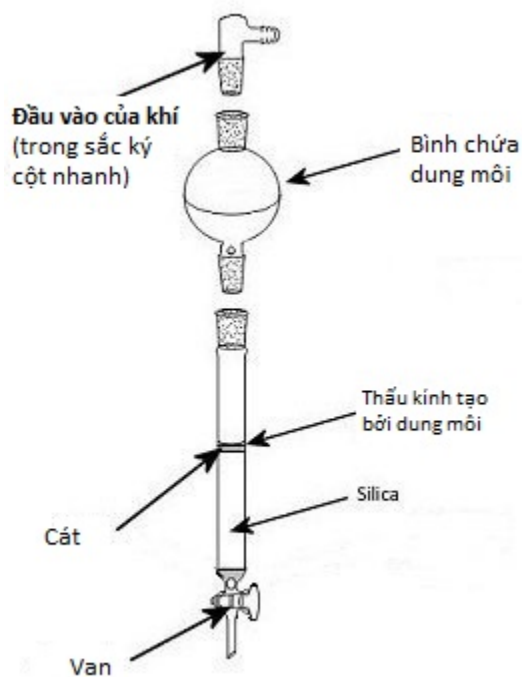


## Bài 4: Tách các sắc tố thực vật bằng sắc ký cột

### 4.1. Giới thiệu chung

Các cột sắc ký thường được dùng trong các phòng thí nghiệm vô cơ và hữu cơ để loại bỏ các nguyên liệu không phản ứng ban đầu hoặc phân lập một sản phẩm mong muốn khỏi các sản phẩm phụ sau khi phản ứng hoàn thành. Để làm được điều này, hỗn hợp phản ứng được đi qua một ống thủy tinh thẳng đứng, bên trong có nhồi hạt silica hoặc alumina, các chất đi ra được thu lại thành từng phần nhỏ hay phân đoạn nhỏ ở đầu dưới của cột. Các thành phần khác nhau của mẫu được phân tách thành các loại hợp chất khác nhau do tương tác của hỗn hợp với silica.

Trong một cột tiêu biểu, pha tĩnh – chất hấp thụ rắn thường là silica gel ( $\text{SiO}_2$ ) hoặc alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) được nhồi trong cột thủy tinh thẳng đứng. Pha động – dạng lỏng, được rót vào từ trên đỉnh cột và chảy xuống dưới cột nhờ tác dụng của trọng lực hoặc của áp suất bên ngoài (trong sắc ký cột nhanh – flash chromatography). Quá trình phân tách các chất đạt được nhờ khả năng hấp thụ khác nhau và tương tác giữa pha động và pha tĩnh.



### Cấu tạo cột sắc ký nói chung

Chất lượng của quá trình phân tách phụ thuộc vào nhiều yếu tố tối thiểu để tránh tạo thành bóng khí trong pha tĩnh. Để tránh tạo thành bóng khí, việc nhồi cột đúng cách là rất quan trọng.

Sắc ký cột, đặc biệt là sắc ký cột nhanh, thường tiến hành với một hỗn hợp 2 dung môi được dùng làm pha động: một dung môi phân cực và một dung môi không phân cực. Đôi khi có thể dùng một dung môi duy nhất hoặc hỗn hợp 3 dung môi khác nhau.

|   | Dung môi đơn<br>(từ ít phân cực tới phân cực nhất) | Hệ 2 dung môi<br>(từ ít phân cực tới phân cực nhất)                                                                                                                 | Hệ dung môi thường dùng                                                                                                            |
|---|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Các Hydrocarbon như: pentan, ete dầu hỏa, hexane   | Ete + ete dầu hỏa / hexan / pentan                                                                                                                                  | n-Butanol + axit axetic + nước                                                                                                     |
| 2 | Ete hoặc diclometan                                | <b>Hexan + Etyl axetat / diclometan</b>                                                                                                                             | 2-Metyl-1-propanol + axit axetic + nước                                                                                            |
| 3 | Etyl axetat                                        | Diclometan + Metanol                                                                                                                                                | 1-propanol + NH <sub>4</sub> OH (dd) + nước                                                                                        |
|   | <i>Lựa chọn số 1 của nhiều người</i>               | Tỷ lệ có thể thay đổi để thu được phổ của toàn bộ chất. Lưu ý rằng methanol không được dùng trên 10% vì nhóm -OH sẽ tương tác với silica và làm cho nó mất tác dụng | Chỉ sử dụng trong trường hợp rất khó tách hoặc để tránh phải sử dụng chất hấp phụ pha đảo (đắt hơn silica rất nhiều từ 10-100 lần) |

Lá của thực vật có chứa một số sắc tố màu thường chia thành hai loại, diệp lục và carotenoid. Các diệp lục a và b là các sắc tố làm cho cây có màu xanh lục. Carotenoid là một phần của một bộ sưu tập lớn hơn các hợp chất có nguồn gốc thực vật được gọi là tecten. Carotenoid là tetraterpenes (tám đơn vị isoprene). Lycopene, hợp chất tạo ra màu đỏ của cà chua và dưa hấu, và  $\beta$ -carotene, hợp chất khiến cà rốt và mơ có màu cam, là những ví dụ về carotenoid. Lá rau bina có chứa chất diệp lục a và b và  $\beta$ -carotene là các sắc tố chính cũng như một lượng nhỏ các sắc tố khác. Chất diệp lục a và diệp lục b có cấu trúc tương tự nhau và có thể không phân giải được trong quy trình này.

## 4.2. Tiến hành

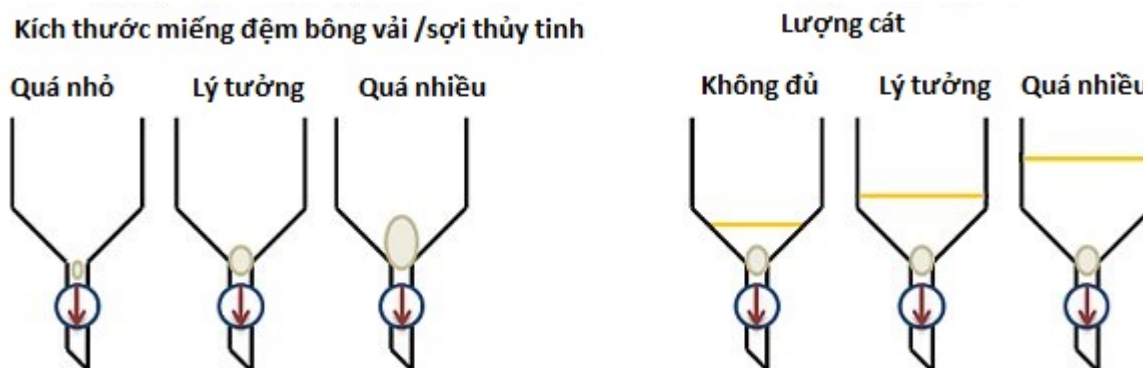
### 4.2.1. Chuẩn bị mẫu

Khoảng 5 gam lá được làm khô và cho vào cối giã nát. Sau đó, các chất màu được chiết xuất bằng cách nghiền lá bằng chày với khoảng 5-10 ml hỗn hợp 80:20 (v / v), hexane: acetone. Sau đó, chất lỏng lọc qua giấy lọc. Dịch lọc được trộn với Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> để loại bỏ nước và lọc qua giấy lọc 1 lần nữa. Dịch chiết trộn đều với 3g silicagel.

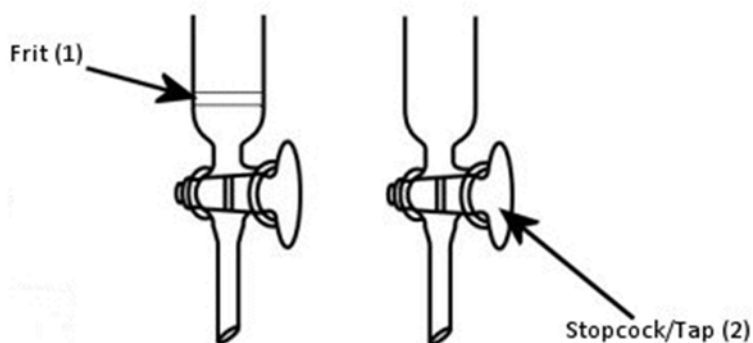
### 4.2.2. Nhồi cột

#### 4.2.2.1. Chuẩn bị cột:

- Miếng đệm bông vải hoặc sợi thủy tinh cần đủ rộng để che được đáy của cột, nhưng không được rộng quá và chặt quá sẽ làm cản trở dòng chảy của dung môi (hình 2). Một mảnh có kích thước bằng ngón tay út là đủ dùng.



- Vị trí của miếng đệm bông hay sợi thủy tinh phải đảm bảo nằm chắc chắn ở phần hẹp nhất của cột bằng cách dùng đũa thủy tinh hoặc dụng cụ khác nén xuống.
- Kẹp cột thẳng đứng lên giá và đóng van ở phía dưới cột lại

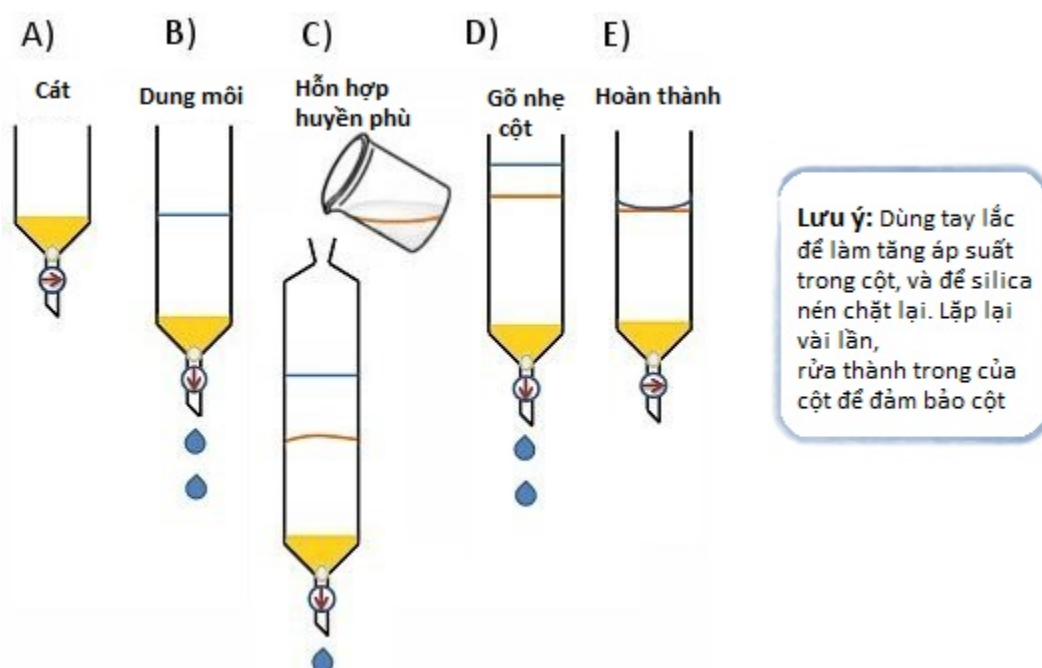


- Thêm một lớp cát vào cột (khoảng 2cm, Hình 2). Điều này đảm bảo pha tĩnh một lớp nền và ngăn sự tập trung và không liên tục do lớp vải bông khi các chất đi ra ở cuối cột.

#### 4.2.2.2. Nhồi cột

- Rót dung môi hexane vào khoảng 1/3 dung tích cột (Hình 4, bước B)
- Dùng cốc có mỏ, đong lượng silica/alumina vừa đủ (20g)
- Trong bình phản ứng hoặc cốc có mỏ, đong lượng dung môi gấp khoảng 1,5 lần lượng silica

- Thêm silica vào dung môi, từng ít một, vừa thêm vừa lắc nhẹ, sử dụng pipet Pasteur hoặc đũa thủy tinh để khuấy lên.
- Rót hoặc dùng pipet để thêm hỗn hợp silica và dung môi vào cột. Để dung môi thoát ra khỏi cột tránh bị tràn (Hình 4, bước C)
- Gõ nhẹ vào cột để bọt khí thoát ra và silica lắng xuống (Hình 4, bước D)
- Tiếp tục đổ hỗn hợp vào cột đến khi tất cả lượng silica/alumina hết.
- Rửa thành cột bằng cách rót dung môi lên thành trong của cột.
- Mở van tháo dung môi đến khi mức dung môi trong cột chạm đến bề mặt của pha tĩnh (Hình 4, bước E)



#### 4.2.2.3.Đưa chất cần phân tích vào cột

- Khi toàn bộ mẫu đã được đưa lên cột, tráng rửa bình đựng mẫu 3 lần bằng dung môi và chuyển vào cột.
- Yêu cầu khi đưa chất phân tích vào cột là phải phân tán thành 1 lớp mỏng đồng đều trên mặt thoáng phẳng

#### 4.2.2.4. Rửa cột – Hứng phân đoạn

- Đặt một bình hứng ở dưới cột và mở van cột. Chỉnh van để điều chỉnh tốc độ dung môi chảy ra (1 giọt/ giây).Dung môi chạy cột là hexane

- Đầu tiên,  $\beta$ -caroten màu vàng cam được rửa giải. Khi rửa giải sản phẩm có màu vàng cam, được thu vào ống nghiệm
- Khi  $\beta$ -caroten đã được rửa giải, rửa giải chất diệp lục bằng cách sử dụng một dung môi phân cực hơn. Để mức dung môi giảm đến đỉnh của silica. Nhẹ nhàng lấp đầy cột bằng axeton nguyên chất hoặc hỗn hợp 70% hexane : 30% acetone, nó có thể tách được chất diệp lục a và b. Sau đó, các diệp lục được thu thập trong một ống nghiệm riêng biệt.

#### 4.2.2.5. Làm sạch cột

Sau khi có được sản phẩm tách ra, công việc còn lại là đổ silica ra và làm sạch cột cho lần tách tiếp theo. Để làm nhanh quá trình, việc rửa giải loại bỏ dung môi có thể dùng máy nén khí và cho dòng khí đi qua cột khoảng 2 giờ. Quá trình này sẽ làm khô silica, từ đó đổ ra khỏi cột dễ hơn nhiều.

Sau khi rửa giải tất cả các dung môi và giữ cột thẳng đứng, úp ngược vào trong cốc có mở lớn, để khô qua đêm trong tủ hút.

Thường chỉ cần làm sạch cột bằng nước và axeton là đủ.

Lưu ý: Bụi silica rất độc khi hít phải, luôn xử lý silica trong tủ hút và mặc quần áo phù hợp để bảo vệ bản thân. Tránh quá trình làm tăng bụi khi xử lý.

#### 4.3. Thực hành sắc ký bản mỏng

- Chuẩn bị tấm TLC
- Đánh dấu tấm: Dùng bút chì vẽ một đường mảnh ở dưới cùng của tấm TLC.
- Pha hệ dung môi: Hexane 100%; Hexane – Acetone 9:1; Hexane acetone 1:9; Acetone 100%
- Chuẩn bị buồng TLC: pha động, bao gồm dung môi hoặc hỗn hợp dung môi thích hợp, được đổ vào buồng TLC. Mức pha động phải cao hơn đáy buồng vài cm.
- Tấm TLC đã chuẩn bị với các vết mẫu được đặt bên trong buồng với mặt chứa vạch mẫu hướng về phía pha động. Buồng sau đó được đóng lại bằng nắp để đảm bảo môi trường được kiểm soát.
- Tấm TLC được phép phát triển trong buồng. Bản được nhúng sao cho các vết mẫu nằm trên mức của pha động nhưng không được nhúng trực tiếp vào dung môi. Có đủ thời gian để các hợp chất tách ra và di chuyển trên đĩa.

- Loại bỏ và sấy khô: Sau khi đạt được sự phân tách mong muốn, tấm TLC được cẩn thận lấy ra khỏi buồng. Sau đó để khô hoàn toàn trước khi phân tích tiếp.
- Trực quan hóa các điểm: Tấm TLC đã phát triển được hiển thị để quan sát các điểm riêng biệt. Các kỹ thuật khác nhau có thể được sử dụng để trực quan hóa, tùy thuộc vào bản chất của mẫu. Các kỹ thuật phổ biến bao gồm:
  - Ánh sáng tia cực tím: Có thể kiểm tra tấm TLC dưới ánh sáng tia cực tím và các điểm tách biệt có thể xuất hiện dưới dạng các điểm huỳnh quang do huỳnh quang tự nhiên hoặc việc sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang trong mẫu.
  - Nhuộm iốt: Hơi iốt có thể được sử dụng để phát hiện carbohydrate, vì nó chuyển sang màu đen khi tiếp xúc với carbohydrate trên tấm TLC.
  - Vết  $\text{KMnO}_4$ : Các phân tử hữu cơ có thể được hiển thị bằng cách sử dụng thuốc nhuộm kali permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ).
  - Thuốc thử Ninhydrin: Các axit amin và protein có thể được phát hiện bằng thuốc thử ninhydrin, làm cho các vết chuyển sang màu tím hoặc xanh lam.

## **Bài 6: Tìm hiểu phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

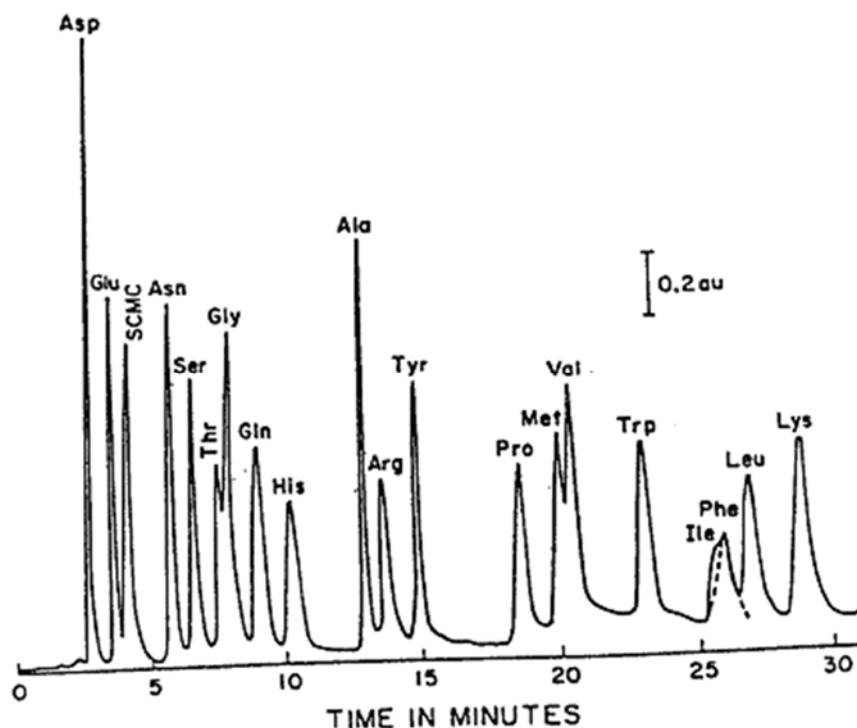
### **6.1. Giới thiệu**

Các mẫu được thu thập từ bệnh nhân y tế, các sản phẩm công nghiệp và môi trường thường là hỗn hợp của nhiều hợp chất. Thông thường, các bác sĩ, nhà sản xuất và nhà nghiên cứu quan tâm đến các thành phần cụ thể trong các hỗn hợp này, vì vậy các hỗn hợp này cần được tách riêng. Sắc ký chất lỏng hiệu suất cao (HPLC) cung cấp khả năng làm điều đó. Dữ liệu HPLC có thể được sử dụng để bổ sung sắc ký khí (GC) hoặc là một sự thay thế tuyệt vời cho GC khi các thành phần không biến động hoặc sẽ phân hủy nhiệt động dưới nhiệt độ cao.

Để tách các thành phần hỗn hợp, HPLC tận dụng lợi thế của việc phân vùng giữa pha động và pha tĩnh dưới một áp suất đồng nhất, thường nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 psi. Cần có áp suất cao để có được tốc độ dòng chảy qua cột hợp lý. Quá trình bắt đầu khi một lượng nhỏ mẫu chất lỏng được đưa vào cột có một luồng chất lỏng chảy qua (được gọi là pha động). Trong sắc ký phân đoạn, cột được đóng gói với các hạt được phủ pha tĩnh. Sự phân cực của thành phần và loại HPLC được thực hiện xác định pha nào mà thành phần thu hút nhiều hơn. Nếu thành phần bị thu hút nhiều hơn vào pha di động, nó sẽ chảy ra khỏi cột và có thời gian lưu ngắn hơn. Nếu thành phần bị thu hút nhiều hơn vào giai đoạn đứng yên, thành phần sẽ được giữ lại và do đó, sẽ có thời gian lưu dài hơn. Tương tự như điện di mao quản (CE) hoặc sắc ký khí (GC), thời gian lưu này có thể được sử dụng để xác định các thành phần. Chọn pha động (hoặc dung môi) là một trong những bước quan trọng nhất khi thực hiện HPLC và được chọn dựa trên phân cực.

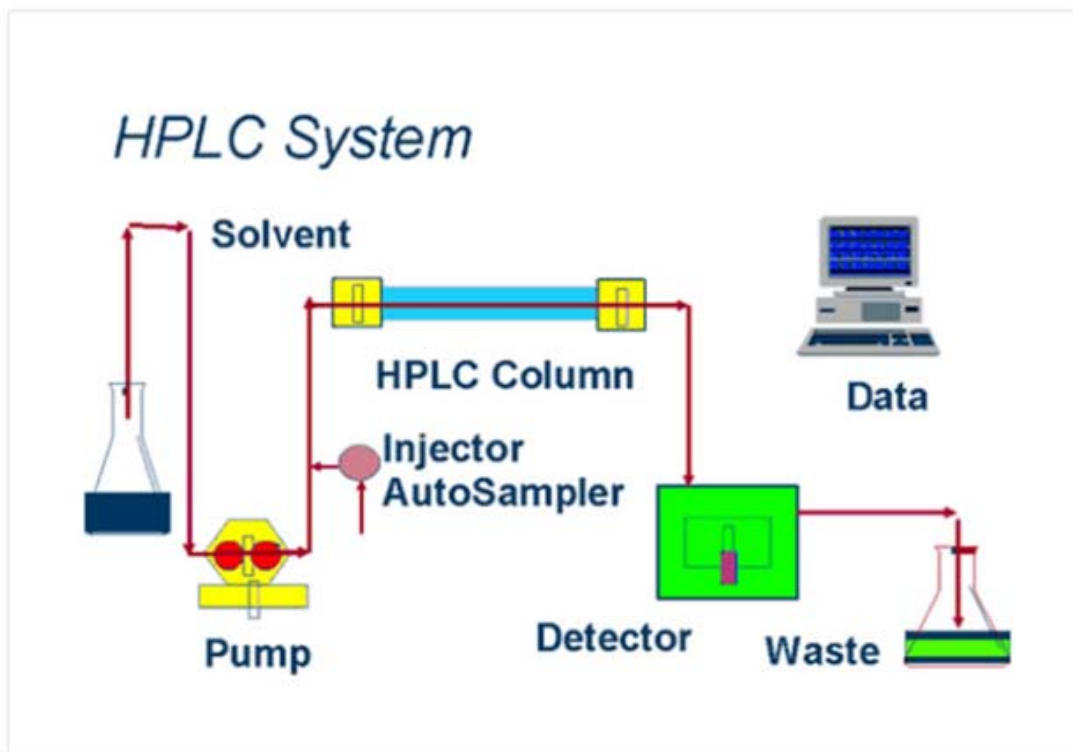
HPLC có thể được thực hiện với thành phần dung môi cố định hoặc thay đổi. Khi độ phân cực của dung môi được cố định, nó được gọi là quá trình chạy đẳng cấp. Dữ liệu này có giá trị vì nó có thể được sử dụng để so sánh thời gian lưu giữ của các thành phần khác nhau. Phương pháp này chỉ hoạt động khi các thành phần có thời gian lưu duy nhất trong điều kiện đó. Khi thời gian lưu của các thành phần rất giống nhau hoặc cực kỳ khác nhau, không phải thành phần nào cũng được nhìn thấy trên sắc ký đồ. Khi độ phân cực của dung môi thay đổi trong suốt quá trình chạy, đây được gọi là quá trình chạy gradient. Điều kiện gradient có thể được tối ưu hóa để cải thiện cơ hội nhìn thấy tất cả các thành phần trên sắc ký đồ. Mặc dù tất cả thời gian lưu không thể so sánh được do các điều kiện khác nhau, nhưng điều hữu ích là xem có bao nhiêu thành phần trong hỗn hợp và mô tả đặc điểm của các thành phần.

Trong quá trình phân tích HPLC của một hỗn hợp, các thành phần sẽ tách ra dựa trên thời gian lưu của chúng. Điều này sẽ tạo ra một sắc ký đồ; một ví dụ về sắc ký đồ có thể được xem trong Hình 1. Có thể sử dụng chiều cao pic hoặc diện tích pic để ước tính nồng độ. Điều này có thể được thực hiện vì các giá trị này tỷ lệ với nồng độ khi các đỉnh sắc nét và tốc độ dòng chảy được kiểm soát cẩn thận. Đường chuẩn có thể được lập bằng cách vẽ đồ thị chiều cao pic hoặc diện tích pic như một hàm của nồng độ.



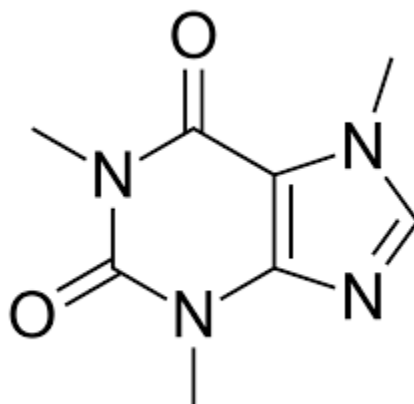
Hình 1: Sắc ký đồ của hỗn hợp amino acid

Các thành phần chính của hệ thống HPLC là một máy bơm cao áp, một cột và một hệ thống kim phun cũng như một đầu báo. Hệ thống hoạt động như sau: dung dịch rửa giải được lọc và bơm qua cột sắc ký, mẫu được nạp và bơm lên cột và nước thải đầu ra được theo dõi bằng máy dò và được ghi lại dưới dạng peak.



Hình 2: Sơ đồ cấu tạo hệ thống HPLC

Caffeine là một phân tử hữu cơ phổ biến được tìm thấy trong nhiều loại đồ uống như cà phê, trà, cola và một số loại thực phẩm mà chúng ta tiêu thụ. Caffeine là một chất kích thích hệ thần kinh trung ương. Đó là lý do tại sao nhiều người uống cà phê hoặc soda để giúp họ cảm thấy tỉnh táo.



## 6.2. Tiến hành

### 6.2.1. Chuẩn bị mẫu

#### 6.2.1.1. Mẫu trà

- Dùng pipet lấy 10 mL trà cho vào bình định mức 50 mL sạch và khô và pha loãng bằng nước cấp HPLC / CE đến vạch.
- Lọc mẫu bằng bộ lọc được cung cấp.
- Tráng bộ lọc bằng cách lọc 1-2mL mẫu đầu tiên vào cốc thải.
- Đổ dung tích thích hợp vào lọ và dán nhãn lọ.

#### 6.2.1.2. Mẫu nước ngọt

- Nếu nước ngọt bạn chọn là loại có ga, hãy khử cacbonat nước ngọt bằng cách rót qua lại giữa hai cốc cho đến khi hết bọt.
- Dùng pipet lấy 25 mL nước ngọt cho vào bình định mức 50 mL sạch và khô và pha loãng bằng nước cấp HPLC / CE đến vạch.
- Lọc mẫu bằng bộ lọc được cung cấp.
- Tráng bộ lọc bằng cách lọc 1-2mL mẫu đầu tiên vào cốc thải.
- Đổ dung tích thích hợp vào lọ và dán nhãn lọ.

### 6.2.2. Chuẩn bị trình tự cho các tiêu chuẩn và mẫu Caffeine

- Cân chính xác 10,0 mg caffein
- Chuyển caffein vào bình định mức 100 mL sạch.
- Pha loãng bằng nước cấp HPLC / CE đến vạch. Dung dịch gốc sẽ có nồng độ cuối cùng là 0,1 g / L.
- Tiến hành một loạt các dung dịch pha loãng để thu được các dung dịch chuẩn 0,01 g / L, 0,025 g / L, 0,05 g / L và 0,075 g / L. Tạo 10 mL cho mỗi dung dịch và sử dụng nước cấp HPLC / CE để pha loãng
- Lọc các dung dịch bằng cách sử dụng bộ lọc được cung cấp
- Lọc dung dịch vào lọ thích hợp như hình sau:



### 6.2.3. Điều kiện chạy sắc ký lỏng hiệu năng HPLC

- Cột C18 3-5 $\mu$ m
- Thể tích mẫu 10 - 20 $\mu$ l
- Hệ dung môi: 47% Methanol và 53% Water hoặc hệ 10% Acetonitrile: 90% dung dịch đệm acetate (900ml dung dịch CH<sub>3</sub>COONa pH 4.3, điều chỉnh pH bằng CH<sub>3</sub>COOH + 100 ml Acetone nitrile)
- Tốc độ dòng: 1 ml/ phút
- detector DAD tại 280 nm

### 6.2.4. Tính toán kết quả

- Sử dụng các chất chuẩn caffeine để xác định đỉnh caffeine.
- Ghi lại thời gian lưu và diện tích đỉnh cho từng chất chuẩn
- Lập đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị diện tích đỉnh so với nồng độ của caffeine theo ppm
- Xác định hàm lượng caffeine trong mẫu