



# ĐẠI CƯƠNG VỀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ



# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

**19.1 Định nghĩa – Mục đích**

**19.2 Phân loại**

**19.3 Một số khái niệm**

**19.4 Kỹ thuật tách bằng sắc ký**

**19.5 Peak sắc ký: các đặc trưng cơ bản**

**19.6 Độ phân giải của cột**

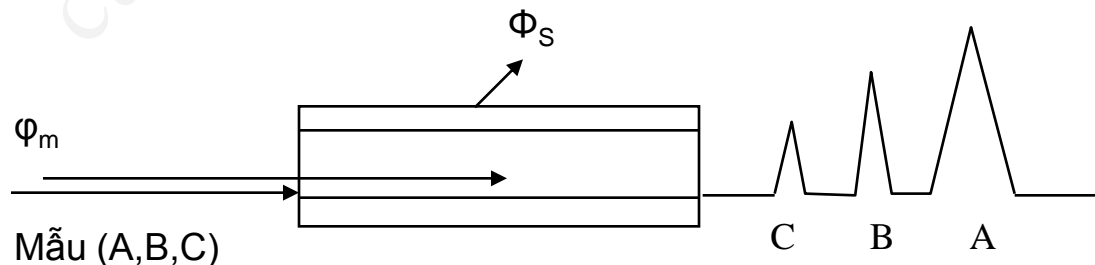
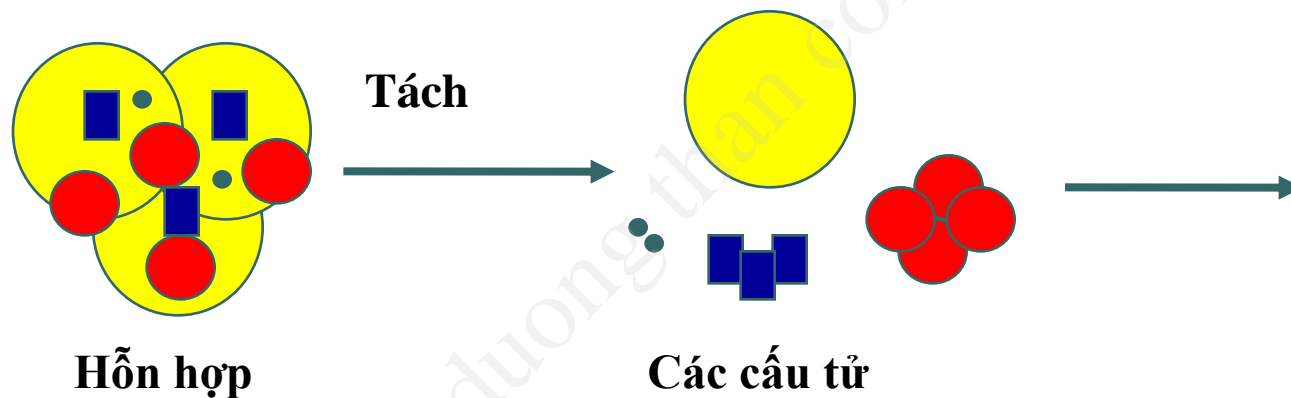
**19.7 Kỹ thuật thực nghiệm & ứng dụng**

**19.8 Tối ưu hóa quá trình sắc ký**

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

### 19.1 ĐỊNH NGHĨA-MỤC ĐÍCH



# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

### 19.2 PHÂN LOẠI

- Dựa vào phương tiện tách
- Dựa vào trạng thái của  $\varphi_s$  &  $\varphi_m$  và cân bằng chuyển chất giữa các pha
- Dựa theo cơ chế của quá trình tách
- Dựa trên kỹ thuật tách sắc ký



# PHÂN LOẠI DỰA VÀO PHƯƠNG TIỆN TÁCH

**Sắc ký cột**

**Sắc ký giấy**

**Sắc ký bản mỏng**

**(Sắc ký  
phẳng)**

# PHÂN LOẠI DỰA VÀO TT CỦA $\varphi_s$ & $\varphi_m$ VÀ CB CHUYỂN CHẤT GIỮA CÁC PHA

## PHÂN LOẠI DỰA VÀO TRẠNG THÁI CỦA PHA ĐỘNG

Sắc ký khí GC  
(Gas Chromatography)

$\varphi_m$ : khí

Tiến hành trên cột

Sắc ký lỏng LC  
(Liquid Chromatography)

$\varphi_m$ : lỏng

Tiến hành trên cột  
& bản phẳng

# PHÂN LOẠI DỰA VÀO TT CỦA $\varphi_s$ & $\varphi_m$ VÀ CB CHUYỂN CHẤT GIỮA CÁC PHA

## PHÂN LOẠI DỰA VÀO TRẠNG THÁI CỦA PHA TÍNH

Sắc ký  
HẤP PHỤ  
 $\varphi_s$ : rắn  
(chất  
hấp phụ)

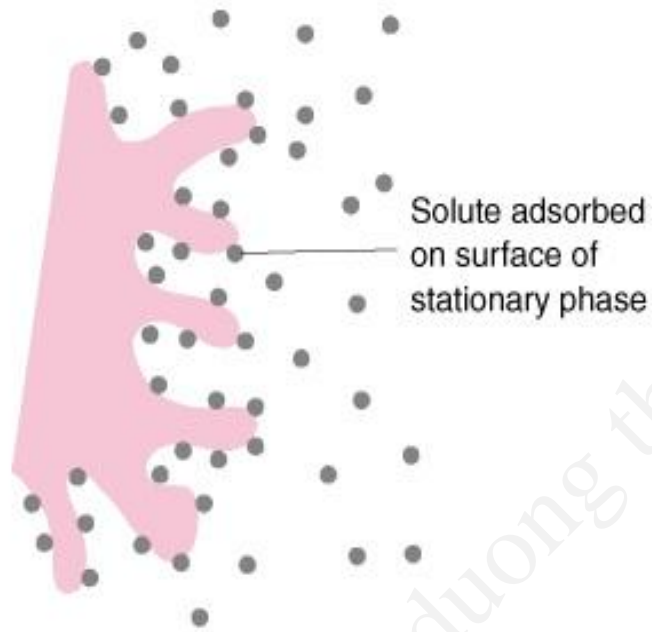
Sắc ký  
PHÂN BỐ  
 $\varphi_s$ : lỏng

Sắc ký  
TRAO ĐỔI  
ION  
 $\varphi_s$ : nhựa  
trao đổi ion

Sắc ký  
RÂY PHÂN TỬ  
 $\varphi_s$ : vật liệu rắn  
độ xốp lớn có  
các lỗ kích  
thước xác định

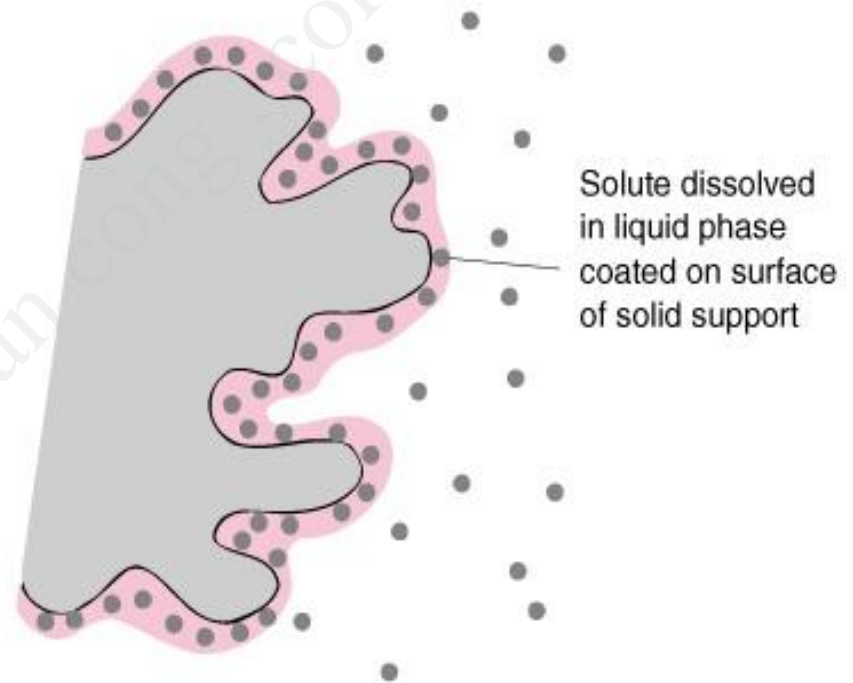
# PL THEO CƠ CHẾ CỦA QT TÁCH

(Tương tác giữa chất sắc ký với  $\varphi_s$  &  $\varphi_m$ )



Adsorption chromatography

**Sắc ký hấp phụ**



Partition chromatography

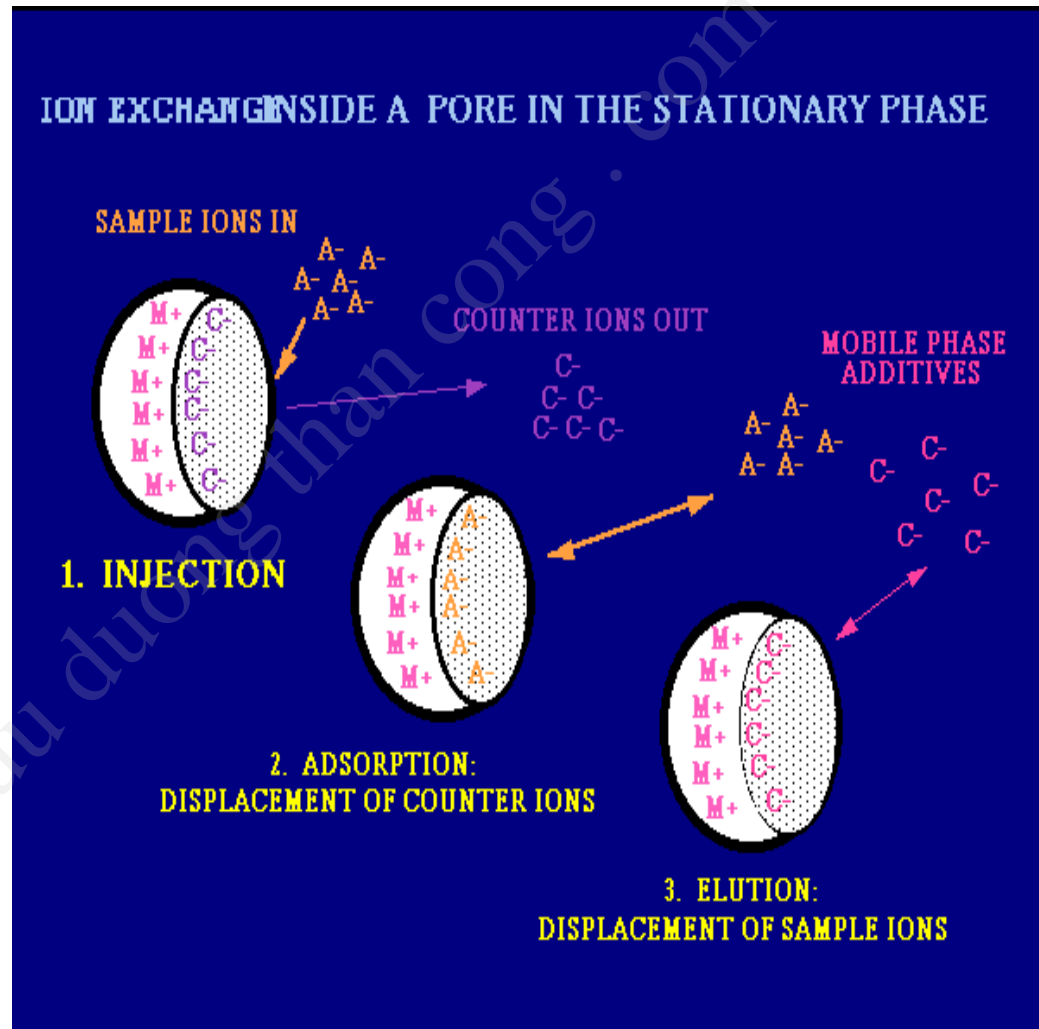
**Sắc ký phân bố**



# PL THEO CƠ CHẾ CỦA QT TÁCH

(Tương tác giữa chất sắc ký với  $\varphi_s$  &  $\varphi_m$ )

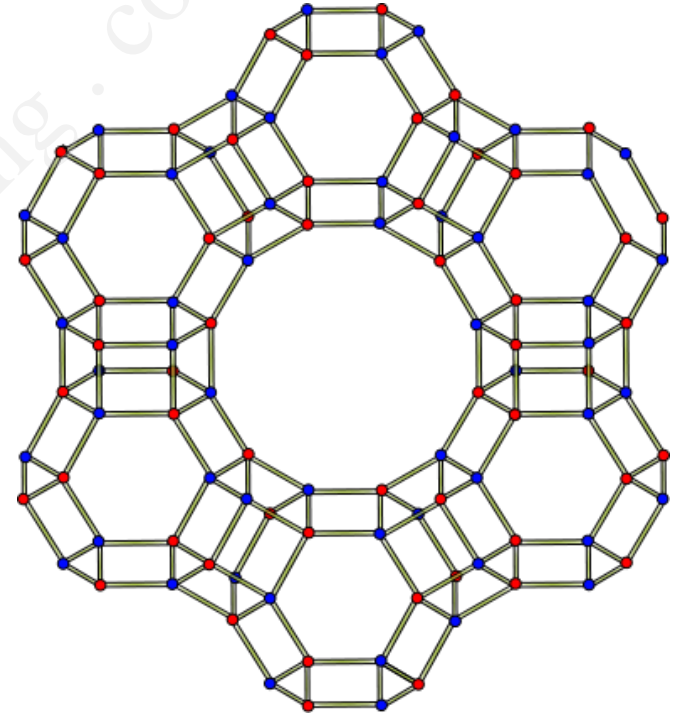
SẮC  
KÝ  
TRAO  
ĐỔI  
ION



# PL THEO CƠ CHẾ CỦA QT TÁCH

(Tương tác giữa chất sắc ký với của  $\varphi_s$  &  $\varphi_m$ )

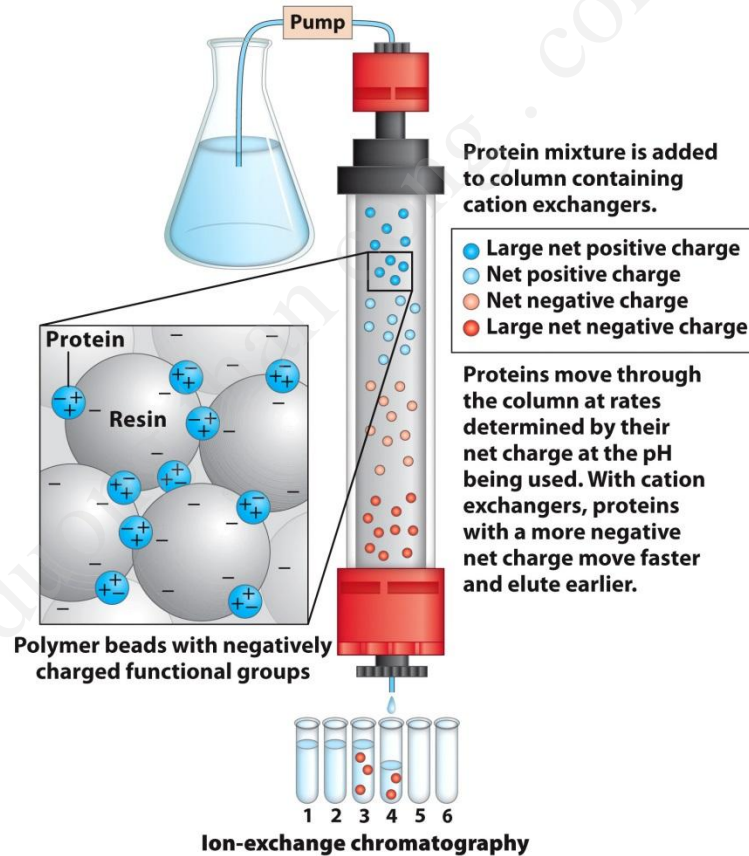
SẮC  
KÝ  
RÂY  
PHÂN  
TỬ  
(Sắc  
Ký  
gel)



# PL THEO CƠ CHẾ CỦA QT TÁCH

(Tương tác giữa chất sắc ký với của  $\varphi_s$  &  $\varphi_m$ )

SẮC  
KÝ  
RÂY  
PHÂN  
TỬ  
(Sắc  
Ký  
gel)



# PL THEO KỸ THUẬT TÁCH SẮC KÝ

(Dựa trên sự chuyển dịch tương đối của  $\varphi_m$  so với  $\varphi_s$  )

PP  
TIỀN  
LƯU

PP  
RỬA  
GIẢI

PP  
ĐẨY

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

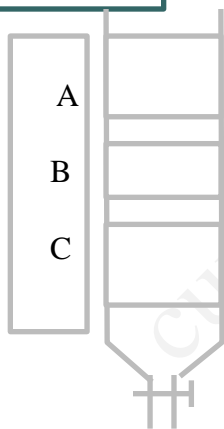
### 19.3 MỘT SỐ KHÁI NIỆM

- Sắc đồ
- Sắc phổ
- Sắc ký đồ:
  - \* Tích phân
  - \* Vi phân

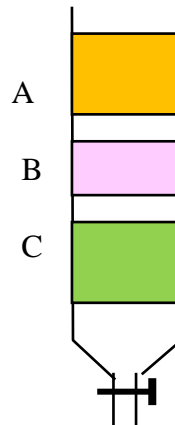
# SẮC ĐỒ

Các vùng riêng biệt có màu hoặc không màu trên cột hoặc trên mặt phẳng sau quá trình tách → kết luận sự hiện diện của các cấu tử trong DD phân tích

Thuốc thử



Sắc đồ không màu

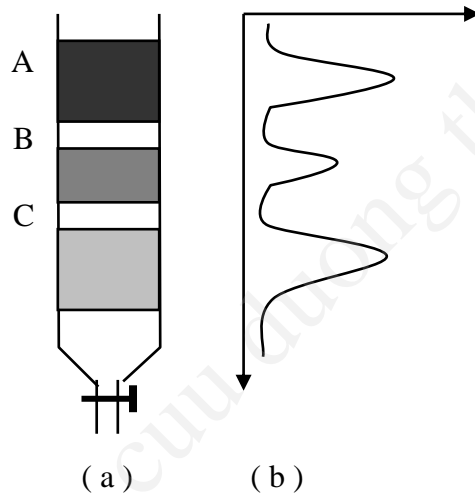


Sắc đồ có màu

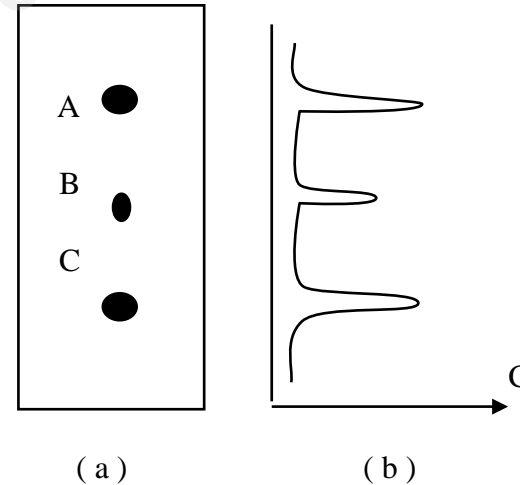
VD: đội  $K_3[Fe(CN)_6]$  qua cột có ion  $Fe^{2+}$  sẽ làm lớp hấp phụ nhuộm màu xanh tối

# SẮC PHỔ

**Đường biểu diễn sự phân bố nồng độ các cấu tử dọc theo cột hoặc trên mặt phẳng**



**Sắc đồ (a) và sắc phổ (b) trong sắc ký cột**



**Sắc đồ (a) và sắc phổ (b) trong sắc ký phẳng**



# SẮC KÝ ĐỒ

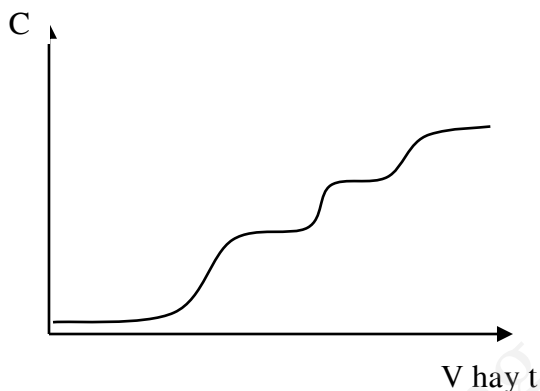
**Đường biểu diễn sự phụ thuộc của nồng độ chất đi ra khỏi cột sắc ký theo thể tích dung môi rửa giải hoặc thời gian rửa giải**

**SẮC KÝ ĐỒ TÍCH PHÂN**

**SẮC KÝ ĐỒ VI PHÂN**

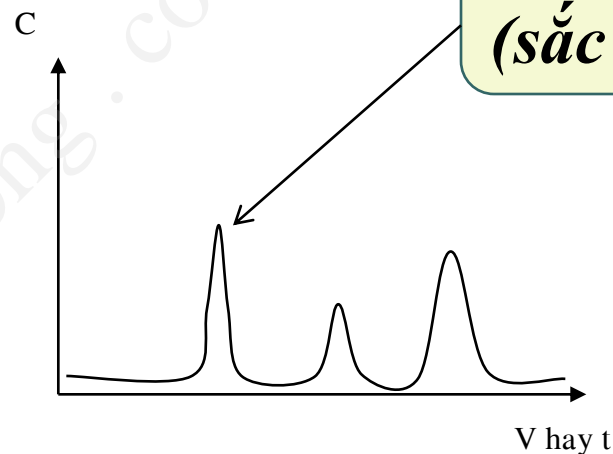


# SẮC KÝ ĐỒ



**Sắc ký đồ tích phân**

**Trục tung C (tổng nồng độ chất đã đi ra khỏi cột)**



**Sắc ký đồ vi phân**

**Trục tung C hoặc  $\frac{\Delta C}{\Delta t}$  (nồng độ chất trong từng phân đoạn dung dịch giải hấp)**

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

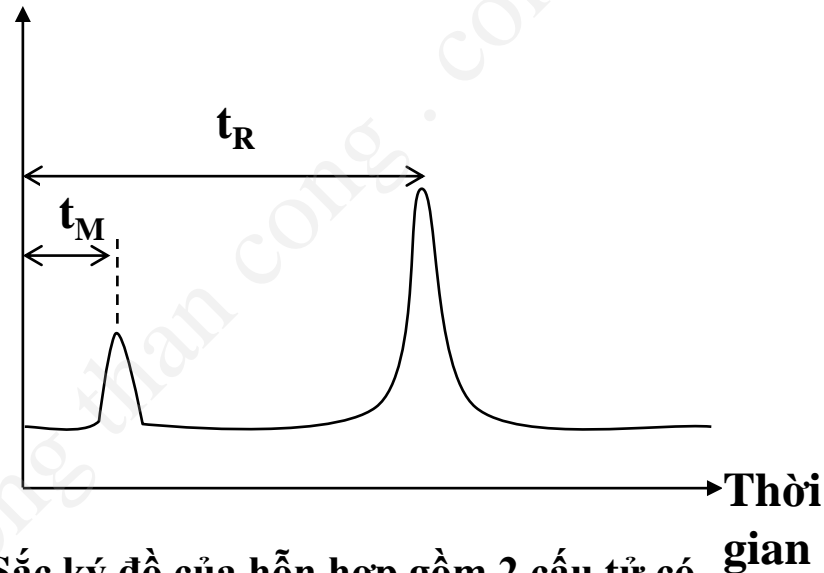
### 19.3 KỸ THUẬT TÁCH BẰNG SẮC KÝ

- Phương pháp tiền lưu
- Phương pháp đẩy
- Phương pháp rửa giải

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

**THỜI  
GIAN  
LƯU  
GIỮ**

Tín  
hiệu  
phát  
hiện



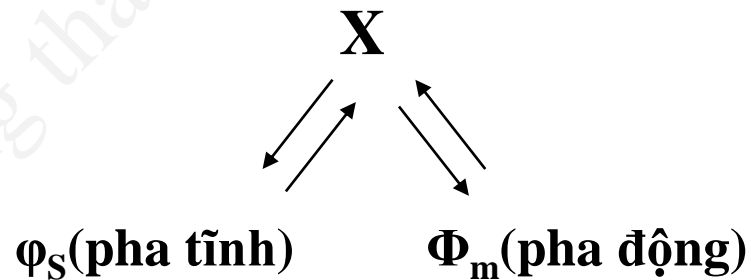
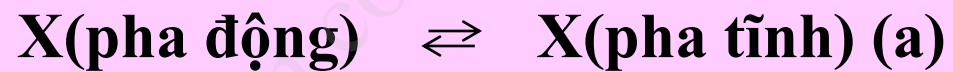
Sắc ký đồ của hỗn hợp gồm 2 cấu tử có  
một cấu tử không bị lưu giữ

**Hiệu  $t_R - t_M = t_R'$  :  
Thời gian lưu đã hiệu chỉnh**

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
PHÂN  
BỐ

Sự chuyển nồng độ chất phân tích X giữa pha động và pha tĩnh:



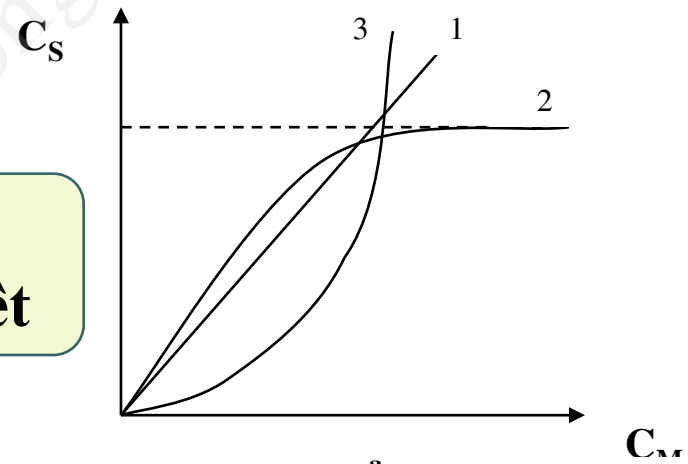
HSCB K của (a): *hệ số phân bố*, đặc trưng cho khả năng lưu giữ

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
PHÂN  
BỐ

$C_S, C_M$  – nồng độ cấu tử trong pha tĩnh  
và pha động

$C_S = f(C_M)$ :  
Đường đẳng nhiệt



Các đường đẳng nhiệt: (1)  
Henry ; (2) Langmuir ; (3)  
Freunlich

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
PHÂN  
BỐ

Sắc ký phân bố

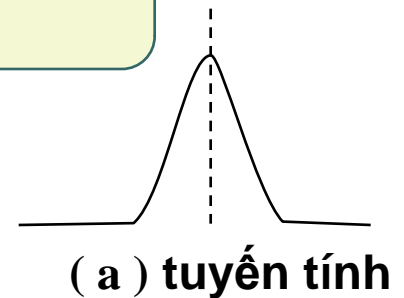
$$C_S = K C_M$$

Đường đẳng nhiệt  
thường tuyến tính  
(tuân theo PT Henry):

$$\Rightarrow K = \frac{C_S}{C_M}$$

**K:** hệ số phân bố, đặc trưng  
cho khả năng lưu giữ

Peak sắc ký  
đối xứng



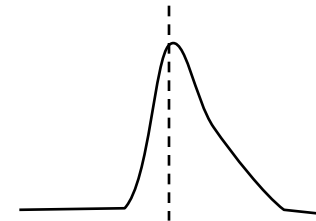
# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
PHÂN  
BỐ

Sắc ký hấp phụ

1. Đường đẳng nhiệt  
**Langmuir**

$$C_s = \frac{KC_M}{1 + K'C_M}$$



Peak sắc ký  
mất đối xứng  
về bên phải

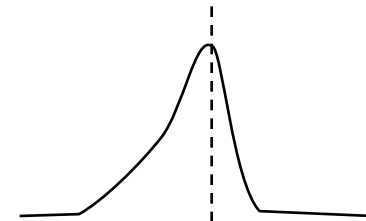
# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
PHÂN  
BỐ

Sắc ký hấp phụ

$$C_s = KC_M^n$$

2. Đường đẳng nhiệt  
**Freunlich**



( c )Freunlich

Peak sắc ký  
mất đối xứng  
về bên trái



# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

## VẬN TỐC DI CHUYỂN

**L – chiều dài của pha tĩnh nhồi trong cột**

**Vận tốc di chuyển tuyến  
tính trung bình của cấu tử:**

$$\bar{V} = \frac{L}{t_R}$$

**Vận tốc di chuyển tuyến  
tính trung bình của pha  
động:**

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$$

$$v = u \frac{1}{1 + K_x \frac{V_s}{V_M}}$$

**$V_M$  ,  $V_S$  : thể tích của pha động, tĩnh (ml)**

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

**HỆ  
SỐ  
CHỨA  
(Dung  
Lượng  
Cột)**

$$k'_X = \frac{K_X V_S}{V_M}$$

**Hoặc:**

$$k'_X = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

***Giá trị hệ số chứa tối ưu: từ 1 đến 5***

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

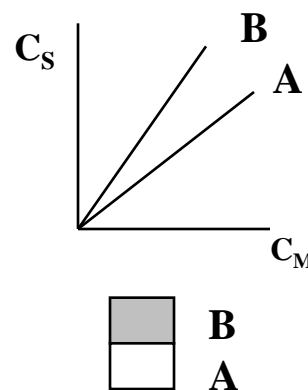
HỆ  
SỐ  
CHỌN  
LỌC  
 $\alpha$

$\alpha$  đặc trưng cho khả năng phân tách các  
cấu tử khác nhau trong hỗn hợp k/sát

Hệ số  $\alpha$  của cột đối với  
2 cấu tử A và B:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$K_A, K_B$ —hệ số phân bố của cấu tử A và cấu tử B  
(cấu tử B bị lưu giữ mạnh hơn so với cấu tử A,  
tức  $> 1$ )



# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HỆ  
SỐ  
CHỌN  
LỌC  
 $\alpha$

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$$

$$k'_B = \frac{K_B V_S}{V_M} = \frac{(t_R)_B - t_M}{t_M}$$

Suy ra  $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$

Từ hệ số chọn lọc  $\alpha$  và hệ số chứa sẽ xác định được độ phân giải của cột

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

Theo thuyết đĩa  
(Do Martin và Synge đề nghị 1942)

Hiệu năng của cột sắc ký được đánh giá thông qua hai đại lượng :

- (1) *chiều cao đĩa lý thuyết H*
- (2) *số đĩa lý thuyết N*

$$N = \frac{L}{H}$$

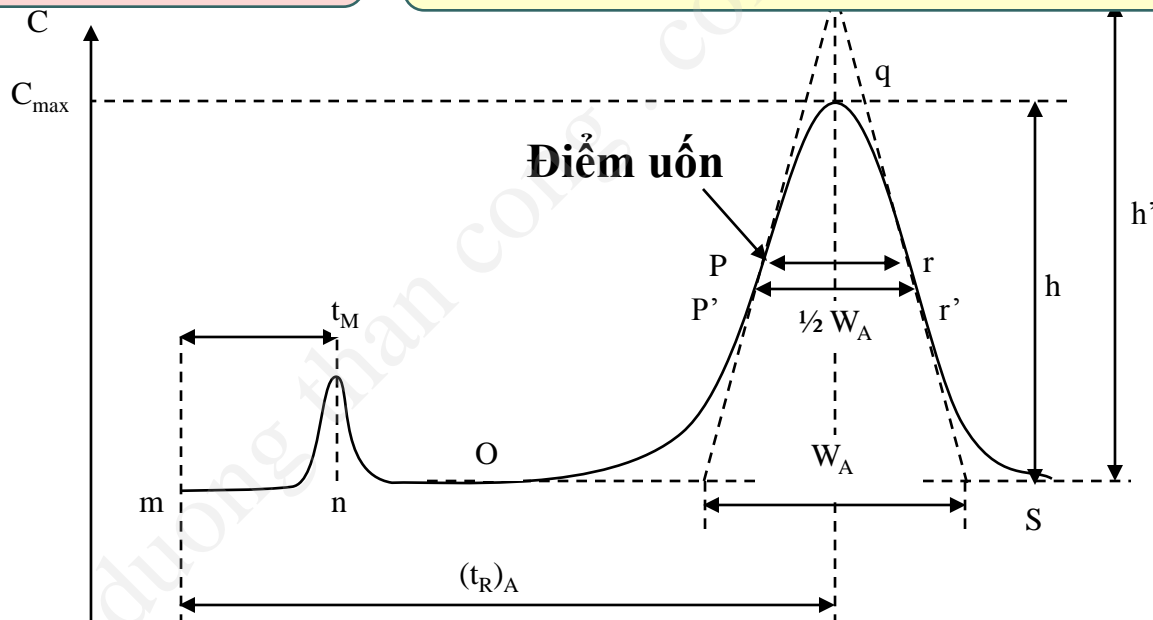
**L** – chiều dài của chất nhồi trong cột, cm  
**N** càng lớn: cột càng hiệu nghiệm

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

Theo thuyết đĩa

XĐ H và N bằng thực nghiệm

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ



Diện tích của hình tam giác đáy  $W$  bằng 96% tổng diện tích giới hạn bởi đường cong, tương đương với diện tích được giới hạn bởi 2 đường  $2\sigma$  với  $W \approx 2 PR \approx 4 \mu$

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

Theo thuyết đĩa

XĐ H và N bằng thực nghiệm

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

Hoặc:

$$H = \frac{LW^2}{16 t_R^2}$$

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

Theo thuyết tốc độ

Phương trình Van Deemter:

$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + Cu$$



# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

PT Van Deemter:

Theo thuyết tốc độ

$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$H_A$  – chiều cao riêng phần thể hiện chất lượng cột nhồi:

$$A = 2 \lambda d_p$$

$\lambda$  phụ thuộc vào kích thước hạt và mức độ đồng nhất khi nạp cột ( $\lambda=1$  khi kích thước hạt 0,4 – 0,8mm);  $d_p$  – đường kính hạt chất hấp phụ, cm.

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

PT Van Deemter:

Theo thuyết tốc độ

$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + C u$$

$H_B$  – chiều cao riêng phần biểu diễn sự phân tán của cấu tử khảo sát trong pha động:

$$B = 2 \gamma D_M$$

$\gamma$ –hệ số phụ thuộc vào khoảng cách giữa các hạt ( $\gamma \approx 0,6 - 0,8$ );  $D_M$  – hệ số khuếch tán trong pha động,  $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

PT Van Deemter:

Theo thuyết tốc độ

$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$H_C$  – chiều cao riêng phần biểu diễn sự hấp phụ/ giải hấp phụ của cấu tử trên  $\phi_s$  và sự phân tán của cấu tử trong hai pha:

$$C = C_s + C_M = \text{const} \frac{d_f^2}{D_s}$$

$d_f$ —bề dày của lớp phủ lỏng trên pha tĩnh, cm;  
 $D_s$ —hệ số khuếch tán trong pha tĩnh,  $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ;  
const—hằng số đặc trưng cho QT chuyển khối:

$$\text{const} = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1 + k')^2}$$

Với  $k'$  – hệ số chứa  
 $u$ —vận tốc của pha động

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

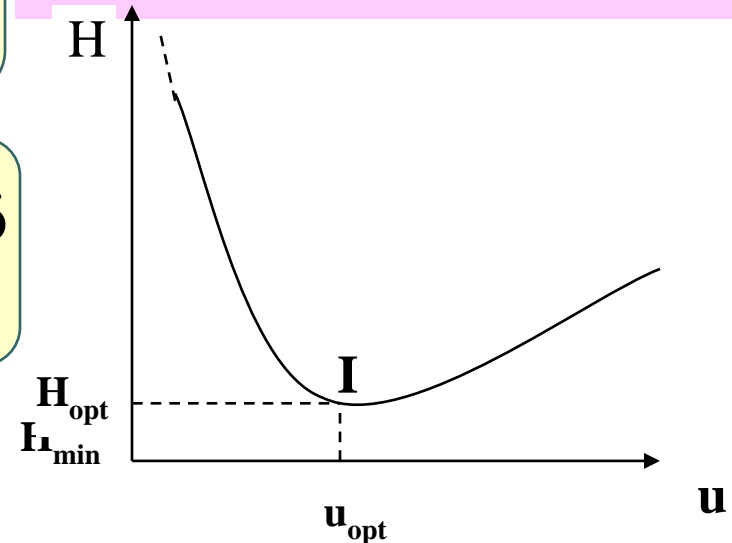
HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

Theo thuyết tốc độ

PT Van Deemter  
được viết lại đầy  
đủ:

Đường  $H = f(u)$  có  
dạng hyperbol:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \text{const} \frac{d_f^2}{D_s} u$$



Sự phụ thuộc của  $H$  vào  
vận tốc pha động  $u$

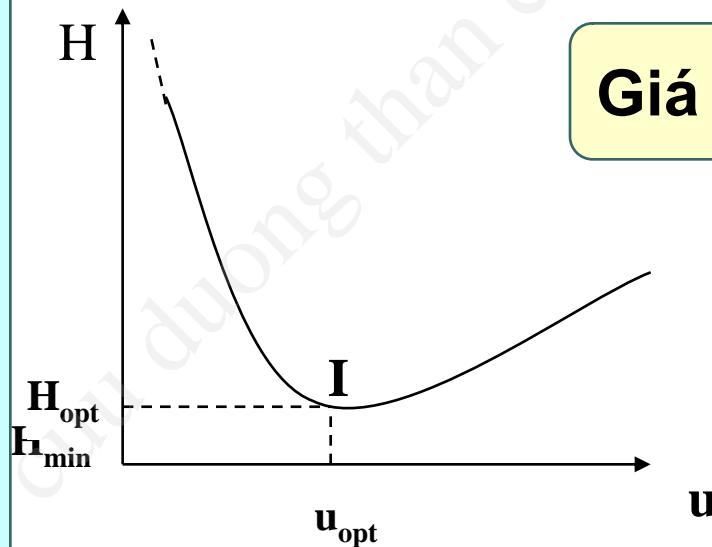
# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ

Theo thuyết tốc độ

Hiệu năng của cột đạt giá trị cực đại tại điểm I với  $u_{opt}$  và  $H_{opt}$

Giá trị  $H_{opt}$  xảy ra tại



$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

$$H_{opt} = A + 2\sqrt{BC}$$

# PEAK SẮC KÝ: CÁC ĐẶC TRƯNG CƠ BẢN

$$H_{opt} = A + 2\sqrt{BC}$$

$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + Cu$$

**HIỆU  
NĂNG  
CỦA  
CỘT  
SẮC  
KÝ**

**Đại lượng A không phụ thuộc vào u**

- u quá lớn/ quá bé đều làm giảm hiệu năng:**
- + u lớn làm cho thành phần thứ ba rất lớn, hiệu năng của cột kém do QT trao đổi chất xảy ra không kịp**
- + u quá bé làm cho B/u rất lớn (peak bị giãn rộng)**

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

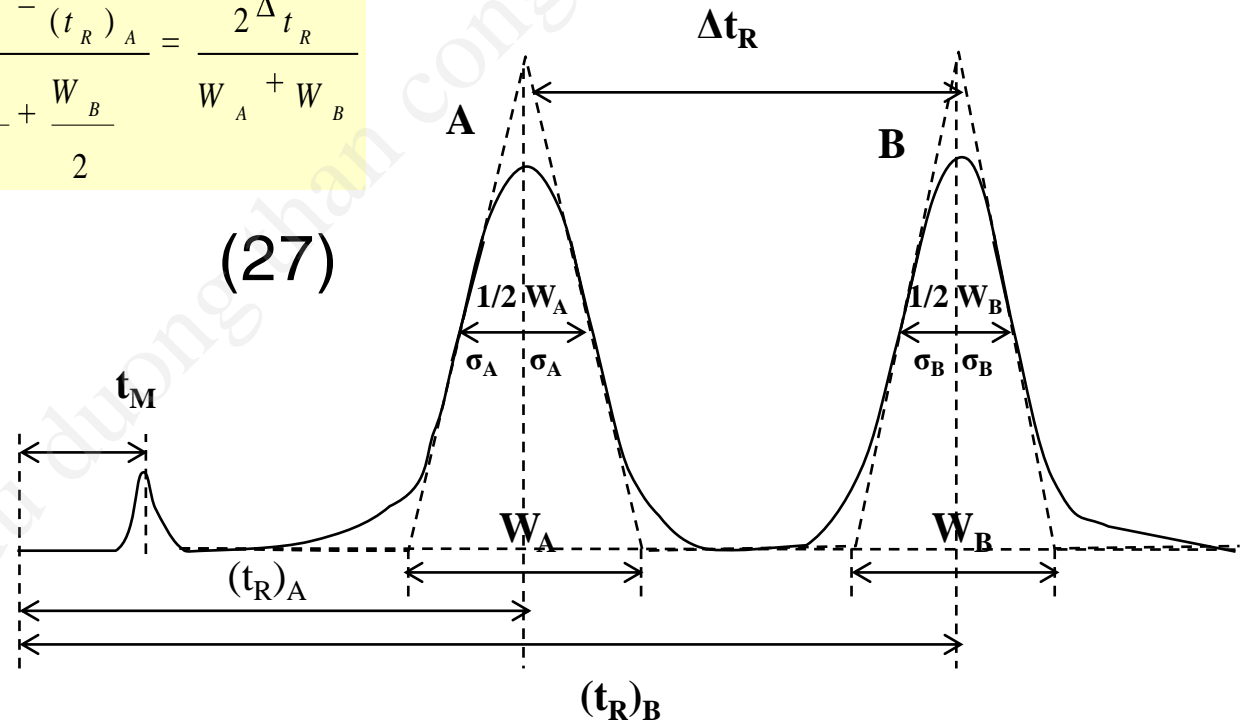
### 19.6 ĐỘ PHÂN GIẢI CỦA CỘT $R_s$

# ĐỘ PHÂN GIẢI CỦA CỘT $R_S$

$R_S$  biểu thị khả năng tách hai cấu tử A,B ra khỏi nhau:

$$R_S = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}} = \frac{2\Delta t_R}{W_A + W_B}$$

(27)



Sắc ký đồ của 2 cấu tử A,B với độ phân giải  $R_S \approx 1,5$



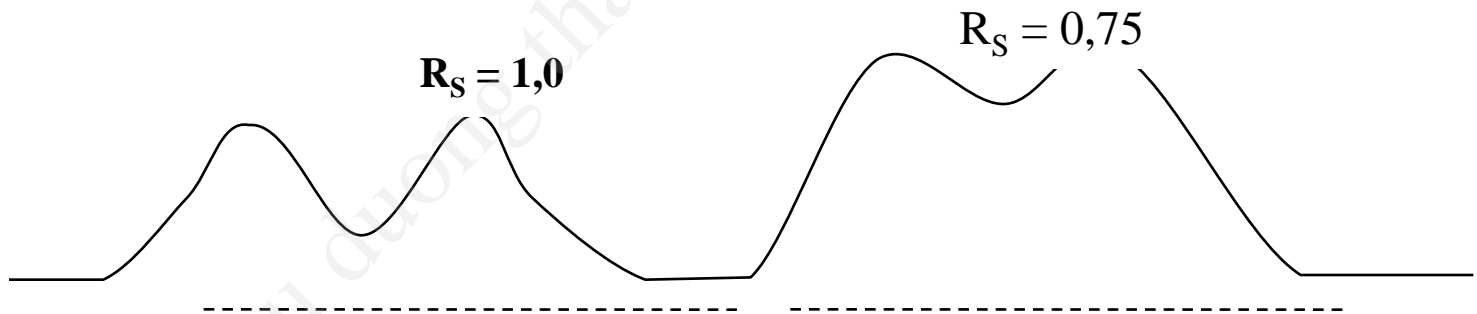
# ĐỘ PHÂN GIẢI CỦA CỘT $R_S$

$R_S = 0,75$ : hai peak không tách được

$R_S = 1$ : hai peak chồng lấp  $\approx 4\%$  ;

$R_S = 1,5$ : hai peak chồng lấp  $\approx 0,3\%$

*(A và B được xem là tách hoàn toàn nếu  $RS \geq 1,5$ )*



Quá trình tách 2 peak với  $R_S = 1,0$  và  $R_S = 0,75$

*Có thể tăng  $R_S$  của một pha tĩnh cho trước bằng cách tăng  $L$  nhưng cần lưu ý rằng thời gian tách cũng sẽ tăng lên*

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

### 19.7 KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM & ỨNG DỤNG

- Thiết bị phân tích sắc ký:

- \*Bộ nạp mẫu

- \*Cột sắc ký

- \*Detector

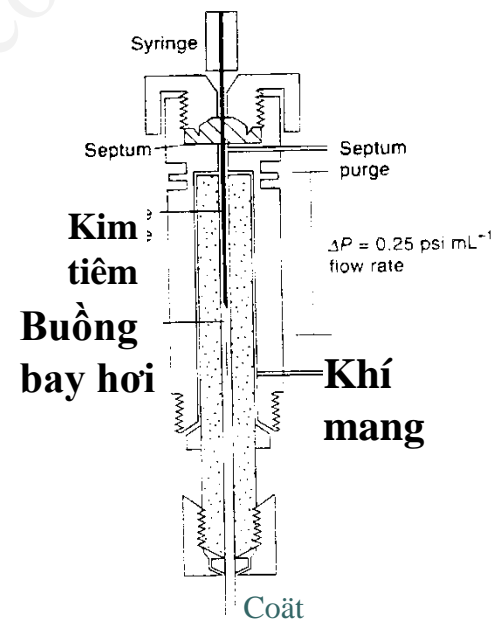
- Phân tích định tính và định lượng

- Tối ưu hóa quá trình sắc ký

# THIẾT BỊ PHÂN TÍCH SẮC KÝ

## BỘ NẠP MẪU

Mẫu được bơm bằng các syringe (thể tích từ một phần mười đến vài chục  $\mu\text{L}$ )



Bộ nạp mẫu lỏng dùng cho sắc ký khí

# THIẾT BỊ PHÂN TÍCH SẮC KÝ

## CỘT SẮC KÝ

Thẳng hoặc xoắn, bằng thép, đồng, thủy tinh nóng chảy có độ bền nhiệt và bền hoá học cao

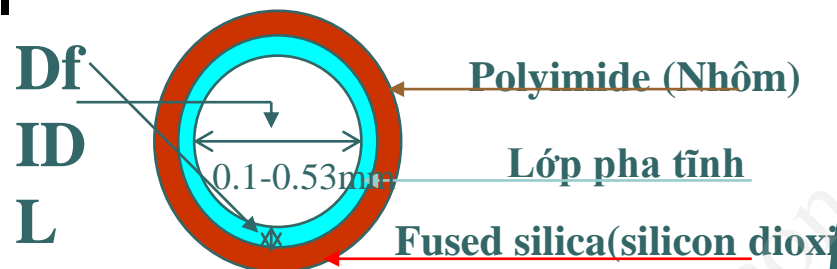
L : vài cm đến cả trăm mét

Φ cột:

- Vài cm đ/v cột nhỏ
- Từ 0,1–0,5mm đối với cột mao quản

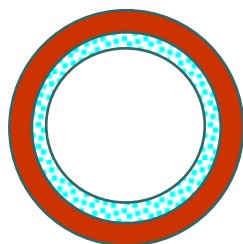
# THIẾT BỊ PHÂN TÍCH SẮC KÝ

## CỘT SẮC KÝ



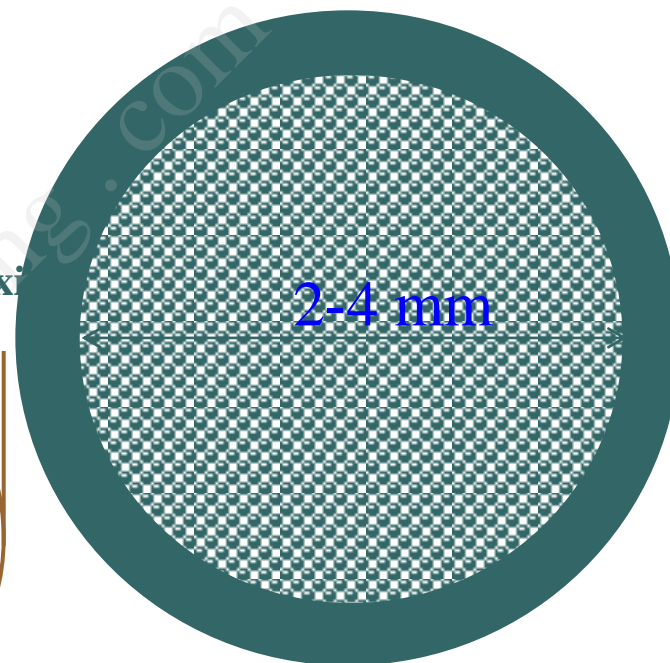
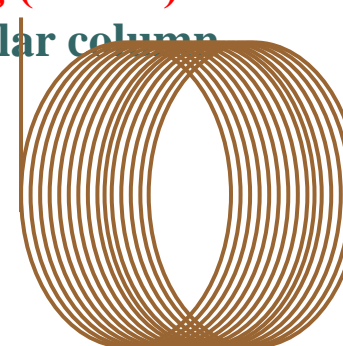
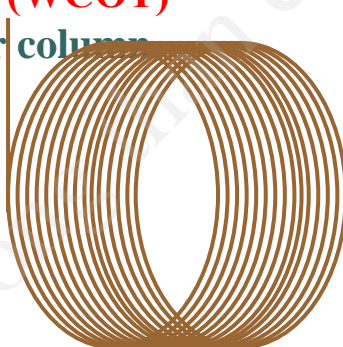
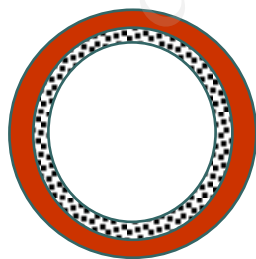
**Cột mao quản phim mỏng (WCOT)**

Wall-coated open-tubular column

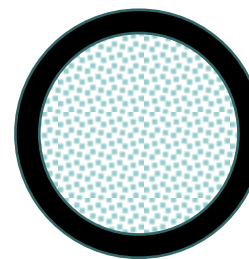


**Cột mao quản lớp mỏng (SCOT)**

Support-coated open-tubular column



**Cột nhồi**



**Cột mao quản nhồi**

# THIẾT BỊ PHÂN TÍCH SẮC KÝ

## CỘT SẮC KÝ

Các chất nhồi trong cột phải tách tốt, bền cơ, bền hóa (thường dùng oxyd nhôm, silicagel, than hoạt tính, các polymer xốp và zeolite tổng hợp...)

Cột có thể được lắp trong lò nung để thực hiện quá trình tách ở nhiệt độ cao theo một chương trình nhiệt độ cài đặt sẵn

Trong SK giấy, SK bản mỏng, “cột sắc ký” là giấy/ bản mỏng được phủ một lớp pha tĩnh

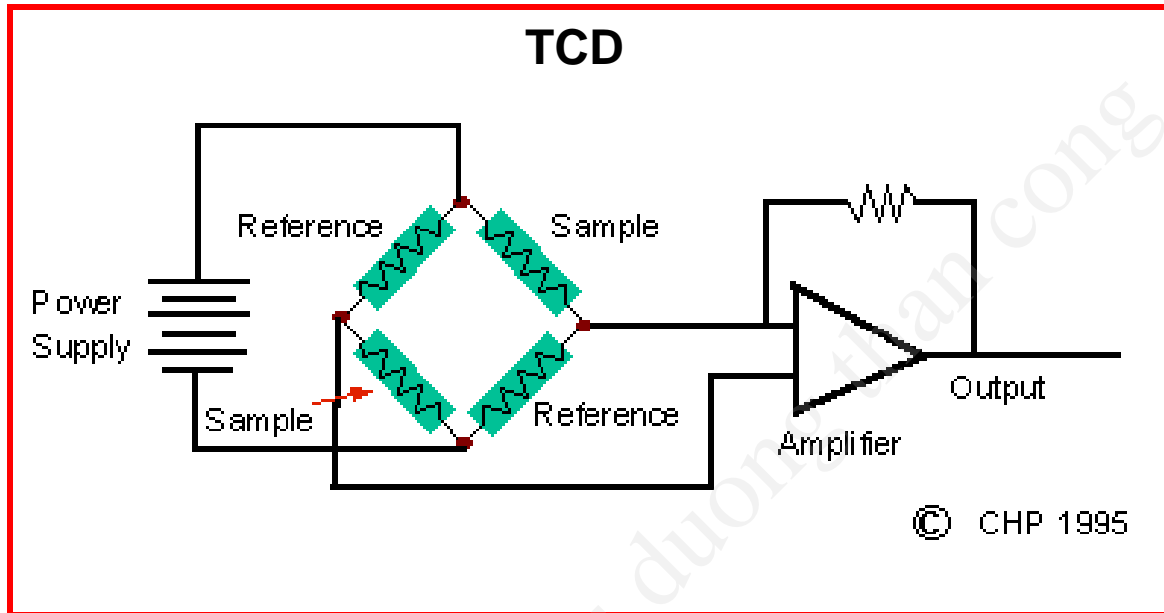
# THIẾT BỊ PHÂN TÍCH SẮC KÝ

## DETECTOR (đầu dò)

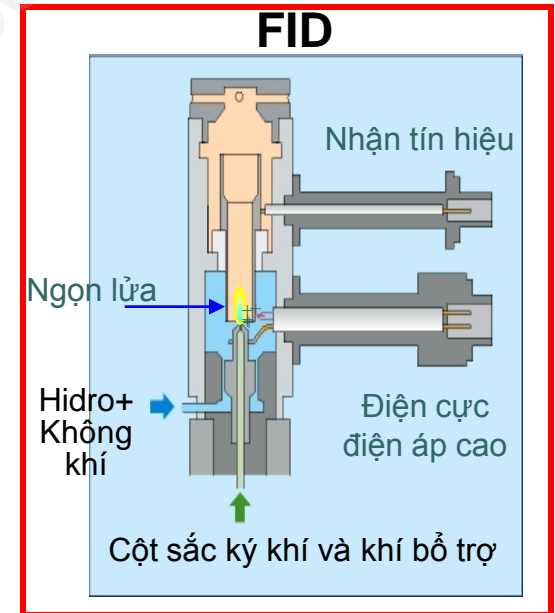
Phát hiện thành phần các chất đi qua cột (khí hoặc DD ) thông qua độ dẫn nhiệt, độ dẫn điện, theo ngọn lửa, ngọn lửa ion hóa, chỉ số khúc xạ, khối lượng cấu tử được tách...

Khả năng của detector được đánh giá thông qua độ nhạy, giới hạn phát hiện, quán tính và phạm vi tuyến tính giữa nồng độ và độ lớn của tín hiệu. Detector ngày nay thường làm việc theo kiểu vi phân (kiểu tích phân ít được sử dụng do quán tính cao và độ nhạy thấp)

# • Các loại Detector sắc ký khí thông dụng



**Thermal conductivity detector**



**Flame Ionization Detector)**



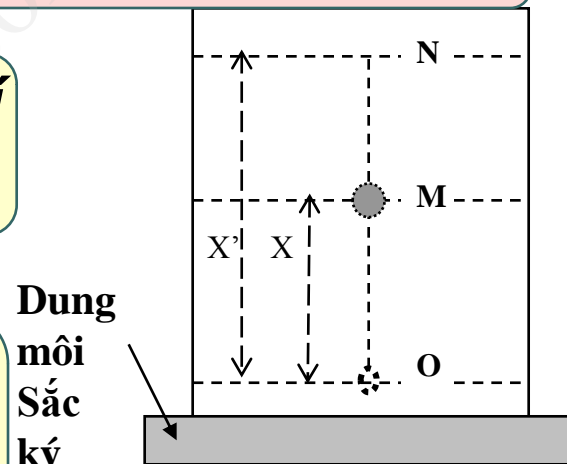
# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH

### Định tính trong sắc ký đơn giản

Dựa chủ yếu vào *vị trí*  
*cấu tử trên pha tĩnh*

Với PP sắc ký phân bố,  
còn có thể dựa vào  $R_f$   
(hằng số phân bố vùng)



$$R_f = \frac{x}{x'} = \frac{OM}{ON}$$

O—điểm xuất phát

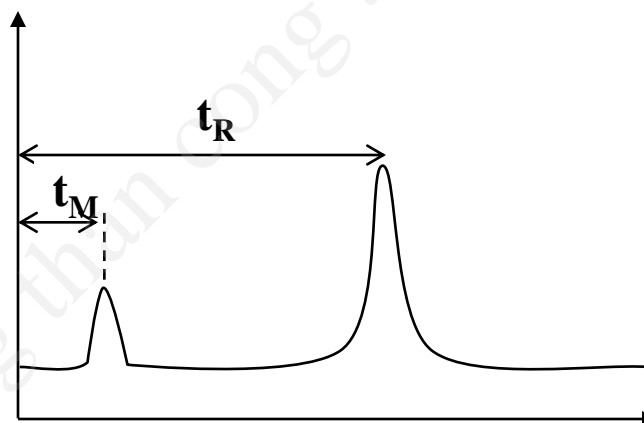
M—điểm có nồng độ cấu tử đạt cực đại.

N—vị trí ứng với đoạn di chuyển cực đại của  
dung môi

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH

### Định tính trong sắc ký hiện đại



So sánh thời gian lưu tương đối  $t_R$  giữa các cấu tử và các chuẩn (thực hiện độc lập hoặc thêm chuẩn vào DD mẫu)

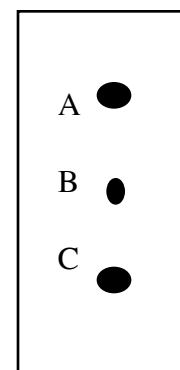
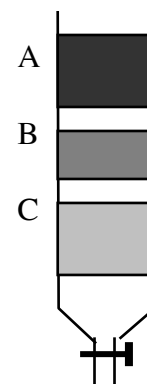
# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

### Định lượng trong sắc ký đơn giản

**Sắc ký cột: phân tích từng phần DD được hứng ở cuối cột**

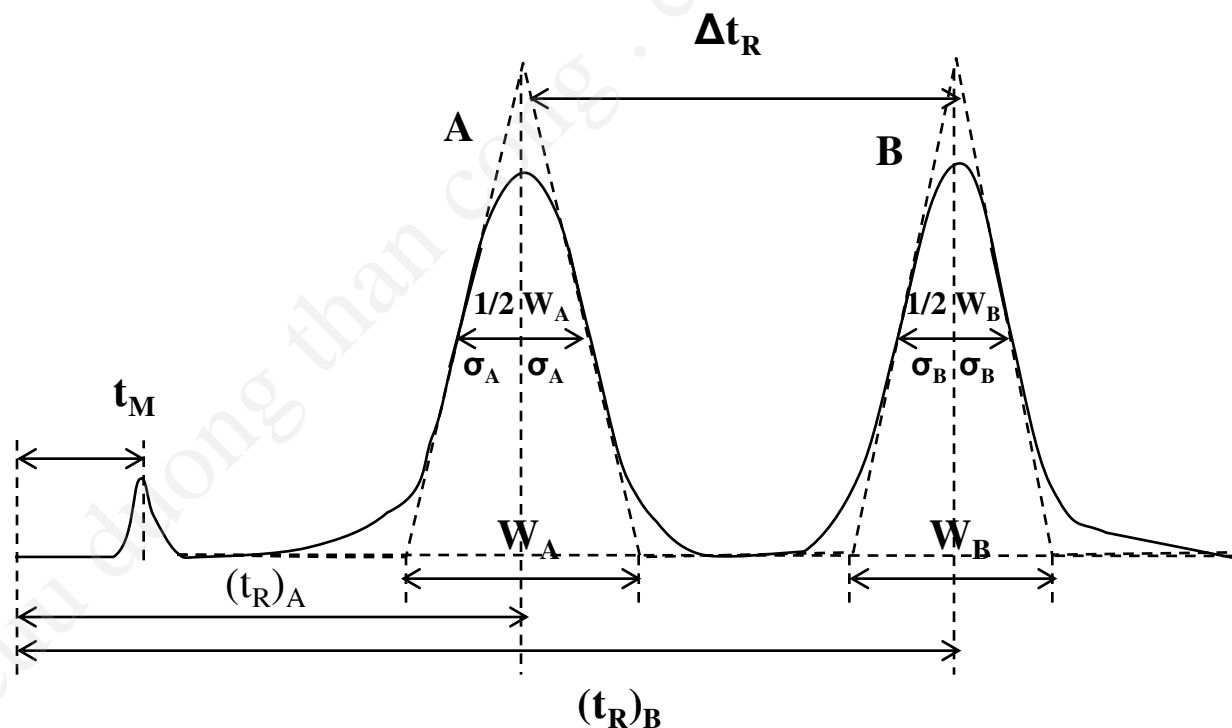
**Sắc ký phẳng: đo diện tích các vết màu của mẫu và chuẩn sau khi tách và hiện màu**



# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

### Định lượng trong sắc ký hiện đại



Định lượng dựa vào chiều cao  $h$  hoặc diện tích  $S$  của peak

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào chiều cao peak  $h$**

**Nối đường nền giữa hai chân của peak bằng một đường thẳng và đo chiều cao  $h$  của peak từ đường nền này**

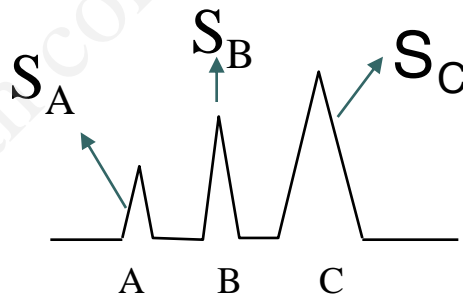
**Chỉ nên sử dụng PP đo chiều cao khi bề rộng của peak mẫu và peak chuẩn hoàn toàn bằng nhau**

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trong sắc ký hiện đại

Dựa vào diện tích peak S: **PP % diện tích**



$\%S_A$ ,  $\%S_B$  và  $\%S_C$   
chính là  $\%A$ ,  $\%B$  và  $\%C$  trong hỗn hợp

PP này ngày nay ít được dùng vì rất kém chính xác

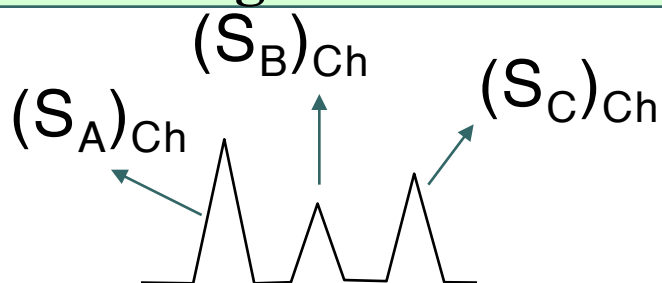
# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trong sắc ký hiện đại

Dựa vào diện tích peak S: % diện tích  
được chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh

Để hiệu chỉnh sự khác nhau về độ nhạy  
của detector đối với các cấu tử, pha chế  
mẫu chuẩn chứa các cấu tử tinh khiết có  
thành phần bằng nhau



Chọn một trong các cấu tử (thường có diện  
tích peak lớn nhất) làm chuẩn, ( $K_{hc} = K_0 = 1$ )

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trong sắc ký hiện đại

Dựa vào diện tích peak S: % diện tích  
được chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh

Hệ số hiệu chỉnh  $K_i$  của cấu tử  $i$  trong mẫu:

$$K_i = \frac{S_R}{(S_i)_{chuan}}$$

$S_R$  – diện tích của peak chuẩn;  
 $(S_i)_{chuan}$  – diện tích của peak cấu tử  
 $i$  trong mẫu chuẩn



# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trong sắc ký hiện đại

Dựa vào diện tích peak S: % diện tích  
được chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh

Cấu tử i trong mẫu thật có diện tích  $S_i$ .  
Hiệu chỉnh  $S_i$  theo độ nhạy của detector:

$$S_i (\text{hiệu chỉnh}) = S_i \cdot K_i$$

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào diện tích peak S: % diện tích  
được chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh**

**Nếu khối lượng của cấu tử i và cấu tử chuẩn  
không bằng nhau thì  $K_i$  được tính:**

$$K_i = \frac{S_R}{(S_i)_{\text{chuan}}} \frac{G_i}{G_R} K_0$$

$G_i, G_R$ —khối lượng của cấu tử i và cấu tử chuẩn;  
 $K_0$ —hệ số hiệu chỉnh của cấu tử chuẩn

**% của cấu tử i trong dd chứa ba cấu tử  
A, B, C:**

**% cấu tử i =**

$$\frac{S_i K_i 100 \%}{S_A K_A + S_B K_B + S_C K_C}$$

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào diện tích peak S:  
PP chuẩn ngoại**

**Lập đường chuẩn diện tích peak S theo  
nồng độ C của cấu tử khảo sát**

**Chọn điều kiện thích hợp để quan hệ giữa  
S và C tuyến tính**

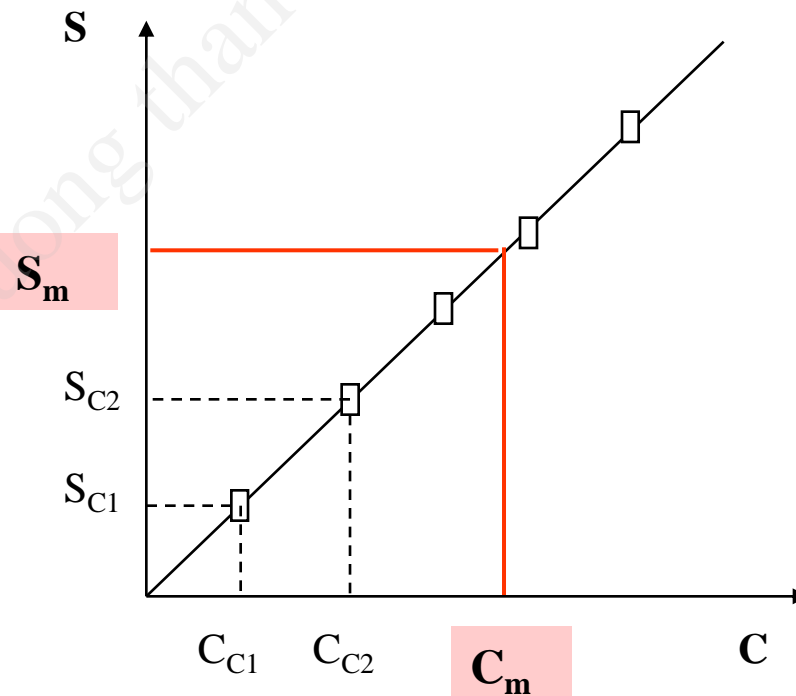
**Định lượng cấu tử khảo sát bằng đồ thị  
hoặc PP bình phương cực tiểu**

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

Định lượng trong sắc ký hiện đại

Dựa vào diện tích peak S:  
**PP chuẩn ngoại**

PHÂN  
TÍCH  
ĐỊNH  
LƯỢNG



# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào diện tích peak S:**  
**PP chuẩn ngoại**

Việc bơm mẫu đòi hỏi độ lặp cao thực ra rất khó thực hiện vì lượng mẫu đưa vào máy là rất ít để tránh cho cột không bị quá tải

Mẫu được bơm vào máy còn có khả năng bị thất thoát do bay hơi, nhất là khi bộ nạp mẫu đang ở nhiệt độ cao

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào diện tích peak S:**  
**PP chuẩn nội**

**Nhằm hiệu chỉnh sai số do bơm mẫu  
không lặp lại:**

**-Thêm vào mẫu một chất chuẩn có nồng  
độ biết trước được gọi là chất nội chuẩn**

**Chất nội chuẩn có thể có tính chất hóa lý  
rất gần với cấu tử khảo sát hoặc cũng có  
thể chính là một cấu tử nào đó có mặt  
trên sắc ký đồ**

# PT ĐỊNH TÍNH & ĐỊNH LƯỢNG

## PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

**Định lượng trong sắc ký hiện đại**

**Dựa vào diện tích peak S:**

**PP chuẩn nội**

**Nếu chất nội chuẩn không phải là thành phần của hỗn hợp phân tích thì thành phần khối lượng của cấu tử khảo sát được tính theo công thức:**

$$\% \text{ cấu tử } i = \frac{S_i K_i}{S_R K_R} \frac{m_R}{m_{\text{mau}}} \cdot 100$$

$m_R$  – khối lượng chất nội chuẩn thêm vào mẫu;  $m_{\text{mau}}$  – khối lượng của mẫu

**Độ chính xác của PP không phụ thuộc vào độ lặp lại của quá trình bơm mẫu**

# CHƯƠNG 19

## ĐẠI CƯƠNG VỀ PP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

### 19.8 TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

- Ảnh hưởng của  $k'$  và  $\alpha$  lên độ phân giải  $R_s$  của cột
- Ảnh hưởng của  $R_s$  đến thời gian lưu giữ



# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

Tối ưu hóa là tìm các điều kiện để đạt được  $R_S$  cao trong thời gian chấp nhận được, hoặc **đạt được thời gian ngắn nhất ứng với  $R_S$  đạt yêu cầu** (các peak tách hoàn toàn ra khỏi nhau)

Muốn đánh giá khả năng tách của cột (hay lớp mỏng) phải xem xét đồng thời hiệu năng của cột, độ chọn lọc, độ tách và (xem xét  $H$ ,  $\alpha$ ,  $R_S$  và  $k'$ )

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

**ẢNH  
HƯỞNG  
CỦA  
 $k'$   
VÀ  
 $\alpha$   
LÊN  
 $R_s$   
CỦA  
CỘT**

**Giả thiết bề rộng W chân các peak khác nhau không đáng kể**

$$N = 16 R_s^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{k'_B + 1}{k'_B} \right)^2$$

**Thời gian phân tích sắc ký được xác định dựa vào vận tốc của cấu tử di chuyển chậm nhất. Nếu cấu tử đó là B:**

$$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(k'_B + 1)^3}{(k'_B)^2}$$

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

Khi tiến hành tối ưu hóa, *phải luôn luôn nhớ rằng  $\alpha$  và  $k'$  không thay đổi khi  $N, H$  (hoặc  $L$ ) thay đổi và ngược lại*

**Biện pháp thay đổi các thông số:**

Thay đổi  $\alpha$  và  $k'$ : thay đổi nhiệt độ hoặc thành phần của  $\varphi_M$ . Thay đổi  $\varphi_S$  cũng đạt mục đích nhưng bất tiện hơn

Thay đổi  $N$  bằng cách thay đổi  $L$ ; thay đổi  $H$  bằng cách thay đổi  $u$ , kích thước hạt của pha tĩnh, độ nhớt của pha động (để làm thay đổi  $D_M, D_S$ ) và bề dày của lớp phim lỏng trên bề mặt pha tĩnh

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

**VÍ DỤ: Dùng cột có  $L = 30,0$  cm tách A và B đo được  $(T_R)_A = 16,40$  và  $(T_R)_B = 17,63$  phút;  $W_A = 1,11$  và  $W_B = 1,21$  phút. Hãy xác định:**

- (a)  $R_s$  của cột**
  - (b)  $N$  trung bình của cột;**
  - (c) Chiều cao đĩa  $H$  ;**
  - (d)  $L$  đòi hỏi để đạt độ phân giải là 1,5; (e) thời gian rửa giải cấu tử B trên cột dài hơn;**
  - (f) chiều cao đĩa lý thuyết để đạt độ phân giải 1,5 trên cột 30,0 cm với cùng thời gian lưu.**
- Cho biết  $t_M = 1,30$  phút**

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

(a) Áp dụng PT (27):

$$R_s = \frac{2(17,63 - 16,40) \text{ phut}}{(1,11 + 1,21) \text{ phut}} = 1,06$$

(b) Áp dụng PT (21) :

$$N = 16 \left( \frac{16,40}{1,11} \right)^2 = 3,49 \cdot 10^3 \quad \text{và} \quad N = 16 \left( \frac{17,63}{1,21} \right)^2 = 3,40 \cdot 10^3$$

$$\text{Suy ra } N_{tb} = 3,44 \cdot 10^3$$

(c) Chiều cao đĩa lý thuyết H:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30}{3,44 \cdot 10^3} = 8,72 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

(d)  $k'$  và  $\alpha$  không thay đổi khi tăng  $N$  và  $L$ . Do đó, thay thế  $N_1$ ,  $N_2$  vào (30) và lập tỷ số :

$$\frac{(R_s)_1}{(R_s)_2} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \quad \leftrightarrow \quad \frac{1,06}{1,50} = \frac{\sqrt{3,44 \cdot 10^3}}{\sqrt{N_2}}$$

Suy ra :  $N_2 = 6,89 \cdot 10^3$

Chiều dài cột để độ phân giải tăng lên 1,5:

$$L_2 = H \times N = 8,72 \cdot 10^{-3} \times 6,89 \cdot 10^3 = 60,0 \text{ cm}$$

# TỐI ƯU HÓA QT SẮC KÝ

(e) Thay thế  $(R_s)_1$ ,  $(R_s)_2$  vào (32) và lập tỷ số, ta có:

$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} \leftrightarrow \frac{17,63}{(t_R)_2} = \frac{(1,06)^2}{(1,50)^2}$$

Suy ra  $(t_R)_2 = 35,3$  phút

(f) Thay thế  $H_1$ ,  $H_2$  vào PT (32) và lập tỷ số, ta có:

$$\frac{(t_R)_B}{(t_R)_B} = \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} \times \frac{H_1}{H_2} \leftrightarrow H_2 = H_1 \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} = 8,72 \cdot 10^{-3} \frac{(1,06)^2}{(1,50)^2} = 4,3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$