

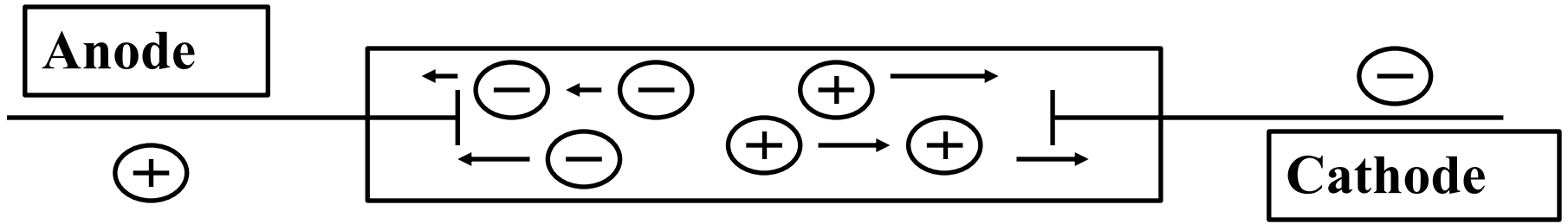
Capillary Electrophoresis

ĐIỆN DI MAO QUẢN

Sự phát triển của CE

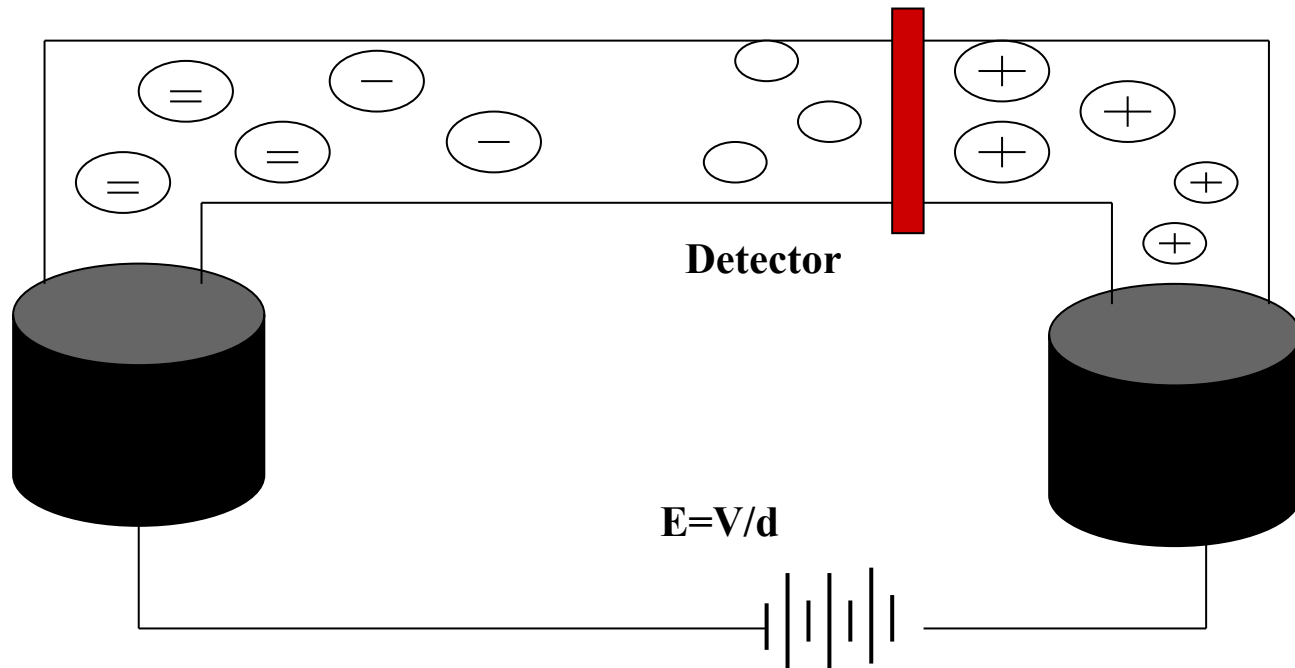
- 1937 A. Tiselius Electrophoretic Cell
- 1967 S. Hjerten Rotating tubes (300 μm)
- 1970 V. Neuhoff PAG filled tubes
- 1979 Mikkers, Everaerts, Verheggen FZE
- 1981 Jorgenson and Lukags 75 μm cap.
- 1983 Micellar Electrokinetic Chrom.
- 1988 Commercial introduction
- Hiện nay HPCE

Điện di

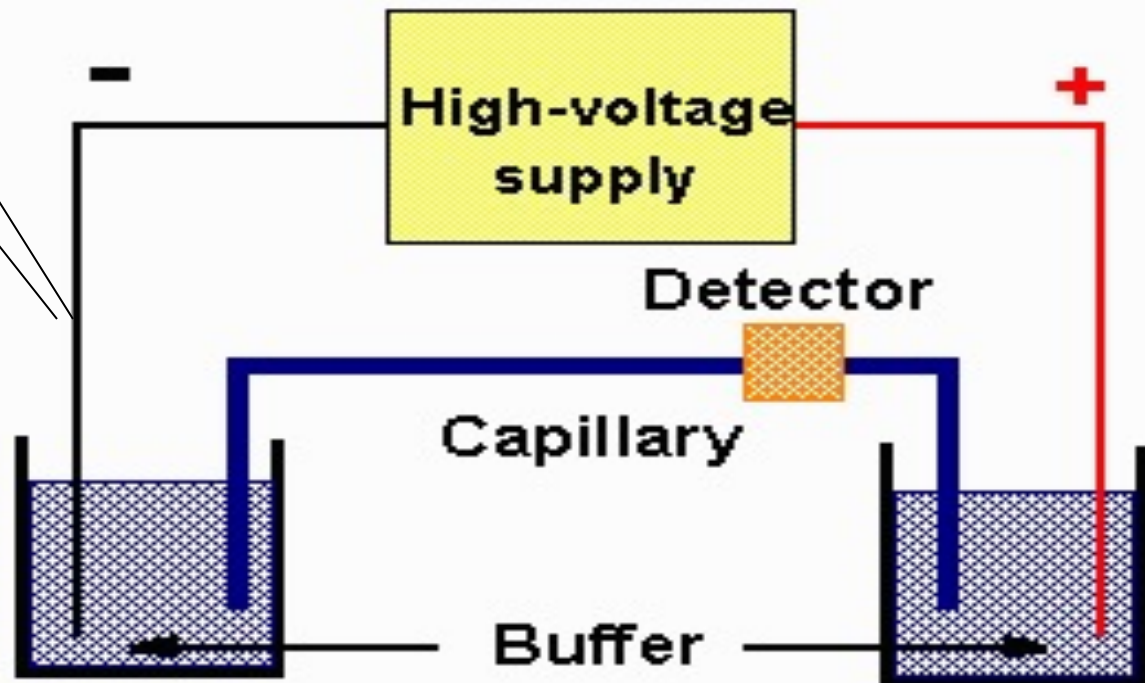
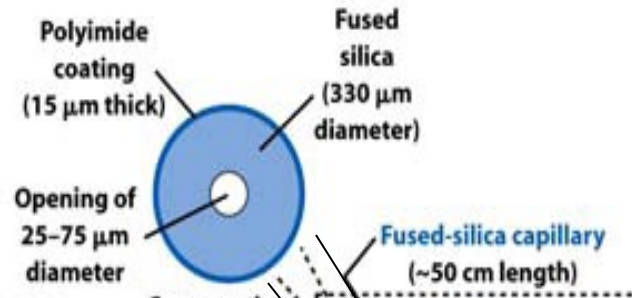


Anode

Cathode



Sơ đồ khối máy điện di mao quản

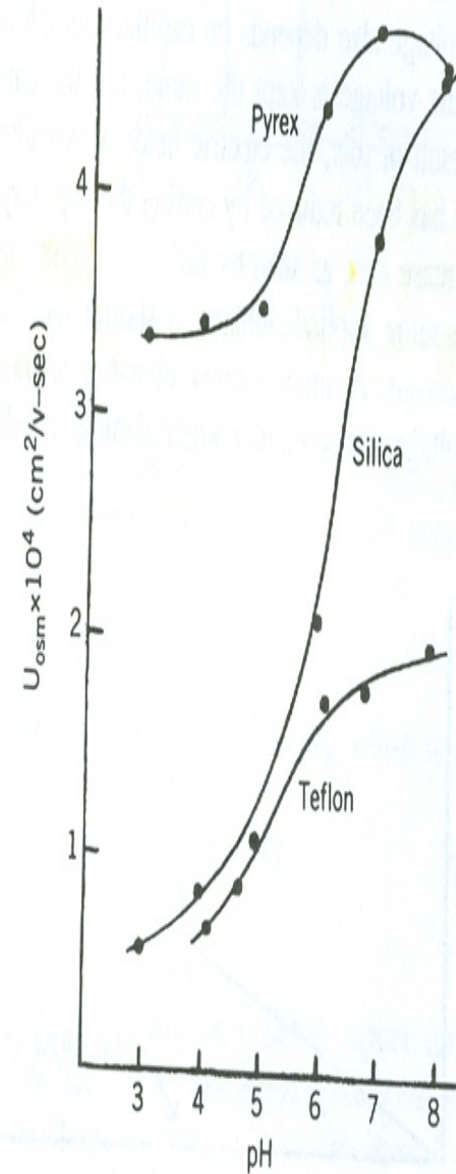


- **Dung dịch đệm:**

- pH = 3 – 11
- Đệm phtalate, acid citric/citrate, boric/ borate, đệm phosphate

- **Cột mao quản:**

- Chế tạo từ thủy tinh nóng chảy
- Bên ngoài phủ lớp nhựa bảo vệ
- Thường được làm nguội bằng dd làm nguội (*coolant*)



- **Tiêm mẫu:**
 - Lượng mẫu tiêm nhỏ 1 – 50nl
 - Tiêm thủy động lực
 - Tiêm điện động

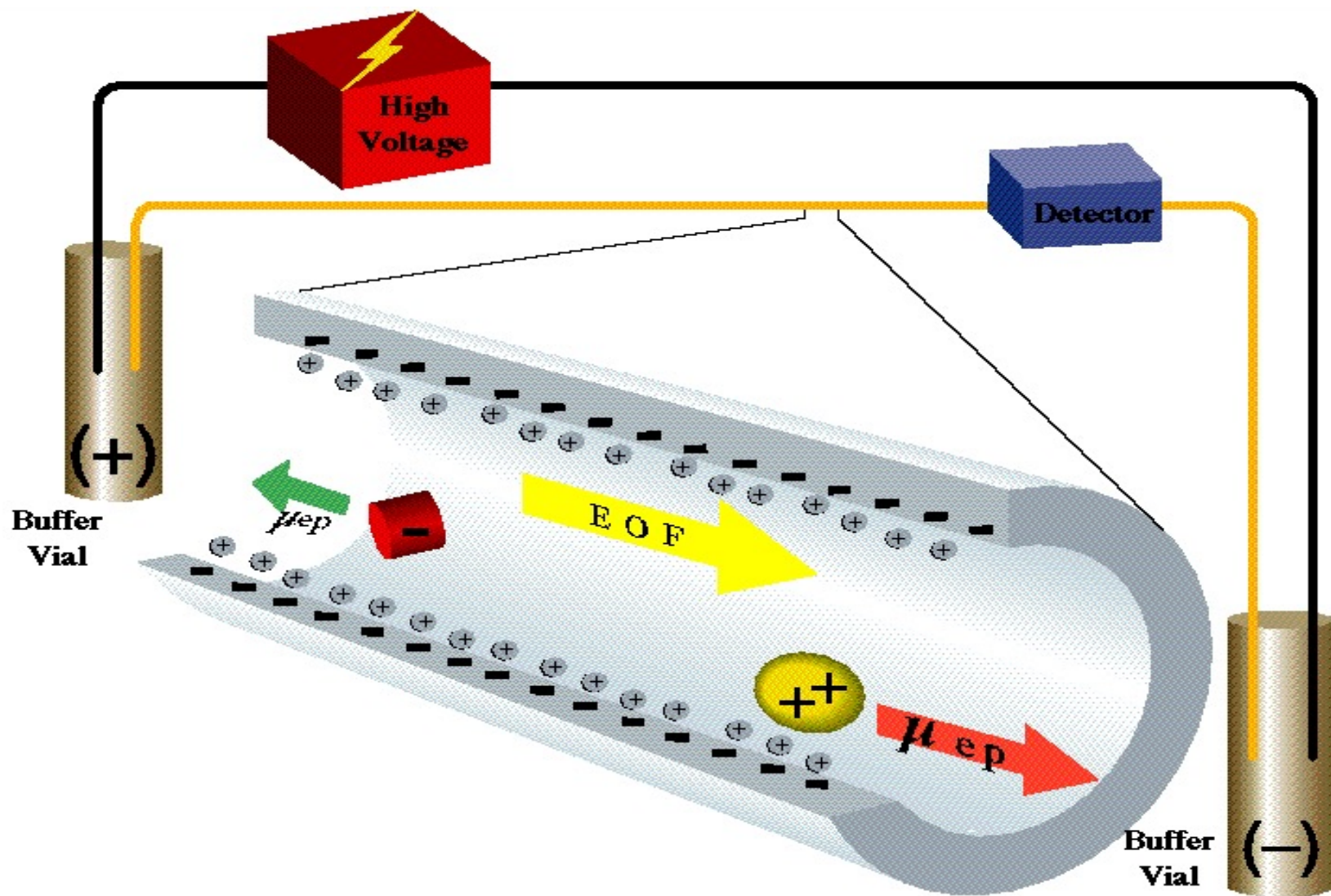
- **Detector:**
 - UV –VIS
 - Huỳnh quang
 - Đo ampe
 - Độ dẫn điện
 - Phổ khối

- **Hệ thống thu nhận dữ liệu**

ĐẠI CƯƠNG

Điện di mao quản (Capillary Electrophoresis, CE)

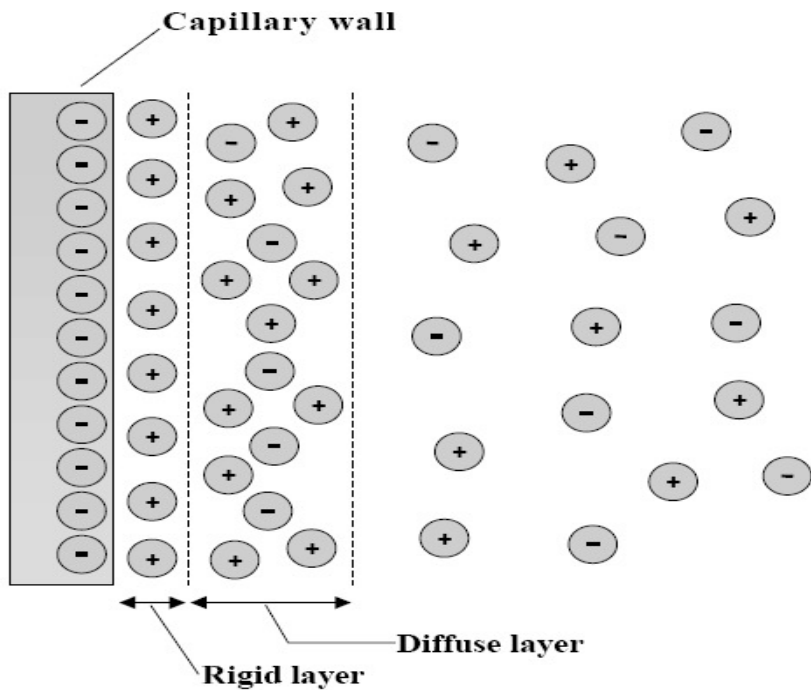
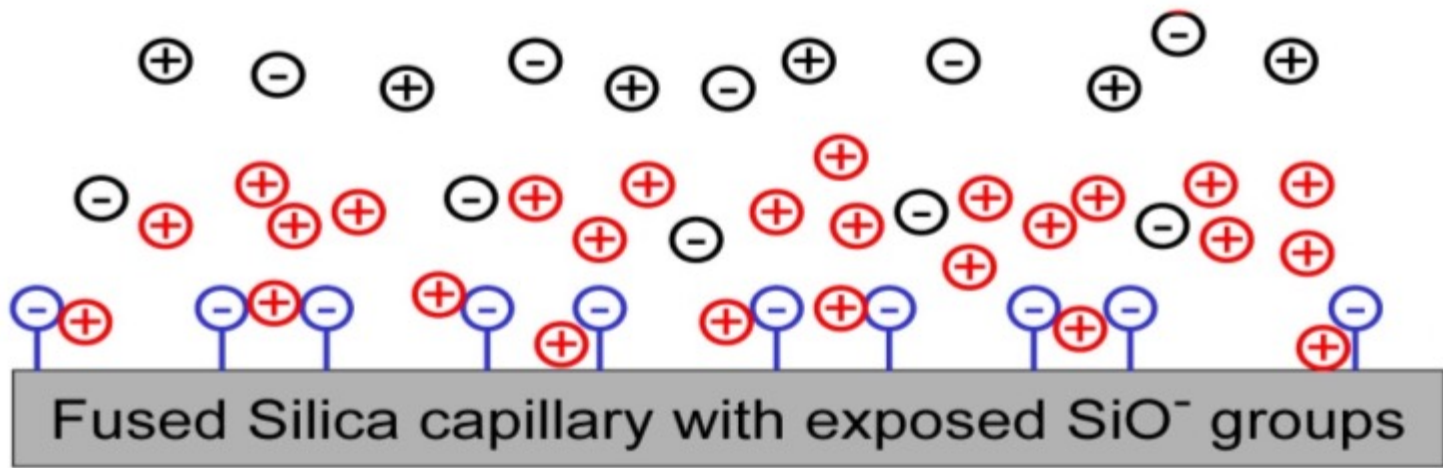
- Kỹ thuật tách các chất trong mao quản silica
 - Dài 25 – 100 cm
 - Đường kính trong 25 – 100 μm
 - Đường kính ngoài 300 – 400 μm
 - Điện thế 1 chiều áp vào hai đầu mao quản 10 – 30 kV
tạo ra quá trình chia tách
- Các chất phân tích được phát hiện khi di chuyển về một đầu mao quản nhờ một detector thích hợp



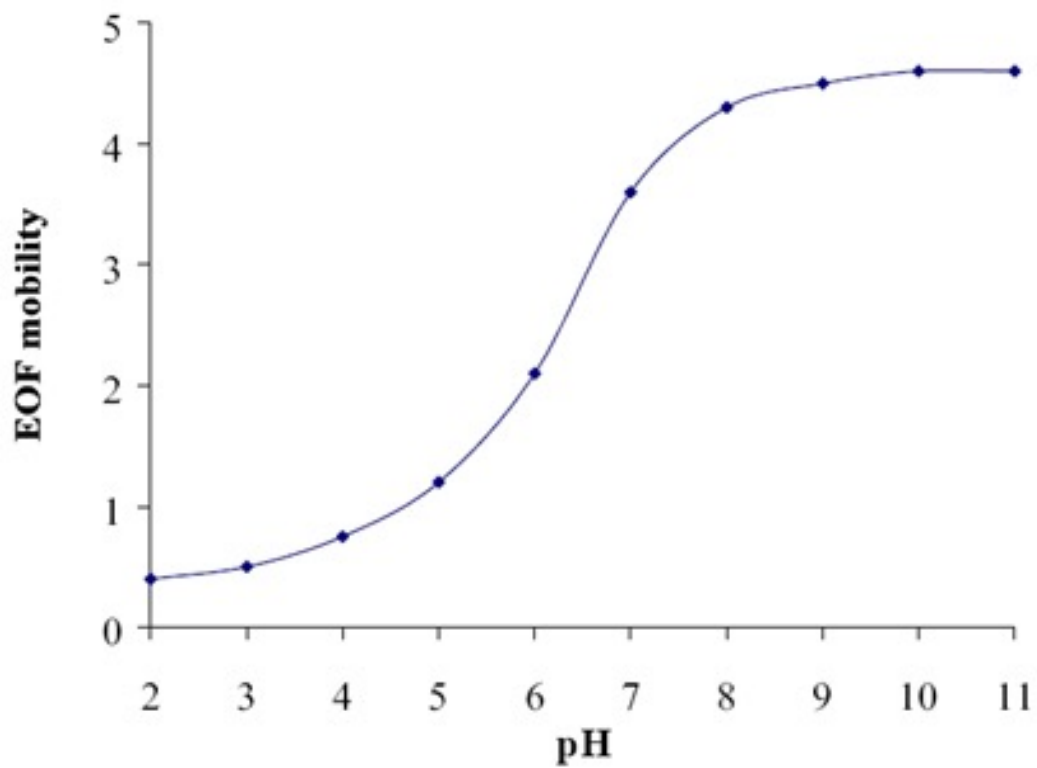
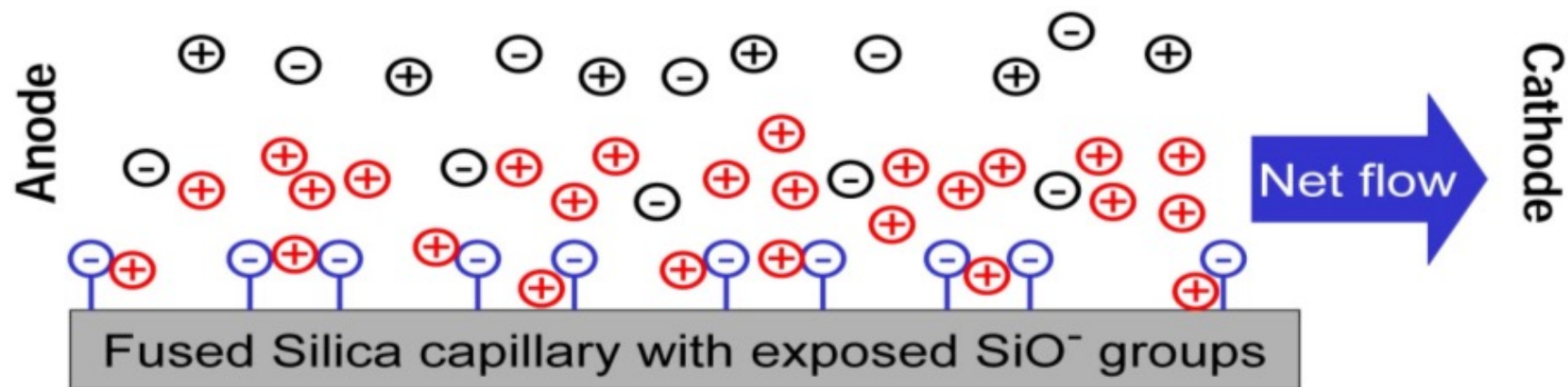
NGUYÊN TẮC HOẠT ĐỘNG

1. Dòng điện thẩm (Electroosmotic flow , EOF):

- Yếu tố cơ bản trong nguyên tắc hoạt động của pp CE
- Dòng chất lỏng bên trong mao quản, được hình thành do điện tích ở bề mặt bên trong thành mao quản
- Nguyên nhân gây ra dòng EOF là lớp điện tích kép phát sinh giữa bề mặt trong mao quản và dung dịch điện giải



$$\zeta = 4\pi\delta e/\epsilon$$

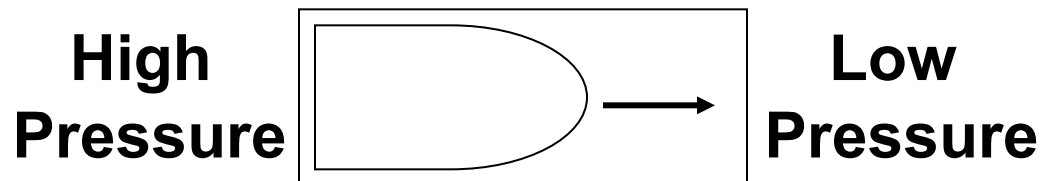
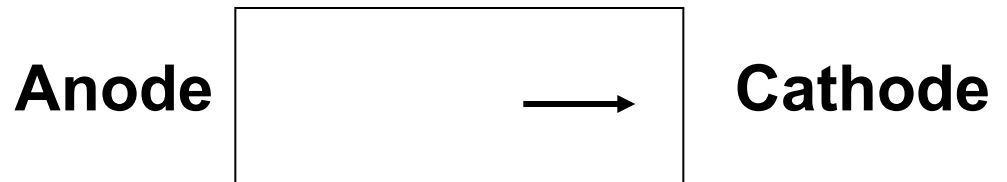


– Dòng EOF phụ thuộc vào

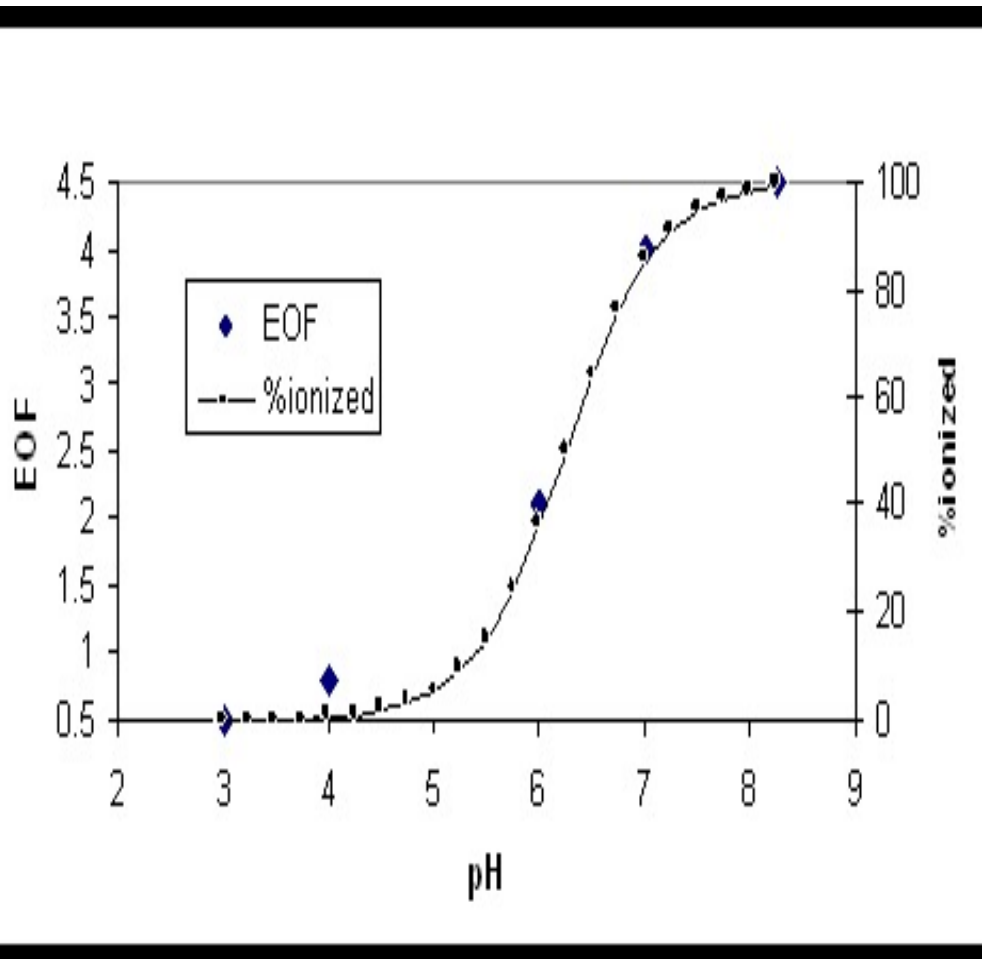
- *pH dung dịch đệm*: pH cao làm tăng dòng EOF và ngược lại
- *nồng độ dung dịch đệm*: tỷ lệ nghịch với thời gian di chuyển, nồng độ cao hơn nồng độ mẫu ít nhất 100 lần.
- *bản chất dung dịch đệm*: có thể thêm dung môi hữu cơ vào dung dịch đệm để làm tăng hay giảm dòng EOF
- *điện thế nguồn*: tỷ lệ với độ lớn của điện trường
- *nhệt độ*: tăng hay giảm sẽ làm thay đổi độ nhớt của dd đệm và dòng EOF tỷ lệ nghịch với độ nhớt của dd đệm

Đặc điểm của EOF

- Tạo nên dòng chuyển khối phẳng trong mao quản ($d_i < 200 \mu\text{m}$)
- Đưa tất cả các tiểu phân có mặt trong dung dịch điện di di chuyển theo cùng một hướng

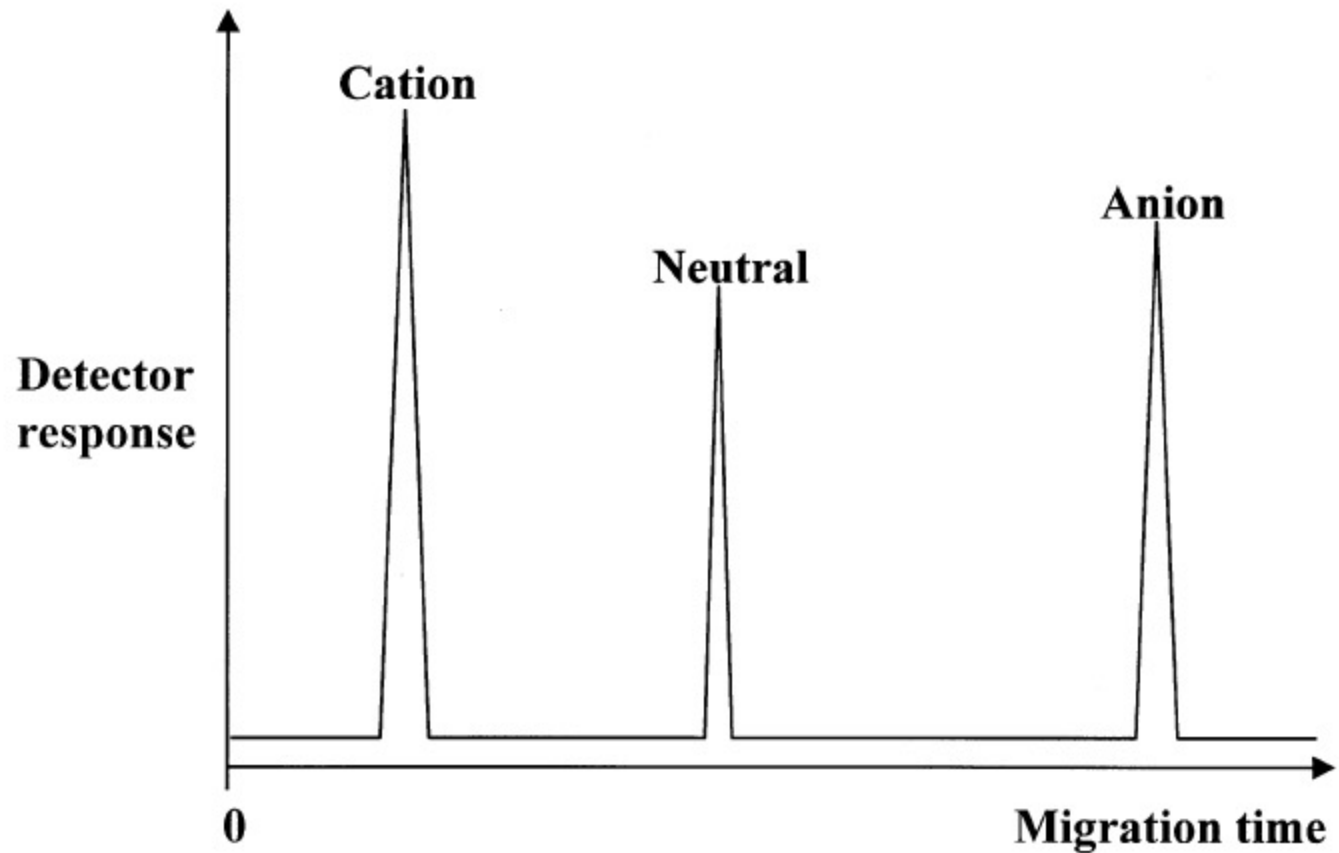


Kiểm soát EOF



- Thay đổi điện tích bề mặt mao quản
- Thay đổi độ nhớt của dung dịch điện di

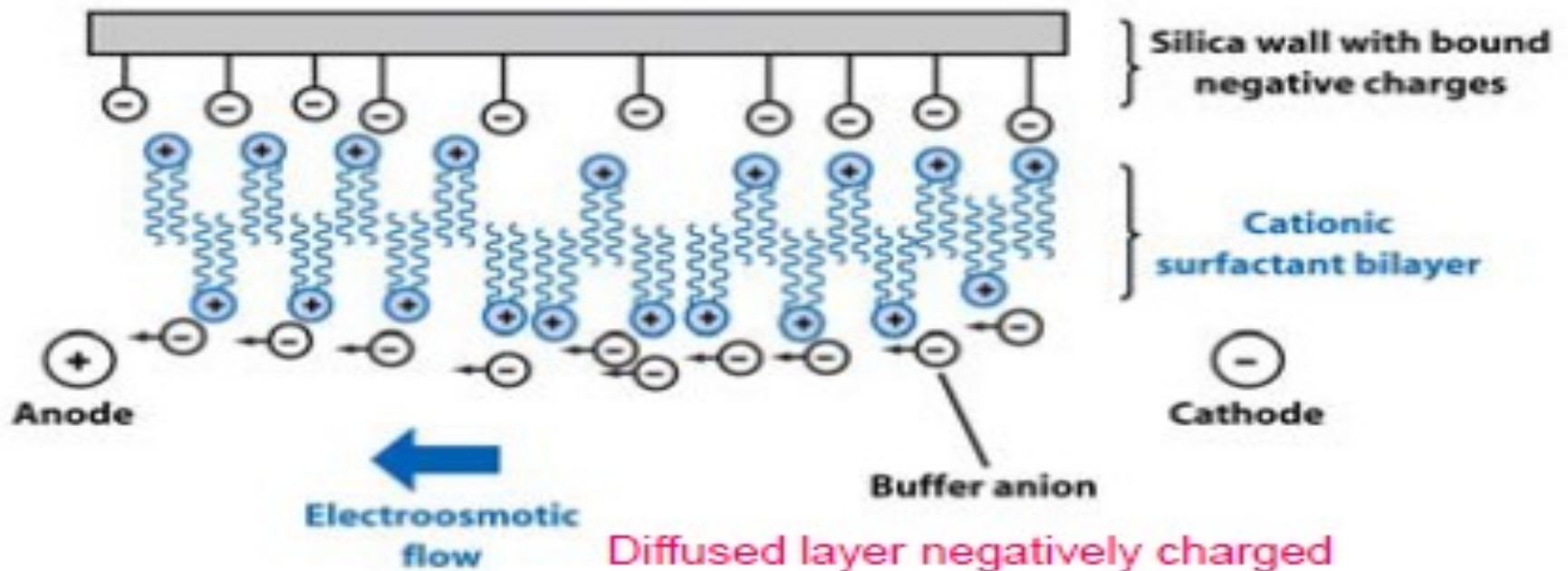
Thứ tự rửa giải:



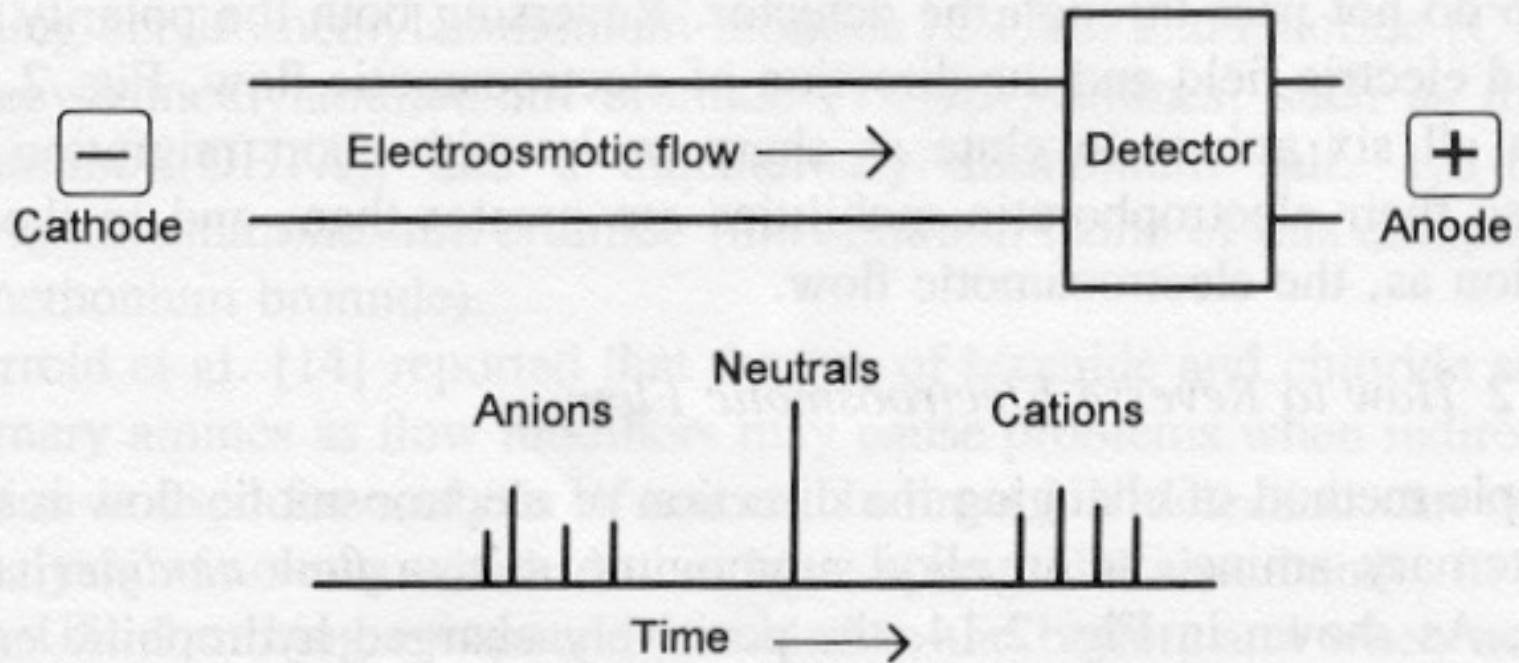
Trường hợp chỉ cần phân tích anion:

- **Đổi chiều EOF:**

- Cetyl trimetyl amoni bromid CTAB hay CTAC
- Tetradecyl trimetyl amoni bromid TTAB
- Hexadimethrin bromid HDB



- **Đổi cực của thế áp mao quản**



Linh độ điện di

$$v = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{V}{L}$$

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Linh độ dòng EOF

$$v = \mu_{eo} E = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

$$\zeta = 4\pi\delta e/\varepsilon$$

Nguyên tắc hoạt động:

- Khi tiêm mẫu, các phân tử chất tan sẽ di chuyển theo dòng EOF, do khác nhau về linh độ điện di nên tốc độ di chuyển của các phân tử chất tan sẽ khác nhau và được phát hiện khi đi ngang detector
- Tốc độ di chuyển tương đối của ion ảnh hưởng bởi hai yếu tố: tốc độ dòng EOF và tốc độ điện di

$$U_{OBS} = U_{ep} + U_{EOF}$$

Tốc độ di chuyển tương đối của ion

Tốc độ điện di

Tốc độ dòng EOF

Anions: $v_{OBS} < v_{EOF}$
Cations: $v_{OBS} > v_{EOF}$
Neutrals: $v_{OBS} = v_{EOF}$

- Các phân tử điện tích dương sẽ chuyển động trong mao quản với vận tốc lớn hơn vận tốc dòng EOF:

$$U_{\text{OBS, cation}} = U_{\text{cation}} + U_{\text{EOF}}$$

- Các phân tử điện tích âm chuyển động chậm hơn dòng EOF:

$$U_{\text{OBS, anion}} = U_{\text{EOF}} - U_{\text{anion}}$$

- Các phân tử trung hòa chuyển động cùng với vận tốc dòng EOF:

$$U_{\text{OBS, trung hòa}} = U_{\text{EOF}}$$

CÁC THÔNG SỐ ĐẶC TRƯNG

1. Thời gian di chuyển t_m :

- Thời gian một chất bắt đầu đi vào mao quản cho đến khi chất đó đi qua detector
- Là thông số dùng để định tính trong phương pháp điện di

$$t_m = \frac{L_t}{V} \quad \begin{array}{l} \text{(khoảng cách di chuyển)} \\ \text{(tốc độ di chuyển)} \end{array}$$

$$V = U_{ep} + U_{EOF}$$

2. Độ phân giải R_s :

- Trong thực tế thường được dùng chỉ chất lượng của một quá trình tách
- Trong phân tích định lượng độ phân giải tốt nhất $R_s > 1,5$

$$R_s = \frac{2 (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

3. Hệ số chọn lọc α :

- Là một chỉ tiêu về hiệu quả tách
- Biểu diễn tốc độ di chuyển tương đối của hai chất với nhau

$$\alpha = \frac{t_2 - t_{\text{EOF}}}{t_1 - t_{\text{EOF}}}$$

4. Hiệu lực cột:

- Được thể hiện bằng số đĩa lý thuyết

$$N = 16 \frac{t_m^2}{w^2}$$

CÁC KỸ THUẬT ĐIỆN DI

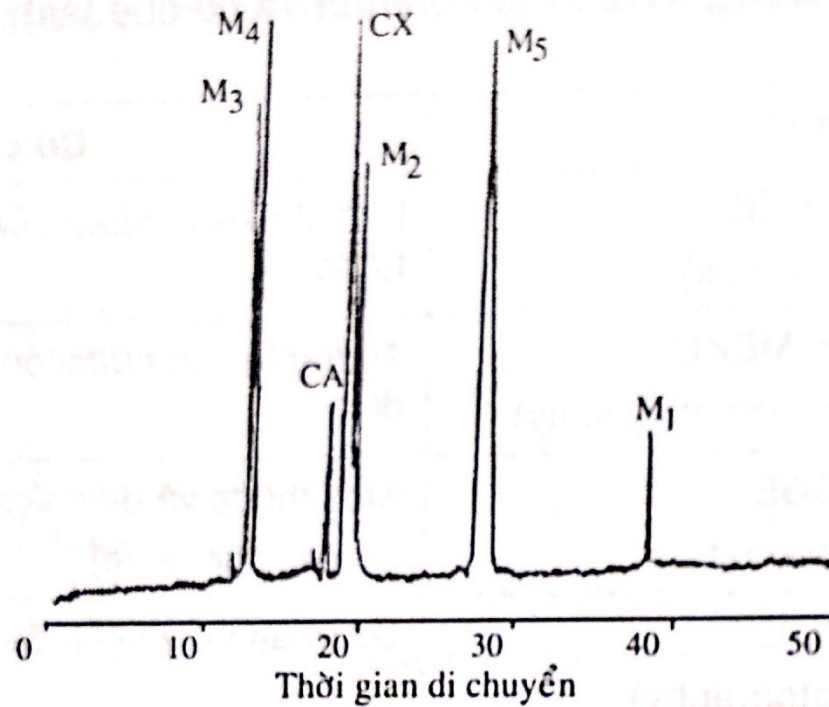
- Điện di mao quản vùng (Capillary Zone Electrophoresis - CZE)
- Điện di mao quản điểm đẳng điện (Isoelectric focusing - IFF)
- Điện di mao quản đẳng tốc độ (Isotachopheresis - ITP)
- Điện di mao quản Gel (Capillary Gel Electrophoresis - CGE)
- Sắc ký điện di mao quản điện động học kiểu micelle
(Micellar electrophoresis capillary chromatography - MECC).

- **Điện di mao quản vùng, CZE:**

- Nguyên tắc hoạt động đơn giản và có tính đa chức năng
- Cơ sở tách là linh độ điện di khác nhau của các ion trong mao quản silica nung chảy và dòng điện thẩm di chuyển về phía catod
- Thứ tự rửa giải là cation, các chất trung hòa và sau cùng là anion
- Nhược điểm của CZE là không tách được các chất trung hòa về điện

Phạm vi ứng dụng:

- Phân tích các Aa, peptide và nhiều dạng ion khác
- Ứng dụng trong phân tích kháng sinh, kháng viêm, vitamin, các ion vô cơ, các acid hữu cơ...
- Phân tích các chất ô nhiễm môi trường



. Điện di đồ nước tiểu có cefixim (CX) và các chất chuyển hóa của nó (M₁ đến M₅) và acid cinnamic (CA).

Điều kiện điện di: Mật độ phosphat 50 mM pH 6,8; V = 15 kV, L_{HD} = 50 cm, id = 50 μm, λ = 280nm.

- **Điện di mao quản hội tụ đẳng điện, CIEF:**

- Nguyên tắc dựa trên sự khác nhau về **pI** của protein và được quyết định bởi chất lưỡng tính (tạo thành gradient pH trong mao quản: dd base ở cực âm và dd acid ở cực dương)
- Nhờ điện trường mà chất lưỡng tính sẽ tích điện và những protein di chuyển qua chất trung gian đến được vùng mà ở đó chúng không tích điện

- Sau khi hội tụ xong, các chất tan và chất lượng tính được tập trung lại thành vùng và những vùng này được phát hiện khi đi ngang qua detector nhờ áp suất
- Là một kỹ thuật điện di có độ phân giải cao
- Áp dụng thành công trong việc tách các dạng đồng phân và các dạng protein (hemoglobin, immunoglobulin...)

- **Điện di mao quản đẳng tiếp xúc, CITP:**
 - Là kỹ thuật điện di có sự di chuyển của đường ranh giới tiếp xúc
 - Kỹ thuật này kết hợp hai hệ đệm (đầu và cuối) để tạo trạng thái mà tất cả các vùng được tách di chuyển cùng một tốc độ và những vùng này giữ nguyên trạng thái kẹp giữa 2 dung dịch đầu và cuối này

- **Điện di mao quản gel, CGE:**

- Được dùng chủ yếu trong lĩnh vực sinh học, đặc biệt như protein và acid nucleic
- Khi các phân tử tích điện di chuyển qua màng polymer, chúng sẽ bị cản trở
- Phân tử kích thước lớn bị cản trở nhiều hơn phân tử kích thước nhỏ

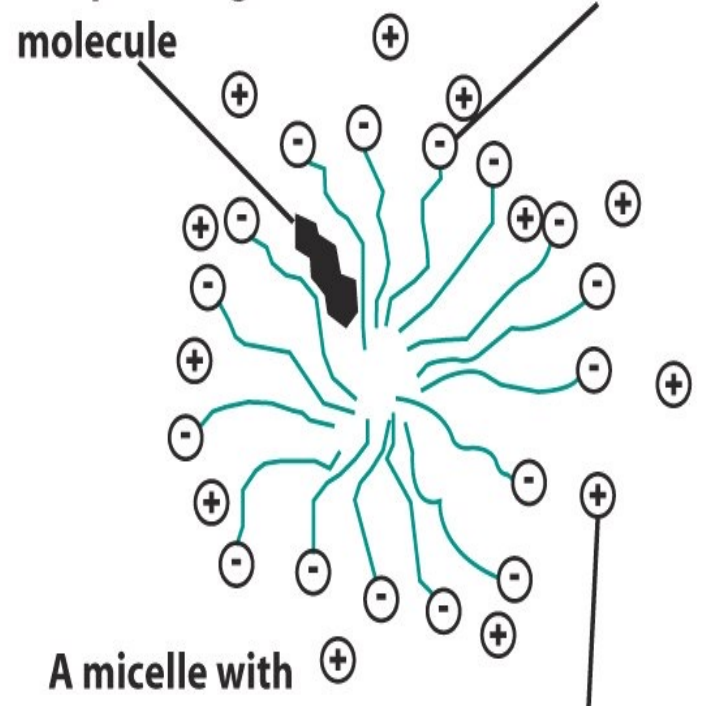
- **Điện di mao quản mixen điện động, MEKC:**
 - Là một kỹ thuật bổ sung cho CZE: tách được ion và cả phân tử trung hòa điện bằng cách thêm các chất hoạt động bề mặt vào dung dịch điện di ở nồng độ lớn hơn nồng độ mixen tới hạn
 - Các chất hoạt động bề mặt thường dùng SDS, SDC, CTAC
 - Hạt mixen được coi là một pha tĩnh giả
 - Việc tách các chất trung hòa dựa trên cơ sở sự phân bố của chúng giữa dung dịch và pha tĩnh giả



Sodium dodecyl sulfate (a surfactant)



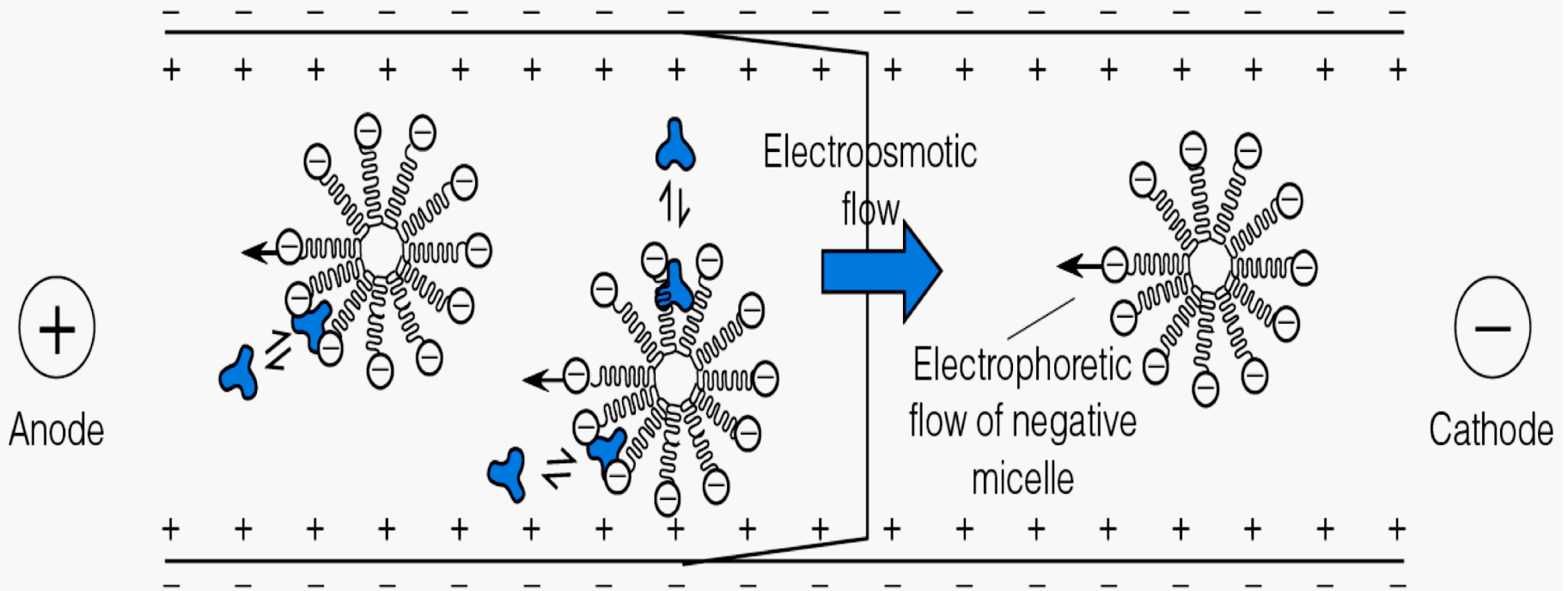
Surfactant molecule with long organic tail
Nonpolar organic and polar headgroup molecule



A micelle with an organic molecule dissolved inside

Counterion in solution

Neutral molecule equilibrates
between free solution and
inside of micelle



- Được ứng dụng nhiều vì có thể tách và định lượng các chất trung hòa và mang điện tích, có đặc tính thân nước như Aa, nucleotide, vitamin, hydrocarbon thơm.

Table 6. Selecting the Mode of Capillary Electrophoresis

Small Ions	Small Molecules	Peptides	Proteins	Oligonucleotides	DNA
CZE	MECC	CZE	CZE	CGE	CGE
ITP	CZE	MECC	CGE	MECC	
	ITP	IEF	IEF		
		CGE	ITP		
		ITP			

- **Điện sắc ký mao quản, CEC:**

- Là kỹ thuật mới lai tạo của CE và HPLC
- Pha động đi qua cột nhờ dòng EOF nên tạo cho kỹ thuật này khả năng tách rất hiệu quả, khắc phục giới hạn dung lượng của HPLC
- Tuy đang trên đường nghiên cứu, phát triển nhưng CEC đã được ứng dụng trong phân tích thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau như phân tích dược, phân tích các phân tử sinh học, các đồng phân quang học.

Dược phẩm	Phương pháp, điều kiện đo	TLTK
β-lactam	MECC: 0,02M borat, 0,2M SDS, 30kV, 72cmx50μm, 210nm (MECC)	(20)J.Chrom 657, 393-399
Sunfonamides	MECC: 0,025M phosphat-borat, pH 8,5; 0,1M SDS; 0,02mTAB; 12kV, 50cmx50μm, 240nm	(26)J. Chrom. 603, 259-266
Taxol (anticancer)	MECC: 0,025M tris-phosphat. pH 8,5, 0,05M SDS; 25% MeOH; 25kV, 87cmx50μm, 200nm	(34) J.Chrom. 657, 301-306
Cimetidine	CZE: 3,3mM trizma bazo; 9,4mM phosphat, pH 6,4; 9,8mM HTAB; 20kV, 60cmx50μm, 228nm	(39) J.Chrom. 559, 547-558
Salicylic acid	MECC: 0,025M borate 0,02 phosphat, 0,025 NaClO ₃ , pH 9,0, 0,05M SDS; 20kV, 57cmx75μm, 214nm	(39) J.Chrom. 559, 547-558
Acetaminophene salicylic acid	MECC: 0,015M phosphat, pH 11; 0,025M SDS; 30kV, 60cmx50μm, 214nm	(47) J.Chrom. 689, 305-311

Chỉ tiêu, hợp chất phân tích	Phương pháp, điều kiện đo	Đối tượng mẫu
Vitamin B ₁ , B ₂ , B ₁₂ ...	MECC: 20mM tetraborat 30mm SDS, pH 9; mao quản 64,5cm; hiệu dụng 56cm, 75µm; 15kV; 220 nm	Hoa quả
Đường glucose, fructose, maltose...	CZE: 20mM pyridinecacboxilic axit; 0,5M CTAB; pH 12,3; mao quản không phủ, 80,5 cm, hiệu dụng 72cm; 75µm; 25kV; 275/10 nm; mẫu 0,5 ppm mỗi chất	Nước hoa quả
Chất bảo quản: Dulcin, sorbic acid, benzoic acid...	MECC: 20mM pyridinecacboxilic axit; 0,5M CTAB; pH 12,3; mao quản không phủ, 80,5 cm, hiệu dụng 72cm; 75µm; 25kV; 275/10 nm; mẫu 0,5 ppm mỗi chất	Nước hoa quả, bánh kẹo...
Đường hóa học: Saccharin, acesultamine-K, aspartame	MECC: 50mM sodium deoxicholate; 10mM KH ₂ PO ₄ ; 10mM đệm borat; pH 8,6; 50cm; 75µm; 20kV; 254 nm	Nước hoa quả, nước giải khát, bánh kẹo...
Chất chống oxi hóa: PG, TBHQ, BHA, BHT	MECC: 50mM tetraborat 50mM SDS, pH 9,5; mao quản 50cm, 50µm, 24kV; 214nm	Bảo quản chất béo trong các loại thực phẩm như bơ, snack, thịt....
Các chất màu thực phẩm: Green S, Brilliant blue, Erythrosine B, Sunset yellow, Tatrazine...	MECC: 15% CAN và 85% 50mM sodium deoxicholate; 5mM KH ₂ PO ₄ ; 5mM đệm borat; 40cm; 50µm; 30kV; 214 nm; 25°C	Bánh kẹo, nước giải khát, nước hoa quả....

ĐIỆN DI MIỄN DỊCH

ĐIỆN DI MIỄN DỊCH

- Là kỹ thuật sử dụng điện di để nhận diện các chất miễn dịch
- Thường sử dụng gel agarose cho protein và gel polyacrylamid cho peptide

- Western blot = Western blotting = phương pháp lai thấm protein
- Phương pháp có độ nhạy cao, thường được sử dụng để phân tách protein và sau đó phát hiện protein đặc hiệu quan tâm
- Xác định trọng lượng phân tử, định lượng protein trong các mẫu khác nhau

Kỹ thuật thực nghiệm Western blot

Bước 1: sau khi điện di hỗn hợp protein trên gel SDS – PAGE, chuyển băng đã phân tách từ gel lên màng xốp với khả năng giữ tốt protein

- **Bước 2**: ủ màng trong dung dịch kháng thể Ab₁ đặc hiệu cho protein đích.

Chỉ băng trên màng chứa protein đích gắn với kháng thể, tạo thành một lớp kháng thể.

Sau đó rửa màng để loại các kháng thể Ab₁ không gắn với protein đích.

- **Bước 3**: ủ màng với dung dịch kháng thể thứ 2 (Ab_2).

Kháng thể thứ 2 này nhận biết và gắn đặc hiệu với Ab_1 . Đồng thời Ab_2 cũng gắn cộng hóa trị với enzyme, đồng vị phóng xạ hoặc một số cơ chất khác có độ nhạy cao.

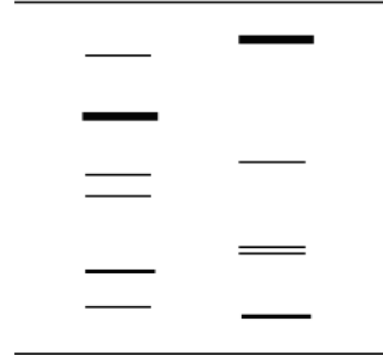
- **Bước 4**: xác định vị trí và lượng Ab_2 gắn cho phép xác định lượng cũng như khả năng di động trong điện trường của protein quan tâm

Western blot (blot miễn dịch)

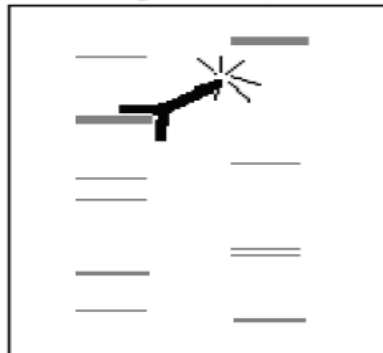
Protein được chuyển
lên màng lai
nitrocellulose



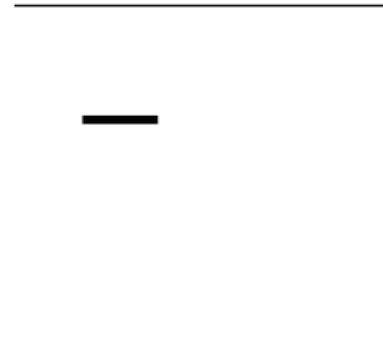
Protein được phân tách
bằng điện di trên gel
SDS polyacrylamide



Đánh dấu với
kháng thể đặc hiệu



Phát hiện kháng thể



cho thấy protein
quan tâm