

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ

- **Sắc ký cột**
- **Sắc ký lớp mỏng**
- **Sắc ký trao đổi ion**
- **Sắc ký lọc gel**
- **Sắc ký khí**
- **Sắc ký lỏng hiệu năng cao**

- 1906 – Mikhail Tswett : **sắc ký**, công trình của Tswett là ví dụ của **sắc ký lỏng hấp phụ trên cột**
- 1938 – Izmailov và Schraiber xây dựng và 1958 – Stahl hoàn thiện phương pháp **sắc ký lớp mỏng**
- 1941 – A.J.P. Martin và R.L.M. Synge đặt nền tảng cho **sắc ký phân bố: sắc ký giấy và sắc ký khí**
- 1960 -1970: **sắc ký lỏng hiệu năng cao** được xây dựng và phát triển
- 1937 – 1972: có **12 giải thưởng Nobel** cho những công trình khoa học trong đó sắc ký là nội dung chủ yếu

★ Định nghĩa: sắc ký là quá trình tách liên tục từng vi phân hỗn hợp các chất do sự phân bố không đồng đều của chúng giữa pha tĩnh và pha động khi cho pha động đi xuyên qua pha tĩnh

❖ Định nghĩa của IUPAC (1993)



Đặc điểm chung của PPSK: là quá trình tách dựa trên sự chuyển dịch của hỗn hợp phân tích qua lớp chất bất động ở trạng thái rắn hay trạng thái lỏng tẩm trên chất mang rắn (pha tĩnh) và sự chuyển dịch đó được thực hiện bằng một chất lỏng / chất khí có khả năng di chuyển (pha động)

★ Nguyên lý tách:

- Mẫu phân tích được hòa tan trong một pha động
- Pha động được cho qua pha tĩnh một cách liên tục và không hòa lẫn với pha tĩnh
- Pha tĩnh được cố định trong cột hay trên bề mặt chất rắn
- Các chất tan là thành phần của mẫu sẽ di chuyển qua cột theo pha động với tốc độ khác nhau tùy thuộc vào tương tác giữa pha tĩnh – pha động – chất tan
- Nhờ tốc độ di chuyển khác nhau các thành phần của mẫu sẽ tách riêng biệt thành dải, làm cơ sở cho phân tích định tính và định lượng



Phân loại sắc ký:

– Dựa vào phương tiện tách:

- sắc ký cột (*column chromatography*)
- sắc ký phẳng (*planar chromatography*)

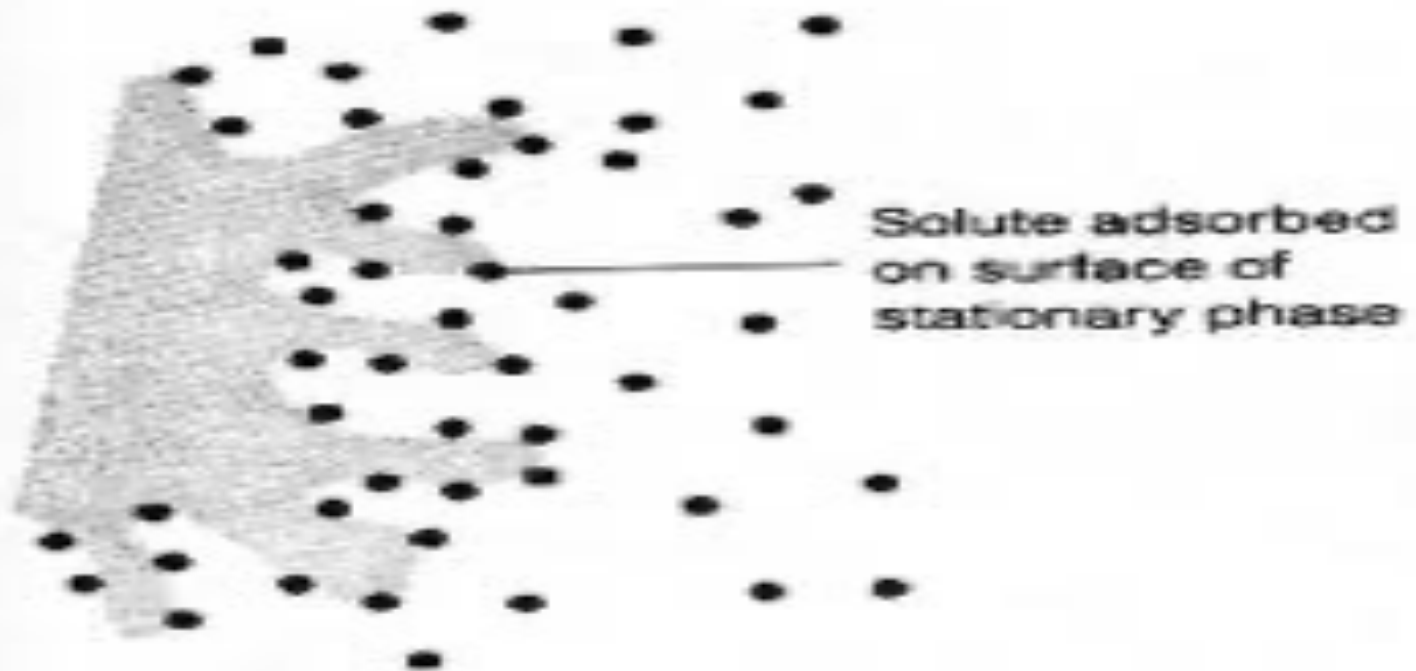
– Dựa vào pha động, pha tĩnh và cân bằng chuyển chất giữa các pha:

- sắc ký khí (GC)
- sắc ký lỏng (LC)
- sắc ký lưu chất siêu tới hạn (SFC)

– Dựa theo cơ chế của quá trình tách:

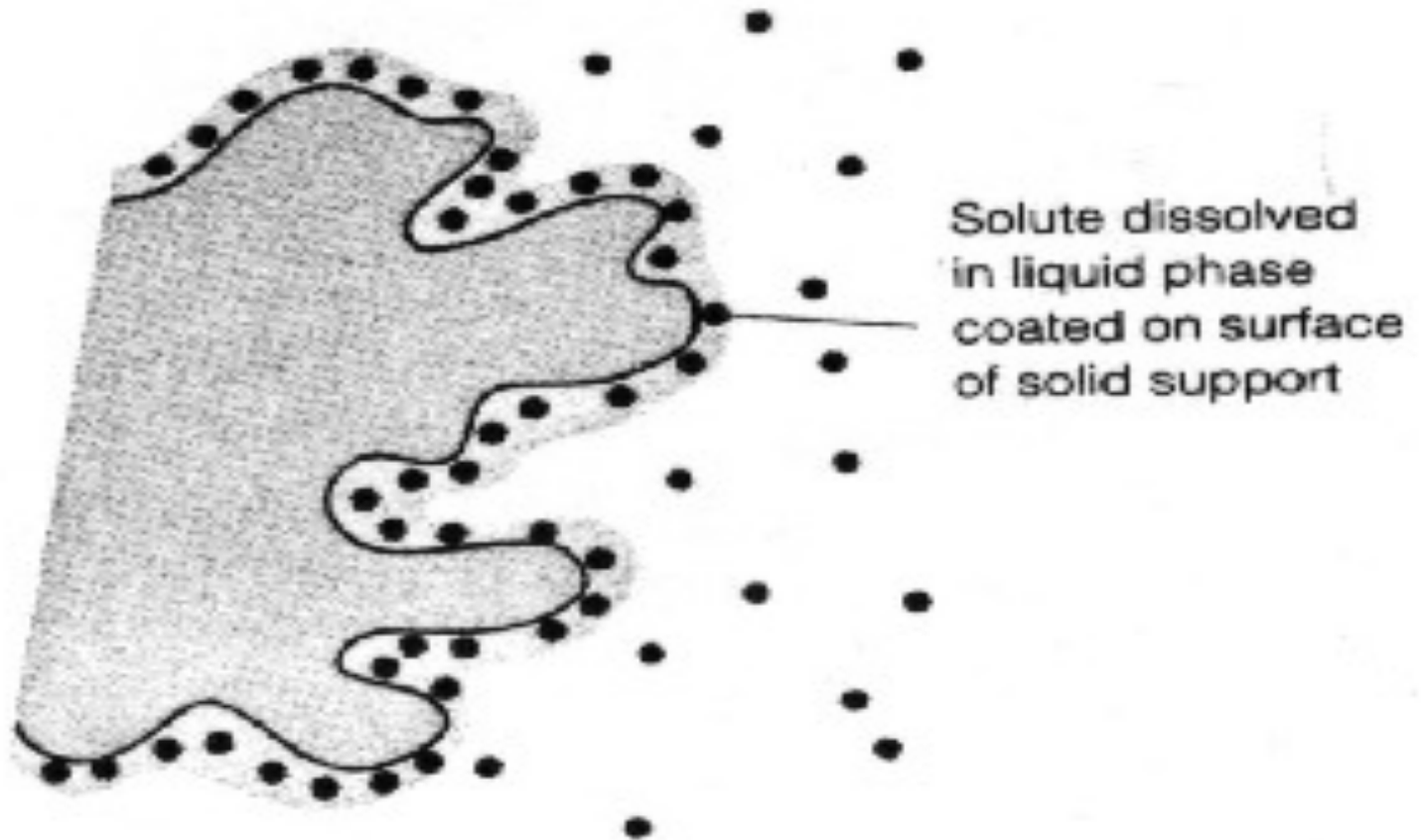
- **Sắc ký hấp phụ:** là quá trình tách do ái lực khác nhau của các chất tan đối với chất hấp phụ rắn (pha tĩnh).

Đối với
đó ch



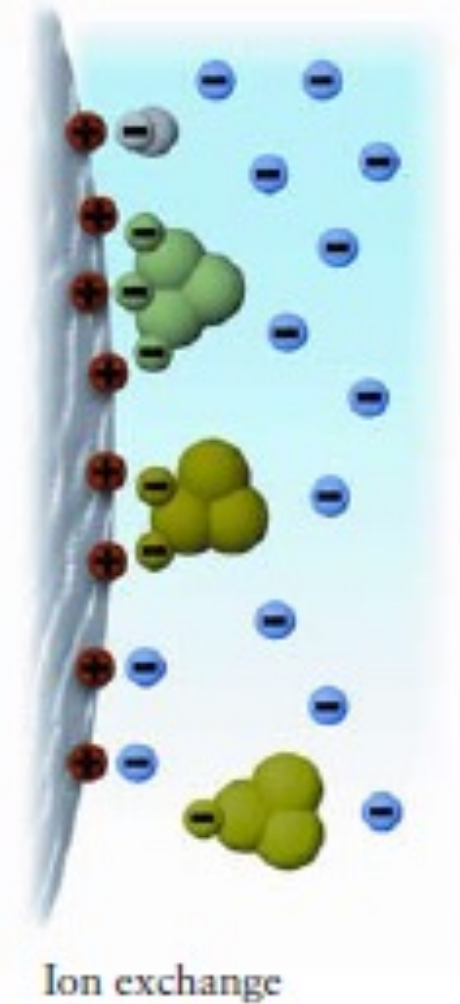
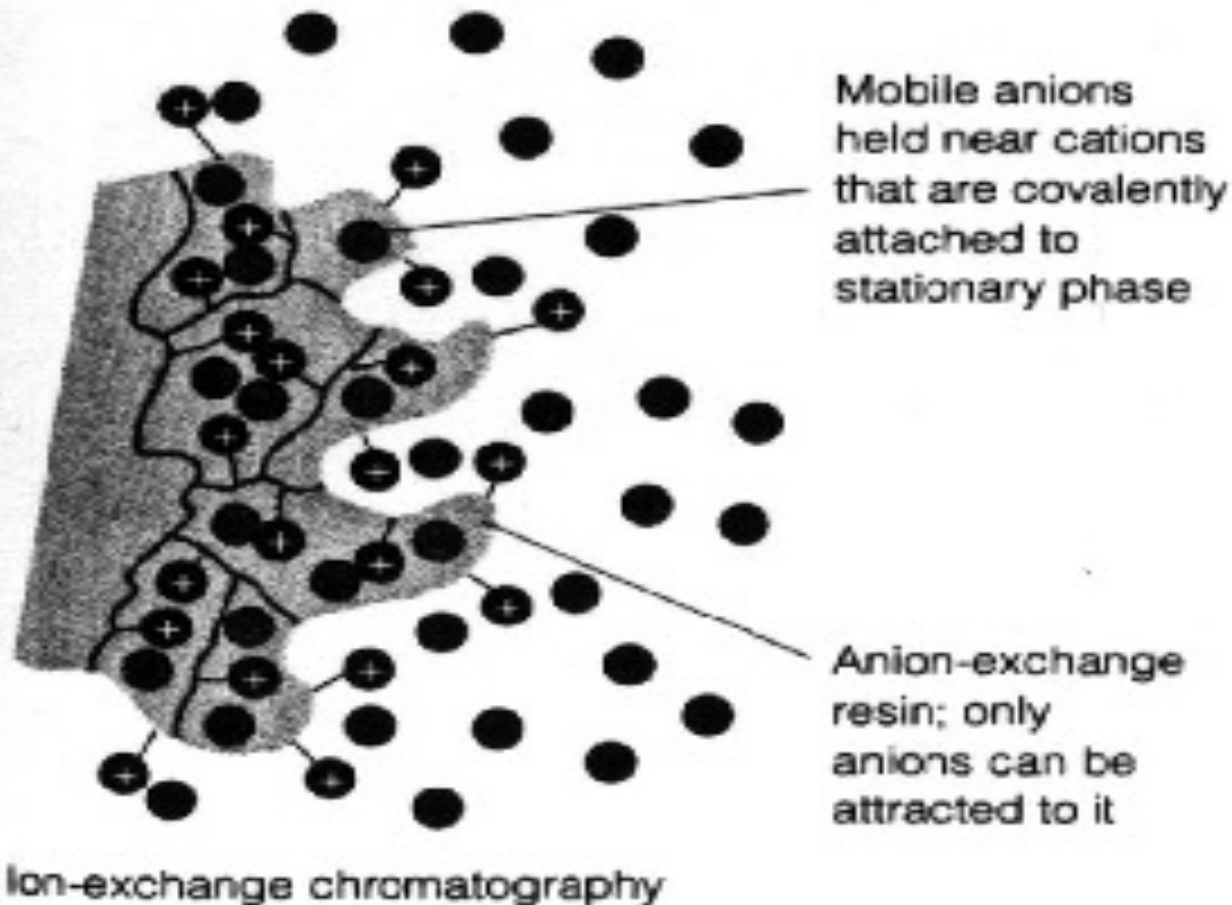
Adsorption chromatography

➤ **Sắc ký phân bố:** dựa trên tính tan khác nhau hay sự phân bố khác nhau của các chất



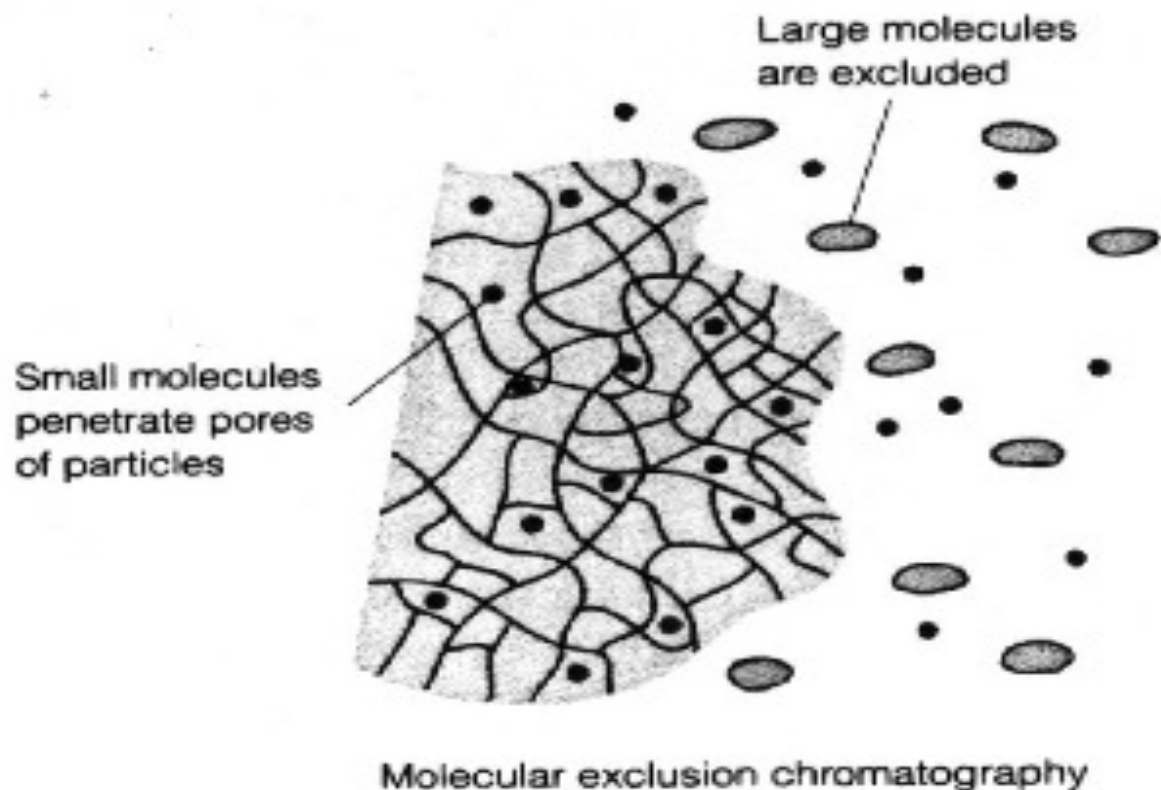
Partition chromatography

➤ **Sắc ký trao đổi ion** : là quá trình tách do ái lực khác nhau của các ion trong dung dịch đối với các trung tâm trao đổi ion trên pha tĩnh dạng rắn

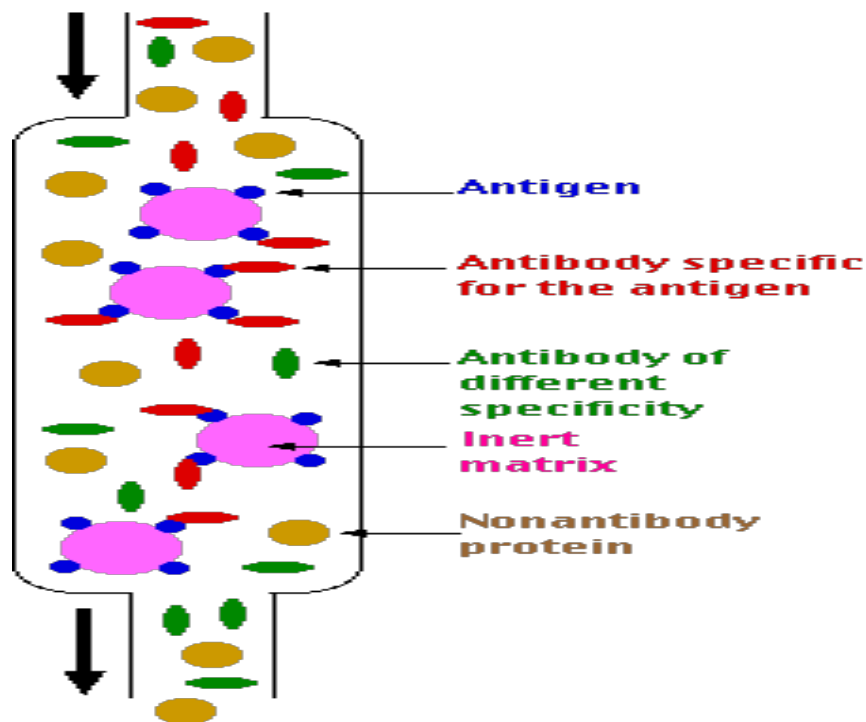


- **Sắc ký rây phân tử (sắc ký gel):**

sử dụng các vật liệu rắn có độ xốp lớn và các lỗ với kích thước xác định để rây chọn lọc các cấu tử tùy theo kích thước và hình dạng phân tử



➤ **Sắc ký ái lực:** dựa vào tương tác đặc hiệu giữa một loại phân tử chất tan với một phân tử hai liên kết cộng hóa trị pha tĩnh. Đây là một kiểu sắc ký mới và có tính chọn lọc cao



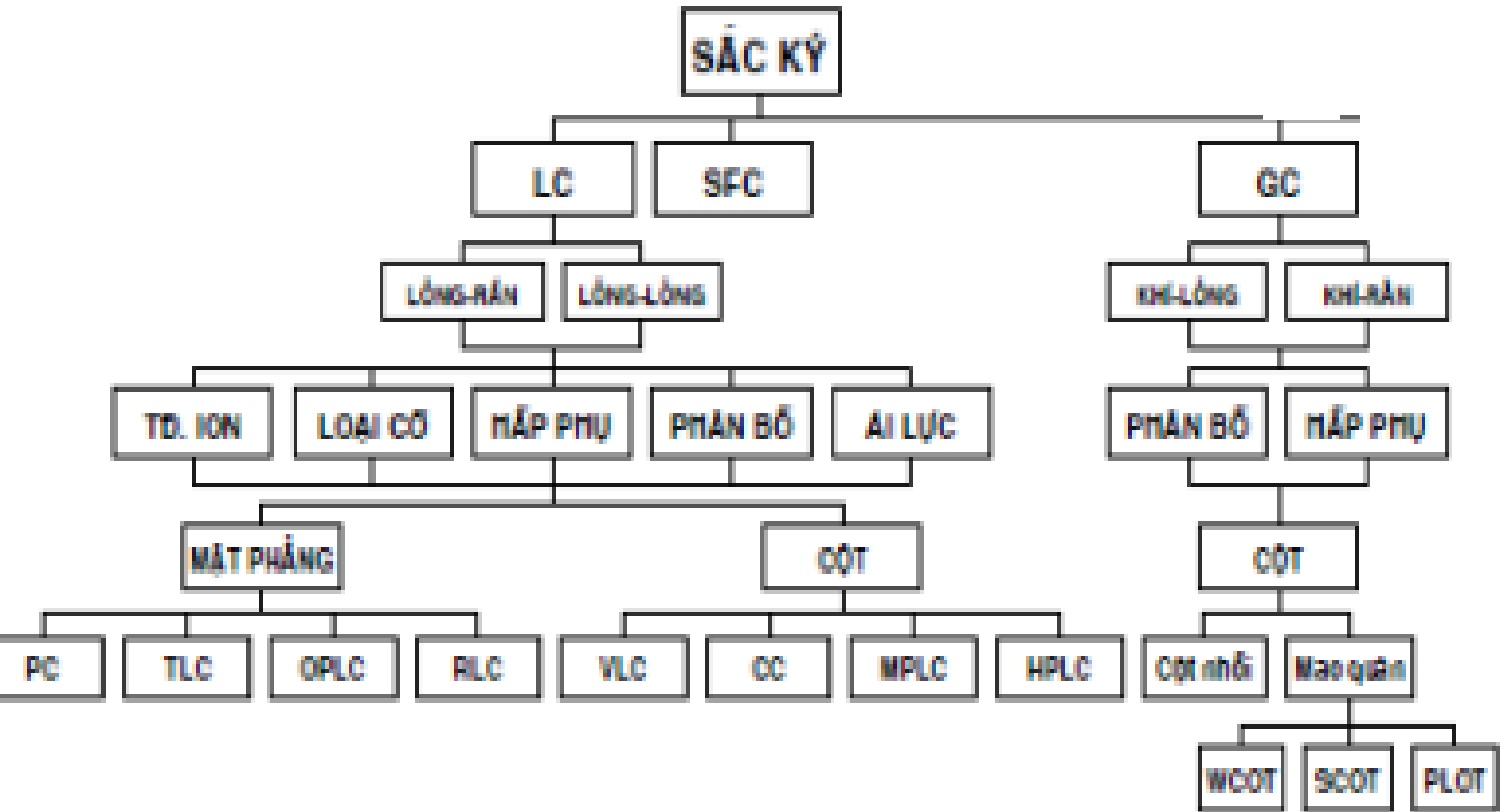
○ Dựa theo kỹ thuật tách sắc ký:

- PP tiên lưu
- PP đẩy
- PP rửa giải

○ Dựa theo mức độ phức tạp của PPSK:

- PPSK đơn giản
- PPSK hiện đại

PHÂN LOẠI CÁC PHƯƠNG PHÁP SẮC KỸ

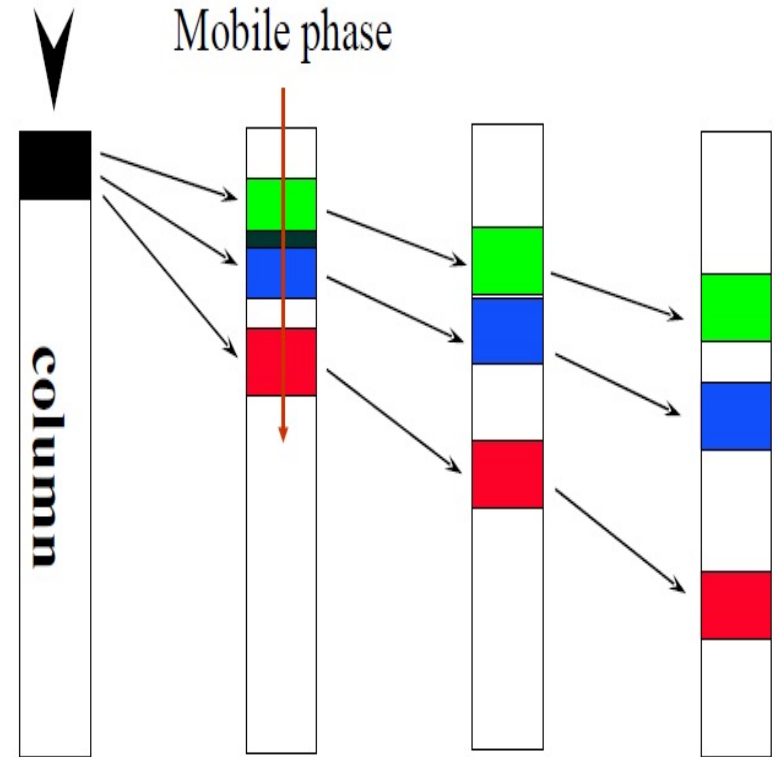




Một số khái niệm

–Sắc đồ: quá trình tách sắc ký làm cho các cấu tử được tách thành các vùng riêng biệt có màu hay không màu trên cột hay trên mặt phẳng. Những vùng riêng biệt đó được gọi là sắc đồ

mixed sample



Injector

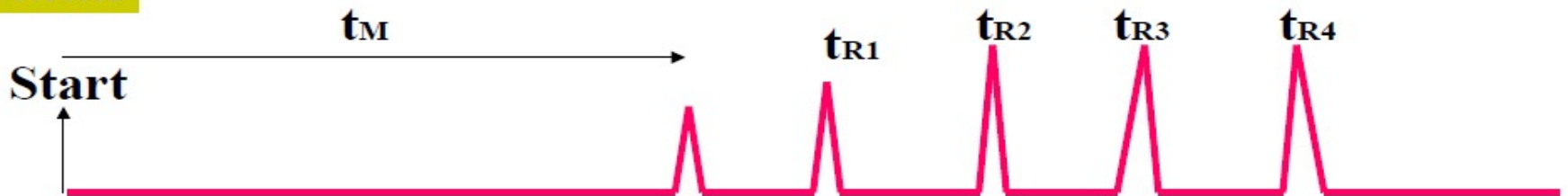


Column

Mobile phase

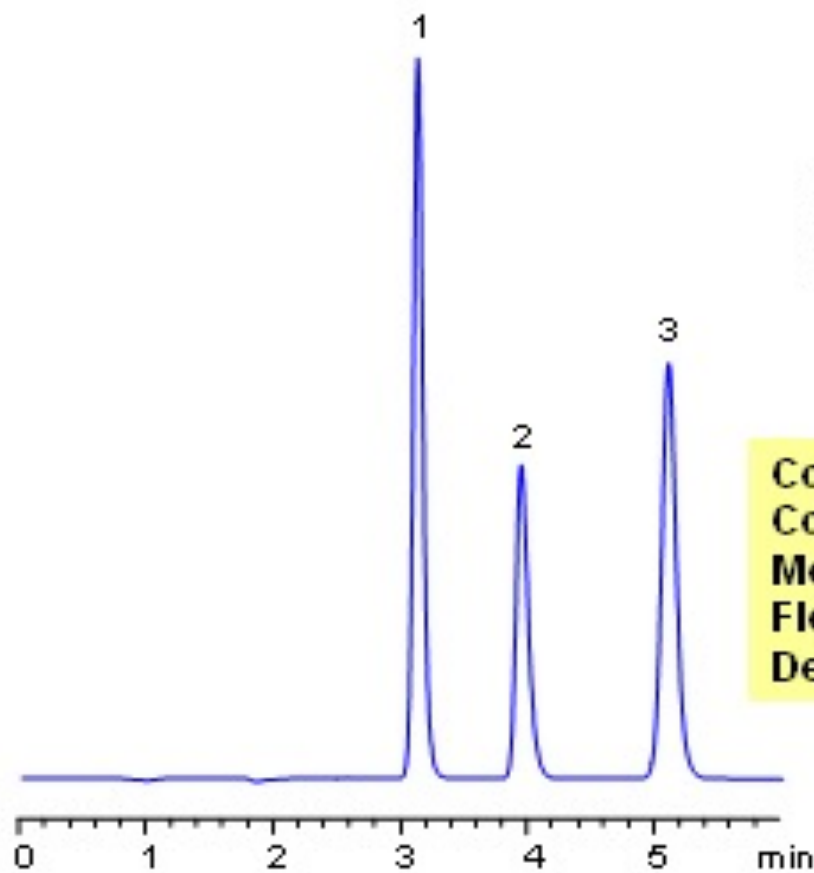
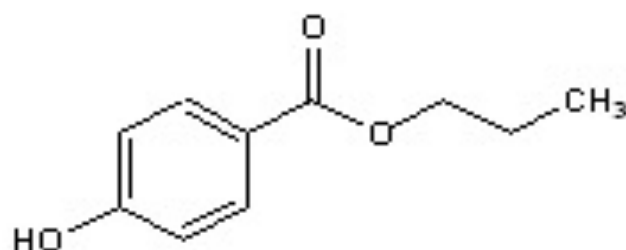
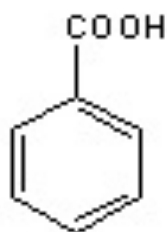
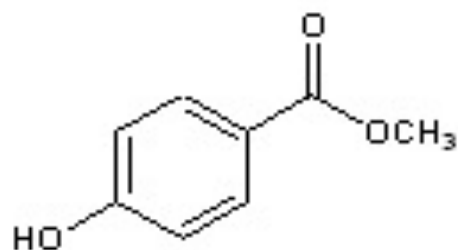
Detector

○ Sắc phổ: trong quá trình tách bằng sắc ký, nếu bằng một cách nào đó ghi được sự phân bố nồng độ các cấu tử dọc theo cột hoặc trên mặt phẳng, ta thu được một đường cong gọi là sắc phổ



- Sắc ký đồ: trong PPSK cột, đường biểu diễn sự phụ thuộc của nồng độ chất đi ra khỏi cột sắc ký theo thể tích dung môi rửa giải hay thời gian rửa giải được gọi là sắc ký đồ
 - Sắc ký đồ tích phân: là sắc ký đồ mà trục hoành biểu diễn V dung môi rửa giải hay t rửa giải, còn trục tung biểu diễn tổng C chất đã đi ra khỏi cột
 - Sắc ký đồ vi phân: trục tung biểu diễn C chất trong từng phân đoạn dung dịch giải hấp

o Peak sắc ký



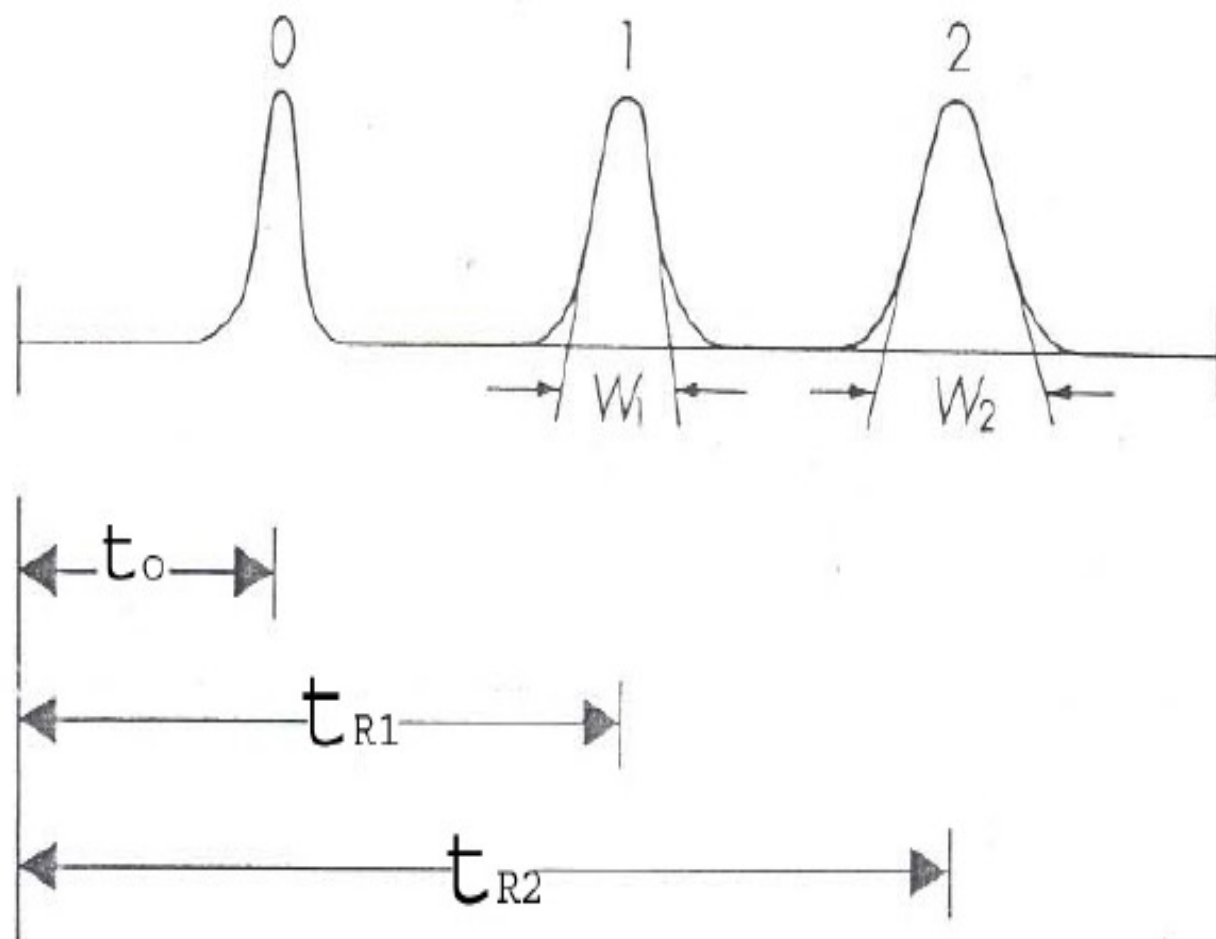
1. Methyl paraben
2. Benzoic Acid
3. Propyl paraben

Column:	Primesep B2
Column size:	150 x 4.6 mm
Mobile phase:	MeCN -40%, H ₃ PO ₄ -0.1%
Flow rate:	1.0 mL/min
Detection:	UV 210 nm

★ Các đại lượng cơ bản của sắc ký:

- Hệ số phân bố
- Thời gian lưu giữ
- Hệ số chứa
- Hệ số chọn lọc
- Hiệu năng của cột sắc ký
- Độ phân giải của cột

- *Hệ số dung lượng k' (Capacity factor)*



Minh họa các thông số sắc ký

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.20)$$

Ở đây:

K : hệ số phân bố

V_s : thể tích pha tĩnh

V_m : thể tích pha động

Q_s : lượng chất trong pha tĩnh

Q_m : lượng chất trong pha động

t_R : thời gian lưu

t'_R : thời gian lưu hiệu chỉnh

t_0 : thời gian chết

Cần chọn cột, pha động ... sao cho k' nằm trong khoảng tối ưu : $1 \leq k' \leq 8$.

- Hệ số chọn lọc α :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{RB}}{t_{RA}} \quad (3.21)$$

Qui ước ở đây B là chất bị lưu giữ mạnh hơn A nên $\alpha > 1$

Để tách riêng 2 chất thường chọn $\mathbf{1,05 \leq \alpha \leq 2,0}$

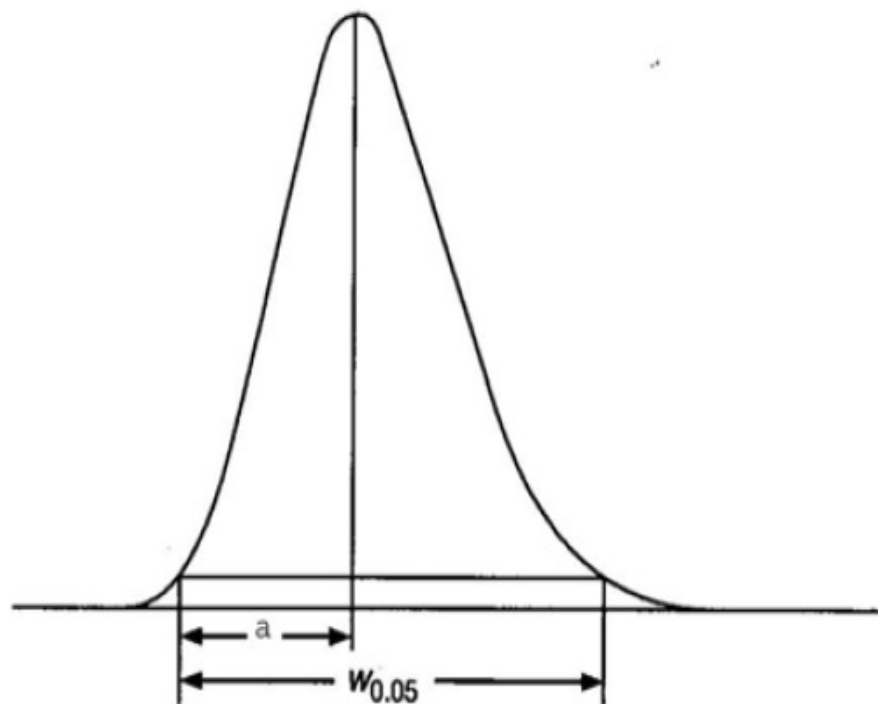
- Hệ số đối xứng của pic F :

$$F = \frac{W}{2a} \quad (3.22)$$

Ở đây:

W : Chiều rộng pic đo ở 1/20 chiều cao pic,

a : Khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ đỉnh pic đến mép đường cong phía trước tại vị trí 1/20 chiều cao pic.



Xác định hệ số đối xứng

- *Số đĩa lý thuyết và hiệu lực cột N:*

Hiệu lực cột được đo bằng thông số: Số đĩa lý thuyết N của cột

$$N = 16 \frac{t_R^2}{W^2} = 5,54 \frac{t_R^2}{W_{1/2}^2} \quad (3.23)$$

Ở đây:

W: Chiều rộng đo ở đáy pic,

$W_{1/2}$: Chiều rộng pic đo ở nửa chiều cao pic.

- Độ phân giải R_s :

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_B + W_A} = \frac{1,18(t_{RB} - t_{RA})}{W_{1/2B} + W_{1/2A}} \quad 3.24$$

Với:

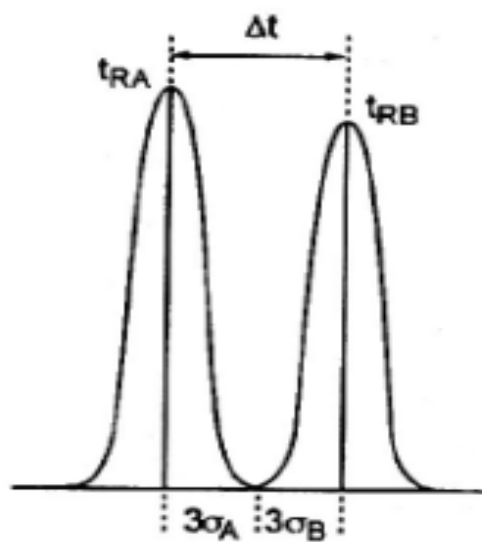
t_{RB}, t_{RA} : Thời gian lưu của 2 pic liên kế nhau (B và A),

W_B, W_A : Độ rộng pic đo ở các đáy pic,

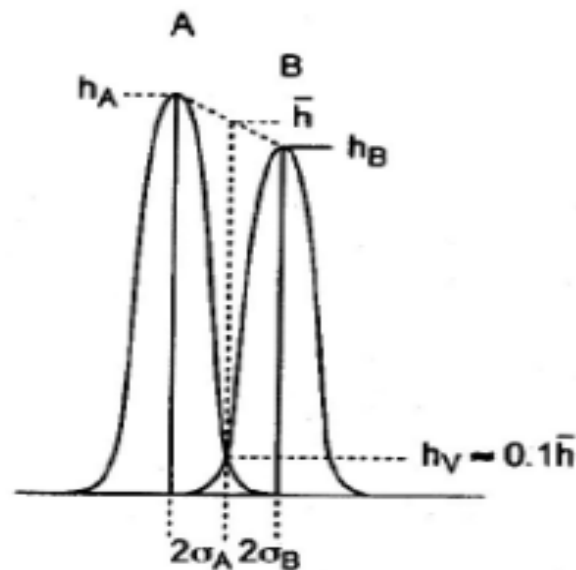
$W_{1/2B}, W_{1/2A}$: Độ rộng pic đo ở nửa chiều cao pic.

Các giá trị: $t_{RB}, t_{RA}, W_B, W_A, W_{1/2B}, W_{1/2A}$ phải tính theo cùng một đơn vị.

Yêu cầu $R_s > 1$, giá trị tối ưu $R_s = 1,5$.

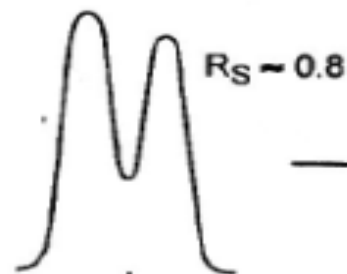


$R_s \sim 1.5$

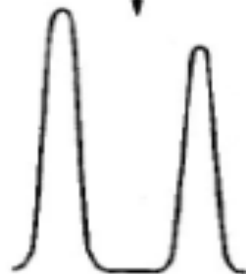


$R_s \sim 1.0$

Độ phân giải kém, độ chọn lọc tồi



Độ phân giải kém, độ chọn lọc tốt nhưng thời gian phân tích dài



Độ phân giải kém, độ chọn lọc tốt nhưng thời gian phân tích quá dài, pic bị doãng rộng

Độ phân giải kém, độ chọn lọc tốt và thời gian phân tích hợp lý

★ Thiết bị dùng trong phân tích sắc ký:

- Bộ nạp mẫu
- Cột sắc ký
- Đầu dò

★ **Phân tích định tính bằng sắc ký**: dựa vào các đặc trưng lưu như thời gian lưu, thể tích lưu... của các cấu tử sau một thời gian rửa giải

- **Định tính trong sắc ký đơn giản**: dựa chủ yếu vào vị trí cấu tử trên pha tĩnh. Biện pháp này áp dụng cho SK hấp phụ lỏng trên cột, SK phân bố trên cột, SK phân bố trên mặt phẳng (dựa vào R_f đặc trưng đối với từng cấu tử)
- **Định tính trong sắc ký hiện đại**: dựa vào việc so sánh thời gian lưu giữa các cấu tử và các chuẩn

★ Phân tích định lượng bằng sắc ký:

- Định lượng bằng PPSK đơn giản: tiến hành phân tích từng phần dung dịch được hứng ở cuối cột bằng pp hóa lý, pp hóa học hay pp densitomet

- **Định lượng bằng PPSK hiện đại**: thực hiện dựa trên việc so sánh chiều cao hay diện tích của các peak đặc trưng cho cấu tử mẫu với một hoặc nhiều chuẩn
 - **Định lượng dựa vào chiều cao peak**
 - **Định lượng dựa vào diện tích peak:**
 - **Phương pháp 100% diện tích**
 - **Phương pháp 100% diện tích chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh**
 - **Phương pháp chuẩn ngoại**
 - **Phương pháp chuẩn nội**

ĐỊNH LƯỢNG DỰA VÀO CHIỀU CAO PEAK

- Chiều cao peak được đo bằng cách nối đường nền giữa 2 chân của peak bằng một đường thẳng và đo chiều cao của peak từ đường nền này**
- Chỉ dùng phương pháp này khi bề rộng của peak mẫu và peak chuẩn hoàn toàn bằng nhau**

ĐỊNH LƯỢNG DỰA VÀO DIỆN TÍCH PEAK

- **Diện tích peak không phụ thuộc vào độ rộng của peak**
→ là thông số lý tưởng cho việc định lượng mẫu
- **Các cách đo diện tích:**
 - Máy tích phân điện tử (sai số khoảng 0,5%)
 - Máy tích phân cơ học (sai số khoảng 1,3%)
 - Tính diện tích tam giác (sai số khoảng 2,6%)

Phương pháp 100% diện tích

- Hàm lượng % của chất phân tích được xác định bằng tỷ số (%) của diện tích peak của chất đó và tổng diện tích các peak có mặt trong mẫu
- Phương pháp này hiện rất ít được sử dụng do sai số rất lớn

Ví dụ :

Phân tách sắc ký một hỗn hợp gồm 3 thành phần : X, Y, Z.

Hàm lượng phần trăm của X được tính như sau :

$$\%X = \frac{.S_X \cdot 100}{S_X + S_Y + S_Z} = \frac{S_X \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

Phương pháp 100% diện tích chuẩn hóa theo hệ số hiệu chỉnh

- **Để hiệu chỉnh sự khác nhau về độ nhạy của detector đối với từng cấu tử, người ta pha chế mẫu chuẩn chứa các cấu tử tinh khiết có thành phần bằng nhau và tiến hành phân tích sắc ký mẫu chuẩn cùng điều kiện với mẫu phân tích**
- **Chọn một trong các cấu tử đo làm chuẩn có hệ số hiệu chỉnh được lấy bằng 1**

Phương pháp chuẩn ngoại

- Là phương pháp định lượng cơ bản, trong đó cả 2 mẫu thử và mẫu chuẩn đều được tiến hành sắc ký trong cùng điều kiện
- So sánh diện tích (chiều cao) peak của mẫu thử với diện tích (chiều cao) peak của mẫu chuẩn sẽ tính được nồng độ của các chất trong mẫu thử
- Có thể sử dụng phương pháp chuẩn hóa 1 điểm hay nhiều điểm

Phương pháp chuẩn nội

- Thêm vào mẫu phân tích và trong dung dịch chuẩn đối chiếu 1 chất chuẩn có nồng độ biết trước được gọi là chất chuẩn nội
- Tỷ số diện tích của chất phân tích và chất chuẩn nội là thông số phân tích được dùng để xây dựng đường chuẩn
- Phương pháp này cho sai số đáng tin cậy nhất
(0,5 – 1%)

- Hai yêu cầu đối với chất chuẩn nội:
 - Peak của chất chuẩn nội phải tách khỏi peak của các thành phần khác
 - Peak của chất chuẩn nội phải gần với peak của chất phân tích

SẮC KÝ CỘT

(Column Chromatography)

- 1. Khái quát những nguyên tắc của SK cột**
- 2. Kỹ thuật sắc ký cột**
- 3. Các ứng dụng của sắc ký cột**



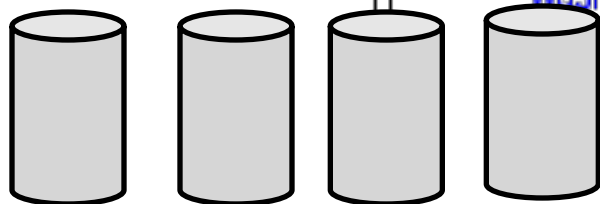
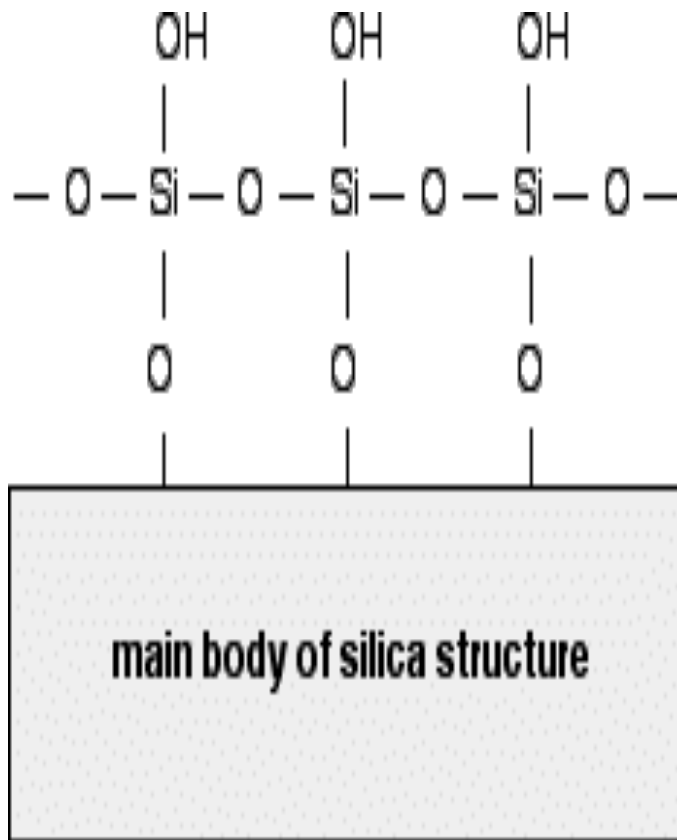
Bình chứa
dm giải ly

layer of solvent on
top of column

column packed with
silica gel or alumina
completely saturated
with solvent

50 – 150 μm

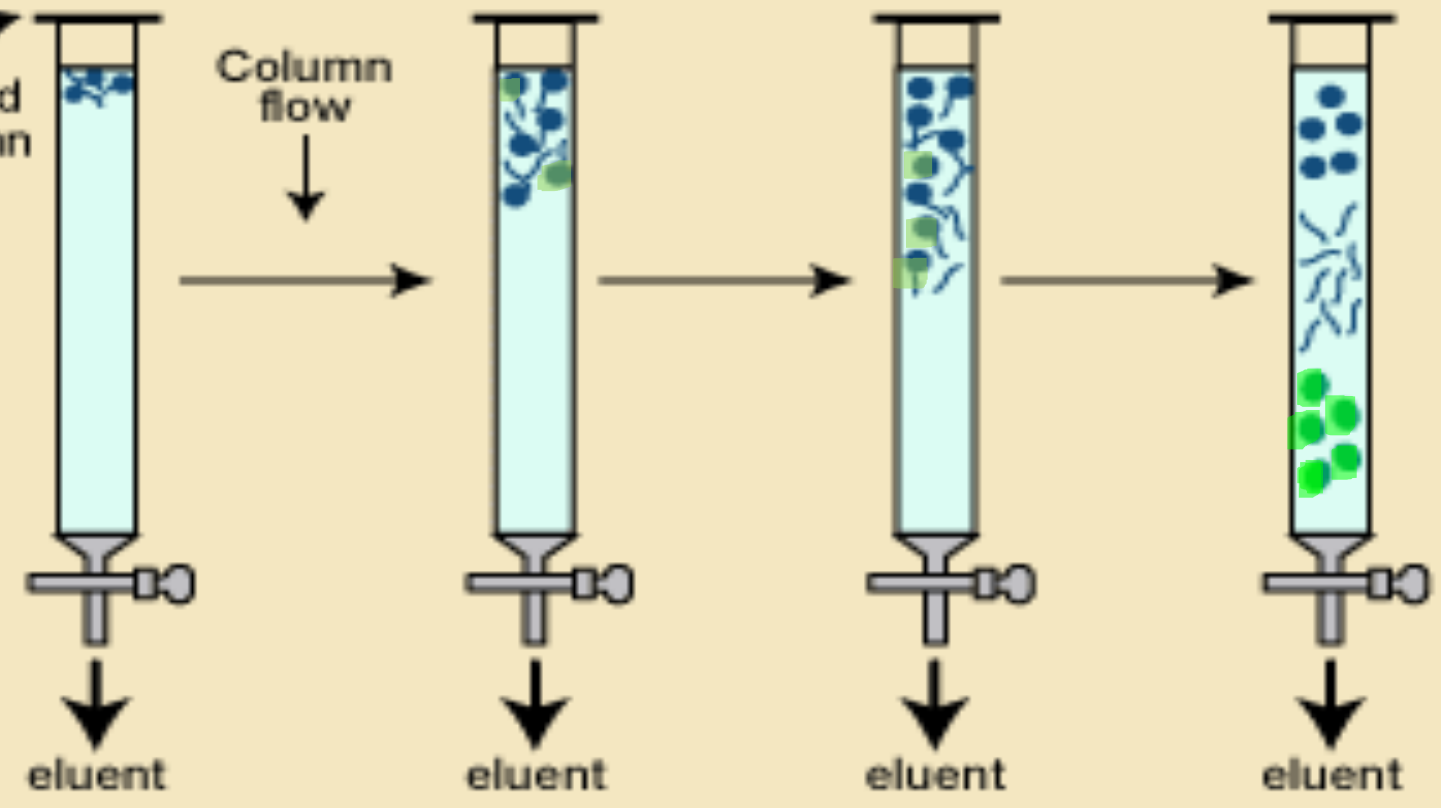
glass wool to prevent
stationary phase being
washed out of column



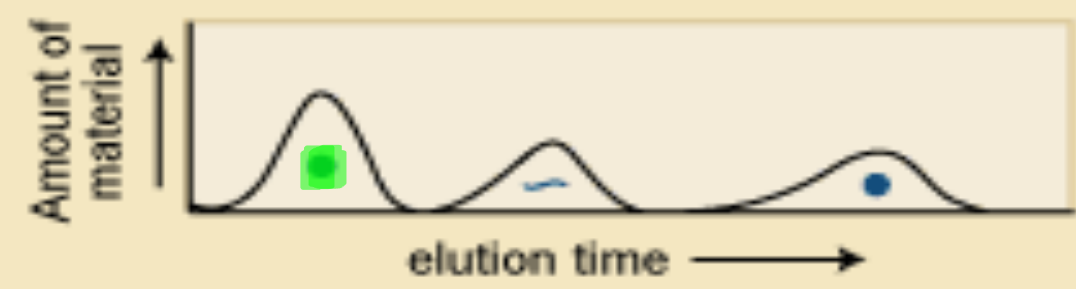
Increasing time →

Sample applied to top of column

Column flow ↓



(a)



(b)

- Lựa chọn chất hấp phụ và dung môi :

Loại hợp chất	Thứ tự giải ly khỏi cột
Hydrocarbon	Nhanh, với dm không phân cực
Ether	↓
Hợp chất thơm	↓
Ceton	↓
Aldehyde	↓
Alcol	↓
Amin	↓
Acid carboxylic	↓
Các hợp chất kiềm mạnh	Chậm nhất, cần dm phân cực

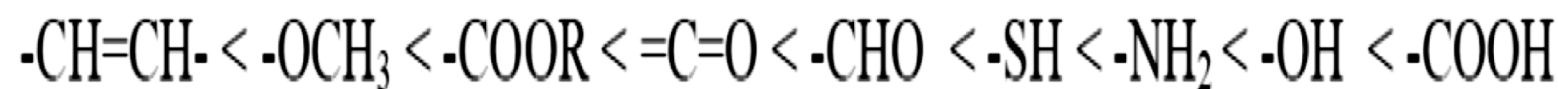
- Trapper → lực rửa giải của các dung môi cho những chất hấp phụ trên cột chứa silicagen giảm theo trật tự :

Nước nguyên chất > methanol > ethanol > propanol >
acetone > ethyl acetate > diethyl ether > chloroform > dichloromethane >
benzene > toluene > trichloroethylene > carbon tetrachloride >
cyclohexane > hexane

- **Chất hấp phụ pha tĩnh:**

Solid	Used to separate
Alumina	Sterols, dyestuffs, vitamins, esters, alkaloids, inorganic compounds
Silica gel	Sterols, amino acids
Carbon	Peptides, carbohydrates, amino acids
Magnesia	Similar to alumina
Magnesium carbonate	Porphyrins
Magnesium silicate	Sterols, esters, glycerides, alkaloids
Calcium hydroxide	Carotenoids
Calcium carbonate	Carotenoids, xanthophylls
Calcium phosphate	Enzymes, proteins, polynucleotides
Aluminium silicate	Sterols
Starch	Enzymes
Sugar	Chlorophyll, xanthophyll

Các chất hấp phụ được sử dụng làm pha tĩnh có tính phân cực mạnh như Al_2O_3 , silicagen, đá vôi... thì có khả năng hấp phụ mạnh các hợp chất có các nhóm càng phân cực theo trật tự như sau:



Trật tự này đảo ngược đối với cacbon.

- **Chất mang rắn:**

Support	Stationary phase	Mobile phase
Celite	Water	CHCl₃ or CCl₄
Silica gel	Water (buffered)	CHCl₃/BuOH
Silica gel	Water	Skellysolve/Bu₂O
Silica gel	Water	CHCl₃/BuOH
Kieselguhr	Water	CHCl₃/BuOH
Starch	Water	PrOH or BuOH/HCl
Kieselguhr	Water	(NH₄)₂SO₄/H₂O/cellosolve
Starch	Water	PrOH/HCl
Silica gel	Aqueous sodium acetate	CHCl₃/EtOH/AcOH

- **Tỉ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách đối với kích thước cột:**

- Tỉ lệ giữa lượng mẫu cần tách (M) và lượng chất hấp phụ (S) sử dụng:

S = 25 đến 50 lần M hay từ 100 – 200 lần M tùy vào hỗn hợp các hợp chất dễ tách hay khó tách

- Tỉ lệ giữa chiều cao chất hấp phụ (H) trong cột và đường kính trong của cột sắc ký (D) :

$$H : D = 10 : 1$$

- **Nạp chất hấp phụ vào cột:**
 - Chất hấp phụ phải được nạp trong cột một cách đồng nhất
 - Kích cỡ hạt đóng vai trò quan trọng
 - Hai kiểu nạp chất hấp phụ vào cột: dạng sệt và dạng khô
- **Đặt mẫu chất cần tách lên đầu cột sắc ký**
- **Tiến hành giải ly chất ra khỏi cột** (trọng lực hay lực đẩy)
- **Dung môi giải ly** (dm đơn nồng độ / nồng độ tăng theo kiểu bậc thang / nồng độ tăng dần tuyến tính)
- **Vận tốc giải ly cột** : 5 – 50 giọt / phút hoặc 1 – 2cm / phút

- **Theo dõi quá trình giải ly cột :** (sắc ký lớp mỏng)
- **Tổng kết quá trình sắc ký cột :** vừa giải ly cột, vừa theo dõi dung dịch giải ly bằng TLC để gom thành những phân đoạn.

Chỉ ngưng sắc ký khi đã thu được tổng lượng cao các phân đoạn bằng 70 – 80% trọng lượng mẫu đã nạp vào cột

SẮC KÝ LỚP MỎNG

(Thin Layer Chromatography)

- 1. Khái quát những nguyên tắc của TLC**
- 2. Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng**
- 3. Các ứng dụng của TLC**

KHÁI QUÁT NHỮNG NGUYÊN TẮC CỦA TLC

- SKLM thuộc sắc ký lỏng (lỏng – lỏng hay lỏng – rắn)
- Sắc ký phẳng (planar chromatography)
- Nguyên tắc cơ bản của SKLM là tiến trình tách hỗn hợp các chất xảy ra khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh
- Trong SKLM có 4 loại cơ chế:
 - Sắc ký hấp phụ
 - Sắc ký phân bố
 - Sắc ký trao đổi ion
 - Sắc ký rây phân tử

- Dựa chủ yếu vào hiện tượng hấp phụ trong đó :
 - ❖ Pha động là một dung môi hoặc hỗn hợp các dung môi
 - ❖ Pha tĩnh là 1 chất hấp phụ trơ, thí dụ như: silica gel hoặc oxid alumin.
- Pha tĩnh được tráng thành 1 lớp mỏng, đều, phủ lên 1 nền phẳng như tấm kính, tấm nhôm, hoặc tấm plastic.
- Do chất hấp phụ được tráng thành 1 lớp mỏng nên phương pháp này gọi là sắc ký lớp mỏng

KỸ THUẬT SẮC KÝ LỚP MỎNG

Trang thiết bị:

 Pha tĩnh: hơn 30 chất hấp phụ khác nhau được sử dụng

 Silicagel

 Nhôm oxid

 Kieselguhr

 Thạch cao

 Cellulose

 Polyamid

 Nhựa trao đổi ion loại ionit vô cơ – hữu cơ

– Bản mỏng: 5 x 20cm, 10 x 20cm,

20 x 20cm

- **Bản mỏng dính chắc** : dùng chất hấp phụ được trộn thêm 5 – 15% chất kết dính (thạch cao, tinh bột, dextrin)
- **Bản mỏng không dính chắc**:

– Pha động:

- Để tăng cường sức rửa giải thường kết hợp
2 dung môi
- Hệ dung môi chọn càng đơn giản càng tốt và
dung môi phải tinh khiết

- **Việc lựa chọn pha tĩnh và pha động cần căn cứ vào một số yếu tố sau:**
 - Tính chất của hỗn hợp chất cần phân tách
 - Cơ chế sắc ký của pha tĩnh
 - Độ bay hơi, độ nhớt, sự phân lớp và độ tinh khiết của hỗn hợp dung môi

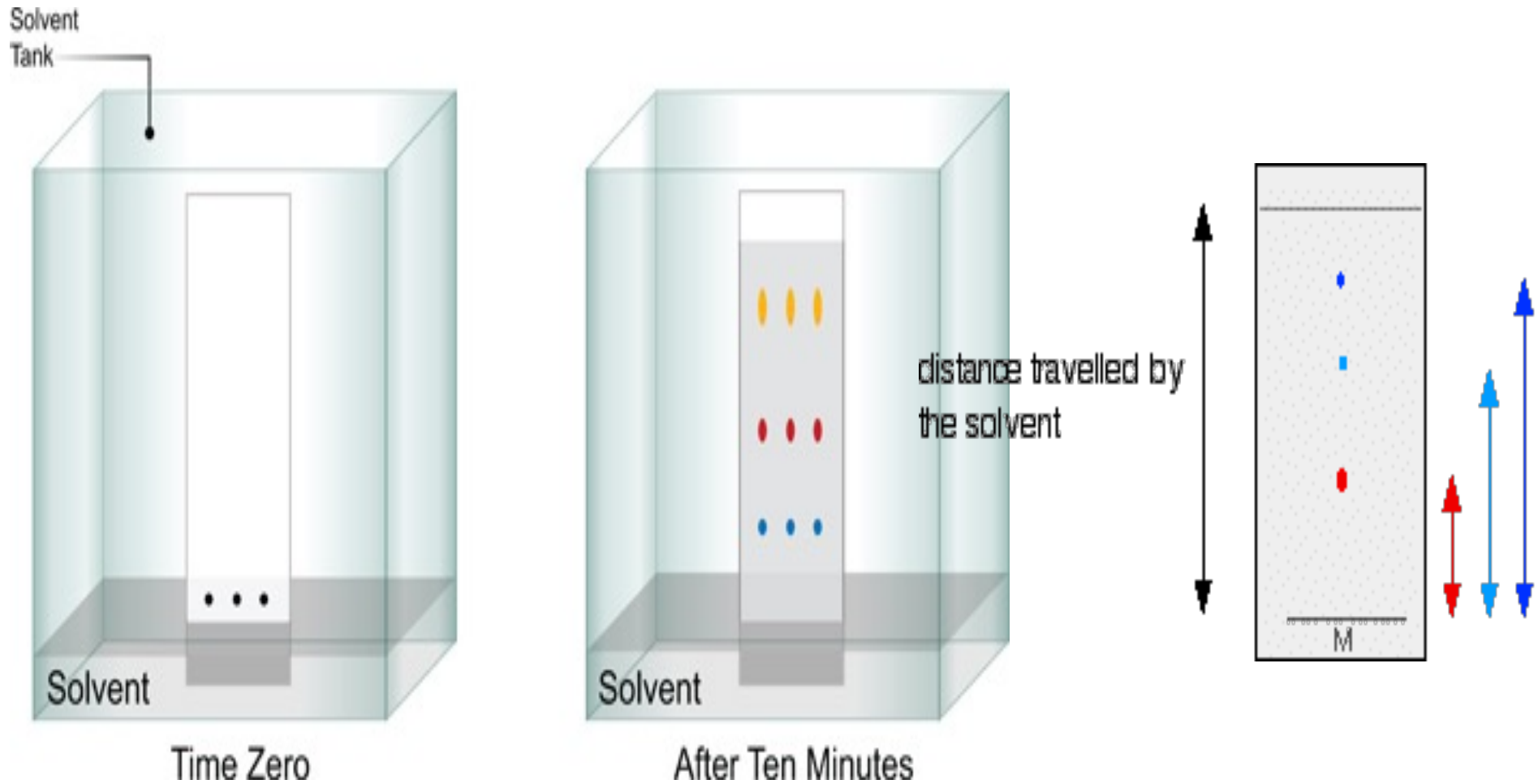
- Cần điều chỉnh sức rửa giải của pha động để trị số R_f đạt độ phân giải cực trị
- Chất phân tích dạng ion hay phân cực được rửa giải tốt bằng dung môi phân cực như hỗn hợp
n-butanol : nước
- Khi dùng silicagel hoặc các chất hấp phụ phân cực khác, độ phân cực của pha động sẽ quyết định tốc độ di chuyển của chất phân tích và trị số R_f của chúng

- Bình sắc ký: gồm những bình đáy tròn, vuông hay hình chữ nhật
 - Hình tròn: $\varnothing = 12\text{cm}$, cao 30cm
 - Hình vuông: 24 x 24 cm
 - Hình chữ nhật: 24 x 30 cm

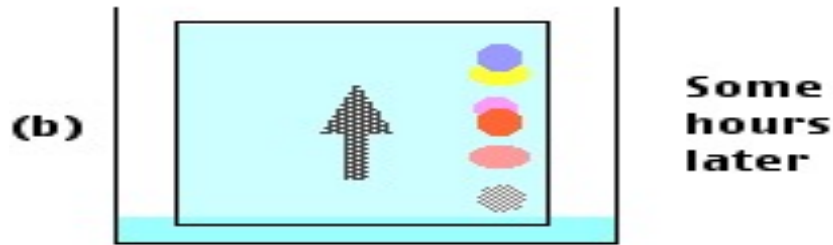
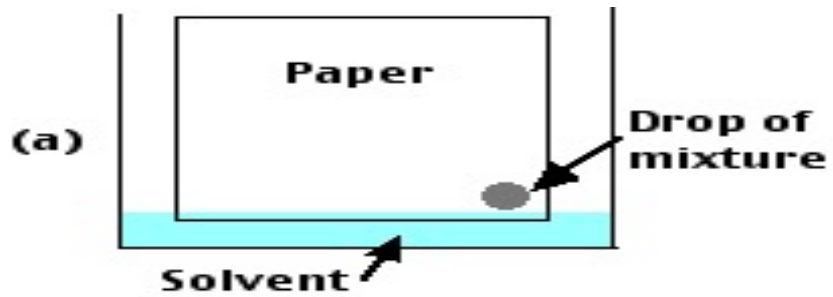
- Quá trình sắc ký:
 - Chuẩn bị bản mỏng
 - Chấm dung dịch lên bản mỏng
 - Khai triển sắc ký
 - Phát hiện các vết trên bản mỏng
 - **Phun thuốc thử hiện màu**
 - **Soi dưới đèn UV**
 - **Dùng densitometer**

- Các kỹ thuật khai triển SKLM:
 - Kỹ thuật sắc ký 1 chiều
 - Kỹ thuật sắc ký 2 chiều
 - Kỹ thuật SRS (separation – reaction – separation)
 - Kỹ thuật sắc ký chế hóa

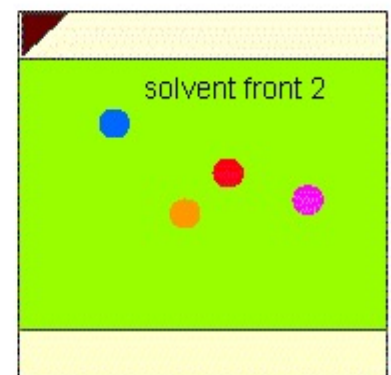
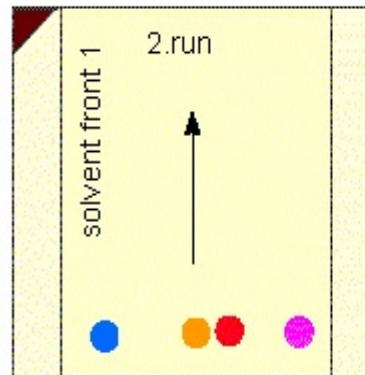
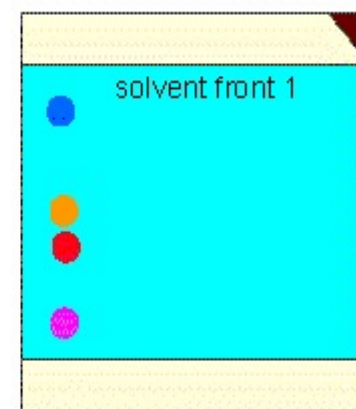
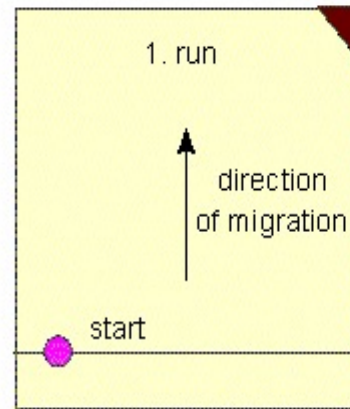
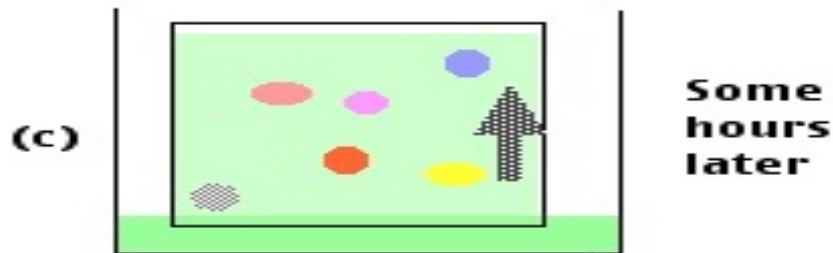
Kỹ thuật sắc ký 1 chiều



Kỹ thuật sắc ký 2 chiều



Turn paper 90° clockwise and use a different solvent



Ưu điểm

- Thiết bị đơn giản
- Chỉ cần 1 lượng rất ít mẫu để phân tích
- Thời gian phân tích không kéo dài
- Việc tách các cấu tử có thể thực hiện khá dễ dàng
- Có thể phân tích đồng thời mẫu và chất đối chứng trong cùng điều kiện phân tích

Nhược điểm

- Là loại sắc ký có độ phân giải thấp \Rightarrow không dùng để tách các hợp chất có nhiều cấu tử

Các ứng dụng của sắc ký lớp mỏng

- Để công bố đặc điểm của hợp chất vừa chiết tách cô lập
- Để kiểm tra sự giống nhau giữa 2 hợp chất
- Để tìm hiểu sơ bộ về tính chất của mẫu cần khảo sát
- Để chuẩn bị cho việc sắc ký cột
- Để theo dõi diễn tiến của một phản ứng hóa học
- Để kiểm tra biết một hợp chất kém bền
- Để cô lập hợp chất
- Ứng dụng SKLM một số hợp chất hữu cơ (protein, carbohydrate, lipid, flavonoid, quinon, chlorophyl...)

Để công bố đặc điểm của hợp chất vừa chiết tách cô lập

$$R_f = \frac{a}{b}$$

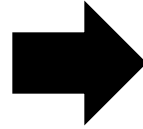
Trong đó:

a là khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết mẫu thử, tính bằng cm.

b là khoảng cách từ điểm xuất phát đến mức dung môi đo trên cùng đường đi của vết, tính bằng cm.

R_f: Chỉ có giá trị từ 0 đến 1.

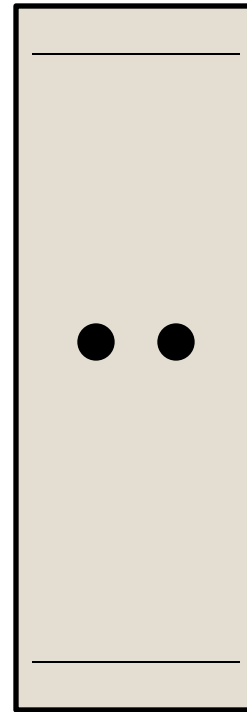
Để kiểm tra sự giống nhau giữa 2 hợp chất



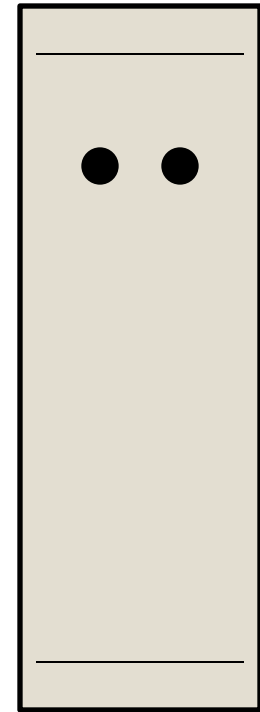
Eter dầu hỏa:
cloroform (2:8)



Cloroform : Etyl
acetat (1:1)



Cloroform : metanol
(9:1)



Chấm 2 mẫu
lên cùng một
bản. Hai vết có
cùng nồng độ

Giải ly với
hệ dung
môi sao cho
vết đi gần
trên bản

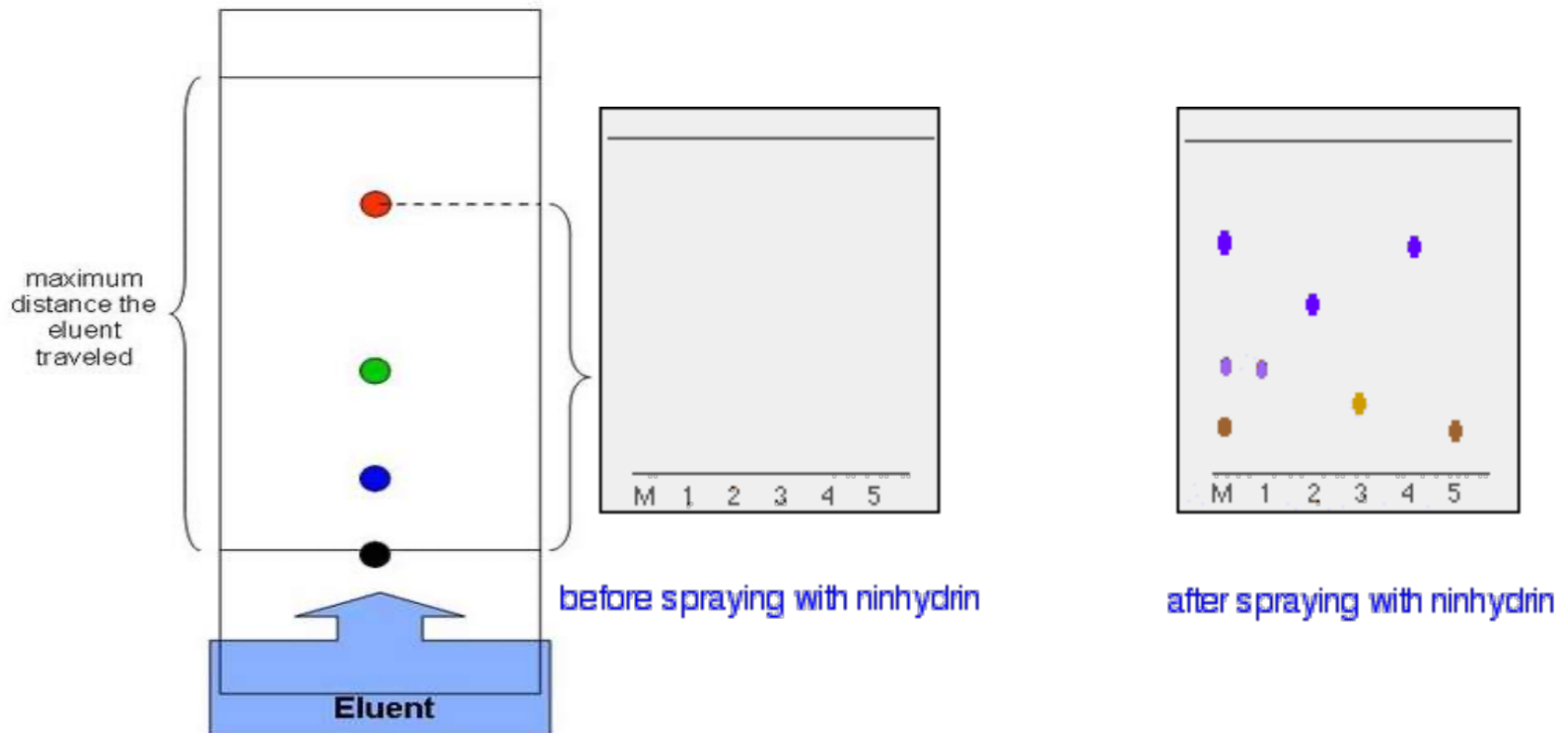
Giải ly với
hệ dung môi
sao cho vết
đi trung bình
trên bản

Giải ly với
hệ dung
môi sao cho
vết đi xa
trên bản

- Muốn kết luận hai hợp chất có giống nhau hay không, phải đáp ứng cùng lúc 2 điều kiện sau, thiếu một cũng không đạt:
- Về R_f của 2 chất so sánh
- Về màu sắc của hai vết đối với một loại thuốc thử

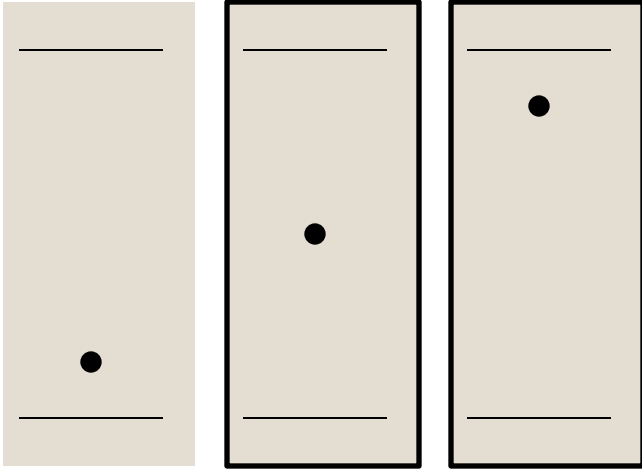
Để tìm hiểu sơ bộ về tính chất của mẫu cần khảo sát

- Biết được số các hợp chất có trong hỗn hợp mẫu ban đầu:

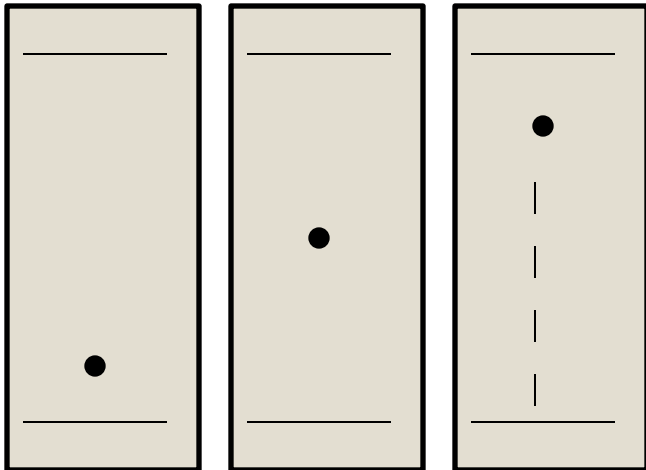
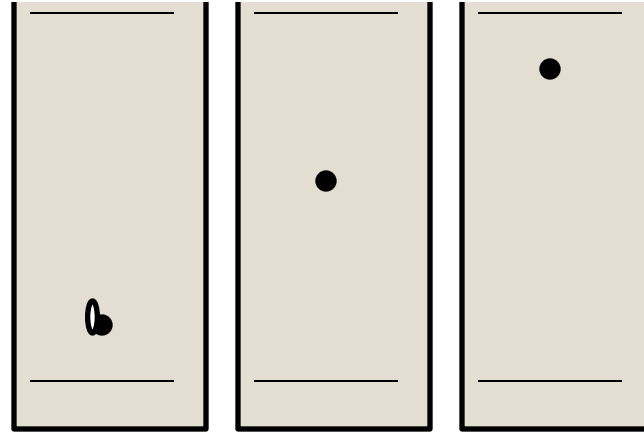


- Kiểm tra độ tinh khiết của một hợp chất:

Mẫu đã tinh khiết

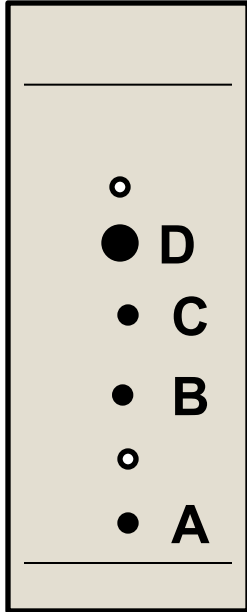


Mẫu còn lẫn một ít bản, cần tinh chế thêm



**Mẫu còn lẫn một ít bản,
cần tinh chế thêm**

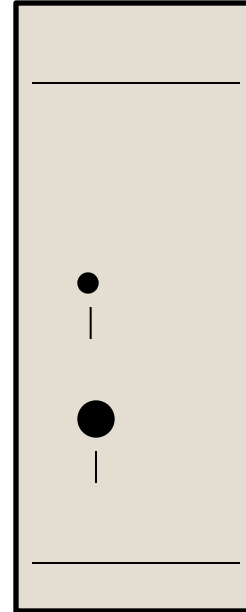
- Biết được sơ bộ về thành phần phần trăm của các hợp chất có trong mẫu ban đầu.



Mẫu là hỗn hợp có chứa ít nhất 4 hợp chất chính với dự đoán sơ bộ:

D: 40% B: 20%

C: 10% A: 20%



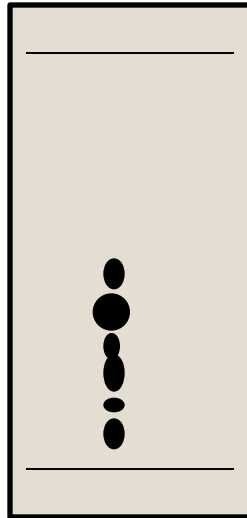
Mẫu có chứa một chất chính, chiếm khoảng 90%, còn lại là tạp phẩm.

Biết sơ qua về tính phân cực của những thành phần hợp chất có trong mẫu

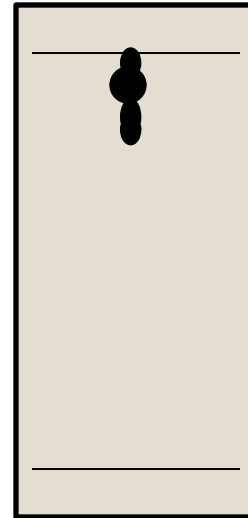
Giải ly bởi hệ dung môi phân cực trung bình



Giải ly bởi hệ dung môi phân cực mạnh



Giải ly bởi hệ dung môi phân cực trung bình



Giải ly bởi hệ dung môi phân cực mạnh



Mẫu M chứa các hợp chất có tính phân cực mạnh

Mẫu N chứa các hợp chất có tính ít phân cực

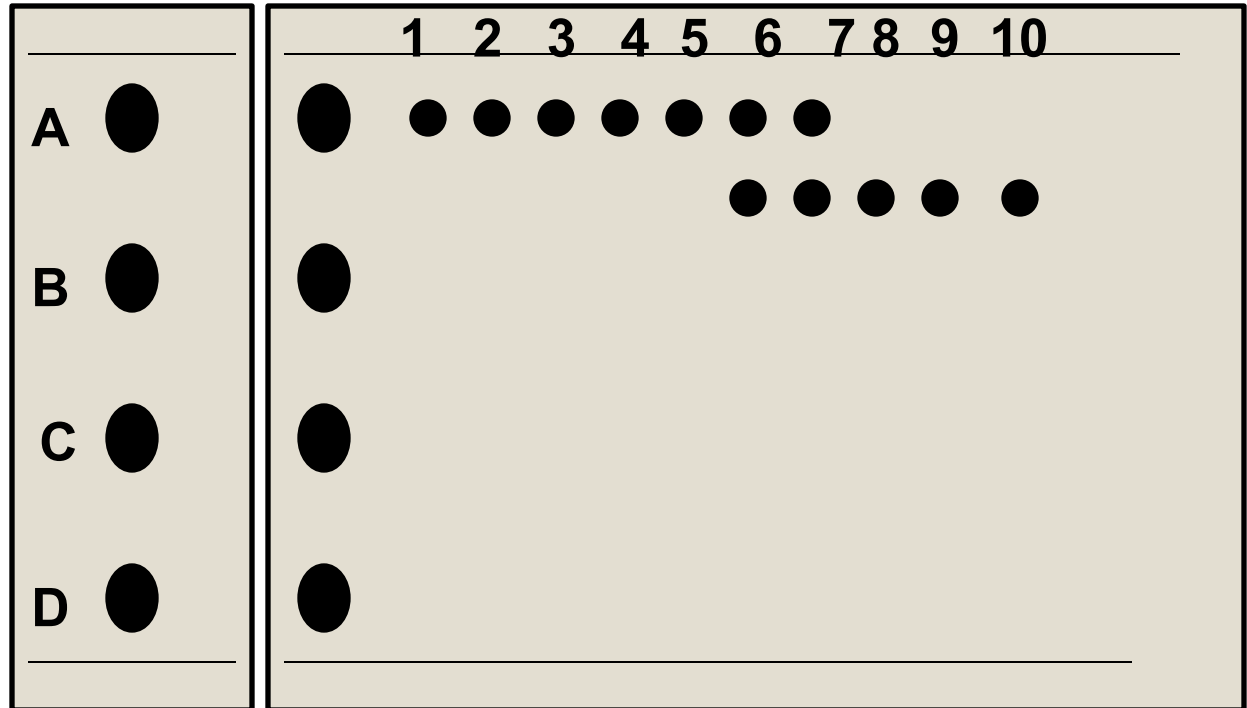
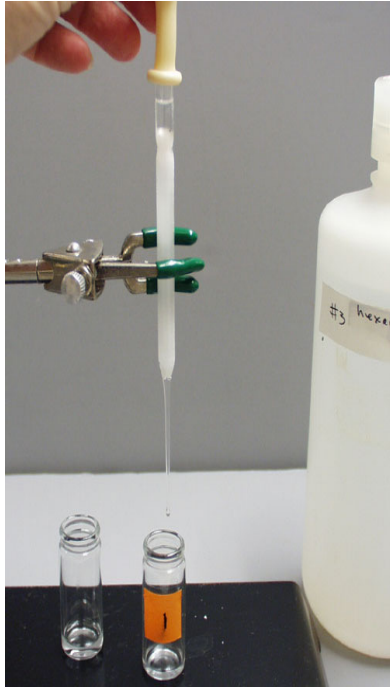
ĐỀ chuẩn bị cho sắc ký cột

- Tìm hệ dung môi để bắt đầu sắc ký cột:

Với hỗn hợp mẫu chất là kết quả của phản ứng tổng hợp hữu cơ, hãy chọn hệ dung môi có thể đẩy hợp chất cần quan tâm lên vị trí trên bản với $R_f = 0,2 - 0,3$.

Đối với mẫu cao thô chiết xuất từ cây cỏ, chọn dung môi giải ly đầu tiên là dung môi có thể đẩy vết ít phân cực nhất của cao chiết lên vị trí có $R_f = 0,5$ và chọn dung môi chấm dứt sắc ký cột là dung môi có thể đẩy vết phân cực nhất của cao chiết lên vị trí có $R_f = 0,2$.

Để theo dõi quá trình sắc ký cột

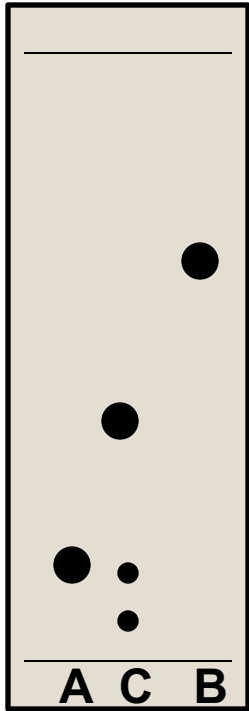
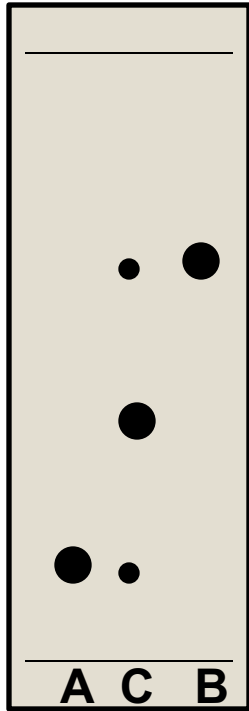
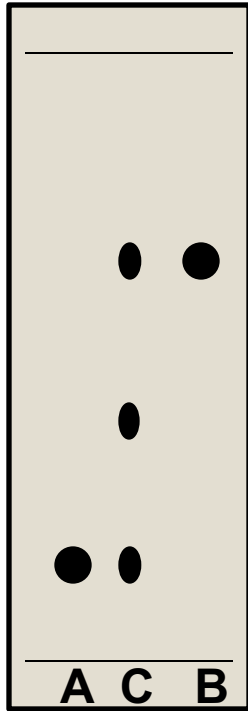
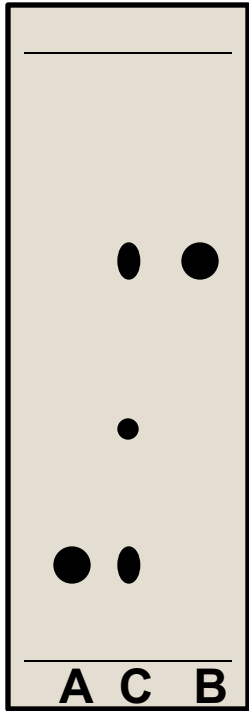
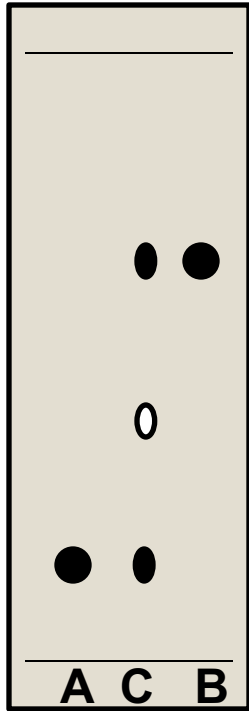
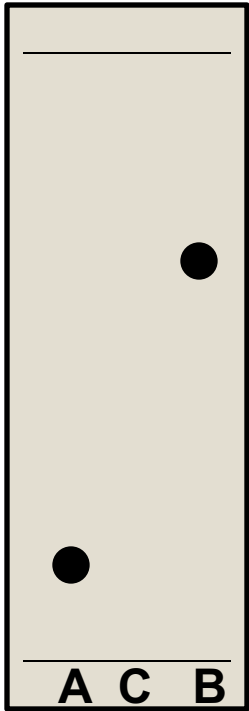


Sắc ký lớp mỏng của hỗn hợp mẫu chất ban đầu

Các lọ đựng dung dịch giải ly ra khỏi cột:
Trong các lọ từ 1 đến 5 chứa hợp chất A
Trong các lọ 6, 7 chứa hỗn hợp chất A và B
Trong các lọ 8 đến 10 chứa chất B

Để theo dõi diễn tiến của một phản ứng tổng hợp hữu cơ

- Phản ứng hóa học: $A + B$ tạo ra chất C. Sử dụng sắc ký lớp mỏng để theo dõi phản ứng theo thời gian:
- Chuẩn bị:
 - Dò tìm hệ dung môi giải ly thích hợp để 3 chất A, B, C hiện vết với R_f khác nhau.
 - Chuẩn bị sẵn một số bản mỏng tại mức xuất phát có chấm sẵn hai vết A, B ở hai bên rìa, chừa khoảng giữa để chấm hỗn hợp dung dịch phản ứng.



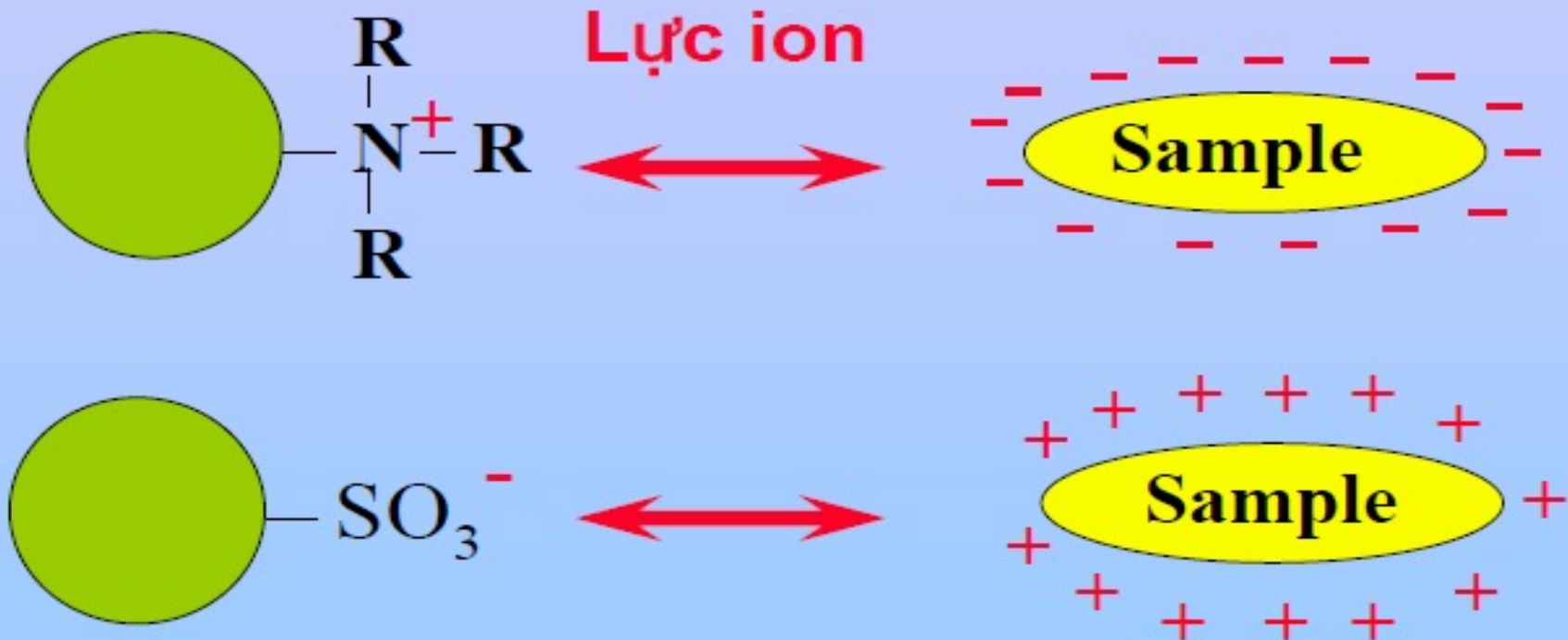
SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION *(Ion Exchange Chromatography)*

- 1. Các kiến thức căn bản về SK trao đổi ion**
- 2. Kỹ thuật sắc ký trao đổi ion**
- 3. Một số áp dụng của sắc ký trao đổi ion**

CÁC KIẾN THỨC CĂN BẢN VỀ SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

- Dựa trên hiện tượng trao đổi thuận nghịch giữa các ion linh động của pha tĩnh rắn với các ion trong dung dịch phân tích khi cho dung dịch này đi qua cột được nạp đầy pha tĩnh (ionit)

- Bản chất của quá trình tách là do ái lực khác nhau của các ion trong dung dịch đối với các trung tâm trao đổi ion của ionit



- **Ionit:**

- Là các hợp chất polymer vô cơ và hữu cơ không tan có chứa các nhóm hoạt động

- Ionit vô cơ tự nhiên

- Ionit vô cơ tổng hợp

- Ionit hữu cơ tự nhiên

- Ionit hữu cơ tổng hợp (nhựa trao đổi ion)

- **Nhựa trao đổi ion:**
 - Cấu tạo từ **hợp chất polymer hữu cơ** gồm một sườn hydrocarbon có mang các nhóm chức hoạt động mang điện tích dương (+) hay âm (-) và luôn liên kết với các đối ion của nó.
 - Các nhóm chức này nối với các ion linh động bằng **lực hút tĩnh điện**

Negatively Charged
Analyte [Anion]

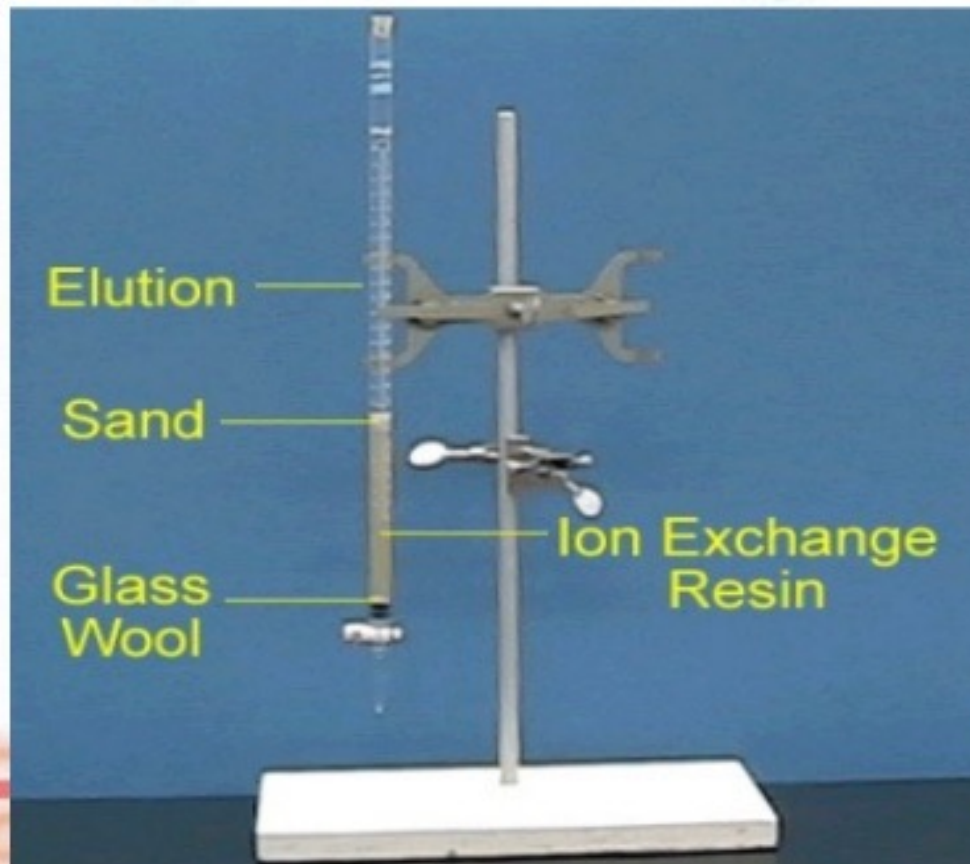
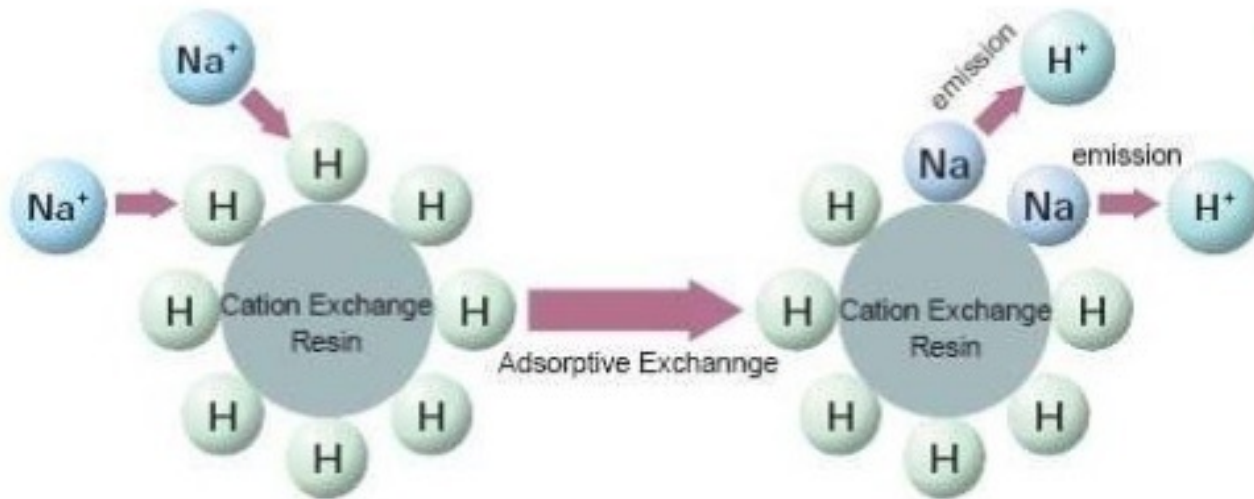
Attracted to
Positive Surface



Positively Charged
Analyte [Cation]

Attracted to
Negative Surface





– **Gồm các loại:**

- **cationit**

- **anionit**

- **ionit lưỡng tính**

- **ionit có chứa nhóm tạo phức**

- **ionit chứa nhóm oxy hóa khử**

- **ionit lỏng**

- **màng trao đổi ion**

cationit

- Chứa nhóm hoạt động là các anion R^- ,

đổi ion là M^+

- R^- có thể là: nhóm sulphonate, nhóm phosphate, carboxylate hay amino diacetate

anionit

- Có dạng $R^+ X^-$ với nhóm hoạt động R^+ thường là nhóm amin
- Độ base của nhóm anionit phụ thuộc vào độ base của nhóm amin
- Anionit phổ biến thường chứa amin bậc 4

- Nhựa trao đổi ion **tính base mạnh** sẽ hấp phụ các hợp chất có **tính acid**
- Nhựa trao đổi ion **tính base yếu** sẽ hấp phụ các hợp chất có **tính acid mạnh**
- Nhựa trao đổi ion **tính acid mạnh** sẽ hấp phụ các hợp chất có **tính base**
- Nhựa trao đổi ion **tính acid yếu** sẽ hấp phụ các hợp chất có **tính base mạnh**

Các nguyên liệu sử dụng làm nhựa trao đổi ion:

- Nguyên liệu làm nhựa trao đổi ion có thể là các loại polysaccharide hay resin tổng hợp
- Có 3 loại nguyên liệu chính:
 - Nhựa polystyren
 - Polysaccharide
 - Silicagel
- Đáp ứng một số đặc điểm:
 - Dung môi giải ly có thể chảy ngang qua với vận tốc thích hợp
 - Hạt nhựa có độ bền cơ học

KỸ THUẬT SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

- Dùng kỹ thuật tách tĩnh hay kỹ thuật tách động
- Cột sắc ký trao đổi ion thường có đường kính trong và chiều dài thích hợp
- Nhồi nhựa trao đổi vào cột và nạp mẫu cần phân tích vào đầu cột
- Giải ly cột trao đổi ion (tăng dần pH dung dịch giải ly hoặc tăng dần nồng độ dung dịch giải ly)
- Vận tốc giải ly cột trao đổi ion

MỘT SỐ ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

- **Cô lập những loại hợp chất acid, base mạnh hay yếu, protein, các enzym, hormon, nucleotid... từ nguyên liệu thô ban đầu**
- **Thường sử dụng kết hợp với các kỹ thuật khác như:**
 - Tạo kết tủa
 - Sắc ký lọc gel
 - Điện di

SẮC KÝ GEL

(Gel Chromatography)

- 1. Nguyên tắc căn bản của sắc ký gel**
- 2. Kỹ thuật sắc ký gel**
- 3. Các ứng dụng của sắc ký gel**

NGUYÊN TẮC CĂN BẢN CỦA SẮC KÝ GEL

- Là phương pháp tách dựa trên sự khác nhau về kích thước phân tử của các chất
- Pha tĩnh là mạng polymer có lỗ rỗng và các lỗ rỗng này được phủ đầy dung môi dùng làm pha động.
- Đây là loại sắc ký phân chia giữa hai pha lỏng và cả hai pha đều có thành phần hóa học giống nhau

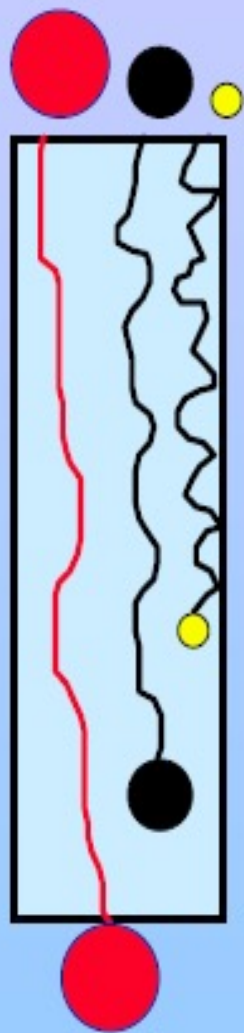
- **GPC (Gel Permeation Chromatography):**

SK thẩm thấu gel, thường sử dụng trong lĩnh vực polymer

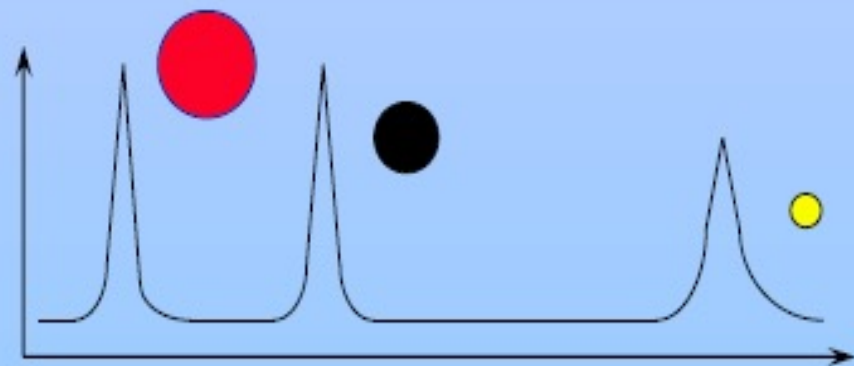
- **GFC (Gel Filtration Chromatography):**

SK tinh lọc gel, thường sử dụng trong lĩnh vực sinh hóa

Thứ tự rửa giải



**SEC
Column**



KỸ THUẬT SẮC KÝ GEL

- Việc tách trong sắc ký gel tùy vào đặc điểm của lỗ rỗng trong hệ mạng không gian 3 chiều
- Hạt gel phải có kích cỡ giống nhau, có tính trơ về mặt hóa học, bền về mặt cơ học, các lỗ rỗng trong hạt gel phải có hình dạng đồng nhất (hình cầu)
- Các loại : gel dextran, gel polyacrylamid, gel styragel

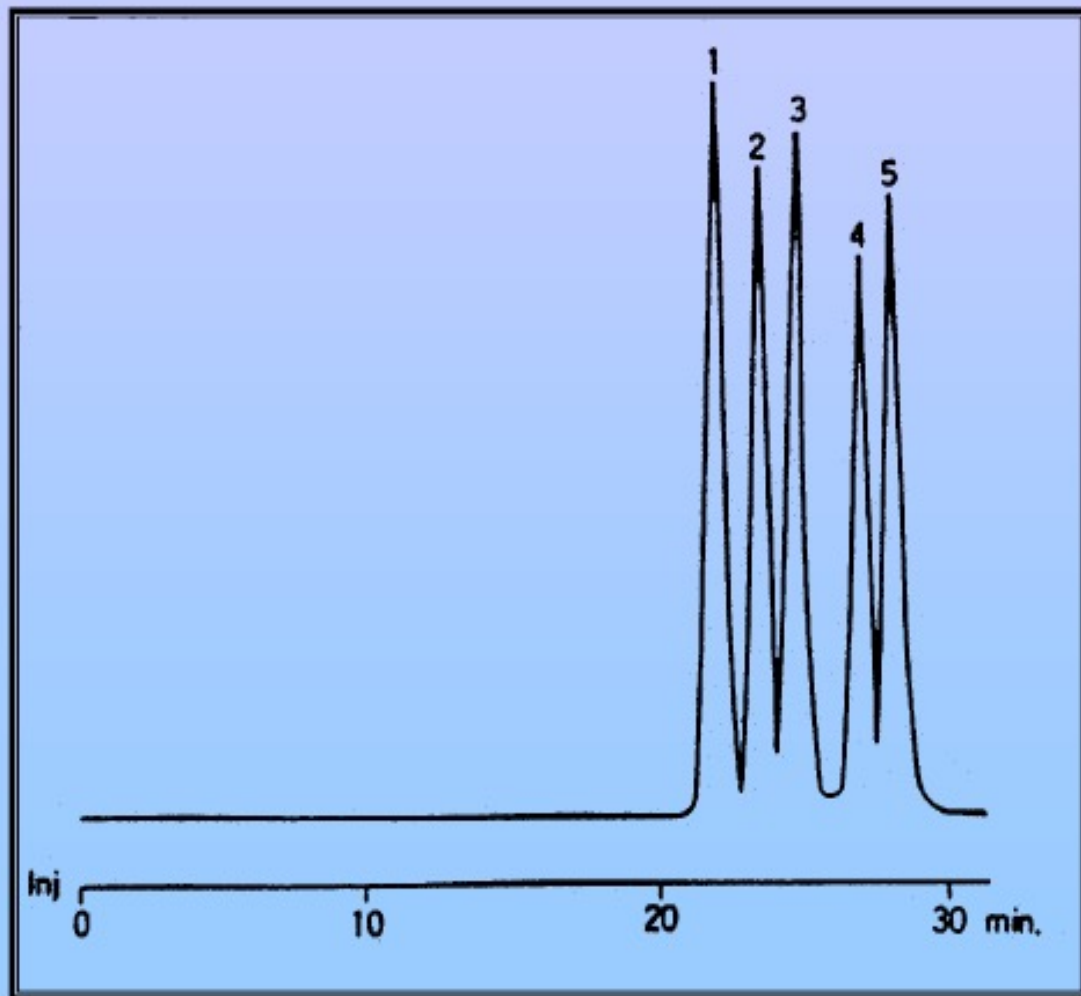
Sắc ký gel phải thực hiện trong cột hình ống trụ bằng thủy tinh:

- Nhồi gel vào cột
- Đặt mẫu cần sắc ký lên đầu cột gel
- Triển khai sắc ký gel

CÁC ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ GEL

- Để xác định trọng lượng phân tử của một hợp chất đại phân tử
- Để tách một hỗn hợp nhiều chất thành các nhóm hợp chất riêng rẽ
- Để loại bỏ muối ra khỏi một hợp chất hoặc dung dịch
- Để loại bỏ các chất màu tạp bản ra khỏi hợp chất đang khảo sát

Tách Protein sử dụng cột GFC



◆ Analytical Conditions

- ◆ Column : Asahipak GFA-50
- ◆ Mobile phase :
 - 0.1 M sodium phosphate
 - 0.1 M NaCl (pH=7.0)
- ◆ Flow rate : 0.5 mL/min
- ◆ Temperature : ambient
- ◆ Detector : UV-280 nm
- ◆ Injection volume : 10 uL

◆ Peaks

1. glutamate dehydrogenase
2. lactate dehydrogenase
3. enolase
4. adenylate kinase
5. cytochrome C

SẮC KÝ KHÍ

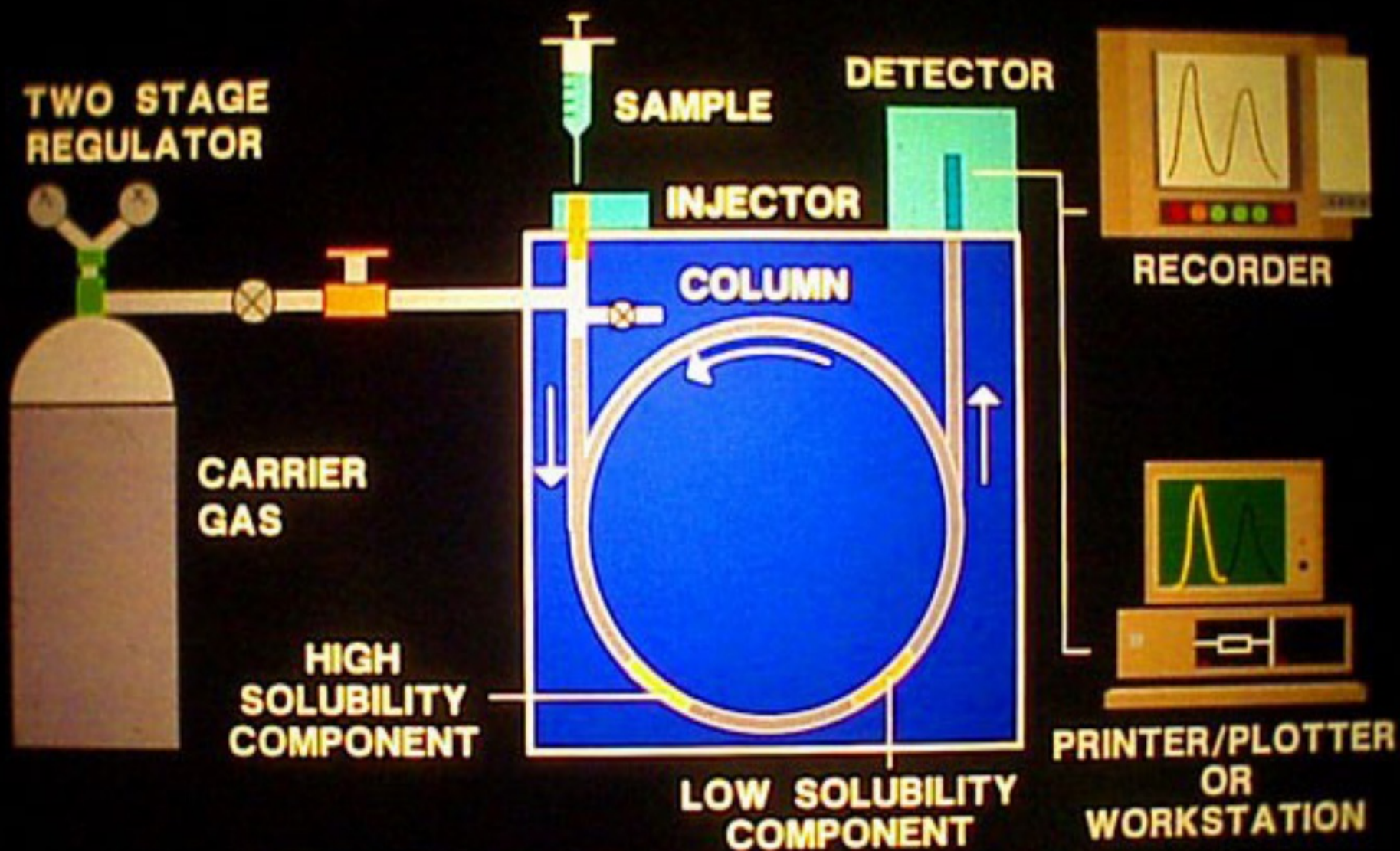
(Gas Chromatography)

- 1. Nguyên tắc căn bản của sắc ký khí**
- 2. Kỹ thuật sắc ký khí**
- 3. Các ứng dụng của sắc ký khí**

NGUYÊN TẮC

- Là phương pháp sắc ký mà pha động là chất khí hay ở dạng hơi
- Nếu pha tĩnh là chất hấp phụ rắn → sắc ký hấp phụ
(sắc ký khí – rắn GCS, GSC)
- Nếu pha tĩnh là màng mỏng chất lỏng trên bề mặt chất hấp phụ rắn → sắc ký phân bố
(sắc ký khí – lỏng GCL, GLC)

GC ANALYSIS



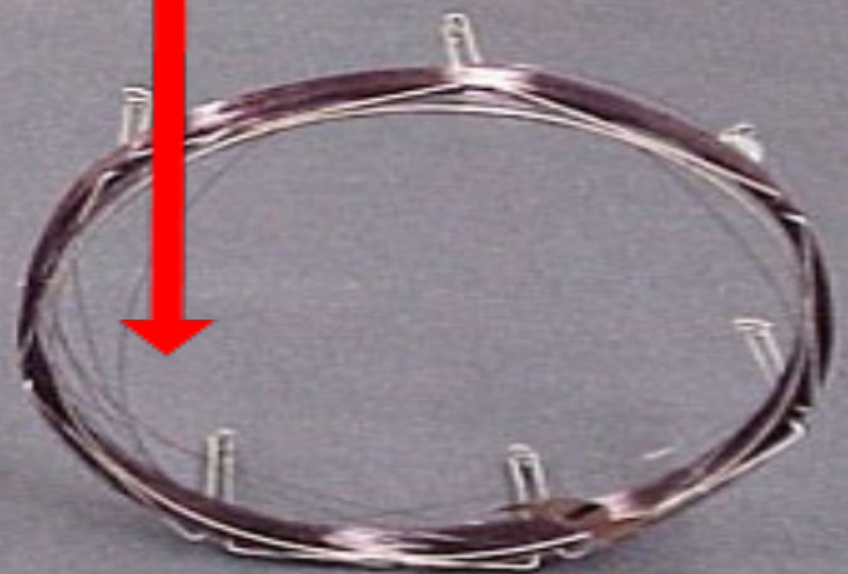
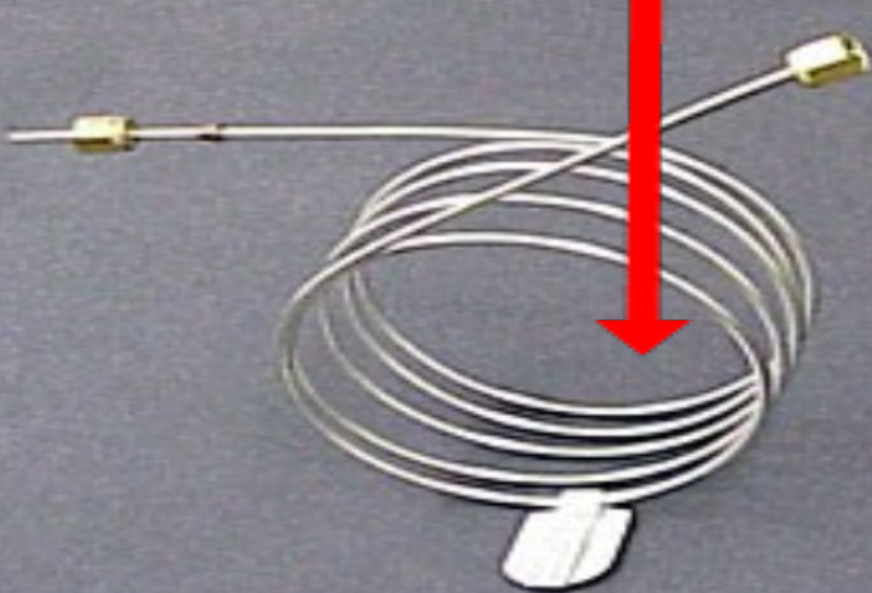
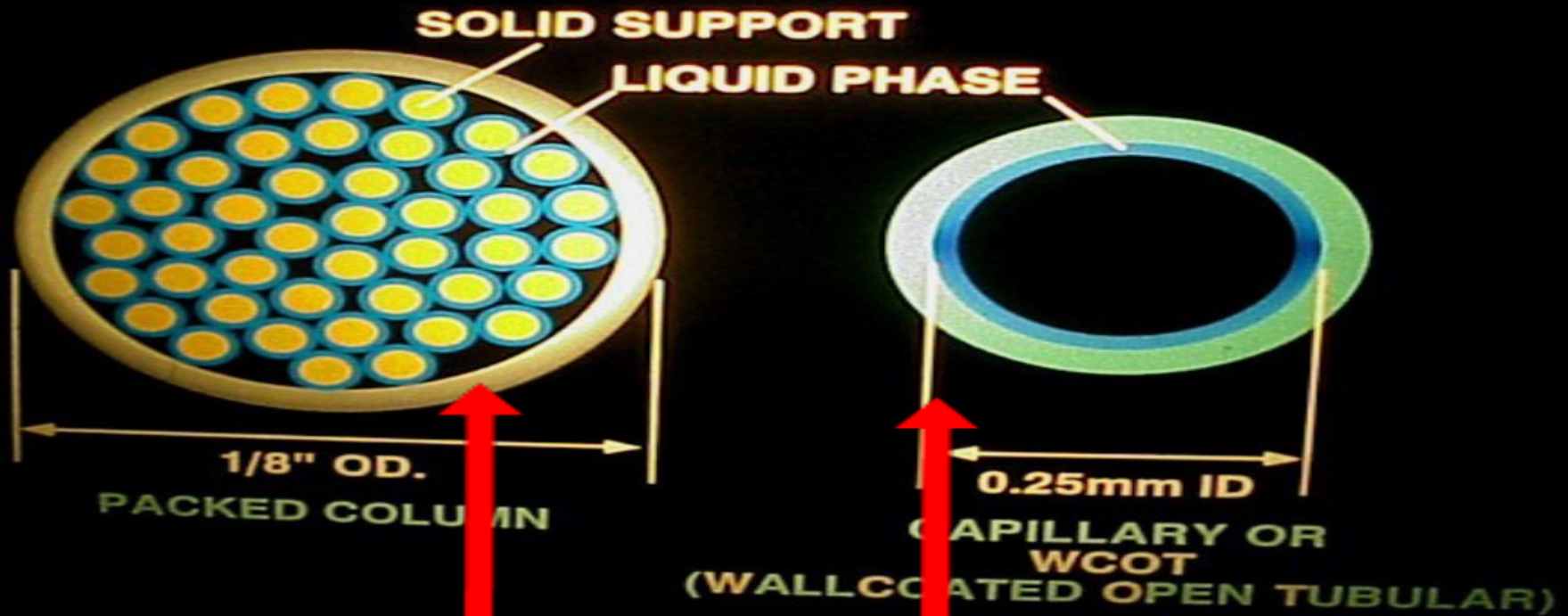
KỸ THUẬT SẮC KÝ KHÍ

1. Thiết bị sắc ký khí:

- Hai bộ phận quan trọng nhất của sắc ký khí là hệ thống cột tách và detector
- Khí mang thường dùng : H_2 , N_2 , He, Ar...
- Bộ nạp mẫu được giữ ở nhiệt độ thích hợp theo chương trình nhiệt độ, thường cao hơn nhiệt độ hóa hơi của cấu tử một ít

- **Cột sắc ký có độ bền nhiệt và bền hóa học cao**
(cột nhồi, cột mao quản và cột “530 μm ”)
- **Detector phổ biến: dẫn nhiệt, ion hóa ngọn lửa, cộng kết điện tử, phát xạ nguyên tử**
- **Bộ phận ghi nhận kết quả: ghép với hệ thống máy vi tính để xử lý số liệu, tính toán và lưu trữ kết quả**

PACKED AND CAPILLARY COLUMNS



2. Một số kỹ thuật trong sắc ký khí:

- **Xử lý chất mang**
- **Tâm pha tĩnh trên chất mang**
- **Kỹ thuật bơm mẫu**
- **Một số kỹ thuật khác (sử dụng hệ thống sắc ký bao gồm nhiều cột tách, hay dùng kỹ thuật sắc ký tuần hoàn nhằm kéo dài cột tách...)**

Chất mang (giá rắn)

- **Cấu tạo bởi những phân tử nhỏ hình cầu, đồng nhất, có độ bền cơ học và bề mặt tối đa $1\text{m}^2 / \text{g}$.**
- **Vật liệu phải trơ ở nhiệt độ cao**
- **Phổ biến hiện nay là các giá được làm từ vật liệu thiên nhiên, đất diatomic, được cấu tạo bởi khung sườn bằng silica của hàng ngàn loài tảo đơn bào sống trong ao, hồ và biển(chromosorb W hay P)**

Thành trong của cột mao quản

- **Cột W.C.O.T (wall coated open tubular) : thành trong cột được áo bằng pha tinh dưới dạng một lớp mỏng có độ dày kiểm soát được 0,05 – 3 μm**
- **Cột SCOT hay PLOT : thành trong được phủ một lớp diatomic có bề dày khoảng 30 μm**
- **Cột FSOT : là cột WCOT mới, làm bằng silic nóng chảy trong đó chứa một hàm lượng oxyd kim loại**

Pha tĩnh lỏng

- **Áp suất hơi thấp, tốt nhất điểm sôi của dung dịch phải nhỏ hơn 100°C và cao hơn nhiệt tối đa của cột sử dụng**
- **Bền với nhiệt**
- **Trơ về mặt hóa học**
- **Tính chất của dung môi như giá trị k và α nằm trong phạm vi tối ưu để cho các chất tan tốt**
- **Tính phân cực của pha tĩnh phải tương ứng với tính phân cực của các cấu tử của mẫu thử**

Một vài loại pha tĩnh lỏng dùng trong sắc ký khí – lỏng

PHA TĨNH	TÊN THƯƠNG MẠI	NHIỆT ĐỘ TỐI ĐA/ ° C	PHẠM VI ỨNG DỤNG
Polydimethylsiloxane	OV-1, SE-30	350	Các chất không phân cực, sử dụng chung trong hydrocarbua, hương liệu, dược phẩm, steroid
5% phenyl-polydimethylsiloxane	OV-3, SE-52	350	Ester metylic của acid béo, alcaloid, dược phẩm và hợp chất chứa holozen
50% phenyl-polydimethylsiloxane	OV-17	250	Dược phẩm, steroid, thuốc trừ sâu, glycol
50% trifluoropropyl – polydimethylsiloxane	OV-210	200	Chất thơm chứa clo, alkylbenzen thế
Polyetylenglycol	Carbowax 20M	250	Acid tự do, alcol, eter, tinh dầu, glycol
50% cyanopropyl – polydimethylsiloxane	OV-275	240	Acid béo không no có nhiều nối đôi, acid của colophane, acid tự do, alcol

Đề nâng cao hiệu suất tách có thể:

- Lựa chọn pha tĩnh, chiều dài cột, đường kính cột... phù hợp với lượng mẫu, loại mẫu, lựa chọn chương trình nhiệt độ phù hợp.
- Ghép nối hai hay nhiều cột có pha tĩnh khác nhau.
- Với những mẫu có thành phần phức tạp việc ghép nối thường được sử dụng.
- Những cột có đường kính không khác nhau nhiều có thể ghép nối với nhau.
- Nếu kết hợp với van chuyển cột tự động cho phép tự động chuyển cột trong quá trình phân tách.

Pha động

- Khí mang lý tưởng dùng cho sắc ký phải là khí trơ, có độ tinh khiết cao.
- Độ tinh khiết của khí mang tốt nhất phải lớn hơn 99,995%.
- Khí mang cần phải qua các bộ lọc để loại bỏ oxy, nước và vết các chất hữu cơ trước khi vào cột tách.

- Khí mang thường dùng là tùy thuộc vào detector sử dụng, trong đó heli là khí mang thông dụng nhất và thích hợp với hầu hết các detector dùng cho sắc ký khí.
- Nitơ cho hiệu suất tách tốt chỉ trong trường hợp nhiệt độ cột tách và tốc độ dòng thấp. Khi dùng khí mang là nitơ, giới hạn phát hiện đối với detector ion hóa ngọn lửa hơi thấp hơn heli nhưng thời gian phân tích kéo dài hơn.

- Khí mang hydro : hiệu suất tách lớn hơn và thời gian phân tích ngắn hơn , tuy nhiên khá nguy hiểm vì hydro có thể gây nổ khi tiếp xúc với oxy không khí, không dùng được cho detector khối phổ và là tác nhân phản ứng với các hợp chất không bão hòa trên bề mặt kim loại.

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách chất trong sắc ký khí

- Áp suất hơi của một hợp chất
- Đặc trưng của các loại cột sắc ký
- Độ phân giải R_s

CÁC ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ KHÍ

- **Xác định độ tinh khiết của những hợp chất cần phân tích**
- **Theo dõi phản ứng hóa học**
- **Biết được số cấu tử hiện diện trong hỗn hợp mẫu phân tích cũng như tỉ lệ tương đối của mỗi cấu tử trong hỗn hợp**
- **Tìm biết sự hiện diện một chất trong hỗn hợp phân tích**
- **Để phân tích thực phẩm, dược phẩm, môi trường...**

SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

(High – Performance Liquid Chromatography)

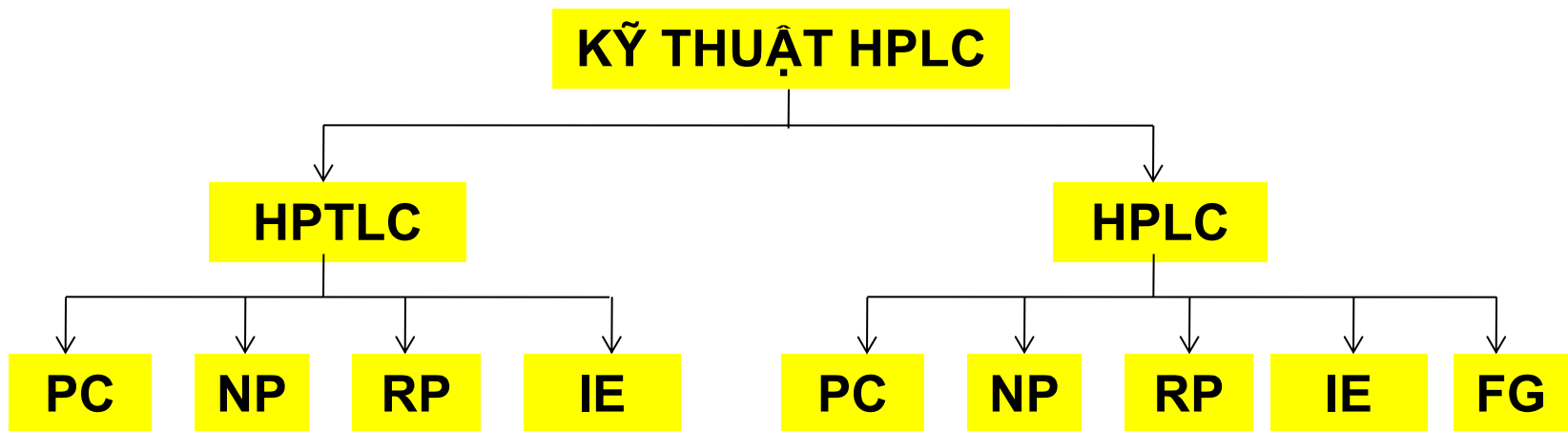
- 1. Nguyên tắc căn bản của HPLC**
- 2. Kỹ thuật thực nghiệm HPLC**
- 3. Các ứng dụng của HPLC**

NGUYÊN TẮC CĂN BẢN CỦA HPLC

- HPLC là một kỹ thuật tách trong đó các chất phân tích di chuyển qua cột chứa các hạt pha tĩnh (cỡ hạt 10 μm)
- Tốc độ di chuyển khác nhau liên quan đến hệ số phân bố của chúng giữa 2 pha.
- Phương pháp HPLC có thể là phương pháp sắc ký hấp phụ rắn – lỏng, sắc ký phân bố lỏng – lỏng, sắc ký lỏng trao đổi ion hay lọc gel

Phương pháp chia tách :

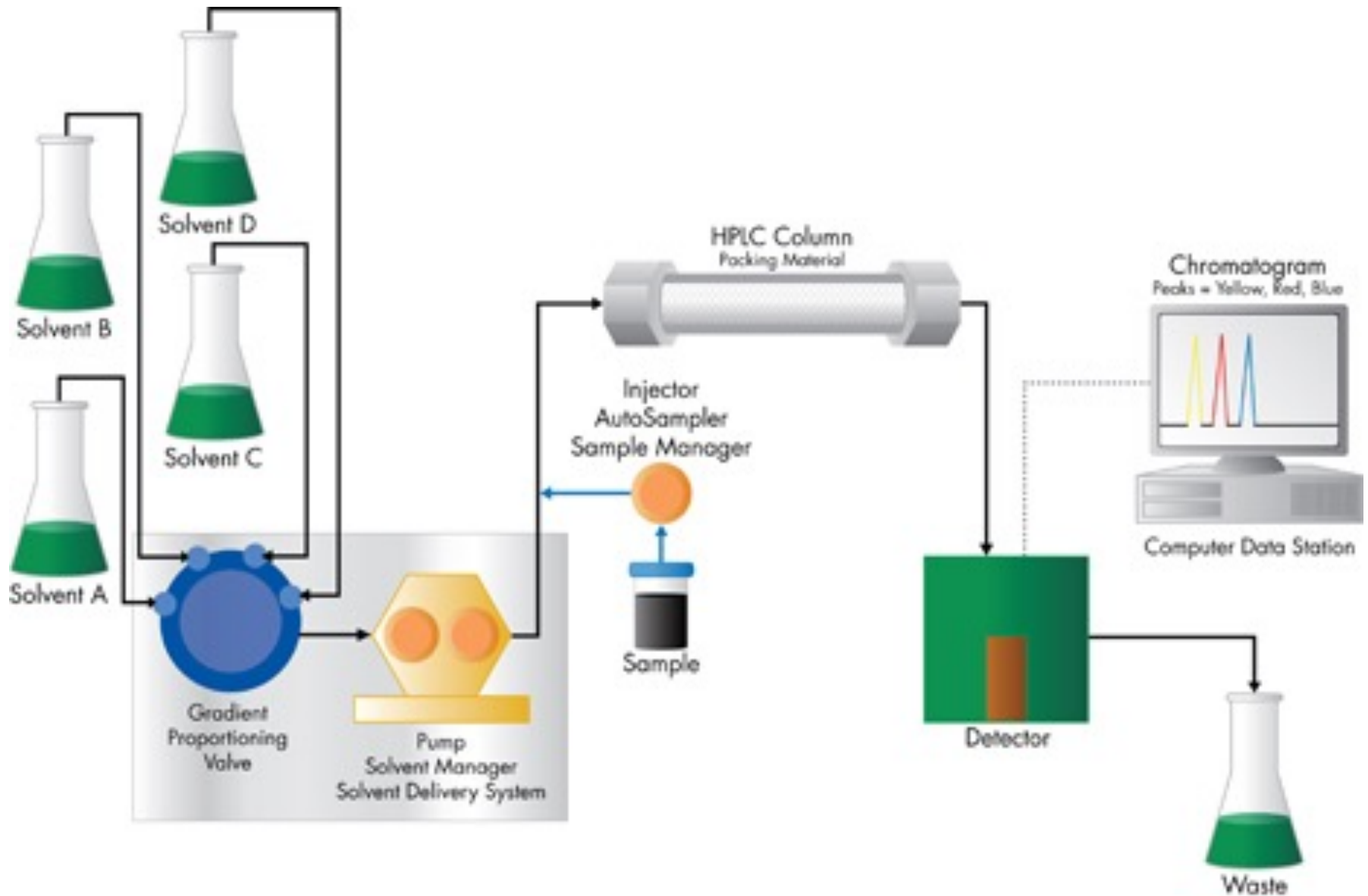
- pha động là chất lỏng.
- pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một chất lỏng đã phủ lên một chất mang rắn hay là một chất mang đã được biến đổi bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ.



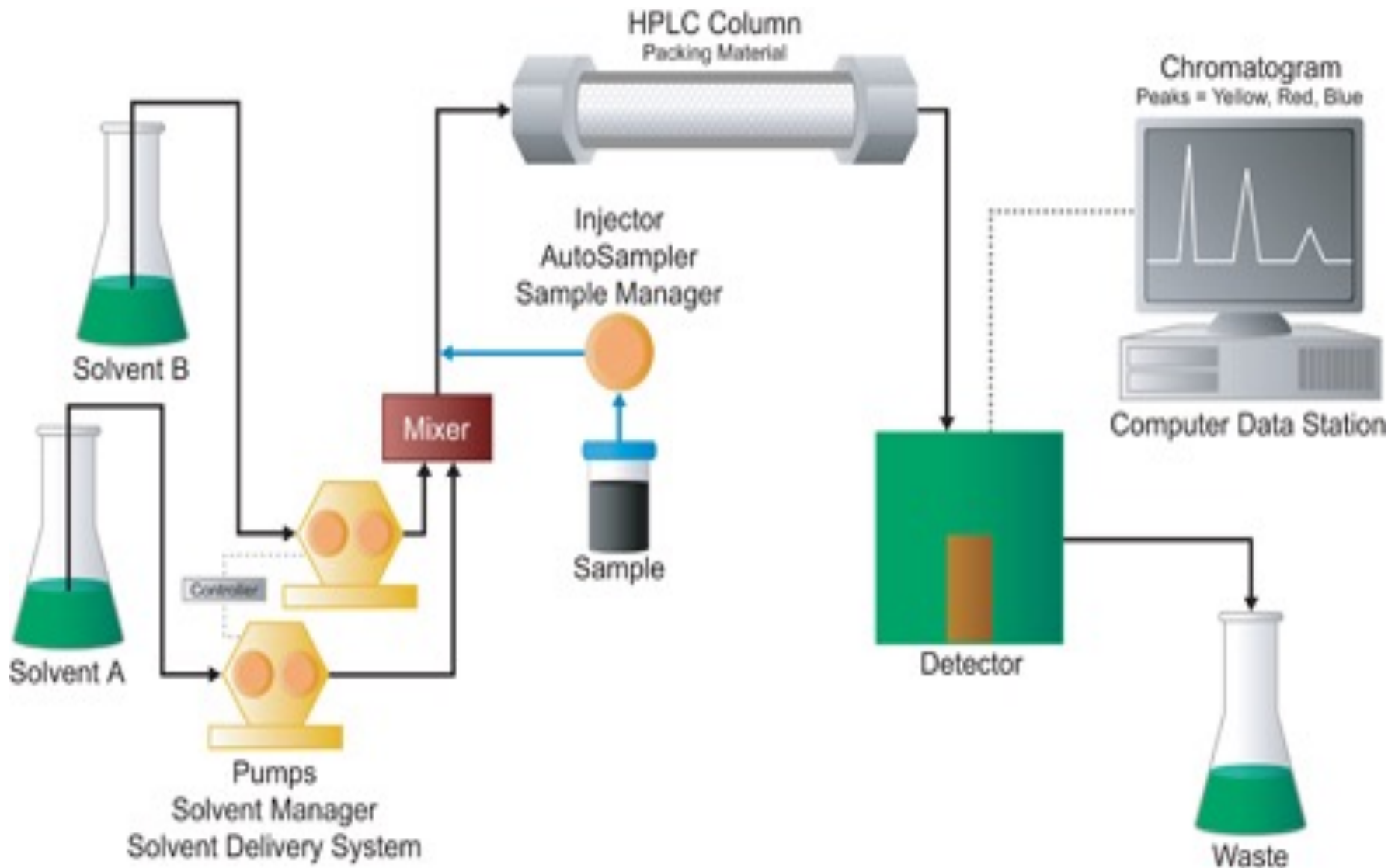
Pha động

- Thường là 2 dung môi hòa tan vào nhau để có khả năng tách với độ phân giải phù hợp
- Trước khi sử dụng cần lọc (màng lọc $0,45 \mu\text{m}$) và đuổi khí hòa tan trong pha động (lọc dưới áp suất giảm, siêu âm, sục khí trơ)
- Có 2 cách dùng pha động rửa giải:
 - Đẳng dòng (isocratic): thành phần pha động không thay đổi trong quá trình sắc ký
 - Gradient: pha động là hỗn hợp của nhiều dung môi. Tỷ lệ các thành phần thay đổi trong quá trình sắc ký theo chương trình đã định (chương trình dung môi)

- Chương trình dung môi áp suất thấp



- Chương trình dung môi áp suất cao



Cột sắc ký (thép không gỉ / thủy tinh đặc biệt)

- **Cột phân tích: dài 10 – 30cm, $d = 4 – 10$ mm, kích thước hạt nhồi cột 5 hoặc $10\mu\text{m}$**
- **Cột chế hóa: dài 25 – 100cm, $d = 6$ mm, chất nhồi cột tùy thuộc kiểu sắc ký được thực hiện**
- **Cột bảo vệ: được đặt trước cột sắc ký để loại các chất có mặt trong pha động và trong mẫu phân tích làm giảm tuổi thọ của cột phân tích**

Pha tĩnh

- Là dẫn chất khác nhau của siloxane hoặc polymer (polysaccharide, polystyren) tùy thuộc vào kỹ thuật
- Thường là hạt hình cầu, $d = 3 - 10 \mu\text{m}$
- Kích thước hạt càng nhỏ, chiều cao H của đĩa càng giảm
→ số đĩa lý thuyết tăng, nhưng lực cản đối với pha động lớn → đòi hỏi áp suất đầu vào lớn

- **Silica, nhôm oxyd hoặc than hoạt tính dạng xốp thường được dùng trong sắc ký pha thuận mà quá trình phân tách dựa trên sự khác nhau về khả năng hấp phụ hoặc (và) phân bố khối lượng**
- **Nhựa hoặc polymer có chứa các nhóm chức acid hoặc base, sử dụng trong sắc ký trao đổi ion mà trong đó sự chia tách được thực hiện dựa trên sự cạnh tranh giữa các ion cần tách và các ion trong pha động.**

- **Silica xốp hoặc polymer, sử dụng trong sắc ký rây phân tử, ở đó sự chia tách dựa trên sự khác nhau về thể tích phân tử, tương ứng với sự loại trừ không gian.**
- **Pha tĩnh loại biến đổi hoá học đặc biệt, ví dụ như dẫn xuất của cellulose và amylose, protein hay peptid, cyclodextrin ... dùng để phân tách các đồng phân đối quang (sắc ký bất đối).**

- Các pha liên kết dùng phổ biến là:



So sánh pha thường và pha đảo

Thông số	Normal Phase	Reversed Phase
Độ phân cực của cột	Cao	Thấp
Độ phân cực của dung môi	Thấp	Cao
Thứ tự rửa giải	Chất kém phân cực ra trước	Chất phân cực ra trước
Tăng độ phân cực dung môi	Rửa giải nhanh hơn	Rửa giải chậm hơn

- **Dung môi pha động sử dụng cho sắc ký lỏng pha thuận**
- **Dung môi chủ yếu (không phân cực) :**
 - Hydrocarbons (Pentane, Hexane, Heptane, Octane)
 - Aromatic Hydrocarbons (Benzene, Toluene, Xylene)
 - Methylene chloride
 - Chloroform
 - Carbon tetrachloride
- **Dung môi phụ (phân cực hoặc hơi phân cực) :**
 - Methyl-t-butyl ether (MTBE), Diethyl ether, Tetrahydrofuran (THF), Dioxane, Pyridine, Ethyl acetate, Acetonitrile, Acetone, 2-propanol, ethanol, methanol
- **Dung môi chủ yếu được sử dụng chính làm pha động, dung môi phụ thường được thêm vào với tỉ lệ nhất định để thay đổi thời gian lưu.**

- **Các dung môi sử dụng trong HPLC pha đảo**

- Dung dịch đệm + dung môi hữu cơ

- Khi sử dụng dung dịch đệm, nồng độ đệm và pH là những thông số rất quan trọng.

- Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) ...là các dung môi thường sử dụng nhất cho sắc ký pha đảo.

- Việc tối ưu hóa tỉ lệ của dung dịch đệm và dung môi hữu cơ cũng rất quan trọng.

- Với cùng một loại vật liệu nhồi cột, tùy theo kích cỡ hạt nhồi cột, hãng chế tạo cột ... thành phần pha động cũng có thể phải thay đổi cho phù hợp

HPLC Columns

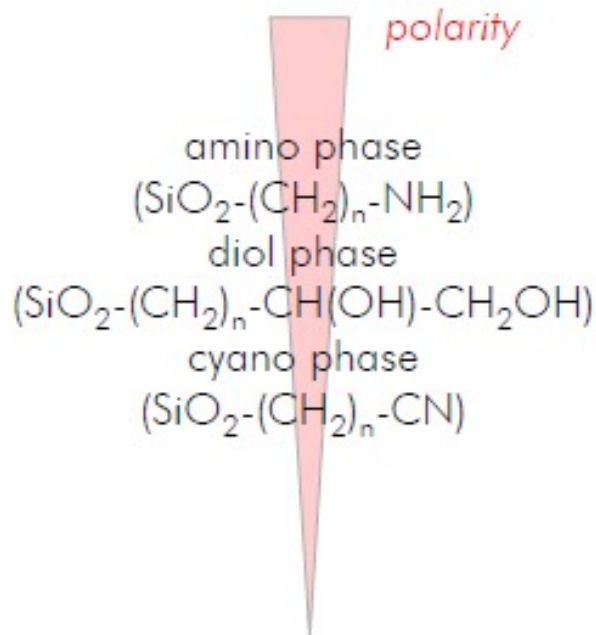


	Stationary phase	Mobile phase	Application
Normal phase HPLC	$\text{Al}_2\text{O}_3, \text{SiO}_2$	hydrocarbons, iso-propanol	non-polar compounds (e.g. hydrocarbons, halohydrocarbons, ethers)
			 Only weak interactions between the sample and the stationary phase is required.
Reversed phase HPLC	$\text{SiO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ ($n = 8 - \text{RP } 8$ or $18 - \text{RP } 18$) "endcapped columns" = quantitative saturation of all OH groups by $-\text{CH}_3$)	water, methanol, acetonitrile	polar compounds (e.g. alcohols, carbon acids)

Table C.1 HPLC solvents

Solvent	Formula	Molecular weight (Daltons)	Boiling pt. (°C)
Acetonitrile	CH ₃ CN	41.05	81.6
Chloroform	CHCl ₃	119.38	61.7
Dichloromethane	CH ₂ Cl ₂	84.93	40.0
Ethanol	CH ₃ CH ₂ OH	46.08	78.5
Ethyl acetate	CH ₃ CO ₂ CH ₂ CH ₃	88.12	77.1
Diethyl ether	(CH ₃ CH ₂) ₂ O	74.12	34.5
Heptane	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH ₃	100.21	98.4
Hexane	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	86.18	69
Methanol	CH ₃ OH	32.04	65
<i>n</i> -Propanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	60.11	97.4
Isopropanol	CH ₃ CH(OH)CH ₃	60.11	82.4
Tetrahydrofuran	C ₄ H ₈ O	72.12	66
Toluene	C ₆ H ₅ (CH ₃)	92.15	110.6
Water	H ₂ O	18.02	100

Table C.2 HPLC volatile buffers

Volatile buffer	Structure	pKa	Buffer range
Trifluoroacetic acid	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$	0.5	3.8–5.8
Formic acid	HCO_2H	3.8	—
Ammonium formate	HCO_2NH_4	3.8	2.8–4.8
Acetic acid	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	4.8	—
Ammonium acetate	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	4.8	3.8–5.8
4-Methylmorpholine	$\text{OC}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CH}_3)$	8.4	7.4–9.4
Ammonium bicarbonate	$\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$	6.3/9.2/10.3	6.8–11.3
Ammonium acetate	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	9.2	8.2–10.2
Ammonium formate	HCO_2NH_4	9.2	8.2–10.2
1-Methylpiperidine	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}(\text{CH}_3)$	10.1	10.0–12.0
Triethylammonium acetate	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_3$	11.0	10.0–12.0
Pyrrolidine	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NH}$	11.3	10.3–12.3

Note: Usually, 1–10 mM buffer concentration is recommended for LC/MS. TFA is known to quench ionization in electrospray LC/MS, leading to lower sensitivity and should be avoided.

KỸ THUẬT THỰC NGHIỆM HPLC

- Thiết bị HPLC:
 - Bơm cao áp
 - Bộ nạp mẫu
 - Cột tách
 - Bộ lọc tạp chất
 - Hệ thống pha động
 - Detector:
 - hấp thụ tử ngoại
 - chiết suất vi sai
 - vận chuyển
 - hấp thụ nhiệt

- **Các kiểu sắc ký lỏng hiệu năng cao:**
 - **Sắc ký phân bố hiệu năng cao**
 - **Sắc ký hấp phụ hiệu năng cao**
 - **Sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao**
 - **Sắc ký lỏng hiệu năng cao trên gel**
 - **Sắc ký ái lực hiệu năng cao**
 - **Sắc ký các đồng phân quang học**

- Một số kỹ thuật HPLC:

- **Kỹ thuật chương trình dung môi (rửa giải gradient trong HPLC)**: giúp rút ngắn đáng kể thời gian phân tích, độ phân giải của phương pháp tăng lên, peak nhọn hơn và độ nhạy tăng lên

- **Kỹ thuật chương trình tốc độ dòng:** làm giảm thời gian phân tích mà không ảnh hưởng đến độ phân giải, không cần tái sinh cột tách như trong chương trình dung môi
- **Kỹ thuật sắc ký ngược pha HPLC – RP:** làm thay đổi tính chất của chất mang và do đó quá trình tách các cấu tử có thể diễn ra theo một thứ tự ngược lại

Các phương pháp nâng cao độ phân giải trong HPLC

- ✓ **Tăng chiều dài của cột (Increase column length)**
- ✓ **Giảm đường kính của cột (Decrease column diameter)**
- ✓ **Giảm lưu lượng pha động (Decrease flow-rate)**
- ✓ **Pha tĩnh (vật liệu nhồi cột) đồng nhất (Uniform stationary phase (packing))**
- ✓ **Giảm thể tích bơm mẫu (Decrease sample size)**
- ✓ **Lựa chọn pha tĩnh sạch hơn (Select proper stationary phase)**
- ✓ **Lựa chọn pha động tinh khiết hơn (Select proper mobile phase)**
- ✓ **Sử dụng áp suất ổn định hơn (Use proper pressure)**
- ✓ **Thành phần của pha động thay đổi hợp lý (Use gradient elution)**

QUÁ TRÌNH SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION TRONG HPLC

Pha động chỉ có thể là chất lỏng. Việc ứng dụng sắc ký trao đổi ion vào kỹ thuật HPLC đòi hỏi pha động phải đáp ứng được các yêu cầu sau :

- Trơ đối với pha tĩnh**
- Phải hoà tan được mẫu phân tích**
- Phải bền vững theo thời gian**
- Có độ tinh khiết cao**
- Nhanh đạt đến cân bằng trong quá trình tách**
- Phù hợp với detector sử dụng.**

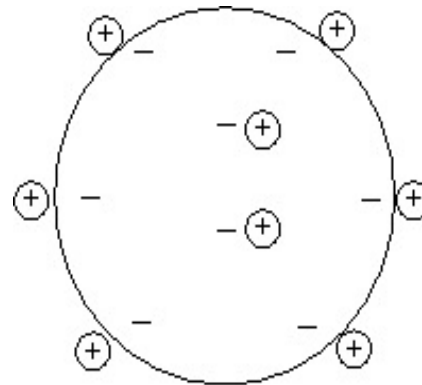
Các loại dung môi được sử dụng làm pha động trong HPLC : metanol, axetonitril, benzen, n-hexan, nước

QUÁ TRÌNH SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION TRONG HPLC

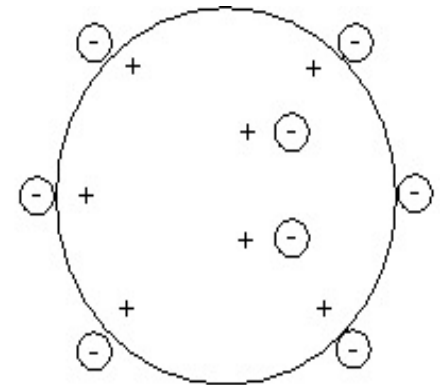
Pha tĩnh là chất rắn, là những hạt hình cầu rất nhỏ, có cấu tạo hoá học là polymer, nên được gọi là các hạt nhựa. Bề mặt của hạt mang các nhóm chức ở dạng ion.

Có hai loại nhựa:

- Nhựa trao đổi anion mang nhóm chức có điện tích dương nên nhựa bắt giữ các ion âm của pha động.
- Nhựa trao đổi cation mang nhóm chức có điện tích âm nên nhựa bắt giữ các ion dương của pha động.



A



B

A Cation exchange resin with bound positive counterions

B Anion exchange resin with bound negative counterions

QUÁ TRÌNH SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION TRONG HPLC

Các yêu cầu đối với pha tĩnh sử dụng trong HPLC :

- Trơ và bền vững với các điều kiện trong môi trường sắc ký
- Có khả năng tách chọn lọc một hỗn hợp chất tan trong điều kiện sắc ký nhất định
- Tính chất bề mặt phải ổn định
- Có độ tinh khiết cao
- Nhanh đạt các cân bằng động học
- Cỡ hạt phải tương đối đồng nhất

Các nguyên liệu sử dụng làm pha tĩnh

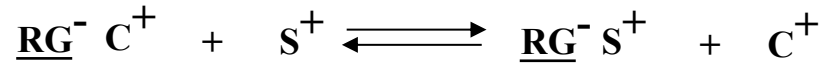
Pha tĩnh trên nền silica gel

Pha tĩnh trên nền nhôm oxit

Pha tĩnh trên nền hợp chất cao phân tử

Pha tĩnh trên nền mạch Cacbon

QUÁ TRÌNH SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION TRONG HPLC



R : pha tĩnh còn được gọi là nhựa (resin).

G : nhóm chức mang điện tích được cố định trên pha tĩnh. Còn được gọi là nhóm chức hoạt động của nhựa.

C : đối -ion của G.

S : chất hữu cơ có mang điện tích trái dấu với G.

MỘT SỐ ỨNG DỤNG

- PP sắc ký lỏng hiệu năng cao được sử dụng để tách các acid nucleic, Aa, vitamin, glucid, các dược phẩm, các steroid, thuốc bảo vệ thực vật, các phức chất...

Application	Column	Detector	Conditions ^{a,b}
1. Vitamins (water soluble)	C ₁₈	UV (254 nm)	8% AN/H ₂ O, C ₇ SO ₃
2. Vitamins (fat soluble)	C ₁₈	UV (280 nm)	80% AN/H ₂ O
3. Steroids	C ₁₈	UV (230 nm)	60% MeOH/H ₂ O
4. Triglycerides	C ₈	UV (220 nm)	60% AN/H ₂ O
5. Phospholipids	Si	UV (206 nm)	130/5/1.5AN/MeOH/ 85% H ₃ PO ₄
6. Prostaglandins	C ₁₈	UV (192 nm)	35% AN/H ₂ O, PO ₄ , pH 2.5
7. Bromphenacyl acids	C18	UV (254 nm)	15–80% AN/H ₂ O
8. Krebs cycle acids	RNH ₂	UV (210), RI, CAD	25–250mM PO ₄ , pH 2.5
9. Monosaccharides	CX-Ca	UV (195 nm), RI, CAD	H ₂ O (80°C)
10. Polysaccharides	TSKpw	UV (195 nm), RI, CAD	H ₂ O (<20% AN)
11. Nucleic acids	CX-Na	UV (254 nm)	0.4M NH ₄ HCO ₂ , pH 4.6
12. Nucleosides	C ₁₈	UV (254 nm)	8% MeOH/H ₂ O, PO ₄ , pH 5.5
13. Nucleotides	C ₁₈	UV (254 nm)	20% AN/H ₂ O, TBA, PO ₄ , pH 2.6
14. PTH amino acids	C ₁₈	UV (254 nm)	10% THF/5 mM AcOH →10% THF/AN
15. OPA amino acids	C ₁₈	Fl (230/418)	8% AN/PO ₄ , pH1.6→ 3/25/30/40–DMSO/ MeOH/AN/H ₂ O

Application	Column	Detector	Conditions ^{a,b}
16. Peptides (<99 amino acids)	C ₈	UV (254 nm)	→30% n-BuOH/0.1% TFA, H ₂ O
17. Peptides	C ₃	UV (210 nm)	40–70% AN/H ₂ O, PO ₄ , pH 5.5
18. Proteins (enzymes)	TSK _{SW}	UV (254,280)	0.1 M Tris, PO ₄ , pH 7.0
19. Proteins (enzymes)	TSK _{DEAE}	UV (280 nm)	50 mM PO ₄ , pH 7.5→ +150 mM NaCl
20. Proteins (structure)	C ₃	UV (280 nm)	0.1% TFA→75% AN, 0.1% TFA
21. Catecholamines	C ₁₈	UV (270 nm)	6% MeOH/H ₂ O, C ₈ SO ₃ , EDTA, PO ₄ , pH 4.
22. Theophylline	C ₁₈	UV (270 nm)	7% AN/H ₂ O, PO ₄ , pH 4.0
23. Anticonvulsants	C ₁₈	UV (220 nm)	40% MeOH/H ₂ O
24. Tricyclic antidepressants	C ₁₈	UV (254 nm)	55% AN/H ₂ O, C ₅ SO ₃ , pH 5.5
25. Aspirin, acetaminophen	C ₁₈	UV (254 nm)	10% AN/H ₂ O, AcOH, pH 2.5
26. Aflatoxins	Si	UV (235), FI, CAD	6% MeOH/hexane
27. PNA	C ₁₈	UV (254 nm)	80% AN/H ₂ O
28. Pesticides (carbamate)	C ₁₈	UV (192), RI, CAD	50% MeOH/H ₂ O
29. Pesticides (PO ₄)	C ₁₈	UV (192), CAD	50% MeOH/H ₂ O
30. Pesticides (chlorinated)	C ₁₈	UV (220 nm) CAD	80% AN/H ₂ O

^a These separations are intended as a guide. They are not intended as recommended or standard procedures for *in vivo* diagnosis. Conditions will vary from compound to compound and from column to column.

^b Abbreviations: AN, acetonitrile; AcOH, acetic acid; CAD, charged aerosol detector; DMSO, dimethyl sulfoxide; PO₄, pH 2.6, phosphate buffer, pH 2.6; RI, refractive index detector; TFA, trifluoroacetic acid; C₇SO₃, heptane sulfonate; TBA, tertiary butylamine; UV, ultraviolet detector.

Capillary Electrophoresis

ĐIỆN DI MAO QUẢN