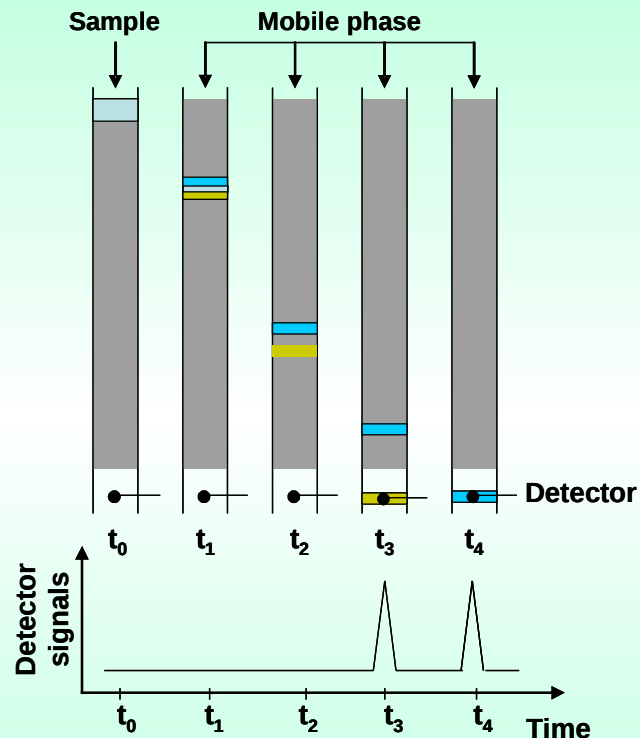


# CHUYÊN ĐỀ: SẮC KÝ (CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ ỨNG DỤNG)



TS NGUYỄN ĐÌNH LÂM

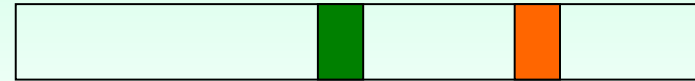
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ HÓA HỌC VÀ VẬT LIỆU, KHOA HÓA  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA – ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

# A. ĐẠI CƯƠNG VỀ PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ (Chromatography)

Được phát minh bởi nhà sinh vật học người Nga – **Mikhail Tswest**

Tách Chlorophylls và Xanthophylls bằng  $\text{CaCO}_3$

Tiếng Hy-lạp: Chroma: màu  
Graphein: ghi

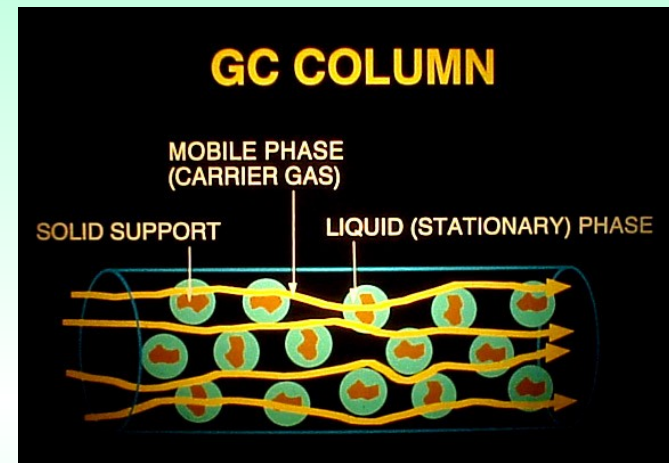
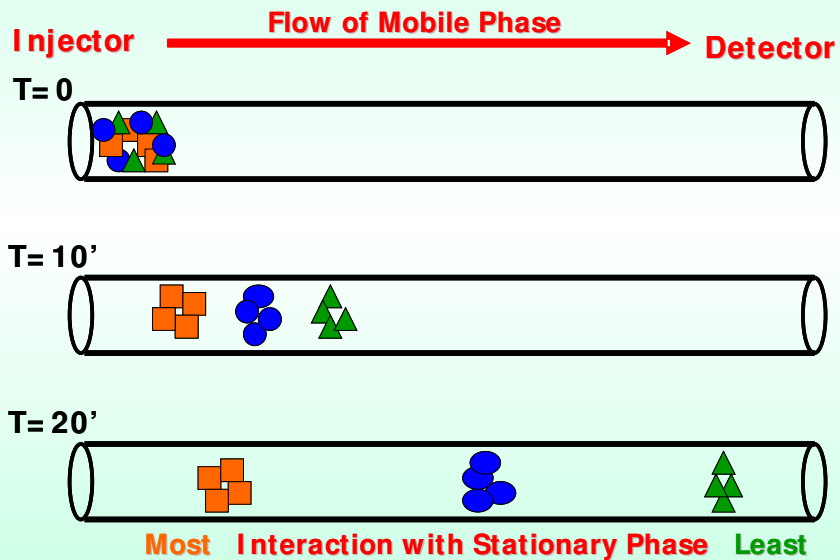


Sắc ký màng mỏng (*planar chromatography*), Sắc ký cột (*Column chromatography*)

Phương pháp sắc ký:

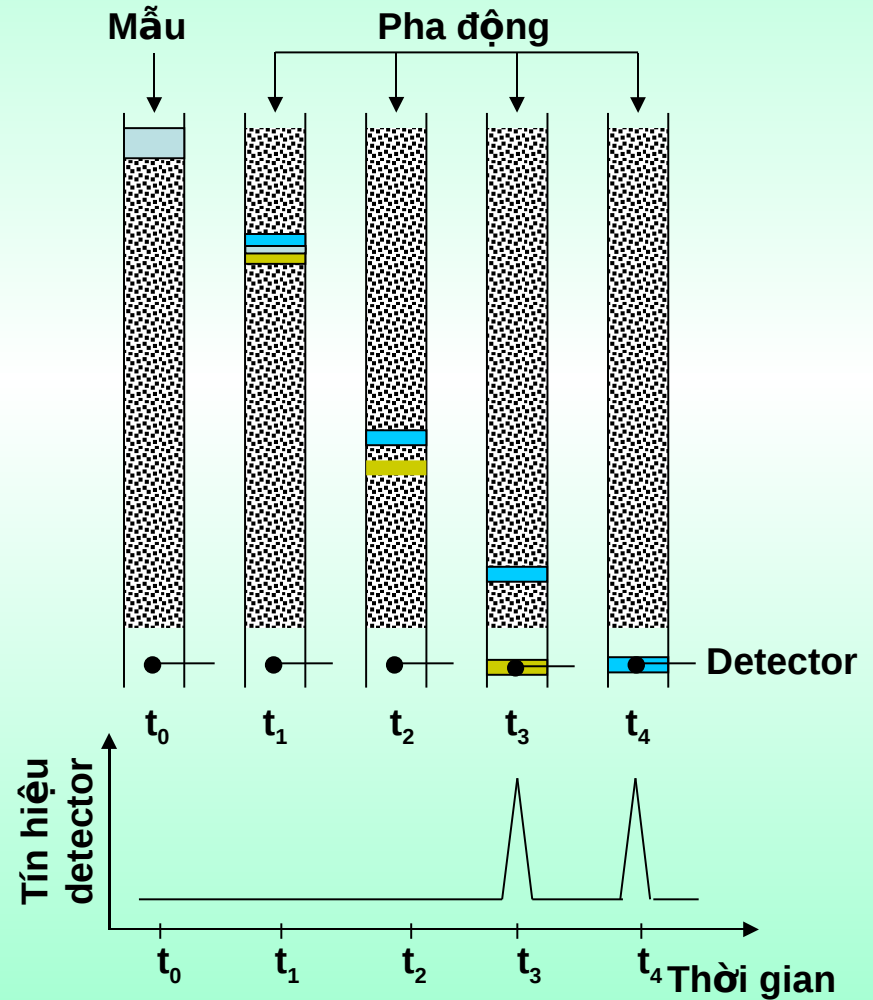
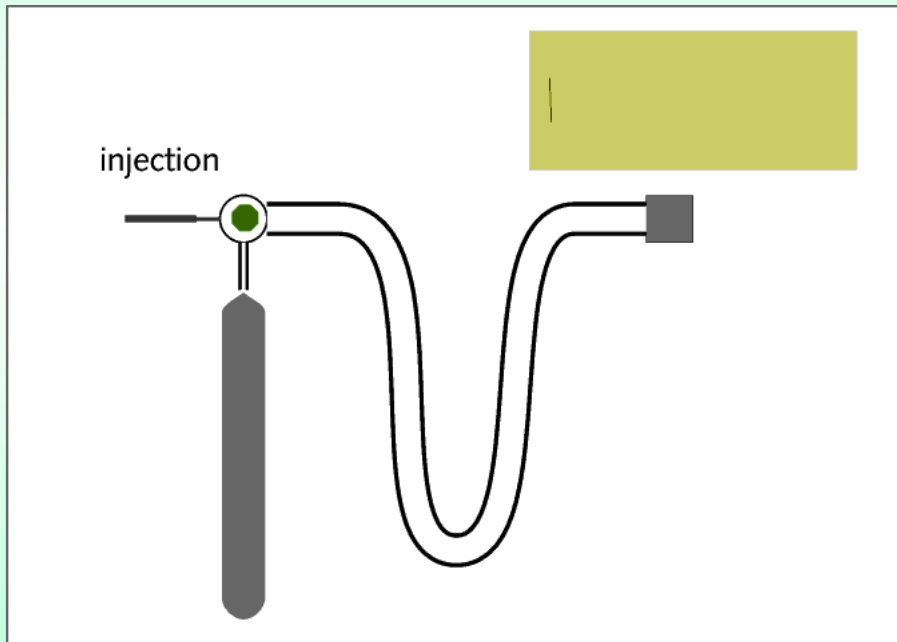
- ✓ Kỹ thuật tách (separation) các cấu tử trong một hệ đồng thể (khí hoặc lỏng)
- ✓ Cân bằng nồng độ của các cấu tử trong hai pha tiếp xúc nhau: pha tĩnh (*stationary phase*) và pha động (*mobile phase*)
- ✓ Sự phân tách dựa trên tốc độ kéo theo (*elution*) khác nhau của các cấu tử trong cột (*column*)
- ✓ Một đầu dò (detector) ở đầu ra của cột cho phép định lượng liên tục các cấu tử trong hỗn hợp đầu

# ĐẠI CƯƠNG VỀ PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ (Chromatography)



# Sắc ký phân tách (*Elution chromatography*)

Phân tách sắc ký: Các chất tan bị rửa qua một pha tĩnh nhờ sự chuyển động của pha động qua nó



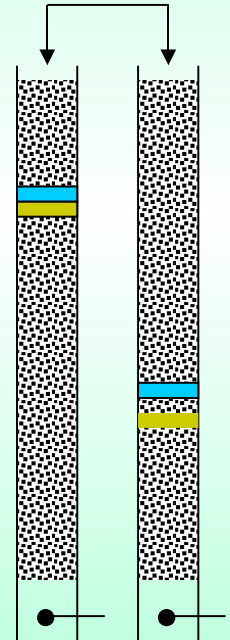
# Sắc ký phân tách (*Elution chromatography*)

**Phân tách sắc ký:** Các chất tan bị rửa qua một pha tĩnh nhờ sự chuyển động của pha động qua cột chứa pha tĩnh

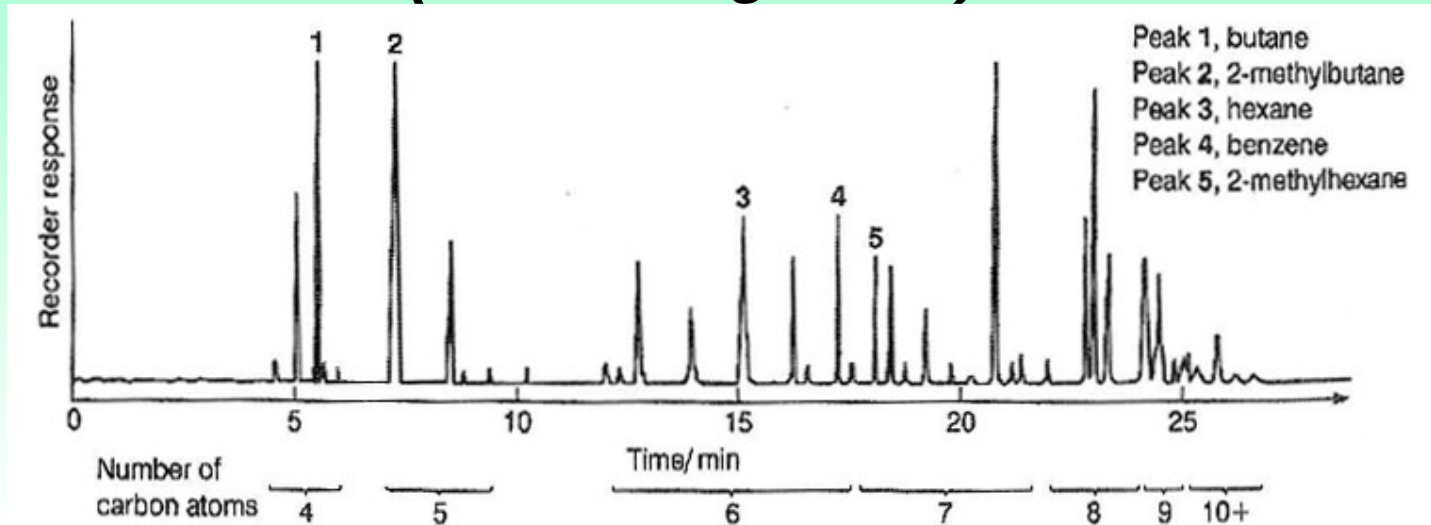
**TABLE 26-1** Classification of Column Chromatographic Methods

General Classification	Specific Method	Stationary Phase	Type of Equilibrium
Liquid chromatography (LC) (mobile phase: liquid)	Liquid-liquid, or partition	Liquid adsorbed on a solid	Partition between immiscible liquids
	Liquid-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Liquid-solid, or adsorption	Solid	Adsorption
	Ion exchange	Ion-exchange resin	Ion exchange
	Size exclusion	Liquid in interstices of a polymeric solid	Partition/sieving
Gas chromatography (GC) (mobile phase: gas)	Gas-liquid	Liquid adsorbed on a solid	Partition between gas and liquid
	Gas-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Gas-solid	Solid	Adsorption
Supercritical-fluid chromatography (SFC) (mobile phase: supercritical fluid)		Organic species bonded to a solid surface	Partition between supercritical fluid and bonded surface

Pha động



# Sắc ký đồ (Chromatograms)



**Điều kiện để thu được sắc ký đồ:**

- Đầu dò (Detector) được lắp đặt ở điểm cuối của cột

- Đầu dò tương thích với các chất cần phát hiện

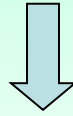
**Sắc ký đồ:** Biểu diễn sự biến thiên của tín hiệu ra theo thời gian hoặc theo thể tích tiêu hao của pha động

**Các peaks đối xứng (hoặc không đối xứng)**

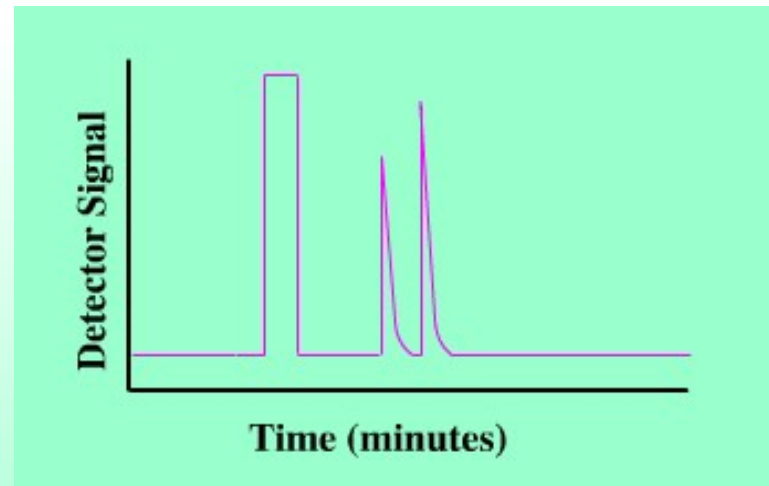
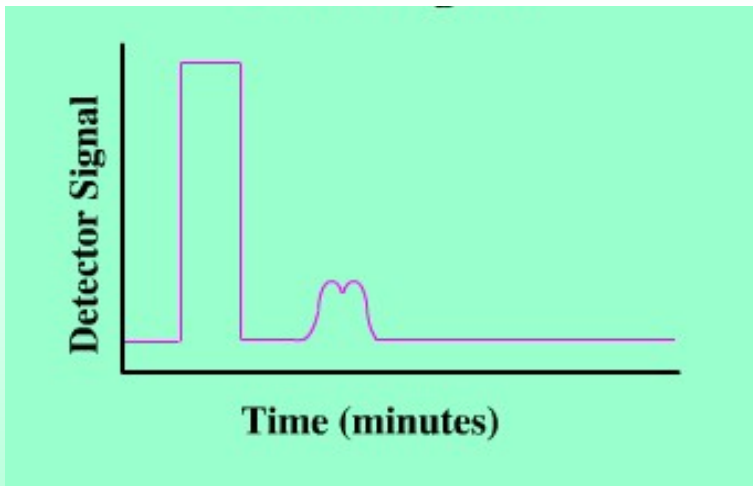
**Phân tích định tính (qualitative) và định lượng (quantitative)**

# Sắc ký đồ (Chromatograms)

- Vận tốc di chuyển tương đối (relative migration rates)
- Sự giãn peak (band broadening)



**Sự phân giải (resolution)**



# Vận tốc di chuyển của các chất tan

## (Migration rates of solutes)

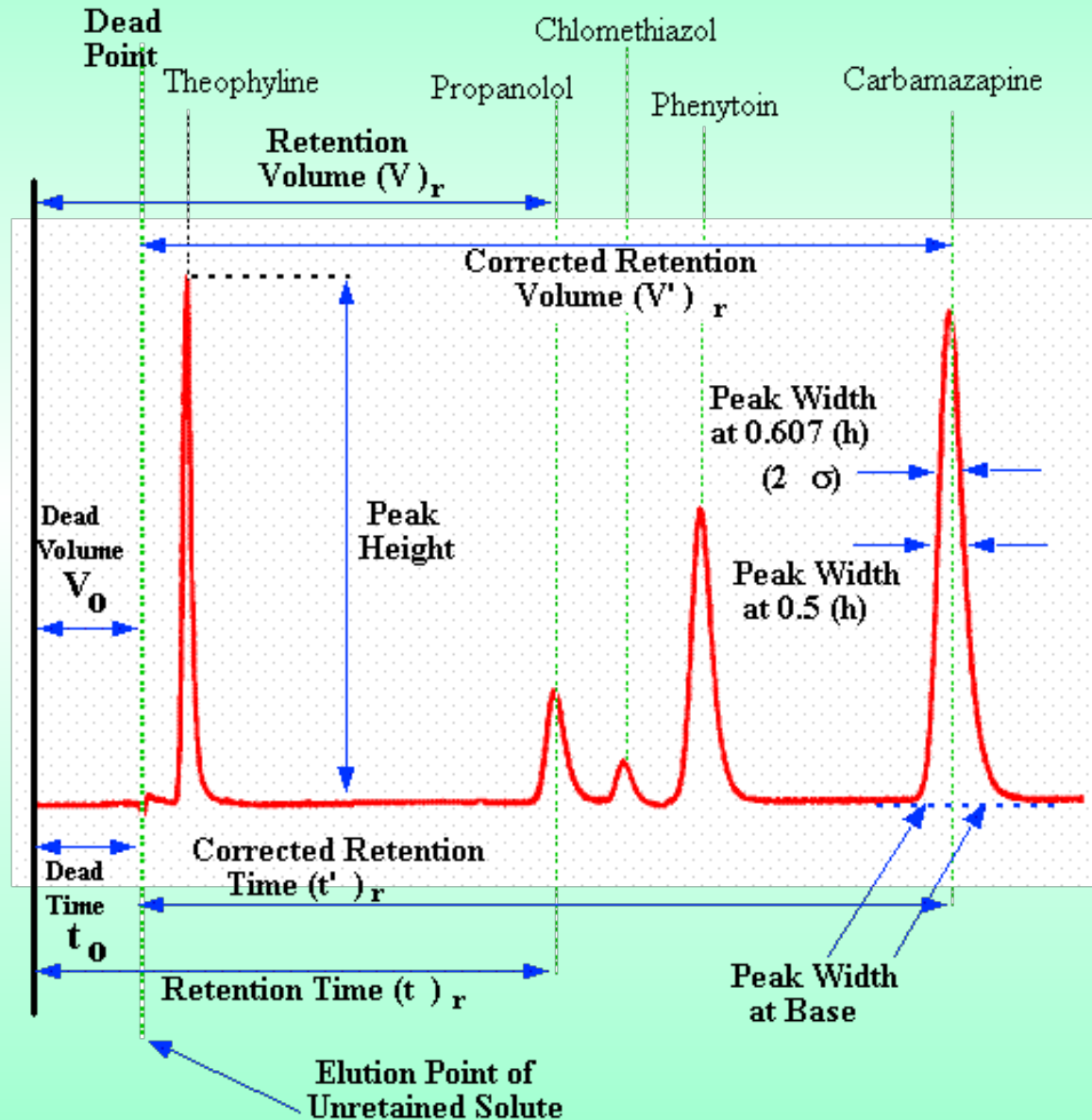
Thời gian lưu  $t_R$   
(Retention time)

Tốc độ di chuyển trung  
bình của chất tan

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

Tốc độ di chuyển trung  
bình pha động

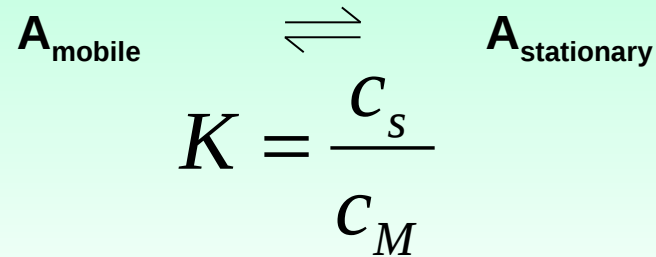
$$u = \frac{L}{t_0}$$





# Vận tốc di chuyển của các chất tan (Migration rates of solutes)

Hệ số phân bố  $K$  (Partition Ratios)  $\longrightarrow$  Cân bằng phân bố của chất tan trong pha động và pha tĩnh



Quan hệ giữa tốc độ di chuyển và hệ số phân bố

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{moles of solute in mobile phase}}{\text{total moles of solute}}$$

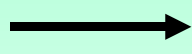
$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M}$$

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M}$$

$V_S$  và  $V_M$  có thể xác định dựa theo phương pháp chuẩn bị cột

# Vận tốc di chuyển của các chất tan (Migration rates of solutes)

Hệ số khả năng  
(Capacity Factor)



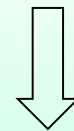
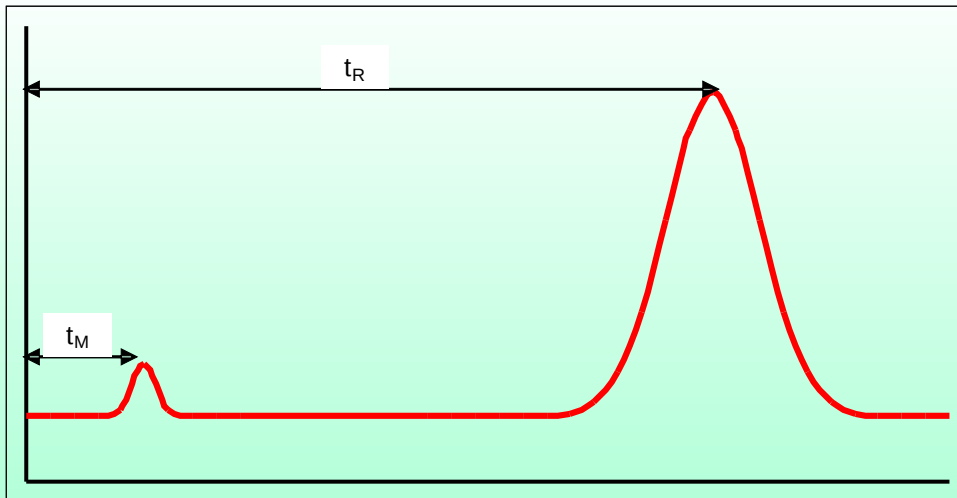
Thông số thực nghiệm quan trọng



Mô tả tốc độ di chuyển của chất tan trong cột

Đối với chất tan A, hệ số khả năng  $k'_A$ :

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \Rightarrow \bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k'_A}$$



$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k'_A} \Rightarrow k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

# Vận tốc di chuyển của các chất tan (Migration rates of solutes)

Tốc độ di chuyển tương đối: Hệ số chọn lọc  $\alpha$   
(Selectivity Factor)

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

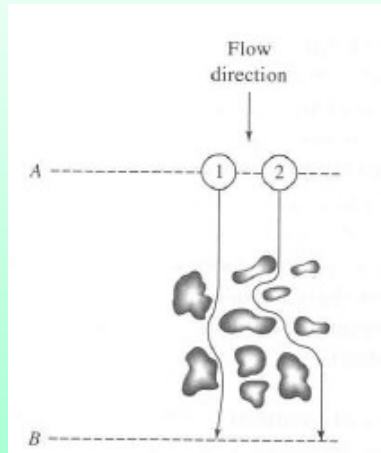
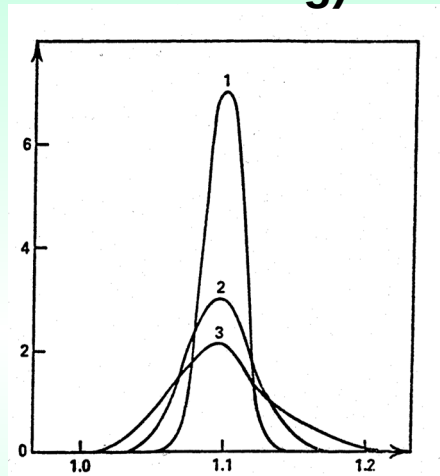
B là cấu tử bị giữ mạnh ở trên cột  
A là cấu tử bị hấp phụ yếu hơn trên  
cột  $\alpha \geq 1$

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

# Hiệu quả của cột sắc ký

## (Efficiency of chromatographic columns)

Sự giãn peaks (band broadening)



Một phân tử chịu hàng ngàn lần chuyển từ pha động sang pha tĩnh

Cần trao đổi năng lượng giữa phân tử và môi trường xung quanh

Thời gian lưu của một phân tử trong một pha thường có sai lệch ngẫu nhiên so với các phân tử cùng loại khác

Khoảng cách di chuyển thực tế trong cột có thể khác nhau giữa các phân tử

Giãn đối xứng (symmetric spread) xung quanh một giá trị chính

Dạng hình học của peak: phân bố Gaussian hoặc đường cong sai số chuẩn (normal error curves)

# Hiệu quả của cột sắc ký (Efficiency of chromatographic columns)

## ĐỊNH LƯỢNG HIỆU QUẢ CỦA CỘT SẮC KÝ

Chiều cao tương đương của đĩa (H)  
(Plate height)

$$N = L/H$$

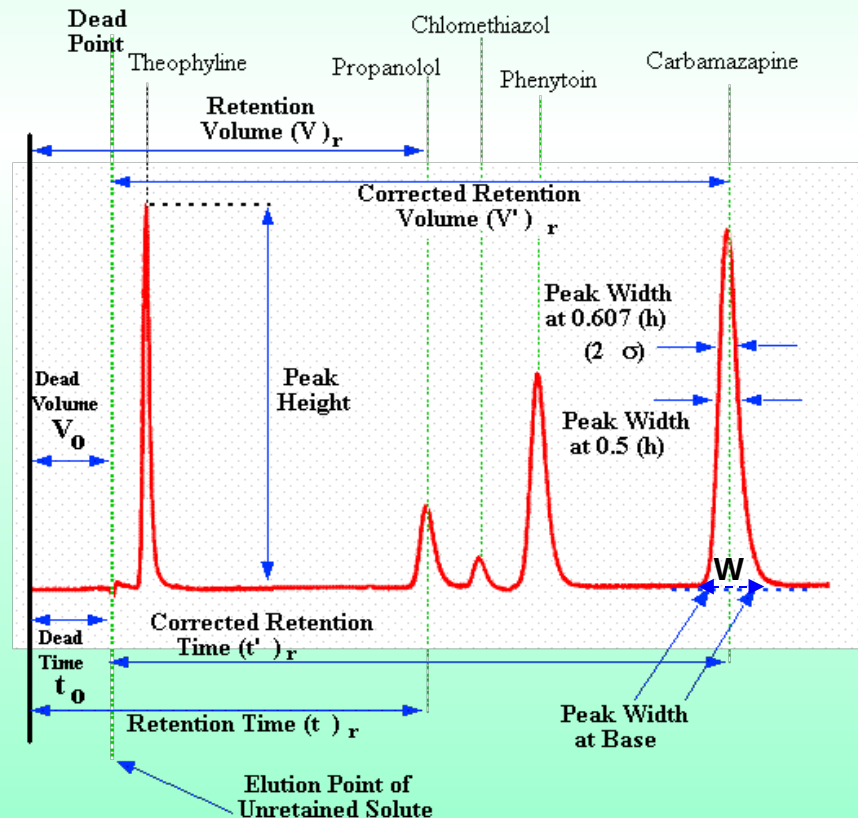
Số đĩa lý thuyết (N)  
(Number of theoretical plates)

Độ lệch chuẩn ( $\sigma$ )

Variance ( $\sigma^2$ )



$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$



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

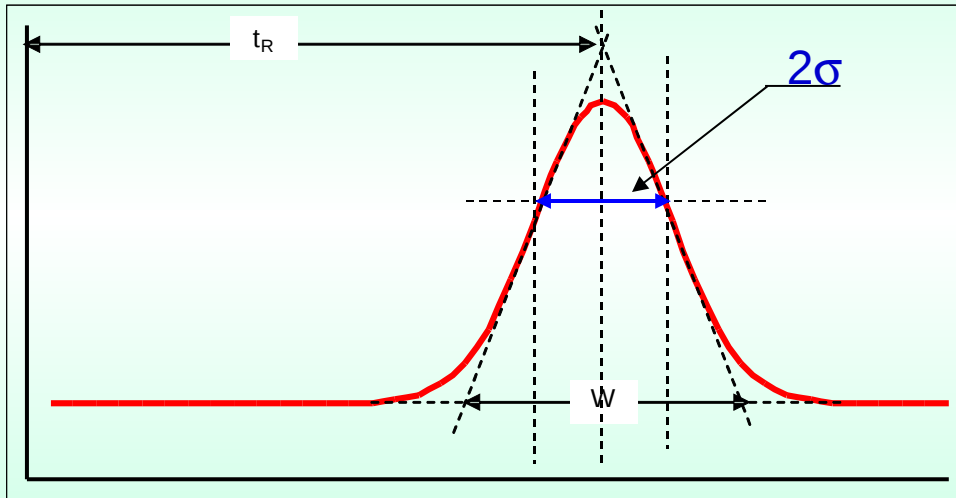
$$t_R = (t')_R + t_0$$

# Hiệu quả của cột sắc ký

## (Efficiency of chromatographic columns)

Variance thời gian của peak:  $\tau^2$        $\tau = \frac{\sigma}{L/t_R}$

Với  $L/t_R$ : Vận tốc thẳng trung bình (average linear velocity) của chất phân tích



Xác định  $\tau$  từ thực nghiệm:

Vẽ 2 tiếp tuyến từ các điểm uốn

Diện tích tam giác = 96% diện tích peak  
(sai lệch  $\pm 2\tau$ ) và  $W = 4\tau$

$$\sigma = \frac{LW}{4t_R}$$

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

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

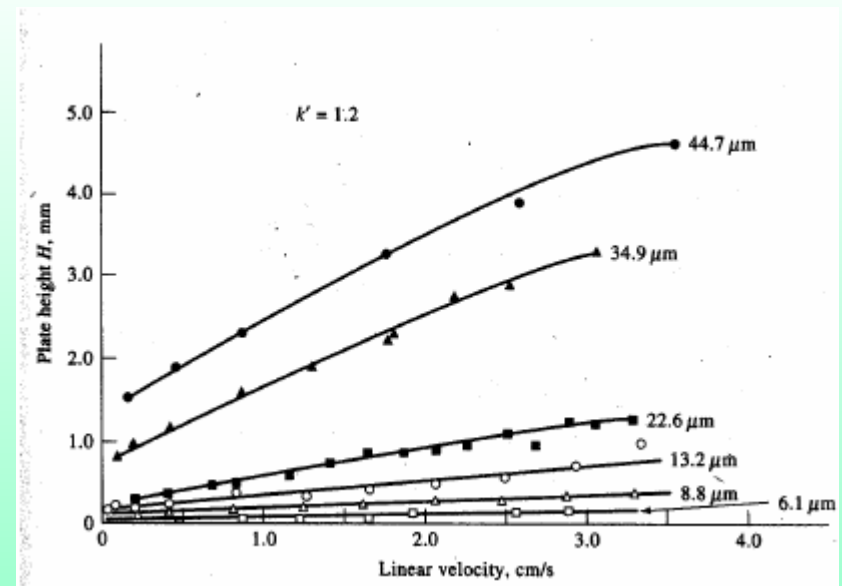
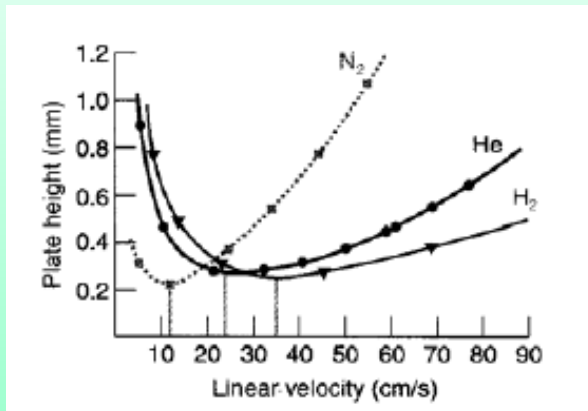
$$N = L/H$$

# Hiệu quả của cột sắc ký

## (Efficiency of chromatographic columns)

### CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU QUẢ CỘT SẮC KÝ

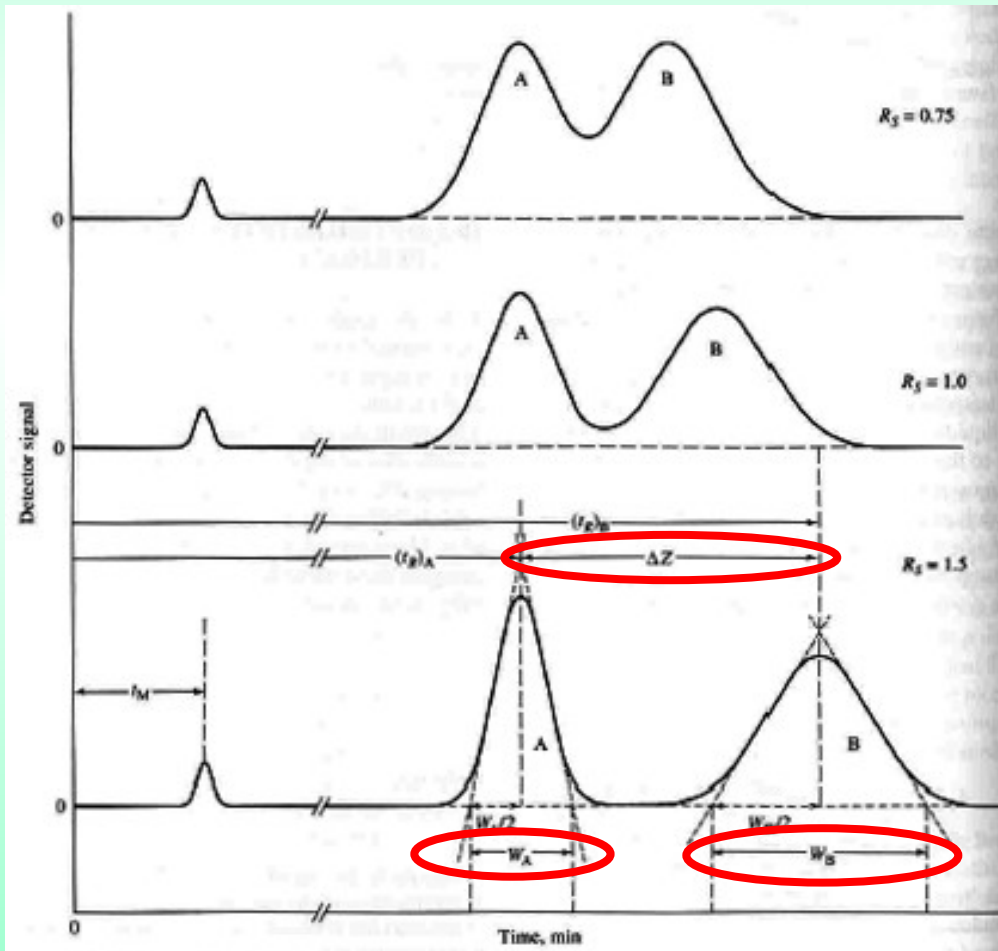
- ✓ Tốc độ dòng của pha động:  $H_{\text{minimum}}$  (Hiệu quả cao nhất) xuất hiện ở vùng tốc độ thấp ( $0,1 - 0,2 \text{ m.s}^{-1}$ : LC và  $1-2 \text{ m.s}^{-1}$ : GC)
- ✓ Kích thước hạt của pha tĩnh đối với cột nhồi (column packings)
- ✓ Chiều dày mỏng hơn của lớp cố định (immobilized film) khi pha tĩnh là chất lỏng hấp thụ trên chất rắn (liquid adsorbed on a solide)
- ✓ Tăng nhiệt độ sẽ làm giảm sự giãn peak đối với tất cả các trường hợp
- ✓ Giảm độ nhớt của pha động



# Độ phân giải của cột ( $R_s$ )

## (Column resolution)

**Độ phân giải của cột ( $R_s$ ) cung cấp các giá trị định lượng đặc trưng cho khả năng tách của hai chất cần phân tích**



$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$R_s = 0,75$  độ phân giải và phân tách peak kém

$R_s = 1$  Vùng A chứa khoảng 4% B và vùng B chứa khoảng 4% (overlap = 4%)

$R_s = 1,5$  phân tách peak gần tuyệt đối (overlap = 0,3%)

**Tăng độ phân giải:**

**Tăng chiều dài cột  $\gg$  thời gian**



# Độ phân giải của cột ( $R_s$ )

## (Column resolution)

**Ảnh hưởng của các hệ số khả năng và chọn lọc đến độ phân giải**

**Xét độ phân giải của hai chất A và B:**

- Số lượng đĩa (number of plates),  $N$
- Hệ số khả năng (capacity factor),  $k'_B$
- Hệ số chọn lọc (selectivity factor),  $\alpha$

➔  $R_s$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

**Số đĩa cần thiết (chiều cao cột sắc ký để đạt được một độ phân giải cho trước**

↓

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

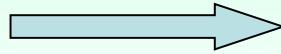
# Độ phân giải của cột ( $R_s$ )

## (Column resolution)

### Ảnh hưởng của độ phân giải đến thời gian lưu

Mục đích của một quá trình phân tích sắc ký

- Độ phân giải cao
- Thời gian lưu nhỏ nhất



Xác định thời gian lưu  $t_R$   
đối với cấu tử khó tách  $(t_R)_B$

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

$u$ : Tốc độ tuyến tính của pha động

# Tóm tắt các công thức

Tốc độ di chuyển trung bình của chất tan

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

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + KV_S/V_M}$$

Tốc độ di chuyển trung bình pha động

$$u = \frac{L}{t_o}$$

Chiều cao đĩa (plate height) và số đĩa (number of plates)

$$N = L/H$$

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

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

Hệ số khả năng (capacity factor)

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \Rightarrow \bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

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

Độ phân giải của cột (column resolution)

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

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

Hệ số chọn lọc (selectivity factor)

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

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_o}{(t_R)_A - t_o}$$

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

# Áp dụng

## Số liệu ban đầu:

$(t_R)_A = 16.4$  phút,  $(t_R)_B = 17.63$  phút,  $(t_R)_M = 1.3$  phút, chiều dài cột:  $L = 30$  cm

Độ rộng của peak tại đường nền:  $W_A = 1.11$  phút và  $W_B = 1.21$  phút

Tính toán:  $R_s$ ,  $N$ ,  $H$ , Chiều dài của cột để bảo đảm  $R_s = 1.5$  và  $(t_R)_B$  tương ứng.

## Giải:

$$R_s = 2(17.63 - 16.4)/(1.11 + 1.21) = 1.06$$

$$N = 16(16.4/1.11)^2 = 3493 \text{ và } N = 16(17.63/1.21)^2 = 3397$$

$$\Rightarrow N = (3493 + 3397)/2 = 3445$$

$$H = L/N = 30/3445 = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

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

Do  $k'_B$  và  $\alpha$  không thay đổi khi tăng chiều cao của cột, ta có:

$$\frac{(R_s)_1}{(R_s)_2} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \Rightarrow \frac{1.06}{1.5} = \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{N_2}} \Rightarrow N_2 = 6.9 \times 10^3$$

$$L = N \times H = 6.9 \times 10^3 \times 8.7 \times 10^{-3} = 60 \text{ cm}$$

$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} \Rightarrow \frac{17.63}{(t_R)_2} = \frac{1.06^2}{1.5^2} \Rightarrow (t_R)_2 = 35 \text{ phut}$$

# Các ứng dụng của sắc ký

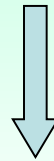
- Phân tích định tính
- Phân tích định lượng
- Phân tích dựa vào chiều cao peak
- Phân tích dựa vào diện tích peak
- Xây dựng đường chuẩn (calibration with standards)
- Phương pháp chuẩn nội (internal-standard)

# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Sắc ký khí

Gas-Liquid Chromatography (GLC) hoặc là Gas Chromatography (GC)

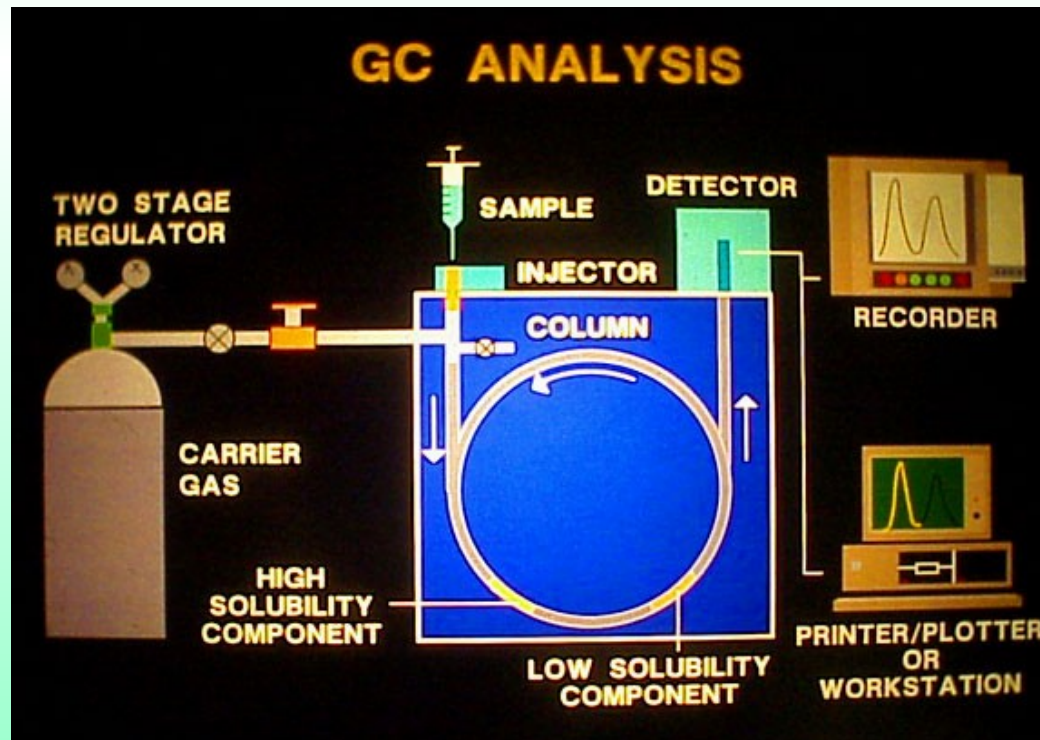


- Bốc hơi mẫu
  - Tách các cấu tử trong cột nhờ vào sự phân bố trong pha động và pha tĩnh
  - Pha động: pha khí ( $N_2$ , He, Ar...)
  - Pha tĩnh: pha rắn hoặc pha lỏng phủ lên pha rắn được giữ ở trong cột
- **Phương pháp công cụ để phân tách và xác định các hợp chất hóa học**

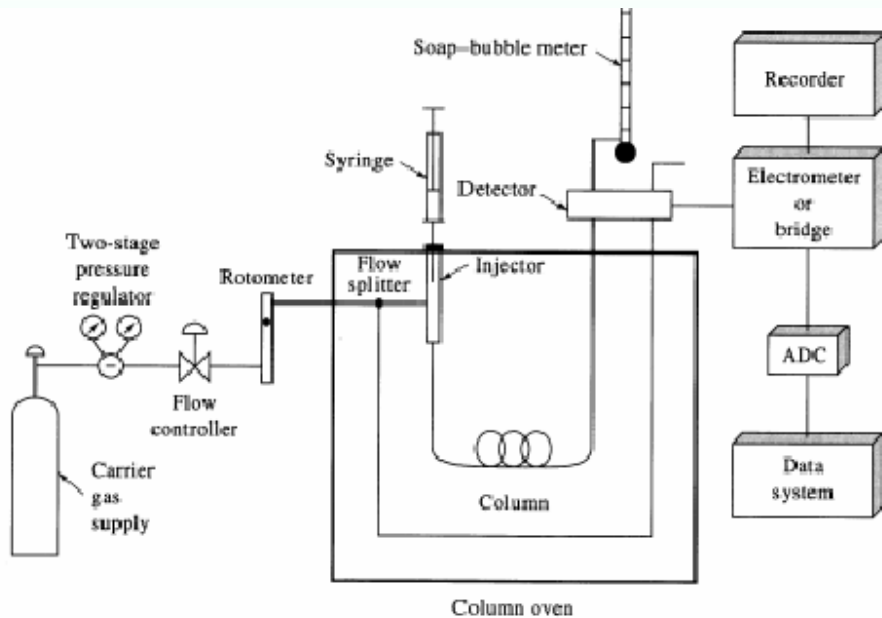
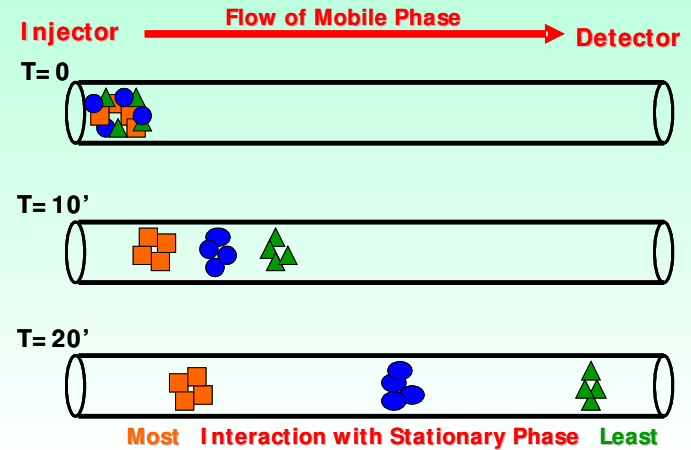
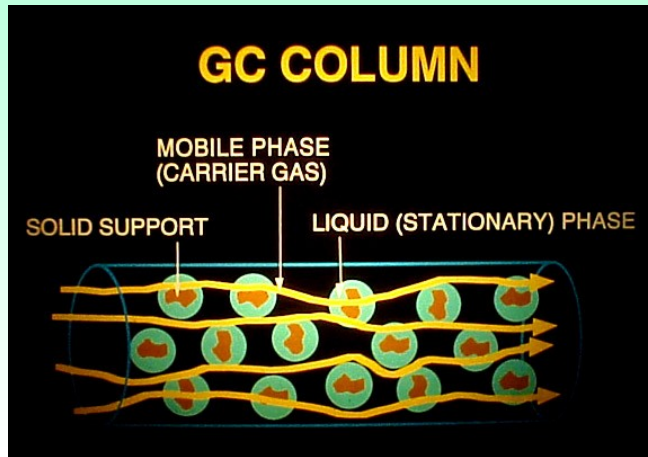
# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

Mẫu (sample) phân tích được

- Đưa vào **bộ phận nạp mẫu** (heated injector)
- Di chuyển qua một **cột phân tách** (seperating column) nhờ một dòng **khí mang trơ** (inert carrier gas)
- **Phát hiện và ghi lại dưới dạng các peaks** khi các cấu tử đi ra khỏi cột



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)





# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Nguồn cung cấp khí mang (Carrier Supply)

**F = 25 – 150 ml.min<sup>-1</sup>: Cột nhồi (Packed column)**

**F = 1 – 25 ml.min<sup>-1</sup>: Cột mao quản (Open-tubular or Capillary column)**

- N<sub>2</sub>: chi phí thấp, an toàn
- H<sub>2</sub>: chi phí thấp, nguy cơ cháy nổ
- He: thông thường, đắt
- Ar:

Bình chứa áp suất cao (pressurized tank)

- Dụng cụ điều chỉnh áp suất (pressure regulator)
- Điều khiển lưu lượng dòng khí (Flow controller)



Two stages pressure regulator



# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Nguồn cung cấp khí mang (Carrier Supply)

#### **Thiết bị tách N<sub>2</sub> từ không khí nén (Pure Nitrogen Generator)**

- Thẩm thấu chọn lọc N<sub>2</sub>
- 0.5 ppm O<sub>2</sub>, > 0.5 ppm H<sub>2</sub>O, > 2.0 ppb halocarbons hoặc C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>.
- Lưu lượng tối đa ~ 1 l/min. Áp suất 3,5 – 7 atm.

#### **Thiết bị cung cấp khí H<sub>2</sub> từ nước cất (Hydrogen Generators)**

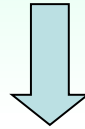
- Phương pháp điện phân (Electrolysis)
- Chất điện ly: polymer rắn (solid polymer electrolyte)
- H<sub>2</sub> 99.999%
- Khả năng lưu trữ H<sub>2</sub>: 4 litre
- Áp suất: 1,4 – 7 atm.
- Lưu lượng: 0 to 125 ml.min<sup>-1</sup> và có thể đạt đến 1200 ml.min<sup>-1</sup>.

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Hệ thống nạp mẫu (Sample Injection system)

Các yêu cầu:

- Lượng mẫu thích hợp
- Tốc độ nạp mẫu phải nhanh và mẫu nạp khi vào cột ở trạng thái khí



Giảm sự giãn peak (band broadening) và tăng độ phân giải của cột

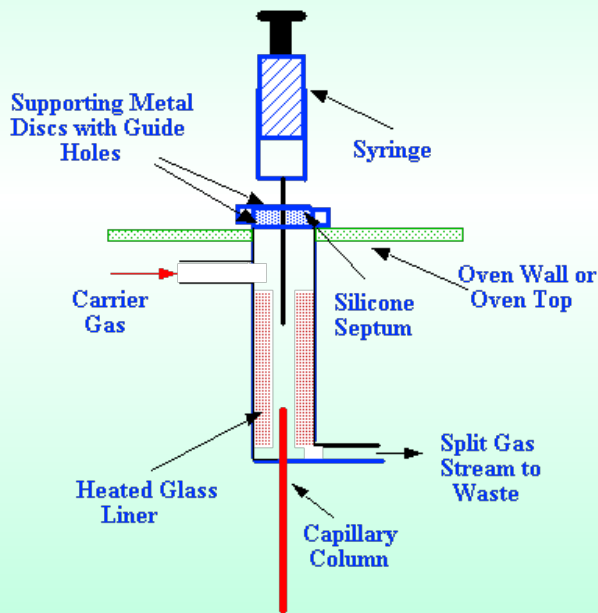
- ✓ Microsyringe chuẩn (calibrated)
- ✓ Septum: màng bằng cao su silicone
- ✓ Gia nhiệt cho vùng nạp mẫu:  $T > 50^{\circ}\text{C}$  của cấu tử có nhiệt độ sôi cao nhất
- ✓ Thể tích nạp mẫu: ~ 20  $\mu\text{l}$  đối với cột nhồi (packed column)
  - ~ 0,2  $\mu\text{l}$  hoặc nhỏ hơn đối với mao quản (open-tubular or capillary column)

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

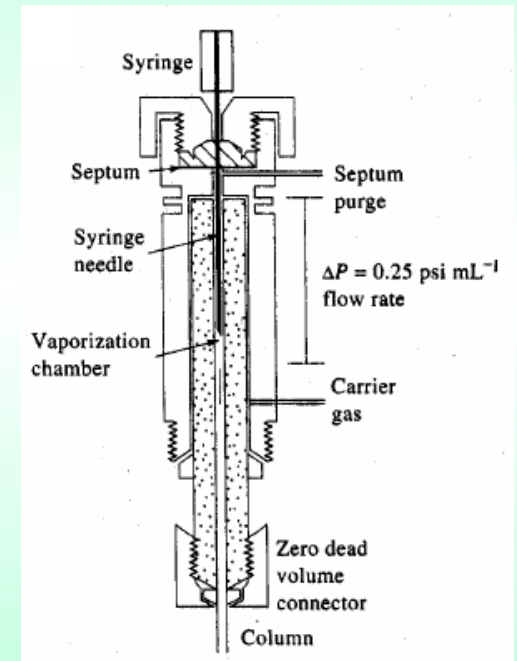
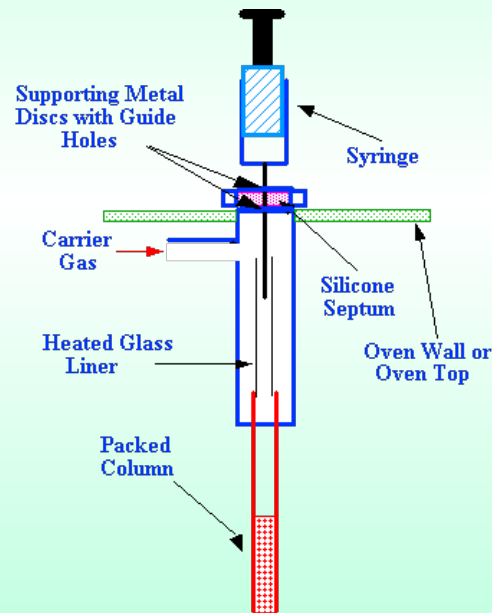
## Hệ thống nạp mẫu (Sample Injection system)

Sơ đồ nguyên lý hệ thống nạp mẫu

Cột mao quản



Cột nhồi

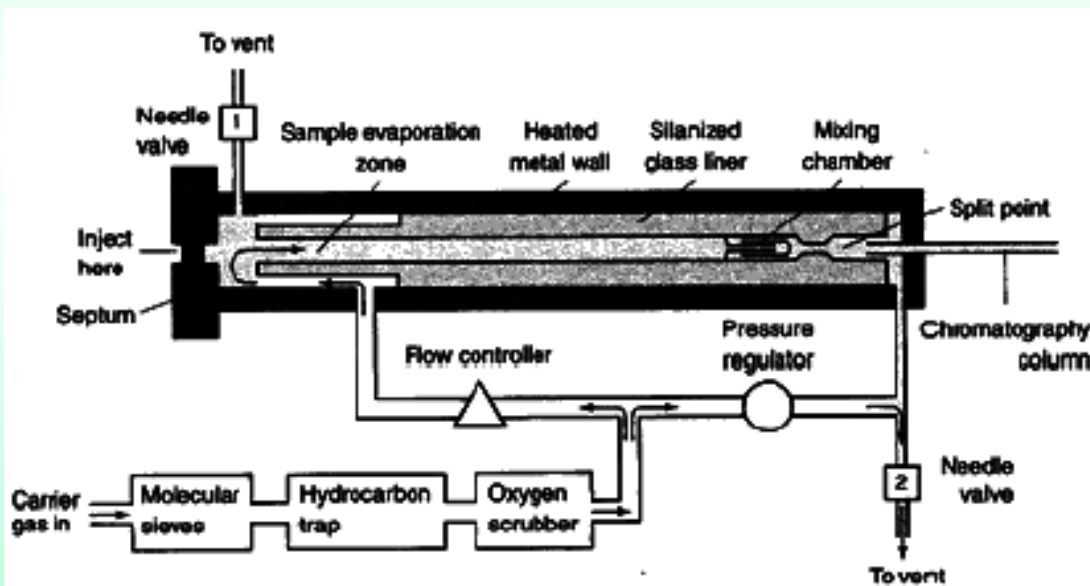


# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

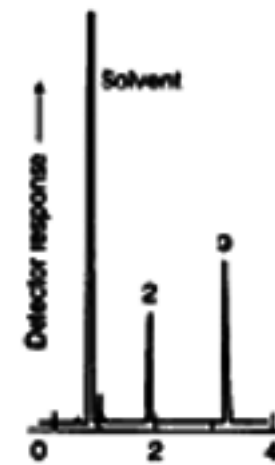
## Hệ thống nạp mẫu (Sample Injection system)

Chế độ nạp mẫu:

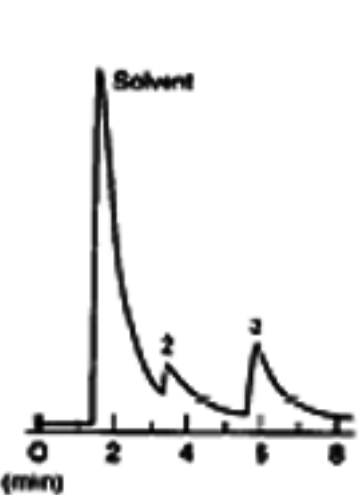
- Chia dòng (split)
- Không chia dòng (splitless)



A: Split injection



B: Split vent closed



# B. Sắc ký khí

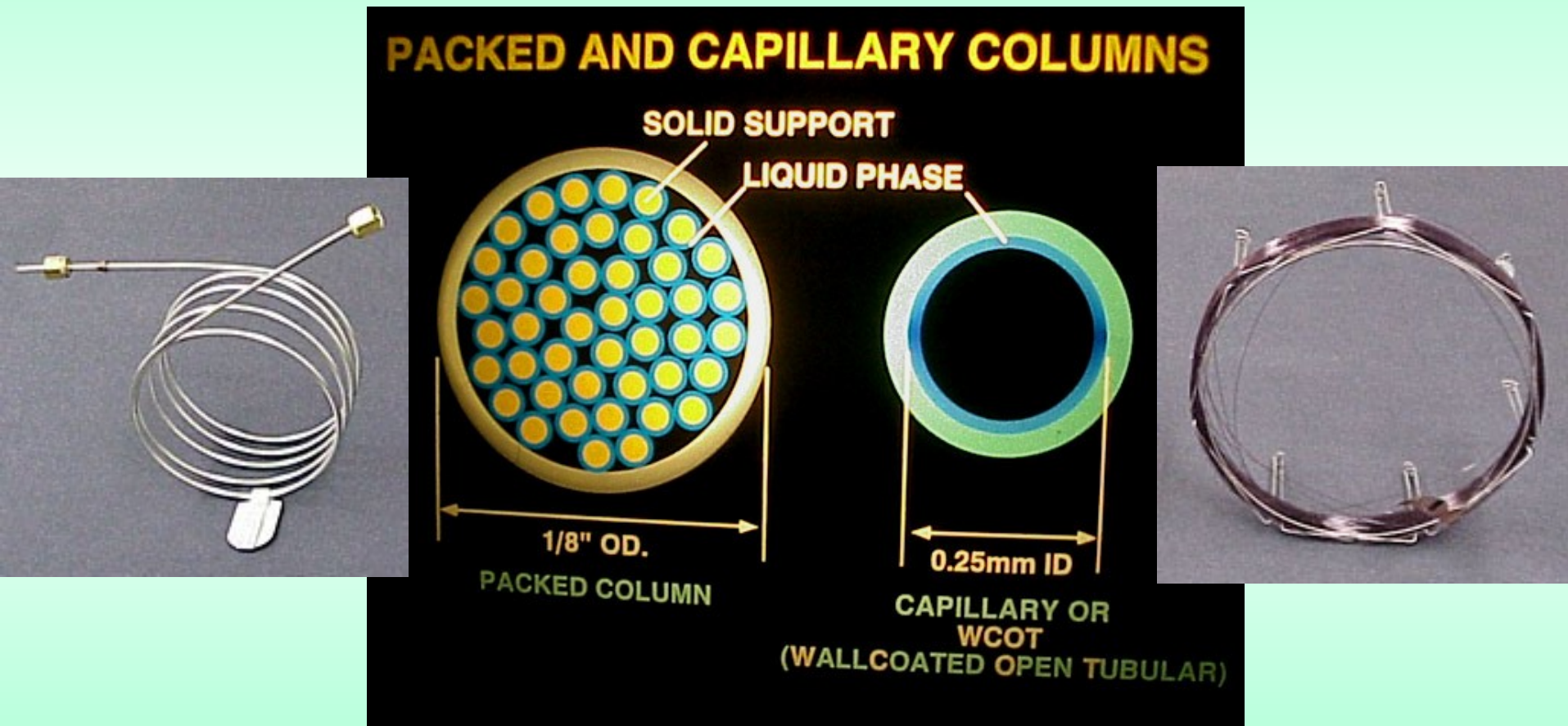
## (Gas-Liquid Chromatography)

### Cột sắc ký (Column)

- Cột nhồi (packed column): **ID: 2 – 4 mm, L: 2 – 3 m**
  - Pha tĩnh - Chất hấp phụ được nhồi vào cột
  - phân tích khí (gas analysis)
  - Nạp mẫu đơn giản
  - Độ chính xác cao
- Cột mao quản (open-tubular or capillary column): **ID: 0,25 – 0,5 mm, L: 25 – 50 m**
  - Nạp mẫu khó khăn
  - 'State of art' column
  - Pha tĩnh được phủ vào mặt trong của cột (0,2 - 1 $\mu$ m)

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Cột sắc ký (Column)



*wall-coated open-tubular (WCOT) column*



# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Cấu tạo của cột nhồi

**Vỏ cột:** thép không gỉ hoặc thủy tinh Pyrex

**Chất hấp phụ (Adsorbents):** hai loại chất được nhồi vào cột :

- Chất hấp phụ. Kích thước: - 30/40 -100/120 mesh
- Chất mang (support) được phủ pha tĩnh. - Đồng nhất

**Các chất hấp phụ thường sử dụng:**

- **Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ):** Hoạt hóa ở  $200^\circ\text{C}$  – 1h: tách khí và các hydrocarbon đến  $\text{C}_5$ , kích thước hạt: 100/120 mesh, kích thước lỗ xốp: 1 Å - 100 Å.
- **Silica ( $\text{SiO}_2$ ):** tách các khí có M nhỏ và các Hydrocarbon nhẹ
  - Bề mặt riêng 750  $\text{m}^2/\text{g}$ , kích thước lỗ xốp trung bình: 22 Å
  - Bề mặt riêng 100  $\text{m}^2/\text{g}$  kích thước lỗ xốp trung bình: 300 Å.



# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Cấu tạo của cột nhồi

#### Các chất hấp phụ thường sử dụng:

➤ **Zeolith:** Tách các khí có M nhỏ bằng phương pháp loại trừ (exclusion):  
Rây phân tử (**molecular sieves**)

- Các zeolith ký hiệu: 5A và 13X: thường được sử dụng để tách H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, Ar, Ne...

➤ **Carbon:**

- Carbon hoạt tính: bề mặt riêng ~ 1000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>

- Graphit: bề mặt riêng 5 - 100 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>

➤ **Các hợp chất cao phân tử:**

- Co-polymer của polystyrene và divinylbenzene

- Lỗ xốp: macropore và micropore

- Bề mặt riêng lớn và độ xốp cao

- Tương tác đa dạng với các dung môi và chất tan tiếp xúc với nó.

# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Cấu tạo của cột nhồi

#### Các chất mang sử dụng cho GLC:

- Celite (một dạng đặc biệt của khoáng diatomic), Celite nung, Celite nung hoạt hóa bởi Ag hoặc Au, các hạt vi cầu thủy tinh, polymer, teflon...

↳ Biến tính Celite:

-Nung ở 900°C với  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  và trợ dung: silica  $\Rightarrow$  cristobalite, các vết Kim loại tác dụng với Silica  $\Rightarrow$  gây màu (hồng) cho vật liệu.

*Chromosorb P, Chromosorb W, Chromosorb G và Chromosorb S*

↳ Vi cầu Polystyren

#### Chuyển chất hấp phụ lên chất mang:

↳ Sử dụng các nhóm Silanol ( $\equiv \text{Si-OH}$ )

Hexamethyldisilazane +  $\equiv \text{Si-OH}$   $\Rightarrow$  gốc trimethylsilyl

↳ Phương pháp tẩm (slurry method of coating)



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Cấu tạo của cột mao quản (capillary or open-tubular column)

Phát minh vào những năm 1950

Tốc độ phân tách nhanh với số lượng đĩa cực lớn ~ **300.000** đĩa

Đưa vào áp dụng vào cuối những năm 1970

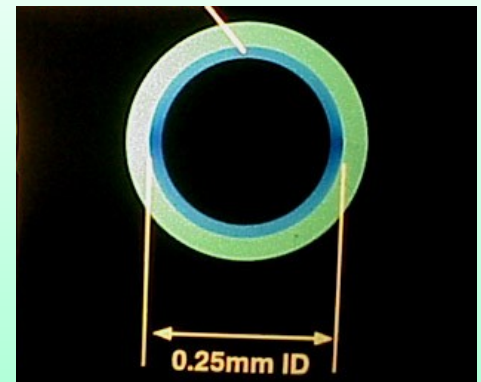
Cấu tạo từ thủy tinh hoặc fused silica

ID = 0,25 – 0,5 mm

L = 25 – 50 m

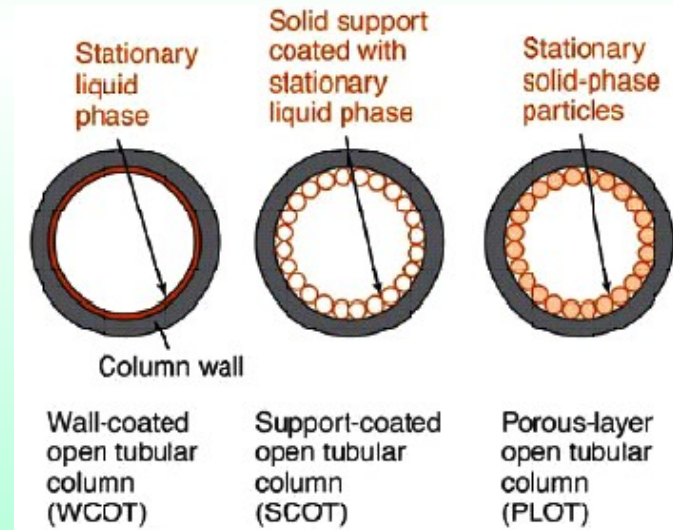
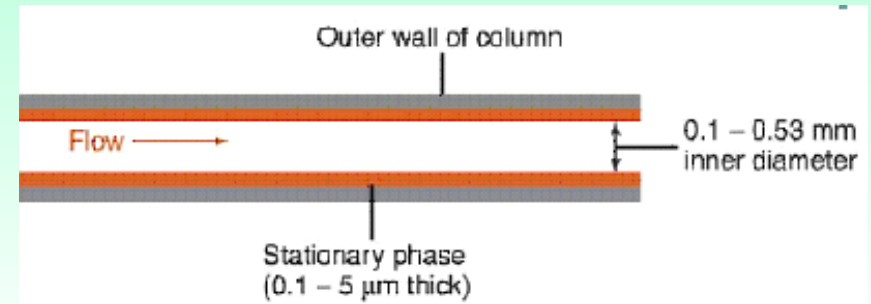
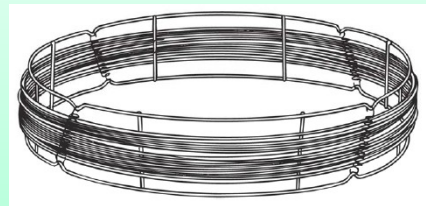
Bề mặt trong của mao quản được phủ một lớp mỏng pha động 0,25 – 1,5 $\mu$ m

(WallCoated Open-Tubular - WCOT)



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Cấu tạo của cột mao quản (capillary or open-tubular column)



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

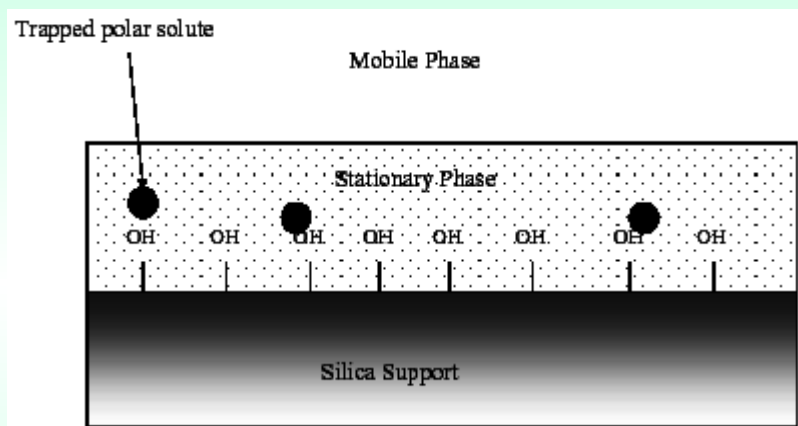
## Biến tính bề mặt fused silica

Độ phân cực (polar) của các gốc Silanol trên bề mặt

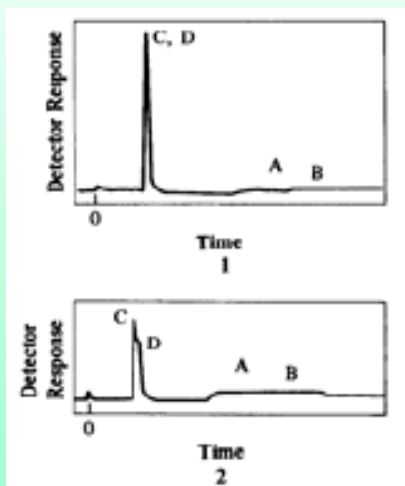
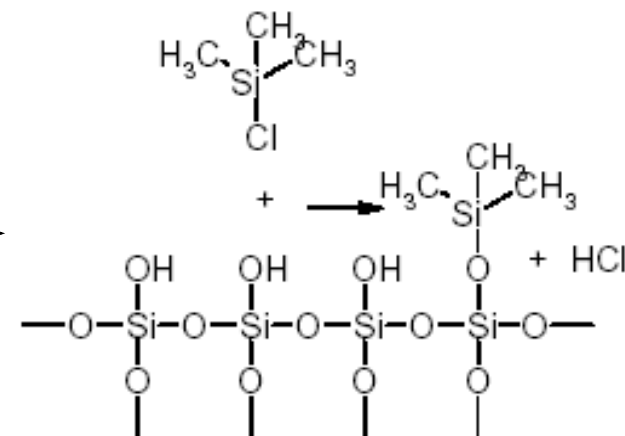
✓ Phân cực: -CN, -CO và -OH

✓ Không phân cực: Hydrocarbon (dialkyl siloxane)

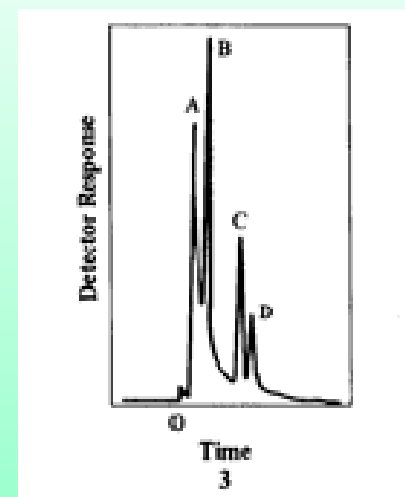
✓ Phân cực lớn: Polyester



Biến tính bề mặt Silica

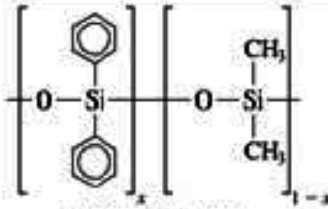
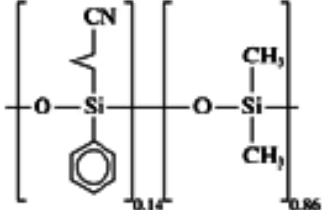
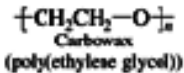
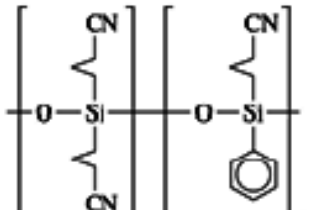


A = EtOH  
B = methylethyl ketone  
C = benzene  
D = cyclohexane



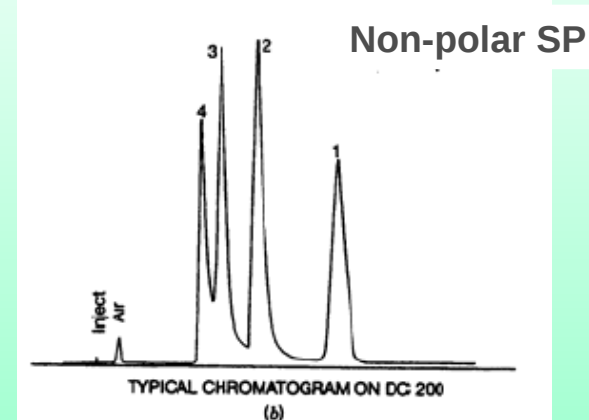
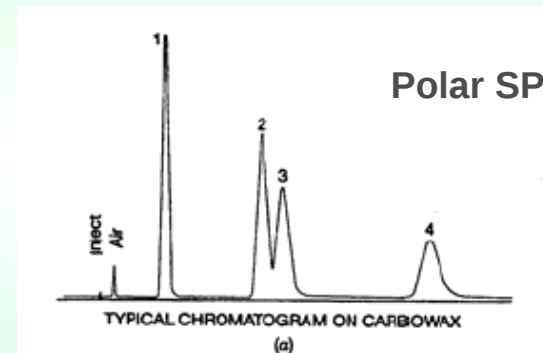
# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Các pha tĩnh (ST) thường sử dụng trong GLC

Structure	Polarity	Temperature range (°C)
 <p>(Diphenyl)<sub>x</sub>(dimethyl)<sub>1-x</sub> polysiloxane</p>	<p><math>x = 0</math> Nonpolar</p> <p><math>x = 0.05</math> Nonpolar</p> <p><math>x = 0.35</math> Intermediate polarity</p> <p><math>x = 0.65</math> Intermediate polarity</p>	<p><math>-60^{\circ} - 320^{\circ}</math></p> <p><math>-60^{\circ} - 320^{\circ}</math></p> <p><math>0^{\circ} - 300^{\circ}</math></p> <p><math>50^{\circ} - 370^{\circ}</math></p>
 <p>(Cyanopropylphenyl)<sub>0.14</sub>(dimethyl)<sub>0.86</sub> polysiloxane</p>	Intermediate polarity	$-20^{\circ} - 280^{\circ}$
 <p>Carbowax (poly(ethylene glycol))</p>	Strongly polar	$40^{\circ} - 250^{\circ}$
 <p>(Biscyanopropyl)<sub>0.9</sub>(cyanopropylphenyl)<sub>0.1</sub> polysiloxane</p>	Strongly polar	$0^{\circ} - 275^{\circ}$

## Ảnh hưởng của độ phân cực của pha tĩnh đến thời gian lưu

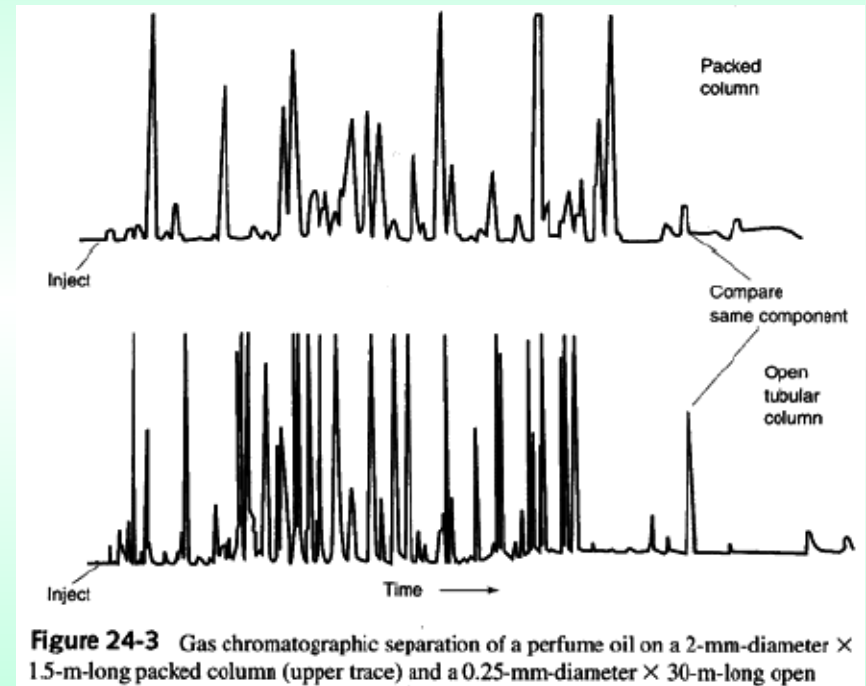
- #1 n-heptane
- #2 tetrahydrofuran
- #3 2-butanone
- #4 n-propanol



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## So sánh cột nhồi và cột mao quản

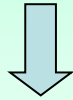
	Typical 1/8 " packed	Typical Capillary
I.D.	2.2 mm	0.25 mm 0.1-0.53 mm
$d_f$	5 $\mu\text{m}$	0.25 $\mu\text{m}$
L	1-2 m	10-60 m
N	4,000	180,000
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lower cost</li> <li>• Easy to make</li> <li>• Larger samples</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Higher sep. efficiency</li> <li>• Faster sep.</li> <li>• Better for complex mixtures</li> </ul>



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Ổn nhiệt cột sắc ký (Column Thermostating)

Mục đích: Bảo đảm tính lặp lại của thời gian lưu

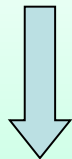


Lò ổn nhiệt (thermostating oven)

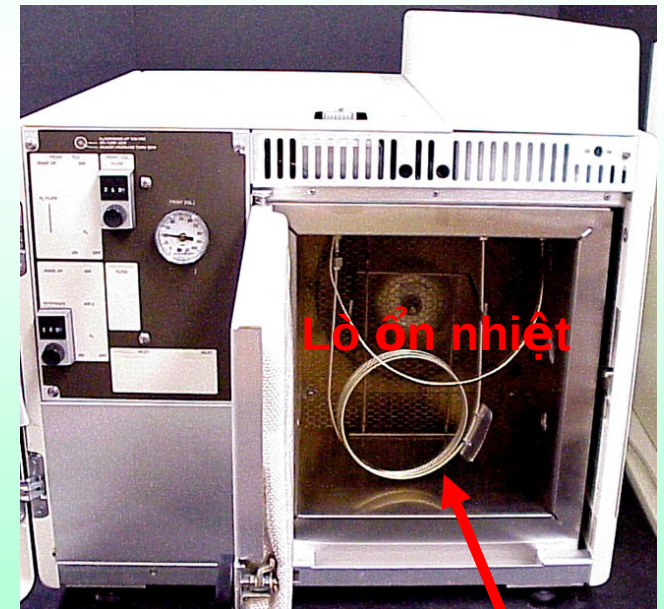
Isothermal: mẫu đơn giản

$$T_{opti.} = f(T_{sôi}), T_{opti} \geq T_{sôi} \text{ với } RT = 2 - 30 \text{ phút}$$

## Nhiệt độ chương trình hóa (Temperature Programming)



Mẫu phức tạp: Tách các cấu tử của mẫu dựa vào sự thay đổi của T sôi

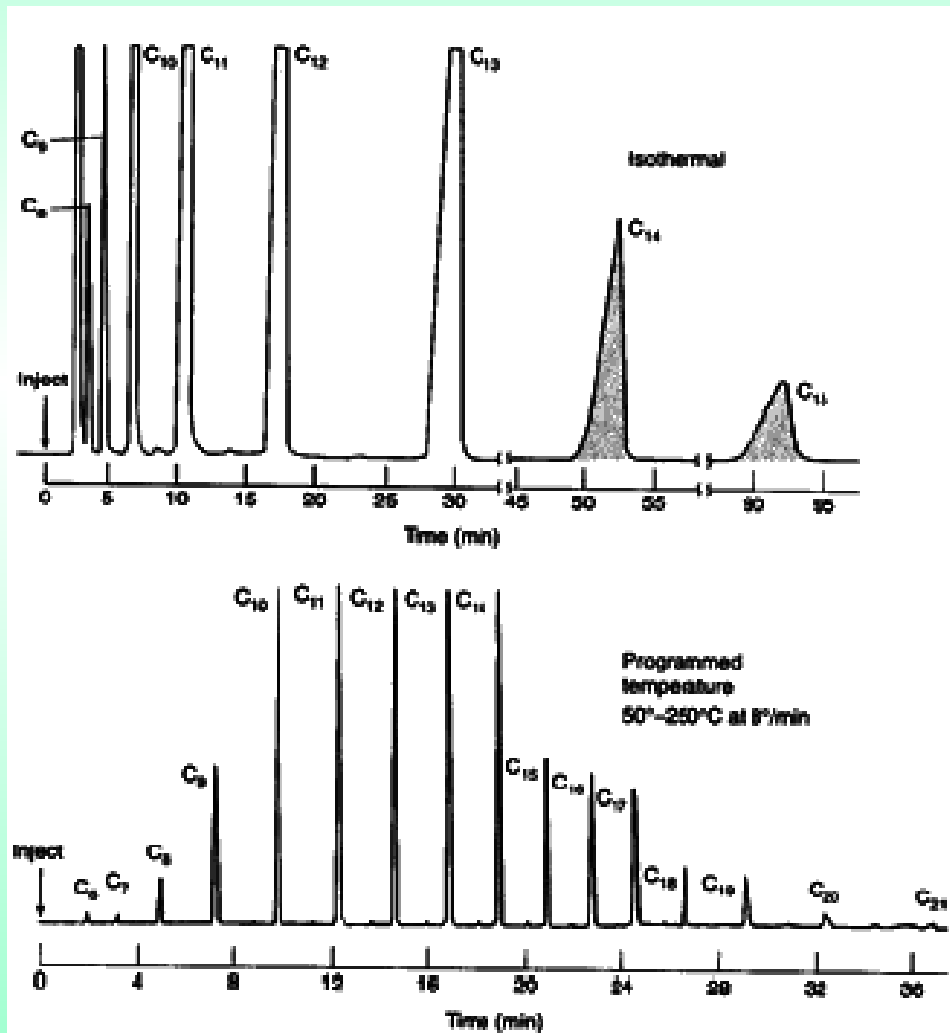


Cột sắc ký

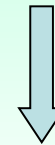


# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

So sánh sắc ký đồ ở hai chế độ: Isothermal  
và chương trình hóa nhiệt độ



Chương trình hóa nhiệt độ



Hệ số khả năng  $k'_A = \frac{t_r - t_m}{t_m}$



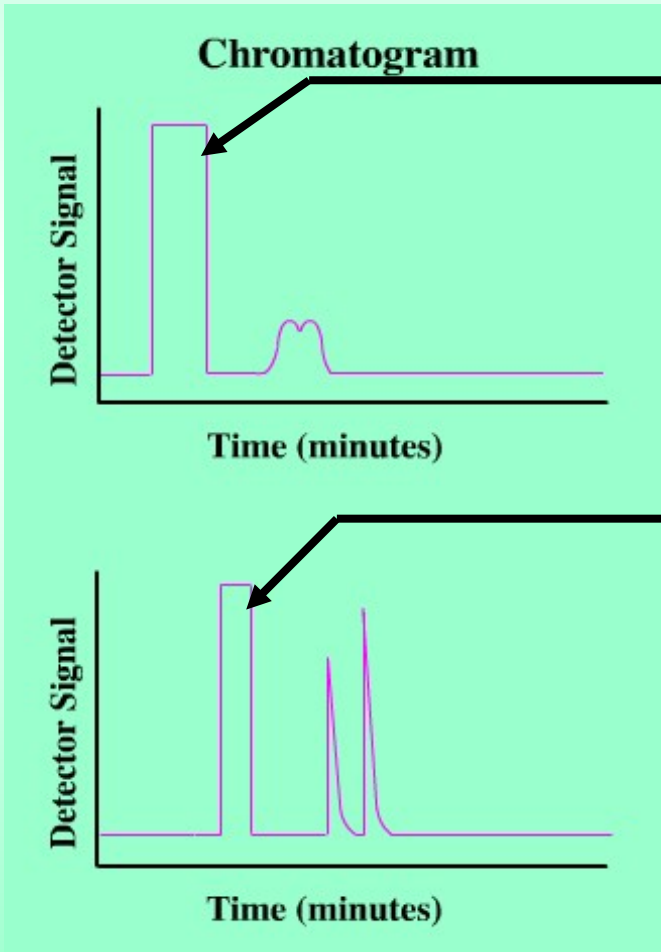
Độ phân giải  $R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Nhiệt độ chương trình hóa

Tăng khả năng tách của cột nhờ ngưng tụ rồi bốc hơi dung môi



Chromatogram

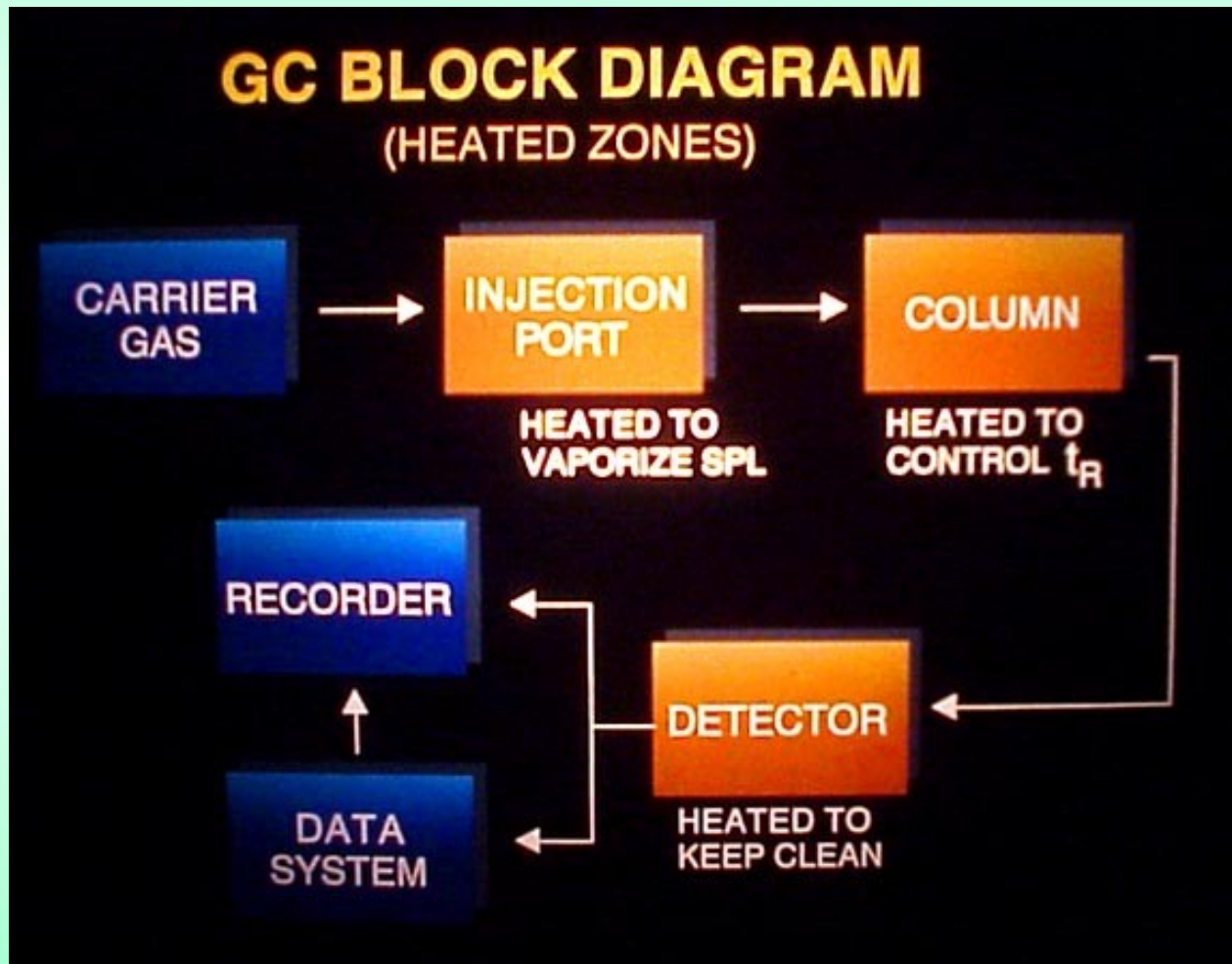
Dung môi bốc hơi ngay khi vào cột sắc ký

Dung môi ngưng tụ trên cột cùng với các cấu tử khác, sau đó bốc hơi, tái phân bố lại các chất cần phân tích



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

Các vùng có gia nhiệt của hệ sắc ký khí (GC)



# B. Sắc ký khí

## (Gas-Liquid Chromatography)

### Đầu dò (Detectors)

Một số yêu cầu:

- ✓ Tín hiệu thu được tuyến tính hoặc gần tuyến tính với lượng mẫu
- ✓ Thời gian trả lời nhanh
- ✓ Phát hiện đa dạng (universal detection)
- ✓ Tín hiệu ra không phụ thuộc vào nhiệt độ
- ✓ Làm việc ổn định từ nhiệt độ thường đến 400°C (đối với GC)

- **Thermal Conductivity Detector (TCD)**
- **Flame Ionization Detector (FID)**
- **Electron Capture Detector (ECD)**
- *Nitrogen-Phosphorous Detector (NPD)*
- *Flame Photometric Detector (FPD): FID tweaked for S compounds*
- *Photoionization Detector (PID)*

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## *Thermal Conductivity Detector (TCD)*

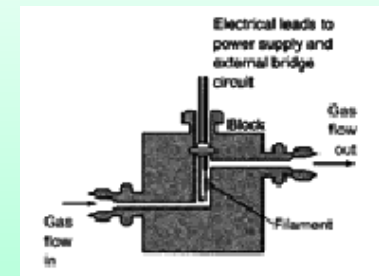
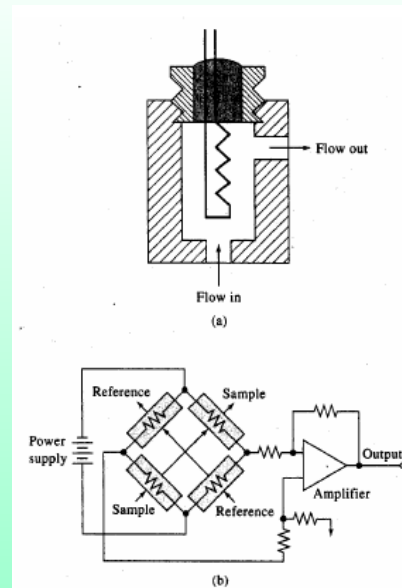
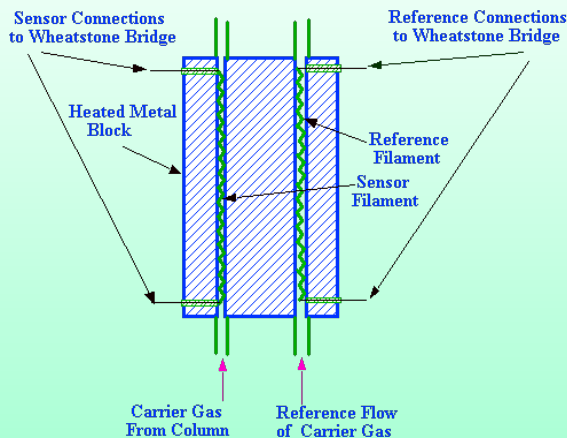
Measures heat loss from a hot filament – nearly universal

- ✓ Filament heated to const T
- ✓ When only carrier gas flows heat loss to metal block is constant, filament T remains constant
- ✓ When an analyte species flows past the filament generally thermal conductivity goes down, T of filament will rise. (resistance of the filament will rise).

*Độ dẫn nhiệt của khí mang (He hoặc H<sub>2</sub>)*

*10 lần lớn hơn các hợp chất hữu cơ*

### Sơ đồ nguyên lý



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## *Thermal Conductivity Detector (TCD)*

Table 24-4		
Thermal conductivity at 273 K and 1 atm		
Gas	Thermal conductivity $J/(K \cdot m \cdot s)$	Molecular weight
H <sub>2</sub>	0.170	2
He	0.141	4
NH <sub>3</sub>	0.021 5	17
N <sub>2</sub>	0.024 3	28
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	0.017 0	28
O <sub>2</sub>	0.024 6	32
Ar	0.016 2	40
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	0.015 1	44
CO <sub>2</sub>	0.014 4	44
Cl <sub>2</sub>	0.007 6	71

The energy per unit area per unit time flowing from a hot region to a cold region is given by

$$\text{energy flux } (J/m^2 \cdot s) = -\kappa(dT/dx)$$

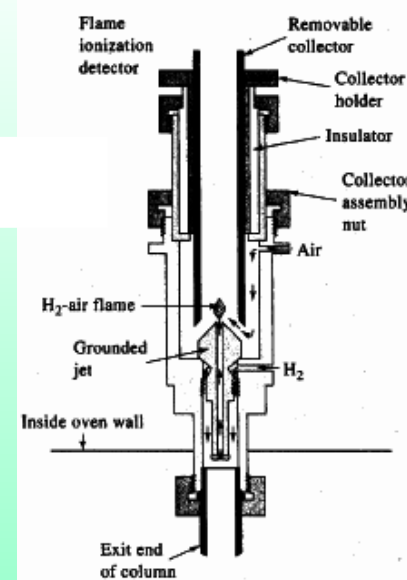
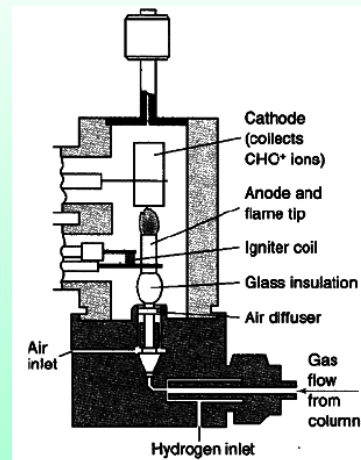
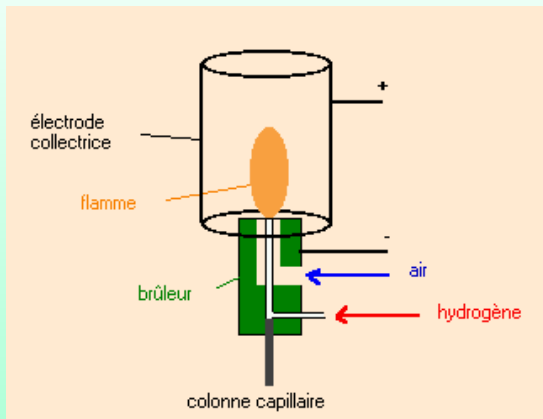
where  $\kappa$  is the thermal conductivity [units =  $J/(K \cdot m \cdot s)$ ] and  $dT/dx$  is the temperature gradient (K/m). Thermal conductivity is to energy flux as the diffusion coefficient is to mass flux.

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Flame Ionization Detector (FID)

### Sensitive towards organics

- ✓ Analyte is burned in H<sub>2</sub>/air, which produces CH and CHO<sup>+</sup> radicals
- ✓ CHO<sup>+</sup> radicals are reduced at a cathode which produces a current proportional to the radical quantity ~ 10<sup>-12</sup> A
- ✓ Specific for organic carbon, insensitive to inorganics, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> etc.
- ✓ Generally DL 100x less than TCD about pg/s (flow rate dependent)
- ✓ Response to specific organic depends on the number of organic carbons.

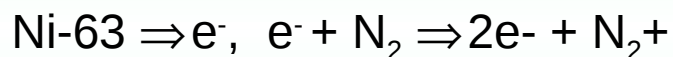


# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## *Electron Capture Detector (ECD)*

**Sensitive to electron withdrawing groups especially towards organics containing -F, -Cl, -Br, -I also, -CN, NO<sub>2</sub>**

✓ **Nickel-63** source emits energetic electrons collides with N<sub>2</sub> (introduced as make-up gas or can be used as carrier gas) producing more electrons:



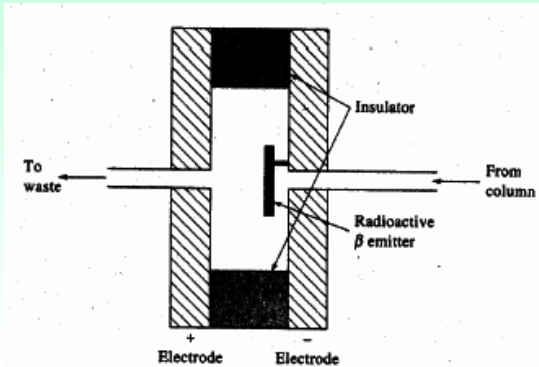
- ✓ The result is a constant current that is detected by the electron collector (anode).
- ✓ As an analyte flows through past the Ni-63 source, electron capture is possible by electron-withdrawing species:  $\text{A} + e^{-} \Rightarrow \text{A}^{-}$
- ✓ Current decreases as a result of e<sup>-</sup> capture by analyte. This is one of the few instances in which a signal is produced by a *decrease* in detectable phenomenon.
- ✓ Very low DL for detected species 10<sup>-15</sup>g/ml for many halogenated substances



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Electron Capture Detector (ECD)

Sơ đồ nguyên lý



The bad

- Radioactive Ni-63 source
- Easily contaminated with O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, sample overloading.
- High maintenance device.
- Highly variable response to halogenated substances
- Sometimes complementary information from FID helps.

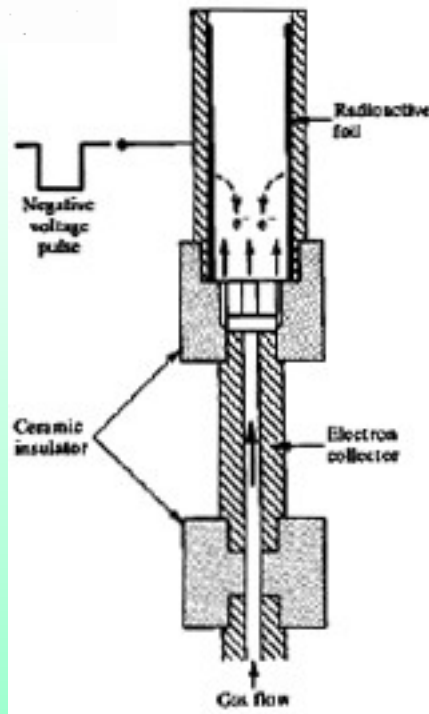


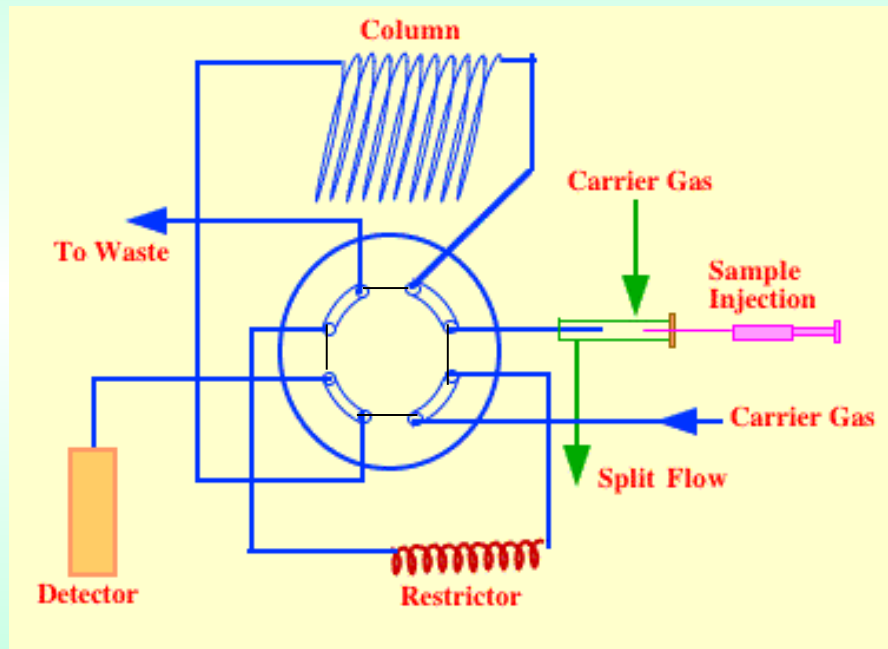
TABLE 7.5 Relative ECD Molar Responses [24]<sup>a</sup>

M	ECD Response <sup>b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl	1.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.5
CHCl <sub>3</sub>	420
CCl <sub>4</sub>	10,000
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> Cl	1.9
CH <sub>2</sub> ClCH <sub>2</sub> Cl	4.2
CH <sub>3</sub> CHClCH <sub>3</sub>	1.8
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CCl	1.5
CH <sub>2</sub> = CHCl	0.0062
CH <sub>2</sub> = CCl <sub>2</sub>	17
<i>trans</i> -CHCl = CHCl	1.5
<i>cis</i> -CHCl = CHCl	1.1
CHCl = CCl <sub>2</sub>	460
CCl <sub>2</sub> = CCl <sub>2</sub>	3,600
Ph - Cl <sup>b</sup>	0.026
Ph - CH <sub>2</sub> Cl <sup>b</sup>	38
CF <sub>2</sub> Cl	6.3
CHF <sub>2</sub> Cl	1.8
CF <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	160
CFCl <sub>3</sub>	4,000

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Một số kỹ thuật chuyển valve

### Back flushing Techniques



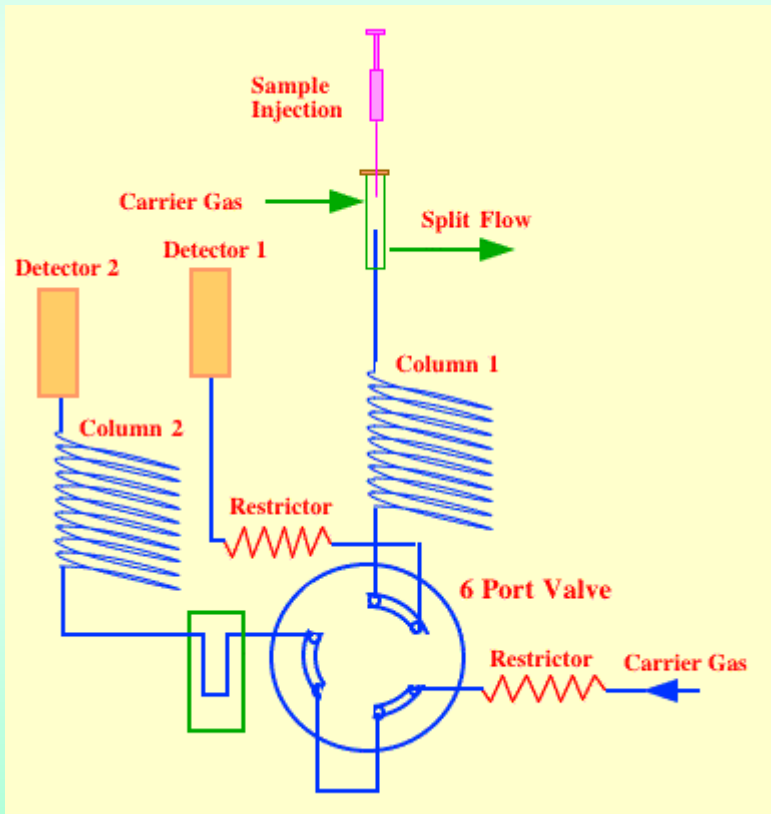
**Mục đích:** phân tích các mẫu chứa các chất tan tương tác mạnh với cột: nhiễm bẩn cột hoặc thời gian lưu kéo dài

- ✓ Valve 8 cổng
- ✓ Chuyển valve và đảo chiều chuyển động của pha động
- ✓ Hạn chế sự nhiễm bẩn của cột và thời gian phân tích

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Một số kỹ thuật chuyển valve

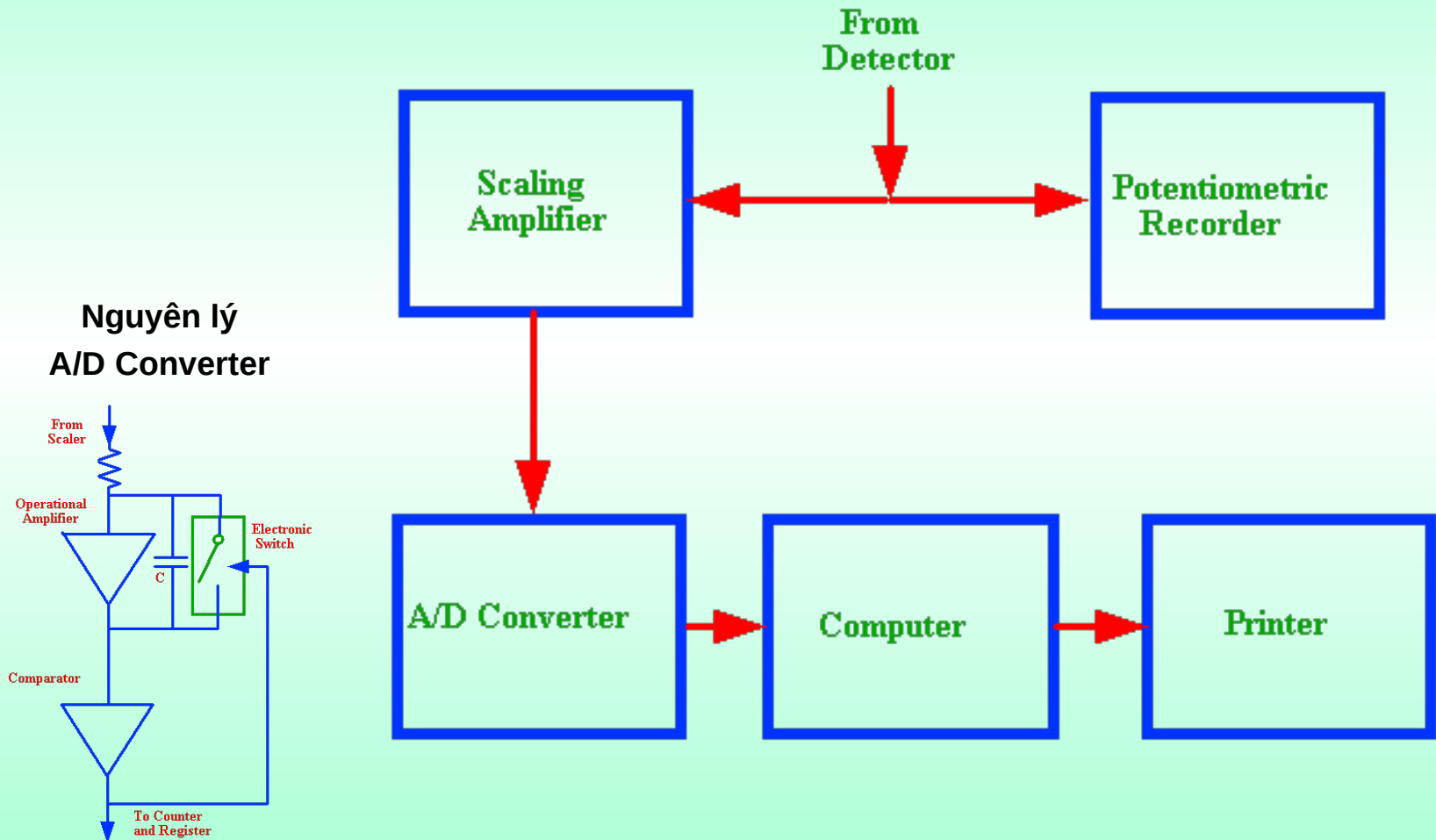
### *Apparatus for Heart Cutting*



- ✓ Valve 6 ngã
- ✓ Sử dụng đối hệ thống với hai cột và 2 detectors
- ✓ Các cấu tử ở vùng giữa của mẫu được phân tách trên cột 2
- ✓ Các cấu tử đầu và cuối được phân tách trên cột 1

# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Thu thập và xử lý số liệu (Data Acquisition and Processing)



# B. Sắc ký khí (Gas-Liquid Chromatography)

## Một số ứng dụng của GC (GLC)

- ✓ Áp dụng đối với các mẫu bốc hơi và ổn định nhiệt đến vài trăm °C
- ✓ Có khả năng phát hiện và phân tích rất nhiều chất và hỗn hợp
- ✓ Được ứng dụng rộng rãi để tách và xác định các cấu tử trong các mẫu từ nhiều chủng loại khác nhau

## Một vài ví dụ:

- ☺ Ketones: polydiméthyl siloxane
- ☺ Alkaloides: 5% phenyl polydimethyl siloxane
- ☺ Steroïds: 50% phenyl polydimethyl siloxane
- ☺ Chlorinated Aromatics: 50% Trifluoropropyl polydimethyl siloxane
- ☺ Alcohols: Polyethylenglycol
- ☺ Esters: 50% Cyanopropyl polydimethyl siloxane



- ✓ Sắc ký khí kết hợp khối phổ

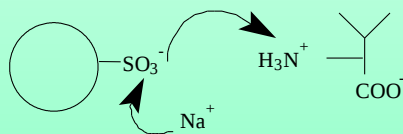
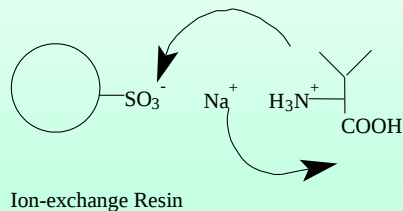


# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Phân loại HPLC dựa bản chất tương tác

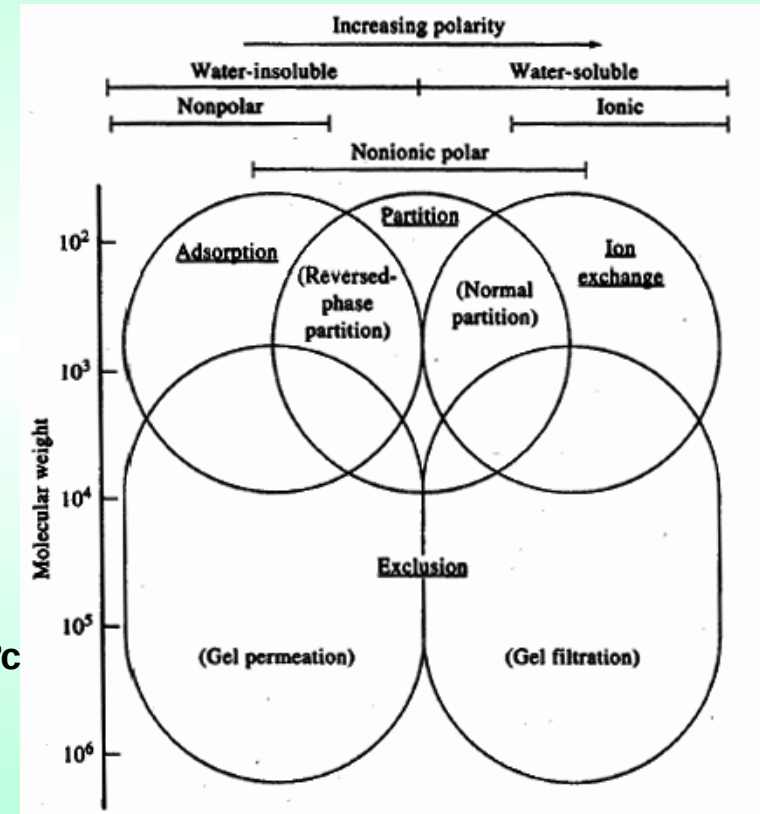
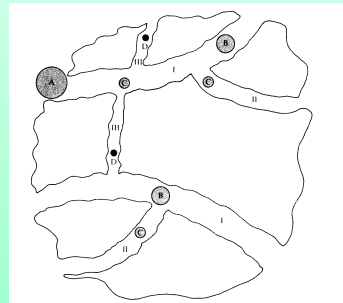
- Sắc ký phân bố (partition chromatography)
- Sắc ký hấp phụ hoặc lỏng-rắn (adsorption or liquid-solid chromatography)
- Sắc ký trao đổi ion (ion exchange chromatography)
- Sắc ký loại trừ kích thước (size exclusion chromatography)

VD: nguyên lý sắc ký trao đổi ion  
(acide amine)



pH2  
pH4.5

## Sắc ký loại trừ kích thước



# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

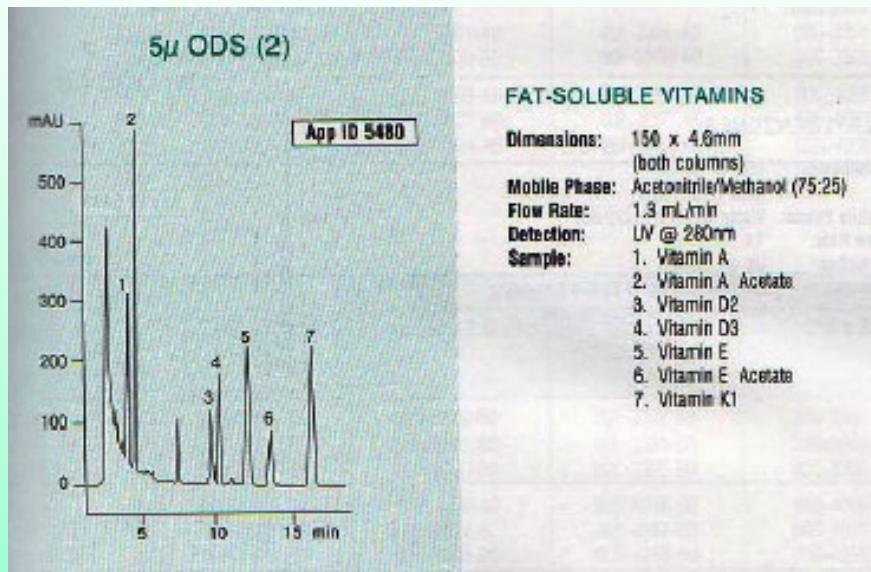
## Phân loại HPLC dựa vào vật liệu nhồi

### **Đặc điểm của HPLC**

*Pha tĩnh được nhồi trong cột*

*Pha động ở trạng thái lỏng: Các dung môi, hỗn hợp dung môi hoặc nước*

- ✓ Pha thông thường (Normal phase): vật liệu nhồi là silica đơn giản
- ✓ Trao đổi ion: silica biến tính (modified silica)
- ✓ Pha đảo (reverse-phase): silica biến tính




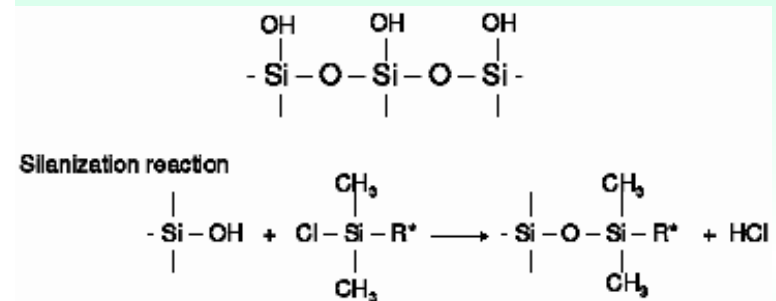
Phần lớn các HPLC là pha đảo

- ✓ Chất phân tích được giữ trên pha tĩnh phân cực nhỏ hơn cho đến khi bị rửa trôi bởi pha động phân cực đủ lớn
- ✓ Thao tác đơn giản
- ✓ Hiệu quả cao
- ✓ Cột làm việc ổn định
- ✓ Có thể phân tích cho cả hai loại cấu tử có đặc tính tương tự hoặc khác xa nhau

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## HPLC: Stationary Phases

$\text{-Si-OH}$	Normal phase
$\text{-Si-C}_8\text{H}_{17}$	Reverse-phase ; basic column
$\text{-Si-C}_{18}\text{H}_{37}$	Reverse-phase ; more retentive than C8 ; excellent for ion-pairing
$\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CN}$	Normal- or reverse-phase ; selectivity for polar compounds
$\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 	Reverse-phase ; good for aromatic compounds
$\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-SO}_2\text{H}$	Ion-exchange ; separates bases
$\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$	Ion-exchange ; separates acids

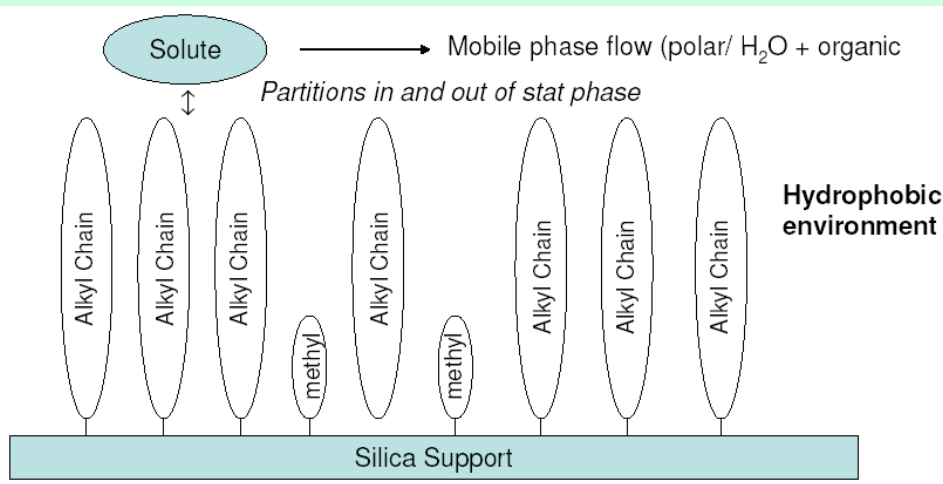


Mặc dầu có nhiều lý thuyết nghiên cứu về việc sử dụng pha đảo nhưng phần lớn các chương trình HPLC pha đảo đều thu được từ **phương pháp thử và sai** (by trial and error).



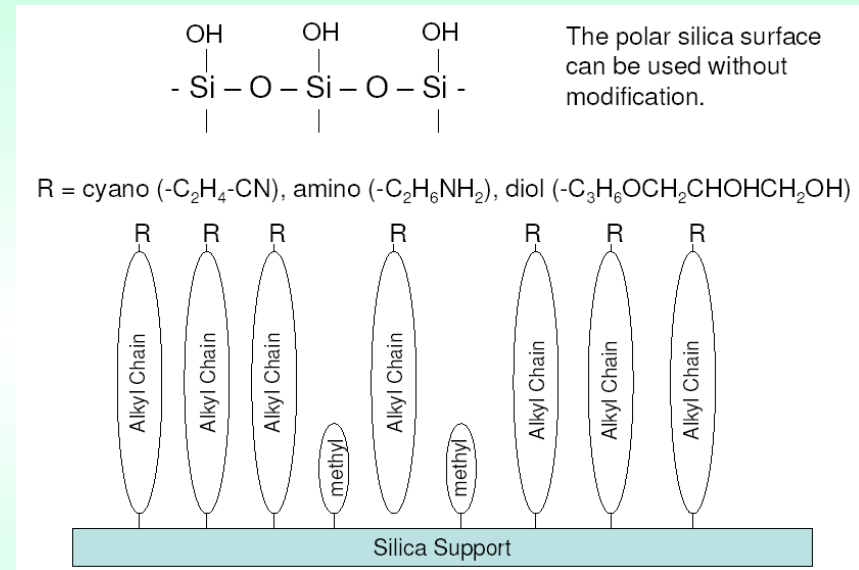
# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Pha tĩnh-Pha đảo (Stationary Phases for Reversed-Phase LC)



- ✓ **Gốc R là C8 (n-octyl), C12 (n-octyl) hoặc C18 (n-octyldecyl).**
- ✓ **Pha động là H<sub>2</sub>O + dung môi hòa tan (acetonitrile, methanol, ethanol, isopropanol).**
- ✓ **Các cấu tử phân cực sẽ bị rửa ra nhanh nhất, tăng độ phân cực của pha động sẽ làm tăng thời gian chạy mẫu**

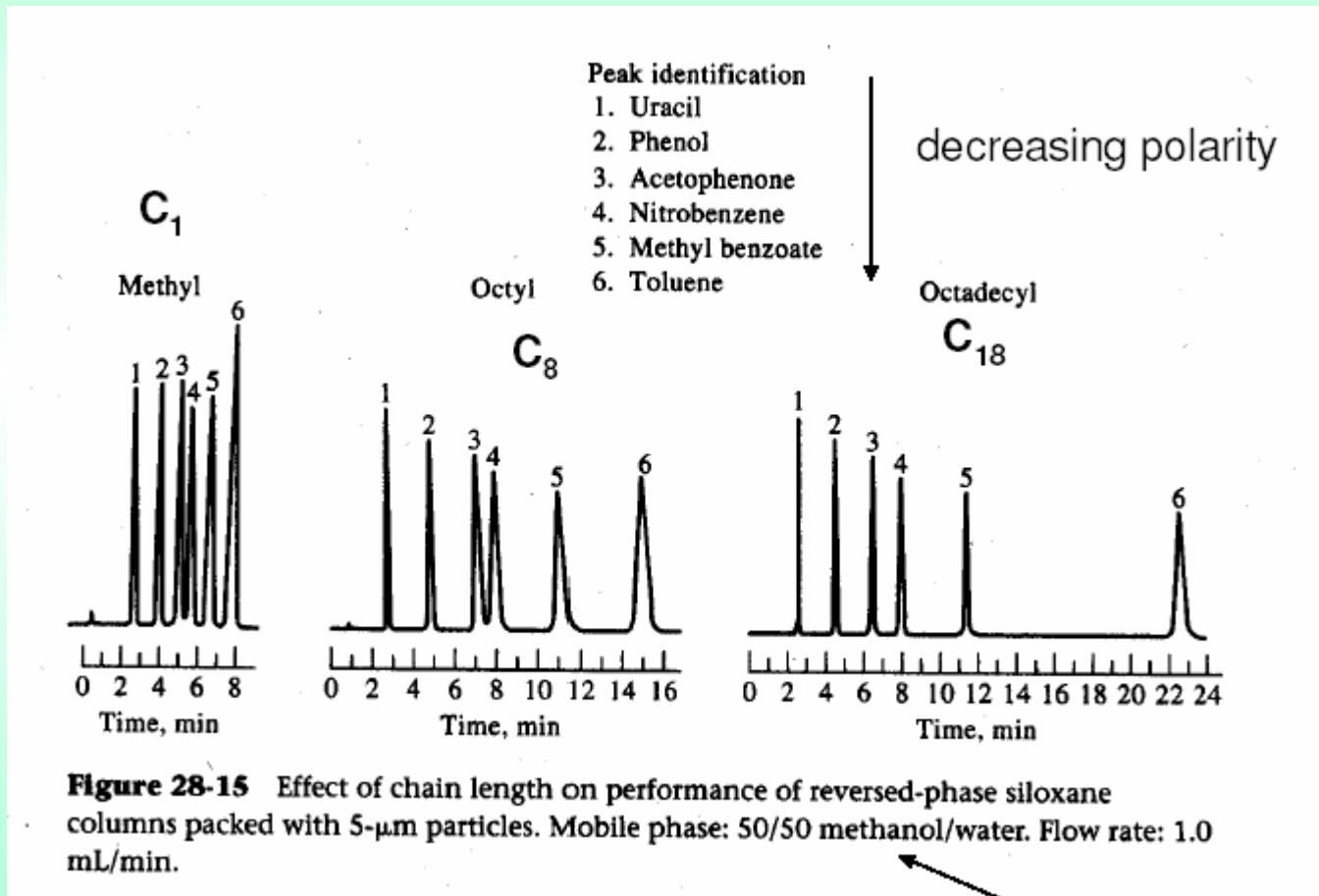
## Pha tĩnh bình thường của LC (Stationary Phases for Normal LC)



- ✓ **Pha động tương đối không phân cực: Hexane, Isopropyl eter, toluene...**
- ✓ **Các cấu tử không phân cực sẽ bị rửa ra nhanh nhất, tăng độ phân cực của pha động sẽ giảm thời gian chạy mẫu**

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

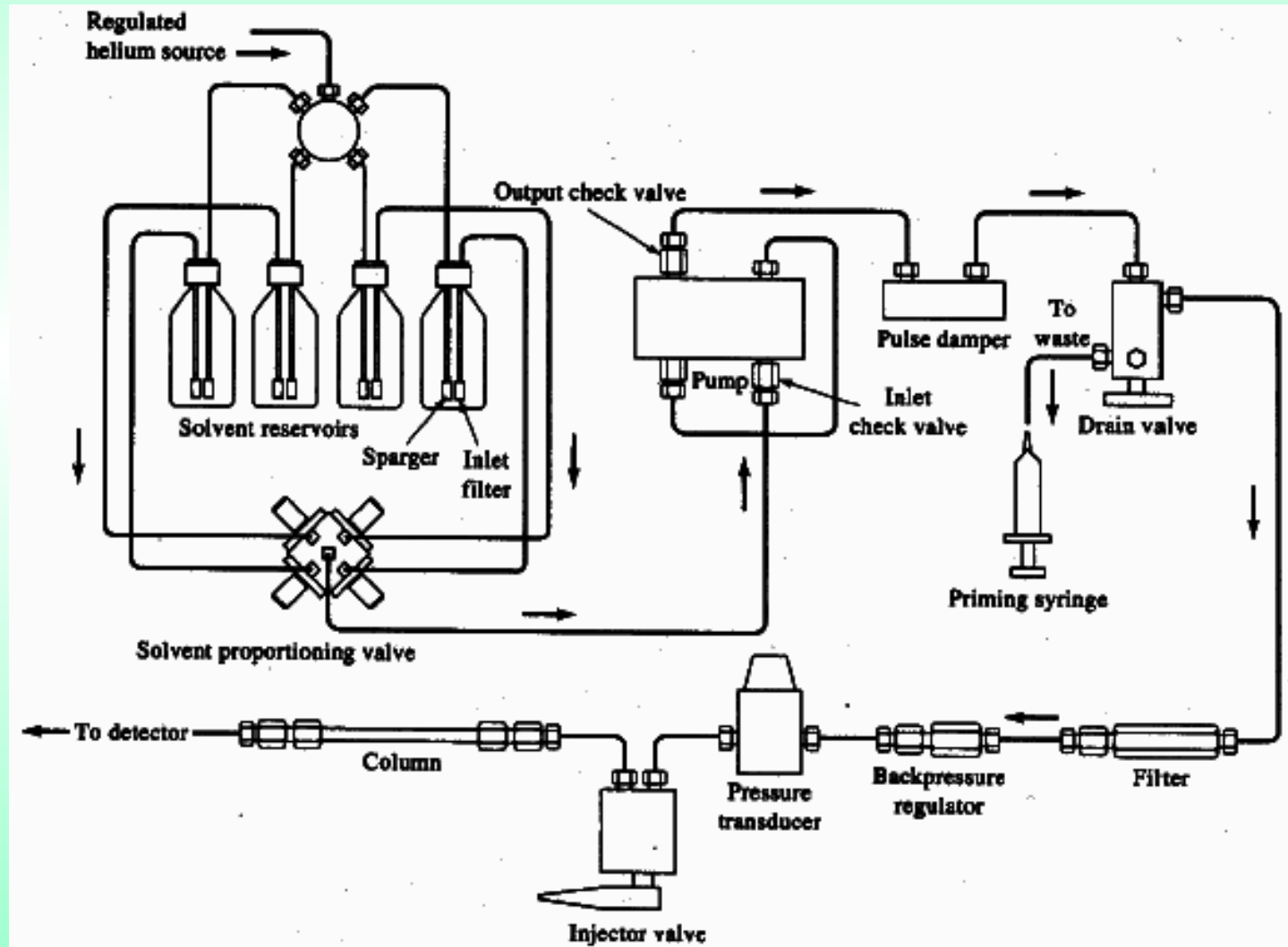
## Ảnh hưởng của bản chất pha tĩnh đến chất lượng tách



Pha đảo

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Sơ đồ nguyên lý của HPLC



# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Các yêu cầu đối với dung môi

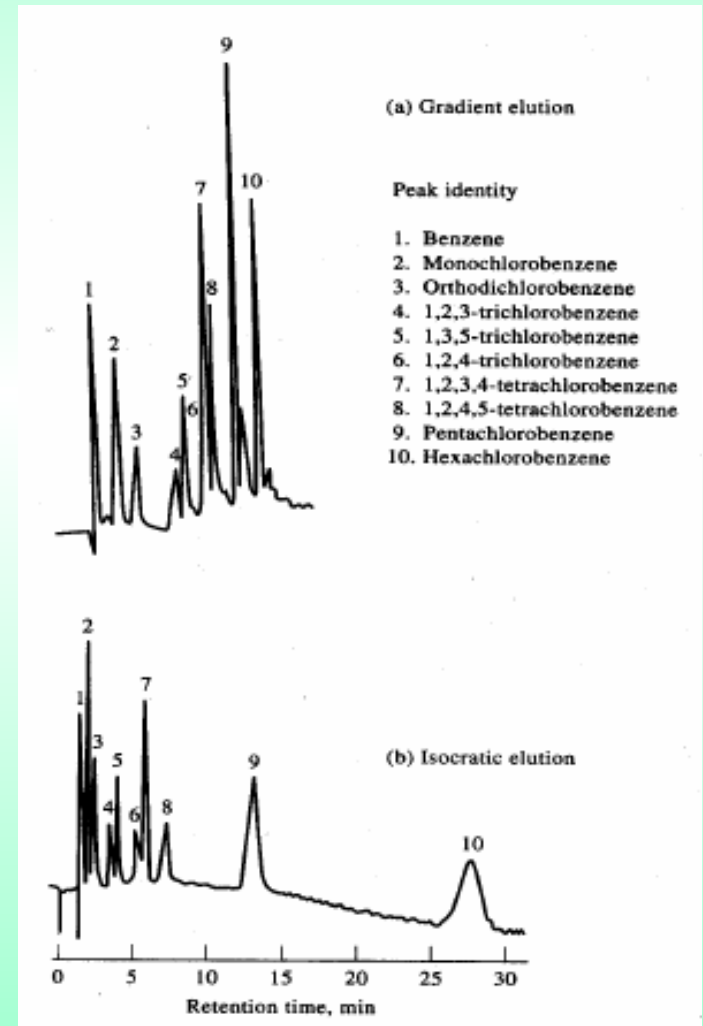
- ✓ Áp suất bơm: vài trăm atm (~ 6000psi), lưu lượng 0,1 – 10 ml.min<sup>-1</sup> với E<0,5%
- ✓ Vật liệu bơm bền ăn mòn đối với nhiều loại dung môi khác nhau
- ✓ Chế độ bơm piston
- ✓ Cỡ hạt trong cột sắc ký: 3 - 10μm
- ✓ Một hoặc nhiều bình chứa dung môi (500 ml)
- ✓ Loại bỏ hoàn toàn khí hòa tan và cặn trong dung môi ⇔ giảm độ rộng của peak (band spreading) và ảnh hưởng đến chất lượng detector
- ✓ Đuổi khí hòa tan trong dung môi bằng khí trơ (sparger)
- ✓ Lựa chọn chế độ tách rửa (elution) cho dung môi
- ✓ Trang bị các loại valves tỷ lệ (proportionating valves) cho phép đưa dung môi từ hai bình chứa với các lưu lượng thay đổi liên tục

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Hiệu quả tách bằng phương pháp gradient elution

### Quá trình tách rửa (Elution)

- ✓ Sử dụng một dung môi đơn giản có thành phần không đổi: **isocratic**
- ✓ Sử dụng hai hay nhiều hơn các hệ dung môi có độ phân cực (polarity) khác nhau nhiều: **gradient elution**
- ❖ Tỷ lệ các loại dung môi được **chương trình hóa liên tục hoặc theo từng bậc**
- ❖ **Gradient elution**: tăng chất lượng của quá trình tách (improve separation efficiency)



# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Độ phân cực của một số dung môi sử dụng trong HPLC

### Polar Solvents

**Water > Methanol > Acetonitrile > Ethanol > Oxydipropionitrile**

### Non-polar Solvents

**N-Decane > N-Hexane > N-Pentane > Cyclohexane**

## Lựa chọn pha động và pha tĩnh

Chủ yếu dựa vào sự phân cực của cấu tử phân tích, pha động, pha tĩnh

Quy tắc chung: độ phân cực (polarity) của cấu tử cần phân tích và pha tĩnh là tương đương còn pha động có độ phân cực sai biệt

Khi độ phân cực của cấu tử và pha tĩnh quá giống nhau: tương tác mạnh giữa cấu tử cần phân tích và pha tĩnh  $\Rightarrow$  thời gian phân tích kéo dài

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Tính chất một số loại dung môi sử dụng trong HPLC

Solvent	Refractive Index <sup>a</sup>	Viscosity, cP <sup>b</sup>	Boiling Point, °C	Polarity Index, P <sup>c</sup>	Eluent Strength, $\epsilon^d$
Fluoroalkanes <sup>d</sup>	1.27–1.29	0.4–2.6	50–174	<–2	–0.25
Cyclohexane	1.423	0.90	81	0.04	–0.2
n-Hexane	1.372	0.30	69	0.1	0.01
1-Chlorobutane	1.400	0.42	78	1.0	0.26 <sup>e</sup>
Carbon tetrachloride	1.457	0.90	77	1.6	0.18
i-Propyl ether	1.365	0.38	68	2.4	0.28
Toluene	1.494	0.55	110	2.4	0.29
Diethyl ether	1.350	0.24	35	2.8	0.38
Tetrahydrofuran	1.405	0.46	66	4.0	0.57
Chloroform	1.443	0.53	61	4.1	0.40
Ethanol	1.359	1.08	78	4.3	0.88
Ethyl acetate	1.370	0.43	77	4.4	0.58
Dioxane	1.420	1.2	101	4.8	0.56
Methanol	1.326	0.54	65	5.1	0.95
Acetonitrile	1.341	0.34	82	5.8	0.65
Nitromethane	1.380	0.61	101	6.0	0.64
Ethylene glycol	1.431	16.5	182	6.9	1.11
Water	1.333	0.89	100	10.2	Large

<sup>a</sup>At 25°C.

<sup>b</sup>The centipoise is a common unit of viscosity; in SI units, 1 cP = 1 mN · s · m<sup>-2</sup>.

<sup>c</sup>On Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Multiplication by 0.8 gives  $\epsilon^d$  on SiO<sub>2</sub>.

<sup>d</sup>Properties depend upon molecular weight. Range of data given.

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

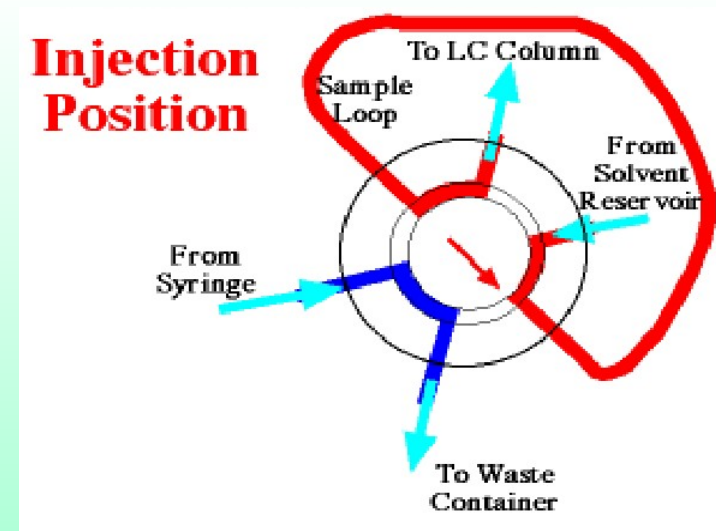
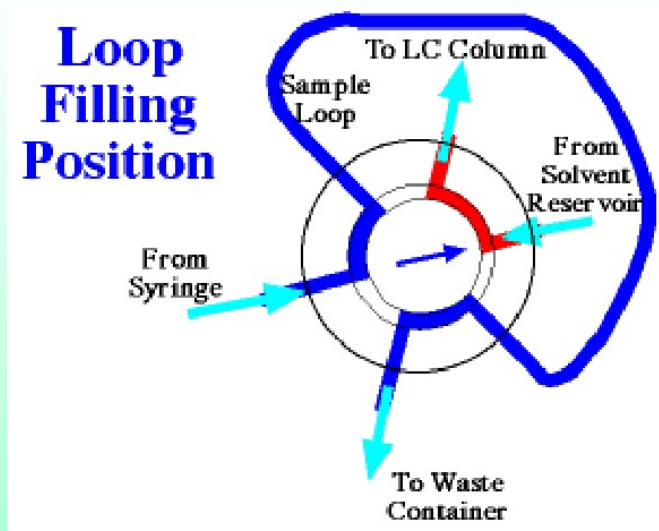
## Hệ thống nạp mẫu (Sample Injection Systems)

Sử dụng valve 6 cổng

Nạp mẫu qua vòng lấy mẫu (sampling loops)  $\Rightarrow$  Sắc ký lỏng hiện đại

Có thể thay thế sampling loops từ 5  $\mu$ l đến 500  $\mu$ l

Sai số của lượng mẫu nạp dưới 1%





# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Cột sắc ký HPLC



### ➤ Thông thường:

**L = 10 – 30 cm và có thể nối tiếp 2 cột hoặc nhiều hơn**

**ID = 4 – 10 mm, kích thước hạt nhồi: 3, 5 và 10 $\mu$  m**

**40.000 – 60.000 đĩa/m cột**

### ➤ *Cột tốc độ cao và hiệu quả hơn*

***L = 3 - 7 cm và có thể nối tiếp 2 cột hoặc nhiều hơn***

***ID = 1 – 4,6 mm, kích thước hạt nhồi: 3 hoặc 5  $\mu$  m***

***100.000 đĩa/m cột***

### Cột bảo vệ (Guard Column)

Được lắp đặt trước cột phân tách để kéo dài tuổi thọ của cột  
Thành phần = thành phần của cột phân tách nhưng cỡ hạt lớn hơn để giảm tổn thất áp suất

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Ổn định nhiệt độ của cột (Column Thermostats)

- Phần lớn ứng dụng của HPLC được thực hiện ở nhiệt độ phòng
- Tuy vậy chất lượng của sắc ký đồ sẽ tốt hơn nếu duy trì nhiệt độ của cột không thay đổi (sai số  $< 0,05^{\circ}\text{C}$ )
- Thiết bị HPLC hiện đại được trang bị thêm lò gia nhiệt cho cột (Column heater) ổn định nhiệt độ ở gần  $150^{\circ}\text{C}$  với sai số  $< 0,05^{\circ}\text{C}$
- Trang bị hệ thống phun nước làm lạnh (water jackets fed) từ bể ổn nhiệt để khống chế chính xác nhiệt độ

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Đầu dò (Detector) dùng cho HPLC

Không nhạy và có khả năng phân tích đa dạng như detector của GC

Thường gặp nhất là Detector UV-Vis

*LOC: Limit Of Detection*

LC Detector	Commercially Available	Mass LOD (commercial detectors) <sup>a</sup>	Mass LOD (state of the art) <sup>b</sup>
Absorbance	Yes <sup>c</sup>	100 pg–1 ng	1 pg
Fluorescence	Yes <sup>c</sup>	1–10 pg	10 fg
Electrochemical	Yes <sup>c</sup>	10 pg–1 ng	100 fg
Refractive index	Yes	100 ng–1 µg	10 ng
Conductivity	Yes	500 pg–1 ng	500 pg
Mass spectrometry	Yes <sup>d</sup>	100 pg–1 ng	1 pg
FT-IR	Yes <sup>d</sup>	1 µg	100 ng
Light scattering <sup>e</sup>	Yes	10 µg	500 ng
Optical activity	No	—	1 ng
Element selective	No	—	10 ng
Photoionization	No	—	1 pg–1 ng

<sup>a</sup>Mass LOD is calculated for injected mass that yields a signal equal to five times the  $\sigma$  noise, using a mol wt of 200 g/mol, 10 µL injected for conventional or 1 µL injected for microbore LC.

<sup>b</sup>Same definition as *a*, above, but the injected volume is generally smaller.

<sup>c</sup>Commercially available for microbore LC also.

<sup>d</sup>Commercially available, yet costly.

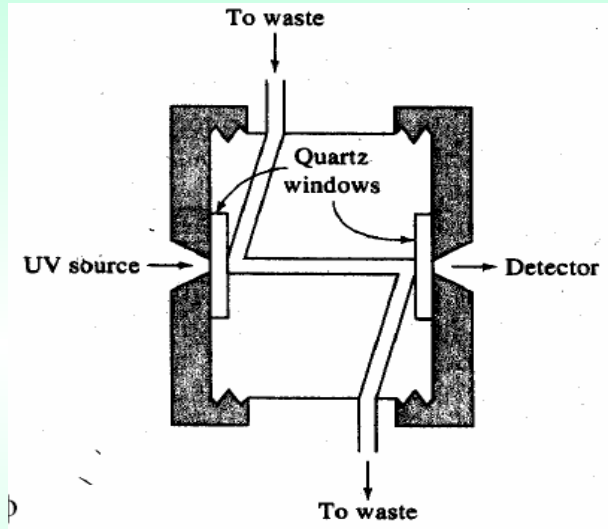
<sup>e</sup>Including low-angle light scattering and nephelometry.

(From E. S. Yeung and R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1238. With permission.)

$$\text{Mass LOD} = \text{concentration (mol/L)} \times \text{inj. vol. (L)} \times \text{FW (g/mol)}$$

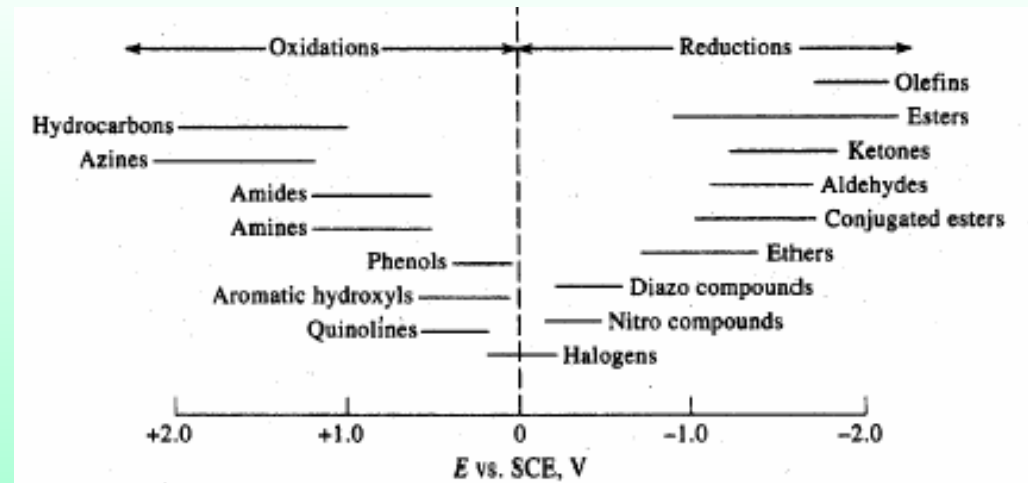
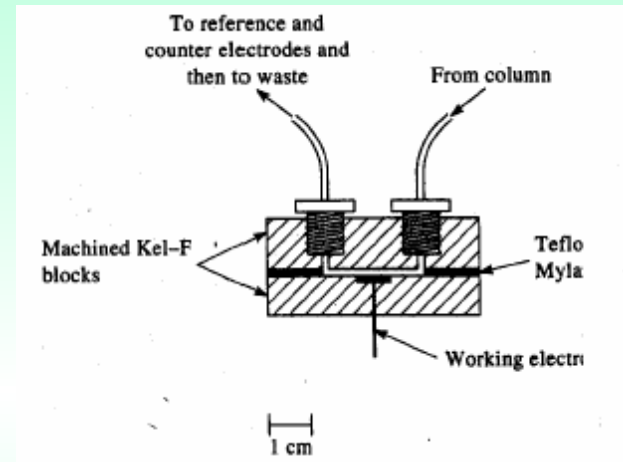
# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## UV-Vis and Fluorescence Detector



$\lambda = 200-400\text{nm}$   
 $\lambda$  sử dụng 254 nm

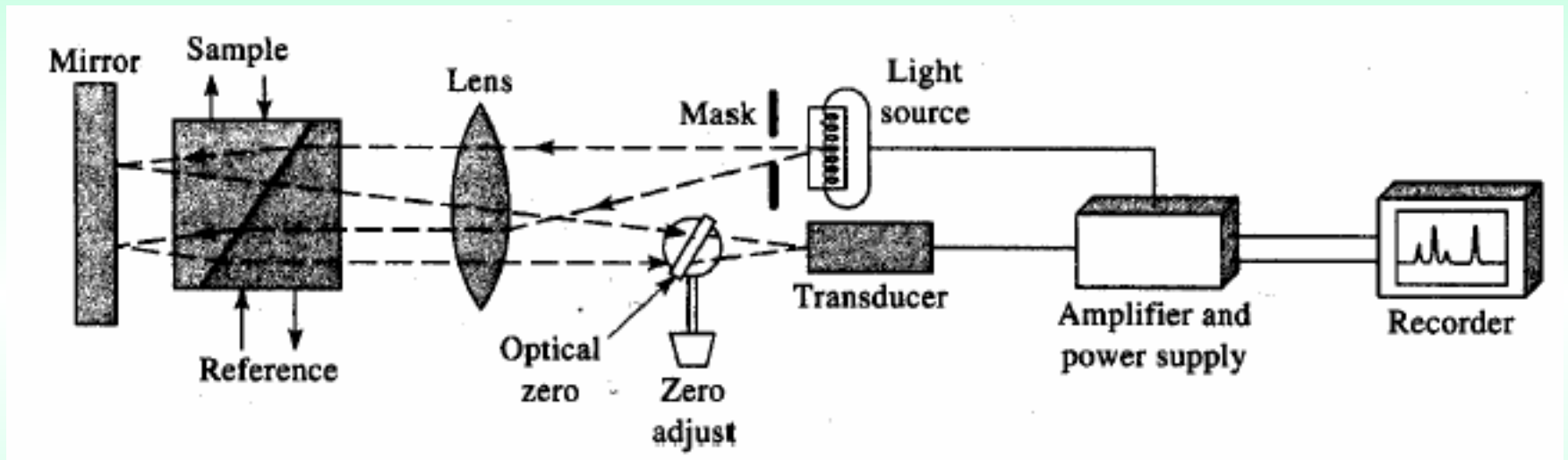
## Electrochemical Detector



Amperometric detection = fixed potential and measure the current response.

# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## Refractive Index Detector



# B. Sắc ký lỏng hiệu quả cao (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

## 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)

# So sánh HPLC và GC

## (Comparison of HPLC and GLC)

### Các đặc điểm chung:

- ✓ Hiệu quả, độ chọn lọc cao, ứng dụng rộng rãi
- ✓ Thể tích mẫu nhỏ
- ✓ Có thể không phá hủy mẫu (nondestructive of sample)
- ✓ Định lượng dễ dàng

### Ưu điểm của HPLC

- ✓ Áp dụng được với các mẫu không bay hơi và không bền nhiệt
- ✓ Áp dụng được cho các ion vô cơ

### Ưu điểm của GC

- ✓ Thiết bị đơn giản và rẻ
- ✓ Nhanh chóng
- ✓ Dễ dàng kết nối với phổ khối