

Triển khai sắc ký: Đặt bản mỏng vào bình triển khai. Chú ý lượng dung môi dùng sao cho để các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi. Đậy kín bình và để triển khai ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C và tránh ánh sáng mặt trời. Nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 3/4 bản mỏng, lấy bản mỏng ra khỏi bình, đánh dấu mức dung môi, làm bay hơi dung môi còn đọng lại trên bản mỏng rồi hiện vết theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Quan sát các vết xuất hiện, tính giá trị R_f hoặc R_r và tiến hành định tính, phát hiện tạp chất hoặc định lượng như quy định trong chuyên luận riêng.

CHÚ Ý:

Khi phân tích bằng sắc ký lớp mỏng luôn phải chấm chất đối chiếu bên cạnh vết chất thử với lượng tương tự như dự đoán có trong vết chất thử để so sánh kết quả về màu sắc, kích thước và giá trị R_f hoặc R_r trong cùng điều kiện.

Hiệu năng của bản mỏng được kiểm tra như sau: Chấm một thể tích thích hợp (10 μ l) cho lớp mỏng thông thường và 1 μ l đến 2 μ l cho loại bản mỏng có kích thước hạt mịn dung dịch thử hiệu năng lớp mỏng gồm lục bromocresol, da cam methyl, đỏ methyl và sudan G đỏ (thuốc thử). Tiến hành sắc ký với hệ dung môi *methanol - toluen* (20 : 80). Kết quả trên sắc ký đồ phải có 4 vết tách rõ ràng có R_f như sau: Lục bromocresol: < 0,15; da cam methyl: 0,1 đến 0,25, đỏ methyl: 0,35 đến 0,55 và sudan G đỏ: 0,75 đến 0,98.

5.5 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

Sắc ký rây phân tử là phương pháp chia tách các phân tử trong dung dịch dựa trên kích thước của chúng. Trong trường hợp pha động là một dung môi hữu cơ, kỹ thuật được gọi là sắc ký thẩm qua gel, còn trường hợp pha động là nước thì kỹ thuật được gọi là sắc ký lọc trên gel. Mẫu được đưa vào cột chứa đầy gel hoặc một loại vật liệu xốp, và được pha động dẫn chạy qua cột. Sự chia tách theo kích thước được thực hiện nhờ sự trao đổi lặp đi lặp lại các phân tử chất tan giữa dung môi pha động và cùng dung môi đó được pha tĩnh giữ ở trong các lỗ xốp của gel. Khoảng kích thước lỗ của vật liệu nhồi trong cột sẽ xác định khoảng kích thước phân tử được chia tách qua quá trình sắc ký.

Những phân tử có kích thước đủ nhỏ để có thể đi vào trong tất cả khoảng không gian của lỗ xốp được rửa giải trong thể tích thẩm tổng V_r . Các phân tử có kích thước lớn hơn kích thước lỗ xốp lớn nhất chỉ di chuyển được dọc theo cột qua các khoảng trống giữa các hạt vật liệu nhồi mà không bị giữ lại, được rửa giải trong thể tích loại trừ V_o (thể tích trống). Sự chia tách theo kích thước phân tử xảy ra giữa thể tích trống và tổng thể tích thẩm, chia tách hiệu quả thường được thực hiện ở hai phần ba đầu tiên của khoảng này.

Thiết bị

Thiết bị bao gồm một cột sắc ký có kích thước phù hợp, nếu cần thiết phải khống chế nhiệt độ, được nhồi đầy vật liệu chia tách có thể phân loại theo các khoảng kích thước

phân tử phù hợp. Kích thước của cột (chiều cao $\times$ đường kính trong) được quy định ở chuyên luận riêng. Pha động chạy qua cột ở tốc độ không đổi dưới tác dụng của trọng lực hoặc nhờ một bơm. Một đầu của cột được nối với một thiết bị phù hợp để cấp mẫu theo kiểu bộ phận điều chỉnh lưu lượng dòng, một bơm tiêm đi qua vách hoặc một van tiêm và có thể được nối với một bơm điều khiển lưu lượng dòng dung dịch rửa giải. Một cách khác là mẫu có thể được tiêm vào trực tiếp trên bề mặt lớp gel hoặc dưới dung dịch rửa giải nếu như mẫu có tỷ trọng lớn hơn dung dịch rửa giải.

Đường ra của cột được nối với một detector có gắn với một máy ghi tự động để theo dõi nồng độ tương đối của các thành phần trong mẫu. Detector thường được thiết kế dựa trên các tính chất hấp thụ quang, khúc xạ ánh sáng hay phát quang. Bộ phận thu hứng phản đoạn tự động có thể được lắp trong trường hợp cần thiết. Vật liệu trong cột có thể là một chất mang mềm như gel nở hay một chất mang cứng cấu tạo từ thủy tinh, silic hoặc một hợp chất cao phân tử liên kết chéo tương thích dung môi. Chất mang cứng thường đòi hỏi hệ thống điều áp để tăng tốc độ phân tách. Pha động thường được chọn theo loại mẫu, môi trường phân tách và phương pháp phát hiện.

Vật liệu nhồi cần được xử lý và được nạp vào cột như mô tả trong chuyên luận hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hiệu năng

Hệ thống sắc ký phải thỏa mãn quy định về tính phù hợp của hệ thống được mô tả trong phần Các kỹ thuật tách sắc ký (Phụ lục 5). Việc điều chỉnh các thông số của hệ sắc ký có thể được thực hiện nhằm đáp ứng các yêu cầu về sự phù hợp của hệ thống cũng được trình bày trong phụ lục này.

Xác định tỷ lệ thành phần tương đối

Tiến hành phương pháp theo các điều kiện ghi trong chuyên luận riêng. Nếu có thể, theo dõi quá trình rửa giải một cách liên tục và ghi lại diện tích của các pic tương ứng. Nếu mẫu được xác định dựa vào tính chất hóa lý mà tất cả các thành phần của mẫu đều cho một đáp ứng tương đương (ví dụ cùng có một hệ số hấp thụ riêng), thì lượng tương đối của mỗi thành phần có thể được xác định bằng cách tính tỷ lệ diện tích mỗi pic thu được trên tổng diện tích pic của những thành phần quan tâm. Nếu sự đáp ứng khác nhau, tính tỷ lệ thành phần tương đối bằng cách dựa vào đường chuẩn của các dung dịch chuẩn được ghi trong chuyên luận riêng hoặc bằng phương pháp khác được ghi trong chuyên luận riêng.

Xác định khối lượng phân tử

Thực hiện phương pháp với dung dịch thử và các dung dịch chuẩn theo quy trình ghi trong chuyên luận riêng. Xây dựng một đồ thị biểu thị sự phụ thuộc giữa thể tích lưu của các chất chuẩn dùng cho hiệu chuẩn và hàm logarit của khối lượng phân tử của chúng. Đường chuẩn thường xấp xỉ với một đường thẳng nằm giữa giới hạn loại trừ và giới hạn thẩm tổng thể. Khối lượng phân tử của thành phần

quan tâm có thể được ước lượng từ đường chuẩn. Việc xây dựng đường chuẩn chỉ có giá trị đối với một hệ cụ thể trong những điều kiện thí nghiệm xác định.

Sự phân bố polymer theo kích thước phân tử

Sắc ký rây phân tử có thể được sử dụng để xác định sự phân bố các polymer theo kích thước phân tử. Tuy nhiên, việc so sánh mẫu sẽ chỉ có ý nghĩa nếu kết quả thu được là cùng một điều kiện thí nghiệm. Nguyên liệu sử dụng để xây dựng đường chuẩn và phương pháp xác định sự phân bố dựa theo kích thước phân tử của các polymer được ghi trong chuyên luận riêng.

Phân bố khối lượng phân tử trong dextran

Kiểm tra bằng phương pháp sắc ký rây phân tử.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,200 g mẫu thử vào pha động và pha loãng tới 10 ml bằng pha động.

Dung dịch đánh dấu: Hòa tan 5 mg dextrose chuẩn và 2 mg chất đối chiếu hóa học dextran V_0 trong 1 ml pha động.

Dung dịch hiệu chuẩn: Hòa tan riêng rẽ 15 mg các chất đối chiếu hóa học dextran 4, dextran 10 dùng cho hiệu chuẩn và 20 mg các chất đối chiếu hóa học dextran 40, dextran 70, dextran 250 dùng cho hiệu chuẩn trong 1 ml pha động.

Dung dịch kiểm tra tính phù hợp của hệ thống:

Hòa tan 20 mg chất đối chiếu dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng (đối với dextran 40) hoặc 20 mg dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng (đối với dextran 60 và dextran 70) vào 1 ml pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột (0,3 m × 10 mm) nhồi agarose loại liên kết chéo dùng trong sắc ký hoặc một dây các cột (0,3 m × 10 mm) nhồi gel polyether hydroxyl hóa dùng trong sắc ký.

Pha động: Dung dịch chứa 7 g natri sulfat khan và 1 g clorobutanol trong 1 lít nước.

Tốc độ dòng: 0,5 ml/min đến 1 ml/min, giữ ổn định với sai số ± 1 %/h.

Detector khúc xạ ánh sáng vi sai.

Buồng tiêm mẫu dung tích 100 µl đến 200 µl.

Duy trì hệ thống hoạt động ở nhiệt độ ổn định (± 0,1°C).

Chuẩn hóa hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại vài lần một thể tích nhất định dung dịch đánh dấu. Trên sắc ký đồ sẽ xuất hiện 2 pic, pic đầu tương ứng chất đối chiếu dextran V_0 và pic thứ 2 là của dextrose. Từ thể tích rửa giải của pic tương ứng với dextran V_0 , tính thể tích trống V_0 và từ pic tương ứng với dextrose, tính được thể tích thẩm tổng V_t .

Tiêm một thể tích nhất định các dung dịch chuẩn. Vẽ cẩn thận đường nền của mỗi sắc ký đồ. Phân chia mỗi sắc ký đồ thành p phần (ít nhất là 60) bằng những đường gạch thẳng dọc bằng nhau (tương ứng với những thể tích rửa giải).

Trong mỗi phần, i tương ứng với một thể tích rửa giải V_i , đo chiều cao (y_i) của đường sắc ký đồ phía trên đường nền và tính hệ số phân bố K_i theo công thức:

$$\frac{(V_i - V_0)}{(V_t - V_0)} \quad (1)$$

Trong đó:

V_0 là thể tích trống của cột, được xác định bởi pic tương ứng với chất đối chiếu hóa học dextran V_0 trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch đánh dấu;

V_t là thể tích thẩm tổng của cột, được xác định bởi pic tương ứng với dextrose trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch đánh dấu;

V_i là thể tích rửa giải của phần i trong sắc ký đồ thu được với mỗi dung dịch chuẩn.

Tiến hành hiệu chuẩn sử dụng một trong những phương pháp dưới đây:

Vẽ đường cong chuẩn

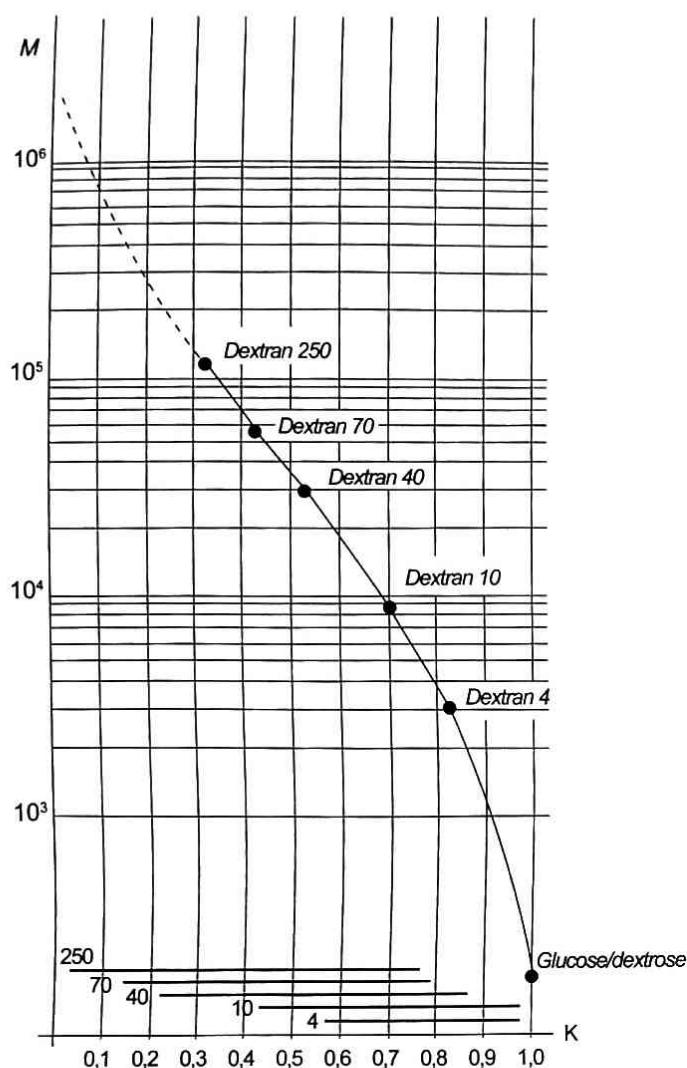
Với mỗi chất đối chiếu hóa học dextran dùng cho hiệu chuẩn, tính hệ số phân bố K_{max} tương ứng với chiều cao cực đại của đường sắc ký, sử dụng công thức (1). Trên giấy kẻ ô bán logarit đặt các giá trị của K_{max} (trục x) tương ứng với khối lượng phân tử ghi trên nhãn của mỗi chất dextran hiệu chuẩn và của dextrose; những giá trị này được lấy tại điểm cao nhất của đường sắc ký (M_{max}). Vẽ đường cong chuẩn đầu tiên qua những điểm thu được, ngoại suy từ điểm K_{max} thu được với chất đối chiếu hóa học dextran 250 dùng cho hiệu chuẩn tới giá trị K thấp nhất thu được từ chất đối chiếu hóa học này (xem Hình 5.5.1). Sử dụng đường cong chuẩn đầu tiên này, chuyển tất cả các giá trị K_i ở mỗi sắc ký đồ sang khối lượng phân tử tương ứng M_i để thu được sự phân bố khối lượng phân tử. Tính khối lượng phân tử trung bình M_w cho mỗi loại dextran đối chiếu hóa học sử dụng phương trình (3) dưới đây. Nếu giá trị thu được đối với M_w không khác hơn 5 % so với giá trị công bố của mỗi dextran và mức khác biệt trung bình là ± 3 %, đường cong chuẩn được chấp nhận. Nếu không đạt yêu cầu đó, chuyển dịch đường cong chuẩn dọc theo trục y và lặp lại tiến trình này cho tới khi các giá trị M_w thu được và giá trị công bố không khác nhau lớn hơn 5 %.

Tính qua đường cong chuẩn

Tính từ phương trình (2) và (3) dưới đây, sử dụng phương pháp thích hợp¹, các giá trị b_1 , b_2 , b_3 , b_4 và b_5 cho phép thu được giá trị M_w nằm trong khoảng 5 % của tất cả những giá trị công bố từ mỗi dextran chuẩn và khối lượng phân tử của dextrose nằm trong khoảng 180 ± 2 .

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)} \quad (2)$$

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^p y_i} \quad (3)$$



Hình 5.5.1 - Ví dụ về đường cong chuẩn. Đường chấm chấm tương ứng với phần đường cong ngoại suy. Đường nằm ngang ở dưới cùng của đồ thị thể hiện độ rộng và vị trí của đường sắc ký thu được tương ứng với mỗi dextran chuẩn.

Trong đó:

p là số phân đoạn chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao của đường sắc ký phía trên đường nền trong phân đoạn i ;

M_i là khối lượng phân tử trong phân đoạn i .

Tính phù hợp của hệ thống

Tiêm một thể tích nhất định dung dịch thử tính phù hợp hệ thống thích hợp.

Khối lượng phân tử trung bình của chất đối chiếu hóa học dextran dùng cho thử hiệu năng

Tính khối lượng phân tử trung bình M_w như đã trình bày trong phần hiệu chuẩn hệ sắc ký, sử dụng đường cong chuẩn hoặc các giá trị thu được ở trên đối với b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 . Phép thử chỉ có giá trị khi M_w nằm trong khoảng 41.000 đến 47.000 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng) và 67.000 đến 75.000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng).

Khối lượng phân tử trung bình của dextran phân đoạn cao 10 %

Tính M_w đối với dextran phân đoạn cao 10 % được rửa giải qua phần thứ n sử dụng công thức:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^n y_i} \quad (4)$$

Với n được xác định như sau:

$$\sum_{i=1}^n y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (6)$$

Trong đó:

p là số phần chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao đường sắc ký phía trên đường nền trong phân i ;

M_i là khối lượng phân tử của phần i .

Phép thử chỉ có giá trị khi M_w của dextran phân đoạn cao nằm trong khoảng: 110.000 đến 130.000 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho hiệu chuẩn) và 190.000 đến 230.000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho hiệu chuẩn).

Khối lượng phân tử trung bình của dextran phân đoạn thấp 10 %

Tính M_w đối với dextran phân đoạn thấp 10 % rửa giải trong và sau phần thứ m theo công thức sau:

$$M_w = \frac{\sum_{i=m}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=m}^p y_i} \quad (7)$$

Trong đó:

m được xác định như sau:

$$\sum_{i=m}^p y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^p y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (9)$$

p là số phần chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao đường sắc ký phía trên đường nền trong phân i ;

M_i là khối lượng phân tử của phần i .

Phép thử chỉ có giá trị khi M_w của dextran phân đoạn thấp 10 % là: sửa lại là 6000 đến 8500 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng) và 7000 đến 11.000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng).

Sự phân bố khối lượng phân tử của dextran được phân tích

Tiêm một thể tích nhất định dung dịch (1) và tính M_w của phân bố tổng khối lượng phân tử, M_w của dextran phân đoạn cao 10 % và M_w của dextran phân đoạn thấp 10 % như chỉ dẫn trong phần thử tính phù hợp của hệ thống.

¹ Phương pháp lập như phương pháp Gauss – Newton cải tiến bởi Hartley là phù hợp [Xem O Hartley, *Tecnometrics*, 3 (1961) and G Nilsson and K Nilsson, *J.Chromat.* 101, 137 (1974)]. Một chương trình đường cong thích hợp xử lý tương quan hồi quy không tuyến tính chạy trên máy tính điện tử có thể được sử dụng.

5.6 PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI

Điện di là hiện tượng liên quan đến sự di chuyển của các protein, các colloid, các phân tử, hay các tiểu phân tích điện hòa tan hoặc phân tán trong dung dịch điện giải khi có dòng điện đi qua.

Điện di được chia thành hai loại tùy theo thiết bị sử dụng: Điện di dung dịch tự do hay điện di với sự chuyển dịch của các lớp biên và điện di vùng.

Trong phương pháp điện di dung dịch tự do, dung dịch đậm của các protein trong một ống hình chữ U dưới tác dụng của dòng điện sẽ hình thành nên các lớp protein có linh độ giảm dần. Chỉ phân di chuyển nhanh nhất của protein sẽ tách rõ rệt khỏi các protein khác, kiểm tra sự dịch chuyển của các lớp biên bằng hệ thống quang học sẽ cung cấp các dữ liệu để tính toán linh độ điện di và các thông tin về mặt định tính và định lượng của thành phần hỗn hợp protein.

Trong điện di vùng, mẫu được đưa vào dưới dạng một dải hẹp hay điểm trong cột, trên tấm phẳng, hay trên một lớp phim chứa đậm. Sự di chuyển của các thành phần trong các dải hẹp cho phép tách hoàn toàn chúng. Có thể tránh sự chồng lấn giữa các dải hẹp do sự đối lưu nhiệt bằng cách đưa chất điện giải vào các nền (matrix) xốp như chất rắn dạng bột, hay nguyên liệu dạng sợi như giấy, hay gel như tinh bột, agar hoặc polyacrylamid.

Các phương pháp điện di vùng có ứng dụng rộng rãi. Điện di gel, đặc biệt là điện di đĩa được sử dụng để tách protein do khả năng cho độ phân giải cao.

Sự di chuyển điện di của các tiểu phân của một chất nhất định phụ thuộc vào tính chất của tiểu phân mà chủ yếu là điện tích, kích thước hay khối lượng phân tử và hình dạng của các tiểu phân cũng như các tính chất và các thông số thực nghiệm của hệ thống. Những thông số này bao gồm: pH, nồng độ ion, độ nhớt và nhiệt độ của chất điện giải, mật độ hoặc độ liên kết chéo của các matrix nền như gel và điện thế áp đặt.

Ảnh hưởng của điện tích, kích thước tiểu phân, độ nhớt của chất điện giải và biến thiên điện thế

Các tiểu phân tích điện sẽ di chuyển về phía điện cực ngược dấu với chúng, sự di chuyển của các phân tử tích cả điện dương và điện âm phụ thuộc vào điện tích mạng. Tốc độ di chuyển tỷ lệ thuận với độ lớn của điện tích mạng trên tiểu phân và tỷ lệ nghịch với kích thước tiểu phân, mà kích

thước tiểu phân lại có liên quan trực tiếp với phân tử lượng. Những tiểu phân hình cầu lớn, khi định luật Stoke có giá trị, linh độ điện di μ_0 sẽ tỷ lệ nghịch với bán kính của tiểu phân theo phương trình:

$$\mu_0 = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

Trong đó v là vận tốc của tiểu phân, E là thế đặt lên chất điện giải, Q là điện tích của tiểu phân, r là bán kính tiểu phân và η là độ nhớt của dung dịch chất điện giải.

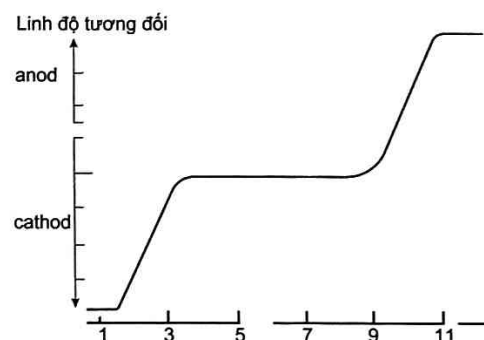
Phương trình này chỉ có giá trị giới hạn ở độ pha loãng nhất định và không có sự hiện diện của các nền như giấy hoặc gel. Các ion và peptid có trọng lượng phân tử lớn hơn 5000, đặc biệt khi có mặt môi trường nền, không tuân theo định luật Stoke và linh độ điện di của chúng được biểu thị bằng phương trình:

$$\mu_0 = \frac{Q}{A\pi r^2 \eta}$$

Trong đó A là thừa số hình dạng, thay đổi trong khoảng từ 4 - 6, biểu thị sự phụ thuộc tỷ lệ nghịch của linh độ điện di đối với bình phương bán kính tiểu phân. Về mặt khối lượng phân tử, linh độ điện di sẽ tỷ lệ nghịch với căn bậc ba của bình phương khối lượng phân tử.

Ảnh hưởng của pH

Hướng và tốc độ di chuyển của phân tử có nhiều nhóm chức có thể bị ion hóa như acid amin và protein sẽ phụ thuộc vào pH của dung dịch chất điện giải. Ví dụ: Linh độ điện di của acid amin đơn giản như glycine sẽ thay đổi theo giá trị pH gần đúng như trong Hình 5.6.1.



Hình 5.6.1

Giá trị pK_a bằng 2,2 và 9,9 trùng với điểm uốn trên biểu đồ. Do nhóm chức bị ion hóa 50 % ở giá trị $pH = pK_a$, nên linh độ điện di ở những điểm này sẽ bằng 1/2 giá trị quan sát được khi cation và anion bị ion hóa hoàn toàn lần lượt ở pH rất thấp và pH rất cao. Ion lưỡng cực tồn tại ở khoảng pH trung gian là những chất trung hòa về điện và có linh độ điện di bằng 0.

Ảnh hưởng của lực ion và nhiệt độ

Linh độ điện di sẽ giảm khi tăng lực ion của chất điện giải nền. Hoạt độ ion μ được xác định theo phương trình:

$$\mu = 0,5 \sum C_i Z_i^2$$