Primjena elektroforeze na mikročipu u određivanju organskih supstanci

Budimčić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

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:182:441697

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

University Undergraduate Study Program

Student: Jelena Budimčić

The application of microchip electrophoresis in determination of the organic substances

Final year project

Mentor: Milan Sak- Bosnar, associate prof. dr. sc.

Assistent: Mirela Samardžić, doc. dr. sc.

Osijek, October 2012

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Studentica: Jelena Budimčić

Primjena elektroforeze na mikročipu u određivanju organskih supstanci

Završni rad

Mentor: Milan Sak- Bosnar, izv. prof. dr. sc.

Asistent: Mirela Samardžić, doc. dr. sc.

Osijek, listopad 2012.

1. UVOD

U prošlome desetljeću otkriveno je da je elektroforeza na mikročipu vrlo snažan analitički alat koji otvara vrata ka novoj generaciji uređaja za analitičku separaciju i detekciju tvari. Velik je pomak postignut i u proizvodnji mikročipova te njihovoj primjeni u odnosu na prototipove, no ipak komercijalizacija i šira upotreba ovoga snažnoga analitičkoga alata nije u potpunosti realizirana, ponajprije zbog manjka stručnosti i iskustva. Nadalje, elektroforeza na mikročipu ne nudi istu preciznost i točnost za pojedine analize kao tehnike bazirane na tekućinskoj kromatografiji. Nedavna otkrića i poboljšanja u kolonskoj tehnologiji tekućinske kromatografije dovela su do mogućnosti separacije tvari u sekundi, i uz to, veća stručnost i iskustvo na ovome području predstavljaju elektroforezi na mikročipu velikoga suparnika. Ipak, separacijska učinkovitost tehnika koje su bazirane na električnome polju nadmašuje učinkovitost tehnika baziranih na mehaničkome pumpanju i laminarnome toku, koje su osnova svih vrsta tekućinske kromatografije, što je vrlo bitno za opsežne i kompleksne kliničke analize. Tako velika učinkovitost elektroforeze na mikročipu, s više od milijun teoretskih tavana, preduvjet je za razvoj sljedeće generacije separacijskih tehnika i za njeno korištenje u širem spektru područja, kao što su medicina i industrija.

2. RAZRADA

2.1 Podrijetlo elektroforeze

Elektroforeza se definira kao migracija nabijenih čestica pod utjecajem primjenjenoga vanjskoga električnoga polja. Zbog različitoga naboja, veličine i oblika analita te zbog različitih svojstava upotrijebljenih otopina elektrolita postoje razlike u mobilnosti čestica analita. Reuss je bio prvi znanstvenik koji je proveo separaciju baziranu na ovome principu 1809. godine. Tijekom proučavanja migracije koloidnih čestica[1], zamjetio je da sloj tekućine najbliži negativno nabijenoj površini zida migrira prema negativnoj elektrodi pod utjecajem primjenjenoga vanjskoga električnoga polja. Teoretsko gledište ovoga elektrokinetičkoga fenomena, kojeg je Reuss nazvao elektroosmoza, izložio je Kohlrausch 1897. godine. Njihov je rad ohrabrio mnoge znanstvenike da započnu elektroforetske separacije različitih otopina, kao što su otopine globulina i toksina difterije, pa je u kasnome devetnaestome i ranome dvadesetome stoljeću provedeno mnoštvo takvih separacija u U-cijevima.

Tiselius je mnogo pridonio unaprijeđenju analitičkoga gledišta elektroforeze. Tijekom svoga rada na usavršavanju elektroforeze sa slobodno pomičućom granicom, uspješno je separirao smjesu kompleksa proteina na temelju različitih elektroforetskih mobilnosti pojedinoga kompleksa. Za ovaj je uspjeh bio odlikovan Nobelovom nagradom za kemiju godine 1948. Tada je vrlo slaba rezolucija pikova, uzrokovana njihovim širenjem zbog razvijanja Joulove topline te manjim dijelom uzrokovana difuzijom molekula, predstavljala veliki izazov za sve one koji su proučavali elektroforezu. Da bi se smanjilo širenje pikova, počeli su se upotrebljavati stabilizatori kao što su škrobni gel, papir, agaroza, celulozni acetat i poliakrilamidni gel. Iako su navedeni stabilizatori smanjili problem konvekcije, došlo je do nastanka drugih fenomena koji uzrokuju širenje pikova kao što je vrtložna difuzija i neželjena interakcija između analita i stabilizatora. Da bi se i tim fenomenima umanjio učinak, ili čak potpuno uklonio, Tiselius i Hjertén razvili su elektroforezu na poliakrilamidu s trimilimetarskim rotirajućim kapilarama te primijenili tu

[1] Koloidne su čestice veličine od 1 do 100 nm (1 nm = $1x10^{-9}$ m) te čine koloidni sustav za koji je karakteristično svojstvo Tyndallov fenomen, odnosno raspršenje svjetlosnih zraka.

tehniku za separaciju ribosoma i virusa. Hjertén je opisao i sažeo tu tehniku godine 1967., kada je postignuta stabilizacija kontinuiranom rotacijom cjevčice oko njene longitudinalne osi te kada se time mogao izbjeći problem širenja pikova i slabe rezolucije uzrokovane time.

2.2 Razvoj elektroforeze

Koristeći se dvjestomikrometarskim teflonskim cjevčicama, Everaerts i suradnici su 1970. godine pravili ekperimente vodeći se principom Giddingsove dedukcije[2], a također i Virtanen koristeći se staklenim cjevčicama godine 1974., te su potvrdili svoje hipoteze. Otkrili su stabilizirajući „efekt zida“ koristeći se tankim cjevčicama kao kolonama za separaciju u kojima se vrlo mali promjer kolone suprotstavlja konvekcijskome strujanju te se tako učinkovitost separacije i rezolucija pospješuju. Porast učinkovitosti proporcionalan je smanjenju promjera cjevčice na račun povećanja omjera površine i obujma cjevčice. Jorgenson i Lukacs su 1981. godine razvili uređaj za elektroforezu koristeći sedamdeset i petmikrometarsku otvorenu staklenu kapilaru s detektorom fluorescencije koji se nalazio na koloni. Uređajem su se koristili pri separaciji fluorescentnih danzilliranih aminokiselina i aminokiselina ljudskoga urina derivatiziranih fluoreskaminom. Separacija je trajala manje od 25 minuta, što je potvrdilo predviđenu učinkovitost ($>4_x10^5$ teoretskih tavana) te ilustriralo visoku učinkovitost elektroforeze u otvorenim cječicama maloga promjera.

Moguće prednosti elektroforeze u otvorenim cjevčicama maloga promjera su sljedeće:

1. Postignuto je djelotvorno vođenje topline unutar elektroforetskoga medija, vodeći k minimalnome temperaturnome gradijentu.
2. Efekti koji uzrokuju nedostatke, kao što je preostao temperaturni gradijent, smanjeni su difuzijom otopljene tvari kroz cjevčicu.
3. Medij je stabiliziran „efektom zida“ koji se protivi konvekcijskome strujanju.

Nakon navedenih početnih eksperimenata i nakon predstavljanja prvoga komercijalnoga uređaja za elektroforezu 1988. godine, potencijal elektroforeze, kao snažnoga analitičkoga alata visoke učinkovitosti, uskoro se počeo otkrivati te se ona krajem dvadesetoga stoljeća počela primjenjivati u analitičkoj (bio)tehnologiji, bioanalizi i farmaceutskoj analizi, posebno iz razloga što su za analizu potrebne samo vrlo male količine analita.

[2] Giddingsova dedukcija princip je koji govori o tome kako se mora postići vrlo visoka učinkovitost razdvajanja pikova, odnosno dobra rezolucija, kada je longitudinalna difuzija jedini uzrok širenja pikova.

Prvi minijaturizirani analitički uređaj bio je plinski kromatograf proizveden na silikonskome čipu, kojeg su izumili Terry, Jerman i Angell 1979. godine. Jedanaest godina nakon toga, 1990.-te godine, Manz, Graber i Widmer demonstrirali su koncept „potpunoga minijaturiziranoga kemijskoga sustava za analizu“, u kojem su analizatori ugrađeni na silikonski čip objedinili tri faze kemijske analize uzoraka: njihovu predobradu, separaciju i detekciju. Prvotno je glavni razlog minijaturizacije bio poboljšati analitičku izvedbu uređaja, a ne reducirati njegovu veličinu. Ipak, tijekom vremena ustanovili su da i veličina uređaja predstavlja prednost jer su tako potrebne i manje količine uzoraka i reagenasa, te shema potpune analize osigurava integraciju separacijskih tehnika koja omogućuje nadzor i praćenje funkcija velikoga broja komponenata i to na samo jednome uređaju. Otada razvoj elektroforeze na mikročipu ekplozivno napreduje. Elektroforeza i sistem injektiranja uzorka integriran na planarni silikon i staklene čipove demonstrirani su po prvi puta 1992. godine, te je dokazana uspješna izvedba korištenja elektroosmotskoga pumpanja za kontrolu toka u međusobno povezanim kanalima na planarnim čipovima. Fluorescein i kalcein separirani su kroz 6 minuta i detektirani fluorescencijom induciranoj laserom (LIF detekcijom). Naknadni napori bili su posvećeni poboljšanju brzine separacije na mikročipovima. Povećavajući napon i poboljšavajući detektor aminokiseline i boje su separirane za manje od 30 sekundi, te je tako ostvaren automatski reproducibilan postupak injektiranja uzorka i separacije na vremenskoj skali unutar jedne minute. Primjena mikročipova se tada počela proširivati u analitičke znanosti, te su se počeli primjenjivati u kliničkoj analizi, npr. za lančanu reakciju polimeraze (PCR), za DNA sekvenciranje, dijagnoze i imunoeseje. Proširenje upotrebe elektroforeze na mikročipu rezultiralo je brojnim komercijalnim produktima tvrtki Agilent, Caliper, Hitachi i Shimadzu.

Da bi se postigla uspješnija izvedba i specifična primjena, bilo je potrebno modificirati površinu mikrokanala. Jacobson, Hergenroeder, Koutny i Ramsey uveli su modifikaciju površine mikrokanala koristeći po prvi puta oktadecilsilan kao stacionarnu fazu u kromatografiji otvorenih kanala. Tijekom narednih nekoliko godina predlagane i proučavane su nove mikrotvorničke metode, sheme za injektiranje, geometrija kanala, načini separacije i detekcijske tehnike.

Proteklih godina objavljeno je mnoštvo znanstvenih radova vezanih uz primjenu elektroforeze na mikročipu u kliničkim testiranjima i analizama. Colyer sa svojim

suradnicima objavio je članke o primjeni elektroforeze na mikročipu u analizi proteina humanoga seruma, imunoeseju, DNA studijama, a također i o velikome potencijalu koncepta „laboratorij-na-čipu“. Li i Kricka predstavili su vrlo dobar pristup u dijagnozi većine bolesti, uključujući karcinome, kardiovaskularne i neurološke bolesti, te dijabetes korištenjem elektroforeze na mikročipu u kliničkim istraživanjima. Yatsushiro i Kataoka su opisali stvaranje sistema za nadgledanje i praćenje visoke razlučivosti za biomarkere u krvi te za aktivnost α-amilaze u humanoj plazmi korištenjem elektroforeze na mikročipu.

2.3 Princip elektroforeze

Kao što je rečeno, elektroforeza je analitička metoda kojom se određene supstance u otopini, najčešće otopini pufera, razdvajaju te determiniraju kvalitativno i kvantitativno pod utjecajem električnoga polja pomoću različitih detektora. Različite čestice razdvajaju se na temelju različitih mobilnosti u prisutstvu električnoga polja određene jakosti.

Kada se ion naboja q/C smjesti u električno polje jakosti E/Vm^{-1}, na njega djeluje akcelerirajuća sila qE/N. Prema III. Newtonovom zakonu na njega djeluje protusila suprotnoga smjera, a to je sila trenja fu_{ep}[3], gdje je f koeficijent frikcije ili trenja i u_{ep} brzina iona. Ion vrlo brzo postiže stalnu brzinu kada se akcelerirajuća sila izjednači iznosom sa silom trenja:

$F_a = F_{tr}$

$qE = fu_{ep} \ /_x 1/f$

$u_{ep} = (q/f)_x E$

$u_{ep} = \mu_{ep} E$, gdje je μ_{ep} elektroforetska mobilnost određenoga iona.

Elektroforetska mobilnost je konstanta proporcionalnosti između brzine iona i jakosti električnoga polja. Proporcionalna je električnome naboju iona, a obrnuto proporcionalna koeficijentu trenja, odnosno frikcije. Za molekule slične veličine, elektroforetska mobilnost raste s nabojem. Za sferne čestice hidrodinamičkoga radijusa r koje se gibaju kroz fluid viskoznosti η[4], frikcijski koeficijent f određen je prema Stokesovom zakonu:

$f = 6\pi\eta r$

Elektroforetska mobilnost je, prema prethodnim jednadžbama, omjer električnoga naboja i frikcijskoga koeficijenta (q/f), te je stoga ona obrnuto proporcionalna radijusu čestice: $\mu_{ep} = q/f = q/(6\pi\eta r)$

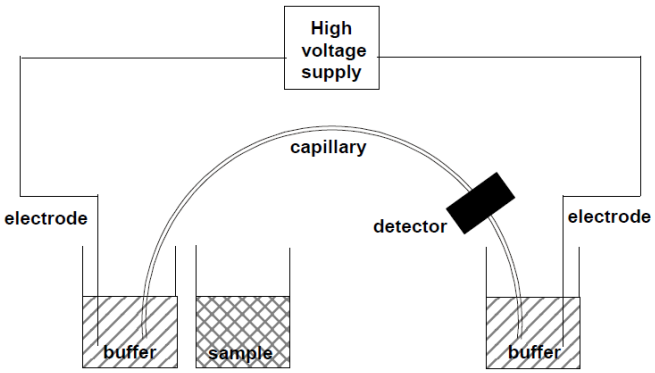
[3]Indeks „ep“ stoji kao skraćenica za „elektroforezu“.
[4] Viskoznost je fizikalna veličina koja opisuje otpor fluida prema laminarnome protjecanju, odnosno gibanju slojeva u obliku koaksijalnih cilindara. SI jedinica za viskoznost je kg m^{-1} s^{-1}.

Unutrašnji zid kapilare od taljenoga silicijevoga dioksida prekriven je silanolnim grupama (Si-OH) s negativnim nabojem ($Si-O^-$) i ima pH vrijednost oko 2. Dvostruki sloj sastoji se od fiksnoga negativnoga naboja na unutrašnjemu zidu kapilare i viška kationa blizu toga zida. Čvrsto adsorbirani nemobilni sloj kationa djelomično neutralizira negativni naboj. Preostali negativni naboj neutralizira se mobilnim kationima u difuzijskome dijelu dvostrukoga sloja u otopini blizu zida. Debljina difuzijskoga dijela dvostrukoga sloja je oko 10 nm kada je ionska jakost otopine 1 mM te oko 0,3 nm kada je ionska jakost otopine 1 M.

2.4 Elektroforeza u kapilarama i mikrokanalima

2.4.1 Svojstva kapilarne elektroforeze visoke razlučivosti (HPCE)

Kapilarna elektroforeza visoke razlučivosti analitička je tehnika u kojoj se separacija izvodi u uskim kapilarama s unutrašnjim promjerom između 10 i 100 μm. Korištenje kapilara ima brojne prednosti, posebno što se tiče rješavanja problema s Jouleovim efektom. Velika električna otpornost kapilara omogućuje primjenu električnoga polja velike jakosti s minimalnom pojavom stvaranja topline, koja se ionako raspršuje zbog velikoga omjera površine i volumena kapilare. Korištenje električnoga polja velike jakosti omogućuje vrlo kratko vrijeme analize, visoku djelotvornost i razlučivost. Nadalje, velik broj separacijskih metoda omogućuje mijenjanje selektivnosti, što ovu tehniku čini primjenjivom na široki spektar analita. Instrumentacija za kapilarnu elektroforezu visoke razlučivosti jednostavna je i shematski je prikazana na sljedećoj slici.



Slika 1. Shematski prikaz eksperimentalno postavljene aparature za kapilarnu elektroforezu.

Oba kraja uske kapilare od taljenoga silicijevog dioksida uronjena su dvije posude s otopinom pufera koji također ispunjava kapilaru. Posude također sadrže elektrode koje omogućuju električni kontakt između izvora visokoga napona i kapilare. Kapilara se napuni otopinom uzorka zamijenjujući jednu od posuda koje sadrže otopinu pufera s posudom u kojoj se nalazi uzorak, odnosno analit, primjenjujući vanjski tlak, što se naziva hidrodinamičko injektiranje, ili primjenjujući električno polje, što se naziva elektrokinetičko injektiranje. Nakon injektiranja uzorka, posuda s uzorkom i posuda s puferom ponovno se zamijene, primjeni se električno polje određene jakosti i separacija započinje. Detekcija je obično postavljena na suprotni kraj kapilare. Vrste detekcije su različite, ovisno o vrsti i svojstvima analita koji se želi kvalitativno ili kvantitativno odrediti. Za kapilarnu elektroforezu najčešće se koristi UV/Vis detektor, a nakon njega prema korištenju slijede detektori bazirani na fluorescenciji, amperometriji, konduktometriji te masenoj spektrometriji. Moderni uređaji za kapilarnu elektroforezu visoke razlučivosti potpuno su automatizirani te omogućuju jednostavnu i preciznu kvantitativnu analizu.

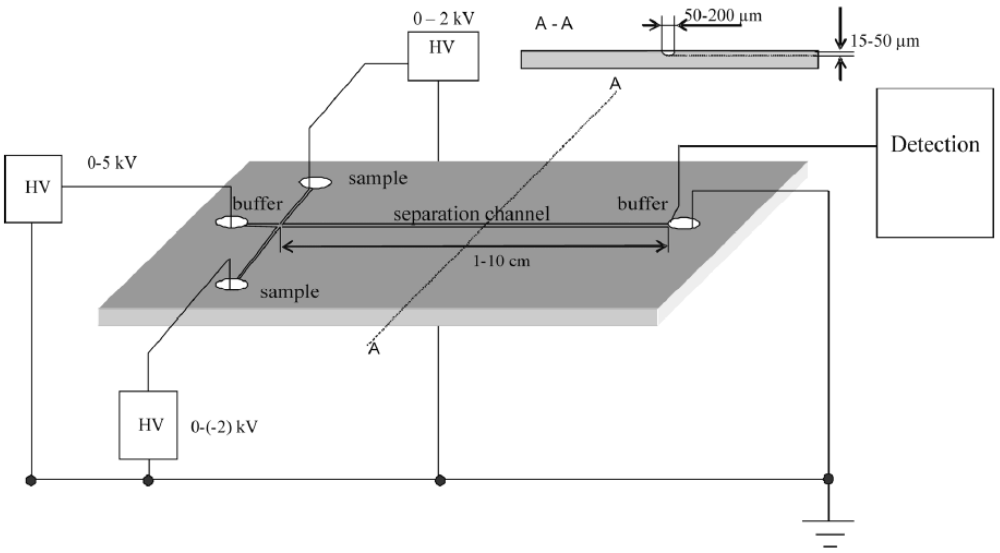
Posebno važan fenomen koji se pojavljuje u kapilarnoj elektroforezi je takozvani elektroosmotski tok (EOF). Elektroosmotski tok je masovni tok tekućine unutar kapilare, koji uzrokuje kretanje većine vrsta u istome smjeru, bez obzira na njiihov naboj i hidrodinamički polumjer, te je tako omogućena simultana separacija kationa i aniona. Ova pojava događa se zbog disocijacije silanolnih grupa kapilarnoga zida načinjenoga od taljenoga silicijevog dioksida. Negativno nabijeni zid kapilare privlači ione suprotnoga naboja te se tako formira dvostruki sloj. Primjenjeno električno polje uzrokuje gibanje kationa difuzijskoga dijela dvostrukoga sloja prema katodi, negativno nabijenoj elektrodi. Budući da molekule vode stvaraju hidratacijski plašt oko kationa, i one su odvučene prema katodi zajedno s kationima oko kojih su poslagane te tako dolazi do pojave elektroosmotskoga toka. Njegova veličina, koja se izražava kao mobilnost elektroosmotskoga toka, ovisi o brojnim parametrima promatrane otopine kao što su pH, ionska jakost, jakost električnoga polja te prisutnost određenih aditiva.

Pojava elektroosmotskoga toka može se smanjiti ili izbjeći modifikacijama kapilarnoga zida, koje mogu biti trajne ili dinamičke. Trajne modifikacije kapilarnoga zida realiziraju se kovalentnim vezanjem ili fizikalnim prijanjanjem određenih spojeva na

silanolne grupe kapilarnoga zida. Najčešće trajne modifikacije uključuju sililaciju kapilarnoga zida praćenu deaktivacijom s prikladnim funkcionalnim grupama spojeva kao što su poliakrilamid, polietilenglikol i polisaharidi. Dinamičke modifikacije kapilarnoga zida uključuju dodavanje prikladnoga modifikatora elektrolitu koji reagira s neobloženim zidom kapilare te na taj način utječe na pojavu i veličinu elektroosmotskoga toka.

2.4.2 Svojstva elektroforeze na mikročipu

Elektroforeza na mikročipu rezultat je minijaturizacije kapilarne elektroforeze, tako da je separacijski proces na mikročipu baziran na istome principu kao i u kapilari. Obje tehnike imaju dosta zajedničkih karakteristika kao što su visoka električna otpornost koja omogućuje primjenu električnoga polja velike jakosti te postojanje elektroosmotskoga toka. Mikročip, kao i kapilara, nudi različite separacijske modove za širok spektar analita. Upravo zbog svoga planarnoga minijaturiziranoga formata uređaj za mikrofluidičku separaciju ima i neka svojstva koja se razlikuju od onih za kapilaru.



Slika 2. Shematski prikaz mikročipa za elektroforezu (HV označava izvor visokoga napona, a A-A poprečan presijek mikročipa).

Tipična konstrukcija mikročipa sastoji se od mikrokanala posloženih u obliku križa s jednim produljenim krajem koji se naziva separacijski kanal jer se ondje odvija separacija analita. Tipična dubina kanala je od 15 do 50 μm, širina od 50 do 200 μm, a duljina od 1 do 10 cm. Četiri posudice za tekućinu smještene su po jedna na svakom kraju kanala; dvije služe za uvođenje analita i elektrolita (otopine pufera) u injekcijski, odnosno separacijski kanal, a preostale dvije služe kao posudice za otpad. Elektrode su postavljene u svim posudicama omogućujući tako povezivanje s izvorom visokoga napona.

Injektiranje analita počinje u kraćem kraju kanala uključivanjem električnoga polja određene jakosti te traje obično nekoliko sekundi. Trajanje injektiranja trebalo bi odgovarati vremenu prelaska udaljenosti od posudice do raskrižja kanala, gdje se primjenom novoga električnoga polja analit usmjerava u separacijski kanal (dulji kraj kanala). Da bi se izbjegle pogreške nejednakih vremena injektiranja analita ili njegove separacije, ovi su koraci automatizirani i najčešće kontrolirani neovisnim izvorom visokoga napona.

Detekcija na mikročipu uobičajeno je postavljena pri završetku duljega kraja separacijskoga kanala, a najčešće se koristi LIF detektor, odnosno detektor baziran na fluorescenciji induciranoj laserom, upravo zbog svoje osjetljivosti. Koriste se i elektrokemijske detekcijske metode, te maseni spektrometar, no, za razliku od uređaja za kapilarnu elektroforezu, za elektroforezu na mikročipu se ne koriste detektori bazirani na UV/Vis apsorpciji jer su male osjetljivosti.

2.5 Prijenos kapilarne elektroforeze na mikročip

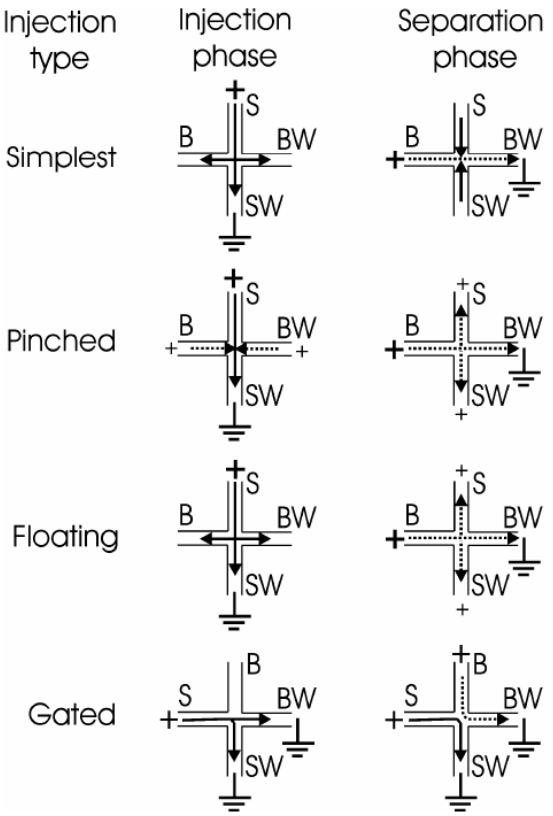
Minijaturizacija i prijenos kapilarne elektroforeze na mikročip obećavajuća je tehnologija u analitičkoj kemiji budući da elektroforeza na mikročipu ima nekoliko prednosti u odnosu na kapilarnu elektroforezu. Prednosti minijaturizacije procesa su skraćeno vrijeme analize, smanjena potrošnja reagenasa i uzoraka budući da se radi o mikrokoličinama, on- line povezivanje različitih procesa i potencijalna paralelna mjerenja. Iako su prednosti brojne, one ne umanjuju činjenicu da se uređaji za elektroforezu na mikročipu još trebaju poboljšavati jer nedostaci koji postoje ograničavaju djelotvornost i preciznost injektiranja i separacije, pa time i točnost same metode.

2.5.1 Prednosti minijaturizacije

Reducirano vrijeme analize i smanjena potrošnja reagenasa i uzoraka prednosti su koje su proizašle iz same minijaturizacije uređaja za separaciju. Separacija na mikročipu traje najviše nekoliko minuta, što vodi do veće propusne moći uzorka u usporedbi s kapilarnom elektroforezom. Brza analiza također ubrzava razvoj same separacijske metode zato što se bilo kakva promjena u uvjetima odmah manifestira na čipu. Nadalje, mikročip zahtijeva samo pikolitre uzorka i mikrolitre ostalih reagenasa te tako omogućuje korištenje skupljih i rijetkih tvari. On- line povezivanje, odnosno integracija različitih procesa u samo jedan uređaj čini osnovu za koncept *potpunoga mikrosustava za analizu*. Iako je taj koncept još uvijek teorija, ulažu se napori da se taj koncept ostvari i u praksi, te da ima što manje nedostataka. Pravi *potpuni mikrosustav za analizu* bi trebao sadržavati sve navedene elemente: komponentu za pripremu uzorka kao što je ekstrakcija ili pročišćavanje, načine da se manipulira uzorkom uključujući miješanje i reagiranje s ostalim reagensima, separacijski korak, te detekcijsku komponentu za kvantitativno određivanje analita od interesa. Dosad je dokazano da je elektroforeza na mikročipu najpraktičnija separacijska metoda za separacijski korak u konceptu *potpunoga mikrosustava za analizu* jer ne zahtijeva korištenje pumpi ili pokretnih dijelova za poticanje toka fluida.

2.5.1.1 Poboljšanje strategije injektiranja

Predloženo je nekoliko shema injektiranja kontroliranih naponom radi poboljšanja kontrole ulaska uzorka elektrokinetičkim injektiranjem.



Slika 3. Pregled osnovnih shema injektiranja kontroliranih naponom za elektrokinetičko injektiranje na mikročipu (S označava uzorak, SW otpadni uzorak, B pufer, BW otpadni pufer). Strjelice pokazuju smjer toka uzorka (puna crta), te smjer toka pufera (isprekidana crta) tijekom injektiranja i separacije.

Najčešće korištena strategija injektiranja je takozvano *pinched* injektiranje. U ovoj shemi, ograničeni napon je primjenjen na ulazni (B) i izlazni kraj kanala pufera (BW) tijekom faze injektiranja. Tako se inducira tok pufera prema posudici za otpadni uzorak (SW) da bi se suprotstavio difuziji analita u separacijskome kanalu. U isto vrijeme tok uzorka fokusiran je tako da omogućuje injektiranje vrlo uske zone uzorka. U separacijskoj fazi koja slijedi, primjenjuje se statički napon na ulaz za uzorak (SI)[5] i na posudicu za otpadni uzorak (SW) kako bi odvukao analite natrag prema posudici, sprječavajući tako curenje uzorka u separacijski kanal za vrijeme trajanja mjerenja. Iako je ova strategija injektiranja vrlo reproducibilna, točnu je količinu uzorka teško odrediti. Istraživanjima je dokazano da injektirana količina uzorka jako ovisi o razlici potencijala primjenjenoj na svaku posudicu tijekom injektiranja i faze separacije. Generalno gledajući, granica detekcije injektiranoga analita koristeći se ovom strategijom puno je veća u odnosu na nekontrolirano jednostavno injektiranje iako su u njoj korištene manje količine uzorka, odnosno otopine uzorka manje koncentracije. Nadalje, injektiranje uske zone uzorka ima prednost jer omogućava vrlo visoku učinkovitost elektroforetičke separacije.

Također je predložena strategija *floating* injektiranja kao kompromis između reproducibilnosti injektiranja i osjetljivosti detekcije. U ovoj strategiji faza injektiranja se provodi bez kontrole napona, dok se u separacijskoj fazi primjenjuje statički napon na ulaz za uzorak (SI) i na posudicu za otpadni uzorak (SW). Konačna koncentracija uzorka injektiranoga korištenjem *floating* strategije povećana je difuzijom uzorka u separacijskome kanalu tijekom faze injektiranja.Očigledno je da vrijeme injektiranja ima važnu ulogu u ovoj strategiji.

Drugačiji pristup prema elektrokinetičkom injektiranju kontroliranom naponom predstavlja takozvana strategija *gated* injektiranja. Za razliku od dosad navedenih strategija, u ovoj shemi uzorak ima stalan tok praveći okret pod pravim kutom u središtu križanja kanala nasuprot posudice za otpadni uzorak (SW). Simultano, kontinuirani tok pufera se stvaraprema posudicama za otpadni uzorak (SW) i za otpadni pufer (BW), sprječavajući tako curenje uzorka u separacijski kanal. Tijekom faze injektiranja uzorka prekinut je tok pufera kako bi se dio uzorka počeo kretati kroz separacijski kanal. Mogućnost periodničnoga uzorkovanja kontinuiranoga toka analita je velika prednost koja omogućuje spajanje procesa elektroforeze sa derivatizacijom ili prekoncentriranjem.

[5] SI označava *sample inlet*, odnosno mjesto ulaska uzorka u kanal.

Sve navedene sheme pripadaju tipovima elektrokinetičkoga injektiranja te je bitno naglasiti da se kod ove vrste injektiranja događa diskriminacija analita temeljena na njihovim specifičnim mobilnostima. Količina injektiranoga analita proporcionalna je njegovoj mobilnosti. Ovakva vrsta diskriminacije spriječena je korištenjem metode injektiranja uzorka pod utjecajem tlaka. Uzorak se uvodi u injekcijski kanal pod utjecajem vanjskoga primjenjenoga ili hidrostatičkoga tlaka. Ipak, nijedna od dviju navedenih metoda injektiranja nije idealna u terminima precizne kontrole točno određene količine uzorka koji se uvodi i potpune eliminacije curenja uzorka iz injekcijskoga u separacijski kanal.

2.5.2 Nedostaci minijaturizacije

2.5.2.1 Ograničena separacijska učinkovitost mjerenja u zonalnoj elektroforezi

Separacijska učinkovitost može se definirati kao sposobnost separacijskoga sustava određene selektivnosti da razdvoji zone dvaju ili više analita. U zonalnoj elektroforezi separacija je bazirana na različitim mobilnostima analita. Razlika u mobilnosti, nužna da bi se dvije zone razdvojile, što se naziva i rezolucijom zona, determinirana je separacijskom učinkovitošću, koja je, nadalje, određena duljinom zone. Na duljinu zone utječu brojni disperzijski čimbenici koji uzrokuju njeno širenje, odnosno disperziju zone. Pri idealnim uvjetima samo longitudinalna difuzija[6] ima utjecaj na širenje zone. Iz ovoga se može zaključiti da će se postići veća separacijska učinkovitost ukoliko je kraći migracijski put jer analiti stižu do detektora u kraćem vremenu te tako imaju manje vremena difundirati. Pri realnim uvjetima ne postoji samo jedan, već mnoštvo disperzivnih faktora, pa je time i sama separacijska učinkovitost ograničena što predstavlja izazov kojemu je potrebno naći rješenje.

[6] Longitudinalna difuzija termin je koji opisuje difuziju uzduž migracijskoga puta.

Na mikročipu duljina ulaza injektiranja najčešće premašuje duljinu zone kontroliranu difuzijom i tako postaje dominantni izvor disperzije. To je pravi razog zašto je separacijska učinkovitost mjerenja u zonalnoj elektroforezi na mikročipu često puno manja no što bi to teoretski bilo moguće uzimajući u obzir skraćene putove migracije. Da bi se smanjio ili čak uklonio disperzijski učinak kojega pridonosi dulji ulaz injektiranja, zona injektiranja bi se trebala minimizirati. Ovo se može postići smanjenjem dimenzija poprečnoga presijeka mikročipa, koji služi kao injektor. Primjer ove strategije, kojom se želi postići veća separacijska učinkovitost, primjena je uskoga kanala za uzorak koji ima širinu pet puta manju od širine separacijskoga kanala. Nadalje, kraći ulaz injektiranja zahtijeva korištenje koncentriranijih uzoraka kako bi se postigla jednaka osjetljivost detekcije. Kao što se može primjetiti, nereproducibilno injektiranje predstavlja kritičan problem koji je nastao iz same križne geometrije kanala, a kojemu treba naći riješenje da bi sustav uopće mogao biti pouzdan u mjerenjima.

2.5.2.2 Neprecizno injektiranje

Elektrokinetičko je injektiranje najčešće korištena metoda injektiranja na mikročipu budući da ne zahtijeva dodatne mehaničke uređaje koji bi pokretali tekući uzorak. Korištenjem ove metode injektiranja uzorak se uvodi u kanal za uzorak prijenom električnoga polja određene jakosti . Kada se električno polje isključi u kanalu za uzorak, ili injekcijskome kanalu, istovremeno se uključi električno polje određene jakosti u separacijskome kanalu pa dio uzorka koji se nađe u središtu raskrižja kanala pod utjecajem električnoga polja odlazi u separacijski kanal te tako sparacija započinje. Duljina puta injektiranja prvenstveno ovisi o vremenu injektiranja te o samoj geometriji poprečnoga presijeka. Nadalje, točna količina injektiranoga uzorka ne može se odrediti budući da se curenje uzorka u injekcijski kanal tijekom injektiranja ne može strogo kontrolirati, a također i za vrijeme separacije. Može se samo napraviti usporedba koncentracija i količina uzorka na temelju spektra dobivenog detektorom, odnosno integriranjem površina ispod dobivenih pikova. Kako je kratak i precizno definiran ulaz za uzorak kritična točka za postizanje visoke separacijske učinkovitosti, razvijaju se različite strategije za poboljšanje reproducibilnosti injektiranja.

2.5.2.3 Mala osjetljivost apsorpcijske detekcije

UV/Vis detekcija jedna je od najčešćih detekcijskih metoda korištenih u kromatografskim i elektroforetičkim mjerenjima. Ova je detekcijska metoda izrazito selektivna i primjenjiva na većinu organskih spojeva. Nadalje, u odnosu na ostale detekcijske metode UV/Vis detekcija je vrlo jefina i jednostavno ju je implementirati. Osim detektora koji mjere samo pri jednoj valnoj duljini, dostupni su i detektori koji mogu istovremeno mjeriti pri više valnih duljina i ti se danas najviše koriste. Detekcija analita pri nekoliko valnih duljina smanjuje apsorpciju nerelevanitnih pikova. Detektori s diodnim matricama omogućuju određivanje nepoznatih analita uspoređujući dobivene UV/Vis apsorpcijske spektre s knjižničkim spektrima. Osjetljivost UV/Vis detekcije ovisi o molarnoj apsorptivnosti zadanoga analita ε, koja je specifično svojstvo određene tvari, te o optičkoj duljini puta l. Beer- Lambertov zakon opisuje količinu, odnosno intenzitet svjetlosti koji apsorbira otopina koncentracije c i molarne apsorptivnosti ε na duljini puta l. Budući da Beer- Lambertov zakon nema linearan oblik, uveden je matematički termin apsorbancije koji je jednak negativnome logaritmu transmitancije[7] kako bi se dobila linearna ovisnost.

$I=I_0 x10^{-\varepsilon lc}$ /log

$log(I/I_0)= -\varepsilon lc$

$log\ T=-\ \varepsilon lc$

$log(1/T)= \varepsilon lc$

$A= \varepsilon lc$

Kratka optička duljina puta osnovni je razlog male osjetljivosti UV/Vis apsorpcijske detekcije na mikročipu. Osjetljivost ove detekcije na mikročipu može se povećati povećanjem optičke duljine puta korištenjem ćelija u obliku slova Z ili korištenjem multireflektirajućih detekcijskih ćelija s metalnim ogledalima. Budući da je

[7] Transmitancija je omjer izlaznoga i ulaznoga zračenja, odnosno količina propuštene svjetlosti.

takve ćelije komplicirano praviti i proizvoditi, za mikročip se preferiraju ostale detekcijske tehnike.

2.5.2.4 Rana faza komercijalizacije

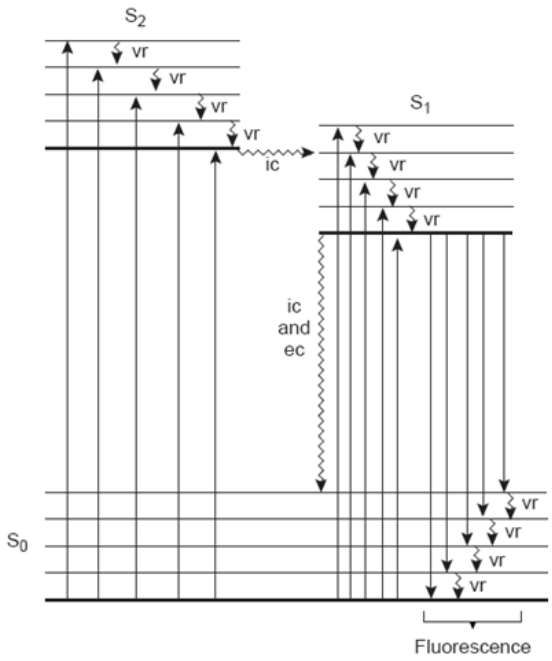
Komercijalizacija tehnologije separacija i analiza na mikroskali za primjenu u genomici, proteomici, otkriću lijekova i medicinskoj dijagnostici glavna je pokretačka snaga u razvoju mikrotvorničkih separacijskih uređaja. Iako se nekoliko komercijalnih uređaja za elektroforezu na mikročipu pojavilo na tržištu, njihova primjena u rutinskim analizama još

uvijek se nalazi u fazi testiranja. Daljnja poboljšanja automatizacije i povećanja osjetljivosti detekcije za analite koji se u otopinama nalaze u tragovima mogu se očekivati vrlo skoro, što će učiniti tehnologiju elektroforeze na mikročipu prihvatljivom u komercijalnim laboratorijima.

2.5.3 Ostale detekcijske metode za elektroforezu na mikročipu

2.5.3.1 LIF detekcija

Detekcija fluorescencijom induciranoj laserom (LIF detekcija) najčešće je korištena metoda na čipu zbog svoje visoke osjetljivosti. Koherencija laserske zrake omogućuje jednostavno fokusiranje na malu detekcijsku ćeliju i skoro stopostotan intenzitet laserske svjetlosti usmjeren je na ćeliju što omogućuje jako veliku detekcijsku osjetljivost, ponekada čak detekcijska granica seže na nivo same molekule. Fluorescencija je relaksacija s pojavom zračenja unutar istoga multipleta, obuhvaća prijelaz iz pobuđenoga singletnoga stanja na nulti vibracijski nivo osnovnoga singletnoga stanja, te traje nekoliko nanosekundi.



Slika 4. Shematski prikaz fluorescencije.

Nažalost, dosta analita nisu prirodni fluorofori te se moraju derivatizirati kako bi se detektirali ovom metodom, no ponekada čak niti ne postoji način derivatiziranja analita u fluorofore pa korištenje ove metode detekcije postaje neupotrebljivo. Nadalje, uređaj za LIF detekciju, kao i za UV/Vis, puno je veći od samoga mikrotvorničkoga separacijskoga uređaja, što je prepreka u ostvarivanju proizvodnje prijenosnoga analitičkoga uređaja.

2.5.3.2 Elektrokemijska detekcija

Elektrokemijska detekcija generalno se uklapa jako dobro u minijaturizirane analitičke uređaje te je stoga pogodno alternativno rješenje za elektroforezu na mikročipu, i k tome ima jako dobru osjetljivost i selektivnost. Postoji nekoliko prednosti elektrokemijskih detekcijskih metoda u odnosu na ostale, uključujući mogućnost minijaturiziranja i detektora i kontrolne instrumentacije te činjenica da se mnogi spojevi mogu detektirati bez derivatizacije. Elektrokemijska detekcija dijeli se u četiri skupine detektora bazirane na različitim fizikalnim veličinama koje mjere: amperometrijski, koji

mjeri jakost električne struje koja prolazi kroz elektrolitsku ćeliju pri konstantnom potencijalu, voltametrijski, koji određuje koncentracije iona u razrijeđenim otopinama mjerenjem struje kao funkcije napona kad se polarizacija iona događa oko elektrode, konduktometrijski, koji mjeri vodljivost otopine koristeći inertne elektrode, naizmjeničnu struju i električni nulti krug; mjerenje pri nultoj struji i bez elektrolize, te potenciometrijski, koji mjeri elektrodni potencijal elektrode u otopini elektrolita pri nultoj struji.

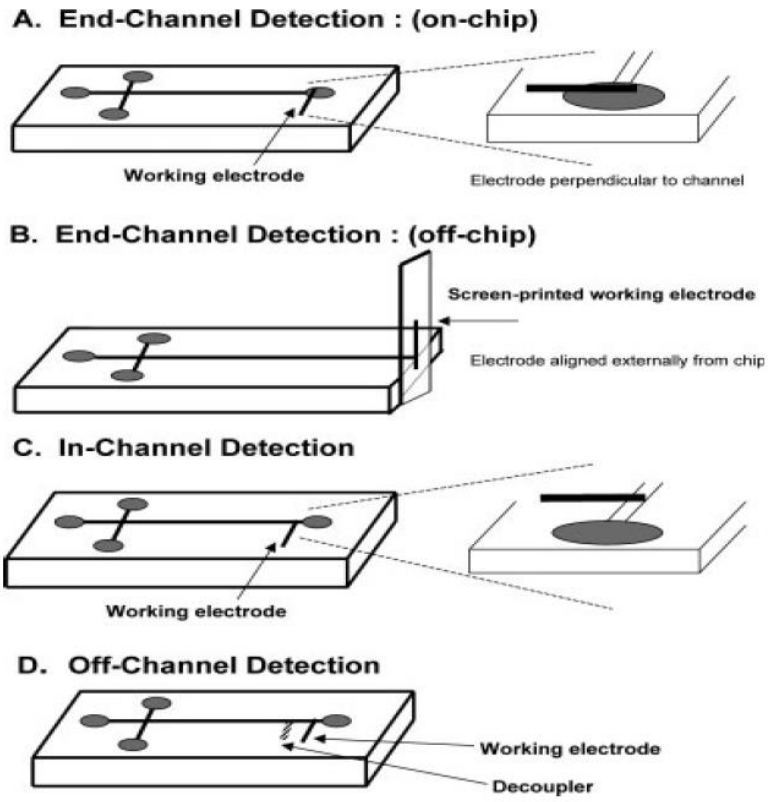
2.5.3.2.1 Amperometrijska detekcija

Od svih dostupnih elektrokemijskih detektora za elektroforezu na mikročipu najupotrebljavaniji je amperometrijski detektor zbog jednostavnoga rukovanja i minimalnoga prinosa pozadinske[8] struje. Ova detekcijska metoda temelji se na mjerenju jakosti električne struje oksidiranoga i reduciranoga oblika analita na radnoj elektrodi te je tako ograničena na elektroaktivne specije. Redoks reakcija elektroaktivnoga analita omogućena je primjenom konstantnoga potencijala radne elektrode, a proizvedena struja se bilježi kao funkcija vremena. Za spajanje amperometrijske detekcije i elektroforetske separacije vrlo je važno eliminirati smetnje rezultirane visokim separacijskim naponom. Razvijena su tri različita pristupa za izolaciju električnoga polja separacije. Pristupi se razlikuju prema lokaciji radne elektrode u odnosu na separacijski kanal te se zovu: *end-channel* (*off-chip* ili *on-chip*), *off- channel* i *in- channel* detekcija.

Konvencionalni potenciostat za amperometrijsku detekciju sastoji se od tri elektrode i to od radne, pomoćne i referentne. Sveukupno treba biti četiri elektrode (tri navedene te jedna elektroforetska osnovna elektroda) na kraju separacijskoga kanala u konvencionalnom pristupu *end- channel* detekcije za elektroforezu na mikročipu. Ipak, stavljanje četiri elektrode na kraj detektora predstavlja tehnički izazov za minijaturizirane separacijske uređaje s obzirom na položaj referentne elektrode koja mora imati unutrašnji elektrolit ili tekuću poveznicu, a koje je teško minijaturizirati. Zato je smišljen jednostavniji raspored elemenata detekcije, koji zahtijeva sveukupno samo dvije elektrode: radnu i elektroforetsku osnovnu elektrodu. Elektroforetska osnovna elektroda ponaša se kao

[8] Pozadinska struja je doslovan prijevod engleskoga termina *background current*, koji označava šumove i smetnje u pozadini, odnosno u otopini pufera u kojoj se uzorak nalazi.

pomoćna u odnosu na detektor, te kao pseudoreferentna. Bilo je potrebno konstruirati poseban strujni krug za jednostavniji dvoelektrodni amperometrijski detektor. Dvoelektrodna detekcija može se primijeniti na velik broj različitih analita, no optimalni detekcijski potencijal za određeni analit mora se eksperimentalno odrediti jer se on mjeri relativno, u odnosu na pseudoreferentnu osnovnu elektroforetsku elektrodu, koja ima dovoljno stabilan i stalan potencijal, a čija vrijednost ovisi o jačini primjenjenoga separacijskoga napona. Dakle, potencijal pseudoreferentne elektrode funkcija je separacijskoga napona.



Slika 5. Četiri moguće konfiguracije amperometrijskoga detektora za elektroforezu na mikročipu koje omogućuju razdvajanje detektora od napona za separaciju.

2.5.3.2.1.1 *End- channel* detekcija

End- channel detekcija najčešće je korišteni oblik amperometrijske detekcije za elektroforezu na mikročipu zbog svoje jednostavne eksperminetalne instalacije. U ovoj je konfiguraciji radna elektroda udaljena desetak mikrometara od izlaznoga kraja separacijskoga kanala, što omogućuje dovoljno razdvajanje separacijskoga napona od radne elektrode. Postoje dvije vrste rasporeda elemenata u *end- channel* detekciji, a to su: *off-chip* i *on-chip*. *Off- chip* detekcija rasprostranjenija je zbog svoga jednostavnoga mijenjanja sastavnih elemenata i lakoga čišćenja, dok se za *on- chip* detekciju moraju koristiti moderne mikrofabricirane tehnike da bi se elektrode inkorporirale na mikročip, i k tome ova vrsta detekcije koristi se za jednokratnu upotrebu jer su elektrode nezamijenjive.

2.5.3.2.1.2 *Off- channel* i *in- channel* detekcija

Off- channel detekcija bazira se na postojanju razdvajajućega elementa koji efektivno odvodi separacijski napon te se tako stvara slobodno područje za elektroforezu, gdje elektroosmotski tok usmjeruje analite pored radne elektrode.

In- channel detekcija se bazira na postojanju električki izoliranoga potenciostata, koji omogućuje smještanje radne elektrode direktno u separacijski kanal. Obje vrste detekcije eliminiraju širenje pikova, koje je karakteristika *end- channel* detekcije, upravo zbog difuzije analita koja se događa u području između kraja separacijskoga kanala i elektrode.

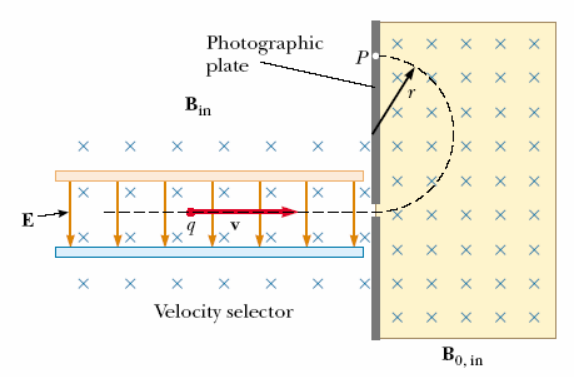
2.5.3.3 Masena spektrometrija

Potrebno je spomenuti i ovu vrstu detekcije koja se najčešće koristi u proteomičkim eksperimentima na uređajima za elektroforezu na mikročipu. Bazirana je na primjeni međusobno okomitih vektora električnoga i magnetskoga polja. Nabijena čestica

najprije ulazi u diskriminator brzina kojeg zapravo čine dvije suprotno nabijene ploče kondenzatora. Budući da se radi o nabijenoj čestici u gibanju, na nju djeluju i električna i magnetska sila, koje se jednim imenom nazivaju Lorentzovom silom. Ovisno o omjeru mase i naboja čestice, nakon izlaska iz diskriminatora brzina, nabijena čestica ulazi u novo magnetsko polje te se zakreće i udara o fotografsku ploču. Radijus zakretanja proporcionalan je masi, a obrnuto proporcionalan električnome naboju čestice, što pokazuje izraz:

$m/q = (rB_0B)/E$

gdje je B jakost magnetskoga polja u diskriminatoru brzina, a B_0 nakon izlaska iz diskriminatora brzina, E je jakost električnoga polja u diskriminatoru brzina.



Slika 6. Shematski prikaz spektrometra mase.

Mikročipovi, koji se koriste u elektroforezi, uspješno su povezani s masenim spektrometrom korištenjem elektrospreja ili novije tehnike bazirane na desorpciji ionizacije laserom. Budući da je tvornička proizvodnja takvih sklopova vrlo komplicirana i skupa, to i dalje predstavlja veliki tehnički izazov.

Sve navedene detekcijske metode za elektroforezu na mikročipu imaju analogne signale odziva. Najčešće su to fizikalne veličine električnoga napona i jakosti električne struje u ovisnosti o migracijskome vremenu analita.

2.6 Kvantitativno određivanje triju derivata imidazola elektroforezom na mikročipu kemiluminiscentnom detekcijom

Derivatima sličnim imidazolu pripadaju: karnozin (Car), anserin (Ans) te homokarnozin (Hcar). Skupina ovih triju peptida zapravo su derivati imidazola i široko su rasprostranjeni unutar koljena Vertebrata, odnosno kralješnjaka. Tijekom dosadašnjih istraživanja dokazano je da navedeni spojevi sudjeluju u mnogobrojnim esencijalnim reakcijama u organizmu, kao što su puferiranje, kelatiranje metala, skupljanje radikala, te modulacija enzimske aktivnosti.

Navedeni spojevi kvantitativno su određeni HPLC- om te kapilarnom elektroforezom s LIF detekcijom u uzorcima mesa i humanog cerebrospinalnog fluida. Navedene metode imaju brojne nedostatke što se tiče dugoga vremena analize i ograničenoga trajanja stacionarne faze (kod HPLC- a) te sofisticirana i preskupa instrumentacija (kod kapilarne elektroforeze). Kao što je već navedeno, elektroforeza na mikročipu ima prednost pred kapilarnom budući da je njena minijaturizirana verzija, te sadrži sve biokemijske procese analize na jednom jedinom uređaju.

Kemiluminiscencijska detekcija je vrlo osjetljiva i selektivna detekcijska metoda, k tome ima jednostavnu instrumentaciju te se lako i jeftino održava. Još je jedna prednost ovoga detektora, a to je ta da se može minijaturizirati, te tako uklopiti s elektroforezom na mikročipu.

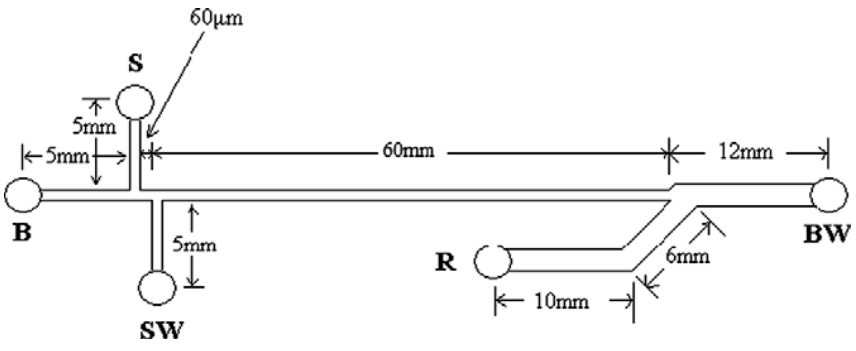
Kako bi se naveddeni peptidi detektirali ovim detektorom, bilo je potrebno označiti ih markerom, odnosno reagensom s kojim će postati detektabilni kemiluminiscentnim detektorom. Peptidima je dodan *N*- (4- aminobutil)- *N*- etilsoluminol ili skraćeno ABEI. ABEI je derivat izosoluminola i jako je kemiluminiscentan u svom oksidiranome stanju. U prethodnim objavljenim radovima koristio se za označavanje biogenih amina korištenjem metode HPLC- a. Objavljen je rad o prekolonskom označavanju biogenih amina kemiluminiscentnim markerom ABEI što je pokazalo da prekolonsko označavanje ima puno prednosti pred klasičnim dodavanjem markera u otopinu pufera. Na taj način se izbjegava miješanje pufera i markera što rezultira smanjenjem pozadinskih šumova

kemiluminiscentnoga detektora. U navedenom eksperimentu dodan je adenin kao pojačivač kemiluminiscencije te kobaltov (II) ion kao katalizator, koji su poboljšali osjetljivost cjelokupne metode.

2.6.1 Materijali i metode

U eksperimentu su korišteni sljedeće tvari i otopine: karnozin, anserin i homokarnozin; glutation, taurin i *γ*- aminobutanska kiselina (GABA); 20 preoteinogenih aminokiselina, *N*, *N*`- disukcinimidil karbonat (DSC), vodikov peroksid i natrijev dodecilsulfat (SDS); kao elektroforetski pufer koristio se 15 mM boratni pufer (pH 9,8 standardiziran 1 M otopinom NaOH) koji sadrži 1 mM Co^{2+}, 1 mM adenin i 35 mM SDS. Kemiluminiscentni oksidans bila je 40 mM otopina natrijevoga bikarbonatnoga pufera (pH 12,5 standardizirana s 1 M otopinom NaOH) koja sadrži 110 mM vodikova peroksida. Otopine ABEI- a i DSC- a pripremljene su u metanolu i acetonitrilu, dok su otopine peptida pripremljene u vodi.

Koristio se hibridni mikročip od stakla/polidimetilsiloksana (PDMS). Kemiluminiscentni fotoni detektirali su se na fotomultiplicirajućoj cijevi nakon prolaska pored ogledala i leća koji se nalaze u sastavu kemiluminiscentnoga detektora.



Slika 7. Shematski prikaz korištenoga staklo/PDMS mikročipa.

Uzeti su uzorci cerebrospinalnoga fluida (CSF) pacijenta s raznim neurološkim stanjima kao što su cefalitis, tumor mozga te kirurško oštećenje mozga nastalo operacijom pacijenta. 400 μL CSF-a pomiješano je s 800 μL hladnoga acetonitrila i mućkano sve dok se nisu istaložili svi proteini. Nakon centrifugiranja supernatant je sušen nad parom inertnoga dušika. Ostatak nakon sušenja otopio se u 20 μL 20 mM boratnoga pufera pri pH 9,0. Otopina je čuvana u hladnjaku pri temperaturi 4°C do analize.

Kako bi uzorci bili detektabilni, potrebno je bilo dodati ABEI, i to 25 μL otopine množinske koncentracije 5 mM u jednaki volumen 10 mM otopine DSC –a. Reakcijska je smjesa ostavljena 2 sata pri sobnoj temperaturi te joj je potom dodano 10 μL otopine uzorka.

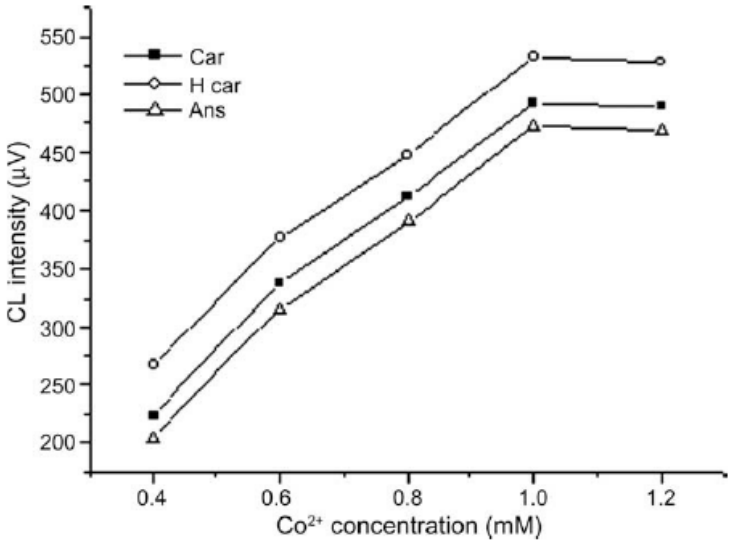
Nakon što su se mikrokanali isprali naizmjenično s 0,1 M otopinom NaOH, vodom i elektroforetskim puferom, sve četiri osnovne posudice su se napunile elektroforetskim puferom dok se R posudica napunila otopinom oksidansa. Primijenio se vakuum kako bi otopina pufera napunila separacijski kanal, te je potom u posudicu S umjesto pufera stavljena otopina uzorka. Primijenile su se određene razlike potencijala na svaku posudicu: na S posudicu 750 V, na B 240 V, na BW 320 V, te je separacija tako započela.

2.6.2 Rezultati eksperimenta

ABEI se koristio kao prekolonski označivač triju derivata imidazola, a kako bi se postiglo djelotvorno prekolonsko označivanje, ABEI- u je najprije dodana otopina DSC- a, te se formira kompleks ABEI- DSC, koji tada reagira s peptidima. Uvjeti prekolonskoga označivanja, kao i molarni omjer ABEI- DSC- a i peptida te reakcijsko vrijeme istraživali su tijekom ekperimenta. Rezultati su pokazali da je bio potreban molarni omjer veći od 10, dok je pri sobnoj temperaturi ekperimentalno određeno da je označivanje optimalno pri reakcijskome vremenu duljem od 2 sata.

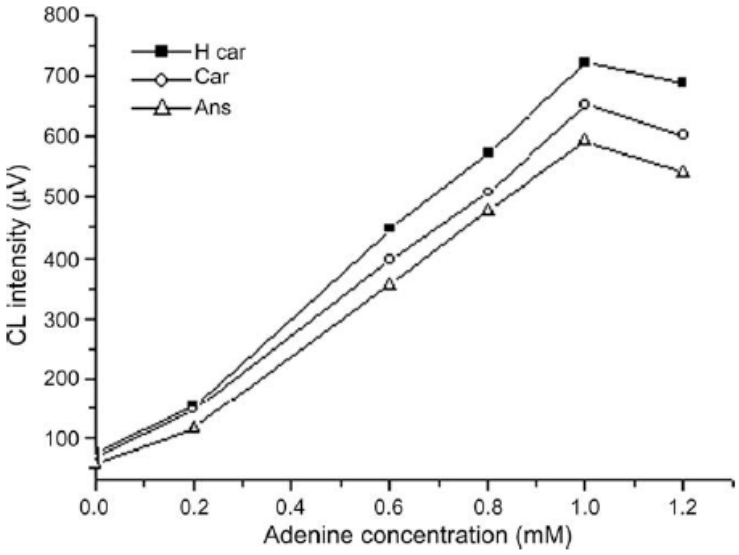
Uvjeti kemiluminiscentne detekcije također su se proučavali tijekom eksperimenta kako bi se dobio maksimalan intenzitet kemiluminiscencije, odnosno najveći pikovi. Eksperiment se proveo s koncentracijom otopine peptida 1×10^{-6} M pri različitim

uvjetima. Vodikov peroksid koristio se kao oksidans, te se zaključilo da njegova koncentracija jako utječe na intenzitet kemiluminiscencije. Koristile su se otopine oksidansa u rasponu koncentracija od 60 do 120 mM. Eksperiment je pokazao da se intenzitet kemiluminiscencije isprva naglo povećao, te se povećanjem koncentracije oksidansa počeo smanjivati. Maksimalan signal kemiluminiscencije dobio se pri koncentraciji oksidansa 90 mM. Također je potvrđeno da je Co^{2+} katalizator reakcije između vodikova peroksida i peptida označenih ABEI- em.



Slika 8. Utjecaj koncentracije Co^{2+} na intenzitet kemiluminiscencije. Rezultati su dobiveni korištenjem 15 mM boratnoga pufera (pH 9,8) koji sadrži 35 mM SDS- a, 1 mM adenin i Co^{2+} različitih koncentracija. Otopina oksidansa sadržavala je 40 mM natrijev bikarbonatni pufer (pH 12,5) i 90 mM vodikovoga peroksida. Koristila se metoda *pinched* injektiranja.

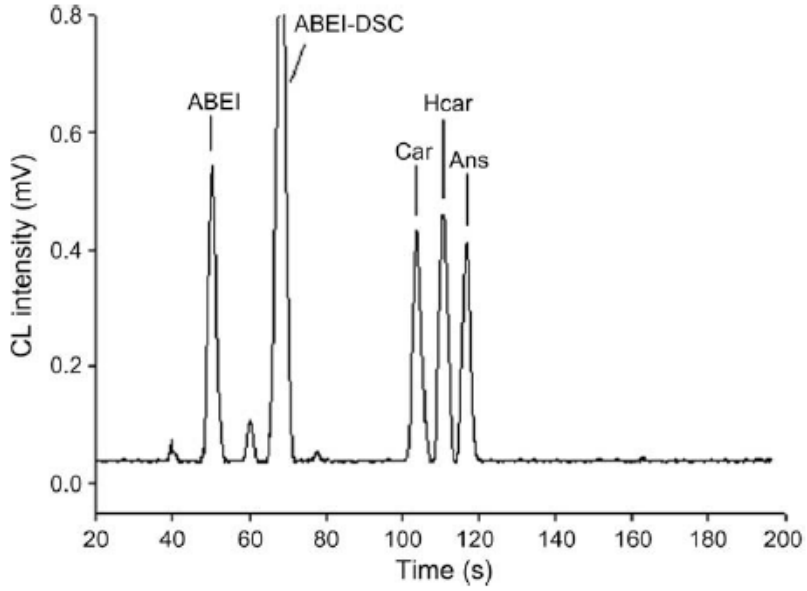
Kao što se može vidjeti, intenzitet kemiluminiscenicije raste s porastom koncentracije Co^{2+} sve dok ne postigne stabilan intenzitet pri koncentraciji Co^{2+} većoj od 1 mM.



Slika 9. Utjecaj koncentracije adenina na intenzitet kemiluminiscencije. Rezultati su dobiveni korištenjem 15 mM boratnoga pufera (pH 9,8) koji sadrži 35 mM otopinu SDS- a, 1 mM Co^{2+} i adenin različitih koncentracija.

Eksperimentom je pokazano da se emisija kemiluminiscencije pojačava dodavanjem pojačivača: adenina, galne kiseline, rodanina, ksantina te benzotiazola. Rezultati su pokazali da je adenin najjači pojačivač od navedenih, te je on odabran kao fiksna komponenta daljnjih pokusa. Koncentracije adenina koje su se koristile bile su u rasponu od 0 do 1,2 mM. Kao što je prikazano na prehodnoj slici, maksimalna emisija svjetlosti odgovara koncetraciji adenina od 1 mM. Bitno je zamijetiti da je intenzitet kemiluminiscencije 10 puta veći u odnosu na mjereni intenzitet otopine bez adenina.

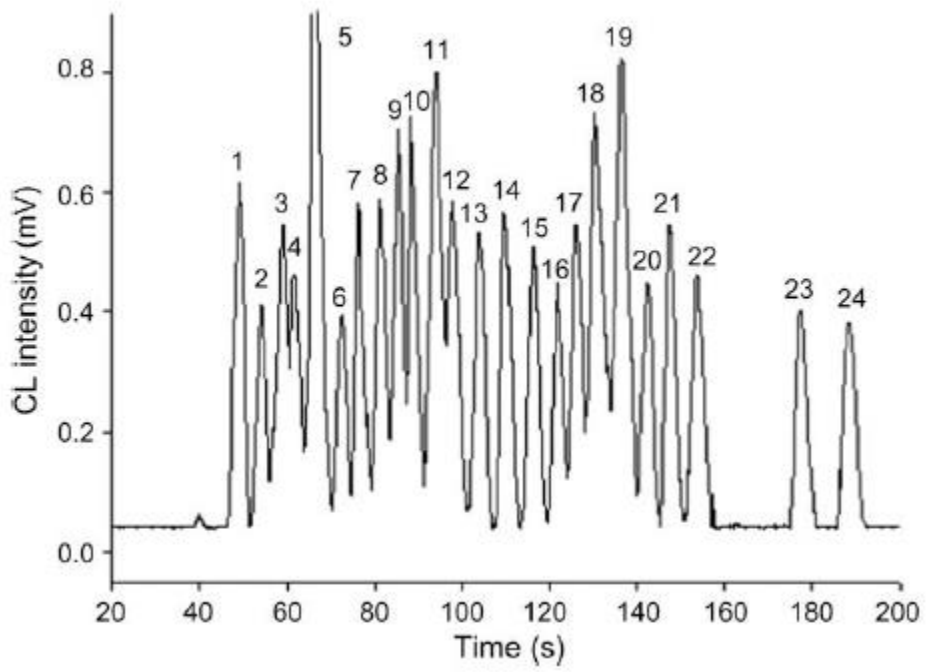
Pri izvođenju eksperimenta korištene su dvije tehnike: zonalna kapilarna elektroforeza i micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC), kako bi se odredilo koja tehnika ima veću efikasnost. Težnja da se tri peptida separiraju zonalnom kapilarnom elektroforezom u boratnome puferu, odmah je pala u vodu, budući da sva tri peptida imaju vrlo sličnu strukturu. Što se tiče separacije metodom MEKC u SDS-u kao mediju, ustanovilo se da je SDS značajno popravio rezoluciju. Najbolja separacija bila je uz prisutstvo 35 mM SDS. Također i razlika potencijala separacije utječe na rezoluciju, stoga je separacija provedena pod utjecajem različitih električnih napona u rasponu od 2100 do 3000 V. Uzimajući u obzir i rezoluciju i vrijeme analize, separacijski napon od 2800 V je uzet kao optimalan.



Slika 10. Separacija peptida označenih ABEI- em elektroforezom na mikročipu uz kemiluminiscentni detektor.

Budući da su prethodnim pokusima određene optimalne vrijednosti pojednih vrsta, provedena je separacija pod optimalnim uvjetima i to: pufer koji se koristio bio je boratni pufer koncentracije 15 mM (pH 9,8), a sadržavao je 1 mM Co^{2+}, 1 mM adenin i 35 mM SDS. Otopina oksidansa bila je 40 mM natrijev bikarbonatni pufer (pH 12,5) koji je sadržavao 90 mM vodikovoga peroksida. Separacijski napon fiksiran je na 2800 V. Pod idealnim uvjetima koji su navedeni, analizirana je otopina triju peptida koncentracije $8x10^{-7}$ M. Kao što se može vidjeti iz slike gore, tri peptida potpuno su separirana unutar 120 sekundi.

U biološkim uzorcima postoji mnoštvo endogenih aminokiselina i biogenih amina koji mogu reagirati s kompleksom ABEI- DSC te stvoriti derivate ABEI- a te tako smetati pri određivanju ovih triju zadanih peptida. Stoga se također proučavala prisutnost i utjecaj takvih spojeva, i to posebice: GABA- e, dopamina (DA), noradrenalina (NE), agmatina (Agm), oktopamina (Oct) i 20 proteinogenih aminokiselina.



Slika 11. Elektroferogram dobiven separacijom smjese koja sadrži DA, NE, Agm, GABA-u, Oct, Car, Ans, Hcar i 20 proteinogenih aminokiselina. Koncentracija pojedinoga analita bila je $1x10^{-6}$ M. Identifikacija pikova: 1) ABEI, 2) Agm + Oct, 3)Arg, 4)Lys, 5)ABEI-DSC, 6)NE, 7)DA + Val, 8)Pro, 9) Asn, 10) Gln + Met, 11)Leu + Ile, 12) His, 13) Car, 14) Hcar, 15)Ans, 16)Phe, 17)GABA, 18)Ala + Trp, 19)Thr + Tyr, 20)Ser, 21)Cys, 22)Gly, 23)Glu, 24)Asp

Kao što se može vidjeti iz slike, karnozin, homokarnozin i anserin su vrlo dobro separirani od ostalih aminokiselina i amina, što govori da navedeni spojevi nisu smetali pri određivanju triju peptida od interesa.

Što se tiče linearnosti, granice detekcije i reproducibilnosti, dobiveni su sljedeći rezultati; koncentracija peptida u odnosu na visinu pikova pokazuje izrazito dobru linearnu ovisnost, što znači da je koncentracija određenoga peptida proporcionalna integriranoj površini ispod određenoga pika. Dobra linearna ovisnost određena je na području koncentracija u rasponu od $6x10^{-8}$ M do $1,5x10^{-5}$ M, korelacijski koeficijenti kretali su se od 0,9927 do 0,9991. Određene granice detekcije iznosile su $3x10^{-8}$ M za karnozin, $2,8x10^{-8}$ M za homokarnozin, te $3,4x10^{-8}$ M za anserin. Što se tiče reproducibilnosti, standardna otopina koja je sadržavala Car, Hcar i Ans koncentracije $5x10^{-7}$ M za svaki peptid,

analizirana je 7 puta. Rezultati pokazuju da je relativna standardna devijacija migracijskoga vremena i visine pikova u granicama od 1,8 do 3,5%.

2.6.3 Zaključak eksperimenta

Pokazano je da je razvijena metoda elektroforeze na mikročipu s kemiluminiscentnim detektorom za određivanje triju derivata imidazola koji igraju neke od ključnih uloga u organizmu. Kombinacija prekolonskoga označivanja markerima i postkolonsko korištenje katalizatora kemiluminiscencije i pojačivača omogućili su vrlo visoku detekcijsku osjetljivost triju navedenih peptida. Detekcijske granice navedene metode nalaze se od $2{,}8 \times 10^{-8}$ do $3{,}4 \times 10^{-8}$ M. Vrlo je bitno da se ova metoda može koristiti i za kvantitativnu determinaciju ostalih bioloških uzoraka, što omogućuje nove spoznaje ne samo u kemiji, nego u širem spektru područja, kao što su medicina i industrija.

3. ZAKLJUČAK

Iako je poprilično mlada metoda, elektroforeza na mikročipu primjenjuje se u mnoštvo svrha jer je vrlo pogodna metoda, i što se tiče veličine samoga uređaja, i što se tiče separacije tvari, čak i onih koje je drugim metodama nemoguće razdvojiti zbog vrlo slične građe. Još jedna karakteristika ove metode također je i njena dobra reproducibilnost, što je vrlo važno. Ovako moćan analitički alat ima nedostataka, ali se iz dana u dan nedostaci brišu, a prednosti stvaraju jer tehnologija napreduje. Poboljšanjem karakteristika mikročipa; geometrije njegovih kanala, te pronalaskom njegovoga optimalnoga građevnoga materijala; pronalaženjem optimalnih uvjeta, kao i ispravnim odabirom detekcije koja je strogo selektivna i jako osjetljiva, u budućnosti će se moći određivati tako niske koncentracije tvari koje sežu na molekulski ili atomski nivo, što i jest karakteristika realnih sustava. Kada bude moguće točno okarakterizirati realne sustave, znanost više neće imati granice, a elektroforeza na mikročipu na dobrome je putu da se to zaista ostvari.

4. LITERATURA

1. Zhao, S. , Huang, Y. , Shi, M. , Huang, J. , Liu, Y. – M. , (2009.), Quantification of carnosine- related peptides by microchip electrophoresis with chemiluminiscence detection, Analytical biochemistry, 393, 105- 110
2. Tomazelli Coltro, W. K. , Fracassi da Silva, J. A. , Torres da Silva, H. D. , Richter, E. M. , Furlan, R. , Angnes, L. , do Lago, C. L. , Mazo, L. H. , Carilho, E. , (2004.), Electrophoresis microchip fabricated by a direct- printing process with end-channel amperometric detection, Electrophoresis, 25, 3832- 3839
3. Ohlsson, P. D. , Ordeig, O. , Mogensen, K. B. , Kutter, J. P. , (2009.), Electrophoresis microchip with inegrated waveguides for simultaneous native UV fluorescence and absorbance detection, Electrophoresis, 30, 4172- 4178
4. Vlčkova, M. , (2008.), Microchip electrophoresis- bioanalytical applications, Philosophisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, Basel
5. Shang, F. , Guihen, E. , Glennon, J. D. , (2012.), Recent advances in miniaturisation- the role of microchip electrophoresis in clinical analysis, Electrophoresis, 33, 105- 116
6. Landers, J. P. , (2008.), Handbook of capillary electrophoresis and associated microtechniques, CRC Press: Taylor and Francis Group, USA
7. Harris, D. C. , (2007.), Quantitative chemical analysis, 7th edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA
8. Halliday, D. , Resnick, R. , Walker, J. , (2009.), Fundamentals of physics, 8th edition, Willey and Sons, New Yersey, USA