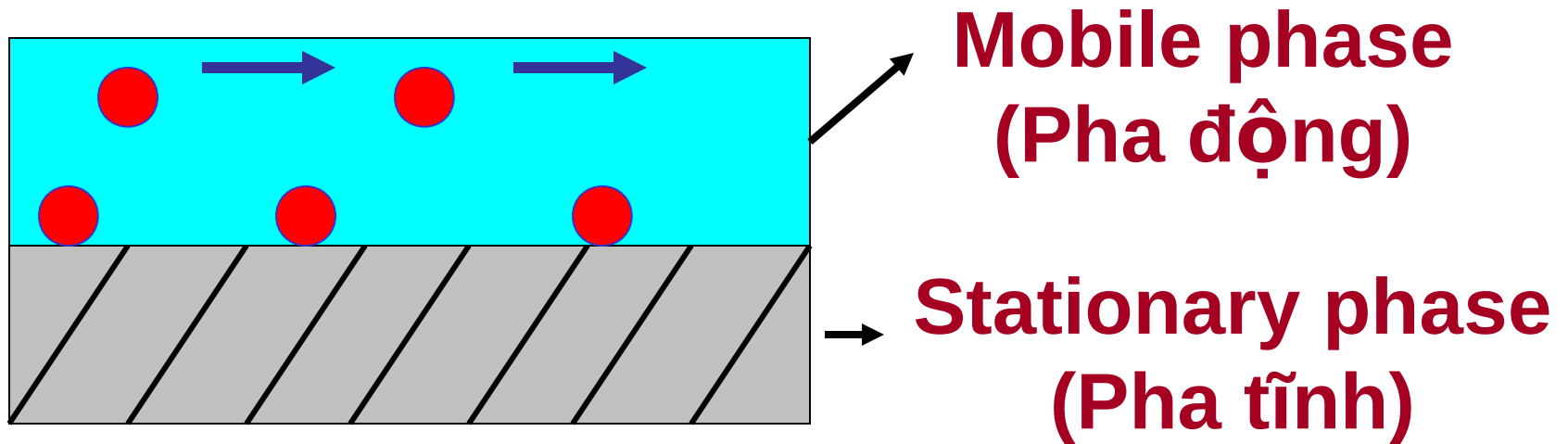


**Sắc ký lỏng**

# 1. Khái niệm về kỹ thuật sắc ký lỏng

- Phương pháp tách
- Các cấu tử được tách phân bố giữa

**pha tĩnh và pha động**



- Quá trình tách dựa vào tính chất hóa học, vật lý và hóa lý của các chất.
- Dựa trên 2 quá trình:
  - Hấp phụ
  - Giải hấp phụ
- Xảy ra liên tục giữa 2 pha:
  - Pha tĩnh: chất rắn hoặc lỏng**
  - Pha động: chất lỏng** (1 chất hoặc hỗn hợp nhiều chất)

**Pha động:** hòa tan và di chuyển chất phân tích

**Pha tĩnh:** giữ chất phân tích

## **SKL chia thành 2 nhóm**

- SK lỏng áp suất thường (sắc ký cổ điển)
- SK lỏng áp suất cao (SKL hiệu năng cao:

**HPLC)**

(High Performance Liquid Chromatography)

**Dựa vào bản chất của quá trình sắc ký,**

**HPLC:**

- SK phân bố
- SK pha thường (normal phase chromatography)
- SK pha đảo (reversed phase chromatography)
- Sk trao đổi ion (ion exchange chromatography)
- SK ghép cặp ion (ion pair chromatography)

## - Dựa vào trạng thái pha tĩnh

Pha động: Lỏng

Pha tĩnh: **Lỏng**



SK lỏng – lỏng (LLC)

(Liquid – liquid chromatography)

Pha động: lỏng

Pha tĩnh: **Rắn**



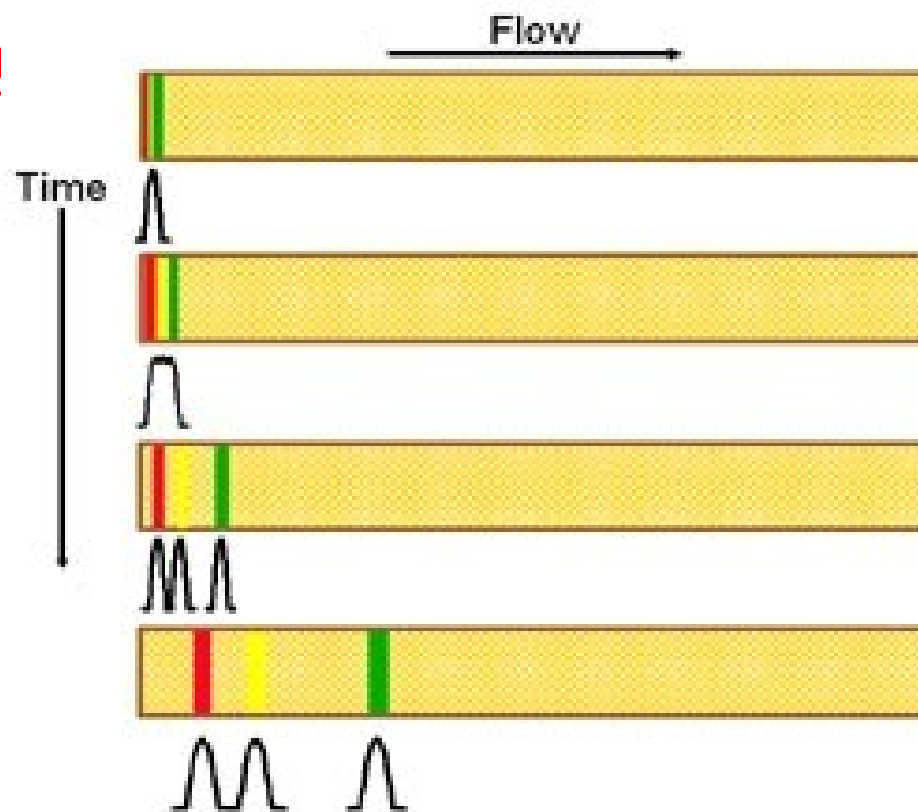
SK lỏng – rắn (LSC)

(Liquid – solid chromatography)

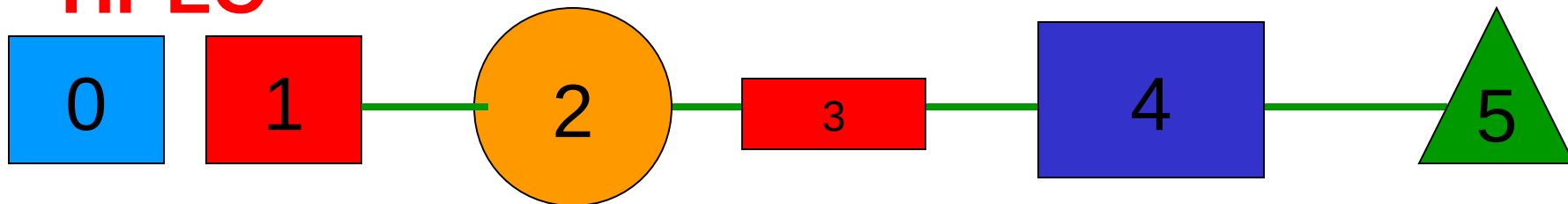
Khi nối với đầu dò (detector), HPLC cho phép:

- **Định tính:** dựa vào **thời gian lưu**

- **Định lượng tích peak** hoặc diện tích peak



## 2. Nguyên tắc cấu tạo của hệ thống máy HPLC



**0:** Nguồn cung cấp pha động (ví dụ như bình chứa pha động)

- Bình chứa pha động





# 1: Bơm cao áp (hệ thống cung cấp dung môi)

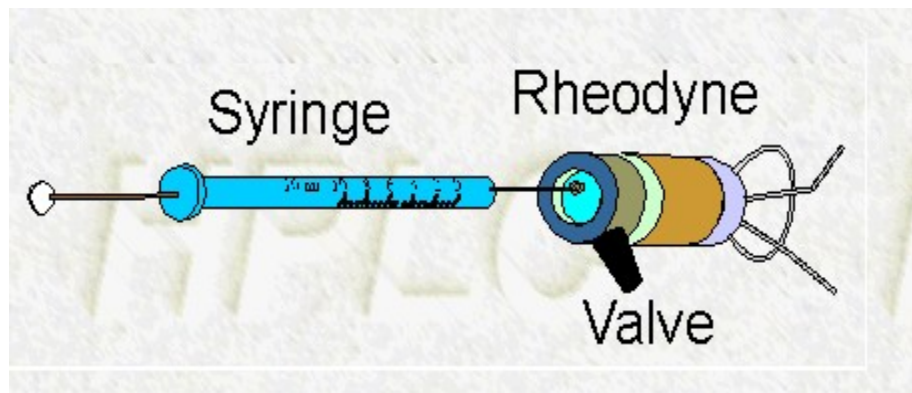
- Bơm pha động vào cột tách
- Điều khiển tốc độ dòng, áp suất của pha động



## 2. Van bơm mẫu (Injection valve):

- Bơm mẫu PT vào cột tách theo những lượng mẫu nhất định

### Tiêm mẫu bằng tay



### Tiêm mẫu tự động (Auto sampler)



### 3: Cột tách (Column)

- Cột chứa pha tĩnh

- **Yếu tố quyết định quá trình tách sắc ký**



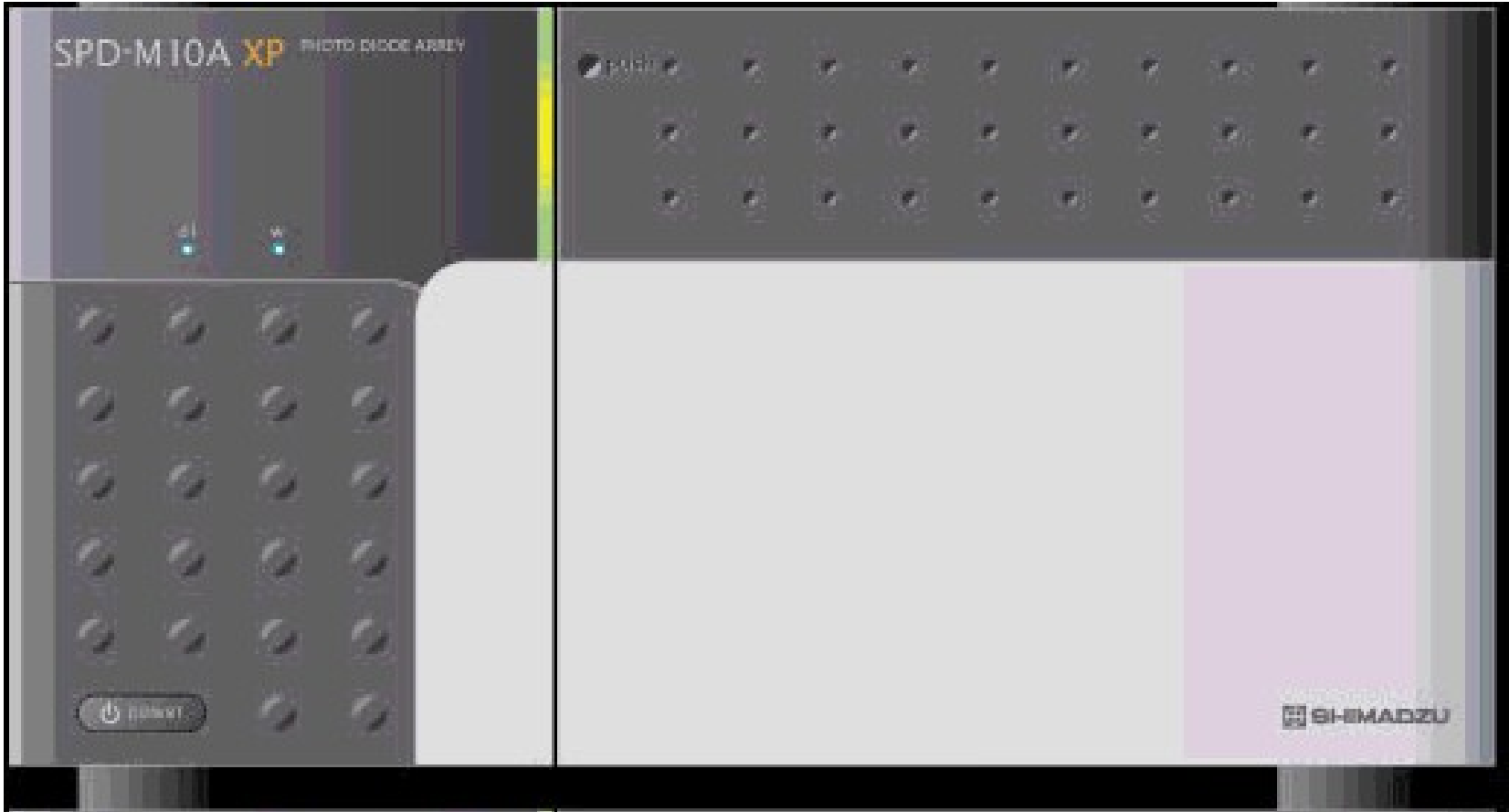
- Cột tách có kích cỡ khác nhau

- Chiều dài: 10 – 25cm

- Đường kính: 2 – 5mm

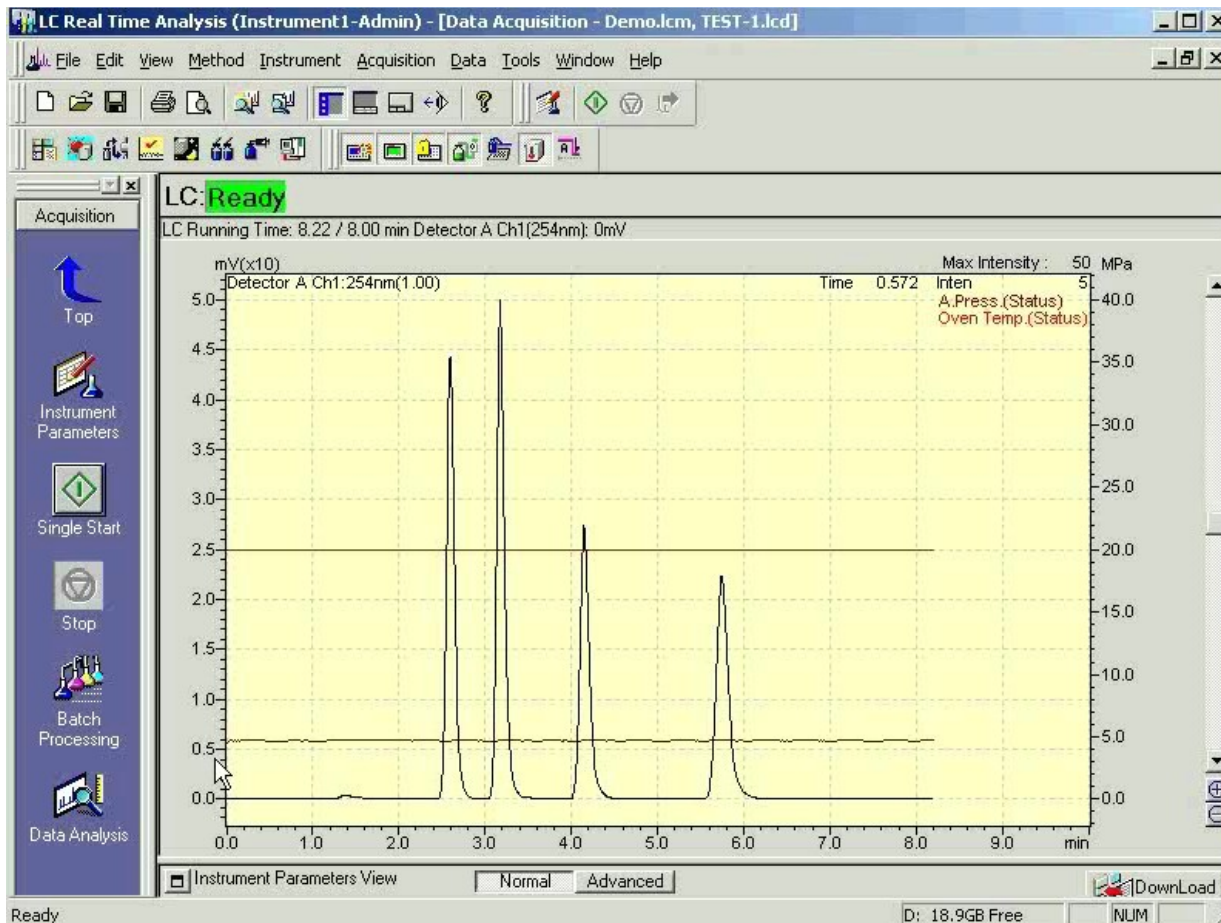
## 4: Đầu dò (detector)

- Thiết bị **phát hiện chất phân tích** (định tính và định lượng)
- Có nhiều loại khác nhau tùy mục đích phân tích: **UV-VIS, Huỳnh Quang, Nồng Độ Dẫn, Nhiệt Hòa, K hoái Phỏ, ..**



# 5. Hệ thống ghi nhận và xử lý tín hiệu:

- Thu thập và xử lý kết quả
- Recorder, Computer + printer, software



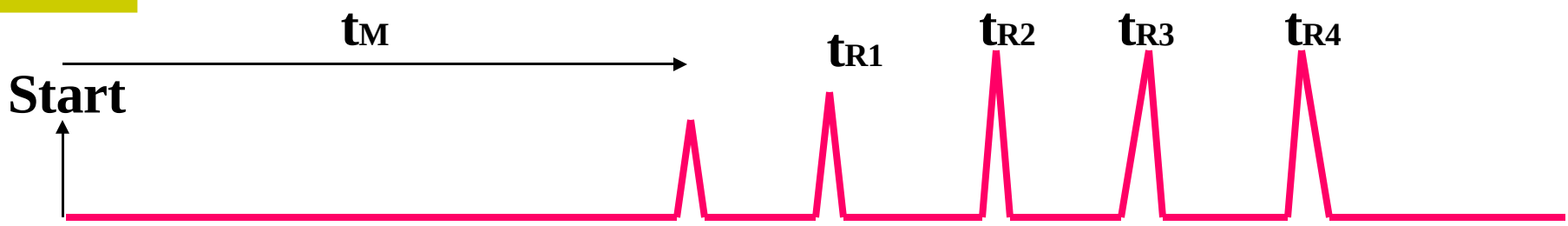
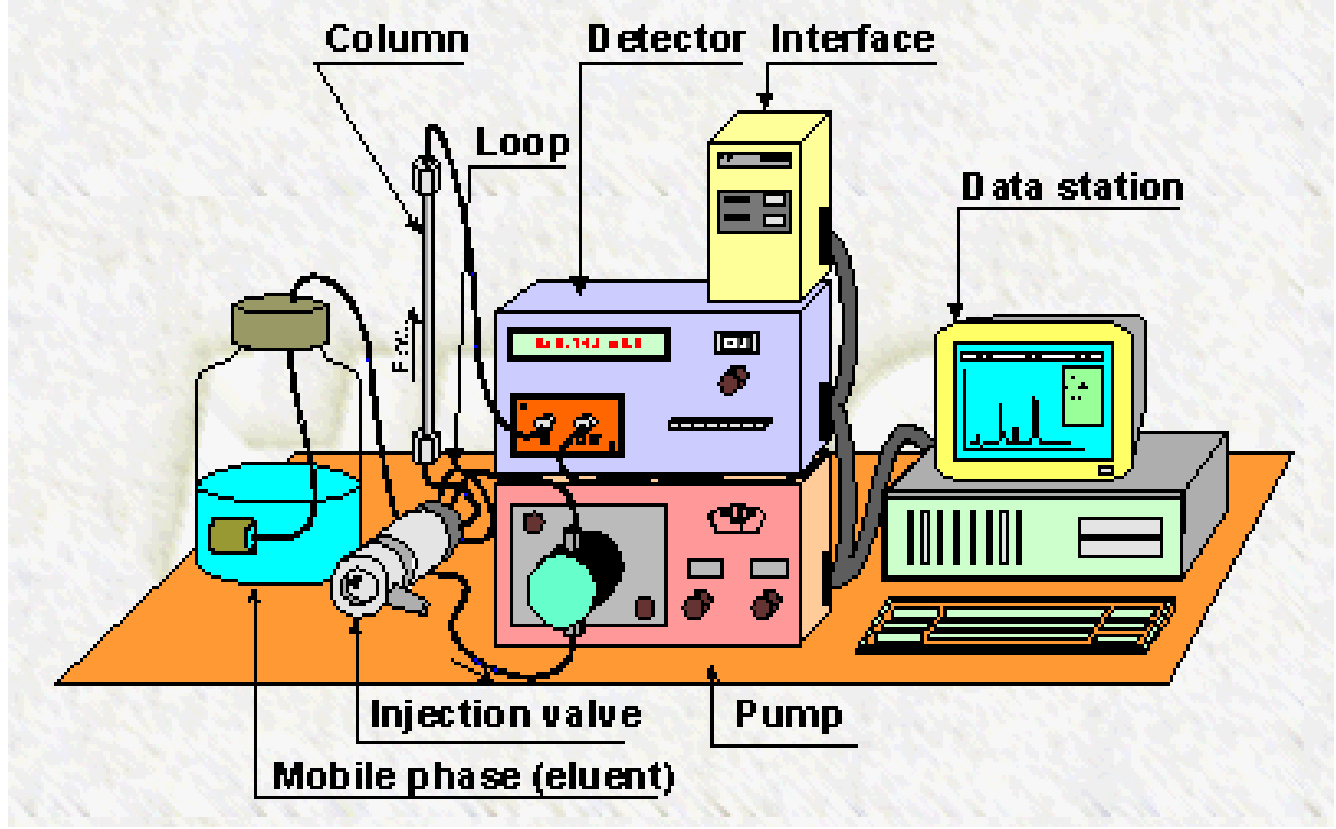
Injector

# Hệ thống HPLC đơn giản

Column

Mobile phase

Detector



# Detector

♣ **UV-Vis:** detector phổ hấp thụ phân tử

→ Xác định các chất có khả năng hấp thụ quang

♣ **Huỳnh quang (Fluorescence detector):** xác định các chất có khả năng phát huỳnh quang

- Aflatoxin, Mycotoxin, Amino Acid, thuốc trừ sâu họ Carbamate,....

♣ **Đầu dò chỉ số khúc xạ (Refractive Index Detector: RI)**



♣ **Đầu dò độ dẫn** (Conductivity detector):

Xác định các ion vô cơ, hữu cơ

♣ **Đầu dò khối phổ** (MS: mass spectrometry)

Xác định phần lớn các chất hữu cơ

### 3. Các quá trình tách trong sắc ký lỏng

- Quá trình quan trọng nhất trong phương pháp sắc ký
- Những cân bằng động xảy ra giữa pha tĩnh và pha động trong cột sắc ký
- Là sự vận chuyển và phân bố liên tục của chất PT từ đầu cột đến cuối cột

- Chất phân tích luôn phân bố giữa 2 pha, trong đó pha động luôn chảy qua cột tách với một tốc độ nhất định hoặc gradient
- Hiệu quả của quá trình tách phụ thuộc rất nhiều vào tương tác giữa các chất trong pha tĩnh và pha động
- Mục đích chính của sắc ký là **tách và định tính các chất trong hỗn hợp chất phức tạp**

- Thời gian chất PT bị pha tĩnh lưu giữ (**thời gian lưu**) quyết định bởi:

Bản chất của pha tĩnh, cấu trúc và tính chất của chất PT

Bản chất và thành phần của pha động dùng để rửa giải chất PT ra khỏi cột sắc ký (pha tĩnh)

- Ghi lại toàn bộ quá trình tách sắc ký của hỗn hợp chất PT → sắc ký đồ gồm nhiều peak.

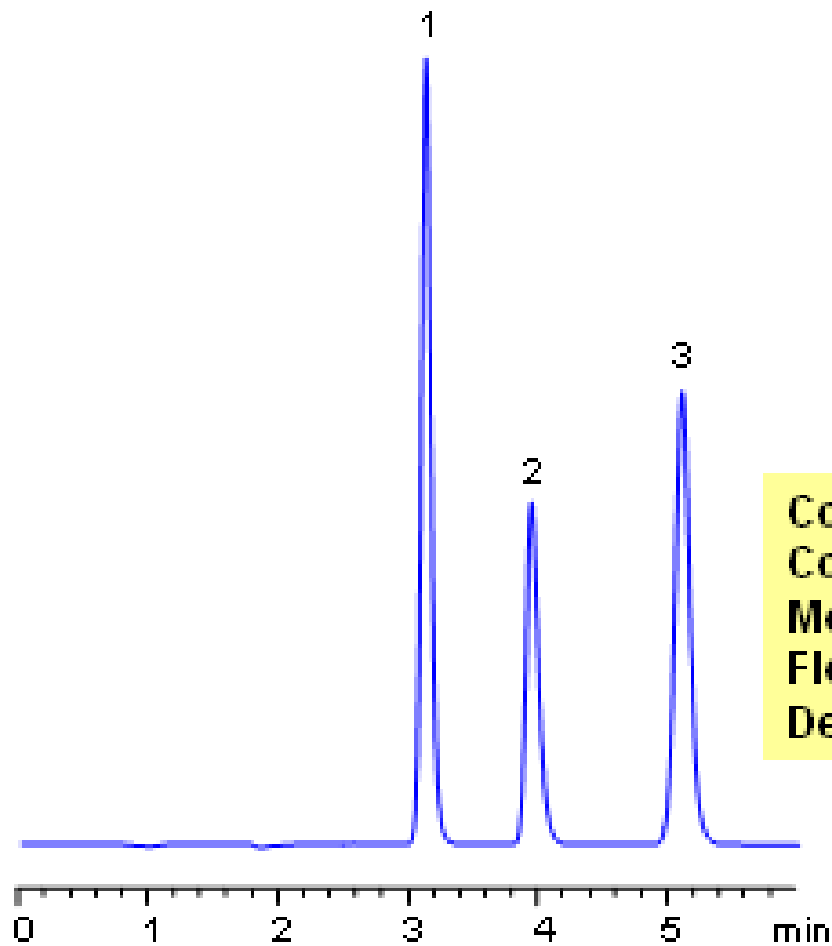
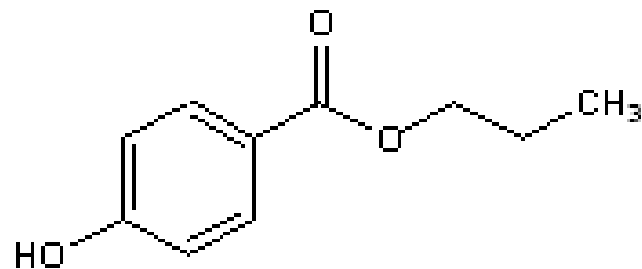
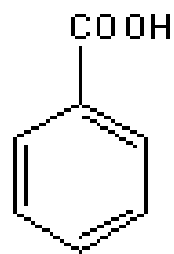
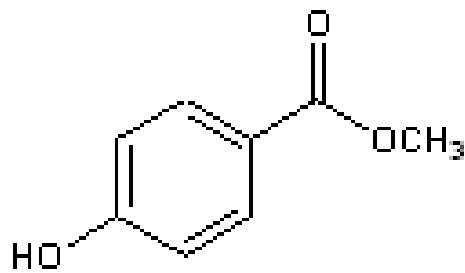
- **Đặc điểm của peak PT:**

Các peak có thể tách rời nhau hoàn toàn

Chập nhau một phần

Chập nhau hoàn toàn

- Sắc ký đồ phản ánh quá trình tách sắc ký trong cột tốt hay không tốt.
- **Tách tốt:** hỗn hợp có **bao nhiêu chất** → **có bấy nhiêu peak riêng biệt** không chập nhau
- **Chất nào bị lưu giữ mạnh sẽ được rửa giải ra sau cùng, chất lưu giữ kém sẽ ra trước**



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

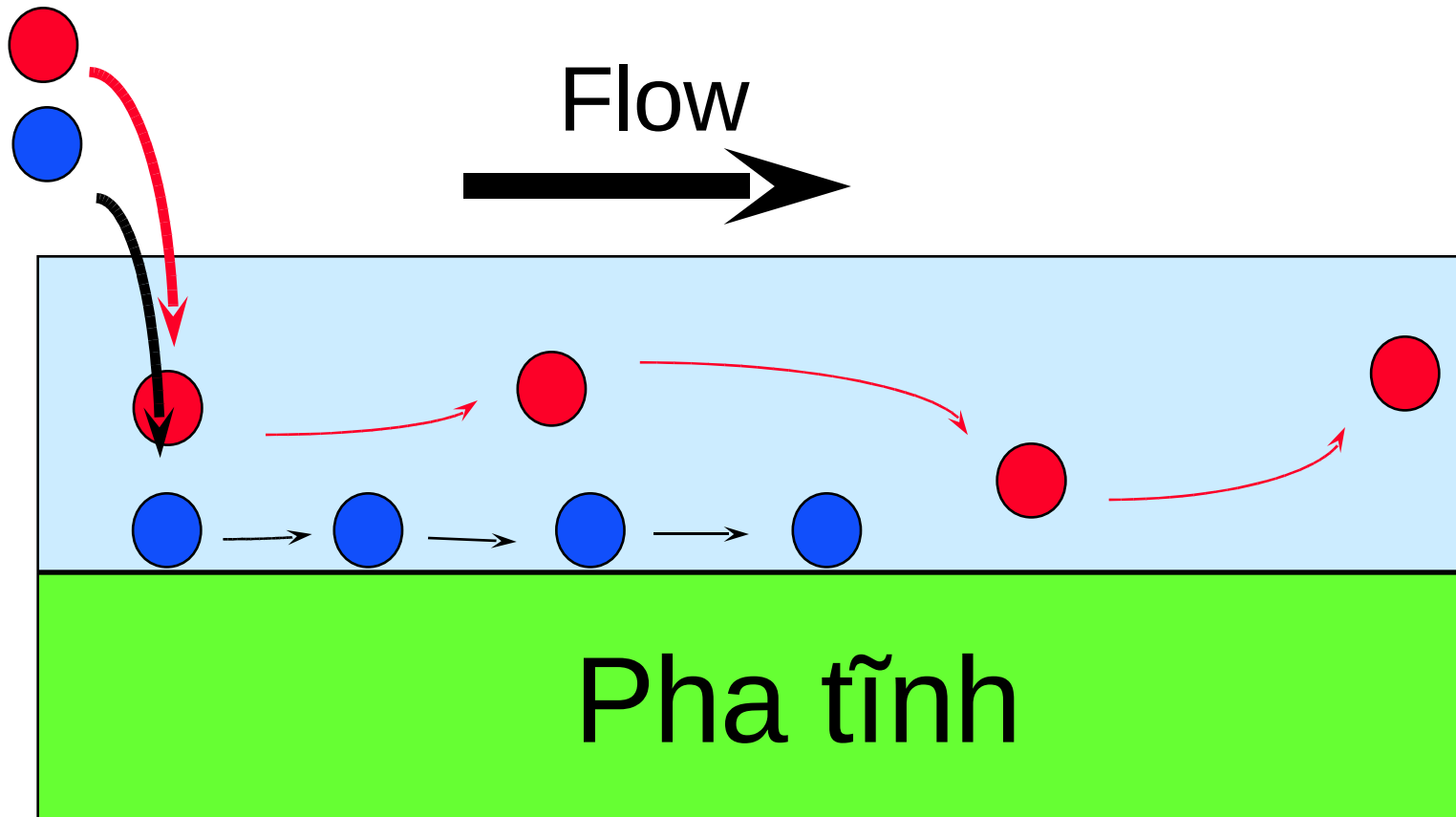
<b>Column:</b>	<b>Primesep B2</b>
<b>Column size:</b>	150 x 4.6 mm
<b>Mobile phase:</b>	MeCN -40%, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -0.1%
<b>Flow rate:</b>	1.0 mL/min
<b>Detection:</b>	UV 210 nm

## 4. Ưu điểm của phương pháp sắc ký

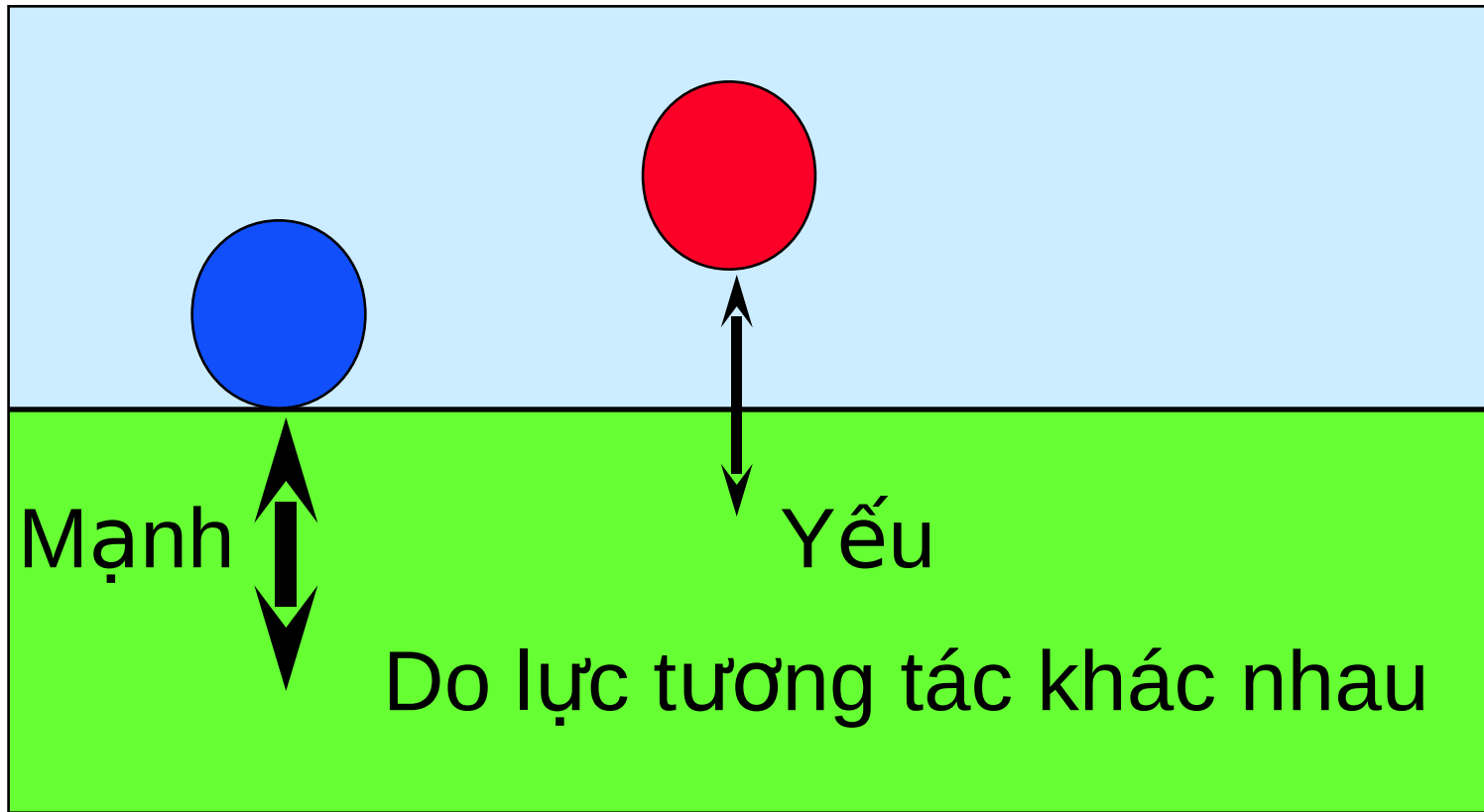
- Có thể phân tích đồng thời nhiều hợp chất
- Không cần làm bay hơi mẫu
- Độ phân giải cao nhờ quá trình tách trên cột
- Độ nhạy cao (ppm-ppb) nhờ đầu dò
- Thể tích mẫu phân tích nhỏ (1-100 $\mu$ L)



# Hỗn hợp chất tách khỏi nhau thế nào ?



# Tại sao lại có sự khác nhau?



# Các cân bằng trong cột HPLC

**Mẫu PT đi qua cột:** tồn tại đồng thời 3 thành phần:

- SP không chuyển động
- Chất PT vừa chuyển động từ đầu cột đến cuối cột, đồng thời phân bố lại giữa SP và MP:

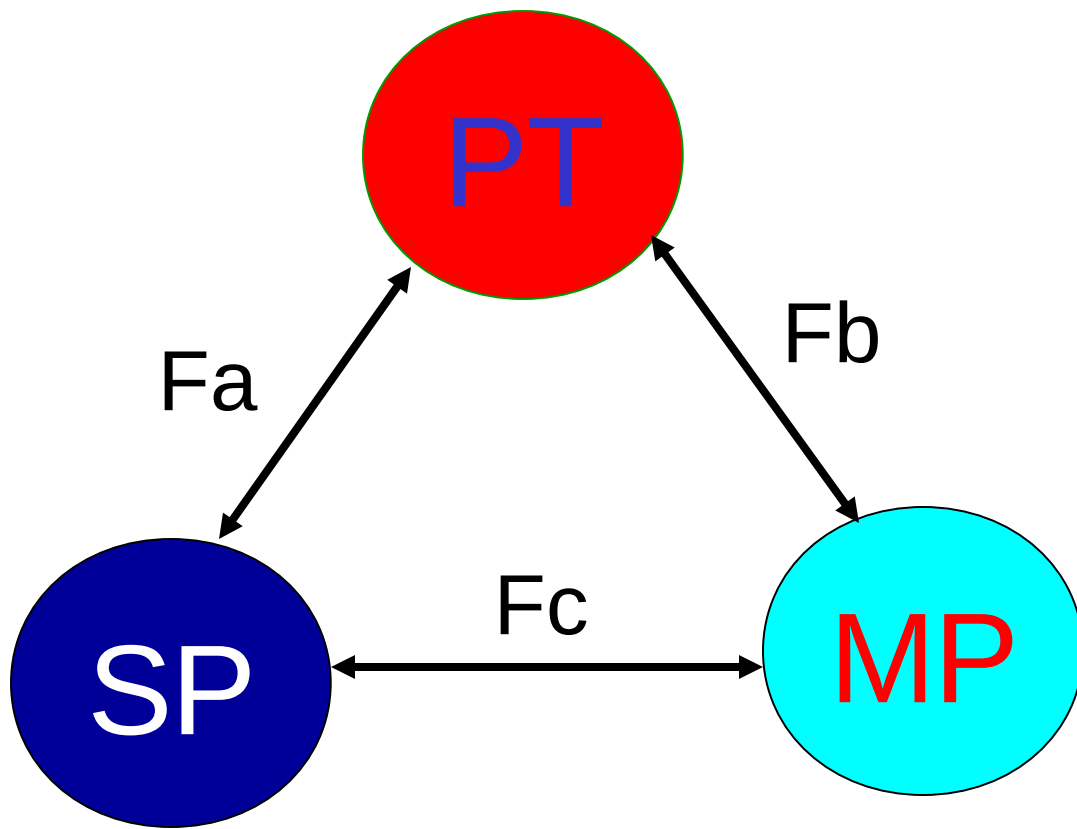
Bị SP hấp phụ, rồi rửa giải bởi MP

- MP: dung môi rửa giải và chuyển động

Tương tác với các chất, lôi kéo và mang chất

### 3 tương tác chính:

- Sự tương tác và cân bằng của chất PT với SP
- Sự tương tác và cân bằng của chất PT với MP
- Sự tương tác của SP và MP

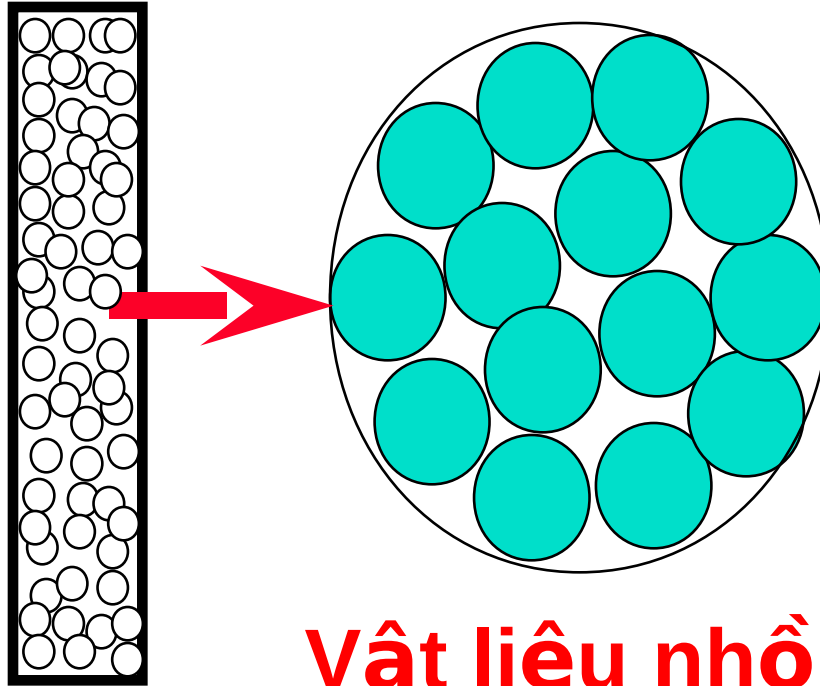


$$F_{\text{tot}} = F_a + F_b + F_c$$

- **Chất nào có lực tương tác lớn nhất sẽ bị giữ lại lâu trên cột**
- **Chất nào có  $F$  nhỏ  $\rightarrow$  bị rửa giải đầu tiên**
- **$F_{\text{tot}}$  khác nhau nhiều thì quá trình tách tốt**

- Quá trình tách diễn ra trong cột sắc ký

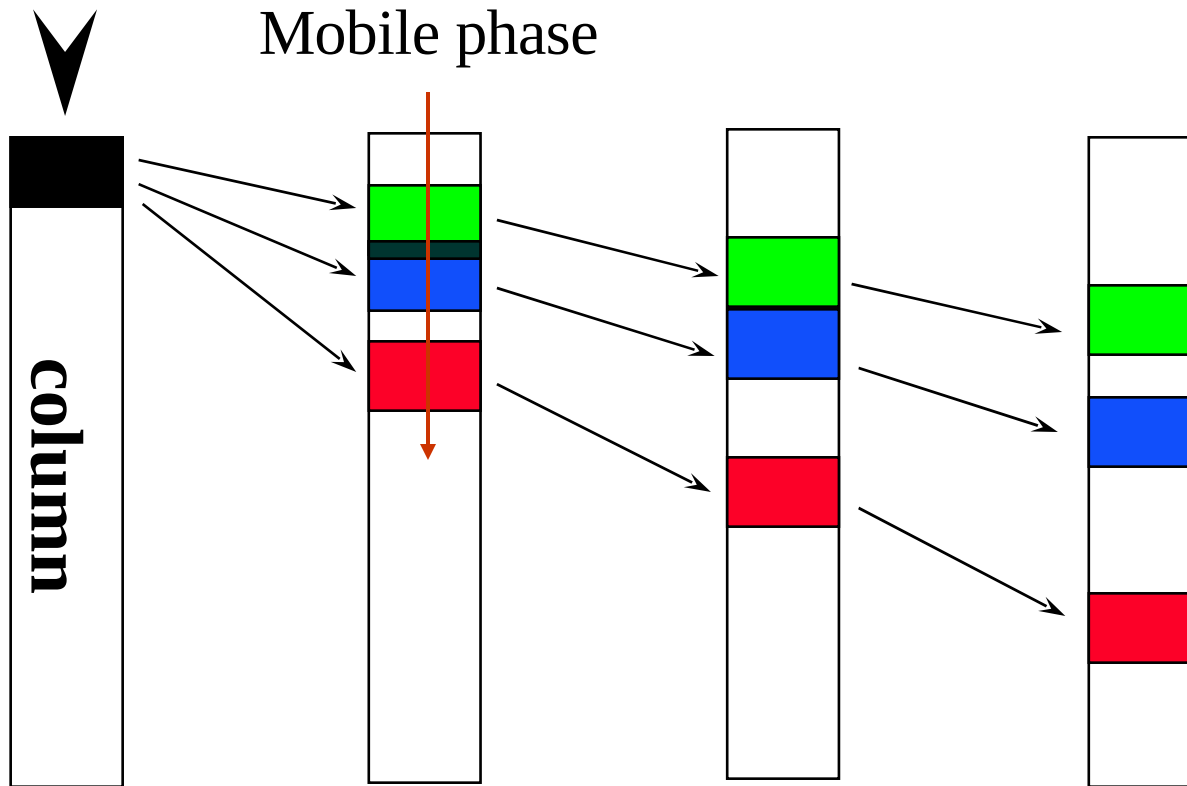
**column**



**Vật liệu nhồi cột 3- 5 $\mu$  m**

# Quá trình tách

mixed sample



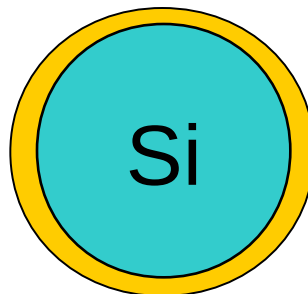
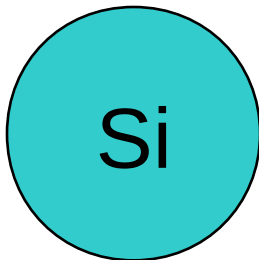
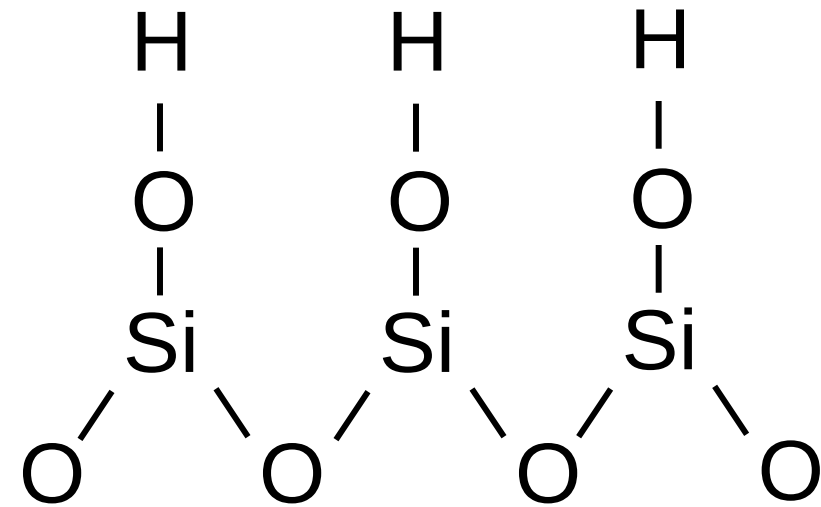


## 5. Sắc ký lỏng pha thường và pha đảo

	<b>Pha thường</b>	<b>Pha đảo</b>
<b>Pha tĩnh</b>	<b>Phân cực</b>	<b>Không phân cực</b>
<b>Pha động</b>	<b>Không phân cực</b>	<b>Phân cực</b>

# Cột nhồi trong sắc ký pha thường

- Cột silica trung tính:



-Bề mặt có chứa nhóm phân cực (ưa nước): -OH

-Xác định các chất không phân cực hoặc ít phân cực

- Cột silica trên nền mạch carbon:



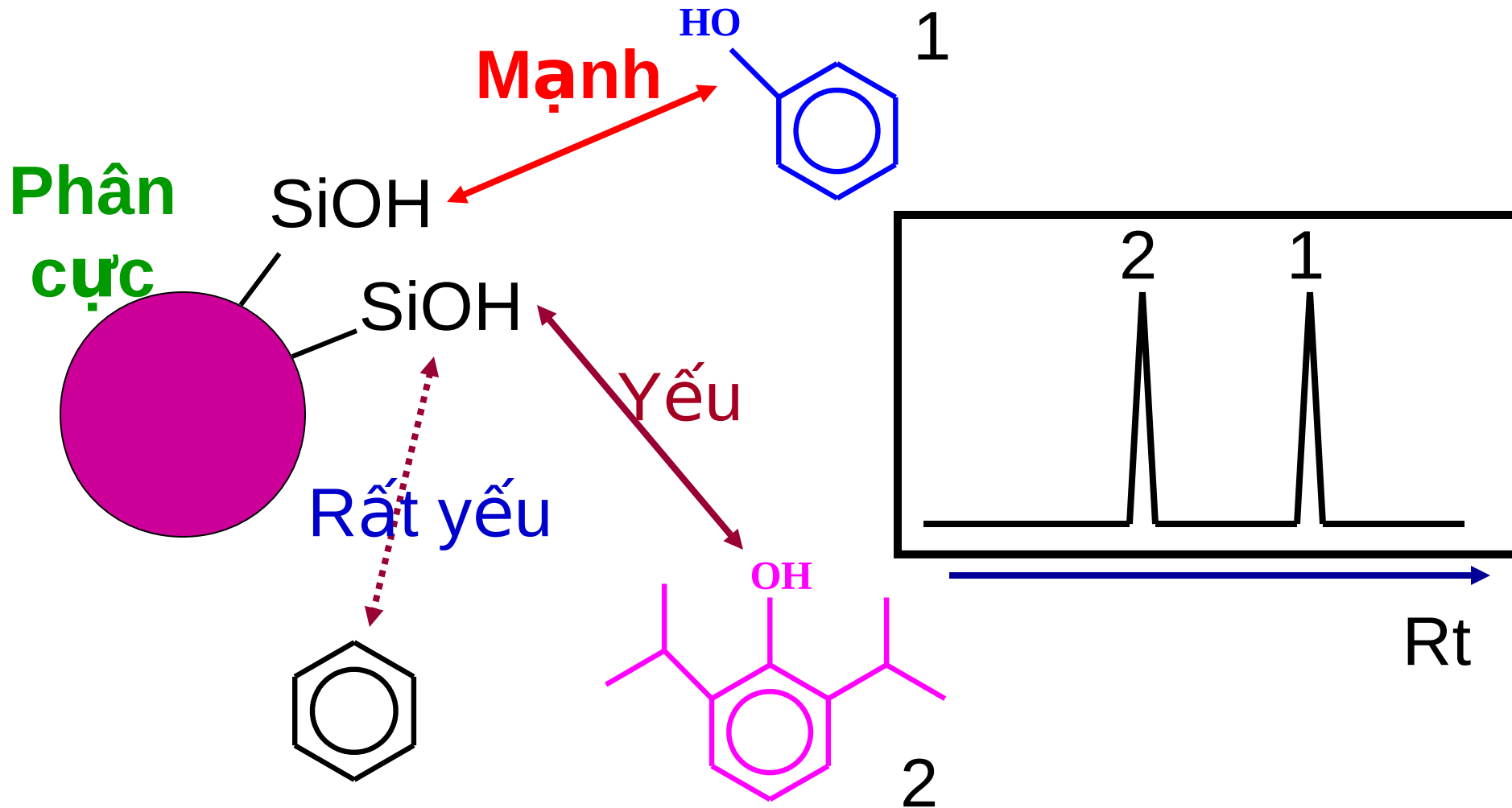
2



+ Cột cyano: đa mục đích

- **Dung môi chủ yếu:** không phân cực
- + Hydrocarbon: hexan, pentan, octan
- + Aromatic hydrocarbon: benzen, toluen, xylen,...
- + Chloroform  $\text{CHCl}_3$
- + Methylene chloride  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- **Dung môi phụ:** phân cực hoặc hơi phân cực
- + Ethanol, methanol,....

# Liên kết hydrogen và thời gian lưu



# Liên kết hydrogen

♣ Mẫu phân tích có:

–COOH: nhóm carboxyl

–OH : nhóm hydroxyl

–NH<sub>2</sub> : nhóm amino

Liên kết  
hydrogen **mạnh**

♣ **Mẫu phân tích có nhóm tert-butyl hoặc các nhóm không phân cực lớn**

→ LK hydrogen sẽ yếu

# Cột nhồi trong sắc ký pha đảo

- **Cột: không phân cực**
- **Pha động: phân cực**
- **Cột silica đã alkyl hóa các nhóm –OH trên bề mặt silica trung tính:**

Cột C18 (ODS)

Cột C8 (octyl)

Cột C4 (butyl)

Cột phenyl

**Bề mặt không phân cực**

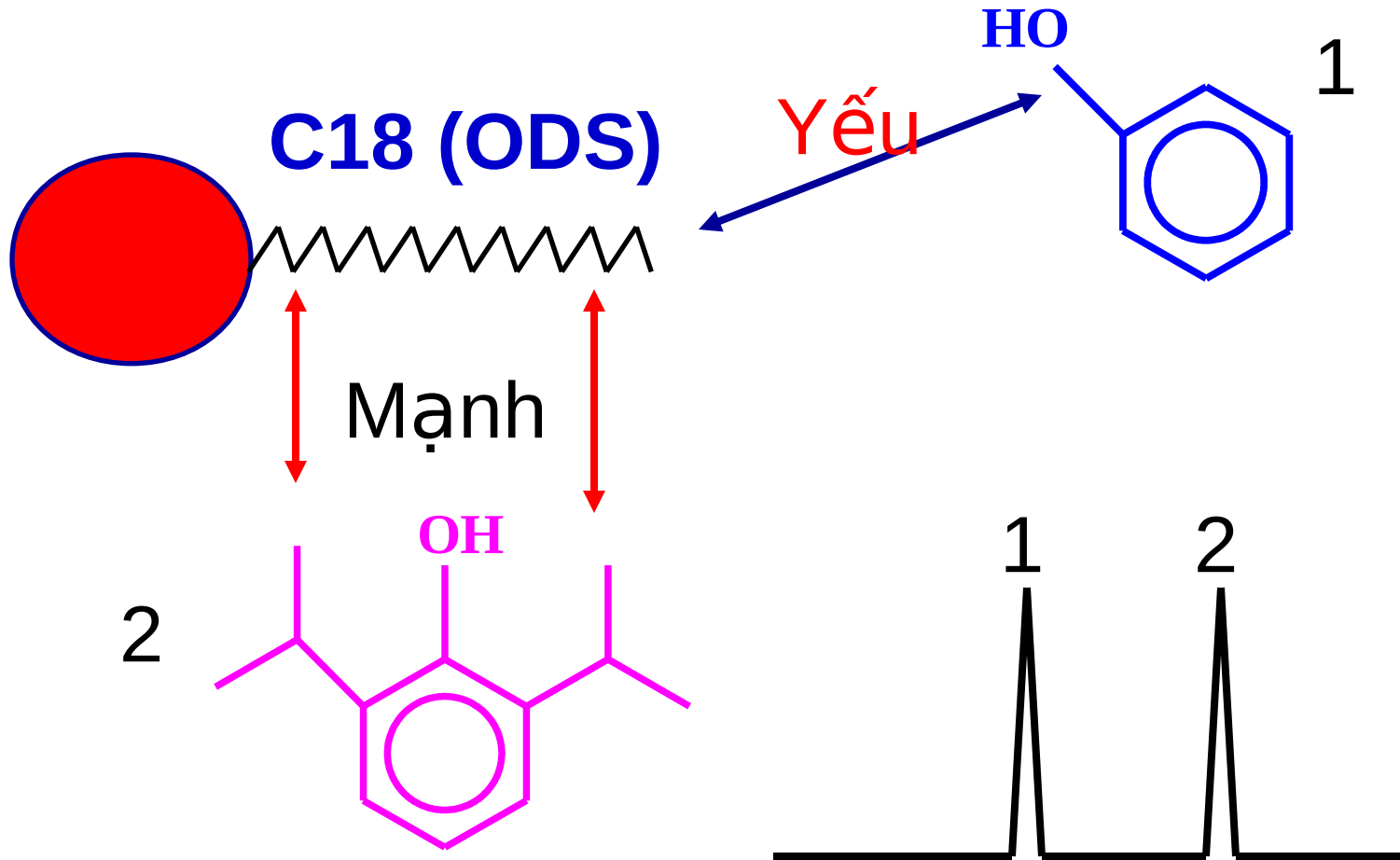
**hay ít phân cực**

**(kỵ nước)**

→ **Xác định chất phân cực, không phân cực và ít phân cực**



# Thời gian lưu và liên kết kỵ nước



# Dung môi trong HPLC pha đảo

## - Dung môi phân cực:

Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ : MEOH), acetonitrile  
( $\text{CH}_3\text{CN}$ : ACN)

## - Dung dịch đậm

→ Tối ưu hóa tỉ lệ dd đậm/ dung môi rất quan trọng để quá trình tách tốt

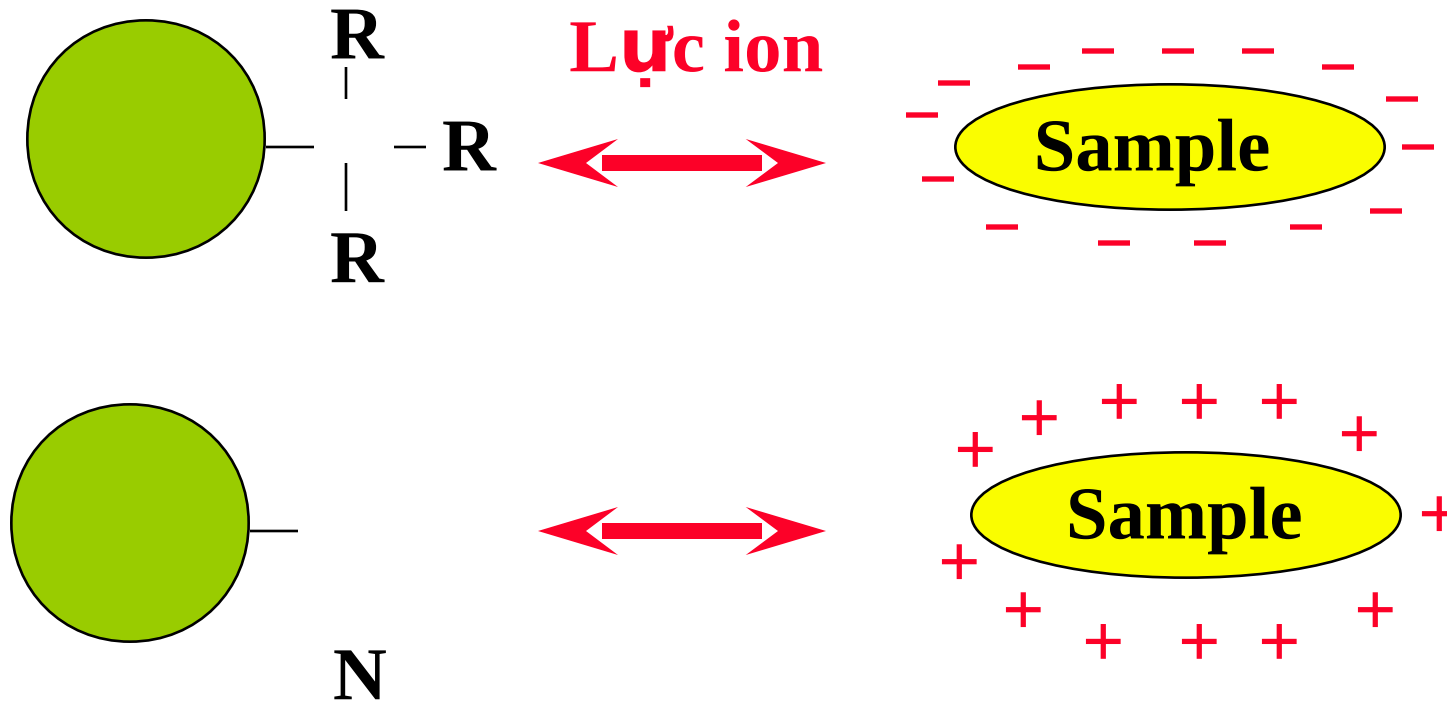
# So sánh pha thường và pha đảo

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

# Ứng dụng của HPLC

- Chủ yếu xác định các hợp chất hữu cơ khó bay hơi trong nhiều đối tượng khác nhau:
  - + Amino acid
  - + Acid hữu cơ
  - + Thuốc trừ sâu
  - + .....

# Sắc ký ion (Ion Chromatography) Ion Exchange



- Phân tích các hợp chất ion

- Có 2 loại cột:

**+ Cột trao đổi cation**

3

Strong cation exchange : (R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

Weak cation exchange : (R-COO<sup>-</sup>)

# Pha động: thường là dung dịch đậm trong dung môi nước

## Anion:

- Carbonat/bicarbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ )
- Potassium hydroxide (KOH)

## Cation:

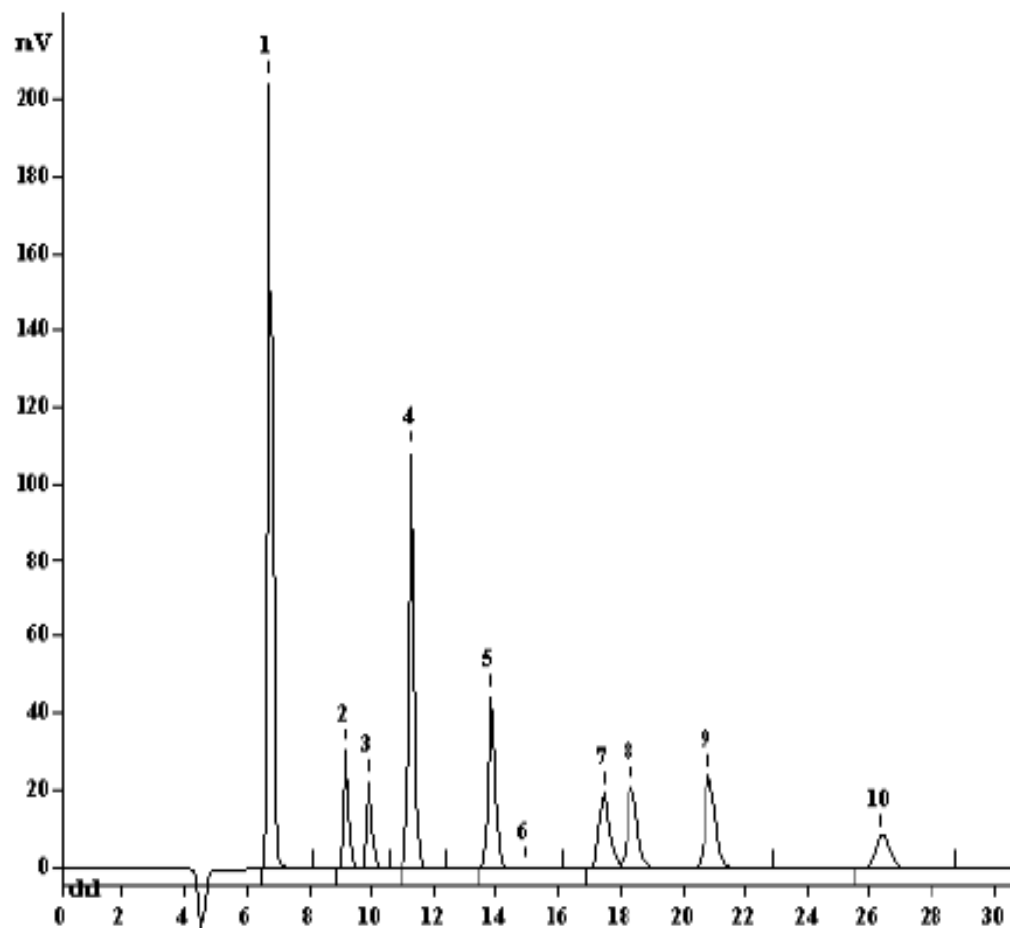
- Nitric acid
- Tartaric acid
- Tartaric acid/dipicolinic acid
- Tartaric acid/citric acid

# Anions

A Supp 5 – 250

$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 1/3.2 mmol/L

1	Fluoride	5.0
2	Chlorite	5.0
3	Bromate	5.0
4	Chloride	5.0
5	Nitrite	5.0
7	Chlorate	5.0
8	Bromide	5.0
9	Nitrate	5.0
10	Phosphate	5.0
11	Sulfate	5.0 ppm





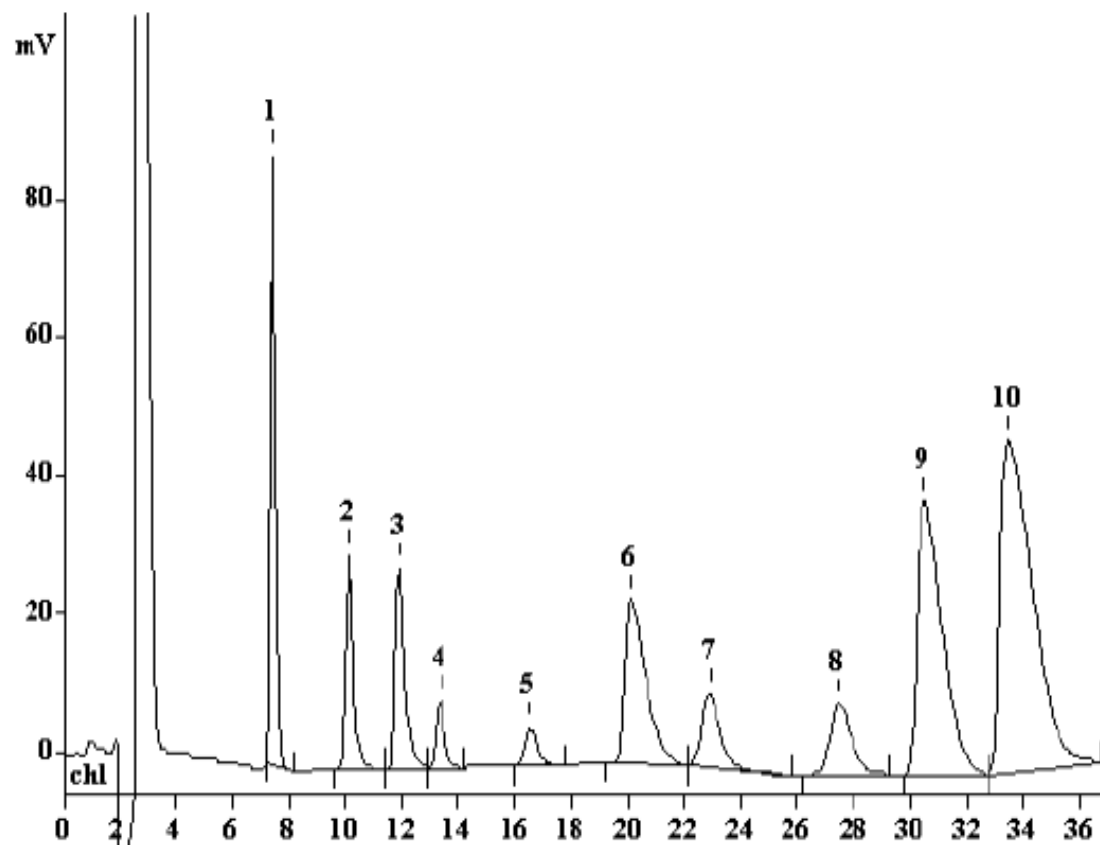
# Cations

C2 – 250

Tartaric-/dipicolinic acid/crown  
ether; 4/0.45/0.05 mmol/L

1	Lithium	0.5
2	Sodium	1.0
3	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1.0
4	MEA	1.0
5	DEA	1.0
6	Potassium	4.8
7	TEA	5.0
8	MDEA	4.8
9	Calcium	5.0
10	Magnesium	4.0

ppm



# Ôn tập

1. Khái niệm về phân tích định lượng
2. Tính toán và xử lý số liệu phân tích
3. Phương pháp phân tích dụng cụ
  - PP phổ hấp thụ phân tử
  - PP phổ nguyên tử
  - PP điện hóa
  - PP sắc ký lỏng
4. Các bài thực tập, tính toán số liệu từ số đo thực nghiệm