



GIỚI THIỆU MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.1 Sắc ký hấp phụ lỏng (trên cột)

20.2 Sắc ký phân bố (trên cột)

20.3 Sắc ký trao đổi ion

20.4 Sắc ký rây phân tử

20.5 Sắc ký bản mỏng

20.6 Sắc ký giấy

20.7 Sắc ký khí

20.8 Sắc ký lỏng hiệu năng cao

20.9 Ứng dụng



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.1 SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG (TRÊN CỘT)

- Nguyên tắc
- Hệ sắc ký lỏng
- Kỹ thuật thực nghiệm & ứng dụng

NGUYÊN TẮC

Sắc ký hấp phụ lỏng:

Là quá trình tách do ái lực khác nhau của các cấu tử lỏng đối với chất hấp phụ rắn, bao gồm:

Lực Van der Waals

Lực cảm ứng

Lực liên kết hóa học

Lực liên kết hydro

**Đa số đường đẳng nhiệt tuân theo PT Langmuir
(DD loãng: PT Henry)**

HỆ SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG

**PHA
TÍNH
(Chất
Hấp
Phụ)**

Yêu cầu đối với chất hấp phụ

Không tương tác hoá học với cấu tử, không có hoạt tính xúc tác để tránh các P/Ú phụ

Chọn lọc cao

Ổn định để các kết quả có độ lặp lại cao

Diện tích bề mặt riêng và kích thước hạt thích hợp

HỆ SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG

**PHA
TÍNH
(Chất
Hấp
Phụ)**

Các chất hấp phụ phổ biến

**Nhôm
oxide**

**Phân cực và có tính lưỡng tính
Hoạt tính phụ thuộc rất lớn
vào hình dạng và độ ẩm.
Dùng trong sắc ký dạng ʁ**

**Silicagel
 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$**

**Hấp phụ tốt sản phẩm dầu mỡ,
acid béo và ester của chúng,
các amin thơm và các hợp chất
hữu cơ khác...**

HỆ SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG

Các chất hấp phụ phổ biến

PHA TÍNH (Chất Hấp Phụ)

Than Hoạt Tính

Bề mặt riêng 1300–1700 m²/ g,
được điều chế từ gỗ, lignin,
xương, than đá, than nâu...

Hấp phụ rất tốt nhưng kém ổn
định và màu quá đen.
Thường dùng tách các chất cao
phân tử hoặc chất thơm ra khỏi
các chất có phân tử lượng thấp

Còn có thể dùng MgO, MgCO₃, CaCO₃,
bột talc ... và các chất hấp phụ biến
tính, ví dụ như Silicagel tẩm bạc nitrate
dùng tách các olefin ra khỏi parafin

HỆ SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG

Yêu cầu đối với pha động

PHA ĐỘNG

- độ tinh khiết cao
- hòa tan tương đối tốt tất cả các cấu tử PT
- bị hấp phụ tối thiểu trên pha tĩnh
- không phản ứng hoá học với chất tan và chất hấp phụ

Để tăng khả năng tách, rửa giải bằng nhiều dung môi theo thứ tự khả năng giải hấp tăng dần. Dung môi có hằng số điện môi càng lớn có khả năng giải hấp càng cao khi chất hấp phụ càng phân cực

Thường dùng kỹ thuật chân không hay áp suất cao để bơm pha động qua cột (SK lỏng cao áp)

HỆ SẮC KÝ HẤP PHỤ LỎNG

Dãy elutrop của Trappe

**PHA
ĐỘNG**

STT	Dung môi	ϵ	ST T	Dung môi	ϵ
01	Nước	81,0	11	Dioxane	-
02	Acid acetic	31,2	12	Chloroform	5,2
03	Ethylene Glycol	-	13	Benzene	2,3
04	Rượu metylic	31,2	14	Toluen	2,3
05	Rượu etylic	25,8	15	TrichlorEthylene	3,4
06	Rượu n-propylic	22,8	16	CCl ₄	2,2
07	Acetone	21,5	17	CS ₂	-
08	DichlorEthane	10,4	18	Cyclohexane	2,0
09	Ethyl Acetate	6,1	19	n - Pentane	-
10	Ether Etylic	4,4	20	Ether dầu hỏa	1,9

KT THỰC NGHIỆM & ỨNG DỤNG

CỘT SẮC KỸ HẤP PHỤ VÀ KT TÁCH

Cột SK bằng thủy tinh, thép, nhôm, đồng, chất dẻo, kim loại ..., có dạng hình trụ hoặc hình nón. Chiều dài cột L từ vài cm tới 10-20m; đường kính cột d từ vài mm tới 10-20cm

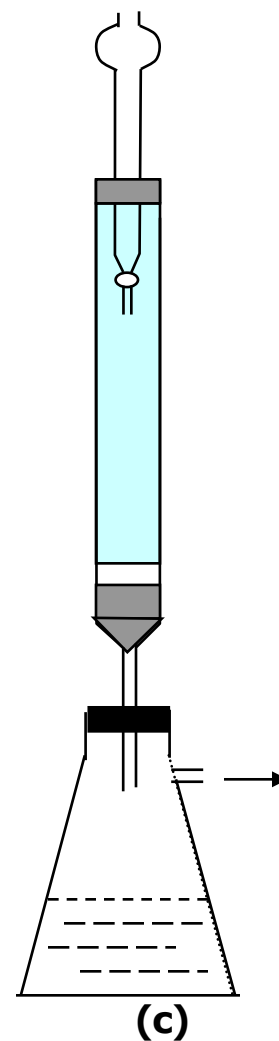
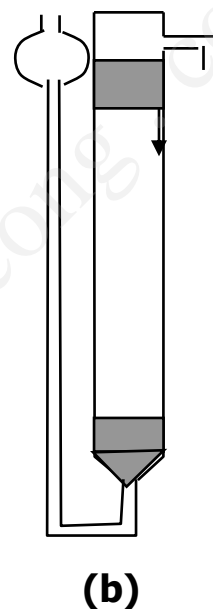
Theo kinh nghiệm:

$$\frac{L}{d} = 40 - 100$$

Quá trình tách có thể được thực hiện theo PP đi xuống hoặc đi lên
Tăng vận tốc của dung môi bằng kỹ thuật chân không hoặc kỹ thuật cao áp

KT THỰC NGHIỆM & ỨNG DỤNG

CỘT SẮC KÝ HẤP PHỤ VÀ KT TÁCH



Các loại cột sắc ký hấp phụ: cột sắc ký đi xuống (a); cột sắc ký đi lên (b); cột làm việc ở chân không (c)



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.2 SẮC KÝ PHÂN BỐ (TRÊN CỘT)

- Nguyên tắc
- Hệ sắc ký phân bố trên cột
- Kỹ thuật thực nghiệm & ứng dụng



NGUYÊN TẮC

Dựa trên sự phân bố không giống nhau của chất tan giữa φ_s lỏng và φ_m lỏng không trộn lẫn vào nhau. φ_s lỏng được hấp phụ trên bề mặt chất rắn mang hoặc liên kết hoá học với chất mang

Đường đẳng nhiệt phân bố thường tuyến tính, nhưng cũng có thể bị lõm hoặc lồi do sự phân ly hoặc sự liên hợp của các chất trong dung môi

Lý thuyết SK phân bố thường được xem là lý tưởng

HỆ SẮC KÝ PHÂN BỐ TRÊN CỘT

Bao gồm chất mang, φ_s lỏng và φ_m lỏng

Để bảo đảm tính ổn định của hệ:

(1) trộn φ_s và φ_m trước khi cho cả hai đi qua mẫu

(2) cho φ_s liên kết hoá học với chất mang (φ_s liên kết)

Chất mang phải có bề mặt riêng lớn, kích thước hạt nhỏ (1- 200 μ m), thường dùng diatomite, thủy tinh xốp, silicagel, nhôm oxide...

HỆ SẮC KÝ PHÂN BỐ TRÊN CỘT

Chất mang ưa nước được dùng khi φ_s là nước còn φ_m là dung môi hữu cơ

VD chất mang là silicagel hoặc bột xenluloze dùng tách hỗn hợp các chất phân cực như acid amin, dẫn xuất của piridin...; φ_m là phenol bão hòa nước hoặc các dung môi khác

Chất mang kỵ nước được dùng khi φ_s là các chất lỏng không phân cực như eter dầu hỏa, dầu parafin... còn φ_m là dung môi phân cực hoặc nước...

VD, để tách các acid béo cao phân tử, chất mang thường là bột cao su, φ_s là benzene, φ_m là hỗn hợp rượu etylic – nước

Pha động có độ nhớt càng thấp càng có lợi về mặt động học, vì độ hiệu nghiệm của cột tăng lên

KT THỰC NGHIỆM & ỨNG DỤNG

CÁCH CHUẨN BỊ PHA TĨNH

Hòa tan φ_S vào dung môi dễ bay hơi và cho chất mang xốp vào DD thu được

Cho bay hơi dung môi (đun nóng hoặc hút chân không)

CỘT SẮC KÝ

Tương tự cột dùng trong sắc ký hấp phụ trên cột



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.3 SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

- Nguyên tắc
- Ionit
- Cơ chế trao đổi ion

NGUYÊN TẮC

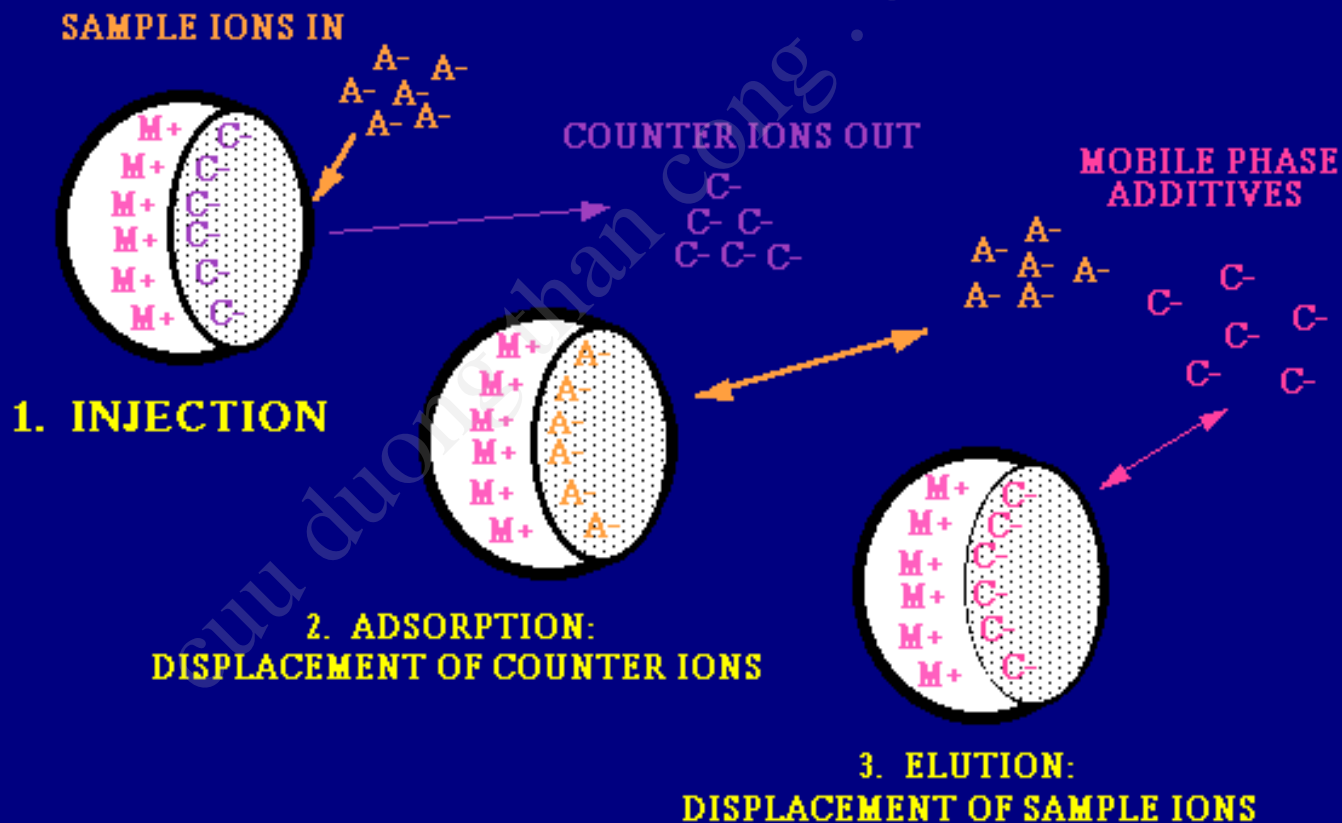
Dựa trên hiện tượng trao đổi thuận nghịch giữa các ion linh động của φ_s rắn với các ion trong DD PT khi cho DD này đi qua cột được nạp đầy φ_s

PP SK ion cho phép tách các ion và các phân tử phân cực dựa trên sự khác biệt về điện tích của các phân tử

φ_s : chất trao đổi ion (ionit)

NGUYÊN TẮC

ION EXCHANGE INSIDE A PORE IN THE STATIONARY PHASE



IONIT

Ionit là các hợp chất polymer vô cơ và hữu cơ không tan có chứa các nhóm hoạt động, gồm:

Ionit vô cơ tự nhiên
(zeolite, đất sét, glauconit...)

Ionit vô cơ tổng hợp
(alumosilicate như permutit, zeolite)

Ionit hữu cơ tự nhiên
(xenlulose, lông thú, than bùn, than nâu...)

Ionit hữu cơ tổng hợp
(nhựa trao đổi ion)

IONIT

NHỰA TRAO ĐỔI ION

Là hợp chất polymer hữu cơ gồm một sườn hydrocarbon (polystyrene) mang các nhóm chức hoạt động, nối với các ion linh động bằng lực hút tĩnh điện

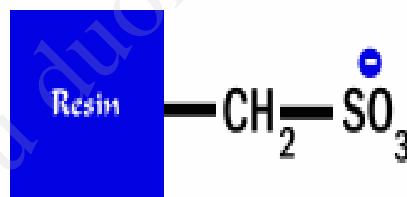
Gồm cationit, anionit, ionit lưỡng tính (trao đổi anion lẫn cation); ionit có chứa nhóm tạo phức; ionit chứa nhóm oxy hóa khử; ionit lỏng và màng trao đổi ion

Hiện nay, các loại nhựa trao đổi ion được sản xuất chủ yếu bằng PP ngưng tụ hoặc trùng hợp monome

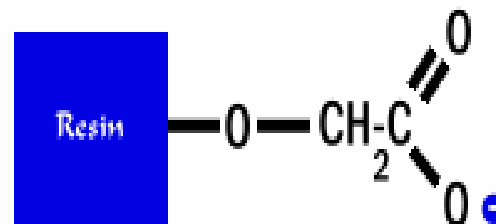
IONIT

NHỰA TRAO ĐỔI ION: Cationit

Chứa nhóm hoạt động R^- , ion linh động là M^+ . Anion R^- có thể là sulphonate (nhựa S), carboxylate (nhựa CM), nhóm phosphate hoặc amino diacetate:



S-cation exchanger



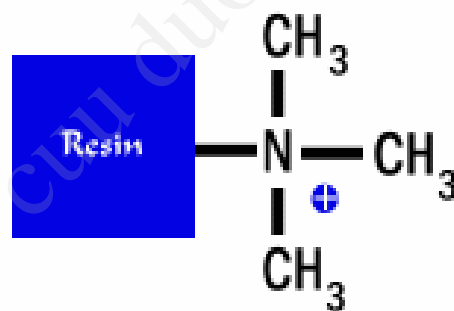
CM-cation exchanger

IONIT

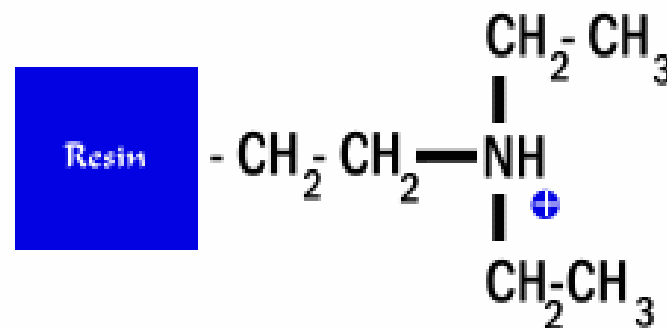
NHỰA
TRAO
ĐỔI
ION:
Anionit

Có dạng R^+X^- với R^+ thường là nhóm amine nên anionit mang tính base

Anionit phổ biến: nhựa Q (amine bậc 4);
nhựa DEAE



Q-anion exchanger



DEAE-anion exchanger

IONIT

NHỰA TRAO ĐỔI ION: **IONIT LƯỢNG TÍNH**

Có khả năng trao đổi cả cation lẫn anion, cũng được tổng hợp bằng hai PP ngưng tụ và trùng hợp

Ví dụ để tổng hợp ionit lưỡng tính bằng PP trùng hợp, đầu tiên trùng hợp styren hoặc chlorua vinyl với DVB rồi sau đó tiếp tục amin hóa và sulpho hóa sản phẩm thu được

IONIT

NHỰA TRAO ĐỔI ION: ĐẶC ĐIỂM

Cationit sulphonate (- SO₃H) là cationit acid mạnh, anionit amine tứ là anionit kiềm mạnh (hoạt động tốt trong mọi môi trường acid, base, trung tính)

Cationit carboxylate (-COOH) là cationit acid yếu (hoạt động tốt trong môi trường kiềm)

Anionit amine tam, nhị, nhất là các anionit kiềm yếu (hoạt động tốt trong môi trường acid)



CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

Mạng lưới của ionit là mạng không gian cao phân tử không đồng đều của các liên kết hydrocarbon

Khi ngâm nhựa vào nước, nhựa trương nở, các nhóm chứa ion trở nên linh động hơn và có thể bị phân ly một phần

Các phản ứng trao đổi xảy ra giữa các ion của pha tĩnh và các ion trong DD rất giống với các phản ứng trao đổi (P/U' hoá học) thông thường

Tính ưa nước của ionit được quyết định bởi cấu trúc của ionit

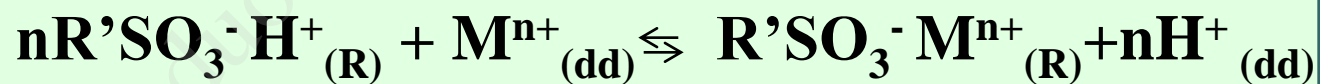
Về mặt định lượng, khả năng trao đổi của ionit là trao đổi theo đương lượng các chất

CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

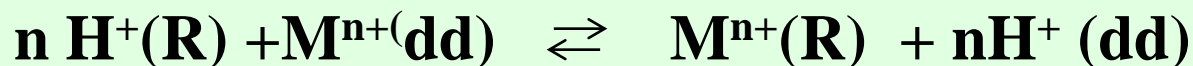
DUNG
DỊCH
CHỨA
MỘT
CẤU
TỬ

Cơ chế trao đổi ion của cationit

Giả sử cationit được sử dụng là nhựa sulphonate $R'SO_3H$. Sau khi được ngâm vào nước, nhựa bị trương, chuyển thành $R'SO_3^- H^+$. Khi tiếp xúc với DD chứa ion M^{n+} sẽ xảy ra phản ứng trao đổi như sau:



Hoặc



CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

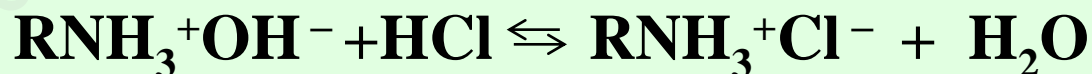
**DUNG
DỊCH
CHỨA
MỘT
CẤU
TỬ**

Cơ chế trao đổi ion của anionit

Amin của anionit tác dụng tương tự amin trong DD nước:



Ion OH^- trên anionit trao đổi với các anion trong DD:



CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

**DUNG
DỊCH
CHỨA
NHIỀU
CẤU
TỬ**

Để ước lượng khả năng tách hai ion M_1 ,
 M_2 ra khỏi nhau dùng hệ số tách với

$$\alpha = \frac{D_{M(1)}}{D_{M(2)}} \quad (6)$$

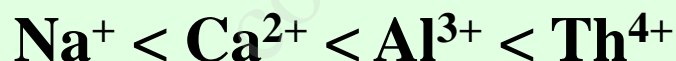
Nếu $D_{M(1)} \gg D_{M(2)}$ tức $\gg 1$ thì có thể
tách M_1 , M_2 ra khỏi nhau trên loại nhựa
đang xét

CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

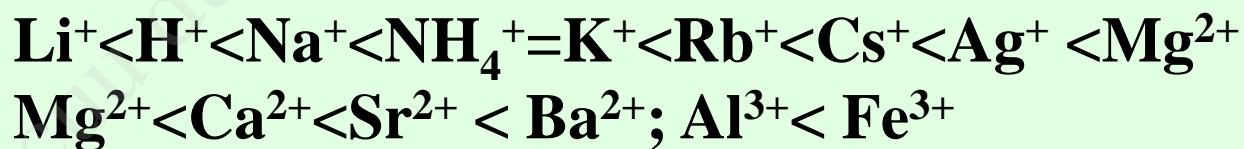
DUNG
DỊCH
CHỨA
NHIỀU
CẤU
TỬ
?

Ái lực của nhựa đối với ion

Nhựa sulphonate: Ái lực của nhựa tăng theo điện tích của cation



Đối với các cation có cùng điện tích: ái lực trao đổi tăng theo đường kính (đã hydrate hóa) của cation khi dung dịch loãng:



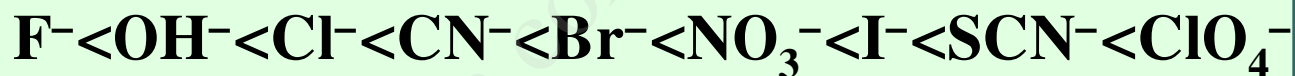
Nếu dd đậm đặc: ái lực trao đổi cation giảm dần và thứ tự có thể bị thay đổi

CƠ CHẾ TRAO ĐỔI ION

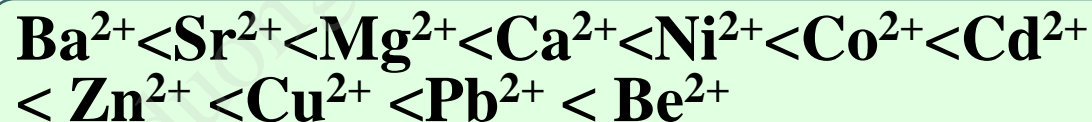
DUNG
DỊCH
CHỨA
NHIỀU
CÁI
TỬ

Ái lực của nhựa đối với ion

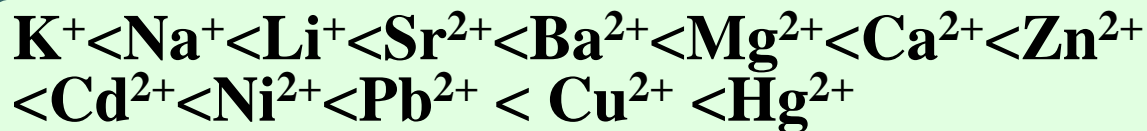
Nhựa ammonium tứ:



Nhựa phosphate:



Nhựa amino diacetate:



KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

KỸ THUẬT TÁCH

Tách tĩnh

Cho nhựa vào DD k/sát, khuấy đều. Sau khi CB trao đổi xảy ra, dùng biện pháp thích hợp để tách rời hai pha. Chỉ áp dụng được cho trường hợp DD k/sát chứa các ion kim loại có hệ số phân bố giữa hai pha khác nhau rõ rệt

Tách động

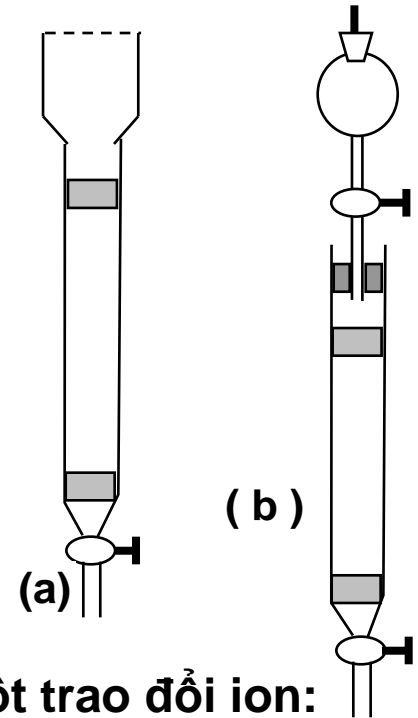
Dùng cột sắc ký, tách các cấu tử theo một trong ba cách: tiền lưu, đẩy và rửa giải

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Cột thủy tinh có $L/d_{tr} > 10$

CỘT
SẮC
KÝ
TRAO
ĐỔI
ION

Ở đáy ống có khoá để
DD thoát ra. Để tránh
ionit làm nghẽn cột,
phần dưới của cột
thường để bị thủy tinh
hoặc bông thủy tinh
dày 3 - 10mm



Cột trao đổi ion:
a) Hở phía trên;
b) Đóng bằng phễu
nhỏ giọt

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Chuẩn bị cationit

THỰC HIỆN QUÁ TRÌNH TÁCH

Ngâm trương nhựa trong dd NaCl bão hòa

Ngâm tiếp vào DD NaOH 5% (3-4 giờ).
Gạn DD kiềm, ngâm tiếp trong kiềm mới,...
cho đến khi DD gạn ra không còn màu

Rửa sạch kiềm bằng nước cất, HCl 5% rồi
HCl 10%, HCl 15% cho đến khi không còn
 Fe^{3+} (thử bằng $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)

Rửa bằng nước cất đến hết Cl^- tự do,
hết ion H^+

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

THỰC HIỆN QUÁ TRÌNH TÁCH

Chuẩn bị cationit

Nếu sử dụng cationit trong sinh hóa, dược, thực phẩm..., sau khi rửa hết ion H^+ tự do phải rửa tiếp cationit bằng dung dịch H_2O_2 5%, cồn etylic 95% và acetone

Chuyển cationit về dạng R- H bằng dung dịch HCl 5% và sau đó cũng phải rửa hết ion H^+ tự do

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Chuẩn bị anionit

THỰC HIỆN QUÁ TRÌNH TÁCH

Ngâm trương nhựa trong dd NaCl bão hòa, rửa nhựa bằng dd HCl 2% cho sạch Fe^{3+}

Rửa tiếp bằng dd NaOH 5% và nước cất

Anionit base mạnh chứa nhiều tạp chất hữu cơ gây cản trở cho quá trình tách, cần rửa thêm với cồn etylic

Không nên giữ anionit quá lâu ở dạng R-OH, vì ở dạng này anionit kém bền, nhất là ở nhiệt độ cao hơn 30°C

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Chuẩn bị cột

THỰC HIỆN QUÁ TRÌNH TÁCH

Sau khi được ngâm trương và làm sạch, *rót ionit vào cột cùng với nước* để tránh sự xuất hiện của bọt khí bao quanh hạt ionit (chiếm khoảng 2/3 thể tích cột). Phía trên của ionit để thêm một lớp bông thủy tinh

Ionit đã được làm sạch và làm khô để bảo quản thì vẫn phải được ngâm trương trong nước trước khi cho vào cột

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Trao đổi trên cột

Cho dung dịch khảo sát qua cột nhựa (2–3 ml / phút). Nên sử dụng lượng ionit thừa một ít so với tính toán

**Rửa giải
(Giải hấp ion ra khỏi ionit)**

Bằng acid có nồng độ khác nhau, hoặc một số chất hữu cơ có khả năng tạo phức với ion cần tách.... Rửa tiếp ionit bằng các dd thích hợp để đuổi hết dung dịch giải hấp

**THỰC
HIỆN
QUÁ
TRÌNH
TÁCH**

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

Tái sinh cột

Cationit

Cho chảy qua cột dd HCl 2- 4% (nhựa RH), hoặc dd NaCl 2 - 4% (nhựa RNa)

Anionit

Cho qua cột dd NaOH 2- 4% (nhựa RNH_2) hay dd HCl, NaCl 2 - 4% (nhựa RCl)

Việc tái sinh ionit nên thực hiện lại vào giai đoạn đầu của quá trình sắc ký

THỰC
HIỆN
QUÁ
TRÌNH
TÁCH

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

XĐ MỘT SỐ ĐẶC TRƯNG CỦA IONIT

Dung lượng trao đổi ion của ionit

Biểu diễn bằng số mili đương lượng phân tử mà ionit có thể trao đổi tính cho một đơn vị khối lượng hay một đơn vị thể tích của ionit (phổ biến nhất là mđlg/ g):

Dung lượng trao đổi tĩnh: cho một lượng ionit XĐ vào một thể tích không đổi DD bão hòa ion, lắc mạnh cho đến khi nhựa trở nên bão hòa ion. Thường sử dụng để XĐ dung lượng trao đổi toàn phần, dung lượng trao đổi theo từng nhóm trao đổi và dung lượng trao đổi CB trong những điều kiện khác nhau

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

XĐ
MỘT
SỐ
ĐẶC
TRƯNG
CỦA
IONIT

Dung lượng trao đổi ion của ionit

Dung lượng trao đổi động: cho DD bão hòa ion chảy liên tục qua một lớp ionit xác định chứa trong cột

Dung lượng trao đổi được XĐ khi *bắt đầu xuất hiện ion trao đổi đầu tiên trong dung dịch thoát ra ngoài cột.*

PP được sử dụng để XĐ dung lượng trao đổi toàn phần (tương ứng thời điểm DD đi ra khỏi cột đã bão hòa ion trao đổi) và tốc độ trao đổi ion của ionit. Lưu ý chỉ điều chỉnh khóa một lần để cố định vận tốc qua cột



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.4 SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

- Nguyên tắc
- Hệ sắc ký rây phân tử
- Kỹ thuật thực nghiệm & ứng dụng

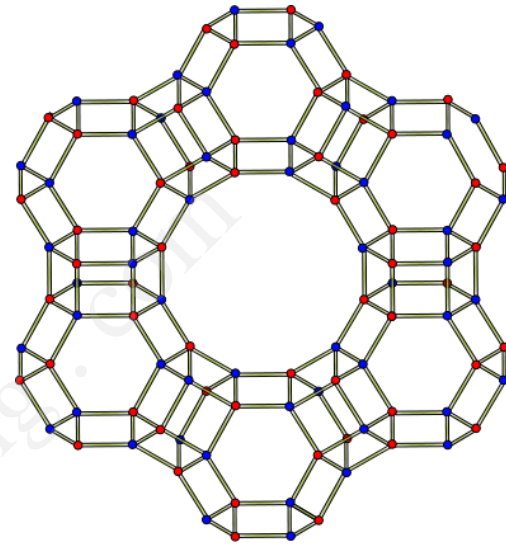
NGUYÊN TẮC

Sắc ký rây phân tử (sắc ký gel, sắc ký thẩm thấu gel, lọc gel ...) là PP tách dựa trên sự khác nhau về kích thước phân tử của các chất:

Cho DDPT đi qua các vật liệu có khả năng tạo thành bộ khung gel hoặc các rây phân tử. φ_s là dung môi ở trong các lỗ của gel, còn φ_m cũng chính là dung môi chạy qua

Các phân tử có kích thước lớn hơn lỗ gel chỉ khuếch tán vào các kẽ hở giữa các hạt rắn xấp, còn các phân tử có kích thước bé hơn “cửa sổ “ có thể đi xuyên vào các lỗ của gel vào sâu bên trong

NGUYÊN TẮC



Khi φ_m đi ngang qua, các cấu tử được rửa giải theo thứ tự giảm dần của kích thước phân tử (các phân tử có kích thước lớn hơn lỗ gel sẽ theo φ_m ra đầu tiên)

Phân tử có cấu trúc không gian gần giống nhau, thứ tự rửa giải sẽ giảm theo chiều giảm M

HỆ SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

CÁC LOẠI GEL VÀ RÂY PHÂN TỬ

Phổ biến nhất hiện nay bao gồm các khung gel hữu cơ (dextran, polyacrylamit, polyvinylacetate, polystirol...) và rây phân tử vô cơ (zeolite tổng hợp, thủy tinh xốp, silicagel đại xốp...)

Zeolite tổng hợp được dùng để tách chất khí. Các chất xốp vô cơ, hữu cơ, polymer tổng hợp dùng tách các chất vô cơ và hữu cơ, còn các nhóm polymer ưa nước dùng để tách các chất có hoạt tính sinh học

HỆ SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

PHA TĨNH VÀ PHA ĐỘNG

Dung môi (không quan trọng lắm), có thể là:

Nước

**Dùng tách các biopolymer,
rượu polyvinyl**

Toluene

**tách cao su, polystyrol, ester
polyvinyl...**

Chloroform

**tách silicon, nhựa epoxy,
polyeter béo...**

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

THIẾT BỊ

Tương tự với thiết bị dùng trong các dạng LC khác:

Dùng cột sắc ký thông thường (bằng thủy tinh $L = 20 - 200\text{cm}$, $d = 5 - 50\text{mm}$)

Hoặc dùng máy HPLC để phân tích

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM

CÁCH TIẾN HÀNH

Nạp gel hoặc các rây phân tử vào cột dưới hình thức “vũ” và gõ nhẹ

Mở khóa cho dung môi chảy qua cột, *luôn luôn giữ lại một ít dung môi trên gel hoặc các rây phân tử để không khí không lọt vào*

Đưa mẫu vào bằng micropipet hoặc bơm vi lượng trong lúc d/môi vẫn tiếp tục đi qua (đặt bình hứng có chia độ ở phía dưới cột)

(thường tách riêng từng phân đoạn 0,5 – 1,0 ml dung dịch đi ra ứng với các kích thước phân tử khác nhau)



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

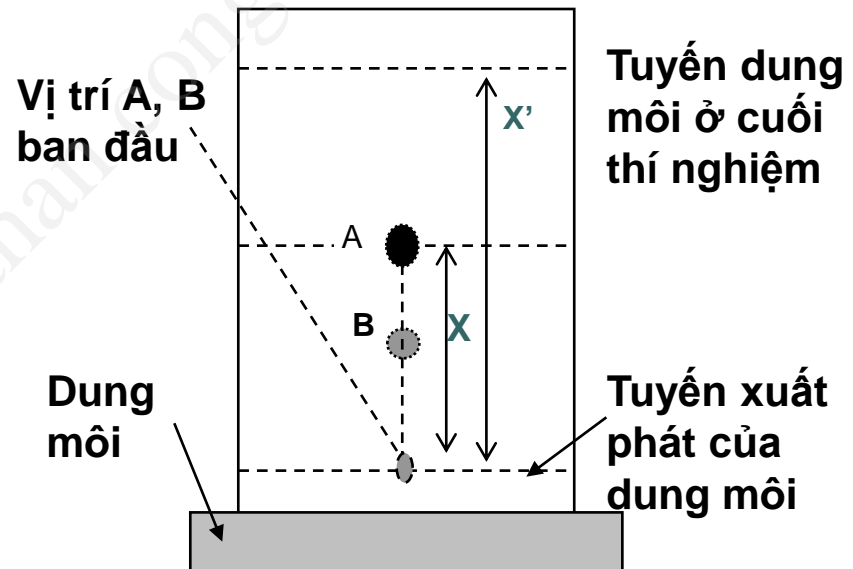
20.5 SẮC KÝ TRÊN BẢN MỎNG

- Nguyên tắc
- Hệ sắc ký bản mỏng
- Kỹ thuật thực nghiệm
- Định tính & định lượng

NGUYÊN TẮC

Nguyên tắc tương tự sắc ký hấp phụ trên cột, nhưng sự hình thành sắc đồ được tiến hành trên bản phẳng

Đại lượng đặc trưng cho QT di chuyển của các cấu tử là hằng số phân bố vùng

$$R_f(A) = x / x'$$


Sắc đồ của dd chứa 2 cấu tử A, B được tác bằng SK bản mỏng

HỆ SẮC KÝ BẢN MỎNG

Bản

**Bảng thủy tinh / lá nhôm / lớp màng polyester.
Dùng kính (mờ) tốt nhất vì có thể rửa sạch dễ dàng, sử dụng lại được và bền với các thuốc thử hiện màu**

Pha tĩnh

Pha tĩnh có thể là silicagel, oxyd nhôm , xenlulose, tinh bột, sephadex (rây phân tử) và cả nhựa trao đổi ion...được trải thành lớp mỏng trên bản

HỆ SẮC KÝ BẢN MỎNG

Pha động

Thường dùng hỗn hợp hai hay ba dung môi để làm pha động

Ví dụ, để tách các acid amin người ta dùng hỗn hợp n – butanol với acid acetic và nước làm dung môi. Khi phân tích các ion vô cơ người ta dùng dung dịch đệm (trong nước) có pH xác định

CÁCH TIẾN HÀNH

CHUẨN BỊ BẢN

Làm sạch bề mặt kính: ngâm vào nước cất, rửa bằng dung dịch rửa thích hợp (ví dụ như sulphochromic), làm sạch hết chất mỡ, rửa sạch lại bằng nước cất và sấy khô

CHUẨN BỊ PHA TÍNH

Với pha tính không dính, trải pha tính lên mặt kính rồi dùng trục lăn cán pha tính thành lớp mỏng

Với lớp pha tính dính, có thể sử dụng biện pháp quét vữa, tưới vữa, nhúng bản vào vữa hoặc phun vữa loãng lên bản (các mép của tấm kính được chừa trống không phủ vữa khoảng 5mm)

CÁCH TIẾN HÀNH

ĐƯA MẪU LÊN BẢN

Lượng mẫu thích hợp từ 0,1 μ g đến 50 μ g DD (dung môi là eter, chloroform, nước ...)

Thể tích dung dịch chấm lên bản từ 0,001ml đến 0,005ml (chấm dưới dạng điểm) và từ 0,1 – 0,2 ml (dưới dạng vạch, tức điểm này chấm cạnh điểm kia)

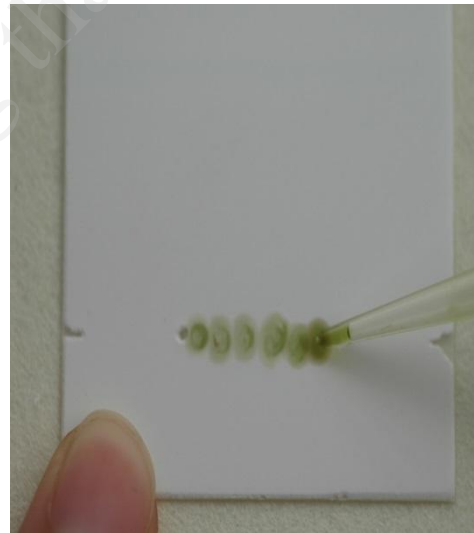
Mẫu phải được lấy bằng mao quản thủy tinh hoặc micropipet có độ chính xác cao

CÁCH TIẾN HÀNH

ĐƯA
MẪU
LÊN
BẢN

Kẻ 2 đường bút chì cách mép trên và mép dưới của bản mỏng 2 – 3 cm

Dùng pipet Pasteur nhỏ dd phân tích trên đường xuất phát cách rìa bản 2 – 3 cm

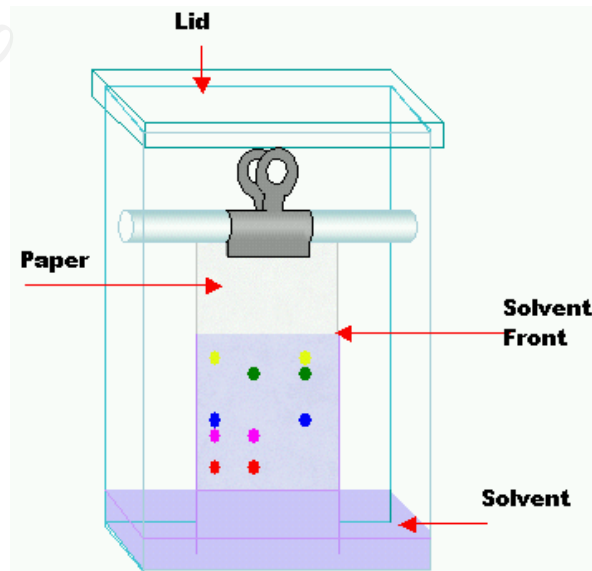


CÁCH TIẾN HÀNH

PP sắc ký đi lên

CÁCH TRIỂN KHAI SẮC ĐỒ

Đặt bản trong bình sắc ký -bình thủy tinh có nút nhám- chứa dung môi, mức dung môi ngập bản khoảng 0,5 – 0,7 cm (dưới điểm xuất phát 0,8 – 1,0 cm) (ngiêng 15^0 và dựa vào thành bình) hoặc treo trong bình bằng móc



CÁCH TIẾN HÀNH

CÁCH TRIỂN KHAI SẮC ĐỒ

PP sắc ký đi lên

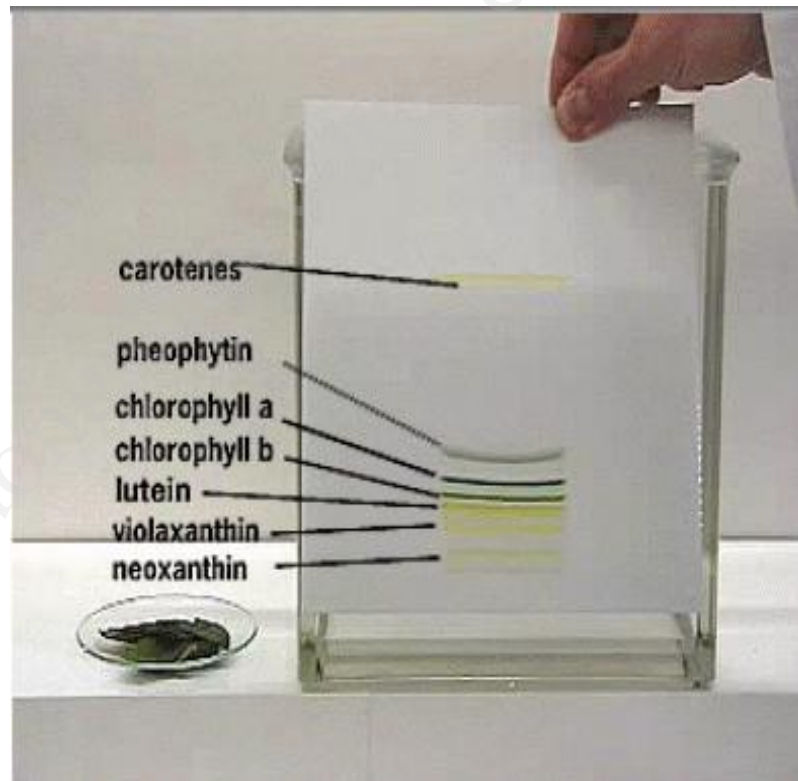
Khoảng đường di chuyển của dung môi qua bản <10-12cm vì sau đó tốc độ chuyển động của dung môi rất chậm, vết sắc ký bị loang rộng và R_f bị dao động nhiều

Đến chiều cao thích hợp, lấy bản ra khỏi bình, ghi nhận tuyến dung môi, làm khô bản, cho hiện màu nếu cần

CÁCH TIẾN HÀNH

PP sắc ký đi lên

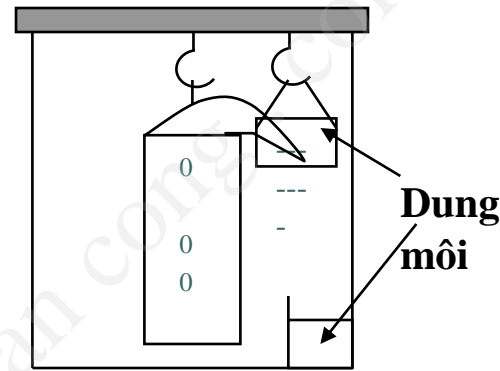
CÁCH
TRIỂN
KHAI
SẮC
ĐỒ



CÁCH TIẾN HÀNH

PP sắc ký đi xuống

CÁCH TRIỂN KHAI SẮC ĐỒ



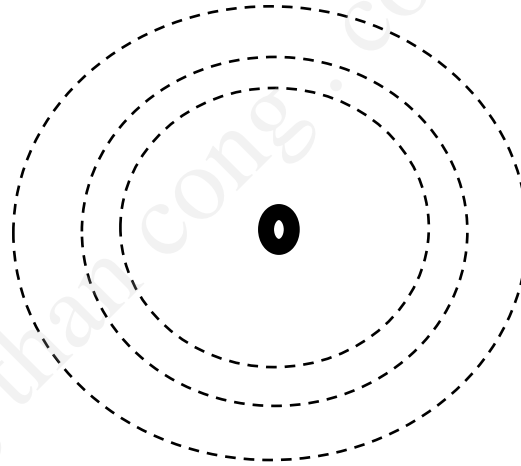
Phương pháp sắc ký
đi xuống

Dung môi thấm vào bản nhờ băng giấy nối với bản và nhúng vào lọ dung môi (được treo bằng móc), chuyển động từ trên xuống dưới do tác dụng của lực mao quản và lực trọng trường

CÁCH TIẾN HÀNH

PP sắc ký nằm ngang

**CÁCH
TRIỂN
KHAI
SẮC
ĐỒ**



Để dung môi bay hơi tự do, dưới tác dụng của lực mao quản, dung môi sẽ chuyển động hướng từ tâm ra ngoài và các cấu tử sẽ phân bố trên bản mỏng dưới dạng các vòng đồng tâm

CÁCH TIẾN HÀNH

CÁCH TRIỂN KHAI SẮC ĐỒ

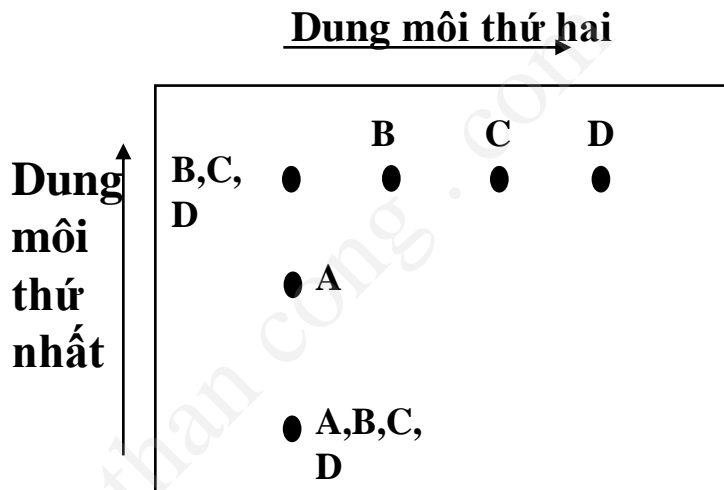
PP sắc ký đa bậc

Kỹ thuật tách được tiến hành với nhiều dung môi (được sử dụng theo thứ tự độ phân cực tăng dần)
Giá trị R_f sẽ tính riêng đối với từng dung môi

CÁCH TIẾN HÀNH

PP sắc ký hai chiều (vuông góc)

CÁCH TRIỂN KHAI SẮC ĐỒ



PPP sắc ký hai chiều

Khi DD phân tích chứa 10 cấu tử trở lên, thường dùng PP sắc ký hai chiều để tách chúng: sau khi cho chạy một chiều với dung môi thứ nhất, xoay bản 90° và chạy tiếp với hệ dung môi thứ hai

CÁCH TIẾN HÀNH

HIỆN SẮC ĐỒ

Đối với những chất được sắc ký không màu hoặc có màu rất nhạt thì sau khi triển khai phải làm hiện sắc đồ bằng PP thích hợp (hoá học, quang học, phóng xạ...)

Cách phổ biến nhất là phun thuốc hiện màu lên toàn bản dưới dạng các hạt sương rất nhỏ

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG

ĐỊNH TÍNH

So sánh chuẩn với mẫu ngay trên cùng một bản sắc ký để đảm bảo điều kiện tách giống hệt nhau

Nên tiến hành thí nghiệm với R_f nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,8

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG

ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trực tiếp trên sắc đồ

Đánh giá diện tích S của sắc đồ hoặc cường độ của vết màu xuất hiện bằng mắt thường hoặc dùng máy đo...

- Pha tĩnh ở trạng thái rắn được trải thành lớp mỏng trên các bản thủy tinh, bản kim loại hay chất dẻo

- Phương pháp đo S : trong khoảng lượng chất sử dụng $m = 1 - 100\mu\text{g}$, giữa m và diện tích S có quan hệ tuyến tính sau đây:

$$S = a \lg m + b \quad (7)$$

a, b – hằng số thực nghiệm

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG

ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trực tiếp trên sắc đồ

Xây dựng đồ thị $S = f(\lg m)$ đối với các DD chuẩn có nồng độ khác nhau
Xác định nồng độ mẫu dựa vào đường chuẩn hoặc bằng PP bình phương cực tiểu

Ngoài ra, còn có thể dùng:
+ PP *densitomet*
+ PP huỳnh quang
+ PP đo độ phóng xạ... để định lượng trực tiếp trên sắc đồ

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG

ĐỊNH LƯỢNG

PP tách chất khỏi sắc đồ

Chuyển tất cả phần chất cần phân tích trên bản mỏng vào bình và dùng PP thích hợp (đo màu, đo huỳnh quang, cực phổ, sắc ký khí...) để xác định hàm lượng chất



CHƯƠNG 20

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

20.6 SẮC KÝ GIẤY

- Nguyên tắc
- Hệ sắc ký giấy
- Cách tiến hành
- Định tính & định lượng



NGUYÊN TẮC

Sắc ký giấy thuộc dạng sắc ký phân bố lỏng lỏng mà chất mang pha lỏng là giấy sắc ký

Trong quá trình sắc ký các cấu tử được tách dọc theo lớp mỏng của tờ giấy

Có thể áp dụng lý thuyết tách trong sắc ký phân bố trên cột cho sắc ký giấy

HỆ DUNG MÔI SẮC KÝ GIẤY

Giấy sắc ký phải tinh khiết hoá học, trơ với các cấu tử của DD và dung môi sắc ký, đồng nhất về tỷ trọng để dung môi di chuyển với vận tốc nhất định, có hướng sợi trùng với hướng chuyển động của dung môi

Giấy sắc ký thuộc loại hydrophil ưa nước (hấp phụ ẩm trong không khí đến 20 -25% khối lượng giấy) nên nếu ψ_s lỏng là nước, không cần làm ẩm giấy trước φ_s

Nếu φ_s lỏng là chất hữu cơ, phải tẩm giấy bằng các chất kỵ nước như parafin, dầu thực vật

HỆ DUNG MÔI SẮC KÝ GIẤY

Dung môi động và dung môi tĩnh phải không trộn lẫn. Để tách tốt, các cấu tử của mẫu khảo sát phải có tính tan khác nhau rõ rệt trong hệ dung môi đã chọn

Tính tan của các cấu tử trong φ_m phải bé hơn tính tan của chúng trong φ_s và nói chung là nên ở mức vừa phải

Để tách các chất tan trong nước, thường chọn φ_m là dung môi hữu cơ còn φ_s là nước. Ngược lại, tách các chất tan trong dung môi hữu cơ, φ_m là nước và φ_s là dung môi hữu cơ



CÁCH TIẾN HÀNH SẮC KÝ GIẤY

Tương tự phương pháp sắc ký bản mỏng. Cách định tính và định lượng cũng hoàn toàn tương tự

Ngoài ra, có thể kết hợp PP sắc ký giấy với PP điện di (điện di trước sắc ký sau) cho kết quả tách rất cao