

Kỹ thuật điện di mao quản trợ áp phân tích các anion

Mai Thanh Đức^{1,2}, Dương Hồng Anh^{1,*}, Peter C.Hauser², Phạm Hùng Việt¹

¹Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Basel, Thụy Sĩ

Nhận ngày 12 tháng 6 năm 2012

Tóm tắt. Kỹ thuật điện di mao quản trợ áp được dùng để phân tách các anion sử dụng hệ điện di mao quản bơm mẫu tuần tự ghép với detector độ dẫn không tiếp xúc tự chế tạo và mao quản có đường kính trong 10 μm. Dưới tác dụng áp suất hỗ trợ, dòng thủy động lực được vào dòng chuyển động của các anion có thể làm tác nhân bù trừ dòng điện di thẩm thấu thay cho việc sử dụng chất hoạt động bề mặt và được chứng minh là có thể làm tối ưu độ phân giải tín hiệu/thời gian phân tích. Tốc độ của dòng thủy động lực và thời điểm đưa vào quá trình phân tách có thể điều chỉnh được nhờ bộ bơm tuần tự với bơm xylanh.

Từ khóa: anion/dòng thủy động lực/ điện di mao quản trợ áp/bộ bơm mẫu tuần tự/detector độ dẫn không tiếp xúc.

1. Giới thiệu

Trong quá trình phân tách điện di trợ áp, có thể bơm dòng thủy động lực cùng chiều dòng chuyển động của ion để rút ngắn thời gian phân tích; hoặc bơm ngược chiều với dòng ion để kéo dài thời gian lưu trong hệ giúp tăng khả năng phân tách. Dòng thủy động lực sẽ gây ra hiện tượng giãn tín hiệu do ảnh hưởng của dòng chảy lớp, tuy nhiên điểm yếu này có thể khắc phục nếu dùng mao quản có đường kính hẹp 10 μm thay vì mao quản thông thường có đường kính 50 - 75 μm. Nếu hệ điện di (CE) kết nối với detector quang thì mao quản hẹp 10 μm không phù hợp do độ dài truyền sáng quá ngắn nhưng khi kết nối với detector đo độ dẫn không tiếp

xúc (C^4D), mao quản hẹp không ảnh hưởng đáng kể đến độ nhạy [1,2]. Bài này sẽ trình bày nghiên cứu về việc sử dụng dòng thủy động lực để tối ưu thời gian phân tích/ hoặc khả năng phân tách các anion vô cơ và hữu cơ nhỏ khi dùng hệ thiết bị CE- C^4D tự chế tạo với mao quản 10 μm.

2. Vật liệu phương pháp

2.1. Hóa chất và dụng cụ

Tất cả các hóa chất có độ tinh khiết phân tích của Fluka (Buchs, Thụy Sĩ) hay Merck (Darmstadt, Đức). Dung dịch gốc 10 mM của các anion vô cơ: Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} và các anion hữu cơ: oxalat, malonat, fomiat, succinat, cacbonat, axetat, lactat, salixylat, benzoat,

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-912380373.
E-mail: hoanggianga0@gmail.com

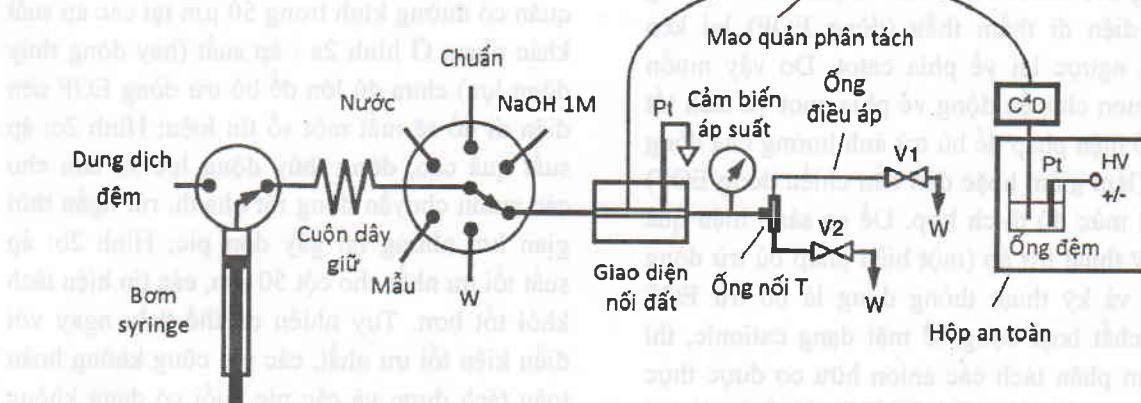
sorbit, ascorbat, gluconat pha từ các muối natri tương ứng (trừ ascorbat được chuẩn bị trực tiếp từ axit ascobic) được dùng để chuẩn bị các dung dịch chuẩn của các anion vô cơ và hữu cơ. Mao quản được xử lý bởi NaOH 1M trong 10 phút và nước deion trong 10 phút trước khi sử dụng cho phân tách.

2.2. Thiết bị và vận hành thiết bị

Hình 1 biểu diễn sơ đồ hệ thiết bị điện di mao quản bơm mẫu tuần tự ghép với detector độ dẫn không tiếp xúc (hệ SIA-CE-C⁴D) tự chế tạo. Bộ bơm mẫu tuần tự (SIA) bao gồm một bơm xylanh khớp với một xylanh 1mL và van đa kênh 6 cổng (Tecan, Crailsheim, Đức) [3]. Bộ giao diện (interface) bằng plexiglass được sử dụng để nối bộ SIA với mao quản [4]. Tại đầu ra của giao diện có lắp cảm biến đo áp suất (Honeywell, Thụy Sĩ) để quan trắc trực tiếp áp suất của dòng chất lỏng; một ống nối PEEK đường kính 0,007 inch dài 35 cm và 2 van dừng (Nresearch, Thụy Sĩ) để điều chỉnh áp lực ngược. Thiết bị có nguồn cấp điện cao thế

(Spellman CZE2000, Pulborough, Anh) với điện thế tối đa là ±30 kV và mao quản có đường kính ngoài 365 µm và đường kính trong 10 µm (Polymicro, Phoenix, AZ, Mỹ).

Tất cả các bước vận hành thiết bị bao gồm: xử lý, rửa mao quản, hút và bơm mẫu thủy động lực, điều áp cũng như phân tách và thu nhận tín hiệu đều được thực hiện tự động hóa với phần mềm tự xây dựng trên cơ sở LabVIEW. Khi bơm một đoạn mẫu xác định chạy qua đầu vào của mao quản trong giao diện SIA-CE, van dừng V1 được mở và V2 đóng. Để tạo dòng thủy động lực trong quá trình phân tách điện di cả hai van dừng V1 và V2 được đóng sau đó động cơ đẩy bơm xylanh với bước đẩy phù hợp. Thay đổi bước đẩy của bơm sẽ tạo ra các tốc độ dòng thủy động lực hay áp suất khác nhau. Khi rửa giao diện V1 (hoặc cả hai van dừng) mở. Trong quá trình phân tách các ion, điện cực tại đầu detector được đặt một điện thế cao có dấu phù hợp và điện cực còn lại được nối đất.



Hình 1. Sơ đồ hệ SIA-CE-C⁴D để thực hiện kỹ thuật điện di mao quản trợ áp.

C⁴D: detector đo độ dẫn không tiếp xúc; HV: nguồn cao thế; W: thải; V1, V2: van dừng.

2.3. Thực nghiệm

Để chứng minh khả năng sử dụng mao quản đường kính hẹp cỡ 10um nhằm khắc phục hiện tượng giãn tín hiệu do dòng chảy lớp gây ra đồng thời không ảnh hưởng tới độ nhạy của thiết bị chúng tôi tiến hành thực nghiệm so sánh hiệu quả tách của các cột mao quản với đường kính khác nhau trong trường hợp có trợ áp. Trước hết sử dụng mao quản với đường kính thường là 50 μm , phân tách 15 anion vô cơ và hữu cơ khi có sử dụng dòng thủy động lực trợ áp với các tốc độ khác nhau (điều kiện thí nghiệm cụ thể được trình bày trong hình 2). Sau đó sử dụng các loại mao quản có đường kính khác nhau: 10, 25, 50 μm phân tách các anion khi có sử dụng dòng thủy động lực trợ áp với các tốc độ khác nhau (điều kiện thí nghiệm cụ thể được trình bày trong hình 3) và so sánh các kết quả để đưa ra kết luận về việc dùng mao quản đường kính trong 10 μm . Các thí nghiệm tiếp theo đều sử dụng loại mao này.

Trong quá trình phân tách các anion bằng kỹ thuật điện di, dưới tác dụng của lực điện trường các anion sẽ bị hút về phía anot nhưng dòng điện di thâm thấu (dòng EOF) lại kéo chúng ngược lại về phía catot. Do vậy muốn các anion chuyển động về phía anot và tách tốt cần có biện pháp để bù trừ ảnh hưởng của dòng EOF (làm giảm hoặc đảo hẳn chiều dòng EOF) ở một mức độ thích hợp. Để so sánh hiệu quả của kỹ thuật trợ áp (một biện pháp bù trừ dòng EOF) và kỹ thuật thông dụng là bù trừ EOF bằng chất hoạt động bề mặt dạng cationic, thí nghiệm phân tách các anion hữu cơ được thực hiện trong hệ đệm Tris/CHES pH=8,4 với hai kỹ thuật: (a) trợ áp (bù trừ dòng EOF).

Một ưu điểm khi sử dụng kỹ thuật trợ áp so với kỹ thuật thông dụng dùng chất hoạt động bề mặt là khi tối ưu hóa quá trình phân tách bằng

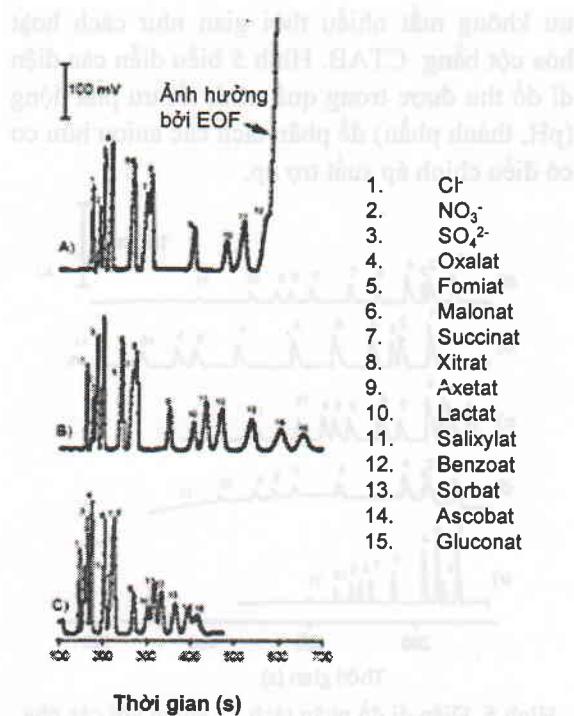
những pha động khác nhau sẽ không phải xử lý lại mao quản mà chỉ cần thay đổi áp suất. Điều này được chứng minh qua dãy thí nghiệm phân tách các anion hữu cơ ở các điều kiện pH khác nhau từ 6 tới 10.

Với hệ thiết bị SIA-CE-C4D tự chế việc trợ áp có thể thực hiện tại các thời điểm khác nhau so với thời điểm bơm mẫu giúp tối ưu hóa đồng thời khả năng phân tách và rút ngắn thời gian lưu của các ion. Thí nghiệm phân tách đồng thời các anion vô cơ và hữu cơ được thực hiện trong hệ đệm His 90 mM/MES 90 mM và một số điều kiện khác nhau: (a) trợ áp $P = 1,7$ bar ngay từ khi bắt đầu bơm mẫu; (b) trợ áp $P = 2,4$ bar ngay từ khi bắt đầu bơm mẫu; (c) trợ áp $P_1 = 1,7$ bar ngay từ khi bắt đầu bơm mẫu và $P_2 = 2,4$ bar từ sau khi bơm 240 s.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. So sánh hiệu quả tách của các cột mao quản với đường kính khác nhau

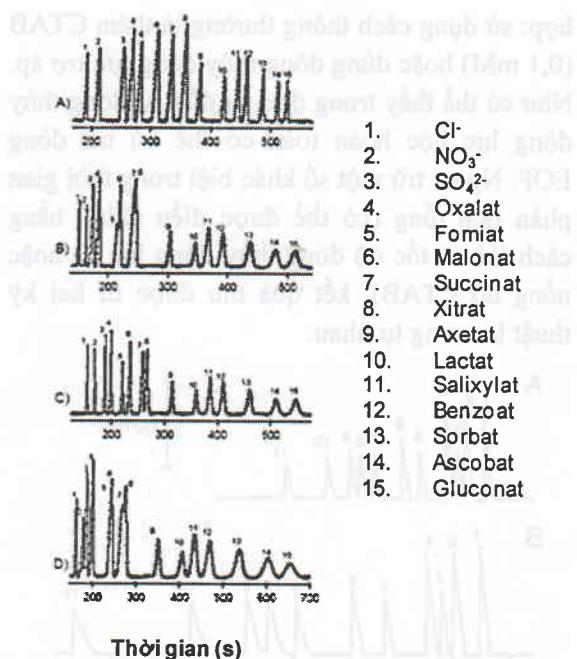
Hình 2 mô tả việc tách các anion hữu cơ bằng kỹ thuật trợ áp ở pH cao sử dụng cột mao quản có đường kính trong 50 μm tại các áp suất khác nhau. Ở hình 2a : áp suất (hay dòng thủy động lực) chưa đủ lớn để bù trừ dòng EOF nên điện di đồ sẽ mất một số tín hiệu; Hình 2c: áp suất quá cao, dòng thủy động lực sẽ làm cho các anion chuyển động rất nhanh, rút ngắn thời gian lưu nhưng lại gây dồn pic; Hình 2b: áp suất tối ưu nhất cho cột 50 μm , các tín hiệu tách khỏi tốt hơn. Tuy nhiên có thể thấy ngay với điều kiện tối ưu nhất, các pic cũng không hoàn toàn tách được và các pic cuối có dạng không nhọn, chân pic không gọn. Hiện tượng giãn tín hiệu này gây ra do dòng chảy lớp trong mao quản 50 μm tạo nên do chênh lệch áp hai đầu cột (vốn cần thiết để bù trừ dòng EOF).



Hình 2. Điện di đồ phân tách 15 anion vô cơ và hữu cơ (nồng độ 100 và 200 μ M) khi sử dụng dòng thủy động lực với tốc độ khác nhau để bù trừ dòng EOF.

Các điều kiện điện di: mao quản có đường kính trong 50 μ m, độ dài hiệu dụng = 32 cm, E = 334 V/cm, tốc độ dòng EOF = 0,13 cm/s, tốc độ dòng thủy động lực: A) 0,089 cm/s; B) 0,103 cm/s; C) 0,16 cm/s.

Lặp lại thí nghiệm trên với các mao quản nhỏ hơn có đường kính 25 và 10 μ m, các kết quả được trình bày trong hình 3. So sánh các điện di đồ 3A, B, C, D có thể thấy rõ ràng mao quản nhỏ hơn cho độ tách tốt hơn, và ảnh hưởng của dòng chảy lớp sẽ được giảm đi đáng kể làm cho các tín hiệu không bị doãng chân. Việc sử dụng C4D có lợi thế là tín hiệu gần như không bị phụ thuộc vào đường kính trong mao quản (trong khi với UV truyền thống, đường kính mao quản tối thiểu phải bằng 50 μ m mới cho độ nhạy tốt). Với mao quản 10 μ m (hình 3A), pic thu được là cao và nhọn nhất, và các pic được tách hoàn toàn khỏi nhau. Theo đó, các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi sẽ sử dụng mao quản 10 μ m.

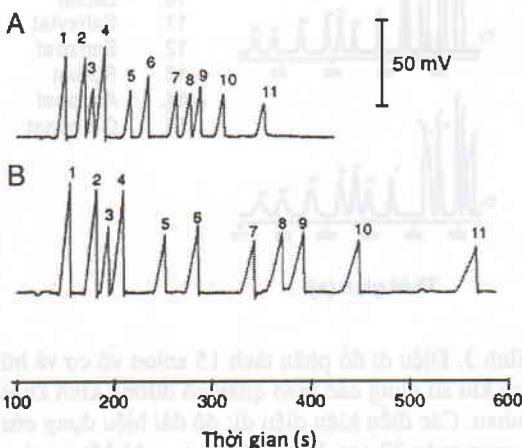


Hình 3. Điện di đồ phân tách 15 anion vô cơ và hữu cơ khi sử dụng các mao quản có đường kính khác nhau. Các điều kiện điện di: độ dài hiệu dụng của mao quản 32 cm, E = 334 V / cm. A) Mao quản đường kính trong 10 μ m, pha động: His / MES 90 mM, tốc độ dòng thủy động lực 0,075 cm/s, dòng EOF 0,086 cm/s; B) Mao quản đường kính trong 25 μ m, pha động: His / MES 30 mM, tốc độ dòng thủy động lực 0,137 cm/s, dòng EOF 0,13 cm/s; C) Mao quản đường kính trong 25 μ m, pha động: His / MES 60 mM, tốc độ dòng thủy động lực 0,103 cm/s, dòng EOF 0,098 cm/s; D) Mao quản đường kính trong 50 μ m, pha động: His / MES 30 mM, tốc độ dòng thủy động lực 0,103 cm/s, dòng EOF 0,13 cm/s.

3.2. So sánh giữa sự phân tách các anion khi bù trừ dòng EOF bằng áp hay dùng chất hoạt động bề mặt

Khi phân tách anion hữu cơ yếu bằng CE thường phải thực hiện ở pH tương đối cao để đảm bảo sự phân ly hoàn toàn. Ở điều kiện này dòng EOF rất mạnh, người ta thường thêm chất hoạt động bề mặt để làm giảm cường độ hoặc đảo chiều dòng EOF. Để so sánh, quá trình phân tách của cùng hỗn hợp chuẩn các 11 anion hữu cơ yếu được thực hiện trong hai trường

hợp: sử dụng cách thông thường là thêm CTAB (0,1 mM) hoặc dùng dòng thủy động lực trợ áp. Như có thể thấy trong điện di đồ 4A, dòng thủy động lực học hoàn toàn có thể bù trừ dòng EOF. Ngoại trừ một số khác biệt trong thời gian phân tích tổng (có thể được điều chỉnh bằng cách tối ưu tốc độ dòng thủy động lực và/hoặc nồng độ CTAB), kết quả thu được từ hai kỹ thuật là tương tự nhau.

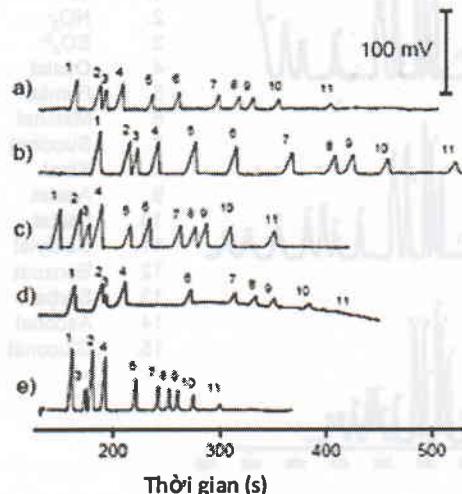


Hình 4. Điện di đồ phân tách các anion hữu cơ. (A) CE trợ áp với $P = 2,8$ bar. **(B)** CE thông thường dùng CTAB dào chiều dòng EOF (0,1 mM). Anion: (1) oxalat; (2) malonat; (3) fomiat; (4) succinat; (5) cacbonat; (6) axetat; (7) lactat; (8) salixylat; (9) benzoat; (10) sorbat; (11) gluconat (tất cả ở 200 μM). Điều kiện CE: độ dài hiệu dụng của mao quản 35 cm; $E = 400$ V/cm; pha động: Tris 70 mM/CHES 70 mM, pH 8,4, điện thế dương đặt ở đầu detector.

3.3. Phân tách anion ở các pH khác nhau, sử dụng kỹ thuật trợ áp

Với kỹ thuật thông dụng để bù trừ dòng EOF phải sử dụng các chất hoạt động bề mặt ví dụ CTAB, như vậy mỗi khi thay đổi pH và thành phần đệm, cần mất thời gian tối ưu nồng độ CTAB. Với kỹ thuật CE trợ áp và hệ thiết bị SIA-CE, người dùng chỉ cần thay đổi bước đẩy của bơm xylanh dẫn tới thay đổi áp suất tại đầu cột và tạo ra dòng thủy động lực với tốc độ khác nhau để bù trừ dòng EOF. Do vậy việc tối

ưu không mất nhiều thời gian như cách hoạt hóa cột bằng CTAB. Hình 5 biểu diễn các điện di đồ thu được trong quá trình tối ưu pha động (pH, thành phần) để phân tách các anion hữu cơ có điều chỉnh áp suất trợ áp.

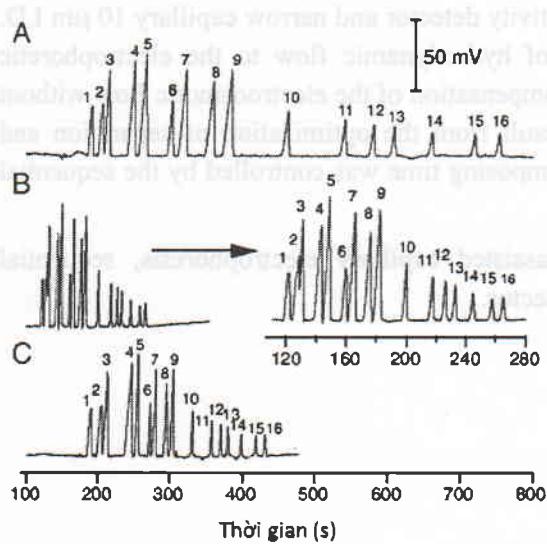


Hình 5. Điện di đồ phân tách 11 anion với các pha động có pH khác nhau bằng điện di mao quản kết hợp với kỹ thuật trợ áp. a) pH 10,2, pha động: CAPS 90 mM + Arginin 90 mM, $P = 2,3$ bar; b) pH 9,1, pha động: CHES 50 mM + Arginin 30 mM, $P = 2,4$ bar; c) pH 8,4, pha động: TRIS 70 mM + CHES 70 mM, $P = 2,8$ bar; d) pH 7,2, pha động: MOPSO 25 mM + Arginin 15 mM, $P = 2,1$ bar; e) pH 6,1, pha động: Histidin 90 mM + MES 90 mM, $P = 2,4$ bar. Thứ tự các pic: 1) Oxalat; 2) malonat; 3) Fomiat; 4) Succinat; 5) Cacbonat; 6) Axetat; 7) Lactat; 8) Salixylat; 9) Benzoat; 10) Sorbat; 11) Gluconat. Điều kiện điện di: chiều dài hiệu dụng của mao quản 35 cm; $E = 400$ V/cm.

3.4. Phân tách anion sử dụng bước tăng áp

Khi phân tách hỗn hợp của nhiều anion có độ linh động điện di khác nhau (tạm gọi là các anion nhanh và anion chậm) có dòng EOF ngược chiều với dòng chuyển động ion cần phải bù trừ dòng EOF (bằng những biện pháp khác nhau), do đó sẽ xảy ra hiện tượng pic của các anion chuyển động nhanh (anion nhanh) bị kéo lại gần nhau trong khi pic các anion chuyển động chậm (anion chậm) ở cách xa làm kéo dài tổng thời gian phân tích quá mức. Tình huống

này đã được biểu diễn ở điện di đồ 6A, việc đặt áp lực liên tục 1,7 bar đảm bảo độ phân giải của các pic nhưng thời gian phân tích kéo dài tới 800s. Còn trong điện di đồ 6B, dòng thủy động lực học mạnh hơn ở 2,4 bar giúp giảm đáng kể thời gian phân tích nhưng lại gây mất độ phân giải đối với các pic của ion nhanh là nitrat và nitrit. Cách giải quyết trong trường hợp này là thay đổi tốc độ dòng thủy động lực (hay áp suất hỗ trợ) trong quá trình phân tách. Điều kiện tối ưu là đặt áp suất 1,7 bar khi bắt đầu bơm mẫu sau đó tăng lên 2,4 bar sau 240s. Kết quả trong điện di đồ 6C cho thấy việc điều chỉnh điều kiện trợ áp đảm bảo độ phân giải cho tất cả các pic của anion nhanh và chậm trong khoảng thời gian phân tích tương đối ngắn (gần 450s).



Hình 6. Phân tách đồng thời anion nhanh và chậm sử dụng bước tăng áp. (A) $P = 1,7$ bar từ $t = 0$ s; (B) $P = 2,4$ bar từ $t = 0$ s; (C) $P_1 = 1,7$ bar từ $t = 0$ s, $P_2 = 2,4$ bar từ $t = 240$ s. Điều kiện CE: $l_{eff} = 35$ cm; $E = 400$ V/cm; pha động: His 90 mM và MES 90 mM. Anion (200 μ M): (1) clorua; (2) nitrat; (3) nitrit; (4) sulfat; (5) oxalat; (6) fomiat; (7) malonat; (8) succinat; (9) xitrat; (10) axetat; (11) lactat; (12) salixylat; (13) benzoat; (14) sorbat; (15) ascorbat; (16) gluconat.

4. Kết luận

Nghiên cứu cho thấy trong quá trình phân tách điện di mao quản việc đưa dòng thủy động lực vào dòng chuyển động của các ion có thể làm tác nhân bù trừ dòng EOF và là kỹ thuật có ích để điều chỉnh linh hoạt thời gian lưu của anion nhằm tối ưu độ phân giải và/hoặc thời gian phân tích. Với hệ điện di mao quản bơm mẫu tuần tự ghép với detector độ dẫn không tiếp xúc tự chế tạo có thể sử dụng bơm xylanh điều khiển bằng máy tính để thay đổi dòng thủy động lực một cách linh hoạt (cả về tốc độ và thời gian bắt đầu), do vậy có thể thu được kết quả phân tách tối ưu tương tự như rửa giải gradient trong sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Lời cảm ơn

Các tác giả trân trọng cảm ơn Quỹ NAFOSTED (đề tài mã số 104.07-2010.45) đã tài trợ cho nghiên cứu này. Tác giả Mai Thanh Đức trân trọng cảm ơn Quỹ Khoa học Quốc gia Thụy Sỹ (grant No.200021-129721/1) đã tài trợ cho thời gian thực tập sau tiến sĩ tại Đại học Basel Thụy Sỹ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Wuersig, A., Kuba'n' , P., Khaloo, S. S., Hauser, P. C., Rapid electrophoretic separations in short capillaries using contactless conductivity detection and a sequential injection analysis manifold for hydrodynamic sample loading, *Analyst* (2006), 131, 944–949.
- [2] Mayrhofer, K., Zemann, A. J., Schnell, E., Bonn, G. K., Capillary electrophoresis and contactless conductivity detection of ions in narrow inner diameter capillaries, *Anal. Chem.* (1999), 71, 3828–3833.
- [3] Thanh Duc Mai, Benjamin Bomastyk, Hong Anh Duong, Hung Viet Pham, Peter C. Hauser, Automated capillary electrophoresis with on-

line preconcentration by solid phase extraction using a sequential injection manifold and contactless conductivity detection, *Anal. Chim. Acta* (2012), 727, 1-7

- [4] P. Kubáň, A. Engström, J.C. Olsson, G. Thorsén, R. Tryzell, B. Karlberg, New interface for coupling flow-injection and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* (1997), 337, 117-124.

Anion determination by pressure-assisted capillary electrophoresis technique

Mai Thanh Duc^{1,2}, Duong Hong Anh¹, Peter C. Hauser², Pham Hung Viet¹

¹Centre for Environmental Technology and Sustainable Development, VNU University of Science,
334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

²University of Basel, Department of Chemistry

The separation of anions was carried out by pressure-assisted capillary electrophoresis technique using the built in-house system with contactless conductivity detector and narrow capillary 10 µm I.D. Based on the pressure assistance, the incorporation of hydrodynamic flow to the electrophoretic movement of anions can be used as a solution for the compensation of the electroosmotic flow without using surface modifier. This technique is likely to result from the optimization of separation and analysis time. The rate of hydrodynamic flow and the imposing time was controlled by the sequential injection analysis manifold with a syringe pump.

Keywords: anion, hydrodynamic flow, pressure-assisted capillary electrophoresis, sequential injection analysis manifold, contactless conductivity detector.

