Primjena elektroforeze na mikročipu za određivanje anorganskih analita

Jakić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:182:318679

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski sveučilišni studij Kemija;

smjer: nastavnički

Marija Jakić

PRIMJENA ELEKTROFOREZE NA MIKROČIPU ZA ODREĐIVANJE ANORGANSKIH ANALITA

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski sveučilišni studij Kemija;

smjer: nastavnički

Marija Jakić

PRIMJENA ELEKTROFOREZE NA MIKROČIPU ZA ODREĐIVANJE ANORGANSKIH ANALITA

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Marija Jozanović

Osijek, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom doc. dr. sc. Marije Jozanović. Rad je predan stručnom vijeću na ocjenu radi stjecanja diplome magistra edukacije iz područja kemije.

Zahvala

Najprije se od srca želim zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Mariji Jozanović, koja je uz mene još od mog završnog rada. Veliko Vam hvala na strpljenju, podršci i svim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Hvala Vam na svom odvojenom vremenu koje ste mi priuštili, te omogućili sudjelovanje na raznim smotrama i kongresima, i u konačnici obranu ovog diplomskog rada! Bilo mi je iznimno drago surađivati s Vama !

Također se želim zahvaliti i kolegici Ivi Pukleš, koja je uz sve svoje obaveze, uvijek pronašla vrijeme za odgovore na moja pitanja i bila uz mene tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Po završetku svog fakultetskog obrazovanja, želim se zahvaliti i svim ostalim djelatnicima Odjela za kemiju na stručnom vođenju i edukaciji koju su mi pružili tijekom vremena studiranja.

Posebno se želim zahvaliti i svojoj obitelji i svom zaručniku, koji su svojim strpljenjem i odricanjem omogućili da danas stojim ovdje pred vama i branim svoj diplomski rad. Veliko vam hvala na svemu jer bez vas ovo ne bi bilo moguće!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Diplomski sveučilišni studij Kemija;
smjer: nastavnički
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

PRIMJENA ELEKTROFOREZE NA MIKROČIPU ZA ODREĐIVANJE ANORGANSKIH ANALITA

Marija Jakić

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Marija Jozanović

SAŽETAK

Minijaturizacijom kapilarne elektroforeze nastala je elektroforeza na mikročipu. Separacija nabijenih vrsta odvija se u separacijskom mikrokanalu pod utjecajem električnog polja.

Cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti separacije kalija u dijetetskim suplementima elektroforezom na mikročipu.

Dijetetski suplementi su dodaci prehrani koji su spravljeni od koncentriranih izvora hranjivih tvari. Zbog njihove sve lakše dostupnosti na tržištu i povećanja broja potrošača, pojavila se potreba za njihovom preciznom analizom.

U prikazanom radu ispitana je mogućnost detekcije i separacije kalija u dijetetskim suplementima. Za detekciju je korišten C^4D detektor, a kao pozadinski elektrolit octena kiselina kiselina *($c = 0,5\ mol/dm^3$)*. Uz pomoć linearne regresijske analize utvrđen je linearni odziv.

Metodički dio rada obuhvaća pripremu za nastavni sat „Elektroforeza i hemodijaliza“. Nastavni sat sadrži kombinaciju frontalnog, individualnog i grupnog rada. Pomoću individualnog rada nastoji se osamostaliti učenike i naglasiti posebnost svakog pojedinca, dok se kroz grupni rad i rad u paru, potiče razumijevanje gradiva i razvoj socijalnih kompetencija učenika.

Diplomski rad obuhvaća: Stranica: 66; Slika: 19 ; Tablica: 8 , Literaturnih navoda: 46
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: kalij / dijetetski suplementi / C^4D detektor / elektroforeza na mikročipu
Rad prihvaćen: 5. 7. 2022.
Datum obrane: 19. 7. 2022.
Sastav povjerenstva za obranu: 1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
2. doc. dr. sc. Marija Jozanović
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
4. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; educational programme
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

APPLICATION OF MICROCHIP ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF INORGANIC ANALYTES

Marija Jakić

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Marija Jozanović, Ph. D., assistant prof.

ABSTRACT

Microchip electrophoresis was created by miniaturization of capillary electrophoresis. The separation of charged species takes place in the separation microchannel under the influence of an electric field.

The aim of this work is to investigate the possibility of potassium separation in children's supplements by electrophoresis on a microchip.

Dietary supplements are nutritional supplements made from concentrated sources of nutrients. Due to their increasingly easy availability on the market and the increase in the number of consumers, the need for their precise analysis has risen.

The presented paper examines the possibility of detecting and separating potassium in dietary supplements. A C^4D detector was used for detection, and *($c = 0,5\ mol/dm^3$)* acetic acid was used as the background electrolyte. With the help of linear regression analysis, a linear response was determined.

The methodological part of the work includes preparation for the "Electrophoresis and Hemodialysis" lesson. The lesson contains a combination of face-to-face, individual, and group work. Individual work is used to make students independent and emphasize the uniqueness of each individual, while through group work and pair work, the understanding of the material and the development of students' social competences are encouraged.

Thesis includes: pages: 66; pictures: 18; tables: 8, references: 46
Original in: Croatian
Keywords: potassium / C^4D detector / supplements / microchip electrophoresis
Thesis accepted: 5. 7. 2022.
Thesis defence: 19. 7. 2022.
Reviewers: 1. Mirela Samardžić, Ph. D., Associate Prof.
2. Marija Jozanović, Ph. D. Assistant Professor
3. Elvira Kovač-Andrić, Ph. D., Associate Prof.
4. Aleksandar Sečenji, Ph. D. Assistant Professor

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača, Osijek, Croatia

SADRŽAJ

1. Uvod ... 1
2. Literaturni pregled ... 3
   2.1 Dijetetski suplementi ... 4
   2.2 Kalij u dijetetskim suplementima ... 5
      2.2.1 Metode određivanja kalija u dijetetskim suplementima ... 6
   2.3 Elektroforeza ... 11
      2.3.1 Princip rada ... 11
      2.3.2 Vrste elektroforeze ... 13
      2.3.3 Elektroforeza na mikročipu ... 13
      2.3.4 Određivanje anorganskih analita kapilarnom i elektroforezom na mikročipu 16
   2.4 Primjena elektroforeze na mikročipu za separaciju i kvantifikaciju kalija ... 17
      2.4.1 Detekcijski sustavi ... 19
      2.4.2 Optimiranje separacije kalija u realnim uzorcima ... 20
      2.4.3 Primjena C^4D detekcijskog sustava za detekciju kalija ... 22
3. Eksperimentalni dio ... 24
   3.1 Uređaji i pribor ... 25
      3.1.1 C^4D detektor (engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection*, CCCCD, C^4D) ... 25
      3.1.2 HV Sekvencer ... 26
      3.1.3 Platforma mikročipa (ET121) ... 27
      3.1.4 Mikročip (02-0750-0082-01) ... 27
      3.1.5 Ostali pribor ... 28
   3.2 Popis korištenih kemikalija ... 30
   3.3 Priprema otopina ... 30
      3.3.1 Priprema otopine octene kiseline koncentracije 0,5 mol/dm^3 ... 30
      3.3.2 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-2} mol/dm^3 ... 30
      3.3.3 Priprema otopine KCl koncentracije 5 x 10^{-4} mol/dm^3 ... 30
      3.3.4 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-4} mol/dm^3 ... 31
      3.3.5 Priprema otopine KCl koncentracije 7,5 x 10^{-5} mol/dm^3 ... 31
      3.3.6 Priprema otopine KCl koncentracije 5 x 10^{-5} mol/dm^3 ... 31
      3.3.7 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-5} mol/dm^3 ... 31
      3.3.8 Priprema otopine realnog uzorka ... 31
   3.4 Postupak mjerenja ... 32

4. Rezultati i rasprava 33
4.1 Bazna linija 34
4.2 Baždarni pravac za kalij 35
4.3 Određivanje sadržaja kalija u suplementima elektroforezom na mikročipu 37
5. Metodička obrada nastavne jedinice „Elektroforeza i hemodijaliza“ 41
5.1 Priprema za nastavni sat 42
5.2 Struktura nastavnog sata 43
5.3 Plan učeničkog zapisa 44
5.4 Radni listići 45
5.4.1 Radni listić 1. - Vrste koloidnih sustava 45
5.4.2 Radni listić 2. Pitanja za ponavljanje i domaću zadaću 45
5.4.3 Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje na početku sata 47
5.4.4 Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje i domaću zadaću 47
6. Zaključak 51
7. Literatura 53
8. Životopis 57

1. Uvod

Analitička metoda kojom se separiraju komponente iz neke smjese pomoću električnog polja naziva se elektroforeza. Spomenuta elektrokemijska i elektroanalitička metoda danas je široko rasprostranjena, te se kontinuirano razvija i nadograđuje, a najčešće je korištena u istraživanjima iz područja biokemije, molekularne biologije i analitičke kemije. Elektroforeza je primjenjiva za separaciju nabijenih analita, to jest moguće je separirati komponente smjesa koje sadrže nabijene aminokiseline, proteine, šećere, nukleinske kiseline, te anorganske katione ili anione. Razlog zašto se ova metoda često nadograđuje, te zauzima veliki interes znanstvenika, je težnja za otkrićem što jednostavnijih, ekološki prihvatljivijih i ekonomičnijih metoda. Vođenjem tom idejom nastala je i elektroforeza na mikročipu. Elektroforeza na mikročipu je jednostavno, minijaturizirana kapilarna elektroforeza, koja ispunjava kriterije analitičkih metoda današnjice.

Cilj ovog rada je ispitati primjenjivost elektroforeze na mikročipu za anorganske analite, odnosno ispitati mogućnost separacije kalija u uzorcima dodataka prehrani, to jest u dijetetskim suplementima.

2. Literaturni pregled

2.1 Dijetetski suplementi

Dijetetski suplementi su dodaci prehrani koji su spravljeni od koncentriranih izvora hranjivih tvari ili tvari s fiziološkim djelovanjem u svrhu očuvanja zdravlja. Mogu biti u doziranom obliku (kapsule, tablete i sl.) ili u obliku praha, granula ili tekućine koji se konzumiraju u određenim količinama [1].

Dodaci prehrani prvi puta su zakonski regulirani 1994. u SAD–u, kada je Američka agencija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) definirala dijetetske suplemente kao nadopunu pravilnoj ishrani, pri čemu je posebno istaknuto da je potrebno da nose oznaku dijetetski suplementi i da ne mogu zamijeniti pojedinačne obroke. Regulativa u Europskoj Uniji ima nedostataka u pogledu usklađivanja propisa zemalja članica u vezi dijetetskih suplemenata. Naime, maksimalne dozvoljene količine vitamina i minerala nisu bile usklađene na razini EU. Zato je donesena direktiva 2002/46/EZ europskog parlamenta i vijeća o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani. U toj direktivi, također su navedeni u prilogu I. i II. svi vitamini i minerali, te vitaminske i mineralne tvari koje se smiju koristiti u proizvodnji dodataka prehrani. Ipak, zakonske regulative u Europskoj Uniji, a niti u Republici Hrvatskoj nisu dovoljno precizirane što navodi Proso u svom radu iz 2020. godine [2]. Proso ukazuje na problem deklariranja i kontaminacije dijetetskih suplemenata, što se očituje kao problem kod prehrane sportaša. Naime, u slobodnoj prodaji mogu se pronaći dodaci prehrani koji sadrže anaboličke steroide, stimulanse i druge tvari karakteristične za doping [2]. Isto tako valja istaknuti problem lake dostupnosti suplemenata, jer s obzirom na regulativu koja navodi kako su dijetetski suplementi namirnice, dodatke prehrane moguće je pronaći osim u specijaliziranim ljekarnama i u drogerijama i samoposlugama. U rezultatima provedenog istraživanja, iz 2016. godine, Sertić i suradnici upozoravaju na izrazito nisku razinu osviještenosti ispitanika o dodacima prehrani namijenjenih djeci [3]. Ispitanicima izostaje znanje o mogućim nuspojavama dijetetskih suplemenata, a glavni razlog tomu je što se o dodacima prehrane informiraju putem reklama, interneta i sličnih izvora, a ne u ljekarnama kod farmaceutskih stručnjaka [3].

Najčešće korištene analitičke metode za kvantifikaciju dijetetskih suplemenata su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti *(engl. High performance liquid chromatography, - HPLC),* kapilarna elektroforeza i masena spektroskopija. Navedene metode su izrazito točne i precizne, ali su jednako tako kompleksne, iziskuju puno sredstava i veliku potrošnju otrovnih otapala, što ih čini ekološki neprihvatljivim. Zbog navedenih nedostataka, danas znanstvenici ulažu velike napore u dizajniranje novih, ekonomski i ekološki prihvatljivijih metoda, a jedna od takvih metoda je elektroforeza na mikročipu.

2.2 Kalij u dijetetskim suplementima

Kalij je kemijski element koji se u periodnom sustavu nalazi u skupini alkalijskih metala. Otkriven je 1796. godine, uz natrij, a elementarni kalij izolirao je H. Davy početkom 19. stoljeća, elektrolizom taline kalijevog hidroksida [4]. Spojevi kalija poznati su još od biblijskih vremena, kada su se koristili u izradi sapuna, dok su ih Kinezi koristili za dobivanje eksploziva, to jest baruta.

Kalij je vrlo mekan metal, srebrno – bijele boje, stabilan na suhom zraku, ali s vodom reagira burno, pri čemu se razvija vodik. Na zemlji je vrlo rasprostranjen te se nalazi u sastavu mnogih stijena i minerala, a također se nalazi u sastavu svih biljnih i životinjskih organizama. Kalij je vrlo bitan makroelement u organizmu čovjeka, te je po zastupljenosti elektrolita u ljudskom tijelu, treći po redu [5]. Njegova uloga je aktivacija enzima ATP–aze, koji regulira prijenos Na^+ i K^+ iona kroz membranu stanice. Unutar svih životinjskih stanica, koncentracija kalija je visoka, dok je ta koncentracija izvan stanice znatno manja. Ovakav koncentracijski gradijent omogućuje aktivni transport tvari između celularnog i ekstracelularnog prostora, te regulaciju količine vode u stanicama. Kalij je esencijalan element za normalan rad srčanog mišića i cijelog živčanog sustava jer kao i ostali elektroliti, omogućuje prijenos živčanih impulsa [6]. Kod normalne prehrane, unosi se dnevno približno 100 mmola kalijevih iona, pri čemu se najveći dio izlučuje putem mokraće, a za normalnu regulaciju kalija u krvi zadužena je nadbubrežna žlijezda. Prema tome, omjer koncentracije natrijevih i kalijevih iona u mokraći, dobar je pokazatelj, funkcije nadbubrežne žlijezde [6].

Čovjek u svoj organizam unosi kalij uglavnom biljnom hranom, kao što su banane, zeleno lisnato povrće i cjelovite žitarice. Kako bi bila održana fiziološka ravnoteža, dnevni unos kalija treba biti malo iznad ili na istom nivou s njegovim izlučivanjem. Ukoliko, je ta ravnoteža narušena, može doći do hipokalemije, nedostatka kalija ili hiperkalemije, nakupljanja kalija u organizmu. Hipokalemija se očituje umorom, slabosti mišića te zatvorom, dok se hiperkalemija odnosi na srčane probleme i tegobe u mišićima. S obzirom na današnju prehranu i užurbani način života, često se javlja nedostatak kalija u krvi, koji suvremena populacija pokušava nadomjestiti unosom dijetetskih suplementa, a neki od njih prikazani su na slici 1.



·**Slika 1**. Dijetetski suplementi koji u svom sastavu sadrže kalij.

[7], [8], [9]

2.2.1 Metode određivanja kalija u dijetetskim suplementima

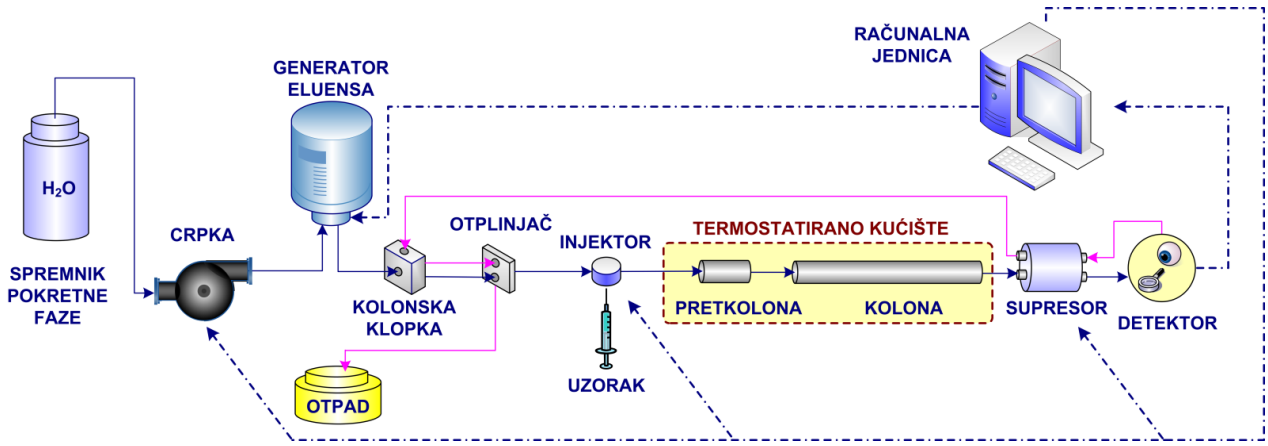
Vrlo je bitno uspješno i pouzdano mjeriti i analizirati sastav dodataka prehrani i drugih farmaceutskih pripravaka. Kako bi se detaljno analizirao sastav kationa ili aniona u nekoj smjesi, to jest u dijetetskom suplementu, potrebno je izvršiti detekciju i kvantifikaciju prisutnih analita nekom od primjenjivih analitičkih metoda.

Neke od najuspješnijih metoda za detekciju i odjeljivanje nabijenih vrsta u smjesi su:

a. ionska kromatografija
b. spektrometrijska analiza
c. kapilarna elektroforeza [10]

2.2.1.1 Ionska kromaografija

Ionska kromatografija je analitička metoda, koja omogućuje detekciju, separaciju i kvantifikaciju nabijenih analita. Princip rada zasniva se na razdvajanju smjese između dvije faze: stacionarne i mobilne. Razdvajanje sastojaka iz smjese ovisi o brzini kojom ih mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze [11]. Na slici 2, shematski je prikazan moderni ionski kromatografski sustav, gdje je vidljivo kako se kao pokretna faza koristi voda, koja protječe sustavom uz pomoć crpke. Idući u nizu je generator eluensa u koji se dodaje pripremljeni eluens, koji isto kao i voda protječe dalje u sustav. Kolonsku klopku sadrži svaki ionski kromatografski sustav koji sadrži jedinicu za generiranje eluensa, jer klopka uklanja smetajuće ionske vrste i reducira pozadinske šumove. Pomoću otplinjivača se uklanjaju plinovi iz eluensa koji odlaze u otpad. Injektorska jedinica služi kako bi se uzorak uveo u tok eluensa i dalje bio nošen pokretnom fazom, to jest vodom. Unutar termostatiranog kućišta dolazi do razdvajanja nabijenih vrsta iz uzorka, koje po izlasku iz kolone nailaze na supresor, zadužen za još jedno smanjenje pozadinskog šuma i konačno detektor koji skuplja signale koji se obrađuju u računalnoj jedinici [11].



Slika 2. Grafički prikaz modernog ionskog kromatografa [11].

Danas je ionska kromatografija često korištena i široko rasprostranjena separacijska metoda. Prvi znanstvenici koji su predstavili ovu metodu bili su Small, Stevens i Bauman [11], te je ova metoda vrlo brzo postala metoda za određivanje niza kationa i aniona u uzorcima. Ionska kromatografija ima veliku važnost i primjenjuje se gotovo u svim prirodoslovnim, kemijskim ili farmaceutskim laboratorijima [11].

2.2.1.2 Spektrometrijska analiza

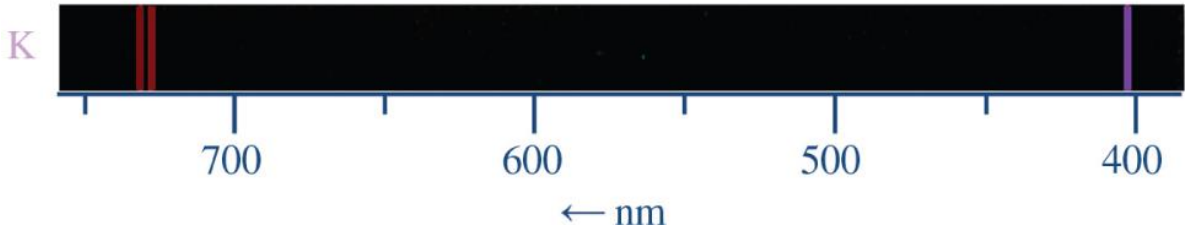
Spektrometrijska analiza se odnosi na primjenu spektroskopskih tehnika kako bi se odredili kemijski sastav i struktura neke tvari. Uz pomoć spektrometrijskih instrumenata i položaja spektralnih linija moguće je odrediti kvalitativni sastav, dok je za kvantitativnu kemijsku analizu potrebno odrediti intenzitet spektralnih linija. Spektrometrijske analize dijele se na emisijske i apsorpcijske metode [12].

Sveukupna spektrometrijska analiza svodi se na dobivanje spektra i identifikaciju promatranih linija. Najprije je potrebno uzorak staviti u izvor za ekscitaciju, gdje se odvija separacija na atome, a atomi se zatim pobuđuju i zrače svijetlost. Emitirana svjetlost, prolazi kroz spektralni aparat koji separira valne duljine i identificira spektralne linije. Prije same provedbe metode, potrebno je pripremiti uzorak za analizu i izabrati izvor za ekscitaciju [13].

Posljednjih godina se različite spektormetrijske tehnike primjenjuju u biokemiji, medicini, forenzici, fizici i mnogim drugim prirodnim znanostima. U ovom odlomku biti će istaknuta atomska spektroskopija, jer je to najčešće korištena metoda prilikom određivanja kemijskih elemenata. Svaki atom, određenog elementa, ima karakterističan položaj linije u spektru, to jest vrijednost valne duljine, te intenzitet linije ovisno o njegovoj koncentraciji [14]. Atomska apsorpcijska spektroskopija, temelji se na apsorpciji zračenja vidljivog ili ultraljubičastog spektra, koje prolazi kroz sloj atoma u osnovnom stanju. Emitirano zračenje se djelomično apsorbira prolaskom kroz atomsku paru, što za rezultat ima karakterističan spektar nekog elementa. Apsorpcijska atomska spektrometrija najčešće je korištena metoda za kvantitativno određivanje metala u uzorcima poput vode, hrane i dodataka prehrani. Atomska emisijska spektrometrija zasniva se na pobuđivanju atoma uz pomoć nekog izvora toplinske energije.

Na taj način će se dio pojedinih atoma vratiti u osnovno stanje nakon nekog vremena, te će pri tome emitirati karakteristično elektromagnetsko zračenje, dok će ostatak izgubiti energiju

pobuđenog stanja u sudaru s drugim česticama. S obzirom na valnu duljinu emitiranog zračenja, moguće je odrediti i svojstva tih atoma. Ova metoda analize, temeljena na atomskoj emisiji koristi se za detekciju alkalijskih i zemnoalkalijskih metala kao što je kalij [15]. Na slici 3 prikazan je emisijski spektar kalija, što je konačan rezultat atomske emisijske spektrometrije kalija.



Slika 3. Emisijski spektar kalija [16]

2.2.1.3 Kapilarna elektroforeza

Izrazito zastupljena elektroforetska metoda, kojom se uz pomoć električnog polja u uskoj kapilari odvija separacija ionskih vrsta nekog uzorka, naziva se kapilarna elektroforeza. Ova metoda prvi put je predstavljena 1981. godine, prilikom separacije peptida i proteina [18]. Kapilarna elektroforeza temelji se na protoku iona kroz elektrolit, prema jednoj od elektroda, pri čemu na ione utječe električno polje visokog potencijala, te se separacija odvija u uskoj kapilari [17]. Brzina kojom nabijene specije putuju v_{ep} proporcionalna je elektroforetskoj mobilnosti čestice μ_{ep} i jakosti električnog polja koje se primjenjuje E, što je vidljivo iz izraza :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \bullet E \qquad (1).$$

Jakost električnog polja E proporcionalna je primijenjenom naponu V u voltima, a obrnuto proporcionalna s duljinom kapilare L izraženom u centimetrima (jednadžba 2).

$$E = \frac{V}{L} \qquad (2).$$

Elektroforetska mobilnost μ_{ep} dana je izrazom:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3).$$

gdje je q naboj iona, r polumjer istog, a η viskoznost elektrolita.

Spajanjem izraza 1, 2 i 3, dobije se izraz za brzinu kojom ioni putuju prema elektrodi :

$$v_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \bullet \frac{V}{L} \quad (4).$$

Iz izraza 4 moguće je zaključiti kako brzina kojom ioni putuju u elektrolitu pod utjecajem električnog polja, ovisi o naboju i radijusu iona [18].

S obzirom na način razdvajanja analita, razlikuje se nekoliko vrsta kapilarne elektroforeze prikazanih u tablici 1.

Tablica 1. Vrste kapilarne elektroforeze [18].

VRSTA KAPILARNE ELEKTROFOREZE	**VRSTE ANALITA**
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

U usporedbi s tradicionalnim analitičkim metodama, kapilarna elektroforeza je brža, ekonomičnija i ekološki prihvatljivija. Zbog navedenih prednosti, ova metoda je danas široko rasprostranjena i često korištena u analizi velikih molekula poput hormona, anorganskih iona, lijekova ili biomolekula [17].

2.3 Elektroforeza

Elektroforeza je separacijska metoda koja objedinjuje elektrokemijski i elektroanalitički proces. Naime, riječ je o metodi koja se temelji na pokretljivosti nabijenih specija u pozadinskom elektrolitu, pod utjecajem električnog polja. Početkom 19. stoljeća, ovu pojavu je prvi opazio F. F. Reuss [19], prilikom proučavanja čestica gline, raspršenih u vodi. Reuss je uočio kako se čestice gline gibaju u vodi pod utjecajem električnog polja, te da su ta gibanja ovisna o naboju, veličini i obliku molekule. Osim navedenih parametara, gibanje nabijenih čestica ovisi i o viskoznosti i temperaturi medija u kojem putuju. 1948. godine, Arne Tiselius, dobiva Nobelovu nagradu za svoj rad iz područja elektroforeze. Naime, Tiselius je prvi osmislio i izradio aparaturu za izvođenje elektroforeze, te razdvojio serumske albumine i globuline [19].

Danas je elektroforeza široko rasprostranjena metoda koju poznaje gotovo svaki laboratoriji, ali unatoč tome, elektroforetske metode su još uvijek neiscrpan izvor mnogim znanstvenicima i glavna tema mnogih radova i istraživanja. Rezultat kontinuiranog rada na unaprjeđivanju ove metode, doveo je do raznovrsne podjele elektroforetskih metoda.

2.3.1 Princip rada

Za uspješnu primjenu elektroforeze u različitim istraživanjima, ključno je poznavati teorijske osnove elektroforeze kako bi se mogli mijenjati uvjeti i u konačnici dobiti valjani i željeni rezultati. Mnogo je faktora koji utječu na način i brzinu kretanja iona u otopini pozadinskog elektrolita, a to dokazuje izvedeni izraz za elektroforetsku mobinost.

Električno polje, jakosti *E,* nastaje spajanjem dviju elektroda, te povezivanjem istih na izvor struje, pri čemu nastalo električno polje djeluje silom *F* na nabijene specije. Iznos pogonske sile unutar elektroforetskog procesa, dan je sljedećim izrazom:

$$F = Eq \tag{5}.$$

Gibanje čestica, odnosno sudar čestica, uzrokuje silu trenja F_{tr} , koja je dana Stokesovim zakonom o utjecaju sile na čestice sfernog oblika :

$$F_{tr} = 6\,\pi\eta r\,v \tag{6}.$$

Izjednači li se izraz 5 s izrazom 6, dobiti će se izraz za brzinu gibanja čestice u elektrolitu:

$$v = \frac{Eq}{6\pi\eta r} \tag{7}.$$

Iz dobivenog izraza 7, vidljivo je kako je brzina nabijenih čestica proporcionalna jakosti električnog polja E i količini naboja q, dok je obrnuto proporcionalna viskoznosti elektrolita η, te veličini, odnosno radijusu čestice r.

Nadalje, jakost električnog polja E dana je izrazom, omjerom napona U i udaljenost među elektrodama d :

$$E = \frac{U}{d} \tag{8}.$$

Kako bi se izvela konačna formula za brzinu kojom se čestica giba u elektroforetskom procesu v, potrebno je definirati i elektroforetsku mobilnost μ koja je dana izrazom:

$$\mu = \frac{d}{tE} \tag{9}.$$

Ukoliko se uzme u obzir da je omjer prijeđenog put d i nekog vremena t, jednak brzini koju čestica prijeđe, iz toga slijedi:

$$\mu = \frac{v}{E} \tag{10}.$$

Izvođenjem formule 10, dobiva se konačan izraz za brzinu čestice [19].

$$v = \mu E \tag{11}.$$

2.3.2 Vrste elektroforeze

Elektroforezu je moguće podijeliti na osnovi mnogih kriterija. S obzirom na napon dijeli se na standardnu i visokonaponsku, ukoliko postoji nosač onda je to zonska elektroforeza, a ako ne postoji nosač onda je to slobodna elektroforeza. Elektroforetske metode moguće je podijeliti i s obzirom na dimenzije, pa se razlikuju jednodimenzionalna ili dvodimenzionalna, dok se obzirom na položaj komore, dijele na horizontalnu i vertikalnu [20]. Gruba podjela elektroforetski metoda prikazana je u tablici 2. Bez obzira na šaroliku raspodjelu i mnogobrojne podvrste elektroforetskih metoda, glavni cilj svih ovih metoda je razdijeliti uzorak, to jest nabijene vrste unutar uzorka, na temelju kojih se dobiva analitički podatak [19].

Tablica 2. Gruba podjela elektroforetskih metoda.

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

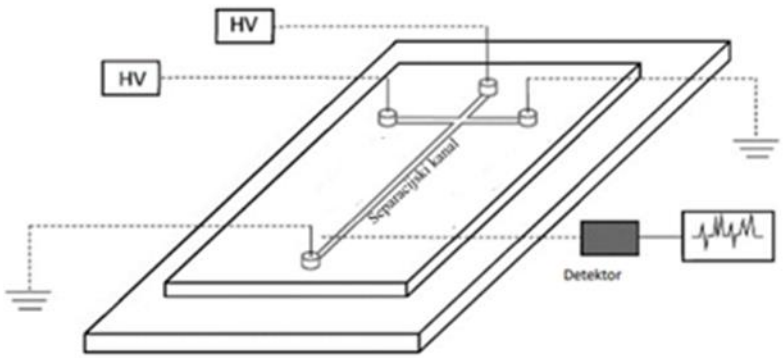
2.3.3 Elektroforeza na mikročipu

Elektroforeza na mikročipu je jedna od najranijih primjera minijaturizacije neke analitičke metode. Naime krajem 20. stoljeća, predstavljena je minijaturizirana, kapilarna elektroforeza na mikročipu [22]. Ciljevi minijaturizacije ove analitičke metode, bili su smanjiti vrijeme analize, količinu utrošenog reagensa i uzorka, te ušteda vremena i novca. Najprije se ova tehnika koristila za separaciju biomolekula kao što je DNA, no danas je ova metoda postigla određeni uspjeh te je korištena i za mnoge druge analite [21]. Separacija injektiranog uzorka se odvija u separacijskom kanalu koji se nalazi na mikročipu, dok detekciju mogu vršiti različite vrste detektora. Separacija i injektiranje se odvijaju uz točno određeni napon, pri čemu se najčešće primjenjuje elektrokinetičko injektiranje, na način da je električno polje prilikom injektiranja manje nego kod separacije. Potrebno je obratiti pažnju i na odabir dobrog pozadinskog elektrolita, ovisno o ispitivanom uzorku.

Kako bi se izbjegli pozadinski šumovi, odabiru se puferi što niže vodljivosti. Na taj način dobit će se intenzivniji pikovi te čitljiviji signali koje će dati nabijene vrste [22].

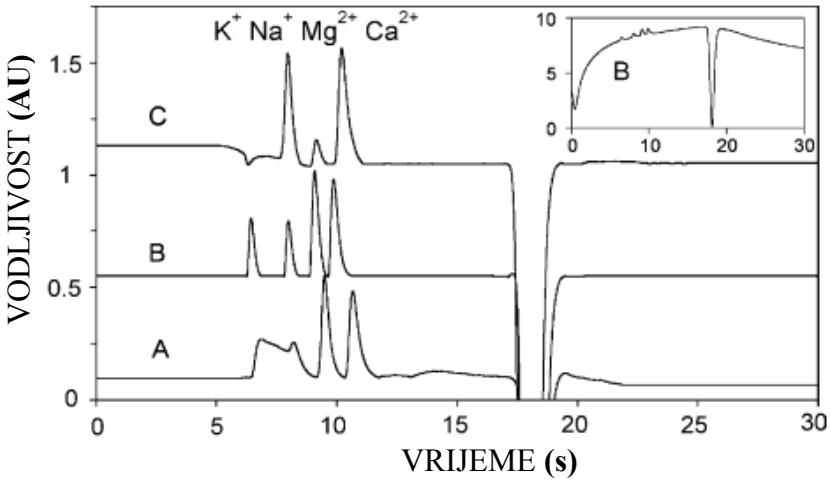
Detekcija nabijenih vrsta moguća je putem elektroda ako se koristi elektrokemijska detekcija, do kojih razdijeljeni segmenti putuju prilikom mjerenja [22]. Ovisno od pH vrijednosti pozadinskog elektrolita te prirodi analita, potrebno je izabrati materijal za izradu mikročipa, jer će o tome ovisiti uspješnost analize.

Dimenzije mikrokanala su u rasponu od 1 do 10 centimetara dužine, 30 do 200 mikrometara širine i 15 do 100 mikrometara dubine. Shematski prikaz jednog takvog mikročipa vidljiv je na slici 4. Na slici 4 su vidljiva dva kanala, duži separacijski i kraći injekcijski kanal.



Slika 4. Shematski prikaz mikročipa [23]

Vrouwe i suradnici u svom istraživanju provedenom 2006. godine ističu važnost razvijanja elektroforeze na mikročipu, te navode kako je ova metoda vrijedan dodatak već uvriježenim metodama ionskih analiza [24]. Autori su uspješno proveli ionsku separaciju u uzorcima pitke vode u vremenu od 15 sekundi. Prilikom mjerenja uočili su poteškoće kod ponovljivosti mjerenja za anione i interakcije kationskih vrsta sa staklenom površinom mikročipa. Uočili su i nešto lošiju razlučivost između iona kalija i natrija, što je moguće poboljšati modifikacijom pozadinskog elektrolita. Na slici 5 prikazani su dobiveni elektroferogrami za anorganske katione [24].



Slika 5. Elektroferogram A – kalibracijske otopine, elektrofoerogram B – metoda poznatog dodatka, KCl, elektroferogram C – uzorak vode iz slavine [24].

Početkom 2018. godine Huang i suradnici u svom radu prikazali su analizu kationa i aniona elektroforezom na mikročipu, ali su dizajnirali dva mikročipa za istovremeno odvajanje nabijenih vrsta [25]. Naime, prvi mikročip imao je zavijeni separacijski kanal, a drugi mikročip imao je kanal za odvajanje oblika Y. Oba mikročipa bila su napravljena od poli(metilmetakrilata) (PMMA) i sastojala su se od jednog kanala za injektiranje i jednog za separaciju. Separacijski mikrokanal, prvog čipa bio je dug 88 mm, 150 μm širok i 100 μm dubok. Širina i dubina Y mikrokanala bila je ista kao kod mikročipa sa savijenim kanalom. Rezultati elektroforeze na mikročipu s dva različita mikročipa, prikazani su u tablici 3 [25].

Tablica 3. Vremena migracije i površine pikova za određivanje različitih anorganskih ionskih vrsta [25].

	Mikročip sa savijenim separacijskim kanalom			Mikročip sa separacijskim kanalom Y		
Ion	Relativna standardna devijacija vremena migracije	Relativna standardna devijacija površine pika	Granica detekcije ($\mu mol/dm^3$)	Relativna standardna devijacija vremena migracije	Relativna standardna devijacija površine pika	Granica detekcije ($\mu mol/dm^3$)
K^+	1,8	6,8	20	1,6	6,4	20
Na^+	1,9	7,5	25	1,8	7,2	25
Li^+	2,6	7,1	40	2,4	7,0	40
Cl^-	0,6	3,5	50	0,6	3,4	50
F	4,8	9,1	20	4,6	8,9	20
PO_4^{3-}	3,4	7,2	40	3,3	7,0	40

2.3.4 Određivanje anorganskih analita kapilarnom i elektroforezom na mikročipu

Kapilarna elektroforeza je metoda separacije koja se odvija u uskoj kapilari, pri čemu kroz istu, ionske vrste putuju pozadinskim elektrolitom. Ioni tako putuju prema jednoj od elektroda, pod utjecajem električnog polja. Kapilarna elekroforeza je prvi puta prikazana kao prikladna metoda za analizu anorganskih analita 1990. godine [26]. Tih godina kapilarna elektroforeza bila je vrlo često uspoređivana s metodama koje su predstavljene godinama prije, kao što su ionska kromatografija i tekućinska kromatografija. Kontinuirani rad znanstvenika na unaprjeđenju ovog oblika elektroforeze, rezultirao je povećanom upotrebom kapilarne elektroforeze za detekciju ionskih vrsta male mase. Ova metoda još uvijek je aktivno područje istraživanja te se značajno razvija i unapređuje. Kapilarna elektroforeza ima primjenu u brojnim područjima istraživanja, te je priznata od strane mnogih međunarodnih agencija [26].

S vremenom je pokazano da je moguća i minijaturizacija kapilarne elektroforeze, te je osmišljena elektroforeza na mikročipu. Nova minijaturizirana metoda pokazala je prednosti u vidu jeftinije aparature, ekološke prihvatljivosti i smanjenja vremena analize.

Vrouwe i suradnici su 2004. godine osmislili metodu za određivanje litija u uzorcima krvi, pomoću elektroforeze na mikročipu [27]. Prilikom analize, kap krvi pomiješana je s antikoagulansom i prenesena na mikročip bez uklanjanja komponenti iz krvi. Granica detekcije za litiji bila je 0,4 mmol/dm^3 [27].

Kapilarna elektroforeza se često koristi u forenzičke svrhe, prilikom analize sastava eksploziva, koji su najčešće sačinjeni od anorganskih soli. Minijaturizacijom kapilarne elektroforeze omogućena je istovremena analiza eksploziva na terenu. To pokazuje i Kobrinovo istraživanje iz 2014. godine kada su uspješno analizirali ostatke eksplozije za četiri minute [28].

Unatoč svim prednostima elektroforeze na mikročipu u odnosu na kapilarnu elektroforezu, valja istaknuti i nedostatke. Separacijska učinkovitost i nereproducibilno injektiranje uvelike ograničavaju preciznost mjerenja. Naime, prema teoriji, kraći putevi bi trebali biti učinkovitiji jer će nabijena vrsta prije doći do detektora, ali u praksi, prisutni su i drugi izvori smetnji. Osim toga, potrebno je poboljšati i kvalitetu izrade mikročipova. Usprkos nedostatcima minijaturizacije kapilarne elektroforeze, ova analitička metoda ima veliki potencijal u budućnosti.

2.4 Primjena elektroforeze na mikročipu za separaciju i kvantifikaciju kalija

U posljednje vrijeme elektroforeza na mikročipu je pobudila veliko zanimanje mnogih znanstvenika. Uobičajena elektroforetska analiza na mikročipu obuhvaća injektiranje, separaciju i detekciju. Najčešće se primjenjuje elektrokinetičko injektiranje, zbog svoje jednostavnosti i ekonomičnosti, budući da ne zahtijeva dodatne mehaničke dijelove. Kada se uzorak unosi u separacijski kanal, koristi se istosmjerni napon, pri čemu je taj napon veći nego prilikom injektiranja uzorka. Razdvojene specije zatim putuju do radnih elektroda gdje će biti detektirane. Razlikuje se nekoliko vrsta detekcije, a to su: amperometrijska, konduktometrijska i potenciometrijska. Ipak, najčešće korištene metode detekcije u elektroforezi na mikročipu su amperometrijska i konduktometrijska [29].

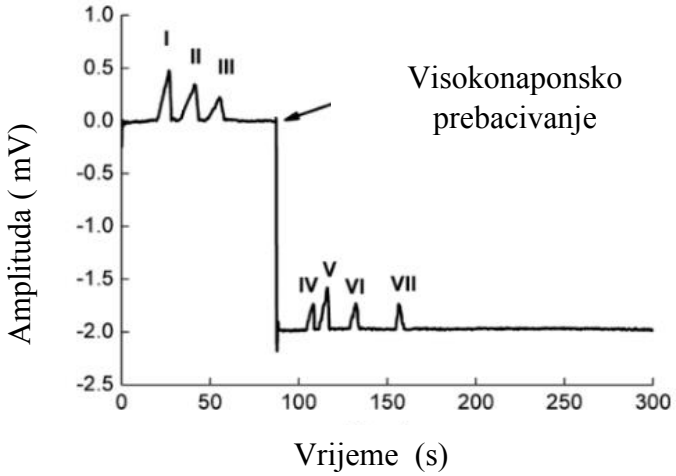
2005. godine Segato je sa suradnicima odredio koncentraciju anorganskih kationa u uzorcima pustinjskog tla iz Čilea, Atacama, primjenjujući elektroforezu na mikročipu i C^{4}D detektor. Rezultati tog istraživanja prikazani su u tablici 4 [30].

Tablica 4. Ispitivani kationi i njihove koncentracije u tlu pustinje Atacama [30].

VRSTA KATIONA	KONCENTRACIJA (μmol/L)
NH_4^+	7
K^+	53
Ca^+	38
Na^+	57
Mg^{2+}	45
Li^+	91

Nadalje, Mu X. i suradnici su 2012. godine uspješno odredili kinetiku alanin aminotransferaze elektroforezom na mikročipu, na način da se mjerila koncentracija L-alanina i L-glutamina [31]. U istraživanju su korišteni stakleni mikročipovi čiji su injekcijski kanali bili dugi 5 mm, a separacijski 40 mm, dok se za pozadinski elektrolit koristila 80 mM borna kiselina (pH 10,0). U radu Mu-a i suradnika, pokazano je kako je elektroforezom na mikročipu, moguće mjeriti aktivnost ovog vrlo važnog jetrenog enzima, alanin aminotransferaze u realnim uzorcima. Osim valjanih rezultata ovo istraživanje pruža znanje za ubrzanje istraživanja bolesti jetre [31].

Novije istraživanje, iz 2018. godine, predstavili su Huang i suradnici, gdje opisuju istovremeno određivanje kationa i aniona elektroforezom na mikročipu s C^4D detektorom [32]. Unutar 140 sekundi, s jednom separacijskom kapilarom i jednim C^4D detektorom, znanstvenici su uspjeli izvršiti separaciju smjese koja sadrži K^+, Na^+, Li^+, Cl^-, F^- i PO_4^{3-} . Na slici 6 prikazani su rezultati njihova istraživanja [32].



Slika 6. Istovremeno određivanje (I) K^+, (II) Na^+, (III) Li^+, (IV) Cl^-, (V) F^-, (VI) PO_4^{3-}. Uvjeti detekcije: 800 kHz, 20 Vpp. Pozadinski elektrolit je 20 mmol/dm^3 His/MES i 0,01 mmol/dm^3 CTAB [32] .

2.4.1 Detekcijski sustavi

S obzirom na prirodu ispitivanog uzorka i koncentraciju analita odabire se i vrsta detektora. Prilikom elektroforeze na mikročipu koriste se elektrokemijski detektori ili optički. Elektrokemijski detektori su konduktometrijski, amperometrijski i potenciometrijski detektori, dok su optički najčešće laserski detektori.

Najčešće korišteni detekcijski sustavi u procesu elektroforetske analize na mikročipu su konduktometrijski i amperometrijski. Konduktometrijski detektori mjere vodljivost elektrolita koja je proporcionalna koncentraciji otopljene tvari. Amperometrijski detektori, mjere jakost struje koja nastaje uslijed oksidacije, odnosno redukcije elektrolita, na površini radnih elektroda. Ipak, u praksi je učestalije korišten konduktometrijski detekcijsku sustav jer je moguće detektirati sve nabijene vrste koje se gibaju unutar električnog polja mikročipa, a ne samo one koje su podložne oksidacijsko – redukcijskim procesima [33].

Nadalje Kowalski i suradnici su u svom radu iz 2017. godine predstavili metodu neizravne UV detekcije na kapilarnoj elektroforezi, pri čemu su analizirali različite uzorke vode [34]. Uspješno su identificirali dvanaest metalnih kationa u vremenu od osam minuta. Prilikom mjerenja koristili su novi elektrolitski sustav čija je pH vrijednost iznosila 4, 22, a sadržavao je benzimidazole, octenu kiselinu i 18–kruna–6 eter. Autori su u istraživanju

koristili uzorke vode iz slavine, mineralne vode i uzorke medicinskih otopina za injekcije. Analize su uspješno provedene te autori zaključuju kako bi se metoda mogla uspješno koristiti i u analizi okoliša [34].

Vođeni idejama zelene kemije, brzim i efikasnim otkrivanjem mnogih zagađivača prirode, mnogi drugi znanstvenici svoj rad su usmjerili ka razvoju metode koja će zadovoljavati navedene uvjete. Tako je Wang sa suradnicima razvio metodu za istovremenu UV detekciju kalcija i nekih aniona u riječnoj vodi, koji tamo dospijevaju iz umjetnih gnojiva [35].

Osim UV detekcije, u mnogim drugim radovima navodi se korištenje C^4D detektora. C^4D je beskontaktni konduktometrijski detektor, koji se posljednjih nekoliko godina sve učestalije koristi u kapilarnoj i elektroforezi na mikročipu. Mai i Hauser u svom radu izvršili su istovremenu separaciju kationa i aniona u vodi iz slavine, a pri tome su primijenili dvostruko injektiranje u svrhu dobivanja zasebnih elektroferograma, dok su za detekciju upotrijebili C^4D detektor [36].

Osim u svrhu analize kvalitete vode, korištenje C^4D detektora moguće je i u medicinskoj dijagnostici. Naime, znanstvenik Kubáň razvio je metodu za neinvazivno prikupljanje i analizu znoja, pri čemu je korišten C^4D detekcijski sustav za određivanje koncentracije natrijevih i kalijevih iona, te klorida [37]. Kod oboljelih od cistične fibroze je vrlo bitno pratiti koncentraciju navedenih iona, jer je to indikator bolesti. U praksi se cistična fibroza dijagnosticira pomoću standardizirane metode pilokarpinske iontoforeze, pri čemu se prikuplja znoj za analizu klorida. Kubáň navodi kako je moguće minijaturizirati uređaj za kapilarnu elektroforezu, te tako dobiti uređaj za mjerenje koncentracije spomenutih iona i učiniti proces dijagnosticiranja jednostavnijim [37].

2.4.2 Optimiranje separacije kalija u realnim uzorcima

Čimbenici koji najviše utječu na uspješnost analize su izbor pozadinskog elektrolita i materijal od kojeg je izrađen mikročip. Prilikom odabira pozadinskog elektrolita potrebno je obratiti pozornost da odabrana vrsta ima što nižu vodljivost, kako bi se maksimalno smanjio pozadinski šum. Neki od najčešće korištenih pozadinskih elektrolita, prilikom separacije alkalijskih ili zemnoalkalijskih metala, te u konačnici i kalija, su octena i borna kiselina, pri čemu je potrebo pripaziti i na njihovu pH vrijednost.

Često se može dogoditi da se ne postigne potpuna separacija, prilikom analize uzoraka s velikim brojem kationa, zbog njihovih bliskih elektroforetskih mobilnosti. Jedan od takvih uzoraka je uzorak prirodne vode, gdje je teško provesti separaciju kalijevog i amonijevog iona. U takvim slučajevima se koristi krunski eter kako bi se optimirao sustav pozadinskog elektrolita, a najefikasniji za separaciju upravo spomenutih kationa je 18–kruna-6 eter. Primjer takvog optimiranja objavljen je u istraživanju Kubáňa i Hausera iz 2005. godine, kada su određivali ukupnu, kvantitativnu, ionsku analizu alkoholnih i bezalkoholnih pića [38]. Analiza je provedena elektroforezom na mikročipu, a kao pozadinski elektrolit korištena je smjesa 10,5 mmol/dm^3 histidina, 50 mmol/dm^3 octene kiseline i 2 mmol/dm^3 18–kruna–6 etera dok je pH vrijednost iznosila 4,1. Znanstvenici Kubáň i Hauser uspjeli su za manje od 40 sekundi separirati i identificirati glavne anorganske katione NH_4^+, K^+, Ca^{2+}, Na^+ i Mg^{2+} u pićima. Rezultati njihova istraživanja prikazani su u tablici 5 [38].

Tablica 5. Vrijeme migracije (RSD(t_M), %), visina pika (RSD(PH), %), površina pika (RSD(PA),%), koeficijent korelacije (r ^{2}) i granica detekcije (LOD, μg/L) za elektroforezu na mikročipu s C^{4}D detektorom za anorganske katione [38].

	RSD(t_M), %	RSD(PH), %	RSD(PA),%	R ^{2}	LOD, μg/L
NH_4^+	0,12	0,53	1,87	0,9991	150
K^+	0,23	1,11	2,06	0,9981	200
Ca^{2+}	0,08	1,20	2049	0,9973	150
Na^+	0,11	1,00	2,53	0,9977	150
Mg^{2+}	0,14	1,70	2,59	0,9981	90

Vrlo je bitno odabrati i valjani napon injektiranja i separacije. Prilikom injektiranja uzorka koristi se napon u rasponu od + 0,70 do + 1,2 kV, dok se separacija odvija pod naponom od +1,40 do +4 kV. Uzorak se injektira u samo jedan rezervoar mikročipa, a u ostale se dodaje pozadinski elektrolit. Prije samog mjerenja, potrebno je sve kanale isprati ultra čistom vodom, zatim odabranim pozadinskim elektrolitom. Nakon ispiranja, snima se bazna linija za zadani sustav. Osim toga, svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće i proći obradu u ultrazvučnoj kupelji.

Izrazito je važan i odabir mikročipa, odnosno materijala od kojeg se napravljen. Materijal za mikročip potrebno je odabrati s obzirom na pH korištenog pozadinskog

elektrolita. Danas su na tržištu dostupni mikročipovi izrađeni od stakla ili polimerskih materijala. Iako stakleni mikročipovi imaju višu cijenu i skloni su pucanju, najčešće se koriste radi dobrih optičkih svojstava i bolje otpornosti na organska otapala.

Unutar mikročipa razlikuju se dva križno postavljena kanala, kraći injekcijski i duži separacijski kanal, te četiri rezervoara, od toga jedan za uzorak i ostala tri za pozadinski elektrolit. Kako bi se omogućila detekcija nabijenih vrsta, u rezervoare se uranjaju ekscitacijske elektrode izrađene od plemenitih metala.

2.4.3 Primjena C^4D detekcijskog sustava za detekciju kalija

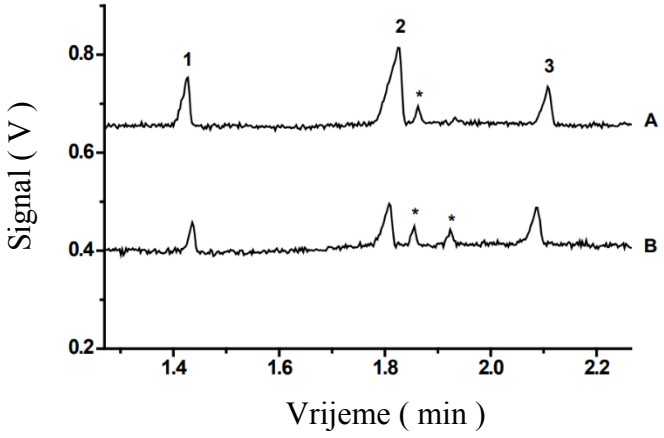
Posljednjih godina najčešće je korišten C^4D detektor, koji pripada skupini beskontaktnih konduktometrijskih detektora. Ovaj detekcijski sustav za razliku od optičkih metoda ne zahtijeva kompleksnu derivatizaciju analita. Beskontaktna detekcija sprječava nepoželjne pojave kao što su onečišćenja i stvaranje mjehurića na elektrodama. C^4D detektor se sastoji od dvije elektrode koje su osjetljive na promjenu vodljivosti i na taj način nastaje signal, koji se prikazuje kao serija pikova na računalu [39].

Mariana C. Marra i suradnici u svom radu iz 2017. godine izvještavaju o novoj i brzoj metodi za istovremeno određivanje amoksicilina, klavulanata i kalija kapilarnom elektroforezom s kapacitivno spregnutim beskontaktnim konduktometrijskim detektorom, odnosno C^4D detektorom [40]. Prilikom mjerenja korištena je ekvimolarna smjesa TRIS/TAPS kao pozadinski elektrolit, te su za mjerenja korišteni farmaceutski preparati. U tablici 6. prikazani su rezultati dobiveni pomoću kapilarne elektroforeze – C^4D te su statistički uspoređeni s onima dobivenim HPLC–om i plamenom fotometrijom korištenjem nesparenog Studentovog t-testa. Iz navedene tablice 6, vidljivo je kako rezultati dobiveni novom metodom ne odstupaju puno od onih dobivenih već provjerenim metodama [40].

Tablica 6. Određivanje amoksicilina, klavulata i kalija u farmaceutskim formulacijama pomoću kapilarne elektroforeze-C^4D, HPLC i plamene fotometrije (vrijednost ± SD; n = 3) [40].

Uzorak	Nabijena vrsta	Naznačena količina (mg/tableti)	HPLC (mg/tableti)	Plamena fotometrija (mg/tableti)	Kapilarna elektroforeza C^4D (mg/tableti)
A1	K	20,5	-	20,3 ± 1,5	20,5 ± 0,7
A2	K	20,5	-	20,2 ± 1,7	19,8 ± 0,8
A1	Amoksicilin	500	462 ± 14	-	462 ± 23
A2	Amoksicilin	500	476 ± 10	-	466 ± 19
A1	Klavulanat	105	103 ± 2	-	103 ± 3
A2	Klavulanat	105	107 ± 4	-	100 ± 4

Istom metodom su Guimarães I. C. i suradnici 2009. godine određivali količinu kalija i natrija u dijetetskim i nedijetetskim bezalkoholnim pićima. Slika 7 prikazuje dobivene elektroferograme, pri čemu se elektroferogram A odnosi na dijetetsko piće, a elektroferogram B na nedijetetsko piće. Iz dobivenih elektrofoerograma vidljivo je kako dijetetska pića sadrže veće količine kalija i natrija, te je potvrđeno kako se kapilarna elektroforeza s C^4D detektorom može koristiti u prehrambenoj industriji i zdravstvenim regulatornim agencijama za praćenje koncentracije kalija i natrija u prehrambenim proizvodima [41].



Slika 7. Elektroferogrami za dijetetsko (A) i nedijetetsko piće (B).

3. Eksperimentalni dio

3.1 Uređaji i pribor

Uređaji korišteni za određivanje anorganskih analita elektroforezom na mikročipu (Slika 6):

- C^4D detektor (ER225)
- HV Sekvencercer (ER230)
- Platforma mikročipa (ET121)
- Mikročip (02-0750-0082-01)

3.1.1 C^4D detektor (engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection*, CCCCD, C^4D)

Kapacitivno spregnuti beskontaktni konduktometrijski detektor, kraćeg naziva C^4D, je sustav za konduktometrijsku detekciju i najčešće se koristi prilikom izvođenja kapilarne elektroforeze. Prednost ove metode u odnosu na optičke načine detekcije je što nije potrebna derivatizacija analita. Osim toga valja istaknuti kako elektrode uređaja nisu u dodiru s otopinom koja se mjeri, te zbog toga ne dolazi do stvaranja mjehurića plina prilikom mjerenja. Uređaj se sastoji od dvije elektrode koje detektiraju promjenu vodljivosti pri čemu nastaje signal koji se dalje u uređaju oblikuje u čitljiv podatak koji se naziva elektrofoerogram. Elektroferogram se sastoji od pikova čije su visina i površina razmjerne koncentraciji ispitivane tvari. Kako bi se dobio što točniji rezultat potrebno je odabrati pozadinski elektrolit niske vodljivosti [42]. Na slici 8 prikazan je kapacitivno spregnuti beskontaktni konduktometrijski detektor.



Slika 8. C^4D detekcijski sustav [43].

Dani izraz 12 opisuje na koji način elektroda mjeri vodljivost uzorka:

$$L = \frac{A}{d} \sum \lambda_i c_i \qquad (12).$$

pri čemu je:

L - vodljivost,

A - površina elektrode,

d - relativna udaljenost između elektroda,

c_i - koncentracija svih spojeva koji prenose naboj,

λ_i - ukupna molarna vodljivost

Ukoliko se promjeni površina elektrode moguće je mijenjati i granicu detekcije, a to je vidljivo iz jednadžbe 12 [44].

3.1.2 HV Sekvencer

HV Sekvencer je uređaj koji služi za visokonaponsku opskrbu, posebno dizajniran za elektroforezu na mikročipu. Moguće ga je koristiti i za izvođenje elektrokinetičke kromatografije i za mikro reaktore bazirane na Sekvencer elektro–osmotskom protoku. Uređaj omogućuje kontinuirano praćenje i mjerenje napona i električne struje, što doprinosi lakšem uklanjanju mogućih smetnji. HV Sekvencer osim hardvera, uključuje i programsku podršku QuadSequencer™, pomoću kojeg je na računalu moguće zadavati željeni napon za primjenu na mikročipu. Na slici 9 prikazan je korišteni HV Sekvencer.



Slika 9. HV Sequencer [45].

3.1.3 Platforma mikročipa (ET121)

Platforma mikročipa dizajnirana je za C^4D detektor, te se koristi prilikom izvođenja elektroforeze na mikročipu. Na gornju stranu platforme postavlja se mikročip, te se učvršćuje pomoću dva vijka. Mikročip je prilikom postavljanja potrebno precizno pozicionirati na platformu tako da separacijska kapilara leži točno na detekcijskim elektrodama. Veličina platforme je 50 mm x 165 mm x 30 mm. Slika 10 prikazuje platformu mikročipa ET121.

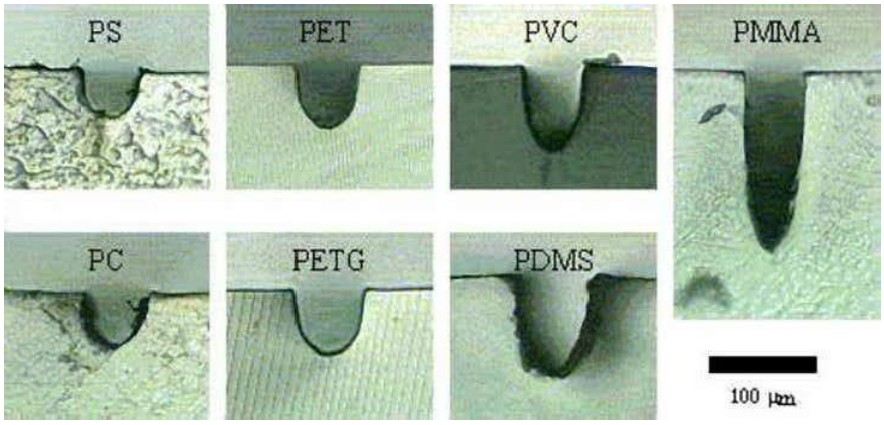


Slika 10. ET121 mikročip platforma za C^4D detektor [46].

3.1.4 Mikročip (02-0750-0082-01)

Mikročipovi koji se koriste za elektroforezu na mikročipu sastoje se od dva kanala, sepracijskog i mikrokanala za injekciju. Uobičajene dimenzije mikrokanala su: 15 – 50 mikrometara dubine, 50 – 200 mikrometara širine, dok je duljina separacijskog mikrokanala 1 – 10 centimetara. Na krajevima svakog od kanala se nalaze spremnici za uzorak i pozadinski elektrolit. Prije mjerenja u spremnike s tekućinom, uranjaju se visokonaponske elektrode od plemenitih metala pomoću kojih se odvija separacija.

Vrlo je bitno obratiti pozornost na odabir materijala od kojih je mikročip napravljen jer to utječe na separaciju prilikom analize. Prvi mikročipovi izrađivali su se od stakla, silicija ili kvarca, dok se danas u izradi često koriste razni polimeri. U odnosu na staklo, polimeri su ekonomski prihvatljiviji i lakše se oblikuju tijekom izrade mikročipova. Neki od polimera koji se koriste su: polidimetilsiloksan (PDMS), polikarbonat (PC), poli(etilen-tetraftalat) (PET) i polimetil-metakrilat (PMMA) (Slika 11).



Slika 11. Shematski prikaz presjeka mikrokanala mikročipova za elektroforezu na mikročipu [30].

Prilikom mjerenja korišteni su mikročipovi načinjene od PMMA, čije su dimenzije mikrokanala bile 50 µm širine, 50 µm dubine i 87 µm dužine. Korišteni mikročip prikazan je na slici 12.



Slika 12. Mikročip korišten u elektroforetskim mjerenjima.

3.1.5 Ostali pribor

Za pripremu standardnih otopina kalija i pripremu otopine pozadinskog elektrolita korišteno je :

3.1.5.1 Aparat za ultra čistu vodu

Prilikom pripreme standardnih otopina kalija, pozadinskog elektrolita i uzorka dijetetskog suplementa korištena je ultra čista voda. Uređaj pročišćava vodovodnu vodu i na taj način se dobiva ultra čista voda.

3.1.5.2 Ultrazvučna kupelj

Kako bi se uklonili mjehurići plinova iz pripremljenih otopina, korištena je UZV kupelj (Badelin RK-100, Njemačka) prikazana na slici 13. Uređaj uz pomoć ultrazvučnih vibracija prenosi velike količine energije i na taj način se uklanjaju mjehurići iz otopine.



Slika 13. Korištena ultrazvučna kupelj.

3.1.5.3 Analitička vaga

Za pripremu otopina uzorka, standarda i pozadinskog elektrolita korištena je analitička vaga Kern, ABT 120 4M prikazana na slici 13.



Slika 14. Analitička vaga Kern, ABT 120 4M.

3.1.5.4 Pipete

Prilikom izvođenja mjerenja korištene su pipete Hirschmann, Labopette, volumena 10-100 µL te volumena 100-1000 µL.

3.2 Popis korištenih kemikalija

Za pripremanje otopina uzorka pozadinskog elektrolita i standardnih otopina:

- Octena kiselina (konc.)
- KCl

Kao pozadinski elektrolit korištena je otopina 0,5 mol/dm^3 octena kiselina, a za pripremu standardnih otopina korištena je sol KCl. Korištene kemikalije su analitičke čistoće. Sve otopine su filtrirane kroz filtere za špricu od celuloze s dijametrom pora 0,22 μm (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka) i stavljene u ultrazvučnu kupelj (5 min). Prije analize uzorak je razrijeđen u omjeru 1:1000.

3.3 Priprema otopina

3.3.1 Priprema otopine octene kiseline koncentracije 0,5 mol/dm^3

U volumetrijsku tikvicu od 100 mL otpipetirano je 2,87 mL koncentrirane octene kiseline. Prije dodatka kiseline, u tikvicu je potrebno uliti malo ultra čiste vode. Nakon dodatka kiseline, tikvicu se nadopuni do oznake ultra čistom vodom.

3.3.2 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-2} mol/dm^3

Na analitičkoj vagi odvagati 0,0746 g KCl, te kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL, otopiti u malom volumenu ultra čiste vode i nadopuniti do oznake vodom.

3.3.3 Priprema otopine KCl koncentracije 5 x 10^{-4} mol/dm^3

Otpipetirati 0,5 mL pripremljene otopine KCl koncentracije 10^{-2} mol/dm^3 u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.3.4 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-4} mol/dm^3

Otpipetirati 0,1 mL pripremljene otopine KCl koncentracije 10^{-2} mol/dm^3 u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.3.5 Priprema otopine KCl koncentracije 7,5 x 10^{-5} mol/dm^3

Otpipetirati 0,075 mL pripremljene otopine KCl koncentracije 10^{-2} mol/dm^3 u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.3.6 Priprema otopine KCl koncentracije 5 x 10^{-5} mol/dm^3

Otpipetirati 0,05 mL pripremljene otopine KCl koncentracije 10^{-2} mol/dm^3 u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.3.7 Priprema otopine KCl koncentracije 1 x 10^{-5} mol/dm^3

Otpipetirati 0,01 mL pripremljene otopine KCl koncentracije 10^{-2} mol/dm^3 u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.3.8 Priprema otopine realnog uzorka

Odvagati 100 mg uzorka dijetetskog suplementa i otopiti u 10 mL ultra čiste vode. Zatim pripremljenu otopinu profiltrirati kroz filtere za špricu od regenerirane celuloze sa dijametrom pora 0,22 μm.

3.4 Postupak mjerenja

Mikrokanale mikročipa je potrebno najprije isprati ultra čistom vodom. Nakon toga kapilare se ispiru otopinom pozadinskog elektrolita, u ovom slučaju otopinom octene kiseline (c = 0,5 mol/dm^3). Nakon što se čip ispere otopinom pozadinskog elektrolita, potrebno je u spremnike ponovno dodati otopinu pozadinskog elektrolita i uključiti uređaj kako bi se izmjerila vodljivost pozadinskog elektrolita. Mikročip je potrebno ispirati dok se ne stabilizira bazna linija. Kada se bazna linija stabilizirala, iz spremnika za uzorak, pomoću mikropipete, izvlači se otopina pozadinskog elektrolita i dodaje uzorak. Prije svake serije mjerenja, mikročip je potrebno isprati ultra čistom vodom i otopinom pozadinskog elektrolita. Prilikom mjerenja korišten je napon injektiranja od 1000 V i napon separacije od 2750 V. U spremnike je dodavano 40 μL otopine.

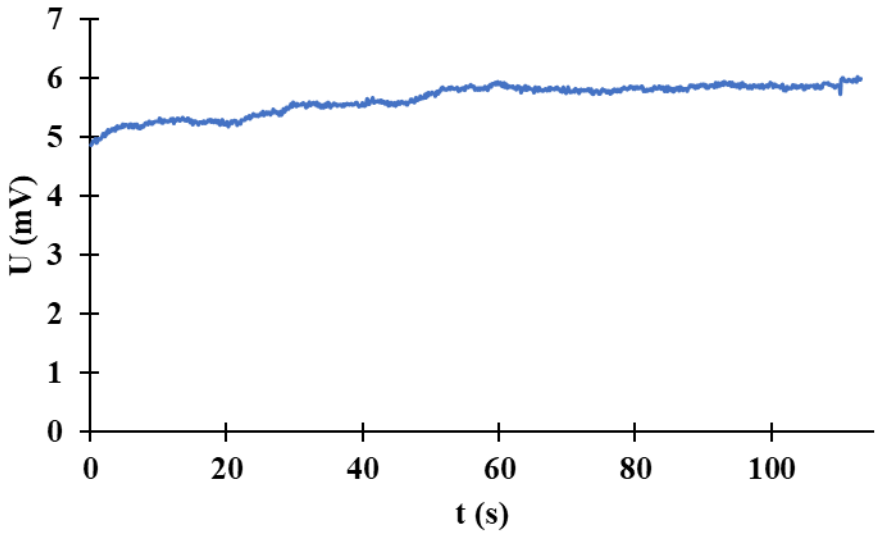
Najprije se provodi mjerenje otopine pozadinskog elektrolita, zatim otopina poznatih koncentracija, te naposljetku realnog uzorka. Ukoliko je potrebno može se primijeniti i metoda poznatog dodatka.

Po završetku dnevnog mjerenja mikrokanale je potrebno isprati ultra čistom vodom.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Bazna linija

Prije početka svake serije mjerenja potrebno je utvrditi stabilnost mjernog uređaja, i propusnost mikrokanala, te napraviti baznu liniju i testirati vodljivost pozadinskog elektrolita. Na slici 15 prikazan je elektroferogram pozadinskog elektrolita, odnosno bazna linija mjerenja.



Slika 15. Elektroferogram otopine pozadinskog elektrolita, 0,5 mol/dm^3 octena kiselina, pH = 2,5.

Bazna linija elektroferograma čiste otopine pozadinskog elektrolita bez prisutnih interferirajućih pikova, ukazuje na njegovu podobnost za analitička ispitivanja. Nestabilnost signala koja se očituje u blago dijagonalnom porastu napona s vremenom, je posljedica postupnog zagrijavanja pozadinskog elektrolita, što uzrokuje promjene njegovih električnih i reoloških osobina. Opaženi pomak signala (Slika 15) prihvatljiv je s obzirom da mikrofluidički sustav za mjerenje nije termostatiran.

4.2 Baždarni pravac za kalij

Linearnost je utvrđena izradom kalibracijskog pravca koji se sastoji od pet koncentracijskih razina standardnih otopina, s najmanje deset mjerenja po koncentracijskoj razini. Prilikom izrade baždarnog pravca za kalij, korištene su otopine kalijevog klorida u rasponu koncentracija od 5 x 10^{-4} mol/dm^3 do 1 x 10^{-5} mol/dm^3. Baždarni pravac za kalij prikazan je na slici 15. Iz dobivenih podataka izračunati su ovisnost odziva (visine i površine pika) o koncentraciji analita i koeficijenti kalibracijske krivulje (a, b). U ovom radu linearnost je izračunata preko kalibracijske krivulje za visinu pika koja je pokazala analitički prihvatljivije rezultate. Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca y = 4161,3 x + 0,8783 iz koje je određen nagib pravca, a = 4161,3 i odsječak b = 0,8783. Rezultati linearnosti metode za visinu pika su zadovoljavajući na širokom području većem od jednog reda veličine uz dobiveni koeficijent korelacije (R) od 0,9764, te koeficijent determinacije (R^2) 0,9534.

Uzorak slijepe probe izmjeri se deset puta i izračuna se standardna devijacija, te se granica detekcije (LOD) zatim izračuna prema sljedećoj formuli:

$$LOD = 3{,}3\sigma/a \qquad (12)$$

gdje je :

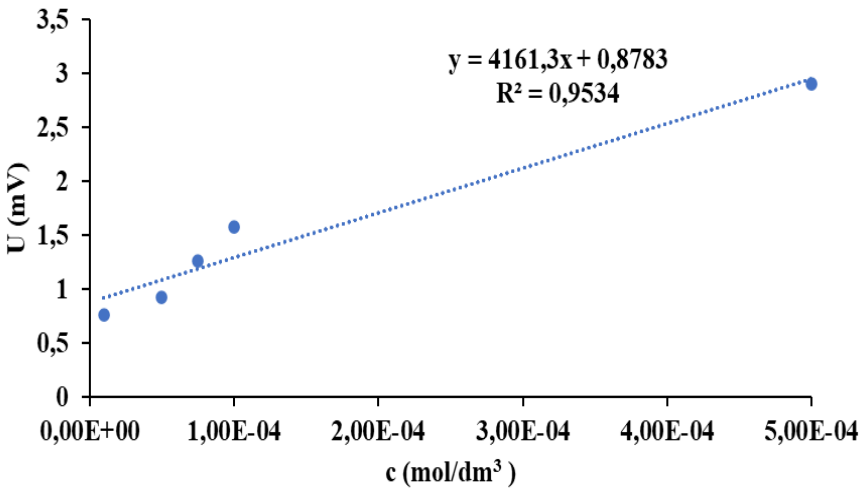
σ - standardna devijacija mjerenja slijepe probe

a – nagib kalibracijskog pravca.

Granica kvantifikacije (LOQ) se izračuna na jednaki način primjenom jednadžbe 13;

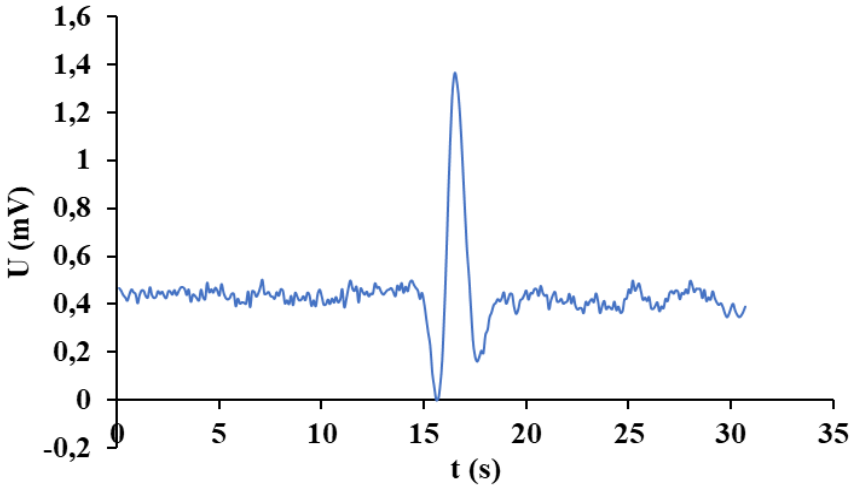
$$LOQ = 10\sigma/a. \qquad (13)$$

Granica detekcije za kalij iznosi 2,98 x 10^{-6} mol/L, a granica kvantifikacije (LOQ) iznosi 8,95 x 10^{-6} mol/dm^3. S obzirom na visoku koncentraciju kalija u dijetetskim suplementima niže granice detekcije nisu bile potrebne, te se može zaključiti da su mikrofluidičke metode zadovoljavajuće za kvantifikaciju aktivnih komponenti dijetetskih suplementa koji sadrže alkalijske metale.



Slika 16. Baždarni pravac za kalij u 0,5 mol/dm^3 octenoj kiselini.

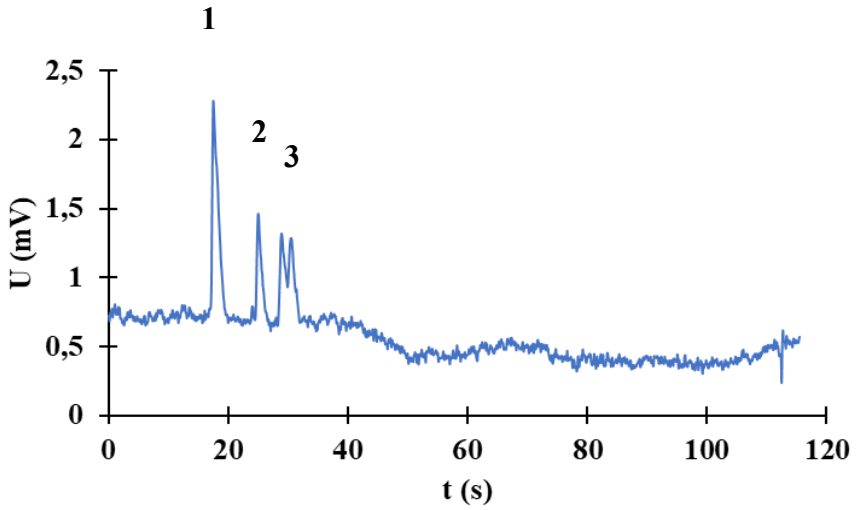
Na slici 17 prikazan je elektroferogram standardne otopine kalija u 0,5 mol/dm^3 octenoj kiselini za koncentraciju kalija 7,5 x 10^{-5} mol/dm^3. Na elektroferogramu je vidljiv istaknut, pravilan i simetričan pik koji izlazi na retencijskom vremenu od 17±1 s, te je karakterističan za otopine koje sadrže kalij.



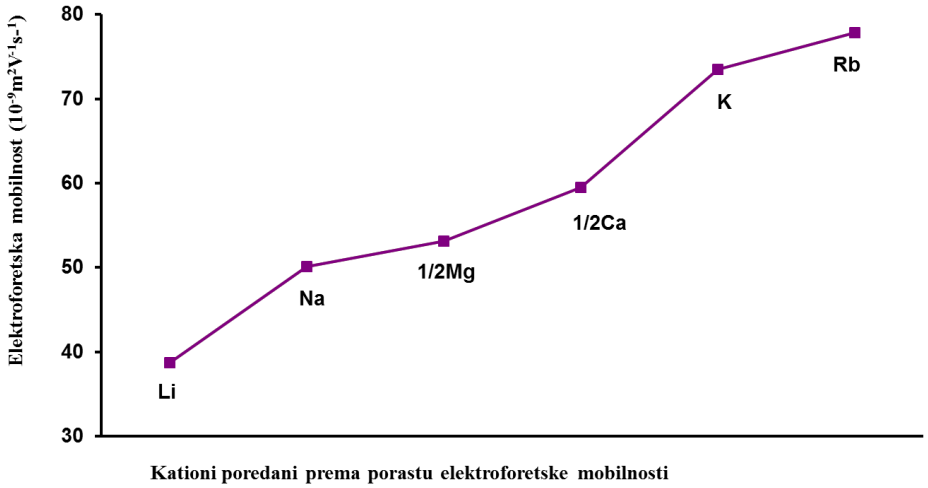
Slika 17. Elektroferogram otopine kalija (c = 7,5 x 10^{-5} mol/dm^3) u 0,5 mol/dm^3 octenoj kiselini.

4.3 Određivanje sadržaja kalija u suplementima elektroforezom na mikročipu

Separacija kalija u uzorcima dijetetskih suplemenata, često puta nije lak posao. Razlog tomu je što kalij najčešće dolazi u kombinaciji s drugim alkalijskim i zemnoalkalijskim kationima kao što su natrij, magnezij i/ili kalcij. Naime alkalijski i zemnoalkalijski metali imaju vrlo bliske vrijednosti elektroforetskih mobilnosti, pa ih je stoga vrlo zahtjevno separirati i u konačnici dobiti potpuno separirane pikove na elektroferogramu. Osim toga u dijetetskim suplementima nalaze se i druge aktivne tvari kao što su vitamini, aminokiseline i dr., kao i pomoćne tvari, punila i arome koji također mogu ometati uspješnu analizu. Na slici 18 prikazan je elektroferogram uzorka dijetetskog suplementa koji sadrži kaliji, magneziji i vitamin C kao aktivne komponente.



Slika 18. MCE elektroferogram dijetetskog suplementa dobiven u pozadinskom elektrolitu 0,5 mol/dm^3 octene kiseline uz primjenu C^{4}D detekcije. Identifikacija pikova: 1, kalij; 2, neidentificiran; 3, neidentificiran.



Slika 19. Elektroforetske mobilnosti izabranih alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa u rastućem redoslijedu u odnosu na njihovu elektroforetsku mobilnost.

Elektroforeza na mikročipu je jednostavna tehnika visoke razlučivosti koja odvaja nabijene specije na temelju njihove relativne pokretljivosti. Pod utjecajem primijenjenog električnog polja. Za određivanje kationa, ekscitacijska elektroda s pozitivnim polaritetom postavlja se na stranu ubrizgavanja uzorka, pod ovim uvjetima redoslijed migracije je takav da kation s najvećom pozitivnom elektroforetskom mobilnošću migrira prvi, a analit s najmanjom pozitivnom mobilnošću migrira posljednji (Slika 19). Što je međusobna elektroforetska mobilnost različitih kationa bliža, to je njihovo separiranje u smjesi zahtjevnije.

Analit kalij je od ostalih sastojaka matrice odvojen elektroforezom na mikročipu te detektiran beskontaktnim konduktometrijskim detektorom. Specifičnost metode potvrđena je snimanjem elektroferograma analita u otopini standarda i otopinama uzoraka. Potvrđeno je da se radi o kationu s istim retencijskim vremenima. Na retencijskom vremenu kalija (Rt = 17±1 s) nisu uočeni pikovi koji bi ometali određivanje analita (Slika 17). Elektroferogram dijetetskog suplementa prikazan na slici 17 pokazuje jasno izražen pik kalija na retencijskom vremenu od 17,6 s i preostale pikove koji nisu identificirani. No, s obzirom na vrijednosti elektroforetskih mobilnosti na slici 18, može se pretpostaviti da pikovi 2 i 3 pripadaju magneziju i vitaminu C. Sastav analiziranog dijetetskog suplementa je vrlo složen te osim 500 mg kalija sadrži i 400 mg magnezija i 60 mg vitamina C. Uzorak sadrži i limunsku kiselinu, natrijev hidrogenkarbonat, magnezijev karbonat, kalijev hidrogenkarbonat, inulin, aromu grejpa (sadrži sojin lecitin), škrob, aspartam, acesulfam kalij, riboflavin-5'-fosfat i fenilalanin. Važno je za istaknuti da opisana metoda može simultano u jednom mjerenju

određivati analite vrlo različite strukture kao što su kalij i vitamin C što je osobito važno s obzirom na raznolik sastav dijetetskih suplementa.

U tablici 7 prikazani su podaci, dobiveni prilikom izrade kalibracijskog pravca. Iz tablice je vidljivo kako porastom koncentracije, standardne otopine kalijevog klorida, raste vrijednost visine pika, a i vrijednost površine pika. Iz toga se može zaključiti da su koncentracija i visina pika proporcionalne vrijednosti. Prikazani podaci za visinu i površinu pika dobiveni su kao srednja vrijednost deset mjerenja.

Tablica 7. Prikaz izmjerenih vrijednosti visine i površine pika za kalij, (srednje vrijednosti, N = 10).

***c* (KCl)**	**Visina pika (mV), n=10**	**Površina pika (mV), n=10**
1×10^{-5} mol/dm^3	0,77	0,63
5×10^{-5} mol/dm^3	0,93	0,89
$7,5 \times 10^{-5}$ mol/dm^3	1,26	1,20
1×10^{-4} mol/dm^3	1,58	1,62
5×10^{-4} mol/dm^3	2,91	2,84

U tablici 8 prikazani su analitički parametri, određeni prilikom izrade kalibracijskog pravca. Po završetku mjerenja odabrane su vrijednosti visine pikova za daljnju analizu, jer su te vrijednosti pokazale bolju linearnu zavisnost u odnosu na koncentraciju. Standardna devijacija (SD) visine pika za koncentracije od $1 \times 10^{-5} – 5 \times 10^{-4}$ mol/dm^3 iznosila je od 0,04 do 0,19, dok je relativna standardna devijacija (RSD) iznosila od 0,05 do 0,18. Nadalje, koeficijent varijacije (CV) je u rasponu od 4,98 do 12,29 %, a interval pouzdanosti (CL) je u rasponu od 0,03 do 0,15.

Tablica 8. Prikaz analitičkih parametara za standardne otopine kalijevog klorida, (srednje vrijednosti, N = 10).

***c* (KCl)**	**SD**	**RSD**	**CV (%)**	**CL, p=0,05 (±)**
1 x 10^{-5} mol/dm^3	0,04	0,05	5,39	0,03
5 x 10^{-5} mol/dm^3	0,13	0,14	13,53	0,08
7,5 x 10^{-5} mol/dm^3	0,06	0,05	4,98	0,04
1 x 10^{-4} mol/dm^3	0,16	0,10	10,43	0,10
5 x 10^{-4} mol/dm^3	0,19	0,18	12,29	0,15

Rezultati dobiveni na visokom koncentracijskom području su manje zadovoljavajući od rezultata dobivenih na srednjem i niskom koncentracijskom području.

Iz dobivenih podataka izračunata je ovisnost odziva (visine pika) o koncentraciji analita. Koncentracija kalija u realnom uzorku razrijeđenom 100 puta izračunata je pomoću jednadžbe pravca y = 4161,3 x + 0,8783. Nepoznata koncentracija iz visine pika izračunata je iz izraza:

x = (y - 0,8783) / 4161,3

Za izračunavanje koncentracije kalija u dijetetskom suplementu uzeta je srednja vrijednost deset uzastopnih mjerenja visine pika koja je iznosila 1,68.

x = (1,68 - 0,8783) / 4161,3 = 1,74 x 10-4 mol/dm^3

Izračunata koncentracija kalija u realnom uzorku iznosila je 1,74 x 10^{-4} mol/dm^3.

5. Metodička obrada nastavne jedinice „Elektroforeza i hemodijaliza“

5.1 Priprema za nastavni sat

Datum: ...

Razred: 4.r gimnazije

Ime i prezime učitelja/nastavnika kemije: Marija Jakić

Tematska cjelina: Kemija koloida

Nastavna jedinica: Elektroforeza i hemodijaliza

Tip sata: Obrada novoga gradiva i ponavljanje

Cilj: Objasniti procese dijalize i elektroforeze

POSTIGNUĆA IZ PIP-A	ISHODI UČENJA I POUČAVANJA	RAZINA ISHODA (prema Crooksu, 1988):	PLANIRANI ZADACI/AKTIVNOSTI ZA PROVJERU USVOJENOSTI ISHODA UČENJA I POUČAVANJA	OSTVARENOST PLANIRANIH ZADATAKA/AKTIVNOSTI ZA PROVJERU USVOJENOSTI ISHODA UČENJA I POUČAVANJA
KEM SŠ D.4.28. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama.	- objasniti procese dijalize i elektroforeze	R2	Što je dijaliza? Na čemu se temelji? Što je elektroforeza? Na čemu se temelji?	
KEM SŠ D.4.29. Primjenjuje matematička znanja i vještine.	- izračunati oplošje i brojevnu koncentraciju koloidnih čestica - interpretirati rezultate.	R2	Kuglica zlata promjera 1,25 cm dispergirana je fizikalno – kemijskim procesom do veličine kuglica koloidnih dimenzija promjera 312 nanometara. Izračunajte ukupno oplošje dobivenih kuglica i usporedite ga s oplošjem početne kuglice.	
KEM SŠ D.4.30. Uočava	- izračunati oplošje i	R2	Na nalazu krvne slike izražena je referentna	

zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima	brojevnu koncentraciju koloidnih čestica - interpretirati rezultate.		vrijednost leukocita u krvi 4 – 10 · 10^3 po litri. Izračunajte broj leukocita u krvi osobe ako mi je prema nalazu analize broj leukocita u krvi 8,2 · 10^9 uz pretpostavku da je u ljudskom organizmu 5,5 L krvi. Na što upućuje povećan broj leukocita u krvi ?	

Potrebna predznanja i vještine: Znati vrste koloidnih čestica

Ključni pojmovi: elektroforeza, dijaliza, hemodijaliza, polupropusna membrana

Povezanost s nastavnim predmetima:

- Biologija, Fizika

Razrada postignuća (ishoda) i zadaci/aktivnosti za provjeru njihove usvojenosti

5.2 Struktura nastavnog sata

ETAPE NASTAVNOG SATA	AKTIVNOSTI UČITELJA/NASTAVNIKA	AKTIVNOSTI UČENIKA	SOCIOLOŠKI OBLICI RADA
UVODNI DIO (10 min)	Rješavanjem radnog listića učenici će ponoviti gradivo prošlog sata, odnosno vrste koloidnih sustava.	Prema uputama nastavnice ispunjavati radni listić za ponavljanje.	Prema uputama nastavnice ispunjavati radni listić za ponavljanje.
SREDIŠNJI DIO (10 min)	Napisati na ploču naslov Elektroforeza i dijaliza . Porazgovarati s učenicima gdje su se već upoznali s pojmovima elektroforeza i dijaliza. Napisati na ploču definicije i princip rada elektroforeze i dijalize.	Aktivno sudjelovanje u razgovoru. Pisanje zapisa s ploče u bilježnicu prema uputama nastavnice. Aktivno slušati.	Frontalni - razgovor Frontalni, individualni - razgovor - pisanje

(15 min)	Podijeliti učenike u parove i zadati im da, služeći se udžbenikom i mrežnim stranicama, istraže primjenu elektroforeze i dijalize u znanosti i medicini. Uputiti učenike kako napraviti zabilješke tijekom istraživanja. U konačnici njihovo istraživanje provjeriti kroz razgovor s učenicima.	Postavljati pitanja Pisanje bilješki u bilježnicu tijekom provođenja istraživanja. Aktivno sudjelovanje u razgovoru. Aktivno slušanje.	Rad u paru. Frontalni, individualni - razgovor - pisanje
ZAVRŠNI DIO (10 min)	U paru ponoviti naučeno uz pomoć radnog listića sa zadacima za provjeru ostvarenosti ishoda učenja i zadati domaću zadaću.	Aktivno sudjelovati u rješavanju zadataka	Rad u paru

5.3 Plan učeničkog zapisa

<u>Elektroforeza i dijaliza</u>

ELEKTROFOREZA → postupak razdvajanja i identifikacije čestica djelovanjem istosmjerne struje, to jest uz pomoć električnog polja

- ➔ Naboj čestice – temelj metode
- ➔ Brzina kretanja ovisi o: masi i veličini čestice, gustoći naboja, jakosti električnog polja, pH - vrijednosti, temperaturi otopine

DIJALIZA → razdvajanje otopljenih tvari na temelju razlika u sposobnosti difuzije njihovih čestica kroz polupropusnu membranu

- ➔ hemodijaliza

5.4 Radni listići

5.4.1 Radni listić 1. - Vrste koloidnih sustava

(1.) Prazna polja u tablici ispravno popuni ponuđenima pojmovima.

Pojmovi : biseri, tekućina, čvrsta tvar, magla, mlijeko, polistiren, tekućina, čvrsta tvar, aerosol, sol

VRSTA KOLOIDA	DISPERZNO SREDSTVO	DISPERGIRANA FAZA	PRIMJER
aerosol	plin	tekućina	
	plin	čvrsta tvar	dim
pjena		plin	tučeno vrhnje
emulzija	tekućina	tekućina	
	tekućina	čvrsta tvar	pasta za zube
čvrsta pjena	čvrsta tvar	plin	
čvrsta emulzija	čvrsta tvar		maslac
gel		tekućina	gel za kosu
čvrsta sol	čvrsta tvar	čvrsta tvar	

5.4.2 Radni listić 2. Pitanja za ponavljanje i domaću zadaću

(1.) Što je dijaliza? Na čemu se temelji?

(2.) Što je elektroforeza? Na čemu se temelji?

(3.) Kuglica zlata promjera 1,25 cm dispergirana je fizikalno – kemijskim procesom do veličine kuglica koloidnih dimenzija promjera 312 nanometara. Izračunajte ukupno oplošje dobivenih kuglica i usporedite ga s oplošjem početne kuglice.

Račun:

Odgovor:

(4.) Na nalazu krvne slike izražena je referentna vrijednost leukocita u krvi $4 – 10 \cdot 10^9$ po litri. Izračunajte broj leukocita u krvi osobe ako mi je prema nalazu analize broj leukocita u krvi $7{,}8 \cdot 10^9$ uz pretpostavku da je u ljudskom organizmu 5,0 L krvi. Na što upućuje povećan broj leukocita u krvi ?

Račun:

Odgovor:

5.4.3 Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje na početku sata

(1.)Prazna polja u tablici ispravno popuni ponuđenima pojmovima.

Pojmovi : biseri, tekućina, čvrsta tvar, magla, mlijeko, polistiren, tekućina, čvrsta tvar, aerosol, sol

VRSTA KOLOIDA	DISPERZNO SREDSTVO	DISPERGIRANA FAZA	PRIMJER
aerosol	plin	tekućina	magla
aerosol	plin	čvrsta tvar	dim
pjena	tekućina	plin	tučeno vrhnje
emulzija	tekućina	tekućina	mlijeko
sol	tekućina	čvrsta tvar	pasta za zube
čvrsta pjena	čvrsta tvar	plin	polistiren
čvrsta emulzija	čvrsta tvar	tekućina	maslac
gel	čvrsta tvar	tekućina	gel za kosu
čvrsta sol	čvrsta tvar	čvrsta tvar	biseri

5.4.4 Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje i domaću zadaću.

(1.) Što je dijaliza? Na čemu se temelji?

Dijaliza je pojava, razdvajanje otopljenih tvari na temelju razlika u sposobnosti difuzije njihovih čestica kroz polupropusnu membranu.

(2.) Što je elektroforeza? Na čemu se temelji?

Elektroforeza je postupak razdvajanja i identifikacije čestica djelovanjem istosmjerne struje, to jest uz pomoć električnog polja. Elektroforeza se temelji na naboju čestica

(3.) Kuglica zlata promjera 1,25 cm dispergirana je fizikalno – kemijskim procesom do veličine kuglica koloidnih dimenzija promjera 312 nanometara. Izračunajte ukupno oplošje dobivenih kuglica i usporedite ga s oplošjem početne kuglice.

Račun:

Zadano je :

2r(kuglica) = 1,25 cm

r(kuglica) = 0,625 cm

2r(koloidna kuglica) = 312 nm

R(koloidna kuglica) = 156 nm

$= 1,65 \cdot 10^{-5}$ cm

Traži se :

O (koloidne kuglice, ukupno) = ?

$$\frac{O(koloidne \quad kuglice, ukupno)}{O(kuglica)} = ?$$

V(kuglica) = $4/3 \cdot r^3 \cdot \pi$

$= 4/3 \cdot (0,625 \text{ cm})^3 \cdot \pi$

$= 1,02 \text{ cm}^3$

V(koloidna kuglica) = $4/3 \cdot r^3 \cdot \pi$

$= 4/3 \cdot (1,65 \cdot 10^{-5} \text{cm})^3 \cdot \pi$

$= 1,59 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3$

N (koloidnih kuglica) = $\frac{V(kuglica)}{V(koloidnih \quad kuglica)}$

$$= \frac{1,02 \bullet cm^3}{1,59 \bullet 10^{-14} cm^3}$$

$= 6,42 \cdot 10^{13}$

O (koloidne kuglica) = $4 \cdot r^2 \cdot \pi$

$= 4 \cdot (1{,}56 \cdot 10^{-5}\ \text{cm})^2 \cdot \pi$

$= 3{,}06 * 10^{-9}\ \text{cm}^2$

O (koloidne kuglice, ukupno) = N (koloidnih kuglica) · O (koloidnih kuglica)

$= 6{,}42 \cdot 10^{13} \cdot 3{,}06 \cdot 10^{-9}\ \text{cm}^2$

$= 1{,}96 \cdot 10^{5}\ \text{cm}^2$

O (kuglica) = $4 \cdot r^2 \cdot \pi$

$= 4 \cdot (0{,}624\ \text{cm})^2 \cdot \pi$

$= 4{,}91\ \text{cm}^2$

$$\frac{O(koloidne\quad kuglice)}{O(kuglica)} = \frac{1{,}96 \bullet 10^5 cm^2}{4{,}91 cm^2}$$

$= 3{,}99 \cdot 10^{4}$

Odgovor:

Ukupno oplošje dobivenih kuglica iznosi $1{,}96 \cdot 10^4\ \text{cm}^2$, što je 40 000 puta veće od oplošja početne kuglice zlata.

(4.) Na nalazu krvne slike piše da je referentna vrijednost leukocita u krvi 4 – 10 · 10^9 po litri. Izračunajte broj leukocita u krvi osobe ako mi je prema nalazu analize broj leukocita u krvi 7,8 · 10^9 uz pretpostavku da je u ljudskom organizmu 5,0 L krvi. Na što upućuje povećan broj leukocita u krvi?

Račun:

Zadano je :

C (leukociti) = 7,8 · 10^9 L^{-1}

V (krvi) = 5,0 L

Traži se :

N (leukociti) =?

$$C(X) = \frac{N(X)}{V}$$

N (leukociti) = C (leukociti) · V

N (leukociti) = 7,8 ·10^9 L^{-1} · 5,0 L = 3,9 · 10^{10}

Odgovor :

Broj leukocita u krvi osobe iznosi 3,9 · 10^{10} . Povećan broj leukocita u krvi upućuje na upalne procese u organizmu.

6. Zaključak

Prisutnost kalija u dijetetskim suplementima i pripremljenim standardnim otopinama, uspješno je dokazana pomoću elektroforeze na mikročipu sa C^4D detektorom. Odabrana metoda pokazala se kao brza, efikasna i ekološki prihvatljiva za separaciju anorganskih analita, te je postignuta analiza u vremenu kraćem od jedne minute. S obzirom da je koncentracija kalija proporcionalna visini dobivenog pika na elektroferogramu, za izračunavanje željenih podataka korištena je visina pika. Koristeći regresijsku analizu utvrđeno je područje linearnog odziva za kalij u standardnim otopinama. Dobiveni rezultati su zadovoljavajuće točni i precizni.

Iako su vidljivi određeni tehnički nedostatci tijekom izvođenja metode, unaprjeđenjem kvalitete mikročipova i detekcijskog sustava, te moguće i odabira drugog pozadinskog elektrolita, ova metoda daje zadovoljavajuće rezultate.

Brojni literaturni izvori navedeni u ovom radu, pokazuju uspješnost i moguću upotrebu u razne svrhe, kao na primjer u farmaciji, prehrambenoj industriji i mnogim drugim industrijama i znanstvenim poljima. U bliskoj budućnosti, radi lake prenosivosti i male veličine, metoda elektroforeze na mikročipu sa C^4D detektorom, mogla bi se koristiti na terenu ili čak komercijalizirati i naći na tržištu.

7. Literatura

[1] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_126_2740.html (2. 5. 2022.)

[2] M. Proso, Građansko pravno uređenje dodataka prehrani za sportaše, Zbornik radova Pravnog fakulteta u Splitu, 2021 Feb 9;58(1):233-51.

[3] M. Sertić, A. Mornar, A. Salapić, M. Šepetavc, Ž. Juričić, Farmaceutski glasnik, 72(2) (2016), 69-83.

[4] L. Kovačević, I. Žugaj, Kemijski elementi, Media Sci, Zagreb, 1996.

[5] M. Ashwell, G. Bussell, L. Clasen, J. Egginton, S. Gibson, A. Govindji, J. McClenaghan, F. Wilcock, Vodič kroz vitamine, minerale i dodatke prehrani, Mozaik knjiga, Zagreb, 2008.

[6] P. Karlson, Biokemija za studente kemije i medicine, Školska knjiga, Zagreb, 1993.

[7] https://ljekarnaonline.hr/proizvodi/dodaci-prehrani/vitamini-i-minerali/nw-kalij-magnezijc-effa10-7903/ (5. 5. 2022.)

[8] https://polleosport.si/kalij-120-tablet (5. 5. 2022.)

[9] https://gymbeam.hr/kalij-gymbeam.html (5. 5. 2022.)

[10] M. Kraševac, Određivanje kationa u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu sa C^4D detektorom, diplomski rad, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer, Odjel za kemiju, Osijek, 2016.

[11] T. Bolanča, Š. Ukić: Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015

[12] https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=57378 (7. 5. 2022.)

[13] M. Tomljanović, Instrumentalne kemijske metode, U. G. HIJATUS, Zenica, 2000.

[14] B. Néel, G. A. Crespo, D. Perret, T. Cherubini, E. Bakker, Journal of Chemical Education, 14;91(10), (2014), 1655-60.

[15] http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=4486 (20. 5. 2022.)

[16] C. Mavroukakis-Karagounis, I. Papadopoulou, M. Papadopoulou, C. Makedonas, Chemistry Teacher International. 2019; 20180013. 1;2(1), (2019).

[17] C. D. García, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho, Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: principles, applications, and limitations. John Wiley & Sons, New Jearsy, 2013.

[18] M. Damić, B. Nigović, Farmaceutski glasnik, 66(4), (2010), 195-207.

[19] I. Piljac, Elektroforeza, Media Print, Zagreb, 2006.

[20] A. H. Gordon, Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels, American Elsevier Pub. Co., 2013.

[21] E. R. Castro, A. Manz, Journal of Chromatography A. 20;1382, (2015), 66-85.

[22] T. P. Segato, S. A. Bhakta, M. T. Gordon, E. Carrilho, P. A. Willis, H. Jiaod, C. D. Garcia., Analytical Methods, 5 (2013), 1631 – 1888

[23] https://www.researchgate.net/figure/Glass-microchip-Micralyne-Inc-with-double-T-intersection_fig7_8015278 (21. 5. 2022.)

[24] E. X. Vrouwe, R. Luttge, W. Olthuis, A. van den Berg, Journal of chromatography A. 13;1102(1-2), (2006), 287-93.

[25] Z. Huang, M. Yang, H. You, Y. Xie, Electrophoresis, 39(14), (2018), 1802-7.

[26] W. R. Jones, P. Jandik, Am Lab., 22(9), (1990), 5-13.

[27] E. Vrouwe, R. Luttge, A. van den Berg, Electrophoresis, 25(1011), (2004) 1660–7.

[28] E. G. Kobrin, H. Lees, M. Fomitšenko, P. Kubáň, M. Kaljurand, Electrophoresis, 35(8), (2014), 1165-72.

[29] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper, Analytical chemistry, 74(10), (2002), 2407-15.

[30] 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.

[31] X. Mu, L. Qi, J. Qiao, H. Zhang, H. Ma, Analytical biochemistry, 421(2), (2012), 499-505.

[32] Z. Huang, M. Yang, H. You, Y. Xie, Analytical Sciences, 34(7), (2018), 801-5.

[33] J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M. A. Schwarz, P. C. Hauser, Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis. Analyst. Analyst, 127, (2002) , 214-218.

[34] P. Kowalski, I. Olędzka, A. Plenis, T. Bączek, Electrophoresis. 38(3-4), (2017), 477-85.

[35] Q. P. Wang, Z. L. Chen, G. N. Chen and J. M. Lin, Int. J. Environ. Anal. Chem., 91, (2011), 255–262.

[36] M. Thanh Duc, P. C. Hauser, Journal of chromatography A., 1267, (2012), 266-72.

[37] P. Kubáň, E. G. Kobrin, M. Kaljurand, Journal of Chromatography A. 1267, (2016), 239-45.

[38] P. Kubáň, P. C. Hauser, Electrophoresis. 26(16), (2005), 3169-78.

[39] M. Štefanović, Elektroforetske separacije nukleinskih kiselina, HKMB priručnik, Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, (Ž. Debeljak), Medicinska naklada, Zagreb, 2018., 53-72.

[40] M. C. Marra, R. R. Cunha, R. A. Muñoz, A. D. Batista, E. M. Richter, Journal of separation science. 40(17), (2017), 3557-62.

[41] I. C. Guimarães, J. A. Silva, D. P. Jesus, Eclética Química., 34, (2009), 51-6.

[42] A. J. Zemann, Electrophoresis. 12-13, (2003), 2125-37.

[43] https://www.edaq.com/product_sheets/hardware/ER225_C4D_Data_System.pdf (26. 5. 2022.)

[44] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper, Anal Chem., 74, (2002), 2407 – 2415

[45] https://www.edaq.com/product_sheets/hardware/ER430_HV_Sequencer.pdf (26. 5. 2022.)

[46] https://www.edaq.com/ET121 (26. 5. 2022.)

8. Životopis

Ja sam Marija Jakić, rođena 3. 2. 1998. godine u Osijeku. Osnovnu školu sam završila u OŠ Vladimira Nazora, Čepin. Zatim sam upisala Tehničku školu i prirodoslovnu gimnaziju Ruđera Boškovića u Osijeku, gdje sam 2016. završila prirodoslovnu gimnaziju. Iste godine upisujem preddiplomski studiji na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju. Preddiplomski studiji sam završila 2020. godine, a završni rad sam napisala pod mentorstvom doc.dr.sc. Marije Jozanović i doc.dr.sc. Brunislava Matasović, na temu „*Određivanje anorganskih kationa elektroforezom na mikročipu sa C^4D detektorom"*. Zatim sam upisala diplomski studiji na Odjelu za kemiju u Osijeku i odlučila se za nastavnički smjer. Diplomski rad sam pisala u okviru kolegija Analitička kemija, pod vodstvom doc.dr.sc. Marije Jozanović. Tema i naslov diplomskog rada je „*Primjena elektroforeze na mikročipu za određivanje anorganskih analita*". Tijekom svog studiranja aktivno sam sudjelovala na 3. studentskom kongresu zaštite zdravlja; Sanitas , 2020. godine, s temom „ *Razvoj novih metoda za detekciju aminokiselina u dijetetskim suplementima mikročip elektroforezom"* gdje smo osvojili prvo mjesto u kategoriji posterskih priopćenja. Nadalje, sudjelovala sam na 18. Ružičkinim danima u Vukovaru, 16. – 18. rujna 2020., na 27. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera na Velom Lošinju 2021. godine, te na 13. međunarodnom znanstveno-stručnom skupu Hranom do zdravlja u Osijeku od 16. do 17. rujna 2021.