

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
KHOA CÔNG NGHỆ HÓA HỌC VÀ THỰC PHẨM



ThS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1: KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH	1
1.1. Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng.....	1
1.1.1. Nguyên tắc cơ bản.....	3
1.1.2. Điều kiện chiết	3
1.2. Kỹ thuật chiết rắn – lỏng.....	5
1.2.1. Kỹ thuật chiết cổ điển	6
1.2.1.1. Kỹ thuật chiết ngấm kiệt (Percolation)	6
1.2.1.2. Kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration).....	7
1.2.1.3. Kỹ thuật chiết bằng máy Soxhlet	8
1.2.1.4. Kỹ thuật chiết bằng lôi cuốn hơi nước	9
1.2.2. Kỹ thuật chiết hiện đại	10
1.2.2.1. Kỹ thuật chiết hỗ trợ vi sóng	10
1.2.2.2. Kỹ thuật chiết hỗ trợ siêu âm	13
1.2.2.3. Kỹ thuật chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid method)	14
1.2.2.4. Kỹ thuật chiết dưới áp suất cao (Pressurized liquid extraction).....	16
1.3. Kỹ thuật chiết pha rắn.....	17
1.4. Phương pháp thu hồi dung môi.....	19
CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NHẬN DANH MỘT SỐ LOẠI HỢP CHẤT TỰ NHIÊN.....	20
2.1. Alkaloid	20
2.1.1. Đại cương.....	20
2.1.2. Phương pháp định tính alkaloid	21
2.1.3. Phương pháp chiết tách alkaloid	21
2.2. Flavonoid	23
2.2.1. Đại cương.....	23
2.2.2. Phương pháp định tính flavonoid.....	24
2.2.3. Phương pháp chiết tách flavonoid.....	25
2.3. Terpenoid – Steroid	27
2.3.1. Đại cương.....	27
2.3.2. Phương pháp định tính terpenoid-steroid.....	29

2.3.3. Phương pháp chiết tách terpenoid-steroid.....	30
2.4. Chất béo	30
2.4.1. Đại cương.....	30
2.4.2. Phương pháp định tính chất béo.....	32
2.4.3. Phương pháp tách chiết chất béo	32
2.5. Glycosid	33
2.5.1. Đại cương.....	33
2.5.2. Phương pháp chiết tách glycosid	34
2.6. Hợp chất phenol.....	35
2.6.1. Đại cương.....	35
2.6.2. Phương pháp định tính hợp chất phenol	36
2.6.3. Phương pháp chiết tách hợp chất phenol	37
CHƯƠNG 3: PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ.....	38
3.1. Giới thiệu	38
3.1.1. Nguyên tắc cơ bản.....	38
3.1.2. Phân loại.....	39
3.1.3. Các loại pha tĩnh sử dụng trong sắc ký	40
3.2. Sắc ký lớp mỏng	42
3.2.1. Tổng quát	42
3.2.2. Quy trình sắc ký lớp mỏng.....	44
3.2.2.1. Chuẩn bị.....	44
3.2.2.2. Chấm dung dịch lên bản mỏng.....	45
3.2.2.3. Khai triển sắc ký.....	45
3.2.2.4. Hiện hình các vết sau khi giải ly	45
3.2.2.5. Đọc kết quả.....	45
3.2.3. Ứng dụng.....	46
3.3. Sắc ký cột.....	46
3.3.1. Sắc ký cột hở.....	46
3.3.1.1. Nguyên tắc.....	46
3.3.1.2. Lựa chọn chất hấp thu, dung môi giải ly cột và cách nhồi cột.....	47
3.3.2. Một số kỹ thuật sắc ký cột khác	51
3.3.2.1. Sắc ký cột khô (DCC)	51

3.3.2.2. Sắc ký chớp nháy.....	51
3.3.2.3. Sắc ký nhanh-cột khô	52
3.4. Sắc ký khí.....	52
3.4.1. Giới thiệu máy sắc ký khí	53
3.4.2. Chuẩn bị mẫu và các yếu tố ảnh hưởng đến việc tách mẫu	55
3.4.3. Ứng dụng.....	58
3.5. Sắc ký lỏng hiệu năng cao	58
3.5.1. Giới thiệu máy sắc ký lỏng hiệu năng cao	58
3.5.2. Chuẩn bị mẫu	59
3.5.3. Ứng dụng.....	60
3.6. Một số kỹ thuật sắc ký khác.....	60
3.6.1. Sắc ký giấy	60
3.6.2. Sắc ký trao đổi ion.....	61
3.6.3. Sắc ký gel	62
3.6.4. Sắc ký ái lực	63
3.6.5. Sắc ký tương tác kỵ nước	63
CHƯƠNG 4: MỘT SỐ THỦ THUẬT KHI TINH CHẾ HỢP CHẤT HỮU CƠ	65
4.1. Kỹ thuật kết tinh	65
4.1.1. Giới thiệu.....	65
4.1.2. Các giai đoạn kết tinh.....	66
4.1.3. Các phương pháp kết tinh	67
4.2. Kỹ thuật chưng cất.....	69
4.2.1. Chưng cất đơn giản	70
4.2.2. Chưng cất phân đoạn.....	71
4.2.3. Chưng cất lôi cuốn hơi nước.....	72
4.3. Kỹ thuật thăng hoa.....	72
4.4. Kỹ thuật điện di.....	73
4.4.1. Nguyên tắc	73
4.4.2. Phân loại.....	74
4.4.3. Cách tiến hành.....	75
4.5. Các phương pháp làm khô mẫu	76

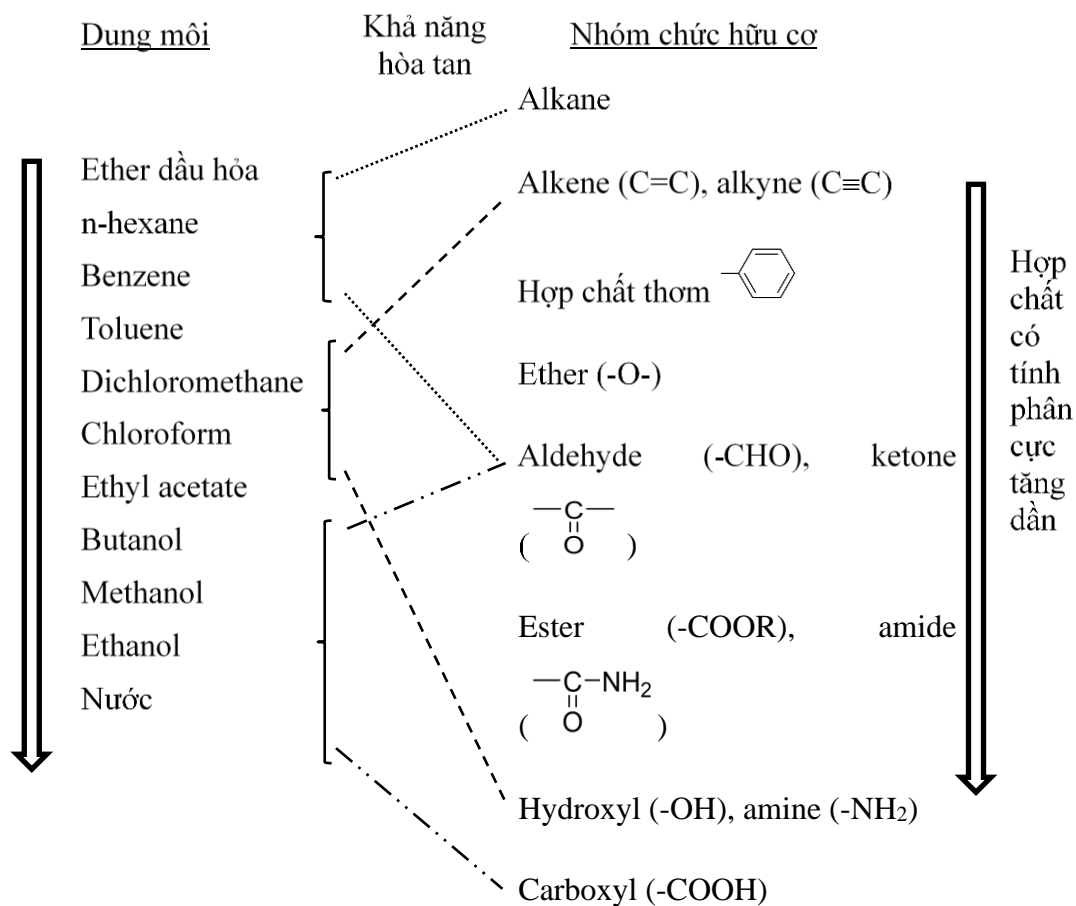
CHƯƠNG 1: KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH

Chiết là dùng một dung môi thích hợp có khả năng hòa tan chất đang cần tách và tinh chế để tách chất đó ra khỏi môi trường rắn hoặc lỏng khác. Lý do phổ biến để thực hiện quá trình chiết trong phân tích hóa học là để tách hoặc làm giàu chất phân tích, hay tách nó ra khỏi những chất có thể gây nhiễu trong phân tích. Phổ biến nhất là quá trình chiết giữa dung môi nước và dung môi hữu cơ. Chiết một chất đang nằm trong chất lỏng khác gọi là chiết lỏng, còn chiết các chất khi chúng nằm trong các chất rắn gọi là chiết rắn. Tùy theo bản chất của chất bị chiết và môi trường chúng đang tồn tại ta chọn dung môi chiết thích hợp sao cho chỉ hòa tan chất định chiết mà không hòa tan các chất của môi trường.

1.1. Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng

Kỹ thuật này còn được gọi là sự chiết bằng dung môi. Đây là phương pháp tách dựa trên sự di chuyển của các chất từ pha lỏng này sang pha lỏng khác do tính tan khác nhau của chúng trong hai pha lỏng riêng biệt. Trong đó, một pha là dung dịch chứa chất cần chiết, pha còn lại là dung môi chiết.

Nguyên tắc của sự chiết là dung môi không phân cực (ether dầu hỏa, benzene,...) sẽ hòa tan tốt các hợp chất có tính không phân cực (alcol béo, ester béo,...), dung môi phân cực trung bình (diethyl ether, chloroform,...) hòa tan tốt các hợp chất có tính phân cực trung bình (hợp chất ether, aldehyde, ketone, ester,...) và dung môi phân cực mạnh (methanol, ethanol, nước,...) hòa tan tốt các hợp chất có tính phân cực mạnh (alcol, acid,...).



Dung môi có độ phân cực khác nhau sẽ hòa tan ở nhiệt độ phòng các hợp chất có độ phân cực tương ứng (chỉ phù hợp với đơn chức)

Bảng 1: Độ phân cực của dung môi

Dung môi	Chỉ số phân cực	Nhiệt độ sôi (°C)
<i>n</i> -Hexane	0.0	36
Toluene	2.4	111
Diethyl ether	2.8	35
<i>n</i> -Butanol	3.9	118
Tetrahydrofurane	4.0	65
Chloroform	4.1	61
Ethyl acetate	4.4	77
Acetone	5.1	56
Methanol	5.1	65
Ethanol	5.2	78
Acetonitrile	5.8	82
Dimethylsulfoxide	7.2	189
Nước	9.0	100

1.1.1. Nguyên tắc cơ bản

Nguyên tắc cơ bản của sự chiết lỏng – lỏng là sự phân bố của một chất tan vào hai pha lỏng và hai pha lỏng này không hòa tan vào nhau. Hằng số phân bố của một chất tan cho biết khả năng hòa tan của chất này đối với hai pha lỏng tại thời điểm cân bằng, được biểu diễn bằng hằng số phân bố K.

$$K = \frac{C_a}{C_b}$$

Trong đó: C_a : nồng độ chất tan trong pha (a) tại giai đoạn cân bằng.

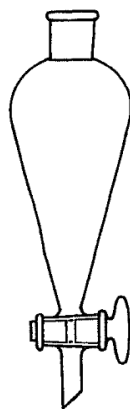
C_b : nồng độ chất tan trong pha (b) tại giai đoạn cân bằng.

Mục đích chính của sự chiết bằng dung môi là để sơ bộ tinh chế hóa một hợp chất nào đó. Nếu một chất tan X hoặc những chất tương đồng với chất X có hằng số phân bố lớn còn các tạp bản cũng như các chất khác có cấu trúc hóa học không tương đồng với X lại có hằng số phân bố nhỏ thì có thể áp dụng kỹ thuật chiết lỏng – lỏng để cô lập X và các chất tương đồng với nó.

1.1.2. Điều kiện chiết

- Dung môi hòa tan tốt các chất cần tách.
- Dung môi tinh khiết, trung tính, không độc, không quá dễ cháy, dễ bay hơi.
- Chiết nhiều lần, mỗi lần một lượng ít dung môi.
- Thực hiện trong nhiệt độ thích hợp và giữ không đổi trong cả quá trình.
- Sự phân lớp khi chiết phải rõ ràng, nhanh và dễ tách riêng biệt hai pha.
- Lắc hoặc trộn đều để quá trình chiết xảy ra tốt.

Việc chiết lỏng – lỏng được thực hiện bằng phễu chiết, trong đó chất cần tách ban đầu đang nằm trong một chất lỏng có thể là pha hữu cơ hoặc pha nước, sử dụng thêm nước hoặc dung môi hữu cơ thích hợp để tách chất cần chiết hoặc loại bỏ bớt tạp chất khỏi dung dịch ban đầu. Tùy vào tỉ trọng giữa dung môi hữu cơ và nước mà pha hữu cơ nằm trên hoặc dưới so với pha nước.



Phễu chiết (separating funnel) sử dụng trong sự chiết lỏng – lỏng

Muốn kiểm tra xem các hợp chất nào đã được chiết vào pha hữu cơ cũng như các hợp chất nào còn lại trong pha nước và chiết bao nhiêu lần thì hoàn tất, có thể sử dụng sắc ký lớp mỏng, trên bản mỏng cần so sánh đồng thời vết của pha nước và của pha hữu cơ. Sự chiết bởi một dung môi cụ thể nào đó được gọi là hoàn tất khi lần chiết n, trên bản mỏng không còn nhìn thấy vết của chất đó trong pha nước cũng như trong pha hữu cơ. Cũng có thể kiểm tra bằng cách nhỏ một giọt dung dịch chiết lần thứ n lên trên một tấm kính sạch, sau khi bay hơi hết dung môi, không còn vết gì trên mặt kính.

Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng có nhược điểm là do phải lắc phễu chiết nhiều lần, nên dung môi trong phễu chiết tạo nhũ tương, gây khó khăn trong việc tách pha thành hai lớp. Để khắc phục nhược điểm này, có thể sử dụng một đĩa thủy tinh dài đưa vào phễu chiết, khuấy nhẹ dung dịch hoặc cọ xát nhẹ vào thành bình, chỗ mặt mặt thoáng của dung dịch nhằm phá vỡ bọt khí để dung dịch nhanh chóng phân thành hai lớp. Cũng có thể phá bọt bằng cách ly tâm dung dịch. Ngoài ra, khi sử dụng những dung môi như ethyl acetate, acetonitrile, ... những dung môi này có tan ít trong nước nên khi lắc nhiều lần dễ tạo nhũ tương, khi đó cho thêm muối NaCl để giảm sự hòa tan vào nhau giữa dung môi hữu cơ và nước.

Trong trường hợp chất cần chiết tan trong pha lỏng hiện tại nhiều hơn các dung môi mới hay không chọn được dung môi mới thì không dùng phương pháp chiết thường như trên, mà phải dùng phương pháp chiết liên tục. Để lắp ráp dụng cụ cho phương pháp chiết liên tục cần phải biết được tỉ khối của dung môi cao hay thấp so với chất cần chiết, vì tỉ khối này khác thì dụng cụ lắp ráp sẽ khác. Trong phương pháp chiết này, khi thực hiện chiết, hai pha lỏng không trộn lẫn vào nhau (hai dung môi, có một dung môi có chứa chất phân tích) được bơm liên tục và đi ngược chiều nhau với tốc độ nhất định trong hệ chiết, như phễu chiết, hay bình chiết liên hoàn đóng kín để chúng tiếp xúc với

nhau. Hoặc cũng có thể chỉ một dung môi chuyển động, cần một pha đứng yên trong bình. Khi đó, chất phân tích sẽ được phân bố vào hai dung môi theo tính chất của chúng, để đạt đến trạng thái cân bằng. Để thực hiện cách chiết này, phải có hệ thống máy chiết, cột chiết hay bình chiết, có bơm để bơm các chất theo dòng chảy ngược chiều nhau với tốc độ nhất định thích hợp, hoặc chỉ một chất, hay cả 2 chất chuyển động ngược chiều nhau, và phải có bộ tách pha, để tách các chất ngay trong quá trình chiết, để lấy chất được chiết ra liên tục, hay theo từng thời điểm (chu kỳ) nhất định mà cân bằng chiết đạt được. Phương pháp chiết này cho hiệu suất cao, tiết kiệm dung môi nhưng do liên tục đun sôi nên dễ phân hủy chất cần tách. Đây là phương pháp chiết được ứng dụng trong chiết sản xuất công nghệ.



(a)



(b)

(a) Hệ thống chiết lỏng – lỏng liên tục với dung môi có tỉ trọng lớn hơn nước

(b) Hệ thống chiết lỏng – lỏng liên tục với dung môi có tỉ trọng nhỏ hơn nước

1.2. Kỹ thuật chiết rắn – lỏng

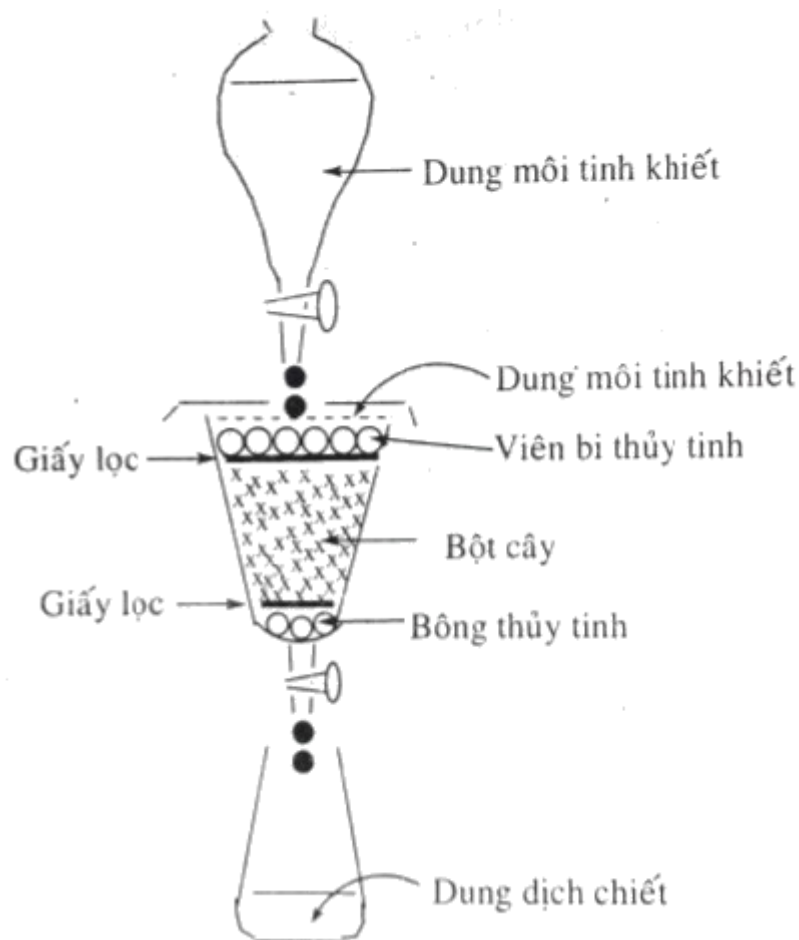
Đối với các chất rắn thì chất cần chiết hoặc ở thành nang nhỏ hoặc phân tán trong chất rắn. Hiệu suất chiết chất rắn bằng chất lỏng phụ thuộc trước hết vào độ hòa tan, và tốc độ chuyển từ pha này sang pha khác. Tính tan phụ thuộc vào dung môi và tốc độ hòa tan phụ thuộc vào bề mặt tiếp xúc. Vì vậy để tăng cường bề mặt tiếp xúc giữa dung môi chiết và chất cần chiết, cần nghiền chất rắn càng nhỏ càng tốt.

Có thể tiến hành chiết nguội bằng cách ngâm chất rắn vào dung môi trong một thời gian rồi chiết dung môi ra. Hoặc cũng có thể thực hiện chiết nóng bằng cách đun hồi lưu dung môi với chất rắn một thời gian rồi chiết ra.

1.2.1. Kỹ thuật chiết cổ điển

1.2.1.1. Kỹ thuật chiết ngấm kiệt (Percolation)

Hệ thống gồm một bình ngấm kiệt thủy tinh, dưới đáy bình là một van khóa để điều chỉnh vận tốc của dung dịch chảy ra; một bình chứa đặt bên dưới để hứng dung dịch chiết. Phía trên cao của bình ngấm kiệt là phễu chiết để chứa dung môi tinh khiết.



Hệ thống chiết ngấm kiệt

Dung môi được rót từ từ vào bình cho đến khi phủ lấp mặt bột cây, có thể sử dụng dung môi nóng hoặc nguội. Để yên sau một thời gian, thường là 12-24 giờ. Mở van bình ngấm kiệt cho dung dịch chiết chảy ra từng giọt nhanh và đồng thời mở khóa phễu chiết để dung môi tinh khiết chảy xuống bình ngấm kiệt. Điều chỉnh sao cho vận tốc dung môi tinh khiết chảy vào bình ngấm kiệt bằng với vận tốc dung dịch chiết chảy ra khỏi bình này.

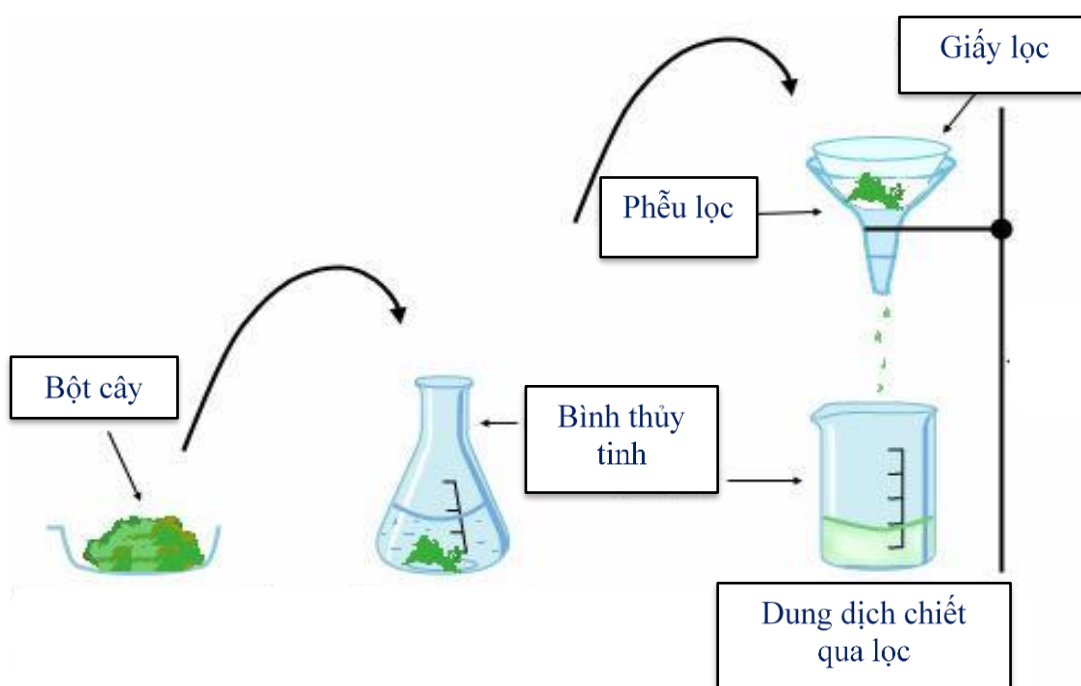
So sánh với phương pháp ngâm dầm, phương pháp này đòi hỏi thiết bị phức tạp hơn một chút nhưng hiệu quả lại cao hơn và ít mất công hơn, vì đây là quá trình chiết liên tục, dung môi trong bình ngấm kiệt đã bão hòa mẫu chất sẽ liên tục thay thế bằng

dung môi tinh khiết. Kiểm tra việc chiết kiệt mẫu bằng sắc ký lớp mỏng hoặc bằng tấm kính sạch.

1.2.1.2. Kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration)

Kỹ thuật ngâm dầm cũng tương tự như kỹ thuật chiết ngâm kiệt nhưng không đòi hỏi thiết bị phức tạp, vì thế có thể dễ dàng thao tác với một lượng lớn mẫu. Ngâm bột cây trong một bình chứa bình thủy tinh hoặc bằng thép không rỉ, có nắp đậy. Tránh sử dụng bình bằng nhựa vì dung môi hữu cơ có thể hòa tan một ít nhựa, gây nhầm lẫn là hợp chất có chứa trong cây.

Rót dung môi tinh khiết vào bình cho đến xấp bề mặt của lớp bột cây. Giữ yên ở nhiệt độ phòng một đêm hoặc một ngày, để cho dung môi xuyên thấm vào cấu trúc tế bào thực vật và hòa tan các hợp chất tự nhiên. Sau đó, dung dịch chiết được lọc ngang qua giấy lọc; thu hồi dung môi sẽ có được cao chiết. Tiếp theo, rót tiếp dung môi mới vào bình chứa mẫu và tiếp tục quá trình chiết thêm một số lần nữa cho đến khi chiết kiệt mẫu.

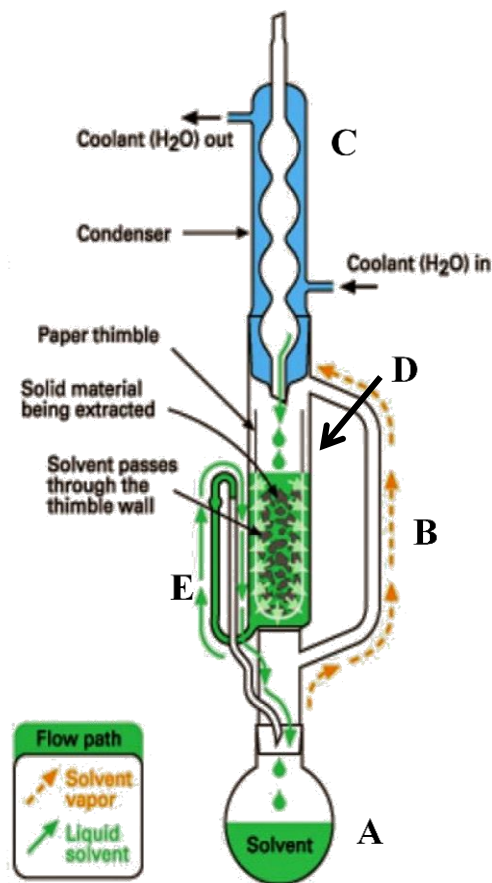


Kỹ thuật chiết ngâm dầm

Có thể gia tăng hiệu quả sự chiết bằng cách thỉnh thoảng đảo trộn lớp bột cây. Mỗi lần ngâm dung môi, chỉ cần 24 giờ là đủ, vì với một lượng dung môi cố định trong bình, mẫu chất chỉ hòa tan vào dung môi đến đạt mức bão hòa, không thể hòa tan thêm được nhiều hơn. Dung môi sau khi được thu hồi, làm khan nước bằng các chất làm khan và được tiếp tục sử dụng để chiết các lần sau.

1.2.1.3. Kỹ thuật chiết bằng máy Soxhlet

Bột cây xay thô được đặt trực tiếp trong ống D hoặc tốt nhất đặt trong túi vải để dễ lấy kha khỏi máy. Không được để lượng bột cây trong ống D cao vượt hơn mức cong của ống thông nhau E. Rót dung môi đã lựa chọn vào bình cầu, thể tích không được nhiều hơn 2/3 thể tích bình cầu.



A: Bình cầu chứa dung môi

B: Dung môi sau khi sôi bay hơi theo ống B

C: Ống sinh hàn

D: Ống chứa bột cây

E: Ống thông nhau, dung môi sau khi chiết mẫu trở lại bình A

Hệ thống chiết bằng máy Soxhlet

Dung môi tinh khiết khi được đun nóng sẽ bốc hơi lên cao gặp ống sinh hàn làm lạnh, ngưng tụ thành thể lỏng, tót thẳng xuống ống D đang chứa bột cây. Dung môi ngấm vào bột cây và chiết những chất hữu cơ nào có thể hòa tan vào dung môi. Theo quá trình đun nóng, lượng dung môi rơi vào ống D càng nhiều, mức dung môi dâng lên cao trong ống D cũng đồng thời dâng cao trong ống E. Đến mức cao nhất trong ống E, dung môi sẽ bị hút về bình cầu A. Bếp tiếp tục đun và quy trình lặp lại.

Lưu ý

- Các hợp chất chiết được trữ trong bình A, đến một lúc nào đó nồng độ chất đạt mức bão hòa thì cần phải thay dung môi mới.

- Sau khi chiết kiệt với một loại dung môi, muốn chiết tiếp với một dung môi khác có tính phân cực hơn, lấy túi bột cây mở ra cho dung môi bay hết, rồi cho trở lại ống D, rót dung môi mới và bắt đầu quy trình chiết mới.

Ưu điểm

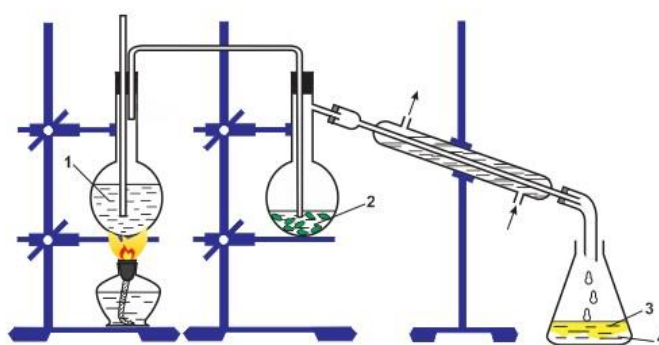
- Tiết kiệm dung môi, thời gian.
- Thao tác đơn giản
- Chiết kiệt các hợp chất trong bột cây

Nhược điểm

- Giới hạn lượng bột cây chiết.
- Không thích hợp để chiết các hợp chất kém bền nhiệt
- Giá thành cao, dễ vỡ, khó thay thế.

1.2.1.4. Kỹ thuật chiết bằng lôi cuốn hơi nước

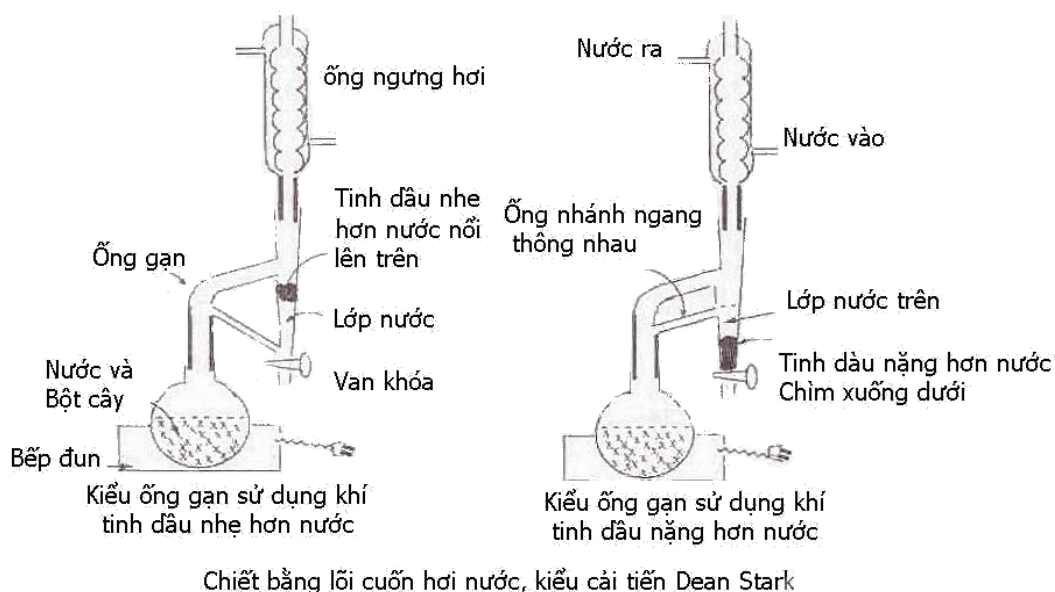
Kỹ thuật đặc trưng để chiết ra khỏi cây cỏ các loại hợp chất có tính chất bay hơi được như tinh dầu.



Hình. Chưng cất lôi cuốn hơi nước

1. Bình cấp hơi nước
2. Bình chứa nguyên liệu chưng cất
3. Lớp tinh dầu
4. Lớp nước

Hệ thống chiết lôi cuốn hơi gián tiếp



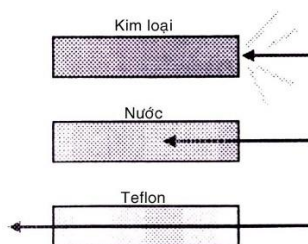
Sự lôi cuốn hơi nước được thực hiện trên cây tươi, được cắt nhuyễn, đặt vào bình cầu, cho nước cất vào bình sao cho tổng thể tích chỉ chiếm 2/3 bình cầu. Nước trong bình cầu khi bị đun nóng sẽ bốc hơi bay lên mang theo tinh dầu, hơi này bị ống ngưng hơi làm lạnh, ngưng tụ trở lại thể lỏng, rót xuống ống gạn. Trong ống gạn, dung dịch tách thành hai lớp gồm nước và tinh dầu. Phần lớn tinh dầu đều tan một phần trong nước, vì vậy để biết chính xác hàm lượng tinh dầu trong cây cần phải sử dụng dung môi diethyl ether và phễu chiết để thu được tinh dầu.

1.2.2. Kỹ thuật chiết hiện đại

1.2.2.1. Kỹ thuật chiết hỗ trợ vi sóng

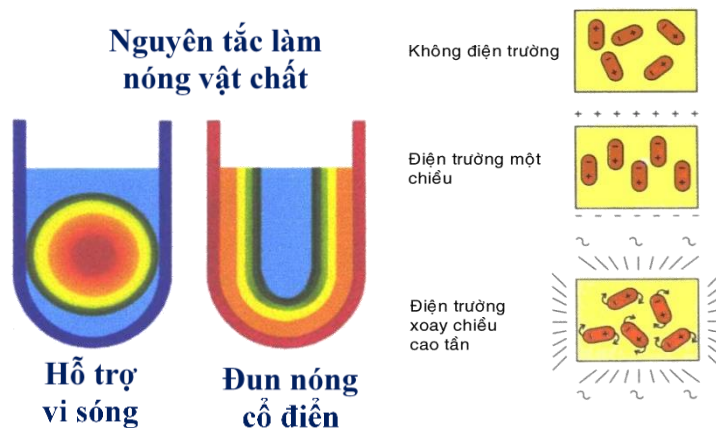
Vi sóng (microwave, micro-onde) là sóng cực ngắn hay còn gọi là sóng siêu tần. Năng lượng của vi sóng là năng lượng điện từ.

Vi sóng có đặc tính xuyên qua được không khí, gốm sứ, thủy tinh, polymer và phản chiếu trên bề mặt kim loại.

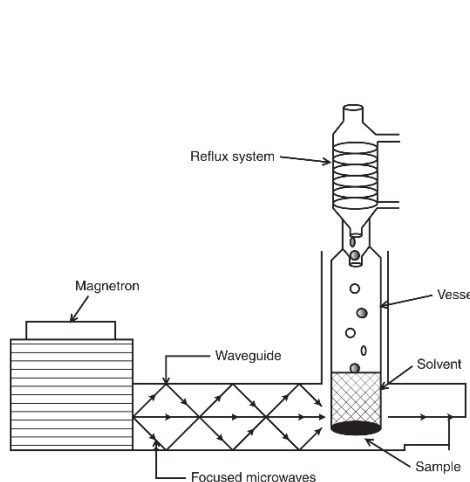


Vi sóng chỉ có tác dụng làm tăng nhiệt độ, vô hại đối với sinh vật. Khi vi sóng chạm đến vật liệu một phần năng lượng của nó bị phản xạ trở lại, một phần đáng kể hơn

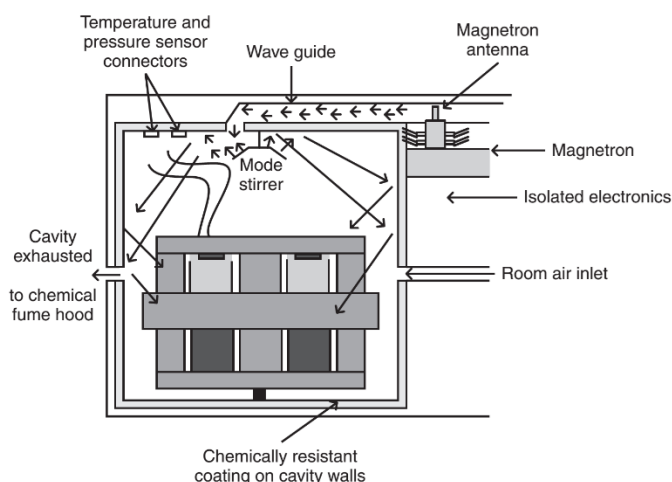
sẽ bị vật liệu hấp thu. Năng lượng này chuyển hóa thành nhiệt lượng và giảm dần khi nó truyền đi trong vật liệu. Sự đun nóng bằng vi sóng là một tiến trình làm tăng nhiệt độ của vật chất một cách đặc biệt, làm nóng từ trong ra ngoài. Tiến trình làm nóng này không phụ thuộc vào sự dẫn nhiệt của bình chứa và vật chất. Các phân tử hợp chất hữu cơ thường ở dạng lưỡng cực điện. Dưới tác động của điện trường, các phân tử lưỡng cực có khuynh hướng sắp xếp theo chiều điện trường. Do đó trong điện trường xoay chiều tần số rất cao (MHz) sẽ gây ra một sự xáo trộn ma sát với vận tốc rất lớn giữa các phân tử với nhau, đó chính là nguồn gốc sự nóng lên của vật chất. Nhiệt độ tăng lên rất nhanh (khoảng 10 °C /phút).



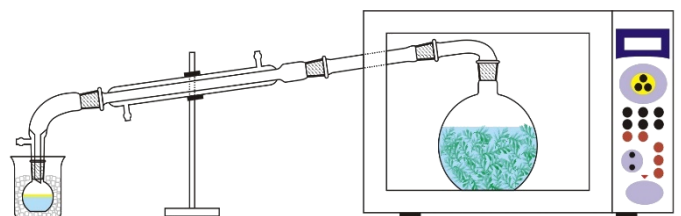
Vi sóng kích hoạt những phân tử phân cực, đặc biệt là nước, nước bị đun nóng bởi sự hấp thu vi sóng và bốc hơi nên được sử dụng để hỗ trợ phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước.



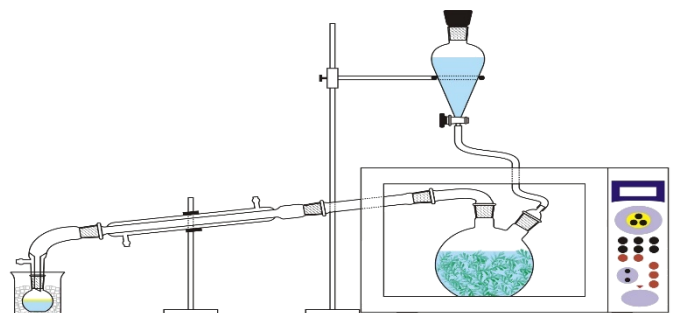
Lò đơn cách



Lò đa cách

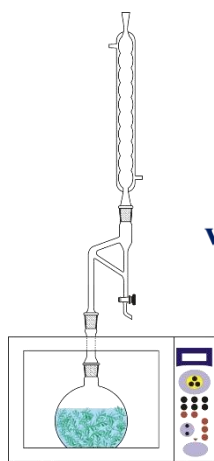


Chưng cất lôi cuốn hơi nước

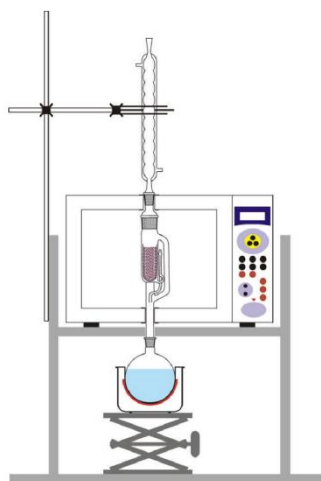
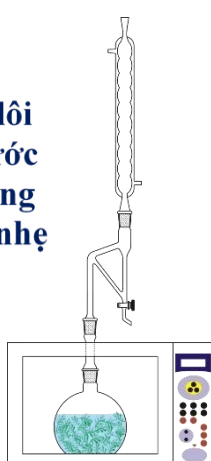


Chưng cất lôi cuốn hơi nước có thêm nước

Chiết Soxhlet hỗ trợ vi sóng



Chưng cất lôi cuốn hơi nước tinh dầu nặng và tinh dầu nhẹ



Ưu điểm

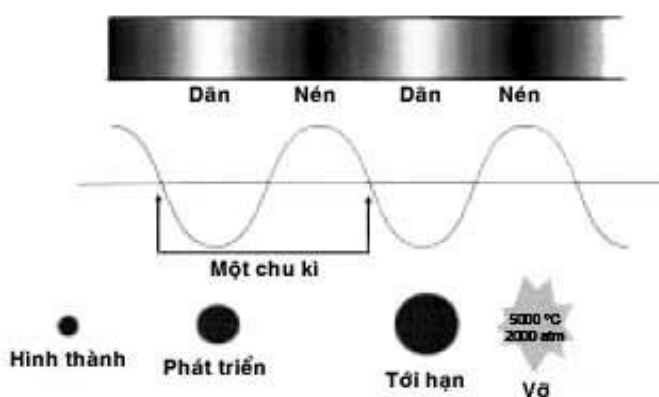
- Không có quán tính nhiệt
- Hiệu suất chiết cao hơn
- Thiết bị dễ sử dụng, an toàn, bảo vệ môi trường
- Thời gian chiết nhanh.
- Tiết kiệm năng lượng
- Có tác dụng đặc biệt với các phân tử phân cực.

Nhược điểm

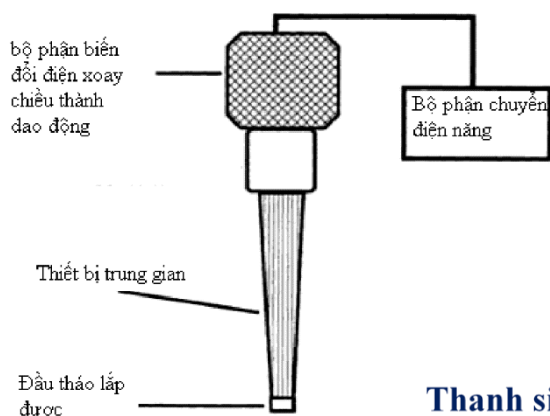
- Khó áp dụng cho quy mô công nghiệp.
- Nhiệt độ sôi của dung môi đạt được nhanh, có thể gây nổ.
- Không phù hợp chiết các chất không bền nhiệt.

1.2.2.2. Kỹ thuật chiết hỗ trợ siêu âm

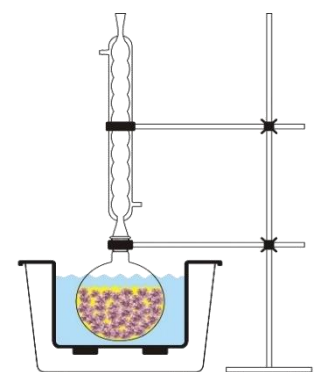
Siêu âm là sóng cơ học hình thành do sự lan truyền dao động của các phần tử trong không gian có tần số lớn hơn giới hạn trên ngưỡng nghe của con người (16- 20kHz). Ngoài ra, sóng siêu âm có bản chất là sóng dọc hay sóng nén, nghĩa là trong trường siêu âm các phần tử dao động theo phương cùng với phương truyền của sóng. Khi sóng siêu âm được truyền vào môi trường chất lỏng, các chu trình kéo và nén liên tiếp được tạo thành. Trong điều kiện bình thường, các phân tử chất lỏng ở rất gần nhau nhờ liên kết hóa học. Khi có sóng siêu âm, trong chu trình nén các phân tử ở gần nhau hơn và trong chu trình kéo chúng bị tách ra xa. Áp lực âm trong chu trình kéo đủ mạnh để thắng các lực liên kết giữa các phân tử và tạo thành những bọt khí nhỏ. Các bọt khí lớn dần đến một kích cỡ nhất định mà tại đó năng lượng của sóng siêu âm không đủ để duy trì pha khí khiến các bọt khí nổ tung dữ dội. Khi đó các phân tử va chạm với nhau mãnh liệt tạo nên hiện tượng “sốc sóng” trong lòng chất lỏng, kết quả là hình thành những điểm có nhiệt độ và áp suất rất cao (5000°C và 5×10^4 kPa) với vận tốc rất nhanh 106 °C/s.



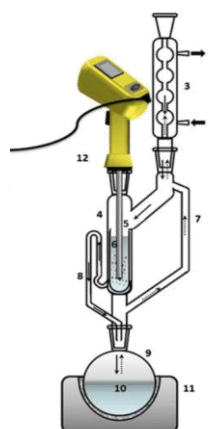
Sóng siêu âm có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chất tan vào dung môi và tăng quá trình khuếch tán chất tan. Sóng siêu âm cường độ cao cũng có thể phá vỡ cấu trúc tế bào, thúc đẩy quá trình chiết.



Thanh siêu âm



Lý trích kích hoạt bằng bồn siêu âm



Chiết Soxhlet hỗ trợ siêu âm

Ưu điểm

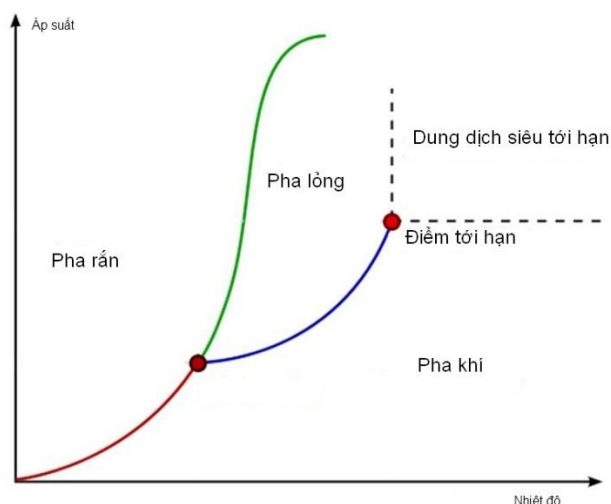
- Hiệu suất chiết cao hơn
- Thiết bị dễ sử dụng, an toàn, bảo vệ môi trường
- Thời gian chiết nhanh.
- Tiết kiệm năng lượng
- Giảm được nhiệt độ và áp suất, phù hợp chiết các chất không bền nhiệt.

Nhược điểm

- Áp dụng cho qui mô nhỏ.

1.2.2.3. Kỹ thuật chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid method)

Chất lỏng siêu tới hạn là chất có nhiệt độ và áp suất trên điểm tới hạn của nó, mang đặc tính của cả chất khí và chất lỏng.

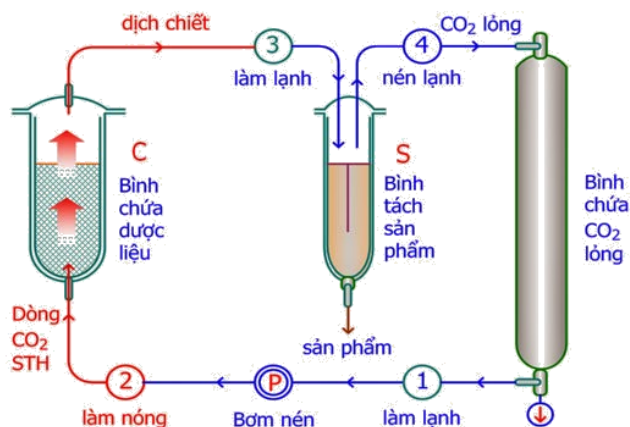


Giản đồ pha cho biết mối liên hệ giữa áp suất và nhiệt độ của một chất tinh khiết

Bảng 2: Giá trị nhiệt độ và áp suất tới hạn của một vài hợp chất có thể sử dụng trong phương pháp chiết siêu tới hạn

Hợp chất	Nhiệt độ tới hạn (K)	Áp suất tới hạn (bar)
CO ₂	304.1	73.8
Nước	647.3	221.2
Ethane	305.4	48.8
Propane	369.8	42.5
Ammoniac	405.5	113.5

Trong các hợp chất khảo sát, CO₂ được sử dụng phổ biến nhất vì nó có áp suất và nhiệt độ tới hạn thấp, giá tiền rẻ, bền về mặt hóa học, không độc, không dễ cháy, có độ nhớt thấp, khả năng khuếch tán cao, dễ loại bỏ sau khi chiết. CO₂ chỉ phù hợp để chiết các hợp chất có tính chất từ không phân cực đến phân cực trung bình. Để tăng thêm tính phân cực cho nó cần bổ sung thêm các chất phân cực như: methanol, acetone,... (thêm từ 1-5 %mol).



Sơ đồ hệ thống chiết siêu tới hạn CO_2

Ưu điểm

- Khuếch tán vào trong mẫu chiết tốt hơn dung môi khác.
- Sử dụng ít dung môi.
- Thân thiện với môi trường.
- Có tính chọn lọc, hiệu suất chiết cao.
- Phù hợp chiết chất kém bền nhiệt.

Nhược điểm

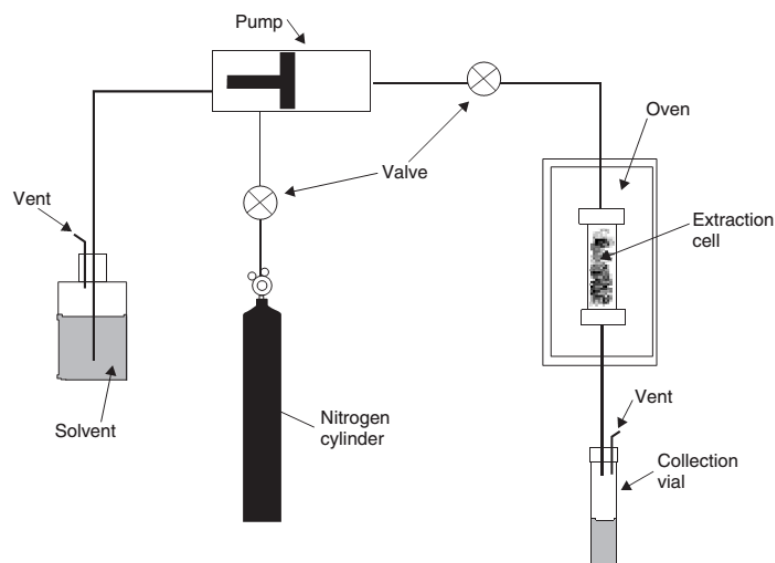
- Thiết bị chuyên dùng, mắc tiền.
- Không thích hợp với mẫu chiết dạng lỏng.
- Phải thực hiện nhiều khảo sát để tìm các thông số tối ưu cho việc chiết hiệu quả.

1.2.2.4. Kỹ thuật chiết dưới áp suất cao (Pressurized liquid extraction)

Khả năng hòa tan của các chất trong dung môi phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ. Khi nhiệt độ tăng, khả năng hòa tan các chất tăng. Vì thế, trong chiết xuất, người ta có xu hướng tăng nhiệt độ để giảm lượng dung môi sử dụng và giảm thời gian chiết. Tuy nhiên, trong điều kiện bình thường, việc tăng nhiệt độ để chiết có giới hạn của nó là nhiệt độ sôi của dung môi. Khi hóa hơi, dung môi không còn khả năng hòa tan các chất nữa. Để khắc phục điều này, người ta tiến hành chiết các chất dưới áp suất cao dựa vào nguyên tắc: nhiệt độ sôi của chất lỏng tăng khi áp suất tăng. Khi đó ta có phương pháp chiết chất lỏng dưới áp suất.

Khi nhiệt độ tăng lên 10^0C , khả năng hòa tan của dung môi tăng lên gấp rưỡi. Trong chiết dưới áp suất, dung môi chiết được đưa tới nhiệt độ và áp suất gần với vùng tới hạn. Nhiệt độ và áp suất cao làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của dung môi để cho

việc chiết xuất hiệu quả hơn. Nhiệt độ có thể thay đổi từ 80 – 200°C và áp suất có thể tới 150 bar tùy theo loại dung môi và chất cần chiết.



Hệ thống chiết dưới áp suất cao

Ưu điểm

- Lựa chọn dung môi linh hoạt.
- Hòa tan được nhiều hợp chất từ không phân cực đến phân cực.

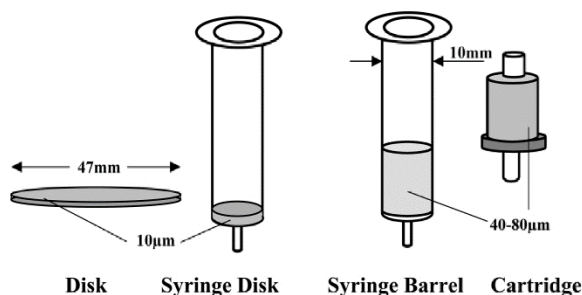
Nhược điểm

- Chiết nhanh và hiệu quả đối với mẫu rắn.
- Không phù hợp chiết các chất kém bền nhiệt.

1.3. Kỹ thuật chiết pha rắn

Chiết pha rắn (hay chiết rắn – lỏng) là quá trình phân bố các chất tan giữa hai pha lỏng và rắn. Trong đó, chất tan ban đầu ở trong pha lỏng (nước hoặc dung môi hữu cơ), chất để hấp thụ chất tan ở dạng rắn (dạng hạt nhỏ và xốp) gọi là pha rắn.

Pha rắn (còn được gọi pha tĩnh) thường là các hạt silica gel xốp trung tính, (chất hấp thụ pha thường), oxit nhôm, silica gel trung tính được alkyl hóa bằng các gốc hydrocarbon mạch thẳng –C₂, –C₄, –C₈, –C₁₈,... (chất hấp thụ pha đảo) hay nhân phenyl, polymer hữu cơ, hạt nhựa, than hoạt tính,... Các hạt này được nhồi vào cột chiết nhỏ (thường là cột có kích thước 5 x 1 cm) hoặc nén dạng đĩa dày 1-2 mm với đường kính 3-4 cm (đĩa chiết).

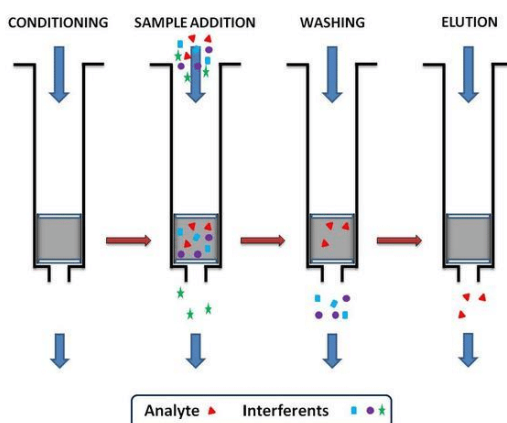


Các loại chất chiết pha rắn

- Chất hấp thu pha thường: silica gel, nhôm oxid.
- Chất hấp thu pha ngược: silica gel pha đảo (silica gel thường được alkyl hóa nhóm -OH).
- Chất trao đổi ion: để tách cation và anion.
- Chất ray hay sàng lọc phân tử theo độ lớn, kích thước phân tử.
- Chất hấp thụ khí

Pha lỏng là pha chứa chất cần phân tích, chúng có thể là dung môi hữu cơ, dung dịch đậm,...

Khi cho pha lỏng đi qua cột chiết (hoặc đĩa chiết), pha rắn tương tác với chất cần phân tích và giữ một nhóm (hoặc một số nhóm) của chất cần phân tích lại trên pha rắn, các chất còn lại đi ra khỏi cột cùng với dung môi hòa tan mẫu. Sau đó, dùng dung môi thích hợp để lấy nhóm chất cần phân tích ra khỏi cột. Thông thường, thể tích dung dịch chứa chất cần phân tích giải hấp ra nhỏ hơn nhiều lần so với dung dịch mẫu ban đầu, điều này có nghĩa là chất cần phân tích đã được làm giàu.



Quá trình tiến hành chiết pha rắn

Ưu điểm

- Có tính chọn lọc.
- Thao tác nhanh, đơn giản.

- Cân bằng chiết nhanh và có tính thuận nghịch.

Nhược điểm

- Thích hợp cho mẫu lượng nhỏ và phân tích các vết.

1.4. Phương pháp thu hồi dung môi

Sau các quá trình chiết tách lỏng – lỏng hoặc rắn – lỏng, dung dịch chiết được làm khan nước bằng các chất làm khan như Na_2SO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 ,... Sau đó, tiến hành đuổi dung môi để thu được cao chiết.



Máy cô quay chân không

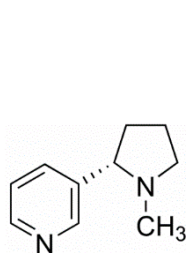
CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NHẬN DANH MỘT SỐ LOẠI HỢP CHẤT TỰ NHIÊN

2.1. Alkaloid

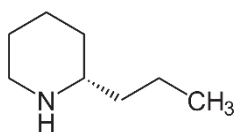
2.1.1. Đại cương

Alkaloid là những hợp chất hữu cơ có chứa N, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm, thường gặp trong thực vật. Alkaloid có phổ biến trong thực vật, nó thường ở trong dịch tế bào dưới dạng muối với acid hữu cơ, lúc đầu mới hình thành alkaloid nằm trong các bộ phận đang phát triển của cây (mầm, chồi ngọn) sau chuyển ra các bộ phận khác của cây.

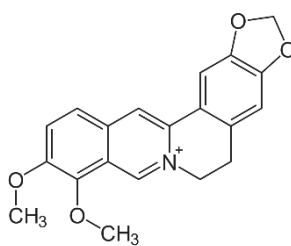
Đa số alkaloid không màu, ở trạng thái kết tinh rắn với điểm nóng chảy xác định hoặc có khoảng nhiệt độ phân hủy. Một vài alkaloid ở dạng nhựa vô định hình, một vài alkaloid ở dạng lỏng (nicotine, coniine) và một vài alkaloid có màu (berberin màu vàng, betanidin màu đỏ).



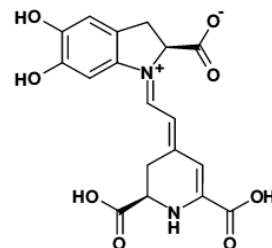
Nicotine



Coniine



Berberin



Betanidin

Alkaloid là những hợp chất có tính base yếu, do sự có mặt của nguyên tử N. Tính base của các alkaloid cũng khác nhau tùy theo sự hiện diện của các nhóm thế R gắn trên nguyên tử N.

Tính hòa tan của các alkaloid đóng vai trò quan trọng trong việc chiết tách alkaloid ra khỏi cây cũng như trong kỹ nghệ dược phẩm điều chế dạng thuốc uống. Hầu hết các alkaloid dạng base tự do không tan trong nước nhưng tan trong các dung môi hữu cơ như CHCl_3 , ether và các alcol bậc thấp methanol, ethanol, propan-1-ol,...). Một số nhóm alkaloid có thêm các nhóm phân cực nên tan một phần trong nước hoặc kiềm. Ngược lại, các muối alkaloid nói chung tan được trong nước và cồn nhưng hầu như không tan trong dung môi hữu cơ như: benzene, ether, chloroform. Base của alkaloid có N - bậc 4 và N-oxid khác tan trong nước và trong kiềm, ít tan trong dung môi hữu cơ.

2.1.2. Phương pháp định tính alkaloid

Người ta sử dụng thuốc thử để xác nhận sự có mặt của alkaloid trong thực vật. Do cơ sở các phản ứng hóa học của alkaloid không rõ ràng, nên người ta chỉ phân biệt các phản ứng này là phản ứng màu hoặc phản ứng tạo tủa.

a) Phản ứng tạo tủa

- Thuốc thử Mayer: K_2HgI_4 , thường cho tủa màu trắng hoặc vàng nhạt không tan kể cả trong dung dịch acid loãng.
- Thuốc thử Dragendoff hay Kraut: $KBiI_4$ cho tủa màu vàng cam – đỏ.
- Thuốc thử Bouchardat hay Wagner: KI_3 (KI 0.1N + I_2) cho kết tủa màu nâu.
- Thuốc thử Sonnenchein: $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ tạo tủa với hầu hết alkaloid đặc biệt nhạy với quinin và strychnin.

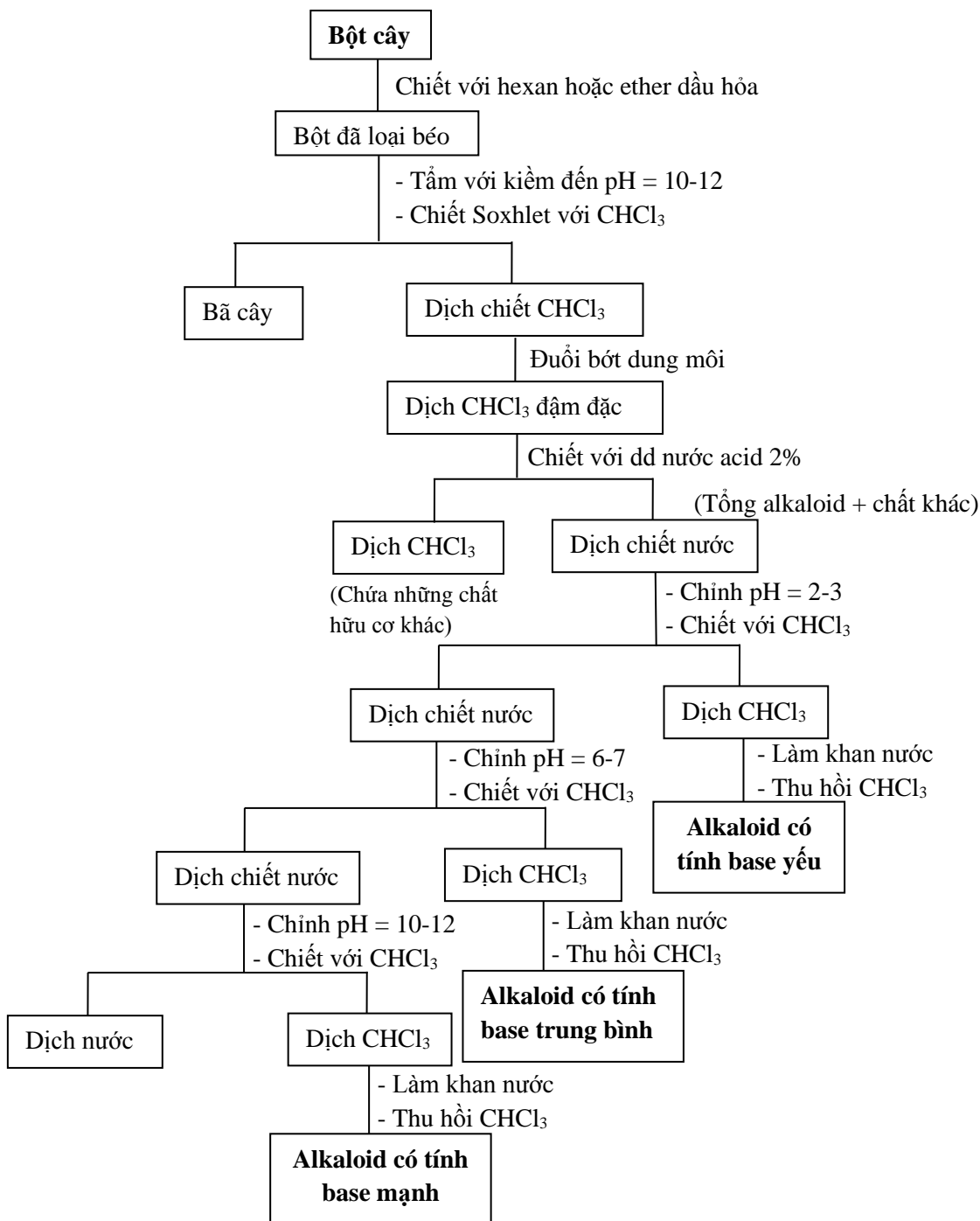
b) Phản ứng tạo màu

- Tác nhân Erdmann: 20ml H_2SO_4 đậm đặc + 10 giọt (dung dịch 100ml chứa 10 giọt HNO_3 dùng định tính brucin (đỏ, vàng), papaverin (nâu đỏ, nâu sẫm), tebain (đỏ máu, vàng).
- Tác nhân Frohde: acid H_2SO_4 đậm đặc + 5% ammoni-molibdat định tính morphin (xanh tím), hydrastin (xanh oliu).
- Tác nhân Mandelin: acid H_2SO_4 đậm đặc + vanadin (acid H_2SO_4 đậm đặc + 5% ammoni-vanadat) định tính strychnin (xanh da trời sang đỏ).
- Tác nhân Marquis: Formaldehyde + acid H_2SO_4 đậm đặc (1ml acid + 1 giọt formaldehyde) định tính morphin và các dẫn xuất (đỏ tím).
- Tác nhân Thalleiochin: nước clo (brom)+amoniac định tính quinin, quinidin (xanh lá cây)
- Tác nhân Arnold-Vitali: lượng nhỏ KNO_2 + acid H_2SO_4 đậm đặc định tính strychnin (đỏ tím), atropin, hyoscyamin, scopolamin (tím).

2.1.3. Phương pháp chiết tách alkaloid

Dựa vào khả năng hòa tan của alkaloid trong các dung môi hữu cơ, vô cơ và nước để tiến hành tách chiết và dựa vào các tính chất lý hóa của alkaloid để tiến hành tinh chế.

a) Chiết bằng dung môi hữu cơ

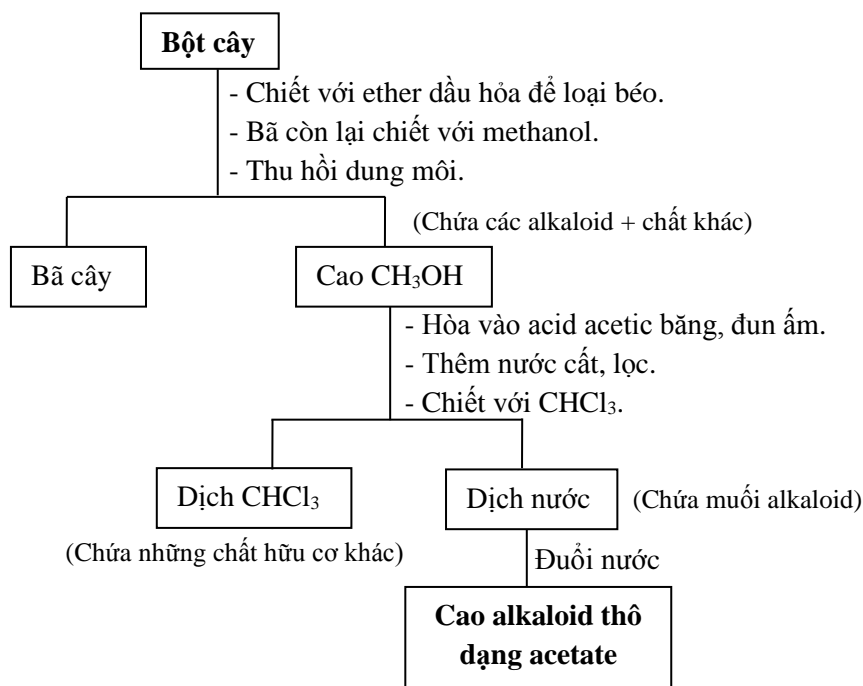
**Sơ đồ 1:** Phương pháp chiết tách alkaloid bằng dung môi hữu cơ**Ưu nhược điểm**

- Không chiết được những alkaloid dạng N-bậc 4 và N-oxid. Ngoài ra, việc sử dụng dung môi có tính phân cực trung bình như chloroform sẽ không chiết tốt các alkaloid glycosid, các loại alkaloid phân cực mạnh. Để khắc phục, trước khi chiết tách có thể sử dụng bột Zn trong môi trường HCl để khử dạng N-oxid thành

N tự do hoặc thủy giải alkaloid glycosid bằng dung dịch acid; hoặc đôi dung môi chloroform bằng loại dung môi khác có tính phân cực mạnh hơn.

- Lựa chọn nồng độ kiềm cho từng giai đoạn cần nghiên cứu kỹ để tách được hết alkaloid.

b) Chiết bằng dung dịch nước acid



Sơ đồ 2: *Phương pháp chiết alkaloid ra bằng dung dịch nước acid*

Ưu nhược điểm: sử dụng dung môi methanol sẽ chiết hết tất cả các hợp chất trong mẫu cây nên sẽ khó khăn cho việc tách riêng các alkaloid.

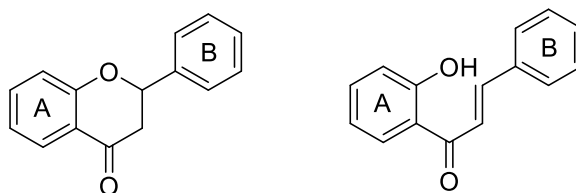
Sau khi chiết xuất ít khi thu được một alkaloid tinh khiết mà thường là một hỗn hợp các alkaloid còn lẫn tạp chất. Nếu chỉ có một alkaloid thô thì có thể tinh chế bằng cách chuyển nó nhiều lần từ dung môi hữu cơ sang dung môi nước và ngược lại, cuối cùng bốc hơi dung môi ta được một alkaloid tinh khiết. Nếu là hỗn hợp nhiều alkaloid, để tinh chế và phân lập riêng từng alkaloid bằng phương pháp kết tinh phân đoạn bằng các dung môi, hoặc sử dụng thêm một số phương pháp khác như: phương pháp trao đổi ion, phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng điều chế...

2.2. Flavonoid

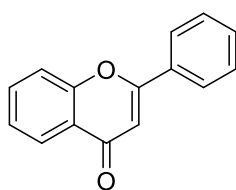
2.2.1. Đại cương

Flavonoid là những hợp chất màu phenol thực vật, tạo nên màu cho rất nhiều rau, quả, hoa,..., phần lớn flavonoid có màu vàng.

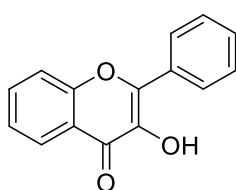
Flavonoid có cấu trúc cơ bản là 1,3-diphenylpropane, nghĩa là 2 vòng benzene A và B nối nhau qua một dây có 3C, nên thường được gọi là $C_6 - C_3 - C_6$.



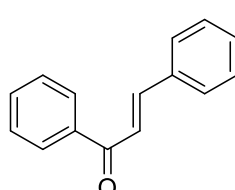
Các flavonoid có thể hiện diện ở dạng tự do hoặc dạng glycosid. Các flavonoid thường dễ kết tinh và có màu. Flavon có màu vàng nhạt hoặc cam; flavonol có màu vàng đến vàng nhạt; chalcon có màu vàng đến cam đỏ. Các isoflavon, flavanon, flavanol, leucoanthocyanidin, catechin kết tinh không màu.



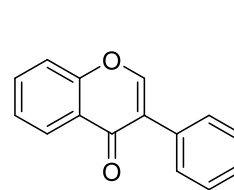
Flavone



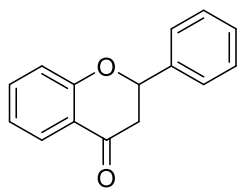
Flavonol



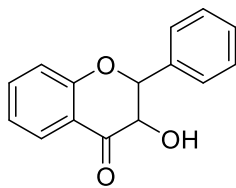
Chalcone



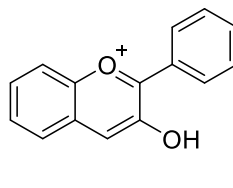
Isoflavone



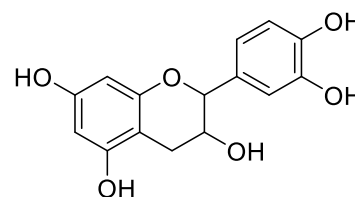
Flavanone



Flavanol



Anthocyanidin



Catechin

Một số khung sườn loại flavonoid

2.2.2. Phương pháp định tính flavonoid

a) Hơi amoniac

Sử dụng sắc ký lớp mỏng, sau khi giải ly, đặt bản mỏng trong bình kín bão hòa hơi amoniac NH_3 , sau đó phun xịt bản mỏng bởi dung dịch 1% KOH/ethanol.

Bảng 3: Màu của flavonoid dưới ánh đèn tử ngoại khi có và không có xử lý với kiềm

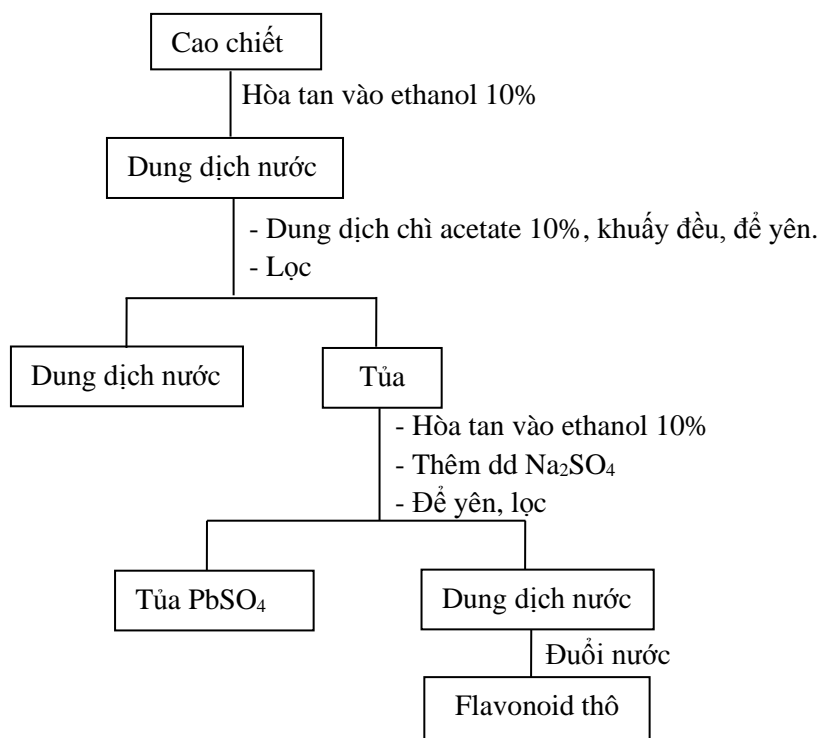
Flavonoid	Không có dung dịch kiềm		Phun xịt với dung dịch kiềm	
	Ánh sáng thường	UV ₃₆₅	Ánh sáng thường	UV ₃₆₅
Flavone	Không màu Vàng nhạt	Nâu Xanh dương	Vàng	Vàng
Flavonol	Vàng nhạt Vàng đậm	Vàng Vàng lục	Vàng	Vàng
Flavanone	Không màu	Không màu	Không màu	Vàng
Catechin	Không màu	Không màu	Không màu	Vết tối
Anthocyanidin	Đỏ	Nâu tối	Xanh dương	Vết tối
Chalcone	Vàng đậm	Vàng nâu đậm	Vàng cam-đỏ	Cam-đỏ tía

- b) Sulfuric acid đậm đặc định tính flavon và flavonol cho màu vàng đậm đến cam và có phát huỳnh quang. Chalcon, auron cho màu đỏ hoặc xanh dương/ Flavanon cho màu từ cam đến đỏ.
- c) Dung dịch NaOH/ethanol định tính flavon, isoflavon, isoflavanon, flavonon, chalcon, leucoanthocyanidin có màu vàng, flavonol cho màu từ vàng đến cam, aurob cho màu đỏ đến đỏ tím.
- d) Dung dịch AlCl₃ (FeCl₃)/ethanol: tùy theo số lượng -OH, hợp chất có màu khác nhau từ xanh lục đến xanh đen.
- e) Dung dịch chì acetat có tính kiềm: màu phụ thuộc vào dẫn xuất flavonoid.
- f) Phản ứng Cyanidin (Shinoda): Flavon, flavonon, flavonol, flavanol, xanthon có màu cam, đỏ hoặc tím; isoflavon, isoflavanon, auron không đổi màu.

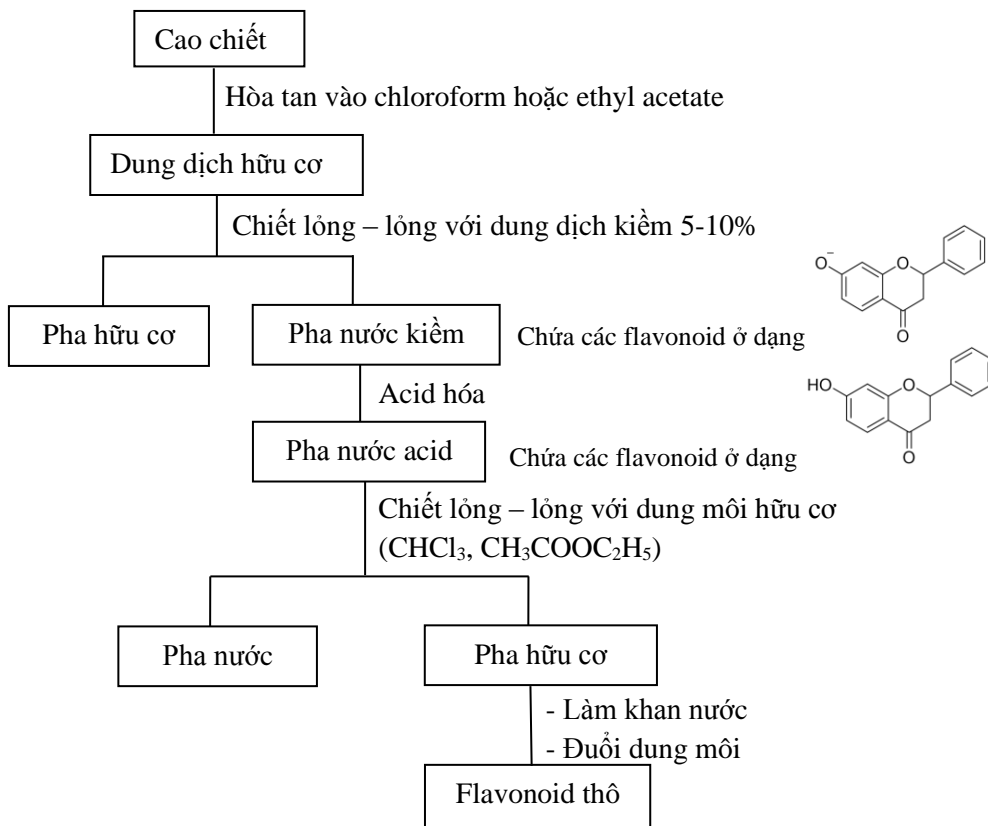
2.2.3. Phương pháp chiết tách flavonoid

Các flavonoid có độ hòa tan khác nhau tùy theo số nhóm hydroxyl và các nhóm thế khác trong cấu trúc hóa học, nên rất khó có một phương pháp chung để trích ly flavonoid ra khỏi cây. Flavonoid nào mang nhiều nhóm methoxy -OCH₃ và ít nhóm hydroxyl -OH, có tính phân cực yếu, tan tốt trong dung môi ít phân cực như: benzene, chloroform, ethyl acetate. Flavonoid mang nhiều nhóm hydroxyl, có tính phân cực mạnh sẽ hòa tan tốt trong dung môi có tính phân cực như acetone, ethanol, methanol,... Các flavonoid glycosid, anthocyanidin không tan trong diethyl ether nhưng tan trong nước

nóng, ethanol nóng. Riêng anthocyanidin có thể chiết tách dưới dạng chloride bởi dung dịch 0.01N HCl/methanol.



Sơ đồ 3: Quy trình chiết flavonoid bằng dung dịch chì acetate



Sơ đồ 4: Quy trình tách flavonoid bằng dung dịch kiềm

Sau khi thu được cao flavonoid thô, tiến hành sắc ký cột để tách riêng các flavonoid.

2.3. Terpenoid – Steroid

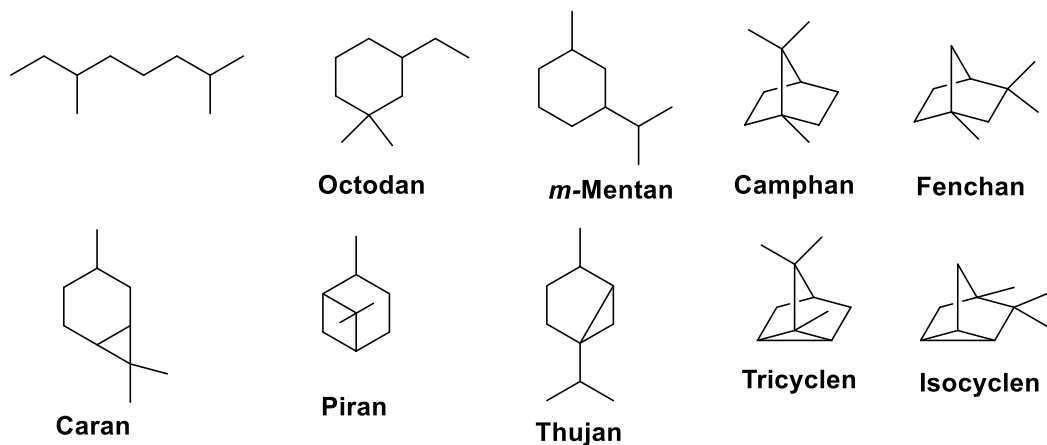
2.3.1. Đại cương

Terpenoid là nhóm hợp chất tự nhiên mà cấu trúc hóa học dựa trên cơ sở các phân tử isopren liên kết lại với nhau, có công thức tổng quát $(C_5H_8)_n$ với $n \geq 2$.

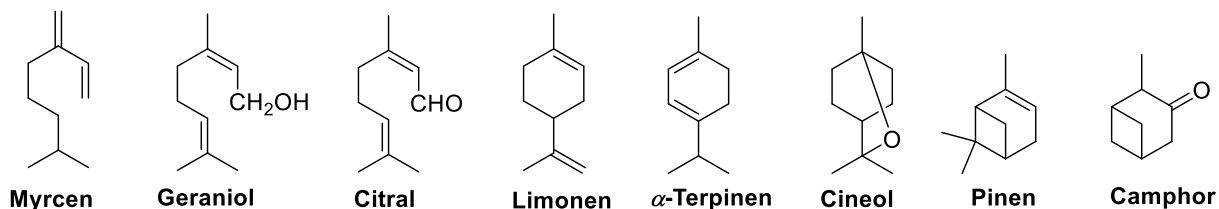
Dựa vào một số đơn vị isopren, người ta phân chia như sau:

a) Monoterpen ($C_{10}H_{16}$)

Là thành phần chủ yếu của tinh dầu. Cấu trúc của monoterpen có thể là mạch hở, 1, 2 hoặc 3 vòng với khoảng 10 khung sườn carbon cơ bản chính.



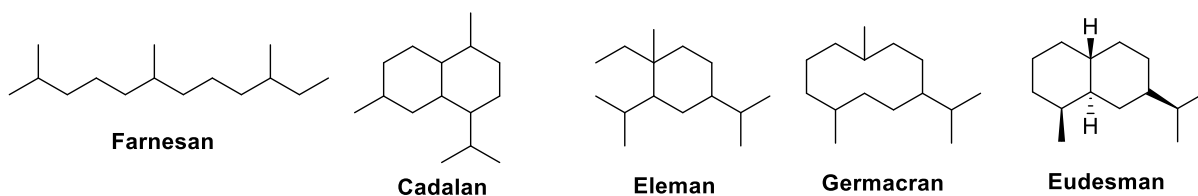
Một số khung monoterpene



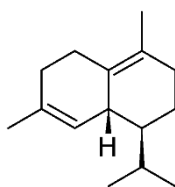
Một số hợp chất tự nhiên loại monoterpene

b) Sesquiterpen ($C_{15}H_{24}$)

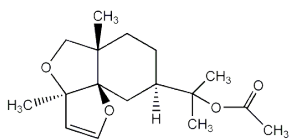
Tinh dầu cũng chứa những hợp chất sesquiterpen. Cấu trúc hóa học của các hợp chất tự nhiên sesquiterpen có thể là mạch hở, 1, 2, 3 hoặc 4 với 80 khung sườn cơ bản chính.



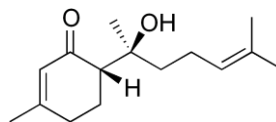
Một số khung sườn sesquiterpen



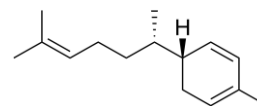
δ -Cadinen



Phytuberin



Hernandulcin

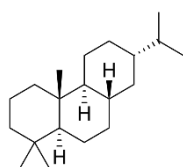


Zingiberen

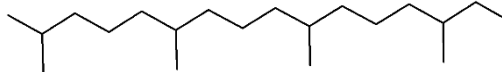
Một số hợp chất sesquiterpen

c) Diterpen ($C_{20}H_{32}$)

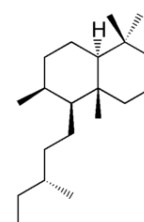
Trong tự nhiên, diterpen không vòng là hợp chất phytol. Diterpen đơn vòng là vitamin A. Diterpen 4 vòng có khung cơ bản là gibberelan. Cấu trúc hóa học của diterpen có thể là mạch hở, 1, 2, 3 hoặc 4 vòng với 70 khung sườn carbon cơ bản chính.



Abietan

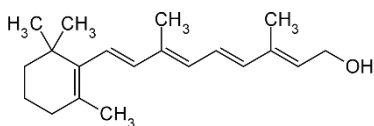


Phytan

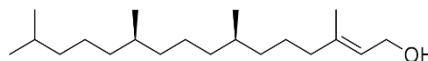


Labdan

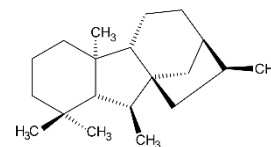
Một số khung sườn cơ bản loại diterpen



Retinol (Vitamin A)



Phytol

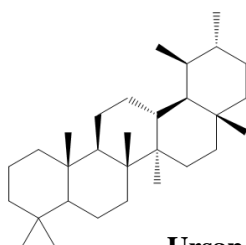


Gibberellan

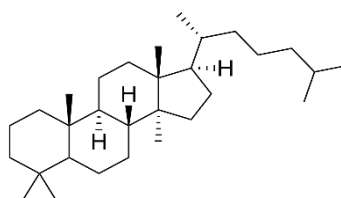
Một số hợp chất tự nhiên cơ bản loại diterpen

d) Triterpen ($C_{30}H_{48}$)

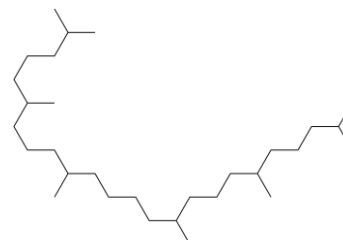
Cấu trúc hóa học của triterpen có thể là mạch hở, 3, 4 hoặc 5 vòng với 33 khung sườn cơ bản chính.



Ursan

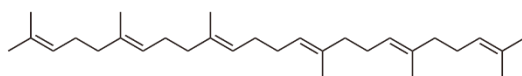


Lanostan

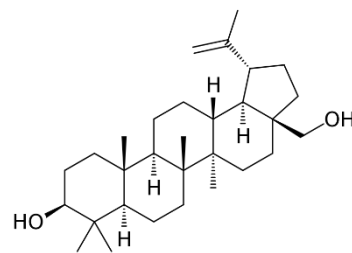


Squalan

Một số khung sườn triterpen



Squalen

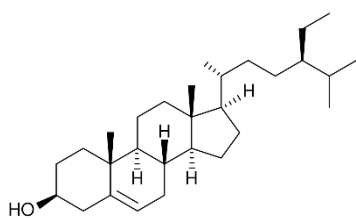


Betulin

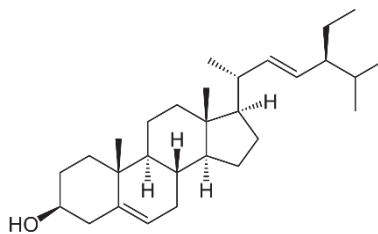
Một số hợp chất tự nhiên loại triterpen

e) Steroid

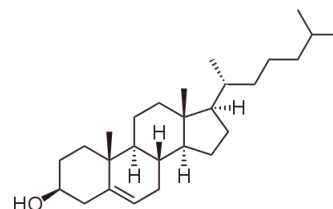
Steroid là nhóm hợp chất tự nhiên phân bố rộng rãi trong giới động vật và thực vật, với cấu trúc tổng quát là hệ thống vòng cyclopentanoperhydrophenantren hoặc một trong vài trường hợp hiếm gặp là dạng biến đổi của hệ thống vòng nói trên.



β -Sitosterol



Stigmasterol



Cholesterol

Một số hợp chất steroid tự nhiên

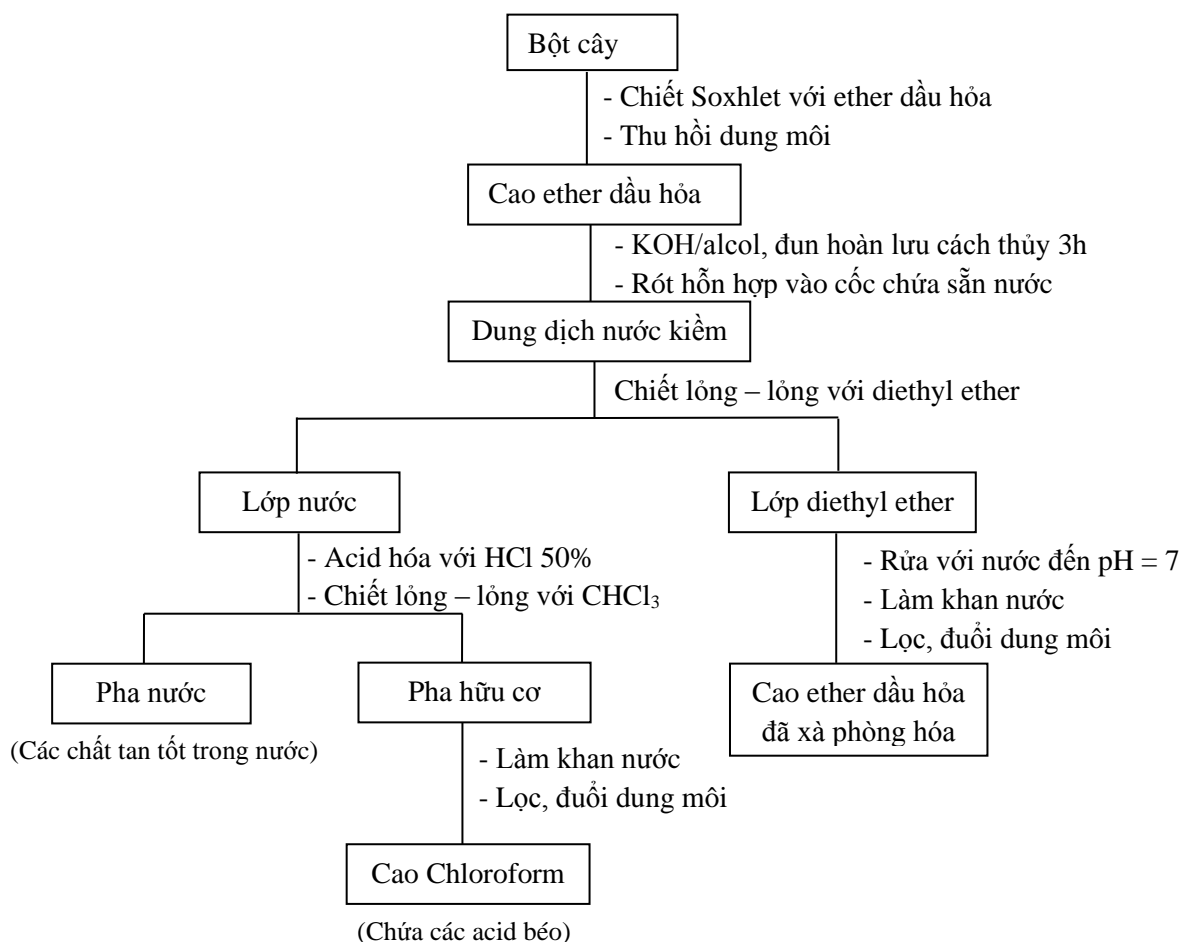
2.3.2. Phương pháp định tính terpenoid-steroid

- Phản ứng Liebermann-Burchard: định tính steroid cho màu xanh dương – lục, triterpenoid cho màu đỏ (thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng).
- Phản ứng Rosenheim: định tính saponin triterpen cho màu xanh dương (thử trong ống nghiệm).
- Phản ứng Rosenthaler: định tính triterpenoid-steroid cho màu xanh lục hoặc tím (thử trong ống nghiệm).
- Phản ứng Salkowski: định tính steroid cho màu đỏ đậm, xanh, xanh tím (thử nghiệm trong ống nghiệm).
- Phản ứng Noller: định tính cho màu đặc trưng.
- Thuốc thử Komarowsky: dùng phun xịt trên bản mỏng, định tính steroid cho màu vàng đến hồng.

2.3.3. Phương pháp chiết tách terpenoid-steroid

Hầu hết các terpenoid, steroid là hydrocarbon có mang một số nhóm chức hydroxyl (-OH), acetyl (-OAc), ether (-O-), carbonyl (C=O),... nên nói chung là hợp chất có tính ít phân cực, có tính thân dầu nên tan tốt trong ether dầu hỏa, diethyl ether, hexane, chloroform,... ít tan trong nước ngoại trừ khi chúng kết hợp với các phân tử đường để tạo thành glycosid.

Không có phương pháp đặc trưng nào để chỉ tách riêng terpenoid-steroid ra khỏi mẫu cây. Sử dụng dung môi hữu cơ nêu trên để chiết tách chúng ra khỏi cây cỏ và tiếp theo sử dụng các kỹ thuật sắc ký cột để tách riêng các hợp chất.



Sơ đồ 5: Quy trình tách chiết riêng sterol, triterpen ra khỏi cao ether dầu hỏa

2.4. Chất béo

2.4.1. Đại cương

Chất béo là những hợp chất hữu cơ thu được khi chiết mô, tế bào bởi những dung môi không phân cực. Người ta thường chia chất béo thành các nhóm: sterol (không chứa nối ester, không bị thủy giải), nhóm sáp, nhóm glycerid, dầu béo, nhóm chất béo phức tạp (phospholipid, lipoprotein,...).

a) *Sáp*

Lá cây và vỏ trái cây (loại vỏ trơn láng) được che phủ bên ngoài bởi một lớp bảo vệ mềm mại, không thấm nước. Lớp màng này được tạo thành bởi cutin và sáp.

Lớp cutin được tạo nên do các phân tử hydroxyacid bị ester hóa-liên phân tử: một nhóm -COOH của một phân tử tạo nối ester với nhóm chức alcol của một phân tử khác.

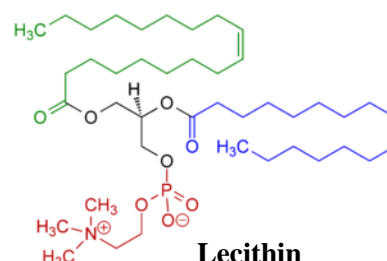
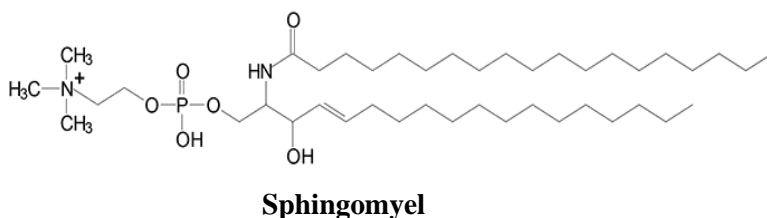
Lớp sáp là chất liệu tráng phủ lên hệ thống màng cutin. Chất này không tan trong nước, không ẩm ướt, có nhiệt độ nóng chảy thấp. Sáp là hỗn hợp của các ester của acid carboxylic mạch dài với các alcol mạch dài.

b) *Triglycerid*

Triglycerid là triester của glycerol với 3 acid carboxylic dây dài. Các acid béo thường là mạch thẳng, có số carbon chẵn khoảng 12-20 carbon. Trong thực vật thường gặp các acid béo như palmitic acid, stearic acid, linoleic acid,...

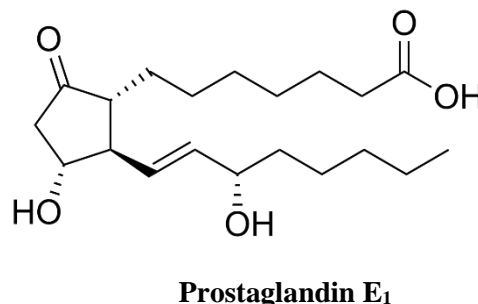
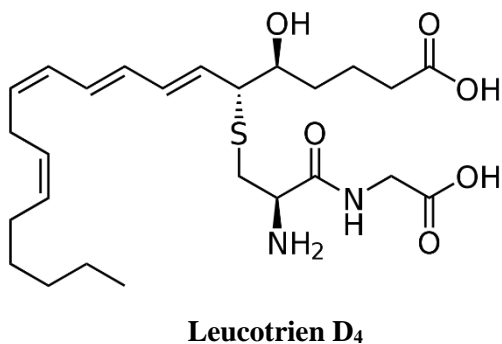
c) *Phospholipid*

Là thành phần chính của màng tế bào thực vật và động vật. Các phospholipid có công thức hóa học giống dầu béo, mỡ ở chỗ khung sườn glycerol nối qua hai nối ester với hai acid béo và nối ester thứ ba với phosphoric acid.



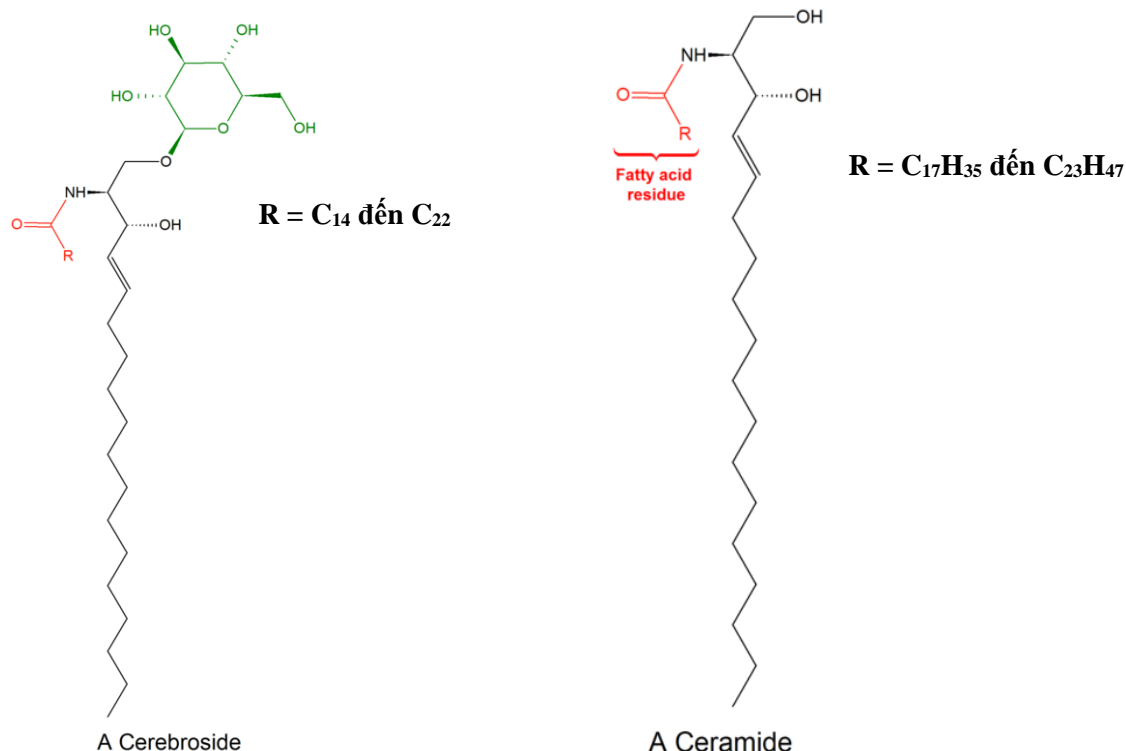
d) *Prostaglandin*

Là nhóm hợp chất gồm carboxylic acid dây dài 20 carbon có chứa một vòng năm và hai mạch dài.



e) *Glycolipid*

Gồm hai nhóm chính là ceramid và cerebrosid, với các mạch carbon dài ngắn khác nhau.



2.4.2. Phương pháp định tính chất béo

Phát hiện chất béo bằng sắc ký lớp mỏng với các thuốc thử phun xịt bản mỏng như sau:

- 2',7'-Dichlorofluorescein: vết lipid phát quang màu xanh lục
- Dung dịch 50% H₂SO₄ trong methanol: sterol cho màu đỏ tía, lipid cho màu nâu đen,
- Hơi iod: lipid có màu vàng đến nâu nhạt.
- Glucose-Anilin: dùng để phát hiện acid hữu cơ, cho màu nâu.

2.4.3. Phương pháp tách chiết chất béo

- Loại béo bằng ether dầu hỏa
 - Sử dụng nhiệt độ lạnh: các chất béo sẽ đông váng trên bề mặt dung dịch hoặc kết tủa khi để dung dịch ether dầu hỏa trong tủ lạnh ở -10°C trong vài ngày. Sau đó vớt và lọc để thu chất béo.
 - Thực hiện xà phòng hóa để tách riêng sterol.
 - Sử dụng sắc ký cột với dung môi giải ly là ether dầu hỏa hoặc hexane.

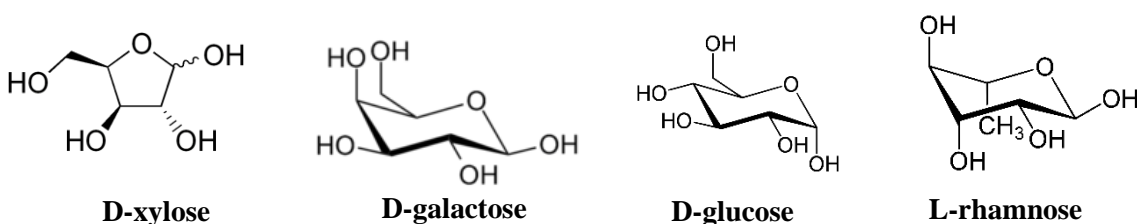
- b) Sử dụng chì acetate: sử dụng dung dịch chì acetate 2-5% cho thêm vào cao chiết đã hòa tan trong alcol-nước. Để qua đêm và lọc kết tủa trắng để loại chất béo.
- c) Sử dụng sắc ký cột với pha tĩnh là silica gel pha đảo.

2.5. Glycosid

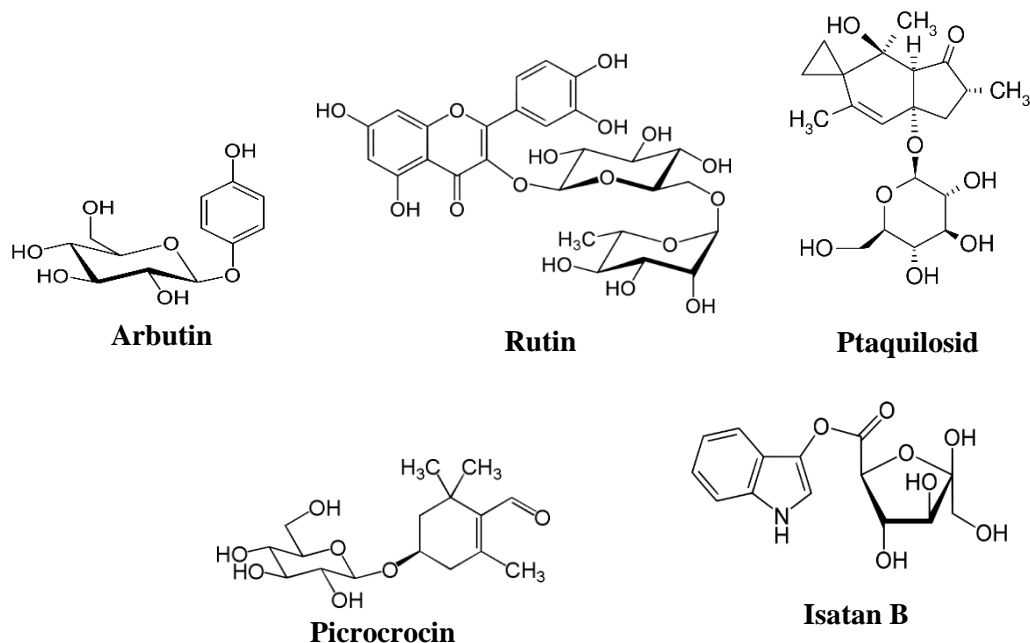
2.5.1. Đại cương

Glycosid là hợp chất mà cấu trúc hóa học gồm có hai phần: phần đường và phần không đường thường được gọi là aglycon. Dưới tác dụng của enzym thực vật hoặc dung dịch acid hoặc kiềm, glycosid bị thủy phân thành aglycon và phần đường.

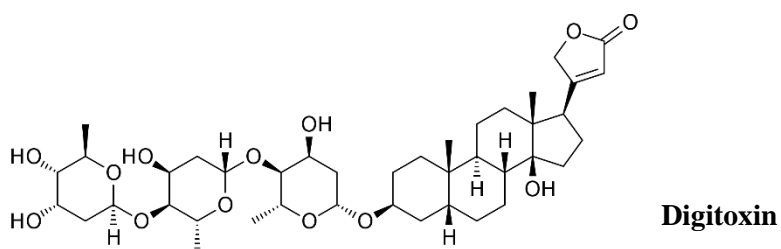
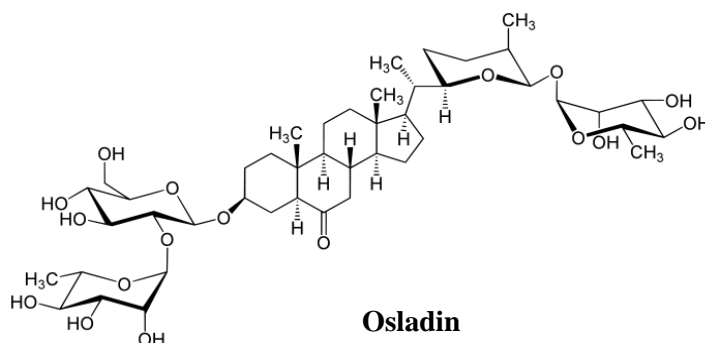
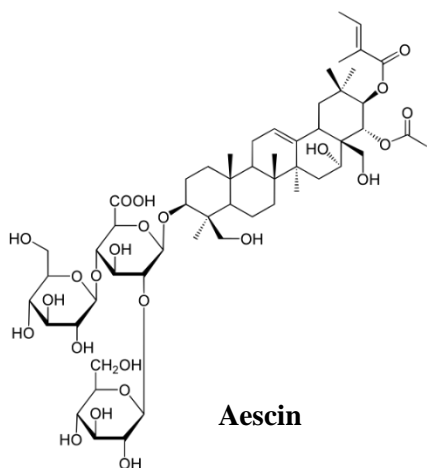
Phần đường của glycosid phổ biến là D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose,...



Phần aglycon của glycosid có thể là terpenoid, steroid, flavonoid, alkaloid,...

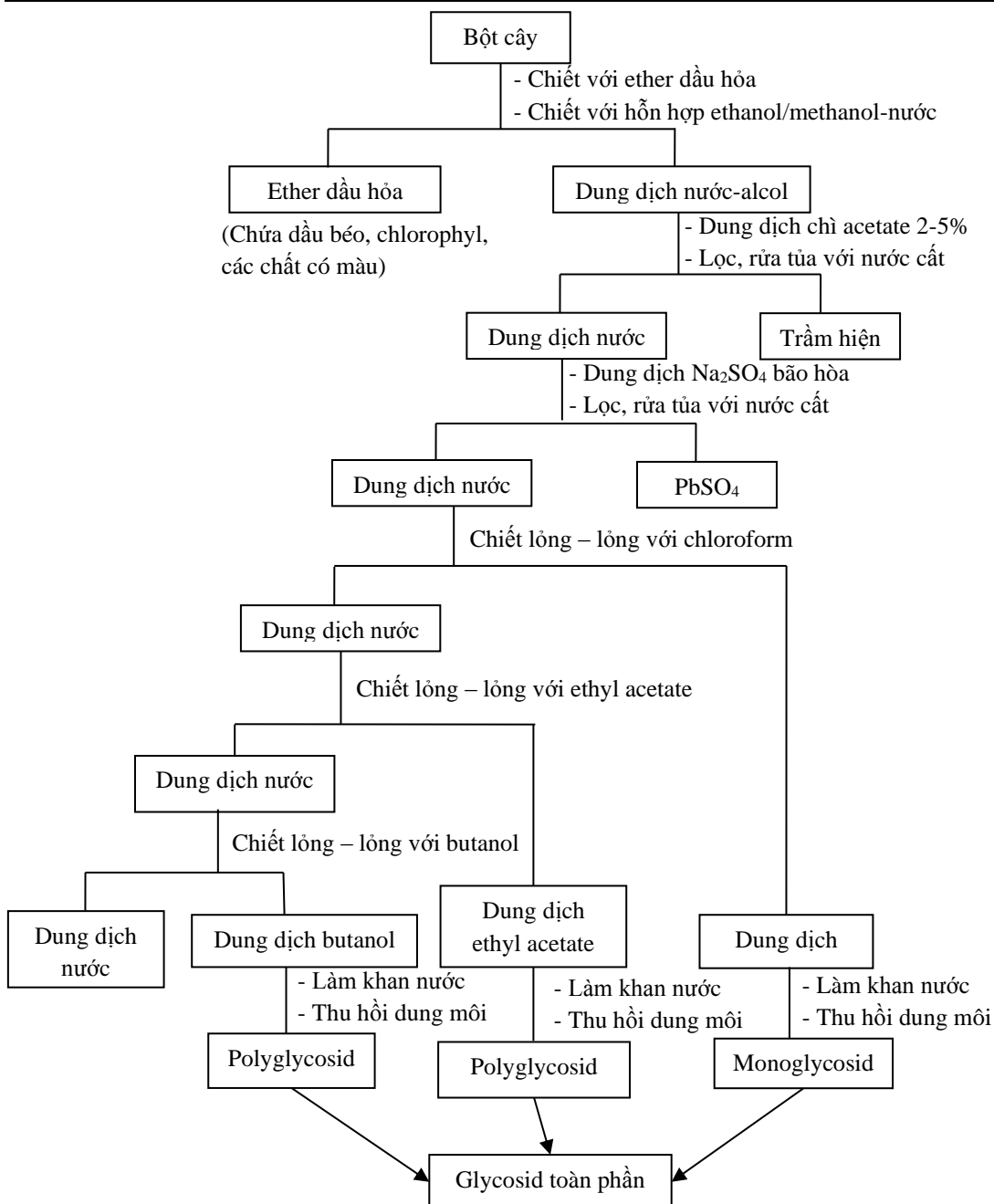


Saponin: là một glycosid phân bố rộng rãi trong thực vật, khi hòa tan vào nước có tác dụng làm giảm sức căng bề mặt của dung dịch và tạo nhiều bọt. Saponin thường ở dạng vô định hình, có vị đắng. Saponin rất khó tinh chế, bị tủa bởi chì acetate, hydroxy barium, sulfat amonium,... Dựa vào cấu trúc aglycon, saponin được chia thành saponin steroid và saponin triterpenoid.



2.5.2. Phương pháp chiết tách glycosid

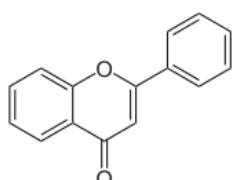
Glycosid có tính phân cực khá mạnh nên không tan trong ether dầu hỏa, hexan, benzen nhưng tan được trong chloroform, diethyl ether, tan tốt trong alcol, nước. Người ta thường chiết glycosid bằng nước nóng, ethanol, methanol hoặc hỗn hợp alcol-nước (50 – 90%).



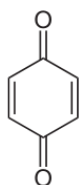
2.6. Hợp chất phenol

2.6.1. Đại cương

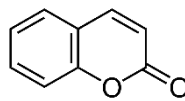
Các hợp chất phenol dùng để chỉ chung các hợp chất trong cấu trúc có vòng benzene mang một hay nhiều nhóm chức hydroxyl -OH. Trong thiên nhiên, các hợp chất phenol là: flavonoid, xanthon, coumarin, quinon, các phenol đơn vòng, polyphenol,... Các hợp chất phenol dễ tan trong nước vì chúng thường hiện diện trong cây ở dạng glycosid.



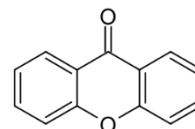
Flavonoid



Quinon

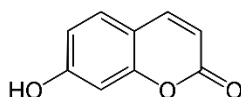


Coumarin

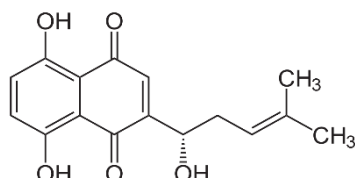


Xanthon

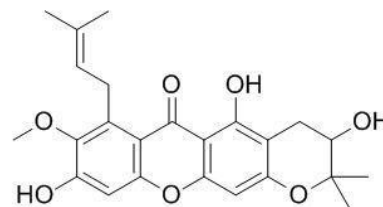
Một số khung sườn hợp chất phenol



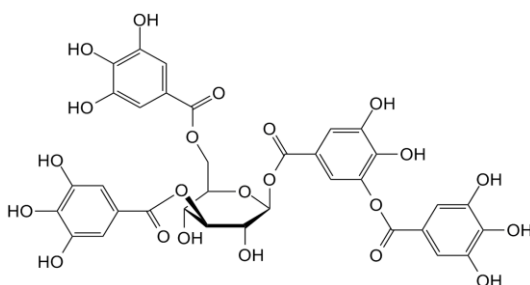
Umbelliferon



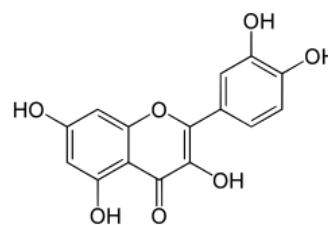
Alkannin



Mangostanol



Tannic acid



Quercetin

Một số hợp chất phenol tự nhiên

2.6.2. Phương pháp định tính hợp chất phenol

- Dung dịch FeCl_3 : dùng phun xịt bản mỏng, các phenol cho vết màu xanh dương đen.
- Thuốc thử Millon: định tính phenol, glucosid phenol, dùng phun xịt bản mỏng, cho vết màu vàng đến cam.
- Dung dịch Vanilin/ HCl : phun xịt bản mỏng để định tính catechol cho màu đỏ.
- Thuốc thử Benedict: định tính flavonoid, coumarin có mang nhóm *o*-dihydroxyl, phun xịt bản mỏng, quan sát UV không thấy ánh sáng huỳnh quang.
- Thuốc thử Magnesium acetate: định tính antraquinon, phun xịt bản mỏng cho màu cam đến tím.
- Thuốc thử gelatin mặn: định tính tanin cho kết tủa màu vàng, để lâu hóa thành màu nâu.
- Thuốc thử Stiasny: định tính tanin cho kết tủa màu đỏ.

2.6.3. Phương pháp chiết tách hợp chất phenol

Các hợp chất phenol có tính phân cực từ trung bình đến mạnh, tùy theo hợp chất có mang ít hay nhiều nhóm -OH, -COOH,... Vì vậy, muốn chiết tách các hợp chất này ra khỏi bột cây, cần sử dụng các dung môi có độ phân cực tăng dần như ether dầu hỏa, chloroform, ethyl acetate, ethanol,...

Có thể sử dụng dung dịch kiềm loãng hoặc carbonate loãng, nóng để chiết các hợp chất phenol ra khỏi bột cây, tiếp theo acid hóa để thu rửa.

Một số hợp chất coumarin, quinon có thể thăng hoa nên có thể sử dụng phương pháp này để thu lấy hợp chất đối với chất bền nhiệt và có hàm lượng cao trong cây.

CHƯƠNG 3: PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ

3.1. Giới thiệu

Định nghĩa của Mikhail S. Tsvett (1906): Sắc ký là một phương pháp tách trong đó các cấu tử của một hỗn hợp được tách trên một cột hấp thụ đặt trong một hệ thống đang chảy.

Định nghĩa của IUPAC (1993): Sắc ký là một phương pháp tách trong đó các cấu tử cần tách được phân bố giữa hai pha, một trong hai pha là pha tĩnh đứng yên còn pha kia chuyển động theo một hướng xác định.

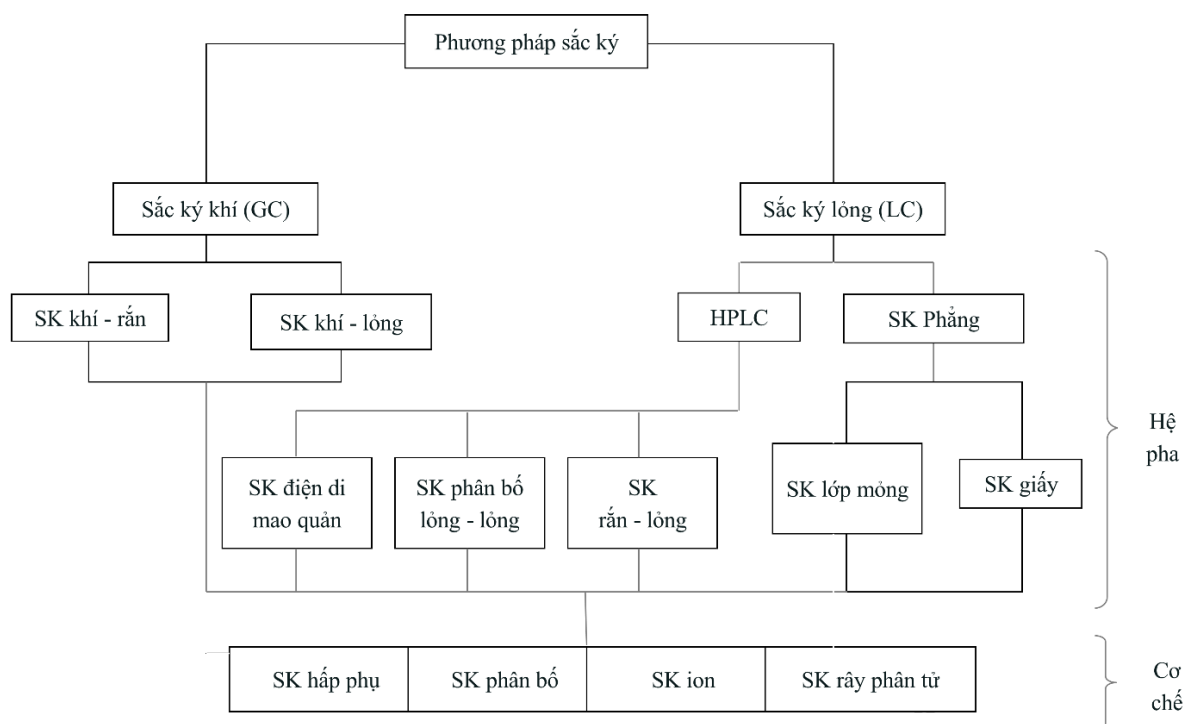
3.1.1. Nguyên tắc cơ bản

Sự tách sắc ký được dựa trên sự phân chia khác nhau của các chất khác nhau vào hai pha luôn tiếp xúc và không hoà lẫn vào nhau: một pha tĩnh và một pha động.

- Pha tĩnh: Đứng yên có khả năng hấp thụ chất phân tích.
- Pha động: Di chuyển qua pha tĩnh.

Các chất phân tích có ái lực khác nhau với pha tĩnh, chúng di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau theo thời gian. Mỗi một thành phần đi qua hệ thống trong một khoảng thời gian riêng biệt, gọi là thời gian lưu. Trong kỹ thuật sắc ký, hỗn hợp được chuyển chở trong chất lỏng hoặc khí và các thành phần của nó được tách ra do sự phân bố khác nhau của các chất hòa tan khi chúng chảy qua pha tĩnh rắn hoặc lỏng. Nhiều kỹ thuật khác nhau đã được dùng để phân tích hợp chất phức tạp dựa trên ái tính khác nhau của các chất trong môi trường động khí hoặc lỏng và đối với môi trường hấp phụ tĩnh mà chúng di chuyển qua.

3.1.2. Phân loại



a) Theo bản chất vật lý các pha

- Pha động có thể là một chất lỏng hay chất khí
- Pha tĩnh có thể là một chất rắn (hạt xốp hay bột mịn) hay một chất lỏng (được giữ trên một chất mang rắn).

Do đó, dựa vào bản chất các pha ta phân biệt các phương pháp

- Sắc ký lỏng (LC).
 - Sắc ký lỏng - lỏng (liquid - liquid chromatography LLC)
 - Sắc ký lỏng - rắn (liquid - solid chromatography LSC)
- Sắc ký khí (GC).
 - Sắc ký khí - lỏng (gas - liquid chromatography GLC)
 - Sắc ký khí - rắn (gas - solid chromatography GSC)

b) Theo hiện tượng sắc ký

- *Sắc ký hấp phụ (absorption chromatography)*: pha tĩnh là một chất rắn có khả năng hấp phụ, đó là các phương pháp sắc ký lỏng - rắn và khí - rắn.
- *Sắc ký phân bố (partition chromatography)*: pha tĩnh là chất lỏng không hoà lẫn được với pha động, chất lỏng này được bao trên bề mặt của một chất rắn gọi là giá hay chất mang và phải là chất trơ, không tham gia vào sắc ký. Sắc ký phân

bồ bao gồm sắc ký lỏng - lỏng và sắc ký khí - lỏng.

- *Sắc ký trao đổi ion (ion - exchange chromatography)*: pha tĩnh là chất nhựa trao đổi ion dùng để phân tách các ion hay các phân tử phân cực dựa trên tính chất của chúng.
- *Sắc ký theo kích cỡ (size - exclusion chromatography)*: còn gọi là sắc ký gel. Các phân tử cỡ lớn sẽ không chui qua lỗ, các phân tử nhỏ hơn sẽ khuếch tán vào các lỗ và được tách theo kích thước do di chuyển chậm hơn.

c) Theo kỹ thuật và phương tiện sắc ký

❖ *Theo phương pháp giữ pha tĩnh*

- Sắc ký trên cột (column chromatography: CC) pha tĩnh được chứa trong một cột bằng kim loại hay thủy tinh.
- Sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography: TLC): pha tĩnh được tráng đều và giữ trên mặt phẳng của bản thủy tinh, nhựa hay nhôm. Lớp mỏng pha tĩnh thường là: silica gel, nhôm oxid, xenlulose, chất nhựa trao đổi lớn và có chiều dày khoảng 0.25 – 0.5mm.
- Sắc ký giấy (paper chromatography - PC): pha tĩnh (lỏng) được thấm trên một loại giấy lọc đặc biệt gọi là giấy sắc ký.

❖ *Theo cách cho pha động chạy*

- Sắc ký khai triển (development chromatography): cho pha động kéo các chất chạy và tách trên pha tĩnh (Sắc đồ nằm trên pha tĩnh).
- Sắc ký rửa giải (elution chromatography): cho pha động chạy và kéo các chất lần lượt ra ngoài pha tĩnh (ra khỏi cột, ra khỏi giấy).

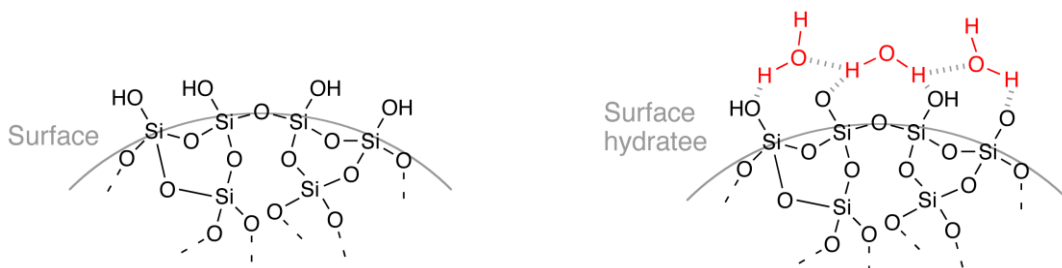
3.1.3. Các loại pha tĩnh sử dụng trong sắc ký

Có nhiều loại chất hấp thu sử dụng cho các loại sắc ký: silica gel, alumina,.. Silica gel được sử dụng phổ biến nhất, còn alumina thường được lựa chọn nhờ vào tính base của nó, nên được sử dụng để tách các hợp chất có tính acid.

Silica gel

Các vị trí hoạt động trên bề mặt của hạt silica gel là các nhóm silanol, mỗi nhóm cách nhau 5Å. Muốn điều chỉnh hoạt tính bề mặt silica gel chỉ cần thêm hoặc loại bớt nước. Khi silica gel hấp thu nước, các phân tử nước sẽ che khuất những vị trí hoạt động trên bề mặt silica gel làm hạt bị giảm hoạt tính, muốn silica gel tăng hoạt tính trở lại, chỉ cần đun nóng để loại bỏ nước. Tuy nhiên, khi đun nóng khoảng 400-500°C, silica gel bị

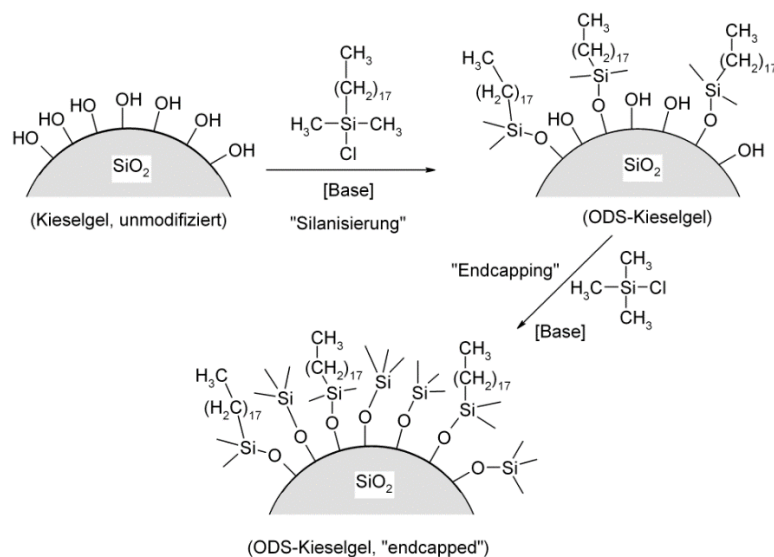
mất vĩnh viễn hoạt tính bề mặt, do hai nhóm silanol kế bên đã mất một phân tử nước, tạo nối ether.



Bản chất hóa học của bề mặt hạt silica gel là những nhóm silanol -OH, những tâm này rất hoạt động có thể tạo nối hydrogen mạnh với những hợp chất được sắc ký. Vì thế, sắc ký với chất hấp thu là silica gel, những hợp chất phân cực (có mang các nhóm chức -OH, -NH₂, -COOH,..) có khả năng tạo nối hydrogen mạnh, bị silica gel giữ chặt lại so với những chất khác có tính kém phân cực như alkan, terpen ít bị silica gel giữ lại.

Silica gel có thể được chế hóa bằng cách cho các nhóm chức silanol của silica tác dụng với nhiều loại silyl chloride khác nhau để tạo thành những loại chất hấp thu mới, với các đặc tính vật lý đôi khác, được gọi là silica gel tạo nối.

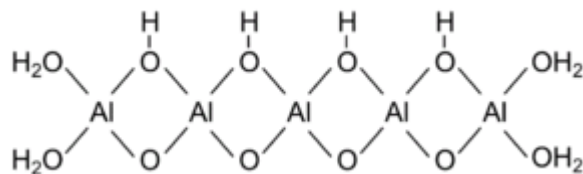
Cho silica gel tác dụng với chlorodimethylalkylsilane R-Si(CH₃)₂-Cl để biến đổi silica gel này thành loại chất hấp thu mới có tính không phân cực. Dây alkyl R có thể là C-1, C-2, C-4, C-6, C-8 và C-18. Tuy nhiên, người ta thường hay chế tạo dây C-8 và C-18.



Loại silica gel pha đảo có tính kém phân cực, nên có ái lực mạnh với các hợp chất kém phân cực, giữ chặt các hợp chất này. Pha động thường là nước, hoặc có thể thêm vào những dung môi như methanol, acetonitrile với nồng độ tăng dần theo quá trình sắc ký.

Alumina

Alumina là chất hấp thu mạnh và có thể hoạt động như ion lưỡng cực, tùy theo tính chất của dung môi giải ly và bề mặt của hạt alumina.



Alumina kiềm, khi sử dụng với dung môi hữu cơ, sẽ hấp thu các chất thơm, hydrocarbon bất bão hòa, ...

Alumina trung tính sử dụng chủ yếu với các dung môi hữu cơ, thích hợp tách các chất dễ bị hỏng.

Alumina acid dùng để tách các hợp chất có tính acid hoặc trung tính với điều kiện các chất này bền với acid.

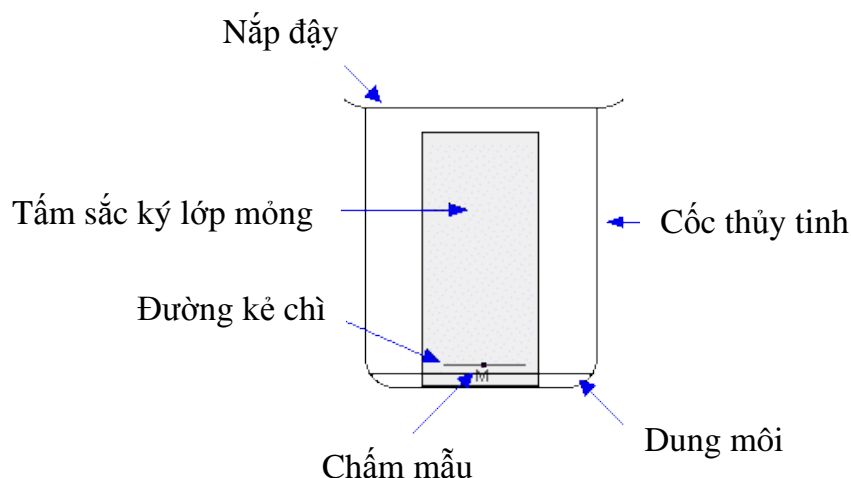
3.2. Sắc ký lớp mỏng

3.2.1. Tổng quát

Sắc ký lớp mỏng là hay còn gọi là sắc ký phẳng (planar chromatography), dựa chủ yếu vào hiện tượng hấp thu trong đó pha động là dung môi hoặc hỗn hợp các dung môi, di chuyển ngang qua một pha tĩnh là một chất trơ (thí dụ như: silicagel hay oxid alumin). Pha tĩnh được tráng thành một lớp mỏng, đều, phủ lên nền phẳng như tấm kính, tấm nhôm hay tấm plastic. Do chất hấp thu được tráng thành một lớp mỏng nên phương pháp này được gọi là sắc ký lớp mỏng.

- Bình sắc ký: Một chậu, hũ, lọ bằng thủy tinh, hình dạng đa dạng, có nắp đậy.
- Pha tĩnh: Một lớp mỏng khoảng 0,25 mm của một loại hợp chất hấp thu (silica gel, alumin, ...) được tráng thành lớp mỏng, đều, phủ lên tấm kính, tấm nhôm, hay tấm plastic.
- Mẫu cần phân tích: thường là hỗn hợp gồm nhiều chất với độ phân cực khác nhau. Sử dụng khoảng 1μl dung dịch mẫu với nồng độ pha loãng 2-5%, nhờ một vi quản để chấm thành một điểm gọn trên pha tĩnh, ở vị trí phía trên cao hơn một chút so với mặt thoáng của chất lỏng chứa trong bình.
- Pha động: dung môi hay hỗn hợp 2 dung môi, di chuyển chậm chậm dọc theo tấm lớp mỏng, và lôi kéo mẫu chất đi theo nó. Dung môi di chuyển càng cao nhờ tính mao quản. Mỗi thành phần chất sẽ di chuyển với vận tốc khác nhau, đi phía

sau mực của dung môi. Vận tốc di chuyển này phụ thuộc vào các lực tương tác tĩnh điện mà pha tĩnh muốn níu giữ các mẫu chất ở lại pha tĩnh và tùy thuộc vào độ hòa tan của mẫu chất trong dung môi.



Ưu điểm

- Chỉ cần một lượng rất ít mẫu để phân tích.
- Có thể phân tích đồng thời mẫu và chất chuẩn đối chứng trong cùng điều kiện phân tích.
- Tất cả các hợp chất trong mẫu phân tích có thể được định vị trên tấm sắc ký lớp mỏng.

Sự tương tác giữa hợp chất cần phân tích với pha tĩnh và pha động

Sự tương tác giữa các hợp chất của mẫu với dung môi giải ly và với pha tĩnh là yếu tố quyết định hiệu quả tách của sắc ký. Một chất tan được dung môi giải ly tách rời và mang đi xa trên bản mỏng (hoặc di chuyển ra khỏi cột đối với sắc ký cột) tùy thuộc vào hai lực: lực hút của pha tĩnh đối với chất tan và lực lôi kéo của pha động (dung môi) đối với chất tan.

- Lực hút của pha tĩnh đối với chất tan

Nếu chất tan là hợp chất trung tính, lực níu giữ của silica gel hoặc alumin đối với các hợp chất này tùy thuộc vào độ phân cực của dung môi giải ly.

Các chất tan có tính phân cực kém như hydrocarbon bị silica gel hoặc alumin hấp thu kém, còn các chất có tính phân cực mạnh như ester, alcol, acid carboxylic,... bị silica gel/alumin hấp thu mạnh, giữ chặt

- Lực lôi kéo của dung môi đối với chất tan

Có hai loại lực xảy ra trong quá dung môi lôi cuốn chất tan. Lực đầu tiên là nhờ độ hòa tan, nghĩa là mẫu cần phân tích có khuynh hướng hòa tan vào dung môi, nên khi

dung môi di chuyển đến đâu thì mẫu chất bị lôi kéo theo đến đấy. Trong trường hợp này, dung môi phải hòa tan được chất tan và đủ hiệu quả để loại bỏ khả năng chất hấp thu muốn níu giữ mẫu chất lại.

Lực thứ hai là hiện tượng thay thế chỗ (sự cạnh tranh chỗ): trong trường hợp các hợp chất có trong mẫu có thể gắn và pha tĩnh nhờ các đặc trưng như nối hydrogen, tương tác lưỡng cực,..., nếu phân tử dung môi cũng có những đặc trưng trên, phân tử dung môi này sẽ cạnh tranh, giành lấy chỗ của pha tĩnh và đẩy phân tử mẫu chất rời xa pha tĩnh.

3.2.2. Quy trình sắc ký lớp mỏng

3.2.2.1. Chuẩn bị

a) Ống vi quản

Ống thủy tinh có đường kính trong ống nhỏ, khoảng 1-2mm, một đầu được vót nhọn, dài 10-20 cm. Sử dụng ống vi quản để chấm nhiều loại mẫu dung dịch khác nhau, chỉ cần sau mỗi lần sử dụng, rửa sạch vi quản bằng dung môi hữu cơ như acetone.

b) Bản mỏng

Tấm bản mỏng thương mại 20 x 20 cm, dùng kéo cắt bản với kích thước cần thiết, tấm bản phải vừa bình giải ly. Chất hấp thu dùng cho sắc ký lớp mỏng thường dùng nhất là silica gel pha thường 60 F₂₅₄ hoặc silica gel pha đảo (C-2, C-8, C-12, C-18). Dùng bút chì vạch nhẹ nét xuất phát và mức tiền tuyến dung môi.

c) Dung môi

Là loại tinh khiết, thường dùng hỗn hợp 2-3 các dung môi, không nên chọn dung môi quá dễ bay hơi như diethyl ether. Một mẫu chất cần phân tích có chứa nhiều cấu tử khác nhau. Khả năng tách riêng các hợp chất này bằng sắc ký lớp mỏng tùy thuộc vào tỉ lệ phân phối của các hợp chất này giữa chất hấp thu và dung môi giải ly. Muốn thay đổi khả năng tách, người ta thay đổi thành phần các dung môi sử dụng để giải ly. Các dung môi xếp theo thứ tự mạnh dần (sức đẩy, phản hấp phụ): hexane, heptane, cyclohexane, carbon tetrachloride, benzene, chloroform, butyl acetate, ether, ethyl acetate, pyridin, acetone, ethanol, methanol, nước. Cho dung môi vào bình, quanh thành bình lót giấy lọc để bão hòa dung môi được nhanh hơn.

d) Dung dịch mẫu

Mẫu là chất lỏng, có thể chấm trực tiếp mẫu lên bản mỏng, còn mẫu là dung dịch quá sệt, có thể pha loãng mẫu. Với mẫu là chất rắn phải hòa tan trong dung môi hữu cơ phù hợp, nồng độ 2-5%.

3.2.2.2. Chấm dung dịch lên bản mỏng

Kẻ một vạch thẳng nằm ngang bằng bút chì, cách mép dưới của bản mỏng 1 cm làm vạch xuất phát. Dùng mao quản hay micropipet chấm các vết dung dịch thử và dung dịch chuẩn lên đó. Các vết phải cách nhau và cách mép bản mỏng ít nhất 1 cm. Mỗi vết chấm trên bản không chứa nhiều hơn $12\mu\text{g}$ ($10\mu\text{g}$ là tối ưu) mẫu chất.

3.2.2.3. Khai triển sắc ký

- Là quá trình cho pha động chạy, kéo mẫu phân tích di chuyển trên pha tĩnh.
- Sấy nhẹ để dung môi bay đi khỏi vết chấm.
- Đặt bản mỏng vào bình sắc ký đã bão hòa hơi dung môi của pha động, mép phía chấm mẫu được nhúng vào dung môi động nhưng không được cho điểm đã chấm mẫu chạm trực tiếp vào dung môi động, vì như thế mẫu sẽ khuếch tán vào trong dung môi. Sau khi dung môi lên đến đầu trên của bản mỏng lấy ra để khô hay sấy khô.

3.2.2.4. Hiện hình các vết sau khi giải ly

Các hợp chất có màu sẽ được nhìn thấy bằng mắt thường, nhưng phần lớn các hợp chất hữu cơ không có màu, nên nếu muốn nhìn thấy các vết, cần sử dụng phương pháp vật lý (phát hiện bằng tia tử ngoại UV: đèn chiếu tia UV 254 nm ánh sáng này nhận ra các hợp chất có thể hấp thụ tia UV, các hợp chất có màu tối sẫm trên nền sáng; đèn chiếu tia UV 366 nm, ánh sáng này phát hiện những hợp chất có phát huỳnh quang, các vết sẫm của chất mẫu có màu sáng trên nền bản mỏng sẫm màu) hay dùng phương pháp hóa học (bằng cách dùng thuốc thử hiện hình như hơi iod, 2,7-fluorescein phát hiện đa số hợp chất hữu cơ, ninhydrin phát hiện aminoacid hay amin, 2,4-dinitrophenylhydrazin phát hiện aldehyde hay ceton, clorur antimony phát hiện steroid hay vitamin hay carotenoid,...).

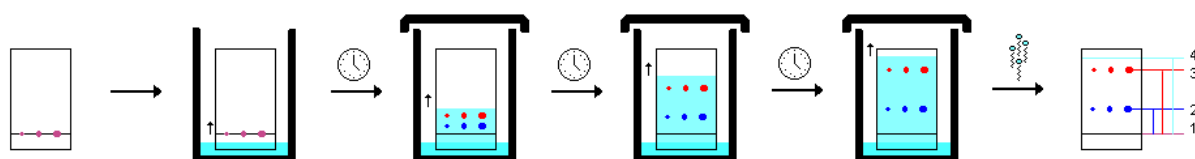
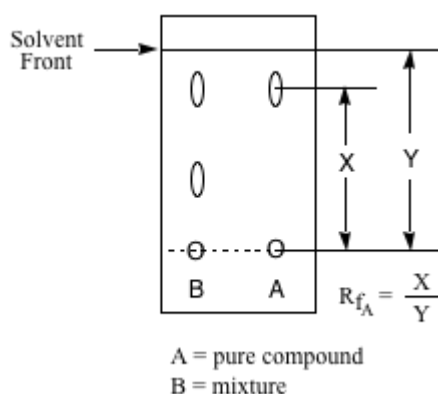
3.2.2.5. Đọc kết quả

Vị trí của vết là cơ sở để định tính một chất. Trong sắc ký lớp mỏng, vị trí vết được biểu thị bằng chỉ số R_f . (retention factor-hệ số lưu giữ). Có thể nói, nếu trên sắc đồ có một vết chất chưa biết nằm ngang (có cùng chỉ số R_f) với vết của chất chuẩn thì chất chưa biết đó chính là chất chuẩn.

Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của chất phân tích là hệ số di chuyển R_f được tính bằng tỷ lệ giữa khoảng dịch chuyển của chất thử và khoảng dịch chuyển của dung môi. R_f chỉ có giá trị từ 0 đến 1.

$$R_f = \frac{X}{Y}$$

X: khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết mẫu thử, tính bằng cm
Y: là khoảng cách từ điểm xuất phát đến mức dung môi đo trên cùng đường đi của vết, tính bằng cm.



Các bước của quá trình sắc ký lớp mỏng

3.2.3. Ứng dụng

Sắc ký lớp mỏng được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực:

- ❖ Kiểm tra độ tinh khiết của một hợp chất.
- ❖ Biết được sơ bộ về thành phần phần trăm của các hợp chất có trong mẫu ban đầu.
- ❖ Để cô lập hợp chất hữu cơ.
- ❖ Chuẩn bị cho sắc ký cột.
- ❖ Giám sát các phản ứng hữu cơ.

3.3. Sắc ký cột

3.3.1. Sắc ký cột hở

3.3.1.1. Nguyên tắc

Sắc ký hấp phụ được tiến hành trên một cột thủy tinh thẳng đứng gọi là “cột” với chất hấp phụ đóng vai trò pha tĩnh, dung môi rửa cột là pha động chảy qua pha hấp phụ. Đối với mỗi chất riêng biệt trong pha hỗn hợp cần tách, tùy theo khả năng hấp

phụ và khả năng hòa tan của nó với dung môi rửa cột để lấy ra lần lượt trước hoặc sau. Chất hấp phụ trong sắc ký cột thường dùng là silica gel. Sắc ký cột hở được tiến hành ở áp suất khí quyển. Pha tĩnh là chất hấp thu, mẫu chất cần phân tích được nạp lên đầu cột, phía trên là pha tĩnh. Pha động là các dung môi giải ly cột.

3.3.1.2. Lựa chọn chất hấp thu, dung môi giải ly cột và cách nhồi cột

❖ *Lựa chọn chất hấp thu*

Tùy thuộc vào tính phân cực của mẫu chất cần tách mà ta lựa chọn chất hấp thu cho phù hợp.

❖ *Lựa chọn dung môi giải ly cột*

Trước khi tiến hành sắc ký cột phải tiến hành sắc ký lớp mỏng để chọn ra dung môi giải ly phù hợp. Thứ tự dung môi giải ly sẽ bắt đầu từ dung môi không phân cực, dung môi ít phân cực, dung môi phân cực trung bình và sau cùng là dung môi có độ phân cực cao.

Chú ý

- Pha tĩnh của sắc ký lớp mỏng và sắc ký cột phải giống nhau.
- Dung môi chọn giải ly phải có tính kém phân cực một ít so với dung môi đã chọn.

❖ *Chọn cột*

Trước khi tiến hành sắc ký cột cần phải tìm ra cột có kích thước phù hợp. Điều này là rất quan trọng bởi vì hiệu quả của việc tách chất phụ thuộc nhiều vào lượng chất cần tách, chất hấp thu, kích thước cột. Ta có mối tương quan sau đây:

Tỷ lệ giữa lượng mẫu cần tách và lượng chất hấp thu sử dụng: các khảo sát thực nghiệm cho thấy muốn tách chất tốt thì trọng lượng của chất hấp thu phải lớn hơn 25 – 50 lần trọng lượng của mẫu sắc ký. Tuy nhiên, đối với những hỗn hợp mẫu chất khó tách riêng thì cần sử dụng lượng chất hấp thu nhiều hơn và ngược lại.

Một mẫu chất muốn tách tốt thì chiều cao chất hấp thu nạp trong cột cần đạt tỉ lệ chiều cao chất hấp thu : đường kính trong của cột (10 : 1).

❖ *Cách tiến hành*

❖ *Chuẩn bị cột*

- Rửa cột thật sạch, sấy khô, sau đó tráng cột vài lần với acetone.
- Cho bông gòn vào đáy cột (có thể cho thêm một lớp cát mịn sạch).
- Kẹp cột thẳng đứng trên giá sắt.

❖ *Nạp chất hấp thu (nhồi cột)*

Có hai cách nhồi cột: nhồi cột ướt và nhồi cột khô.

Nhồi cột ướt

Dùng cho các chất hấp phụ có khả năng trương nở như silica gel, sephadex,... thì phải ngâm trong dung môi một thời gian trước khi cho vào cột để tránh bị nứt cột. Lắc, trộn đều bột hấp phụ với dung môi tạo thành một hỗn dịch, rót vào cột, chất hấp thu sẽ lắng tự nhiên xuống đáy cột. Hỗn dịch dung môi và chất hấp phụ không nên quá sệt khiến bột khí bị giữ trong cột và cũng không được quá lỏng để phải rót nhiều lần vào cột. Chú ý trong quá trình nhồi cột, dung môi vẫn liên tục chảy đều ra khỏi cột và không được để khô dung môi trong cột. Sau khi nhồi hết chất hấp phụ vào cột dùng dung môi hứng được tiếp tục rót vào cột và cho chảy liên tục một thời gian để cột hấp phụ được hoàn toàn ổn định. Mặt thoáng trên đầu cột phải nằm ngang, người ta cho thêm một lớp cát hoặc bông để không làm xáo trộn mặt.

Nhồi cột khô

Dùng cho các chất hấp phụ không có khả năng trương nở như Al_2O_3 , CaCO_3 . Chất hấp phụ được nhồi từ từ vào cột ở dạng khô bởi một phễu có cuống dài. Dùng một que bằng gỗ hoặc cao su gỗ nhẹ và đều chung quanh cột theo chiều từ dưới lên để bột xuống đều đặn. Khi chất hấp phụ được cho hết vào cột mới rót dung môi vào và cho chảy liên tục một thời gian để cột được ổn định và từ lúc này trở đi thì không được để khô dung môi trong cột.

❖ *Nạp mẫu chất cần tách lên đầu cột sắc ký*

Nạp mẫu chất ở dạng dung dịch

- Nếu mẫu ở dạng lỏng thì cho trực tiếp vào cột. Nếu mẫu ở dạng rắn, hòa tan mẫu bằng một lượng nhỏ dung môi. Dung dịch mẫu có nồng độ càng đậm đặc càng tốt.
- Thực hiện nạp mẫu lên cột như sau:
 - Mở khoá cho dung môi chảy ra khỏi cột để hạ mức dung môi trong cột xuống sao cho vừa sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột.
 - Đóng khóa lại, nạp dung dịch mẫu vào đầu cột. Muốn nạp mẫu, sử dụng một pipet hút dung dịch mẫu chất, đặt đầu pipet gần sát mặt thoáng của chất hấp thu trong cột, vừa bóp vừa rây pipet dọc quanh thành cột cho dung dịch chảy ra theo thành trong của cột, chạm xuống bề mặt chất hấp

thu.

- Mở khoá bên dưới cho dung môi chảy ra khỏi cột, làm cho dung dịch mẫu được thấm hết vào chất hấp thu trên đầu cột, cần canh chừng không cho chất hấp thu đầu cột bị khô.
- Dùng pipet cho một lượng nhỏ dung môi mới lên đầu cột, đồng thời dùng dung môi này để rửa sạch ống mà dung dịch dính trên thành cột.
- Mở khoá cho dung môi chảy ra. Lặp lại vài lần giúp cho dung dịch mẫu thấm sâu vào chất hấp thu, dung môi trong suốt không lấy màu của chất mẫu.
- Sử dụng bông thủy tinh, bông gòn, cát hay giấy lọc đặt nhẹ lên mặt thoáng chất hấp thu để bảo vệ mặt cột.
- Cho dung môi vào đáy cột để tiến hành giải ly trên cột.

Nạp mẫu chất ở dạng bột khô

- Mẫu cần sắc ký (Xg) → hòa tan trong 50Xg dung môi → thêm 10Xg silica gel → cô quay → mẫu ở dạng bột khô.
- Thực hiện nạp mẫu lên cột như sau
 - Mở khoá cho dung môi chảy ra khỏi cột để hạ mức dung môi trong cột xuống sao cho vừa sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột.
 - Đóng khoá lại, cho mẫu ở dạng bột khô vào cột bằng phễu thủy tinh.
 - Mở khoá bên dưới cho dung môi chảy ra khỏi cột, cần canh chừng không cho chất hấp thu đầu cột bị khô.
 - Sử dụng bông thủy tinh, bông gòn, cát hay giấy lọc đặt nhẹ lên mặt thoáng chất hấp thu để bảo vệ mặt cột.
 - Cho dung môi vào đáy cột để tiến hành giải ly trên cột.

❖ Dung môi giải ly

Trong sắc ký cột, có khi chỉ cần sử dụng một đơn dung môi là có thể giải ly tất cả các chất ra khỏi cột, đôi khi cần đến hỗn hợp dung môi. Nhưng trước tiên thường dung môi không phân cực để giải ly những hợp chất tương đối không phân cực, tiếp đó dung môi có tính phân cực mạnh hơn để giải ly những hợp chất phân cực.

Có hai kiểu giải ly: giải ly sử dụng dung môi đơn nồng độ và giải ly với dung môi có tính phân cực tăng dần.

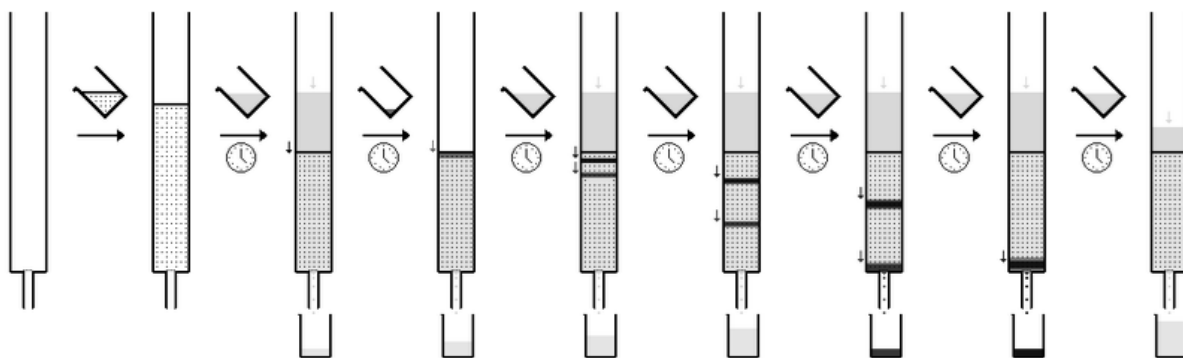
Giải ly sử dụng dung môi đơn nồng độ: chỉ sử dụng đơn dung môi hoặc hỗn hợp dung

môi nhưng trong hỗn hợp tỉ lệ các thành phần không thay đổi.

Giải ly có nồng độ tăng dần theo kiểu bậc thang: trong quá trình sắc ký cần thay nhiều loại dung môi khác nhau, có độ phân cực tăng dần để có thể giải ly được hết chất ra khỏi cột. Muốn tăng tính phân cực cho bất kỳ một dung môi nào, nhất thiết phải tăng chậm, bằng cách thêm từ từ mỗi lần vài phần trăm một dung môi mới có tính phân cực hơn vào dung môi cũ đang sử dụng. Thí dụ, đang giải ly với hexan, muốn chuyển sang benzene, sẽ pha benzene vào hexan theo tỉ lệ 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 50% và 100% benzene. Nếu tăng tính phân cực nhanh, đột ngột sẽ làm gãy cột. Silica gel khi được trộn với bất kỳ một loại dung môi nào cũng tạo ra nhiệt, nhiệt này làm cho dung môi bốc hơi một cách cục bộ, hơi sinh ra tạo nên bọt khí làm nứt gãy cột. Cột gãy làm mất đi sự liên tục của chất hấp thu và vì thế không tách chất tốt được.

❖ *Theo dõi quá trình giải ly cột*

- Vận tốc giải ly là khoảng 5- 50 giọt/phút hoặc 1- 2 cm/phút.
- Có thể quan sát bằng mắt thường nếu mẫu ban đầu có màu
- Phương pháp thông dụng nhất là hứng dung dịch giải ly trong những lọ có đánh số có thể tích 50 ml.
- Sử dụng sắc ký lớp mỏng để gom chung các lọ có kết quả giống nhau thành một phân đoạn.
- Chỉ ngưng cột khi thu được lượng cao các phân đoạn bằng 70- 80% trọng lượng mẫu đã nạp vào đầu cột.



Quá trình sắc ký cột hở

3.3.2. Một số kỹ thuật sắc ký cột khác

3.3.2.1. Sắc ký cột khô (DCC)

a) Nguyên tắc

Kỹ thuật này tương đồng với kỹ thuật sắc ký lớp mỏng điều chế, là một phương pháp sắc ký "không rửa giải", nghĩa là, những chất cần tách sẽ nằm lại trong cột ở cuối quá trình sắc ký. Việc sử dụng ống nylon ép mỏng cho phép dễ dàng lấy ra những chất phân tách bằng cách cắt ống thành từng đoạn. Trong sắc ký lớp mỏng, dòng dung môi chảy nhờ lực mao dẫn chống lại trọng lực trong khi ở phương pháp DCC, dung môi chảy nhờ trọng lực. Pha tĩnh dùng trong DCC là pha tĩnh sử dụng trong sắc ký lớp mỏng.

b) Ưu điểm

Phương pháp sắc ký cột khô là phương pháp bắc cầu giữa phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký cột điều chế cổ điển. Áp lực chi phí về thiết bị ít hơn so với phương pháp sắc ký lỏng điều chế. Cũng như các phương pháp sắc ký cột nói chung, DCC dùng được cả trong phân tích và điều chế. DCC nhanh, dễ dàng và hiệu quả cao trong việc tách và/hoặc tinh chế các chất với số lượng lớn. Giống như TLC, DCC là một phương pháp "không rửa giải" sử dụng ống nylon như là vật hỗ trợ và có thể dùng UV-254 để nhận biết. Cũng như các loại sắc ký cột, các cột với hầu hết mọi kích cỡ chứa đầy pha tĩnh trong sắc ký cột khô có thể dùng để tách, hoặc làm sạch một lượng rất lớn các chất. Để thiết lập cột đòi hỏi kỹ thuật, sự khéo léo và cần thời gian. Đòi hỏi sự chú ý liên tục trong suốt quá trình tiến hành.

c) Nhược điểm

Cũng như các phương pháp sắc ký cột nói chung, DCC dùng được cả trong phân tích và điều chế. DCC được dùng để xác định số lượng thành phần chất trong hỗn hợp, phân tách và làm tinh khiết những thành phần này để dùng cho những phân tích sau đó. Sắc ký cột khô đã áp dụng thành công cho những chất như thuốc nhuộm, alkaloid, và những hợp chất dị vòng khác, mặc dù có thể tách bằng các loại cột sắc ký khác nhưng sẽ gặp nhiều khó khăn đáng kể. Lipid cũng có thể được tách bằng sắc ký cột khô.

3.3.2.2. Sắc ký chớp nhoáng

Sắc ký chớp nhoáng khác các kỹ thuật truyền thống khác ở 2 điểm:

- Sử dụng các phân tử silica gel nhỏ 250-400 mesh, vì giới hạn dòng chảy của dung môi gây bởi những phân tử silica gel nhỏ, do đó, khí nén (áp lực từ 10-15 psi) được sử dụng để đẩy dung môi qua cột pha tĩnh. Do đó quá trình sắc ký nhanh,

có độ phân giải cao.

- Đặc điểm: kỹ thuật tương tự với sắc ký cột truyền thống, ngoại trừ việc dung môi được đẩy qua cột nhờ áp suất trên đầu cột. Tốc độ dòng lớn, thời gian triển khai ngắn, tăng khả năng phân tách với các phương pháp cũ. Dung môi có độ nhớt thấp. Lượng mẫu lớn, phân đoạn hứng lớn.

a) Ưu điểm

Nhờ khí nén đẩy dung môi giải ly nên thời gian triển khai nhanh hơn sắc ký cột cổ điển (thời gian triển khai ngắn nhỏ hơn 20 phút). Cho phép phân lập mẫu 0.01-10 g trong 10-15 phút. Có thể tách rất tốt hỗn hợp có khoảng 4 chất. Thiết bị đơn giản, rẻ tiền so với HPLC. Độ phân giải trung bình (lớn hơn 0.15). Không tách được hỗn hợp phức tạp hay tách riêng chất cần phân lập mà chỉ thu được các phân đoạn chứa chất cần phân lập. Để thực hiện cần phải có máy bơm nén khí và một bộ phận gồm những cột và những nắp vặn kín chuyên dụng.

b) Nhược điểm: Những bộ phận này tương đối đắt tiền nếu so với sắc ký cổ điển.

c) Ứng dụng: tách các phân đoạn đơn giản từ hỗn hợp phức tạp. Sau đó đưa các phân đoạn này lên sắc ký cột cổ điển để tách thành các phân đoạn tinh khiết.

3.3.2.3. Sắc ký nhanh-cột khô

- Là một biến đổi của sắc ký chớp nhoáng
- Để tăng vận tốc giải ly của pha động dùng một lực hút tạo chân không ở đầu ra của cột nhờ một máy bơm hút loại nhẹ.
- Sử dụng silica gel loại dùng cho sắc ký lớp mỏng (15-40 μm) hoặc alumina loại dùng cho sắc ký lớp mỏng.
- Trong quá trình giải ly cột sắc ký được rút khô sau mỗi phân đoạn thu được.

3.4. Sắc ký khí

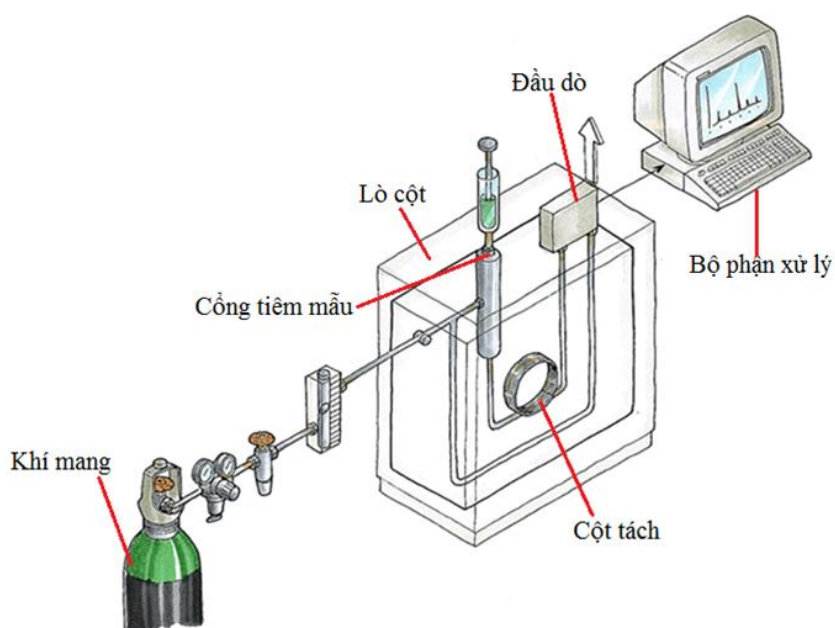
Sắc ký khí là phương pháp được dùng để tách các chất ở thể khí, với pha động là chất khí, gọi là khí mang (carrier gas). Sắc ký khí còn áp dụng cho các chất khí, lỏng, rắn dễ bay hơi và bền nhiệt độ cao, có trọng lượng phân tử $M < 500$.

Sắc ký khí rắn (GSC - gas solid chromatography): pha tĩnh rắn là một chất hấp phụ, đây là sắc ký khí hấp phụ và sắc ký khí lỏng (GLC - gas liquid chromatography): pha tĩnh lỏng được bao hay gắn trên một chất mang rắn (solid support) đây là sắc ký khí phân bố.

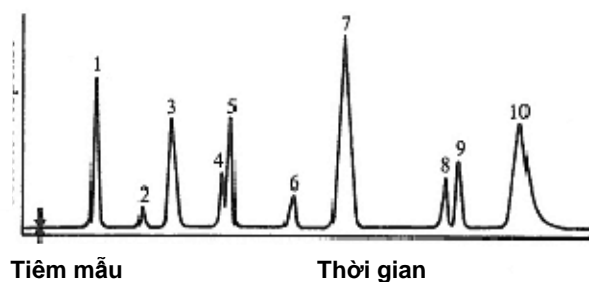
Sử dụng phương pháp sắc ký khí có khả năng tách được hoàn toàn những chất

hữu cơ tương tự, ví dụ như *o*-; *m*-; *p*-xylene không thể tách được bằng phương pháp chưng cất phân đoạn nhưng tách được khá đơn giản bằng sắc ký khí, cũng như sử dụng để tách những hỗn hợp rất phức tạp như khí thải ô tô chứa trên 300 hợp chất. Với việc ra đời của nhiều loại detector nhiều phương pháp mới xuất hiện như: sắc ký khí - khối phổ (GS - MS), sắc ký khí - hồng ngoại (GC - IR), ... đã làm tăng khả năng phân tích của sắc ký khí.

3.4.1. Giới thiệu máy sắc ký khí



Sơ đồ các bộ phận của máy sắc ký khí



Sắc ký đồ tiêu biểu tách các ester bão hòa bởi sắc ký khí

1. methyl formate 2. methyl acetate 3. ethyl formate 4. ethyl acetate 5. *n*-propyl formate 6. *iso*-propyl acetate 7. *n*-butyl formate 8. *sec*-butyl acetate 9. *iso*-butyl acetate 10. *n*-butyl acetate

a) Khí mang

Khí mang là một khí trơ như He, Ar, N₂, CO₂ và H₂ và việc chọn lựa khí mang

thường được quyết định bởi loại detector sử dụng. Khí được chứa trong bom khí có van giảm áp và điều chỉnh. Khí mang cần có độ tinh khiết cao và phải không tương tác với mẫu, chỉ mang mẫu đi qua cột. Tín hiệu detector có phụ thuộc vào sự khác nhau về tính chất giữa khí mang và chất cần phân tích.

Hệ thống cung cấp khí mang bao gồm các bộ điều chỉnh áp suất (pressure regulators), các thiết bị đo áp suất (gauges), và thiết bị đo tốc độ dòng.

Hệ thống khí mang còn chứa một hệ thống lọc phân tử để tách nước và các chất nhiễm bẩn khác.

Tốc độ dòng được kiểm soát bởi các bộ điều chỉnh áp suất hai giai đoạn được lắp vào các bình chứa khí mang.

Áp suất của khí vào thiết bị nằm trong khoảng từ 10 đến 50 psi để có tốc độ dòng từ khoảng 30 đến 150 ml/ph đối với cột nhồi và khoảng từ 1 đến 25 ml/ph đối với cột mao quản. Nói chung, nếu áp suất đi vào thiết bị không đổi thì tốc độ dòng sẽ không đổi.

b) Bộ tiêm mẫu

Cách thông dụng nhất để đưa mẫu vào cột là sử dụng một bơm tiêm mẫu vi lượng (microsyringe) để tiêm một mẫu lỏng hoặc khí qua một đệm cao su silicon (septum) chịu nhiệt vào một buồng hóa hơi (injector). Buồng này được đốt nóng với nhiệt độ thích hợp và được nối với cột tách.

Đối với các cột tách thông thường, cỡ mẫu thường thay đổi từ một vài đến 20 μ l. Cột mao quản đòi hỏi lượng mẫu đưa vào nhỏ hơn nên trong trường hợp này hệ thống chia dòng mẫu được thiết kế trong bộ injector được sử dụng để chỉ đưa một phần nhỏ lượng mẫu được tiêm đi vào cột, phần còn lại được thải ra ngoài.

c) Cột sắc ký

❖ Cột nhồi

Cột thường được làm bằng thép không gỉ, niken, thủy tinh với đường kính khoảng từ 3 đến 6 mm và chiều dài khoảng từ 1 đến 5 m.

Cột nhồi chứa các hạt chất mang rắn được phủ một lớp pha tĩnh lỏng hoặc bản thân hạt rắn là pha tĩnh. Chất mang rắn thường là diatomite đã được silan hóa để giảm liên kết hydro với các chất phân cực:

Yêu cầu của chất mang rắn là không tham gia vào sự tách và có khả năng giữ được pha tĩnh (không ít hơn 10 %).

❖ *Cột mao quản*

Đa số các phép phân tích trong sắc ký khí sử dụng các cột mao quản dài từ 15 đến 100 m và đường kính trong rất nhỏ từ 0.10 đến 0.53 mm. Các cột này được chế tạo từ thủy tinh oxit tinh khiết nấu chảy có mức độ liên kết ngang cao hơn nhiều so với thủy tinh thường nên bền và chịu được nhiệt độ cao đến 350°C.

Các cột mao quản mở có lớp phim mỏng tráng trên thành ống cung cấp độ phân giải cao hơn, thời gian phân tích ngắn hơn và độ nhạy cao hơn cột nhồi nhưng chúng có dung lượng thấp hơn cho các mẫu. Cột mao quản mở hẹp cung cấp độ phân giải cao hơn cột mao quản mở rộng hơn nhưng chúng đòi hỏi áp suất cao hơn để hoạt động và có dung lượng cho mẫu nhỏ hơn.

Một loại khác là các cột mao quản có các hạt rắn chất mang phủ một lớp pha tĩnh lỏng được gắn trên bề mặt bên trong của cột. Bởi vì diện tích bề mặt của loại này tăng lên, cột này có thể xử lý những mẫu lớn hơn cột phủ lớp phim mỏng trên thành cột. Loại cột này là trung gian giữa cột mao quản phủ phim mỏng trên thành và cột nhồi.

d) Detector

Hiện nay trong phương pháp GC người ta sử dụng những loại detector sau:

- Detector dẫn nhiệt (TCD): Detector dẫn nhiệt thích hợp với nhiều chất cần phân tích.
- Detector ion hoá ngọn lửa (FID): Đây là detector được dùng nhiều nhất, phát hiện được đến 10^{-9} g.
- Detector hấp thụ electron (Detector bắt electron - ECD): Nhờ có nguồn phóng xạ như ^3H hoặc ^{63}Ni . Độ nhạy cao, đạt tới 10^{-12} g.

3.4.2. Chuẩn bị mẫu và các yếu tố ảnh hưởng đến việc tách mẫu

a) Chuẩn bị mẫu

Các mẫu trong thực tế rất phong phú và thường có thành phần phức tạp, bên cạnh cấu tử chính mẫu còn chứa một số cấu tử với hàm lượng vết. Có mẫu có các cấu tử với nhiệt độ sôi khác nhau trong một khoảng rộng. Mẫu có thể ở dạng dung dịch nhưng cũng có ở dạng khí hoặc dạng rắn. Mẫu chứa nhiều cấu tử phân cực hoặc chứa nhiều cấu tử ít hoặc kém phân cực. Chìa khóa để có một quá trình sắc ký thành công cho một mẫu phức tạp là cần phải làm “sạch” nó trước khi đưa nó vào cột.

Các phương pháp như chiết pha rắn, chiết lỏng - lỏng, chiết rắn - lỏng, sự giải

hấp nhiệt các các cấu tử dễ bay hơi giúp loại bỏ những chất cản trở để làm sạch mẫu cần phân tích. Ngoài ra, các phương pháp này giúp cô lập và làm giàu các cấu tử cần phân tích đến mức độ có thể dò tìm được.

Nếu ta không làm “sạch” mẫu thì sắc ký đồ thu được sẽ chứa nhiều các pic kém phân giải và các cấu tử không bay hơi sẽ còn giữ trong cột và phá hủy cột.

Mẫu được đưa vào cột bằng hai cách: tiêm mẫu thủ công hoặc tiêm mẫu tự động. Mẫu sẽ được bơm vào bên trong theo dòng khí mang, đưa đến cột sắc ký (pha tĩnh). Mẫu khí qua cột sắc ký sẽ được hấp phụ lên trên pha tĩnh, sau đó các chất sẽ được lần lượt tách khỏi cột và theo dòng khí ra ngoài, được ghi nhận bởi đầu dò. Từ các tín hiệu nhận được máy tính sẽ xử lý và biểu hiện kết quả bằng sắc ký đồ. Các chất sẽ được xác định nhờ giá trị thời gian lưu trên sắc ký đồ.

b) Các yếu tố ảnh hưởng đến việc tách mẫu

❖ Chọn detector

Detector ion hóa ngọn lửa cũng là loại được dùng phổ biến nhất nhưng nó chỉ đáp ứng tốt cho hợp chất chứa mạch cacbon dài hoặc các hydrocacbon. Loại này không nhạy như detector bắt electron hoặc detector huỳnh quang. Detector ion hóa ngọn lửa đòi hỏi mẫu phải chứa lớn hơn 10 ppm chất cần phân tích cho phân tích tiêm mẫu chia dòng.

Detector dẫn nhiệt là cách phổ biến nhất để dò tìm các chất nhưng nó không đủ nhạy cho những cột mao quản mở có độ phân giải cao.

Các detector nhạy cho phân tích siêu vết chỉ đáp ứng với một loại hợp chất nào đó thôi. Ví dụ detector bắt electron là loại đặc biệt cho các hợp chất chứa halogen, carbonyl liên hợp, nitril, và hợp chất nitro.

Nếu chỉ cần biết những thông tin định tính để nhận diện các chất rửa giải, các detector khối phổ và hồng ngoại là những chọn lựa tốt. Detector hồng ngoại giống detector đo độ dẫn nhiệt thường không đủ nhạy cho những cột mao quản mở.

❖ Chọn cột

Những chọn lựa chính là pha tĩnh, đường kính cột và chiều dài cột.

Chọn pha tĩnh theo nguyên tắc các chất có cấu tạo càng giống nhau thì tương tác tốt với nhau. Các pha tĩnh không phân cực được sử dụng nhiều. Pha tĩnh có độ phân cực trung bình được sử dụng hầu hết những phép tách mà pha tĩnh không phân cực không thể. Đối với những hợp chất phân cực cao thì một cột phân cực mạnh là cần

thiết. Các đồng phân quang học và những hợp chất có cấu trúc hình học gần giống nhau đòi hỏi những pha tĩnh đặc biệt cho phép tách này.

Giữa đường kính cột và bề dày của lớp phim có mối quan hệ trong việc ảnh hưởng đến độ phân giải. Độ phân giải cao nhất có thể đạt được bởi những cột hẹp nhất với pha tĩnh mỏng nhất. Các cột hẹp và lớp phim mỏng đặc biệt thích hợp cho việc tách các hỗn hợp của các chất có nhiệt độ sôi cao nên bị lưu giữ quá mạnh trên các cột có lớp phim mỏng. Các thời gian lưu ngắn cung cấp những phép phân tích nhanh. Tuy nhiên, các cột hẹp có lớp phim mỏng có dung lượng mẫu rất thấp, đòi hỏi những detector có độ nhạy cao (detector ion hóa ngọn lửa có thể không tương thích), không lưu giữ tốt những hợp chất dễ bay hơi và có thể chịu những ảnh hưởng do những vị trí hoạt động trên bề mặt có thể bị lộ ra. Các cột cỡ hẹp có lớp phim dày cung cấp một thỏa hiệp tốt giữa độ phân giải và dung lượng mẫu. Chúng có thể được sử dụng với nhiều detector (nhưng thường không phải các detector đo độ dẫn điện hoặc hồng ngoại) và với những hợp chất dễ bay hơi. Các thời gian lưu giữ dài hơn so với cột có lớp phim mỏng.

Các cột cỡ rộng và có lớp phim dày được đòi hỏi cho việc sử dụng các detector đo độ dẫn điện và hồng ngoại. Chúng có dung lượng mẫu cao và có thể xử lý các hợp chất dễ bay hơi nhưng cho độ phân giải thấp và thời gian lưu giữ lâu. Nếu một cột chuyên biệt đáp ứng với hầu hết những yêu cầu đặt ra nhưng không cung cấp đủ độ phân giải thì cột dài hơn cùng loại có thể được sử dụng.

Chiều dài gấp đôi của cột làm tăng gấp đôi số đĩa lý thuyết và theo phương trình tính độ phân giải thì làm tăng độ phân giải lên gấp 2 lần. Điều này không phải là cách tốt nhất để tăng độ phân giải bởi vì nó làm tăng gấp đôi thời gian lưu.

Việc sử dụng một cột hẹp hơn hoặc lớp pha tĩnh mỏng hơn sẽ làm tăng độ phân giải mà không kéo dài thời gian lưu giữ.

Việc thay đổi pha tĩnh làm thay đổi hoàn toàn sự lưu giữ tương đối của những hợp chất khác nhau (α trong phương trình...) và có thể phân giải các cấu tử đang quan tâm.

❖ Chương trình nhiệt độ

Nếu nhiệt độ được chọn quá thấp, những pic hòa tan đầu tiên sẽ có khoảng cách rất gần nhau, trong khi đó các cấu tử bị lưu giữ mạnh sẽ có các pic bị giãn rộng và nằm thấp. Ngoài ra nếu nhiệt độ cột hơi thấp thì thời gian phân tích sẽ tăng theo

cấp số nhân.

Nếu chọn nhiệt độ thích hợp cho các cấu tử có điểm sôi thấp thì các cấu tử có điểm sôi cao sẽ bị lưu giữ lâu trong cột tách dẫn đến pic của chúng bị dẫn rộng. Ngược lại nếu thực hiện việc tách ở nhiệt độ cao thì các cấu tử có điểm sôi cao sẽ rửa giải nhanh và có độ phân giải tốt, nhưng các cấu tử có điểm sôi thấp thì bị tách chậm và có độ phân giải kém, thậm chí nhiều pic bị chập lên nhau.

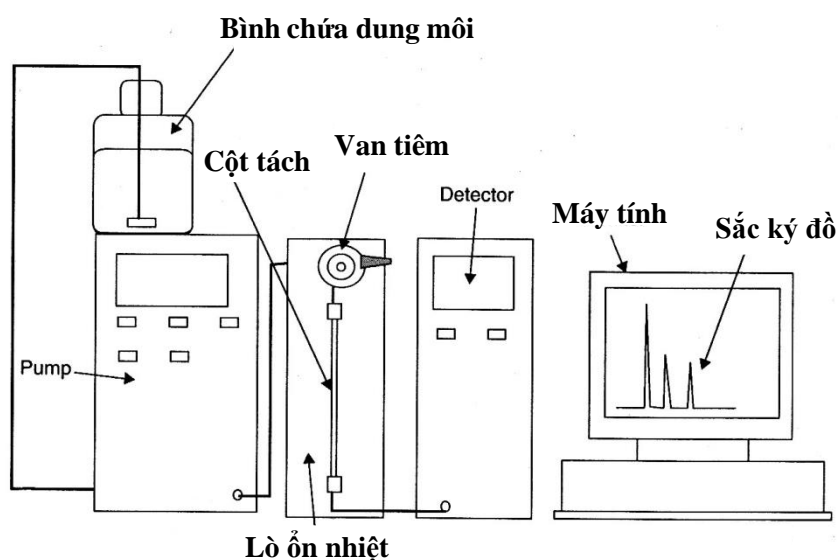
Nếu các cấu phần của hỗn hợp có nhiệt độ sôi khác biệt nhau nhiều nên sử dụng chương trình nhiệt độ để tăng nhiệt độ của lò lên từ từ, tách rời các hợp chất của hỗn hợp một cách tốt nhất.

3.4.3. Ứng dụng

- Xác định độ tinh khiết
- Theo dõi phản ứng hoá học
- Biết được số cấu tử hiện diện trong hỗn hợp.
- Phân tích thực phẩm, dược phẩm.
- Phân tích môi trường

3.5. Sắc ký lỏng hiệu năng cao

3.5.1. Giới thiệu máy sắc ký lỏng hiệu năng cao



Các bộ phận của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao

a) Bình chứa dung môi

Thường làm bằng thủy tinh, đôi khi làm bằng thép không gỉ, trong phương pháp rửa giải thông thường chỉ cần một bình chứa dung môi, trong phương pháp rửa giải gradient thường dùng 2, 3, 4 bình chứa các dung môi khác nhau và hệ dung môi rửa giải là hỗn

hợp của các loại dung môi trên trộn lẫn với nhau theo tỉ lệ đã được xác định. Cần loại các hạt và các khí hoà tan trong dung môi.

b) Hệ thống bơm

Bơm dùng trong phương pháp phải tạo được áp suất cao (3000 - 6000 psi hay khoảng 250 - 500at), lưu lượng bơm khoảng 0,1 đến 10 ml/ph, phải trơ với các dung môi. Hệ thống bơm này phải có khả năng bơm pha động qua cột ở áp suất cao mà không bị ngắt quãng hoặc tạo nhịp sóng có thể làm sai lệch các lực thu được.

c) Hệ bơm mẫu (hệ tiêm mẫu)

Mẫu được bơm vào cột nhờ hệ thống van mẫu. Người ta bơm mẫu vào vòng mẫu với thể tích thường là từ 10 đến 20 μ l.

d) Cột sắc ký

Kiểu cột thường phụ thuộc vào phương pháp dùng để tách, nhưng thường là những cột bằng thép không gỉ, có cỡ lỗ chính xác đường kính từ 3 đến 4 mm và dài từ 10 đến 30 cm. Cột sắc ký được nhồi thật chặt bởi những hạt nhỏ đường kính $\leq 5\mu$ m.

e) Detector

Là bộ phận phát hiện các chất khi chúng ra khỏi cột và ghi nhận các tín hiệu ghi trên sắc ký đồ. Hiện đang sử dụng các loại detector sau:

- Detector tử ngoại (UV): Dùng đèn thuỷ ngân cho vạch 254nm. Nhiều chất hấp thụ ở bước sóng này.
- Detector tử ngoại và khả kiến (UV-VIS): Dùng phổ quang kế lựa chọn bước sóng từ 195 đến 750 nm. Loại này hiện nay được dùng nhiều nhất.
- Detector điện hoá và detector huỳnh quang có độ nhạy và độ chọn lọc cao dùng trong phân tích vết. Dùng detector điện hoá có thể phát hiện được những lượng picogram.

3.5.2. Chuẩn bị mẫu

Yêu cầu mẫu sắc ký:

- Độ tan trong pha động hợp lý (đặc biệt trong HPLC pha đảo). Nếu mẫu tan ít trong pha động => thể tích tiêm lớn => hiệu quả phân tách giảm. Nếu mẫu tan nhiều => dung môi chạy qua cột đậm đặc vì hòa tan nhiều có thể dẫn đến tủa trên bề mặt cột => hỏng cột.
- Mẫu thử được chuẩn bị theo đúng chuyên luận riêng. Quy trình chuẩn bị theo nguyên tắc: Dung môi hòa tan hoạt chất phải hòa tan trong pha động, trong nhiều

trường hợp dùng chính dung môi pha động để hòa tan mẫu. Loại bỏ các chất không tan trong pha động hoặc các chất không rửa giải được bằng cách lọc hay chiết... (chiết lại nhiều lần, lọc qua màng lọc 0.2 – 0.45 micromet). Đối với HPLC điều chế, mẫu phải qua xử lý để tương đối tinh khiết chứ không dùng cao chiết nguyên để làm mẫu, mẫu đem chiết tách bằng HPLC có ít chất hơn.

3.5.3. Ứng dụng

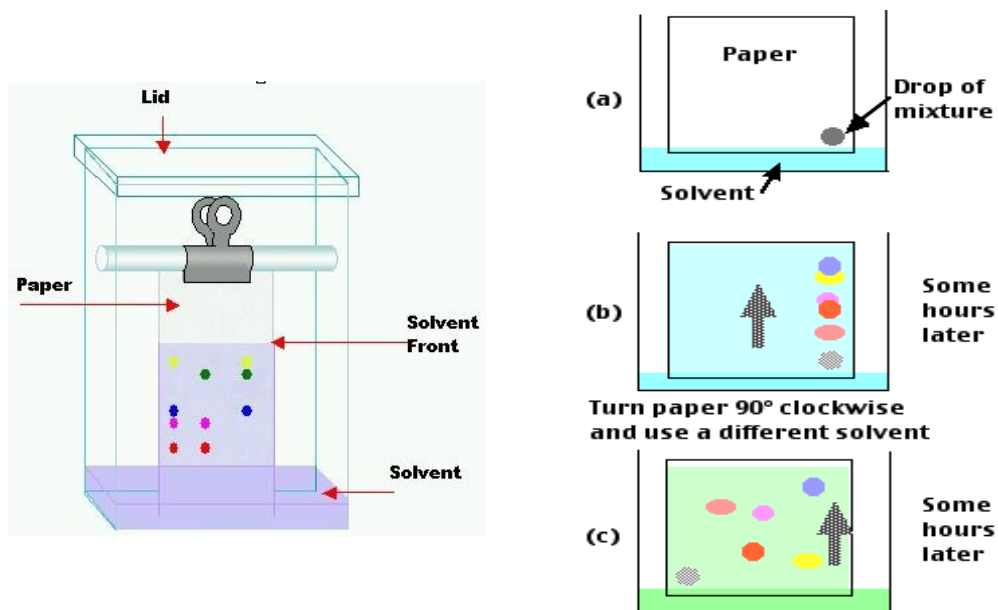
HPLC có nhiều ứng dụng bao gồm y học (ví dụ phát hiện nồng độ vitamine D trong huyết thanh), trong pháp luật (ví dụ phát hiện các thuốc làm tăng lực trong nước tiểu), trong nghiên cứu (ví dụ tinh khiết chất từ mẫu sinh học phức hợp, hoặc tách các chất tổng hợp giống nhau từ các chất khác) và trong sản xuất (ví dụ trong tiến trình sản xuất các chế phẩm sinh học hoặc dược). HPLC có thể lựa chọn mô tả như một sự lựa chọn liên quan sự hút bám hàng loạt trong hóa học.

3.6. Một số kỹ thuật sắc ký khác

3.6.1. Sắc ký giấy

Sắc ký giấy là một phương pháp phân tách dễ dàng các thành phần của một hỗn hợp (acid amin). Trong sắc ký giấy, pha tĩnh là một tờ giấy bằng cellulose (thí dụ như tờ giấy thấm, giấy lọc trong phòng thí nghiệm). Các loại giấy này có tính ái nước nên trên thực tế, pha tĩnh là một lớp nước (H_2O) thật mỏng đã được che phủ lên trên bề mặt của tờ giấy, chính vì thế sắc ký giấy là loại sắc ký phân chia. Pha động là chất lỏng (có thể là chất lỏng hay một hỗn hợp dung môi).

Phương pháp này thường được sử dụng để tách các chất ưa nước như amino acid, đường, ... Trong giấy, cellulose có dạng sợi, các sợi này khi nằm cạnh nhau sẽ tạo thành mạng lưới với các lỗ rỗng to. Khi giải ly, dung môi di chuyển dọc theo bề mặt sợi và các lỗ rỗng sẽ được phủ đầy dung môi. Như thế, các chất tan bị phân tán nhiều trong lỗ rỗng khiến các vết sắc ký to hơn. Bột giấy hấp thu nước, nước bị giữ lại trong cấu trúc glucopyranose bằng cầu nối hydrogen, vì thế quá trình sắc ký xảy ra theo cơ chế phân chia.



Các chất màu di chuyển theo dung môi lên giấy với các điểm khác nhau

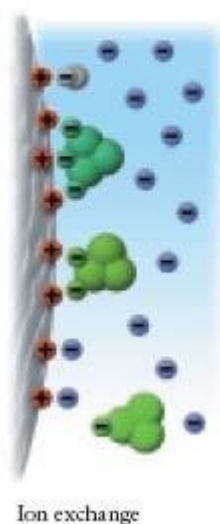
- Một giọt hỗn hợp (drop of mixture) đặt ở một góc mảnh giấy lọc, một cạnh giấy nằm trong dung môi.
- Dung môi di chuyển lên tấm giấy bằng lực hút mao mạch, các chất sẽ phân bố theo các tỷ lệ khác nhau. Mỗi hợp chất di chuyển với tốc độ phản ánh kích thước của phân tử của nó và hòa tan của nó trong dung môi.
- Những chất khác nhau sẽ được trải ra ở những điểm khác biệt trên bảng, tạo thành một sắc ký đồ.

Hiện nay, sắc ký giấy đang dần được thay thế bằng sắc ký lớp mỏng. Do phần lớn các chất hữu cơ không có màu, nên sắc ký giấy sẽ không cho thấy được vị trí của mẫu chất trong quá trình dung môi di chuyển đi lên giấy.

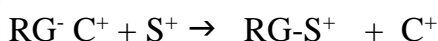
Nhược điểm: Trong giấy, cellulose ở dạng những sợi dài nằm song song kề nhau một cách tự nhiên, và một hệ thống mạng như thể chắc chắn có các lỗ hổng. Khi dung môi giải ly di chuyển (mang theo các chất tan, solute) dọc theo bề mặt của sợi, các lỗ rỗng này sẽ được dịp phủ đầy dung môi, và các chất tan có dịp khuếch tán vào các lỗ rỗng này, khiến các chất tan càng lúc càng to dần so với vết chấm tạo mức xuất phát ban đầu. Còn nếu sợi cellulose được nén chặt quá dòng chảy sẽ rất khó di chuyển.

3.6.2. Sắc ký trao đổi ion

Sự trao đổi ion là sự gắn kết có tính chất thuận nghịch giữa các phân tử có mang điện tích. Trong sắc ký cột nhồi, pha tĩnh R có gắn thêm nhóm chức G mang điện tích.



Giả sử cho đi ngang qua cột một hỗn hợp mẫu chất ban đầu có chứa nhiều loại chất tan (solute) khác nhau, chất tan nào có mang điện tích ngược dấu với điện tích của nhóm chức, thí dụ chất tan S, chất tan sẽ đuổi đối ion C ra thế chỗ vào, để gắn vào pha tĩnh, và như thế chất tan sẽ bị giữ lại trong cột, trong khi đó những chất khác của hỗn hợp mẫu chất ban đầu sẽ không bị giữ lại nên đi ra khỏi cột. kỹ thuật này tách riêng được hợp chất S ra khỏi hỗn hợp ban đầu.



Trong đó: R là pha tĩnh hay gọi là nhựa (resin), G là nhóm chức mang điện tích được cố định trên pha tĩnh hay còn gọi là nhóm chức hoạt động của nhựa. C là đối ion của G. S là chất hữu cơ có mang điện tích trái dấu với G.

Các loại hạt nhựa trao đổi ion: nhựa polystyren, silicagel, polymer carbohydrate.

Trong phương pháp sắc ký trao đổi ion, pha tĩnh là những hạt mang sẵn một điện tích nhất định, những hạt này sẽ tương tác với các phân tử (protein) mang điện tích trái dấu với chúng. Cụ thể, nếu hạt mang điện âm, tiến trình được gọi là **sắc ký trao đổi ion dương**, thì sẽ tương tác với những phân tử mang điện tích dương. Ngược lại, nếu hạt mang điện tích dương, gọi là **sắc ký trao đổi ion âm**, thì tương tác với phân tử mang điện tích âm. Vì thế, những phân tử cùng dấu với cột sẽ chạy ra khỏi cột trong khi những phân tử trái dấu bị giữ lại cột. Để phóng thích những phân tử này, ta tăng nồng độ ion của pha động, những ion này sẽ thế phân tử tương tác với các hạt mang điện tích.

3.6.3. Sắc ký gel

Trong sắc ký gel, pha tĩnh là mạng polymer có lỗ rỗng và các lỗ rỗng này được phủ đầy dung môi dùng làm pha động. Một hỗn hợp gồm nhiều hợp chất có trọng lượng phân tử khác nhau có thể tách riêng được hay không là tùy vào kích thước lỗ rỗng. Các phân tử có kích thước lớn hơn lỗ rỗng, không thể chui lọt vào bên trong lỗ rỗng, nhanh chóng theo dòng chảy của pha động đi ra khỏi cột. Các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn kích thước lỗ rỗng, sẽ toàn phần hay bán phần lọt vào lỗ rỗng, tuy rằng cuối cùng rồi cũng theo dòng chảy đi ra khỏi cột nhưng sẽ chậm trễ hơn.

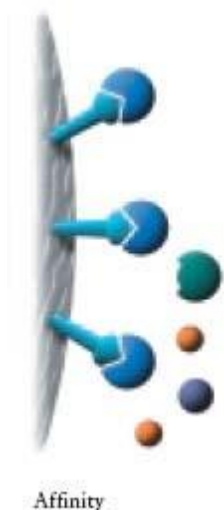


Như vậy, các thành phần khác nhau của hỗn hợp mẫu khi đi ngang qua cột sắc ký gel, sẽ ra khỏi cột lần lượt theo trình tự trọng lượng phân tử

lớn đi ra khỏi cột trước, phân tử nhỏ đi ra khỏi cột sau.

Ứng dụng: kỹ thuật này dùng để tách các đại phân tử có nguồn gốc sinh học như: protein, polysaccharide, acid nucleic, enzyme, ... Người ta ứng dụng vào việc đoán trọng lượng phân tử của một hợp chất chưa biết.

3.6.4. Sắc ký ái lực



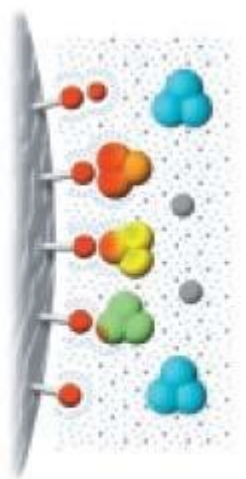
Sắc ký ái lực hấp thụ phát hiện các ái lực sinh học mà một phân tử sinh học có với một phân tử khác được cố định trên một pha ổn định. Có nhiều phương pháp để rửa giải các phân tử ái lực vì có nhiều loại sắc ký ái lực khác nhau, các bước theo gradient vẫn thường được sử dụng. Thường sử dụng trên các hệ thống có áp suất thấp. Các giá thể (thường là agarose) thường chịu được áp suất dưới 50psi.

Nhược điểm: đắt tiền, khó tẩy rửa, chọn lọc phối tử, gắn kết phối tử lên giá thể hoạt hóa thường gặp nhiều khó khăn.

Ưu điểm: phát triển phương pháp tinh sạch trên protein A (protein A là antigen cho IgG), bắt giữ tốt, cho phép phân tách protein dạng nguyên thủy còn hoạt tính với dạng biến tính. Sử dụng sắc ký ái lực cho tương tác giữa kháng nguyên-kháng thể để tinh sạch một kháng nguyên. Ngược lại, một giá thể có liên kết với một kháng nguyên chuyên biệt sẽ bắt giữ kháng thể chuyên biệt cho kháng nguyên đó. Ứng dụng nhiều nhất là gắn kết protein A vào gel để gắn kết với các globulin miễn dịch.

3.6.5. Sắc ký tương tác kỵ nước

Sắc ký tương tác kỵ nước là phương pháp bổ sung khá tốt cho các kỹ thuật phân tách khác. Trong những năm gần đây, phương pháp này trở nên thông dụng như là bước đầu tiên trong quá trình sắc ký.



Hydrophobic interaction

Loại hạt Macro-Prep có dẫn xuất là nhóm kỵ nước, có thể là gốc methyl hay t-butyl. Các gốc này hấp dẫn các gốc kỵ nước khác có trên bề mặt protein. Khi cho mẫu protein vào trong điều kiện nồng độ muối cao ép các phần kỵ nước lại gần nhau và dính với nhau. Quá trình rửa giải được thực hiện bằng cách giảm dần nồng độ muối cho đến khi các phần kỵ nước đi lại vào trong dung dịch.

Đặc điểm: Phân tách các phân tử theo tính kỵ nước của phân tử. Các nhóm kỵ nước khác nhau được cố định trên bề mặt giá thể. Dưới điều kiện nồng độ muối cao (thấp) CÁC phần kỵ nước trên phân tử tương tác các nhóm cố định. Các phân tử gắn kết được rửa giải bằng cách giảm áp lực ion và vì vậy hòa tan các phân tử ra khỏi giá thể.

Ưu điểm: cho phép cô mẫu, công suất cao, nhanh, mẫu được thu nhận trong nồng độ muối thấp.

Nhược điểm: một số protein có thể bị rửa ở nồng độ muối cao, khó nâng cấp quy mô lớn.

CHƯƠNG 4: MỘT SỐ THỦ THUẬT KHI TINH CHẾ HỢP CHẤT HỮU CƠ

4.1. Kỹ thuật kết tinh

4.1.1. Giới thiệu

a) *Khái niệm*

Kết tinh là quá trình tách chất rắn hòa tan trong dung dịch dưới dạng tinh thể. Tinh thể là những vật rắn đồng nhất có các hình dạng khác nhau, giới hạn bởi các mặt phẳng. Tinh thể gồm cả các phân tử nước gọi là tinh thể ngậm nước (tinh thể hydrat). Tùy theo điều kiện thực hiện quá trình mà tinh thể có thể ngậm số phân tử nước khác nhau.

b) *Phương pháp*

Kết tinh là phương pháp thông dụng để tách các chất rắn ra khỏi hỗn hợp của chúng. Có thể kết tinh từ dung dịch bão hòa và từ trạng thái nóng chảy. Phương pháp kết tinh đơn giản nhất là phương pháp kết tinh từ dung dịch bão hòa.

Điều kiện cần thiết để có quá trình kết tinh là phải tạo cho được những dung dịch quá bão hòa, tức là làm mất cân bằng pha của hệ. Do vậy trong công nghiệp người ta sử dụng nhiều phương pháp: kết tinh tách một phần dung môi, kết tinh với thay đổi nhiệt độ, kết tinh chân không.

Trong điều kiện sản xuất, quá trình kết tinh bao gồm các giai đoạn sau:

- Giai đoạn kết tinh bằng cách hạ nhiệt độ hay làm bay hơi một phần dung môi.
- Tách tinh thể ra khỏi dung dịch còn lại bằng cách lắng, lọc, li tâm.
- Kết tinh lại (trong trường hợp cần thiết).
- Rửa và sấy khô tinh thể.

Trong phòng thí nghiệm, quá trình kết tinh lại gồm các giai đoạn sau:

- Hòa tan mẫu chất rắn không tinh khiết trong dung môi thích hợp.
- Lọc nóng dung dịch trên để loại bỏ chất phụ không tan.
- Làm lạnh dung dịch hoặc đuổi bớt dung môi để tạo dung dịch bão hòa và gây mầm kết tinh
- Làm khô tinh thể.

Quy trình này có thể làm lại nhiều lần để thu được chất tinh khiết.

Chú ý: sự khác nhau giữa cô đặc và kết tinh:

- Cô đặc là tách một phần dung môi để đạt đến trạng thái bão hòa hoặc cũng có thể

đến quá bão hòa.

- Kết tinh là hoặc tách một phần dung môi hoặc hạ nhiệt độ để đạt đến trạng thái quá bão hòa.

Điểm khác cơ bản của hai quá trình là quá trình kết tinh có quá trình tạo mầm và phát triển mầm tạo thành tinh thể, còn cô đặc thì không (trừ trường hợp cô đặc đến nồng độ rất cao, có nghĩa là vừa cô đặc vừa kết tinh)

Ứng dụng: trong công nghệ hóa chất và thực phẩm quá trình kết tinh được ứng dụng rộng rãi để nhận được các chất dưới dạng sạch, như sản xuất muối khoáng, sản xuất amonisunphat, sản xuất đường mía, đường củ cải, ...

4.1.2. Các giai đoạn kết tinh

a) Quá trình tạo mầm

Mầm tinh thể còn gọi là tâm kết tinh được hình thành khi dung dịch ở trạng thái quá bão hòa do dung dịch được làm lạnh hay cho bốc hơi một phần dung môi (trong nồi nấu đường chẳng hạn). Theo quan điểm hiện đại, mầm được tạo ra do sự liên kết của các ion (phân tử) khi va chạm với nhau của chất hòa tan trong dung dịch. Mầm tinh thể khi đạt đến trạng thái cân bằng với dung dịch thì sự kết tinh sẽ dừng lại.

Trạng thái quá bão hòa của dung dịch có thể tồn tại trong một khoảng thời gian nhất định được gọi là chu kì cảm ứng và nó có thể kéo dài từ vài giây đến vài tháng mà trong khoảng thời gian này không có mầm tinh thể xuất hiện. Chu kì cảm ứng phụ thuộc vào bản chất của chất tan và dung môi, vào mức độ quá bão hòa của dung dịch, vào nhiệt độ và phương pháp khuấy trộn, vào các tạp chất, và vào tác động cơ học.

Nếu trạng thái quá bão hòa quá lớn vượt quá một giới hạn nhất định (đến vùng quá bão hòa cao) thì sẽ xuất hiện quá trình kết tinh tự nhiên, lúc này lượng mầm tinh thể rất nhiều, lúc đó dung dịch sẽ đóng rắn chứ không tạo thành những tinh thể riêng biệt.

Có một số dung dịch mặc dù có độ quá bão hòa rất lớn vẫn không xuất hiện mầm tinh thể, khi đó cần phải kích thích quá trình kết tinh bằng cách cho vào dung dịch đó một lượng nhỏ các tinh thể chất tan hoặc tinh thể của các chất khác có cùng cấu trúc tinh thể giống chất tan (chất cho thêm gọi là chất trợ mầm), hoặc bằng cách tác động cơ học như làm rung động, lắc, ma sát, ... (như làm ma sát tường của chai lọ bằng đũa thủy tinh). Độ nhám của bề mặt của thiết bị kết tinh và vật liệu làm cánh khuấy cũng có ảnh hưởng đến quá trình tạo mầm.

b) Quá trình phát triển mầm tinh thể

Tinh thể phát triển về kích thước và đạt tới giá trị tới hạn của mầm. Tinh thể có năng lượng bề mặt lớn nên nó hút (hấp thụ) các chất hòa tan trong dung dịch. Sự lớn lên của mầm tinh thể đồng thời theo các mặt của nó, nhưng vận tốc lớn lên của các mặt tinh thể có khác nhau.

Theo thuyết khuếch tán sau khi xuất hiện mầm tinh thể, trên bề mặt mầm sẽ tập trung, kết tụ chất hòa tan (ở trong dung dịch ở trạng thái tĩnh). Cùng với sự lớn lên của mầm do vật chất khuếch tán từ môi trường xung quanh đến bề mặt mầm, do đó chất lỏng xung quanh mầm sẽ loãng dần chất tan, tức là mất đi tính chất quá bão hòa và nếu như không có chất hòa tan từ các vùng xung quanh đi vào khu vực đó thì quá trình lớn lên của các tinh thể sẽ ngừng lại.

4.1.3. Các phương pháp kết tinh***a) Trong công nghiệp***

Tùy thuộc vào điều kiện cụ thể mà có thể áp dụng phương pháp kết tinh có tách dung môi hoặc không tách dung môi (hạ nhiệt độ của dung dịch) hoặc kết tinh chân không.

Các quá trình kết tinh có thể thực hiện theo phương pháp gián đoạn hay liên tục. Quá trình gián đoạn có những nhược điểm cơ bản như: thiết bị cồng kềnh, tinh thể nhận được không đều, thao tác vất vả. Còn quá trình kết tinh liên tục được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp do năng suất cao, tinh thể nhận được có kích thước đều đặn.

❖ Kết tinh tách một phần dung môi

Phương pháp được áp dụng để kết tinh từ các dung dịch khi độ hòa tan của các cấu tử ít phụ thuộc vào nhiệt độ.

Để tách dung môi có thể thực hiện theo các phương pháp sau:

- Cô đặc dung dịch (cho bay hơi tại nhiệt độ sôi). Phương pháp kết tinh cho bay hơi bằng cô đặc có nhược điểm là các tinh thể sẽ bị dính lên bề mặt truyền nhiệt và đồng thời sẽ làm tăng nồng độ tạp chất có trong dung dịch. Để hạn chế lượng chất rắn đọng trên bề mặt truyền nhiệt phải tăng vận tốc tuần hoàn dung dịch hoặc khuấy trộn.
- Cho bay hơi dung môi tại nhiệt độ nhỏ hơn nhiệt độ sôi của dung dịch. Cho bay hơi tự nhiên (thực hiện trong các thiết bị hở), hay cho bay hơi ở áp suất chân không.

❖ *Kết tinh với sự thay đổi nhiệt độ: (kết tinh không tách dung môi)*

Phương pháp được áp dụng để kết tinh từ các dung dịch khi độ hòa tan của các cấu tử phụ thuộc vào nhiệt độ. Kết tinh có đuổi dung môi để tạo điều kiện những tập hợp liên kết lớn (nếu lượng mầm quá nhiều sẽ tạo thành tinh thể nhỏ, mịn dễ đóng rắn, gây bất lợi). Hơn nữa trong sản phẩm kết tinh có chứa nhiều tạp chất, ngoài ra việc đuổi dung môi bằng phương pháp tự bay hơi tiến hành rất chậm, còn cô đặc và hút chân không tương đối đắt tiền. Do đó, việc kết tinh bằng cách hạ nhiệt độ khá thuận lợi.

Để hạ nhiệt độ của dung dịch thường dùng nước lạnh hay nước muối.

Phương pháp kết tinh này có thể làm việc liên tục hay gián đoạn. Kết tinh gián đoạn bằng cách cho dung dịch vào đầy thiết bị, sau kết tinh xong, nước cái và tinh thể được tháo ra ngoài. Còn kết tinh liên tục được thực hiện trong nhiều thiết bị nối với nhau, dung dịch đi từ thiết bị này qua thiết bị khác và sản phẩm lấy ra liên tục.

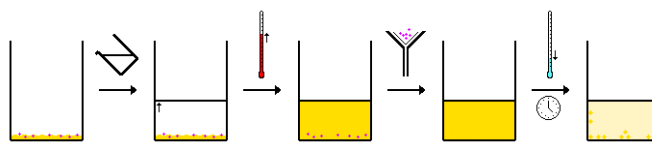
❖ *Kết tinh chân không*

Trong phương pháp kết tinh chân không, một phần dung môi được bay hơi nhờ vào nhiệt vật lý của dung dịch. Hơi bay ra theo đường bơm chân không. Nhiệt độ của dung dịch ở trạng thái bão hòa sẽ giảm đến nhiệt độ sôi tương ứng với áp suất chân không trong thiết bị. Dung dịch sẽ đạt đến trạng thái quá bão hòa và kết tinh. Dung môi bay hơi không chỉ do nhiệt vật lý của dung dịch mà còn do sự tỏa nhiệt khi kết tinh. Kết tinh tiến hành đồng thời bay hơi do hút chân không và làm lạnh sẽ tăng cường quá trình và xảy ra trong toàn bộ thể tích dung dịch, do đó các tinh thể sẽ hạn chế dính vào bề mặt thiết bị và thời gian rửa thiết bị sẽ được rút ngắn.

b) Trong phòng thí nghiệm

Hòa tan chất rắn cần kết tinh trong dung môi thích hợp vừa phải ở nhiệt độ sôi (thường là nhiệt độ sôi của dung môi) với một lượng chất hòa tan xác định. Đun sôi sau đó tiếp tục bổ sung thêm dung môi đến khi chất rắn tan hoàn toàn (ở nhiệt độ sôi). Nếu quá trình hòa tan như trên xuất hiện lớp dầu cần thêm dung môi tiếp và đun cho tan hết lớp dầu. Nếu dung dịch hòa tan có màu thì cần thêm than hoạt tính (với lượng bằng 1-2% hàm lượng chất hòa tan) vào dung dịch và đun sôi lại dung dịch.

Sau khi hòa tan xong cần lọc nóng ngay để loại các chất bẩn không tan, tránh kết tinh trong khi lọc. Dung dịch sau lọc, để nguội từ từ sẽ kết tinh. Quá trình kết tinh có thể lặp lại nhiều lần để thu được chất tinh khiết. Các tinh thể được lọc, làm khô và xác định nhiệt độ nóng chảy.



Điều quan trọng là phải biết chọn và thử dung môi hòa tan: các chất phân cực dễ tan trong dung môi phân cực, các chất không phân cực dễ tan trong dung môi không phân cực.

- Các dung môi phân cực: nước, alcol, ether, ester, acetic acid.
- Các dung môi không phân cực: benzene, hexane, cyclohexane, CCl_4 , carbon disulfide...
- Có thể dùng hỗn hợp dung môi.

Các dung môi được chọn phải thỏa mãn một số tính chất sau:

- Phải tan tốt chất hòa tan và rất ít tan ở nhiệt độ thường và lạnh.
- Không phản ứng hóa học với chất tan.
- Các tạp chất không tan với dung môi chọn ở nhiệt độ cao hoặc hòa tan tốt ở nhiệt độ thường và lạnh.
- Dung môi chọn phải dễ dàng bay hơi khỏi bề mặt tinh thể.
- Nhiệt độ sôi của dung môi phải thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của chất rắn khoảng 10→15%.

4.2. Kỹ thuật chưng cất

Chưng cất là quá trình chuyển chất lỏng thành hơi rồi ngưng tụ thành lỏng. Để chuyển chất lỏng thành hơi, tiến hành đun sôi chất lỏng đó. Chất lỏng sôi khi áp suất hơi của nó bằng áp suất bên ngoài. Khi áp suất bên ngoài giảm thì nhiệt độ sôi của chất giảm. Với một chất tinh khiết thì nhiệt độ sôi không đổi trong quá trình đun, nếu không có hiện tượng hơi quá nhiệt do đun mạnh. Nếu nhiệt độ sôi của chất thấp hơn nhiệt độ chất đó bị phân hủy thì có thể tiến hành chưng cất ở áp suất thường. Còn nếu nhiệt độ sôi của chất cao hơn nhiệt độ phân hủy thì phải tiến hành chưng cất ở áp suất thấp. Phương pháp chưng cất thường dùng để tách biệt (tinh chế) các chất có nhiệt độ sôi khác nhau ra khỏi hỗn hợp của nó. Có nhiều phương pháp chưng cất khác nhau tùy thuộc vào tính chất của hỗn hợp chất lỏng.

- Với các chất có nhiệt độ sôi xa nhau thường chọn phương pháp chưng cất đơn hay chưng cất thường.
- Với các chất có nhiệt độ sôi gần nhau thường chọn phương pháp chưng cất phân

đoạn.

- Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước dùng để tách biệt các chất trong hỗn hợp, trong đó có một chất không tan trong nước và dễ bay hơi với hơi nước. Thông thường phương pháp này được lựa chọn khi thỏa mãn các điều kiện trên và không thực hiện được với hai phương pháp trên.

Các phương pháp chưng cất trên có thể tiến hành ở áp suất bình thường hoặc ở áp suất thấp tùy vào đặc điểm tính chất của hỗn hợp chưng cất. Dụng cụ dùng để chuyển từ dạng hơi sang dạng lỏng trong quá trình chưng cất được gọi là ống sinh hàn. Có nhiều loại ống sinh hàn: ống sinh hàn không khí, ống sinh hàn nước; ống sinh hàn thẳng, xoắn, bầu, ... tùy vào bản chất của các chất và tùy vào mục đích sử dụng. Với chất lỏng sôi ở nhiệt độ thấp hơn 80°C thì dùng ống sinh hàn nước, nếu cao hơn 150°C thì dùng sinh hàn không khí, còn trong giới hạn $200-300^{\circ}\text{C}$ thì hứng trực tiếp ở nhánh bình cất.

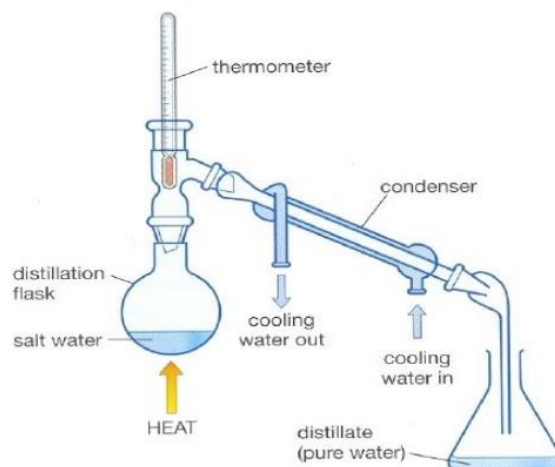
4.2.1. Chưng cất đơn giản

Dùng để tách biệt chất đủ bền khi đun nóng và thực tế không bị phân hủy ở nhiệt độ sôi. Phương pháp này thường dùng với các chất có nhiệt độ sôi cao hơn 40°C và thấp hơn 160°C vì những chất lỏng sôi thấp hơn 40°C sẽ mất đi nhiều sau khi chưng cất nên không có hiệu quả. Nếu chưng cất sử dụng ống sinh hàn, thì các ống sinh hàn này thường được lắp xuôi để chất ngưng tụ thu được ở bình hứng. Tốc độ cất thường từ 1-2 giọt chất lỏng rơi vào bình hứng trong một giây. Để chất lỏng sôi đều và tránh hiện tượng quá lửa sẽ không có hiện tượng sôi với biểu hiện các hạt chất lỏng chuyển động trên bề mặt chất lỏng, dẫn đến hiện tượng thỉnh thoảng chất lỏng sôi trào mạnh và tràn sang bình hứng, cần phải cho vào bình cất một ít đá bọt, hay ống mao quản hàn kín một đầu vào ngay khi bắt đầu đun nóng. Chú ý không được cho đá bọt vào bình cất khi đang sôi.

Chưng cất đơn giản được ứng dụng:

- Khi nhiệt độ sôi của hai cấu tử khác xa nhau.
- Khi không đòi hỏi sản phẩm có độ tinh khiết cao.
- Tách hỗn hợp lỏng ra khỏi tạp chất không bay hơi.
- Tách sơ bộ hỗn hợp nhiều cấu tử.

Simple Distillation



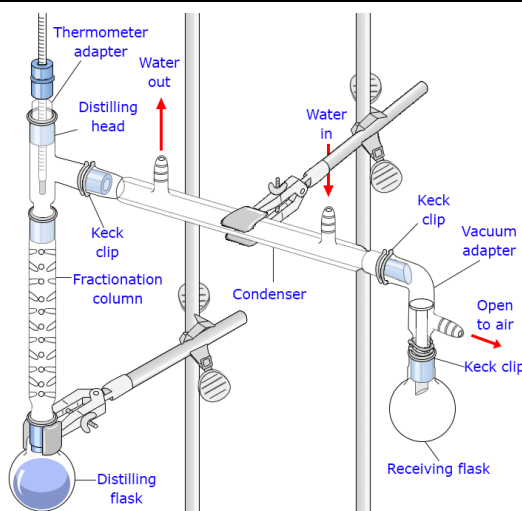
Hệ thống chưng cất đơn

4.2.2. Chưng cất phân đoạn

Chưng cất phân đoạn dùng để tách biệt hỗn hợp các chất lỏng hòa tan vào nhau. Để tách các chất khác nhau khỏi hỗn hợp chất lỏng có thể dùng phương pháp chưng cất thường nhiều lần thường gọi là chưng cất “thuận dòng”. Tuy nhiên để tăng hiệu suất chưng cất và giảm số lần chưng cất, người ta dùng cột cất phân đoạn.

Bản chất tác dụng của cột cất phân đoạn là ngưng tụ từng phần hỗn hợp hơi và cho bay hơi từng phần chất ngưng tụ lại một cách liên tục. Hơi bay lên cột cất phân đoạn càng cao sẽ càng giàu cấu tử có nhiệt độ sôi thấp, còn chất lỏng chảy trở lại vào bình sẽ giàu cấu tử có nhiệt độ sôi cao.

Cấu tạo của cột cất đảm bảo tiếp xúc tốt giữa chất lỏng chảy xuống và hơi đi lên trên, nên gọi là chưng cất “ngược dòng”. Trong cột cất, nếu số mắt hay đĩa càng nhiều thì sự tách biệt càng hoàn toàn hơn nhưng tốc độ cất càng nhỏ, vì mỗi mắt hay đĩa có tác dụng như một lần cất thường.



Hệ thống chưng cất phân đoạn

4.2.3. Chưng cất lôi cuốn hơi nước

Quá trình chưng bằng hơi nước trực tiếp hợp lý nhất là chỉ dùng để tách cấu tử không tan trong nước khỏi tạp chất không bay hơi, trường hợp này sản phẩm ngưng sẽ phân lớp: cấu tử bay hơi và nước. Ưu điểm của quá trình chưng này là giảm được nhiệt độ sôi của hỗn hợp, nghĩa là có thể chưng ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ sôi của từng cấu tử. Điều này rất có lợi đối với các chất dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao cũng như đối với các chất có nhiệt độ sôi cao. Chưng bằng hơi nước trực tiếp có thể tiến hành gián đoạn hay liên tục. Đối với các chất hữu cơ ít tan trong nước, không phản ứng với nước có áp suất hơi lớn ở nhiệt độ sôi của nước thường dùng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước. Phương pháp lôi cuốn hơi nước áp dụng cho các chất có nhiệt độ sôi lớn hơn 100°C.

4.3. Kỹ thuật thăng hoa

Thăng hoa là quá trình làm bay hơi chất rắn thành hơi rồi ngưng tụ lại thành trạng thái rắn, không qua trạng thái lỏng. Những chất chuyển từ trạng thái rắn sang trạng thái khí mà không qua trạng thái lỏng gọi là chất thăng hoa.

Sự thăng hoa là do áp suất hơi của chất rắn tăng theo nhiệt độ nên khi đun nóng đến nhiệt độ mà áp suất hơi của chất rắn bằng áp suất bên ngoài thì chất đó thăng hoa. Dựa vào tính chất này để tinh chế các chất rắn có áp suất hơi khá lớn ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của chúng tại áp suất thường, ví dụ tinh thể iốt, benzoic acid, naphthalene, quinon, ... Đối với những chất ít bay hơi hoặc không thăng hoa ở áp suất thường hoặc thăng hoa rất chậm thì tiến hành ở áp suất thấp.

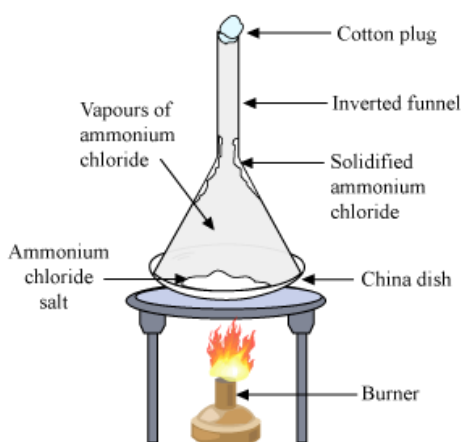
Sự thăng hoa xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ sôi. Phương pháp thăng hoa có ưu điểm hơn các phương pháp khác là thu được chất tinh khiết hơn và có thể dùng một lượng nhỏ chất. Ngược lại phương pháp này cũng có nhược điểm là các chất bản phải có tính bay hơi khác nhiều so với chất tinh chế, quá trình thăng hoa thường chậm và hao phí nhiều chất hơn các phương pháp khác. Tốc độ thăng hoa tỉ lệ thuận với áp suất hơi của chất ở nhiệt độ xác định, tỉ lệ với độ lớn bề mặt chất bay hơi và tỉ lệ nghịch với áp suất trong bình.

Phương pháp tiến hành thăng hoa ở áp suất thường

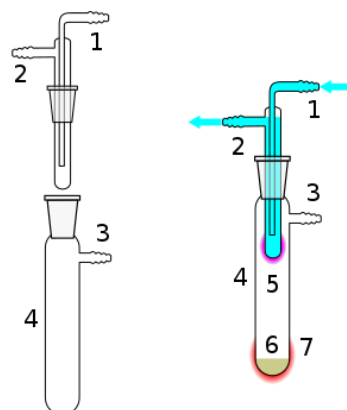
Với dụng cụ đơn giản, lượng nhỏ: chất cần thăng hoa vào bát sứ, phủ bằng giấy lọc có chọc thủng nhiều lỗ nhỏ rồi đặt bát bằng phễu thủy tinh có bọc giấy tẩm ướt hay vải ướt ở bên ngoài, có đặt cuống phễu bằng một ít bông. Sau đó, đun nóng bát sứ trên ngọn lửa đèn cồn hay trên bếp điện qua lưới amiăng hay trên bếp cách cát một cách cẩn thận vì nếu đun nóng quá sẽ phân hủy chất thăng hoa. Những chất không hoặc khó thăng hoa ở áp suất thường thì có thể thăng hoa ở áp suất thấp.

Ưu điểm: công nghệ đơn giản, thời gian ngắn, độ tinh khiết cao, giá thành rẻ.

Nhược điểm: không có nhiều chất thăng hoa trong thực tế.



Dụng cụ thăng hoa ở áp suất thường



Dụng cụ thăng hoa ở áp suất thấp

4.4. Kỹ thuật điện di

Điện di là quá trình dịch chuyển của phân tử tích điện trong dung dịch dưới tác dụng của điện trường. Điện di thường được dùng trong việc tinh sạch và phân tích các phân tử sinh học như nucleic acid, protein và một số ít phức hợp của carbohydrat, lipid.

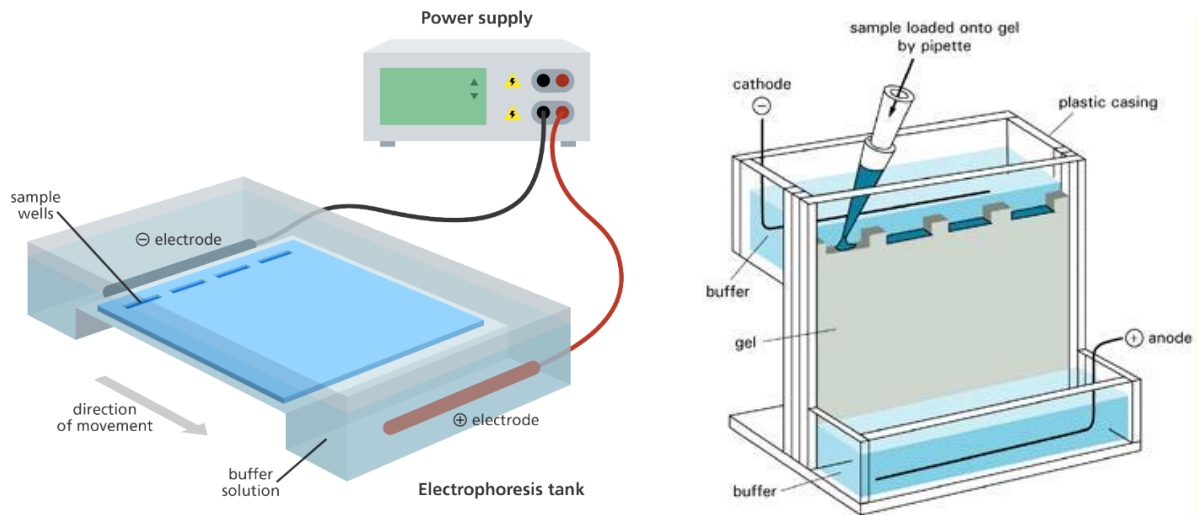
4.4.1. Nguyên tắc

Dựa vào sự tích điện nhất định và khối lượng khác nhau của các phân tử protein hay nucleic acid nên khi đặt chúng trong một điện trường chúng sẽ di chuyển. Các ion

mang điện tích ngược dấu sẽ di chuyển theo hai hướng ngược chiều nhau, còn các ion mang điện tích cùng dấu tuy di chuyển cùng chiều nhưng di chuyển với vận tốc khác nhau nên sẽ tách rời nhau.

Có nhiều phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để phân tích ADN và ARN như: phương pháp ly tâm, sắc ký, đo bằng qunag phổ kế, điện di: agarose gel, polyacrylamide, điện di trong trường xung điện. Nhưng cho đến nay điện di agarose gel là phương pháp được sử dụng phổ biến hơn vì ưu điểm nhanh và tương đối đơn giản.

Hệ thống điện di dung dịch sử dụng hệ đệm dung dịch thay cho môi trường rắn, những hệ thống như vậy có thể chịu ảnh hưởng bởi sự xáo trộn mẫu do có sự khuếch tán của phân tử tích điện, làm giảm độ phân giải trong quá trình ứng dụng, phân tách và các bước loại bỏ mẫu. Như vậy hệ thống điện di dung dịch phải sử dụng một vài phương tiện nhằm ổn định dung dịch trong tế bào điện di.



Máy điện di với bản gel được đặt nằm ngang hoặc dựng đứng

4.4.2. Phân loại

Điện di thường được phân loại dựa vào sự khác nhau của môi trường điện di hoặc chất mang rắn nơi mà phân tử tích điện dịch chuyển

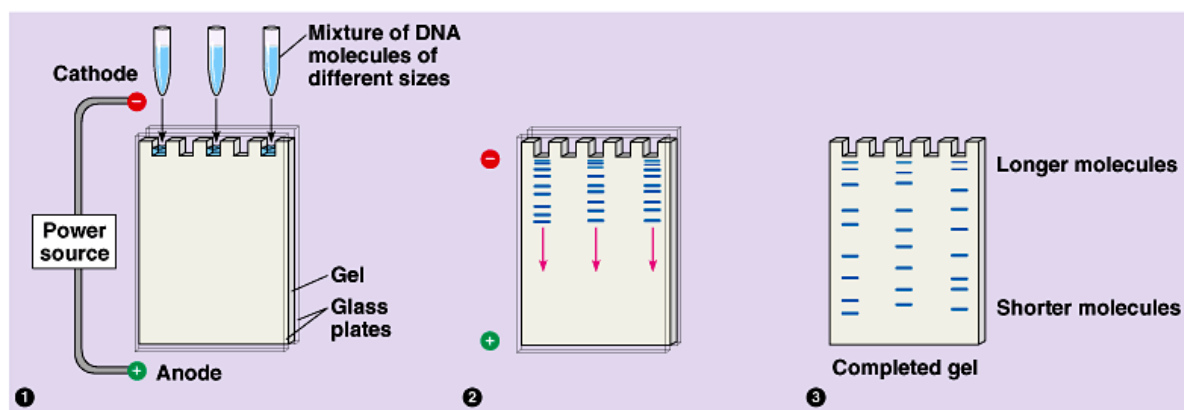
- **Điện di giấy (Paper Electrophoresis):** Điện di trên giấy là phương pháp điện di thường được sử dụng để phân tích và phân giải các phân tử cỡ nhỏ. Phương pháp này không được sử dụng để phân giải các đại phân tử (ví dụ protein...) bởi vì sự hấp thụ và sức căng bề mặt liên kết với giấy điện di thường làm thay đổi hoặc biến tính các đại phân tử tạo ra độ phân giải kém.
- **Điện di mao quản (Capillary Electrophoresis):** vật chất được phân tích và môi trường điện di được đặt trong một ống mao dẫn mịn, dài (thông thường dài từ 50 đến

100cm và đường kính trong từ 15 đến 100 μm). Một lượng mẫu rất nhỏ (cỡ nano lít) được đặt tại một đầu của ống mao dẫn và chịu sự điện di dưới trường tạo bởi điện áp từ 20 đến 30kV.

- **Điện di trên gel (Gel Electrophoresis):** Đối với phương pháp điện di trên gel, phân tử được phân tách trong hệ đệm lỏng được hỗ trợ trong một chất nền polime.
- **Điện di hội tụ (Electrofocalisation):** Đó là một kiểu điện di thực hiện trong gradient pH. Các thành phần di chuyển theo điểm đẳng điện và dừng lại ở vùng có pH tương ứng với pH đẳng điện của chúng.
- **Điện di hai chiều (Electrophoresis bidimensionnel):** Thực hiện 2 lần điện di theo 2 hướng vuông góc với nhau. Có thể kết hợp điện di acrylamide-agarose, điện di đơn và điện di hội tụ, ... Trong thực hành, đầu tiên người ta thực hiện điện di hội tụ theo một hướng, rồi điện di gel acrylamide-SDS theo hướng thứ hai.
- **Điện di miễn dịch:** Điện di miễn dịch được thực hiện trong gel agarose trên một lam kính hoặc trên phim nhựa, cho phép phân tích đồng thời nhiều mẫu thử.

4.4.3. Cách tiến hành

- Chất mang có thể được cấu tạo từ một số vật liệu khác nhau như: giấy, cellulose acetate, polycrylamide, agarose, tinh bột. Trong đó, các gel polyacrylamide và agarose là chất mang còn có tác dụng sàng lọc lực chọn theo kích thước. Gel thường được tạo thành ở các dạng: thời, bản, lá mỏng. Để tách protein thường sử dụng dụng gel polyacrylamide, còn để tách nucleic acid có thể dùng gel polyacrylamide hoặc agarose tùy thuộc vào kích thước các phân tử cần tách.
- Đưa một lớp mẫu mỏng vào dung dịch được ổn định bằng một chất mang (supporting media) có cấu tạo nhiều khe hở (mạng lưới).
- Dưới tác dụng của hiệu điện thế, các phân tử khác nhau trong mẫu sẽ di chuyển qua chất mang với vận tốc khác nhau. Chất mang này là cần thiết vì dòng điện khi đi qua dung dịch điện di sẽ tạo nhiệt và trộn lẫn các băng khi thiêu môi trường tạo cân bằng.
- Các phân tử sau khi tách có thể được phát hiện dưới dạng băng (vết) ở các vị trí khác nhau trong chất mang bằng cách:
 - Nhuộm (ethyldium bromide, coomassie blue, AgNO_3)
 - Sử dụng phương pháp phóng xạ ghi.
 - Định lượng bằng cách quét trên mật độ kế.



4.5. Các phương pháp làm khô mẫu

Sau khi chiết mẫu bằng dung môi, lọc, thu hồi dung môi, hỗn hợp thu được cần làm khô vì:

- Các hợp chất ở trong hỗn hợp sẽ ổn định bền nếu chúng hiện diện ở trạng thái khô hơn là trạng thái lỏng.
- Để biết khối lượng và tính hiệu suất.
- Để tiếp tục tinh chế bằng các phương pháp khác.
- Nếu mẫu là hợp chất tinh khiết muốn đo các số liệu phổ hoặc lý tính.

a) Sấy khô bằng khí trơ trong máy cô quay chân không

Khi cô quay chân không, đến lúc mẫu đã khô hoàn toàn, cho một luồng khí trơ (N_2) đi vào máy. Nếu không có khí trơ, có thể để mẫu lâu hơn trong máy cô quay vẫn hoạt động.

b) Sấy khô nhờ bình hút ẩm

Mẫu cần làm khô được đặt trong một cốc thủy tinh, miệng cốc được đậy bằng tờ giấy lọc, cột chặt nhờ cộng thun, dùng kim nhọn để đục một số lỗ trên tờ giấy lọc. Đặt cốc thủy tinh vào bình hút ẩm, dưới đáy bình có chứa chất hút ẩm như KOH, NaOH rắn, silica gel, P_2O_5 , $CaCl_2$ khan, ... Đậy nắp bình, nắp cần được thoa đều bằng chất bôi trơn silicon để giữ bình được kín. Sử dụng ống cao su để nối vòi ra của bình vào một máy bơm hút. Mở van khóa ở vòi ra của bình, cho máy bơm hoạt động để hút không khí ra khỏi bình, đến khi trong bình là chân không. Cho máy bơm hút trong 30-60 phút tùy công suất máy. Khóa van bình hút ẩm rồi tắt máy bơm sau, rút ống cao su ra khỏi bình, để yên một đêm. Thực hiện thao tác vài lần, mẫu chất trong bình sẽ khô.



Bình hút ẩm

Cần lưu ý thay thế mới chất hút ẩm. Hợp chất được xem là khô khi cân lần sau trọng lượng của mẫu không thay đổi so với lần cân trước đó (giữa hai lần cân, mẫu được sấy).

c) Đông khô chân không (lyophilization)

Kỹ thuật này áp dụng cho mẫu là dịch chiết bằng nước, thường được dùng trong công nghiệp dược hoặc thực phẩm.

Dung dịch chiết được chứa trong một bình cầu, dung dịch này được làm đông đặc thành đá bằng cách nhúng bình cầu này vào một chậu thủy tinh kích thước lớn hơn bình cầu, chậu có chứa ethanol hoặc acetone và những viên đá CO₂ rắn. Xoay tròn đều bình cầu để thành ngoài của bình cầu tiếp xúc với lạnh. Hỗn hợp alcol-CO₂ làm dung dịch nước bên trong bình cầu hóa rắn thành đá cục. Tiếp theo, lắp bình cầu vào máy đông khô chân không. Hệ thống máy sẽ hạ nhiệt độ xuống -80°C, ở chân không sâu, kế đó nhiệt độ được nâng dần lên. Trong quá trình được nâng dần lên, nước trong bình cầu sẽ bốc hơi hết ra khỏi bình cầu. Sau khoảng 24 giờ, trong bình cầu chỉ còn chứa mẫu ở dạng khô, tơi, xốp, dễ dàng hòa tan trở lại vào nước. Dạng bột này rất dễ hút ẩm, phải được trữ trong bình kín hoặc đóng gói kín.