

Các Phương Pháp Tách - Chiết

PGS.TS. Nguyễn Đức Tuấn

Bộ môn Hóa Phân Tích – Kiểm Nghiệm

Khoa Dược – Đại học Y Dược TPHCM

Các Phương Pháp Tách - Chiết

Mục tiêu

- Trình bày được nguyên lý của các phương pháp tách
- Phân biệt được phương pháp thẩm thấu và thẩm tích
- Hiểu được ý nghĩa của các hệ số trong chiết lỏng - lỏng
- Hiểu được cơ sở lý thuyết của chiết ngược dòng
- Trình bày được phạm vi áp dụng của chiết lỏng – lỏng
- Hiểu được nguyên tắc hoạt động của chiết pha rắn

Các Phương Pháp Tách - Chiết

Dàn bài

- Mở đầu
- Các phương pháp tách
- Phương pháp lọc
- Phương pháp ly tâm
- Phương pháp chia cắt pha
- Phương pháp thẩm thấu và thẩm tích
- **Chiết**
- **Chiết pha rắn**

Mở đầu

- Tách là nhóm các phương pháp hóa học, vật lý và hóa lý nhằm đi từ một hỗn hợp phức tạp → hỗn hợp đơn giản → từng chất
- Hỗn hợp phức tạp → tách một chất hoặc một nhóm chất
- Dược: đối tượng phân tích đa dạng → khó xác định trực tiếp một chất mà phải qua giai đoạn tách → định lượng
- Tách có thể dùng để tinh chế hoặc nghiên cứu thành phần của một hỗn hợp

Các phương pháp tách

▪ Tách hỗn hợp không đồng nhất:

- Hỗn hợp có ít nhất hai pha không hòa lẫn vào nhau. Ví dụ: nhũ tương, hỗn dịch
- Tách hai pha:
 - ✓ **Lọc, ly tâm**: áp dụng cho hỗn dịch
 - ✓ Thay đổi nhiệt độ, pH, lắng, gạn: áp dụng cho nhũ tương

▪ Tách hỗn hợp đồng nhất:

- **Chia cắt pha**: hỗn hợp đồng nhất → hỗn hợp không đồng nhất
- Chuyển pha:
 - ✓ Chuyển một chất từ pha này sang pha khác: **Chiết, thẩm thấu, sắc ký**
- Biến đổi trạng thái: **cất, thăng hoa**

Phương pháp lọc

- Tách pha lỏng khỏi pha rắn
- Vật liệu lọc:
 - Dạng sợi hoặc xốp
 - Chất vô cơ:
 - ✓ Dioxyd silic
 - ✓ Amiăng
 - ✓ Thủy tinh (phễu lọc thủy tinh xốp, bông thủy tinh)
 - Chất hữu cơ:
 - ✓ Cellulose (giấy lọc)
 - ✓ Màng polymer
- Kỹ thuật lọc:
 - Lọc ở áp suất thường
 - Lọc ở áp suất giảm (lọc chân không): bình Kitasato

Phương pháp ly tâm

- Dùng sức ly tâm (lực ly tâm) làm lắng tủa
- Tốc độ lắng phụ thuộc lực ly tâm
- Lực ly tâm càng lớn, tốc độ lắng càng cao

$$F = 4\pi^2 n^2 m R$$

n: số vòng quay trong một phút;

m: khối lượng tiểu phân chất kết tủa

R: bán kính vòng quay hay cánh tay đòn

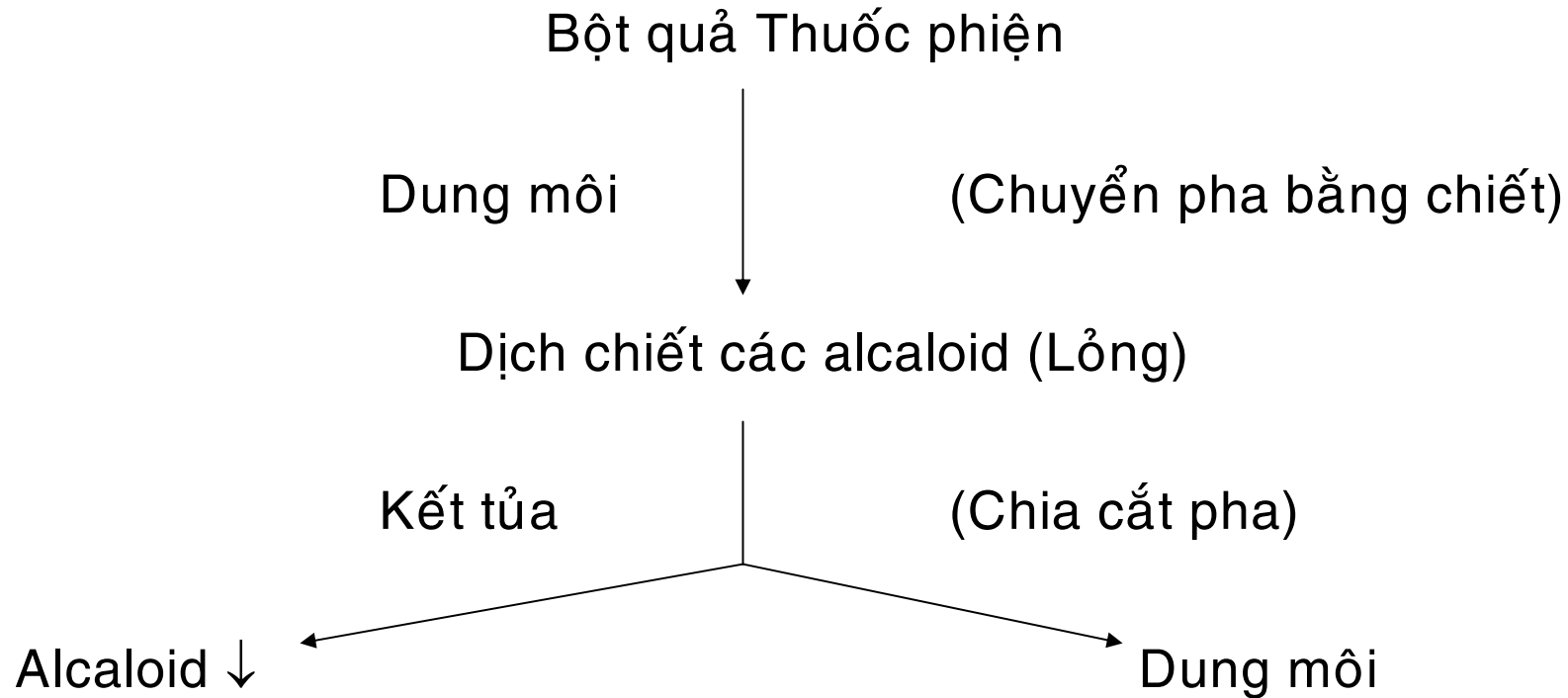
F: lực ly tâm

- Tăng tốc độ lắng → tăng số vòng quay n
- Các máy ly tâm hiện nay thường có tốc độ 3000 vòng – 5000 vòng/phút
- Các máy siêu ly tâm: > 5000 vòng/phút

Phương pháp chia cắt pha

- Một pha → hai pha
- Đơn giản, dễ thực hiện
- Tiến hành sau khi chuyển pha

Ví dụ: Chiết hỗn hợp alcaloid từ quả Thuốc phiện



Phương pháp chia cắt pha

- Tách hỗn hợp rắn
 - Lắng đãi
 - Chọn lọc cơ học
- Tách hỗn hợp lỏng
 - Loại bớt dung môi: cô đặc, bay hơi
 - ✓ Áp suất thường
 - ✓ Áp suất giảm: máy cô quay
 - o Bình cất quay nối với bơm chân không
 - o Phần ngưng đọng cho chảy qua bình khác
 - o Quay làm tăng diện tích bề mặt bay hơi
 - o Ưu điểm: giảm sự oxy hóa chất tan, thu được tủa tinh thể thấm ít dung môi
 - Giảm khả năng hòa tan dung môi
 - ✓ Thay đổi nhiệt độ: tinh chế
 - ✓ Thêm chất lỏng không phải là dung môi vào dung dịch
 - ✓ Thêm chất rắn (phương pháp muối kết)

Phương pháp thẩm thấu và thẩm tích

▪ Thẩm thấu:

➤ Phương pháp chuyển pha. Chất tan chuyển từ pha A sang pha B có thể hòa lẫn vào nhau nên cần có màng ngăn cách (màng thẩm thấu)

➤ Quá trình nội thẩm

(1): dd X trong nước; (2): nước

$$PV = nRT \quad P = hdg$$

V: thể tích dung dịch có n phân tử

d: Khối lượng riêng của dung dịch

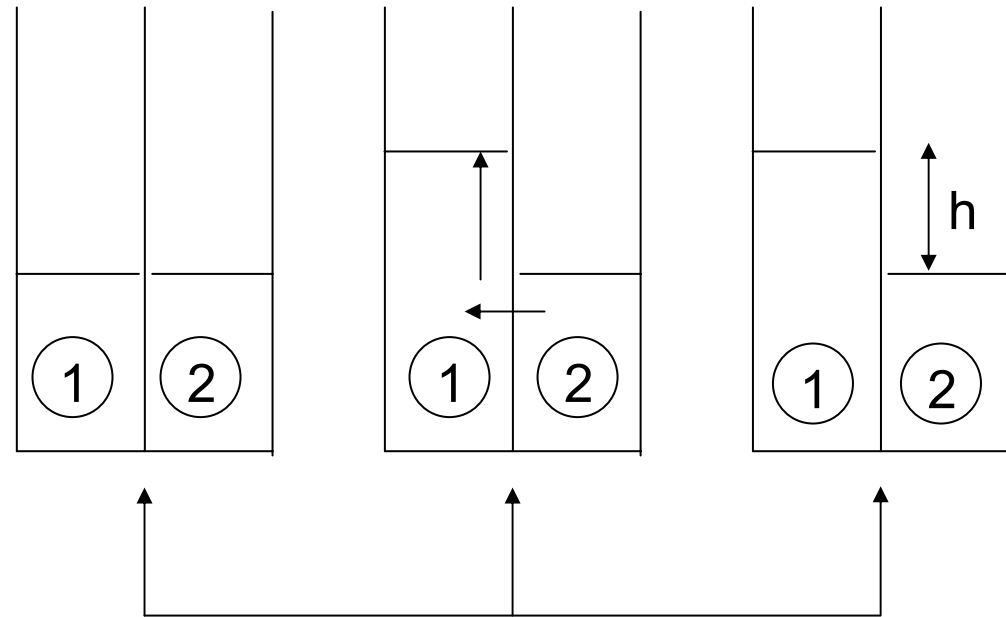
P: áp suất thẩm thấu

$$\Rightarrow n/V = hdg/RT \text{ hay } C = hdg/RT$$

▪ Thẩm tích:

➤ Màng thẩm thấu cho các phân tử nhỏ và trung bình đi qua

➤ Quá trình ngoại thẩm



Màng bán thấm

Ban đầu → Nội thẩm → Cân bằng

Quá trình nội thẩm

Chiết (Ly trích – Extraction)

- Chiết là một phương pháp dùng dung môi (đơn hay hỗn hợp) để tách lấy một chất hay một nhóm các chất từ hỗn hợp cần nghiên cứu
- **Thường gặp:** chiết hoạt chất từ dung dịch nước vào dung môi hữu cơ
- **Mục đích:** định tính, định lượng, xác định cấu trúc
- Chiết là một phương pháp tách bằng chuyển pha dựa vào sự phân bố của chất tan trong hai pha A và B
- **Phân loại:**
 - Chiết lỏng – lỏng (liquid-liquid extraction, LLE)
 - Chiết lỏng – rắn (liquid-solid extraction, LSE): kỹ thuật chiết pha rắn (Solid phase extraction, SPE)
- Chiết có vai trò quan trọng trong kiểm nghiệm

Chiết lỏng - lỏng

❖ **Hệ số phân bố** $K = \frac{C_B}{C_A}$ C_A, C_B lần lượt là nồng độ S trong pha A và B ở trạng thái cân bằng

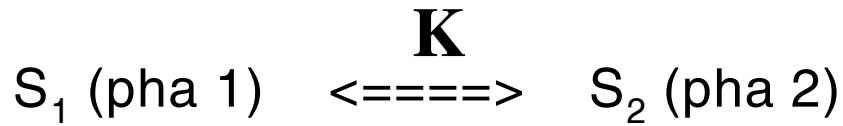
- **Hằng số** ở một nhiệt độ xác định và trong những điều kiện lý tưởng
- **Đặc trưng** cho một chất tan và một cặp dung môi xác định A và B
- **Phụ thuộc** vào nhiệt độ, áp suất, tính chất của chất tan và dung môi

K càng lớn, quá trình chiết càng hiệu quả

Ví dụ: Fe^{3+}

Pha A	Pha B	K
Ether etylic	Nước + HF	0,001
Ether etylic	Nước + HCl	99,0

Chiết lỏng - lỏng



$$K = \frac{[S]_2}{[S]_1} \quad K: \text{ hệ số phân bố}$$

- Pha 1 (V_1) có m mol chất tan S , được chiết bằng pha 2 (V_2)
- q_1 là % S còn lại trong pha 1, nồng độ S trong pha 1: $\frac{m \times q_1}{V_1}$
- $(1-q_1)$ là % S được chiết sang pha 2, nồng độ S trong pha 2: $\frac{(1-q_1) \times m}{V_2}$

$$K = \frac{\frac{(1-q_1) \times m}{V_2}}{\frac{q_1 \times m}{V_1}} \iff q_1 = \frac{V_1}{V_1 + KV_2}$$

Chiết lỏng - lỏng

Tiến hành chiết lần 2: $q_2 = \frac{V_1}{V_1 + KV_2} q_1 = \left[\frac{V_1}{(V_1 + KV_2)} \right]^2$

Sau n lần chiết với V_2 , S còn lại trong pha 1: $q_n = \left[\frac{V_1}{(V_1 + KV_2)} \right]^n$

q luôn luôn nhỏ hơn 1, sau n lần chiết nào đấy tức là q_n sẽ vô cùng nhỏ và có thể coi như bằng 0

Ví dụ: Chất tan A trong nước - benzen có $K = 3$, có nồng độ 0,01 M trong 100 ml dung dịch nước

a) Chiết một lần với 500 ml benzen: $q_1 = \frac{100}{(100 + 3 \times 500)} = 0,062 = 6,2\%$

b) Chiết 5 lần mỗi lần với 100 ml dung môi $q_5 = \left[\frac{100}{(100 + 3 \times 100)} \right]^5 = 0,00098 \approx 0,1\%$

Chiết lỏng - lỏng

❖ **Hệ số phân bố biểu kiến (Hệ số phân chia D)** $K_D = \frac{\sum C_B}{\sum C_A}$ $\Sigma C_B, \Sigma C_A$: tổng nồng độ các dạng khác nhau của chất tan trong B và A

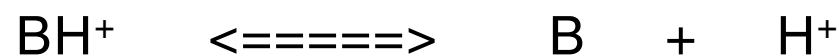
K_D : không bắt buộc là hằng số

- B là một base hữu cơ:

BH⁺ chỉ tồn tại trong pha nước


Pha 1: pha nước

Pha 2: pha DMHC



$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$

Ta có: $K = \frac{[B]_2}{[B]_1} \implies [B]_2 = K[B]_1$ và $K_a = \frac{[B] \times [H^+]}{[BH^+]} = \frac{[B]_1 \times [H^+]}{[BH^+]_1}$

 $D = \frac{K \times K_a}{K_a + [H^+]}$

Hệ số phân chia phụ thuộc vào pH

Chiết lỏng - lỏng

❖ **Hệ số phân bố biểu kiến (Hệ số phân chia D)** $K_D = \frac{\sum C_B}{\sum C_A}$ $\Sigma C_B, \Sigma C_A$: tổng nồng độ các dạng khác nhau của chất tan trong B và A

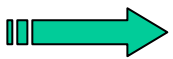
K_D : không bắt buộc là hằng số

- HA là một acid:
A⁻ không tồn tại trong pha hữu cơ
Pha 1: pha nước
Pha 2: pha DMHC



$$D = \frac{[HA]_2}{[HA]_1 + [A^-]_1}$$

Ta có: $K = \frac{[HA]_2}{[HA]_1} \implies [HA]_2 = K[HA]_1$ và $K_a = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[HA]_1}$

 $D = \frac{K \times [H^+]}{K_a + [H^+]}$ **Hệ số phân chia phụ thuộc vào pH**

Chiết lỏng - lỏng

Ví dụ: Dung dịch nước của một amin 0,010 M có $K = 3$, $K_b = 1 \times 10^{-5}$, 50 ml dung dịch trên được chiết bằng 100 ml dung môi

$$\text{a) Ở pH} = 10,00 \quad D = \frac{(3,0 \times 1,0 \times 10^{-9})}{(1,0 \times 10^{-9} + 1,0 \times 10^{-10})} = 2,73 \quad q = \frac{50}{(50 + 2,73 \times 100)} = 0,15 = 15\%$$

$$\text{b) Ở pH} = 8,00 \quad D = \frac{(3,0 \times 1,0 \times 10^{-9})}{(1,0 \times 10^{-9} + 1,0 \times 10^{-8})} = 0,273 \quad q = \frac{50}{(50 + 0,273 \times 100)} = 0,65 = 65\%$$

$$D = \frac{K \times K_a}{K_a + [H^+]} \quad q_n = \left[\frac{V_1}{(V_1 + DV_2)} \right]^n$$

So sánh:

pH

10,00

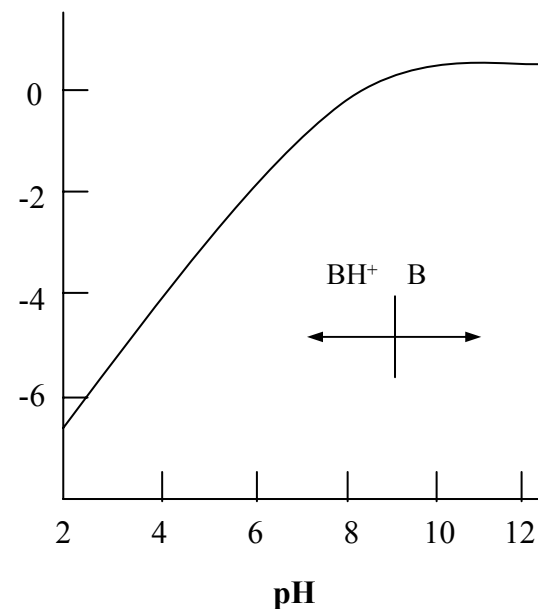
8,00

Nồng độ amin còn lại
trong pha nước

0,0015 M

0,0065 M

Log D



Chiết lỏng - lỏng

❖ **Hiệu suất chiết (độ chiết hay hệ số chiết):**

$$R = \frac{\sum Q_B}{Q_{AO}}$$

$\sum Q_B$: toàn bộ lượng Q_B của S chiết được vào pha hữu cơ

Q_{AO} : lượng chất tan S trong dung dịch nước ban đầu

Các phương pháp chiết lỏng - lỏng

- ❖ **Chiết đơn:** hiệu suất chiết thấp

Hiệu suất chiết:
$$R = 1 - \frac{1}{1 + k'}$$
 với
$$k' = K_D \frac{V_B}{V_A}$$

- ❖ **Chiết lặp:** hiệu suất chiết cao hơn nhưng tốn nhiều thời gian, công sức

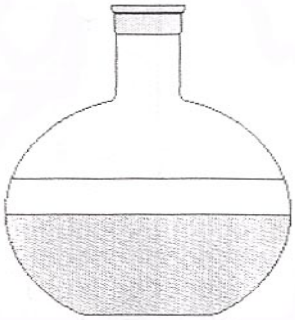
- Chiết n lần, V_B ml dung môi/lần:
$$R = 1 - \frac{1}{(1 + k')^n}$$
 với
$$k' = K_D \frac{V_B}{V_A}$$

- Chiết n lần, V_B ml dung môi/n lần:
$$R = 1 - \frac{1}{\left[1 + \frac{K_D V_B}{n V_A}\right]^n}$$

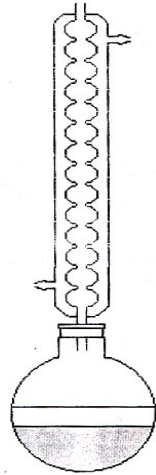
- **Phòng thí nghiệm:** chiết gián đoạn hay chiết liên tục

- ❖ **Chiết ngược dòng:** hiệu suất chiết rất cao, tách được nhiều chất

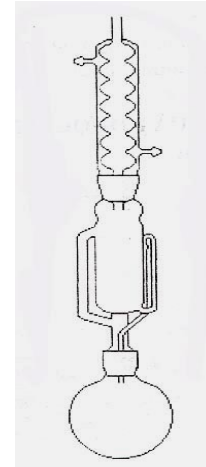
Các phương pháp chiết lỏng - lỏng



Ngâm

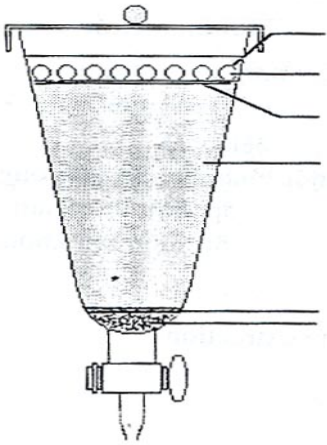


Đun hồi lưu

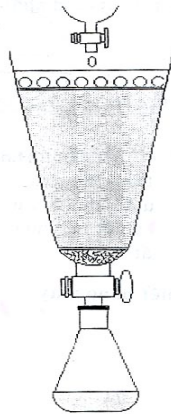


Soxhlet

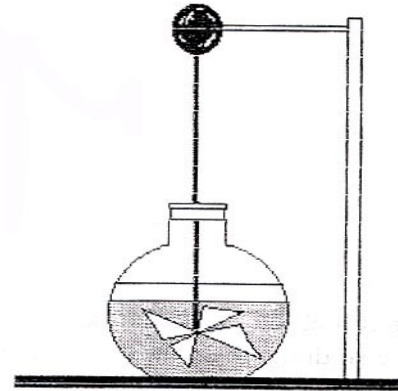
**Dụng cụ
dùng chiết
gián đoạn
và liên tục**



Bình ngấm kiệt



Ngấm kiệt liên tục



Chiết bằng máy có bộ phận khuấy và nghiền

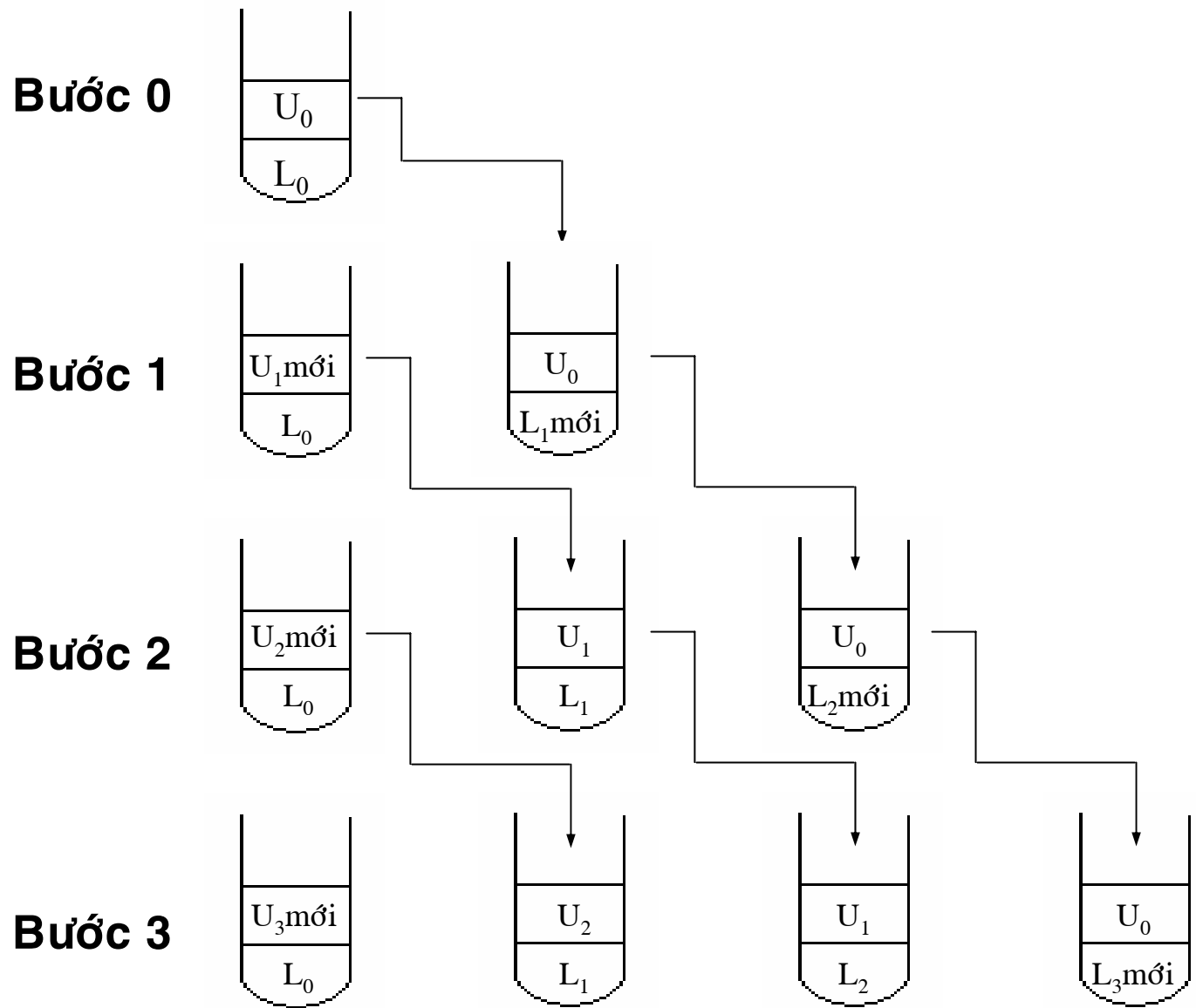
Chiết ngược dòng

- **Nguyên tắc:** dung môi chiết và dung dịch chiết chạy ngược chiều và tiếp xúc với nhau
- **Mục tiêu:** tách hai hay nhiều chất tan bằng một loạt sự phân chia giữa hai pha lỏng – lỏng
- Chiết gián đoạn qua nhiều bước
- Chiết liên tục qua nhiều bước

Chiết gián đoạn qua nhiều bước

- Giả sử có hai chất tan A và B trong hỗn hợp AB đang tồn tại ở pha dưới L (lower phase), được chiết bằng pha trên U (upper phase)
- Ban đầu:
 - ❖ $[A] = 1 \text{ mM}$
 - ❖ $[B] = 1 \text{ mM}$
 - ❖ $D_A = [A]_U/[A]_L = 4$, $D_B = [B]_U/[B]_L = 1$. Điều kiện cần thiết cho sự tách riêng là hai chất phải có **D hoàn toàn khác nhau**

Sơ đồ chiết gián đoạn qua nhiều bước



Chiết gián đoạn qua nhiều bước

		Pha	A (mM)	B (mM)
<u>Bước 0:</u>	Ống 0	U_0	0,8	0,5
		L_0	0,2	0,5
<u>Bước 1:</u>	Ống 0	U_1 (mới)	0,16	0,25
		L_0	0,04	0,25
	Ống 1	U_0	0,64	0,25
		L_1 (mới)	0,16	0,25
<u>Bước 2:</u>	Pha U_0 được chuyển vào ống có L_2 mới			
	Pha U_1 được chuyển vào ống có L_1 cũ			
	Pha U_2 mới được đổ lên pha L_0 cũ			

Sau khi cân bằng ở mỗi ống sự phân chia theo $D_A = 4$, $D_B = 1$

Chiết gián đoạn qua nhiều bước

		Số ống (r)												
		0	1	2	3	4	5							
Số bước (n)	Pha trên (A) 0	Pha trên (B) 0												
	Pha dưới (A) 1	Pha dưới (B) 1												
0	(A) 0,8	(B) 0,5												
	(A) 0,2	(B) 0,5												
1	(A) 0,16	(B) 0,25	(A) 0,64	(B) 0,25										
	(A) 0,04	(B) 0,25	(A) 0,16	(B) 0,25										
	(A) 0,032	(B) 0,125	(A) 0,256	(B) 0,25	(A) 0,512	(B) 0,125								
	(A) 0,008	(B) 0,125	(A) 0,064	(B) 0,25	(A) 0,128	(B) 0,125								
2	(A) 0,0064	(B) 0,0625	(A) 0,0768	(B) 0,1875	(A) 0,3072	(B) 0,1875	(A) 0,4096	(B) 0,0625						
	(A) 0,0016	(B) 0,0625	(A) 0,0192	(B) 0,1875	(A) 0,0768	(B) 0,1875	(A) 0,1024	(B) 0,0625						
	(A) 0,00128	(B) 0,03125	(A) 0,02048	(B) 0,125	(A) 0,12288	(B) 0,1875	(A) 0,32768	(B) 0,125	(A) 0,32768	(B) 0,03125				
	(A) 0,00032	(B) 0,03125	(A) 0,00512	(B) 0,125	(A) 0,03072	(B) 0,1875	(A) 0,08192	(B) 0,125	(A) 0,08192	(B) 0,03125				
3	(A) 0,000256	(B) 0,15625	(A) 0,00512	(B) 0,078125	(A) 0,04096	(B) 0,15625	(A) 0,16384	(B) 0,15625	(A) 0,32768	(B) 0,078125	(A) 0,262144	(B) 0,015625		
	(A) 0,000064	(B) 0,15625	(A) 0,00128	(B) 0,078125	(A) 0,01024	(B) 0,15625	(A) 0,04096	(B) 0,15625	(A) 0,08192	(B) 0,078125	(A) 0,065536	(B) 0,015625		
	(A) 0,00032	(B) 0,03125	(A) 0,0064	(B) 0,15625	(A) 0,0512	(B) 0,3125	(A) 0,2048	(B) 0,3125	(A) 0,4096	(B) 0,15625	(A) 0,32768	(B) 0,03125		
	(A) 0,00032	(B) 0,03125	(A) 0,0064	(B) 0,15625	(A) 0,0512	(B) 0,3125	(A) 0,2048	(B) 0,3125	(A) 0,4096	(B) 0,15625	(A) 0,32768	(B) 0,03125		
S*	(A) 0,00032	(B) 0,03125	(A) 0,0064	(B) 0,15625	(A) 0,0512	(B) 0,3125	(A) 0,2048	(B) 0,3125	(A) 0,4096	(B) 0,15625	(A) 0,32768	(B) 0,03125		

Phân chia ngược dòng của A và B

S: % A hoặc B trong mỗi ống sau 5 bước

Chiết gián đoạn qua nhiều bước

- Sau 5 bước gộp các ống 0, 1 và 2 vào lọ I và các ống 4 và 5 vào lọ II. Ta có:

	A (mM)	Tỷ lệ	B (mM)	Tỷ lệ	Mức độ tinh khiết*
Lọ I	0,05792		0,5	50%	B: 89%
Lọ II	0,73728	73,7%	0,1875		A: 74%

* **Mức độ tinh khiết của A: $[A]/([A] + [B])$ và B: $[B]/([A] + [B])$**

Nhận xét:

A càng ngày càng cách xa B khi số bước càng tăng

Chiết liên tục qua nhiều bước

- Sơ đồ minh họa **chiết ngược dòng liên tục** từ sơ đồ **chiết gián đoạn qua nhiều bước**

U_9^*	U_8^*	U_7^*	U_6	U_5	U_4	U_3	U_2	U_1	U_0	====> MP		
SP			L_0	L_1	L_2	L_3	L_4	L_5	L_6	L_7^*	L_8^*	L_9^*

*Dấu * là các pha mới*

Với:

- ✓ Pha trên U di động dọc theo pha dưới L bất động
 - ✓ Pha trên gọi là pha động MP (Mobile Phase)
 - ✓ Pha dưới gọi là pha tĩnh SP (Stationary Phase)
- Giả sử A được chiết bằng phân chia ngược dòng theo sơ đồ trên. Phân đoạn A ở pha trên là **p%** và ở pha dưới là **q%**. Ta có $p + q = 1$

Chiết liên tục qua nhiều bước

Bước 0 - Trước khi cân bằng

0	0	0	0	1						
				0	0	0	0	0	0	
				số ống	$r =$	0	1	2	3	4

- Sau khi cân bằng

0	0	0	0	p						
				q	0	0	0	0	0	
				số ống	$r =$	0	1	2	3	4

Bước 1 - Trước khi cân bằng

0	0	0	0	p						
				q	0	0	0	0		
				số ống	$r =$	0	1	2	3	4

- Sau khi cân bằng

0	0	0	pq	p^2					
			q^2	pq	0	0	0		
			số ống	$r =$	0	1	2	3	4

Chiết liên tục qua nhiều bước

Bước 2 - Trước khi cân bằng

0	0	0	pq	p^2		
		q^2	pq	0	0	0
số ống	$r =$	0	1	2	3	4

- Sau khi cân bằng

0	0	pq^2	$2p^2q$	p^3		
		q^3	$2pq^2$	p^2q	0	0
số ống	$r =$	0	1	2	3	4

Bước 3 - Trước khi cân bằng

0	0	pq^2	$2p^2q$	p^3		
	q^3	$2pq^2$	p^2q	0	0	
$r =$	0	1	2	3	4	

- Sau khi cân bằng

0	pq^3	$3p^2q^2$	$3p^3q$	p^4		
	q^4	$3pq^3$	$3p^2q^2$	p^3q	0	
$r =$	0	1	2	3	4	

Chiết liên tục qua nhiều bước

Phân đoạn A ở mỗi ống sau mỗi bước di chuyển của pha động

Bước chiết n	Số ống r				
	0	1	2	3	4
1	q	p			
2	q^2	$2pq$	p^2		
3	q^3	$3pq^2$	$3p^2q$	p^3	
4	q^4	$4pq^3$	$6p^2q^2$	$4p^3q$	p^4
....

Nhận xét: Nhị thức $(p + q)^n$ khai triển

Chiết liên tục qua nhiều bước

- Phân đoạn f (fraction) trong ống r sau bước chiết n :

$$f = \frac{n!}{(n-r)!r!} p^r q^{n-r}$$

- Với n lớn, ống chứa lượng chất A cao nhất (r_{\max}):

$$r_{\max} \# np$$

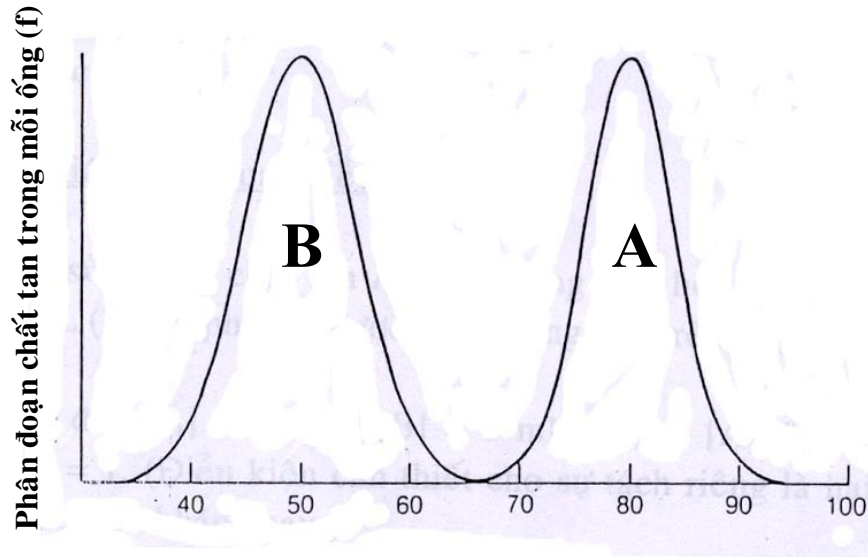
Ví dụ:

A có $p = 4/5$, sau 100 bước chiết ta có $r_{\max} \# 100 \times 4/5 \# 80$: **ống 80**

B có $p = 1/2$, sau 100 bước chiết ta có $r_{\max} \# 100 \times 1/2 \# 50$: **ống 50**

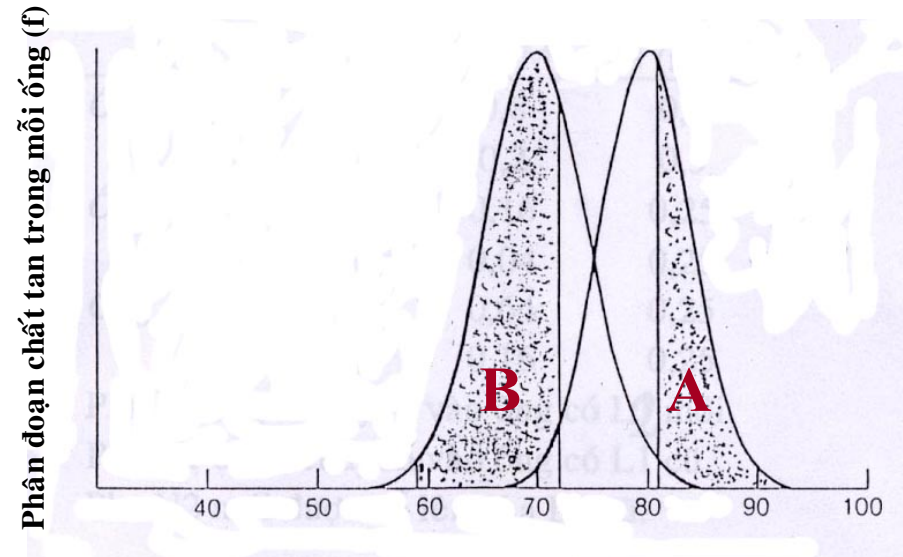
Độ rộng của dải và năng suất phân giải

Tách A và B bằng phân chia ngược dòng qua 100 bước chiết



$$D_A = 4 \text{ và } D_B = 1$$

- Ống 70 - 90 hoàn toàn là A
- Ống 40 - 60 hoàn toàn là B



$$D_A = 4 \text{ và } D_B = 7/3$$

	Ống 59 - 72	Ống 81-90	Độ tinh khiết
A	2,27%	38,90%	97,94%
B	66,06%	0,82%	96,68%

Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

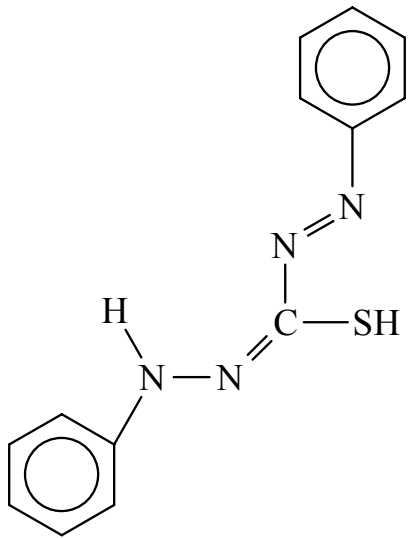
❖ Chiết bằng dung môi hữu cơ

- Nhiều phân tử CHC và một số ít chất VC có độ tan trong dung môi hữu cơ lớn gấp nhiều lần độ tan trong nước
- Các yếu tố ảnh hưởng:
 - **Cấu trúc phân tử**
 - **Thuốc thử tạo phức mang điện tích:** Au, Fe trong HBr tạo phức tan trong ether etylic
 - **pH:**
 - ✓ Xà phòng/pH thấp tạo acid tan trong DMHC
 - ✓ Muối alcaloid/pH cao chuyển alcaloid base tan trong DMHC

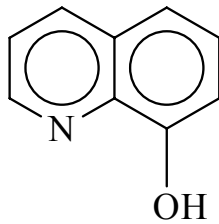
Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

❖ Chiết với chelator kim loại

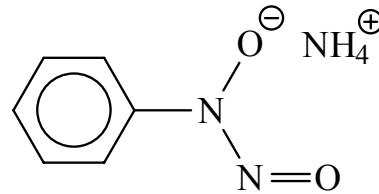
- Ion kim loại + chất phối trí → phức tan trong DMHC
- Chất phối trí (ligand) hay dùng:



Dithizone



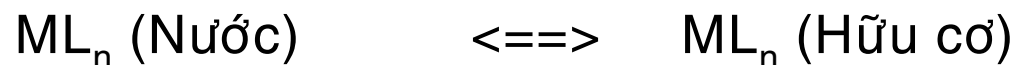
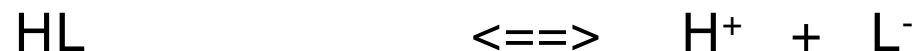
8-hydroxyquinolin



Cupferron

Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

❖ Chiết với chelator kim loại



Trong đó HL là ligand, M^{n+} là ion kim loại.

Hệ số phân chia D:

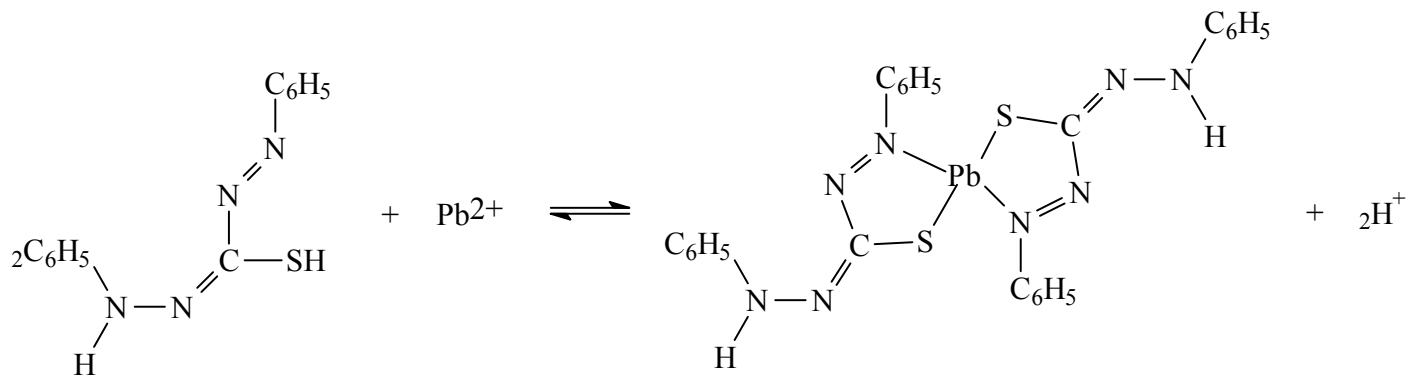
$$D = \frac{[ML_n] (\text{Hữu cơ})}{[ML_n] (\text{Pha nước})}$$

Hệ số này phụ thuộc vào nồng độ của ligand và pH của dung dịch

Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

❖ Chiết với chelator kim loại

Ví dụ: Định lượng Pb^{2+} trong nước bằng phản ứng tạo phức với dithizone



Dithizone (xanh)

Không màu

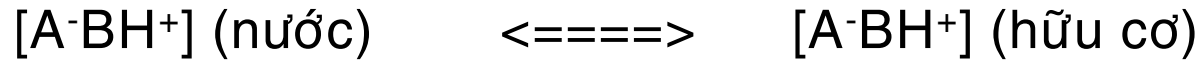
Đỏ

Ống nghiệm	A (ml)	B (ml)	C (ml)
Nước cất	10	0	0
Nước máy	0	10	0
Dung dịch $Pb(NO_3)_2$ 2mM	0	0	10
Hexan	7	7	7
Dithizone/ $CHCl_3$ 0,01%	3	3	3
Lắc yên để phân lớp:			
Màu của lớp hexan	Xanh lam	Đỏ	Đỏ

Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

❖ Chiết cặp ion

- Base (hay acid) + acid (hay base)/pha nước → cặp ion tan trong DMHC



A^-BH^+ : cặp ion tạo thành

A^- hoặc BH^+ : tác nhân tạo cặp ion (ion pair agent, IPA)

- Cơ sở của phương pháp chiết đo quang, acid màu, acid màu-base hữu cơ
- Ứng dụng trong kiểm nghiệm
 - Chiết và đo quang: chlorpheniramin, loperamid, promethazine
 - Chuẩn độ tạo cặp ion: dung dịch chuẩn độ là chất điện hoạt anion dùng định lượng alcaloid, chỉ thị vàng methyl, môi trường chloroform

Ứng dụng của chiết lỏng - lỏng

❖ Chiết cặp ion

➤ Các IPA thường dùng

- ✓ Các acid mạnh: acid perchloric, acid sulfuric, acid phosphoric, acid hydrochloric,....
- ✓ Các hợp chất sulfonic:
 - Heptansulfonat natri, laurylsulfat natri
 - **Helianthine**, tropeoline,...
 - **Xanh bromothymol, xanh bromophenol, xanh bromocresol**,...
 - Dẫn chất sulfonic của naphthalen
 - Dẫn chất sulfonic của fluorescein
- ✓ Các ammonium: tetrabutylammonium $(C_4H_9)_4N^+$

Chiết lỏng – rắn

- ❖ Pha rắn (nhôm oxid, than hoạt, nhôm silicat) chiết các chất từ pha lỏng: hấp phụ
- ❖ Pha lỏng (dung môi hay hệ dung môi) chiết các chất từ mẫu phân tích rắn (bột dược liệu)

Kỹ thuật chiết pha rắn (Solid Phase Extraction, SPE)

- ❖ Tách chất phân tích từ mẫu bằng chất rắn
- ❖ Rửa giải bằng dung môi thích hợp
- ❖ Tinh chế dịch chiết trong cân bằng chiết lỏng – lỏng
- ❖ Không những là kỹ thuật tách chiết độc lập, mà còn được cài đặt vào GC-MS hoặc HPLC-MS

Chiết pha rắn – Thực hành

- ❖ Làm sạch mẫu → Kéo dài tuổi thọ cột sắc ký
- ❖ Cô đặc mẫu → tăng độ nhạy
- ❖ Ưu điểm hơn chiết lỏng – lỏng:
 - ✓ Mẫu sạch hơn
 - ✓ Hiệu suất chiết (tỷ lệ hồi phục) cao hơn
 - ✓ Dung môi chiết ít hơn
 - ✓ Ít tốn thời gian hơn
 - ✓ Tự động hóa

Phân loại pha rắn

- ❖ Nguyên liệu tạo pha rắn: dẫn chất polysiloxan, polymer (pha liên kết)
- ❖ Đặc điểm cột SPE

Đặc điểm	Cột SPE
Vật liệu tạo cột	Poly tetrafluoroethylen (PTFE), poly ethylen (PE), poly propylen (PP)
Hình dạng hạt	Không đều
Kích thước hạt	40 μm
Số đĩa lý thuyết	< 100
Cơ chế tách	Lưu giữ và rửa giải kế tiếp nhau
Sử dụng	Dùng một lần

Phân loại pha rắn

❖ Pha liên kết: pha thuận và pha đảo

Pha liên kết	Cấu trúc	Pha liên kết	Cấu trúc
Pha đảo		Pha thuận	
C18	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	Cyano	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CN}$
C8	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	Amino	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
C2	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Diol	$-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$
Cyclohexyl	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_{11}$	Silicagel	$-\text{SiOH}$
Phenyl	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$		

Phân loại pha rắn

❖ Pha không liên kết

Tên pha	Đặc điểm
Silicagel - SiOH	Hạt 40 μm
Silicagel hoạt tính cao	Hạt 55 - 105 μm , lỗ xốp 125 A^0
Florisil MgSiO_3	Hạt 50 - 200 μm , lỗ xốp 60 A^0
Alumina trung tính	Hạt 25 μm , pH = 7,5
Alumina acid	Hạt 50 – 300 μm , pH = 4 - 5
Alumina base	Hạt 50 – 300 μm , pH = 9 - 10, lỗ xốp 120 A^0

❖ Nhựa trao đổi ion

- ✓ Trao đổi mạnh cation: dẫn chất phenylsulfonic $\text{R-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$
- ✓ Trao đổi mạnh anion: dẫn chất amoni bậc 4 $\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$

Cơ chế lưu giữ, rửa giải

❖ Chiết bằng cột chứa pha đảo

- ✓ Tương tác giữa chất phân tích và pha liên kết là lực Van der Waals
- ✓ Chất phân tích càng sơ nước càng có khuynh hướng nằm lại trên pha liên kết
- ✓ Rửa giải: chọn dung môi phân cực đủ để phá vỡ liên kết do lực Van der Waals. Ví dụ: MeOH, MeCN, ethyl acetat
- ✓ Chất phân tích rất sơ nước: rửa giải bằng hỗn hợp ethyl acetat : methylen clorid (1:1)

Cơ chế lưu giữ, rửa giải

❖ Chiết bằng cột chứa pha thuận

- ✓ Lưu giữ chất phân tích trên pha thuận bắt nguồn từ tương tác phân cực. Liên kết hydro, liên kết π - π hoặc tương tác lưỡng cực – lưỡng cực
- ✓ Pha không liên kết:
 - Chất phân tích có tính base được lưu giữ mạnh trên bề mặt có tính acid và ngược lại
 - Các alcol, aldehyd, dẫn chất halogen hòa tan trong dung môi không phân cực bị hấp thụ mạnh trên silicagel
- ✓ Rửa giải: methanol được dùng cho nhiều trường hợp

Cơ chế lưu giữ, rửa giải

❖ Chiết bằng cột chứa nhựa trao đổi ion

✓ Lưu giữ: lực hút tĩnh điện giữa hai ion tích điện trái dấu

✓ Rửa giải:

- Cột anionit: NaOH 0,1M

- Cột cationit: HCl 0,1M

- Pha liên kết silica

 - o Rửa giải anion hữu cơ: hỗn hợp NaOH 0,1M – MeCN (1:1)

 - o Rửa giải acid hữu cơ: đệm phosphat – MeOH (1:1)

Kỹ thuật chiết pha rắn (Solid Phase Extraction, SPE)

❖ Trang thiết bị

- ✓ Ống hình trụ bằng thủy tinh hay polypropylen: 1, 3, 6 ml
- ✓ Chất hấp phụ: hạt silica 40 μm , đường kính lỗ xốp 60 Å, bề mặt có nhóm silanol Si-OH, hàm lượng 100, 200, 500, 1000 mg
 - Phân cực: cyano, diol, amino, silica
 - Không phân cực: C₁, C₈, C₁₈, phenyl
 - Trao đổi ion: benzensulfonyl propyl, amin bậc 4
- ✓ Màng lọc polyetylen, teflon, thép không gỉ
- ✓ Hệ thống tạo chân không
- ✓ Bộ phận nối các ống, bình chứa dung môi



Thực hành chiết pha rắn

❖ Tiến hành

- ✓ Cân bằng (ổn định) cột SPE
- ✓ Đưa mẫu lên cột
- ✓ Rửa cột
- ✓ Rửa giải chất phân tích

❖ Lựa chọn chất hấp phụ

- ✓ Độ phân cực của chất hấp phụ tương đương với chất phân tích
- ✓ Độ phân cực của dung môi và chất hấp phụ phải khác nhau
- ✓ Tùy thuộc chất phân tích để chọn lượng pha rắn và thể tích rửa giải khác nhau

Lượng chất phân tích	Lượng pha rắn	Thể tích nền
500 mg	< 25 mg	1 ml
1000 mg	< 50 mg	2 ml
5 g	< 0,25 g	10 ml

Kỹ thuật chiết pha rắn (Solid Phase Extraction, SPE)

❖ Quy trình chiết

- ✓ Xử lý cột bằng dung môi hoặc dung dịch đệm thích hợp để chuyển pha rắn sang trạng thái có thể lưu giữ chất phân tích trong mẫu
- ✓ Tách chất phân tích: mẫu được hòa tan trong dung môi và cho qua cột. Pha rắn sẽ lưu giữ chất phân tích và một số tạp chất
- ✓ Loại tạp: dùng dung môi hoặc dung dịch đệm cho qua cột để loại tạp đã được giữ lại trên pha rắn và làm giàu mẫu phân tích. Hoặc có thể rửa giải chất cần phân tích ra trước và giữ lại tạp trên cột
- ✓ Rửa giải: dùng dung môi thích hợp đẩy chất phân tích khỏi pha rắn. Dịch chiết thu được sẽ được tiếp tục phân tích bằng các phương pháp thích hợp

Thực hành chiết pha rắn

❖ Dung môi

Chất hấp phụ phân cực	Sức dung môi	Chất hấp phụ không phân cực
Hexan	YẾU	Nước
Isooctan		Methanol
Toluen		Isopropanol
Chloroform		Acetonitril
Methylen chlorid		Aceton
Tetrahydrofuran		Ethyl acetat
Ethyl ether		Ethyl ether
Ethyl acetat		Tetrahydrofuran
Aceton		Methylen chlorid
Acetonitril		Chloroform
Isopropanol		Toluen
Methanol		Isooctan
Nước	MẠNH	Hexan

Thực hành chiết pha rắn

❖ **Lựa chọn dung môi:** tùy theo từng giai đoạn tiến hành

✓ **Ổn định cột:** sử dụng 2 loại dung môi

- Dung môi 1: mạnh hơn dung môi rửa giải: loại bỏ tạp chất
- Dung môi 2: không mạnh hơn dung môi rửa giải: tránh hiệu suất chiết giảm
- Thể tích dung môi: 1 – 2 ml/100 mg chất hấp phụ

✓ **Đưa mẫu lên cột:**

- Dung môi hòa tan mẫu phải yếu so với chất hấp phụ sử dụng (**trong trường hợp chất phân tích bị hấp phụ trên cột**)

✓ **Rửa cột:**

- Dung môi tương đương hoặc hơi mạnh hơn dung môi hòa tan mẫu
- Thể tích: 0,5 – 0,8 ml/100 mg chất hấp phụ

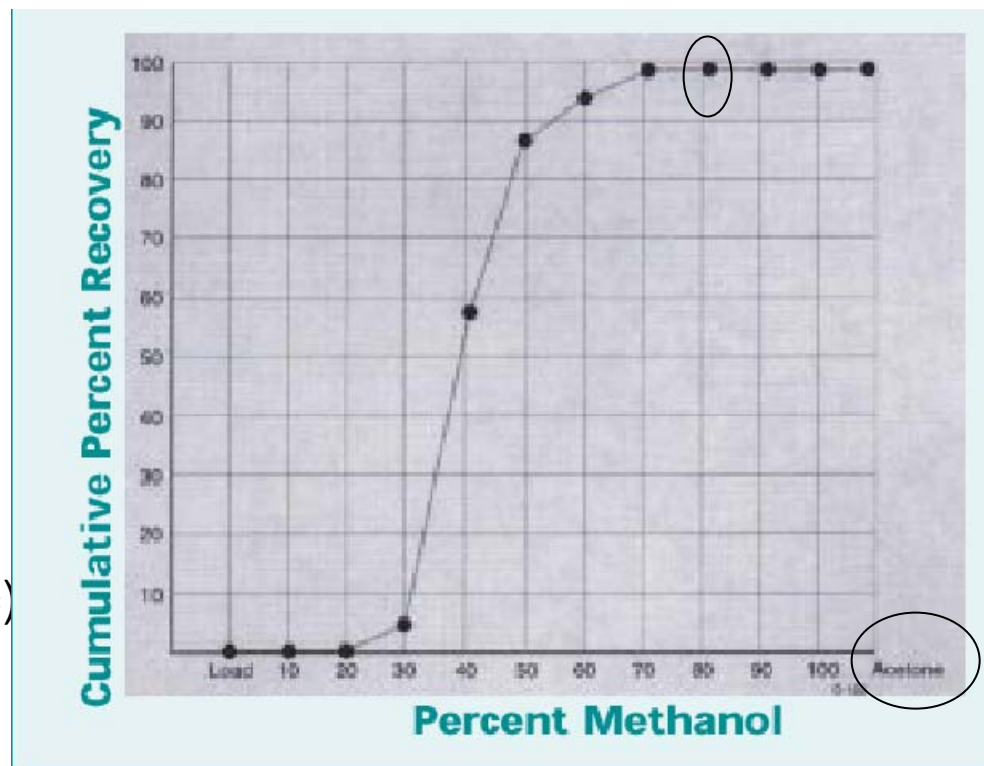
✓ **Rửa giải:**

- Thể tích: 0,5 – 0,8 ml/100 mg chất hấp phụ
- Chọn dung môi dựa trên mẫu chuẩn đã biết nồng độ khi cho qua cột SPE

Thực hành chiết pha rắn

Triển khai phương pháp

- ❖ Ví dụ: sử dụng cột SPE (500 mg chất hấp phụ không phân cực) để làm sạch mẫu chứa thuốc trừ sâu phospho
 - ✓ Cân bằng cột: methanol, nước
 - ✓ Đưa mẫu lên cột: 3 ml dung dịch chuẩn (dung môi nước)
 - ✓ Rửa cột/rửa giải:
 - 3 ml **nước**
 - 3 ml MeOH 10%
 - 3 ml **MeOH 20%**
 - 3 ml MeOH 30%
 -
 - 3 ml MeOH 100%
 - 3 ml acetone
 - ✓ Xác định hiệu suất chiết (tỷ lệ hồi phục) sau khi tìm được điều kiện tối ưu



Thực hành chiết pha rắn

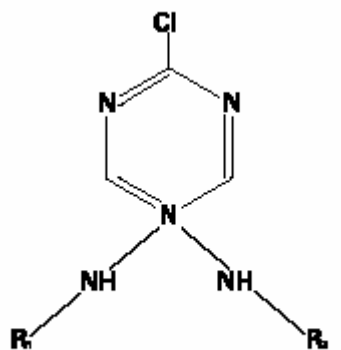
❖ Ví dụ: quy trình chiết vitamin B₁₂ từ nước tiểu

- ✓ Xử lý cột C18 (1 g)
 - 2 ml MeOH, 2 ml nước
 - NaH₂PO₄ 0,05M
- ✓ Cho qua cột 10 ml nước tiểu
- ✓ Rửa cột bằng nước
- ✓ Rửa giải vitamin B₁₂
 - 2 ml hỗn hợp EtOH - NaH₂PO₄ 0,05M (1:1)
 - 3 ml nước

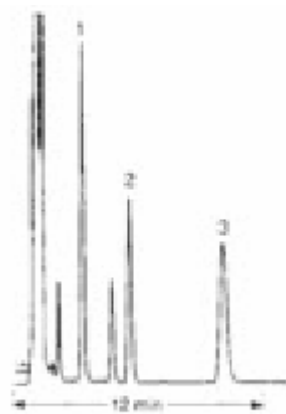
Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng

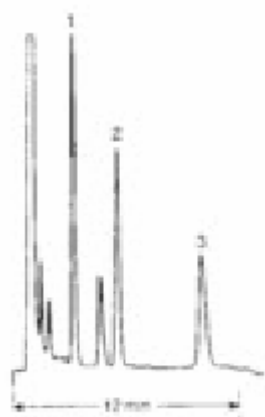
✓ Thuốc diệt cỏ Triazin



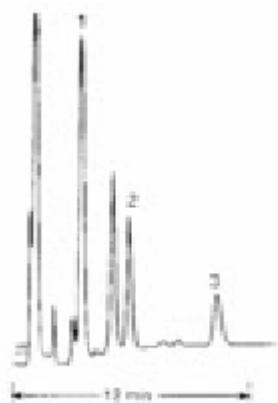
General Structure of Triazine Herbicides



Soil



Muscle Tissue



Corn Oil

Solid Phase Extraction Method

Results in Chromatogram

	Soil	Muscle Tissue	Corn Oil
CARTRIDGE	SCX	ODS (C18)	Diol
EXTRACTION	Shaken in acetonitrile	Homogenized in methanol	None
PRE-TREAT	Acetic acid	Methanol	Methanol, hexane
LOAD	Diluted with acetic acid	Diluted with water	Diluted with hexane
WASH	Acetic acid, acetonitrile, water, 0.1 M K ₂ HPO ₄	Water	Hexane
ELUTE	Acetonitrile/ K ₂ HPO ₄	Methanol	Methanol

Key to Chromatograms

Peak		R1	R2
1	Simazine	—CH ₂ CH ₃	—CH ₂ CH ₃
2	Atrazine	—CH ₂ CH ₃	—CH(CH ₃) ₂
3	Propazine	—CH(CH ₃) ₂	—CH(CH ₃) ₂

Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Thuốc trừ sâu chlor

Condition: Add 5 mL acetone to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Repeat with 5 mL methanol then 5 mL water. Do not allow the sorbent to go dry at any point during this step.

Load: Attach a sample reservoir to the top of the cartridge. Add 0.2 mL methanol to 20 mL of the water sample.¹ Mix, then add to the cartridge. Apply the vacuum and discard the eluant. The flow rate should be no greater than 10 mL/min.²

Rinse: Add 3 mL water to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Leave the vacuum on for 30 seconds after all of the water has passed through the cartridge. Centrifuge the cartridge at 1000–1500 rpm for 5 minutes.³

Elution: Place a collection tube beneath the cartridge. Add 3 mL of acetone to the cartridge. Apply vacuum and collect the eluant. Concentrate to dryness under a stream of dry nitrogen⁴ (transfer to a small vial may be necessary). Dissolve the residue in 200 μ L acetone. Inject 2 μ L into the GC.

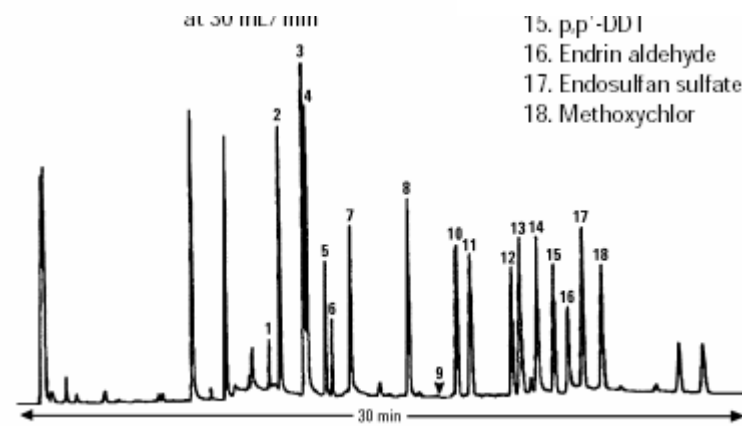
- ¹ Volume up to 100 mL may be used. Adjust the amount of added methanol so that the final concentration is 1%.
- ² Using slower flow rates will result in slightly better recovery values.
- ³ Centrifuging removes additional water which aids in sample concentration.
- ⁴ The use of heat to aid in sample concentration may result in reduced recovery values.

Equipment

- AccuBOND[®] ODS (C18) 6 mL/500 mg cartridge (P/N 188-1356)
- 25 mL sample reservoir (P/N 700-4007)
- coupling fitting (P/N 5185-5794)
- vacuum manifold (P/N 5185-5754, 10-port)
- (P/N 5185-5765, 20-port)

Reagents

- water (HPLC grade)
- methanol (pesticide grade)
- acetone (pesticide grade)



Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Caffein trong huyết thanh

Condition: Add 5 mL methanol to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Repeat with 5 mL water. Do not allow the sorbent to go dry at any point during this step.

Load: Add 1 mL 0.01 N HCl to 4 mL serum. Mix, then add to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant.

Rinse: Add 1 mL 0.01 N HCl to cartridge. Make sure to rinse any remaining serum from the interior walls of the tube upon addition of the 0.01 N HCl solution. Apply vacuum and discard the eluant. Continue to apply vacuum for 30 seconds after all of the water has passed through the cartridge. Centrifuge the cartridge at 1000–1500 rpm for 5 minutes.¹

Elution: Place a collection tube beneath the cartridge. Add 3 mL acetone² to the cartridge. Apply vacuum and collect the eluant. Concentrate to dryness using gentle heat (<45°C) and under a stream of nitrogen (transfer to a small vial may be necessary). Dissolve the residue in 200 µL into the HPLC.

¹ *Centrifuging removes additional water which aids in sample concentration.*

² *Methanol will provide adequate recoveries. Acetone was used to decrease the amount of time required to concentrate the sample to dryness.*

Equipment

- AccuBOND[®] ODS (C18) 6 mL/500 mg cartridge (P/N 188-1356)
- vacuum manifold (P/N 5185-5754, 10-port) (P/N 5185-5765, 20-port)

Reagents

- methanol (HPLC grade)
- hydrochloric acid (reagent grade) (prepare as 0.01N HCl in water)
- acetone (pesticide grade)
- acetonitrile (HPLC grade)
- water (HPLC grade)
- potassium dihydrogen phosphate (prepare at 15mM)

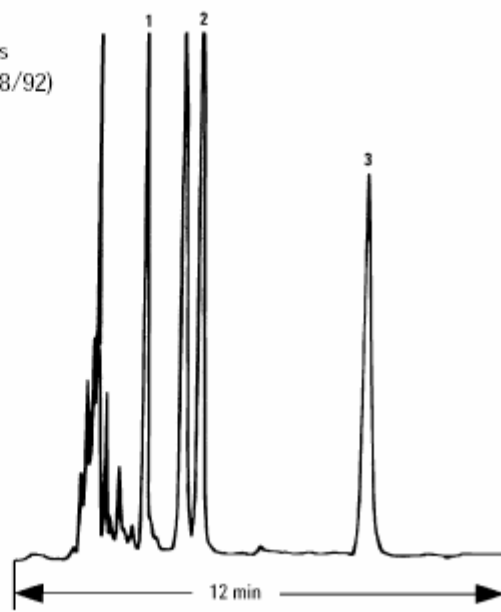
Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Caffein trong huyết thanh

Serum Extract Containing Xanthines

Column: C18
15 cm x 4.6 mm I.D., 5 microns
Mobile Phase: Acetonitrile/15 mM KH₂PO₄ (8/92)
Flow: 1 mL/min
Detector: Diode array at 273 nm

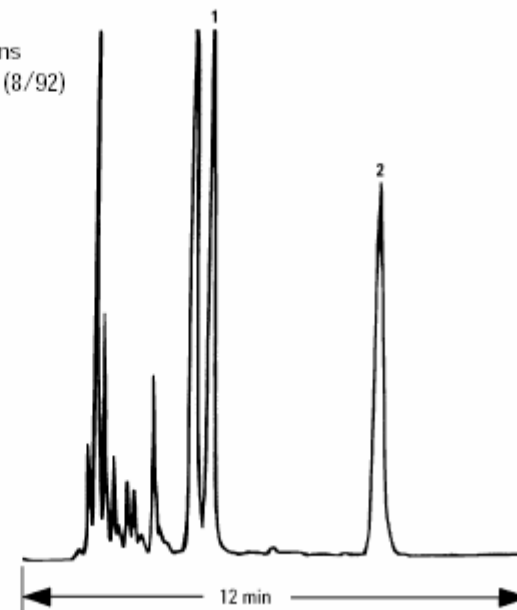
1. Theobromide
2. Theophylline
3. Caffeine



Serum Extract Containing Xanthines

Column: C18
15 cm x 4.6 mm I.D., 5 microns
Mobile phase: Acetonitrile/15 mM KH₂PO₄ (8/92)
Flow: 1 mL/min
Detector: Diode array at 273 nm

1. Paraxanthine
2. Caffeine



Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Barbiturat trong huyết thanh

Condition: Add 5 mL acetone to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Repeat with 5 mL water. Do not allow the sorbent to go dry at any point during this step.

Load: Add 1 mL 0.5 M K_2HPO_4 to 4 mL of serum. Mix, then add to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant.

Rinse: Add 2 mL 5% methanol to the cartridge. Make sure to rinse any remaining serum from the interior walls of the tube upon addition of the 5% methanol. Apply vacuum and discard the eluant. Leave the vacuum on for 30 seconds after all of the phosphate buffer has passed through the cartridge. Centrifuge the cartridge at 1000–1500 rpm for 5 minutes.¹

Elution: Place a collection tube beneath the cartridge. Add 3 mL acetone to the cartridge. Apply vacuum and collect the eluant. Concentrate to dryness using gentle heat (<45°C) under a stream of nitrogen (transfer to a small vial may be necessary). Dissolve the residue in 200 μ L acetonitrile/water (20/80) (HPLC mobile phase). Inject 10–20 μ L into the HPLC.

¹ *Centrifuging removes additional water which aids in sample concentration.*

Equipment

- AccuBOND[®] ODS (C18) 6 mL/500 mg cartridge (P/N 188-1356)
- vacuum manifold (P/N 5185-5754, 10-port) (P/N 5185-5765, 20-port)

Reagents

- water (HPLC grade)
- dipotassium hydrogen phosphate (prepare at 0.5M)
- methanol (pesticide grade)
- acetone (pesticide grade)

Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Barbiturat trong huyết thanh

Serum Extract Containing Barbiturates

Column: C18

15 cm x 4.6 mm I.D., 5 microns

Mobile phase: Time Acetonitrile Water

0 20 80

5 20 80

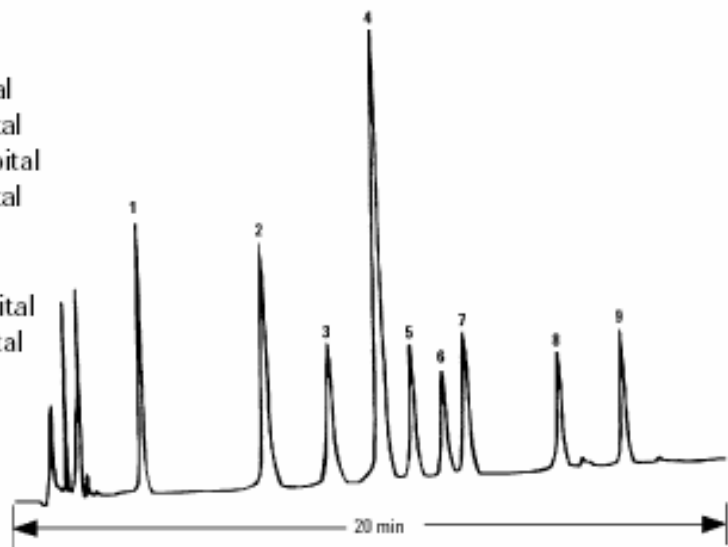
15 40 60

20 40 60

Flow: 1 mL/min

Detector: Diode array at 235 nm

1. Barbitol
2. Allobarbitol
3. Aprobarbitol
4. Phenobarbitol
5. Butabarbitol
6. Butethal
7. Bitalbital
8. Pentobarbitol
9. Secobarbitol



Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Benzodiazepin trong huyết thanh

Condition: Add 5 mL methanol to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Repeat with 5 mL water. Do not allow the sorbent to go dry at any point during this step.

Load: Add 1 mL 0.1 M sodium acetate to 4 mL serum. Mix, then add to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant.

Rinse: Add 3 mL water to the cartridge. Apply vacuum and discard the eluant. Leave vacuum on for 30 seconds after all of the water has passed through the cartridge. Centrifuge the cartridge at 1000–1500 rpm for 5 minutes.¹

Elution: Place a collection tube beneath the cartridge. Add 3 mL acetone² to cartridge. Apply vacuum and collect the eluant. Concentrate to dryness using gentle heat (<45°C) and under a stream of nitrogen (transfer to a small vial may be necessary). Dissolve the residue in 200 µL methanol. Inject 20 µL into the HPLC.

¹ *Centrifuging removes additional water which aids in sample concentration.*

² *Methanol will provide adequate recoveries. Acetone was used to decrease the amount of time required to concentrate the sample to dryness.*

Equipment

- AccuBOND[®] ODS (C18) 6 mL/500 mg cartridge (P/N 188-1356)
- vacuum manifold (P/N 5185-5754, 10-port) (P/N 5185-5765, 20-port)

Reagents

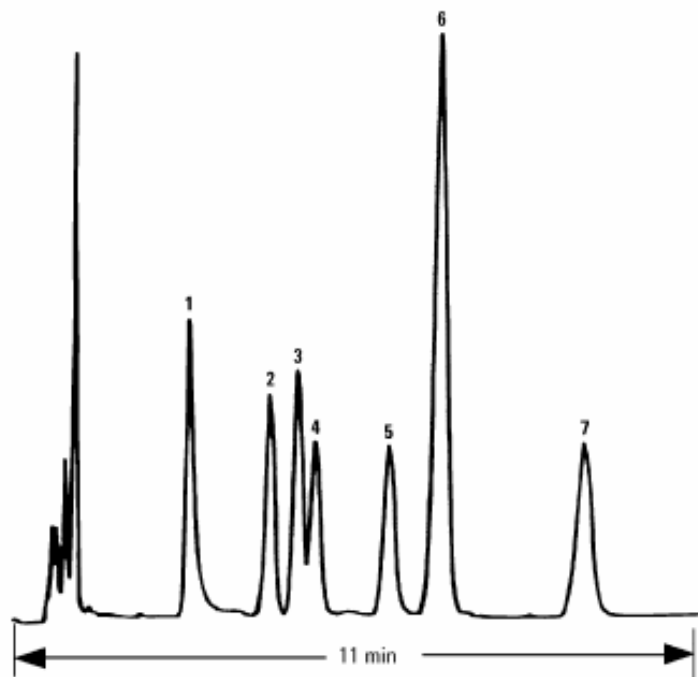
- water (HPLC grade)
- methanol (HPLC grade)
- sodium acetate (prepare at 0.10M in water)
- acetone (pesticide grade)

Ứng dụng của thực hành chiết pha rắn

❖ Ứng dụng: Benzodiazepin trong huyết thanh

Serum Extract Containing Benzodiazepines

Column:	C8, 15 cm x 4.6 mm I.D. 5 microns	1. Bromazepam 2. Oxazepam
Mobile Phase:	Acetonitrile/Methanol/ 0.005M KH ₂ PO ₄ (15/30/55)	3. Flunitrazepam 4. Lorazepam
Flow Rate:	2 mL/min	5. Temazepam
Temperature:	40°C	6. Desmethyldiazepam
Detector:	Diode array at 245 nm	7. Diazepam



So sánh chiết lỏng – lỏng và chiết lỏng - rắn

	Ưu điểm	Khuyết điểm
Chiết lỏng – lỏng	<ul style="list-style-type: none">• Đơn giản, dễ thực hiện.	<ul style="list-style-type: none">• Dùng nhiều dung môi, ảnh hưởng đến sức khỏe người phân tích và gây ô nhiễm môi trường.• Khó khăn trong việc kết nối với GC, HPLC, ... gây cản trở cho quá trình tự động hóa việc phân tích.• Đôi khi tạo nhũ tương làm sai lệch kết quả.
Chiết pha rắn	<ul style="list-style-type: none">• Lượng dung môi dùng ít hơn nhiều so với chiết lỏng – lỏng.• Đã có một số thiết bị kết nối chiết pha rắn với GC hoặc HPLC, dễ dàng tự động hóa phân tích mẫu.• Có nhiều lựa chọn pha rắn dùng cho SPE, nên có cơ chế chiết đa dạng, phù hợp hơn với chất phân tích, tính chọn lọc tốt hơn.	<ul style="list-style-type: none">• Khó lưu giữ chất phân cực mạnh.• Tính chọn lọc chỉ dựa vào tương tác phân cực, tương tác kỵ nước, chưa dựa vào đặc điểm của chất phân tích.• Lượng dung môi dùng đã giảm nhiều nhưng hãy còn lớn.