoj disertaciji iznio činjenicu da čvrste soli u vodi disociraju na Faradayeve ione i kako za njihovo formiranje nije potrebna električna struja. Arrhenius je za svoje otkriće 1903. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju [1].



Slika 1. Disocijacija vode na kation i anion [2].

3 METODE ODREĐIVANJA ANORGANSKIH KATIONA

Kako bi se što bolje odredila količina kationa ili aniona u sastavu neke smjese potrebno je provesti određene analize. Cilj takvih metoda je određivanje kvalitete, detekcija određenih nabijenih vrsta, odjeljivanje ili pročišćavanje smjese.

Uzorak koji je najpogodniji za dokazivanje anorganskih kationa je voda. Voda je najrasprostranjenije otapalo na Zemlji i u sebi sadrži otopljenje plinove, krutine i tekućine. Otopljene tvari u vodi možemo podijeliti u pet skupina: plinovi, ioni, biogene tvari, mikroelementi i organske tvari.

Neke od metoda za uspješnu detekciju kationskog i anionskog sastava su:

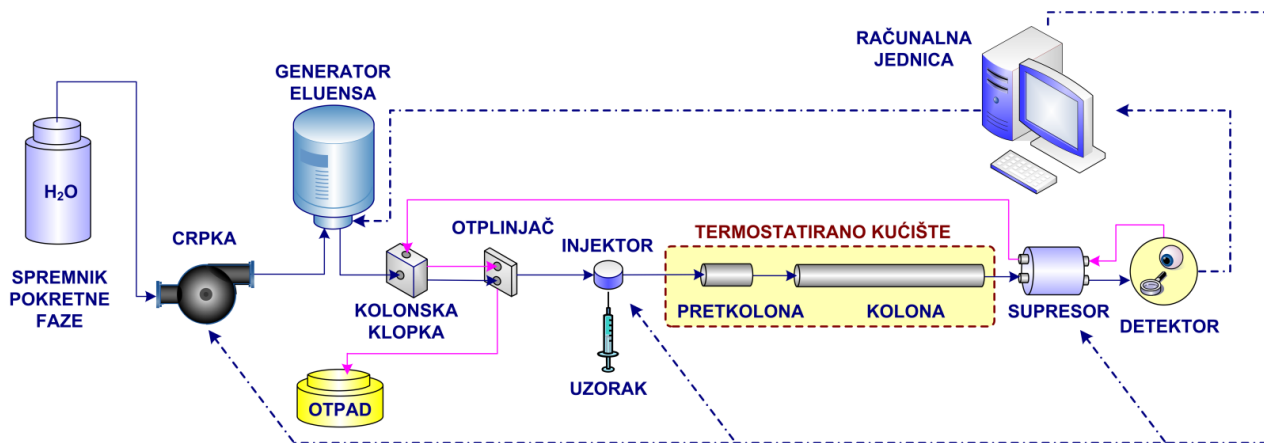
1. Ionska kromatografija
2. Elektroforetske metode
 - a. Kapilarna elektroforeza
 - b. Elektroforeza na mikročipu
3. Spektroskopija [3].

3.1 Ionska kromatografija

Kromatografija je analitička metoda razdjeljivanja smjese kod koje se smjesa razdjeli između stacionarne i mobilne faze. Sam proces razdvajanja zasniva se na adsorpciji, na razdjeljivanju između dvaju otapala koji se međusobno ne miješaju ili između tekuće i plinske faze, na difuziji u porama određene veličine, te na ionskoj izmjeni. Kromatografija danas ima veliku važnost i primjenu. Gotovo svaki kemijski, farmaceutski ili drugi prirodoslovni laboratoriji koriste kromatografiju za separaciju i determinaciju sastava složenih smjesa [10].

Ionska kromatografija ili kromatografija ionskim izmjenjivačima je široko rasprostranjena analitička metoda za odjeljivanje i određivanje nabijenih vrsta. Small, Stevens i Bauman bili su prvi znanstvenici koji su predstavili ovu metodu. Brzi razvoj ionske kromatografije, omogućio je da se razvije u suvremenu metodu za određivanje niza kationa i aniona [4].

U modernim ionskim kromatografima se koristi voda kao pokretna faza, koja pomoću crpke protječe kroz sustav. Nakon toga slijedi generator eluensa u koji se dodaje pripremljeni eluens od kuda nastavlja dalje u sustav. Kolonska klopka i otplinjač služe za eliminaciju plinova i reduciranje pozadinskih šumova. Pomoću injektorske jedinice uzorak se uvodi u termostatirano kućište koje odjeljuje sastojke uzorka. Supresor omogućava smanjenje pozadinskog šuma, pojačavanjem signala, a detektor skuplja signale koji se onda obrađuju u računalnoj jedinici (Slika 2.) [4].



Slika 2. Shema modernog ionskog kromatografskog sustava [4].

3.2 Elektroforetske metode

Elektroforeza je relativno nova analitička metoda koja ima široku primjenu u svim područjima kemije. Postoji čitav niz elektroforetskih metoda, a u ovom radu biti će opisane kapilarna elektroforeza odnosno elektroforeza na mikročipu. Gruba podjela elektroforetskih metoda na zonsku elektroforezu i elektroforezu pomičnih granica prikazana je u tablici 1. Glavna zadaća ovih metoda je separacija nabijenih specija. Proučavanje ovih metoda te uočavanje njihovih prednosti dovelo je do velike podjele i grananja elektroforetskih metoda i do toga da su danas, ove metode jedne od najkorištenijih metoda analitičke separacije. Elektroforetske metode se temelje na kretanju električki nabijenih čestica kroz otopinu u električnom polju koje nastaje između dvije elektrode. Na temelju razdiobe nabijenih čestica dobiva se analitički podatak [5].

Tablica 1. Podjela elektroforetskih metoda [6].

ELEKTROFOREZA	
ZONSKA ELEKTROFOREZA	ELEKTROFOREZA POMIČNIH GRANICA
Elektroforeza na papiru	Kapilarna elektroforeza
Elektroforeza na gelu	Izotahforeza
Tankoslojna elektroforeza	Izoelektrično fokusiranje
Elektroforeza na acetat-celulozi	Imunoelektroforeza

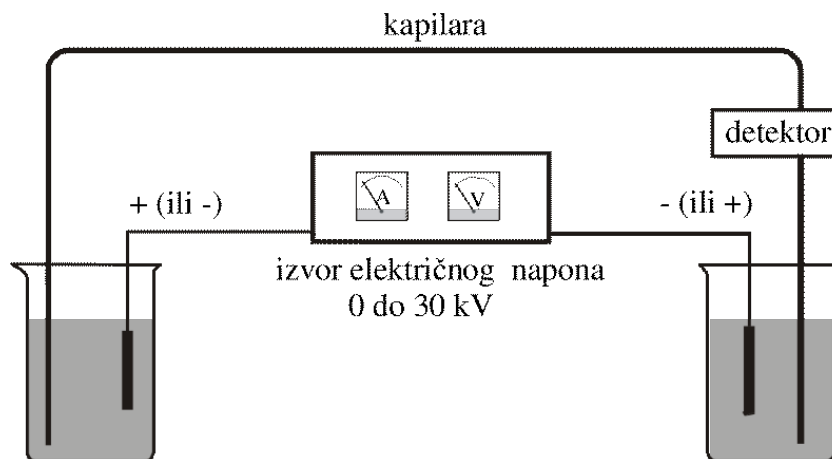
3.2.1 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je podvrsta elektroforeze koje se primjenjuje prvi put 1981. god. kod separacije smjese peptida i proteina. Temelji se na kretanju iona kroz elektrolit pod utjecajem električnog polja visokog potencijala u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda. Metoda služi za odvajanje ionskih vrsta nekog uzorka prema njihovoj masi i naboju, te se uspješno koristi za razdvajanje i određivanje mnogih molekula poput anorganskih kationa i aniona, aminokiselina i DNA. Također moguće je dodatkom različitih kiralnih selektora separirati i smjese enantiomera.

Otkriće ove metode uvelike je pomoglo u proučavanju genoma, te je većina sekvenci genoma određena kapilarnom elektroforezom. Također ova metoda ima veliku primjenu u biotehnologiji i analizi velikih molekula poput lijekova, hormona i anorganskih iona [7].

Prednosti ove metode su da se brzo, efikasno, jeftino koristeći male količine uzorka može izvršiti uspješno mjerenje. Metoda je i izrazito ekološki prihvatljiva čemu se danas pridodaje velika pažnja [7].

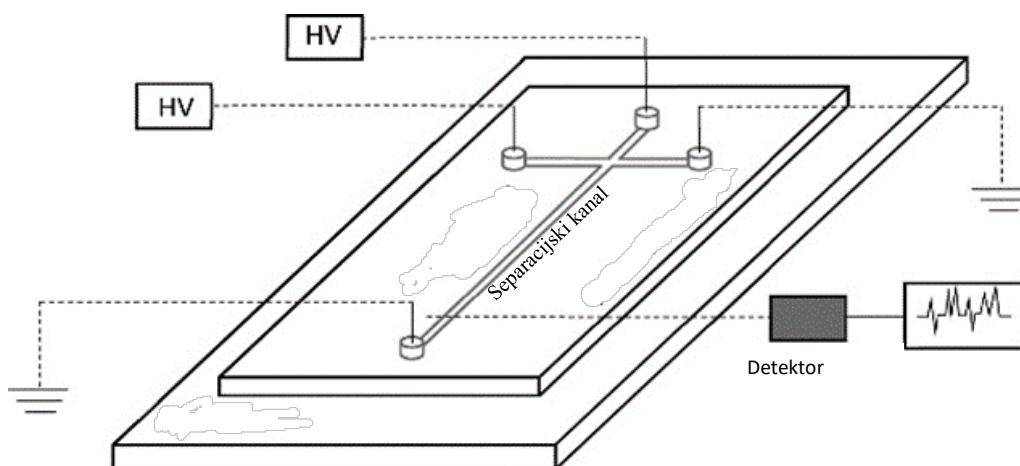
Shema kapilarne elektroforeze prikazana je na slici 3. Elektrode su spojene na izvor električnog napona i uronjene u pufersku otopinu skupa s kapilarom. Na početak kapilare nanosi se mala količina uzorka nakon čega nabijene čestice putuju kroz kapilaru pod utjecajem električnog polja.



Slika 3. Shema kapilarne elektroforeze [5].

3.2.2 Elektroforeza na mikročipu

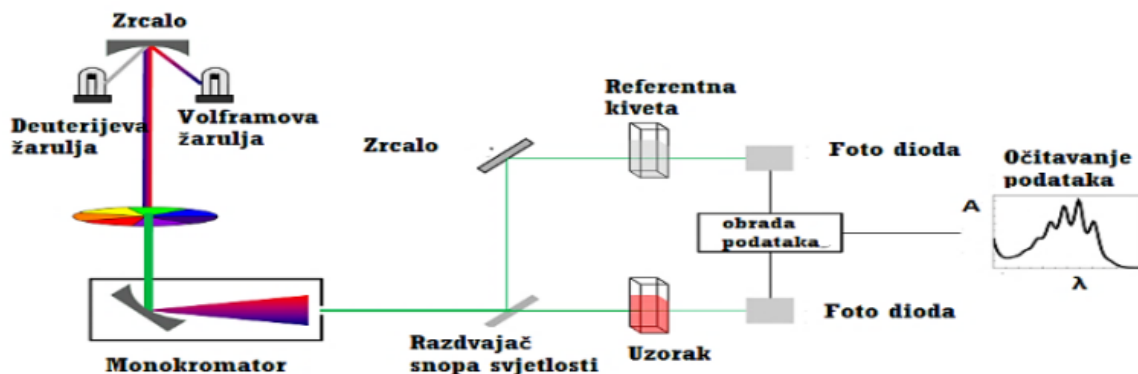
Minijaturizacijom kapilarne elektroforeze predstavljena je elektroforeza na mikročipu. Primjenom električnog polja razdvajaju se nabijene specije na osnovu njihovih elektroforetskih mobilnosti. Specije s najvećom vrijednosti elektroforetske mobilnosti migriraju prve, a zatim ih slijede one s nižom mobilnosti. Metoda je jednostavna za provođenje i ima visoku rezoluciju. Glavne prednosti elektroforeze na mikročipu su: kratko vrijeme mjerenja, mali utrošak otopine uzorka i pomoćnog elektrolita, povoljna cijena, male dimenzije uređaja koje omogućuju terenski rad i laku prenosivost. Provođenje mjerenja na elektroforezi na mikročipu sastoji se od injektiranja, separacije i detekcije. Najčešće se primjenjuje elektrokinetičko injektiranje, pri čemu je električno polje manje nego ono pri separaciji uzorka u separacijskom kanalu. Detekcija segmenata omogućena je tako što separirani segmenti putuju do elektroda gdje se detektiraju [8].



Slika 4. Shematski prikaz elektroforeze na mikročipu (HV- izvor visokog napona) [8].

3.3 Spektroskopija

Spektroskopija je analitička metoda koja se zasniva na interakciji uzorka s elektromagnetskim zračenjem prilikom koje se dobije informacija o analiziranom uzorku. Ova metoda ima veliku ulogu u identifikaciji organskih i anorganskih molekula. Prilikom analize uzorka spektroskopijom mjeri se valna duljina i intenzitet elektromagnetskog zračenja koje uzorak emitira ili apsorbira. Osnovna podjela spektroskopije je na apsorpcijsku, emisijsku i interferencijsku spektroskopiju. Područja spektroskopije dijele se na temelju valne dulje elektromagnetskog zračenja, a to su: radiofrekventno područje (NMR), mikrovalno područje, infracrveno područje (IR), ultraljubičasto i vidljivo područje (UV i VIS), x-fotoni i γ -fotoni. Izvori elektromagnetskih zračenja su laser, rendgenska cijev, živina lampa, volframova lampa ili crno tijelo, ovisno o području i valnoj duljini u kojoj analiziramo uzorak. Spektrofotometar je uređaj koji mjeri količinu elektromagnetskog zračenja koje uzorak apsorbira. Svaki takav uređaj sastoji se od izvora zračenja, monokromatora, detektorai računala. [9].



Slika 5. Shema spektrofotometra [2].

4 PRIMJENA ELEKTROFOREZE NA MIKROČIPU ZA SEPARACIJU I KVANTIFIKACIJU ANORGANSKIH KATIONA

Minijaturizacijom kapilarne elektroforeze 90-ih godina prošlog stoljeća došlo je do raširene upotrebe ove metode. Najprije su detektirani biološki uzorci kao što su DNA molekule i proteini, a kasnije su detektirani analiti širokog spektra. U posljednjih pet godina metoda je uspješno korištena u medicinskim, farmaceutskim i forenzičkim istraživanjima, te za kontrolu kvalitete vode i hrane. Jednostavnost i efikasnost ove metode omogućuju njezinu široku primjenu [11].

4.1 Detekcijski sustavi

Izbor vrste detektora ovisi o prirodi uzorka i koncentraciji analita. U elektroforezi na mikročipu koriste se optički i elektrokemijski detektori. Od optičkih detektora najčešće se koriste detektori bazirani na kemiluminiscenciji i laserski induciranoj fluorescenciji.

Od elektrokemijskih detektora najčešće se primjenjuju konduktometrijski i amperometrijski detektori. Poznati su još i potenciometrijski i volumetrijski elektrokemijski detektori. Ovisno o varijabli koja se mjeri, odabire se detekcijski sustav.

Konduktometrijska detekcija temelji se na mjerenju vodljivosti otopine elektrolita koja je proporcionalna koncentraciji otopljene tvari. Amperometrijska detekcija, zasniva se na mjerenju električne struje koja je uzrokovana oksidacijom ili redukcijom elektrolita na površini elektrode. U praksi je zastupljenija konduktometrijska detekcija jer nije ograničena samo na detekciju specija koje se mogu oksidirati/reducirati već se njome mogu detektirati sve nabijene specije koje se gibaju u električnom polju mikročipa [12] [13].

4.1.1 C⁴D detektor (engl. C⁴CCCD, engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection, C⁴D*)

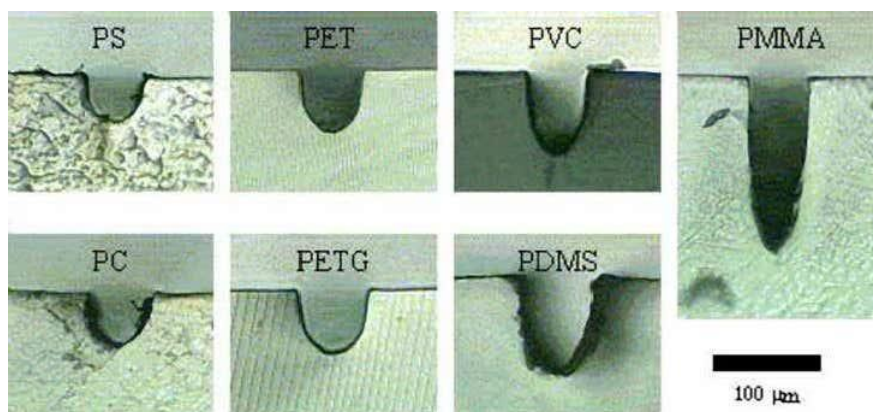
C⁴D je kapacitivno spregnuti beskontaktni konduktometrijski detektor koji ne zahtjeva derivatizaciju analita. Stoga je ovaj oblik detekcije idealna zamjena za optičke metode detekcije kao što je laserska fluorescencija koje zahtijevaju derivatizaciju analita. Velika prednost C⁴D detektora je što elektrode nisu u direktnom kontaktu sa otopinom koju mjerimo, zbog čega ne dolazi do stvaranja mjehurića plinova prilikom mjerenja, te se također elektrode ne mogu onečistiti tvarima iz uzorka. Detektor se sastoji od dvije metalne elektrode koje su osjetljive na promjenu vodljivosti otopine. Promjena vodljivosti je signal koji detektor očitava i prosljeđuje ga nama u obliku čitljivog podatka, elektroferograma. Zaprimljene signale uređaj pretvara u čitljivu seriju pikova čija su površina i visina proporcionalna koncentraciji nabijenih specija [14].



Slika 6. C⁴D detekcijski sustav [15].

4.2 Optimiranje separacije anorganskih kationa

Izbor materijala pri izradi mikročipova vrlo je bitan za učinkovitost analize na elektroforezi na mikročipu. Ovisno o pH vrijednosti otopine pozadinskog elektrolita te osobinama analita, izabire se materijal mikročipa. Danas se prilikom izrade mikročipova za analizu koriste različiti polimeri, kao što su: PET (polietilen-tereftalat), PC (polikarbonat), PDMS (polidimetilsiloksan) i PMMA (polimetilmetakrilat). Osim mikročipova napravljenih od polimernih materijala, koriste se i stakleni mikročipovi koji su znatno skuplji, te podložni pucanju, no imaju veću otpornost prema organskim otapalima i pokazuju bolja optička svojstva te se najčešće primjenjuju ako se koriste optički detekcijski sustavi.



Slika 7. Shematski prikaz presjeka mikrokanala mikročipova za elektroforezu na mikročipu [8].

Dimenzije mikročipova najčešće se protežu od 15 do 50 μm dubine, 50 do 200 μm širine i 1 do 10 cm dužine. Mikrokanali su najčešće križno postavljeni unutar mikročipa i svaki na kraju ima rezervoar u koji se dodaje pomoću elektrolit ili uzorak. Unutar mikročipa obično se nalaze dva kanala, kraći injekcijski kanal služi za injektiranje otopine uzorka. Najduži mikrokanal naziva se separacijski kanal te služi za separaciju injektiranog uzorka. Pri kraju separacijskog kanala nalaze se detekcijske elektrode, izrađene od plemenitih metala pomoću kojih se detektira signal. Unošenje uzorka na mikročip i njegovo detektiranje vrši se pod određenim naponom [16].

Kako bi se dobila što preciznija i točnija mjerenja vrlo je važan odabir dobrog pozadinskog elektrolita. Svaka ionska vrsta pokazat će određenu vodljivost, te je stoga bitno izabrati pozadinski elektrolit što niže vodljivosti. Tako će se izbjeći pozadinski šumovi te dobiti izraženiji pikovi, pri čemu ćemo dobiti čitljiviji signal koji daju nabijene čestice prilikom promjene vodljivosti cjelokupnog uzorka.

Za analizu kationa obično se izabiru niske pH vrijednosti pozadinskog elektrolita, pri čemu se precizno optimizira sastav anorganskih i organskih kiselina, te soli i ostalih dodataka u sastavu pozadinskog elektrolita kako bi se postigla potpuna separacija svih kationa u uzorku. Zbog vrlo bliskih elektroforetskih mobilnosti pojedinih alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa u uzorcima u kojima je prisutan velik broj različitih kationa teško je postići potpunu separaciju. U uzorcima prirodnih voda često je teško provesti separaciju kalijevog i amonijevog iona, u tu svrhu se sastav pozadinskog elektrolita optimira dodatkom krunastih etera. Najefikasniji krunasti eter za separaciju navedena dva kationa je 18-kruna-6.

Prije svakog mjerenja potrebno je mikrokanale isprati ultračistom vodom, a zatim puferom to jest izabranim pozadinskim elektrolitom. Električnu vodljivost pozadinskog elektrolita, te stabilnost uređaja, također je potrebno provjeriti prije svakog mjerenja, snimanjem bazne linije za zadani sustav.

Prilikom injektiranja uzorka koristi se napon u prosjeku od +0,70 – +1,2 kV, a za separiranje specija napon od +1,40 – +4 kV. Uzorak je potrebno injektirati u za to predviđen rezervoar na mikročipu, dok se u ostale rezervoare dodaje pozadinski elektrolit. Mjerenje je potrebno izvršiti za pozadinski elektrolit i za odabrani uzorak [3].

4.3 Primjena C⁴D detekcijskog sustava za detekciju anorganskih kationa

Zahvaljujući praktičnosti, efikasnosti i povoljnoj cijeni elektroforeze na mikročipu, ova metoda ima raznoliku primjenu. Izvrsnom se pokazala i u detekciji anorganskih kationa. Tim znanstvenika s brazilskog kemijskog instituta Sao Carlos, i američkog odjela za kemiju San Antonio 2005. godine, uspješno je proveo analizu kationa u pustinjskom tlu pustinje Atacama (Čile) metodom elektroforeze na mikročipu C⁴D detektorom. Sažeti rezultati njihovog istraživanja prikazani su u Tablici 2. [8].

Tablica 2. Koncentracije kationa u uzorku tla pustinje Atacama [8].

Kationi	t _M (min)	Koncentracija (μmol/L)
NH ₄ ⁺	7,1	7
K ⁺	8,2	53
Ca ⁺	8,9	38
Na ⁺	9,3	57
Mg ²⁺	9,6	45
Li ⁺	11,0	91

Kraševac u svom diplomskom radu iz 2016. godine prikazuje rezultate ispitivanja sastava kišnice, vode iz slavine i vode iz boce. Analiza je provedena za alkalijske i zemnoalkalijske katione u vodi pomoću elektroforeze na mikročipu s $C^{4}D$ detektorom. Dobiveni rezultati pokazali su najmanju koncentraciju kationa u kišnici jer je to meka voda, dok su u vodi iz slavine koncentracije bile deset puta veće u odnosu na kišnicu. Voda iz boce bila je najtvrdja odnosno imala je najveću koncentraciju otopljenih kationa, čak sto puta više nego kišnica [3].

4.3.1 Analiza kvalitete vode

Mnogi antropološki utjecaji mogu biti ozbiljni zagađivači vode na Zemlji te je stoga vrlo važno efikasno, precizno i učestalo analizirati sastav vode. Grupe znanstvenika posljednjih godina usmjeravaju svoj rad ka unaprjeđivanju metoda za istovremenu detekciju kationa i aniona iz vode.

Wang je razvio metodu za analizu riječne vode pri čemu su određivane koncentracije kalcija i nekih aniona kao što su fosfati koji se nalaze u gnojivima koji izravno utječu na kvalitetu vode i život u vodi, analiti su detektirani pomoću $C^{4}D$ detektora.

Mai i Hauser su proučavali istovremenu separaciju anorganskih kationa i aniona u vodi iz slavine, koristeći dvostruko injektiranje za dobivanje zasebnih elektroferograma za negativno i pozitivno nabijene vrste koristeći prethodno spomenuti detekcijski sustav.

Gaudry je analizirao uzorak vode iz pogona za preradu cinka pri čemu su uzeti uzorci iz različitih faza proizvodnje. Također, je dizajnirao i uređaj za simultano određivanje aniona i kationa pomoću dvokanalne elektroforeze (DCE). Na taj način, znanstvenici su mogli analizirati i sakupljati uzorke vode iz slavine tijekom četrdeset i osam sati bez nadzora. Autori ovog rada analizirali su i druge uzorke kao što su riječna i jezerska voda, gdje su uspješno detektirali do dvadeset i tri kationa i aniona [11].

Zbog velike onečišćenosti podzemne vode koja se u Vijetnamu koristila kao izvor pitke vode, javila se potreba za brzim, povoljnim i efikasnim načinom kontrole kakvoće vode. Pham i skupina znanstvenika provela je analizu kontaminirane vode iz podzemlja pomoću sustava koji se temelji na kapilarnoj elektroforezi s kapacitivno spergnutim beskontaktnim detekcijskim sustavom $C^{4}D$. Dobiveni rezultati pokazali su uspješnu detekciju nitrata i nitrita u vodi koji su indikacija za prisutnost amonijaka, dok je pri ispitivanju koncentracije arsenovih iona uočeno otežano očitavanje podataka zbog prisutnosti željezovih kationa [17].

Mnogobrojna su istraživanja koja obuhvaćaju istovremenu separaciju kationa i aniona u prirodnim uzorcima, a jedan od razloga je što te uzorke nije potrebno obrađivati prije injektiranja. Obrada se sastoji samo od jednostavnog razrjeđivanja ili filtracije te je stoga kapilarna elektroforeza posebno pogodna za analizu vodenih uzoraka [11].

4.3.2 Medicinska dijagnostika

Istovremeno odvajanje kationa i aniona kapilarnom elektroforezom pokazalo se korisnim i u medicinskoj dijagnostici. Naime, dokazano je kako je metoda prikladna u testovima za dokazivanje pojedinih bolesti. Minijaturiziranje uređaja uvelike bi pomoglo oboljelima za njegu kod kuće. Uređaji za elektroforezu na mikročipu se mogu lako uklopiti u kompaktan oblik, male snage i proizvoditi kao jeftini instrumenti koji će oboljelima omogućiti kvalitetniji život.

Kuban i suradnici osmislili su uređaj male veličine koji je u stanju prikupiti 100 – 200 mililitara kondenzata daha za manje od dvije minute i uz pomoć C⁴D detekcijskog sustava separirati 15 anorganskih kationa i aniona u manje od tri minute. Uočene su promjene koncentracija nitrita i ostalih iona kod oboljelih od kronične opstruktivne bolesti pluća i osoba oboljelih od akutne prehlade, a kao simptom osobe su imale akutni kašalj. Autori navode kako bi metoda bila učinkovita i kod nadgledanja brzih metaboličkih procesa.

Znanstvenik Kuban nedavno je razvio i pristup za neinvazivno prikupljanje uzoraka znoja koji su analizirani istim detekcijskim sustavom. Uzorci su analizirani za kloridne, natrijeve i kalijeve ione, čije koncentracije je potrebno pratiti kod oboljelih od cistične fibroze. Metoda se pokazala učinkovita i bile su vidljive razlike u koncentracijama kod oboljelih i zdravih pojedinaca. Razvoj manjih i povoljnijih instrumenata i novih metoda kroz kratko vrijeme može biti od velike važnosti medicinskoj dijagnostici u bliskoj budućnosti. Velika prednost elektroforeze na mikročipu je i mogućnost jeftine individualizacije instrumenata prema potrebama bolesnika [11].

4.3.3 Farmaceutska primjena

Analitičke metode imaju veliku važnost u farmaceutskoj industriji jer istraživanja zahtijevaju brojne analize sastava lijeka. Farmaceutska istraživanja većinom su usmjerena ka djelotvornosti nekog lijeka. Polovicu sastojaka lijeka čine anorganske soli. Učinkovitost, fizikalno-kemijska svojstva i stabilnost lijeka ovise o prirodi i izboru ispravne soli. Dostupnost brojnih aniona i kationa čine izbor soli složenim, a kako bi se izbor smanjio potrebno je provesti analizu lijeka. Uobičajena kapilarna elektroforeza zahtijeva dvije zasebne analize, po jednu za katione i anione. No posljednjih godina unaprjeđivanjem metodologije dokazalo se kako je moguća i istovremena separacija. Lopez posljednjih godina razvija metodu za efikasnu analizu lijekova i njihovih odgovarajući iona uz pomoć $C^{4}D$ detektora. Na taj način znanstvenici su uspjeli analizirati pet različitih lijekova u svega deset minuta. Ovakvi radovi pokazuju potencijalnu primjenjivost elektroforeze na mikročipu s $C^{4}D$ detektorom u kontroli farmaceutskih pripravaka [11].

4.3.4 Forenzičke aplikacije

Istraživanje eksploziva, posljednjih godina posebno je privuklo zanimanje znanstvenika. Identifikacija eksplozivnih naprava moguća je iz analize ostataka nakon eksplozije. Improvizirani eksplozivi najčešće se sastoje od anorganskih soli koje sadrže perklorate, klorate ili nitrate, a mogu se identificirati kapilarnom elektroforezom. Minijaturiziranjem instrumenta kapilarne elektroforeze bila bi moguća jeftina, efikasna i istovremena analiza kationa i aniona na terenu u slučaju kada su potrebne brze informacije o eksplozivu.

Kobrin i suradnici su uzorkovali i analizirali ostatke eksplozije na različitim materijalima. Uzorkovanje i analiza eksploziva s $C^{4}D$ detektorom trajala je četiri minute i uspjeli su identificirati vrstu svakog detoniranog eksploziva. Metoda se pokazala korisnom i u kontroli sastava eksplozivnih naprava kao što je vatromet [11].

5 MINIJATURIZACIJA KAPILARNE ELEKTROFOREZE

Kapilarna elektroforeza na mikročipu je tehnologija budućnosti u analitičkoj kemiji jer ima nekoliko prednosti u odnosu na kapilarnu elektroforezu. Prednosti koje pruža minijaturizacija su skraćeno vrijeme analize, ekološki prihvatljivija metoda, ekonomičnost i mogućnost rada na terenu. Unatoč svim prednostima koje su navedene, ne treba zanemariti i nedostatke koji ograničavaju sposobnost detekcije i provedbe separacije, te tako onemogućavaju pravilno injektiranje i separaciju uzorka, koji su vrlo bitni za preciznost ove metode [18].

5.1 Prednosti elektroforeze na mikročipu

Prednosti koje proizlaze iz same minijaturizacije su skraćeno vrijeme analize i reducirana potrošnja uzoraka i reagenasa. Separacija traje svega nekoliko minuta, što povećava njezinu efikasnost i funkcionalnost u odnosu na kapilarnu elektroforezu. Brza analiza omogućava laku uočljivost promjene uvjeta koja je odmah vidljiva. Mikročipovi korišteni za ovu vrstu elektroforeze zahtijevaju količine u pikolitrima za uzorak i mikrolitrama za ostale reagense što omogućuje korištenje skupih reagenasa i korištenje uzoraka kojih je moguće dobiti u vrlo malim količinama. U budućnosti se predviđa integracija više različitih procesa u jednom uređaju, što podrazumijeva ekstrakciju ili pročišćavanje uzorka, miješanje te reagiranje s ostalim reagensima, separaciju, te konačno detekciju. Do danas se elektroforeza na mikročipu pokazala najpraktičnijom separacijskom metodom za razvoj prijenosnog sustava za separacijsku analizu jer ne zahtijeva korištenje crpki i sličnih dijelova za poticanje toka fluida [18].

5.2 Nedostatci elektroforeze na mikročipu

Poteškoće na koje se nailazi tijekom izvođenja elektroforeze na mikročipu su ograničena separacijska učinkovitost i nereproducibilno injektiranje. Prema teoriji, kraći putovi separacije su povoljniji, jer nabijena vrsta dolazi do detektora u kraćem vremenskom periodu i prema tome ima manje vrijeme difuzije. Međutim, u praksi su prisutni i drugi izvori raspršivanja, te ukoliko doprinos jednog od njih bude značajan, mjerenje neće biti precizno.

Elektrokinetičko injektiranje je najzastupljeniji način nanošenja uzorka na mikročip, budući da nije potrebno korištenje dodatnih mehaničkih uređaja. Uzorak se injektira u kanal za uzorak primjenom električnog polja pod određenim naponom. Nakon dodatka uzorka, slijedi separacija nabijenih vrsta isto tako pod utjecajem električnog polja određene jakosti. Duljina puta injektiranja ovisna je o vremenu injektiranja. Zatim, količinu injektiranog uzorka ne možemo sa sigurnošću odrediti, budući da dio uzorka tijekom nanošenja, iscuri u injekcijski kanal, a dio tijekom separacije. Moguće je napraviti usporedbu na temelju dobivenog elektroferograma, integriranjem površina dobivenih pikova. Radom na unaprjeđenju ove metode, razvijaju se različite strategije za usavršavanje reproducibilnosti injektiranja [18].

6 ZAKLJUČAK

Elektroforeza na mikročipu je jednostavna metoda visoke rezolucije, kojom je omogućena separacija nabijenih vrsta na osnovu njihove električne vodljivosti. Analizom kationa zabilježeno je kako su kationi s najvišom pozitivnom vodljivosti migrirali prvi, pri čemu ih slijede kationi sa nižim pozitivnim nabojem. Uočeno je kako je teže postići čitljiv rezultat prilikom separacije kationa sličnih vrijednosti separacije. Podaci o koncentraciji kationa u uzorku dobiveni su čitanjem serije pikova, koje bilježi detektor nakon primanja signala uzrokovanog promjenom električne vodljivosti u analitu.

Razvojem i minijaturizacijom kapilarne elektroforeze razvijena je precizna, točna i efikasna metoda koja se pokazala učinkovitom, prilikom analize uzoraka s anorganskim kationima. Prednosti koje pruža ova metoda ispitane su tijekom analize vode, u medicinskoj dijagnostici, farmaceutskoj industriji i forenzici. Za očekivati je kako će u bliskoj budućnosti biti omogućena komercijalizacija uređaja za elektroforezu na mikročipu, koja će uvelike poboljšati kvalitetu života oboljelih pojedinaca.

Poboljšanjem kvalitete mikročipova, njihove geometrije, pronalaskom adekvatnog materijala za izradu, te unaprjeđenjem detekcijskih sustava, moći će se detektirati vrlo niske koncentracije tvari. Unatoč određenim tehničkim nedostacima koje su prisutne tijekom analize i koje ostavljaju prostor za napredak, ova metoda ima ogromni potencijal u analitičkoj kemiji.

7 LITERATURA

- [1] D. Grdenić, Povijest kemije, Školska knjiga, Zagreb, 2001.
- [2] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4d/Autoprotolyse_eau_simpliffee.svg (20.4.2020.)
- [3] M. Kraševac, Određivanje kationa u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu sa C⁴D detektorom, diplomski rad, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer, Odjel za kemiju, Osijek, 2016.
- [4] T. Bolanča, Š. Ukić: Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [5] I. Piljac, Elektroforeza, Media Print, Zagreb, 2006.
- [6] L. Dončević, Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina, Doktorska dizertacija, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2017.
- [7] M. Damić, B. Nigović, Kapilarna elektroforeza u farmaciji, Farmaceutski glasnik, Hrvatsko farmaceutsko društvo, Zagreb, 2010., 195-207.
- [8] T. P. Segato, S.A. Bhakta, M. T. Gordon, E. Carrilho, P. A. Willis, H. Jiaod, C. D. Garcia., Microfab-less microfluidic capillary electrophoresis devices, Analytical Methods, 5 (2013), 1631 – 1888.
- [9] S. Luterotti, D. Bičanić, Odabrane teme iz bioanalitike, skripta, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.
- [10] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove Analitičke Kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [11] J. Koenka, T. D. Mai, P. C. Hauser, J. Saizt, Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis – recent applications, Analytical Methods, 8 (2016.) 1439-1730.
- [12] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper, Contact conductivity detection in poly (methyl methacrylate)-based microfluidic devices for analysis of mono-and polyanionic molecules, Anal Chem., 74 (2002) 2407 – 2415.
- [13] J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M. A. Schwarz, P. C. Hauser, Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis, Analyst, 127 (2002) 214-218.

- [14] M. Štefanović, Elektroforetske separacije nukleinskih kiselina, HKMB priručnik, Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, (Ž. Debeljak), Medicinska naklada, Zagreb, 2018., 53-72.
- [15] http://www.edaq.com/product_sheets/hardware/ER225_C4D_Data_System.pdf (25.4.2020.)
- [16] https://www.researchgate.net/figure/8015278_fig7_Glass-microchip-Micralyne-Inc-with-double-T-intersection (5.5.2020.)
- [17] H. A. Duong, M. D. Le, K. D. M. Nguyen, P. C. Hauser, H. V. Pham, T. D. Mai, In-house-made capillary electrophoresis instruments coupled with contactless conductivity detection as a simple and inexpensive solution for water analysis: a case study in Vietnam, Environmental Science: Processes & Impacts, Royal Society of Chemistry, London, 2015., 1941-1951.
- [18] M. Vlcková, Microchip electrophoresis bioanalytical applications, doktorska dizertacija, Sveučilište Basel, Basel, 2008.