

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ HÓA HỌC



ThS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

**THỰC HÀNH CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP
VÀ TINH CHẾ**

BÀI 1: CHUNG CẤT LÔI CUỐN HƠI NƯỚC

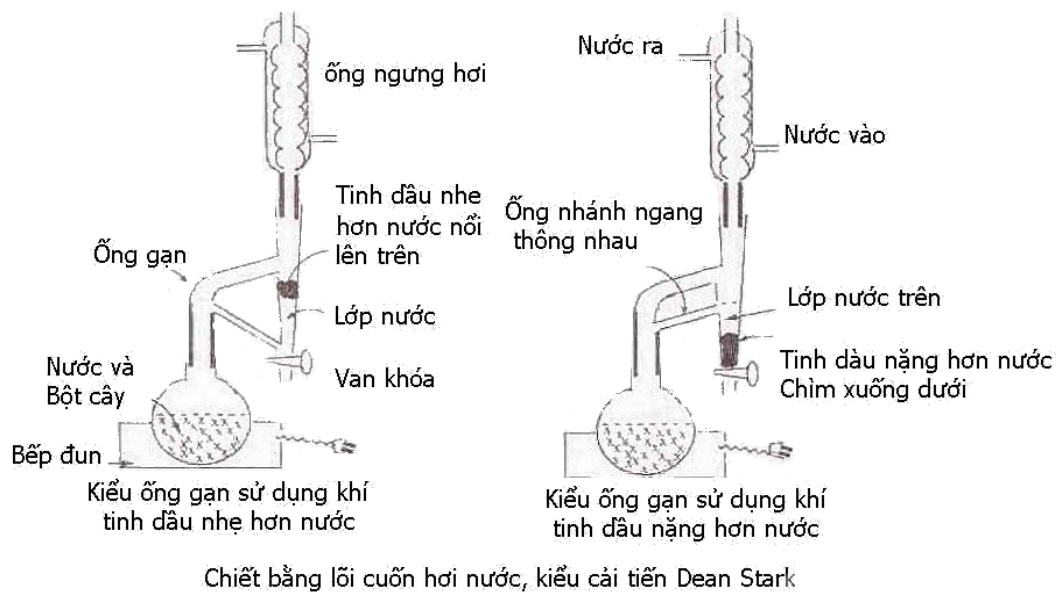
1. Lý thuyết

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.

Phương pháp chưng cất lôi cuốn tinh dầu bằng hơi nước dựa trên nguyên lý của quá trình chưng cất một hỗn hợp không tan lẫn vào nhau là nước và tinh dầu. Khi hỗn hợp được gia nhiệt, hai chất đều bay hơi. Nếu áp suất của hơi nước cộng với áp suất của tinh dầu bằng áp suất của môi trường thì hỗn hợp sôi, và tinh dầu được lấy ra cùng với hơi nước. Phương pháp này có ưu điểm giúp tránh được việc phải đun nóng hỗn hợp lên một nhiệt độ quá cao có thể phá hủy một hay nhiều cấu tử trong hỗn hợp.

a) Chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp

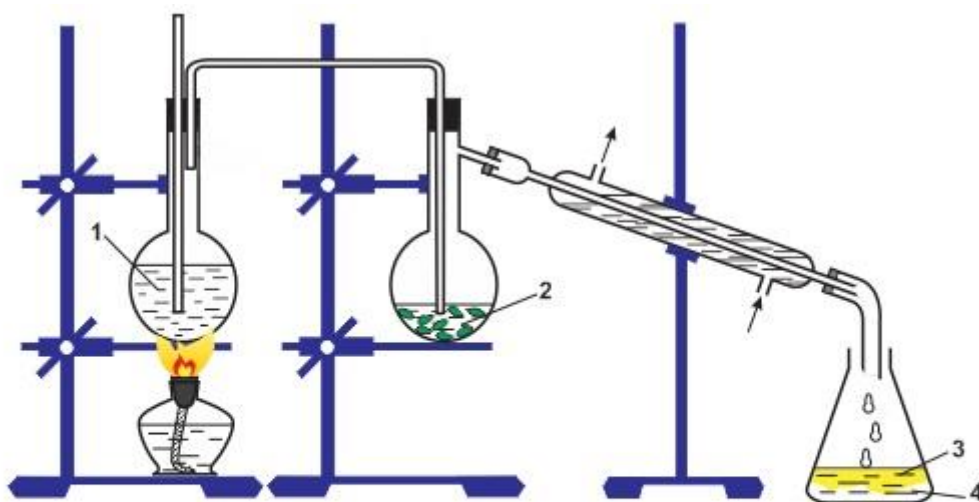
Nguyên liệu và nước được cho vào cùng một thiết bị, đun sôi, nước bay hơi sẽ lôi cuốn theo hơi tinh dầu, sau đó làm lạnh ngưng tụ hơi, ta sẽ thu được tinh dầu sau khi phân ly tách nước.



Hình 1: Chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp

b) Chưng cất lôi cuốn hơi nước gián tiếp

Sử dụng bình tạo hơi nước riêng (bình 1), bình khác chứa nước và nguyên liệu (bình 2). Khi đun sôi nước trong bình 1, hơi nước từ bình 1 sẽ đi vào bình 2 và lôi cuốn theo tinh dầu có trong nguyên liệu và sau đó bị ngưng tụ trong ống sinh hàn và được hứng vào bình hứng.



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

Hình 2: Hệ thống chưng cất lôi cuốn hơi nước gián tiếp

2. THỰC HÀNH

Trong bài này, sinh viên tiến hành trích tinh dầu từ vỏ cam hoặc vỏ bưởi bằng chưng cất lôi cuốn hơi nước. Tinh dầu vỏ cam có màu vàng đậm, mùi thơm đặc trưng của phần vỏ quả hoặc tinh dầu bưởi có màu vàng nhạt, mùi gỗ nhẹ với thành phần chính là Limonene.

a) Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ		Nguyên liệu/Hóa chất	Số lượng
Bộ chưng cất lôi cuốn hơi nước	1	Vỏ cam/vỏ bưởi	50-100g
Bếp điện đun bình cầu	1	Diethyl ether	
Dao/Kéo	1-2	Na ₂ SO ₄ khan	
Cốc thủy tinh 50ml	4	NaCl	
Phễu chiết	1		

b) Cách tiến hành

Vỏ cam rửa sạch, xay nhỏ rồi ngâm trong dung dịch NaCl 10% khoảng 3 giờ. Sau đó cho vào bình cầu, có thể thêm nước đến khoảng 2/3 thể tích bình. Lắp hệ thống chưng cất lôi cuốn hơi nước như *hình 1*. Đun sôi nước trong bình cầu. Khi nước sôi, hơi nước bay lên mang theo tinh dầu, hơi này bị ống sinh hàn làm lạnh ngưng tụ thành thể lỏng và rơi xuống ống gạn. Trong ống gạn cho sẵn một ít nước, dung dịch tách thành 2 lớp. Khi lượng nước trong ống gạn tăng lên, nó sẽ được trả về bình cầu nhờ ống ngang thông nhau.

Sau khoảng 2 giờ từ khi nước sôi, ngừng chưng cất, mở khóa thu hỗn hợp tinh dầu và nước vào cốc 50ml.

Cho hỗn hợp tinh dầu – nước vào phễu chiết, thêm 15ml diethyl ether, lắc phễu chiết, đặt phễu chiết vào giá, mở nút và đợi đến khi hai lớp chất lỏng tách lớp. Lớp trên là ether chứa tinh dầu. Lớp dưới là nước. Mở khóa thu pha nước và dung dịch ether riêng ra hai cốc. Phần pha nước tiếp tục trích với diethyl ether để lấy hết tinh dầu còn lại. Gộp chung 2 lần trích, cho một ít Na_2SO_4 khan vào dung dịch, lọc thu được dung dịch trong. Cô quay hoặc đun cách thủy để loại dung môi. Sau khi bay hết dung môi, để nguội rồi đóng thể tích hoặc cân khối lượng.

Nội dung báo cáo

1. Màu sắc, khối lượng tinh dầu thu được?
2. Tại sao khi cho hỗn hợp tinh dầu – nước vào phễu chiết rồi cho thêm dung môi diethyl ether, lớp ether nằm trên, còn nước nằm ở dưới?
3. Mục đích sử dụng Na_2SO_4 ?

BÀI 2: SẮC KÝ LỚP MỎNG VÀ SẮC KÝ CỘT

1. Lý thuyết

a) Sắc ký lớp mỏng

Sắc ký lớp mỏng là một kỹ thuật chỉ cần sử dụng một lượng nhỏ mẫu chất (10^{-7}g) để tách nhanh định tính một hợp chất. Sắc ký lớp mỏng là kỹ thuật phân bố rắn – lỏng trong đó, pha lỏng di động được cho đi lên một lớp mỏng chất hấp phụ, chất này được tráng phủ lên một nền là một tấm kính, một bản nhôm hay một miếng plastic. Do chất hấp phụ được tráng thành một lớp mỏng nên có tên gọi là tấm bản mỏng.

Bản mỏng được chuẩn bị sẵn là loại bản có thể tự tráng hoặc mua trên thị trường, sau đó chấm mẫu phân tích (mẫu đã được hòa tan trong một dung môi dễ bay hơi thích hợp) lên bản mỏng, chấm thành vết nhỏ gọn, sấy nhẹ để đuổi phân dung môi hòa tan mẫu. Khi đó, mẫu chất chỉ còn lại bột khô trên tấm bản mỏng. Đặt tấm bản mỏng theo chiều thẳng đứng trong bình có chứa sẵn dung môi phù hợp. Do tác dụng của lực mao quản, dung môi thấm theo bản mỏng qua điểm xuất phát. Sau đó, các vết sẽ được xác định bằng phương pháp vật lý (nhìn bằng mắt, soi dưới đèn tử ngoại,...) hoặc bằng phương pháp hóa học (sử dụng thuốc thử). Một chất tinh khiết chỉ cho một vết tròn có giá trị R_f không đổi trong một dung môi xác định.

$$R_f = \frac{\text{Đoạn đường di chuyển của chất}}{\text{Đoạn đường di chuyển của dung môi}}$$

b) Sắc ký cột

Sắc ký cột là một phương pháp hiện đại để tách các cấu tử hóa học ra khỏi hỗn hợp của chúng. Đối với mỗi chất riêng biệt trong pha hỗn hợp cần tách, tùy theo khả năng hấp phụ và khả năng hòa tan hòa 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.

Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tách gồm:

- Lựa chọn chất hấp phụ
- Lựa chọn dung môi giải ly
- Kích thước cột, khối lượng chất hấp phụ, lượng mẫu dùng.
- Vận tốc giải ly.

Cột được rửa sạch, sấy khô. Cột là một ống thủy tinh có khóa, cột được giữ cố định thẳng đứng, phía dưới có một bình hứng, dưới đáy cột được lót một lớp bông gòn. Sau đó tiến

hành nhồi cột (nhồi ướt hoặc nhồi khô). Khi cho chất hấp phụ hết vào cột, tiếp tục cho dung môi chảy ngang qua chất hấp phụ liên tục trong một thời gian để giúp cho việc nạp cột được chặt chẽ. Sau khi cột đã ổn định cho mẫu chất cần phân tích vào cột. Mở khóa cột hạ mực dung môi đến sát mức chất hấp phụ đang có trong cột, dùng ống nhỏ giọt cho mẫu vào đầu cột, mở khóa cho dung dịch mẫu thấm xuống bề mặt chất hấp phụ. Cho một lớp bông gòn đặt nhẹ lên mặt thoáng của chất hấp phụ và bắt đầu tiến hành cho dung môi giải ly.

2. Thực hành

a) Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ		Hóa chất	
Cột sắc ký	1	Acetone	
Cốc thủy tinh 250 ml	2	Ether dầu hỏa	
Cốc thủy tinh 100 ml	2	Silica gel	
Cối chà	1		
Phễu thủy tinh	1		
Phễu chiết	1		
Cối chà	1		
Ống nghiệm	15		
Đũa thủy tinh	1		
Bếp điện	1		
Cốc thủy tinh dùng giải ly bản mỏng	1		
Bản mỏng silica gel			
Ống vi quản			
Kiểm thủy tinh	1		
Ống đong 10 ml	1		

b) Cách tiến hành

❖ Chuẩn bị dịch sắc tố màu của lá cây

Cho lá cây đã rửa sạch, lau thật khô, cắt nhỏ vào cối rồi dùng chày nghiền nát. Chuyển lá cây đã giã nát vào cốc 100 ml có chứa sẵn 30 ml hỗn hợp gồm 18 ml ether dầu và 12 ml acetone, lắc đều trong 10 phút, rồi lọc lấy dịch trích, cho vào một cốc khác bằng phễu và giấy lọc. Rửa bã nằm trên phễu bằng 5 ml hỗn hợp trên.

Cho dịch trích vào phễu chiết, rửa bằng 20 ml nước, tách riêng lớp hữu cơ (lớp trên) cho vào một cốc thủy tinh khác, làm khan bằng Na_2SO_4 , gạn lấy dung dịch. Đun cách thủy dung dịch này để loại bớt dung môi, sẽ thu được dung dịch sắc tố đậm đặc.

❖ Chuẩn bị cột sắc ký và chọn dung môi giải ly

Dùng đũa thủy tinh dài để nhồi một lớp bông gòn dày khoảng 1-2mm vào dưới đáy cột, không nhồi quá chặt. ráp cột sắc ký thẳng đứng vào giá nhờ cây kẹp, thêm dung môi ether dầu hỏa cho đầy cột.

Cho 15ml dung môi ether dầu hỏa vào một cốc thủy tinh 100ml, thêm từ từ 10g silica gel và khuấy đều để thấm ướt hết silica gel. Cho từ từ silica gel vào cột sắc ký, vừa gõ đều cột và mở khóa kho dung môi chảy ra từng giọt. Lưu ý dung môi luôn ngập trên silica gel. Sau khi cho hết silica gel, vẫn mở khóa để dung môi chảy ra, hứng dung môi để sử dụng cho đoạn tiếp theo.

Cắt bản mỏng thành những bản nhỏ có kích thước 2x10 cm. Dùng bút chì vạch mức xuất phát cách mép dưới 1 cm và mức tiền tuyến dung môi cách mép trên 0.5 cm.

STT	Dung môi giải ly	Tỉ lệ
1	Ether dầu hỏa	100%
2	Ether dầu hỏa : acetone	90:10
3	Ether dầu hỏa : acetone	70:30

Cho mỗi dung môi giải ly vào các ly thủy tinh khác nhau (đã có sẵn giấy lọc), đậy miếng kiếng thủy tinh để dung môi bão hòa.

Chấm mẫu lên bản mỏng và tiến hành giải ly, chọn dung môi phù hợp để tiến hành sắc ký cột.

❖ Nạp mẫu vào cột sắc ký

Khi dung môi trong cột nằm trên lớp silica gel còn khoảng 1 mm thì khóa cột lại. Dùng ống nhỏ giọt để đưa mẫu vào đầu cột sắc ký. Từ từ mở khóa cột để cho dung dịch mẫu thấm xuống bề mặt silica gel trên đầu cột, lúc thấy dung dịch đã xuống gần lớp silica gel thì khóa cột lại, tiếp tục nạp cho mẫu vào đầu cột (lưu ý giữ lại một ít mẫu để chấm sắc ký lớp mỏng).

Mở khóa để hạ mực dung dịch mẫu xuống sát mặt thoáng chất hấp phụ, đóng khóa lại. Dùng ống nhỏ giọt cho một lượng nhỏ dung môi hoặc hệ dung môi chọn để sắc ký cột vào đầu cột, mở khóa để dịch màu tiếp tục thấm xuống silica gel. Đến khi thấy dịch chất màu đã gắn chặt vào silica gel ở phần đầu cột. Liên tục cho dung môi vào để giải ly. Sắc tố sẽ di chuyển ra khỏi cột và được hứng vào các ống nghiệm.

Tiến hành sắc ký lớp mỏng ống nghiệm chứa sắc tố màu và dung dịch mẫu trước khi chạy cột trên cùng một bản mỏng để so sánh.

Nội dung báo cáo

1. Cho biết dung môi hoặc hệ dung môi lựa chọn để tiến hành sắc ký cột. Nêu hiện tượng quan sát được trong quá trình chạy cột?
2. Cho biết màu sắc, hình dạng vết và giá trị R_f của các chất có trong mẫu.

BÀI 3: CHIẾT TÁCH VÀ TINH CHẾ ROUTIN

1. Lý thuyết

a) Kỹ thuật chiết tách

Phương pháp chiết là phương pháp tách chất từ hỗn hợp bằng dung môi thích hợp. Có các phương pháp chiết sau. Có thể chiết từ hỗn hợp dung dịch hay từ chất rắn. Tùy theo bản chất của chất bị chiết và môi trường chúng đang tồn tại để chọn dung môi chiết cho thích hợp, nghĩa là dung môi đó chỉ hòa tan hoặc hòa tan nhiều chất định chiết mà không hòa tan hay ít hòa tan các chất khác trong hỗn hợp. Quá trình chiết kết thúc khi đã chiết hết chất cần chiết. Điều này có thể kiểm tra bằng màu hay sắc ký.

❖ Chiết rắn – lỏng

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. Thường chất rắn được chiết liên tục trên máy chiết Soxhlet. Nguyên tắc như sau: đun nóng dung môi trong bình cầu cho hơi dung môi đi lên bình chiết chứa chất qua ống sinh hàn ngược rồi ngưng tụ chảy trở lại vào bình chiết. Dung môi lựa chọn là phải hòa tan chất nghiên cứu hoặc phải hòa tan chất phụ rồi qua ống nhánh chảy trở lại bình cầu. Nếu dung môi hòa tan chất phụ thì chất hữu cơ nghiên cứu còn lại trên bình chiết, còn nếu dung môi hòa tan chất nghiên cứu thì thu được chất hữu cơ trong bình cầu và chất nghiên cứu được tách ra khỏi dung môi bằng các phương pháp khác.

❖ Chiết lỏng – lỏng

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. Chiết chất hữu cơ từ dung dịch là lắc dung dịch đó với dung môi thích hợp không trộn lẫn với dung môi cũ và có khả năng hòa tan tốt chất cần chiết hơn dung môi cũ. Trong trường hợp chất cần chiết tan trong dung môi cũ 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.

❖ 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.

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.

b) Kỹ thuật tinh chế

❖ **Phương pháp kết tinh:** Kết tinh là quá trình hình thành và phát triển của tinh thể từ trạng nóng chảy, dung dịch hay khí. Phương pháp kết tinh lại là phương pháp tinh chế quan trọng dựa trên tính bão hòa của chất rắn cần tinh chế khi đun nóng trong dung môi thích hợp, loại bỏ chất phụ và chất kết tinh trở lại khi làm lạnh. 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.

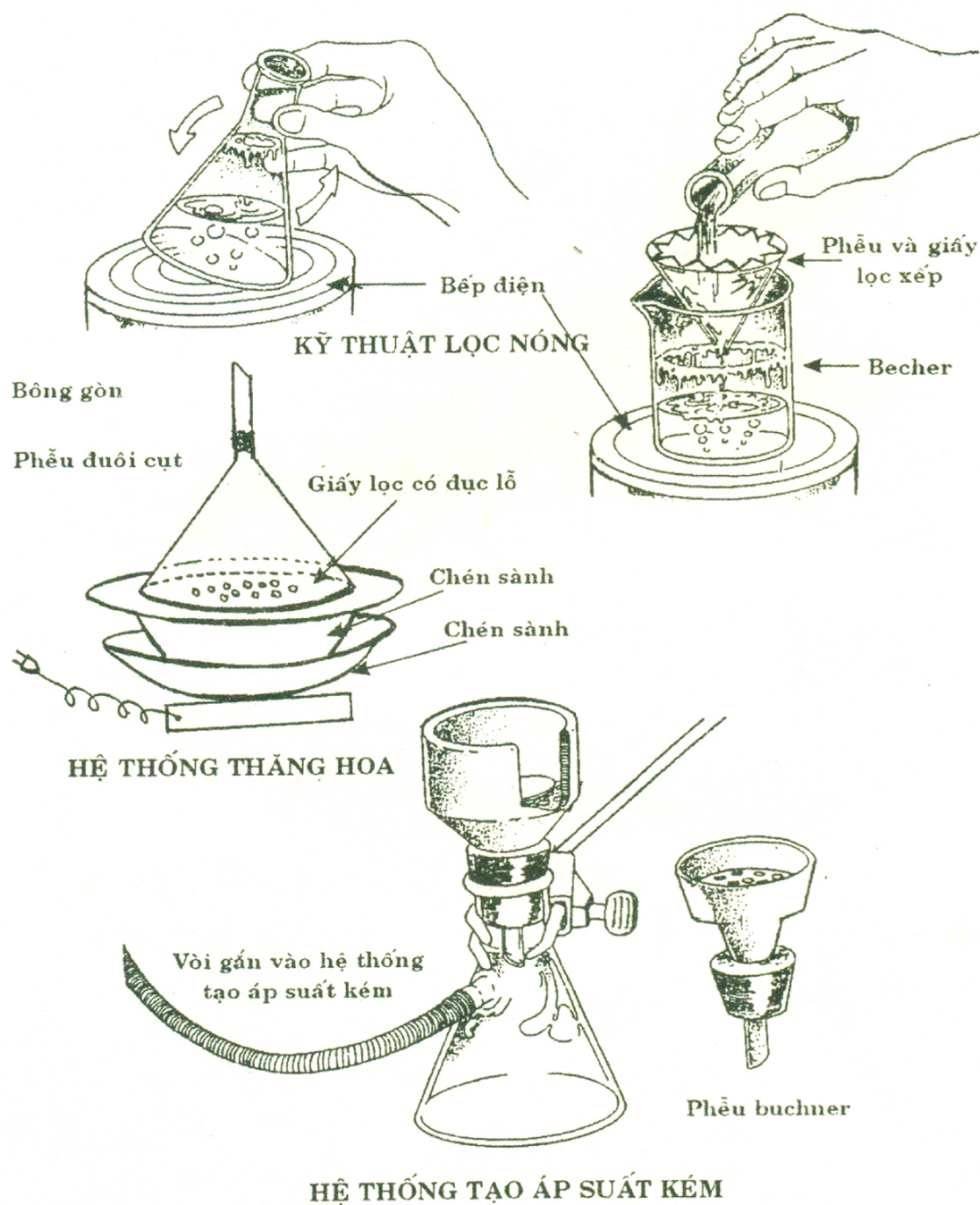
Quy trình này có thể làm lại nhiều lần để thu được chất tinh khiết.

❖ **Phương pháp 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.

Phương pháp tiến hành thăng hoa ở áp suất thường:

Với dụng cụ đơn giản lượng nhỏ là cho 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 đáy cuốn phễu bằng một ít bông. Sau đó đun nóng bát sứ trên ngọn lửa đèn cồn hay trên bếp điện qua lưới amiant hay trên bếp cách cát một cách cẩn thận vì nếu đun nóng quá sẽ phân hủy chất thăng hoa.



❖ 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.

2. Thực hành

a) Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ		Nguyên liệu/Hóa chất	
Bộ chiết Soxhlet	1	Nụ hoa hòe	50-100g
Cốc thủy tinh 250 ml	2	Cồn 90°	
Cốc thủy tinh 100 ml	2	Ether dầu hỏa	
Phễu Buchner	1		
Bình fiol	1		
Đũa thủy tinh	1		
Phễu thủy tinh	1		
Giấy lọc			

b) Cách tiến hành

Cân 50g hoa hòe sấy khô vào ống chứa mẫu của bộ chiết Soxhlet. Cho 250 ml ethanol vào bình cầu. Chiết trong 2-3 giờ. Lọc nóng lấy dịch chiết. Cho quay thu hồi dung môi. Cao chiết được hoà tan vào ethanol nóng. Để nguội đến nhiệt độ phòng, để dung dịch bắt đầu kết tinh. Lọc qua Buchner, sản phẩm thô được rửa bằng ether dầu hỏa đến khi nước rửa không còn màu xanh thì dừng lại.

Cân một lượng cụ thể rutin thô thu được ở trên.

Cho rutin thô vào cốc thủy tinh, thêm một lượng tối thiểu nước, rồi đun trên bếp cách cát hoặc dùng lưới amiant, dùng đũa thủy tinh khuấy đều để cho chất hòa tan hết. Nếu nước đã nóng mà chất chưa hòa tan hết, tiếp tục cho thêm một lượng nhỏ ethanol vào, đun sôi và khuấy đều cho tan hết.

Sau khi chất hòa tan hết, tiến hành lọc nóng từ từ qua cốc thứ 2 (đã chứa sẵn một ít nước và đặt sẵn trên bếp) bằng phễu thủy tinh có chứa giấy lọc (đã được thấm ướt nước nóng). Nếu dung dịch nguội từ từ, chất rắn sẽ kết tinh với tinh thể lớn, nếu làm nguội nhanh, tinh thể sẽ nhỏ. Trong lúc chờ kết tinh, không nên dùng đũa thủy tinh khuấy trộn dung dịch

sẽ làm gãy vụn tinh thể. Trong trường hợp có sự kết tinh chậm, khơi mào kết tinh bằng cách dùng đũa thủy tinh cọ nhẹ vào bên trong thành cốc, ngay mặt thoáng của dung dịch.

Sau khi lọc xong, để yên cho nguội dần, sản phẩm sẽ kết tinh. Sau khi chất rắn kết tinh hoàn toàn, lọc chất rắn bằng cách lọc ở áp suất kém. Hệ thống gồm một hệ thống tạo áp suất kém có sẵn trong phòng thực hành, một bình lọc có vòi (bình fiol), một phễu Buchner, trong phễu này có đặt một miếng giấy lọc cắt vừa vặn sao cho tờ giấy lọc đặt vừa khít, lọt lòng ở dưới đáy phễu. Khi lọc, ráp hệ thống như hình vẽ, mở hệ thống tạo áp suất kém, thấm ướt tờ giấy lọc bằng một ít dung môi để cho tờ giấy lọc được hút sát vào đáy phễu, rồi mới rót chất trong cốc vào phễu. Cân và tính hiệu suất.

Nội dung báo cáo

1. Khối lượng rutin thô và rutin sau khi kết tinh lại. Tính hiệu suất quá trình kết tinh.
2. Mô tả hiện tượng quan sát được khi kết tinh lại rutin. So sánh màu sắc của rutin thô và rutin sau khi kết tinh lại? Cho biết công thức hóa học của rutin.
3. Có thể kết tinh lại rutin trong ethanol thay vì nước được hay không? Giải thích.