Određivanje aminokiselina elektroforezom na mikročipu

Hajduković, Mateja

Master's thesis / Diplomski 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:182:733996

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

Mateja Hajduković

Određivanje aminokiselina elektroforezom na mikročipu

Diplomski rad

Osijek, 2012.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom prof. dr. sc. Milana Sak-Bosnara, dok me kroz znanstvena istraživanja vodila Marija Horvat, prof. Rad je predan stručnom vijeću na ocjenu radi stjecanja diplome magistra edukacije iz područja kemije.

Zahvaljujem svima koji su svojim savjetima, strpljenjem i podrškom pridonijeli izradi ovog diplomskog rada, posebice zahvaljujem svom mentoru prof. dr.sc. Milanu Sak-Bosnaru, na nezamjenjivoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog diplomskom rada, uz ogromnu količinu savjeta koje mi je pružio, te zahvaljujem se doc. dr. sc. Božici Šuveljak-Žuljević i doc.dr.sc. Berislavu Markoviću.

Zatim želim zahvaliti mojim asistenticama Oliveri Galović i Mariji Horvat na pomoći koju su mi pružile tijekom izrade ovog diplomskog rada, što su mi uljepšale svaki dan i svaki dan upotpunile kockom šećera i dozom smijeha.

Veliko hvala svim mojim prijateljima i mojoj obitelji koji su bili svo vrijeme uz mene.

Posebno zahvaljujem svom dečku Vedranu na neizmernoj podršci i strpljenju tijekom mog studiranja, a posebice tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Najveća hvala mojim roditeljima koji su mi pružili sve i baš onoliko koliko mi je bilo potrebno u određenom trenutku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju

Diplomski rad

ODREĐIVANJE AMINOKISELINA ELEKTROFOREZOM NA MIKROČIPU

Mateja Hajduković

SAŽETAK RADA

Elektroforeza na mikročipu uspješno je upotrebljena u ovom radu za separaciju i kvantifikaciju β-alanina i L-histidina, pojedinačno i u smjesi. Za ispitivanja je korišten uređaj za elektroforezu na mikročipu sa kapacitivno spregnutim, beskontaktnim, konduktometrijskim detektorom, C^4D, koji radi na frekvenciji od 4 MHz. Separacija je provedena na polimetil-metakrilatnom (PMMA) mikročipu, duljine separacijskog kanala 75 mm. Kao pufer korištena je 0,5 M octena kiseline, pH = 2,5. Primijenjeni napon injektiranja bio je 0,80 kV, a napon separacije 3,80 kV. Ustanovljen je linearni odziv C^4D detektora za β-alanin u području od 2,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-5} M (R^2 = 0,9990) i za L-histidin u području 1,5 x 10^{-5} M do 5 x 10^{-5} M (R^2 = 0,9538) sa granicom detekcije ispod 1 mg/L. C^4D detektor pokazao je i linearni odziv za smjesu β-alanina i L-histidina u području od 2,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin (R^2 = 0,9926 i 0,9640, respektivno). Točnost određivanja pojedinačnih aminokiselina, kao i njihov sadržaj u smjesi, testirani su metodom poznatog dodatka.

Ključne riječi: aminokiseline, alanin, histidin, elektroforeza na mikročipu

Stranica:63 ; Shema: 0 ; Slika: 32 ; Tablica: 8 ; Literaturnih navoda: 26 ; Jezik: Hrvatski

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za kemiju.

Mentor: prof.dr.sc. Milan Sak-Bosnar
Neposredni voditelj: Marija Horvat, prof.
Sastav povjerenstva za obranu: doc. dr. sc. Berislav Marković
prof. dr. sc. Milan Sak - Bosnar
doc. dr. sc. Božica Šuveljak - Žuljević
doc. dr. sc. Ružica Matešić - Puač

Rad prihvaćen: 02.07.2012. god.

Datum obrane: 19.07.2012. god.

BASIC DOCUMENTATION CARD

J. J. Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry

Graduation Thesis

DETERMINATION OF AMINO ACIDS BY ELECTROPHORESIS ON A MICROCHIP

Mateja Hajduković

ABSTRACT

Microchip electrophoresis (MCE) was successfully used in these investigations for separation and quantification of β-alanine and L-histidine, both single and in a mixture. A microchip electrophoresis device equipped with capacitively-coupled contactless conductivity detector (C^4D) operating at 4 MHz was used for the investigations. The separation was carried out on a polymethyl-metacrylate (PMMA) chip with the separation channel length of 75 mm. Acetic acid solution of the concentration 0,5 M was used as a buffer (pH = 2,5). The applied injection voltage was 0,80 kV and the separation voltage was 3,80 kV. A linear relationship between C^4D detector response and β-alanine concentration was assessed in the range 2,5 x 10^{-5} M - 7,5 x 10^{-5} M (R^2 = 0,9990), and in the range of 1,5 x 10^{-5} M - 5 x 10^{-5} M (R^2 = 0,9538) for L-histidine, with a detection limit below 1 mg/L. C^4D detector exhibited a linear relationship toward the mixture of β-alanine and L-histidine in the range of 2,5 x 10^{-5} M - 7,5 x 10^{-5} M related to β-alanine and L-histidine particularly (R^2 = 0,9926 and 0,9640, respectively). The accuracy of determination for single aminoacids, and their content in a mixture, were tested by known addition method.

Keywords: amino acids, alanine, histidine, electrophoresis on microchip

63 pages; 0 shematics; 32 pictures; 8 tables; 26 references; Language: Croatian

Thesis deposited in the Department of Chemistry library.

Supervisor: prof.dr.sc. Milan Sak-Bosnar
Adviser: Marija Horvat, prof.
Reviewers: doc. dr. sc. Berislav Marković
prof. dr. sc. Milan Sak - Bosnar
doc. dr. sc. Božica Šuveljak - Žuljević
doc. dr. sc. Ružica Matešić - Puač

Thesis accepted: July 2th, 2012
Thesis defence: July 19th, 2012

Sadržaj:

1. Uvod....1

2. Literaturni pregled....3

2.1. Aminokiseline....4

2.1.1. Kiselo-bazna svojstva aminokiselina....5

2.1.2. Peptidna veza....9

2.1.3. Histidin....10

2.1.4. Alanin....11

2.1.5. Karnozin....13

2.2. Elektroforeza....14

2.2.1. Teorijske osnove....15

2.2.2. Elektroforeza na mikročipu....18

2.2.2.1. Teorijske osnove elektroforeze na mikročipu i EOF....19

2.2.2.2. Mikročip....22

3. Eksperimentalni dio....23

3.1. Popis korištenih kemikalija....24

3.2. Aparati i pribor....24

3.2.1. Uređaj za mikročip elektroforezu....24

3.2.1.1. Detektor C^4D....26

3.2.1.2. Mikročip....27

3.2.1.3. PMMA....28

3.2.2. Vaga....28

3.2.3. Pipete....29

3.2.4. Ultrazvučna kupelj....29

3.3. Priprema otopina....30

3.3.1. Priprava pufera koncentracije 0,5 M....30

3.3.2. Priprava otopine histidina, c (His) = 10^{-2} M....30

3.3.3. Priprava otopine histidina, c (His) = 10^{-3} M....30

3.3.4. Priprava otopine histidina, c (His)= 5 x 10^{-6} M....30

3.3.5. Priprava otopine histidina, c (His) = 1 x 10^{-5} M....31
3.3.6. Priprava otopine histidina, c (His) = 2,5 x 10^{-5} M....31
3.3.7. Priprava otopine histidina, c (His) = 5 x 10^{-5} M....31
3.3.8. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 10^{-2} M....31
3.3.9. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 10^{-3} M....31
3.3.10. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 2,5 x 10^{-5} M....32
3.3.11. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 5 x 10^{-5} M....32
3.3.12. Priprava otopine alanina , c (Ala) = 7,5 x 10^{-5} M....32
3.3.13. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 7,5 x 10^{-5} M....32
3.3.14. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 5 x 10^{-5} M....33
3.3.15. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 2,5 x 10^{-5} M....33
3.4. Postupak mjerenja....34
3.4.1. Baždarni pravac za β-alanin....34
3.4.2. Baždarni pravac za L-histidin....35
3.4.3. Baždarni pravac za smjesu β-alanina i L-histidina....36
3.4.4. Određivanje β-alanina i L-histidina....37
4. Rezultati i rasprava....38
4.1. Bazna linija....39
4.2. Baždardni pravac za β-alanin....40
4.3. Baždardni pravac za L-histidin....44
4.4. Baždardni pravac za smjesu β-alanina i L-histidina....48
4.5. Određivanje β-alanina i L-histidina....53
5. Zaključak....54
6. Metodički dio....56
6.1. Priprema za izvođenje nastavnog sata....57
6.2. Plan ploče....61
6.3. Pokus 1. Razdvajanje aminokiselina elektroforezom....62
7. Literatura....64

1. Uvod

Aminokiseline su "gradivni blokovi" tijela. Osim izgradnje stanica i obnove tkiva, također tvore antitijela za borbu imuno sustava protiv bakterija i virusa, dijelovi su enzima i hormona. Izgrađuju nukleoproteine (RNK i DNK); prenose kisik i pretvaraju energiju u mehanički rad u mišićima. U sastav čovjekovog organizma ulazi ukupno 20 aminokiselina, 10 od njih se mogu izgraditi u samom organizmu, dok je preostalih 10 neophodno unijeti kroz ishranu. Aminokiseline koje se ne mogu sintetizirati u čovjekovom organizmu, a neophodne su za njegovo funkcioniranje se nazivaju esencijalne aminokiseline. Esencijalne aminokiseline su: arginin, histidin, leucin, izoleucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, a neesencijalne su: alanin, asparagin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glutamin, glicin, prolin, serin, tirozin.

Aminokiseline se u smjesi mogu razdvajati i kvantitativno određivati kapilarnom elektroforezom.

Cilj je ovog rada ispitivanje mogućnosti razdvajanja i određivanja aminokiselina elektroforezom na mikročipu, tehnikom koja se razvila minijaturizacijom kapilarne elektroforeze, pri kojoj se analiza odvija u separacijskom kanalu mikročipa. Koncept kapilarne elektroforeze na mikročipu prvi je predstavio Harrison [26]. Primjena elektroforeze na mikročipu je vrlo široka, od separacije malih bioloških molekula do separacije brojnih anorganskih kationa i aniona. Količina uzorka koji se injektira u mikrokanal čipa uobičajeno je u pikolitarskom rasponu (pL) u usporedbi s nanolitarskim (nL) rasponom u kapilarnoj elektroforezi ili mikrolitarskim (μL) rasponom u kromatografiji.

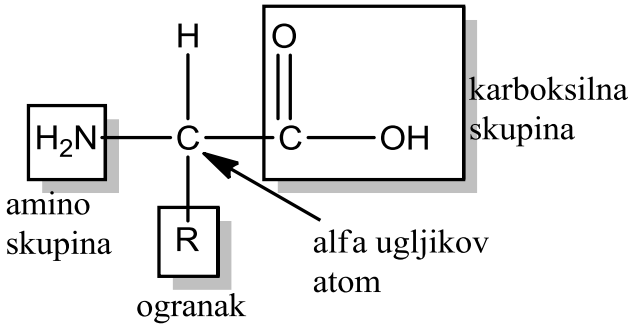
Zbog svog multifunkcionalnog učinka, karnozin je sve više predmet istraživanja mnogih znanstvenika, on je dipeptid sastavljen od alanina i histidina koji su njegovi česti pratioci u biološkim uzorcima, stoga je njihova kvantifikacija vrlo značajna.

Cilj ovog diplomskog rada je kvantitativno određivanje histidna, alanina i njihove smjese, te njihova uspješna detekcija i separacija pomoću elektroforeze na mikročipu.

2. Literaturni pregled

2.1. Aminokiseline

Kao što ime kaže, aminokiseline posjeduju dvije karakteristične funkcionalne skupine: amino skupinu ($–NH_2$) i karboksilnu skupinu (-COOH). Kod aminokiselina, amino skupina je uvijek smještena u α-položaju prema kraboksilnoj skupini. Svaka aminokiselina ima trivijalno ime koje se često skraćuje na prva tri slova. Najjednostavniji predstavnik aminokiselina je glicin, $H_2N\text{-}CH_2\text{-}COOH$. Kod ostalih aminokiselina postoji na α-ugljikovu atomu osim amino skupine još i alifatski ili aromatski ogranak (R), koji može nositi daljnje funkcionalne skupine [1]. Opća formula aminokiseline je prikazana na slici 1.



Slika 1. *Opći strukturni prikaz aminokiseline.*

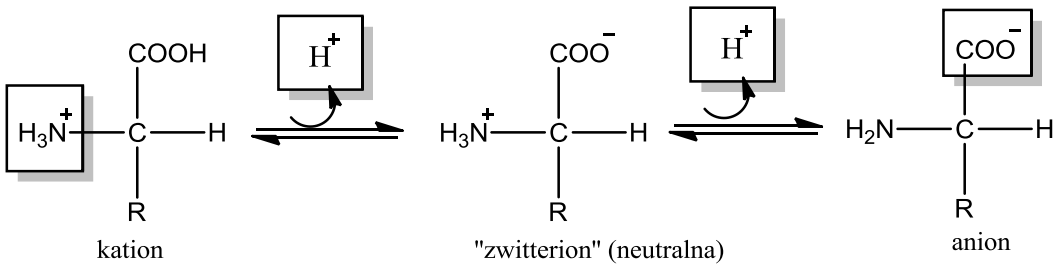
Kad u navedenoj formuli R ne označava vodik (sve aminokiseline osim glicina), već neki alkilni ili arilni radikal, α-ugljikov atom je asimetrično supstituiran, te se javlja optička aktivnost jer se model ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom. Razlikujemo dva sterička reda, L-red i D-red aminokiselina. Aminokiseline koje se nalaze u proteinima pripadaju L-redu, prema tome, imaju jednak raspored supstituenata na α-C atomu kao i L-alanin i L-serin (R = $-CH_3$, odnosno $-CH_2OH$). Sve aminokiseline u našem organizmu su iz reda L, što znači da imaju dušik na prvom (alfa) ugljikovom atomu u molekuli. Smjer optičkog zakretanja neovisan je o pripadnosti nekom steričkom redu.

2.1.1. Kiselo-bazna svojstva aminokiselina

Karboksilna skupina može kao kiselina disocijacijom osloboditi H^+ ione. Bazična amino skupina prima H^+ ione analogno amonijaku pri čemu dolazi do stvaranja amonijeve soli (Jednadžba 1.).

$$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+ \qquad (1)$$

Kada su obje skupine disocirane, dobivamo formulom prikazan dipolarni ion tzv. zwitterion (Slika 2.), u tom obliku aminokiseline se nalaze u vodenoj otopini. Dodatkom H^+ iona (kiseline) negativno nabijena karboksilna skupina prima H^+ ione i postaje neutralna (bez naboja). Dodatkom OH^- iona (lužine) H^+ ioni sa amino-skupine disociraju i vežu se s OH^- ionima u vodi, te dolazi do stvaranja aniona, zadnja strukturna formula aminokiseline na slici 2.



Slika 2. *Struktruni prikaz disocijacije aminokiselina*.

Svaka aminokiselina u vodenoj otopini može postojati u tri oblika, kationski, zwitterion i anionski oblik. Koji je oblik favoriziran, ovisi o konstantama disocijacije karboksilne skupine, odnosno amino skupine i o pH vrijednosti otopine, tj. o koncentraciji H^+ iona.

Disocijacija kiselih i bazičnih skupina aminokiselina podložna je zakonu o djelovanju masa jednako kao i disocijacija slabih kiselina i baza. Svaka skupina ima svoju konstantu disocijacije K, kojoj negativni logaritam označavamo kao pK vrijednost.

Kod neke određene pH-vrijednosti aminokiselina se nalazi u dipolarnom obliku, tu vrijednost označavamo kao izoelektričnu točku. Ona se može izračunati iz pK-vrijednosti kiseline i bazične skupine, a negativan logaritam od vrijednosti izoelektrične točke, pojedine aminokiseline, označavamo s pI (Jednadžba 2.).

Pri pH vrijednosti izoelektrične točke aminokiselina prema van izgleda neutralna, iako svaka aminokiselina posjeduje jedan pozitivan i jedan negativan naboj [1].

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \tag{2}$$

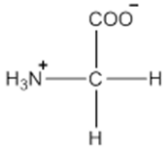
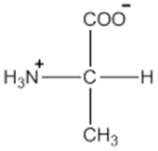
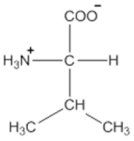
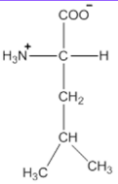
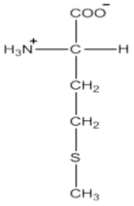
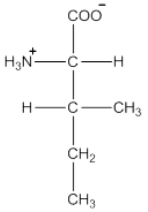
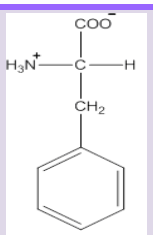
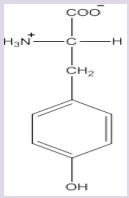
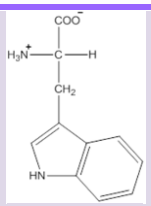
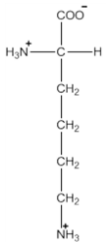
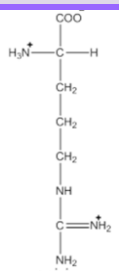
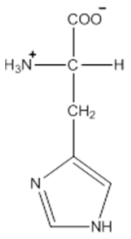
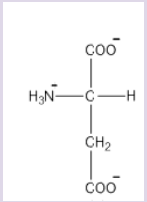
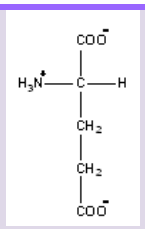
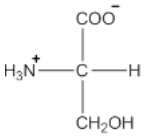
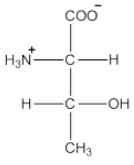
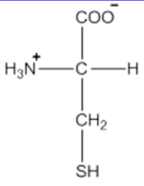
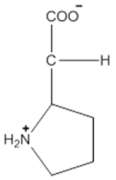
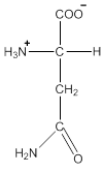
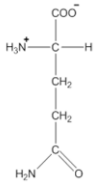
Ako molekula ima više od dvije ionizacijske skupine, disocijacija protona odvija se u više koraka. Izoelektrična točka nalazit će se u onom području pH, u kojem je zwitterionski oblik molekule dominantna vrsta. Vrijednost pI će biti jednak onom pH kod kojeg je koncentracija molekularnog oblika s jednim pozitivnim nabojem jednaka koncentraciji molekulske vrste s jednim negativnim nabojem. Općenito možemo reći da je pI jednak aritmetičkoj sredini pKa vrijednosti onih disocijacijskih reakcija u kojima izravno sudjeluje zwitterionski oblik (Jednadžba 2.).

Na temelju fizikalno-kemijskih, prije svega disocijacijskih svojstava bočnih ogranaka, aminokiseline su podijeljene na nepolarne i polarne, dok se polarne još dijele na nenabijene (neutralne) i nabijene, koje mogu biti ili kisele ili bazične [3], tablica 1. Budući su aminokiseline poliprotonske kiseline, dodatkom kiseline i lužine moguće je pratiti pojedinačne korake disocijacije pri čemu svaki disocijacijski korak stvara pufersko područje.

Tablica 1. *Prikaz svih dvadeset aminokiselina koje ulaze u sastav proteina, njihovih konstanti disocijacije svakog ogranka, izoelektrične točke, molekulske mase i troslovne i jednoslovne oznake.*

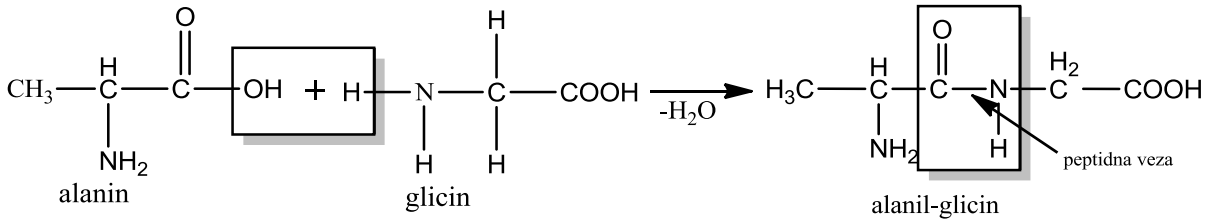
AMINOKISELINA	OZNAKA	pK_1 (-COOH)	pK_2 ($-NH_3^+$)	R-ogranak	pI	Molekulska masa (g/mol)
ALANIN	Ala, A	2,34	9,69	-	6,00	89,09
ARGININ	Arg, R	2,17	9,04	12,48	10,76	174,20
ASPARAGIN	Asn, N	2,02	8,80	-	5,41	132,12
ASPARAGINSKA KISELINA	Asp,D	1,88	9,60	3,65	2,77	133,10
CISTEIN	Cys, C	1,96	10,128	8,18	5,07	121,16
GLUTAMINSKA KISELINA	Glu, E	2,19	9,67	4,25	3,22	147,13
GLUTAMIN	Gln, Q	2,17	9,13	-	5,65	146,15
GLICIN	Gly, G	2,34	9,60	-	5,97	75,07
HISTIDIN	His, H	1,82	9,17	6,00	7,59	155,16
IZOLEUCIN	Ile, I	2,36	9,60	-	6,02	131,17
LEUCIN	Leu, L	2,36	9,60	-	5,98	131,17
LIZIN	Lys, K	2,18	8,95	10,53	9,74	146,19
METIONIN	Met, M	2,28	9,21	-	5,74	149,21
FENILALANIN	Phe, F	1,83	9,13	-	5,48	165,19
PROLIN	Pro, P	1,99	10,60	-	6,30	240,30
SERIN	Ser, S	2,21	9,15	-	5,58	105,09
TREONIN	Thr, T	2,09	9,10	-	5,60	119,12
TRIPTOFAN	Trp, W	2,83	9,39	-	5,89	204,23
TIROZIN	Tyr, Y	2,20	9,11	10,07	5,66	181,19
VALIN	Val, V	2,32	9,62	-	5,96	117,15

Tablica 2. *Prikaz podjele aminokiselina s obzirom na njihov bočni ogranak-R i njihove strukturne molekule.*

Nepolarne, alifatski R ogranak	 **Glicin**	 **Alanin**	 **Valin**	 **Leucin**	 **Metionin**	 **Izoleucin**
Aromatski R ogranak	 **Fenilalanin**	 **Tirozin**	 **Triptofan**			
Pozitivno nabijen R ogranak	 **Lizin**	 **Arginin**	 **Histidin**			
Negativno nabijen R ogranak	 **Aspartat**	 **Glutamat**				
Polarni, nenabijeni R ogranak	 **Serin**	 **Treonin**	 **Cistein**	 **Prolin**	 **Asparagin**	 **Glutamin**

2.1.2. Peptidna veza

Upravo je strukturna raznolikost aminokiselina ključan preduvjet raznolikosti polipeptida (proteina) koji nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom [3]. U proteinima se α-karboksilna skupina jedne aminokiseline veže na α-amino skupinu druge aminokiseline tzv. peptidnom vezom (Slika 3.). Ravnoteža reakcije, nastajanja peptidne veze, pomaknuta je prema hidrolizi peptida, a ne prema sintezi. Zato za biosintezu peptidnih veza treba uložiti energiju dok za njihovu hidrolizu to nije potrebno, jer je ona termodinamički povoljna [2].



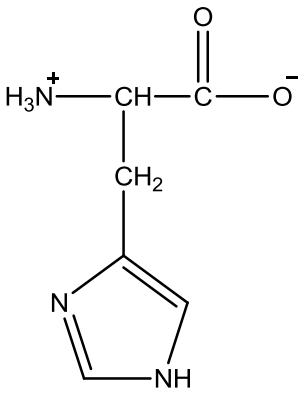
Slika 3. *Strukturni prikaz nastajanja peptidne veze između dvije aminokiseline uz izdvajanje jedne molekule vode.*

Peptidne veze povezuju aminokiseline, u ne razgranati polipeptidni lanac [2]. Po kemijskoj strukturi peptidi su amidi. Sistematska kemijska nomenklatura tretira peptide kao acil-aminokiseline. Ime se tvori tako da aminokiselina kojoj karboksilna skupina ulazi u reakciju dobije nastavak –il, npr. glicil-alanin, alanil-leucil-tirozin itd. Da bi se potpuno upoznao neki peptid, nije dovoljno poznavati samo vrstu i broj aminokiselina koje ga izgrađuju i koje se mogu osloboditi njegovom hidrolizom već i redoslijed njihova povezivanja [1].

Sinteza peptida se provodi, općenito, tako da se reaktivni derivat karboksilne skupine poveže s amino skupinom neke aminokiseline ili nekog peptida. Prilikom povezivanja u peptidnu vezu, mora se spriječiti racemizacija na α-C atomu, kako se ne bi dobili peptidi s neprirodnim D-aminokiselinama. Ostale skupine reaktanata moraju se zaštititi da ne reagiraju.

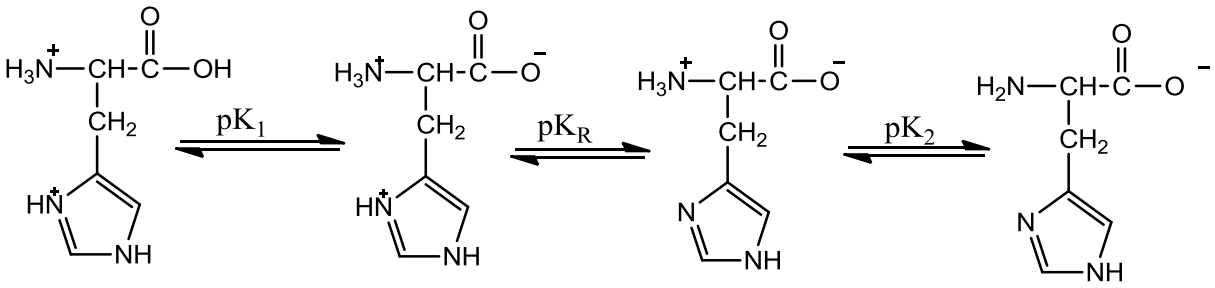
2.1.3. Histidin

Histidin (Slika 4.) je prvi izolirao njemački liječnik Albrecht Kossel, 1896. godine. Histidin je esencijalna aminokiselina u ljudi i drugih sisavaca. U početku se mislilo da je bitan samo za dojenčad, ali dugoročne studije su utvrdile da je neophodan i za odrasle ljude.



Slika 4. *Strukturni prikaz molekule histidina*.

Iako djeca i odrasli mogu sintetizirati nešto malo histidina u tijelu, većina ulazi u organizam prehranom. Značajan je za rast i regeneraciju tkiva. U velikoj količini je zastupljen u hemoglobinu, pomaže u tretmanu reumatoidnog artritisa, alergija i anemije. Histidin nalazimo u voću kao što su banane, mesu i peradi, mlijeku i mliječnim proizvodima. Može se naći i u raznom povrću, ali u manjim količinama. Kod manjka histidina u prehrani može doći do slabljenja sluha. Histidin je po kemijskom sastavu 2-amino-3-imidazol-propionska kiselina, α-aminokiselina sa imidazolnim prstenom kao pozitivno nabijenom funkcionalnom grupom. Ostali podaci o izoelektričnoj točci, molekulskoj masi i pK vrijednost ogranka i skupina dani su u tablici 1. Disocijacijski koraci histidina su prikazani na slici 5.



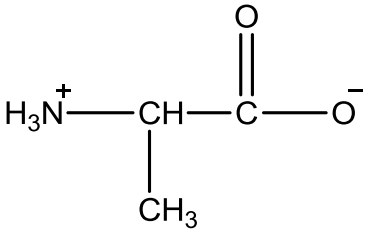
Slika 5. *Prikaz disocijacijskih koraka aminokiseline, histidina, vrijednosti pK_1 ,pK_R i pK_2 dani su u tablici 1.*

2.1.4. Alanin

Alanin (Slika 6.), 2-aminopropionska kiselina, je neesencijalna aminokiselina. Postoje dva oblika molekule alanina:

a) α-alanin, kemijska formula: $CH_3CH(NH_2)COOH$ je jedna od najčešćih aminokiselina koja se koristi u sintezi proteina

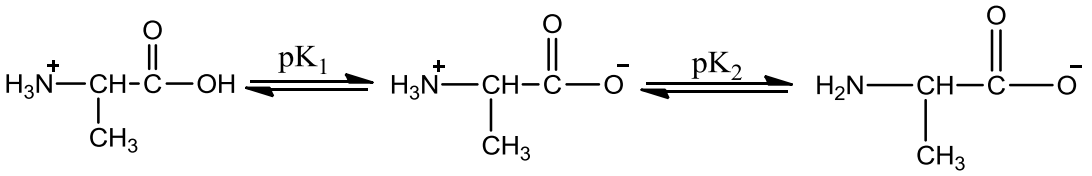
b) β-alanin $NH_2CH_2CH_2COOH$, kojeg nalazimo kod bakterija u staničnoj stijenci i nekim peptidnim antibioticima. Nije proteogen, sastojak je koenzima A i prirodnih peptida, slobodan se nalazi u mozgu [3].



Slika 6. *Strukturni prikaz molekule α-alanina.*

Alanin je važan izvor energije za mišićno tkivo, mozak i centralni živčani sustav, jedna je od važnijih aminokiselina za imuno sustav u proizvodnji antitijela, sudjeluje u metabolizmu šećera i organskih kiselina [4]. U tijelu se ova aminokiselina kombinira s još jednom aminokiselinom, histidinom, kako bi stvorile dipeptid (dvije aminokiseline povezane peptidnom vezom) karnozin. Ostali podaci o izoelektričnoj točci, molekulskoj masi i pK

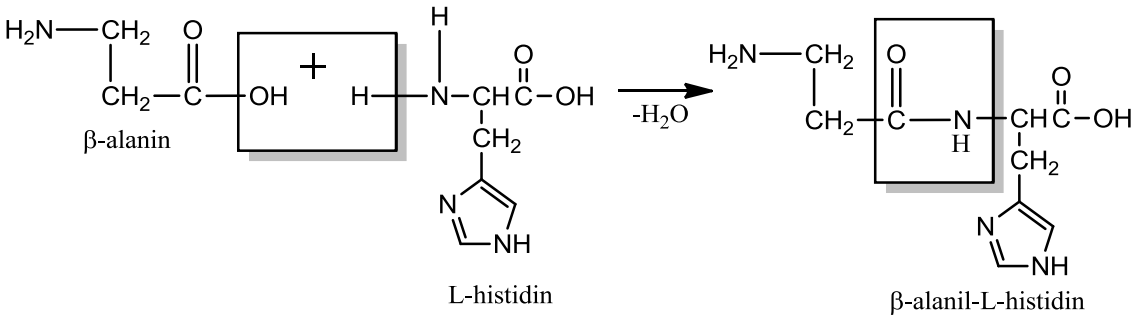
vrijednosti ogranka i skupina dani su u tablici 1. Disocijacijski koraci alanina su prikazani na slici 7.



Slika 7. *Prikaz disocijacijskih koraka aminokiseline, alanina, vrijednosti pK_1 i pK_2 dane su u tablici 1.*

2.1.5. Karnozin

Karnozin je dipeptid, sastoji se od histidina i beta-alanina (Slika 8). Karnozin je (2S)-2-[(3-amino-1-oksoopropil)amino]-3-(3H-imidazol-4-il)propanska kiselina, molekulske mase 226,33 g/mol. Otkrio ga je ruski kemičar V.Gulevich.



Slika 8. Strukturni prikaz nastajanja karnozina (β-alanil-L-histidin).

Karnozin je prirodni mišićni dipeptid koji inhibira katalizu oksidacije lipida. Svojim snažnim antioksidativnim svojstvom djeluje protiv slobodnih radikala. Primijenjen na kožu lako prolazi kroz stanične membrane. Spriječava stvaranje bora i učvršćuje kolagen. Neutralizira denaturaciju (narušavanje strukture) proteina kože i relaksira vezivno tkivo. Spriječava prerano starenje stanica kože, štiti kožu od vanjskih štetnih utjecaja i UV zraka. Izglađuje izražajne linije i pomlađuje [5]. Koncentriran je u mišićnom tkivu, nešto ga više ima u bijelim (brzim) mišićnim vlaknima, koja su zaslužna za povećavanje mišićne mase [6]. Mišić obično sadrži i više nego dovoljno histidina tako da je ograničavajući faktor pri sintezi karnozina beta-alanin, te studije su pokazale da upotreba suplementarnog beta-alanina može rasplamsati mišićnu masu i snagu. Karnozin djeluje kao intermišićna zaštita. To znači da neutralizira višak kiselosti koji nastaje prilikom visokointenzivnih vježbi. Istraživanja pokazuju da trening normalnog intenziteta povećava mišićni karnozin. Iskusni sportaši koji uzimaju dodatni beta-alanin pokazuju povećanu razinu karnozina u mišiću, odnosno 64% preko normalne. Uzimanje samog karnozina ne bi bilo učinkovito budući da ga enzim karnozinaza razgradi prije nego dobije priliku ući u mišić [7].

2.2. Elektroforeza

Elektroforeza je pojam koji se odnosi na različite tehnike separacije bazirane na različitim gibanjima iona ili nabijenih čestica pod utjecajem električnog polja [17]. Brzina gibanja jednog iona određena je intenzitetom električnog polja i elektroforetskom pokretljivošću koja je konstantno karakteristična za ione ovisno o uvjetima u kojima se ioni nalaze [10]. Elektroforeza je elektrokinetička pojava, metoda i proces. Elektrokinetička pojava podrazumijeva kretanje nabijenih čestica pod utjecajem električnog polja prema katodi ili anodi kroz otopinu slabog elektrolita. Nazivamo je metodom jer može služiti za razdvajanje proteina iz smjese kako u preparativne tako i u analitičke svrhe. Možemo ju nazvati i proces jer možemo mijenjati uvjete pod kojim bi najbolje bilo provoditi elektroforezu zbog postizanja što boljih rezultata [9]. Proizvod elektroforeze je elektroferogram, iz njega iščitavamo sve korisne informacije o separaciji koja se događala, svojstven je za svaku elektroforezu. Kao kod atomske spektrofotometrije kad atom iz pobuđenog stanja prelazi u osnovno stanje daje svoju sliku, tako i kod elektroforeze svaki protein, sama DNA i gen daje svoju sliku koja se može usporediti sa genetskim otiskom prsta. Za razliku od elektrolize, kod elektroforeze ne dolazi do kemijske promjene na elektrodama. Za primjenu elektroforeze u razdvajanju proteina Arne Tiselius je dobio Nobelovu nagradu 1948. godine [9]. Od Tiselliusova otkrića, elektroforeza se razvila u jednu od najkorištenijih tehnika analitičke separacije [10].

2.2.1. Teorijske osnove

Ako se dvije elektrode povežu s izvorom jednosmjerne struje određenog napona između njih se stvara električno polje (E) koje je sposobno djelovati nekom silom (F) na česticu sfernog oblika, a čija je količina naboja (q). Ova sila (F) je osnovna pogonska sila elektroforeze i određena je izrazom:

$$F = Eq \tag{3}$$

Suprotno od pogonske sile na česticu koja se kreće djeluje sila trenja određena Stokesovim zakonom:

$$Ft = 6\pi\eta rv \tag{4}$$

U trenutku kada se ove dvije sile izjednače čestica se kreće konstantnom brzinom (v) koja se može izraziti relacijom:

$$v = \frac{Eq}{6\pi\eta r} \tag{5}$$

gdje je η - viskozitet otopine, v - brzina kretanja i r – radijus čestice.

Iz izraza se vidi proporcionalna ovisnost brzine spram jakosti električnog polja (E) i nabijene čestice, a obrnuto proporcionalno spram radijusa čestice i viskoziteta sredine, što znači, brzinu možemo povećavati ako povećamo jakost polja, odnosno napon među elektrodama [9]. Jakost električnog polja (E) predstavlja pad ili razliku potencijala na svakom centimetru između elektroda i proizlazi iz dijeljenja napona izvora struje (U) na elektrodama sa udaljenostima među elektrodama (d).

$$E = \frac{U}{d} \tag{6}$$

Elektroforetska pokretljivost m (engl. *mobility*) definira se kao udaljenost (d) koju čestica prijeđe u vremenu (t) pod djelovanjem gradijenta napona (E):

$$m = \frac{d}{tE} \tag{7}$$

ili

$$m = \frac{v}{E} \tag{8}$$

Većina čestica koje elektroforetski razdvajamo, pa tako i proteini, amfoterne su molekule. Najveći dio naboja aminokiselina potječe od ionizacije karboksilnih i amino skupina.

$$RCOOH \rightarrow RCOO^- + H^+ \tag{9}$$

$$-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+ \tag{10}$$

Disocijacijske konstante (pK vrijednosti) ovih skupina razlikuju se, pa neto naboj molekula ovisi o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze. Stoga će elektroforetska pokretljivost također ovisiti o pH. Ukoliko je pH vrijednost pufera u kojem se odvija elektroforeza jednaka pI vrijednosti aminokiselina (to je onaj pH na kojem je količina pozitivnog i negativnog naboja na proteinskoj molekuli izjednačena, pa čitava molekula nije nabijena), aminokiselina neće migrirati u električnom polju. Po pravilu koncentriraniji puferi imaju povećan broj iona (veću ionsku jakost) i daju jasnije segmente. Ako je povećan broj iona, provodljivost sustava je povećana, dolazi i do povećanja struje te moramo smanjiti napon kako ne bi došlo do pregrijavanja, uslijed toga je vrijeme razdvajanja duže nego u puferima manje koncentracije [9]. Pri pH vrijednostima nižim od njene pI aminokiselina će putovati prema katodi, dok će pri pH višem od njene pI putovati prema anodi. Većina puferskih sustava prilagođena je izvođenju elektroforeze na 25°C, a održavanje stalne temperature važno je iz dva razloga:

1. porast temperature dovodi do difuzije razdvojenih proteinskih vrpci (elektroforetski razdvojene čestice u slobodnoj se tekućini, zbog difuzije, opet izmiješaju čim prestane djelovanje električnog polja),

2. povišena temperatura može dovesti do gubitka biološke aktivnosti proteina zbog denaturacije.

Problem održavanja temperature povezan je s ionskom jakošću puferskog sustava i primjerenom snagom električne struje. Pokretljivost nabijene čestice obrnuto je proporcionalna kvadratnom korijenu ionske jakosti. Slabija ionska jakost dozvoljava veću pokretljivost, dok jača ionska jakost daje oštrije razdvojene zone, ali se tada razvija više topline, što pojačava difuziju i dovodi do pada električnog otpora.

Ako je dovod struje previsok, dolazi do pretjeranog zagrijavanja ($P = E \cdot I$ odnosno $P = I^2 \cdot R$, gdje je snaga P, kao mjera nastale topline, produkt napona i jakosti struje), što opet dovodi do denaturacije proteina.

Iz prethodno opisanog proizlazi da je izbor pufera bitan, jer o njemu ovisi i snaga električne struje koja se može primijeniti na sustav. Potrebno je imati izvor struje (engl. *power supply*) kojim je moguće jedan od parametara struje (napon, jakost, snagu) održavati konstantnim.

Osnovna ideja elektroforeze je jednostavna, no treba uzeti u obzir veliki broj čimbenika koji djeluju na put neke nabijene molekule ili iona kroz određeni medij. Njih možemo iskoristiti kao izvor dodatnih informacija, npr. kad pokretljivost ne bi ovisila o veličini molekule, bilo bi nemoguće razdvojiti velike od malih molekula ako su im naboji približno jednaki [11].

Kao analitička metoda, elektroforeza je jednostavna, brza i vrlo osjetljiva. U kombinaciji s drugim tehnikama molekularne biologije, postala je jedna od najčešće primjenjivanih metoda.

Elektroforeza je vrlo moćna laboratorijska metoda i njene mogućnosti uglavnom ovise o vrsti koja se primjenjuje. Osnovni je cilj primjenom ove metode saznati više o fiziološkim i metaboličkim procesima koji su povezani s osnovnim funkcijama organizma, ishranom, zdravstvenim stanjem i genetikom. Ova metoda služi za razdvajanje proteina i aminokiselina kako u preparativne tako i u analitičke svrhe, kao i za određivanje njihovih genetskih varijanti. Jedinke na molekulskom nivou znatno se više razlikuju nego što to na prvi pogled izgleda. Metodama elektroforeze koje nam stoje na raspolaganju možemo otkriti samo jedan dio nasljedne promjenjivosti, dok mnoge promjene koje se događaju na nivou molekula, prije svega promjene u sekvenci neutralnih aminokiselina koje ne dovode do promjene električnog opterećenja, ne mogu se otkriti [12].

2.2.2. Elektroforeza na mikročipu

Elektroforeza na mikročipu pojavila se početkom 1990-tih godina kao zanimljiv pristup brzoj separaciji bioloških sastojaka, uključujući DNK i proteine. Razvila se minijaturizacijom kapilarne elektroforeze [13]. Od najranijeg početka bavljenja ovom metodom, do danas, prisutan je konstantan razvoj i usavršavanje čitavog područja vezanog za elektroforezu na mikročipu.

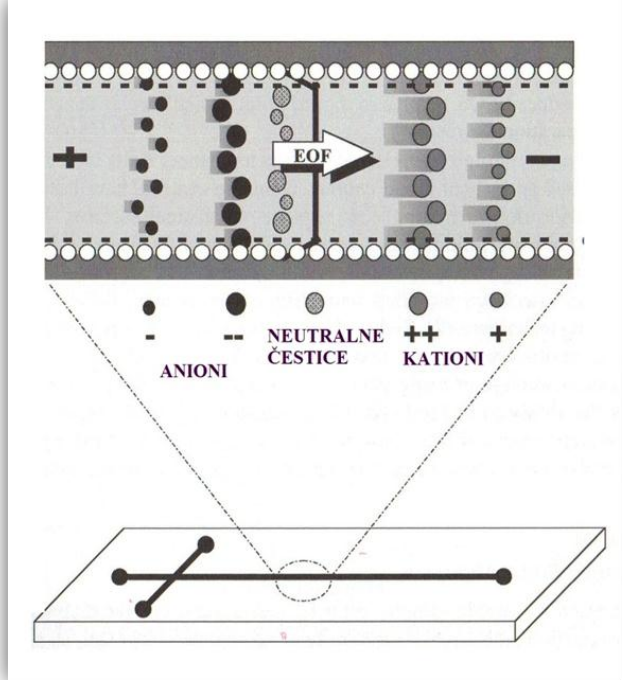
Elektroforeza na mikročipu rezultat je spajanja kemijske analize i mikrotehnologije. Dokazano je kako je elektroforeza na mikročipu dostigla jednostavno upravljanje volumenima na nanolitarskoj srazmjeri, a da pri tome ne zahtjeva pomične dijelove i omogućuje brzu separaciju visoke preciznosti. Ova metoda je stekla određenu pozornost zbog svojih potencijalnih primjena i ukupne izvedbe uređaja. Iako je prvotno bila usmjerena na DNK analizu, brzo se počela primjenjivati u biološke, industrijske i druge svrhe. Elektroforeza na mikročipu za prednost ima nisku cijenu, manju veličinu uređaja, kraće vrijeme analize, a što i jesu glavni ciljevi mnogih analitičkih metoda u kemiji.

2.2.2.1. Teorijske osnove elektroforeze na mikročipu i EOF

Teorija i mehanizmi djelovanja elektroforeze na mikročipu baziraju se na osnovnom znanju stečenom razvojem kapilarne elektroforeze, koja se pripisuje, još iz 1980-tih godina, Lukacsu i Jorgensonu. Oni su razdvajali smjesu proteina i peptida u staklenim kapilarama. Dva glavna ishoda te tehnologije:

1) brzo demonstracijsko odvajanje biomolekula elektroforezom u staklenim cijevima,
2) prisutnost elektoosmotskog toka [15].

Elektroosmotski tok ili **EOF** (engl. ***e****lectro****o****smotic* ***f****low*) ima vrlo važnu ulogu u elektoforezi na mikročipu. EOF je uzrokovan Kulonovom silom induciranom električnim poljem koje djeluje na nabijene čestice dok se gibaju u otopini. Kemijska ravnoteža između čvrste površine i otopine elektrolita uglavnom dovodi do stvaranja naboja iznad površine, tj. sloj pokretnih iona koji se naziva dvostruki sloj ili Debye-ev sloj. Kada se pusti električno polje tada dolazi do kretanja nabijenih čestica iz dvostrukog sloja zbog rezultirajuće Kulonove sile, tj. dolazi do kretanja otopine u kapilari koje je uzrokovano električnim poljem. Protok koji se javlja se naziva EOF. Uzrokovan je primjenom separacijskog potencijala te „gura“ nabijene čestice ili prema detektoru ili od detektora, ovisno o polaritetu elektroda i površinskom naboju [14] (Slika 9.).



Slika 9. *Prikaz elektroosmotskog toka i čestica koje se gibaju u separacijskom kanalu mikročipa pod utjecajem elektroosmotskog toka, od anode prema katodi [15].*

Dva čimbenika kontroliraju EOF, to je jakost električnog polja i dvostruki sloj. Od ta dva čimbenika pri mjerenju je najlakše kontrolirati jakost električnog polja, dok je dvostruki sloj puno teže kontrolirati, ali on je općenito reduciran ako se ionska jakost povećava, a pH smanjuje. Što je dvostruki sloj veći, protok je slabiji.

Brzina EOF-a (izražena kao EOF mobilnost) ovisi o brojnim parametrima poput pH pufera, ionske jakosti pufera, temperature, inteziteta električnog polja i prisutnosti nekih aditiva. Zaustavljanje ili promjena smjera EOF-a postiže se modifikacijama stijenki kapilare, trajnim ili privremenim modifikacijama [19].

Tokom analize, nabijene molekule putuju brzinom koju određuje brzina elektroosmotskog toka. Brzina kretanja pozitivno nabijenih iona se povećava, a negativnih smanjuje. Ukupna mobilnost (μ) supstanci u kapilari predstavlja sumu elektroforetske (μ_{EOF}, zavisi od odnosa m/z) i elektroosmotske mobilnosti (μ_{EOS}). Elektroosmotska mobilnost predstavljena je izrazom:

$$\mu = \frac{\sigma}{\kappa\eta} = \frac{\varepsilon\psi}{\eta} \tag{11}$$

gdje su σ - gustoća naboja na površini kapilare, κ - debljina dvostrukog električnog sloja, η - viskoznost otopina, ε - dielektrična konstanta pufera i Ψ - električni potencijal na površini kapilare. Brzina kretanja otopine pod utjecajem elektroosmoze na razmaku x od zida kapilare zavisi od elektroosmotske mobilnosti i jačine primjenjenog električnog polja (E):

$$v(x) = \mu_{EOF} E \tag{12}$$

te je brzina samog analita određena umnoškom njegove mobilnosti sa EOF-om i jakosti električnog polja, kao što se vidi iz izraza:

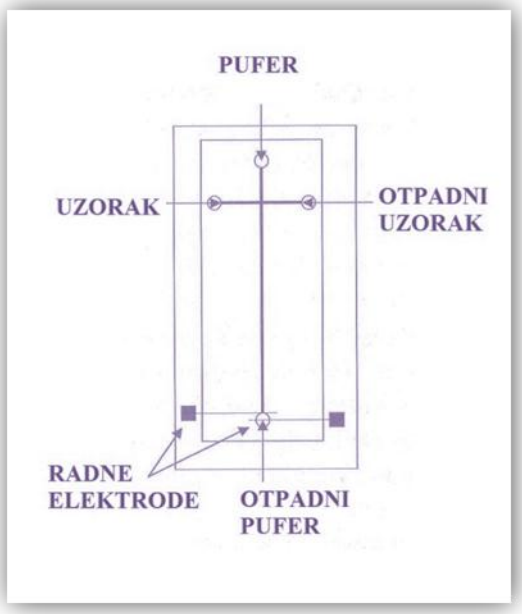
$$v(analita) = (\mu_e \mu_{EOF}) E \tag{13}$$

gdje je v - brzina analita, μ_e - elektroforetska mobilnost analita, μ_{EOF} - elektroosmotski tok te E - jakost električnog polja.

Standardni protokol svake elektroforeze na mikročipu je injektiranje, separacija i detekcija. Injektiranjem uvodimo uzorak u separacijski kanal primjenom istosmjernog napona. U separacijskom kanalu se potom uzorak separira, također, primjenom određenog istosmjernog napona, a segmenti dolaze do radnih elektroda gdje se i detektiraju. Detekcija se prevodi u nama čitljiv ispis, elektroferogram.

2.2.2.2. Mikročip

Tipičan dizajn mikročipa se sastoji od mikrokanala raspoređenih križno sa jednim produljenim kanalom tzv. separacijskim kanalom gdje se odvija proces separacije (Slika 10.).



Slika 10. *Shematski prikaz mikročipa [15].*

Tipične dimenzije kanala su: dubina 15-50 μm, širina 50-200 μm, a duljina separacijskog kanala 1-10 cm. Na svakom mikročipu postoje četiri rezervoara za tekućinu smještena na završetcima kanala, dva rezervoara su za injektiranje uzorka i pomoćni („background“) elektrolit (pufer), a druga dva služe za otpadnu tekućinu. U strujni krug se kapilara povezuje preko rezervoara ispunjenih puferom ili uzorkom u koje su uronjene elektrode izrađene od plemenitih metala [16]. Na čipovima postoje dva oblika sjecišta, u obliku križa ili tzv. dvostruki T. Uzorak se uobičajeno injektira elektrokinetički, puštanjem električnog polja duž kanala kroz uzorak. Injektiranje i separacija su kontrolirani nezavisnim izvorima visokog napona. Detekcija se najčešće odvija na suprotnome kraju separacijskog kanala gdje su smještene elektrode, koje su najčešće natiskane na čip. Prvi čip je bio napravljen od stakla no kasnije se za izradu čipova koriste polimerni spojevi jer su jeftiniji i lakše ih je izraditi.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Popis korištenih kemikalija

Za određivanje aminokiselina elektroforezom na mikročipu korištene su sljedeće kemikalije:

Tablica 3. *Popis korištenih kemikalija.*

Reagensi	Proizvođač	Čistoća
L-HISTIDIN	Sigma-Aldrich	**99%**
ß-ALANIN	Sigma-Aldrich	**98,5%**
OCTENA KISELINA	Panreac	**98%**

3.2. Aparati i pribor

3.2.1. Uređaj za mikročip elektroforezu

ChipGenie® edition E (proizvođač: microfluidic ChipShop GmbH, Jena, Njemačka), (Slika 11.) je sustav baziran na mikrofluidičkoj tehnici separacije nabijenih analita koji rabi kapilarnu elektroforezu sa kapacitivno spregnutim, beskontaktnim, konduktometrijskim detektorom, C^4D (engl. *capacitively-coupled contactless conductivity detection*).

Sustav se sastoji od kanala za uvođenje uzoraka i kanala za separaciju uzorka, detekcijskih (radnih) elektroda i instrumenta sa visokonaponskim izvorom. Instrument je povezan sa kompjuterom pomoću USB-a radi daljnje obrade podataka.

Dimenzije instrumenta su: 19 cm, 12 cm, 8 cm (duljina, širina, visina). Instrument sadrži dvije glavne komponente prikazane na slici 9. Poklopac instrumenta sadrži visokonaponsku jedinicu koja kontrolira napon injektiranja i napon separacije i elektrode za uvođenje i

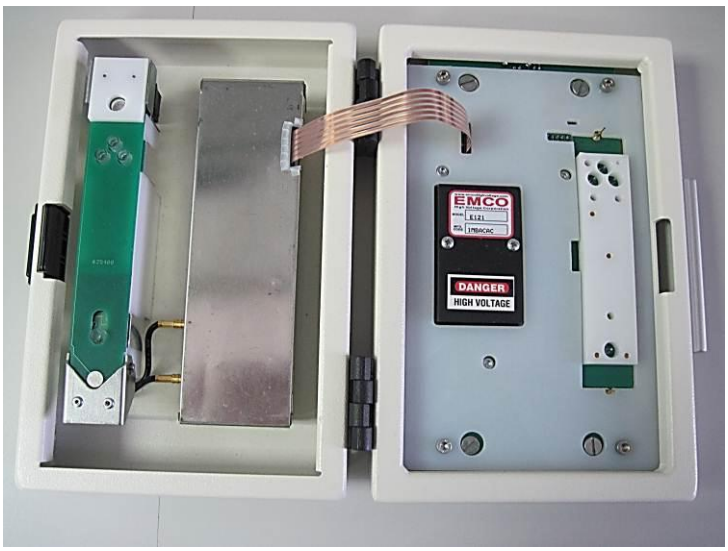
separaciju uzorka. Niži dio instrumenta (lijevo prikazan na slici 9.); sadrži C^4D kontrolnu jedinicu i držač za mikročip sa kontaktnim elektrodama. Mikročip se stavlja na držač mikročipa na kojeg se pričvršćuje pomoću pokretnog podupirača.

Zatvaranjem poklopca, visokonaponske elektrode dolaze u kontakt sa uzorkom ili puferom unutar rezervoara mikročipa i analiza može započeti.

Uz instrument se koristite još dva programa za akviziciju i obradu podataka:

a) *ChipGenie* koji se koristi za akviziciju podataka i podešavanje parametara koji su bitan korak prije svake analize. Podesiti možemo struju, napon injektiranja i separacije uzorka.

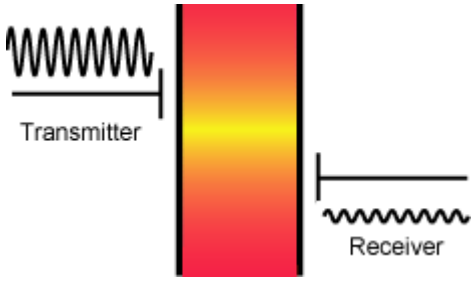
b) *Origin 8.5* koji se koristi za obradu podataka: izračunavanje visine pika, površine pika i retencijskog vremena pika.



Slika 11. *Uređaj za elektroforezu na mikročipu ChipGenie® edition E.*

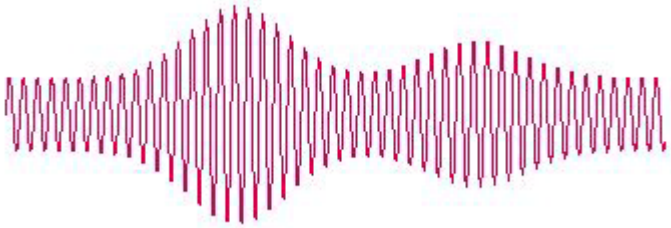
3.2.1.1. Detektor C^4D

C^4D detektor se koristio za detekciju aminokiselina. Princip na kojem radi ovaj detektor opisan je na slikama 12-14. C^4D rabi odašiljačku elektrodu (engl. *transmitter*) kako bi se područje uzorka podvrgnulo visokoj amplitudi visoko frekventnog elektromagnetskog signala, pri čemu se odgovarajući slabi signal izmjenične struje očitava na elektrodi za primanje signala (engl. *receiver*), slika 12.



Slika 12. *Shema funkcioniranja C^4D detektora.*

Na veličinu primljenog signala utječe električna provodnost uzorka (Slika 13).



Slika 13. *Oblik signala na elektrodi za prijam signala.*

Amplituda primljenog signala izmjenične struje smanjuje se u svrhu pretvaranja u signal istosmjerne struje prikladan za prikupljanje podataka (Slika 14).



Slika 14. *Amplituda primljenog signala izmjenične struje nakon pretvaranja u signal istosmjerne struje.*

Kada nabijena čestica prođe područje detekcije uzrokuje malu promjenu ukupne vodljivosti uzorka. Konstantnim praćenjem vodljivosti, signal će prikazati seriju pikova, površine i visine srazmjerne koncentraciji ispitivanog uzorka. Signal će biti obrađen u čitljiv zapis (elektroferogram) [8].

3.2.1.2. Mikročip

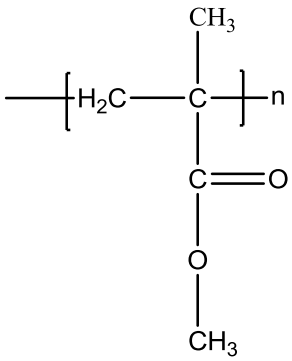
Materijal detekcijskih (radnih) elektroda je sloj natiskanog titanija, debljine 10 nm na kojemu se nalazi sloj natiskanog zlata debljine 100-150 nm. Detekcijske (radne) elektrode su postavljene na vanjskoj strani mikročipa kako analit ne bi bio u doticaju s njima. Korištenje ovih elektroda zahtjeva uporabu C^4D detektora. Sjecište kanala na mikročipu je u obliku križa, a kanali su prekriveni sa tankom folijom. Dimenzije mikročipa su: dužina 75 mm, širina 50µm. Polimetil-metakrilat (PMMA) je materijal od kojeg je napravljan mikročip. Na svakom mikročipu postoje četiri rezervoara koji su također načinjeni od PMMA, volumen svakog rezervoara je 70µL (Slika 15.).



Slika 15. *Prikaz oblika čipa s natiskanim radnim elektrodama koji se koristio u ispitivanjima.*

3.2.1.3. PMMA

PMMA (polimetil-metakrilat) (Slika 16.), je umjetno (akrilno) staklo. PMMA je prozirna plastika, gustoće oko 1.1 g/cm^3. Koristi se kao zamjena za staklo, zbog lakše izrade, manje cijene te velike otpornosti na različite kemikalije. Može se lijepiti sa cijanoakrilatom. PMMA prenosi do 92% vidljive svjetlosti (3 mm debljine). Materijal je razvijen 1928. godine.



Slika 16. *Strukturni prikaz molekule PMMA.*

3.2.2. Vaga

Analitička vaga ADN GR-120 (2000. godina), je korištena za pripremu standardnih otopina aminokiselina i otopina pufera koje su se koristile u ispitivanjima (Slika 17.).



Slika 17. *Prikaz vage koja se koristila u opisanim ispitivanjima.*

3.2.3. Pipete

Pipete Hirschmann, Labopette, volumena 10-100 µL, te volumena 100-1000 µL su korištene u ispitivanjima za pripremu uzoraka i uzimanje uzoraka za analizu (Slika 18).



Slika 18. *Prikaz pipeta koje su se koristile u opisanim ispitivanjima.*

3.2.4. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj BADELIN RK-100 (Germany), je korištena u ispitivanjima za uklanjanje plinova u pripremljenim otopinama. Rad kupki bazira se na korištenju ultrazvučnih vibracija uz korištenje tekućina koje imaju sposobnost prenošenja velike količine energije putem ultrazvuka [18].



Slika 19. *Prikaz ultrazvučne kupelji koja se koristila u opisanim ispitivanjima.*

3.3. Priprema otopina

3.3.1. Priprava pufera koncentracije 0,5 M

Otpipetirati 2,87 mL koncentrirane octene kiseline (HAc) u volumetrijsku tikvicu od 100 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljen pufer ima pH vrijednost 2,5 ± 0,1.

3.3.2. Priprava otopine histidina, c (His) = 10^{-2} M

Odvagati 0,155 grama histidina i kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL i otopiti u malom volumenu ultračiste vode, tikvicu nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 10^{-2} M.

3.3.3. Priprava otopine histidina, c (His) = 10^{-3} M

Otpipetirati 2500 μL otopine histidina, c = 10^{-2} M, u volumetrijsku tikvicu od 25 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 10^{-3} M.

3.3.4. Priprava otopine histidina, c (His)= 5 x 10^{-6} M

Otpipetirati 500 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 5 x 10^{-6} M.

3.3.5. Priprava otopine histidina, c (His) = 1 x 10^{-5} M

Otpipetirati 100 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 1 x 10^{-5} M.

3.3.6. Priprava otopine histidina, c (His) = 2,5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 250 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 2,5 x 10^{-5} M.

3.3.7. Priprava otopine histidina, c (His) = 5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 500 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 5 x 10^{-5} M.

3.3.8. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 10^{-2} M

0,0890 grama alanina kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL i otopiti u malome volumenu ultračiste vode, tikvicu nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 10^{-2} M.

3.3.9. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 10^{-3} M

Otpipetirati 2500 μL otopine alanina, c = 10^{-2} M, u volumetrijsku tikvicu od 25 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 10^{-3} M**.**

3.3.10. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 2,5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 250 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 2,5 x 10^{-5} M.

3.3.11. Priprava otopine alanina, c (Ala) = 5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 500 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 5 x 10^{-5} M.

3.3.12. Priprava otopine alanina , c (Ala) = 7,5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 750 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 7,5 x 10^{-5} M.

3.3.13. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 7,5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 750 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, i 750 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin.

3.3.14. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 500 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, i 500 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin.

3.3.15. Priprava otopine smjese alanina i histidina, c (His, Ala) = 2,5 x 10^{-5} M

Otpipetirati 250 μL otopine alanina, c = 10^{-3} M, i 250 μL otopine histidina, c = 10^{-3} M, u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodano nešto ultračiste vode, a zatim nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina je koncentracije 2,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin.

3.4. Postupak mjerenja

3.4.1. Baždarni pravac za β-alanin

Na početku mjerenja injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom. Nakon toga injekcijsku i separacijsku kapilaru isprati otopinom pufera, octenom kiselinom, c = 0,5 M. Uključiti računalo, uređaj za MCE, a zatim otvoriti pripadajući softver *ChipGenie*. U softveru upisati željene parametre injektiranja i separacije (optimirana metoda za sustav koji se mjeri). Dodati 50 μL otopine pufera u sve rezervoare i napraviti nekoliko mjerenja (elektroferograma) otopine pufera, dok se bazna linija ne stabilizira.

U rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine alanina, c = 2,5 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine alanina, c = 5 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine alanina, c = 7,5 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Na kraju radnog dana injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom.

Parametri mjerenja:

- uzorak: alanin, c = 2,5 x 10^{-5} M , 5 x 10^{-5} M i 7,5 x 10^{-5} M

- pufer = octena kiselina, c = 0,5 M, pH = 2,5

- napon injektiranja = 0,80 kV

- vrijeme injektiranja = 12 s

- napon separacije = 3,80 kV

- vrijeme separacije = 200 s

3.4.2. Baždarni pravac za L-histidin

Na početku mjerenja injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom. Nakon toga injekcijsku i separacijsku kapilaru isprati otopinom pufera, octenom kiselinom, c = 0,5 M. Uključiti računalo, uređaj za MCE, a zatim otvoriti pripadajući softver *ChipGenie*. U softveru upisati željene parametre injektiranja i separacije (optimirana metoda za sustav koji se mjeri). Dodati 50 μL otopine pufera u sve rezervoare i napraviti nekoliko mjerenja (elektroferograma) otopine pufera, dok se bazna linija ne stabilizira.

U rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine histidina, c = 1 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine histidina, c = 2,5 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine histidina, c = 5 x 10^{-5} M, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika). Na kraju radnog dana injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom.

Parametri mjerenja:

- uzorak: alanin, c = 1 x 10^{-5} M , 2,5 x 10^{-5} M i 5 x 10^{-5} M

- pufer = octena kiselina c = 0,5 M, pH = 2,5

- napon injektiranja = 0,80 kV

- vrijeme injektiranja = 12 s

- napon separacije = 3,80 kV

- vrijeme separacije = 200 s

3.4.3. Baždarni pravac za smjesu β-alanina i L-histidina

Na početku mjerenja injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom. Nakon toga injekcijsku i separacijsku kapilaru isprati otopinom pufera, octenom kiselinom, c = 0,5 M. Uključiti računalo, uređaj za MCE, a zatim otvoriti pripadajući softver *ChipGenie*. U softveru upisati željene parametre injektiranja i separacije (optimirana metoda za sustav koji se mjeri). Dodati 50 μL otopine pufera u sve rezervoare i napraviti nekoliko mjerenja (elektroferograma) otopine pufera, dok se bazna linija ne stabilizira.

U rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine smjese alanina i histidina, c = 2,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine smjese alanina i histidina, c = 5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.* (izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika).

Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine smjese alanina i histidina, c = 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine pufera i započeti mjerenje. Napraviti određen broj mjerenja, a dobivene elektroferograme obraditi u programu *Origin 8.5.*

(izračunati visinu pika, površinu pika i odrediti retencijsko vrijeme pika). Na kraju radnog dana injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom.

Parametri mjerenja:

- uzorak: alanin, c = 2,5 x 10^{-5} M , 5 x 10^{-5} M i 7,5 x 10^{-5} M
- pufer = octena kiselina c = 0,5 M, pH = 2,5
- napon injektiranja = 0,80 kV
- vrijeme injektiranja = 12 s
- napon separacije = 3,80 kV
- vrijeme separacije = 200 s

3.4.4. Određivanje β-alanina i L-histidina

Za testiranje točnosti i preciznosti određivanja korištena je metoda poznatog dodatka. Postupak je identičan onom opisanom za izradu kalibracijskih dijagrama za β-alanin i L-histidin, pojedinačno i u smjesi.

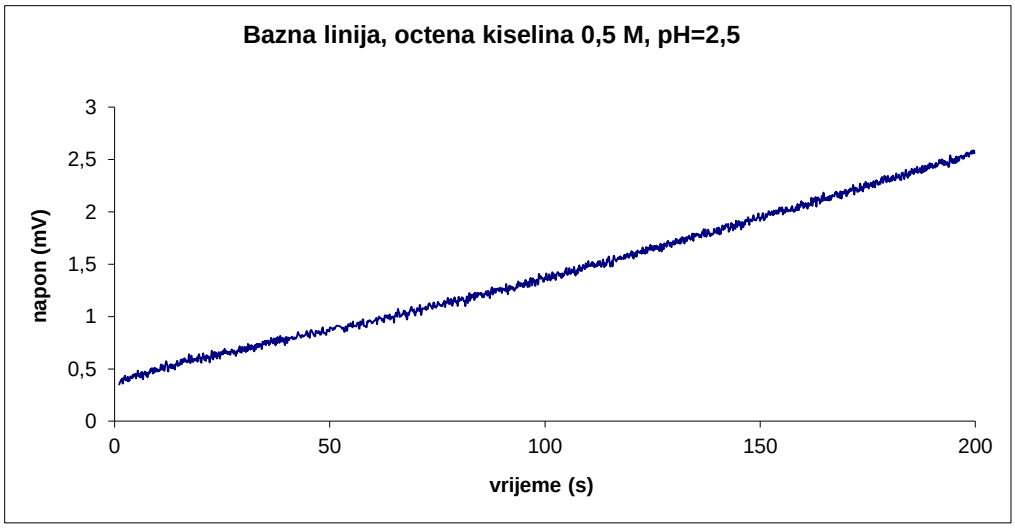
Injekcijsku i separacijsku kapilaru čipa isprati profiltriranom ultračistom vodom, u rezervoar čipa za uzorak dodati 50 μL otopine ispitivanog uzorka poznate koncentracije. Ispitivane su otopine pojedinačnih aminokiselina β-alanina i L-histidina, kao i njihove smjese.

Parametri mjerenja bili su identični onima postavljenim pri izradi odgovarajućih baždarnih pravaca.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Bazna linija

Stabilnost mjernog uređaja, propusnost kapilara mikročipa, električna vodljivost pufera/pomoćnog elektrolita testiraju se prije početka svake nove serije mjerenja. Elektroferogram čiste otopine pufera/pomoćnog elektrolita, koji ujedno predstavlja i baznu liniju mjerenja, prikazan je na slici 20.



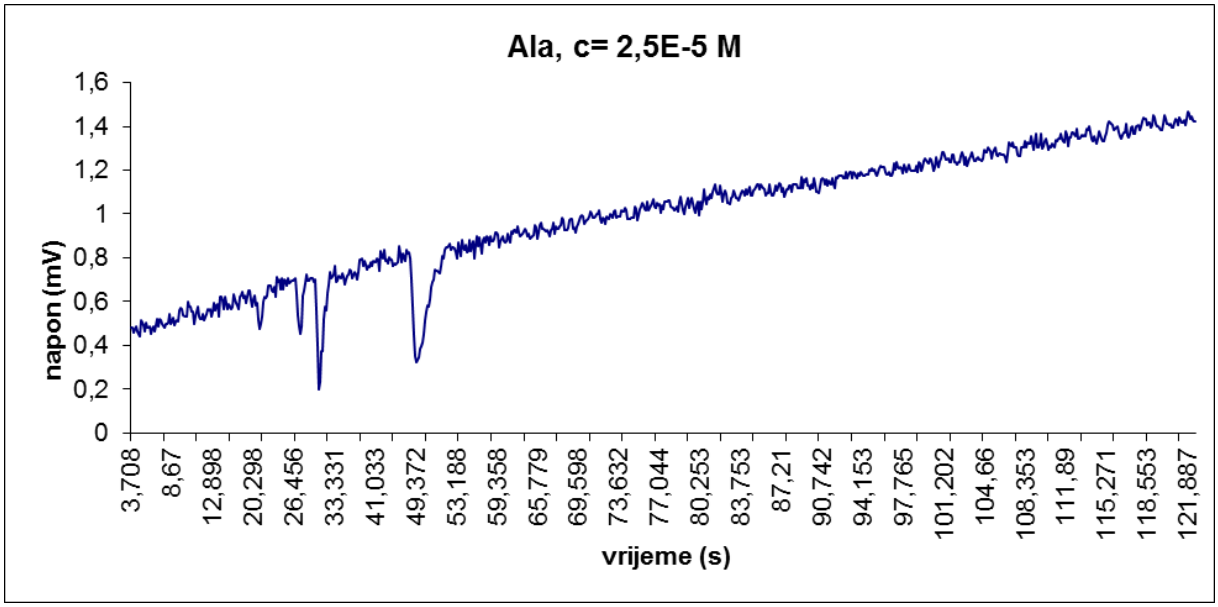
Slika 20. *Elektroferogram otopine pufera, 0,5 M octena kiselina, pH = 2,5.*

Pravilna bazna linija elektroferograma čistog pufera prikazano na slici 20., bez interferirajućih pikova, ukazuje na njegovu analitičku podobnost za sva ispitivanja i mjerenja. Pozitivan drift (mijenjanje napona s vremenom) vjerojatno je posljedica postupnog zagrijavanja pufera/pomoćnog elektrolita, rezultirajući promjenom njegovih električnih i reoloških osobina. Drift prikazan na slici 20. prihvatljiv je za elektroforetska ispitivanja, s obzirom da sustav nije termostatiran.

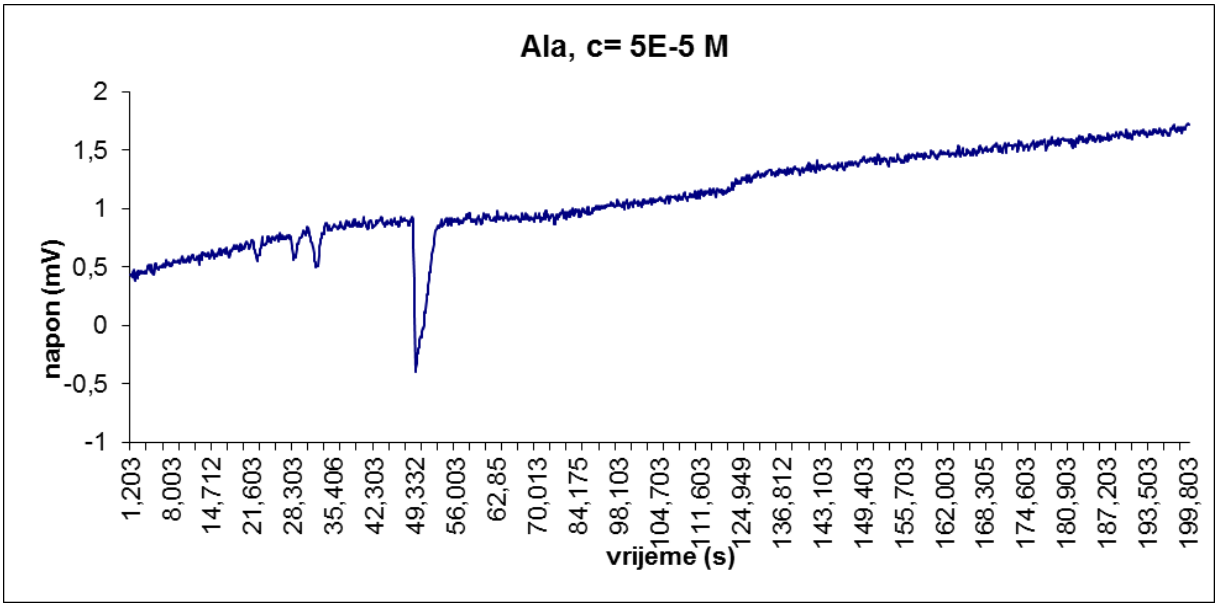
4.2. Baždardni pravac za β-alanin

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za β-alanin u području od 2,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-5} M.

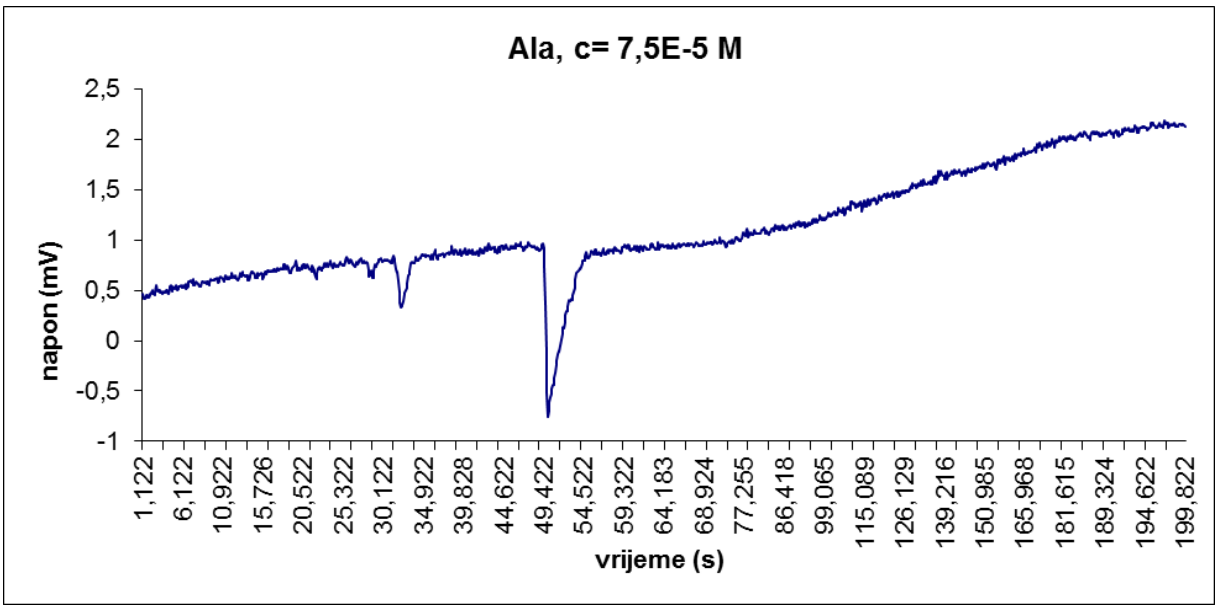
Elektroferogrami β-alanina za koncentracije 2,5 x 10^{-5} M, 5 x 10^{-5} M i 7,5 x 10^{-5} M prikazani su na slikama 21. - 23., respektivno.



Slika 21. *Elektroferogram β-alanina, c = 2*,5 x 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



Slika 22. *Elektroferogram β-alanina c* = 5 x 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



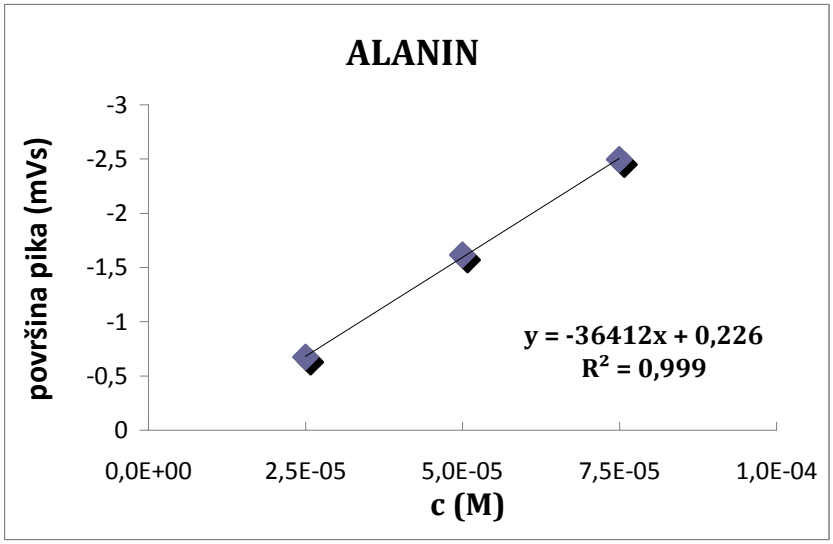
Slika 23. *Elektroferogram β-alanina c* = *7,5* x 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).

Kao što se vidi na slikama 21. - 23., na elektroferogramima je prisutno nekoliko pikova.

Pikovi koji odgovaraju retencijskom vremenu od 49 sekundi pripadaju β-alaninu pri pH = 2,5.

Elektroferogrami otopine β-alanina ispoljavaju jasno izražen, dobro definiran i pravilan negativan pik, koji služi za kvantifikaciju β-alanina. Ostali pikovi vjerojatno se odnose, s obzirom na amfiprotički karakter aminokiseline, na ostale specije β-alanina iz ravnotežnog sustava i nebitni su za njegovu kvantifikaciju.

Baždarni pravac za β-alanin je prikazan na slici 24.



Slika 24. *Baždarni pravac za β-alanin u 0,5 M octenoj kiselini.*

Kao što se može vidjeti na slici 24., prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije β-alanina i odgovarajućih površina pikova (R^2 = 0,999). Parametri pravca linearne regresije su prikazani na slici 24., područje linearnog odziva je 2,5 x 10^{-5} M – 7,5 x 10^{-5} M.

U tablici 4. je prikazana izračunata vrijednost površine pika za tri ispitivane koncentracije β-alanina i njihova pripadajuća statistika.

Tablica 4. *Rezultati izračunatih površina pikova β-alanina s pripadajućom statističkom obradom.*

β-ALANIN (Ala)									
c[M]/[mg/L]	**površina pika [mVs]**				**srednja vrijednost**	**SD**	**RSD**	**CV (%)**	**CL, p=0,05 (±)**
$2{,}5\cdot10^{-5}$ /2,23	-0,6102	-0,7264	-0,8049	-0,5518	**-0,67**	**0,11**	**-0,17**	**-16,9**	**0,11**
$5\cdot10^{-5}$ /4,45	-2,0232	-1,7309	-1,5942	-1,1077	**-1,61**	**0,38**	**-0,24**	**-23,7**	**0,37**
$7{,}5\cdot10^{-5}$ /6,68	-2,5170	-2,4128	-2,4673	-2,5788	**-2,49**	**0,07**	**-0,03**	**-2,9**	**0,07**

LEGENDA

SD = standardno odstupanje (engl. *standard deviation*)

RSD = relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*)

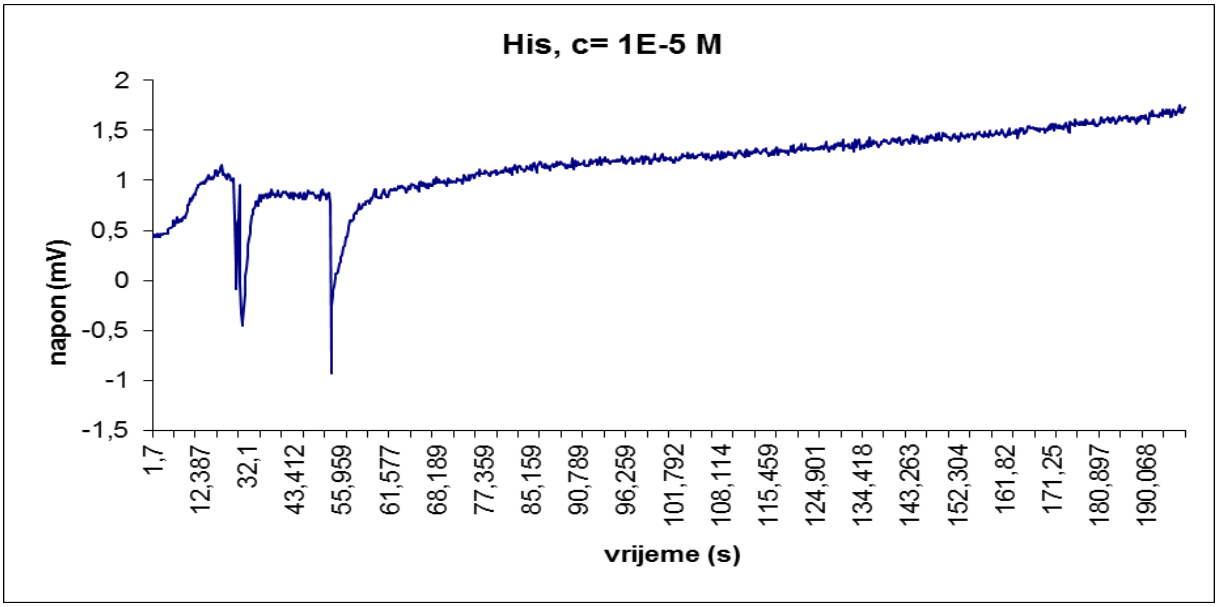
CV (%)= koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*)

CL = interval pouzdanosti (engl. *confidence limits*)

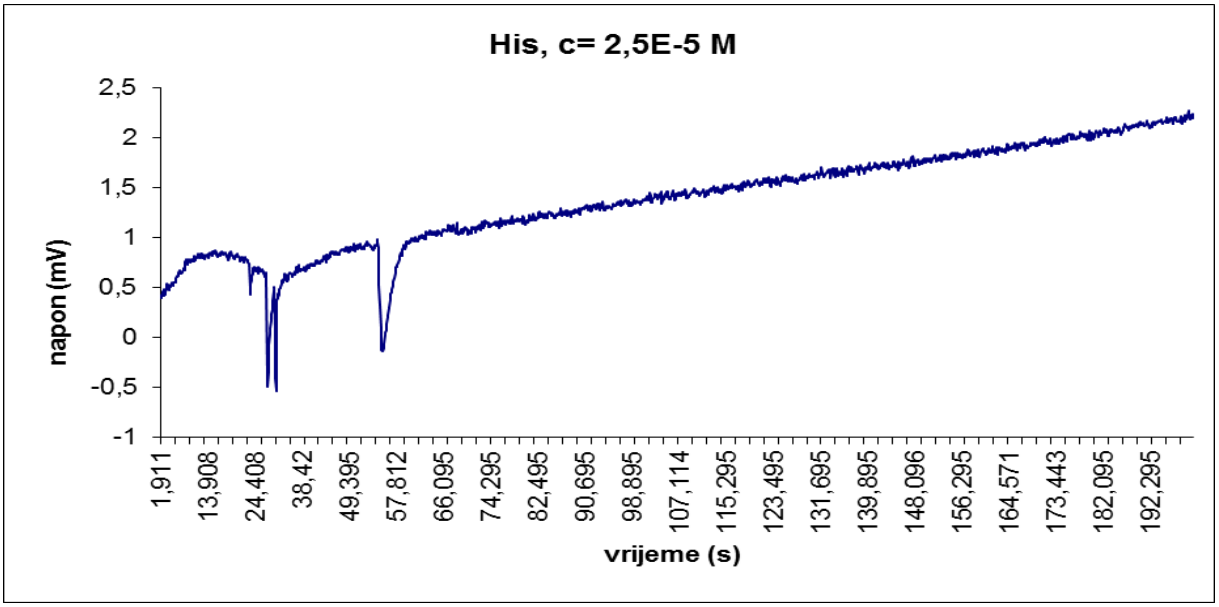
4.3. Baždardni pravac za L-histidin

Preliminarna ispitivanja pokazala su linearni odziv C^4D detektora za L-histidin u području od 1,5 x 10^{-5} M do 5 x 10^{-5} M.

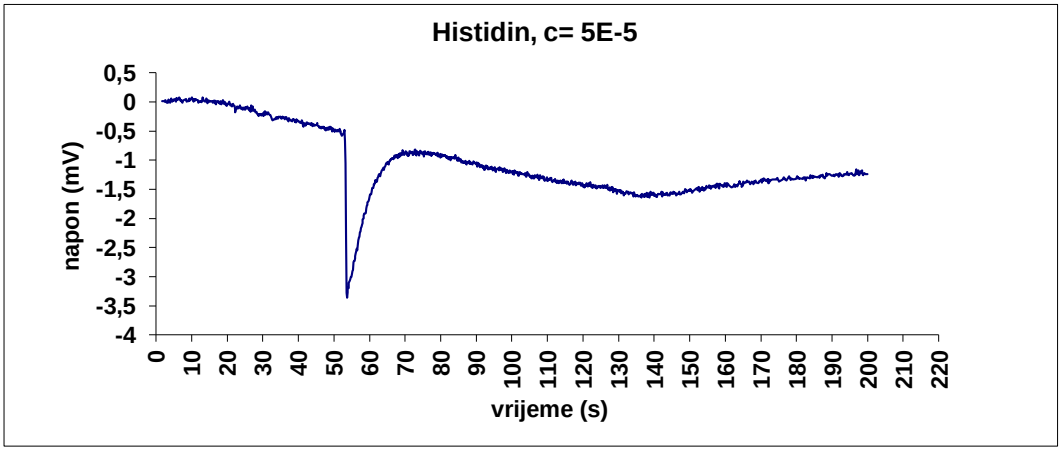
Elektroferogrami L-histidina za koncentracije 1,5 x 10^{-5} M, 2,5 x 10^{-5} M i 5 x 10^{-5} M prikazani su na slikama 25. - 27., respektivno.



Slika 25. *Elektroferogram L-histidina, c = 1,5 x 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).*



Slika 26. *Elektroferogram L-histidina, c = 2,5 x* 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



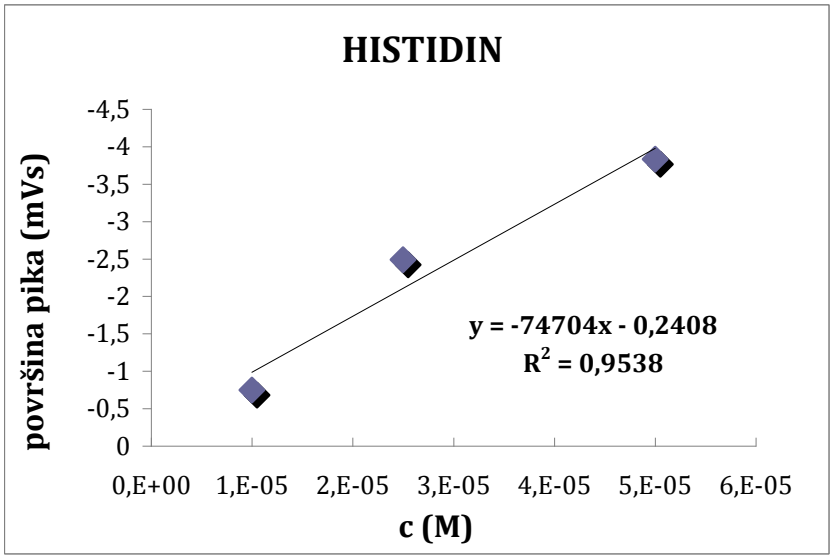
Slika 27. *Elektroferogram L-histidina c* = 5 x 10^{-5} M u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).

Kao što je vidljivo na slikama 25. – 27., na elektroferogramima je prisutno nekoliko pikova.

Pikovi koji odgovaraju retencijskom vremenu od 55 sekundi pripadaju L-histidinu, pri pH = 2,5.

Elektroferogrami otopina L-histidina ispoljavaju jasno izražen, dobro definiran i pravilan negativan pik, koji služi za kvantifikaciju L-histidina. Kao i kod β-alanina, ostali pikovi vjerojatno se i ovdje odnose, s obzirom na amfiprotički karakter aminokiseline, na ostale specije L-histidina iz ravnotežnog sustava i nebitni su za njegovu kvantifikaciju.

Baždarni pravac za L-histidin je prikazan na slici 28.



Slika 28. *Baždarni pravac za L-histidin u 0,5 M octenoj kiselini*.

Kao što se može vidjeti na slici 28., prisutna je zadovoljavajuća linearna zavisnost između koncentracije L-histidina i odgovarajućih površina pikova (R^2 = 0,9538). Parametri pravca linearne regresije su prikazani na slici 28., područje linearnog odziva je 1,5 x 10^{-5} M – 5 x 10^{-5} M.

U tablici 5. je prikazana izračunata vrijednost površine pika za tri ispitivane koncentracije L-histidina i njihova pripadajuća statistika.

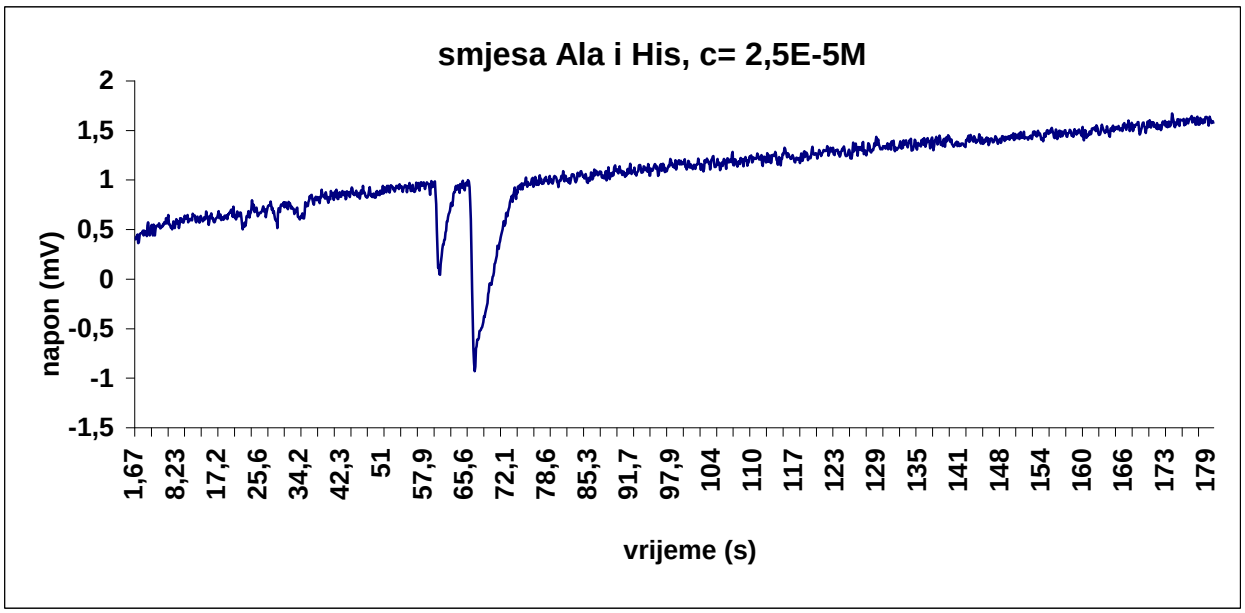
Tablica 5. *Rezultati izračunatih površina pikova L-histidina s pripadajućom statističkom obradom.*

L-HISTIDIN (His)									
c[M]/[mg/L]	**površina pika[mVs]**				**srednja vrijednost**	**SD**	**RSD**	**CV(%)**	**CL, p=0,05 (±)**
$5 \cdot 10^{-6}$ /0,77	-0,3572	-0,5260	-0,4510		**-0,44**	**0,08**	**-0,19**	**-19,0**	**0,09**
$1 \cdot 10^{-5}$ /1,55	-0,7924	-0,7188	-0,7584	-0,7323	**-0,75**	**0,03**	**-0,04**	**-4,3**	**0,03**
$2{,}5 \cdot 10^{-5}$ /3,88	-2,6552	-2,5397	-2,4937	-2,2639	**-2,49**	**0,16**	**-0,07**	**-6,6**	**0,16**
$5 \cdot 10^{-5}$ /7,76	-4,1064	-3,7954	-3,6443	-3,7882	**-3,83**	**0,19**	**-0,05**	**-5,1**	**0,19**

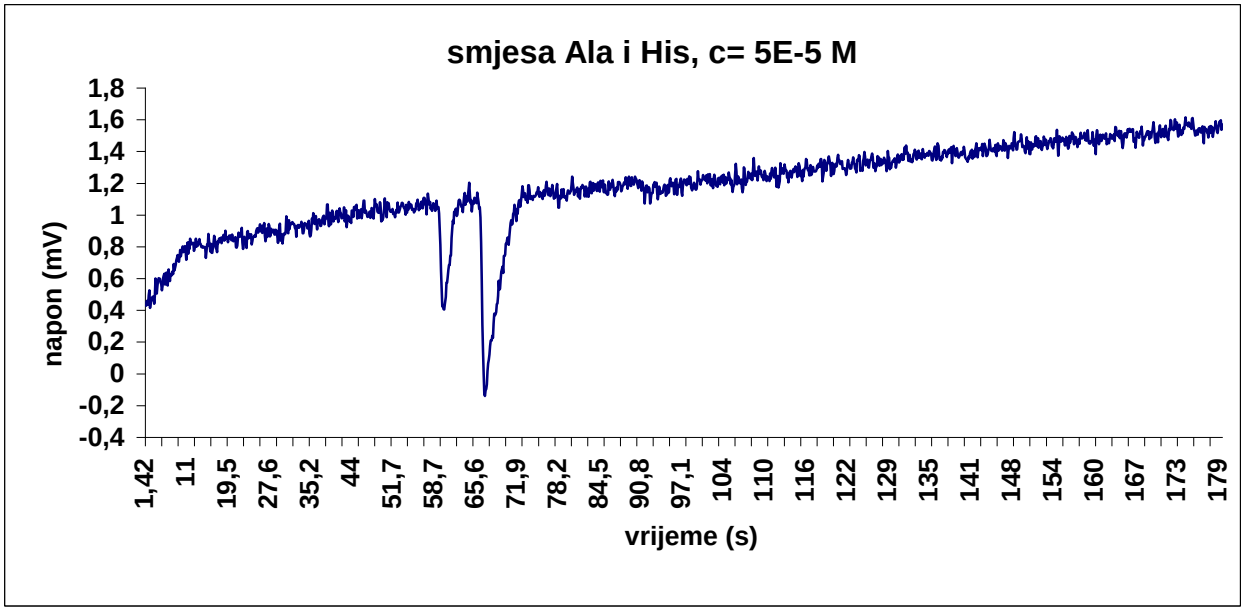
4.4. Baždardni pravac za smjesu β-alanina i L-histidina

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za smjesu β-alanina i L-histidina u području od 2,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin.

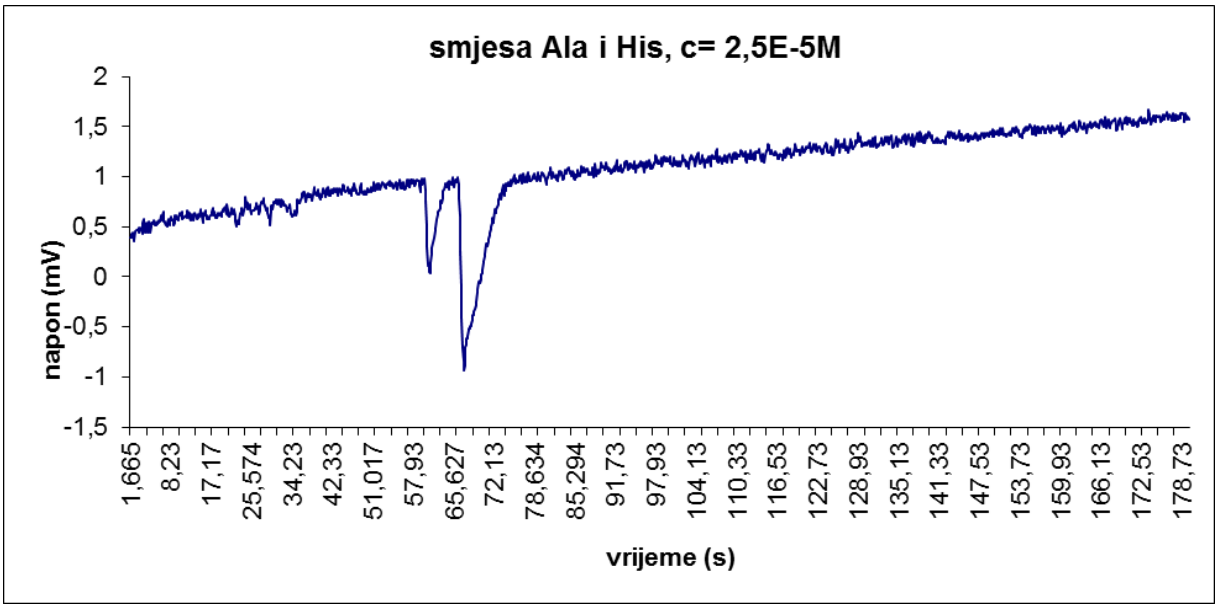
Elektroferogrami smjese β-alanina i L-histidina za koncentracije 2,5 x 10^{-5} M, 5 x 10^{-5} M i 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin su prikazani na slikama 29. - 31., respektivno.



Slika 29. *Elektroferogram smjese β-alanina i L-histidina, c = 2,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).*



Slika 30. *Elektroferogram smjese β-alanina i L-histidina, c = 5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).*



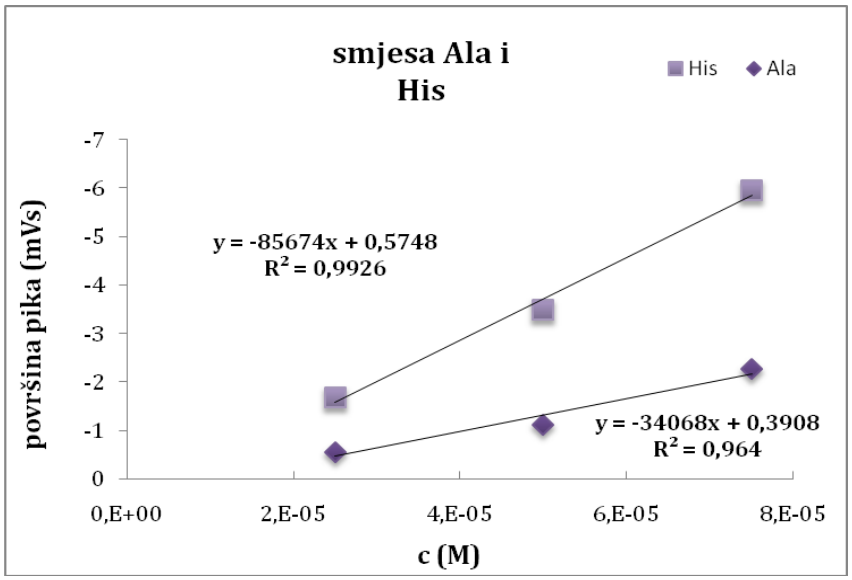
Slika 31. *Elektroferogram smjese β-alanina i L-histidina, c = 7,5 x 10^{-5} M u odnosu na alanin i histidin, u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).*

Kao što se vidi na slikama 29. - 31., na elektroferogramima je prisutno nekoliko pikova.

Pikovi koji odgovaraju retencijskom vremenu od 61 sekundi pripadaju β-alaninu pri pH = 2,5, dok pikovi koji odgovaraju retencijskom vremenu od 68 sekundi pripadaju L-histidinu, pri pH = 2,5.

Elektroferogrami smjese β-alanina i L-histidina ispoljavaju dva jasno izražena, dobro definirana, dobro separirana i pravilna negativna pika, koji služe za kvantifikaciju β-alanina i L-histidina. Ostali pikovi vjerojatno se odnose na ostale specije prisutnih aminokiselina iz ravnotežnog sustava i nebitni su za njihovu kvantifikaciju.

Baždarni pravac za smjesu β-alanina i L-histidina je prikazan na slici 32.



Slika 32. *Kalibracijski graf za smjesu β-alanina i L-histidina u 0,5 M octenoj kiselini.*

U smjesi je moguća kvantifikacija obje navedene aminokiseline sa zadovoljavajućim koeficijentom korelacije.

Kao što se može vidjeti na slici 32., prisutna je jaka linearna povezanost između koncentracije β-alanina i odgovarajućih površina pikova (R^2 = 0,9926).

Također, prisutna je i zadovoljavajuća linearna povezanost između koncentracije L-histidina i odgovarajućih površina pikova (R^2 = 0,9640).

Parametri linearne regresijske linije za obje ispitivane aminokiseline su prikazani na slici 32., područje linearnog odziva je 1,5 x 10^{-5} M $^{-5}$ x 10^{-5} M.

U tablici 6. je prikazana izračunata vrijednost površine pika za tri ispitivane koncentracije smjese β-alanina i L-histidina te njihova pripadajuća statistika.

Tablica 6. *Rezultati izračunatih površina pikova β-alanina i L-histidina s pripadajućom statističkom obradom.*

Smjesa β-alanina (Ala) i L-histidina (His)										
c[M]		**površina pika [mVs]**				**srednja vrijednost**	**SD**	**RSD**	**CV(%)**	**CL, p=0,05 (±)**
$2{,}5\cdot10^{-5}$	**Ala**	-0,5450	-0,5761	-0,5587	-0,5440	**-0,55**	**0,01**	**-0,03**	**-2,7**	**0,01**
	His	-1,6651	-1,6846	-1,6715	-1,6737	**-1,67**	**0,01**	**-0,01**	**-0,5**	**0,01**
$5\cdot10^{-5}$	**Ala**	-1,1999	-1,1468	-1,1135	-1,0230	**-1,12**	**0,06**	**-0,05**	**-5,3**	**0,07**
	His	-3,4974	-3,9526	-3,4418	-3,0906	**-3,49**	**0,35**	**-0,10**	**-10,1**	**0,35**
$7{,}5\cdot10^{-5}$	**Ala**	-2,3619	-2,1672	-2,4526	-2,0558	**-2,26**	**0,18**	**-0,08**	**-8,0**	**0,18**
	His	-6,0138	-5,2057	-5,8754	-6,7349	**-5,96**	**0,63**	**-0,10**	**-10,5**	**0,61**

4.5. Određivanje β-alanina i L-histidina

U tablici 7. prikazani su rezultati određivanja β-alanina i L-histidina, pojedinačno, dok je u tablici 8. prikazan sadržaj spomenutih aminokiselina u smjesi.

Tablica 7. Rezultati pojedinačnog određivanja β-alanina i L-histidina.

β-ALANIN			L-HISTIDIN		
c [mgL^{-1}/M]	Nađeno [mgL^{-1}]	Iskorištenje [%]	c [mgL^{-1}/M]	Nađeno [mgL^{-1}]	Iskorištenje [%]
2,23/ $2,5 \times 10^{-5}$	**2,33**	**104,6**	**0,77/ $1,5 \times 10^{-5}$**	**0,76**	**99,4**
4,45/ 5×10^{-5}	**4,79**	**107,6**	**3,88/ $2,5 \times 10^{-5}$**	**4,27**	**109,9**
6,68/ $7,5 \times 10^{-5}$	**6,86**	**102,7**	**7,76/ 5×10^{-5}**	**7,33**	**94,5**

Točnost rezultata pojedinačnog određivanja β-alanina i L-histidina izraženih kao iskorištenje (*recovery*), testirana metodom poznatog dodatka, kreće se u rasponu od 102,7 – 107,6 %, tj. 94,5 – 109,9 %, respektivno.

Tablica 8. Rezultati određivanja β-alanina i L-histidina u smjesi.

β-ALANIN			L-HISTIDIN		
c [mgL^{-1}/M]	Nađeno [mgL^{-1}]	Iskorištenje [%]	c [mgL^{-1}/M]	Nađeno [mgL^{-1}]	Iskorištenje [%]
2,23/ $2,5 \times 10^{-5}$	**2,33**	**104,6**	**0,77/ $1,5 \times 10^{-5}$**	**0,76**	**99,4**
4,45/ 5×10^{-5}	**4,79**	**107,6**	**3,88/ $2,5 \times 10^{-5}$**	**4,27**	**109,9**
6,68/ $7,5 \times 10^{-5}$	**6,86**	**102,7**	**7,76/ 5×10^{-5}**	**7,33**	**94,5**

Točnost rezultata određivanja β-alanina i L-histidina u smjesi izraženih kao iskorištenje, također testirana metodom poznatog dodatka, kreće se u rasponu od 93,5 – 109,7 %, tj. 95,2 – 104,9 % respektivno.

5. Zaključak

U radu su, korištenjem elektroforeze na mikročipu, uspješno separirane aminokiseline β-alanin i L-histidin, pojedinačno i u smjesi. Spomenute su aminokiseline konstitutivne komponente komercijalno atraktivnog dipeptida karnozina, koji ispoljava snažna antioksidacijska i fiziološka svojstva.

Za separaciju je korišten mikročip od polimetil-metakrilata (PMMA). Za detekciju ispitivanih aminokiselina korišten je kapacitivno spregnuti, beskontaktni, konduktometrijski detektor (C^4D).

Ispitivan je utjecaj sljedećih parametara na efikasnost separacije: napon injektiranja, vrijeme injektiranja, napon separacije i vrijeme separacije. Sastav pomoćnog elektrolita/pufera detaljno je istraživan i optimiran u cilju povećanja osjetljivosti mjerenja i bolje separacije istraživanih aminokiselina i njihove smjese.

Iz podataka dobivenih mjerenjem izračunate su površine i visine pikova za svaku pojedinu koncentraciju. Primjenom linearne regresijske analize određeno je područje linearnog odziva za svaku pojedinačno istraživanu aminokiselinu, te smjesu navedene dvije aminokiseline. Donja granica detekcije istraživanih aminokiselina je niža od 1 mg/ml. Metoda poznatog dodatka korištena je za testiranje točnosti određivanja pojedinačnih aminokiselina, kao i njihovog sadržaja u smjesi.

6. Metodički dio

6.1. Priprema za izvođenje nastavnog sata

Škola: Gimnazija

Predmet: Kemija

Razred: 2.

Nastavna cjelina: Otopine i koloidni sustavi

Nastavna jedinica: Koloidni sustavi (blok sat)

Ciljevi i zadatci nastave:	**Oblici rada:**	**Sredstva i pomagala:**
• Aktivnim učenjem upoznati učenike i definirati što su koloidni sustavi. • Upoznati učenike o rasprostranjenosti koloida oko nas. • Upoznati učenike s karakterističnim svojstvima koloidnih sustava. • Definirati i objasniti Tydallov fenomen. • Objasniti i definirati učenicima elektrofrezu kao jednu od važnijih metoda razdvajanja koloida. • Izvođenjem demonstracijskog pokusa "Razdvajanje aminokiselina elektroforezom", učenici će ponoviti i utvrditi naučeno o elektroforezi. • Obratiti učenicima pažnju i na druge karakteristike koloida kao što su dijaliza i emulzije. • Poticanje na zajedničko učenje.	Frontalni oblik rada Individualni rad	Ploča, krede u boji, računalo, PowerPoint prezentacija, projektor, fosfatni pufer pH=6, ninhidrin sprej - reagens za aminokiseline, celogel-trake za elektroforezu, uzorak (asparaginska kiselina, lizin i histidin), aparatura za elektroforezu,rukavice, zaštitne naočale.

Ključni pojmovi: koloidni sustavi, disperzija, disperzni sustav, Tyndallov fenomen, elektroforeza, dijaliza, emulzija

Obrazovna postignuća:

- Učenici će znati definirati i objasniti koloidne sustave.
- Znati će usporediti i objasniti koja je razlika između disprezne tvari i dispreznog sredstva.
- Znati će prepoznati i definirati Tyndallov fenomen.
- Učenici će znati definirati i objasniti elektroforezu.
- Učenicima će biti prikazano, te će ih se izvjestiti, kroz pokus „Razdvajanje aminokiselina elektroforezom“ , kako i na koji način možemo razdvojiti aminokiseline.
- Učenici će nakon pokusa moći shvatiti kako se aminokiseline mogu razdvojiti elektroforezom.
- Učenici će primjeniti naučeno ponavljanjem kroz pitanja.

Struktura i tijek nastavnog sata	**Metoda rada**
Uvod (10 min) • Uz razgovor ponoviti prethodno naučeno o otopinama i njihovim svojstvima, naglasak na homogeno heterogeno svojstvo otopina.	Metoda razgovora Poticanje Pomaganje
Glavni dio (70 min) • Osim pravih otopina u svakodnevnom se životu često susreću i drugačije smjese dviju ili više tvari u kojima je jedna tvar raspršena u drugoj tvari. • Takvi se sustavi općenito nazivaju disperznim sustavima. Tvari koje ima u suvišku u kojoj je raspršena (dispergirana) druga tvar zove se	Frontalni rad Poticanje Pomaganje Metoda razgovora

disperzno sredstvo, a tvar što je raspršena čini disperznu fazu. • Svojstva disperznog sustava ovise o veličini čestica disperzne faze, iako granice između pojedinih vrsta nisu oštre. • Ako su čestice disperzne faze veće od 200 nm, disperzni se sustavi zovu suspenzije ili grubo disperzni sustavi. To su heterogene smjese. • U koloidnim sustavima veličina čestice disperzne faze je od 1 do 200 nm. • Svaka tvar ima svoja karakteristična svojstva pa tako i koloidi. • Jedan od najpoznatijih svojstava koloida je Tyndallov fenomen. Tyndallov fenomen je pojava raspšivanja svjetlosti na česticama kolodnih dimenzija, tu pojavu opažamo ako u zatamnjenu sobu kroz pukotinu ulazi zraka svjetlosti , u toj svjetlosnoj zraci se vide sitne svijetle točkice, koje lebde u zraku, upravo su to čestice koloidnih dimenzija. • Upravo na tome svojstvu da koloidne čestice imaju električni naboj na površini počiva primjena elektroforeze. • Elektroforeza je metoda separacije koloida, temeljena na putovanju koloidnih iona pod utjecajem električnog polja. • Brzina putovanja ovisi o veličini čestica, kiselosti tekućine u kojoj se gibaju, njihovom naboju i jakosti električnog polja; mogu se odvajati vrlo slični spojevi (pojedine vrste aminokiselina, prehrambenih boja, proteina, itd.) • Izvođenje demonstracijskog pokusa 1 „Razdvajanje aminokiselina elektroforezom“ • U uzorku su bile tri aminokiseline. Aminokiseline s ukupnim pozitivnim nabojem kretale su se prema negativnoj elektrodi, mi smo imali takve dvije aminokiseline točnije lizin i	Učenje otkrivanjem Frontalni rad Pomaganje Učenje otkrivanjem Poticanje Metoda razgovora Metoda razgovora Metode demonstracije

histidin. One s negativnim ukupnim nabojem će se kretati prema pozitivnoj elektrodi, mi smo imali takvu jednu točnije asparaginsku kiselinu. • Čišćenje sola od elektrolita koji zaostaju u disperznom sredstvu nakon pripreme koloidne otopine postiže se dijalizom. Metoda se temelji na pojavi da koloidne čestice nemogu prolaziti kroz polupropusnu membranu u vodu, a ioni mogu. • Emulzije su smjesa dviju nemješivih tekućina, nestabilna smjesa koja se brzo nakon mješanja ponovo razdvaja na svoje sastojke. Mlijeko je najpoznatija emulzija.	Poticanje pomaganje Frontalni rad Metoda razgovora
<u>Zaključni dio (10 min)</u> • Učenici će pomoću niza pitanja ponoviti obrađeno gradivo**.**	Ponavljanje Poticanje Individualno

Literatura za nastavnika:

D. Nöthing, M. Herak, *Opća kemija 2*, Udžbenik za II. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb 2006. 81-94.

M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2001.

A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Radna bilježnica za II. razred gimnazije*, Profil, Zagreb, 2007.

Literatura za učenike:

D. Nöthing, M. Herak, *Opća kemija 2*, Udžbenik za II. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb 2006. 81-94.

A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Radna bilježnica za II. razred gimnazije*, Profil, Zagreb, 2007.

6.2. Plan ploče

Koloidni sustavi

Koloidi: smjese dvaju ili više tvari u kojima je jedna tvar raspršena u drugoj tvari-disperzni sustav

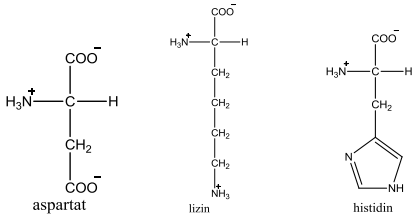
- **disperzna tvar**
- **disperzno sredstvo**
- **čestice 1-200 nm**

Tyndallov fenomen:
pojava raspršenja svjetlosti na česticama koloidnih dimenzija

Elektroforeza:

- metoda za separaciju koloida, temeljena na putovanju koloidnih iona pod utjecajem električnog polja
- brzina putovanja ovisi o veličini čestica, kiselosti tekućine u kojoj se gibaju, njihovom naboju i jakosti el. polja
- mogu se odvajati vrlo slični spojevi (pojedine vrste aminokiselina, prehrambenih boja, proteina....)

Pokus 1. *Razdvajanje aminokiselina elektroforezom*



Dijaliza:
- čišćenje sola od elektrolita koji zaostaju u disperznom sredstvu nakon pripreme koloidne otopine, postiže se dijalizom
- koloidne čestice nemogu prolaziti kroz polupropusnu membranu u vodi, no ioni mogu

Emulzije:
- smjesa dviju nemješivih tekućina
- nestabilna smjesa koja se brzo nakon miješanja ponovo razdvaja na svoje sastojke.

6.3. Pokus 1. Razdvajanje aminokiselina elektroforezom

Pokus 1. *Razdvajanje aminokiselina elektroforezom*



NINHIDRIN - štetan ako se proguta, nadražuje oči, dišni sustav i kožu; ako dođe u doticaj s kožom isprati sa sapunom i vodom,ako dođe u doticaj s očima ispirati s puno vode. Koristiti rukavice i zaštitne naočale!

Pribor i kemikalije:

Fosfatni pufer pH=6, ninhidrin sprej-reagens za aminokiseline,celogel-trake za elektroforezu, uzorak (asparaginska kiselina, lizin i histidin), aparatura za elektroforezu,rukavice i zaštitne naočale.

Postupak

Trake za elektroforezu oprezno izvaditi iz kupelji s puferom, filter-papirom ukloniti višak pufera te položiti traku na mostić za elektroforezu. Laganim pritiskom na bočne strane zalijepiti traku tako da stoji napeto i učvrstiti nosačima. Aplikatorom nanijeti uzorak na traku oko 1 cm od donjega ruba nosača. Postaviti mostić u kadicu s puferom tako da se elektroforeza usmjeri od katode prema anodi, te prilagoditi napon na 200 V. Nakon 30 minuta isključiti struju, izvaditi te poprskati s ninhidrinom i ostaviti da se osuši.



Slika 1. *Prikaz aparature za elektroforezu.*

Zaključak

U uzorku su bile tri aminokiseline. Aminokiseline s ukupnim pozitivnim nabojem kretale su se prema negativnoj elektrodi, mi smo imali takve dvije aminokiseline točnije lizin i histidin. One s negativnim ukupnim nabojem će se kretati prema pozitivnoj elektrodi, mi smo imali takvu jednu točnije asparaginsku kiselinu.

*učenici koji žele više znati i o drugim vrstama elektroforeze mogu saznati i naučiti više na dodatnim satima iz kemije

7. Literatura

[1] P.Karslon, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1993. godina.

[2] L.Strayer,Biokemija. Školska knjiga, Zagreb, 1991. godina.

[3] http://en.wikipedia.org/wiki/Alanine, 18.05.2012.

[4] http://www.nutricionizam.com/index.php?option=com_content&view=article&id=194:aminokiseline&catid=28:bjelanevine&Itemid=33, 18.05.2012.

[5] http://www.nikel.com.hr/karnozin-ps37, 15.6.2012.

[6] http://www.building-body.com/Karnozin.html, 15.06.2012.

[7] http://www.building-body.com/beta-alanin-i-anabolizam.html, 15.06.2012.

[8] http://edaq.com/C4D_intro.php, 22.6.2012.

[9] S. Trenkovski1, R. Cmiljanić, T. Smiljaković, G. Marinkov, Lj. Stojanović, *Biotechnology in Animal Husbandry* **22** (5-6) (2006), 33 – 43.

[10] M. Vlčková, Microchip electrophoresis bioanalytical applications, Doktorska dizertacija, Fakultet prirodoslovno-matematičkih znanost, Basel, 2008.

[11] M. Krsnik-Rasol, B. Balen, B. Maček, D. Pavoković, Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, skripta, Zagreb, 2005. godina.

[12] S. Trenkovski1, R. Cmiljanić, T. Smiljaković, G. Marinkov, Lj. Stojanović, *Biotechnology in Animal Husbandry* **17** (5-6) (2001), 179 – 185.

[13] X. Huang, M.J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem*. **60** (1988), 1837-1838.

[14] J.F.Ricelli, N. L.Carvalho, C.Lago, *JbrazChemSoc*,**14** (2003),265-268.

[15] C. S. Henry, Microchips capillary electophoresis, Humana Press, New Yersey, 2006.

[16] G. Žunić, *Vojnosanit Pregl*, **60** (6) (2003), 733-739

[17] J. Lichtenberg, N.F. de Rooij et. al., *Electrophoresis*, **23** (2002), 3769-3780.

[18] http://www.meta-lab.hr/elma.html, 22.6.2012.

[19] M. Vlčková, Microchip electrophoresis bioanalytical applications, Doktorska dizertacija, Fakultet prirodoslovno-matematičkih znanost, Basel, 2008.

[20] D. Nöthing, M. Herak, Opća kemija 2, Udžbenik za II. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2006. 81-94.

[21] M. Sikirica, Metodika nastave kemije, Školska knjiga, Zagreb, 2001.

[22] A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Radna bilježnica za II. razred gimnazije*, Profil, Zagreb, 2007.

[23] I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.

[24] D. Nöthing, M. Herak, *Opća kemija 2*, Udžbenik za II. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2006. 81-94.

[25] A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Radna bilježnica za II. razred gimnazije*, Profil, Zagreb, 2007.

[26] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Luedi, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* **64** (1992) 1926.