

Cho nên, glycin sẽ di chuyển chậm hơn clorid. Khuynh hướng dịch chuyển nhanh hơn của clorid khỏi glycinat làm giảm nồng độ nơi tiếp giáp, tạo nên sự giảm thể nhiều hơn ở lớp tiếp giáp, điều này làm cho glycinat bắt kịp ion clorid. Trong điều kiện này, lớp tiếp giáp rất hẹp được duy trì, và khi đó nó di chuyển qua lớp gel mẫu thử và lớp gel phân cách, các protein trong mẫu thử ở lớp tiếp giáp sắp xếp thành lớp rất mỏng theo thứ tự về linh độ. Quá trình này là nguồn gốc của việc các đĩa được phân tách.

Các protein được sắp xếp theo trình tự khi tiếp xúc với gel phân tách tỷ trọng cao, chúng sẽ di chuyển chậm lại do quá trình rây phân tử. pH cao hơn trong gel phân tách làm cho glycinat di chuyển nhanh hơn, đến mức độ làm cho lớp tiếp xúc của các đệm không liên tục sẽ vượt qua các protein và cuối cùng sẽ tiếp xúc với đáy của gel phân tách. Trong chu trình này, các đĩa protein tiếp tục phân tách bằng quá trình điện di và quá trình rây phân tử trong gel phân tách. Kết thúc quá trình tách, pH của gel phân tách sẽ tăng từ giá trị ban đầu là 8,9 lên khoảng pH 9,5.

Linh độ tương đối

Bromophenol xanh thường được sử dụng như là một chuẩn để tính toán linh độ tương đối của các dải phân tách và để quan sát các quá trình tách. Nó có thể được thêm vào trong hồ đệm mẫu hoặc trộn lẫn với mẫu, hoặc đơn giản được thêm vào dung dịch đệm ở buồng chứa đệm phía trên.

Linh độ tương đối M_B được tính toán như sau:

$$M_B = \frac{a}{b}$$

Trong đó:

a là khoảng cách từ mốc xuất phát đến vùng mẫu và b là khoảng cách từ mốc xuất phát đến vùng bromophenol xanh.

Quan sát các vùng phân tách

Do polyacrylamid trong suốt, nên các dải protein có thể được quan sát bằng đo mật độ quang với ánh sáng UV. Các vùng có thể cố định bằng cách nhúng vào các dung dịch làm tủa protein như acid phosphotungstic hoặc acid trichloroacetic 10 %. Các thuốc thử hiện màu được sử dụng bao gồm naphthalen đen (amido đen) và Coomassie lam sáng R250. Những vùng được cố định hay có màu có thể được quan sát một cách thuận lợi và được chụp ảnh với ánh sáng truyền qua từ nguồn phát tia X.

Những điều an toàn cần chú ý

Thế sử dụng trong điện di có thể gây sốc chết người. Nguy cơ này sẽ tăng do sử dụng dung dịch đệm nước và điều kiện môi trường làm việc ẩm ướt.

Bộ phận cung cấp nguồn của thiết bị cần được bao lại trong các lồng kim loại có dây nối đất hoặc cần được chế tạo bằng các vật liệu cách điện, các lồng kim loại này cần có chốt tự cắt nguồn khi mở nắp thiết bị.

Vì sự nguy hiểm của thế cao áp, nhân viên phòng thí nghiệm cần làm quen với thiết bị trước khi sử dụng chúng.

5.7 PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN

Điện di là hiện tượng di chuyển của tiểu phân tích điện hòa tan hay phân tán trong chất điện giải khi có dòng điện đi qua. Cation di chuyển về phía cực âm (cathod), anion di chuyển về phía cực dương (anod). Các phân tử không tích điện không bị hút về phía hai điện cực.

Trong phương pháp điện di mao quản (CE) việc sử dụng mao quản để làm kênh di chuyển cho phép thực hiện quá trình tách điện di trên một thiết bị có thể so sánh với thiết bị của sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tuy nhiên, vẫn còn những khác biệt rõ rệt về cách vận hành, những điểm thuận lợi và không thuận lợi so với sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quá trình vận hành của CE điển hình với mao quản mà mặt trong thành mao quản không có lớp bao và mao quản chứa dung dịch “đệm làm việc”, thì nhóm silanol hiện diện trên thành phía trong của mao quản thủy tinh sẽ giải phóng ion hydrogen vào dung dịch đệm và bề mặt thành mao quản sẽ tích điện âm ngay cả ở pH rất thấp. Cation hay các chất hòa tan tích điện dương một phần trong môi trường bị hút tĩnh điện vào thành mao quản tích điện âm tạo nên một lớp điện tích kép. Quá trình điện di bắt đầu bằng cách đặt thế trên chiều dài cột mao quản làm cho phần dung dịch của lớp điện tích kép di chuyển về phía đầu cathod của mao quản kéo theo khối dung dịch. Sự chuyển động của khối dung dịch dưới tác dụng của lực điện trường được gọi là dòng điện thẩm (electroosmotic flow - EOF). Mức độ ion hóa của nhóm silanol trên thành mao quản phụ thuộc chủ yếu vào pH của dung dịch đệm làm việc và các chất điều chỉnh được thêm vào chất điện giải. Ở pH thấp, nhóm silanol nói chung có độ ion hóa thấp và dòng EOF nhỏ. Ở pH cao hơn, nhóm silanol bị ion hóa nhiều hơn và dòng EOF tăng. Trong một số trường hợp, các dung môi hữu cơ như methanol hay acetonitril được cho thêm vào dung dịch đệm để làm tăng độ tan của các chất hòa tan và các chất phụ gia hay để ảnh hưởng đến mức độ ion hóa của mẫu. Nói chung, việc thêm các chất điều chỉnh hữu cơ sẽ làm giảm dòng EOF. Detector được đặt về phía đầu cathod của mao quản. Dòng EOF thường lớn hơn linh độ điện di. Do vậy, ngay cả anion cũng bị đẩy về phía cathod và detector. Khi sử dụng đệm phosphat pH 7,0 ở mao quản không có lớp bao, thông thường trình tự xuất hiện các chất tan trong điện di đồ là các cation, các chất trung tính và các anion.

Hiện nay, có 5 loại chủ yếu của điện di mao quản:

Điện di mao quản vùng (capillary zone electrophoresis - CZE) còn gọi là điện di dung dịch tự do hay điện di mao quản dòng tự do.

Sắc ký mixen điện động, còn gọi là sắc ký điện động mixen (micellar electrokinetic chromatography - MEKC).

Điện di mao quản gel (capillary gel electrophoresis - CGE). Điện di mao quản hội tụ đẳng điện (capillary isoelectric focusing - CIEF)

Điện di mao quản đẳng tốc (capillary isotachopheresis - CITP). Trong **điện di mao quản vùng**, quá trình tách được kiểm soát bằng sự khác nhau về linh độ tương đối của từng thành phần trong mẫu thử hoặc dung dịch thử. Linh độ là hàm số

của điện tích chất phân tích và kích thước trong điều kiện nhất định của phương pháp. Chúng được tối ưu hóa bằng cách kiểm soát các thành phần của đệm, pH và lực ion.

Trong **sắc ký mixen điện động**, các chất hoạt động bề mặt được thêm vào dung dịch đệm làm việc ở nồng độ lớn hơn nồng độ mixen tới hạn. Các chất phân tích có thể phân bố trong pha tĩnh giả do mixen tạo thành. Kỹ thuật này thường được ứng dụng để tách các chất trung tính và các ion.

Trong **điện di mao quản gel**, tương tự như lọc gel, sử dụng các mao quản chứa gel để tách các phân tử, dựa trên cơ sở sự khác nhau tương đối về khối lượng phân tử hay kích thước phân tử. Nó được dùng chủ yếu để tách các protein, peptid và các oligomer. Các gel có ưu điểm là làm giảm dòng EOF và đồng thời làm giảm một cách đáng kể sự hấp phụ protein trên thành phía trong của mao quản, do đó làm giảm đáng kể hiệu ứng bất đối của pic.

Trong **điện di mao quản hội tụ đẳng điện**, các chất được tách trên cơ sở sự khác nhau tương đối về điểm đẳng điện. Nó được thực hiện bằng cách biến đổi pH đệm để thu được các vùng mẫu thử ở trạng thái bền (pH thấp ở anod và pH cao ở cathod). Quá trình biến đổi được xác lập bằng cách đặt thể vào mao quản chứa hỗn hợp thành phần của các chất mang bao gồm các chất lưỡng cực có giá trị pI khác nhau.

Trong **điện di mao quản đẳng tốc** sử dụng hai đệm bao quanh các vùng chất phân tích. Cả anion và cation có thể tách thành những vùng rõ rệt. Ngoài ra, nồng độ chất phân tích như nhau trong mỗi vùng. Như vậy, chiều dài của mỗi vùng sẽ tỷ lệ thuận với lượng chất phân tích.

Hai kỹ thuật điện di mao quản thường được sử dụng nhiều nhất là điện di mao quản vùng và sắc ký mixen điện động. Chúng được đề cập một cách tóm tắt trong các phần sau.

Nguyên lý của điện di mao quản vùng

Điện di mao quản vùng sử dụng nguyên lý của điện di và điện thẩm để tách các tiểu phân tích điện.

Linh độ điện di của ion (μ_{EP}), được biểu diễn bằng phương trình:

$$\mu_{EP} = q/(6\pi\eta r)$$

Trong đó q là điện tích của ion, η là độ nhớt dung dịch và r là bán kính của ion hydrat hóa. Từ mối liên hệ này suy ra, chất phân tích kích thước nhỏ, điện tích lớn có linh độ lớn. Chất phân tích kích thước lớn, điện tích nhỏ có linh độ thấp.

Tốc độ di chuyển (v_{EP}), tính bằng cm/s, được biểu thị bằng phương trình:

$$v_{EP} = \mu_{EP}(V/L)$$

Trong đó μ_{EP} là linh độ điện di, V là điện thế đặt và L là chiều dài (cm) tổng cộng của mao quản.

Tốc độ của EOF (v_{EO}), tính bằng cm/s, được biểu diễn bằng phương trình:

$$v_{EO} = \mu_{EO}(V/L)$$

Trong đó μ_{EO} là linh độ của EOF (hệ số của dòng EOF) và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Thời gian (t), tính bằng giây, cần thiết cho chất tan di chuyển trên toàn bộ chiều dài hiệu dụng (l) của mao quản (từ đầu vào đến detector), t được biểu thị bằng hệ thức sau:

$$t = l \left[E(\mu_{EP} + \mu_{EO}) \right] = lL \left[V(\mu_{EP} + \mu_{EO}) \right]$$

Trong đó E là cường độ điện trường và các ký hiệu khác được định nghĩa như ở trên.

Hiệu lực của hệ thống điện di có thể liên quan đến linh độ, dòng EOF và được biểu thị bằng số đĩa lý thuyết (N), được tính bằng phương trình:

$$N = (\mu_{EP} + \mu_{EO})V/(2D)$$

Trong đó D là hệ số khuếch tán của chất hòa tan và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Độ phân giải (R) của hai chất hòa tan được rửa giải kế tiếp nhau, có thể xác định bằng phương trình:

$$R = 0,18(\mu_{EP1} - \mu_{EP2}) \left[V/D(\bar{\mu}_{EP} + \mu_{EO}) \right]^{1/2}$$

Trong đó: μ_{EP1} và μ_{EP2} là linh độ của hai chất hòa tan;

$\bar{\mu}_{EP}$ là linh độ trung bình của hai chất tan và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Nguyên lý của sắc ký mixen điện động

Trong MEKC, môi trường chất điện giải nền có chứa chất hoạt động bề mặt ở nồng độ cao hơn nồng độ mixen tới hạn (CMC). Trong môi trường nước, các chất hoạt động bề mặt tự ngưng kết và hình thành mixen gồm nhóm có đầu thân nước tạo nên một lớp áo bên ngoài và nhóm có đuôi không thân nước tạo nhân không phân cực ở bên trong mixen để cho các chất tan có thể phân bố. Nói chung, các mixen có những anion trên bề mặt ngoài, dưới tác dụng của điện thế áp đặt chúng di chuyển theo hướng ngược lại so với dòng EOF. Kiểu phân bố này tương tự với phân bố trong chiết xuất với dung môi hay trong sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo. Sự phân bố khác nhau của các phân tử trung tính vào pha động nước và pha "tĩnh giả" mixen là cơ sở duy nhất cho quá trình tách. Dung dịch đệm và các mixen tạo thành hệ thống hai pha, chất tan có thể phân bố giữa hai pha này.

Hệ thống mixen thích hợp cho MEKC phải đáp ứng các tiêu chuẩn sau: Chất hoạt động bề mặt tan tốt trong đệm và dung dịch mixen đồng nhất và trong suốt đối với detector UV. Chất hoạt động bề mặt phổ biến nhất cho MEKC là natri dodecyl sulfat (chất hoạt động bề mặt anion). Những chất hoạt động khác bao gồm cetyltrimethylamoni bromid (chất hoạt động bề mặt cation) và các muối mật (chất hoạt động bề mặt chiral). Độ chọn lọc của hệ thống MEKC chủ yếu tùy thuộc vào bản chất của chất hoạt động bề mặt. Dung môi hữu cơ thường thêm vào trong đệm MEKC để điều chỉnh hệ số dung lượng, tương tự như trong tách bằng sắc ký lỏng pha đảo. MEKC có thể sử dụng để tách các đồng phân đối quang. Để tách các đồng phân, trong dung dịch đệm được thêm vào các chất phụ gia chiral hoặc chất hoạt động bề mặt chiral như muối mật.

Kiến thức chung về sắc ký cột cổ điển sẽ hỗ trợ cho sự hiểu biết nguyên lý MEKC. Tuy vậy, trong MEKC, các mixen không thuần túy là pha tĩnh. Bởi vậy, lý thuyết sắc ký cột cần thiết phải được điều chỉnh. Sự điều chỉnh cơ bản đối với nguyên lý của MEKC là bản chất xác định của cửa sổ tách đối với các phân tử trung tính.

Thời gian lưu (t_R) đối với các chất trung tính được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$t_R = (1 + k')t_0/[1 + (t_0/t_{MC})]$$

Trong đó, t_0 là thời gian yêu cầu đối với chất không lưu giữ đi qua chiều dài hiệu dụng của cột mao quản, t_{MC} là thời gian cần để mixen đi qua mao quản, k' là hệ số dung lượng và t_R luôn luôn ở giữa giá trị t_0 và t_{MC} .

Hệ số dung lượng (k') đối với các chất trung tính được tính theo phương trình:

$$k' = (t_R/t_0 - 1)/(1 - t_R/t_{MC})$$

Trong đó các ký hiệu được định nghĩa như trên.

Để áp dụng cho mục đích thực tiễn, k' được tính bằng phương trình:

$$k' = t_R/t_0 - 1$$

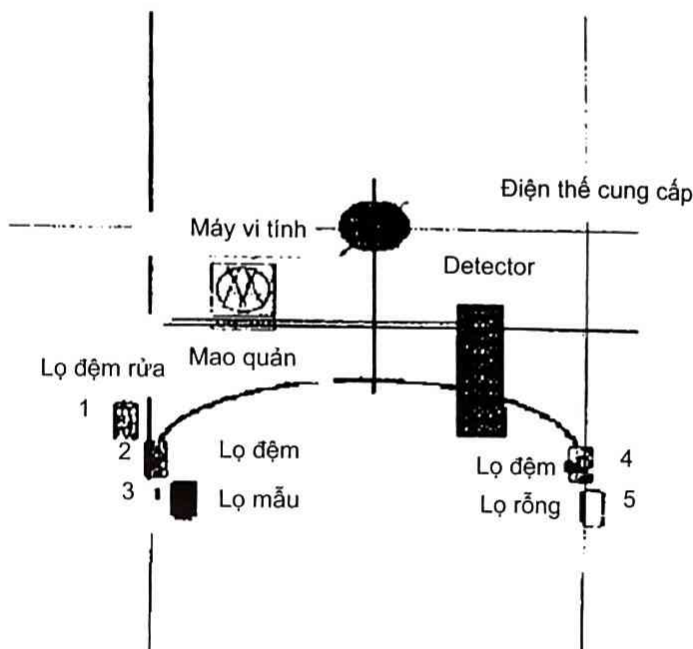
Trong đó t_R là thời gian được đo từ thời điểm đặt thế (hoặc điểm bắt đầu tiêm mẫu) đến thời điểm ứng với đỉnh pic tối đa, t_0 được đo từ điểm đặt thế (hoặc điểm bắt đầu tiêm mẫu) đến điểm biên phía trước của pic dung môi hay đến tín hiệu của chất không lưu giữ. k' trong MEKC có ý nghĩa nhất định và là đặc trưng của một chất tan nhất định trong hệ MEKC. Những bàn luận khác của k' được trình bày trong phần tính phù hợp hệ thống trong mục các thông số làm việc.

Độ phân giải (R_s) đối với các chất trung tính được tính bằng phương trình:

$$R_s = \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right] \left[\frac{(\alpha - 1)/\alpha}{k'_2/(1 + k'_2)} \right] \left[\frac{(1 - (t_0/t_{MC}))}{(1 + (t_0/t_{MC})k'_1)} \right]$$

Trong đó α là độ chọn lọc, bằng tỷ số của k'_2 đối với k'_1 trong điều kiện cụ thể cho việc tách hai chất tan. Nếu hai chất tan rửa giải gần nhau ($\alpha \leq 1,1$), có thể dùng một trong hai trị giá k' . Phương trình chứng tỏ rằng, cũng như với sắc ký kinh điển, độ phân giải trong MEKC có thể được cải thiện qua việc kiểm soát hiệu lực của hệ thống, độ chọn lọc, sự lưu giữ và bản chất hóa học của các chất hoạt động bề mặt. Hạng từ cuối cùng của phương trình chính là khoảng rửa giải giới hạn. Mặc dầu MEKC đặc biệt hữu hiệu trong tách các chất trung tính, kỹ thuật này cũng có thể được áp dụng cho việc tách các chất tan tích điện. Quy trình sau đây liên quan đến sự phối hợp cơ chế tách giữa sắc ký và điện di. Tương tác giữa chất tan tích điện và mixen có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự tách. Cặp ion có thể hình thành nếu như điện tích trên chất hoạt động bề mặt và chất tan là trái dấu nhau. Trong trường hợp ngược lại, chất hoạt động bề mặt và chất tan đẩy nhau. Sự khác biệt này có thể ảnh hưởng có ý nghĩa đến sự tách của các phân tử tích điện.

Các điều chú ý đối với thiết bị



Hình 5.7 - Cấu hình thiết bị CE điển hình

Hệ thống CE điển hình (Hình 5.7) bao gồm một mao quản bằng silica nung chảy có đường kính trong từ 50 μm đến 100 μm và chiều dài từ 20 cm đến 100 cm. Các đầu mao quản được nhúng vào các bình điện giải riêng biệt. Nguồn cung cấp điện một chiều có khả năng tạo điện áp cao từ 0 kV đến 30 kV. Thêm vào đó một detector, bộ phận tiêm mẫu tự động và thiết bị ghi dữ liệu là đủ một hệ thiết bị CE. Hệ thống cung cấp dung dịch đệm tự động và hệ thống kiểm soát bằng máy vi tính, ghi nhận dữ liệu hay kiểm soát nhiệt độ cho cả mao quản và bộ phận tiêm mẫu tự động có thể thấy ở các thiết bị có mặt trên thị trường.

Những điều cần quan tâm đầu tiên đối với thiết bị là kiểu mao quản, cấu hình, cách tiêm mẫu, nguồn cung cấp điện và kiểu detector.

Các loại mao quản và cấu hình thiết bị

Mao quản dùng trong CZE thường được làm bằng silica nung chảy và không có lớp bao mặt trong mao quản. Một vài thiết bị có cấu hình với cột mao quản để tự do, nghĩa là mao quản không đưa vào bên trong hộp chứa. Trong hầu hết các thiết bị trên thị trường, mao quản được đặt vào trong một hộp chứa. Cả hai cấu hình đều có những ưu và nhược điểm riêng. Điều quan trọng là khả năng của thiết bị có thể tương thích được các loại mao quản khác nhau với chiều dài và đường kính mao quản khác nhau. Mao quản với chất bao mặt trong khác nhau hiện nay cũng có mặt trên thị trường. Bởi vậy, khả năng tương thích với các loại cột khác nhau rất quan trọng. Các chất bao mặt trong mao quản có thể được sử dụng để thay đổi cường độ hay hướng của dòng EOF hay làm giảm sự hấp phụ của mẫu. Nếu sử dụng mao quản có chất bao mặt trong, phải có ghi các chi tiết về chất bao và nhà cung cấp trong phương pháp. Mao quản từ nhà cung cấp khác cũng có thể được sử dụng nếu chúng thích hợp.

Kỹ thuật đưa mẫu và tiêm mẫu

Cách đưa mẫu vào trong mao quản bao gồm tiêm kiểu di chuyển điện (kiểu điện động) và tiêm áp suất âm và tiêm áp suất dương (kiểu thủy tĩnh).

Để tiêm kiểu di chuyển điện, dung dịch mẫu được đưa vào mao quản bằng cách nhúng mao quản và điện cực vào trong lọ mẫu và đặt lên đó một điện thế cao trong thời gian ngắn. Mẫu đi vào mao quản bằng sự phối hợp của điện di và dòng EOF. Bởi vậy, các chất phân tích có linh độ khác nhau đi vào trong mao quản ở mức độ khác nhau. Độ dẫn của mẫu thử và chất chuẩn cũng ảnh hưởng đến dòng EOF và thể tích tiêm.

Tiêm áp suất âm là đặt áp suất âm ở đầu mao quản có detector và hút dung dịch mẫu vào đầu tiêm của mao quản. Tiêm áp suất dương là tạo áp suất lên lọ chứa mẫu, đẩy mẫu vào trong mao quản. Tiêm áp suất có thể đưa tất cả các thành phần của mẫu vào trong mao quản ở cùng một mức độ, nói chung là cho độ tái lập tốt nhất và là cách tiêm thường được áp dụng nhất. Thể tích mẫu phụ thuộc vào chiều dài và đường kính trong của mao quản và điện thế hay áp suất áp đặt. Thể tích mẫu đặc trưng được tiêm vào trong mao quản khoảng từ 1 nl đến 20 nl.

Mỗi một phương pháp tiêm mẫu có những ưu và nhược điểm riêng, tùy thuộc vào thành phần của mẫu, kiểu tách và áp dụng phương pháp. Không có kiểu tiêm mẫu nào nói trên có độ tái lập như bộ tiêm mẫu của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao hiện đang có mặt trên thị trường. Tùy theo hoàn cảnh cụ thể, cần thiết phải sử dụng chất chuẩn nội cho các phương pháp cụ thể khi cần sự tiêm mẫu chính xác.

Cung cấp nguồn điện

Hầu hết các thiết bị CE có mặt trên thị trường có nguồn điện một chiều, nó có khả năng tạo nguồn điện thay đổi từ từ hay từng nấc đảm bảo duy trì được điện thế mong muốn một cách ổn định. Điều này sẽ đảm bảo có được đường nền tương đối phẳng.

Một đặc điểm thiết yếu khác của nguồn điện là khả năng sử dụng nguồn này để đưa mẫu vào đầu cathod hay anod của mao quản. Bởi vì trên thực tế không thể thay đổi vị trí detector từ đầu này đến đầu kia của thiết bị, mà chỉ có thể ấn định đầu tiêm mẫu ở phía cathod hay anod.

Các kiểu detector

Nói chung hệ thống CE thường ghép với các detector UV-VIS và detector huỳnh quang cảm ứng laser. Detector quét phổ UV hay detector dây diod có thể thấy ở nhiều thiết bị CE hiện có mặt trên thị trường.

Sự ghép nối CE với phổ khối cho phép thu được thông tin về cấu trúc kết hợp các dữ liệu điện di.

Phát hiện bằng detector huỳnh quang sẽ làm tăng độ nhạy phát hiện đối với mẫu chứa một lượng rất nhỏ chất cần phân tích có khả năng hấp thụ UV. Việc ghép một nhóm huỳnh quang với những chất không hấp thụ UV có thể là có ích. Các chất không hấp thụ UV hoặc không phát quang

có thể được phát hiện bằng cách thêm trực tiếp vào dung dịch đệm các chất mang màu hay chất có huỳnh quang: Các chất không hấp thụ được phát hiện nhờ sự mất tín hiệu so với chất nền hấp thụ hay huỳnh quang. Detector đo độ dẫn và đo amper có thể được sử dụng, nhưng nói chung chúng không thông dụng ở các thiết bị có mặt trên thị trường.

Những điểm cần chú ý khi phân tích mẫu

Một vài thông số như kích thước mao quản, điện thế, lực ion và pH được tối ưu hóa để đạt độ phân giải và sự tách phù hợp. Cần tránh sự thay đổi nhiệt độ vì sẽ ảnh hưởng đến độ nhớt của dung dịch đệm và ảnh hưởng cả đến dòng EOF và linh độ của chất tan.

Kích thước mao quản

Những thay đổi về đường kính và chiều dài mao quản có thể ảnh hưởng đến độ phân giải điện di. Chiều dài mao quản tăng sẽ kéo dài thời gian di chuyển, thông thường sẽ tăng độ phân giải và làm giảm dòng điện. Đường kính mao quản tăng thường làm tăng dòng điện và tạo ra gradient nhiệt độ bên trong cột, dẫn đến làm giảm độ phân giải. Ngược lại, giảm đường kính trong của mao quản sẽ làm giảm sinh nhiệt và cho độ phân giải tốt hơn. Tuy nhiên, ở mao quản có đường kính lớn hơn sẽ có thuận lợi là tiêm được lượng mẫu nhiều hơn và cải thiện được tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu.

Ảnh hưởng điện thế

Khi đặt một điện thế cao hơn, xảy ra sự tăng sinh nhiệt của dung dịch đệm làm việc bên trong mao quản vì có dòng điện đi qua dung dịch đệm. Hiệu ứng nhiệt này còn gọi là nhiệt Jun cần phải được kiểm soát vì trở kháng, hằng số điện môi và độ nhớt phụ thuộc vào nhiệt độ và làm thay đổi tốc độ dòng EOF và linh độ của chất tan.

Nói chung, sự tăng điện thế sẽ làm tăng hiệu lực tách và độ phân giải đến điểm mà nhiệt Jun không phát tán được. Độ phân giải tối đa có thể đạt được bằng cách duy trì điện thế ở dưới mức xảy ra sự phát nhiệt Jun và sự khuếch tán trở thành yếu tố giới hạn.

Ảnh hưởng của lực ion

Kiểm soát lực ion cho phép điều chỉnh độ phân giải, hiệu lực tách và độ nhạy. Tăng lực ion nói chung sẽ cải thiện độ phân giải, hiệu lực tách và hình dạng pic. Độ nhạy có thể được cải thiện do có sự tụ hợp tốt hơn. Tuy nhiên, bởi vì dòng điện sinh ra tỷ lệ thuận với nồng độ đệm, nhiệt sinh ra nhiều hơn khi lực ion của đệm tăng, do đó cần hạn chế tăng lực ion.

Ảnh hưởng của pH

Độ phân giải, độ nhạy và hình dạng pic có thể thay đổi một cách rõ rệt khi có sự thay đổi pH vì thông số này ảnh hưởng đến mức ion hóa của chất tan và dòng EOF. Dòng EOF cao ở pH cao và thấp ở pH thấp đối với cột mao quản bằng silica nung chảy không có lớp bao mặt trong.

Các thông số vận hành

Các bước cơ bản trong quá trình vận hành hệ thống CE là thiết lập hệ thống, quy trình rửa cột mao quản, chuẩn bị mẫu, thử tính phù hợp hệ thống, phân tích mẫu, xử lý dữ liệu và tắt hệ thống.

Thiết lập hệ thống

Cần quan tâm đến khả năng tách, độ phân giải, lực ion của dung dịch đệm và ảnh hưởng pH để chọn cột có kích thước và lớp bao bề mặt cho phù hợp. Điều chế dung dịch đệm có thành phần, lực ion và pH thích hợp, loại khí nếu cần thiết và lọc qua lọc thích hợp.

Tất cả dung môi, bao gồm cả nước cần dùng loại tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng hay CE.

Quy trình rửa mao quản

Sự ổn định về thời gian di chuyển và độ phân giải có thể thu được nếu tuân theo quy trình rửa cột mao quản nhất định. Quy trình rửa và cân bằng mao quản phải phù hợp với các chất phân tích, các nền mẫu (matrix) và phương pháp phân tích. Bởi vậy, những quy trình này được xây dựng như là một phần của phương pháp và được quy định trong từng chuyên luận riêng. Rửa cột có thể dùng *dung dịch acid phosphoric 0,1 M*, nước và *dung dịch natri hydroxyd 0,1 M*. Trước khi bắt đầu quá trình phân tích mẫu, cột mao quản có thể được rửa với năm lần thể tích cột bằng dung dịch đệm làm việc dùng cho quá trình phân tích. Khi thay đổi thành phần đệm, nên rửa cột mao quản với năm lần thể tích cột bằng dung dịch đệm làm việc mới để làm sạch đệm của lần phân tích trước. Khi sử dụng cột mao quản mới bằng silica nung chảy không có lớp bao, thông thường yêu cầu phải hoạt hóa các nhóm silanol trên bề mặt mao quản. Quá trình này bao gồm việc tráng rửa kỹ với *dung dịch natri hydroxyd*. Đối với các loại mao quản có lớp bao bên trong, quy trình rửa cột cần theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vì rửa cột không đúng cách có thể làm phá hủy lớp bao bên trong cột. Cột có thể được chỉ định chuyên dùng cho những loại đệm hay cho những phương pháp phân tích cụ thể để đề phòng nhiễm chéo.

Tiến hành phân tích mẫu

Để có được độ phân giải, độ nhạy và sự tách tốt với pic có hình dạng đẹp cần phải lựa chọn cột mao quản, chất điện giải và quy trình tiêm mẫu phù hợp. Khi cần thì sử dụng nội chuẩn để có được độ chính xác khi tiêm mẫu. Khi lựa chọn nội chuẩn cần quan tâm đến khả năng tách khỏi chất cần phân tích. Sự hoàn hảo của hệ thống có thể được cải thiện bằng cách rửa mao quản giữa các lần tiêm và cung cấp đệm mới cho hai lọ đệm dùng áp đặt thể trong quá trình tách (lọ 2 và 4 trong Hình 5.7). Có thể tiêm lặp lại từ cùng lọ mẫu thử miễn là tránh được sự nhiễm chéo. Nếu có sự nhiễm chéo xảy ra, nên rửa đầu mao quản nơi tiêm mẫu bằng cách nhúng nhanh nó vào trong một lọ có chứa đệm trước khi nhúng vào trong lọ chứa mẫu hay lọ chứa chất điện giải.

Các thông số vận hành được quy định cụ thể trong từng chuyên luận nhằm làm giảm ảnh hưởng của điện thế, lực ion và pH. Thiết bị được lắp đặt để phân tích mẫu với cột mao quản và điều kiện tiêm mẫu phù hợp nằm trong khoảng tuyến tính động học của detector. Sự chính xác về độ di chuyển có thể đạt được bằng cách chọn chất pha loãng mẫu, chất điện giải và điều kiện xử lý cột mao quản phù hợp. Khi tiến hành phân tích chú ý tránh hiện tượng đưa lượng mẫu quá tải vào cột vì điều này sẽ làm giảm hiệu lực và độ tái lập.

Tính phù hợp của hệ thống

Các thông số được đo đặc có thể bao gồm độ lặp của bộ phận tiêm mẫu, độ chọn lọc và hiệu lực của hệ thống, và sự đối xứng của pic. Độ phân giải giữa các chất phân tích và các chất khác có thể được xác định bằng cách sử dụng các chất chuẩn hỗn hợp.

Các thông số tiêu biểu dùng để xác định tính phù hợp hệ thống bao gồm độ lệch chuẩn tương đối (RSD), hệ số dung lượng (k'), số đĩa lý thuyết (N), độ nhạy (giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng), số đĩa lý thuyết tính trên 1 mét (n), hệ số đối xứng (T) và độ phân giải (R).

Hình dạng pic được kiểm tra chặt chẽ, pic lý tưởng phải đối xứng, không có vai và không kéo đuôi. Nếu những điều kiện này không đạt, cần phải tiến hành điều chỉnh trước khi tiến hành phân tích. Việc tích phân pic cũng phải được kiểm tra chặt chẽ để đảm bảo tín hiệu đáp ứng của pic được định lượng chính xác.

Tiêm lặp lại dung dịch chuẩn với nồng độ biết trước để xác định độ tái lập của hệ thống CE. Dữ liệu tiêm lặp lại từ 5 lần hoặc nhiều hơn được sử dụng để tính toán RSD. Trừ khi có quy định trong chuyên luận riêng, độ lệch chuẩn tương đối cho sự tiêm lặp lại không được quá 3,0 %. Giá trị của độ chính xác nhỏ nhất có thể được quy định riêng trong phương pháp CE, đặc biệt khi xác định các thành phần dạng vết. Việc tính toán các thông số điện di trong MEKC, cũng như các phương pháp khác của CE có thể cần đến sự kết hợp các mối quan hệ giữa sắc ký và điện di. Vì vậy, hệ số dung lượng (k') cho sự di chuyển của chất trung tính trong MEKC có thể tính bằng phương trình:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \times \left(1 - \frac{t_R}{t_{MC}}\right)}$$

Trong đó t_R , t_0 , và t_{MC} lần lượt là thời gian di chuyển của chất cần phân tích, của dung dịch (EOF) và của mixen. Số đĩa lý thuyết (N), là thước đo hiệu lực của hệ thống và được tính bằng phương trình:

$$N = 16(t_R/W)^2 \text{ hay } N = 5,54(t_R/W_{1/2})^2$$

Trong đó W là độ rộng pic của chất cần phân tích đo được ở đường nền, $W_{1/2}$ là độ rộng pic của chất cần phân tích đo được ở phân nửa chiều cao của pic và t_R là thời gian di chuyển của chất phân tích.

Số đĩa lý thuyết tính trên mét (n) là thước đo hiệu lực của cột mao quản được xem như là hàm số về độ rộng pic ở đường nền và có thể tính toán bằng công thức:

$$n = 1600(t_R/W)^2/L$$

Trong đó L tính bằng cm là chiều dài tổng cộng của mao quản, các ký hiệu khác được định nghĩa như trên. Hệ số đối xứng pic (T) của chất cần phân tích là thước đo sự đối xứng của pic, nó thể hiện độ lệch của pic so với pic đối xứng lý tưởng. Hệ số này được tính bằng phương trình:

$$T = W_{0,05}/2f$$

Trong đó $W_{0,05}$ là chiều rộng pic đo ở 5 % chiều cao của pic tính từ đường nền, f là chiều rộng nửa bên trái của pic đo ở 5 % chiều cao pic tính từ đường nền. Hệ số 1,0 chỉ rằng pic là đối xứng. Nếu các hiệu ứng phân tán điện di xảy ra, thì chúng có thể tạo ra pic không đối xứng. Điều này có thể xảy ra khi dùng nồng độ mẫu thử cao như trong phân tích tạp chất. Trường hợp pic bất đối xứng cũng có thể chấp nhận được miễn là đạt được độ lặp và chúng không ảnh hưởng đến độ chọn lọc về tách.

Hệ số phân giải (R) đo khả năng của hệ thống CE tách các chất cần phân tích di chuyển kế tiếp nhau. Độ phân giải được xác định cho tất cả các chất cần phân tích, với pH của đệm được điều chỉnh nếu cần thiết để đáp ứng các yêu cầu về tính phù hợp hệ thống. Nó có thể được tính bằng phương trình:

$$R = 2(t_2 - t_1)/(W_1 + W_2)$$

Trong đó t_2 và t_1 lần lượt là thời gian di chuyển (đo được ở cực đại của pic) của pic đi sau và pic trước. W_2 và W_1 lần lượt là chiều rộng của hai pic đo được ở đường nền.

Phân tích mẫu

Sau khi xác định tính phù hợp hệ thống, có thể tiêm dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn có thể tiêm trước hay sau mẫu thử và tiêm xen kẽ trong suốt quá trình phân tích.

Xử lý dữ liệu

Diện tích pic được chuẩn hóa theo thời gian thường được sử dụng trong định lượng. Các dữ liệu được xác định bằng cách chia diện tích pic đã tích phân được cho thời gian di chuyển của chất phân tích. Điều này làm giảm sai số do trong CE, không giống như trong sắc ký lỏng, mỗi chất cần phân tích di chuyển qua detector với một tốc độ khác nhau. Trừ khi sự chuẩn hóa này được thực hiện, những chất di chuyển chậm hơn sẽ có diện tích lớn bất thường so với diện tích của những thành phần di chuyển nhanh.

Tắt hệ thống

Sau khi phân tích, cột mao quản được rửa theo sự hướng dẫn được quy định riêng trong từng chuyên luận hay theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Ví dụ: Cột mao quản có thể được rửa bằng nước cất để loại các thành phần đệm và sau

đó được nạp không khí hoặc khí nitrogen lấy từ lọ rỗng. Thông thường, lọ đích và lọ nguồn (lọ 4 và lọ 2 trong Hình 5.7) là các lọ được bỏ dung dịch đệm đi và được tráng kỹ bằng nước khử khoáng.