

DH2.78

BỘ Y TẾ

HÓA PHÂN TÍCH

Tập 2

PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

SÁCH ĐÀO TẠO DƯỢC SĨ ĐẠI HỌC

Chủ biên:
PGS.TS. TRẦN TỬ AN



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

BỘ Y TẾ

HÓA PHÂN TÍCH

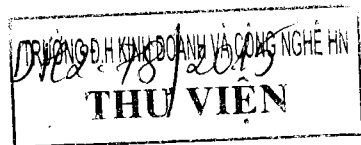
TẬP II. PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

SÁCH ĐÀO TẠO DƯỢC SĨ ĐẠI HỌC

Mã số: Đ.20.Y.14

(Tái bản lần thứ nhất)

Chủ biên: PGS. TS. Trần Tử An



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2012

CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN:

Vụ Khoa học và Đào tạo, Bộ Y tế

CHỦ BIÊN:

PGS.TS. Trần Tử An

NHỮNG NGƯỜI BIÊN SOẠN:

PGS.TS. Trần Tử An

PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu



© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ Khoa học và Đào tạo)

LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện một số điều của Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Dược sĩ đại học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn tài liệu dạy- học các môn cơ sở, chuyên môn và cơ bản chuyên ngành theo chương trình trên nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong công tác đào tạo nhân lực y tế.

Sách *Hóa phân tích Tập 2* được biên soạn dựa trên chương trình giáo dục của Trường Đại học Dược Hà Nội trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt. Sách được các nhà giáo giàu kinh nghiệm và tâm huyết với công tác đào tạo biên soạn theo phương châm: Kiến thức cơ bản, hệ thống; nội dung chính xác, khoa học; cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam.

Sách *Hóa phân tích Tập 2* đã được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách và tài liệu dạy-học chuyên ngành Dược của Bộ Y tế thẩm định vào năm 2006. Bộ Y tế ban hành làm tài liệu dạy-học chính thức của ngành y tế. Trong thời gian 3 đến 5 năm sách phải được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật.

Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Trần Tử An và PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu, Bộ môn Hóa phân tích của Trường Đại học Dược Hà Nội đã dành nhiều công sức hoàn thành cuốn sách này, cảm ơn GS.TS. Nguyễn Đức Huệ và PGS. Phạm Gia Huệ đã đọc, phản biện để cuốn sách được hoàn chỉnh kịp thời phục vụ cho công tác đào tạo nhân lực y tế.

Chúng tôi mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp, của các bạn sinh viên và các độc giả để lần xuất bản sau cuốn sách được hoàn thiện hơn.

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ



THÔNG TIN CHUNG

Đề tài nghiên cứu khoa học này được thực hiện theo kế hoạch nghiên cứu khoa học của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được phê duyệt và cấp kinh phí nghiên cứu theo Quyết định số 123/QĐ-VKCN ngày 15/03/2023 của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu của đề tài tập trung vào việc nghiên cứu và phát triển các ứng dụng công nghệ thông tin trong lĩnh vực quản lý tài nguyên thiên nhiên và môi trường. Các nghiên cứu được thực hiện theo các bước: phân tích yêu cầu, thiết kế hệ thống, phát triển phần mềm, thử nghiệm và đánh giá.

Đề tài nghiên cứu khoa học này được thực hiện theo kế hoạch nghiên cứu khoa học của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được phê duyệt và cấp kinh phí nghiên cứu theo Quyết định số 123/QĐ-VKCN ngày 15/03/2023 của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu của đề tài tập trung vào việc nghiên cứu và phát triển các ứng dụng công nghệ thông tin trong lĩnh vực quản lý tài nguyên thiên nhiên và môi trường. Các nghiên cứu được thực hiện theo các bước: phân tích yêu cầu, thiết kế hệ thống, phát triển phần mềm, thử nghiệm và đánh giá.

Đề tài nghiên cứu khoa học này được thực hiện theo kế hoạch nghiên cứu khoa học của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được phê duyệt và cấp kinh phí nghiên cứu theo Quyết định số 123/QĐ-VKCN ngày 15/03/2023 của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu của đề tài tập trung vào việc nghiên cứu và phát triển các ứng dụng công nghệ thông tin trong lĩnh vực quản lý tài nguyên thiên nhiên và môi trường. Các nghiên cứu được thực hiện theo các bước: phân tích yêu cầu, thiết kế hệ thống, phát triển phần mềm, thử nghiệm và đánh giá.

Đề tài nghiên cứu khoa học này

được thực hiện theo



LỜI NÓI ĐẦU

Theo chương trình đào tạo Dược sĩ đại học đã được Bộ Y tế phê duyệt, môn *Hóa học phân tích* được giảng dạy ở năm thứ hai (học kỳ 3 và 4) với mục tiêu giúp sinh viên nắm vững nguyên tắc và ứng dụng các phương pháp phân tích thường dùng trong ngành Dược.

Để thuận tiện cho việc giảng dạy và học tập, sách *Hóa phân tích* được chia làm hai học phần:

- Hóa phân tích Tập 1, được giảng dạy ở học kỳ 3,
- Hóa phân tích Tập 2, được giảng ở học kỳ 4.

Đây là cuốn Hóa phân tích Tập 2 với hai mục tiêu học tập cụ thể:

1. Giải thích được nguyên tắc, cấu tạo của thiết bị và ứng dụng của ba nhóm kỹ thuật phân tích:

- Quang phổ và khối phổ (UV-VIS, IR, AAS..., MS)
- Điện hóa (đo thế, von-ampe)
- Chia tách (GC, HPLC, SFC, TLC và CE)

2. Trình bày được nguyên tắc kỹ thuật xử lý mẫu như: hòa tan phân hủy mẫu, loại chất cản trở (kết tủa, chưng cất, chiết xuất).

Cuốn sách có 14 chương giới thiệu các kỹ thuật phân tích thành ba nhóm cho khối lượng 45 tiết học. Sau phần giới thiệu đại cương môn học ở chương 1, sáu chương đầu (từ chương 2 đến chương 7) trình bày hai loại phổ: quang phổ và khối phổ. Bốn chương tiếp theo (chương 8 đến chương 11) thảo luận các kỹ thuật tách phân tích. Hai chương tiếp (chương 12 và 13) đề cập đến các kỹ thuật điện hóa: đo thế và phân tích von ampe. Cuối sách (chương 14) tóm tắt một số kỹ thuật xử lý mẫu thường gặp trong phân tích Dược.

Về phương thức biên soạn Hóa phân tích Tập 2 có những điểm khác với Hóa phân tích Tập 1. Ở Hóa phân tích Tập 1, yêu cầu đối với sinh viên là nắm vững các cân bằng trong dung dịch thông qua các bài tập. Trên cơ sở đó giải thích các kỹ thuật chuẩn độ hoặc phân tích khối lượng. Cho nên sau mỗi chương có nhiều câu hỏi và bài tập, kể cả những bài tập khó. Nhưng trong Hóa phân tích Tập 2 do có nhiều nội dung, thời lượng ít nên yêu cầu chính là *nắm vững nguyên lý các kỹ thuật*. Sau mỗi chương chủ yếu có câu hỏi để giúp sinh viên hiểu rõ thêm những vấn đề lý thuyết đã trình bày; còn phần bài tập chỉ mang tính chất minh họa.

Ngoài ra để tiện cho người đọc dễ tra cứu và tránh nhầm lẫn do chưa thống nhất trong tiếng Việt nên sau các thuật ngữ chúng tôi thường có chú thích thêm tiếng Anh đặt trong ngoặc đơn.

Nội dung cuốn sách được biên soạn dựa theo chương trình đào tạo Dược sĩ của Trường Đại học Dược Hà Nội bao gồm các kỹ thuật thường dùng trong phân tích Dược. Khi sử dụng cuốn sách này, cán bộ giảng dạy nên dựa vào điều kiện cụ thể để lựa chọn mục tiêu chương bài, nội dung trình bày và các câu hỏi bài tập cho phù hợp với trình độ của sinh viên và chương trình môn học của trường mình.

Nội dung phân tích dụng cụ rất phong phú, ứng dụng của nó rất đa dạng thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau, trong quá trình biên soạn các tác giả đã có nhiều cố gắng, tuy vậy cũng khó tránh khỏi những thiếu sót hoặc chưa phù hợp với thực tế nghề nghiệp. Chúng tôi rất vui mừng nhận được những chỉ dẫn, đóng góp của đồng nghiệp và bạn đọc để cuốn sách ngày càng có chất lượng cao hơn.

Hà Nội, tháng 9 năm 2012

CHỦ BIÊN

PGS.TS. Trần Tử An



MỤC LỤC

<i>Lời giới thiệu</i>	3
<i>Lời nói đầu</i>	5
Chương 1. Đại cương về phân tích dụng cụ	17
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Phân loại	17
1.1. Phân tích quang học	17
1.2. Phân tích điện hóa	18
1.3. Kỹ thuật tách phân tích	18
1.4. Nhóm hỗn hợp	18
2. Định lượng trong phân tích dụng cụ	19
2.1. Phương pháp so sánh	19
2.2. Phương pháp chuẩn độ	20
3. Hiệu chuẩn và chất chuẩn	20
3.1 Hiệu chuẩn	20
3.2. Chuẩn hoá học	20
3.3. Chất đối chiếu	21
4. Một số đặc trưng của phân tích dụng cụ	21
4.1. Độ nhạy	22
4.2. Giới hạn phát hiện	22
4.3. Khoảng nồng độ tuyến tính	23
5. Kỹ thuật phân tích - phương pháp phân tích	23
5.1. Kỹ thuật phân tích	23
5.2. Phương pháp phân tích	23
Câu hỏi và bài tập	24
Chương 2. Đại cương về phân tích quang học	26
<i>TS. Thái Nguyễn Hùng Thu</i>	
1. Bản chất và các đại lượng đặc trưng của bức xạ điện từ	26
1.1. Tính chất sóng của bức xạ điện từ	26
1.2. Tính chất hạt của các bức xạ điện từ	28

2. Sự hấp thụ và tán sắc ánh sáng	28
2.1. Sự hấp thụ ánh sáng	28
2.2. Màu sắc của ánh sáng và một số biện pháp tạo chùm tia đơn sắc	30
2.3. Sự hấp thụ nguyên tử	33
2.4. Sự hấp thụ phân tử	35
3. Ứng dụng và ảnh hưởng của một số hiện tượng quang học khác với phân tích	36
3.1. Sự tán xạ ánh sáng	37
3.2. Hiện tượng giao thoa ánh sáng	39
3.3. Hiện tượng nhiễu xạ ánh sáng	39
3.4. Hiện tượng phân cực của ánh sáng	39
3.5. Hiện tượng cộng hưởng từ hạt nhân	40
Câu hỏi và bài tập	41
Chương 3. Quang phổ hấp thụ phân tử	43
<i>TS. Thái Nguyễn Hùng Thu</i>	
1. Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)	43
1.1. Tính chất vùng phổ tử ngoại khả kiến	43
1.2. Sự chuyển mức năng lượng electron với hấp thụ bức xạ UV-VIS	44
1.3. Định luật Lambert-Beer và hệ số hấp thụ	46
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS	47
1.5. Các ứng dụng của quang phổ UV-VIS	52
1.6. Máy quang phổ UV-VIS	60
2. Quang phổ hồng ngoại	63
2.1. Sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại và hình thành các đỉnh trên phổ IR	63
2.2. Các ứng dụng của quang phổ hồng ngoại	65
2.3. Máy quang phổ hồng ngoại và một số chú ý khi đo	68
Câu hỏi và bài tập	69
Chương 4. Quang phổ hấp thụ và phát xạ nguyên tử	72
<i>TS. Thái Nguyễn Hùng Thu</i>	
1. Quang phổ hấp thụ nguyên tử	72

1.1. Nguyên tắc	72
1.2. Cấu tạo chính của máy quang phổ hấp thụ nguyên tử	72
1.3. Các quá trình xảy ra trong nguyên tử hóa mẫu và các yếu tố ảnh hưởng	77
1.4. Bố chính nền và các yếu tố ảnh hưởng khác	78
1.5. Ứng dụng	79
2. Quang phổ phát xạ nguyên tử	79
2.1. Nguyên tắc	80
2.2. Cấu tạo của máy quang phổ phát xạ nguyên tử	80
2.3. Ứng dụng của quang phổ phát xạ nguyên tử	81
3. Quang phổ phát xạ plasma	81
Câu hỏi và bài tập	83
Chương 5. Quang phổ huỳnh quang	84
<i>TS. Thái Nguyễn Hùng Thu</i>	
1. Hiện tượng huỳnh quang và lân quang	84
2. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng huỳnh quang	85
2.1. Các yếu tố về cấu trúc	85
2.2. Các yếu tố môi trường	87
3. Một số đặc điểm của huỳnh quang	87
4. Máy quang phổ huỳnh quang	88
5. Ứng dụng của quang phổ huỳnh quang	88
Câu hỏi và bài tập	90
Chương 6. Một số phương pháp quang học khác	91
<i>TS. Thái Nguyễn Hùng Thu</i>	
1. Phương pháp đo chỉ số khúc xạ	91
1.1. Nguyên tắc	91
1.2. Các thiết bị sử dụng để xác định chiết suất	92
2. Phương pháp đo năng suất quay cực	95
2.1. Chất hoạt quang và ứng dụng của hiện tượng quay cực ánh sáng	95
2.2. Phân cực kế	95

2.3. Ứng dụng của phương pháp đo năng suất quay cực	97
3. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân	98
3.1. Tính chất từ của hạt nhân	98
3.2. Tính chất của một hạt nhân nguyên tử trong một từ trường	98
3.3. Hằng số chắn và từ trường hiệu dụng	102
3.4. Độ chuyển dịch hoá học và hằng số tương tác spin	102
3.5. Ứng dụng của cộng hưởng từ hạt nhân	104
3.6. Cấu tạo máy cộng hưởng từ hạt nhân và chuẩn bị mẫu ghi	105
Câu hỏi và bài tập	106
Chương 7. Phân tích khối phổ	107
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Nguyên tắc	107
2. Máy khối phổ	108
2.1. Bộ nạp mẫu	108
2.2. Bộ nguồn ion	109
2.3. Bộ phân tích khối	112
2.4. Detector	117
3. Vài đặc điểm của phân tích khối phổ	117
3.1. Quá trình phân mảnh	117
3.2. Độ phân giải của máy khối phổ	118
3.3. Trình bày dữ liệu	118
4. Ứng dụng	119
4.1. Xác định các đồng vị	119
4.2. Định tính	120
4.3. Xác định công thức cấu tạo	121
4.4. Định lượng	121
Câu hỏi bài tập	121
Chương 8. Đại cương về sắc ký	123
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Một số vấn đề chung sắc ký	123



1.1. Phân loại sắc ký	124
1.2. Sắc ký rửa giải trên cột	125
2. Pic sắc ký và các thông số đặc trưng cho quá trình rửa giải	126
2.1. Sự di chuyển của các chất	126
2.2. Hình dáng pic sắc ký	130
3. Lý thuyết sắc ký	132
3.1. Lý thuyết đĩa	132
3.2. Lý thuyết động học	135
4. Tối ưu hóa quá trình tách sắc ký	138
4.1. Độ phân giải của cột	138
4.2. Tách nhiều chất trên cột	140
4.3. Thời gian phân tích	141
5. Ứng dụng của sắc ký	142
5.1. Phân tích định tính	142
5.2. Phân tích định lượng	142
Câu hỏi và bài tập	144
Chương 9. Sắc ký khí	146
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Vài thông số đặc trưng cho sắc ký khí - lỏng	146
1.1. Nguyên tắc	147
1.2. Thể tích lưu và thời gian lưu	147
1.3. Kiểm soát nhiệt độ của cột	148
2. Máy sắc ký khí	149
2.1. Hệ cấp pha động	149
2.2. Hệ tiêm mẫu	150
2.3. Cột và lò cột	151
2.4. Pha tĩnh trong sắc ký khí - lỏng	153
2.5. Detector	154
3. Một số kỹ thuật đặc biệt dùng trong sắc ký khí - lỏng	158
4. Ứng dụng của sắc ký khí - lỏng	161
4.1. Định tính	161

4.2. Định lượng	162
4.3. Phạm vi ứng dụng	164
5. Sắc ký khí - rắn	165
Câu hỏi và bài tập	166
Chương 10. Sắc ký lỏng	168
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)	168
1.1. Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao	169
1.2. Các kiểu sắc ký lỏng hiệu năng cao	181
1.3. Xu hướng nghiên cứu hiện đại trong sắc ký lỏng	200
2. Sắc ký lỏng siêu tới hạn	201
2.1. Trạng thái siêu tới hạn	201
2.2. Một số đặc điểm của chất lỏng siêu tới hạn	203
2.3. Máy sắc ký lỏng siêu tới hạn	203
2.4. Ứng dụng của SFC	204
3. Sắc ký lớp mỏng	205
3.1. Nguyên tắc của TLC	205
3.2. Pha tĩnh của TLC	205
3.3. Pha động	206
3.4. Kỹ thuật TLC	206
3.5. Vài thông số đặc trưng của TLC	209
3.6. Ứng dụng của TLC	211
3.7. Đánh giá TLC	212
Câu hỏi và bài tập	213
Chương 11. Điện di mao quản	215
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Nguyên tắc của CE	215
1.1. Điện di	216
1.2. Dòng điện thẩm	217
2. Các thông số đặc trưng	222
2.1. Thời gian di chuyển t_M	222
2.2. Số đĩa lý thuyết N	223

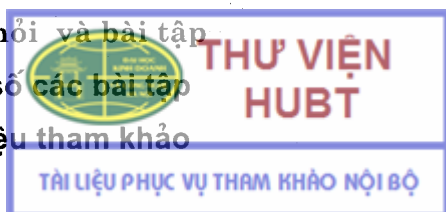


2.3. Độ phân giải	224
3. Các kiểu điện di mao quản	224
3.1. CZE	225
3.2. MEKC	226
3.3. CGE	229
3.4. CEC	230
4. Thiết bị CE	231
4.1. Tiêm mẫu	231
4.2. Mao quản	233
4.3. Detector	234
4.4. Hệ thống thu nhận dữ liệu	235
Câu hỏi và bài tập	235
Chương 12. Phân tích đo điện thế	237
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Nguyên tắc	237
2. Cách xác định thế điện cực	238
2.1. Mạch điện hóa	239
2.2. Cách xác định thế điện cực	240
3. Điện cực so sánh	241
3.1. Điện cực bạc clorid	241
3.2. Điện cực calomel	242
4. Điện cực chỉ thị kim loại	243
4.1. Điện cực loại một	244
4.2. Điện cực loại hai	244
4.3. Điện cực oxy hóa khử	245
5. Điện cực màng	245
5.1. Điện cực thủy tinh đo pH	246
5.2. Điện cực thủy tinh cho ion kim loại M^+	248
5.3. Điện cực màng lỏng	249
5.4. Điện cực màng tinh thể	250
5.5. Tế bào đo khí	251

6. So sánh điện thế	253
6.1. Nguyên tắc chung	253
6.2. Đo pH với điện cực thủy tinh	255
7. Chuẩn độ đo thế	257
7.1. Chuẩn độ đo thế không dòng ($I=0$)	258
7.2. Cách xác định điểm kết thúc	259
7.3. Chuẩn độ đo thế dòng không đổi ($I \neq 0$)	260
Câu hỏi và bài tập	261
Chương 13. Phân tích von - ampe	264
<i>PGS.TS. Trần Tử An</i>	
1. Nguyên tắc	264
1.1. Mạch điện phân của phân tích von-ampe	264
1.2. Điện thế phân cực điện cực	265
1.3. Điện cực công tác	266
2. Von - ampe quét thế tuyến tính	268
3. Cực phổ	271
3.1. Thiết bị cực phổ	271
3.2. Dòng khuếch tán cực phổ	272
3.3. Dòng dư	274
3.4. Sóng oxy	274
3.5. Các cực đại trên sóng cực phổ	275
3.6. Ưu nhược điểm của điện cực nhỏ giọt thủy ngân	275
3.7. Phân tích sóng cực phổ cổ điển	276
4. Ứng dụng của phân tích von-ampe	277
4.1. Tế bào đo oxy	277
4.2. Chuẩn độ ampe	279
5. Các kỹ thuật von – ampe hiện đại	283
5.1. Von – ampe xung	283
5.2. Von – ampe sóng vuông (SWV)	285
5.3. Ứng dụng của von - ampe xung	287
5.4. Von – ampe tuần hoàn	287
5.5. Von – ampe ngược (von - ampe hòa tan)	289
Câu hỏi và bài tập	292



1. Hòa tan và phân hủy mẫu	295
1.1. Phân hủy bằng nhiệt và acid mạnh	296
1.2. Kỹ thuật vi sóng	296
1.3. Phương pháp đốt phân hủy mẫu hữu cơ	298
1.4. Nung chảy phân hủy mẫu vô cơ	299
2. Kết tủa	300
2.1. Điện kết tủa	300
2.2. Kết tủa protein	300
3. Kỹ thuật cất	301
4. Chiết lỏng - lỏng	301
4.1. Nguyên tắc	301
4.2. Các dạng chiết xuất	303
4.3. Kỹ thuật chiết xuất	308
5. Chiết pha rắn	309
5.1. Các loại pha rắn	309
5.2. Cơ chế lưu giữ, rửa giải	311
5.3. Thực hành chiết pha rắn	312
5.4. Các kiểu cải tiến của SPE	314
5.5. Đánh giá về chiết pha rắn	315
6. Các kỹ thuật mới xử lý mẫu	316
6.1. Chiết màng	316
6.2. Chiết pha rắn in dấu phân tử	317
Câu hỏi và bài tập	319
Đáp số các bài tập	321
Tài liệu tham khảo	323





ĐẠI CƯƠNG VỀ PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

MỤC TIÊU

1. Giới thiệu được các cách định lượng trong phân tích dụng cụ và vai trò của chất đối chiếu.
2. Giải thích được các khái niệm: LOD, LOQ và độ nhạy trong phân tích.
3. Phân biệt được kỹ thuật phân tích và phương pháp phân tích.

Ở thời kỳ đầu của hóa học, phần lớn các phép phân tích được thực hiện bằng cách tách riêng đối tượng phân tích với các kỹ thuật kết tủa, chiết xuất hoặc chưng cất. Để định tính có thể dùng phản ứng tạo màu, hoặc đặc tính vật lý như điểm chảy, điểm sôi, năng suất quay cực, chỉ số khúc xạ. Để định lượng có thể dùng đo khối lượng, chuẩn độ thể tích. Đây là các phương pháp phân tích hóa học hiện đang dùng trong các phòng thí nghiệm phân tích. Nội dung của chúng được giới thiệu trong *Hóa phân tích I*.

Từ những năm 30 của thế kỷ trước, các nhà hóa học đã sử dụng các tính chất vật lý của chất phân tích như: độ dẫn điện, thế điện cực, hấp thụ quang, phát xạ và huỳnh quang... phục vụ cho phân tích các chất vô cơ và hữu cơ. Mặt khác, kỹ thuật tách sắc ký đã bổ sung cho kỹ thuật cổ điển (kết tủa, cất, chiết xuất) khi phân tích các hỗn hợp phức tạp nhiều thành phần. Các kỹ thuật ra đời muộn hơn này được tập hợp thành nhóm *phân tích dụng cụ*. Đây là nội dung của giáo trình *Hóa phân tích II*.

1. PHÂN LOẠI

Trong phân tích dụng cụ khác với phân tích hóa học, người ta thường phải khảo sát một hoặc một số tham số hóa lý của đối tượng phân tích sau khi tác động lên đối tượng đó bằng các cách thích hợp. Dựa vào cách tác động lên đối tượng phân tích và các quá trình diễn ra trong đó, người ta chia phân tích dụng cụ thành 4 nhóm:

1.1. Phân tích quang học

Các hiệu ứng của bức xạ điện từ được sử dụng trong phân tích quang học là:

- *Phát bức xạ*: Trong quang phổ phát xạ, phổ huỳnh quang, phổ lân quang.

- *Hấp thụ bức xạ*: Trong quang phổ hấp thụ UV-VIS, hấp thụ IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).
- *Tán xạ ánh sáng*: Trong đo độ đục hấp thụ (turbidimetry), độ đục khuếch tán (nephelometry), quang phổ Raman.
- *Khúc xạ*: Trong phép đo khúc xạ, giao thoa ánh sáng.
- *Nhiều xạ*: Trong nhiễu xạ tia X, nhiễu xạ electron.
- *Phân cực ánh sáng*: Trong phép đo độ phân cực.

1.2. Phân tích điện hóa

Dựa vào quá trình điện cực xảy ra khi cho dòng điện đi qua dung dịch, các tín hiệu phân tích là:

- *Điện trở*: Phân tích độ dẫn điện, độ dẫn điện cao tần.
- *Điện thế*: Phân tích đo thế, thời điện thế.
- *Cường độ*: Phân tích von - ampe, cực phổ.
- *Điện lượng*: Phân tích đo culông.

1.3. Kỹ thuật tách phân tích

Nguyên tắc phân tích dựa vào sự phân bố khác nhau giữa các pha của đối tượng phân tích dưới tác dụng của điện từ trường, lực cơ học. Có thể thống kê nhiều kỹ thuật:

- *Sắc ký lỏng*: Sắc ký cột, sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lớp mỏng.
- *Sắc ký lỏng siêu tới hạn*.
- *Sắc ký khí*.
- *Điện di*: Điện di trên gel, điện di mao quản.

Một điểm đặc biệt của nhóm này là: dựa vào nguyên tắc khác nhau để tách các thành phần trong hỗn hợp phức tạp, sau đó dựa vào tín hiệu quang học hoặc điện hóa để xác định các thành phần đã tách ra.

1.4. Nhóm hỗn hợp

Nhóm này bao gồm các kỹ thuật phân tích dựa vào các tín hiệu khác nhau, đó là:

- *Tín hiệu khối lượng / điện tích (m/z)*: Khối phổ.
- *Hiệu ứng nhiệt*: Phân tích độ dẫn nhiệt, entalpy.
- *Hoạt tính phóng xạ*: Phân tích hoạt hóa neutron, pha loãng đồng vị.
- *Tốc độ phản ứng*: Phân tích động học.



Phân tích dụng cụ bao gồm nhiều kỹ thuật đa dạng dựa vào nguyên lý đo lường rất khác nhau. Với thời lượng được qui định trong chương trình, giáo trình *Hóa phân tích II* sẽ giới thiệu một số *kỹ thuật quan trọng thường dùng* trong ngành Dược phục vụ kiểm tra chất lượng thuốc và kiểm nghiệm chất độc trong phân tích ô nhiễm môi trường và đánh giá an toàn thực phẩm.

2. ĐỊNH LƯỢNG TRONG PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

2.1. Phương pháp so sánh

Như đã giới thiệu trong hóa phân tích I, phân tích hóa học dùng tính toán *định lượng trực tiếp* trên cơ sở các quy luật hóa lý chi phối phản ứng hóa học cùng với các số liệu đầu vào để thu được kết quả. Khác với phân tích hóa học, phân tích dụng cụ phần lớn dùng *cách đo so sánh* (trừ phép đo điện lượng culông): *so sánh đáp ứng của chất phân tích với đáp ứng của chuẩn đối chiếu* để tính toán kết quả.

Sự phụ thuộc của các tín hiệu phân tích S vào nồng độ là một hàm bậc cao. Nhưng người phân tích thường chọn khoảng nồng độ thích hợp để có sự phụ thuộc tuyến tính được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$S = K \cdot C \quad (1.1)$$

Trong đó:

C : Nồng độ chất phân tích,

K : Hằng số phụ thuộc vào đặc điểm của chất phân tích và điều kiện thực nghiệm.

Dựa vào phương trình cơ bản (1.1), để tính được nồng độ của chất phân tích C_x khi đo được đáp ứng S_x cần phải tìm cách xác định hằng số K . Trong phân tích dụng cụ, dùng *chuẩn đối chiếu* để tính K theo hai cách sau:

Cách 1: Xây dựng đường chuẩn:

Pha chế một số dung dịch chuẩn đối chiếu có nồng độ khác nhau. Đo đáp ứng S_i của các dung dịch này và lập đường cong sự phụ thuộc của S vào C :

$S = f(C)$. Thường chọn khoảng phụ thuộc tuyến tính. Đo tín hiệu đáp ứng S_x của chất phân tích và nội suy nồng độ C_x từ đường chuẩn đã xây dựng ở trên.

Nếu đã có thông tin xác định hằng số K và nồng độ phụ thuộc tuyến tính có thể dùng *một dung dịch chuẩn* để tính nồng độ C_x .

Cách 2: Phương pháp thêm đường chuẩn:

Trước hết đo cường độ đáp ứng của mẫu phân tích S_x . Sau đó pha chế một số dung dịch đo có nồng độ C_x và nồng độ chuẩn đối chiếu C_R khác nhau: $C_x + C_{R,i}$. Đo đáp ứng của các dung dịch này S_i và xây dựng đồ thị sự phụ thuộc $S_i = f(C_{R,i})$. Chọn khoảng phụ thuộc tuyến tính. Dựa vào sự phụ thuộc này tính được nồng độ C_x .

Đây là cách xác định hằng số K của phương trình (1.1) trong dung dịch nền chất phân tích nhằm giảm thiểu tác động của nền mẫu đến số liệu đo đáp ứng S.

Có thể sử dụng một dung dịch thêm chuẩn để tính nồng độ C_x .

2.2. Phương pháp chuẩn độ

Ở đây người ta chuẩn độ chất phân tích X bằng một thuốc thử R thích hợp. Phản ứng hóa học diễn ra:



Nồng độ C_x của chất phân tích X ngày một giảm dần theo quá trình chuẩn độ. Do sự thay đổi của tín hiệu đáp ứng S_x theo lượng thuốc thử R (Vml) thêm vào để tính nồng độ C_x ban đầu.

Đường cong chuẩn độ được xây dựng theo hệ tọa độ S_x -V. Đường cong này rất đa dạng phụ thuộc mối liên hệ hàm số giữa tín hiệu đáp ứng và nồng độ C_x . Cần chọn một kỹ thuật thích hợp xử lý số liệu chuẩn độ, phát hiện điểm kết thúc của phản ứng và tính được nồng độ C_x .

3. HIỆU CHUẨN VÀ CHẤT CHUẨN

3.1 Hiệu chuẩn (calibration)

Đó là quá trình *thiết lập đáp ứng* của một hệ đo lường hoặc một thiết bị với một lượng xác định hoặc nồng độ của chất phân tích trong điều kiện cụ thể. Hiệu chuẩn cũng có thể là *so sánh* đại lượng đo được với giá trị đối chiếu.

Hiệu chuẩn (còn được gọi là chuẩn hoá- standardization) xác lập mối quan hệ giữa đáp ứng hóa lý đo được với chất phân tích: Khối lượng hoặc nồng độ của nó tạo ra đáp ứng trên. Điều quan trọng là đánh giá tác động của thành phần nền đến tín hiệu đáp ứng được biết dưới tên *hiệu ứng nền* (matrix effect).

Có một số cách để hiệu chuẩn hệ đo lường. Trong mục 1.2.1 ở trên đã mô tả cách hiệu chuẩn bằng phương pháp đường chuẩn (chuẩn ngoại) và phương pháp thêm chuẩn, thêm đường chuẩn.

Thiết bị và dụng cụ dùng trong phân tích cần được hiệu chuẩn với giá trị đối chiếu, đảm bảo số liệu đo lường chính xác và tin cậy. Ví dụ:

- Hiệu chuẩn cân với quả cân chuẩn.
- Hiệu chuẩn dụng cụ thủy tinh đo thể tích bằng cách cân thể tích nước tinh khiết.
- Hiệu chuẩn bước sóng và độ hấp thụ của máy quang phổ với chuẩn quy định (kính chuẩn, dung dịch $K_2Cr_2O_7$ chuẩn,...).

3.2. Chuẩn hóa học (Chemical standard)

Đây là các đơn chất hoặc hợp chất tinh khiết, ổn định được dùng phổ biến trong chuẩn độ thể tích. Ví dụ:

- Chuẩn độ acid- base: Na_2CO_3 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$,.....
- Chuẩn độ oxy hóa khử: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KIO_3 , $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$,.....
- Chuẩn độ kết tủa: AgNO_3 , NaCl ,.....

Trong giáo trình hóa phân tích I đã giới thiệu yêu cầu của *chuẩn hóa học* và một số chuẩn thường dùng.

3.3. Chất đối chiếu (Reference material)

Các chất đối chiếu thường được dùng để chứng minh độ đúng, độ tin cậy của của kết quả phân tích. *Chất đối chiếu có chứng chỉ* (certified reference material - CRM) hoặc *chất đối chiếu chuẩn* (standard reference material SRM) là chất đối chiếu được cung cấp bởi các tổ chức đo lường quốc tế, ví dụ như NIST, BAS (Bureau of Analytical Standards). Giá trị của một hoặc một số tính chất của nó đã được công nhận:

- Các chất tinh khiết hoặc dung dịch để hiệu chuẩn, định tính.
- Các chất có thành phần nền đã biết và các chất phục vụ cho hiệu chuẩn (mẫu chuẩn: Standard sample).

Ví dụ: Mẫu chuẩn xác định Hg (II) trong trầm tích.

Các chất đối chiếu thường được dùng để:

- Thẩm định một phương pháp mới.
- Chuẩn hóa các chất đối chiếu khác.
- Khẳng định giá trị pháp lý của một phương pháp đã chuẩn hóa.

4. MỘT SỐ ĐẶC TRƯNG CỦA PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

Có 6 đặc trưng định lượng cho một phương pháp phân tích giúp các nhà hóa học lựa chọn để giải quyết một vấn đề cụ thể. Sáu đặc trưng đó là:

- Độ chính xác (Precision)
- Độ chệch (Bias)
- Độ chọn lọc (Selectivity)
- Độ nhạy (Sensitivity)
- Giới hạn phát hiện (Limit of detection: LOD)
- Khoảng nồng độ phân tích (Concentration range)

Một số đặc trưng đã được giới thiệu ở *hóa phân tích I*. Với phân tích dụng cụ cần lưu ý đến 3 đặc trưng: độ nhạy, giới hạn phát hiện và khoảng nồng độ tuyến tính.

4.1. Độ nhạy

Đa số các nhà hóa học thống nhất độ nhạy của một thiết bị hay của một phép đo là khả năng phân biệt được một sự thay đổi nhỏ của nồng độ chất phân tích. Hai yếu tố xác định độ nhạy:

- Hệ số góc của đường chuẩn.
- Độ lặp lại của phép đo.

Nếu hai phương pháp có độ lặp lại như nhau thì phương pháp nào có hệ số góc lớn hơn sẽ nhạy hơn.

- Theo Hiệp hội các nhà hóa học lý thuyết và ứng dụng (IUPAC) *độ nhạy đường chuẩn* thể hiện bằng hệ số góc của đường chuẩn tuyến tính giữa tín hiệu đo S và nồng độ C của chất phân tích.

$$S = m C + S_0 \quad (1.3)$$

S_0 là tín hiệu của mẫu trắng. Độ nhạy đường chuẩn m không phụ thuộc vào nồng độ ở trong khoảng tuyến tính.

- Nếu 2 phương pháp có cùng độ nhạy m thì phương pháp nào có độ chính xác cao hơn sẽ nhạy hơn. Vì vậy một số tác giả đưa độ lệch chuẩn (SD) vào độ nhạy. Đó là *độ nhạy phân tích* γ :

$$\gamma = m/SD \quad (1.4)$$

SD là giá trị độ lệch chuẩn của phép đo tín hiệu S . Độ nhạy phân tích γ có đặc điểm:

- Không có thứ nguyên, tức là không phụ thuộc vào đơn vị đo của S .
- Ít thay đổi với hệ số khuếch đại của thiết bị đo.
- Phụ thuộc vào nồng độ vì trị số SD thường thay đổi theo nồng độ chất phân tích.

4.2. Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện là nồng độ hoặc khối lượng nhỏ nhất có thể được phát hiện với mức tin cậy xác định. Giới hạn này phụ thuộc vào tỷ số giữa tín hiệu phân tích và mức độ thăng giáng tín hiệu của mẫu trắng.

Tín hiệu phân tích S_m sẽ lớn hơn trị số trung bình tín hiệu mẫu trắng $\overline{S_0}$ một số lần độ lệch chuẩn của mẫu trắng SD_0 .

$$S_m = \overline{S_0} + k SD_0 \quad (1.5)$$

Để xác định S_m , người ta làm thực nghiệm đo 20 - 30 lần mẫu trắng, tính toán thống kê $\overline{S_0}$ và SD_0 . Nhiều tác giả chấp nhận lấy trị số $k = 3$ trong phương trình (1.5) để có giá trị S_m . Cuối cùng lấy trị số S_m từ phương trình (1.5) thay vào phương trình (1.3) và sắp xếp lại:

$$C_m = \frac{S_m - \overline{S_o}}{m}$$

(1.6)

C_m là trị số giới hạn phát hiện.

4.3. Khoảng nồng độ tuyến tính

Để định lượng một chất thường chọn khoảng nồng độ có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tín hiệu đo S và nồng độ chất phân tích C . Khoảng này bắt đầu ở nồng độ thấp nhất có thể định lượng được (được gọi là *giới hạn định lượng*) đến nồng độ cao nhất lệch khỏi đường tuyến tính.

Giới hạn định lượng (limit of quantitation - LOQ) thường được lấy bằng mười lần độ lệch chuẩn (10 SD_0) khi nồng độ chất phân tích bằng không. Nếu đã có dữ liệu LOD, nhiều tác giả chấp nhận $\text{LOQ} = 3\text{ LOD}$. Trong thực tế giá trị LOQ còn phụ thuộc vào yêu cầu độ tin cậy của phương pháp định lượng.

5. KỸ THUẬT PHÂN TÍCH - PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

5.1. Kỹ thuật phân tích (analytical technique)

Nhiều quá trình hóa học và hóa lý cung cấp thông tin giúp ta tìm hiểu thành phần định tính, định lượng và cấu trúc của chất phân tích. Các quá trình hóa học và hóa lý làm cơ sở cho phép phân tích được gọi là *kỹ thuật phân tích*. Phân loại phân tích dụng cụ thành 4 nhóm ở trên là phân loại theo kỹ thuật phân tích. Bảng 1.1 thống kê một số kỹ thuật đo kèm theo nguyên tắc của chúng.

Bảng 1. Một số kỹ thuật phân tích.

Kỹ thuật	Nguyên tắc đo lường
Phân tích khối lượng	Đo khối lượng của chất phân tích.
Chuẩn độ	Thể tích dung dịch chuẩn phản ứng với chất phân tích.
Quang phổ phân tử và nguyên tử	Bước sóng và cường độ bức xạ hấp thụ hoặc phát xạ của chất phân tích.
Khối phổ	Tỷ lệ khối lượng và điện tích các phân mảnh của phân tử chất phân tích.
Phân tích nhiệt	Thay đổi tính chất lý hóa của chất phân tích khi làm lạnh hay đun nóng.
Phân tích điện hóa	Hình thành điện của chất phân tích trong dung dịch.
Phân tích phóng xạ	Bức xạ hạt nhân của chất phân tích.

5.2. Phương pháp phân tích (analytical method)

Phương pháp phân tích là một bản chi tiết các lệnh cần thực hiện khi phân tích định tính, định lượng hoặc xác định cấu trúc một mẫu bằng một kỹ thuật thích hợp. Trong bản này có thống kê:

- Thuốc thử, hóa chất, nguồn gốc xuất xứ và chất lượng của chúng.
- Thiết bị đo lường, dụng cụ thí nghiệm.
- Cách chuẩn hóa thuốc thử, thiết bị.
- Cách xử lý mẫu phân tích.
- Các bước phân tích định tính, định lượng, xác định cấu trúc.
- Cách thu thập và xử lý số liệu.

Các cơ quan quản lý nhà nước, các tổ chức tiêu chuẩn hóa thường có qui định các *phương pháp phân tích chuẩn* (standard analytical methods) cho từng đối tượng cụ thể. *Dược điển Việt Nam* là tập hợp các phương pháp phân tích chuẩn để đánh giá chất lượng nguyên liệu và chế phẩm thuốc của nước ta.

Kỹ thuật phân tích và phương pháp phân tích rõ ràng là hai thuật ngữ có nội dung khoa học riêng. Tuy nhiên trong tiếng Việt chưa có sự phân biệt này. Người ta dùng phổ biến thuật ngữ “phương pháp” thay cho “kỹ thuật”. Vì vậy, trong giáo trình này không có ý định phân biệt rạch ròi hai thuật ngữ này.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 1.1. Giải thích tại sao phân tích hóa học là phương pháp tuyệt đối, còn phân tích dụng cụ là phương pháp tương đối?
- 1.2. Theo anh (chị) kết quả thu được khi dùng đường chuẩn (số liệu đo từ nhiều dung dịch) và khi dùng một dung dịch chuẩn thì kết quả nào đáng tin cậy hơn?
- 1.3. So sánh cách định lượng theo lập đường chuẩn (ngoại chuẩn) và thêm đường chuẩn.
- 1.4. Lập công thức tính nồng độ C_x của dung dịch phân tích khi dùng cách thêm chuẩn.
- 1.5. Ưu điểm của phương pháp chuẩn độ so với phương pháp đường chuẩn.
- 1.6. Giải thích mục tiêu và nội dung của hiệu chuẩn.
- 1.7. Tại sao trong phân tích dụng cụ cần dùng chất đối chiếu, còn trong phân tích hóa học lại không?
- 1.8. Phân biệt độ nhạy đường chuẩn và độ nhạy phân tích, độ nhạy và giới hạn phát hiện.
- 1.9. Tại sao trong phân tích dụng cụ thường chọn khoảng nồng độ có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tín hiệu đo S và nồng độ C.
- 1.10. Cho ví dụ về định lượng theo phương pháp chuẩn độ. So sánh với cách định lượng bằng xây dựng đường chuẩn.

- 1.11. Có xảy ra trường hợp khi phân tích hóa học lại cần dùng chất đối chiếu không? Giải thích và cho ví dụ nếu có.
- 1.12. Hãy phân biệt phương pháp phân tích và kỹ thuật phân tích.
- 1.13. Tại sao cần ban hành phương pháp phân tích chuẩn? Khi đã có phương pháp chuẩn có cần xây dựng thêm phương pháp phân tích mới không? Giải thích.
- 1.14. Dữ liệu thực nghiệm định lượng chất X trong dung dịch nước bằng một phương pháp phân tích dụng cụ được thể hiện ở bảng sau:

Nồng độ C_x (ppm)	Số lần lặp lại	Trị số trung bình tín hiệu (S)	Sai lệch chuẩn SD
0,00	25	0,031	0,0079
2,00	5	0,173	0,0094
6,00	5	0,442	0,0084
10,00	5	0,702	0,0084
14,00	5	0,956	0,0085
18,00	5	1,248	0,0110

Hãy tính:

- Độ nhạy đường chuẩn.
- Độ nhạy phân tích ở mỗi nồng độ.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp.
- Tính hệ số biến sai CV (%) theo trung bình mỗi nồng độ.



ĐẠI CƯƠNG VỀ PHÂN TÍCH QUANG HỌC

MỤC TIÊU

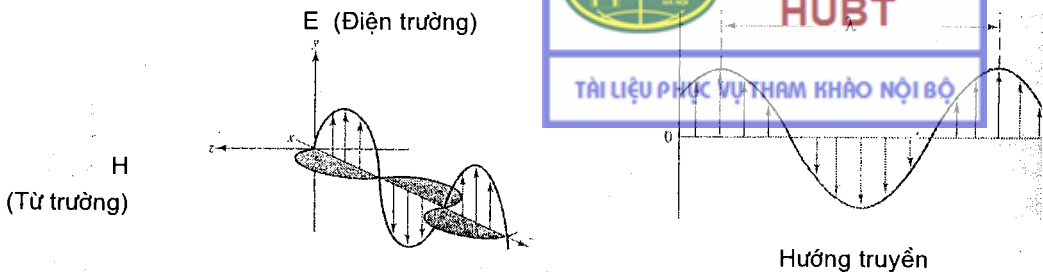
1. Trình bày được bản chất, các đại lượng đặc trưng của bức xạ điện từ và vị trí của các vùng trên phổ bức xạ điện từ.
2. Giải thích được hiện tượng hấp thụ ánh sáng và quan hệ giữa bước sóng và năng lượng của bức xạ điện từ.
3. Trình bày được những đặc điểm khác nhau giữa hấp thụ phân tử và hấp thụ nguyên tử cùng các ứng dụng chính của chúng trong phân tích.
4. Trình bày được các ứng dụng và trở ngại của hiện tượng tán sắc, tán xạ, phân cực ánh sáng, cộng hưởng từ hạt nhân trong phân tích.

1. BẢN CHẤT VÀ CÁC ĐẠI LƯỢNG ĐẶC TRƯNG CỦA BỨC XẠ ĐIỆN TỪ

Bức xạ điện từ gồm nhiều loại khác nhau như: sóng radio, tia hồng ngoại, ánh sáng nhìn thấy, tia tử ngoại, tia X, tia γ Về bản chất chúng vừa có tính chất sóng vừa có tính chất hạt.

1.1. Tính chất sóng của bức xạ điện từ

Các bức xạ điện từ là những dao động lan truyền theo một phương với vận tốc của ánh sáng trong chân không ($\approx 3.10^8$ m/s) với hai thành phần điện trường và từ trường. Hai thành phần này dao động vuông góc với phương truyền của bức xạ trong hai mặt phẳng vuông góc với nhau (hình 2.1). Chính thành phần điện trường của bức xạ điện từ tương tác với các nguyên tử hoặc phân tử gây nên hiệu ứng phổ hấp thụ nguyên tử hay phân tử cũng như một số các hiệu ứng khác đối với nguyên tử và phân tử. Các đặc trưng cho dao động của bức xạ là bước sóng và tần số sóng.



Hình 2.1. Hình ảnh sóng điện từ

Bước sóng (λ) là đại lượng đặc trưng cho các bức xạ điện từ. Bước sóng được đo theo các đơn vị độ dài là mét và các ước số hay bội số của mét. Một số đơn vị đo thường được dùng là nanomet (nm) với $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$ và micromet (μm) với $1\mu\text{m}=10^{-6}\text{m}$.

Tần số sóng (ν) là số dao động mà bức xạ điện từ thực hiện trong 1 giây. Như vậy tần số sóng có thể được tính theo công thức:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \tag{2.1}$$

với c là vận tốc ánh sáng.

Trong công thức trên vận tốc ánh sáng và bước sóng được dùng cùng đơn vị đo độ dài nên tần số có thứ nguyên là s^{-1} .

Đơn vị đo tần số là hertz (Hz) và các bội số thường dùng của nó là kilohertz (kHz) và megahertz (MHz) với $1\text{kHz} = 10^3\text{Hz}$ và $1\text{MHz} = 10^6\text{Hz}$.

Số sóng ($\bar{\nu}$): trong phân tích quang phổ hồng ngoại người ta còn dùng đại lượng số sóng là giá trị nghịch đảo của bước sóng:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \tag{2.2}$$

Trong đó bước sóng λ được đo bằng centimet nên thứ nguyên của số sóng là cm^{-1} .

Vì trong các môi trường khác nhau vận tốc lan truyền của bức xạ là khác nhau cho nên các giá trị bước sóng λ và số sóng $\bar{\nu}$ sẽ bị thay đổi khi bức xạ truyền từ môi trường này sang môi trường khác. Riêng đại lượng tần số sóng ν luôn không thay đổi.

Bảng 2.1. Một số miền bức xạ điện từ và tần số của chúng

Tên bức xạ điện từ	Miền	Tần số (Hz)	Các ứng dụng cụ thể trong phân tích
Sóng radio và vi sóng		$10^3 - 10^{12}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ cộng hưởng từ electron
Ánh sáng quang học	Hồng ngoại xa	$10^{12} - 10^{14}$	Phổ IR
	Hồng ngoại gần	$10^{14} - 4.10^{14}$	
	Khả kiến	$4.10^{14} - 7.10^{14}$	Phổ UV-VIS,
	Tử ngoại gần	$7.10^{14} - 15.10^{14}$	Phổ hấp thụ và phát xạ nguyên tử,
	Tử ngoại xa	$15.10^{14} - 10^{17}$	Phổ huỳnh quang
Tia Rơnghen		$10^{17} - 10^{26}$	Phương pháp tia X trực tiếp, hấp thụ tia X, huỳnh quang tia X, nhiễu xạ tia X...
Tia γ		trên 10^{26}	Phổ tia γ

Ánh sáng quang học là một phần trong phổ các bức xạ điện từ có tần số nằm trong khoảng $10^{12} - 10^{17}$ Hz. Ánh sáng quang học được chia làm 3 miền hồng ngoại, miền nhìn thấy và miền tử ngoại. Bảng 2.1 là một số vùng trên phổ bức xạ điện từ và ứng dụng của nó trong các phương pháp phân tích phổ khác nhau.

1.2. Tính chất hạt của các bức xạ điện từ

Theo quan điểm hạt, bức xạ điện từ là các hạt mang năng lượng được lan truyền với tốc độ ánh sáng. Các hạt mang năng lượng đó được gọi là các *photon*. Các bức xạ điện từ khác nhau có các năng lượng khác nhau.

Khi năng lượng của bức xạ điện từ phù hợp với chênh lệch năng lượng giữa các trạng thái năng lượng của phân tử hoặc nguyên tử sẽ gây ra các hiệu ứng thích hợp. Người ta đã phát hiện ra rằng muốn có hiệu ứng thì bước sóng của bức xạ điện từ phải thoả mãn phương trình:

$$\Delta E = \frac{h.c}{\lambda} = h.\nu \quad (2.3)$$

Trong đó: ΔE là hiệu của 2 trong các mức năng lượng

h là hằng số Planck ($6,63.10^{-34}$ J.s)

c là vận tốc ánh sáng (3.10^8 m/s)

λ là bước sóng của bức xạ điện từ (tính bằng mét)

Chính phương trình 2.3 này cũng đã thống nhất bản chất sóng và bản chất hạt của bức xạ điện từ. Các bức xạ điện từ có bước sóng khác nhau mang năng lượng khác nhau và bước sóng càng dài thì năng lượng của nó càng thấp.

2. SỰ HẤP THỤ VÀ TÁN SẮC ÁNH SÁNG

2.1. Sự hấp thụ ánh sáng

2.1.1. Định luật về sự hấp thụ ánh sáng và phổ hấp thụ của một chất

Giả sử có một môi trường đồng tính được giới hạn bởi hai mặt phẳng song song với bề dày l , một chùm sáng có cường độ I_0 rơi vuông góc lên mặt trước môi trường và gọi cường độ của ánh sáng phát ra mặt sau môi trường là I .

Bên trong môi trường, hãy tưởng tượng tách ra một lớp mỏng bề dày dx , gọi cường độ ánh sáng tại mặt trước của lớp mỏng là i và tại mặt sau của nó là $i+di$ với $di < 0$. Khi đó độ giảm cường độ di được xem là tỷ lệ với cường độ i tới lớp và bề dày của lớp dx :

$$di = -k.i.dx \quad (2.4)$$



hệ số k được gọi là hệ số hấp thụ của môi trường.

Bỏ qua phần năng lượng ánh sáng phản xạ và tán xạ, biến đổi và lấy tích phân 2 vế ta có:

$$\int_{I_0}^I \frac{di}{i} = - \int_0^l k dx$$

hay là: $I = I_0 e^{-kl}$ (2.5)

Đây là biểu thức của định luật hấp thụ ánh sáng: Khi độ dày của lớp môi trường tăng theo cấp số cộng, cường độ sáng giảm theo cấp số nhân.

Định luật này được gọi là định luật Lambert. Một số tài liệu khác cho rằng Bouguer là người đầu tiên thiết lập được nó bằng lý thuyết và thực nghiệm nên gọi là định luật Bouguer.

Khi đo hệ số k để kiểm nghiệm định luật người ta thấy có thể bỏ qua phần ánh sáng tán xạ nhưng nhất thiết phải tính đến phần ánh sáng phản xạ. Định luật nghiệm đúng với chùm sáng có cường độ biến thiên khá rộng nhưng khi cường độ ánh sáng lớn thì hệ số k hấp thụ sẽ giảm.

Hệ số k là độ giảm cường độ tỷ đối do sự hấp thụ của môi trường trên một đơn vị bề dày. Đối với các chất trong suốt khác nhau hệ số k có giá trị khác nhau và rất nhỏ. Phần lớn các chất gặp trong thực tế có hệ số k biến thiên theo bước sóng.

Đường cong biểu diễn khả năng hấp thụ của một chất theo bước sóng (tần số hay số sóng) được gọi là đường cong hấp thụ hay *phổ hấp thụ* của chất đó.

Thực nghiệm cho thấy phổ hấp thụ của các chất rắn và lỏng thường chứa những dải hấp thụ rộng với hệ số k có giá trị lớn trong một miền phổ rộng hàng chục đến hàng trăm nanomet. Chỉ có các khí loãng mới gồm những giải hấp thụ hẹp. Nhiệt độ và áp suất càng thấp thì giải hấp thụ càng hẹp.

2.1.2. Môi trường có hệ số hấp thụ âm

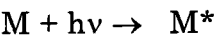
Thông thường hệ số hấp thụ k của các môi trường là dương và ánh sáng truyền qua môi trường bị làm yếu đi. Nhưng cũng có một số môi trường có hệ số hấp thụ k âm với một số bước sóng nào đó của bức xạ. Khi đó cường độ bức xạ tương ứng được tăng dần lên khi đi sâu vào môi trường này. Môi trường trở thành máy khuếch đại ánh sáng. Môi trường có hệ số hấp thụ âm là cơ sở để thực hiện máy phát laser.

Ví dụ hồng ngọc (tinh thể Al_2O_3 có một lượng nhỏ tạp Cr^{2+}) khi được chiếu sáng mạnh có khả năng khuếch đại bức xạ 694,4nm; hỗn hợp khí Heli và Neon với tỷ lệ $p_{He}/p_{Ne} = 15/10$ ở áp suất thấp (0,5mm Hg) khi được kích thích phóng điện có khả năng khuếch đại 3 bức xạ có bước sóng 3390nm, 1150nm và 632,8nm.

2.1.3. Sự giải tỏa năng lượng sau khi hấp thụ ánh sáng

Theo thuyết lượng tử, mỗi hạt sơ cấp (nguyên tử, ion, phân tử) có một hệ thống các trạng thái năng lượng. Ở nhiệt độ thường hầu hết các hạt sơ cấp đều

ở trạng thái có năng lượng thấp nhất- trạng thái cơ bản. Khi một photon ánh sáng đi gần hạt đó, sự hấp thụ có thể xảy ra và chỉ có thể xảy ra khi năng lượng photon đó mang đúng bằng chênh lệch năng lượng giữa trạng thái cơ bản và một trạng thái cao hơn của hạt đó. Khi đó năng lượng của photon truyền sang hạt sơ cấp này và nó sẽ được chuyển lên trạng thái năng lượng cao hơn - *trạng thái kích thích*.



Sau một thời gian rất ngắn (cỡ 10^{-9} - 10^{-6} giây) tiểu phân ở trạng thái kích thích phục hồi trở lại trạng thái cơ bản có mức năng lượng thấp hơn. Quá trình này có thể diễn ra dưới các hình thức khác nhau:

- Khi phục hồi năng lượng thừa được truyền cho các tiểu phân của môi trường xung quanh làm môi trường nóng lên một chút: $M^* \rightarrow M + \text{nhiệt}$.
- Sự phục hồi được thông qua sự phân huỷ quang hóa của M^* thành chất mới hoặc bằng phát huỳnh quang.
- Sự phục hồi có kèm theo phát xạ (huỳnh quang, lân quang), đây là sự phục hồi có bức xạ.

2.2. Màu sắc của ánh sáng và một số biện pháp tạo chùm tia đơn sắc

2.2.1. Màu sắc của ánh sáng

Như trên đã nêu ánh sáng quang học là một phần trong phổ các bức xạ điện từ và được chia làm 3 vùng (miền): hồng ngoại, khả kiến và tử ngoại.

Vùng tử ngoại (*ultraviolet*) là các bức xạ có bước sóng khoảng 2 - 400nm. Vùng hồng ngoại (*infrared*) là các bức xạ có bước sóng khoảng 760nm-1000μm. Các bức xạ ở hai vùng này khó có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Nằm giữa vùng tử ngoại và hồng ngoại là vùng nhìn thấy hay còn gọi là khả kiến. Các bức xạ trong vùng này có thể nhìn thấy được với các màu sắc khác nhau. Mỗi màu ứng với một chùm các tia có bước sóng gần nhau. Vùng khả kiến bao gồm 7 màu chính với các dải bước sóng như trong bảng 2.2 và tổ hợp của chúng tạo nên ánh sáng trắng.

Bảng 2.2. Màu của các dải bức xạ chính trong vùng ánh sáng trắng

Màu	Bước sóng (nm)	Màu	Bước sóng (nm)
Đỏ	760 - 630	Lam	500 - 450
Cam	630 - 600	Chàm	450 - 430
Vàng	600 - 570	Tím	430 - 400
Lục	570 - 500		

Ánh sáng trắng là hỗn hợp của vô số ánh sáng đơn sắc. Mỗi ánh sáng đơn sắc là chỉ gồm các bức xạ có cùng bước sóng xác định.

Các nguồn bức xạ điện từ thường chứa nhiều tia với bước sóng khác nhau do vậy muốn có tia đơn sắc cần thiết phải sử dụng các bộ phận đơn sắc hoá. Có nhiều thiết bị đảm nhiệm chức năng này với các cơ chế khác nhau như: cách tử, lăng kính, kính lọc màu....

2.2.2. Màu phụ nhau và kính lọc màu

Người ta thấy rằng một vật có màu lam hấp thụ mạnh các tia màu vàng và ngược lại vật có màu vàng hấp thụ mạnh các tia màu lam. Khi một cặp màu có tính chất như 2 màu vàng và lam trên thì chúng hình thành một cặp màu phụ nhau hay cặp màu bổ sung nhau. Một số cặp màu phụ nhau là:

Lục vàng - Tím

Vàng - Lam

Da cam - Lam lục

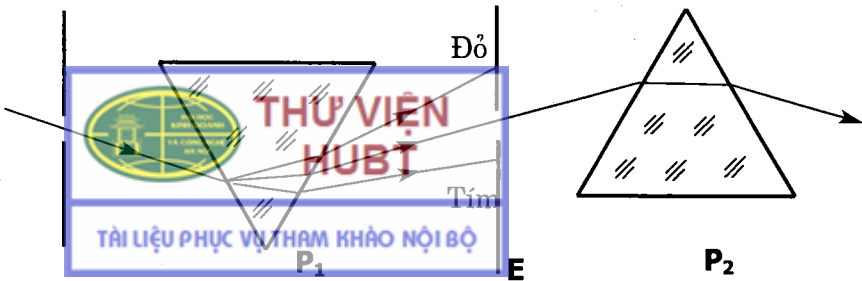
Đỏ - Lục lam

Đỏ tía - Lục

Dựa trên nguyên tắc này trong các thiết bị đo quang đơn giản để tạo ra các nguồn bức xạ có độ đơn sắc tương đối người ta dùng kính lọc màu với kính lọc có màu phụ với màu của dung dịch cần đo. Để có thể đo được nhiều dung dịch có màu khác nhau các thiết bị này được trang bị một bộ kính lọc với mỗi kính lọc cho phép làm việc ở một khoảng bước sóng khoảng vài chục nanomet.

2.2.3. Hiện tượng tán sắc và tạo tia đơn sắc bằng lăng kính

Hiện tượng tán sắc đã được biết từ lâu nhưng Newton là người đầu tiên nghiên cứu hiện tượng một cách đầy đủ và nêu được ý kiến xác đáng. Newton đã bố trí thí nghiệm như hình 2.2. Kết quả là sau khi chùm ánh sáng trắng sau khi đi qua lăng kính P_1 bị phân tích thành các nhiều chùm tia có màu sắc khác nhau, hình thành trên màn chắn E một vệt sáng dài có màu sắc sắp xếp theo thứ tự: đỏ, da cam, lục, lam, chàm, tím. Nếu trên màn chắn E có đục một lỗ đủ hẹp thì tia đi qua lỗ nhỏ này sẽ không bị tán sắc qua lăng kính P_2 .

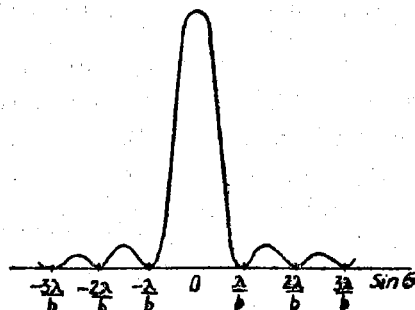


Hình 2.2.Thí nghiệm tán sắc ánh sáng của Newton

Dựa trên hiện tượng này người ta sử dụng các lăng kính với các chất liệu thích hợp để tạo ra các chùm tia đơn sắc trong các máy quang phổ.

2.2.4. Nhiễu xạ qua khe hẹp và tạo tia đơn sắc bằng cách tử

Hiện tượng nhiễu xạ xảy ra khi cho ánh sáng đi qua một lỗ nhỏ. Nếu thay lỗ nhỏ bằng khe hẹp dài vô hạn thì ảnh nhiễu xạ của nguồn là một hệ vân sáng tối xen kẽ. Người ta đã chứng minh được rằng có đến 90% cường độ sáng toàn phần tập trung ở cực đại trung tâm (hình 2.3).



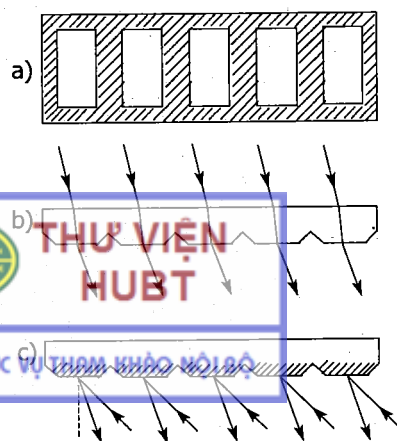
Hình 2.3. Phân bố cường độ sáng sau khe hẹp

Một màn chắn mang N khe hẹp dài vô hạn có cùng độ rộng b, đặt song song và cách đều nhau những khoảng c.

Một hệ thống như vậy được gọi là cách tử, khoảng cách c+b được gọi là khoảng lặp hay hằng số cách tử. Nếu chiếu lên cách tử một chùm sáng tập sắc thì cực đại chính đối với bức xạ có bước sóng khác nhau được quan sát với những góc khác nhau hoặc hội tụ tại các điểm khác nhau trên mặt tiêu của thấu kính hội tụ. Nói cách khác cách tử có khả năng phân tích một chùm sáng tập sắc thành quang phổ, gọi là quang phổ cách tử.

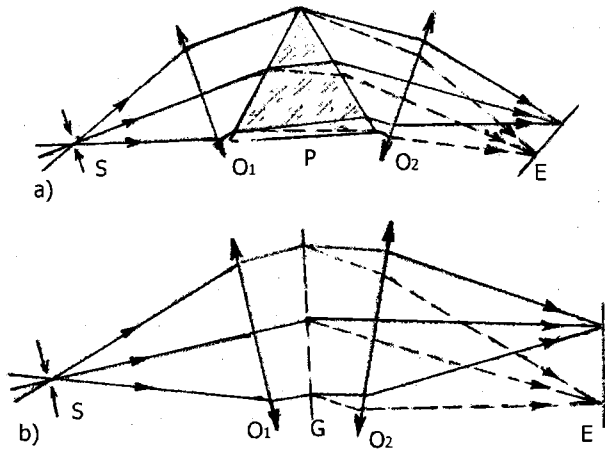
Cách tử trên thực tế thường có số khe rất lớn. Tùy theo vùng quang phổ phải khảo sát mà số khe trên 1 milimet theo bề ngang có thể từ vài chục đến vài trăm cho miền hồng ngoại, khoảng 500 cho miền khả kiến và khoảng 1200-1800 cho miền tử ngoại.

Trước đây người ta chế tạo cách tử bằng dùng mũi kim cương nhọn vạch trên một tấm thủy tinh phẳng. Chỗ bị rạch có tác dụng như những chắn sáng, chỗ còn lại tác dụng như những khe sáng (hình 2.4.a). Cách tử thu được bằng cách đó là cách tử truyền qua với bề mặt cắt ngang như hình 2.4.b. Cách tử kiểu này ngày nay ít dùng vì khó chế tạo, độ rộng các khe không đều và một phần ánh sáng bị mất do phản xạ. Thay vào đó người ta dùng cách tử phản xạ bằng cách rạch lên các bề mặt phản xạ tạo ra các phần chắn sáng, phần còn lại phản xạ ánh sáng có tác dụng như các "khe" (hình 2.4.c). Các bề mặt phản xạ thường là bạc hoặc nhôm khá mềm nên tăng độ đều đặn của các khe khiến cho sự phân bố các cực đại chính càng sát với biểu thức lý thuyết.



Hình 2.4. Cách tử truyền qua và cách tử phản xạ

Sơ đồ nguyên lý tán sắc của máy quang phổ sử dụng lăng kính được trình bày trên hình 2.5.a và sử dụng cách tử được trình bày trên hình 2.5.b.



Hình 2.5. Sơ đồ tán sắc trong máy quang phổ lăng kính (a) và máy quang phổ cách tử (b).

2.3. Sự hấp thụ nguyên tử

2.3.1. Điều kiện để có sự hấp thụ nguyên tử

Nguyên tử là phần tử nhỏ nhất giữ được tính chất của nguyên tố. Nguyên tử bao gồm hạt nhân và các electron chuyển động quanh không gian của hạt nhân trong các orbital. Trong điều kiện bình thường nguyên tử không thu hay phát ra năng lượng dưới dạng các bức xạ. Đó là trạng thái bền vững và nghèo năng lượng nhất của nguyên tử. Nhưng khi nguyên tử ở trạng thái hơi nguyên tử tự do, nếu có chùm tia sáng chiếu vào đám hơi nguyên tử đó thì các nguyên tử tự do sẽ hấp thụ các bức xạ có bước sóng nhất định ứng với những tia bức xạ mà nó có thể phát ra được trong quá trình phát xạ. Lúc đó nguyên tử đã nhận năng lượng từ các tia bức xạ và chuyển lên trạng thái kích thích có năng lượng cao hơn trạng thái cơ bản. Đó là tính chất đặc trưng của nguyên tử ở trạng thái hơi. Quá trình đó được gọi là quá trình hấp thụ năng lượng của nguyên tử. Phổ sinh ra trong quá trình này được gọi là phổ hấp thụ nguyên tử.

Khi nguyên tử hấp thụ năng lượng sẽ làm thay đổi mức năng lượng của electron trong nguyên tử nên phổ nguyên tử cũng là phổ electron. Electron trong nguyên tử tham gia hấp thụ hay phát xạ là các electron lớp ngoài cùng vì nó dễ bị kích thích nhất.

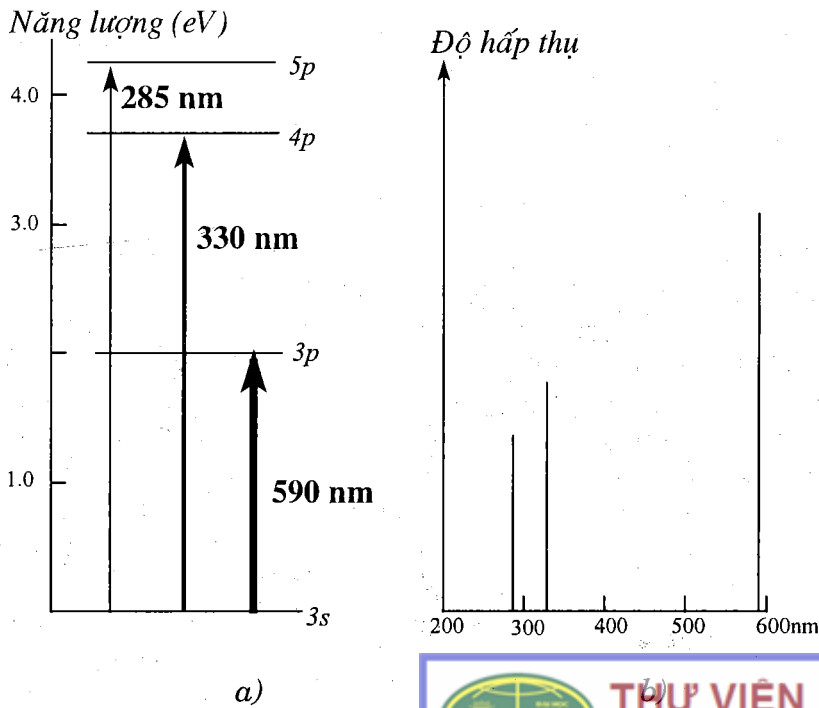
Nếu năng lượng mà nguyên tử hấp thụ là ΔE thì theo công thức 2.3 ta có:

$$\Delta E = \frac{h.c}{\lambda}$$

Như vậy cứ mỗi giá trị năng lượng ΔE_i mà nguyên tử nhận được sẽ ứng với một độ dài sóng λ_i . Số mức năng lượng của nguyên tử ứng với số orbital là hữu hạn. Các giá trị ΔE_i mà nguyên tử có thể hấp thụ khá chênh lệch nên các bước sóng tương ứng của bức xạ điện từ là không liên tục. Do đó phổ hấp thụ nguyên tử là các vạch hấp thụ tại các bước sóng tương ứng.

Nhưng nguyên tử không hấp thụ tất cả các bức xạ mà nó có thể phát ra trong quá trình phát xạ. Quá trình hấp thụ chỉ xảy ra với các vạch phổ nhảy, các vạch đặc trưng và các vạch cuối cùng của nguyên tố. Cho nên đối với các vạch phổ đó quá trình hấp thụ và phát xạ là hai quá trình ngược nhau.

Giản đồ năng lượng (hình 2.6.a) và phổ hấp thụ của hơi natri (hình 2.6.b) trên cho thấy sự chuyển mức năng lượng từ trạng thái cơ bản 3s lên các trạng thái kích thích 3p, 4p, 5p do hấp thụ năng lượng từ các bức xạ tương ứng 590, 330 và 285 nm. Vạch 590nm là vạch có cường độ lớn nhất được gọi là vạch cộng hưởng ứng với sự chuyển mức năng lượng lên trạng thái kích thích gần nhất.



Hình 2.6. Giản đồ năng lượng và phổ hấp thụ của hơi natri

2.3.2. Một số ứng dụng của sự hấp thụ nguyên tử trong phân tích:

Tùy thuộc giá trị ΔE là dương hay âm mà quá trình phát xạ hay hấp thụ xảy ra. Quá trình huỳnh quang xảy ra khi nguyên tử ở trạng thái kích thích bị mất một phần năng lượng trước khi trở về trạng thái cơ bản kèm theo sự phát xạ ra các bức xạ có năng lượng thấp hơn của bức xạ mà nó nhận được để chuyển lên trạng thái kích thích (ánh sáng kích thích). Do vậy điều kiện cụ

thể của nguồn năng lượng dùng để nguyên tử hóa mẫu sẽ quyết định quá trình nào xảy ra là chính.

Các ứng dụng của phổ hấp thụ nguyên tử có thể được phân loại theo nguồn năng lượng được nguyên tử hấp thụ (bức xạ, nhiệt, tia lửa điện, plasma....) và quá trình hấp thụ, phát xạ hay huỳnh quang. Trong phân tích thường áp dụng các loại phương pháp sau:

- Quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS),
- Quang phổ phát xạ nguyên tử (AES),
- Quang phổ phát xạ nguyên tử với nguồn plasma (ICP)
- Quang phổ huỳnh quang nguyên tử.

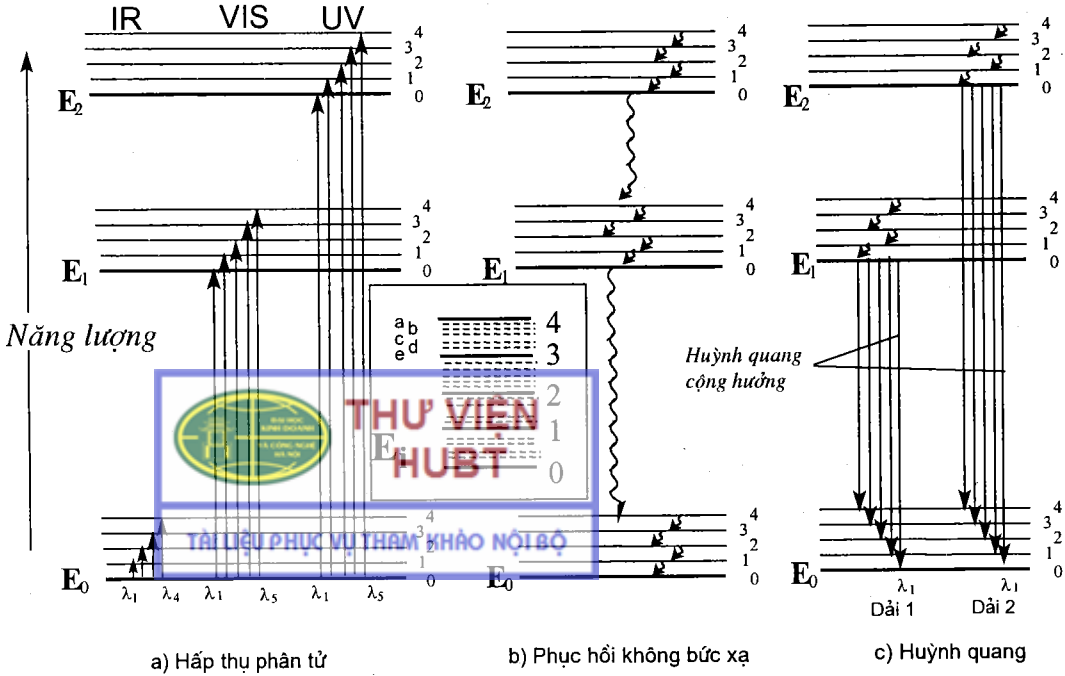
2.4. Sự hấp thụ phân tử

2.4.1. Sự hình thành các mức năng lượng khác nhau trong phân tử

Năng lượng tổng của một phân tử bao gồm nhiều năng lượng thành phần: năng lượng chuyển động tịnh tiến của phân tử (E_t), năng lượng của electron (E_e), năng lượng của các dao động (E_v) và năng lượng chuyển động quay (E_r):

$$E_{\text{tổng}} = E_t + E_e + E_v + E_r \tag{2.4}$$

trong đó năng lượng E_e lớn hơn rất nhiều so với E_v và E_v lớn hơn rất nhiều so với E_r : $E_e \gg E_v \gg E_r$



Hình 2.7. Giải đồ năng lượng và các cách giải toả năng lượng của phân tử được kích thích

Hình 2.7 cho thấy với trạng thái năng lượng electron cơ bản E_0 và các trạng thái năng lượng electron kích thích E_1, E_2 thì mỗi trạng thái có các mức năng lượng dao động khác nhau (được đánh số là 0, 1,...,4...) và ứng với mỗi mức năng lượng dao động đó còn có thể có các mức năng lượng quay (là các đường đứt nét a, b, c, d, e... trong khung nhỏ của hình này).

Hình 2.7 cũng cho thấy có nhiều bức xạ có bước sóng khác nhau nhưng rất gần nhau được hấp thụ ứng với các sự chuyển mức năng lượng khác nhau. Trên thực tế số mức năng lượng dao động còn lớn hơn nhiều, nghĩa là có thể có nhiều vạch phổ đứng liên tiếp cạnh nhau tạo nên các *dải hấp thụ* hay *đỉnh hấp thụ* trong phổ hấp thụ phân tử.

2.4.2. Một số ứng dụng của sự hấp thụ phân tử trong phân tích

Ứng với sự hấp thụ các bức xạ tử ngoại (UV) có năng lượng lớn có thể dẫn đến sự chuyển từ mức năng lượng E_0 lên mức năng lượng E_2 , sự hấp thụ bức xạ khả kiến (VIS) ứng với sự chuyển lên mức năng lượng E_1 . Nói cách khác sự hấp thụ bức xạ tử ngoại - khả kiến làm thay đổi mức năng lượng electron E_e và là nguồn gốc của phổ UV-VIS. Do đó phổ UV-VIS là phổ electron.

Còn sự hấp thụ năng lượng của tia hồng ngoại (IR) chỉ dẫn đến thay đổi các mức năng lượng dao động và chuyển động quay (E_v và E_r). Vì vậy phổ IR thường được gọi là phổ dao động.

Huỳnh quang phân tử là sự phát ra bức xạ của các phân tử đã được kích thích bằng bức xạ điện từ thích hợp trong quá trình phục hồi. Cũng như hiện tượng huỳnh quang nguyên tử, phân tử ở trạng thái kích thích bị mất một phần năng lượng trước khi trở về trạng thái cơ bản (hình 2.7.c). Do đó bức xạ phát ra trong huỳnh quang phân tử cũng có năng lượng thấp hơn năng lượng của bức xạ kích thích nó, nghĩa là huỳnh quang có bước sóng dài hơn bước sóng của bức xạ kích thích.

Những ứng dụng phổ biến của phổ phân tử trong phân tích có thể là:

- Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)
- Quang phổ hồng ngoại (IR)
- Quang phổ huỳnh quang...

3. ỨNG DỤNG VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ HIỆN TƯỢNG QUANG HỌC KHÁC VỚI PHÂN TÍCH

Ngoài hiện tượng phản xạ và khúc xạ của ánh sáng đã được trình bày trong các chương trình vật lý đại cương ở các cấp học, hiện tượng hấp thụ và tán sắc ánh sáng vừa nêu trên còn nhiều hiện tượng khác của quang học có liên quan đến phân tích. Sau đây là một số hiện tượng của quang học có ứng dụng và ảnh hưởng trong phân tích như: sự tán xạ ánh sáng, giao thoa ánh sáng, nhiễu xạ, phân cực, cộng hưởng từ hạt nhân hay electron....

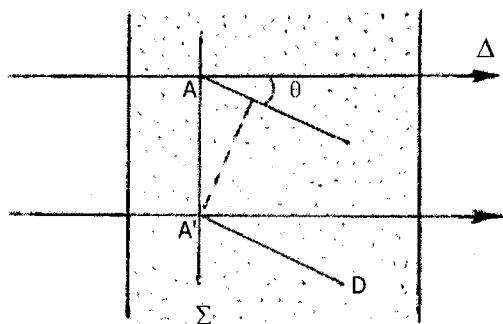


3.1. Sự tán xạ ánh sáng

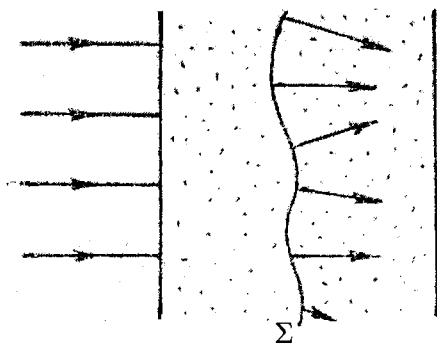
3.1.1. Điều kiện của sự truyền thẳng và của sự tán xạ ánh sáng:

Giả sử một chùm tia sáng song song truyền theo phương Δ qua một môi trường trong suốt, đồng tính và đẳng hướng. Môi trường đồng tính quang học có nghĩa là chiết suất và vận tốc truyền sáng phải như nhau tại mọi điểm. Khi một sóng phẳng truyền vào môi trường đồng tính, mặt sóng tịnh tiến song song với chính nó nên mãi mãi là phẳng, giả sử Σ trên hình 2.8 là một mặt sóng như vậy.

Các sóng thứ cấp sinh ra tại Σ là đồng pha, có cùng tần số và biên độ được phát đi về mọi phía. Theo phương D, hai sóng xuất phát từ A và A' có hiệu quang trình là $\delta = AA'.n. \sin \theta$.



Hình 2.8. Ánh sáng truyền thẳng trong môi trường đồng tính



Hình 2.9. Sự tán xạ ánh sáng trong môi trường không đồng tính

Khi D khác Δ , $\sin \theta$ khác 0, trên Σ có thể chọn được 2 điểm A và A' sao cho $\delta = \lambda/2$ để cho hai sóng phát đi từ A và A' triệt tiêu lẫn nhau vì giao thoa. Có thể ghép các tâm phát sóng thứ cấp trên thành các cặp tương tự. Kết quả là theo phương D không có ánh sáng tán xạ.

Khi D trùng Δ , $\sin \theta = 0$, sóng thứ cấp phát đi từ mọi điểm trên Σ tăng cường lẫn nhau và ánh sáng truyền theo phương Δ có cường độ cực đại (bằng cường độ ánh sáng tới nếu môi trường không hấp thụ)

Như vậy môi trường trong suốt, hoàn toàn đồng tính không tán xạ ánh sáng. Điều đó hoàn toàn phù hợp nguyên lý truyền thẳng của ánh sáng.

Nhưng nếu môi trường có những chỗ không đồng tính, kích thước tương đương với bước sóng ánh sáng thì mặt sóng ánh sáng trong môi trường không còn phẳng nữa (hình 2.9). Sóng thứ cấp phát ra từ mỗi phần nhỏ phẳng của mặt sóng tăng cường lẫn nhau vì giao thoa theo chính phương pháp tuyến của phần mặt sóng đó khiến cho ánh sáng không chỉ truyền theo phương ban đầu.

3.1.2. Các nguyên nhân gây tán xạ

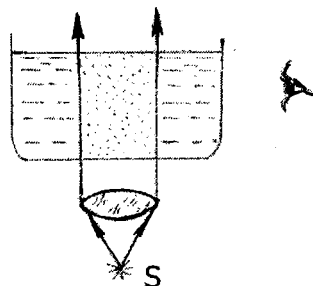
Môi trường tán xạ là môi trường không đồng tính quang học. Môi trường đồng tính về quang học có thể không đồng tính về cơ học. Ví dụ một mẫu thủy tinh trong hỗn hợp hai chất lỏng gồm benzen và carbon tetraclohid có thể tạo thành một môi trường đồng tính quang học nếu như chọn được tỷ lệ hai chất lỏng để tạo ra chiết suất bằng chiết suất của mẫu thủy tinh. Khi đó môi trường không tán xạ và không nhìn thấy các hạt thủy tinh trong chất lỏng. Tính chất đó được ứng dụng để xác định nhanh chóng chiết suất của các hạt trong suốt, nhỏ và có hình thù phức tạp.

Sự không đồng tính quang học của môi trường có nhiều nguyên nhân khác nhau và dưới đây là một số trường hợp gây tán xạ ánh sáng.

1) Tán xạ do môi trường vẩn (Tán xạ Tyndal):

Môi trường vẩn là môi trường trong suốt chứa những hạt nhỏ lơ lửng như khói và sương mù chẳng hạn. Khói là không khí có lẫn những hạt than hay bụi nhỏ, còn sương mù là không khí mang những hạt nước nhỏ. Có thể nhìn thấy khói hay sương mù vì môi trường tán xạ mạnh ánh sáng.

Tán xạ trong môi trường vẩn có thể được minh họa rõ hơn trong thí nghiệm sau: Chiếu chùm tia sáng song song qua một chậu thủy tinh đựng nước cất. Nếu nhìn vuông góc với chùm sáng hầu như không nhận thấy chùm sáng. Nhỏ một vài giọt nước hoa vào chậu, nước bị vẩn đục và khi đó đường truyền của chùm sáng được thấy rất rõ (hình 2.10). Điều đó chứng tỏ nước vẩn đục đã tán xạ ánh sáng.



Hình 2.10. Quan sát tán xạ Tyndal

Hiện tượng này được Tyndal nghiên cứu bằng thực nghiệm, Reyleigh nghiên cứu bằng lý thuyết và đã thiết lập được một số định luật. Hiện tượng Tyndal luôn có mặt trong các dung dịch keo hay trong các dung dịch có chứa các tiểu phân rắn như các dung dịch mẫu đo được chuẩn bị từ các chế phẩm viên gây sai số cho phép đo quang. Để hạn chế ảnh hưởng của hiện tượng này phải tiến hành loại bỏ môi trường vẩn của các mẫu trước khi đo quang bằng lọc hay ly tâm để loại bỏ các tiểu phân rắn hay tiến hành phá nhũ tương... Ngược lại có thể ứng dụng hiện tượng này trong phép đo độ đục.

2) Các nguyên nhân gây tán xạ khác:

Ngoài tán xạ do các hạt lơ lửng trong dung dịch, còn có nhiều nguyên nhân khác gây tán xạ như:

- Tán xạ phân tử,
- Tán xạ Mandelstam - Brillouin,

– Tán xạ tổ hợp.

Các nguyên nhân này được trình bày chi tiết trong giáo trình vật lý quang học.

3.2. Hiện tượng giao thoa ánh sáng

Hiện tượng khi hai sóng cùng tần số và có hiệu pha ban đầu không đổi phối hợp với nhau tạo ra những miền sóng luôn có cường độ cực đại xen kẽ với những miền sóng luôn có cường độ cực tiểu được gọi là giao thoa ánh sáng.

Về thực chất giao thoa ánh sáng là sự phân bố lại năng lượng dao động trong không gian, tồn tại những điểm luôn luôn dao động với biên độ cực đại xen kẽ với những điểm luôn luôn dao động với biên độ cực tiểu.

Muốn sự phân bố đó là đủ ổn định trong khoảng thời gian đủ để quan sát được thì hiệu pha của hai sóng phải không đổi ít nhất trong khoảng thời gian đó. Hai sóng cùng tần số và có hiệu pha không đổi gọi là hai sóng kết hợp. Sóng kết hợp mới chỉ là điều kiện cần vì sóng kết hợp từ hai nguồn sáng độc lập dù có cùng chu kỳ nhưng hiệu pha ban đầu thay đổi nhanh đến nỗi không kịp quan sát vân giao thoa do cơ chế phát sáng quá nhanh (10^{-8} giây) và có rất nhiều tâm phát sáng trong mỗi nguồn sáng. Do đó mọi sơ đồ giao thoa đều phải thực hiện việc tách sóng xuất phát từ một tâm thành hai chùm, sau đó cho chúng gặp nhau.

Hiện tượng giao thoa ánh sáng được ứng dụng trong chế tạo thiết bị đo chiết suất của các chất khí (giao thoa kế Reyleigh, giao thoa kế Michelson...), kiểm tra sự gồ ghề của các mặt quang học, bề dày của bản mỏng (như bề dày của các lớp điện môi...)....

3.3. Hiện tượng nhiễu xạ ánh sáng

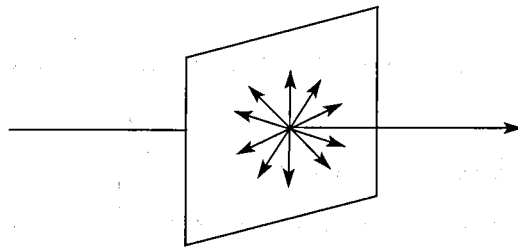
Hiện tượng nhiễu xạ sóng xảy ra khi phương truyền của sóng bị thay đổi do hình thành các tâm phát sóng thứ cấp tại các lỗ nhỏ hay khe hẹp. Hiện tượng nhiễu xạ làm xuất hiện các vệt sáng tối xen kẽ hai bên vệt sáng chính được tạo ra theo nguyên lý truyền thẳng của ánh sáng.

Hiện tượng nhiễu xạ được ứng dụng để tán sắc nhằm tạo ra các chùm tia đơn sắc từ ánh sáng tạp sắc như đã nêu trong phần tạo tia đơn sắc bằng cách tử (mục 2.2.4).

3.4. Hiện tượng phân cực của ánh sáng

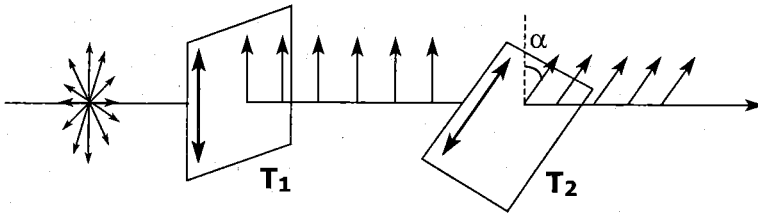
Ánh sáng phát ra từ một nguồn sáng thông dụng không có phương dao động ưu tiên. Trong bất cứ mặt phẳng nào đi qua tia sáng cũng chứa các dao động vuông góc với phương truyền. Một chùm sáng như vậy được gọi là ánh sáng tự nhiên. Nếu mỗi dao động sóng được biểu diễn bằng một vectơ hướng theo phương dao động thì ánh sáng tự nhiên được biểu diễn bởi một giản đồ vô số vectơ có độ dài như nhau và phân bố đều xung quanh tia sáng và đều vuông góc với phương truyền (hình 2.11).





Hình 2.11. Ánh sáng tự nhiên

Hiện tượng ánh sáng tự nhiên sau khi đi qua một số vật liệu đặc biệt chỉ còn giữ được một phương dao động được gọi là hiện tượng phân cực ánh sáng. Ánh sáng có tính chất như vậy được gọi là *ánh sáng phân cực*. (hình 2.12).



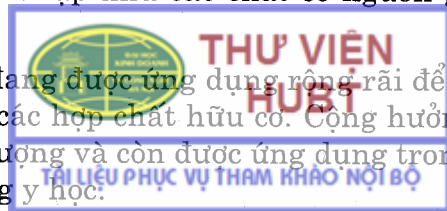
Hình 2.12. Ánh sáng phân cực.

Một số chất hoạt quang có khả năng quay mặt phẳng phân cực của ánh sáng phân cực. Dựa vào tính chất này người ta có thể định tính và định lượng chúng bằng các phân cực kế.

3.5. Hiện tượng cộng hưởng từ hạt nhân

Hạt nhân của một số nguyên tố trong từ trường có thể bị phân thành các mức năng lượng khác nhau. Sự hấp thụ một số bức xạ điện từ thích hợp làm thay đổi sự phân bố của chúng trong các mức. Bằng các biện pháp thích hợp người ta làm xuất hiện các tín hiệu tương ứng với các nguyên tố đặc biệt trong những nhóm chức, cũng như sự tương tác giữa các nhóm chức. Trên cơ sở xử lý các tín hiệu thu được để ứng dụng trong phân tích cấu trúc của các hợp chất đặc biệt là các hợp chất có cấu tạo phức tạp như các chất có nguồn gốc thiên nhiên.

Hiện tượng cộng hưởng từ đã và đang được ứng dụng rộng rãi để xác định cấu trúc lập thể một cách chi tiết của các hợp chất hữu cơ. Cộng hưởng từ hạt nhân cũng được ứng dụng trong định lượng và còn được ứng dụng trong một số thiết bị chẩn đoán hình ảnh dùng trong y học.



CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 2.1. Các đại lượng đặc trưng của bức xạ điện từ? Quan hệ giữa chúng?
- 2.2. Trình bày mối quan hệ giữa năng lượng điện từ với các đại lượng đặc trưng của chúng?
- 2.3. Giải thích sự hình thành phổ hấp thụ nguyên tử? Điều kiện để nguyên tử hấp thụ bức xạ điện từ? Ứng dụng của sự hấp thụ nguyên tử?
- 2.4. Giải thích sự hình thành phổ hấp thụ phân tử? Tác động của các miền bức xạ điện từ với trạng thái phân tử? Ứng dụng của sự hấp thụ phân tử?
- 2.5. Phổ hấp thụ là gì? So sánh những điều kiện và điểm khác nhau giữa phổ hấp thụ nguyên tử và phổ hấp thụ phân tử?
- 2.6. Thế nào là tia đơn sắc? Các phương pháp tạo chùm tia đơn sắc thường được dùng trong các thiết bị đo? Ưu nhược điểm của từng loại?
- 2.7. Các hình thức giải toả năng lượng sau khi hấp thụ bức xạ của các tiểu phân?
- 2.8. Thế nào là một cặp màu phụ nhau và ứng dụng của nó?
- 2.9. Các nguyên nhân gây tán xạ, biện pháp khắc phục?
- 2.10. Thế nào là các hiện tượng giao thoa ánh sáng, nhiễu xạ và một số ứng dụng của chúng?
- 2.11. Thế nào là ánh sáng phân cực? Ứng dụng của hiện tượng phân cực ánh sáng?
- 2.12. Một phổ IR được ghi trong vùng bức xạ có bước sóng 3-15 μ m. Hãy chuyển vùng bức xạ đó thành số sóng?
- 2.13. Một thiết bị UV-VIS cận hồng ngoại có thể làm việc trong vùng 185-3000nm. Hãy chuyển vùng làm việc đó thành tần số tính theo hertz?
- 2.14. Một phổ IR được ghi trong vùng bức xạ có số sóng 4000-600 cm^{-1} . Hãy chuyển vùng bức xạ đó thành bước sóng tính theo micromet?

Hãy xác định các nội dung sau là đúng hay sai, nếu đúng khoanh tròn quanh số câu hỏi còn sai thì gạch chéo:

- 2.15. Hai bức xạ điện từ có bước sóng khác nhau, bức xạ nào có bước sóng dài hơn thì có năng lượng lớn hơn và ngược lại.
- 2.16. Các tiểu phân chỉ hấp thụ một số bức xạ có bước sóng nhất định mà không hấp thụ tất cả mọi tia có bước sóng khác nhau.
- 2.17. Nếu biểu diễn bức xạ điện từ dưới dạng số sóng thì bức xạ nào có số sóng lớn hơn sẽ mang năng lượng lớn hơn.

- 2.18. Tất cả các chất đều có độ hấp thụ lớn hơn hoặc bằng 0 nên cường độ các chùm tia chiếu qua nó hoặc là được giữ nguyên hoặc là giảm đi.
- 2.19. Phân tử càng phức tạp thì càng có thể hấp thụ nhiều bức xạ có bước sóng khác nhau.
- 2.20. Số sóng có thể tính bằng công thức: $\bar{\nu} = c \cdot \nu$, trong đó ν là tần số của bức xạ điện từ tính bằng hertz và c là vận tốc ánh sáng có giá trị $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$.
- 2.21. Ánh sáng trắng bao gồm nhiều bức xạ có bước sóng khác nhau, trong đó tia tím có tần số lớn nhất.
- 2.22. Ánh sáng trắng bao gồm nhiều bức xạ có bước sóng khác nhau, trong đó tia đỏ có bước sóng dài nhất.
- 2.23. Một nguyên tử ở trạng thái hơi có mức năng lượng kích thích càng cao cần hấp thụ một bức xạ có bước sóng càng dài để chuyển lên trạng thái kích thích.



QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ

MỤC TIÊU

1. Giải thích được các điều kiện có thể áp dụng định luật Lambert-Beer.
2. Trình bày được một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS của một chất.
3. So sánh được các phương pháp định lượng bằng quang phổ UV-VIS.
4. Mô tả được cấu tạo chính của một máy quang phổ UV-VIS.
5. Nêu được các ứng dụng chính của quang phổ IR và giải thích lý do phải biện giải phổ IR.
6. Trình bày được các điểm cần lưu ý khi đo và xử lý phổ IR.

Hình 2.7 trong chương 2 cho thấy phân tử có rất nhiều mức năng lượng khác nhau tương ứng với sự thay đổi trạng thái năng lượng của các electron, các dao động... trong phân tử. Vì vậy phân tử các chất có thể hấp thụ các bức xạ điện từ khác nhau. Các bức xạ điện từ có năng lượng ứng với chênh lệch các trạng thái năng lượng của phân tử chủ yếu nằm trong vùng tử tử ngoại đến hồng ngoại. Do đặc tính của nguồn cung cấp bức xạ điện từ và năng lượng của chúng mà quang phổ UV-VIS và quang phổ IR thường được áp dụng với các mục đích khác nhau và cũng là các phổ được ứng dụng rộng rãi nhất trong số các phổ hấp thụ phân tử.

1. QUANG PHỔ HẤP THỤ TỬ NGOẠI KHẢ KIẾN (UV-VIS)

1.1. Tính chất vùng phổ tử ngoại khả kiến

Trong phổ các bức xạ điện từ các tia tử ngoại và khả kiến chỉ chiếm một vùng rất hẹp nằm trong khoảng từ 2 - 760nm. Giảm đồ năng lượng ở hình 2.7 cho thấy các bức xạ UV và VIS có năng lượng khá lớn nên có thể ảnh hưởng đến các mức năng lượng của electron. Tính chất của nguồn cung cấp bức xạ cũng như bộ phận phát hiện của 2 vùng này có nhiều điểm tương đồng nên trong các thiết bị áp dụng phổ tử ngoại thường phối hợp cho cả vùng khả kiến. Người ta chia phổ tử ngoại khả kiến thành các vùng: tử ngoại xa, tử ngoại gần và khả kiến

1.1.1. Vùng tử ngoại xa

Vùng tử ngoại xa gồm các tia bức xạ có bước sóng dưới 200nm.

Vùng này ít được dùng vì có năng lượng khá cao nên có thể phá vỡ liên kết trong phân tử các chất. Mặt khác các tia vùng này bị hầu hết các dung môi hấp thụ mạnh thậm chí có thể hoá hơi dung môi, oxy trong không khí cũng hấp thụ mạnh bức xạ có bước sóng 180nm. Ngay thạch anh vật liệu thường dùng để làm cốc đo cũng hấp thụ các tia vùng này.

1.1.2. Vùng tử ngoại gần và vùng khả kiến (VIS)

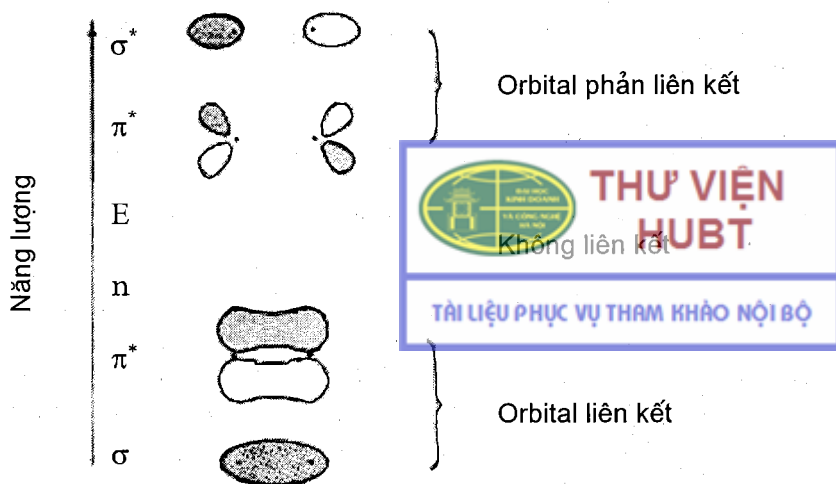
Vùng tử ngoại gần gồm các tia bức xạ có bước sóng trong khoảng từ 200 đến 400nm. Còn vùng khả kiến gồm các tia bức xạ có bước sóng trong khoảng từ 400 - 800nm.

Năng lượng của các tia thuộc vùng này có thể làm thay đổi năng lượng electron trong phân tử. Các máy đo độ hấp thụ UV-VIS thông thường làm việc được với các bức xạ 190-900nm. Thạch anh không hấp thụ các tia tử ngoại nên để đo phổ trong vùng tử ngoại có thể sử dụng cốc đo loại này (cốc quartz). Với các tia nhìn thấy có thể dùng cốc thủy tinh, thậm chí cốc thủy tinh hữu cơ để đo. Các loại cốc này có giá thành rẻ hơn rất nhiều so với cốc quartz.

1.2. Sự chuyển mức năng lượng electron với hấp thụ bức xạ UV-VIS

Các bức xạ UV-VIS có năng lượng khá lớn nên có khả năng làm thay đổi mức năng lượng của các electron từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Các electron tham gia vào hiệu ứng này có thể là:

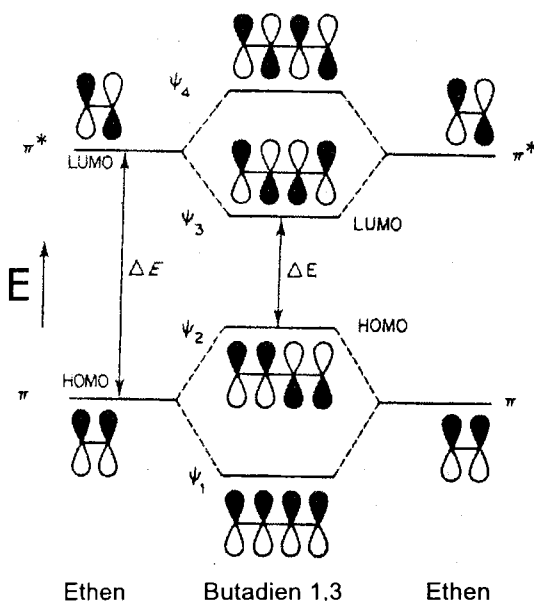
- Các electron σ trong các liên kết đơn C-C hay C-H,
- Các electron π trong các liên kết bội, hệ thống thơm...
- Các electron n của cặp electron tự do không tham gia liên kết của O, N, các halogen...



Hình 3.1. Năng lượng tương đối của các orbital σ , π , π^* và σ^*

Các mức năng lượng của các orbital σ , π , n , π^* và σ^* có thể minh họa như trong hình 3.1. Hình này cho thấy để electron σ chuyển lên trạng thái kích thích σ^* cần phải có năng lượng lớn vì khoảng cách giữa chúng là lớn hơn cả. Còn electron π chuyển lên trạng thái kích thích thì cần năng lượng nhỏ hơn vì hai mức π và π^* gần nhau hơn. Các electron tự do n muốn chuyển lên mức năng lượng π^* cần năng lượng thấp nhưng xác suất xảy ra lại thấp hơn sự chuyển π lên π^* .

Nếu trong phân tử có càng nhiều liên kết đôi thì sự hấp thụ càng chuyển về bước sóng dài hơn, đặc biệt với các hệ liên hợp. Minh họa trong hình 3.2 cho thấy khi 2 phân tử ethen liên kết tạo ra butadien-1,3 thì từ 2 orbital π và 2 orbital π^* (trống) trở thành 4 orbital mới $\psi_1, \psi_2, \psi_3, \psi_4$. Khi đó khoảng cách năng lượng giữa orbital đầy cao nhất (HOMO- *the highest occupied molecular orbital*) và orbital trống thấp nhất (LUMO - *the lowest unoccupied molecular orbital*) trở nên bé hơn khoảng cách năng lượng của 2 orbital π^* và π trong ethen.



Hình 3.2. Năng lượng tương đối của các orbital trong ethen và butadien 1,3

Độ bội của trạng thái năng lượng cũng ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ các bức xạ. Electron trong phân tử có thể quay xung quanh mình theo 2 chiều ngược nhau có số lượng tử spin trái dấu nhau ($-\frac{1}{2}$ và $\frac{1}{2}$). Spin tổng S bằng tổng spin của các electron lớp ngoài. Độ bội của trạng thái năng lượng được tính bằng 2 lần giá trị tuyệt đối của spin tổng S và cộng thêm 1 ($2|S|+1$). Nếu 2 electron lớp ngoài có spin trái dấu thì spin tổng bằng 0 và có độ bội là 1 được gọi là trạng thái đơn bội hay trạng thái S (*Singlet*). Nếu 2 electron đó có spin cùng dấu thì độ bội là 3 và được gọi là trạng thái tam bội hay trạng thái T (*Triplet*). Những sự chuyển trạng thái S_0 lên S^* và T_0 lên T^* là có thể xảy ra nhưng sự chuyển trạng thái S_0 lên T^* rất khó xảy ra.

1.3. Định luật Lambert-Beer và hệ số hấp thụ

1.3.1. Một số khái niệm

❶ Độ truyền qua (T - transmittance):

Khi chiếu một chùm tia đơn sắc có cường độ I_0 qua một dung dịch có chiều dày l (tính bằng centimet). Sau khi bị dung dịch hấp thụ, cường độ chùm tia còn lại là I . Độ truyền qua T được tính dưới dạng % theo công thức:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100 (\%) \quad (3.1)$$

❷ Độ hấp thụ (A - absorbance):

Độ hấp thụ A được tính theo công thức:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I} \quad (3.2)$$

Độ hấp thụ A còn được gọi là mật độ quang (D) hoặc độ tắt (E).

1.3.2. Định luật Lambert - Beer và các hệ số hấp thụ

❶ Định luật Lambert - Beer:

Định luật Lambert - Beer được phát triển từ định luật Lambert, hệ số k trong biểu thức $I = I_0 e^{-kl}$ (2.5) được biểu diễn qua nồng độ và một hệ số khác (sau khi chuyển đổi cơ số của logarit). Theo định luật Lambert - Beer thì:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (3.3)$$

Trong đó: ε là hệ số hấp thụ phụ thuộc vào bản chất của dung dịch, bước sóng của chùm tia đơn sắc.

l là bề dày của dung dịch (cm)

C là nồng độ của dung dịch (mol/l)

hay $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$

(3.4)

❷ Các hệ số hấp thụ:

Nếu thay đổi đơn vị tính toán nồng độ của dung dịch thì giá trị của hệ số hấp thụ thay đổi. Trong quang phổ UV-VIS người ta thường sử dụng nồng độ mol và nồng độ phần trăm và tương ứng với chúng có các loại hệ số hấp thụ sau:

- Nếu nồng độ tính theo mol/l, khi $l = 1\text{cm}$ và $C = 1\text{M}$ thì với (3.4) khi đó $A = \varepsilon$ nên ε được gọi là *hệ số hấp thụ mol*.
- Nếu nồng độ C tính theo phần trăm (kl/tt) và l tính theo centimet thì:

$$A = E_{1cm}^{1\%} \cdot l \cdot C \quad (3.5)$$

$E_{1cm}^{1\%}$ được gọi là *hệ số hấp thụ riêng*, còn được ký hiệu là $A(1\%, 1cm)$.

Hệ số hấp thụ mol ϵ hay được sử dụng trong mô tả tính chất quang phổ của các chất hữu cơ, còn trong phân tích kiểm nghiệm thường dùng hệ số hấp thụ riêng $E_{1cm}^{1\%}$.

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS

Các mẫu đo UV-VIS phổ biến là các dung dịch. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS của mẫu đo như cấu trúc của chất tan và dung môi, tính chất và nồng độ của dung dịch, khả năng đáp ứng của thiết bị đo... Sau đây là một số yếu tố chính có thể ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS của dung dịch đo.

1.4.1. Các yếu tố thuộc về cấu trúc phân tử của chất tan

Cấu trúc phân tử ảnh hưởng rất lớn đến khả năng hấp thụ UV-VIS của phân tử. Các yếu tố ảnh hưởng của cấu trúc lên độ hấp thụ của phân tử có thể là các hiệu ứng cảm ứng, liên hợp và cả hiệu ứng không gian.

❶ Nhóm mang màu và nhóm trợ màu:

Các *nhóm mang màu (chromophore)* làm cho phân tử có thể hấp thụ các bức xạ có bước sóng dài hơn trong UV-VIS. Khi phân tử có chứa các nhóm này thì có thể hấp thụ những bức xạ có bước sóng trên 200nm. Có rất nhiều nhóm mang màu đặc trưng sẽ được giới thiệu cụ thể ở các mục sau. Dựa vào đặc tính của từng nhóm người ta có thể tính toán được một cách gần đúng cực đại hấp thụ của phân tử.

Một số nhóm tự mình ít có khả năng hấp thụ UV-VIS nhưng lại có thể làm ảnh hưởng khả năng của các nhóm mang màu. Các nhóm có đặc tính như vậy được gọi là các *nhóm trợ màu (auxochrome = auxiliary chromophore)*. Nói chung nhóm trợ màu (còn được gọi là nhóm tăng màu) thường là các nguyên tử hay nhóm mà có một hay nhiều cặp electron tự do như: -OH, -OR, -NR₂, các halogen...

Nếu sự thay đổi cấu trúc làm cho cực đại hấp thụ chuyển dịch:

- về phía bước sóng dài hơn được gọi là sự chuyển dịch *bathochromic*.
- về phía bước sóng ngắn hơn được gọi là chuyển dịch *hypsochromic*.

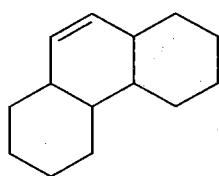
Nhóm trợ màu còn có thể ảnh hưởng cả lên cường độ hấp thụ nếu:

- làm tăng cường độ hấp thụ được gọi là hiệu ứng *hyperchromic*,
- làm giảm cường độ hấp thụ được gọi là hiệu ứng *hypochromic*.

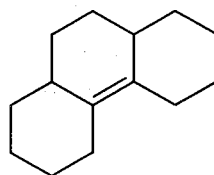
❷ Ảnh hưởng của vị trí không gian:

Vị trí của các liên kết bội ảnh hưởng nhiều đến sự hấp thụ của phân tử, đặc biệt là các hệ liên hợp. Không những thế vị trí các liên kết đôi trong các hệ

vòng cũng có thể làm thay đổi vị trí cực đại hấp thụ cũng như hệ số hấp thụ phân tử, ví dụ:

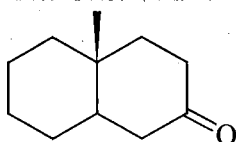


$\lambda_{\max}$ 193 nm
($\epsilon = 11000$)

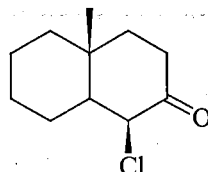


$\lambda_{\max}$ 204 nm
($\epsilon = 12000$)

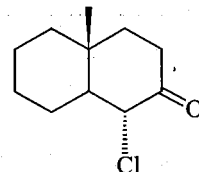
Hướng liên kết của các nhóm mang màu hay tăng màu cũng có ảnh hưởng rõ rệt đến cực đại hấp thụ, ví dụ:



$\lambda_{\max}$ 287 nm



$\lambda_{\max}$ 309 nm



$\lambda_{\max}$ 280 nm

③ Một số nhóm mang màu đặc trưng:

– Các alken và dien:

Các alken đơn giản có cực đại hấp thụ UV nằm ở giới hạn của các máy quang phổ tử ngoại thông thường khi có thêm các nhóm thế cực đại hấp thụ có thể chuyển lên xung quanh 200 nm. Tuy nhiên khi nối đôi nằm trong hệ thống vòng thì cực đại sẽ được chuyển dịch về phía bước sóng dài hơn.

Bảng 3.1. Dự đoán cực đại hấp thụ của các polyen theo qui tắc Fieser-Woodward

Yếu tố cấu trúc	$\lambda_{\max}$ nm	$\lambda_{\max}$ tăng thêm
Dien cùng trong 1 vòng	253	
Dien không cùng vòng của hệ thống 2 vòng hay trong mạch hở	214	
Nếu hệ thống có:		
Thế alkyl hoặc thêm vòng		5
Nối đôi ngoại vòng (exocyclic)		5
Một nối đôi bổ sung cho nhóm mang màu		30
Thế clo, brom		5
Nhóm O-alkyl		6
Nhóm S-alkyl		30
Nhóm O-acyl		0

Các nối đôi bổ sung vào hệ thống liên hợp có thể làm cho trị số $\lambda_{\max}$ tăng thêm khoảng 30nm.

Fieser-Woodward đưa ra qui tắc để dự đoán trong phổ của các polyen. Dựa vào qui tắc này có thể dự đoán cực đại hấp thụ của các polyen với giá trị tính toán sai khác giá trị thu được thực tế không quá 5 nm. Qui tắc Fieser-Woodward dự đoán trong phổ của các polyen được trình bày trong bảng 3.1.

– Các hợp chất carbonyl đơn giản:

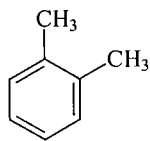
Có hai khả năng để hấp thụ UV xuất hiện với nhóm $C=O$ của các aldehyd và ceton mạch thẳng. Tham gia hiệu ứng trước hết là electron của liên kết đôi. Chúng có thể chuyển lên orbital π^* tương ứng. Yếu tố thứ hai là sự chuyển $n-\pi^*$ với sự xuất hiện hấp thụ ở 270-290nm nhưng với cường độ rất thấp ($\epsilon \leq 100$).

– Các hợp chất enon và polyenon:

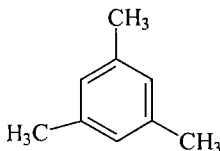
Hiệu ứng liên hợp trong enon cũng như với dien làm giảm khoảng cách năng lượng giữa HOMO và LUMO của hệ thống π (xem hình 3.2).

– Các dẫn chất thế một lần của benzen:

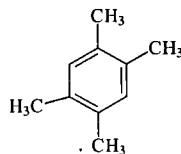
Phổ hấp thụ tử ngoại của benzen trong hexan cho các cực đại ở 184nm ($\epsilon=60000$), 204 nm ($\epsilon=7400$) và 254 nm ($\epsilon=204$). Nhưng dải hấp thụ lại chuyển về phía bước sóng dài hơn khi mà vòng càng được alkyl hoá nhiều hơn.



$\lambda_{\max}$ 263 nm ($\epsilon = 300$)



$\lambda_{\max}$ 266 nm ($\epsilon = 305$)



$\lambda_{\max}$ 279 nm ($\epsilon = 820$)

Các dẫn chất thế trên vòng bởi các nhóm mở rộng sự liên hợp với hệ thống π do sự không no hay các cặp electron tự do làm chuyển các dải hấp thụ có độ nhạy cao vào vùng có thể đo phổ được (khoảng 210-300nm).

– Các dẫn chất thế hai lần của benzen:

Các dẫn chất thế 2 lần ở các vị trí *ortho* hay *meta* cho khả năng mang màu như là sự ghép thuần tuý của hai dẫn chất thế 1 lần. Nhưng nếu là dẫn chất có 2 nhóm thế ở vị trí *para* và 2 nhóm thế khác nhau chúng có thể tương tác với nhau và mở rộng sự liên hợp của hệ thống π và chính vì thế thể hiện dải hấp thụ về phía bước sóng dài hơn.

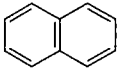
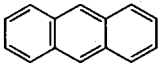
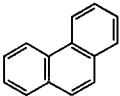
– Các dẫn chất carbonyl thơm:

Các dẫn chất có nhóm carbonyl thẳng thường thể hiện sự chuyển $n-\pi^*$ yếu nhưng trong các dẫn chất thơm loại này cũng được xuất hiện ở bước sóng dài hơn 320-350nm.

– Các dẫn chất thơm đa vòng và các dị vòng:

Việc tăng vòng của các dẫn chất thơm gây ra sự dịch chuyển bathochromic bổ sung nhưng phụ thuộc hướng của vòng thêm. Ví dụ sau cho

thấy sự thay đổi cực đại hấp thụ và hệ số hấp thụ phân tử của các hệ thống 3 vòng với naphthalen:

Hợp chất	$\lambda_{\max}$ nm (ϵ)				
	220 (63000)	275 (56300)	286 (3980)	312 (2510)	320 (350)
	253 (69000)	323 (6900)	339 (8750)	359 (5810)	375 (5950)
	250 (84500)	275 (60200)	293 (61300)	330 (610)	346 (700)

Các dị vòng 5 cạnh, 6 cạnh và đa vòng đều là những hợp chất có khả năng hấp thụ tương tự như benzen và các hợp chất thơm đa vòng.

1.4.2. Các yếu tố thuộc về môi trường

❶ Dung môi:

Dung môi là các hợp chất hoá học nên cũng có thể có khả năng hấp thụ các bức xạ UV-VIS. Các dung môi được dùng để đo phổ UV-VIS có những bước sóng giới hạn (λ_{cutoff}) khác nhau mà dưới bước sóng đó dung môi hấp thụ đa phần các bức xạ chiếu qua nó. Bước sóng giới hạn của một số dung môi được trình bày trong bảng 3.2. Cần lưu ý rằng bước sóng giới hạn của các dung môi trong bảng này chỉ có tính chất tương đối, giá trị có thể khác nhau chút ít trong các tài liệu.

Do đó khi chọn dung môi để chuẩn bị dung dịch đo phổ UV-VIS ngoài việc dựa vào độ tan của chất cần nghiên cứu còn phải tính đến cả khả năng hấp thụ của chính dung môi. Trong quang phổ UV-VIS, dung môi thường được dùng là ethanol 95° hay methanol.

Bảng 3.2. Bước sóng giới hạn (λ_{cutoff}) của một số dung môi

Dung môi	λ_{cutoff} (nm)
Nước	205
Methanol	210
Cyclohexan	210
Acetonitril	210
Isopropanol	210
Tetrahydrofuran (THF)	220
Dicloromethan	235
Cloroform	245
Aceton	330

Sử dụng các dung môi khác nhau còn có thể làm sai khác vị trí cực đại trên phổ hấp thụ của các chất. Ví dụ với các enon và polyenon khi dùng các dung môi khác có thể phải hiệu chỉnh vị trí cực đại dự kiến so với trong 2 dung môi trên như sau: cloroform (+1), cyclohexan (+11), diethyl ether (+7), dioxan (+5), hexan (+11), nước (-8). Vì vậy các thông số về khả năng hấp thụ UV-VIS của các chất thường đưa ra kèm với tên dung môi được dùng để đo.

② Tương tác giữa các lưỡng cực (dipole-dipole):

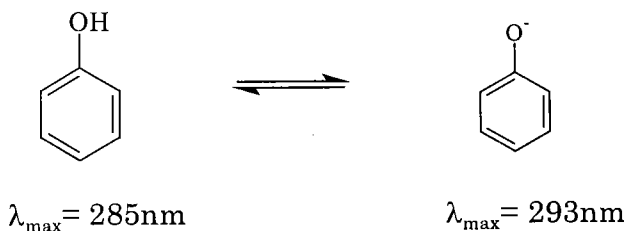
Ảnh hưởng của dung môi còn thể hiện ở tương tác giữa hai lưỡng cực. Khi sử dụng các dung môi phân cực như nước, acetonitril, methanol... nếu chất tan cần nghiên cứu cũng phân cực sẽ xuất hiện tương tác dipole-dipole. Tương tác này làm cho khoảng cách $\pi-\pi^*$ ngắn lại làm cho cực đại hấp thụ dịch chuyển về phía sóng dài (hiệu ứng bathochromic). Ngược lại nó cũng lại làm cho khoảng cách dịch chuyển $n-\pi^*$ dài ra (hiệu ứng hypsochromic)

③ Liên kết hydro:

Các dung môi có liên kết hydro như ethanol có thể tác động lên các electron n trong phân tử. Ngược lại các dung môi có electron n cũng có thể tác động lên chất tan có liên kết hydro. Tác động này làm cho khoảng cách chuyển $n-\pi^*$ bị mở rộng, cực đại chuyển dịch về phía bước sóng ngắn hơn.

④ Ảnh hưởng của pH:

pH môi trường có thể gây hồ biến làm thay đổi cấu trúc phân tử và do đó mà kéo theo sự thay đổi của khả năng hấp thụ của chất đó. Ví dụ:



⑤ Nồng độ và các tương tác khác trong dung dịch:

Khả năng hấp thụ UV-VIS của dung dịch chỉ tỷ lệ tuyến tính với nồng độ trong một khoảng thích hợp. Khi dung dịch quá loãng hay quá đặc có thể gây ra các sai lệch về hoá học do sự phân ly (ion hoá) hay tạo các sản phẩm trùng hợp (dimer, trimer...) mà chúng có độ hấp thụ khác dạng phân tử hay đơn phân tử. Sai lệch hoá học còn có thể xảy ra hoặc tăng lên theo nồng độ do phản ứng của chất nghiên cứu với các chất lạ hay tạo phức với các ion trong dung dịch. Để hạn chế sai lệch này người ta thường dùng mẫu trắng của mẫu phân tích. Việc dùng mẫu trắng càng cần thiết khi sử dụng các phản ứng "tạo màu" nhằm tạo ra khả năng hấp thụ ánh sáng của dung dịch nghiên cứu. Bên cạnh đó các nhà nghiên cứu phải xác định khoảng nồng độ mà khả năng hấp thụ phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ. Việc xác định này được tiến hành bằng thực nghiệm.

1.4.3. Các yếu tố thuộc về thiết bị

Định luật Lambert-Beer chỉ hoàn toàn đúng với chùm tia sáng đơn sắc. Vì với một chất ở các bước sóng khác nhau các hệ số hấp thụ thường khác nhau. Chùm tia sáng càng đơn sắc thì định luật càng đúng. Yếu tố ảnh hưởng của thiết bị dễ thấy nhất là khả năng tạo chùm tia đơn sắc của nó. Đây là một trong những tiêu chí để phân biệt thiết bị đó là máy đo quang hay là máy quang phổ. Trong một số máy đo quang bộ phận đơn sắc hoá có thể chỉ là bộ các kính lọc hoạt động trên nguyên tắc màu phụ nhau và đương nhiên độ đơn sắc của chùm tia chỉ có tính chất tương đối.

Khả năng phát hiện độ chênh lệch cường độ của chùm tia tới và chùm tia đi qua mẫu của thiết bị có thể bị thay đổi theo thời gian sử dụng. Thiết bị có thể bị mất dần các yêu cầu kỹ thuật vốn phải có như khi được sản xuất ra ví dụ độ nhạy giảm đi do tế bào quang điện hay ống nhân quang quá già, bộ khuếch đại yếu... Độ nhạy của bộ phận phát hiện kém có thể kéo theo sự giảm độ đơn sắc của chùm tia do phải mở rộng khe để tăng cường độ chùm tia.

1.4.4. Ảnh hưởng của các hiện tượng quang học khác

Khi chiếu chùm tia qua mẫu đo ngoài việc truyền thẳng qua dung dịch chùm tia có thể còn chịu ảnh hưởng của các hiện tượng quang học khác như phản xạ, khúc tán.... đặc biệt là hiện tượng tán xạ do dung dịch không đồng nhất về mặt quang học. Do vậy dung dịch phải trong suốt để hạn chế hiện tượng tán xạ, phản xạ, khúc tán ánh sáng...

1.4.5. Điều kiện áp dụng định luật Lambert-Beer

Từ các yếu tố ảnh hưởng nêu trên có thể rút ra các điều kiện cơ bản để có thể áp dụng định luật Lambert-Beer trong tính toán như sau:

- Thiết bị phải có khả năng tạo ra chùm tia có độ đơn sắc nhất định. Độ đơn sắc càng cao càng tốt.
- Chất thử phải bền trong dung dịch và bền dưới tác dụng của tia UV-VIS.
- Dung dịch phải nằm trong khoảng nồng độ thích hợp.
- Dung dịch phải trong suốt để hạn chế tối đa các hiện tượng quang học khác.

1.5. Các ứng dụng của quang phổ UV-VIS

Định lượng là ứng dụng chủ yếu và khá phổ biến của quang phổ UV-VIS được áp dụng trong phân tích được. Định lượng bằng quang phổ UV-VIS có ưu điểm là tiến hành nhanh và cho kết quả có độ chính xác cao. Ngoài ra trong một số trường hợp có thể ứng dụng quang phổ UV-VIS để định tính các chất.

1.5.1. Định tính

Về nguyên tắc có thể dựa vào phổ chất cần nghiên cứu với phổ chất chuẩn để định tính xem chất đó có đúng là chất đang được dự kiến không.

Nhưng với phổ UV-VIS có rất ít thông tin đặc trưng về cấu trúc nên người ta thường dùng phổ IR để xác định cấu trúc được chính xác hơn.

Tuy nhiên trong một số trường hợp người ta có thể định tính một số chất bằng cách so sánh vị trí các cực đại và cực tiểu hấp thụ và tỷ lệ mật độ quang giữa các bước sóng đó phải nằm trong một giới hạn cho phép.

Ví dụ:

- Vitamin B12 có 3 cực đại hấp thụ ở các bước sóng $278 \pm 1\text{nm}$, $361 \pm 1\text{nm}$ và $550 \pm 2\text{nm}$; đồng thời tỷ số D_{361}/D_{278} nằm trong khoảng 1,7 - 1,9 và D_{361}/D_{550} nằm trong khoảng 3,15 - 3,40.
- Vitamin B2 có 4 cực đại hấp thụ ở các bước sóng 223, 267, 375 và 444 nm.

Ngoài ra để có thể sử dụng nhiều hơn thông tin do phổ UV-VIS cung cấp người ta tiến hành so sánh hai phổ thông qua hệ số match.

1.5.2. Định lượng dung dịch có một thành phần

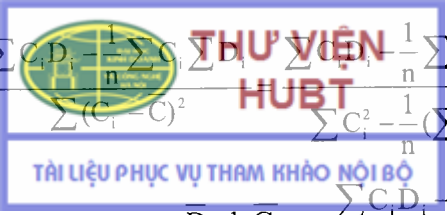
Việc định lượng chất tan trong dung dịch có một thành phần dựa vào định luật Lambert-Beer (phương trình 3.4): $A = \epsilon.l.C = K.C$.

Để xác định nồng độ dung dịch C_x qua giá trị độ hấp thụ A_x , người ta cần xác định hệ số K. Dựa vào nguyên tắc chung cho định lượng trong phân tích dụng cụ, người ta sử dụng chất đối chiếu (so sánh). Nguyên tắc này thường được áp dụng dưới hai dạng: đường chuẩn và thêm chuẩn. Ngoài ra có chuẩn độ đo quang không cần dùng chất đối chiếu.

❶ Kỹ thuật đường chuẩn:

Để xây dựng đường chuẩn người ta chuẩn bị một số dung dịch chuẩn có nồng độ khác nhau, thường dùng 5 - 8 dung dịch chuẩn. Đo mật độ quang của từng dung dịch chuẩn và vẽ đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa mật độ quang và nồng độ của các dung dịch chuẩn.

Trong trường hợp các dung dịch đo thỏa mãn các điều kiện của định luật Lambert-Beer thì đường chuẩn thẳng (hình 3.3). Việc xác định C_x có thể tiến hành bằng đồ thị hay qua các hệ số a và b của phương trình $D = aC + b$. Đường tuyến tính và các hệ số a, b của nó được xác định bằng phương pháp bình phương nhỏ nhất. Sau đây là một số biểu thức tính các hệ số a và b:

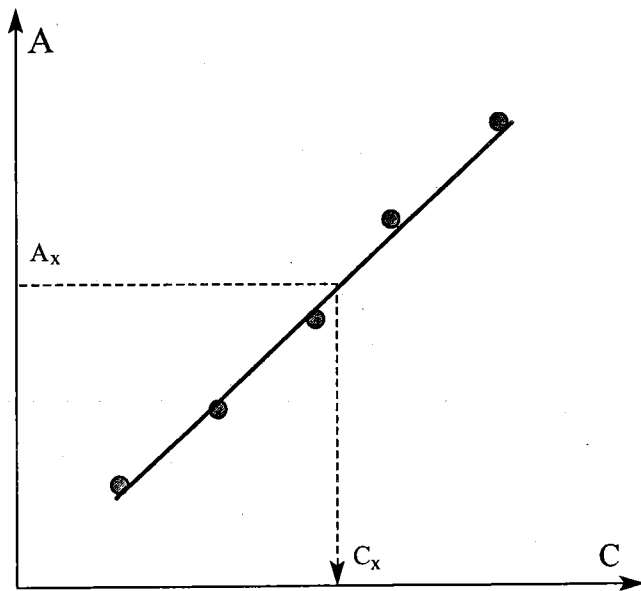


$$b = \frac{\sum C_i D_i - \frac{1}{n} \sum C_i \sum D_i}{\sum (C_i - \bar{C})^2} = \frac{\sum C_i \sum D_i - \frac{1}{n} (\sum C_i)^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}$$

và

$$a = \frac{\sum C_i D_i - n \cdot \bar{C} \cdot \bar{D}}{\sum C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2}$$

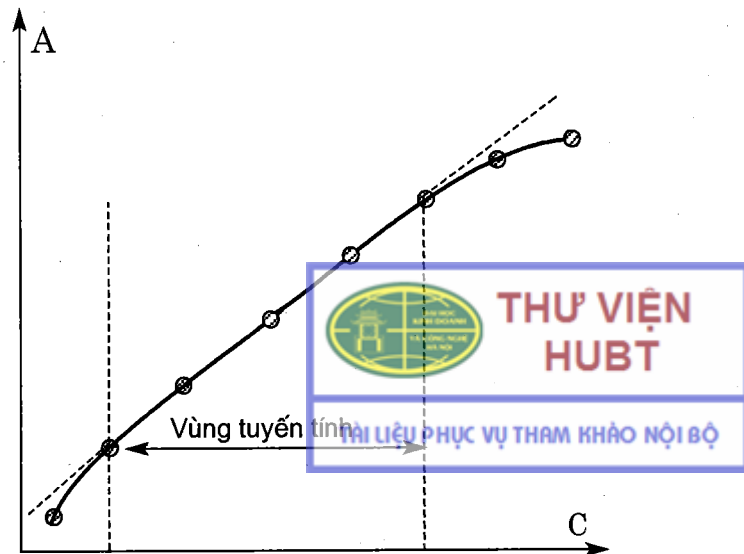
Đường tuyến tính này có thể được vẽ và lấy ra các hệ số một cách nhanh chóng từ các phần mềm vẽ đồ thị có trong các ứng dụng của Microsoft Office.



Hình 3.3. Xác định nồng độ dung dịch thử theo phương pháp đường chuẩn.

Để hạn chế phải ngoại suy, nồng độ các dung dịch thử phải nằm trong khoảng nồng độ của dãy chuẩn.

Trong trường hợp các dung dịch không thật sự tuân theo định luật Lambert-Beer (đường chuẩn không thẳng) thì phải pha nhiều dung dịch chuẩn hơn và các dung dịch chuẩn có nồng độ gần nhau hơn. Khi đó cần xác định vùng tuyến tính là khoảng nồng độ cho đoạn đường chuẩn có hệ số tương quan $r > 0,99$ (hình 3.4).



Hình 3.4. Khảo sát vùng tuyến tính trong phương pháp đường chuẩn.

Do so sánh với một dung dịch chuẩn là trường hợp riêng của đường chuẩn: xác định hằng số K từ một dung dịch.

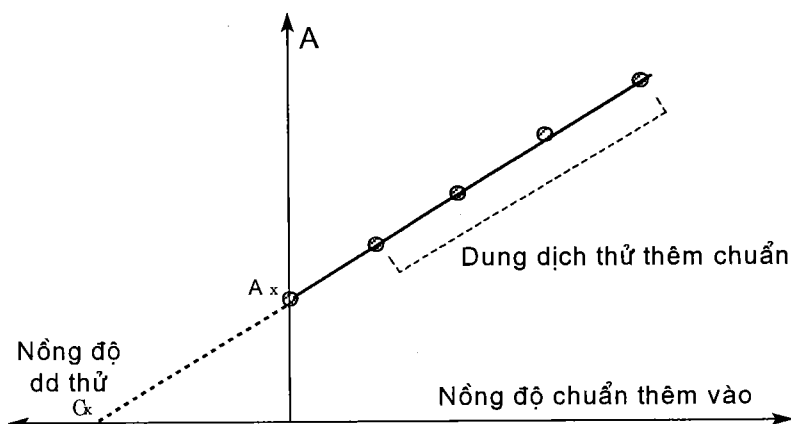
Trong cách đo so sánh xác định mật độ quang của dung dịch thử có nồng độ C_x (chưa biết) được tiến hành cùng với việc xác định mật độ quang của dung dịch chuẩn có nồng độ C_c đã biết chính xác. Trong điều kiện thoả mãn định luật Lambert-Beer thì mật độ quang tỷ lệ thuận với nồng độ dung dịch nên:

$$\frac{A_x}{A_c} = \frac{C_x}{C_c} \rightarrow C_x = \frac{A_x}{A_c} \cdot C_c \quad (3.6)$$

Trong cách đo so sánh kết quả càng chính xác khi nồng độ C_x càng gần nồng độ dung dịch chuẩn.

② Kỹ thuật thêm đường chuẩn:

Đây là cách xây dựng đường chuẩn trên nền dung dịch cần định lượng. Đo mật độ quang của dung dịch chưa thêm chất chuẩn và các dung dịch có thêm chất chuẩn. Vẽ đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa mật độ quang và nồng độ chất chuẩn đã thêm (hình 3.5). Giao điểm của đường chuẩn với trục nồng độ chỉ giá trị của nồng độ dung dịch cần định lượng.



Hình 3.5. Xác định nồng độ dung dịch thử theo cách thêm đường chuẩn.

Đôi khi người ta chỉ dùng một dung dịch có thêm chuẩn đối chiếu để xác định nồng độ dung dịch cần định lượng. Đây là trường hợp riêng của cách thêm đường chuẩn.

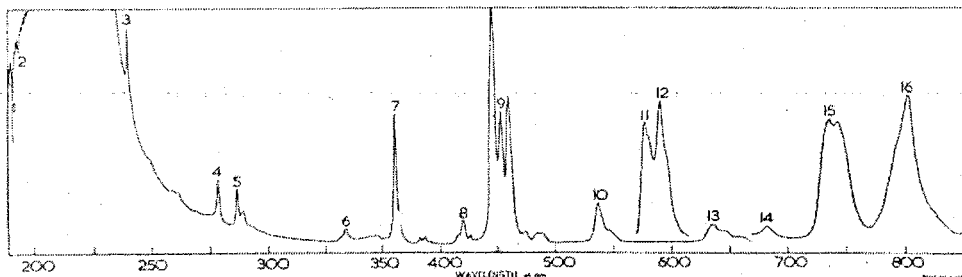
③ Xác định nồng độ khi biết hệ số hấp thụ:

Với các chất có hệ số hấp thụ biết trước chính xác và ổn định ở một bước sóng nào đó, người ta có thể đo mật độ quang của dung dịch chất đó trong dung môi tương ứng tại bước sóng này. Thông thường đó là bước sóng cho độ hấp thụ cực đại. Nồng độ của dung dịch được tính theo công thức của định luật Lambert-Beer.

Để áp dụng được kỹ thuật này, phép đo phải đáp ứng các yêu cầu:

- Máy phải được chuẩn hoá về bước sóng và giá trị mật độ quang.
- Dung dịch đo phải trong suốt và có nồng độ nằm trong vùng đáp ứng của định luật Lambert - Beer.

Sau đây là một ví dụ về kiểm tra độ chính xác của bước sóng: quét phổ hấp thụ của các kính lọc chuẩn như Holmium hay Didymium. Đây là các kính lọc có các cực đại hấp thụ ở một số bước sóng xác định và khá nhọn như trong hình 3.6.

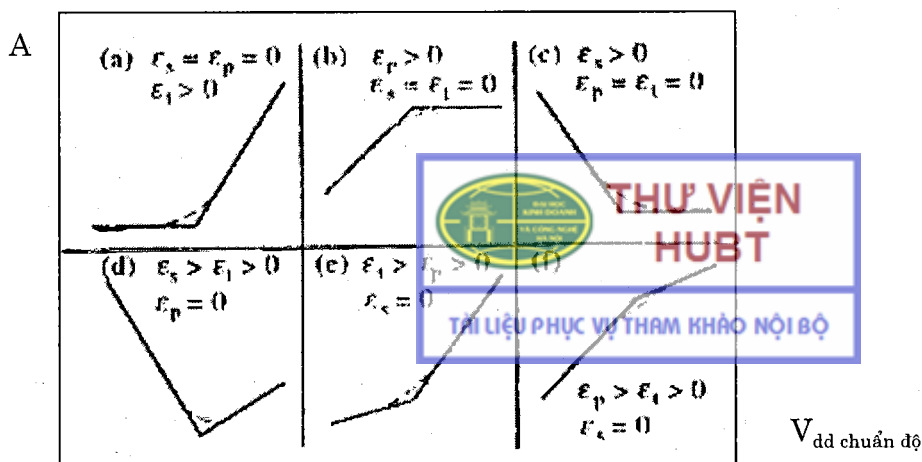


Hình 3.6. Các cực đại hấp thụ của kính chuẩn Holmium và Didymium (các cực đại 11-12 và 14-16 là của kính Didymium còn lại của Holmium).

4 Chuẩn độ đo quang:

Nguyên tắc của kỹ thuật là phát hiện điểm tương đương bằng đo quang. Dựa trên phương trình chuẩn độ là phản ứng của chất cần định lượng X với thuốc thử R để tạo ra sản phẩm P: $X + R \rightarrow P$ với điều kiện ít nhất phải có một chất hấp thụ ánh sáng tại bước sóng khảo sát.

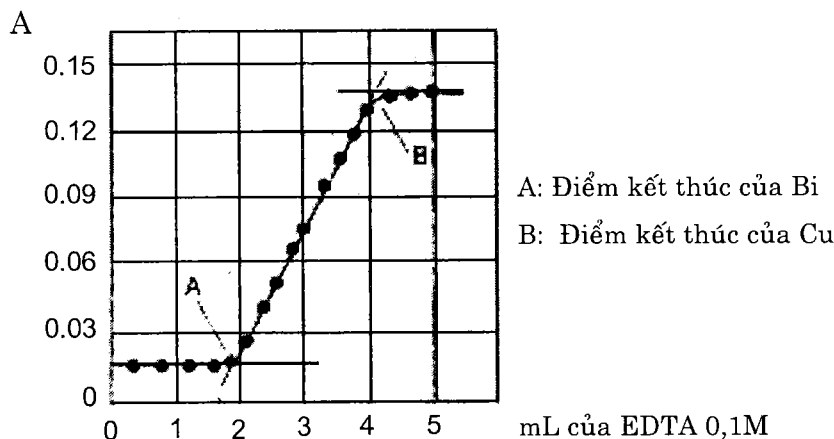
Trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của mật độ quang dung dịch với thể tích thuốc thử cho vào sẽ xuất hiện điểm gãy tại điểm tương đương (hình 3.7). Điều quan trọng là tìm được bước sóng thích hợp để có thể xác định điểm tương đương một cách chính xác và thuận tiện.



Hình 3.7. Một số dạng đường cong chuẩn độ đo quang.

(ϵ_s , ϵ_i và ϵ_p là hệ số hấp thụ phân tử của chất cần chuẩn độ, chất chuẩn độ và sản phẩm)

Ví dụ chuẩn độ hỗn hợp Bi^{3+} và Cu^{2+} với EDTA. Tại 745nm, phức tạo thành trong phần đầu của quá trình chuẩn độ giữa Bi^{3+} và EDTA không hấp thụ nhưng phức giữa Cu^{2+} và EDTA thì lại hấp thụ khá tốt. Vì thế dung dịch chuẩn độ không hấp thụ bức xạ 745nm cho đến khi toàn bộ Bi^{3+} được chuẩn độ hết. Sự tăng của mật độ quang tiếp tục tăng cho đến khi điểm tương đương của đồng. Sau đó sự thêm dung dịch chuẩn độ EDTA không làm thay đổi mật độ quang của dung dịch. Kết quả là có 2 điểm tương đương rõ rệt (Hình 3.8).



Hình 3.8. Đường cong chuẩn độ đo quang ở 745nm của dung dịch Bi^{3+} và Cu^{2+} nồng độ $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ bằng EDTA.

Chuẩn độ đo quang có thể áp dụng khi các chuẩn độ khác không thực hiện được ví dụ như:

- Không tìm được chất chỉ thị
- Không tiến hành chuẩn độ đo thể được
- Dung dịch có màu (nhưng không quá đậm)

1.5.3. Định lượng dung dịch có nhiều thành phần

❶ Tính cộng của độ hấp thụ ánh sáng và nguyên tắc định lượng nhiều thành phần:

Độ hấp thụ ánh sáng có tính chất cộng tính nên dung dịch mà chứa nhiều chất tan khác nhau thì độ hấp thụ tổng cộng sẽ là tổng của độ hấp thụ của các chất:

$$A_{\text{tổng}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots \quad (3.7)$$

Do vậy để định lượng được từng chất trong dung dịch của nhiều chất phải tiến hành loại bỏ ảnh hưởng của các chất khác đối với chất cần khảo sát. Có nhiều cách khác nhau nhưng có thể chia làm các nhóm chính:

- Dùng các biện pháp tách hẳn chất cần khảo sát ra khỏi hỗn hợp và tiến hành các thao tác định lượng thích hợp như với dung dịch của riêng một chất. Nhóm này người ta tiến hành các biện pháp chiết tách, sắc ký để loại bỏ các chất ảnh hưởng đối với chất nghiên cứu ra hỗn hợp.

- Chọn các điều kiện của phổ hấp thụ sao cho tại đó các chất khác không ảnh hưởng hoặc ảnh hưởng hầu như không đáng kể và tiến hành đo quang không cần xử lý các thành phần của hỗn hợp. Ví dụ nếu dung dịch chỉ gồm có 2 chất thì tại bước sóng cực đại (hay gần cực đại) của chất cần khảo sát mà chất kia không hấp thụ hay hầu như không hấp thụ tại đó thì có thể tiến hành đo quang bình thường. Quang phổ đạo hàm cũng thuộc nhóm này.
- Đo mật độ quang của dung dịch tại nhiều bước sóng và tiến hành xác định nồng độ từng chất tan có trong hỗn hợp.

❷ Đo quang hỗn hợp tại nhiều bước sóng:

Mỗi chất có một phổ hấp thụ UV-VIS khác nhau, tại mỗi bước sóng hệ số hấp thụ riêng của các chất thường là khác nhau. Dựa vào tính chất đó người ta có thể tiến hành đo mật độ quang của dung dịch tại một số bước sóng $\lambda_1, \lambda_2, \dots$. Tại bước sóng j , hệ số hấp thụ riêng của chất i có nồng độ C_i được ký hiệu là E_{ij} thì mật độ quang của dung dịch tại các bước sóng đó A_j sẽ là:

$$A_1 = E_{11} \cdot C_1 + E_{21} \cdot C_2 + E_{31} \cdot C_3 + \dots$$

$$A_2 = E_{12} \cdot C_1 + E_{22} \cdot C_2 + E_{32} \cdot C_3 + \dots$$

$$A_3 = E_{13} \cdot C_1 + E_{23} \cdot C_2 + E_{33} \cdot C_3 + \dots$$

.....

Giải hệ phương trình sẽ xác định được các giá trị nồng độ C_i .

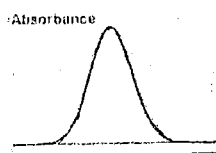
Để giải được hệ phương trình thì số lượng bước sóng khảo sát phải bằng hay lớn hơn số chất có trong dung dịch. Vấn đề quan trọng là phải chọn các bước sóng sao cho tại đó các giá trị E_{ij} là phù hợp để hạn chế sai số tính toán.

❸ Quang phổ đạo hàm:

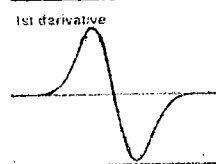
Phổ hấp thụ UV-VIS của các chất khác nhau về hình dáng. Các chất khác nhau có thể có các vị trí cực đại và điểm uốn tại các bước sóng khác nhau. Nếu lấy vi phân của mật độ quang theo bước sóng sẽ có được phổ đạo hàm bậc 1 và có thể có các phổ đạo hàm bậc cao hơn.

Hình 3.9 cho thấy bề rộng của dải phổ hình chuông càng được thu hẹp dần trên các phổ đạo hàm bậc càng cao. Do vậy việc chọn bước sóng thích hợp trên các phổ đạo hàm có thể loại được ảnh hưởng của chất này đối với chất kia trong hỗn hợp 2 chất được thực hiện dễ dàng hơn. Vì thế một trong những ưu điểm của phổ đạo hàm là có thể đo được với các dung dịch có tạp mang màu, thậm chí dung dịch đục. Mặt khác số cực trị tăng lên trên phổ đạo hàm có thể giúp cho việc định tính được tốt hơn.

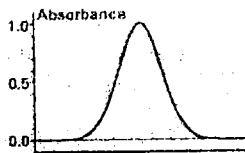
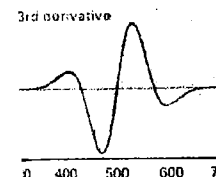
Phổ hấp thụ



Phổ đạo hàm bậc 1

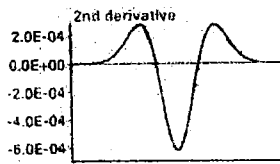


Phổ đạo hàm bậc 3

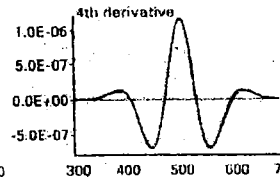


Phổ hấp thụ

Phổ đạo hàm bậc 2



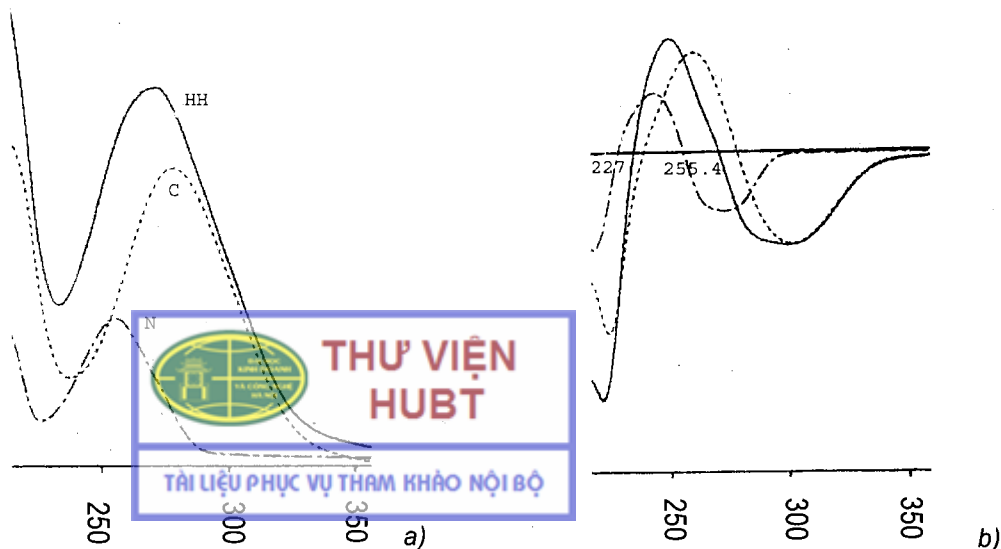
Phổ đạo hàm bậc 4



Hình 3.9. Chuyển dạng của phổ đạo hàm so với phổ hấp thụ UV-VIS

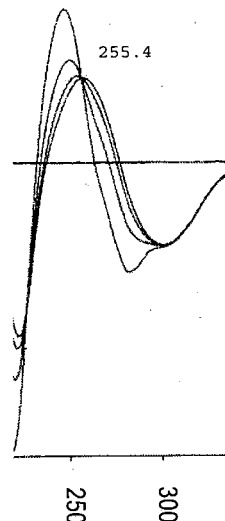
Có thể tham khảo việc ứng dụng phổ đạo hàm trong việc định lượng hoạt chất của hỗn hợp 2 thành phần trong ví dụ sau:

Thuốc nhỏ mắt Chloramphenicol 0,4% ngoài hoạt chất chính là chloramphenicol còn có các chất khác là tá dược đệm và chất bảo quản acid boric, natri borat, natri clorid và nipagin. Trong các chất này chỉ có chloramphenicol và nipagin là có khả năng hấp thụ UV-VIS. Nipagin có cực đại hấp thụ ở bước sóng 255,4 nm nên tại bước sóng này phổ đạo hàm bậc 1 có giá trị là 0 (hình 3.10).



Hình 3.10. Phổ hấp thụ UV-VIS (a) và phổ đạo hàm bậc 1 (b) của Chloramphenicol (C), Nipagin (N) và hỗn hợp của chúng (HH)

Hình 3.11 cho thấy với 4 dung dịch có cùng nồng độ chloramphenicol nhưng có các nồng độ nipagin khác nhau, phổ đạo hàm bậc một của chúng đều cắt nhau tại bước sóng 255,4 nm và 227nm (ứng với cực tiểu trên phổ hấp thụ UV-VIS của nipagin). Có nghĩa tại các bước sóng này nipagin không có ảnh hưởng đến giá trị phổ đạo hàm bậc một của chloramphenicol.



Hình 3.11. Phổ đạo hàm bậc 1 của 4 dung dịch có cùng nồng độ chloramphenicol nhưng khác nhau về nồng độ nipagin

Ngoài ra người ta còn sử dụng phương pháp phổ đạo hàm tỷ đối để định lượng. Trong phương pháp này, phổ hấp thụ của hỗn hợp (ví dụ có 3 chất A, B và C) và phổ hấp thụ của một chất chuẩn (ví dụ chất A) có nồng độ xác định được ghi. Lập tỷ số giữa độ hấp thụ của hỗn hợp và của chất A (tức tổng tỷ số của độ hấp thụ từng chất với chất A). Vì tỷ số độ hấp thụ của A trong hỗn hợp và trong dung dịch chuẩn là hằng số nên khi lấy đạo hàm giá trị này bị triệt tiêu. Do vậy đạo hàm phổ tỷ đối sẽ được đơn giản hóa chỉ còn như là phổ đạo hàm của 2 chất.

1.6. Máy quang phổ UV-VIS

Cấu tạo của các máy quang phổ UV-VIS nói chung gồm các bộ phận chính sau: nguồn sáng, bộ phận đơn sắc hoá, buồng chứa mẫu, bộ phận thu nhận và xử lý tín hiệu.

Thông thường những máy có khả năng đo được trong vùng tử ngoại đều được chế tạo để có thể đo cả được trong vùng khả kiến nhưng cũng có những máy chỉ có thể đo được trong vùng khả kiến mà thôi. Sự khác nhau này chủ yếu do cấu tạo của nguồn sáng và bộ phận đơn sắc hóa.

1.6.1. Nguồn sáng

Nguồn cung cấp ánh sáng trong các máy quang phổ UV-VIS là các đèn. Tuy theo vùng bức xạ điện từ muốn có mà người ta chọn loại đèn thích hợp, cụ thể như sau:

- Để cung cấp ánh sáng có bước sóng trên 320nm người ta thường sử dụng đèn dây tóc wonfram (tungsten) hoặc đèn halogen.
- Nguồn cung cấp ánh sáng tử ngoại thường sử dụng trong các máy quang phổ là đèn Deuteri (D_2). Đèn này có thể cho ánh sáng có bước sóng dưới 350nm.

Với những máy quang phổ có khả năng làm việc cả tử ngoại và khả kiến thường có bố trí cả 2 đèn. Việc chuyển đèn sử dụng có thể tự động hay cơ học trong vùng 320-350nm.

1.6.2. Bộ phận đơn sắc hóa

Tuỳ theo khả năng đơn sắc hóa cần có mà bộ phận đơn sắc hóa cũng được chế tạo khác nhau. Từ một chùm tia sáng có nhiều bước sóng khác nhau người ta có thể thu được các chùm tia đơn sắc hơn qua bộ phận đơn sắc hoá. Bộ phận đơn sắc hóa có thể là:

- *Kính lọc*: chủ yếu áp dụng với các quang kế và làm việc trong vùng khả kiến. Chùm tia thu được sau kính lọc là các tia có bước sóng chênh lệch vài chục nanomet. Các quang kế sử dụng đơn sắc hóa kiểu này thường được bố trí một bộ kính lọc cho phép làm việc ở một số bước sóng (biểu kiến) khác nhau.
- *Lăng kính*: dựa trên hiện tượng tán sắc của ánh sáng khi qua lăng kính. Với các máy làm việc cả trong tử ngoại thì vật liệu làm lăng kính phải không hấp thụ tử ngoại và thường được chế tạo từ thạch anh.
- *Cách tử*: hay dùng nhất là cách tử phản xạ. Trên mặt phản xạ của cách tử người ta bố trí rất nhiều vạch sát nhau. Khi chiếu một chùm tia lên bề mặt phản xạ của cách tử các tia sẽ bị phản xạ theo các phương khác nhau.

Khe sáng (trước buồng đo) cũng là một bộ phận tham gia vào quá trình đơn sắc hoá. Việc mở rộng khe sáng sẽ tăng được cường độ của chùm tia đi vào buồng chứa mẫu nhưng sẽ làm giảm độ đơn sắc của chùm tia. Ngược lại nếu giảm khe sáng sẽ thu được chùm tia đơn sắc hơn nhưng có thể làm cho tín hiệu quá yếu không đủ cho bộ phận thu nhận làm việc.

1.6.3. Bộ phận tiếp nhận và xử lý tín hiệu

Detector là bộ phận tiếp nhận tín hiệu có nhiệm vụ biến đổi các tín hiệu quang thành tín hiệu điện. Detector trong các máy quang phổ có thể là các tế bào quang điện (photocell), ống nhân quang (photomultiplier), mảng diod (diode array). Nhân quang điện kiểu ống là một loại dụng cụ để thu nhận tín hiệu quang học có tính chất vạm vỡ, có độ nhạy và tính chọn lọc cao. Vùng phổ hoạt động của các detector loại này thường là từ 190-900nm với hệ số khuếch đại cỡ 10^6 (hình 3.12).



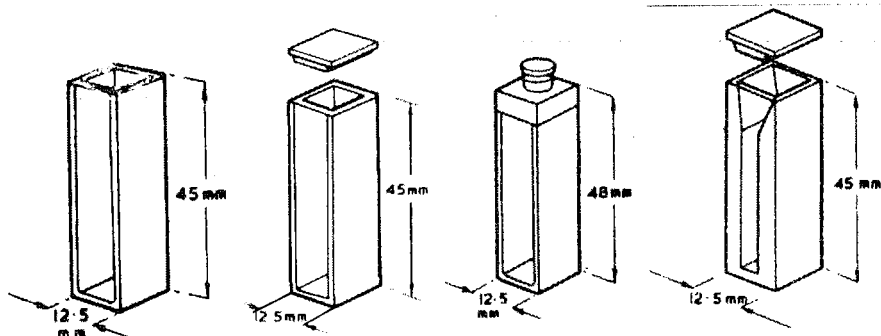
Hình 3.12. Nguyên tắc hoạt động của ống nhân quang và mảng diod

Các tín hiệu quang qua detector được chuyển thành tín hiệu điện và chuyển đến bộ phận khuếch đại. Các tín hiệu sau khuếch đại được chuyển đến

máy ghi (recorder) để vẽ phổ hay chuyển vào máy tính để xử lý tiếp và lưu lại các dữ liệu, đồng thời phổ được dựng và in ra qua máy in hay máy vẽ.

1.6.4. Buồng đo và cốc đo

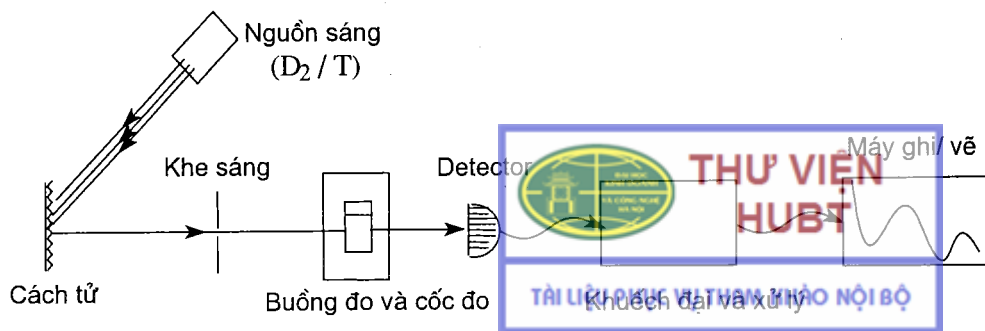
Buồng đo là buồng kín chứa các cốc đo (cuvet). Các dung dịch cần đo được để trong các cốc đo bằng thủy tinh hay nhựa trong suốt, nếu đo trong vùng tử ngoại thì cốc đo phải là thạch anh (quartz). Cốc đo thường có hình hộp chữ nhật 2 hoặc 4 mặt trong suốt và có thể có nắp đậy. Một số có cấu tạo đặc biệt để giảm thể tích nhưng vẫn đảm bảo bề dày dung dịch đo (hình 3.13).



Hình 3.13. Một số loại cốc đo dùng trong quang phổ UV-VIS.

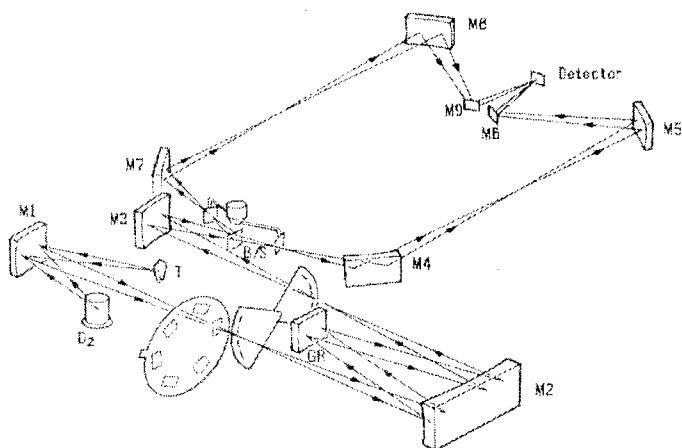
Cấu tạo của buồng đo có thể cho biết đó là máy một chùm tia hay hai chùm tia.

Sơ đồ quang của máy một chùm tia như ở hình 3.14. Với máy một chùm tia mẫu trắng và mẫu đo phải được xử lý lần lượt. Dung môi hoặc mẫu trắng được đưa vào buồng đo để chỉnh giá trị mật độ quang về 0. Sau đó dung dịch đo được đưa vào đo để xác định giá trị. Việc chuyển mẫu đo có thể cơ học bằng các thay thế qua cửa buồng đo hay bằng hệ thống kéo khay chứa cốc cần đo vào vị trí thích hợp.



Hình 3.14. Sơ đồ quang của máy quang phổ một chùm tia.

Với máy hai chùm tia cả mẫu trắng và mẫu đo được đặt cùng trong buồng đo và chùm tia đơn sắc tuần tự đi qua mẫu trắng và mẫu đo nhờ các hệ thống gương quay. Hình 3.15 cho thấy sơ đồ quang của một máy quang phổ tử ngoại khả kiến hai chùm tia.



Hình 3.15. Sơ đồ quang của máy quang phổ hai chùm tia

Với các máy quang phổ UV-VIS hiện nay đều có thể thực hiện đo cả ở chế độ đo điểm, quét phổ. Hiện nay các máy quang phổ thường đi kèm với máy tính nên các thao tác xử lý dữ liệu thu được rất đa dạng. Một số máy ngoài việc cho phép ghi phổ hấp thụ bình thường có thể cho phép thu được các phổ đạo hàm với các bậc khác nhau hay có thể đưa vào các thông số để tính toán ra kết quả từ giá trị mật độ quang thu được...

2. QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI

2.1. Sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại và hình thành các đỉnh trên phổ IR

Bức xạ hồng ngoại bắt đầu từ vùng nhìn thấy đến vùng vi sóng, được kéo dài từ $0,5 - 1000\mu\text{m}$. Tuy nhiên người ta quan tâm và sử dụng nhiều bức xạ thuộc vùng $1-25\mu\text{m}$.

❶ Các kiểu dao động của phân tử:

Ở nhiệt độ bình thường các liên kết của các hợp chất đã có sự dao động như là sự chuyển dạng của phân tử. Hấp thụ bức xạ hồng ngoại làm tăng các dao động này. Có hai loại dao động phân tử là dao động hóa trị và dao động biến dạng.

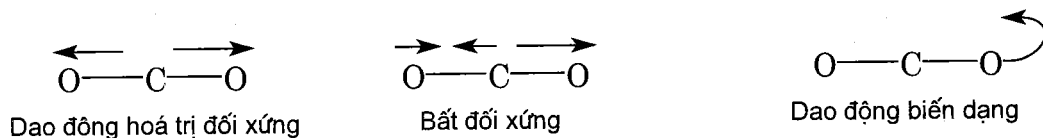
Dao động hóa trị (*valence vibration, stretching*) là chuyển động chu kỳ dọc theo trục liên kết làm thay đổi khoảng cách giữa các nguyên tử có liên kết với nhau trong phân tử.

Dao động biến dạng (*deformation vibration, bending*) có thể bao gồm thay đổi góc giữa các liên kết hoặc chuyển động của nhóm các nguyên tử so với phần còn lại của phân tử... có thể là các dao động xoắn, uốn, cắt kéo...

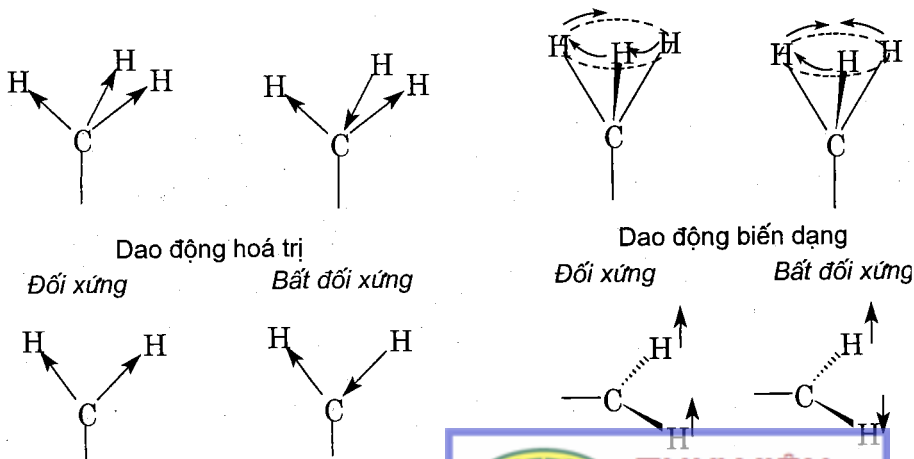
Hãy hình dung hai khối cầu nối với nhau bằng một lò xo không trọng lượng thì năng lượng cần thiết để uốn cong bé hơn rất nhiều so với năng lượng

để kéo chúng ra xa hay ép chúng lại gần nhau hơn. Chính vì thế mà năng lượng cần cho dao động biến dạng yêu cầu bé hơn năng lượng cần cho dao động hóa trị tương ứng. Bức xạ hồng ngoại có bước sóng lớn hơn $100\mu\text{m}$ được phân tử hữu cơ hấp thụ và chuyển thành năng lượng quay cực phân tử. Sự hấp thụ năng lượng cũng được lượng tử hóa do đó phổ quay của phân tử bao gồm những vạch rõ rệt. Bức xạ hồng ngoại ở trong vùng $1\text{-}100\mu\text{m}$ được phân tử hữu cơ hấp thụ và chuyển thành năng lượng dao động phân tử và trên phổ xuất hiện những đỉnh rộng hơn vì năng lượng dao động bao giờ cũng kèm theo một số biến thiên năng lượng quay. Năng lượng của bức xạ hồng ngoại không đủ để làm thay đổi trạng thái năng lượng của electron mà chỉ đủ để thay đổi trạng thái dao động nên phổ IR còn được gọi là phổ dao động.

Trong các phân tử có nhiều nguyên tử sẽ có nhiều liên kết và số dao động có thể có cũng tăng lên. Một phân tử có n nguyên tử ($n > 2$) sẽ có thể có $3n-6$ kiểu dao động có thể với $n-1$ dao động hóa trị và $2n-5$ dao động biến dạng. Cả hai loại dao động này đều có thể đối xứng hay bất đối xứng. Ví dụ các dao động có thể có với CO_2 như sau:



hoặc trong nội bộ nhóm CH_3 hay nhóm CH_2 có thể có các dao động sau đây:



2 Sự tách ghép các đỉnh hấp thụ và cộng hưởng Fermi:

Tuy nhiên khi năng lượng dao động của hai liên kết cạnh kề gần sát nhau thì chúng có thể tương tác và cặp đôi với nhau. Nếu sự tương tác là đủ mạnh đỉnh hấp thụ gốc bị mất và hình thành đỉnh hấp thụ mới. Nếu sự tương tác yếu thì có thể nhận được cả đỉnh hấp thụ nguyên thủy và đỉnh mới. Các đỉnh mới xuất hiện trên phổ có thể do sự bội tần nhân đôi (overtones) hay nhân ba (harmonics) số đỉnh cơ sở ban đầu. Mặt khác cũng có thể xuất hiện sự ghép đôi chính giữa các đỉnh bội tần với các đỉnh cơ sở thích hợp. Hiện tượng này được gọi là cộng hưởng Fermi do Enrico Fermi phát hiện ra.

3 Tần số và cường độ hấp thụ:

Sự thay đổi vị trí của các nguyên tử tham gia vào một liên kết tuân theo định luật Hooke. Tần số của bức xạ điện từ có thể hấp thụ được tính theo biểu thức:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.8)$$

với
$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

Trong đó: μ là khối lượng rút gọn của liên kết và được tính từ khối lượng của hai nguyên tử liên kết m_1 và m_2 ;

c là vận tốc ánh sáng;

k là hệ số phụ thuộc lực liên kết

Tần số dao động của một liên kết tăng khi lực liên kết tăng và giảm khối lượng các nguyên tử.

Cường độ hấp thụ của các đỉnh không quan trọng như trong phổ UV-VIS nên bình thường ít được chú ý. Các đỉnh chỉ được phân loại đơn giản theo mức độ mạnh, trung bình và yếu.

Nói chung momen lưỡng cực của liên kết hay nhóm lớn hơn thì cường độ hấp thụ lớn hơn. Momen lưỡng cực thay đổi tùy thuộc vào độ lớn các điện tích và khoảng cách giữa chúng. Vì vậy các phân tử bất đối xứng và có chứa nhiều nguyên tử thường có nhiều khả năng hấp thụ bức xạ hồng ngoại. Còn các phân tử nhỏ hay phân tử có các nguyên tử xếp thẳng hàng thì khó có những hoạt động trong vùng hồng ngoại. Vì thế các yếu tố phân cực như là nhóm carboxyl sẽ nâng đỉnh hấp thụ một cách rõ rệt so với hợp chất gốc. Tuy nhiên cũng có những ngoại lệ như nhóm $C \equiv N$ lại chỉ cho một đỉnh hấp thụ yếu.

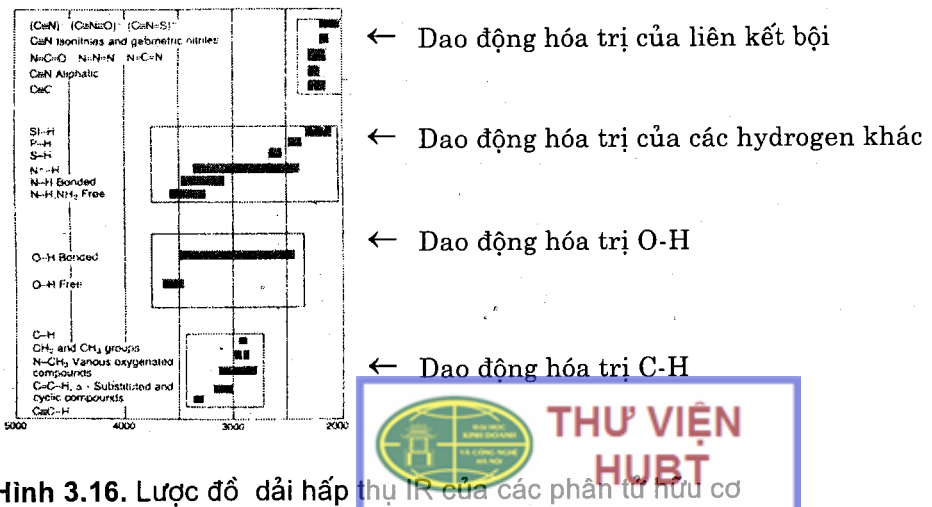
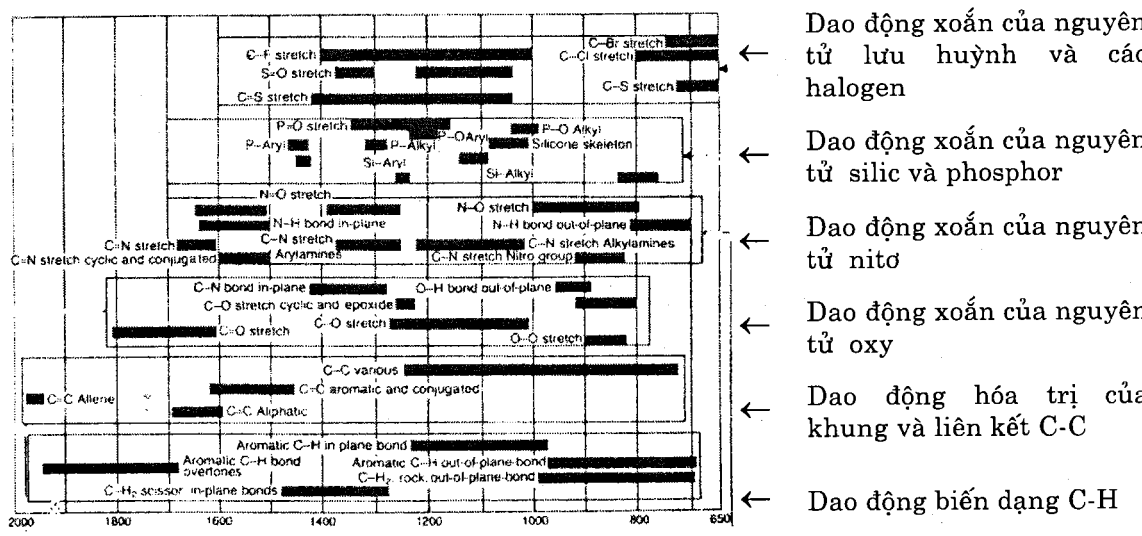
2.2. Các ứng dụng của quang phổ hồng ngoại

Cường độ của các đỉnh trên phổ hồng ngoại không chi tiết như trong phổ UV-VIS mà chỉ có tính chất tương đối nên ít được sử dụng để định lượng. Vì thế quang phổ hồng ngoại chủ yếu được ứng dụng cho định tính các hợp chất.

Có hai ứng dụng chính phổ hồng ngoại như một công cụ phân tích là nhận ra các nhóm chức đặc biệt trong phân tử và định tính các chất bằng cách so sánh với phổ chuẩn. Tuy vậy, với sự phát triển của kỹ thuật chuyển dạng Fourier (FT: *Fourier transform*), quang phổ hồng ngoại FTIR ngày càng được ứng dụng để định lượng nhiều hơn.

Trong quá trình phân lập cũng như tổng hợp hóa học những đỉnh đặc trưng cho các nhóm chức có thể giúp nhận diện cấu trúc của hợp chất chưa biết hay dự kiến tổng hợp ra. Với quang phổ hồng ngoại người ta có thể phân

biệt giữa một aldehyd và một ceton hay giữa một amin và một amid bằng cách xem xét các dữ liệu phổ thu được từ hợp chất phân tích. Tuy nhiên trừ các chất rất đơn giản, phổ hồng ngoại của tất cả các chất là rất phức tạp vì vậy thường cần phải biện giải phổ để xác định các nhóm chức có trong hợp chất. Trên phổ IR có thể có hơn 10% đỉnh khó mà gán chính xác cho các nhóm chức cụ thể vì thế nhiều khi phải nhờ hỗ trợ từ kết quả của phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, thậm chí cả phổ tử ngoại.



Hình 3.16. Lược đồ dải hấp thụ IR của các phân tử hữu cơ

Đối với hầu hết các hợp chất dạng phân tử, phổ IR là đơn nhất và đặc trưng trong vùng $1350-750\text{ cm}^{-1}$ - được gọi là “vùng vân tay” (*fingerprint region*). Người ta thường dựa vào tín hiệu phổ trong vùng này để kết luận sự không có mặt của một nhóm chức nào đó. Nếu trên phổ không có các đỉnh đặc trưng của nhóm chức trong vùng này có thể kết luận là phân tử của chất được ghi phổ không có các nhóm chức này. Tuy nhiên cũng cần chú ý một vài đặc trưng có thể cho đỉnh yếu hay đỉnh quá rộng đến nỗi rất khó quan sát.

Những vùng quan trọng khác thường được chú ý trong khi biện luận phổ IR là vùng $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ và $2000-1500\text{ cm}^{-1}$. Đây là vùng xuất hiện dao động hóa trị của liên kết hydro - dị tố và vùng dao động của các liên kết bội như là anken, carbonyl. Dưới đây là một số đỉnh đặc trưng trên phổ IR (cm^{-1}):

Dao động hóa trị -O-H:

Không có liên kết hydro:	3600
Có liên kết hydro:	3100-3200

Nhóm carbonyl: luôn cho đỉnh dao động hóa trị mạnh trong vùng $1630-1850\text{ cm}^{-1}$

Ceton ($\text{R}-\text{CO}-\text{R}'$)	1700-1725
Aldehyd ($\text{R}-\text{CHO}$)	1720-1740
Aldehyd hoặc ceton thơm hay không no α,β	1660-1715
Cyclopentanon	1740-1750
Cyclobutanon	1760-1780
Acid carboxylic	1700-1725
Ester ($\text{R}-\text{CO}-\text{OR}'$)	1735-1750
Phenolic ester ($\text{R}-\text{CO}-\text{OAr}$)	1770-1800
Ester thơm ($\text{Ar}-\text{CO}-\text{OR}'$) / ester không no α,β	1715-1730
δ -Lacton	1735-1750
γ -Lacton	1760-1780
Amid ($\text{R}-\text{CO}-\text{NR}'\text{R}''$)	1630-1690
Clorid acid ($\text{R}-\text{CO}-\text{Cl}$)	1785-1815
Anhydrid acid ($\text{R}-\text{CO})_2\text{O}$	1740-1850

Các nhóm hấp thụ vùng $1900-2600\text{ cm}^{-1}$:

Alkyn ($-\text{C}\equiv\text{C}-$)	2100-2300
Nitril ($-\text{C}\equiv\text{N}$)	~ 2250
Cyanat ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$)	~ 2270
Thiocyanat ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$)	~ 2150
Allen ($>\text{C}=\text{C}=\text{C}<$)	~ 1950

Các nhóm chức phân cực phổ biến:

Amin ($>\text{N}-\text{H}$)	3300-3500
Imin ($>\text{C}=\text{N}-$)	1480-1690
Nitro ($-\text{NO}_2$)	1500-1650
	1250-1400 (trung bình)

Sulfoxid ($>S=O$)	1010-1070
Sulfon ($>SO_2$)	1300-1350
	1100-1150
Sulfonamid ($-SO_2-N<$)	1140-1180
Sulfonat ester ($-SO_2-O-$)	1300-1370
Alkyl fluorid ($R-F$)	1000-1400
Alkyl clorid ($R-Cl$)	580- 780
Alkyl bromid ($R-Br$)	560- 800
Alkyl iodid ($R-I$)	500- 600

2.3. Máy quang phổ hồng ngoại và một số chú ý khi đo

2.3.1. Máy quang phổ hồng ngoại

Máy quang phổ hồng ngoại hiện nay là các máy 2 chùm tia gồm có các bộ phận chính: nguồn bức xạ hồng ngoại, ngăn đựng mẫu đo, bộ phận đơn sắc hoá, hệ thống quang học và bộ phận phát hiện.

Bức xạ hồng ngoại được phát ra từ nguồn đốt nóng bằng điện dưới dạng dây tóc hay ống, được điều chế bằng các zirconi oxyd, thori, ceri hay bằng silic carbid.

Bộ phận phát hiện có thể là một cặp nhiệt điện hay điện trở nhiệt. Chênh lệch tín hiệu giữa 2 chùm tia được khuếch đại và chuyển trực tiếp ra máy ghi hay máy vẽ thành phổ IR, thông thường là biểu thị độ truyền qua T theo số sóng. Thời gian ghi phổ bị giới hạn bởi tốc độ di chuyển của bút ghi. Kỹ thuật chuyển dạng Fourier cho phép thực hiện đồng thời nhiều quá trình quét với tốc độ cao và các dữ liệu thu được từ các quá trình riêng lẻ được máy tính xử lý kết hợp và nhiễu được nền bị loại bỏ trước khi phổ được in ra. Mặc dù quang phổ FTIR khá đắt nhưng có thể cho phổ phân giải cao nhanh và chỉ cần một lượng mẫu nhỏ. Cho nên kỹ thuật này đặc biệt hữu ích trong phân tích nhanh các hợp chất được tách ra khỏi cột sắc ký.

2.3.2. Chuẩn bị mẫu đo phổ IR

Phổ hồng ngoại có thể đo được với các mẫu rắn, lỏng và khí.

Các mẫu khí hay các chất lỏng có độ sôi thấp được đưa vào các cốc đo (bằng hút chân không) có độ dài quang học tương đối lớn khoảng chục centimet.

Các chất lỏng có thể đo trực tiếp hay dưới dạng dung dịch. Thông thường các mẫu lỏng được ép giữa 2 cửa sổ muối với độ dày mỏng. Nếu dùng dung môi thì dung môi phải hoàn toàn khan. Nếu phải đo toàn phổ thì phải dùng các cặp dung môi thích hợp, thường dùng là carbon tetrachlorid (hầu như không hấp thụ trên 1333 cm^{-1}) và carbon disulfid (ít hấp thụ dưới 1333 cm^{-1}).

Các mẫu rắn được phân tán trong KBr hoặc KCl đã sấy khô với tỷ lệ khoảng 1: 200 rồi ép dưới dạng film mỏng dưới áp lực cao có hút chân không để loại bỏ hơi ẩm. Cũng có thể trộn thành bột nhão chất rắn cần đo phổ với một lượng dầu parafin hay chất lỏng phù hợp khác và ép bột nhão giữa 2 tấm phẳng trong suốt với hồng ngoại.

Trong những trường hợp cần ghi phổ bằng phản xạ nhiều lần mẫu được chuẩn bị với tấm thali bromo-iodid bằng cách bốc hơi dung dịch của chất cần đo trong dung môi thích hợp hay đặt mẫu rắn tiếp xúc đồng đều trên tấm.

2.3.3. Một số chú ý khi ghi và xử lý phổ IR

Không có một qui tắc nghiêm ngặt nào trong biện luận phổ IR tuy nhiên có một số yêu cầu đề ra trước khi biện luận như sau:

- Phổ phải có độ phân giải và cường độ thích hợp.
- Chất đo phổ phải tinh khiết.
- Thiết bị phải được chuẩn hóa đúng số sóng (tần số, bước sóng) thường với bản film polystyren chuẩn (có thể kết hợp kiểm tra độ phân giải).
- Chuẩn bị mẫu đo phải thực hiện đúng kỹ thuật, nếu dùng đến dung môi thì cần phải ghi rõ tên dung môi, nồng độ và bề dày cốc đo.
- Cần chú ý các đỉnh yếu (như là các đỉnh của alkyn và nitril...) nếu cần thiết phải ghi lại phổ với nồng độ mẫu cao hơn.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 3.1. Tính chất của vùng tử ngoại khả kiến?
- 3.2. So sánh chênh lệch mức năng lượng ở trạng thái kích thích so với trạng thái cơ bản của các electron có khả năng hấp thụ bức xạ UV-VIS?
- 3.3. Nêu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ UV-VIS của một chất?
- 3.4. Trình bày các ứng dụng chính của phương pháp UV-VIS?
- 3.5. So sánh các phương pháp định lượng dung dịch một thành phần với quang phổ UV-VIS?
- 3.6. Trình bày các biện pháp để có thể định lượng dung dịch có nhiều thành phần với quang phổ UV-VIS?
- 3.7. Mô tả cấu tạo cơ bản của một máy quang phổ UV-VIS?
- 3.8. Sự khác biệt về cấu tạo của máy một chùm tia với máy 2 chùm tia?
- 3.9. Ứng dụng của quang phổ IR? Những chú ý khi ghi phổ IR?

- 3.10. Tại sao người ta lại phải biện giải phổ IR để xác định cấu trúc của chất ghi phổ?
- 3.11. Hãy chuyển đổi các giá trị mật độ quang sau thành độ truyền qua T (tính theo %):
- a) 0,064 b) 0,760 c) 0,310 d) 0,209
- 3.12. Hãy chuyển đổi các giá trị độ truyền qua T sau thành mật độ quang:
- a) 19,4% b) 0,863 c) 79,8% d) 0,100
- 3.13. Một dung dịch của chất A (có $M=220$) nồng độ $3,75\text{mg}/100\text{mL}$ có độ truyền qua là 39,6% khi đo trong cuvet $1,00\text{cm}$ ở 480nm . Hãy tính độ hấp thụ phân tử của chất A ở 480nm ?
- 3.14. Một dung dịch K_2CrO_4 có nồng độ $2,06 \cdot 10^{-4}\text{M}$ có mật độ quang là 0,762 khi đo trong cuvet $1,00\text{cm}$ ở 275nm . Hãy tính độ hấp thụ riêng của K_2CrO_4 ở 275nm ?
- 3.15. Cân chính xác $0,1500\text{g}$ chất Y tinh khiết pha thành $100,0\text{ mL}$ dung dịch. Lấy chính xác $5,00\text{ mL}$ dung dịch trên pha thành $100,0\text{ mL}$ dung dịch. Đo mật độ quang của dung dịch vừa pha được ở trên máy quang phổ với cuvet dày $1,00\text{ cm}$ tại bước sóng 270 nm thu được giá trị là 0,420. Tính hệ số hấp thụ riêng ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) và hệ số hấp thụ mol (ϵ) của chất Y tại bước sóng 270nm ? Biết chất Y có khối lượng mol là 200.
- 3.16. Một chất X có 2 cực đại hấp thụ tại 280 và 420nm . Cân chính xác $0,0250\text{g}$ chất X tinh khiết pha thành $100,0\text{mL}$ dung dịch (dung dịch A). Lấy $10,00\text{mL}$ dung dịch A pha thành $100,0\text{ mL}$ dung dịch. Đo mật độ quang của dung dịch vừa pha được ở trên máy quang phổ với cuvet dày $1,00\text{cm}$ tại bước sóng 280 nm thu được giá trị là 0,420. Lấy $5,00\text{mL}$ dung dịch A pha thành $100,00\text{mL}$ dung dịch và đo mật độ quang với cuvet trên tại 420nm thu được giá trị là 0,330.
- a) Tính hệ số hấp thụ riêng $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ của chất Y tại bước sóng 270nm và 350nm .
- b) Nếu ứng dụng phương pháp quang phổ UV-VIS để định lượng chất X này thì nên tiến hành tại bước sóng nào?
- 3.17. Một chất M có cực đại hấp thụ ở 350nm . Đo mật độ quang của 5 dung dịch chuẩn và 2 dung dịch X có nồng độ chưa biết của chất M là X và Y ở 350nm trong cùng một cuvet, kết quả như sau:

Dung dịch	A	B	C	D	E	X	Y
Nồng độ ($10^{-2}\%$)	2	4	6	8	10	x	y
Mật độ quang	0,210	0,335	0,450	0,580	0,700	0,880	0,500

- a) Với các số liệu trên có cần phải xử lý gì thêm với mẫu không?
- b) Nồng độ % của M trong dung dịch Y tính theo đường chuẩn là bao nhiêu?
- c) Nếu tính theo phương pháp so sánh thì chọn dung dịch nào là dung dịch chuẩn? So sánh kết quả nồng độ M trong mẫu Y tính được với kết quả vừa tính ở mục b?
- 3.18. Pha loãng dung dịch X ở (bài 3.17) 2 lần bằng chính dung môi đã sử dụng để được dung dịch Z. Đo mật độ quang của dung dịch Z cùng điều kiện trên được giá trị là 0,520.
- a) So sánh mật độ quang của 2 dung dịch X và Z? Giải thích tại sao?
- b) Tính nồng độ M trong dung dịch X trực tiếp theo đường chuẩn và qua dung dịch Z? So sánh 2 kết quả?
- 3.19. Một chất Z có cực đại hấp thụ tại 350nm. Nồng độ chất Z trong dung dịch A được xác định như sau:
- Lấy 5,00 mL dung dịch A pha loãng bằng nước vừa đủ 100,0 mL. Đo mật độ quang ở bước sóng 350nm, với cuvet dày 1,00cm, được giá trị D_1 là 0,264.
 - Làm tương tự trên nhưng thêm 10,00 mL dung dịch của chất Z có nồng độ $10^{-2}\%$ (kl/tt) trước khi định mức đủ 100,0 mL. Đo mật độ quang như trên được giá trị D_2 là 0,308.
- a) Phương pháp định lượng này là phương pháp gì và mục đích của phương pháp này?
- b) Tính % (kl/tt) của Z trong dung dịch A?
- 3.20. Để xác định nồng độ của chất A (có cực đại hấp thụ ở 400nm) trong một mẫu thử với một dung dịch có nồng độ đã biết của nó là $2 \cdot 10^{-2}\%$ bằng phương pháp thêm đường chuẩn thì phải tiến hành như thế nào? Hãy mô tả các bước và cách làm?
- 3.21. Mật độ quang của một dung dịch có chứa hai chất A và B ở bước sóng 440nm và 560nm có giá trị là 0,510 và 0,425. Biết hệ số hấp thụ mol của chất A và chất B ở 440nm lần lượt là 955 và 0, ở 560nm lần lượt là 167 và 1178. Tính nồng độ mol/L của từng chất trong dung dịch trên?
- 3.22. Mật độ quang của một dung dịch có chứa hai chất A và B ở bước sóng 440nm và 560nm đều có giá trị là 0,510. Biết hệ số hấp thụ riêng của chất A và chất B ở 440nm lần lượt là 955 và 60, ở 560nm lần lượt là 167 và 1200. Tính nồng độ % của từng chất trong dung dịch trên, biết khối lượng mol của chất A và chất B là 200 và 300?

QUANG PHỔ HẤP THỤ VÀ PHÁT XẠ NGUYÊN TỬ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc của của phương pháp AAS và ứng dụng của nó.
2. Mô tả được cấu tạo của một máy AAS và chỉ ra điểm khác trong cấu tạo của máy AAS với máy AES.
3. Nêu được các quá trình chính xảy ra trong quá trình nguyên tử hóa mẫu và các yếu tố ảnh hưởng với 2 kỹ thuật chính: ngọn lửa và không ngọn lửa.
4. Trình bày được nguyên tắc của của phương pháp AES và ứng dụng của nó.

1. QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử là phương pháp xác định nồng độ các nguyên tố trong một chất bằng cách đo độ hấp thụ bức xạ bởi hơi nguyên tử tự do của nguyên tố đó được hóa hơi từ chất thử. Phương pháp được tiến hành ở bước sóng của một trong những vạch hấp thụ của nguyên tử cần xác định.

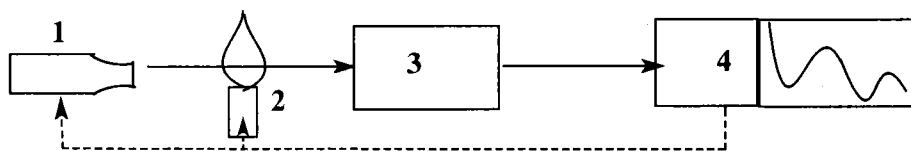
1.1. Nguyên tắc

Khi nguyên tử ở trạng thái hơi có thể hấp thụ các bức xạ có bước sóng xác định. Phổ hấp thụ của các nguyên tử là phổ vạch. Vì vậy muốn thực hiện được phép đo quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) cần phải có các quá trình sau:

- Chọn các điều kiện và trang thiết bị phù hợp để chuyển mẫu phân tích từ trạng thái ban đầu thành trạng thái hơi của nguyên tử tự do.
- Chiếu chùm tia sáng thích hợp (với nguyên tố cần phân tích và còn được gọi là bức xạ cộng hưởng) qua đám hơi nguyên tử vừa tạo ra ở trên. Các nguyên tử của nguyên tố cần phân tích trong đám hơi sẽ hấp thụ một phần bức xạ và tạo ra phổ hấp thụ nguyên tử. Phần bức xạ bị hấp thụ phụ thuộc vào nồng độ của nguyên tử đó trong môi trường hấp thụ.
- Nhờ các bộ phận của máy quang phổ mà người ta thu, phân ly và chọn vạch phổ của nguyên tố cần nghiên cứu và đo cường độ của nó.

1.2. Cấu tạo chính của máy quang phổ hấp thụ nguyên tử

Cấu tạo của một máy AAS gồm các bộ phận chính sau: nguồn bức xạ (1), bộ phận hóa hơi hay nguyên tử hóa mẫu (2), bộ phận đơn sắc hóa (3) và bộ phận phát hiện và khuếch đại (4).



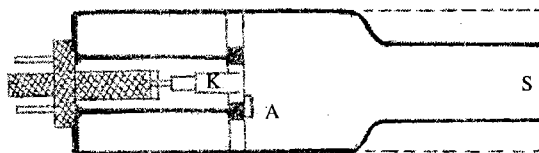
1.2.1. Nguồn phát bức xạ cộng hưởng

Nguồn phát bức xạ cộng hưởng của nguyên tố cần xác định có thể là đèn catod rỗng (HCL: hollow cathode lamp), đèn phóng điện không điện cực (EDL) hay đèn phát phổ liên tục bị biến điệu (D_2 - lamp, W-Lamp)...

❶ Đèn catod rỗng (HCL): gồm có 3 phần: thân đèn và cửa sổ, các điện cực, khí chứa trong đèn.

Thân đèn gồm vỏ đèn, cửa sổ và giá đỡ các điện cực. Vỏ đèn được chế tạo bởi thủy tinh hay thạch anh chịu nhiệt. Cửa sổ có thể là thủy tinh hay thạch anh tùy theo phát bức xạ thuộc vùng nào.

Trong đèn phải được hút hết khí và thay vào đó là một khí trơ như heli, argon hay nitơ với áp suất 5-15 mmHg nhưng với độ sạch cao vì yêu cầu khí trong đèn phải không phát ra phổ làm ảnh hưởng đến chùm tia phát xạ của đèn.



Hình 4.1. Cấu tạo của đèn catod rỗng

Anod và các dây dẫn được chế tạo từ các kim loại trơ và bền với nhiệt như vonfram. Catod được chế tạo dưới dạng ống rỗng bằng chính kim loại cần phân tích với độ tinh khiết cao (>99,99%). Đèn được đốt nóng nhờ một nguồn điện một chiều ổn định với thế làm việc thường là 250-400V và dòng khoảng 3-50mA. Khi đèn làm việc catod bị nung đỏ và xảy ra sự phóng điện liên tục. Các ion sinh ra tấn công vào bề mặt catod đang bị nung đỏ làm cho một số nguyên tử bề mặt bị hóa hơi thành nguyên tử tự do và dưới tác dụng của nhiệt độ chúng bị kích thích và phát ra phổ phát xạ của nó. Đó chính là phổ vạch của chính kim loại làm catod rỗng nhưng trong môi trường khí trơ và áp suất thấp nên phổ phát xạ chỉ gồm các vạch nhạy của kim loại đó mà thôi.

Ngoài những đèn HCL đơn, người ta cũng chế tạo ra những đèn kép cho hai nguyên tố (Ca-Mg, Cu-Mn, Cu-Cr, Co-Ni, K-Na, Cu-Pb...), cho ba nguyên tố (Cu-Pb-Zn) thậm chí là tổ hợp sáu nguyên tố (Cu-Mn-Cr-Fe-Co-Ni). Với các đèn kép, catod của đèn phải là hợp kim của các nguyên tố với thành phần phù hợp để sao cho cường độ phát xạ của các nguyên tố là gần như nhau nghĩa là sự phát xạ của nguyên tố này không được lấn át nguyên tố kia ví dụ với đèn tổ hợp 6 nguyên tố trên thì riêng Cu chiếm 25% còn 5 nguyên tố còn lại là 15%. Nói chung đèn kép có độ nhạy kém đèn đơn tương ứng.

② Đèn phóng điện không điện cực (EDL):

Về cấu tạo, đèn EDL thực chất là ống phóng điện trong môi trường khí kém có chứa nguyên tố cần phân tích với một nồng độ nhất định. Đèn là một ống thạch anh chịu nhiệt được quấn quanh một cuộn dây cao tần công suất 200-400W, có chứa vài miligam kim loại hay muối kim loại dễ bay hơi để sao cho khi đèn ở nhiệt độ 200-400°C thì áp suất hơi của kim loại đó đạt được khoảng 1-1,5mmHg. Nguồn năng lượng nuôi đèn có thể là 2450 MHz hay 25,12 MHz.

③ Đèn phổ liên tục có biến điệu:

Đó là đèn hydro nặng (deuteri, D₂ lamp), các đèn xenon có áp suất cao, các đèn halogen. Đó là các đèn phát ra phổ liên tục trong vùng UV-VIS nhưng nhờ hệ thống biến điệu và lọc giao thoa nên chùm sáng phát xạ bị biến điệu và lượng tử hóa thành chùm sáng không liên tục có phổ dạng răng cưa. Ưu điểm là dễ chế tạo, rẻ tiền và có độ bền cao có thể áp dụng với nhiều nguyên tố nhưng độ đơn sắc và độ chọn lọc kém các đèn HCL.

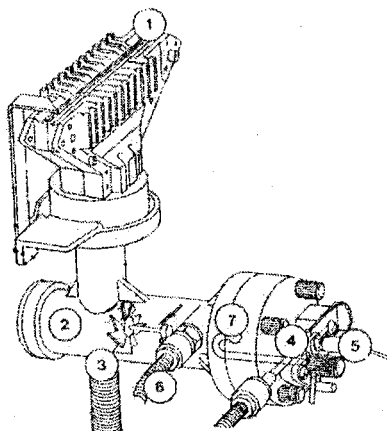
1.2.2. Bộ phận nguyên tử hóa mẫu

Trong phép đo AAS người ta có thể tiến hành nguyên tử hóa mẫu theo 2 kỹ thuật ngọn lửa (F-AAS) và không ngọn lửa (ETA-AAS). Tương ứng với 2 kỹ thuật đó có các dụng cụ nguyên tử hóa mẫu khác nhau.

① Trang bị nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật ngọn lửa:

Trước hết mẫu phân tích được chuẩn bị dưới dạng dung dịch. Sau đó dung dịch mẫu được dẫn vào ngọn lửa đèn khí để nguyên tử hóa mẫu và thực hiện phép đo. Quá trình qua 2 bước chính:

- Chuyển dung dịch thành các hạt sương cùng với khí mang và khí cháy, đó là các hạt sol khí (aerosol).
- Chuyển hỗn hợp aerosol hóa cùng hỗn hợp khí đốt vào đèn (burner) để nguyên tử hóa.

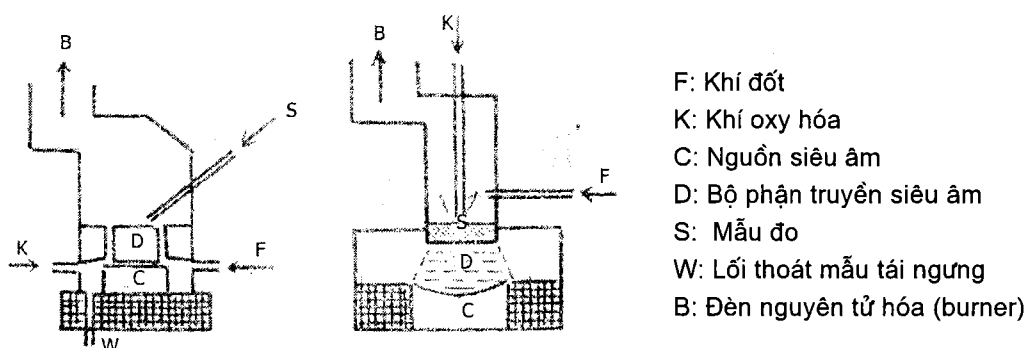


Hình 4.2. Cấu tạo của bộ phận nguyên tử hóa bằng phun khí

- | | |
|-----------------------|------------------|
| 1: Đèn nguyên tử hóa, | 2: Màn bảo hiểm, |
| 3: Đường thải, | 4: Khí oxy hóa, |
| 5: Đường dẫn mẫu, | 6: Khí đốt, |
| 7: Bi tạo bụi | |

Quá trình chuyển mẫu phân tích thành các hạt nhỏ được gọi là quá trình *aerosol* hóa hay *nebulization*. Để thực hiện quá trình này có thể áp dụng hai nguyên lý khác nhau là phun khí (pneumatic) hay dùng siêu âm (ultrasonic). Với nguyên lý phun khí nhờ ống mao dẫn và luồng khí mang (thường cũng là khí oxy hoá) mà mẫu được đưa vào buồng aerosol hóa và đập vào hòn bi tạo hạt và được đánh tung lên nhờ một quạt rồi được trộn đều với khí đốt và đi lên đèn nguyên tử hóa mẫu, phần dung dịch thừa không được tạo hạt hay do các hạt tái ngưng lại được dẫn thoát ra ngoài.

Với nguyên lý siêu âm người dùng siêu âm có tần số 1- 4,5 MHz. Lực siêu âm có thể truyền qua pha rắn hay pha lỏng đến dung dịch aerosol hóa và dung dịch này bị đánh tơi thành các hạt nhỏ rồi trộn đều với hỗn hợp khí đốt để dẫn lên đèn.



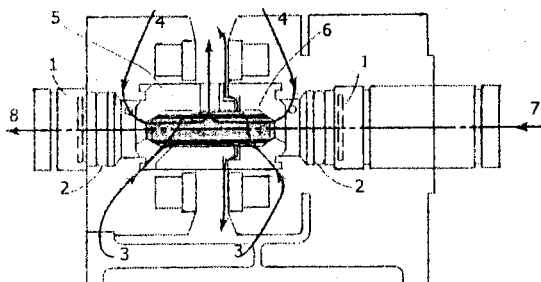
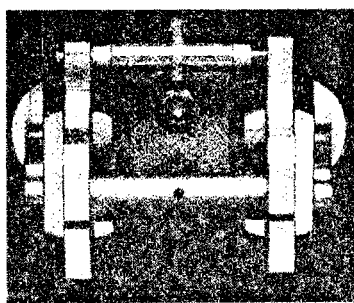
Hình 4.3. Nguyên lý nguyên tử hóa bằng siêu âm

Quá trình tiếp theo là đốt hỗn hợp aerosol của mẫu trong hỗn hợp khí đốt trên đèn nguyên tử hóa mẫu (*burner*). Hỗn hợp khí đốt được tạo thành bằng cách trộn khí đốt và khí oxy hóa với tỷ lệ thích hợp. Khí đốt có thể là acetylen, butan, propan hay hỗn hợp khí đốt. Khí oxy hóa có thể là oxy, không khí nén, N_2O ... Đèn nguyên tử hóa có nhiều hình dạng khác nhau có thể là hình tròn với nhiều lỗ hay khe hẹp (0,5 - 1 mm) dài 5-10cm cho các hỗn hợp khí đốt khác nhau (10 cm cho acetylen-không khí nén, 5cm thường dùng cho hỗn hợp acetylen- N_2O). Dưới nhiệt độ của ngọn lửa quá trình nguyên tử hóa xảy ra để hình thành đám hơi nguyên tử của nguyên tố cần xác định.

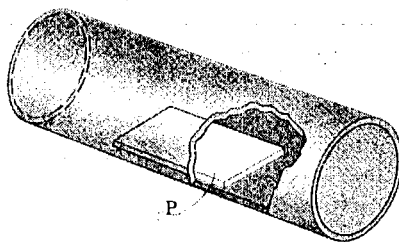
❷ Trang bị nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật không ngọn lửa:

Kỹ thuật này ra đời sau kỹ thuật ngọn lửa nhưng phát triển rất nhanh và được ứng dụng rộng rãi. Kỹ thuật này thực hiện quá trình nguyên tử hóa mẫu trong thời gian rất ngắn nhờ năng lượng của dòng điện công suất lớn và trong môi trường khí trơ.

Dụng cụ để nguyên tử hóa mẫu theo kỹ thuật này có cực graphit (lò graphit) hay các thuyền kim loại chịu nhiệt như chế tạo bằng tantal. Nguồn điện cung cấp cho lò có dòng rất cao (50-500A) nhưng lại có thế rất thấp (dưới 8,3V).



- 1: Cửa sổ
- 2: Vòng chữ O
- 3: Dòng khí bổ sung
- 4: Dòng khí vào
- 5: Lò graphit
- 6: Ống graphit
- 7: Chùm sáng
- 8: Tối bộ phận thu nhận



Ống graphit

Hình 4.4. Thiết bị nguyên tử hóa theo kỹ thuật không ngọn lửa

Quá trình xảy ra theo các giai đoạn kế tiếp nhau như sau:

- Sấy khô mẫu: đây là giai đoạn đầu tiên của quá trình nguyên tử hóa mẫu. Nó rất cần thiết để đảm bảo dung môi hòa tan mẫu bay hơi nhẹ nhàng và hoàn toàn nhưng không làm mất mẫu.
- Tro hóa và luyện mẫu: với mục đích là đốt cháy các hợp chất hữu cơ và mùn có trong mẫu đồng thời nung luyện mẫu đến nhiệt độ thích hợp thuận lợi cho giai đoạn nguyên tử hóa mẫu đạt hiệu suất cao và ổn định.
- Nguyên tử hóa: đây là giai đoạn quan trọng thường được thực hiện trong một thời gian rất ngắn thường là 3-6 giây với tốc độ tăng nhiệt độ rất lớn đạt ngay đến nhiệt độ nguyên tử hóa mẫu.
- Cuối cùng là làm sạch cuvet bằng luồng khí trơ.

1.2.3. Bộ phận đơn sắc hóa

Bộ phận đơn sắc hóa thường được đặt sau bộ phận nguyên tử hóa mẫu với mục đích chọn vạch cộng hưởng từ nguồn phát bức xạ nhiều vạch và loại bỏ những vạch nhiễu do chính ngọn lửa phát ra.

1.2.4. Bộ phận phát hiện

Bộ phận phát hiện và xử lý tín hiệu thu được tương tự như trong các máy quang phổ khác.

1.3. Các quá trình xảy ra trong nguyên tử hóa mẫu và các yếu tố ảnh hưởng

1.3.1. Với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng ngọn lửa

❶ Các quá trình có thể xảy ra:

Có rất nhiều quá trình xảy ra liên tiếp hay đồng thời với nhau trong nguyên tử hóa bằng ngọn lửa có thể tóm tắt như sau:

- Quá trình aerosol hóa mẫu.
- Sự bay hơi của dung môi để lại các hạt mẫu rắn MeA .
- Sự khuếch tán, hóa hơi, thăng hoa của mẫu ($\text{MeA}_{\text{rắn}} \Leftrightarrow \text{MeA}_{\text{lỏng}} \Leftrightarrow \text{MeA}_{\text{khí}}$ và $\text{MeA}_{\text{rắn}} \Leftrightarrow \text{MeA}_{\text{khí}}$)
- Sự phân ly ($\text{Me} + \text{A}$), ion hóa ($\text{Me}^+ + \text{A}^-$), kích thích (Me^* , MeA^* , Me^{++}), hấp thụ ($\text{Me} + h\nu$),...
- Các phản ứng phụ: khử oxy bởi carbon ($\text{MeO} + \text{C} \rightarrow \text{Me} + \text{CO}$); phản ứng giữa các nguyên tử, các gốc, các phân tử với nhau; phân tử, nguyên tử với khí ngọn lửa; sự tạo ra chất rắn ($\text{MeO} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{MeCO}_3$)...

❷ Các yếu tố ảnh hưởng:

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật F-AAS, có thể là:

- Thành phần và tốc độ của hỗn hợp khí đốt tạo ra ngọn lửa, chiều cao của đèn. Đặc biệt khác với kỹ thuật không ngọn lửa là sự ảnh hưởng của oxy.
- Tốc độ dẫn mẫu vào hệ thống nguyên tử hóa mẫu, độ nhớt của dung dịch mẫu.
- Bề dày của môi trường hấp thụ (có thể điều chỉnh bằng thay đổi góc nghiêng của đèn đốt)
- Tần số và công suất của hệ thống siêu âm.

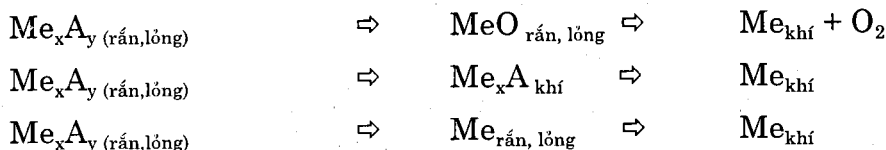
1.3.2. Với kỹ thuật nguyên tử hóa không ngọn lửa

❶ Các quá trình có thể xảy ra:

Mặc dù có 3 giai đoạn chính kế tiếp nhau nhưng là tổng thể của nhiều quá trình xảy ra liên tiếp hay đan xen với nhau, có thể chia ra làm các quá trình sau:

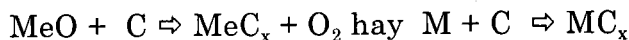
- Bay hơi của dung môi.
- Tro hóa các chất hữu cơ sẽ tạo ra CO_2 và H_2O bay đi để lại cặn vô cơ của mẫu.
- Sự hóa hơi của các hợp phần mẫu dưới dạng phân tử trước khi phân li ($E_{\text{hh}} > E_{\text{pl}}$) như với các oxyd Sb_2O_3 , Ga_2O_3 , các muối halogen như các clorid của Sb, Sn, Al, Ti, Ga.. theo sơ đồ sau: $\text{Me}_x\text{A}_y (\text{rắn, lỏng}) \Leftrightarrow \text{Me}_x\text{A}_y \text{ khí} \Leftrightarrow x\text{Me}_{\text{khí}} + y\text{A}_{\text{khí}}$

- Sự phân li của các hợp phần mẫu trước khi hóa hơi ($E_{pl} > E_{hh}$). Diễn biến của quá trình này có thể theo các sơ đồ sau:

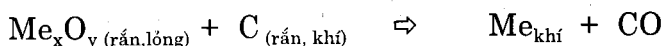


Nếu dùng lò graphit thì có thể có thêm 2 quá trình sau:

- Sự tạo thành các hợp chất carbid kim loại



- Sự khử oxyd kim loại bởi carbon:



② Các yếu tố ảnh hưởng:

Ngoài ảnh hưởng do tính chất của mẫu như tính chất của mỗi kim loại, tính chất nhiệt hóa của hợp chất đó mà quá trình phân li hay bay hơi xảy ra trước... quá trình nguyên tử hóa mẫu theo kỹ thuật ETA-AAS còn có thể chịu ảnh hưởng của các yếu tố sau:

- Môi trường khí trợ để đảm bảo nguyên tử hóa trong điều kiện không có oxy để hạn chế hình thành các hợp chất bền nhiệt loại MeO hay MeOX. Nên bản chất, thành phần tốc độ dẫn khí trợ vào cuvet đều có ảnh hưởng đến cường độ vạch phổ và nhiệt độ trong cuvet. Tốt nhất là dùng argon tiếp đến là nitơ, nhưng cần chú ý rằng dùng nitơ dễ tạo ra CN⁻ rất độc khi sử dụng lò graphit.
- Công suất đốt nóng cuvet nhìn chung cường độ vạch phổ tăng khi tăng công suất.
- Tốc độ đốt nóng cuvet tuy không ảnh hưởng đến diện tích nhưng làm thay đổi chiều cao pic trên phổ.
- Loại nguyên liệu sử dụng để làm lò nguyên tử hóa mẫu cũng ảnh hưởng đến cường độ vạch phổ như graphit có hoạt hóa toàn phần, chỉ hoạt hóa bề mặt và không hoạt hóa.
- Có thể kể đến ảnh hưởng của cả khối.

1.4. Bối cảnh nền và các yếu tố ảnh hưởng khác

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích trong AAS rất đa dạng và phức tạp. Ngoài các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện nguyên tử hóa mẫu còn phải kể đến các yếu tố ảnh hưởng về phổ, các yếu tố vật lý khác, các yếu tố hóa học, thông số của thiết bị đo và phương pháp xử lý mẫu.

Các yếu tố ảnh hưởng về phổ bao gồm: sự hấp thụ nền, sự chen lấn vạch phổ, sự hấp thụ của các hạt rắn. Trong đó yếu tố hấp thụ nền có thể xuất hiện

rất rõ rệt trong trường hợp này nhưng có thể không xuất hiện trong trường hợp khác. Điều này phụ thuộc vào vạch phổ làm việc thuộc vùng nào. Nói chung trong vùng khả kiến yếu tố này thể hiện rõ, còn trong vùng tử ngoại ảnh hưởng này ít xuất hiện. Hơn nữa sự hấp thụ nền còn phụ thuộc nhiều vào thành phần nền của mẫu phân tích. Ví dụ khi xác định chì trong mẫu sinh học bằng phép đo không ngọn lửa thì sự hấp thụ nền không xuất hiện nhưng khi xác định nó trong nước biển thì ảnh hưởng này rất lớn.

Do vậy tùy theo từng trường hợp cụ thể mà xem xét và tìm biện pháp loại trừ. Để loại trừ phổ nền người ta lắp thêm hệ thống bổ chính nền vào máy quang phổ hấp thụ nguyên tử. Trong hệ thống này người ta sử dụng các đèn tương ứng với các vùng phổ cần thiết. Ngày nay người ta còn ứng dụng hiệu ứng Zeeman để bổ chính nền. Ngoài tác dụng bổ chính nền hiệu ứng này còn làm tăng cường độ các vạch phổ hấp thụ nguyên tử của các nguyên tố.

Các yếu tố vật lý khác có ảnh hưởng đến phép đo như: độ nhớt và sức căng mặt ngoài của dung dịch mẫu, hiệu ứng lưu lại (đặc biệt với kỹ thuật không ngọn lửa), sự ion hoá, sự kích thích phổ phát xạ...

Các yếu tố hóa học ảnh hưởng đến phép đo cũng rất đa dạng và phức tạp. Các ảnh hưởng đó có thể là: nồng độ và loại acid có trong mẫu, ảnh hưởng của các cation, anion, dung môi và thành phần nền của mẫu...

1.5. Ứng dụng

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử có thể định lượng được hầu hết các nguyên tố kim loại và một số á kim như As, B nếu như có nguồn bức xạ cộng hưởng. Do vậy phương pháp được sử dụng khá rộng rãi trong công nghiệp hóa dược, trong sinh hoá, trong ngành dược, trong phân tích lương thực với một số ứng dụng cụ thể như sau:

- Xác định các nguyên tố vi lượng trong các dịch sinh học như huyết tương, máu, dịch não tủy....
- Định lượng các yếu tố vi lượng trong thuốc: Cu, Zn, Fe, Cr, Mn, thành phần dịch truyền.
- Xác định hàm lượng của các nguyên tố độc trong môi trường, vật liệu bao gói như As, Bi, Hg, Pb...

Có thể áp dụng các kỹ thuật định lượng đã được giới thiệu trong chương quang phổ UV-VIS. Trong quá trình định lượng cần chuẩn bị mẫu hết sức cẩn thận: dụng cụ phải không được dính các nguyên tố cần định lượng tốt nhất là dùng dụng cụ polyetylen dùng một lần, dung môi hóa chất sử dụng đòi hỏi độ tinh khiết cao, khí mang mẫu có độ tinh khiết cao. Đặc biệt với kỹ thuật lò tuy độ nhạy cao nhưng chịu ảnh hưởng đáng kể của tạp chất.

2. QUANG PHỔ PHÁT XẠ NGUYÊN TỬ

Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử là phương pháp xác định nồng độ các nguyên tố trong một chất bằng cách đo cường độ các vạch phát xạ

của hơi nguyên tử của nguyên tố được hóa hơi từ chất đó. Phương pháp được tiến hành ở bước sóng tương ứng với các vạch phát xạ này.

2.1. Nguyên tắc

Khi nguyên tử ở trạng thái hơi được kích thích bằng một năng lượng thích hợp có thể phát ra những bức xạ đặc trưng. Dựa vào các vạch phát xạ có thể định tính các nguyên tố và dựa vào cường độ vạch phát xạ có thể định lượng chúng.

Trong phổ phát xạ có 3 quá trình xảy ra gần như đồng thời, đó là:

- Chất thử được nguyên tử hoá: nhận được năng lượng các phân tử tách thành các nguyên tử ở trạng thái tự do.
- Các nguyên tử tự do được kích thích bằng năng lượng của ngọn lửa, tia lửa điện, hồ quang điện. Đây là giai đoạn hấp thụ để chuyển từ trạng thái năng lượng cơ bản E_0 lên trạng thái kích thích E^* .
- Nguyên tử trở về trạng thái năng lượng cơ bản ban đầu và phát ra bức xạ có tần số tương ứng.

2.2. Cấu tạo của máy quang phổ phát xạ nguyên tử

Cấu tạo của quang phổ phát xạ nguyên tử (AES) gần như quang phổ hấp thụ nguyên tử nhưng đơn giản hơn vì không cần nguồn phát xạ cộng hưởng và gồm có các bộ phận chính như sau: bộ phận nguyên tử hóa mẫu, bộ phận đơn sắc hóa và bộ phận phát hiện.

2.2.1. Bộ phận nguyên tử hóa mẫu

Trong máy quang phổ phát xạ nguyên tử quá trình nguyên tử hóa mẫu được tiến hành bằng kỹ thuật ngọn lửa. Ngọn lửa ngoài nhiệm vụ nguyên tử hóa mẫu cũng đảm nhiệm luôn vai trò cung cấp năng lượng để các nguyên tử (dạng hơi) chuyển lên trạng thái kích thích.

Do vậy cấu tạo của bộ phận này cũng tương tự như các trang bị nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật ngọn lửa trong AAS. Cũng vì thế đôi khi người ta gọi các thiết bị này là quang phổ ngọn lửa. Hình 4.5 là một máy quang phổ phát xạ nguyên tử.



Hình 4.5. Máy quang phổ phát xạ nguyên tử.

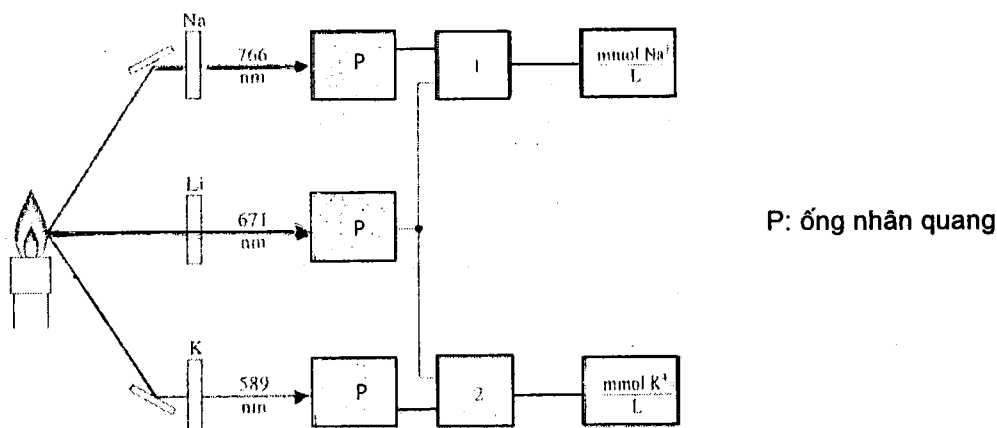
2.2.2. Bộ phận đơn sắc hóa và phát hiện

Một hỗn hợp hơi các nguyên tử của các nguyên tố khác nhau trong ngọn lửa sau khi được kích thích sẽ phát ra những vạch phát xạ đặc trưng riêng của

chúng. Bộ phận đơn sắc hóa có nhiệm vụ tách riêng vạch bức xạ của nguyên tố cần xác định. Cấu tạo của bộ phận đơn sắc cũng tương tự như của các máy quang phổ nói chung. Bộ phận phát hiện và xử lý cũng tương tự như trong các máy quang phổ khác.

Trường hợp đơn giản nhất là sử dụng các kính lọc được dùng trong các quang kế ngọn lửa. Thiết bị rất đơn giản chỉ gồm một đèn nguyên tử hóa mẫu một bộ kính lọc ứng với một số kim loại, tế bào quang điện và một đồng hồ đo. Để tập trung chùm tia phát xạ người ta bố trí thêm phía đối diện với tế bào quang điện một gương. Với cấu tạo như vậy nhưng trong một thời gian dài đã đảm nhiệm cung cấp điện giải đồ trong các bệnh viện.

Hiện nay một số thiết bị được bố trí có thể định lượng đồng thời các kim loại chủ yếu có trong máu theo sơ đồ nguyên lý ở hình 4.6.



Hình 4.6. Quang kế ngọn lửa định lượng đồng thời K và Na trong máu

2.3. Ứng dụng của quang phổ phát xạ nguyên tử

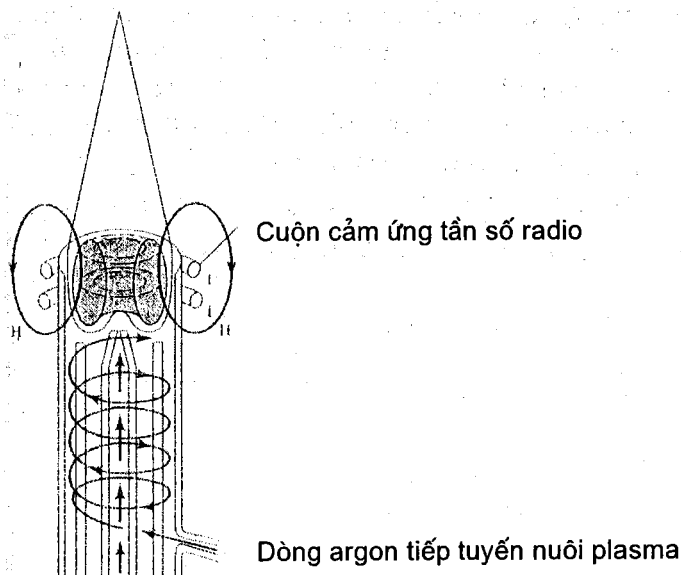
Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử chủ yếu được sử dụng để định lượng hàm lượng các kim loại có trong các dung dịch hay dịch sinh học. Việc định lượng được thực hiện bằng cách so sánh các dung dịch thử với các dung dịch chuẩn của nguyên tố cần xác định trước khi điều chỉnh giá trị đọc được về 0 bằng mẫu trắng. Ứng dụng phổ biến nhất của quang phổ phát xạ là định lượng các kim loại kiềm và kiềm thổ. Trong các bệnh viện quang phổ phát xạ nguyên tử được áp dụng phổ biến trong sinh hóa để làm điện giải đồ với các kim loại chủ yếu như Na, K, Ca và theo dõi hàm lượng Li trong máu với các bệnh nhân tâm thần được điều trị bằng lithi carbonat.

Phương pháp thêm cũng được áp dụng trong quá trình định lượng.

3. QUANG PHỔ PHÁT XẠ PLASMA (ICP)

Nguyên tắc: Plasma là một luồng khí ion hóa mang năng lượng cao, trong nó có chứa các cation và electron. Các khí trơ như argon thường được

dùng để tạo plasma. Có thể coi plasma như một ngọn lửa có nhiệt độ khoảng 1000-6000°K. Khi đưa mẫu vào plasma sẽ xảy ra các quá trình nguyên tử hoá, ion hóa và kích thích như khi đưa vào ngọn lửa. Nguyên tử chất thử bị kích thích sẽ phát ra bức xạ và tạo nên phổ phát xạ plasma.



Mẫu được aerosol hóa trong argon

Hình 4.7. Nguồn plasma

Có nhiều loại nguồn plasma nhưng phổ biến là plasma cảm ứng (hình 4.7). Lúc đầu luồng khí argon được kích thích bởi tia lửa hình thành các electron. Các electron kích thích khí argon tạo ra ion Ar^+ và electron trong quá trình khí argon đi lên. Đến khi gặp cuộn cảm ứng và chịu tác động của từ trường do cuộn cảm ứng gây ra, luồng ion Ar^+ và electron chuyển động hỗn loạn kích thích các nguyên tử khác tạo thành một hệ thống năng lượng cao có hình vành khăn.

Mẫu phân tích có thể là chất khí, lỏng, rắn dưới dạng dung dịch. Nếu mẫu dưới dạng chất lỏng hay dung dịch thì cần được aerosol hóa và đưa vào plasma với tốc độ thích hợp.

Phương pháp phát xạ plasma có giới hạn phát hiện và độ chính xác tương tự như AAS nhưng vùng tuyến tính rộng hơn, định lượng được nhiều nguyên tố nhanh hơn. Phương pháp này được ứng dụng để phân tích các kim loại và một số á kim.

Bảng 4.1. Giới hạn phát hiện của một số phương pháp quang phổ nguyên tử
(ng/mL $\equiv$ ppb)

Nguyên tố	Phương pháp			
	Hấp thụ ngọn lửa (F-AAS)	Hấp thụ nhiệt điện (ETA-AAS)	Phát xạ ngọn lửa (AES)	Phát xạ ICP
Al	30	0,005	5	2
As	100	0,02	0,0005	40
Ca	1	0,02	0,1	0,02
Cd	1	0,0001	800	2
Cr	3	0,01	4	0,3
Cu	2	0,002	10	0,1
Fe	5	0,005	30	0,3
Hg	500	0,1	0,0004	1
Mg	0,1	0,00002	5	0,05
Mn	2	0,0002	5	0,06
Mo	30	0,005	100	0,2
Na	2	0,0002	0,1	0,2
Ni	5	0,02	20	0,4
Pb	10	0,002	100	2
Sn	20	0,1	300	30
V	20	0,1	10	0,2
Zn	2	0,00005	0,0005	2

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 4.1. Nguyên tắc của phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử?
- 4.2. Các bộ phận cấu tạo chính của một máy quang phổ hấp thụ nguyên tử?
- 4.3. Các biện pháp tạo nguồn bức xạ cộng hưởng?
- 4.4. Lý do phải tiến hành nguyên tử hóa mẫu trong AAS và các kỹ thuật tiến hành?
- 4.5. Nguyên lý nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật ngọn lửa trong AAS? Các quá trình xảy ra trong ngọn lửa và các yếu tố ảnh hưởng?
- 4.6. Các quá trình xảy ra trong quá trình nguyên tử hóa mẫu với kỹ thuật không ngọn lửa? Các yếu tố ảnh hưởng?
- 4.8. So sánh cấu tạo của quang phổ hấp thụ và phát xạ nguyên tử?
- 4.9. Ứng dụng của phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử?
- 4.10. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp AAS, AES và ICP với một số kim loại?

QUANG PHỔ HUỖNH QUANG

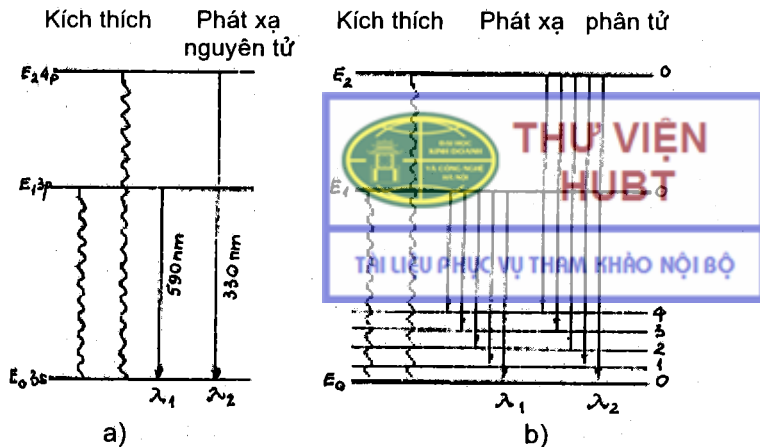
MỤC TIÊU

1. Giải thích được sự hình thành huỳnh quang.
2. Nêu được các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng huỳnh quang của một chất.
3. Trình bày được các ứng dụng chính của hiện tượng huỳnh quang.
4. Mô tả được cấu tạo của một máy quang phổ huỳnh quang.

1. HIỆN TƯỢNG HUỖNH QUANG VÀ LÂN QUANG

Hiện tượng huỳnh quang và lân quang là những quá trình phát xạ quan trọng của nguyên tử hay phân tử được kích thích nhờ hấp thụ bức xạ điện từ và được ứng dụng trong phân tích. Trong quá trình hồi phục về mức năng lượng cơ bản phần năng lượng thừa được phát ra dưới dạng photon. Hiện tượng huỳnh quang xảy ra nhanh hơn nhiều so với hiện tượng lân quang. Nhìn chung sau khi được kích thích, hiện tượng huỳnh quang có thể kết thúc trong khoảng dưới 10^{-5} giây. Còn lân quang có thể kéo dài sau đó hàng phút thậm chí hàng giờ. Huỳnh quang quan trọng hơn nhiều so với lân quang trong phân tích nên được tập trung nghiên cứu.

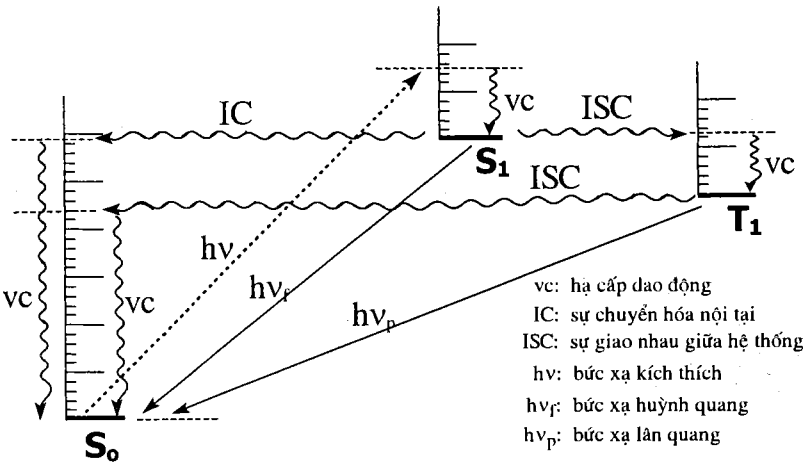
Các nguyên tử thể khí có thể phát ra các bức xạ có cùng bước sóng với một trong những vạch phát xạ của nó trong quá trình hồi phục về trạng thái năng lượng cơ bản sau khi được kích thích. Ví dụ hơi natri hấp thụ bức xạ 330nm khi trở về trạng thái cơ bản có thể phát ra bức xạ 590nm (hình 5.1).



Hình 5.1. Giải đồ mức năng lượng của nguyên tử natri (a) và của một phân tử đơn giản (b)

Số phân tử có khả năng huỳnh quang tương đối ít bởi vì huỳnh quang yêu cầu các đặc điểm về cấu trúc sao cho quá trình phục hồi không bức xạ xảy ra với tốc độ thấp và tăng cường tốc độ phục hồi phát huỳnh quang (hình 2.7). Nhiều phân tử không có các đặc điểm này và tốc độ quá trình hồi phục không bức xạ về mức năng lượng cơ bản lớn hơn đáng kể so với quá trình hồi phục có bức xạ. Vì thế mà quá trình huỳnh quang không xảy ra.

Người ta cho rằng khi phân tử hấp thụ các bức xạ kích thích và chuyển từ trạng thái năng lượng cơ bản đơn bội S lên trạng thái kích thích đơn bội S* thì chúng có thể phục hồi không bức xạ. Các phân tử có thể mất đi một số năng lượng do va chạm trước khi trở về trạng thái cơ bản và phát ra bức xạ. Đó là bức xạ huỳnh quang. Năng lượng của bức xạ huỳnh quang bé hơn năng lượng của bức xạ kích thích do đó bước sóng huỳnh quang lớn hơn bước sóng của ánh sáng kích thích.



Hình 5.2. Giải đồ quan hệ năng lượng giữa bức xạ kích thích, huỳnh quang và lân quang

Một số phân tử khác chuyển sang trạng thái tam bội T trước khi trở về trạng thái năng lượng cơ bản và phát ra bức xạ đó là lân quang hay huỳnh quang chậm.

2. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG HUỖNH QUANG

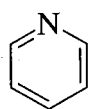
2.1. Các yếu tố về cấu trúc

Huỳnh quang cộng hưởng thường gặp với nguyên tử và một số trường hợp với phân tử.

Các hợp chất có chứa vòng thơm đều thuận lợi nhất cho phát huỳnh quang và cho cường độ lớn nhất. Các hợp chất carbonyl mạch thẳng hay vòng no cũng như các cấu trúc có các nối đôi liên hợp cũng có huỳnh quang nhưng số lượng không đáng kể so với các hợp chất thơm.

Hầu hết các hydrocarbon thơm đều phát huỳnh quang trong dung dịch. Hiệu quả huỳnh quang tăng lên cùng với số vòng thơm và độ tập trung của

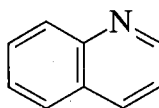
chúng trong cấu trúc. Những dị vòng đơn giản nhất như: pyridin, furan, thiophen, pyrrol... không có huỳnh quang phân tử nhưng các cấu trúc ngưng tụ nhiều vòng như: quinolin, isoquinolin, indol... lại thường có huỳnh quang.



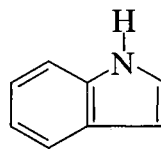
Pyridin



Furan



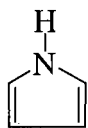
Quinolin



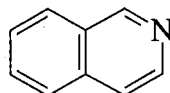
Indol



Thiophen



Pyrrol



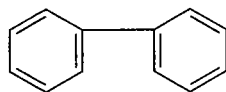
Isoquinolin

Các nhóm thế trên các vòng thơm có thể gây ra sự dịch chuyển bước sóng cực đại kích thích và thay đổi tương ứng các pic trong phổ huỳnh quang. Các nhóm thế thường ảnh hưởng đến hiệu quả huỳnh quang (tham khảo qua bảng 5.1).

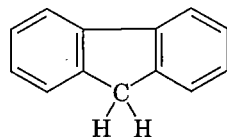
Bảng 5.1. Ảnh hưởng của nhóm thế đến hiệu quả huỳnh quang của các dẫn chất benzen

Hợp chất	Cường độ huỳnh quang tương đối	Hợp chất	Cường độ huỳnh quang tương đối
Benzen	10	Ion phenolat	10
Toluen	17	Anisol	20
Fluorobenzen	10	Anilin	20
Chlorobenzen	7	Ion anilinic	0
Bromobenzen	5	Acid benzoic	3
Iodobenzen	0	Benzonitril	20
Phenol	18	Nitrobenzen	0

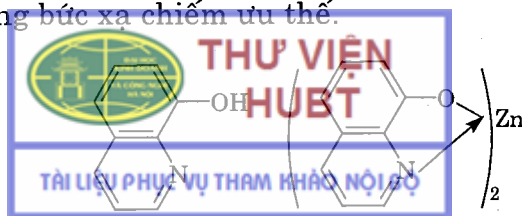
Thực nghiệm chỉ ra rằng hiệu ứng không gian cũng có ảnh hưởng đến khả năng huỳnh quang. Ví dụ trong những điều kiện đơn giản của phép đo nếu hiệu suất lượng tử của fluoren là 1,0 thì của biphenyl chỉ là 0,2. Sự khác nhau này là do cầu methylen trong fluoren mang lại. Sự giảm độ cố định của cấu trúc làm tăng tốc độ hồi phục không bức xạ chiếm ưu thế.



Biphenyl



Fluoren



Ảnh hưởng của sự cố định cấu trúc làm tăng khả năng huỳnh quang của một số tác nhân tạo phức khi chúng liên kết với các ion kim loại. Ví dụ như cường độ huỳnh quang của 8-hydroxyquinolin bé hơn rất nhiều so với phức chất của nó với kẽm.

Nói chung các chất vô cơ không có huỳnh quang trừ một số nguyên tố đất hiếm và các lantanit. Các hợp chất hữu cơ có khả năng phát huỳnh quang chủ yếu là các hydrocarbon thơm, các alpha diceton. Các hợp chất đa vòng làm cho bước sóng của huỳnh quang dài hơn. Những nhóm cho electron như: -OH, -NH₂, alkyl, aryl... làm tăng hiệu suất huỳnh quang. Ngược lại những nhóm hút electron như: NO₂, -COOH, Cl, Br... lại làm giảm hiệu suất huỳnh quang.

Ví dụ: Dưới kích thích của ánh sáng có bước sóng 444nm dung dịch riboflavin sẽ phát ra huỳnh quang bước sóng 530nm.

2.2. Các yếu tố môi trường

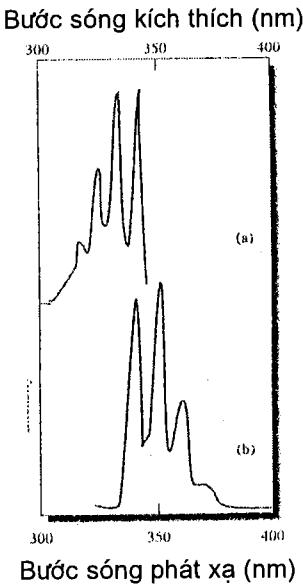
Nhiệt độ và dung môi là hai yếu tố có ảnh hưởng đến huỳnh quang. Hầu hết với các phân tử hiệu suất huỳnh quang giảm khi nhiệt độ tăng bởi vì khi đó tần suất va chạm tăng lên và sự hồi phục do va chạm dễ dàng xảy ra. Việc giảm độ nhớt của dung môi cũng cho kết quả tương tự.

3. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA HUỖNH QUANG

Thời gian huỳnh quang rất ngắn chỉ khoảng 10⁻⁹ giây và sự huỳnh quang là đẳng hướng.

Hiệu suất huỳnh quang Φ_F là một đặc trưng vật lý, cho biết khả năng huỳnh quang của một chất và được tính bằng tỷ số giữa số photon phát xạ và số photon hấp thụ.

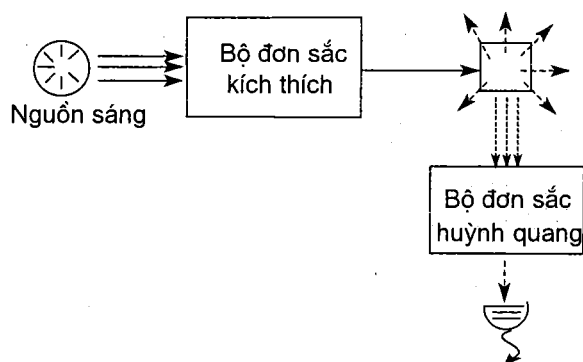
Cường độ huỳnh quang là hiệu suất thực nghiệm hoạt tính phát huỳnh quang của một chất khi nó được kích thích do được hấp thụ một bức xạ thích hợp. Người ta thấy rằng cường độ huỳnh quang tỷ lệ với cường độ bức xạ kích thích, hiệu suất huỳnh quang và nồng độ chất phát huỳnh quang. Vì huỳnh quang là đẳng hướng nên cường độ huỳnh quang đo được chỉ là một phần của cường độ huỳnh quang và người ta thường đo theo phương vuông góc với chùm tia kích thích. Nói chung cường độ huỳnh quang phụ thuộc tuyến tính với nồng độ ở vùng nồng độ thấp. Sự tuyến tính bị mất đi khi độ truyền qua chỉ còn dưới 90% (hay mật độ quang vượt quá 0,05). Trong huỳnh quang người ta dùng 2 khái niệm phổ huỳnh quang và phổ kích thích phát huỳnh quang. Phổ huỳnh quang là đường biểu diễn mối quan hệ giữa cường độ huỳnh quang của chất đã được hoạt hóa và bước sóng của bức xạ huỳnh quang. Phổ kích thích phát huỳnh quang là đường biểu diễn cường độ hấp thụ của một chất và bước sóng của bức xạ hấp thụ. Vì chênh lệch năng lượng giữa các trạng thái dao động ở cả trạng thái cơ bản lẫn trạng thái kích thích nên phổ kích thích và phổ huỳnh quang của các hợp chất thường đối xứng theo kiểu ảnh gương (hình 5.3).



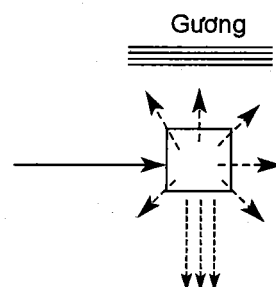
Hình 5.3. Phổ huỳnh quang của 1ppm anthracen trong ancol

4. MÁY QUANG PHỔ HUỖNH QUANG

Máy quang phổ huỳnh quang cũng có các bộ phận chính như: nguồn sáng, bộ phận đơn sắc hoá, buồng đo và bộ phận phát hiện (hình 5.3).



Hình 5.4. Sơ đồ cấu tạo máy quang phổ huỳnh quang



Hình 5.5. Tăng cường độ huỳnh quang bằng hệ thống gương

Nguồn sáng trong máy quang phổ huỳnh quang có nhiệm vụ tạo ra các bức xạ kích thích cần thiết. Nguồn sáng thường dùng là đèn xenon có khả năng phát ra bức xạ trong khoảng rộng 200-800nm nhưng phổ bức xạ không đều các tia UV mạnh hơn các tia VIS. Ngoài ra người ta còn dùng nguồn cảm ứng laser.

Bộ phận đơn sắc hóa gồm 2 phần đơn sắc hóa bức xạ kích thích và đơn sắc hóa bức xạ huỳnh quang. Hai bộ phận này bố trí trước và sau buồng đo.

Buồng đo được bố trí sao cho phương nguồn sáng và phương thu tín hiệu vuông góc với nhau. Do đó cốc đo phải là cốc có 2 mặt trong suốt vuông góc với nhau hay cả 4 mặt trong suốt. Để tăng tín hiệu đến bộ phận thu người ta có thể bố trí thêm gương phía đối diện (hình 5.5).

5. ỨNG DỤNG CỦA QUANG PHỔ HUỖNH QUANG

Có thể dựa vào bước sóng kích thích và bước sóng huỳnh quang phát ra để định tính các hợp chất.

Phương pháp huỳnh quang có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Có thể đo trực tiếp cường độ huỳnh quang và dùng phương pháp so sánh để định lượng các hợp chất phát huỳnh quang mạnh. Với những chất không phát huỳnh quang có thể tác dụng với thuốc thử không huỳnh quang để tạo ra các dẫn chất có huỳnh quang hay dùng các thuốc thử có huỳnh quang để đo và sử dụng các cách xử lý thích hợp.

Đối với các hợp chất vô cơ: Phương pháp đo huỳnh quang có thể được tiến hành theo 2 kiểu: trực tiếp và gián tiếp. Phương pháp trực tiếp dựa trên phản ứng của chất phân tích với một tác nhân tạo phức để tạo ra một phức chất phát huỳnh quang. Phương pháp gián tiếp dựa trên sự giảm hay tắt huỳnh

quang của tác nhân do sự phản ứng của nó với chất phân tích. Sự tắt huỳnh quang đầu tiên được dùng để phát hiện các anion.

Để xác định các cation, tác nhân sử dụng để đo huỳnh quang chủ yếu là các hợp chất thơm có 2 hay nhiều nhóm cho khả năng huỳnh quang mà cho phép tạo phức với ion kim loại như 8-hydroxyquinolin. Một số tác nhân này được giới thiệu trong bảng 5.2. Với hầu hết các tác nhân này, cation được chiết vào dung dịch của tác nhân trong một dung môi hữu cơ như cloroform trước khi đo huỳnh quang.

Bảng 5.2. Phương pháp huỳnh quang chọn lọc với một số hợp chất vô cơ

Ion	Tác nhân	λ (nm)		Độ nhạy $\mu\text{g/ml}$	Chất cản trở
		Hấp thụ	Huỳnh quang		
Al^{3+}	Alizarin garnet R	470	500	0,007	Be, Co, Cr, Cu, F^- , NO_3^- , Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
F^-	Phức Al với Alizarin garnet R (độ tắt)	470	500	0,001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	Benzoin	370	450	0,04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-o.Hydroxyphenyl benzoxazol	365	xanh da trời	2	NH_3
Li^+	8 - Hydroxyquinolin	370	580	0,2	Mg
Sn^{4+}	Flavanol	400	470	0,1	F^- , PO_4^{3-} , Zr
Zn^{2+}	Benzoin	-	xanh lá cây	10	B, Be, Sb, các ion có màu

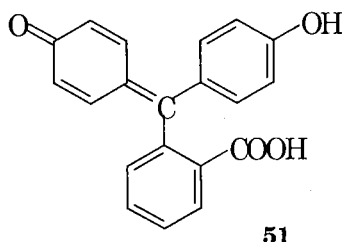
Đối với hợp chất hữu cơ và hóa sinh: Phương pháp huỳnh quang có ứng dụng quan trọng trong phân tích thực phẩm, thuốc chữa bệnh, mẫu bệnh phẩm và các hợp chất tự nhiên nhờ độ nhạy và chọn lọc của phương pháp. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành với các chất hữu cơ như adenin, acid anthranilic, cystein, guanidin, indol, naphtol, tryptophan..., với các thuốc như adrenalin, alkylmorphin, chloroquin, penicillin, phenobarbital, procain, reserpin..., với các enzym và coenzym, với các hợp chất tự nhiên như một số alcaloid, flavonoid, rotenon.

Ngoài ra phương pháp huỳnh quang còn được sử dụng trong bộ phận phát hiện của sắc ký lỏng vì tính đặc hiệu cao và độ nhạy của nó, với nguồn sáng laser có thể phát hiện tới 10^{-12}g .

Đối với huỳnh quang nguyên tử có thể áp dụng để định lượng các kim loại có vạch cộng hưởng có cường độ đủ mạnh hay định lượng gián tiếp một số chất hữu cơ có tham gia tạo phức như S, P, các halogen... Huỳnh quang nguyên tử có thể đạt độ nhạy đến mức 10^{-9} (ppb).

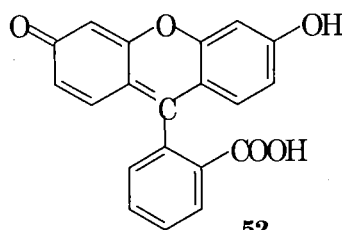
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 5.1. Giải thích hiện tượng huỳnh quang? Phân biệt hiện tượng huỳnh quang và hiện tượng lân quang?
- 5.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng huỳnh quang của một chất?
- 5.3. Phân biệt phổ kích thích huỳnh quang và phổ huỳnh quang? Hai phổ này có quan hệ như thế nào với nhau?
- 5.4. Giải thích lý do huỳnh quang phân tử thường xuất hiện ở bước sóng lớn hơn bước sóng kích thích?
- 5.5. Các ứng dụng của quang phổ huỳnh quang trong phân tích?
- 5.6. Tại sao trong quang phổ huỳnh quang nồng độ làm việc thường phải nhỏ?
- 5.7. Nêu sơ đồ cấu tạo của một máy quang phổ huỳnh quang? Có điểm gì khác so với các quang phổ UV-VIS và IR?
- 5.8. So sánh và giải thích hiệu suất huỳnh quang giữa các hợp chất sau:

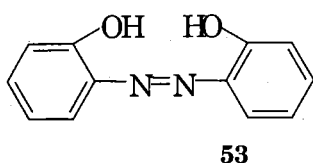


Phenolphthalein

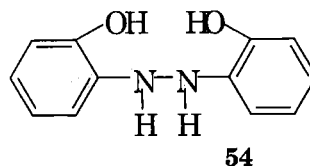
a)



Fluorescein



b) o,o'-Dihydroxyazobenzen



bis (o-Hydroxyphenyl) hydrazin



MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP QUANG HỌC KHÁC

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên lý đo chỉ số khúc xạ và cấu tạo của khúc xạ kế Abbe.
2. Trình bày được nguyên lý đo năng suất quay cực, cấu tạo của phân cực kế và một số ứng dụng của chúng trong phân tích.
3. Trình bày được nguyên tắc cơ bản của một máy cộng hưởng từ hạt nhân và ứng dụng của nó trong phân tích.

Ngoài các phương pháp trên, một số phương pháp phân tích quang học khác với thiết bị đơn giản cũng được ứng dụng khá phổ biến trong phân tích được như phương pháp đo chỉ số khúc xạ và phương pháp đo năng suất quay cực...

Một số phương pháp quang học khác với các trang thiết bị hiện đại cũng được áp dụng rộng rãi kết hợp với phổ khối trong phân tích cấu trúc của các hợp chất đó là các phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân, cộng hưởng từ electron, nhiễu xạ tia X....

Dưới đây chúng tôi chỉ giới thiệu sơ lược một số phương pháp được ứng dụng trong phân tích được.

1. PHƯƠNG PHÁP ĐO CHỈ SỐ KHÚC XẠ

1.1. Nguyên tắc

Chỉ số khúc xạ của một chất so với không khí là tỷ số giữa giá trị sin của góc tới và giá trị sin của góc khúc xạ của tia sáng truyền từ không khí vào chất đó.

Chỉ số khúc xạ (còn được gọi là chiết suất) thường được xác định bằng khúc xạ kế. Chỉ số khúc xạ được đo với chùm tia có bước sóng tương ứng với vạch D của natri (589,3nm) và ở nhiệt độ $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ và được ký hiệu là: n_D^{20}

Phương pháp này chủ yếu được sử dụng để xác nhận tính chất của các chất lỏng như một tiêu chuẩn về độ tinh khiết. Đặc biệt hay gặp trong các chuyên luận về dược liệu như với các tinh dầu.

Về nguyên tắc có thể dựa vào chỉ số khúc xạ để định lượng nhưng ít thấy áp dụng trong các chuyên luận của dược điển. Nồng độ của một dung dịch có thể được xác định theo công thức:

$$C = \frac{n - n_0}{F} \quad (6.1)$$

Trong đó: n và n_0 là chỉ số khúc xạ của dung dịch và dung môi,

F là độ tăng chỉ số khúc xạ khi nồng độ tăng 1% (xác định bằng thực nghiệm).

1.2. Các thiết bị sử dụng để xác định chiết suất

1.2.1. Khúc xạ kế Abbe

❶ **Nguyên tắc:** Khúc xạ kế Abbe dựa trên nguyên tắc phản xạ toàn phần. Cụ thể là xác định góc tới hạn của sự phản xạ toàn phần của tia sáng đi từ môi trường có chỉ số khúc xạ cao (như thuỷ tinh) vào môi trường có chỉ số khúc xạ bé hơn của chất cần đo.

Theo định luật khúc xạ thì:

$$\frac{n}{N} = \frac{\sin \gamma}{\sin \delta}$$

Lúc phản xạ toàn phần thì:

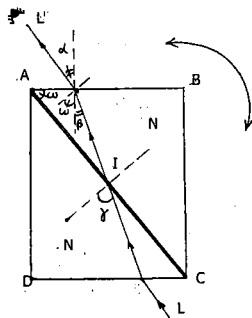
$$\gamma \rightarrow \gamma_{th} \text{ và } \delta \rightarrow 90^\circ$$

$$\text{Do đó: } \frac{n}{N} = \frac{\sin \gamma_{th}}{1} \quad \text{hay } n = N \cdot \sin \gamma_{th}$$

Chiết suất N của thuỷ tinh đã biết nếu xác định được góc tới hạn (γ_{th}) sẽ tính được chỉ số khúc xạ n của chất cần đo.

❷ Cấu tạo:

Bộ phận chính của khúc xạ kế Abbe gồm hai lăng kính tam giác vuông bằng thuỷ tinh ABC và ADC có cùng chiết suất N . Hai lăng kính này được ghép với nhau theo mặt huyền sao cho chúng song song với nhau và giữa chúng có một khoảng cách nhỏ có thể chứa được một lớp mỏng chất cần đo. Nếu lớp mỏng chất lỏng cần đo có chiết suất n ($n < N$) thì nó không làm thay đổi góc của tia sáng trong các lăng kính (hình 6.1).



Hình 6.1. Sơ đồ đường đi của tia sáng trong hệ lăng kính của khúc xạ kế Abbe

Giả sử LL' là tia sáng có phương cố định, nếu quan sát ở L' sẽ thấy tia sáng đi qua hệ. Nếu quay hệ quanh trục đi qua I và vuông góc với thiết diện trong hình 6.1 thì sẽ đến một lúc tia LI bị phản xạ toàn phần và tại vị trí quan sát L' thấy mất ánh sáng. Đó là dấu hiệu đến góc tới hạn.

Với việc dùng hai lăng kính có góc ω đã biết và góc giữa tia quan sát với pháp tuyến của mặt AB có thể đo được hoàn toàn có thể tính được góc tới hạn γ . Vì nếu gọi β là góc tới trên bề mặt ra của lăng kính thì: $\gamma = \omega + \beta$ và do chiết suất của không khí $N_{kk}=1$ nên:

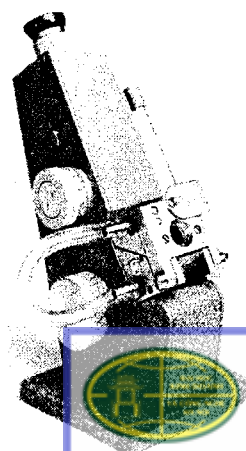
$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{N}{N_{kk}} \quad \text{hay} \quad \sin \beta = \sin \alpha / N.$$

Đo được α xác định được β và vì thế có thể tính được γ .

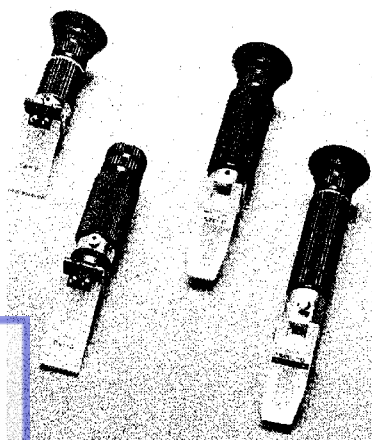
Khúc xạ kế còn có các bộ phận hỗ trợ khác như:

- Hệ thống thị kính có chia vạch đích (hoặc 2 đường thẳng giao nhau) để quan sát, gương lấy ánh sáng, bộ phận tiêu sắc (khử hiện tượng tán sắc) để có thể dùng ánh sáng tự nhiên mà vẫn có kết quả như dùng tia D.
- Thang chia góc tới hạn thường được qui đổi luôn sang giá trị chiết suất.
- Có thể có bộ phận ổn nhiệt để duy trì nhiệt độ đo.

Trước khi sử dụng cũng cần chuẩn hóa máy đo bằng một số dung dịch có chiết suất đã biết như monobromonaphtalen ($n_D^{20}=1,6588$) hay dùng nước cất mới ($n_D^{20} = 1,3330$; $n_D^{25} = 1,3325$ và $n_D^{40} = 1,3306$). Một khúc xạ kế Abbe đầy đủ có hình dáng như hình 6.2. Ngoài ra người ta còn chế tạo ra các khúc xạ kế cầm tay như trong hình 6.3.



Hình 6.2. Khúc xạ kế Abbe



Hình 6.3. Một số khúc xạ kế cầm tay

③ Ứng dụng:

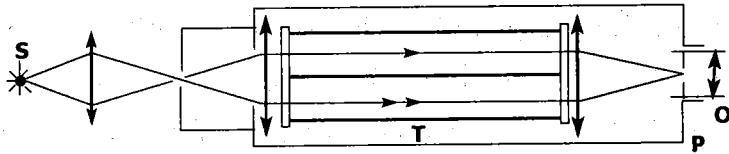
Trong các chuyên luận dược điển của các chất lỏng có thể có các chỉ tiêu về chỉ số khúc xạ. Khúc xạ kế Abbe là công cụ có thể giúp các kiểm nghiệm viên hay các nhà nghiên cứu định tính các thuốc hay sản phẩm điều chế được.

1.2.2. Một số thiết bị đo chỉ số khúc xạ khác

Ngoài khúc xạ kế Abbe để xác định chiết suất của các chất lỏng trong nghiên cứu chiết suất của các chất khí người ta thường áp dụng một số thiết bị khác dựa trên hiện tượng giao thoa ánh sáng. Sau đây là 2 loại giao thoa kế có thể giúp đạt được mục đích trên.

① Giao thoa kế Reyleigh:

Đây là loại giao thoa kế đơn giản nhất. Nó thường dùng để đo chiết suất các chất khí hoặc để khảo sát sự biến thiên của chiết suất chất khí theo nhiệt độ và áp suất. Do vậy giao thoa kế Reyleigh còn được gọi là khúc xạ kế giao thoa. Sơ đồ của giao thoa kế Reyleigh như hình 6.4.

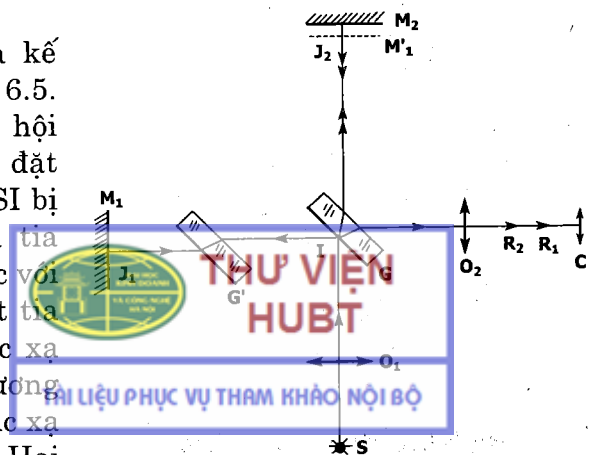


Hình 6.4. Sơ đồ của giao thoa kế Reyleigh

Cấu tạo chính là một ống T có 2 ngăn. Nếu cả 2 ngăn đều chứa cùng một chất khí thì quang trình của 2 chùm sáng giao thoa là bằng nhau và vân sáng chính giữa của hệ vân giao thoa sẽ nằm chính giữa thị trường của máy. Rút hết khí của một ngăn thì hệ chuyển dịch về phía ngăn bên kia. Cho từ từ khí trở lại thì hệ vân cũng từ từ trở về chỗ cũ. Trong quá trình đó người đo có thể đếm được số vân Δm đã đi qua dấu chữ thập trên thị trường O của máy. Với chiều dài của ống là d và bước sóng sử dụng là λ có thể tính được chiết suất n của chất khí theo công thức: $d(n-1) = \Delta m \cdot \lambda$

② Giao thoa kế Michelson:

Sơ đồ nguyên lý của giao thoa kế Michelson được trình bày trong hình 6.5. Nguồn sáng đơn sắc S qua hệ thống hội tụ O_1 chiếu vào gương bán mạ G đặt chếch 45° với quang trục của O_1 . Tia SI bị phân làm 2 tia: tia phản xạ IJ_1 và tia khúc xạ IJ_2 . Tia IJ_1 phản xạ vuông góc với gương M_1 truyền trở lại tới I cho một tia phản xạ trở về nguồn S và tia khúc xạ IR_1 . Tia IJ_2 phản xạ vuông góc với gương M_2 truyền trở lại tới I cho một tia khúc xạ trở về nguồn S và tia phản xạ IR_2 . Hai tia IR_1 và IR_2 trùng nhau và giao thoa với nhau. Hệ vân giao thoa được quan sát trong kính ngắm gồm vật kính O_2 và thị kính C.



Hình 6.5. Sơ đồ của giao thoa kế Michelson

Do 2 chùm tia tách biệt nên giao thoa kế Michelson có thể dùng để khảo sát sự biến thiên của chất khí theo nhiệt độ áp suất rất tiện. Ngoài ra giao thoa kế Michelson còn được dùng để kiểm tra độ đơn sắc của chùm tia bằng cách xác định bậc giao thoa cực đại từ đó tính ra $\Delta\lambda$. Ứng dụng quan trọng có tính chất lịch sử của giao thoa kế Michelson là dùng để khảo sát sự biến thiên của vận tốc ánh sáng theo cường độ chùm sáng và vận tốc chuyển động của nguồn sáng. Nhờ nó mà ông đã rút ra được kết luận là vận tốc truyền ánh sáng trong chân không không phụ thuộc cường độ, phương truyền của ánh sáng, chuyển động của nguồn hay máy thu. Nó là một hằng số vũ trụ.

2. PHƯƠNG PHÁP ĐO NĂNG SUẤT QUAY CỰC

2.1. Chất hoạt quang và ứng dụng của hiện tượng quay cực ánh sáng

Một số chất có khả năng quay mặt phẳng của của các chùm tia phân cực đi qua nó. Những chất như vậy được gọi là chất hoạt quang. Hoạt tính quang học của một chất là do cấu trúc của nó quyết định. Các chất hoạt quang phải chứa ít nhất 1 carbon bất đối. Hai đồng phân quang học là hai đồng phân có hoạt tính quang học đối nhau. Raxemic là hỗn hợp đồng lượng của chúng nên không còn hoạt tính quang học.

Góc quay cực của một chất là góc mà mặt phẳng phân cực bị quay đi khi ánh sáng phân cực đi qua chất đó hoặc dung dịch chất đó. Nếu góc quay theo chiều kim đồng hồ thì đó là chất hữu tuyến (+) còn ngược lại là tả tuyến (-)

Góc quay cực riêng là tỷ số góc quay cực đo được khi chiếu chùm tia đơn sắc ứng với vạch D (589,3nm) của đèn natri qua bề dày 1dm ở nhiệt độ 20°C với tỷ trọng của chất lỏng (hay nồng độ của dung dịch tính bằng g/ml). Góc quay cực riêng được ký hiệu là: $[\alpha]_D^{20}$.

Góc quay cực của các chất lỏng hay dung dịch được đo bằng phân cực kế. Các phân cực kế thường dùng đèn hơi natri.

Căn cứ vào góc quay cực đo được có thể tính ra được nồng độ dung dịch. Đó là nguyên tắc định lượng của phương pháp này.

Có thể sử dụng phương pháp này để định tính, thử tinh khiết của các chất khi biết góc quay cực riêng của chúng.

Phương pháp hay được sử dụng để định lượng các dung dịch, nhất là các dung dịch đường, theo công thức tính sau:



**THƯ VIỆN
HUBT**

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

$$C(k/t) = \frac{\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20}} \quad (6.2)$$

Trong đó: α là góc quay cực đo được; l là bề dày dung dịch.

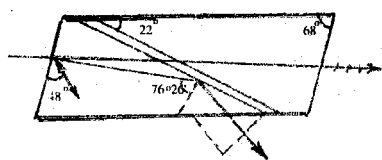
2.2. Phân cực kế

Phân cực kế là thiết bị có thể cho phép đo góc quay cực của một dung dịch chất hoạt quang. Để chuyển ánh sáng tự nhiên thành ánh sáng phân cực

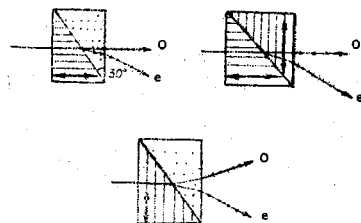
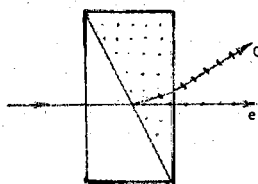
người ta sử dụng kính phân cực. Kính phân cực đơn giản nhất là bản tuamalin. Nhưng tuamalin hấp thụ một phần tia bất thường nên làm yếu đáng kể ánh sáng nghiên cứu, do vậy các kính phân cực có nhiều ứng dụng thường được chế tạo từ tinh thể băng lan. Lợi dụng sự chênh lệch lớn về chiết suất của tia thường và tia bất thường mà có thể chế tạo các loại kính chỉ cho đi qua một tia hoặc cho cả hai tia đi qua nhưng cách nhau xa.

Lăng kính nicol (đôi khi được gọi tắt là nicol) là loại kính đảm bảo cho tia ló là phân cực thẳng. Lăng kính nicol được ghép từ hai lăng kính băng lan. Các lăng kính này được cắt theo những góc thích hợp và gắn với nhau bằng keo canada trong suốt (hình 6.6).

Các kính cho 2 tia lệch nhau có thể được ghép từ băng lan với thủy tinh hay băng lan với nhau với quang trục vuông góc với nhau (hình 6.7).



Hình 6.6. Lăng kính nicol

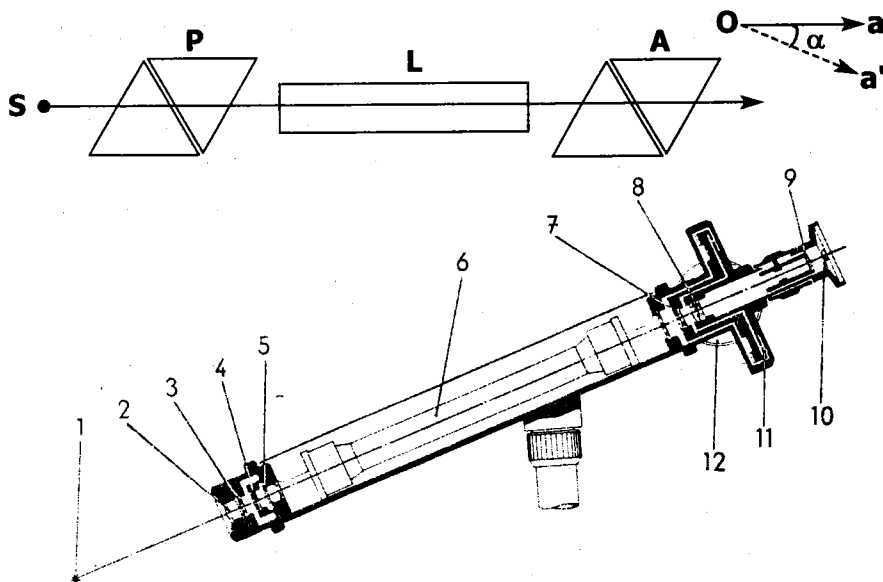


Hình 6.7. Lăng kính ghép tạo 2 chùm tia phân cực

Một phân cực kế đơn giản nhất có cấu tạo như hình 6.8. Những bộ phận không thể thiếu là nguồn sáng đơn sắc S, một nicol P tạo ánh sáng phân cực (nicol phân cực), ống đựng dung dịch hay chất lỏng cần đo có chiều dài xác định L và một nicol A dùng để nhận biết sự phân cực của ánh sáng (nicol phân tích) cấu trúc giống hệt nicol phân cực P.

Khi ống L đựng đầy chất không hoạt quang (dung môi chẳng hạn) có thể quay nicol phân tích A đến vị trí Oa sao cho ánh sáng phân cực không qua được A. Thay dung môi bằng dung dịch đo mặt phẳng phân cực bị quay nên ánh sáng lại đi được qua A. Do đó phải quay nicol phân tích đến vị trí mới Oa' để triệt tiêu ánh sáng. Góc aOa' là góc quay cực đo được (hình 6.8).

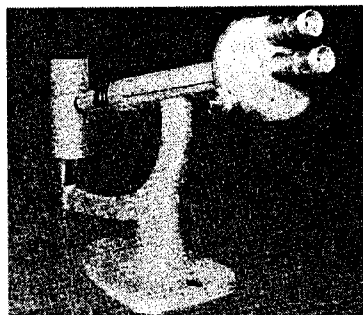
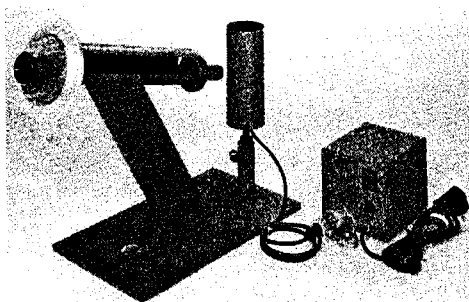
Vì mắt người không thể phân biệt hoàn hảo bóng đen tuyệt đối. Vì vậy thay vì xác định sự triệt tiêu ánh sáng, người ta sử dụng sự cân bằng ánh sáng như trong so màu. Muốn vậy trong phân cực kế người ta gắn thêm tấm Laurent. Lúc đó ánh sáng nhìn thấy trong phân cực kế được phân làm hai nửa. Có hai vị trí cân bằng của hai nửa đó là cả hai cùng rất sáng và cả hai nửa đều sáng rất yếu. Vị trí cả hai nửa sáng đều yếu được chọn để xác định vị trí nicol A triệt tiêu ánh sáng phân cực tới nó.



Hình 6.8. Cấu tạo của phân cực kế.

- | | | |
|---------------------------|------------------------|------------------------------|
| 1: Nguồn sáng đơn sắc (S) | 2: Thấu kính hội tụ | 3: Kính lọc màu |
| 4: Nicol phân cực (P) | 5: Tấm Laurent | 6: Ống đựng dung dịch đo (L) |
| 7: Nicol phân tích (A) | 8: Vật kính | 9: Thị kính |
| 10: Thấu kính hội tụ | 11: Thang chia độ tròn | 12: Nút quay |

Nguồn sáng sử dụng trong phân cực kế thường sử dụng đèn hơi natri để tạo ra tia D sử dụng để đo. Hình ảnh của một phân cực kế đầy đủ như trong hình 6.9.



Hình 6.9. Một số phân cực kế

2.3. Ứng dụng của phương pháp đo năng suất quay cực

Ứng dụng của phương pháp đo năng suất quay cực chủ yếu là dùng để định tính, thử tính khiết của các chất hoạt quang bằng cách đo năng suất quay cực của chúng và so sánh với các chỉ tiêu nêu trong các tài liệu.

Kỹ thuật định lượng bằng phân cực kế cũng được áp dụng dựa vào quan hệ giữa góc quay cực và nồng độ của các dung dịch chất hoạt quang đã nêu trong (6.2). Kỹ thuật này chủ yếu áp dụng với các loại đường. Một số phân cực

kế chuyên dụng để đo đường nên được gọi là đường kế. Khi đó người ta chuyển góc quay thành độ đường tương ứng với:

- Độ đường quốc tế ($^{\circ}\text{S}$): $100^{\circ}\text{S} = 26,605^{\circ}$ tương ứng góc quay của dung dịch đường saccharose 16,29% với bề dày $l=2\text{dm}$
- Độ đường Wentzke ($^{\circ}\text{W}$): $100^{\circ}\text{W} = 34,657^{\circ}$ ứng với dung dịch đường saccharose 26% với bề dày $l=2\text{dm}$.

3. PHƯƠNG PHÁP PHỔ CỘNG HƯỞNG TỪ HẠT NHÂN

3.1. Tính chất từ của hạt nhân

Hạt nhân nguyên tử với số thứ tự là Z và khối lượng nguyên tử là A sẽ có Z proton và $(A-Z)$ neutron. Coi hạt nhân như một hòn bi nhỏ trong đó các proton (điện tích dương) được phân bố đồng đều.

Một số hạt nhân nguyên tử có tính từ. Trước hết là do các hạt nhân nguyên tử luôn quay quanh trục của nó được đặc trưng bằng momen động lượng hay còn gọi là momen spin hạt nhân $\vec{P}$. Mặt khác khi hạt nhân quay các điện tích hạt nhân sẽ chuyển động trên vòng tròn quanh trục quay do đó sẽ xuất hiện một dòng điện. Theo lý thuyết về điện thì mỗi dòng điện bao giờ cũng có một từ trường kèm theo. Như vậy khi hạt nhân quay sẽ xuất hiện một từ trường và trở thành một nam châm vĩnh cửu. Từ tính này của hạt nhân được biểu thị qua momen lưỡng cực từ $\vec{M}$ tỷ lệ thuận với spin hạt nhân $\vec{P}$: $\vec{P}:\vec{M}=\gamma.\vec{P}$ trong đó γ là hằng số tỷ lệ gyromagnetic (hằng số tỷ lệ từ hồi chuyển).

Thực nghiệm chỉ ra rằng không phải tất cả các hạt nhân đều có từ tính. Một số hạt nhân không có từ tính cũng như spin hạt nhân, ví dụ: ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S

3.2. Tính chất của một hạt nhân nguyên tử trong một từ trường

Nếu đặt hạt nhân trong một từ trường H_0 thì sẽ sinh ra một lực làm lệch hướng từ của hạt nhân theo xu hướng sắp xếp hướng của momen từ hạt nhân cùng hướng với đường sức của từ trường. Có thể hình dung tương tự như khi đặt một kim nam châm trong từ trường kim sẽ lệch so với vị trí ban đầu một góc θ , khi thả kim nam châm tự do nó sẽ trở về vị trí cân bằng ban đầu có mức năng lượng thấp nhất của nó. Độ lệch so với vị trí cân bằng càng cao thì năng lượng càng lớn:

$$E = \vec{H}_0 \cdot \vec{M} \quad (6.3)$$

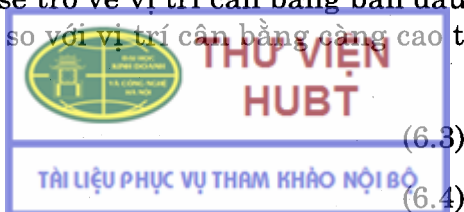
hay $E = -H_0 \cdot M \cdot \cos \theta$

Trong đó: E là năng lượng,

H_0 là cường độ từ trường ngoài,

M là giá trị tuyệt đối của momen từ

θ là góc lệch



Bởi vì $\cos\theta$ có giá trị từ -1 đến 1 nên năng lượng E sẽ tiếp nhận các giá trị từ $+MH_0$ đến $-MH_0$. Trong trường hợp hạt nhân thì khác, hạt nhân nguyên tử từ chỉ tiếp nhận một số khả năng điều chỉnh nhất định và do đó chỉ có một số trạng thái năng lượng tương ứng. Đối với hạt nhân nguyên tử thì $\cos\theta$ chỉ nhận các giá trị là:

$$\cos\theta = \frac{m_i}{I} \tag{6.5}$$

Trong đó: I là số lượng tử của spin hạt nhân

m_i là số lượng tử từ hạt nhân, nhận một trong các giá trị I, I-1, I-2,...,-I+1, -I.

Thực nghiệm chỉ ra rằng mỗi hạt nhân nguyên tử có một số lượng tử spin hạt nhân nhất định phụ thuộc vào số thứ tự nguyên tử Z và số khối nguyên tử A:

Bảng 6.1. Quan hệ giữa số lượng tử spin I với số khối A và số nguyên tử Z

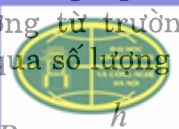
	Giá trị		
Số khối A	lẻ	chẵn	chẵn
Số nguyên tử Z	chẵn hay lẻ	chẵn	lẻ
Số lượng tử spin I	1/2, 3/2, 5/2	0	1, 2, 3

Số lượng tử spin I và giá trị tuyệt đối của spin hạt nhân P hay giá trị tuyệt đối của momen từ M theo các biểu thức sau (trong đó h là hằng số Planck):

$$P=\sqrt{I.(I+1)}.\frac{h}{2\pi} \tag{6.6}$$

$$M=\gamma.\frac{h}{2\pi}\sqrt{I.(I+1)} \tag{6.7}$$

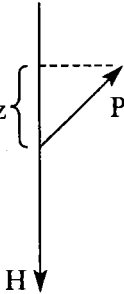
Mỗi sự định hướng khác nhau của momen spin hạt nhân $\vec{P}$ đối với từ trường ngoài cho giá trị hình chiếu P_z khác nhau trên trục hướng từ trường. Những hình chiếu này cũng được lượng tử hóa qua số lượng tử từ m_i .



**THƯ VIỆN
HUBT**

TÀI LIỆU THỰC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

$$P_z = m_i \frac{h}{2\pi} \tag{6.8}$$



Số lượng tử từ m_i nhận các giá trị I, I-1,..., -I+1, -I, nghĩa là có (2I+1) giá trị khác nhau, do đó với từ trường ngoài thì $\vec{P}$ cũng có (2I+1) khả năng định hướng khác nhau.

Momen từ $\vec{M}$ cũng định hướng nhất định trong từ trường ngoài H_o và hình chiếu M_z của nó trên trục Z cũng được xác định bằng biểu thức:

$$M_z = P_z \cdot \gamma = m_i \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \quad (6.9)$$

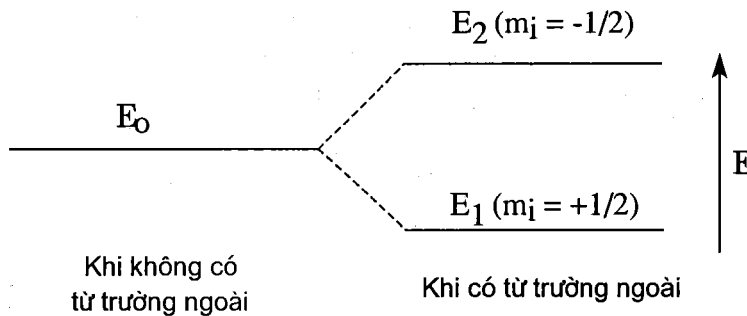
Năng lượng của một hạt nhân từ trong từ trường H_o là $E = \vec{H_o} \cdot \vec{M}$ nhưng vì trục Z cũng là trục của từ trường ngoài do đó:

$$E = -M_z \cdot H_o = -m_i \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot H_o \quad (6.10)$$

Đối với hạt nhân có $I=1/2$ thì số lượng tử từ m_i có giá trị $+1/2$ và $-1/2$, thay vào (6.9) được hai mức năng lượng khác nhau:

$$E_1 = -\left(+\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot H_o \quad \text{và} \quad E_2 = -\left(-\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot H_o$$

Như vậy khi đặt hạt nhân từ có $I=1/2$ vào từ trường nó sẽ tách ra 2 mức năng lượng khác nhau. Một số hạt nhân có spin song song với hướng của từ trường ($m_i=+1/2$) sẽ nằm ở mức năng lượng thấp E_1 , còn số hạt nhân có spin ngược hướng từ trường ($m_i=-1/2$) sẽ nằm ở mức năng lượng cao E_2 (hình 6.10).



Hình 6.10. Mức năng lượng của hạt nhân bị phân tách trong từ trường ngoài.

khi đó $\Delta E = E_2 - E_1 = \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot H_o = h\nu$

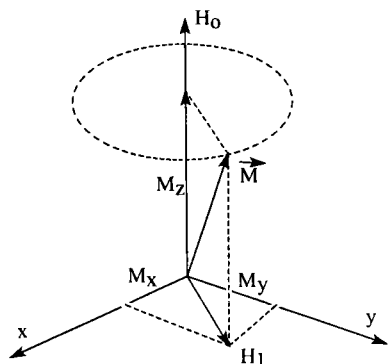
$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} H_o \quad (6.11)$$

Phương trình (6.11) là điều kiện cộng hưởng của hạt nhân và ở đây là tần số cộng hưởng.

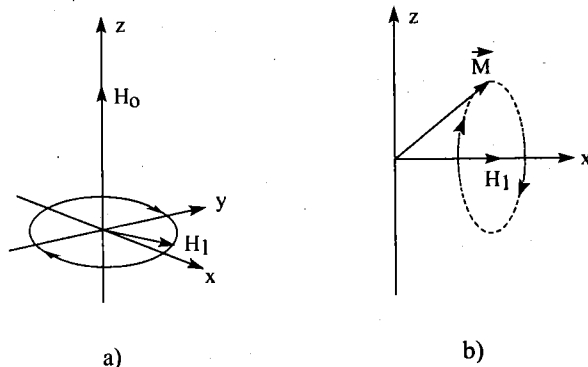
Đối với proton trong một trường có cường độ 1,41T, tỷ lệ từ hồi chuyển γ là $2,6738 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}\text{T}^{-1}$ thì tần số cộng hưởng ν của nó là 60MHz. Tần số của bức xạ cần thiết để kích thích các hạt nhân chuyển từ mức thấp E_1 lên mức cao E_2 nằm trong vùng sóng vô tuyến. Momen từ của mỗi hạt nhân khác nhau nên tần số sóng kích thích cho mỗi hạt nhân cũng khác nhau.

Một vật thể quay sẽ giữ nguyên tốc độ quay và hướng của trục quay nếu như không có tác dụng bên ngoài ảnh hưởng lên nó. Nếu có một momen quay tác dụng lên trục quay thì tốc độ quay không bị thay đổi nhưng trục quay không những bị thay đổi hướng mà momen quay sẽ bị thay đổi qua chuyển động vòng (chuyển động tuế sai). Tốc độ chuyển động tuế sai càng lớn nếu momen tác dụng càng mạnh.

Một quá trình tương tự cũng xảy ra trong hạt nhân nguyên tử. Người ta cần phải cung cấp một năng lượng vào hệ để có bước chuyển từ thấp lên cao bằng cách tác dụng một từ trường H_1 thẳng góc với từ trường H_0 . Tác dụng của từ trường H_1 là hoàn toàn tương tự như H_0 . Nó gây ra một momen quay và kéo trục quay về phía từ trường H_1 . Để kéo dài và giữ được tác dụng này người ta quay từ trường H_1 với tốc độ không đổi thẳng góc với hướng của từ trường H_0 (hình 6.11).



Hình 6.11. Từ trường H_1 tác dụng thẳng góc với từ trường H_0



Hình 6.12. Tác dụng của từ trường H_1 trong hệ tọa độ quay

Để thấy được tác dụng của từ trường H_1 , các quá trình phải được quan sát trong một hệ trục tọa độ quay quanh trục Z được lựa chọn trùng với hướng của từ trường H_0 (hình 6.12.a). Trong hệ này thì chuyển động tuế sai quanh trục Z bị bỏ qua và momen từ quay theo hướng khác.

Trong hệ tọa độ này tác dụng của từ trường H_1 được thấy rõ. Qua lực mà từ trường H_1 tác dụng lên momen từ thì một chuyển động tuế sai mới xuất hiện quanh từ trường H_1 và sẽ càng nhanh nếu H_1 càng lớn (hình 6.12.b). Qua đó hạt nhân sẽ được nâng từ mức năng lượng thấp lên mức năng lượng cao. Đồng thời hạt nhân cũng từ mức năng lượng cao xuống mức năng lượng thấp và kết quả dẫn đến một cân bằng động được thiết lập.

Mặc dù năng lượng của hạt nhân bị phân tách thành hai mức nhưng số hạt nhân nằm ở hai mức năng lượng không như nhau. Số lượng nằm ở mức thấp N_1 bao giờ cũng nhiều hơn ở mức cao N_2 một ít ($N_2/N_1 = 0,99999043$). Điều đó phù hợp với phân bố Boltzman. Nếu cho một từ trường H_1 biến đổi, có tần số ν tác dụng sẽ dẫn đến sự phân bố lại các hạt nhân giữa hai mức trên. Một số hạt nhân sẽ hấp thụ năng lượng của sóng vô tuyến tần số ν và nhảy từ

mức năng lượng thấp sang mức năng lượng cao. Hiện tượng này được gọi là cộng hưởng từ hạt nhân.

Sự hấp thụ năng lượng trên không nằm yên mà hệ spin sẽ nhanh chóng chuyển trở lại trạng thái cân bằng. Sự trở lại trạng thái cân bằng được gọi là sự hồi phục của hệ spin. Thời gian cần thiết để đạt được sự hồi phục của hệ spin được gọi là thời gian hồi phục.

Sự phục hồi spin được chia làm 2 loại: hồi phục spin mạng lưới (hồi phục dọc) và hồi phục spin-spin (hồi phục ngang).

Sự hồi phục dọc xuất hiện do chuyển động của mạng lưới như chuyển động của nguyên tử trong mạng lưới tinh thể rắn, chuyển động của phân tử trong chất lỏng và trong chất khí. Sự chuyển động này gắn liền với từ trường biến đổi và có một tần số riêng. Thời gian hồi phục mạng lưới được ký hiệu là T_1 .

Sự hồi phục spin-spin là quá trình tương tác trao đổi năng lượng giữa các hạt nhân ở mức thấp và mức cao. Thời gian hồi phục spin-spin được ký hiệu là T_2 .

Các giá trị T_1 và T_2 sẽ quyết định bề rộng của vạch phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

3.3. Hằng số chắn và từ trường hiệu dụng

Nếu đặt hạt nhân nguyên tử vào một từ trường ngoài thì lớp vỏ electron quay quanh hạt nhân sẽ sinh ra một lưỡng cực từ mà cường độ của nó ngược hướng và tỷ lệ với từ trường ngoài. Do quá trình sinh ra từ trường phụ nên tại vị trí hạt nhân nguyên tử không phải chịu tác dụng đầy đủ của từ trường H_0 mà bị yếu đi chỉ còn là:

$$H_{\text{eff}} = H_0 (1 - \sigma) \quad (6.12)$$

H_{eff} được gọi là từ trường hiệu dụng. σ được gọi là hằng số chắn. Độ lớn của σ phụ thuộc mật độ electron bao quanh hạt nhân ρ , và khoảng cách r tới

tâm hạt nhân ($\sigma = \frac{4\pi e^2}{3mc^2} \int r \cdot \rho_r \cdot dr$)

Đối với hạt nhân trong phân tử còn phức tạp hơn do ảnh hưởng của các đám mây electron của các nguyên tử bên cạnh. Ví dụ proton H ở nhóm CH_3 của phân tử TMS (tetramethylsilan, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) và của aceton đều được bao quanh bởi đám mây electron nên từ trường hiệu dụng tác dụng lên nó nhỏ hơn H_0 . Nhưng do ảnh hưởng hút electron của nhóm $\text{C}=\text{O}$ nên đám mây quanh proton H của aceton nhỏ hơn của TMS làm cho từ trường hiệu dụng tác dụng lên TMS nhỏ hơn ở aceton.

3.4. Độ chuyển dịch hóa học và hằng số tương tác spin

Trong thực tế, người ta không thể đo được giá trị của từ trường hiệu dụng H_{eff} và hằng số chắn σ nhưng người ta có thể đo được khoảng cách giữa 2 tín hiệu. Ví dụ như khoảng cách giữa hai tín hiệu của các proton trong aceton và TMS:

$$\Delta H = H_{\text{aceton-H TMS}} = H_0(1 - \sigma_{\text{aceton}}) - H_0(1 - \sigma^{\text{TMS}}) = H_0(\sigma^{\text{TMS}} - \sigma_{\text{aceton}})$$

$$\Delta H/H_0 = \sigma^{\text{TMS}} - \sigma_{\text{aceton}} = \delta$$

ΔH thay đổi tùy thuộc độ lớn của từ trường H_0 nhưng tỷ số $\Delta H/H_0$ lại không thay đổi. Người ta có thể so sánh tín hiệu proton của bất kỳ chất nào với TMS và đều có thể được giá trị $\delta = \sigma^{\text{TMS}} - \sigma_{\text{chất cần đo}}$ là đại lượng đặc trưng cho mỗi nhóm proton khác nhau trong những phân tử khác nhau. Giá trị đó được gọi là *độ dịch chuyển hóa học*.

Độ dịch chuyển hóa học δ thường được xác định như sau:

$$\delta = \frac{V_{\text{mẫu}} - V_{\text{chất chuẩn}}}{\text{Tần số làm việc của máy}} \times 10^6 \text{ ppm} \quad (6.13)$$

Độ dịch chuyển hóa học δ không có thứ nguyên. Thực nghiệm chỉ ra rằng proton H của hầu hết các chất hữu cơ có độ dịch chuyển nằm trong một khoảng từ 0-10ppm, trong đó của TMS được qui ước bằng 0 và TMS được gọi là chất chuẩn.

Hằng số chắn xuất hiện là do các từ trường phụ xuất hiện xung quanh hạt nhân đã làm yếu đi hay mạnh lên cường độ từ trường H_0 tại vị trí hạt nhân. Đó có thể là do hiệu ứng nghịch từ, hiệu ứng thuận từ hay do tương tác của các đám electron cạnh nhau. Người ta thấy rằng độ âm điện của nhóm thế bên cạnh proton có ảnh hưởng đến giá trị hằng số chắn tức là ảnh hưởng đến độ dịch chuyển hóa học. Nếu nhóm thế bên cạnh có độ âm điện lớn sẽ kéo điện tử về phía nó làm giảm mật độ điện tử bao quanh proton dẫn đến hằng số chắn nhỏ và độ dịch chuyển hóa học lớn và ngược lại.

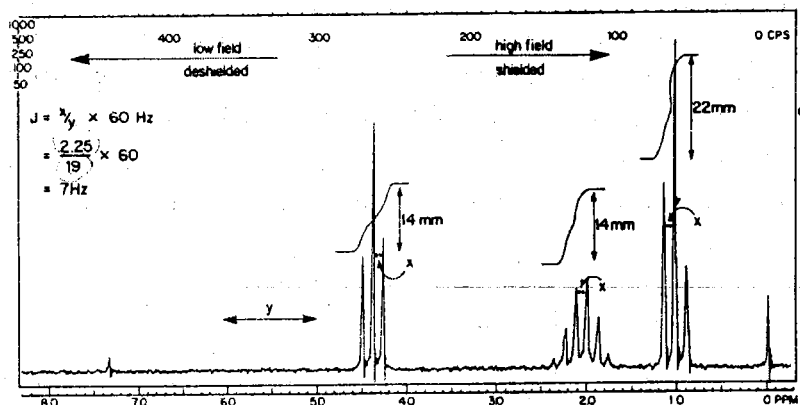
Có nhiều yếu tố bên ngoài ảnh hưởng đến độ dịch chuyển hóa học đó là nhiệt độ, nồng độ dung dịch, dung môi...

Tín hiệu cộng hưởng có thể được xuất hiện dưới dạng nhiều đỉnh (doublet, triplet, quartet...) như trong hình 6.13. Nguyên nhân xuất hiện nhiều đỉnh là do sự tương tác giữa các nhóm $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ với nhau. Tương tác này được gọi là tương tác spin-spin của hạt nhân. Các tương tác spin-spin khá phức tạp và được thể hiện trên phổ bởi hằng số tương tác J. Đặc điểm của tương tác spin-spin:

- Không phụ thuộc độ lớn của H_0 (H_0 chỉ quyết định sự định hướng của spin)
- Giá trị của hằng số này tính bằng Hz, phụ thuộc bản chất liên kết, loại liên kết (π hay σ), góc liên kết (geminal, vicinal...)
- Ảnh hưởng giảm theo số liên kết.
- Đây là thông số quan trọng để xác định cấu trúc.

Bằng cách thay đổi cường độ từ trường ngoài (phương pháp quét trường) đến khi đủ cường độ sẽ xuất hiện cộng hưởng. Khi đó tín hiệu cộng hưởng của

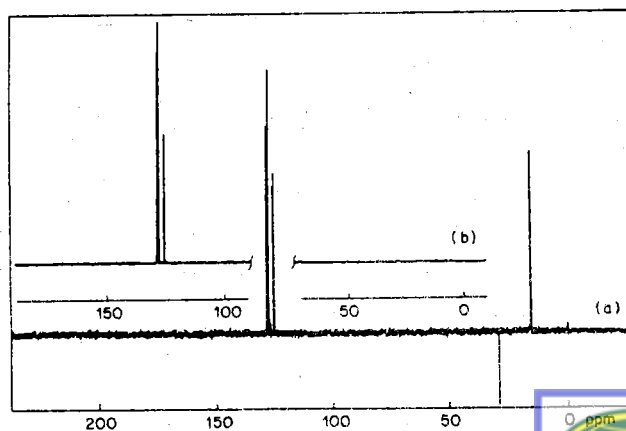
proton ở aceton và TMS sẽ xuất hiện ở các vị trí khác nhau. Người ta cũng có thể giữ nguyên cường độ từ trường H_0 và thay đổi tần số cộng hưởng (phương pháp quét tần) cũng cho kết quả tương tự.



Hình 6.13. Sự tách tín hiệu trên phổ cộng hưởng từ proton thành nhiều đỉnh.

3.5. Ứng dụng của cộng hưởng từ hạt nhân

Ngoài proton 1H , người ta có thể thu được tín hiệu cộng hưởng trên các hạt nhân khác như ^{19}F , ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N , ^{11}B . Bằng cách xác định độ dịch chuyển hóa học δ và hằng số tương tác J và phối hợp nhiều loại phổ cộng hưởng từ khác nhau như 1H -NMR, ^{13}C -NMR, NOESY.... người ta giải phổ để có thể xây dựng cấu trúc phân tử một cách chính xác.



Hình 6.14. Phổ ^{13}C -NMR của ethyl benzen

- a. DEPT 135°
- b. DEPT 90°

Việc xây dựng cấu trúc của các hợp chất hữu cơ phức tạp đòi hỏi phải có nhiều kinh nghiệm dựa trên các đặc tính về độ dịch chuyển hóa học đặc trưng của từng loại hợp chất, dựa vào các hằng số tương tác spin để xác định vị trí và hướng nhóm thế. Điều cần chú ý là các thông tin của các loại phổ khác như phổ khối, IR... là rất quan trọng trong việc xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập từ thiên nhiên hay tổng hợp hoặc bán tổng hợp ra được. Cộng hưởng từ hạt nhân cũng được ứng dụng trong phân tích định tính và định lượng. Phương pháp này có ưu điểm là không phân huỷ mẫu và cần ít thời gian. Tín hiệu cộng hưởng tỷ lệ với số hạt nhân cộng hưởng tại tần số đó cho phép xác

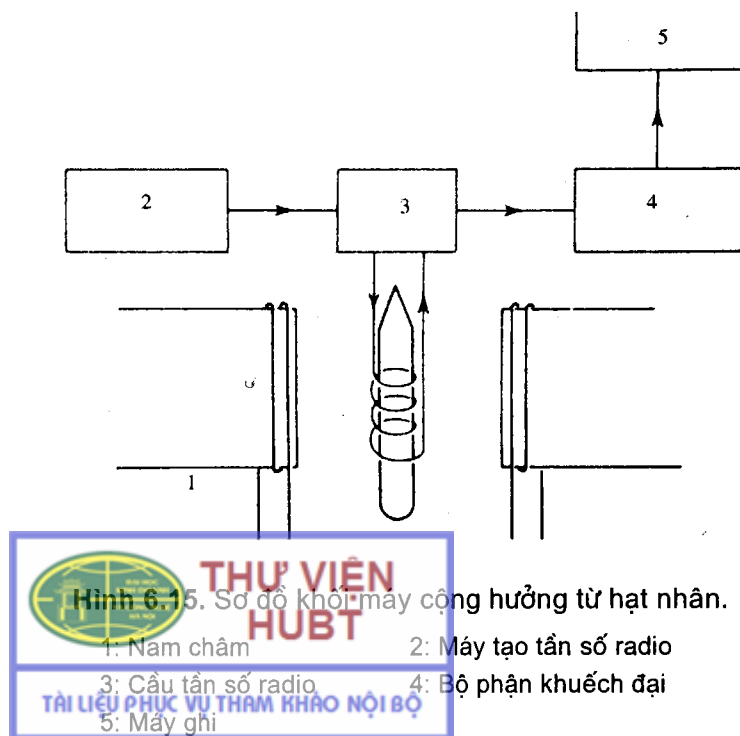
định tỷ lệ tương đối giữa các thành phần trong hỗn hợp. Nếu có chất đối chiếu có thể xác định được nồng độ các chất. Ví dụ với ^{13}C -NMR có thể phân tích tự động các acid amin trong dịch thủy phân của protein.

Ngoài ra cộng hưởng từ hạt nhân hiện được đưa vào ứng dụng trong chẩn đoán hình ảnh với các đặc tính ưu việt của nó mà X-quang hay siêu âm không có được.

3.6. Cấu tạo máy cộng hưởng từ hạt nhân và chuẩn bị mẫu ghi

Máy cộng hưởng từ có bộ phận chính là một nam châm mạnh có cường độ từ trường ổn định và đồng nhất. Nam châm này có thể là nam châm điện hoặc nam châm vĩnh cửu. Đối với những máy có độ phân giải cao thường là nam châm điện. Ống mẫu được đặt giữa hai cực của nam châm và được bao quanh bởi một cuộn cảm ứng. Theo phương pháp Block thì cuộn dây này được đặt thẳng góc với cuộn phát tín hiệu vô tuyến (hình 6.15).

Nhờ một thiết bị riêng gọi là thiết bị quét mà làm thay đổi cường độ từ trường (theo phương pháp quét trường) hay tần số của máy phát cao tần (theo phương pháp quét tần). Do quá trình quét mà điều kiện cộng hưởng $\nu = \gamma \cdot H_0 / (2\pi)$ được thực hiện và thể xoay chiều trên cuộn cảm thay đổi. Tín hiệu này được khuếch đại và đưa sang thiết bị vẽ phổ.



Để ghi phổ của chất cần nghiên cứu người ta hoà tan nó trong dung môi. Với phổ cộng hưởng từ proton (^1H -NMR) dung môi phải không chứa proton nên các dung môi thường dùng là CCl_4 , CDCl_3 , CD_3OD , CD_3OCD_3 Đôi khi người ta cũng có thể dùng các dung môi có chứa hạt nhân từ nếu như tín hiệu

của dung môi không che lấp mất tín hiệu của chất nghiên cứu. Chất chuẩn TMS có thể được cho thẳng vào ống đo cùng chất nghiên cứu (phương pháp chuẩn nội) hoặc cho vào ống thủy tinh nhỏ rồi cắm toàn bộ vào ống đo (phương pháp chuẩn ngoại).

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 6.1. Trình bày nguyên lý đo chỉ số khúc xạ của một chất lỏng bằng khúc xạ kế Abbe?
- 6.2. Trình bày cấu tạo của khúc xạ kế Abbe? Ứng dụng của nó trong phân tích?
- 6.3. Kể tên các thiết bị đo chiết suất khác?
- 6.4. Trình bày cấu tạo và nguyên lý hoạt động của phân cực kế?
- 6.5. Các ứng dụng của hiện tượng phân cực ánh sáng trong phân tích?
- 6.6. Nguyên tắc cơ bản và ứng dụng của phổ cộng hưởng từ hạt nhân?



PHÂN TÍCH KHỐI PHỔ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc hoạt động của máy khối phổ.
2. Mô tả được bộ nguồn ion, bộ phân tích khối, detector và cách trình bày dữ liệu.
3. Giải thích được kết nối GC/MS và HPLC/MS.
4. Giới thiệu được ba ứng dụng của khối phổ trong phân tích.

Năm 1897 nhà vật lý người Anh Joseph John Thomson đã đo tỷ số khối lượng và điện tích electron (m/e) và phát minh ra kỹ thuật khối phổ. Chính Thomson đã dùng kỹ thuật này để phát hiện ra các đồng vị của nguyên tố và chứng minh sự tồn tại hai đồng vị của khí neon. Với phát minh này Thomson J.J được tặng giải thưởng Nobel năm 1906. Từ năm 1940 phân tích khối phổ hữu cơ ra đời khi ứng dụng kỹ thuật này để phân tích sản phẩm trong công nghệ dầu lửa. Đến những năm 70, khối phổ đã được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh y học. Hiện nay khối phổ là một kỹ thuật phân tích mạnh được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau để xác định các chất vô cơ và hữu cơ.

1. NGUYÊN TẮC

Khối phổ (mass spectrometry - MS), khác với các kỹ thuật quang phổ, không dùng bức xạ điện từ. Đây là một kỹ thuật đo trực tiếp *tỷ số khối lượng và điện tích của ion* (m/z) được tạo thành trong pha khí từ phân tử hoặc nguyên tử của mẫu. Tỷ số này được biểu thị bằng đơn vị khối lượng nguyên tử (1 đơn vị khối lượng nguyên tử bằng $1/12$ khối lượng của carbon ^{12}C) hoặc bằng dalton (1 dalton $\approx$ bằng khối lượng của nguyên tử hydro).

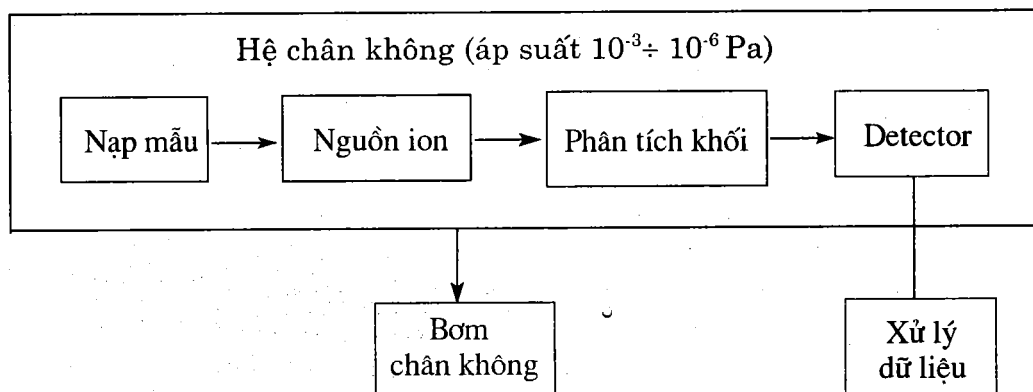
Các ion được tạo thành trong *buồng ion hóa*, được gia tốc và tách riêng nhờ *bộ phân tích khối* trước khi đến *detector*. Tất cả các quá trình này diễn ra trong hệ thiết bị chân không: áp suất trong hệ dao động từ 10^{-3} Pa đến 10^{-6} Pa. Tín hiệu tương ứng với các ion sẽ được thể hiện bằng một số vạch (pic) có cường độ khác nhau tập hợp lại thành một *khối phổ đồ* hoặc *phổ khối*. Nó cung cấp thông tin định tính (khối lượng phân tử, nhận dạng các chất) xác định cấu trúc và định lượng các chất.

2. MÁY KHỐI PHỔ

Hình 7.1 mô tả sơ đồ khối của một máy khối phổ. Nó gồm có 5 bộ phận sau:

- **Bộ nạp mẫu:** Đưa mẫu vào máy. Nếu mẫu ở dạng lỏng hoặc rắn cần phải chuyển sang dạng hơi bằng cách thích hợp.
- **Bộ nguồn ion:** Ion hóa các phân tử, nguyên tử của mẫu ở trạng thái khí hoặc hơi.
- **Bộ phân tích khối:** Tách các ion theo tỷ số m/z . Các ion được gia tốc và tách riêng nhờ tác dụng của từ trường, điện trường để đi đến detector.
- **Detector:** Detector có nhiệm vụ chuyển các ion đã đến thành tín hiệu điện đo bằng hệ điện tử của máy khối phổ.
- **Bộ xử lý dữ liệu:**

Tín hiệu điện từ detector được khuếch đại trước khi chuyển thành tín hiệu số phục vụ xử lý dữ liệu theo yêu cầu khác nhau như: ghi phổ khối, so sánh với thư viện phổ, định lượng,...



Hình 7.1. Sơ đồ khối của máy khối phổ

Sau đây giới thiệu chi tiết hơn một số bộ phận quan trọng.

2.1. Bộ nạp mẫu

Có thể phân thành hai nhóm chính:

2.1.1. Nạp mẫu trực tiếp

Với mẫu lỏng có thể đặt mẫu vào chén thạch anh hoặc trên bề mặt kim loại và đưa vào buồng trung gian (áp suất giảm) trước khi vào buồng chân không của máy. Có thể tách phần hơi của mẫu bằng một màng bán thấm và đưa thẳng vào buồng ion hóa. Đôi khi người ta nhiệt phân mẫu, khí tạo thành được dẫn vào buồng ion hóa máy khối phổ hoặc dùng kết nối GC/MS.



2.1.2. Nạp mẫu gián tiếp

Ở đây bộ nạp mẫu là đầu ra của một thiết bị phân tích khác được kết nối với khối phổ, đó là:

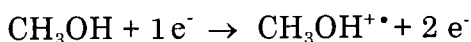
- **GC/MS:** Đầu ra của cột mao quản GC được nối trực tiếp với bộ nguồn ion của máy khối phổ.
- **LC/MS:** Khi chất phân tích khó bay hơi hoặc dễ phân huỷ nhiệt không thể phân tích bằng GC, cần có kết nối LC/MS. Khó khăn ở đây là phải chuyển chất phân tích từ pha lỏng sang pha hơi để ion hoá. Giao diện của kết nối LC/MS được trình bày cụ thể hơn ở bộ ion hóa.
- **SFC/MS:** Pha động là CO_2 siêu tới hạn được chuyển thành pha khí trước khi đi vào buồng ion hóa.
- **CE/MS:** Các chất trong dịch rửa giải từ mao quản được đưa vào buồng ion hóa. Trong một số trường hợp cần thêm dung môi để tăng tốc độ dòng. Hạn chế của kết nối này là thể tích mẫu nhỏ và cần dùng dung dịch đệm bay hơi.

2.2. Bộ nguồn ion (ion sources)

Trong máy khối phổ, có nhiều cách để ion hoá phân tử và nguyên tử của mẫu ở trạng thái khí hoặc hơi. Sau đây là một số kỹ thuật thường dùng.

2.2.1. Va chạm electron (Electron Impact - EI)

Trong buồng ion hoá các electron phát ra từ một catod vonfram hoặc reni khi đốt nóng. Chùm tia electron này bay về anod với vận tốc lớn (có năng lượng khoảng 70 eV) và va chạm với phân tử hoặc nguyên tử của mẫu. Một electron tấn công một phân tử với năng lượng dư lớn sẽ loại một electron khác khỏi phân tử này. Ví dụ, phân tử methanol có thể bị ion hoá theo phản ứng sau:

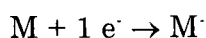
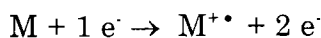


(kí hiệu $+\bullet$ chỉ một cation gốc được tạo thành).

Quá trình ion hoá bằng EI thường tạo ra ion điện tích đơn có một electron không cặp đôi. Đó là *ion gốc* (radical ion). Phân tử ban đầu mang điện tích được gọi là *ion phân tử* (molecular ion). Điều quan trọng hơn là va chạm electron tạo ra ion phân tử không ổn định, dễ bị bẻ gãy thành nhiều mảnh nhỏ hơn trong đó có ion mảnh (fragment ions).



Quá trình ion hoá bằng EI, có thể tạo ra cation và anion:

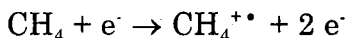


Tuy nhiên, máy MS làm việc với cation gốc cho nhiều thông tin hơn nên được dùng phổ biến. Kỹ thuật EI thường tạo ra nhiều mảnh nhỏ, ít hoặc thậm chí không có ion phân tử. Cho nên đôi khi khó biện giải phổ. Trong trường hợp này người ta dùng kỹ thuật ion hóa “mềm” hơn. Mặt khác, kỹ thuật này đòi hỏi phải hoá hơi mẫu nên ít thích hợp với các chất phân cực hoặc dễ bị nhiệt phân hủy.

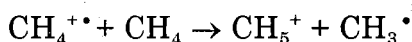
2.2.2. Ion hóa hóa học (chemical ionization - CI)

CI là kỹ thuật ion hóa “mềm” hơn EI. Ở đây người ta dùng một thuốc thử khí như metan, amoniac, và chạm với chùm tia electron năng lượng cao để tạo ra các ion hoặc gốc tự do. Ví dụ với CH_4 :

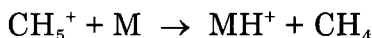
- Đầu tiên va chạm electron sẽ ion hóa thuốc thử:



- Tiếp theo là tạo ra ion thứ cấp:



- Cation CH_5^+ là tiểu phân cho proton mạnh sẽ phản ứng với chất phân tích M của mẫu:

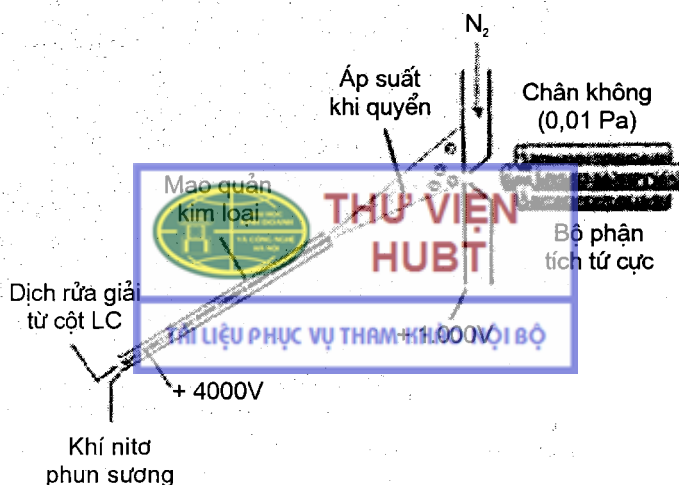


So với EI, kỹ thuật này ít phân mảnh M, nhưng tạo ra ion MH^+ , nó có khối lượng lớn hơn một đơn vị so với khối lượng phân tử tương đối (relative molecular mass - RMM) của chất phân tích.

2.2.3. Nguồn ion bằng phun sương khử solvat (dissolvation nebulization sources)

Kỹ thuật này tạo ra ion từ phân tử trong dung dịch. Dung dịch ở trong một mao quản kim loại (tốc độ dòng dao động từ 1mL đến 10mL/phút). Người ta đặt một trường điện giữa đầu mao quản và một điện cực (điện thế có thể đến + 4000V) các giọt mịn hạt sương mang điện tích được tạo thành và gia tốc đến điện cực. Đây là ion hóa bằng “tia điện” (electrospray ionization ESI).

Kỹ thuật ESI thích hợp để ion hóa các chất phân cực (khác với kỹ thuật EI) và nghiên cứu các phân tử sinh học có khối lượng phân tử lớn: $M \leq 100000$. Hình 7.2 minh họa giao diện ESI cho máy khối phổ.



Hình 7.2. Giao diện ESI cho máy khối phổ.

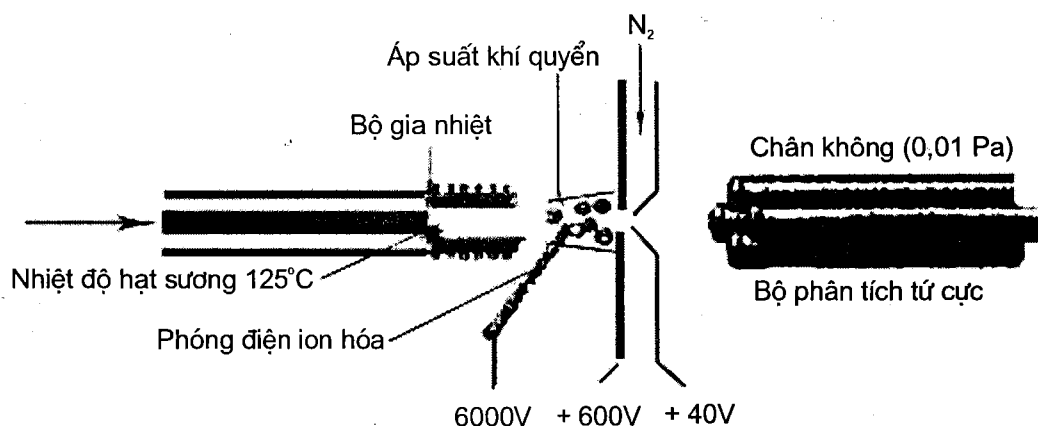
Có thể dùng các loại “tia” khác như:

– *Ion hóa bằng nhiệt* (Thermospray ionization - TSI):

Tương tự kỹ thuật ESI, chất phân tích trong pha động gồm nước, chất hữu cơ và chất điện ly bay hơi (thường dùng amôn acetat) được chuyển thành giọt mịn sau khi đi qua một mao quản ở nhiệt độ được kiểm soát. Các ion của chất điện ly bay hơi sẽ ion hóa phân tử của mẫu. Có thể tăng cường quá trình ion hóa nhờ sự phóng điện của điện thế khoảng 800V.

– *Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển* (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI):

Pha động được chuyển thành hạt sương nhờ dòng nitơ và nhiệt (khoảng 500°C). Một điện thế cao sẽ ion hóa chất phân tích M trong hạt sương. Kỹ thuật này rất thích hợp cho kết nối HPLC/MS. Hình 7.3 minh họa giao diện APCI giữa cột HPLC và máy khối phổ.



Hình 7.3. Giao diện APCI của kết nối HPLC/MS.

2.2.4. Nguồn ion bằng giải hấp (Ionization desorption sources):

Nguyên tắc của các kỹ thuật này dựa trên quá trình phát thử cấp: bắn phá một mẫu ở dạng lỏng hoặc rắn bằng một chùm tia sơ cấp: electron, ion hoặc photon. Các hạt thử cấp như electron, ion hoặc phân tử trung hoà sẽ được tạo thành. Chỉ có các hạt này được phân tích bằng khối phổ. Tên của nguồn ion phụ thuộc vào bản chất của chùm tia sơ cấp. Sau đây là 2 kỹ thuật thường gặp:

– *Bắn phá nhanh bằng nguyên tử* (Fast - atom bombardment FAB):

Mẫu được hòa tan trong dung môi có độ nhớt cao như glycerin và đưa lên bề mặt kim loại. Dùng một dòng nguyên tử như argon hoặc xenon năng lượng cao bắn phá mẫu. Các ion dạng $(M+H)^+$ hoặc $(M-H)^-$ hoặc sản phẩm cộng hợp của các ion được tạo thành. Kỹ thuật này thích hợp để ion hóa các chất phân cực và dễ phân hủy nhiệt. Nếu dùng ion Cs^+ thay cho argon ta có kỹ thuật *bắn phá nhanh bằng ion* (Fast - ion bombardment FIB).

– Ion hóa bằng giải hấp laser (Matrix - assisted laser desorption ionization - MALDI):

Mẫu được hòa tan trong dung môi thích hợp và được ion hóa bằng xung laser có bước sóng trong khoảng UV - IR. Kỹ thuật này được dùng để ion hóa chủ yếu các chất có khối lượng phân tử lớn: polymer và các hợp chất sinh học.

2.3. Bộ phân tích khối (Mass analyser)

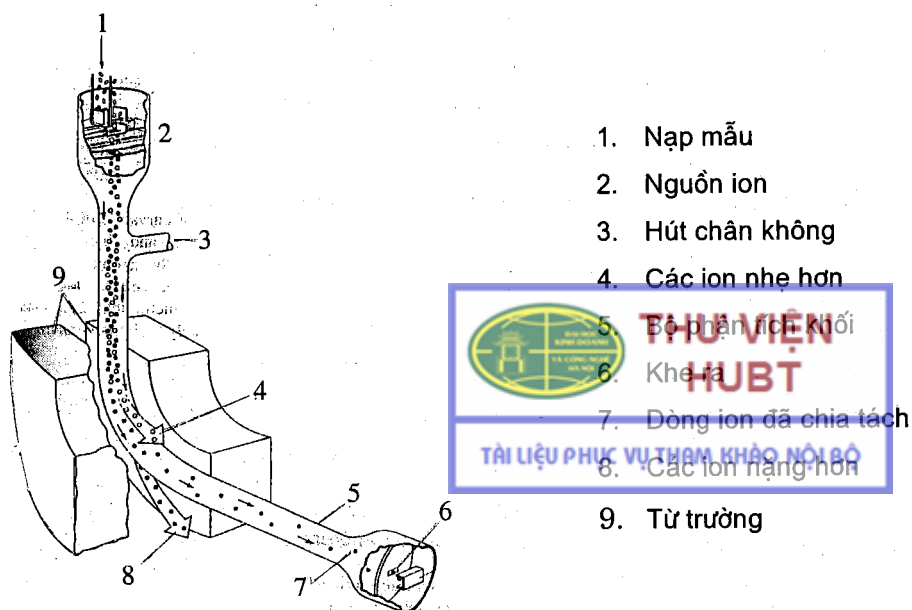
Bộ phân tích khối được coi là quả tim của máy khối phổ, có nhiệm vụ tách các ion có trị số m/z khác nhau thành từng phần riêng biệt. Có thể phân bộ phân tích khối thành 4 loại:

1. Bộ phân tích từ,
2. Bộ phân tích tứ cực,
3. Bộ phân tích thời gian bay,
4. Bộ phân tích cộng hưởng ion cyclotron.

Tính năng của máy khối phổ chủ yếu phụ thuộc vào bộ phân tích khối. Ba loại đầu được sử dụng rất phổ biến. Loại thứ tư đang triển khai sử dụng, có độ phân giải rất cao (khi kết hợp với chuyển dạng Fourier) thường dùng để xác định cấu trúc của các chất hữu cơ.

2.3.1. Bộ phân tích từ (Magnetic analyser)

❶ **Bộ hội tụ đơn:** Hình 7.4 mô tả sơ đồ máy khối phổ có bộ phân tích từ hội tụ đơn (single focusing magnetic analyser).



Hình 7.4. Bộ phân tích từ hội tụ đơn.

Một ion M^{z+} có khối lượng m , điện tích $+ze$ bay trong từ trường cường độ B với vận tốc v vuông góc với đường sức của từ trường, nó sẽ chuyển động trên đường tròn bán kính r được xác định bằng tỷ số m/ze . Khối lượng m bị chi phối bởi lực ly tâm $(mv^2)/r$ và lực hướng tâm $Bzev$. Hai lực này cân bằng với nhau:

$$\frac{mv^2}{r} = Bzev \rightarrow r = \frac{mv}{zeB} \quad (7.1)$$

Ion bay vào từ trường H được gia tốc bởi điện trường cường độ V . Động năng của ion sẽ là:

$$\frac{mv^2}{2} = zeV \quad (7.2)$$

Từ phương trình (7.1) và (7.2) ta có:

$$r = \sqrt{\frac{m}{ze} \cdot \frac{2V}{B^2}} \quad (7.3)$$

Hoặc:
$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2r^2}{2V} \quad (7.4)$$

Với giá trị của B và V xác định ở khe ra của thiết bị chỉ có các ion với tỷ số m/z xác định. Vì bán kính r của bộ phân tích từ cố định nên khi quét từ trường B giữ điện trường V không đổi hoặc ngược lại, ta sẽ có ở khe ra các ion có tỷ số m/z khác nhau và trên phổ khối sẽ có các vạch ứng với từng tỷ số khác nhau đó.

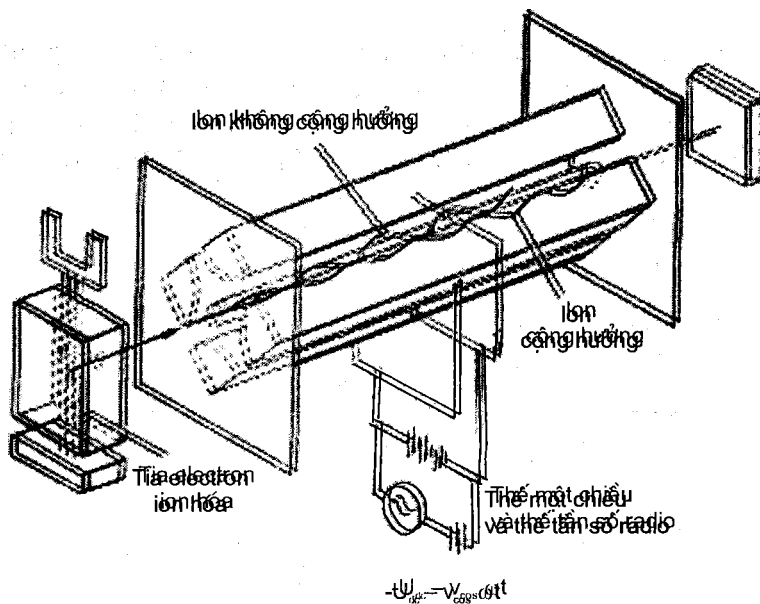
❷ Bộ hội tụ kép:

Để tăng độ phân giải khối, người ta nối bộ tách tĩnh điện (electrostatic separator) với bộ phân tích từ tạo ra bộ phân tích khối hội tụ kép (double focusing mass analyser). Các ion có khối lượng gần nhau khi bay qua trường tĩnh điện hình quạt được tách ra theo năng lượng tịnh tiến. Chỉ những ion có năng lượng tịnh tiến đồng nhất mới đi qua được các khe ở cuối trường tĩnh điện để vào trường từ - tách theo momen. Bằng cách quét cường độ từ trường để đưa các ion có tỷ số m/z khác nhau lần lượt hội tụ ở detector. Ta nhận được phổ khối có độ phân giải rất cao: giá trị của nó dao động trong khoảng 100.000 ± 150.000 . Trong nhiều trường hợp có thể cho tỷ số m/z đủ chính xác để xác định thành phần nguyên tố của chất phân tích.

2.3.2. Bộ phân tích tứ cực (Quadrupole analyser):

❶ Bộ tứ cực đơn:

Bộ phân tích này có 4 cực bằng kim loại đặt song song và sát nhau. Có một khoảng không giữa 4 cực đó để cho các ion bay qua (hình 7.5). Có điện thế một chiều và tín hiệu xoay chiều cao tần áp vào các cặp đối diện của bốn cực.

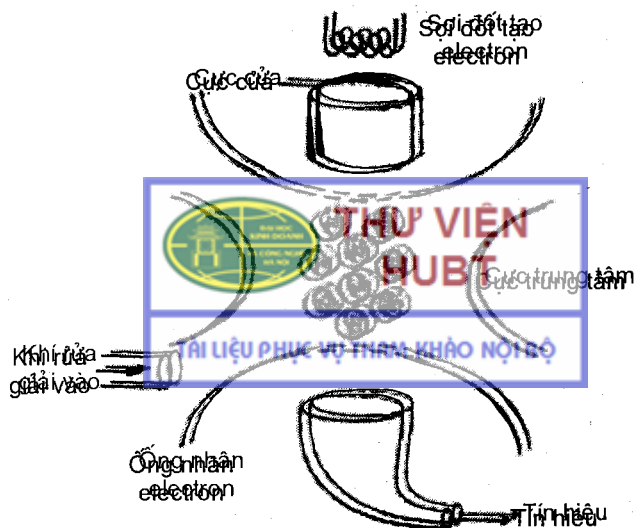


Hình 7.5. Bộ phận tích tụ cực đơn

Các ion bay qua khoảng trống giữa 4 cực được gia tốc bởi điện thế một chiều và tín hiệu xoay chiều. Thiết kế này sẽ tạo cho một số ion có tỷ số m/z xác định có thể đi thẳng qua khoảng trống đến detector. Đó là các ion cộng hưởng. Trong khi đó tất cả các ion khác không cộng hưởng với thế xoay chiều xác định sẽ có quỹ đạo không ổn định, va chạm với các cực và bị giữ lại ở đó. Bằng cách thay đổi thế áp vào các cực, các ion có tỷ số m/z khác nhau có thể vượt qua khoảng trống để đến detector.

● **Bẫy ion tứ cực (quadrupole ion trap):**

Bẫy ion tứ cực hoạt động theo nguyên lý của bộ phận tích khối tứ cực; chỉ có một điểm khác là các ion được lưu giữ và đưa dần ra khỏi bẫy. Hình 7.6 mô tả sơ đồ bẫy ion kết nối với GC.



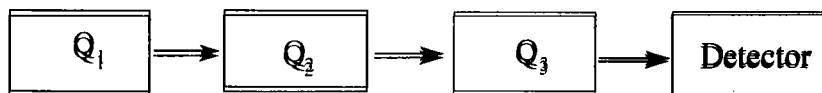
Hình 7.6. Sơ đồ bẫy ion.

Trên sơ đồ, khí rửa giải từ bên trái phía dưới đi vào hốc của bộ phân tích khối. Điện cực của ở phía trên cho các electron từ sợi đốt đi vào hốc và ion hoá các phân tử của mẫu nhờ va chạm điện tử (EI). Có thể sử dụng ion hoá hoá học nếu đưa thuốc thử khí vào.

Thế xoay chiều tần số radio áp vào cực trung tâm sẽ đưa các ion vào chuyển động tròn trong hốc với quỹ đạo ổn định. Bằng cách thay đổi thế xoay chiều làm cho một số ion có trị số m/z xác định chuyển động theo quỹ đạo không ổn định, rơi vào cực phía dưới của bẫy. Bộ phận nhận electron của detector sẽ thu nhận và phát hiện ion.

● Bộ tứ cực chập ba (Triple quadrupole analyser):

Bộ phân tích khối gồm ba bộ tứ cực nối tiếp nhau. Bộ Q_1 và Q_3 làm nhiệm vụ phân tích (hình 7.7).

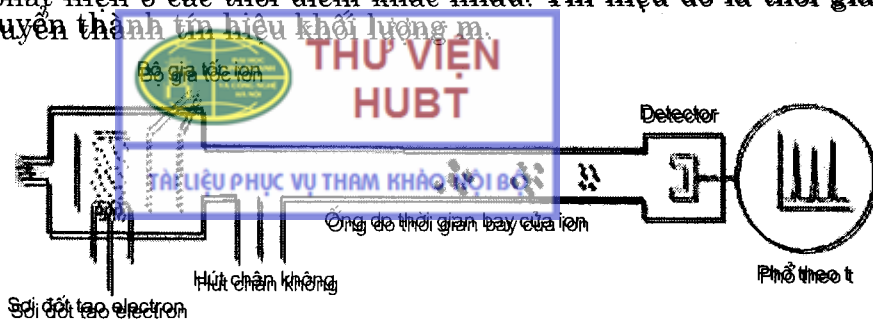


Hình 7.7. Bộ phân tích tứ cực chập ba.

Q_1 sẽ tách các ion; một số ion được chọn lọc (thường gọi là tiền ion) từ đây vào Q_2 . Trong buồng Q_2 với áp suất cao, các tiền ion bị phân ly do va chạm với khí trơ có mặt như nitơ, argon, heli. Bộ Q_2 tạo ra phân ly do va chạm (collision induced dissociation - CID). Nhờ va chạm này năng lượng động học của các ion chuyển thành nội năng nên chúng bị phân mảnh tiếp tạo ra các ion nhỏ hơn, ion con (daughter ions). Các ion con mới hình thành được dẫn tới Q_3 tách riêng và đến detector. Bộ phân tích tứ cực chập ba còn được gọi là tandem mass analyser theo tiếng Anh. Kỹ thuật phân tích khối phổ kiểu này được gọi là khối phổ hai lần: MS/MS (trong tiếng Anh thường dùng tandem mass spectrometry). Kỹ thuật này ra đời vào những năm 70 và được phát triển mạnh vào những năm 80, thường được dùng để khẳng định cấu trúc các chất hữu cơ và phân tích hỗn hợp nhiều thành phần chưa được tinh chế sạch.

2.3.3. Bộ phân tích thời gian bay (Time - of - flight analyser - TOF)

Các ion ra khỏi buồng ion hoá được gia tốc nhờ thế $10 + 20$ kV bay qua một ống phân tích (không có trường điện từ) có chiều dài đến 2m. Thời gian bay hết ống này đến detector tỷ lệ thuận với $\sqrt{m/z}$ của các ion. Ion có khối lượng m càng lớn càng cần nhiều thời gian. Các ion có khối m khác nhau sẽ được phát hiện ở các thời điểm khác nhau. Tín hiệu đo là thời gian nhưng có thể chuyển thành tín hiệu khối lượng m .



Hình 7.8. Sơ đồ bộ phân tích thời gian bay TOF

Kỹ thuật này chủ yếu được dùng cho phân tích các chất có khối lượng phân tử lớn (đến vài trăm ngàn đơn vị).

2.3.4. Bộ phân tích cộng hưởng ion cyclotron: (Ion cyclotron resonance analyser - ICR)

Bộ phân tích này dùng cho máy khối phổ kết hợp với chuyển đổi Fourier. Vì vậy có tên gọi bộ phân tích cộng hưởng ion cyclotron chuyển đổi Fourier (FT-ICR).

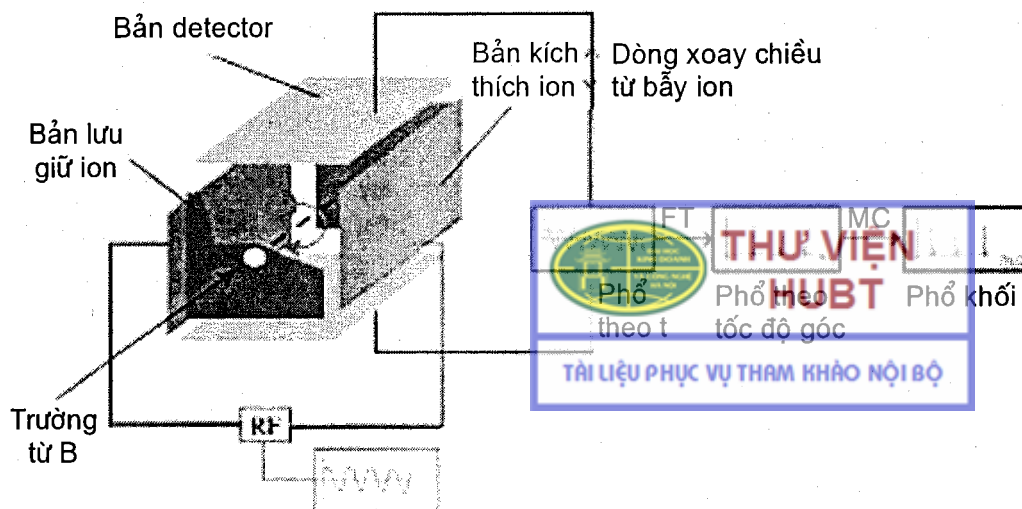
Các ion được tạo ra trong buồng ion hóa theo các cách đã trình bày ở trên, đi qua một hệ thống bơm đảm bảo độ chân không cao (áp suất $10^{-10} \div 10^{-11}$ mBar) vào đến bẫy ion - bẫy Penning. Bẫy này được đặt trong một từ trường mạnh đồng nhất, được làm lạnh bằng heli lỏng và nitơ lỏng, nhiệt độ ở đây gần đến độ không tuyệt đối.

Khi ion vào bẫy, dưới tác dụng của trường từ, nó sẽ chuyển động tròn trên mặt phẳng vuông góc với đường sức từ trường. Các ion nằm trong bẫy bị kích thích bởi trường điện xoay chiều tần số radio (RF) cho đến khi chúng va chạm vào thành bẫy (cộng hưởng). Một dòng xoay chiều tạo ra khi ion chuyển động tới gần bản detector được ghi lại theo thời gian. Nhờ chuyển đổi Fourier tín hiệu ghi theo thời gian được chuyển thành tín hiệu ghi theo tốc độ góc. Sau đó hệ chuyển khối sẽ đưa phổ tốc độ thành phổ khối.

Phương trình mô tả quan hệ giữa tốc độ góc ω_c và khối lượng ion:

$$m/z = \frac{B}{2\pi\omega_c}$$

Hình 7.9 mô tả sơ đồ của bẫy Penning và quá trình tạo tín hiệu.



Hình 7.9. Sơ đồ bẫy Penning của FT-ICR.

Bẫy có dạng hình lập phương: 6 mặt tách rời nhau các cặp mặt (bản) đối diện bằng kim loại có chức năng giống nhau. Hai bản trước và sau là từ trường B giữ ion chuyển động tròn đều trong bẫy. Hai bản bên phải và trái là trường điện RF kích thích ion. Hai bản trên và dưới là detector thu nhận tín hiệu xoay chiều tạo ra theo thời gian khi ion chuyển động đến gần chúng.

Kỹ thuật ICR - MS có độ nhạy cao nhất hiện nay, độ phân giải có thể đến 10^7 .

2.4. Detector

Hiện có 2 dạng truyền thống:

❶ Nhân electron (electron multiplier):

Tác động của một ion lên bề mặt của các bán dẫn sẽ tạo ra electron. Nó được tăng tốc, va chạm tiếp với bề mặt của các bán dẫn khác để tạo ra các electron khác. Quá trình cứ thế tiếp diễn để tạo ra nhiều electron. Các electron được thu nhận và số lượng của chúng tỷ lệ với cường độ tín hiệu - tức là số lượng ion đến detector.

❷ Nhân quang (photomultiplier):

Các electron tạo ra theo cách trên va chạm với một bề mặt phát quang để tạo ra photon. Các photon này được thu nhận và số lượng của chúng tỷ lệ với cường độ tín hiệu.

3. VAI ĐẶC ĐIỂM CỦA PHÂN TÍCH KHỐI PHỔ

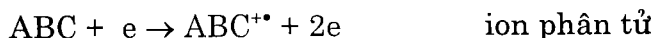
3.1. Quá trình phân mảnh

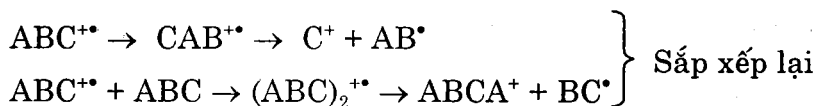
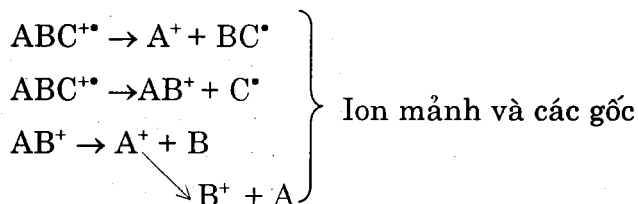
Năng lượng ion hóa là một yếu tố quyết định sự phân mảnh các hợp chất. Thế năng ion hóa của nhiều hợp chất hữu cơ vào khoảng 7÷ 12 eV. Khi năng lượng electron bắn phá mẫu bằng năng lượng ion hóa phân tử sẽ gây nên sự ion hóa.



Phổ khối sẽ có ít pic (vạch) cường độ bé.

Nếu năng lượng ion hóa tăng lên (30 ÷ 50 eV) sẽ dễ gây một số liên kết trong phân tử, tạo ra nhiều mảnh. Đó là các ion hoặc phân tử trung hoà có khối lượng bé hơn. Quá trình phân mảnh này đặc trưng cho cấu trúc của phân tử và chỉ ra sự có mặt của những nhóm chức đặc thù, cung cấp cho người phân tích những thông tin hữu ích về cấu tạo hoặc nhận dạng của chất phân tích. Mặt khác các ion và phân tử hình thành trong quá trình ion hóa có thể kết hợp lại với nhau tạo nên phân tử mới. Có thể minh họa quá trình phân mảnh và sắp xếp lại phân tử với một chất ABC giả định:





Quá trình phân mảnh là cơ sở giúp ta biện giải phổ, nhận dạng hoặc khẳng định cấu trúc của chất phân tích.

3.2. Độ phân giải của máy khối phổ

Một tính năng quan trọng của máy khối phổ là độ phân giải. Đó là khả năng của máy có thể phân biệt được 2 pic có khối lượng gần nhau m_1 và m_2 . Độ phân giải R là:

$$R = m_2 / (m_2 - m_1)$$

Hai pic cạnh nhau được coi là đã tách riêng khi phần chồng lấp giữa hai pic đó nhỏ hơn 10% pic nhỏ.

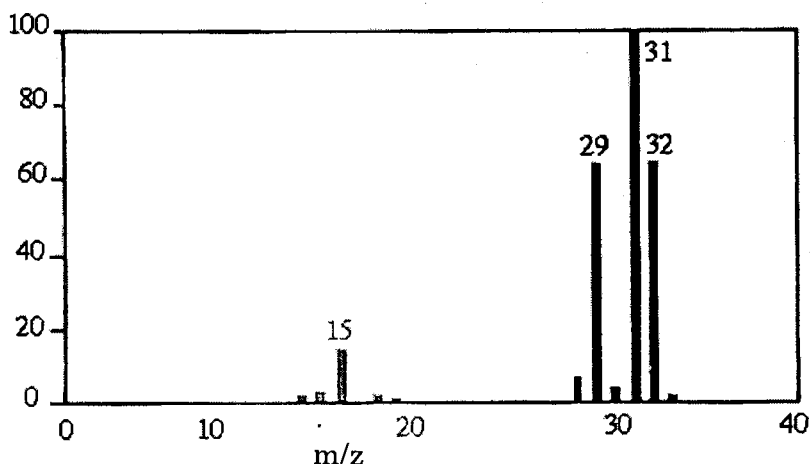
Bộ phân tích từ hội tụ đơn có trị số R khoảng 5000. Nhưng trong nhiều trường hợp cần có máy với độ phân giải cao hơn để phân biệt các ion có khối lượng gần nhau. Ví dụ:

Ion	Khối lượng đúng	Độ phân giải cần
$C_{18}H_{36}N_2^{+•}$	280,2881	25.000
$C_{19}H_{36}O^{+•}$	280,2768	

3.3. Trình bày dữ liệu

Khối phổ cho nhiều dạng dữ liệu. Phổ biến nhất là *phổ khối*, trình bày trên hệ trục: cường độ tương đối - trị số m/z. Người ta chọn pic có cường độ mạnh nhất được gọi là pic cơ bản (base peak) chấp nhận là 100 để tính cường độ tương đối của các pic khác (chế độ TIC: Total ion current). Hình 7.10 trình bày phổ khối của methanol và cường độ tương đối (%) của một số pic.

m/z	Cường độ tương đối(%)	m/z	Cường độ tương đối(%)
14	2,4	29	64
15	13	30	3,8
17	1,0	31	100
28	6,3	32	66



Hình 7.10: Phổ khối của methanol.

- **Chế độ SIM** (Single - ion monitoring) chọn tín hiệu của một ion hoặc chế độ MIM (multiple - ion monitoring) chọn tín hiệu của một số ion đặc trưng của chất phân tích. Phân tích định lượng hoặc bán định lượng được thực hiện theo đường chuẩn hoặc nội chuẩn.
- **Chế độ MRM** (Multiple reaction monitoring)

Theo dõi một số phản ứng phân mảnh của một tiền ion đặc trưng cho chất phân tích bằng khối phổ kép. Kỹ thuật này chỉ thực hiện được trên thiết bị phân tích tứ cực chập ba, bẫy ion hoặc cộng hưởng ion cyclotron.

- **Phổ ba chiều:**

Đôi khi người ta thể hiện dữ liệu phổ theo các đường đồng mức: m/z ở một trục, cường độ ở trục thứ hai và thời gian ở trục thứ ba tạo ra phổ 3D.

4. ỨNG DỤNG

Phân tích khối phổ được ứng dụng rất rộng rãi thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau của khoa học và công nghệ. Trong phạm vi giáo trình này chỉ giới thiệu vài ứng dụng phân tích khối phổ trong ngành dược.

4.1. Xác định các đồng vị

Các nguyên tử đồng vị của cùng một nguyên tố có cùng số điện tích hạt nhân, chỉ khác nhau về số neutron trong nhân đó nên khối lượng nguyên tử khác nhau. Có thể dùng MS để xác định thành phần đồng vị của các nguyên tố trong mẫu. Bảng 7.1 cho biết khối lượng, thành phần các đồng vị bền của một số nguyên tố thường gặp.

Bảng 7. Đồng vị bền của một số nguyên tố thường gặp.

Số thứ tự nguyên tử	Ký hiệu nguyên tố	Khối lượng đồng vị	Khối lượng chính xác đồng vị	Thành phần thiên nhiên (%)
1	H	1	1,0078	99,985
		2	2,0141	0,015
6	C	12	12,0000	98,893
		13	13,0034	1,107
7	N	14	14,00031	99,634
		15	15,0001	0,366
8	O	16	15,9949	99,759
		17	16,9991	0,037
		18	17,9992	0,204
17	Cl	35	34,9698	75,529
		37	36,9659	24,471
35	Br	79	78,9183	50,537
		81	80,9163	49,463

Trong thiên nhiên các nguyên tố thường gồm hỗn hợp nhiều đồng vị. Cho nên với các ion phân tử, ngoài tín hiệu của ion M^+ , còn có thể có tín hiệu của các ion phân tử khác có khối lượng $(M - 1)^+$, $(M + 1)^+$, $(M + 2)^+$ tạo thành từ các đồng vị. Trên phổ khối sẽ có nhiều tín hiệu lân cận M^+ .

Trong hợp chất tạo thành từ nhiều nguyên tử đồng vị của các nguyên tử, tỷ lệ đồng vị cũng có giá trị tương tự, ví dụ:

- Carbon thiên nhiên có 98,9% ^{12}C và 1,1% ^{13}C . Đó là tỷ lệ % của $^{12}\text{CH}_4$ và $^{13}\text{CH}_4$. Trên phổ khối, cường độ tín hiệu vạch khối 16 (của $^{13}\text{CH}_3^+$) chỉ bằng 1,1% so với vạch khối 15 (của $^{12}\text{CH}_3^+$).

Nếu phân tử có n nguyên tử C, cường độ vạch $(M + 1)^+$ thuộc ^{13}C sẽ có cường độ gần bằng $(1,1.n)\%$ cường độ vạch $(M + 1)^+$ thuộc ^{12}C .

- Hai đồng vị của brom có tỷ lệ gần bằng nhau. Nếu trên phổ khối có 2 tín hiệu cường độ gần như nhau mà chênh lệch 2 đơn vị khối, ta có thể nghĩ ngay hai tín hiệu thuộc phân tử hữu cơ có brom. Nếu cặp tín hiệu chênh lệch 2 đơn vị khối nhưng cường độ tín hiệu khối thấp (1/1) gấp ba lần tín hiệu khối cao hơn ta có thể nghĩ là chúng thuộc hợp chất có clor.

Nếu hợp chất của các nguyên tố chứa nhiều đồng vị, người ta có thể tính toán cường độ các pic dựa vào số tổ hợp có thể có của các đồng vị trong hợp chất đó.

4.2. Định tính

- Phân tích khối phổ có thể cho rất chính xác khối lượng các ion phân tử M^+ , $(M + 1)^+$, $(M + 2)^+$. Đây là đặc trưng quan trọng của hợp chất

hóa học. Bên cạnh đó, xem xét thêm các pic đồng vị, tỷ số cường độ của chúng cùng với khối lượng của vài mảnh ion có thể xác định được công thức nguyên của chất phân tích.

- Trong phân tích được thường sử dụng kết nối GC/MS hoặc HPLC/MS. Có thể so sánh phổ nghiên cứu với thư viện phổ có trong máy hoặc phổ nghiên cứu với phổ chất đối chiếu để khẳng định thành phần định tính của mẫu.

4.3. Xác định công thức cấu tạo

Sau phân tích định tính xác định được công thức nguyên của chất nghiên cứu, nếu muốn xác định công thức cấu tạo cần nghiên cứu kỹ hơn phổ khối. Trong trường hợp này cần dùng kỹ thuật ion hóa thích hợp. Phân chất nghiên cứu thành nhiều mảnh ion để làm rõ cấu tạo ghép nối của chúng. Việc biện giải phổ khối xác định cấu tạo của chất nghiên cứu dựa trên nhiều qui tắc kinh nghiệm. Trong nhiều trường hợp thường phối hợp phổ khối với phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ IR. Có thể tham khảo vấn đề này trong giáo trình chuyên đề của Hóa hữu cơ và tài liệu đọc thêm được giới thiệu ở cuối chương này.

4.4. Định lượng

- Phân tích định lượng khối phổ tương tự như các kỹ thuật khác dùng cách thiết lập đường chuẩn hoặc thêm đường chuẩn cùng với đo cường độ vạch phổ để xác định nồng độ.
- Trong phân tích được thường dùng các kết nối HPLC/MS, GC/MS hoặc CE/MS để có thể tăng đáng kể tính chọn lọc và giới hạn định lượng cho phương pháp phân tích mẫu. Nét nổi bật của phân tích khối phổ là tính chọn lọc và độ nhạy. Giới hạn phát hiện có thể đến 10^{-14} gam. Vì vậy thường dùng kỹ thuật này để phân tích hàm lượng *siêu vết* trong mẫu thành phần phức tạp.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Đức Huệ (2005), *Các phương pháp phân tích hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, chương 2, trang 121 - 159.
2. Kealey D., Haines P.J. (2002), *Instant Note, Analytical Chemistry*, Bios Scientific Publishers limited, Section E14, p.p 270 - 282.



CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 7.1. Giải thích nguyên tắc của phân tích khối phổ. So sánh với phân tích quang phổ.
- 7.2. Giải thích 3 kỹ thuật ion hóa mẫu: EI, CI và ESI. So sánh đánh giá đặc điểm của chúng.

- 7.3. Phân tích đặc điểm kỹ thuật giải hấp ion hóa.
- 7.4. Trình bày đặc điểm của bộ phân tích từ, nguyên lý hoạt động của máy khối phổ dựa vào bộ phân tích này.
- 7.5. So sánh bộ phân tích từ với bộ phân tích tứ cực về nguyên lý hoạt động, độ phân giải và ứng dụng.
- 7.6. Trình bày đặc điểm cấu tạo của bộ tứ cực chập ba. Giải thích thuật ngữ tiền ion, ion con (daughter ion).
- 7.7. Giải thích nguyên lý hoạt động của bộ phân tích cộng hưởng ion - cyclotron.
- 7.8. Độ phân giải của máy khối phổ. Ý nghĩa.
- 7.9. Cách xác định đồng vị trong khối phổ. Ý nghĩa của nó trong định tính và xác định cấu trúc.
- 7.10. Giải thích giao diện GC/MS. Ưu thế của kết nối này.
- 7.11. Trình bày cách ghép nối HPLC/MS. Nêu khó khăn và cách giải quyết. So sánh với ghép nối GC/MS.
- 7.12. Theo anh (chị) tại sao khối phổ là một công cụ phân tích mạnh ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau để phân tích các chất vô cơ và hữu cơ.



ĐẠI CƯƠNG VỀ SẮC KÝ

MỤC TIÊU

1. Giới thiệu được nguyên tắc và phân loại các kỹ thuật sắc ký.
2. Giải thích được ba thông số đặc trưng cho sắc ký lỏng: hệ số dung lượng k' , thời gian lưu, hệ số chọn lọc và tối ưu hóa quá trình tách sắc ký hai chất.
3. Trình bày được nguyên tắc ứng dụng của sắc ký trong phân tích định tính và định lượng.

Sắc ký là một kỹ thuật được ứng dụng trong nhiều ngành khoa học. Nhà thực vật người Nga Mikhail Tswett đã phát minh ra sắc ký vào năm 1906 khi dùng sắc ký cột với chất nhồi calci carbonat để tách các sắc tố thực vật chlorophyl và xanthophyl. Chính nhà phát minh đã đặt tên cho kỹ thuật này là chromatography. Tên này được ghép bởi hai từ Hy Lạp "chroma" có nghĩa là "màu" và graphein nghĩa là "viết". Trong mấy thập kỷ tiếp theo nghiên cứu về lý thuyết và ứng dụng của sắc ký đã phát triển rất mạnh mẽ.

Năm 1952 A.J.P.Martin và R.L.M.Synge đã được tặng giải thưởng Nobel do những phát minh của họ trong lĩnh vực sắc ký, đặc biệt là sắc ký khí. Tiếp theo nhiều công trình nhằm hoàn thiện về kỹ thuật, về các loại cột dùng cho sắc ký. Giữa những năm 1937 - 1972 đã có 12 giải thưởng Nobel cho những công trình khoa học trong đó sắc ký là nội dung chủ yếu. Hiện nay các kỹ thuật sắc ký luôn có vai trò quan trọng trong nghiên cứu lý thuyết cũng như ứng dụng của khoa học và công nghệ.

1. MỘT SỐ VẤN ĐỀ CHUNG SẮC KÝ

Tất cả các loại hình sắc ký đều có nguyên lý tách giống nhau: mẫu phân tích được hoà tan trong một pha động. Pha này có thể là một chất khí, chất lỏng hoặc chất lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid) được cho qua pha tĩnh một cách liên tục và không hoà lẫn với nó. Pha tĩnh được cố định trong cột hay trên bề mặt chất rắn. Các chất tan là thành phần của mẫu sẽ di chuyển qua cột theo pha động với tốc độ khác nhau tùy thuộc vào tương tác giữa pha tĩnh - pha động và chất tan. Nhờ tốc độ di chuyển khác nhau các thành phần của mẫu sẽ tách riêng biệt thành dải, làm cơ sở cho phân tích định tính và định lượng.

Trên cơ sở nguyên lý này có thể phân loại các kỹ thuật sắc ký theo nhiều cách khác nhau.

1.1. Phân loại sắc ký

- Dựa vào phương cách lưu giữ *pha tĩnh* người ta chia sắc ký làm hai nhóm:
 - + Sắc ký cột (column chromatography): Pha tĩnh được giữ trong ống nhỏ, pha động đi qua pha tĩnh nhờ áp suất hoặc trọng lực.
 - + Sắc ký phẳng (planar chromatography): Pha tĩnh được cố định trên một mặt phẳng (giấy, bản mỏng), pha động di chuyển qua mặt đó nhờ mao dẫn hoặc tác động của trọng lực.
- Một cách phân loại cụ thể hơn dựa vào *bản chất vật lý* của pha động, pha tĩnh và loại cân bằng tạo nên sự di chuyển qua cột của chất tan giữa hai pha (bảng 8.1)

Bảng 8.1. Phân loại sắc ký cột.

Tên kỹ thuật	Pha tĩnh	Loại cân bằng
* Sắc ký lỏng (LC) Pha động: chất lỏng	- Chất lỏng được hấp phụ trên 1 chất rắn - Pha liên kết - Chất rắn	- Phân bố giữa 2 pha lỏng - Phân bố giữa pha lỏng và bề mặt pha liên kết - Hấp phụ
* Sắc ký khí (GC) Pha động: chất khí	- Chất lỏng được hấp phụ trên chất rắn - Pha liên kết - Chất rắn	- Phân bố giữa pha khí và pha lỏng - Phân bố giữa pha khí và pha liên kết - Hấp phụ
* Sắc ký lỏng siêu tới hạn (SFC) Pha động là chất lỏng siêu tới hạn	- Pha liên kết	- Phân bố giữa pha lỏng siêu tới hạn và pha liên kết

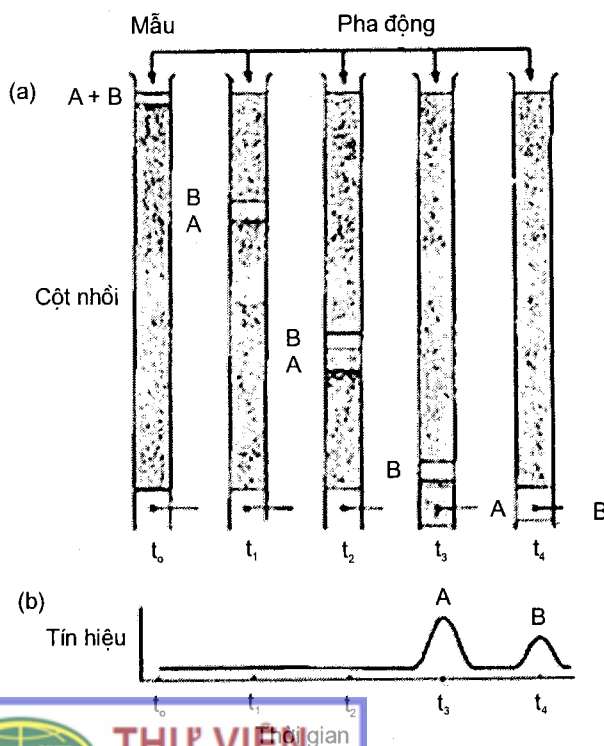
Sắc ký lỏng có thể thực hiện trong cột hoặc trên mặt phẳng. Còn sắc ký khí và sắc ký lỏng siêu tới hạn chỉ có thể trong cột.

- Dựa vào phương cách cho *pha động chạy qua pha tĩnh*, người ta phân ra hai loại:
 - + Sắc ký khai triển (development chromatography): Pha động đưa các thành phần trong mẫu di chuyển và tách ngay trên pha tĩnh. Sắc ký đồ nằm trên pha tĩnh. Sắc ký khai triển thường thực hiện trên mặt phẳng.
 - + Sắc ký rửa giải (Elution chromatography): Pha động đưa các thành phần trong mẫu di chuyển lần lượt ra ngoài pha tĩnh. Sắc ký đồ nằm ngoài pha tĩnh. Sắc ký rửa giải thường thực hiện trên cột.

- Dựa vào bản chất của quá trình sắc ký, người ta có (bảng 8.1):
- + Sắc ký phân bố (Partition chromatography): Phân tích sắc ký này dựa vào phân bố các chất giữa hai hệ lỏng - lỏng và khí - lỏng.
- + Sắc ký hấp phụ (Adsorption chromatography): Pha tĩnh là chất rắn có khả năng hấp phụ các chất. Cân bằng này xuất hiện trong hệ lỏng - rắn và khí - rắn.
- + Sắc ký trao đổi ion (ion - exchange chromatography): Pha tĩnh là nhựa trao đổi ion. Nhựa này mang những ion trao đổi được với ion cùng dấu trong mẫu phân tích.
- + Sắc ký trên gel (Gel permeation hoặc gel filtration chromatography)

1.2. Sắc ký rửa giải trên cột

Hình 8.1 mô tả sơ đồ di chuyển của 2 chất A & B trên cột sắc ký. Quá trình rửa giải được thực hiện bằng cách thêm liên tục lượng mới của pha động.



Hình 8.1

Sơ đồ tách hai chất A & B từ hỗn hợp bằng sắc ký rửa giải (a), sắc ký đồ (b).

Mẫu phân tích hòa tan trong pha động được đưa vào đầu cột (ứng với thời gian t_0). Khi đưa các phần mới của pha động vào cột buộc pha động hòa tan mẫu di chuyển xuống theo cột. Trong quá trình di chuyển có sự phân bố mẫu giữa hai pha. Thêm liên tục pha động sẽ đưa A và B di chuyển tiếp theo cột nhưng với tốc độ khác nhau. Sự khác nhau về tốc độ đã phân hai thành phần trong hỗn hợp thành hai vùng khác nhau dọc theo chiều dài cột (ứng với thời

gian t_2 trên hình vẽ). Ở đây A di chuyển nhanh hơn vì bị pha tĩnh giữ yếu hơn. Còn B ngược lại, bị pha tĩnh giữ lại mạnh hơn nên di chuyển theo pha động chậm hơn.

Quá trình tách hoàn thành khi thêm đủ lượng pha động vào cột để tách riêng biệt thành 2 dải ở cuối cột và ra ngoài (ứng với thời gian t_3 và t_4 trên hình).

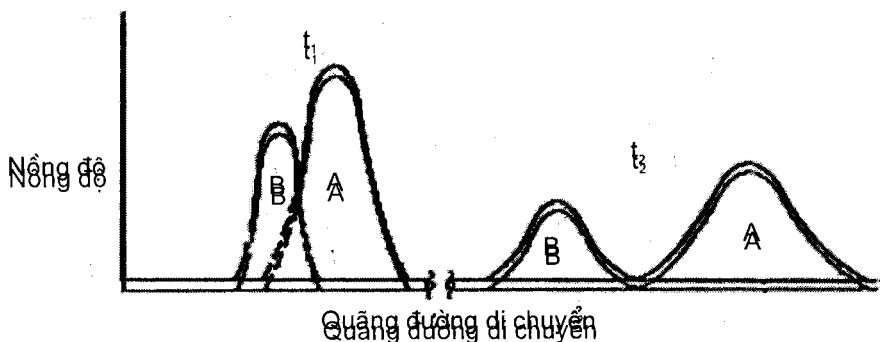
Nếu ở cuối cột có detector phát hiện sự có mặt (thường qua tín hiệu) của A và B, tín hiệu trên được vẽ theo thời gian hoặc thể tích của pha động qua cột, ta sẽ có đồ thị với một số pic sắc ký. Đó là sắc ký đồ, nó được dùng cho phân tích định tính và định lượng.

2. PIC SẮC KÝ VÀ CÁC THÔNG SỐ ĐẶC TRƯNG CHO QUÁ TRÌNH RỬA GIẢI

Hiệu quả tách của cột sắc ký phụ thuộc một phần vào tốc độ di chuyển qua cột của các chất trong quá trình rửa giải. Tốc độ này phụ thuộc vào sự phân bố các chất giữa hai pha. Có một vài thông số đặc trưng cho quá trình rửa giải.

2.1: Sự di chuyển của các chất

Hình 8.2 mô tả nồng độ của chất A và chất B ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình rửa giải theo quãng đường di chuyển dọc chiều dài cột sắc ký.

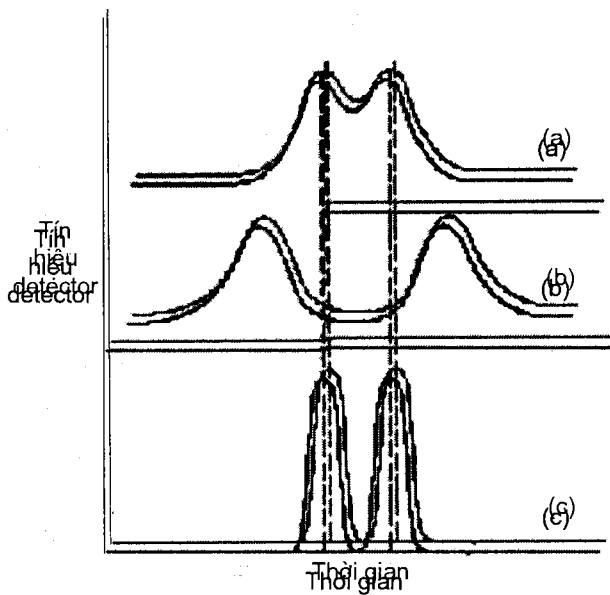


Hình 8.2: Nồng độ của chất A và chất B ở hai thời điểm t_1 , t_2 khi di chuyển dọc theo cột.

Chất B được lưu giữ mạnh hơn so với chất A. Sự di chuyển xuống theo cột sẽ tăng khoảng cách giữa hai dải. Vì vậy để tách hoàn toàn các chất trong hỗn hợp thành các pic riêng biệt, cần có cột đủ dài. Mặt khác để tách các chất trên một cột có thể thực hiện theo 2 phương án:

- Thay đổi tốc độ di chuyển của các chất phân tích
- Thay đổi (giảm) độ rộng của pic

Hình 8.3 mô tả hai cách tăng độ phân giải hai chất trong hỗn hợp. Ở (a) hai pic xen phủ nhau. Để tách hai pic người ta có thể thay đổi điều kiện sắc ký để tăng tốc tách 2 pic (b). Cũng có thể tách bằng cách giảm tốc độ giãn rộng pic, pic nhọn hơn không xen phủ nhau (thời gian lưu không đổi).



Hình 8.3: Sắc ký để tách hai thành phần trong hỗn hợp.

(a) Hai pic xen phủ

(b) và (c) Hai pic tách khỏi nhau

2.1.1. Hệ số phân bố K (Partition coefficient):

Tốc độ di chuyển của chất tan qua pha tĩnh được xác định bởi hệ số phân bố K

$$K = \frac{C_s}{C_M} \quad (8.1)$$

Ở đây C_s là nồng độ mol của chất tan trong pha tĩnh và C_M là nồng độ mol trong pha động. Áp lực tương đối của chất tan với hai pha sẽ lượng giá hệ số K . Trị số K càng lớn, sự di chuyển của chất tan qua pha tĩnh càng chậm. Nếu các chất trong hỗn hợp có hằng số K khác nhau càng nhiều, thì khả năng tách diễn ra càng dễ dàng hơn.

Theo phương trình (8.1), nếu hệ số K giữ không đổi trên một khoảng nồng độ thì nồng độ C_s tỷ lệ thuận với nồng độ C_M trong pha động. Người ta gọi đó là **sắc ký tuyến tính**. Chúng ta khảo sát chủ yếu loại hình sắc ký này.

2.1.2. Thời gian lưu t_R (Retention time):

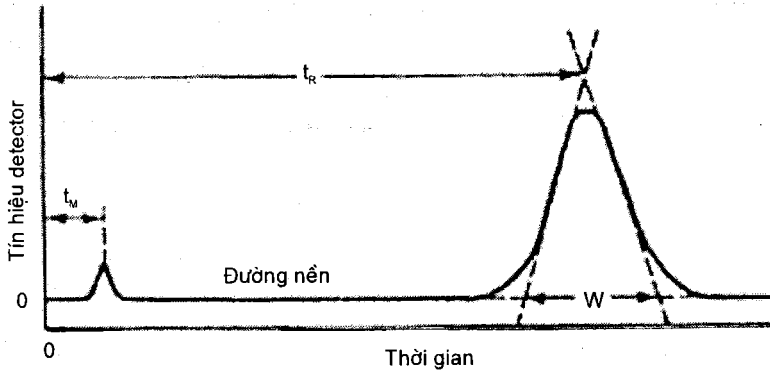
Hình 8.4 là sắc ký đồ của một chất. Trục tung là tín hiệu của detector, trục hoành là thời gian. Khoảng thời gian từ lúc tiêm mẫu vào cột đến khi pic đến detector được gọi là thời gian lưu t_R . Pic nhỏ bên trái là của chất không lưu giữ. Tốc độ di chuyển của nó bằng tốc độ di chuyển trung bình của các phân tử pha động. Thời gian t_M của các chất không lưu giữ được gọi là **thời gian chết**.

Tốc độ trung bình của chất phân tích $\bar{v}$ là:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (8.2)$$

Ở đây L là chiều dài cột. Tương tự $\bar{v}$, tốc độ trung bình của các phân tử pha động là:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (8.3)$$



Hình 8.4. Sắc ký đồ một thành phần.

Thời gian lưu hiệu chỉnh t'_R là:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (8.4)$$

Nếu trục hoành của sắc ký đồ là đơn vị thể tích pha động thay cho thời gian, ta sẽ có thể tích lưu V_R , thể tích chết V_M của cột. V_M chính là thể tích pha động có trong cột từ nơi tiêm mẫu đến detector, nó còn được gọi là thể tích rỗng V_o . Thể tích lưu hiệu chỉnh V'_R :

$$V'_R = V_R - V_M \quad (8.5)$$

* Liên quan giữa t_R và hệ số K :

Tốc độ di chuyển của chất phân tích A là một phần của tốc độ pha động.

$$\bar{v} = u \times \text{phần thời gian của A ở trong pha động}$$

Phần thời gian này bằng tỷ số mol của chất A trong pha động ở một thời điểm chia cho tổng số mol chất A trong cột, cho nên:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{C_M \cdot V_M}{C_M \cdot V_M + C_S \cdot V_S} = u \cdot \frac{1}{1 + K V_S / V_M} \quad (8.6)$$

V_S và V_M là thể tích của pha tĩnh và pha động tương ứng.

Từ (8.6) ta thấy: tốc độ di chuyển của chất phân tích A phụ thuộc vào hệ số phân bố K và tỷ số thể tích hai pha V_S / V_M . Tốc độ di chuyển $\bar{v}$ càng bé khi hệ số K càng lớn, tức là chất A giữ lại ở pha tĩnh càng nhiều.

2.1.3. Hệ số dung lượng k' (Capacity factor)

Hệ số k' là một thông số quan trọng mô tả tốc độ di chuyển của chất phân tích A qua cột. Hệ số k' còn được gọi là hệ số phân bố khối lượng giữa hai pha:

$$k'_A = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K_A \cdot \frac{V_S}{V_M} \quad (8.7)$$

Đưa phương trình (8.7) vào (8.6) ta có:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{1}{1 + k'_A} \quad (8.8)$$

Đưa phương trình (8.2) và (8.3) vào phương trình (8.8) ta có:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k'_A} \quad (8.9)$$

Sắp xếp lại ta có:

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (8.10)$$

Như vậy, hệ số k'_A có thể tính được dễ dàng từ sắc ký đồ (xem hình 8.4). Từ đây ta thấy:

- Khác với hệ số phân bố K_A , hệ số k'_A phụ thuộc không chỉ vào bản chất của chất A, bản chất của hai pha mà còn phụ thuộc vào tỷ lệ V_S/V_M .
- Nếu hệ số $k'_A \ll 1$ quá trình rửa giải diễn ra quá nhanh cho nên khó xác định chính xác thời gian t_R . Ngược lại, nếu k'_A quá lớn (ví dụ 20 ÷ 30), quá trình rửa giải quá dài. Thường người ta chọn điều kiện sắc ký để k' dao động từ 1 → 5.

2.1.4. Hệ số chọn lọc α (Selectivity factor):

Để đặc trưng cho tốc độ di chuyển tỷ đối của 2 chất A và B, người ta dùng hệ số chọn lọc α :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (8.11)$$

Theo qui ước $K_B > K_A$ nên α luôn lớn hơn 1. Đưa hệ số k'_A ở phương trình (8.7) và phương trình tương tự cho k'_B vào phương trình (8.11) ta thu được:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (8.12)$$

Đưa phương trình (8.10) giá trị hệ số k'_A và k'_B vào (8.12):

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (8.13)$$

Để tách riêng 2 chất A và B cần $\alpha > 1$; thường chọn α dao động trong khoảng $1,05 \div 2$. Nếu α lớn quá thời gian phân tích sẽ dài.

Trong phần sau ta sẽ khảo sát cách tính độ phân giải của cột sắc ký từ hệ số k' và α .

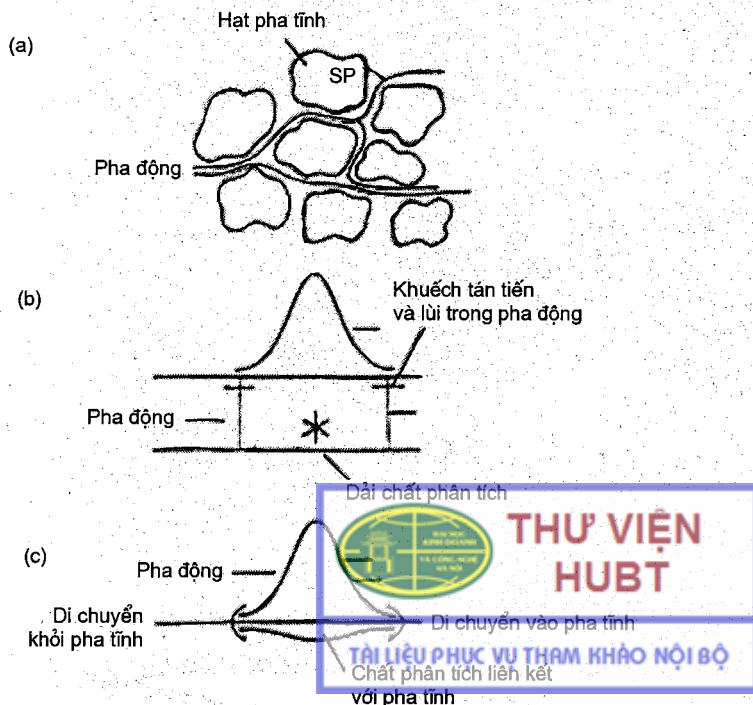
2.2. Hình dáng pic sắc ký

Quan sát pic trên sắc ký đồ ở hình 8.4 (vẽ theo thời gian) và hình 8.2 (vẽ theo quãng đường di chuyển) cho thấy pic sắc ký có hình dáng tương tự đường cong sai số chuẩn (phân bố Gauss).

Dạng pic sắc ký có tính đối xứng như phân bố Gauss là dạng lý tưởng. Trong thực tế thường bị giãn ra và chỉ gần đối xứng.

2.2.1. Sự giãn pic sắc ký

Chất tan di chuyển theo pha động qua pha tĩnh sẽ mở rộng dải và pic trên sắc ký đồ thường trở nên không đối xứng. Có thể thống kê một số nguyên nhân chính gây nên hiện tượng mở rộng dải, làm giảm độ nhọn của pic sắc ký:



Hình 8.5. Minh họa ba nguyên nhân mở rộng dải.

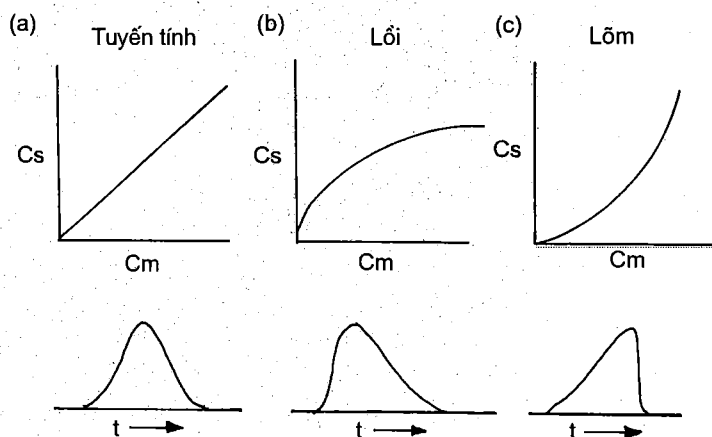
- Di chuyển theo nhiều đường khác nhau;
- Khuếch tán dọc theo cột;
- Chuyển khối không cân bằng.

- Quãng đường di chuyển theo pha động của các phân tử chất tan qua cột không hoàn toàn như nhau. Vì pha động phải qua các kẽ hở giữa các hạt nhồi trong cột (hình 8.5a). Điều này làm pic giãn rộng ra do di chuyển theo nhiều đường khác nhau. Đó là khuếch tán xoáy (Eddy diffusion).
- Phân tử chất tan khuếch tán dọc theo cột (longitudinal diffusion). Nó còn được gọi là khuếch tán trục (axial diffusion), kiểu khuếch tán này có thể cùng hướng và ngược hướng với pha động (hình 8.5b).
- Quá trình phân bố chất tan giữa pha tĩnh và pha động - tức là quá trình chuyển khối (mass transfer) không xảy ra tức thời. Pha động di chuyển liên tục nên thực sự không có cân bằng của chất tan giữa hai pha: quá trình chuyển khối không cân bằng (hình 8.5c).

2.2.2. Tính đối xứng của pic sắc ký

Sự tạo thành pic sắc ký đối xứng như đường cong phân bố Gauss chỉ diễn ra trong *sắc ký tuyến tính* (mục 8.2.1.a). Ở đây hệ số phân bố K giữ giá trị không đổi trên một khoảng nồng độ của chất phân tích. Đồ thị sự phụ thuộc của nồng độ trong pha tĩnh C_M thay đổi tuyến tính với nồng độ trong pha động C_m (hình 8.7a).

Nếu đồ thị trên không tuyến tính đúng như phương trình (8.1), mà có dạng đường cong lồi (convex) thì pic sắc ký sẽ kéo đuôi (tailing) hoặc dạng đường cong lõm (concave): pic sẽ đổ đầu (fronting).



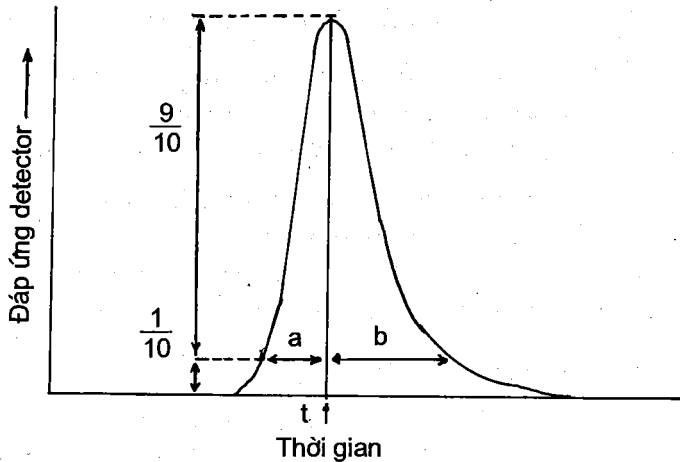
Hình 8.6. Ba dạng pic minh họa tính đối xứng:
a) Đối xứng Gauss b) Kéo đuôi c) Đổ đầu

Để đánh giá tính bất đối xứng người ta dùng hệ số bất đối AF (assymetry factor):

$$AF = \frac{b}{a} \quad (8.14)$$

Ở đây: b : Nửa chiều rộng phía sau pic,
 a : Nửa chiều rộng phía trước pic.

Chiều rộng pic đo ở 1/10 chiều cao pic. Giá trị AF càng gần tới 1, pic càng đối xứng.



Hình 8.7. Pic sắc ký.

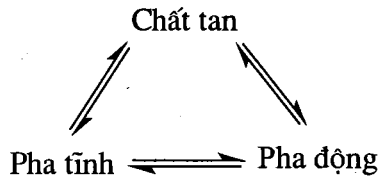
Người ta còn dùng hệ số kéo đuôi A_s của pic để đánh giá tính đối xứng của nó:

$$A_s = \frac{a + b}{2a} \quad (8.15)$$

Ở đây trị số a và b được đo ở 1/20 chiều cao pic. Nếu A_s càng lớn hơn 1, pic kéo đuôi càng nhiều, pic càng mất cân đối.

3. LÝ THUYẾT SẮC KÝ

Sắc ký là một quá trình phức tạp, có sự tương tác giữa 3 thành phần:



Có nhiều công trình khoa học đưa ra lý thuyết mô tả quá trình sắc ký, giải thích một cách định lượng pic sắc ký và các yếu tố ảnh hưởng đến đặc trưng của pic. Lý thuyết sắc ký khá phức tạp, dựa nhiều vào cơ sở của hóa lý và toán học. Trong giáo trình phân tích chỉ có thể giới thiệu một cách định tính hai nội dung được nhiều tài liệu đề cập đến: lý thuyết đĩa và lý thuyết động học.

3.1. Lý thuyết đĩa

Phương pháp đĩa lý thuyết đã được dùng đầu tiên để giải thích quá trình chưng cất. Năm 1941 Martin và Synge đã dùng phương pháp này để mô tả

quá trình sắc ký. Theo họ, cột sắc ký có thể phân ra thành nhiều lớp mỏng xếp sát nhau được gọi là *đĩa lý thuyết*. Ở mỗi đĩa sẽ diễn ra sự phân bố cân bằng tức thời của chất tan giữa pha tĩnh và pha động. Khi một phần mới pha động đưa vào đĩa sẽ làm dịch chuyển cân bằng và một phần chất tan theo pha động sang đĩa tiếp sau. Ở đĩa này cân bằng mới được thiết lập và chất tan lại theo pha động sang tiếp đĩa sau nữa. Nhờ thiết lập quá trình cân bằng ở các đĩa nối tiếp nhau như thế, chất tan sẽ được phân bố trong một số đĩa và trong số đĩa này các đĩa ở giữa có nồng độ cực đại so với các đĩa lân cận ở hai bên. Sự phân bố chất tan dọc theo cột tuân theo phương trình sau:

$$C = C_{\max} \exp \left[- \frac{(x - x_0)^2}{2LH} \right] \tag{8.16}$$

Ở đây: L là chiều dài của cột được chia thành N đĩa lý thuyết;
H là chiều cao của đĩa lý thuyết,
 x_0 là toạ độ của tâm dải sắc ký, ứng với nồng độ $C_{\max}$,
x là khoảng cách từ đầu cột đến điểm tại đó có nồng độ là C.
Số đĩa lý thuyết tưởng tượng sẽ là:

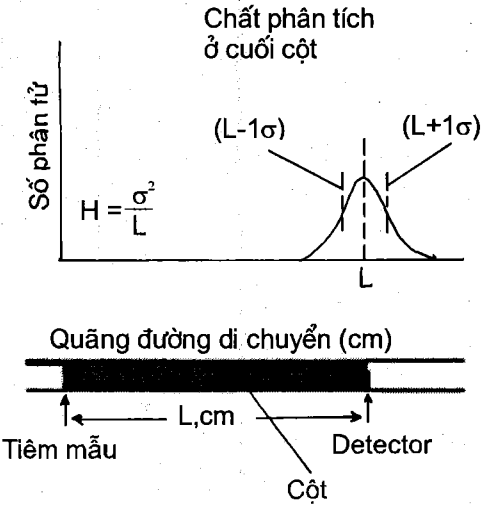
$$N = \frac{L}{H} \tag{8.17}$$

3.1.1. Xác định chiều cao đĩa H

Như trên đã nói pic sắc ký lý tưởng tương tự đường cong Gauss. Chiều rộng của đường cong Gauss liên quan trực tiếp đến phương sai σ^2 . Vì pic sắc ký có dạng phân bố Gauss và hiệu lực của cột được thể hiện ở bề rộng của pic nên có thể biểu diễn chiều cao đĩa H (thể hiện là hiệu lực của cột) bằng phương sai cho một đơn vị chiều dài cột:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \tag{8.18}$$

Hình 8.8 minh họa việc xác định chiều cao đĩa H. Trên hình vẽ cho thấy chiều cao đĩa H là chiều dài của cột có phần chất tan nằm giữa L - σ và L + σ . Theo phân bố diện tích của đường cong Gauss: diện tích giới hạn bởi L $\pm$ σ chiếm 68% diện tích toàn phần. Cho nên diện tích giới hạn bởi chiều cao đĩa H có 34% chất tan.



Hình 8.8. Chiều cao đĩa H

3.1.2. Tính N và H

Nếu trục hoành của sắc ký đồ là thời gian (hình 8.4) ta sẽ thấy có sự tương đồng của σ , độ lệch chuẩn theo đơn vị chiều dài cột và τ độ lệch chuẩn theo đơn vị thời gian.

Từ phương trình (8.2): $L = \bar{v} t_R$ ứng với chiều dài cột ta có σ , ứng với thời gian ta có τ nên:

$$\left. \begin{array}{l} L = \bar{v} \cdot t_R \\ \sigma = \bar{v} \cdot \tau \end{array} \right\} \frac{L}{\sigma} = \frac{t_R}{\tau} \rightarrow \sigma = \frac{L \cdot \tau}{t_R} \quad (8.19)$$

Từ hai phương trình (8.18) và (8.19) ta có:

$$t_R^2 = \frac{L\tau^2}{H} \quad (8.20)$$

Vì $N = L/H$ cho nên:

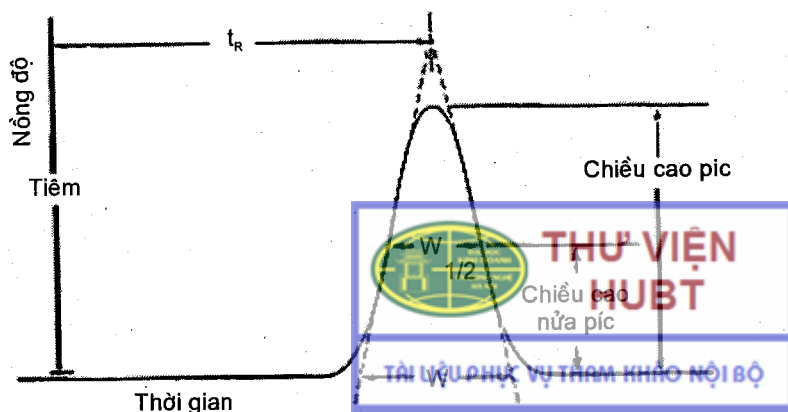
$$t_R = \tau \sqrt{N} \quad (8.21)$$

Chiều rộng W của pic sắc ký - tương tự đường cong Gauss - được xác định theo đơn vị độ lệch chuẩn (hình 8.9):

$$w = 4\tau \quad (8.22)$$

Từ hai phương trình (8.21) và (8.22) ta có:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (8.23)$$



Hình 8.9. Pic sắc ký

Một số tác giả cho rằng tính số đĩa N từ chiều rộng pic $w_{1/2}$ ứng với một nửa chiều cao của pic sẽ cho kết quả tin cậy hơn. Bởi vì $w = 1,7w_{1/2}$, thay trị số w vào phương trình (8.23) ta có:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (8.24)$$

Số đĩa lý thuyết N và chiều cao đĩa H được dùng rộng rãi để mô tả hiệu lực của cột sắc ký. Đó là 2 thông số quan trọng đặc trưng cho quá trình rửa giải. Tuy nhiên lý thuyết đĩa chưa xem xét đến các yếu tố trong và ngoài cột ảnh hưởng đến pic sắc ký, làm giãn pic. Lý thuyết động học bổ sung cho những nhược điểm của lý thuyết đĩa.

3.2. Lý thuyết động học

Lý thuyết động học của quá trình sắc ký dựa vào mối liên quan của chiều cao đĩa lý thuyết H với các yếu tố động học trong quá trình rửa giải. Đó là:

- Sự khuếch tán của chất tan khi di chuyển trong cột,
- Sự thiết lập cân bằng theo tương tác: chất tan - pha động - pha tĩnh,
- Tốc độ của các quá trình tương tác diễn ra trong cột.

3.2.1. Phương trình Van Deemter

Sau thuyết đĩa của Martin và Synge tính toán lý thuyết chiều cao đĩa H và số đĩa lý thuyết N , Van Deemter - một kỹ sư hóa người Hà Lan khi nghiên cứu lý thuyết liên quan đến mở rộng dải sắc ký, đã thiết lập phương trình mô tả sự phụ thuộc của chiều cao đĩa H theo 3 yếu tố động học:

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (8.25)$$

Ở đây:

A, B, C là ba hằng số,

u là vận tốc của pha động.

❶ Hằng số A liên quan đến khuếch tán xoáy (Eddy diffusion) của chất tan di chuyển theo pha động qua cột (hình 8.5a). Thực tế tốc độ pha động thay đổi từ điểm này đến điểm khác phụ thuộc vào nhiều yếu tố:

- Khoảng cách đến bề mặt hạt nhồi trong cột, độ đồng đều của hạt (hình dáng và kích thước hạt).
- Hiệu ứng thành cột.

Ngay trong một ống rỗng, dòng chảy qua ống do hiệu ứng thành ống có vận tốc khác nhau: ở thành ống vận tốc rất bé, gần bằng không, ở trung tâm ống (trục ống) vận tốc cực đại. Trong trường hợp của cột sắc ký nhồi đầy hạt, tính chất của dòng chảy càng phức tạp hơn, phụ thuộc vào tính chất của pha động, đặc điểm kỹ thuật của cột sắc ký (đặc điểm của hạt, mật độ nhồi cột, đường kính trong của cột). Người ta nhận thấy sự thay đổi tốc độ dòng tác

động không đáng kể đến khuếch tán xoáy của chất tan. Cho nên số hạng thứ nhất không có đại lượng u .

② Số hạng thứ hai liên quan đến khuếch tán dọc theo cột của chất tan trong pha động (hình 8.6b). Các phân tử chất tan sẽ khuếch tán từ vùng có nồng độ cao sang vùng có nồng độ thấp hơn. Trong cột sắc ký, phân tử chất tan sẽ khuếch tán ra khỏi dải ở cả 2 phía: phía trước và phía sau dải, cho nên dải được mở rộng ra. Nếu thời gian ở trong cột càng lâu sự khuếch tán dọc theo cột càng mạnh. Cho nên tốc độ pha động càng tăng, thời gian lưu lại trong cột của chất tan càng ngắn và hiệu ứng khuếch tán dọc càng giảm: tác động của khuếch tán dọc tỷ lệ nghịch với tốc độ pha động u .

③ Số hạng thứ ba đặc trưng cho quá trình chuyển khối (hình 8.5c). Chất tan di chuyển trong pha động, trong pha tĩnh và cả ở mặt phân cách của hai pha với tốc độ khác nhau. Sự phân bố chất tan trong dòng chảy qua cột sắc ký không thể đạt cân bằng thực vì quá trình chuyển khối giữa hai pha không diễn ra tức thời. Nếu tốc độ dòng càng lớn sự cân bằng càng khó vì phân tử chất tan trong pha động càng ít có cơ hội chuyển vào pha tĩnh mà lướt nhanh lên phía trước dải; trong khi đó một số phân tử chất tan trong pha tĩnh đi vào pha động càng chậm nên nằm lại phía sau dải. Kết quả là dải mở rộng về hai phía. Rõ ràng trong trường hợp này hiệu ứng mở rộng pic sắc ký liên quan đến động học của quá trình hấp và giải hấp chất tan, tăng tỷ lệ thuận với tốc độ dòng: ta có C_u .

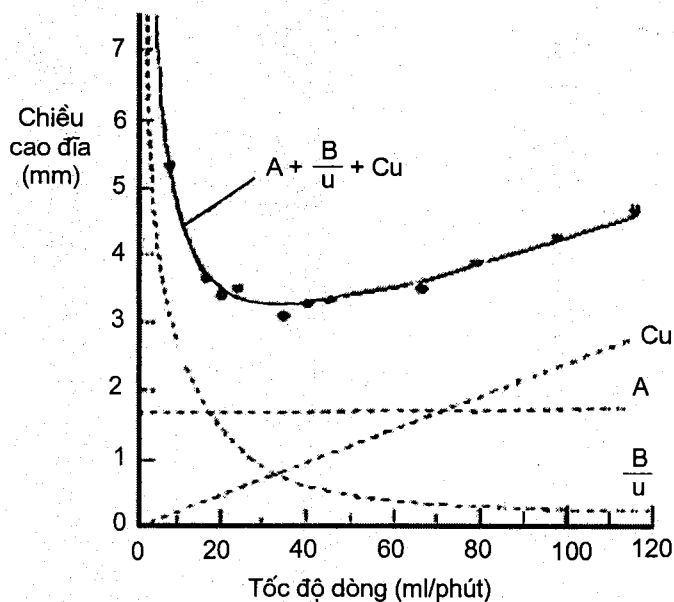
Từ những biện giải phương trình (8.25) ở trên cho ta thấy:

- Khuếch tán xoáy của chất tan qua cột ít chịu ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động.
- Khuếch tán dọc theo cột của chất tan thay đổi tỷ lệ nghịch với tốc độ u . Tác động này thể hiện đáng kể khi tốc độ u nhỏ. Khi tốc độ càng lớn, tác động này càng nhỏ.
- Quá trình chuyển khối, ngược lại với khuếch tán dọc, tỷ lệ thuận với tốc độ dòng.

Đường cong tổng hợp của ba tác động trên đến chiều cao H có dạng một hyperbol. Khi tốc độ dòng u còn bé, chiều cao H giảm theo chiều tăng của u , H giảm và đạt cực tiểu sau đó tăng dần theo tốc độ dòng. Vì hiệu lực cột (column efficiency) đạt tối ưu khi chiều cao H cực tiểu, cho nên hiệu quả cột tối ưu ứng với cực tiểu trên đường cong này (hình 8.10).

Để xác định cực tiểu ta lấy vi phân phương trình (8.25) theo u :

$$\frac{dH}{du} = -\frac{B}{u^2} + C$$



Hình 8.10. Sự phụ thuộc của chiều cao đĩa vào tốc độ pha động.

Cho $\frac{dH}{du} = 0$, giải phương trình sẽ có: $u_{\min} = \sqrt{B/C}$ (8.26)

Thay giá trị $u_{\min}$ vào phương trình (8.25) ta sẽ tìm thấy giá trị chiều cao $H_{\min}$ của đĩa:

$$H_{\min} = A + 2\sqrt{B/C} \quad (8.27)$$

Dựa vào thuyết động học ta có cơ sở để tối ưu hóa quá trình sắc ký rửa giải: xác định được tốc độ dòng tối ưu để có hiệu lực cột cực đại.

Trong sắc ký lỏng do hiện tượng giảm áp suất người ta chỉ dùng cột dài 25 ÷ 30cm. Ngược lại trong sắc ký khí, tuy chiều cao H lớn hơn trong sắc ký lỏng, nhưng người ta có thể dùng cột dài đến 100m. Vì vậy số đĩa lý thuyết của cột sắc ký khí lớn hơn nhiều, nên hiệu cực cột sắc ký khí cao hơn cột sắc ký lỏng.

3.2.2. Các dạng mới của phương trình Van Deemter

Sau Van Deemter đã có nhiều nhà khoa học cố gắng nghiên cứu đưa ra những biểu thức định lượng mô tả phù hợp hơn tác động của các biến trong sắc ký đến chiều cao đĩa lý thuyết. Cho đến nay dường như chưa có một biểu thức toán học nào mô tả hoàn chỉnh giải thích những tương tác vật lý phức tạp dẫn đến mở rộng dải trong sắc ký. Trong bảng 8.2 thống kê một số phương trình cải biên từ phương trình Van-Deemter đánh giá ảnh hưởng của pha động đến chiều cao H của đĩa trong sắc ký lỏng.

Bảng 8.2. Các dạng mới của phương trình Van Deemter.

TT	Phương trình	Tác giả - Năm
1	$h = b/v + a/[1 + (a/c)v^{-1}]$	Giddings , 1961,1991
2	$h = b/v + a/[1 + (a/c)v^{-1/2}]$	Huber và Hulsman, 1969
3	$h = a + b/v + a_R/[1 + (a_R/c)v^{-1}]$	Sie và Rijnders, 1967 John và Littlewood, 1967
4	$h = cv^n$, với $0,3 < n < 0,7$	Snyder, 1969
5	$h = b/v + cv^{1/3}$	Knox và cộng sự, 1972
6	$h = b/v + a/[1 + (a/c)v^{-1/3}]$	Horvath và Lin, 1976

Ở đây:

- Chiều cao rút gọn: $h = H/d_p$

- Tốc độ rút gọn: $v = u \cdot \frac{d_p}{D_m}$

d_p là kích thước hạt (μm),

D_m là hệ số khuếch tán (cm^2/s).

4. TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TÁCH SẮC KÝ

Tách bằng sắc ký được tối ưu hóa bằng cách thay đổi các điều kiện thực nghiệm để có thể tách được các thành phần trong hỗn hợp với chi phí (thời gian, kinh tế) cực tiểu. Một nội dung quan trọng trong tối ưu hóa là tìm cách tăng hiệu lực cột sắc ký. Để đạt mục đích này cần:

- Giảm giãn rộng pic,
- Thay đổi tốc độ di chuyển của các thành phần.

Điều này có nghĩa là cần chọn được toạ độ tối ưu cho các thông số đặc trưng cho quá trình rửa giải như: chiều cao cột H , hệ số dung lượng, hệ số chọn lọc cũng như các biến động học.

Trước khi nghiên cứu các vấn đề này, ta xem xét độ phân giải của cột tức là khả năng tách định lượng hai chất trong hỗn hợp trên cột sắc ký.

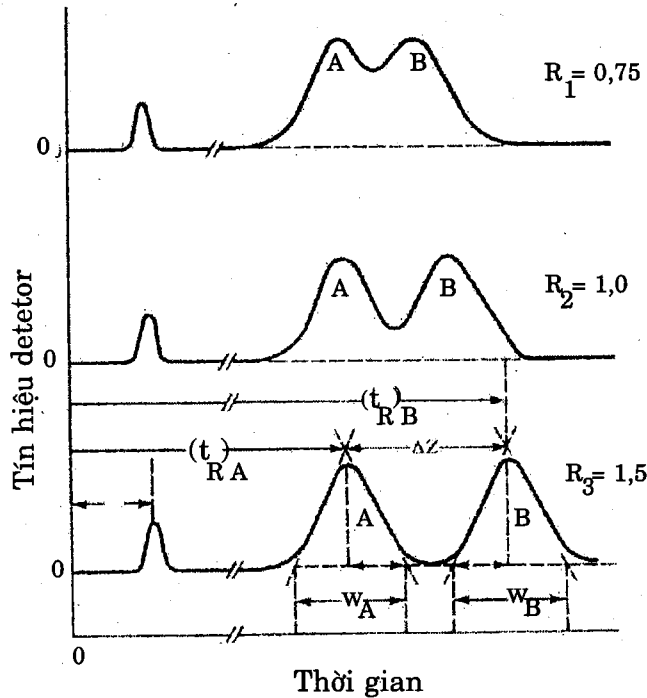
4.1. Độ phân giải của cột

Hình 8.11 cho ba sắc ký đồ tách hai chất A và B trong hỗn hợp trên 3 cột có độ phân giải khác nhau.

Độ phân giải (resolving power) của mỗi cột được tính theo công thức:

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)} = \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)} \quad (8.28)$$

$$= \frac{\text{Khoảng cách giữa 2 pic}}{\text{Độ rộng trung bình của pic}}$$



Hình 8.11. Sơ đồ tách hai chất A & B trên ba cột có độ phân giải khác nhau.

Từ hình vẽ ta thấy với hai pic có cùng độ lớn:

$R_s = 1,5$: Hai pic tách khỏi nhau rõ ràng, chỉ xen phủ nhau 0,3%,

$R_s = 1,0$: Hai pic chưa tách hẳn, còn xen phủ nhau 4%,

$R_s = 0,75$: Hai pic chưa tách nhau.

Việc lựa chọn điều kiện sắc ký để có R_s phù hợp sẽ thuận lợi nếu ta xác định được ảnh hưởng của các thông số đặc trưng như t_R , N , k' đến khả năng tách của cột. Để tìm biểu thức mô tả ảnh hưởng này chúng ta giả thiết rằng bề rộng hai pic xấp xỉ nhau:

$$W_A = W_B \approx W$$

Phương trình (8.28) sẽ có dạng:

$$R_s = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{W} \quad (8.29)$$

Lấy giá trị của W từ phương trình (8.23) thay vào phương trình (8.29):

$$R_s = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{(t_R)_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Thay thế tiếp hệ số dung lượng ở phương trình (8.10) vào đây và sắp xếp lại ta có:

$$R_s = \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Đưa giá trị α từ phương trình (8.12) vào phương trình trên:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \quad (8.30)$$

Phương trình (8.30) mô tả sự phụ thuộc của độ phân giải R_s của cột vào số đĩa N , hệ số chọn lọc α và hệ số dung lượng k' . Để tăng độ phân giải R_s ta có thể:

– **Tăng số đĩa N** bằng 2 cách:

- + Dùng cột dài hơn sẽ tăng được N nhưng thời gian phân tích dài hơn, pic sẽ giãn rộng hơn.
- + Giảm chiều cao H bằng cách giảm tốc độ pha động, giảm kích thước hạt (thay cột khác).

– **Tăng hệ số dung lượng k'_B :**

Nói chung khi tăng k'_B sẽ tăng độ phân giải R_s . Tuy nhiên k'_B tăng sẽ tăng nhiều thời gian phân tích. Để dung hoà độ phân giải và thời gian rửa giải, người ta khuyên trị số k' dao động trong khoảng $1 \div 5$.

Cách dễ dàng và hiệu quả tăng R_s đối với sắc ký khí là tăng nhiệt độ, đối với sắc ký lỏng là thay đổi thành phần pha động.

– **Tăng hệ số chọn lọc α** bằng cách:

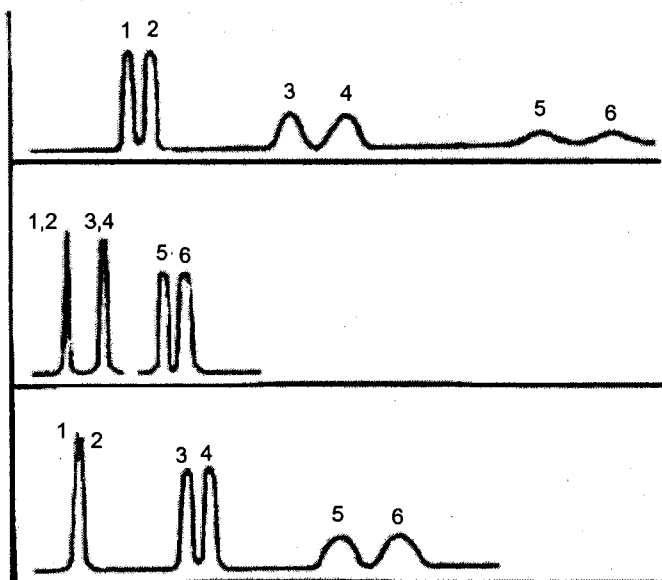
- + Thay đổi thành phần pha động, kể cả thay đổi pH
- + Thay đổi pha tĩnh (đổi cột khác)
- + Tăng nhiệt độ cột: thường đi kèm với tăng k'

4.2. Tách nhiều chất trên cột

Ở phần trên đã xác định tác động của thay đổi N , k' và α đến khả năng tách hai chất. Vấn đề trở nên phức tạp hơn khi hỗn hợp có nhiều chất cần được tách định lượng. Hình 8.12 cho ta sắc ký đồ của 6 chất phân thành 3 nhóm có hệ số dung lượng khác nhau.

Ở sắc ký đồ a, hệ số dung lượng cho hai thành phần 1 và 2 là tối ưu, nhưng với 4 chất còn lại hệ số này quá lớn, nhất là với 2 chất 5 và 6 do t_R quá lớn nên pic giãn quá rộng.

Ở sắc ký đồ b, thay đổi điều kiện sắc ký để tối ưu hóa tách được thành phần 5, 6: pic tách rõ, thời gian phân tích ngắn. Tuy nhiên 4 thành phần còn lại không tách được.



Hình 8.12. Sắc ký đồ tách 6 chất có K' khác nhau.

Ở sắc ký đồ c, trị số k' cho chất thứ 3 và 4 là tối ưu. Với 4 chất còn lại quá trình tách chưa hoàn hảo.

Vấn đề phân tích nhiều thành phần trong hỗn hợp khá phức tạp. Giải pháp chung là thay đổi điều kiện sắc ký để chọn giá trị k' phù hợp. Trong hỗn hợp ứng với sắc ký đồ ở hình 8.12 ta có thể:

- Điều kiện tách cho chất thứ 1 và 2 thực hiện theo sắc ký đồ a,
- Thay đổi rửa giải theo b để tách chất 5 và 6,
- Cuối cùng thực hiện chương trình c để tách chất 3 và 4.

Việc thay đổi điều kiện sắc ký trong một quá trình rửa giải là lựa chọn tối ưu để định lượng hệ nhiều thành phần. Đối với sắc ký lỏng, sự thay đổi thành phần pha động (chương trình dung môi), còn đối với sắc ký khí, thay đổi nhiệt độ (chương trình nhiệt độ) được sử dụng để chọn điều kiện tách tối ưu hệ nhiều thành phần.

4.3. Thời gian phân tích

Tối ưu hóa tách sắc ký là chọn điều kiện để tách định lượng các thành phần trong hệ với chi phí, thời gian ít nhất. Thời gian cần thiết cho một quá trình rửa giải được tính từ thời gian lưu của pic cuối cùng trên sắc ký đồ. Trong phương trình (8.30) chất B di chuyển chậm nhất với tốc độ $\bar{v}$ (xem phương trình 8.2):

$$\bar{v} = \frac{L}{(t_R)_B}$$

Kết hợp phương trình này với hai phương trình (8.8) và (8.17) ta có:

$$(t_R)_B = \frac{NH(1+k'_B)}{u} \quad (8.31)$$

Kết hợp phương trình (8.31) với phương trình (8.30) ta có thời gian lưu của chất B là:

$$(t_R)_B = 16 R_s^2 \cdot \frac{H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \quad (8.32)$$

Ở đây u là tốc độ pha động.

5. ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ

Sắc ký được coi là một kỹ thuật phân tích rất có hiệu quả để tách và định lượng các hợp chất có cấu trúc hóa học gần nhau trong một hỗn hợp. Vì vậy nó được dùng phổ biến khi mẫu phân tích có nguồn gốc tự nhiên hoặc sinh vật.

5.1. Phân tích định tính

Sắc ký đồ cho ta thời gian lưu (trong sắc ký rửa giải) hoặc vị trí trên pha tĩnh (trong sắc ký khai triển) của chất phân tích cùng với điều kiện sắc ký (pha động, pha tĩnh, nhiệt độ...) là những thông tin định tính giúp ta khẳng định sự có mặt của chất phân tích trong mẫu. Với mẫu nhiều thành phần, việc định tính bằng quang phổ thường gặp khó khăn. Cho nên sắc ký thường được dùng để tách các thành phần trước khi phân tích bằng quang phổ. Mặt khác định tính bằng sắc ký không cho ta kết quả dương tính chắc chắn. Vì hai lý do trên để định tính các chất trong hỗn hợp người ta kết hợp sắc ký - phổ IR hoặc sắc ký - phổ khối (nội dung này sẽ trình bày rõ hơn ở các chương tiếp theo). Nhưng sắc ký giúp ta khẳng định đúng kết quả âm tính - tức là xác nhận một chất không có mặt trong hỗn hợp. Vì vậy sắc ký thường được dùng để kiểm tra tạp chất trong mẫu. Trên sắc ký đồ không có pic tại thời gian lưu của tạp chất (dùng chất đối chiếu) khi chạy sắc ký trong cùng điều kiện.

5.2. Phân tích định lượng

Dữ liệu thực nghiệm dùng trong định lượng là chiều cao pic hoặc diện tích pic. Chiều cao pic dễ đo tuy nhiên chỉ dùng được khi pic hẹp cân đối. Diện tích pic được dùng phổ biến và đảm bảo cho kết quả tin cậy.

Ngoài phương pháp đường chuẩn (ngoại chuẩn) đã giới thiệu trong chương 1, trong phân tích sắc ký còn dùng phổ biến hai phương pháp sau.

5.2.1. Phương pháp nội chuẩn

Người ta chọn một chất chuẩn nội đưa vào trong mẫu phân tích và trong dung dịch chuẩn đối chiếu. Tỷ số diện tích của chất phân tích và chất chuẩn nội là thông số phân tích được dùng để xây dựng đường chuẩn.

Hai yêu cầu đối với chất chuẩn nội:

- Pic của chất chuẩn nội phải tách khỏi pic của các thành phần khác ($R_s > 1,25$),
- Pic của chất chuẩn nội phải gần với pic của chất phân tích.

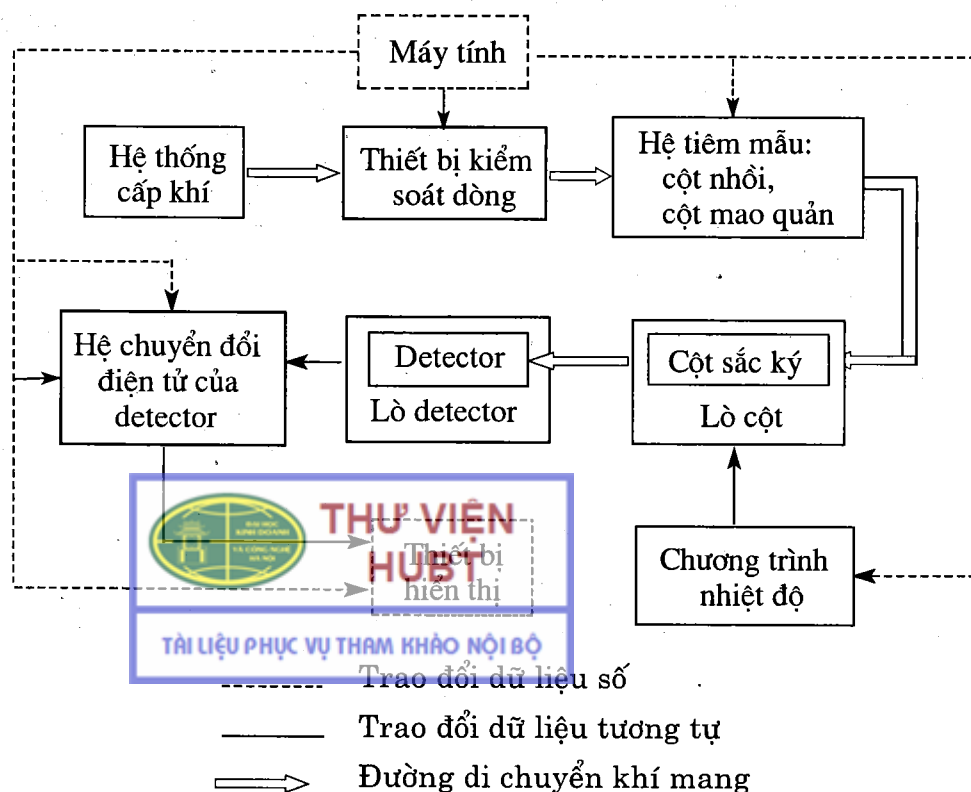
Phương pháp này cho kết quả đáng tin cậy nhất (sai số cực tiểu khoảng 0,5 - 1,0%). Sai số do tiêm mẫu đã được loại bỏ.

5.2.2. Phương pháp chuẩn hóa diện tích

Hàm lượng phần trăm của chất phân tích được xác định bằng tỷ số (tính theo %) của diện tích pic của chất đó và tổng diện tích các pic có mặt trong mẫu (trừ pic của dung môi, thuốc thử và pic các chất có hàm lượng nhỏ hơn giới hạn phát hiện).

Phương pháp này sẽ được thảo luận cụ thể hơn trong bài sắp ký khí.

Ngày nay các máy sắc ký đều có phần mềm xử lý số liệu đi kèm. Vì vậy việc tính toán, trình bày kết quả trở nên dễ dàng hơn nhiều. Điều quan trọng nhất đảm bảo kết quả tin cậy là kỹ thuật viên phải làm chủ được phương pháp phân tích và thiết bị đo lường. Các máy sắc ký hiện đại là một hệ thống phức tạp được điều khiển và kiểm soát bằng máy tính thông qua đường truyền trao đổi dữ liệu tương tự (analog data) và dữ liệu số (digital data). Hình 8.13 mô tả sơ đồ khối của một máy sắc ký khí hiện đại có minh họa các đường trao đổi dữ liệu.



Hình 8.13. Sơ đồ khối của máy sắc ký khí hiện đại.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Đức Huệ (2005), *Các phương pháp phân tích hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, chương 6, trang 353 – 374.
2. Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical Analysis*, 5th edition, W.H.Freeman and Company, New York, p.p 646 – 665.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

8.1. Hãy định nghĩa:

- Pha tĩnh, pha động,
- Hệ số phân bố, hệ số dung lượng, thời gian lưu,
- Hệ số chọn lọc, chiều cao đĩa,
- Khuếch tán dọc, khuếch tán xoáy,
- Độ phân giải giữa 2 pic sắc ký,
- Sắc ký rửa giải, sắc ký khai triển.

8.2. Hãy giải thích ba yếu tố tác động lên pic sắc ký, làm pic giãn rộng ra.

8.3. Cho biết sự khác nhau giữa sắc ký khí - lỏng và sắc ký lỏng - lỏng, sắc ký lỏng - lỏng và sắc ký lỏng - rắn.

8.4. Mô tả cách xác định số đĩa lý thuyết của cột sắc ký.

8.5. Giải thích chương trình nhiệt độ và chương trình pha động trong sắc ký.

8.6. Dữ liệu thực nghiệm cho sắc ký lỏng:

- Chiều dài cột 24,7cm
- Tốc độ dòng 0,313mL/phút
- $V_M = 1,37\text{mL}$
- $V_S = 0,164\text{mL}$

Một sắc ký đồ tách 4 chất A, B, C và D có:

Chất	Thông số	Thời gian lưu	Bề rộng pic W
		(phút)	(phút)
Không lưu giữ		3,1	
A		5,4	0,41
B		13,3	1,07
C		14,1	1,16
D		21,6	1,72

Hãy tính:

- a) Số đĩa lý thuyết theo mỗi pic,
- b) Số đĩa lý thuyết trung bình $\bar{N}$, chiều cao đĩa cho cột.

8.7. Từ bài 8.6, tính cho B và C:

- a) Độ phân giải
- b) Hệ số chọn lọc α

8.8. Dữ liệu thực nghiệm cho một sắc ký khí dùng cột nhồi 40cm

Hợp chất	t_R (phút)	$W_{1/2}$ (phút)
Không khí	1,9	
Methyl cyclohexan	10,0	0,76
Methyl cyclohexen	10,9	0,82
Toluen	13,4	1,06

Hãy tính:

- a) Trị số trung bình của số đĩa lý thuyết
- b) Chiều cao trung bình đĩa

8.9. Từ bài 8.8 hãy tính độ phân giải:

- a) Methyl cyclohexen và methyl cyclohexan
- b) Methyl cyclohexen và toluen
- c) Methyl cyclohexan và toluen

8.10. Nếu trị số V_S và V_M cho cột trong bài 8.8 là 19,6 và 62,6 mL tương ứng, pic không lưu giữ ứng với thời gian 1,9 phút. Hãy tính:

- a) Hệ số dung lượng cho mỗi chất
- b) Hệ số phân bố cho mỗi chất
- c) Hệ số chọn lọc cho methylcyclohexan và methyl cyclohexen.

8.11. Dùng phương trình Van Deemter giải thích sự giãn rộng pic sắc ký.

8.12. Giải thích ba cách thường dùng định lượng bằng sắc ký.



Chương 9

SẮC KÝ KHÍ

MỤC TIÊU

1. Giải thích được nguyên tắc hoạt động của máy GC.
2. Giới thiệu các loại cột trong GC và vai trò của chương trình nhiệt độ.
3. Trình bày được nguyên tắc hoạt động của các detector: TCD, FID, NPD và ECD và ba kỹ thuật đặc biệt trong GC: lấy mẫu khí, phân tích không gian hơi và nhiệt phân.
4. Giải thích được kết nối GC/IR, GC/MS và kỹ thuật chuẩn hóa diện tích trong định lượng bằng GC.

Trong sắc ký khí (GC), pha động là một chất khí thường là khí trơ. Mẫu phân tích được đưa vào đầu cột và quá trình rửa giải được thực hiện nhờ dòng khí trơ qua cột sắc ký. Khác với các dạng sắc ký khác, trong GC pha động không tương tác với chất phân tích mà chỉ làm chức năng vận chuyển chất phân tích qua cột.

Trong sắc ký khí - lỏng (GLC), pha tĩnh là chất lỏng. Pha này được bao hay gắn lên một chất mang là pha rắn, ta có sắc ký khí phân bố. Trong sắc ký khí - rắn (GSC), pha tĩnh là chất rắn: pha tĩnh rắn là chất hấp phụ, đó là sắc ký khí hấp phụ. Do quá trình hấp phụ thường có đặc trưng không tuyến tính, lưu giữ lâu các phân tử không phân cực, pic sắc ký thường bị kéo đuôi. Cho nên GSC ít được ứng dụng ngoại trừ phân tích một số chất khí.

Khái niệm GLC đã được Martin và Synge nêu ra đầu tiên năm 1941. Nhưng mãi đến năm 1955 máy sắc ký khí đầu tiên mới xuất hiện trên thị trường. Từ đó kỹ thuật này được ứng dụng ngày một nhiều trong các lĩnh vực khoa học và công nghệ. Trong chương này, nội dung chính là GLC, còn phần GSC chỉ nêu tóm tắt vài ứng dụng cụ thể.

1. VÀI THÔNG SỐ ĐẶC TRƯNG CHO SẮC KÝ KHÍ - LỎNG

Trong chương 8 đã trình bày nguyên tắc chung của sắc ký. Các biểu thức cho sắc ký rửa giải đều được áp dụng cho sắc ký khí. Ở đây chỉ đề cập đến vài thay đổi liên quan đến đặc điểm của pha động là chất khí.

1.1. Nguyên tắc

Trong GLC, chất tan chỉ có thể di chuyển theo pha động qua cột khi nó ở thể khí. Vì vậy kỹ thuật này được dùng để tách các chất tan *bên với nhiệt*. Quá trình tách phụ thuộc vào tính bay hơi của các chất tan - tức là *điểm sôi* của chúng. Hãy khảo sát mối liên quan của áp suất hơi chất tan và nồng độ của nó trong pha động là chất lỏng. Nếu là dung dịch lý tưởng, nó tuân theo định luật Raoult:

$$p = x p_0 \quad (9.1)$$

Ở đây:

p_0 là áp suất hơi của chất tan tinh khiết,

p là áp suất hơi của chất tan trên dung dịch,

x là phân số mol chất tan trong dung dịch.

Nếu là dung dịch thực cần thêm hệ số hoạt độ γ cho x :

$$p = \gamma x p_0 \quad (9.2)$$

Ở nồng độ rất thấp hệ số hoạt độ γ gần như không đổi. Từ phương trình (9.2) ta có:

$$\frac{x}{p} = \frac{1}{\gamma p_0} = \text{hằng số} \quad (9.3)$$

Đại lượng x/p có bản chất là một hệ số phân bố, nó kiểm soát tính chọn lọc của GLC. Từ phương trình (9.3) ta thấy ái lực của chất tan đối với pha tĩnh phụ thuộc vào áp suất hơi của chất tan và hệ số hoạt độ γ của chất tan. Vì vậy có thể tách được 2 chất tan có áp suất hơi như nhau nhưng hệ số hoạt độ trong pha tĩnh lỏng khác nhau.

Do áp suất hơi phụ thuộc vào tính bay hơi của chất tan nên quá trình rửa giải theo thứ tự điểm sôi tăng dần, ngoại trừ có tương tác đặc biệt giữa chất tan và pha tĩnh. Pha động đưa chất tan ra khỏi cột đến detector. Nhiệt độ cột dao động trong khoảng $50 \div 350^\circ\text{C}$ đảm bảo chất tan bay hơi và đẩy nhanh quá trình rửa giải.

1.2. Thể tích lưu và thời gian lưu

Do tác động của áp suất và nhiệt độ trong GLC nên người ta thường dùng thể tích lưu V_R cùng với thời gian lưu t_R . Hai đại lượng này liên quan với nhau qua tốc độ dòng trung bình của pha động F :

$$V_R = t_R \cdot F \quad (9.4)$$

$$V_M = t_M \cdot F \quad (9.5)$$

Giá trị F thường không đo được trực tiếp, mà chỉ đo được bằng thực nghiệm tốc độ dòng sau khi đi qua cột. Vì vậy tốc độ trung bình F được tính theo biểu thức sau:

$$F = F_m \cdot \frac{T_c}{T} \cdot \frac{P - P_{H_2O}}{P} \quad (9.6)$$

Ở đây:

T_c và T là nhiệt độ cột và nhiệt độ môi trường ($^{\circ}\text{K}$),

F_m là tốc độ dòng đo được sau khi qua cột,

P và P_{H_2O} là áp suất khí ở cuối cột và áp suất của hơi nước (do khí bão hoà nước trong lưu lượng kế).

Cả hai đại lượng V_R và V_M phụ thuộc vào *áp suất trung bình trong cột*. Nhưng áp suất đầu vào cột cao hơn áp suất sau cột (áp suất khí quyển), vì vậy cần hiệu chỉnh V_R và V_M theo hệ số giảm áp:

$$V_R^o = j \cdot t_R \cdot F \quad \text{và} \quad V_M^o = j \cdot t_M \cdot F \quad (9.7)$$

Ở đây:

V_R^o và V_M^o : *thể tích lưu hiệu chỉnh* tương ứng của chất phân tích và của chất không lưu giữ,

j : là hệ số nén được tính theo biểu thức sau:

$$j = \frac{3[(P_i/P)^2 - 1]}{2[(P_i/P)^3 - 1]} \quad (9.8)$$

P_i và P là áp suất đầu vào (inlet) và đầu ra (outlet) tương ứng. Thể tích lưu phụ thuộc vào khối lượng của pha tĩnh W_s . Để loại trừ phụ thuộc này ta chia V_R cho W_s đồng thời chuyển về nhiệt độ 0°C (273°K), ta có *thể tích lưu riêng* V_g :

$$V_g = \frac{V_R^o - V_M^o}{W_s} \times \frac{273}{T_c} \quad (9.9)$$

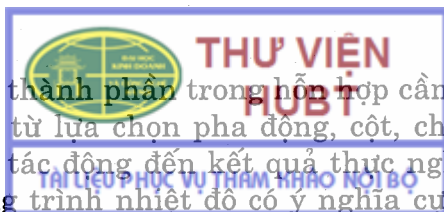
$$V_g = \frac{jF(t_R - t_M)}{W_s} \times \frac{273}{T_c} \quad (9.10)$$

T_c là nhiệt độ của cột ($^{\circ}\text{K}$).

1.3. Kiểm soát nhiệt độ của cột

Để có thể tách định lượng nhiều thành phần trong hỗn hợp cần xây dựng một chương trình sắc ký hoàn chỉnh từ lựa chọn pha động, cột, cho đến loại detector cần dùng. Trong nhiều biến thể động đến kết quả thực nghiệm, việc kiểm soát nhiệt độ của cột với chương trình nhiệt độ có ý nghĩa cực kỳ quan trọng trong quá trình tách bằng sắc ký khí.

Nhiệt độ là thông số chính tác động đến hệ số phân bố chất tan. Lò cột cấp nhiệt cho cột sắc ký có hệ thống phân nhiệt đều, đạt nhiệt độ 400°C với độ chính xác $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.



Khi nhiệt độ cột tăng 20°C hệ số phân bố giảm khoảng 2 lần và thời gian lưu cũng giảm tương ứng. *Chương trình nhiệt độ* là một kiểu rửa giải gradient: tăng nhiệt độ từ từ của cột trong quá trình sắc ký để tăng độ phân giải cho hỗn hợp có nhiều thành phần có điểm sôi khác nhau đồng thời giảm thời gian phân tích. Thường *sắc ký đẳng nhiệt* không cho kết quả mong muốn vì những lý do sau:

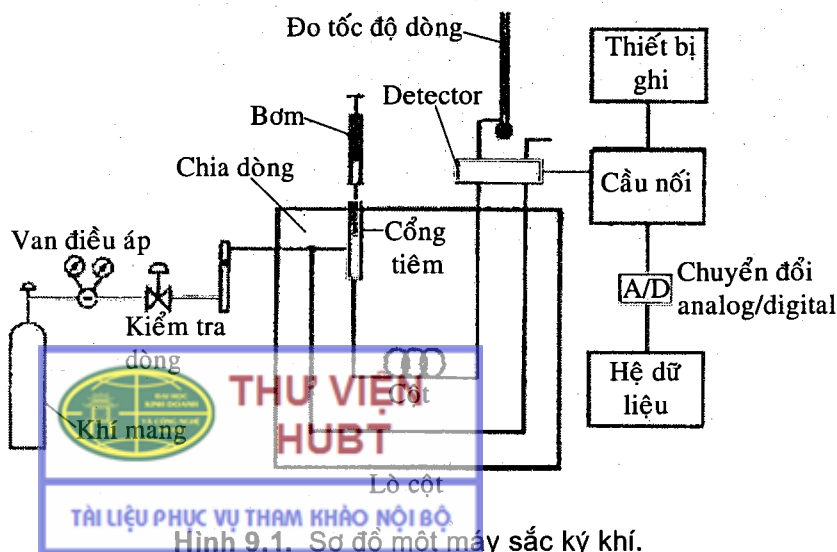
- Nếu đẳng nhiệt quá cao, các pic được rửa giải sớm có thể chưa được phân giải hoàn toàn.
- Nếu đẳng nhiệt quá thấp, các pic được rửa giải sau có thể có thời gian lưu quá dài, pic rộng và (hoặc) không cân đối.

Chương trình nhiệt độ tối ưu cho một mẫu cụ thể được xác lập thông qua thực nghiệm.

2. MÁY SẮC KÝ KHÍ

Hình 9.1 cho ta sơ đồ một máy sắc ký khí. Nó gồm các bộ phận sau:

- Pha động: Khí mang đưa mẫu đi qua cột.
- Pha tĩnh: Cột sắc ký đặt trong lò cột.
- Hệ thống tiêm mẫu: Đưa mẫu vào cột.
- Detector: Phát hiện chất phân tích trong mẫu.
- Hệ thống thu nhận và xử lý dữ liệu.



2.1. Hệ cấp pha động

Trong sắc ký khí pha động thường là các khí trơ như: heli, argon, nitơ, hoặc khí carbonic và khí hydro. Lựa chọn khí trơ nào làm pha động còn phụ

thuộc vào loại detector cần dùng. Nhiệm vụ của pha động là đưa chất tan qua cột. Vì vậy người ta còn gọi pha động là *khí mang*. Đi kèm với bình cấp khí mang còn có van giảm áp, đồng hồ kiểm tra lưu lượng khí.

Áp suất vào cột dao động trong khoảng 10 - 50 psi (0,7 - 3,5 bar) đảm bảo tốc độ dòng 1 ÷ 50 mL/phút tùy thuộc vào loại cột (với cột mao quản tốc độ 1 ÷ 25 mL/phút, với cột nhồi trên 25 mL/phút).

Với cột nhồi thường dùng nhất là heli hoặc nitơ. Heli thường cho pic hẹp hơn (do chuyển khối nhanh hơn). Với cột mao quản thường dùng heli hoặc hydro. Các khí cần phải thật tinh khiết, thường cho qua các chất hấp phụ thích hợp (than hoạt, rây phân tử) để loại hơi nước và các tạp chất (không khí hoặc oxy, hydrocarbon...).

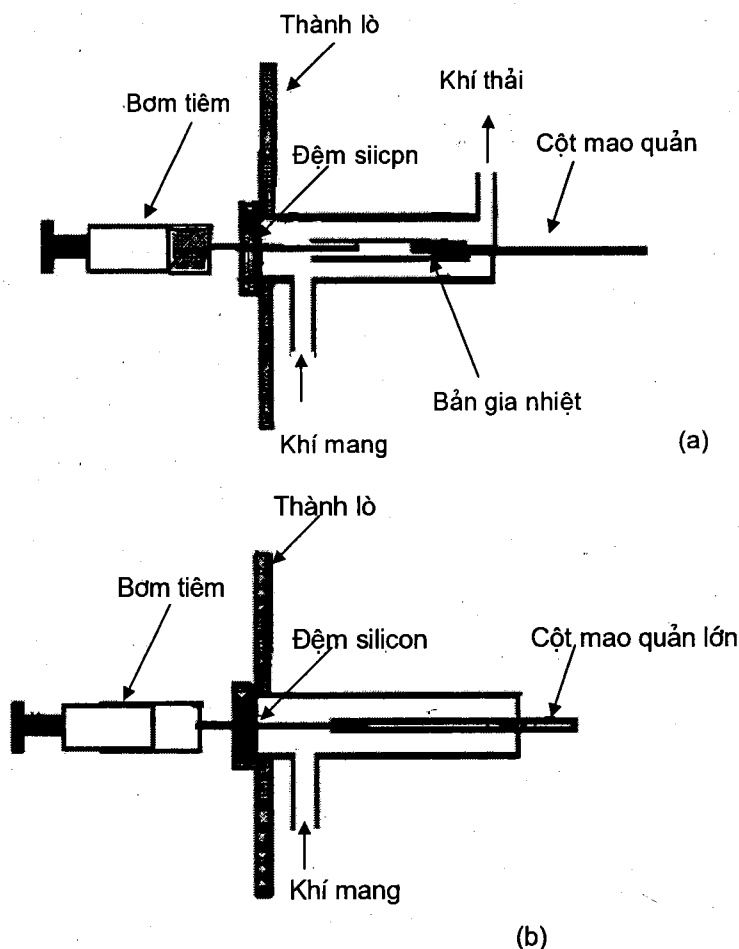
2.2. Hệ tiêm mẫu

Bảng 9.1. Cách tiêm mẫu trong sắc ký khí

Loại cột	Kỹ thuật tiêm	Cách thực hiện	Đánh giá
Mao quản	Chia dòng (split)	Chia dòng khí mang 1:10 đến 1: 100 để giảm lượng mẫu vào cột (giảm 90% hoặc hơn)	Thích hợp cho cột mao quản. Độ nhạy giảm vì chỉ một phần rất nhỏ của mẫu vào cột.
	Không chia dòng (splitless)	Toàn bộ mẫu ngưng tụ ở đầu cột đã làm lạnh, sau đó tăng nhiệt độ làm bay hơi mẫu.	Độ nhạy tăng, nhưng có nguy cơ giãn rộng pic.
	Thẳng vào cột (on - column)	Mẫu được ngưng tụ ở đầu cột, sau đó làm bay hơi theo chương trình nhiệt độ.	Tăng độ nhạy, giảm phân hủy mẫu do nhiệt.
Cột nhồi	Bay hơi nhanh (flash vaporization)	Mẫu tiêm vào vùng có nhiệt độ cao hơn 20 - 50°C so với nhiệt độ cột	Mẫu bay hơi nhanh, có thể xảy ra phân hủy mẫu do nhiệt độ cao
	Thẳng vào cột (on - column)	Mẫu được tiêm thẳng vào đầu cột nhồi	Tăng độ nhạy, giảm phân hủy mẫu do nhiệt.

Mẫu phân tích được tiêm nhanh vào dòng pha động với một lượng vừa đủ bằng bơm tiêm nhỏ (microsyringe) hoặc van tiêm mẫu (sampling valve). Nếu tiêm mẫu dư thì pic sắc ký giãn rộng, độ phân giải kém. Thể tích mẫu chất lỏng hay dung dịch khoảng 0,1 - 10 μL được đưa qua cổng tiêm (đệm cao su silicon) ở đầu cột. Cổng mẫu thường có nhiệt độ cao hơn 50°C so với điểm sôi cao nhất của thành phần trong mẫu. Nếu mẫu phân tích là khí dùng van tiêm mẫu khí (gas sampling valve) hoặc bơm tiêm khí (gas syringe). Có nhiều kỹ thuật tiêm khác nhau. Bảng 9.1 tóm tắt 4 kỹ thuật bơm mẫu thường dùng.

Ngoài 4 kỹ thuật trên, còn có hệ tiêm mẫu tự động. Kỹ thuật này không chỉ xử lý được nhiều mẫu mà còn tăng độ chính xác thể tích tiêm.



Hình 9.2. Minh họa kỹ thuật tiêm mẫu trong sắc ký khí.
a. Tiêm chia dòng b. Tiêm thẳng vào cột

2.3. Cột và lò cột

Trong sắc ký khí có 2 loại cột: cột nhồi (packed column) và cột mao quản (capillary column). Ngày nay, do có nhiều ưu điểm nên người ta sử dụng phổ biến cột mao quản. Chương trình nhiệt độ của sắc ký khí là thông số rất quan trọng cần kiểm soát chính xác. Lò cột làm nhiệm vụ điều nhiệt cho cột sắc ký.

2.3.1. Cột nhồi là ống dài 1 - 3m, đường kính trong 2 - 3mm được chế tạo bằng thủy tinh hoặc kim loại. Trong cột được nhồi đầy các hạt rắn - được gọi là chất mang đã được bao một lớp pha tĩnh lỏng có bề dày 0,05 - 1 μ m.

Hiệu lực cột tăng nhanh khi giảm kích thước hạt. Tuy nhiên nếu hạt quá bé thì cần áp suất lớn để đưa pha động và chất phân tích qua cột. Vì vậy trong sắc ký khí - lỏng thường dùng hạt kích thước hạt 150 - 250 μ m (thường lấy hạt qua rây 60 - 80 mesh: tức là 250 - 170 μ m, hoặc 80 - 100mesh: tức là 170 ÷ 150 μ m).

Bảng 9.2 tóm tắt đặc điểm của hai loại cột.

2.3.2. Cột mao quản

Cột mao quản có đường kính nhỏ hơn nhưng dài hơn cột nhồi. Khác với cột nhồi (các hạt chất mang nhồi đầy cột) cột mao quản được bao một lớp pha tĩnh mỏng ở mặt trong thành cột thường có bề dày $0,1 \div 0,50\mu\text{m}$. Phần còn lại của cột mở, pha động khí dễ dàng đi qua ở phần giữa cột. Cách thiết kế này đã giảm sức cản pha động cho nên có thể dùng cột dài (đến 100m) mà không cần đến áp suất quá lớn.

Trước đây người ta sản xuất hai dạng cột mao quản: cột với lớp bao ở mặt trong thành cột (WCOT) và cột với lớp chất mang pha tĩnh (SCOT). Cột SCOT có lớp chất mang dày đến $30\mu\text{m}$ nhưng hiệu lực kém hơn loại WCOT. Gần đây dựa vào sự phát triển của công nghệ cáp sợi quang, người ta đã cải tiến cột WCOT với nhiều tính năng ưu việt. Cột được chế tạo từ silica nung chảy, mặt ngoài thành cột được bao một lớp bảo vệ polyimid rất dễ uốn, bền, ít phản ứng với thành phần mẫu.

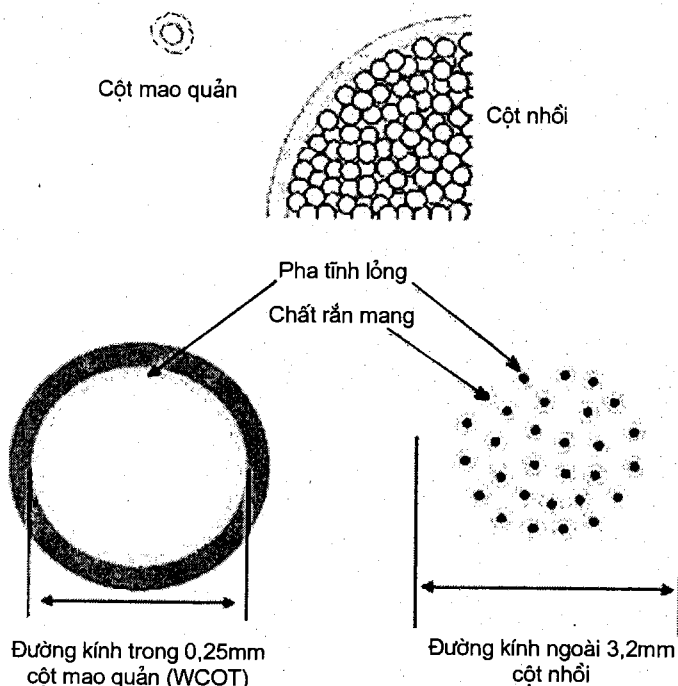
Cột WCOT cải tiến hiện được dùng rất phổ biến có đường kính trong $0,25$ và $0,32\text{mm}$ và hai loại nhỏ hơn $0,15$ và $0,20\text{ mm}$ nhưng độ phân giải cao hơn. Để giảm kích thước mẫu tăng độ nhạy với loại cột này cần dùng cách tiêm mẫu chia dòng.

Ngoài ra có loại cột mao quản với đường kính trong lớn hơn: $0,53\text{mm}$, thường gọi cột *megabore*. Có thể tiêm với lượng mẫu đến $10\mu\text{L}$ tương tự cột nhồi.

Bảng 9.2. Đặc điểm 2 loại cột sắc ký khí - lỏng.

Đặc điểm	Cột mao quản	Cột nhồi
Nguyên liệu chế tạo cột	Silica nung chảy (Fused silica) rất tinh khiết (tạp kim loại $< 1\text{ppm}$)	Thuỷ tinh, thép không gỉ
Kích thước cột	Dài $10 - 100\text{m}$ (cuộn tròn) đường kính trong $0,1 - 0,7\text{mm}$, có áo bảo vệ bằng polyimid hoặc nhôm.	Dài $1 - 3\text{m}$ (cuộn tròn) đường kính trong $2 - 3\text{ mm}$.
Pha tĩnh	Lớp chất lỏng dày $0,1 - 5\mu\text{m}$ bao mặt trong của cột (WCOT) hoặc chất mang bao pha tĩnh (SCOT)	Kích thước hạt $150 \div 250\mu\text{m}$, được bao lớp mỏng (dày $0,05-1\mu\text{m}$)
Hệ bơm mẫu	Chia dòng, không chia dòng, bơm thẳng vào cột	Bơm hơi nhanh, tiêm thẳng vào cột.
Dung lượng mẫu	Tuỳ theo chiều dài và đường kính trong của cột, lượng mẫu thay đổi $0,1 \div 10\mu\text{L}$	$0,1 - 10\mu\text{L}$
Khí mang	Heli hoặc hydro	Nitơ, heli
Hiệu lực cột (số đĩa/m)	WCOT: $1000 - 4000$ SCOT: $600 - 1200$	$500 - 1000$

Đặc điểm	Cột mao quản	Cột nhồi
Độ phân giải	Phân tích nhiều thành phần: 100 chất hoặc hơn nhất là với cột đường kính trong $\leq 0,2$ mm. Chất tan được rửa giải ở nhiệt độ thấp hơn so với cột nhồi.	Thấp, tốt nhất chỉ có thể tách được 20 thành phần.
* WCOT: Wall - coated open tubular column. Người ta còn chia cột WCOT ra làm 3 loại: - Lớp film mỏng: Bề dày lớp film $\sim 0,2$ μm, đường kính trong cột $0,1 \div 0,32$ mm. - Lớp film dày: Bề dày lớp film $1 \div 2$ μm, đường kính trong $0,25 \div 0,32$ mm. Hai loại này có tên chung là cột hẹp lòng (narrow bore). - Cột rộng lòng (megabore): Lớp film dày $2 - 5$ μm, đường kính trong $0,53$ mm. ** SCOT: Support - coated open tubular column.		



Hình 9.3. Sơ đồ cấu tạo hai loại cột sắc ký

2.4. Pha tĩnh trong sắc ký khí - lỏng

Pha tĩnh lỏng được cố định trong cột cần đảm bảo 4 yêu cầu:

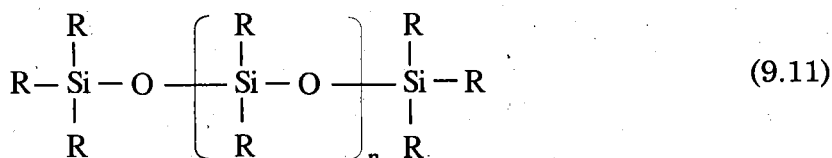
- Áp suất hơi thấp, tức là có điểm sôi cao, ít nhất là cao hơn 100°C so với nhiệt độ vận hành cực đại của cột,
- Bền với nhiệt độ,
- Trơ về mặt hoá học,
- Đặc tính dung môi đảm bảo hệ số k' và α của chất phân tích nằm trong khoảng thích hợp.

Người ta đã nghiên cứu, lựa chọn nhiều chất làm pha tĩnh. Một vấn đề quan trọng là pha tĩnh lỏng phải cho hệ số phân bố khác nhau với chất tan. Điều này liên quan đến độ phân cực của pha tĩnh. Thường phân ra 4 loại:

- Pha tĩnh phân cực thường có nhóm chức - CN, - CO và - OH,
- Pha tĩnh không phân cực thường là dẫn chất dialkyl siloxan, hydrocarbon bão hòa,
- Pha tĩnh rất phân cực như các polyol,
- Phân cực trung bình: các hợp chất ether, ceton, aldehyd.

Hiện nay có hai nhóm chất được dùng phổ biến làm pha tĩnh cho sắc ký khí - lỏng.

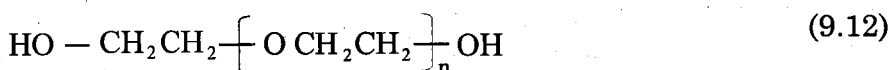
❶ Nhóm dẫn chất polydimethyl siloxan:



Loại đầu tiên: poly dimethyl siloxan, các gốc R là methyl. Đây là dẫn chất chế tạo pha tĩnh không phân cực.

Các loại poly siloxan khác, các nhóm methyl được thay thế bằng nhóm phenyl (- C₆H₅), cyanopropyl (- C₃H₆CN) và trifluoropropyl (- C₃H₆CF₃). Độ phân cực pha tĩnh tăng lên theo lượng nhóm thế trong siloxan.

❷ Nhóm polyethylen glycol (PEG): pha tĩnh phân cực



Bảng 9.3. Một số pha tĩnh lỏng cho sắc ký khí - lỏng

Tên pha tĩnh	Tên thương mại	Độ phân cực	Nhiệt độ cực đại (°C)	Ứng dụng phân tích
Polydimethyl siloxan (100% methyl)	OV -1 SE - 30	Không phân cực	350	Hydrocarbon, sản phẩm dầu mỏ
Poly (phenyl methyl) Siloxan (50% phenyl)	OV 17	Phân cực trung bình	250	Ester, ceton, steroid
Poly (tri fluoropropyl dimethyl) siloxan	OV 210	Phân cực	200	Hợp chất thơm
Polyethylen glycol	Carbowax 20M	Rất phân cực	250	Acid béo, alcol ester, tinh dầu

2.5. Detector

Phát hiện chất phân tích ở dạng khí trong dòng pha động khi đến detector dựa trên sự thay đổi tính chất vật lý hoặc tính chất riêng biệt nào đó khi rửa giải (ví dụ như dễ bị ion hóa). Có thể phân các detector ra làm hai nhóm:

- Detector vạn năng: đáp ứng với tất cả các chất tan.
- Detector chọn lọc: đáp ứng với đặc tính riêng biệt nào đó của chất tan.

Một detector lý tưởng cho sắc ký khí cần đáp ứng yêu cầu sau:

- Đáp ứng nhanh và lặp lại với sự có mặt của chất phân tích trong khí mang,
- Giới hạn phát hiện cao, có thể phát hiện ở nồng độ hoặc khối lượng rất thấp có thể của chất phân tích ,
- Tín hiệu đo tỷ lệ thuận với nồng độ hoặc khối lượng của chất phân tích trong một khoảng rộng (khoảng tuyến tính rộng),
- Vận hành ổn định, xử dụng dễ dàng.

Hiện nay có nhiều detector đã được nghiên cứu. Tuy nhiên chỉ có 4 loại được sử dụng phổ biến. Đó là các detector:

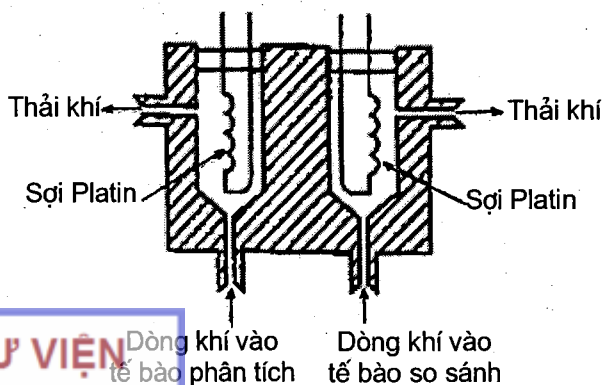
- Dẫn nhiệt TCD (Thermal Conductivity Detector)
- Ion hóa ngọn lửa FID (Flame Ionisation Detector)
- Nitơ phosphor NPD (Nitrogen-phosphorus Detector)
- Cộng kết điện tử ECD (Electron Capture Detector)

Chúng ta xem xét đặc điểm tính năng của 4 loại trên.

2.5.1. Detector dẫn nhiệt (TCD)

Đây là detector được phát minh sớm nhất của sắc ký khí hiện còn được dùng rộng rãi. Nó còn có tên khác là *katharometer*.

Detector có 2 tế bào giống nhau, trong mỗi tế bào có sợi platin, điện trở của chúng phụ thuộc vào nhiệt độ, vì vậy cũng phụ thuộc vào tốc độ tỏa nhiệt. Tốc độ này liên quan đến độ dẫn nhiệt của khí bao quanh sợi platin.



Hình 9.4. Sơ đồ TCD.

Khi khí mang đi qua cả 2 tế bào, điện trở của hai sợi như nhau. Cầu Wheatstone trong mạch cân bằng, cho ta đường nền ổn định. Khi khí mang đi qua một tế bào, còn khí rửa giải (có chất phân tích) đi qua tế bào thứ hai. Ở đây do có mặt chất phân tích điện trở thay đổi (do tốc độ tỏa nhiệt thay đổi),

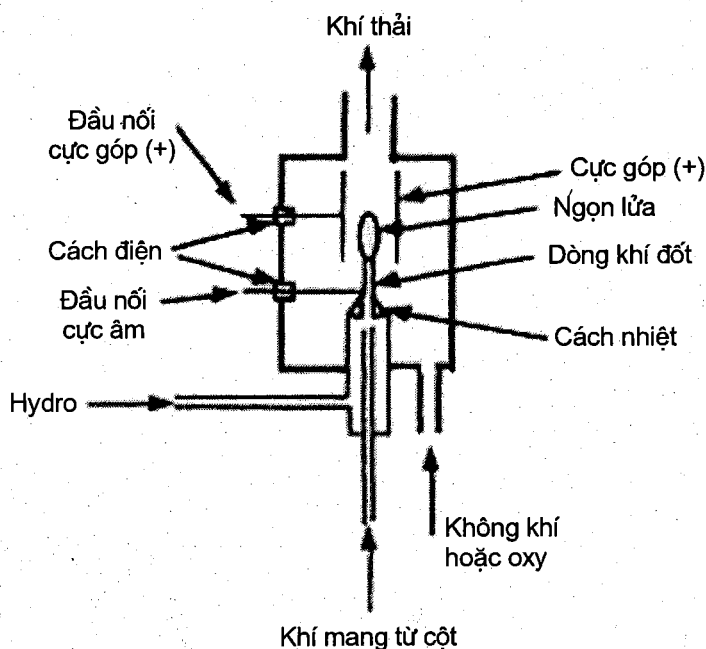
cầu Wheatstone lệch khỏi vị trí cân bằng. Độ lệch của tín hiệu tỷ lệ thuận với chất phân tích trong dòng pha động. Khi chất phân tích trong pha động đi qua khỏi cột, tín hiệu đo trở lại vị trí cân bằng.

Đây là detector vạn năng, không phân hủy chất phân tích nhưng độ nhạy vừa phải, vì vậy thích hợp cho phân tích định tính hơn là định lượng.

2.5.2. Detector ion hóa ngọn lửa (FID)

Đây là detector sử dụng tín hiệu liên quan đến sự ion hóa các chất được rửa giải (hình 9.5).

Khí mang từ cột cùng với không khí và hydro đã được đốt cháy ở đầu đốt kim loại. Một điện thế dòng một chiều $150 \div 200V$ được áp vào đầu đốt (cực âm) và cực góp (cực dương) được đặt ngay trên ngọn lửa. Hai điện cực được nối với một mạch điện ngoài để khuếch đại và ghi tín hiệu.



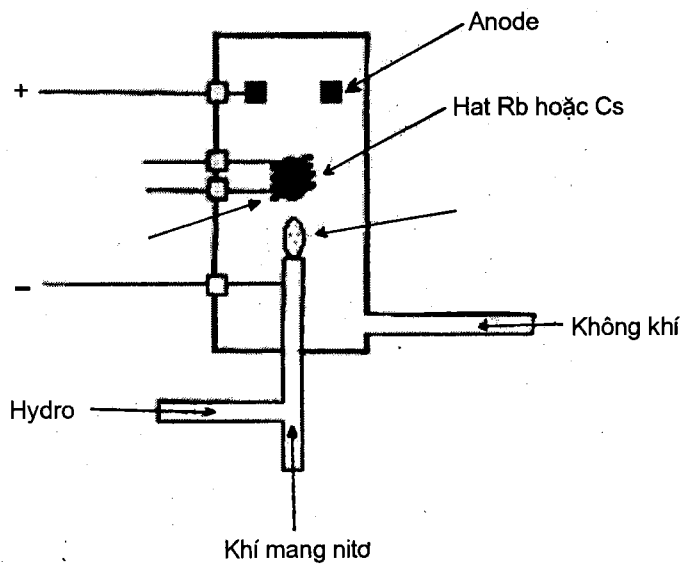
Hình 9.5. Sơ đồ FID.

Các chất hữu cơ có trong khí mang được đốt cháy. Quá trình oxy hóa trong ngọn lửa phát ra electron cùng với các ion. Sản phẩm đốt electron và ion làm tăng độ dẫn điện của ngọn lửa. Các electron và ion này được tập hợp ở điện cực góp, cho nên dòng điện tạo ra tỷ lệ thuận với nồng độ ion có mặt trong khí mang đến ngọn lửa.

FID là detector được sử dụng vạn năng, rất nhạy và đáp ứng với tất cả chất hữu cơ (trừ formaldehyd, acid fomic và các chất đã halogen hoá hết). Đây là detector có khoảng tuyến tính rộng, rộng nhất trong các detector của sắc ký khí. Nhược điểm duy nhất của nó là không đáp ứng với các chất vô cơ (hơi nước, CO_2 , H_2S ...) vì chúng không cháy được.

2.5.3. Detector nitơ-phosphor (NPD)

NPD cũng là một detector ion hoá ngọn lửa như FID. Chỉ khác một điểm: có một chuỗi hạt gồm tấm muối rubidi hoặc cesi đốt nóng đến 800°C đặt ngay trên ngọn lửa giữa cực góp và đầu đốt. Sự thay đổi này đã làm tăng đáp ứng của detector với các hợp chất có nitơ lên 50 lần, với các hợp chất có phosphor lên khoảng 500 lần. Sự tăng bí ẩn này tạo ra ưu thế về độ nhạy và độ chọn lọc cho phân tích định lượng các hợp chất có nitơ hoặc phosphor.



Hình 9.6. Sơ đồ NPD.

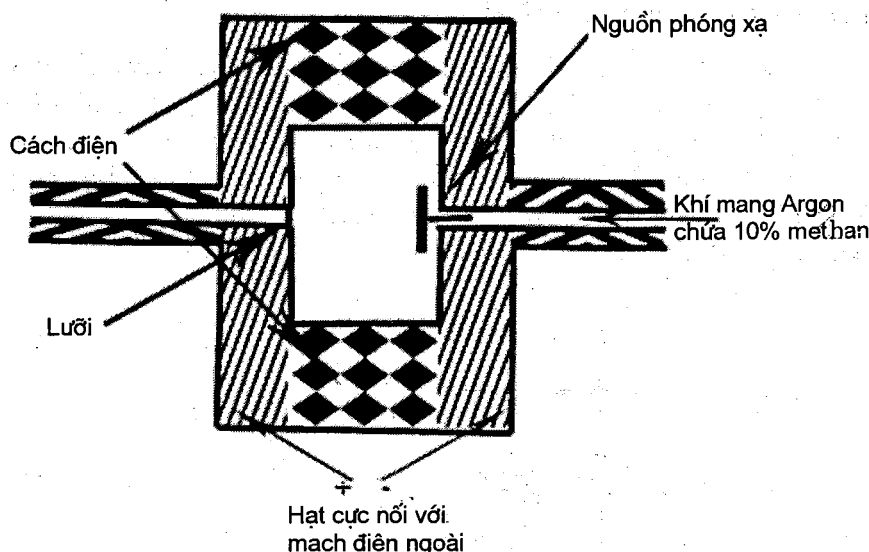
Đây là detector chọn lọc, khoảng tuyến tính nằm trung gian giữa TCD và FID.

2.5.4. Detector cộng kết điện tử (ECD)

ECD cũng là một detector ion hoá sử dụng tia β từ một nguồn phóng xạ, thường là niken - 63.



Electron trong phản ứng phân rã này sẽ kết hợp với các chất phân tích ái electron có mặt trong khí mang tạo ra ion âm, cho nên tạo ra sự thay đổi cường độ dòng ở mạch điện ngoài. Sự thay đổi này tạo ra tín hiệu, nó được khuếch đại và ghi lại. Người ta thường dùng argon chứa 10% methan làm khí mang thay cho nitơ để tăng độ nhạy của ECD.



Hình 9.7. Sơ đồ ECD.

Đây là detector nhạy với các hợp chất ái electron, như dẫn chất halogen của hydrocarbon, hợp chất có lưu huỳnh và các chất có cấu trúc chưa bão hòa. Nhược điểm của ECD:

- Khoảng tuyến tính hẹp,
- Hàm lượng vết không khí, oxy, hơi nước trong khí mang thường gây trở ngại cho hoạt động của detector.
- Phân tích định lượng với ECD thường gặp khó khăn vì đáp ứng của detector phụ thuộc vào cấu trúc chất phân tích. Bảng 9.4 tóm tắt một số đặc điểm cơ bản của bốn loại detector vừa trình bày ở trên.

Bảng 9.4. Một số đặc điểm của detector.

Loại detector	Giới hạn phát hiện (g/mL)	Đặc điểm
TCD	10^{-8}	Vạn năng, không phá hủy mẫu, khoảng tuyến tính hẹp, không nhạy với các chất vô cơ.
FID	10^{-12}	Rất nhạy, khoảng tuyến tính rộng, dùng rộng rãi nhất trong sắc ký khí.
NPD	10^{-14} (N) 10^{-15} (P)	Tương tự FID, chọn lọc với N và P, khoảng tuyến tính hẹp hơn FID.
ECD	10^{-13}	Rất nhạy với các chất ái electron, dễ bị nhiễm bẩn, khoảng tuyến tính hẹp.

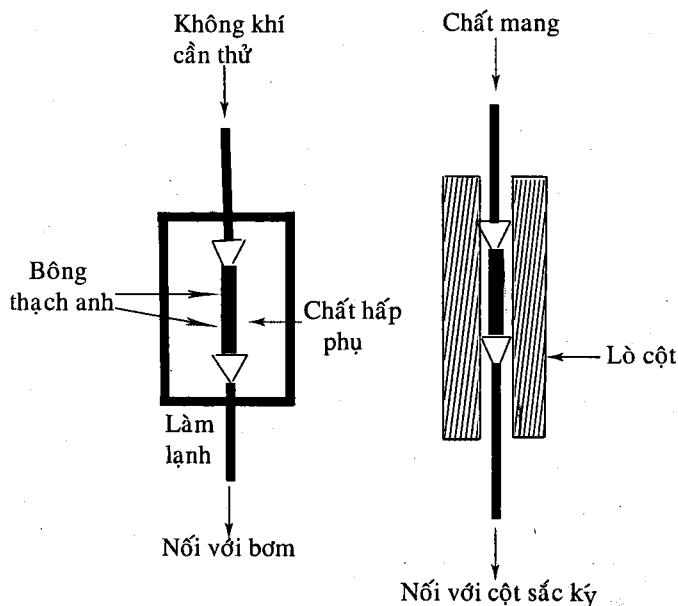
3. MỘT SỐ KỸ THUẬT ĐẶC BIỆT DÙNG TRONG SẮC KÝ KHÍ - LỎNG

Như đã trình bày ở trên, sắc ký được dùng để phân tích hỗn hợp các chất bay hơi. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp mẫu phân tích có cả chất bay hơi

và chất không bay hơi hoặc chất dễ bị phân huỷ nhiệt. Để phân tích các chất bay hơi hoặc dễ phân huỷ trong mẫu cần xử lý, tìm cách tách riêng thành phần cần định lượng. Nội dung này được trình bày ở chương xử lý mẫu phân tích. Tuy nhiên có một số kỹ thuật thường được dùng nhiều hơn cho sắc ký khí sẽ được giới thiệu ở đây.

3.1. Lấy mẫu khí

Để lấy mẫu chất khí trong khí quyển người ta dùng *bẫy khí*. Hình 9.8 mô tả lấy mẫu benzen từ không khí. Người ta dùng bơm để hút một lượng không khí qua ống đựng chất hấp phụ (thường lấy thể tích không khí 0,5L trở lên). Khi lấy mẫu xong, nếu cần lưu giữ phải để lạnh ở 2°C . Để phân tích người ta đặt bẫy khí vào lò và nối với đầu vào của cột sắc ký. Dòng khí mang sẽ đưa benzen vào cột.



Hình 9.8. Lấy mẫu khí.

Việc phân tích đơn giản hơn (vì sắc ký đồ ít pic hơn nhiều), mặt khác cột không bị nhiễm bẩn bởi các chất không bay hơi trong mẫu.

3.2. Phân tích không gian hơi (Headspace analysis)

Người ta lấy thành phần bay hơi tách ra từ mẫu rắn hoặc lỏng bằng cách đun nóng mẫu trong bình và hứng chất bay hơi. Sau khi quá trình bay hơi cân bằng, tỷ lệ thành phần bay hơi ở bình hứng đại diện cho tỷ lệ ở trong mẫu. Người ta dùng bơm tiêm khí đưa thành phần bay hơi vào cột sắc ký. Kỹ thuật này rất thích hợp để định lượng:

- Các alcol hoặc dung môi trong mẫu máu
- Monomer trong sản phẩm polymer,

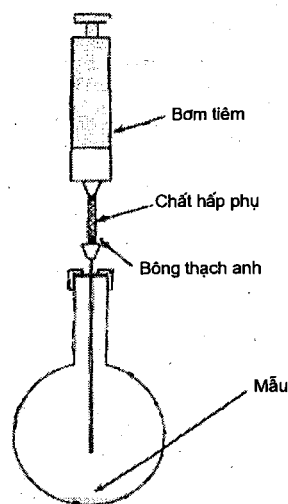
– Hương liệu (tinh dầu, chất thơm...) trong sản phẩm.

3.3. Giải hấp phụ (desorption)

Người ta dùng chất hấp phụ rắn để lấy thành phần bay hơi từ mẫu. Sau đó bằng cách đun nóng để giải phóng chất bay hơi (giải hấp phụ) đưa nó vào cột sắc ký. Chất hấp phụ thường dùng là than hoạt, hoặc hạt nhồi dùng cho cột sắc ký. Kỹ thuật giải hấp phụ này có thể dùng phối hợp với kỹ thuật lấy mẫu không gian hơi ở trên. Hình 9.9 mô tả cách lấy mẫu phối hợp như thế.

Mẫu phân tích được đặt ở đáy bình. Carbon graphit (diện tích riêng $100\text{m}^2/\text{g}$) làm chất hấp phụ được nhồi vào ống nhỏ đặt trên miệng bình. Đun nóng bình khoảng 40°C , chất bay hơi được hấp phụ vào graphit.

Để giải hấp, bơm tiêm được đặt vào một lỗ và nối với máy sắc ký khí. Giữ nhiệt độ cột khoảng 50°C hoặc thấp hơn để chất bay hơi tập trung ở đầu cột. Sau đó tăng nhanh nhiệt độ của lò đến 300°C và dòng khí mang đưa chất bay hơi vào cột. Khi giải hấp xong, chạy sắc ký theo chương trình nhiệt độ đã lựa chọn.

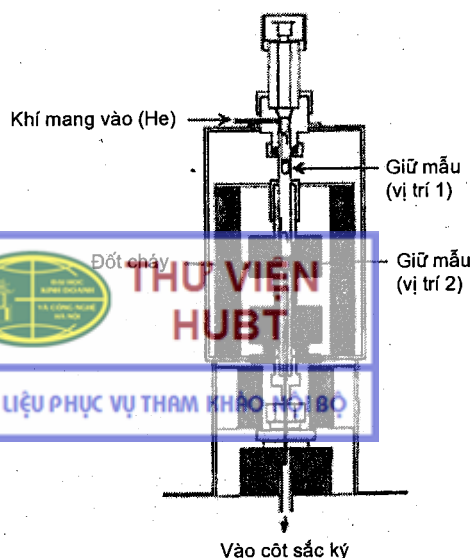


Hình 9.9. Kỹ thuật phối hợp giải hấp phụ với lấy mẫu không gian hơi.

3.4. Nhiệt phân (pyrolyse)

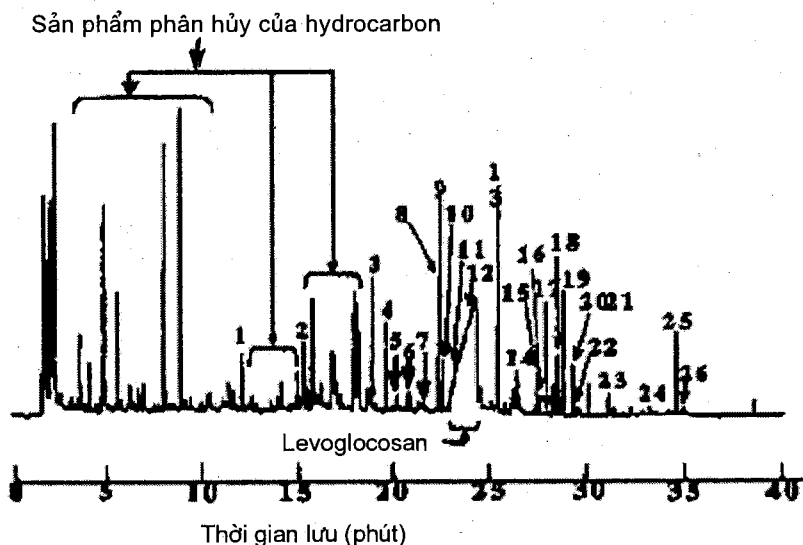
Nhiệt phân được dùng để phân huỷ mẫu tạo ra các chất có khối lượng phân tử nhỏ hơn dễ bay hơi. Nhờ sắc ký khí xác định các thành phần này để nhận diện mẫu ban đầu.

Hình 9.10 mô tả lò nhiệt phân mẫu gỗ. Lấy khoảng $100\mu\text{g}$ mẫu cho vào lò. Nhiệt độ khoảng 450°C . Khí mang heli (50 mL/phút) đi qua lò vào cột sắc ký khí. Chương trình nhiệt độ của cột: $50 \div 280^\circ\text{C}$ (tốc độ 5°C/phút) đã cho sắc ký đồ với 28 pic.



Hình 9.10. Lò nhiệt phân gỗ.

Hình 9.11 là sắc ký đồ của các sản phẩm phân hủy do nhiệt phân của gỗ Eucalyptus.



Hình 9.11. Sắc ký đồ các sản phẩm phân hủy của gỗ Eucalyptus.

4. ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ KHÍ - LỎNG

Sắc ký khí - lỏng được sử dụng phổ biến để phân tích định tính và định lượng nhiều chất trong các loại mẫu khác nhau: y học, dược phẩm, môi trường, công nghệ...

4.1. Định tính

Phương pháp định tính các chất được tách ra bằng sắc ký khí có thể thực hiện theo 3 cách sau:

1. So sánh thời gian lưu t_R của chất phân tích với t_R của chất *chuẩn đối chiếu* trong cùng điều kiện sắc ký. Việc so sánh sẽ tin cậy hơn nếu dùng dữ liệu thu được từ sắc ký trên hai cột có độ phân cực khác nhau.

2. So sánh sắc ký đồ của mẫu phân tích với sắc ký đồ của mẫu phân tích đã thêm chuẩn đối chiếu.

3. Kết nối máy sắc ký khí với máy quang phổ IR hoặc khối phổ:

Dựa vào thời gian lưu của các chất được tách ra bằng sắc ký khí để định tính thường không đảm bảo cho kết quả tin cậy. Vì vậy người ta kết nối máy sắc ký khí với các thiết bị khác để nhận diện chính xác hơn. Hai công cụ có ưu thế trong lĩnh vực này là phổ hồng ngoại và phổ khối. Dựa vào thư viện phổ lưu trong máy IR hoặc MS để so sánh nhận diện các chất trong mẫu phân tích.

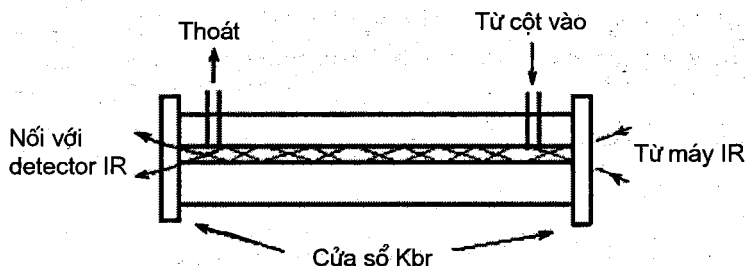
– Kết nối máy sắc ký khí - quang phổ IR (GC - FTIR)

Quang phổ hồng ngoại được thực hiện ở điều kiện áp suất khí quyển. Vì vậy có thể chuyển trực tiếp các chất được tách ra từ máy sắc ký sang máy

quang phổ IR nhờ đường ống đơn giản làm giao diện. Hình 9.12 trình bày một ống kết nối dài 10 ÷ 40 cm, đường kính trong 1 - 3 cm bằng thủy tinh Pyrex, thành trong mạ vàng. Bức xạ IR phản xạ nhiều lần từ thành ống khi truyền qua. Cách thiết kế này làm tăng quang trình nên độ nhạy tăng lên. Dữ liệu số của phổ được lưu giữ trong máy tính.

– Kết nối máy sắc ký khí với khối phổ (GC-MS):

Khác với thiết bị IR, thiết bị phổ khối hoạt động ở áp suất rất thấp: khoảng 10^{-4} bar. Vì vậy dòng khí mang ra khỏi cột cần được hạ áp trước khi vào thiết bị khối phổ. Xem thêm phần kết nối máy sắc ký khí với khối phổ ở chương 7.



Hình 9.12. Sơ đồ bộ phận nối GC - FTIR.

4.2. Định lượng

Phương pháp định lượng bằng sắc ký đã được trình bày trong chương 8. Ba phương pháp thường dùng là:

1. Lập đường chuẩn với chuẩn đối chiếu ở ngoài mẫu thử,
2. Thêm chuẩn đối chiếu vào mẫu phân tích,
3. Nội chuẩn:

Thêm một chất chuẩn nội vào mẫu. Lấy tỷ số diện tích (hoặc chiều cao) pic của chất phân tích và của chất nội chuẩn để lập đường chuẩn. Cách này loại được sai số do tiêm mẫu.

Riêng trong sắc ký khí, phương pháp chuẩn hoá diện tích thường được sử dụng. Hàm lượng phần trăm của một thành phần trong mẫu phân tích được xác định bằng tỷ số (tính bằng %) của diện tích pic của thành phần đó và tổng diện tích của tất cả các thành phần có mặt trong mẫu (trừ pic của dung môi, của thuốc thử và của các thành phần có hàm lượng nhỏ hơn giới hạn phát hiện của chúng).

Ví dụ: Hàm lượng % của chất A trong mẫu phân tích có n thành phần với diện tích pic là $S_1, S_2, \dots, S_n$ (A là một trong số n thành phần):

$$\% A = \frac{S_A}{S_1 + S_2 + \dots + S_n} \times 100 = \frac{S_A \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i} \quad (9.14)$$

Hai yêu cầu cần đáp ứng khi sử dụng phương pháp này:

1. Tất cả các thành phần trong mẫu phân tích cần được rửa giải, xuất hiện trên sắc ký đồ,
2. Detector của thiết bị có đáp ứng như nhau đối với tất cả các thành phần có mặt trong mẫu.

Do hai yêu cầu trên rất khó được đáp ứng đầy đủ nên hàm lượng phần trăm các thành phần tính theo phương trình (9.14) thường không tin cậy. Để tăng độ tin cậy của kết quả người ta dùng hệ số đáp ứng của detector đối với từng thành phần trong mẫu. Hệ số này được xác định bằng cách chạy sắc ký một dung dịch có nồng độ đã biết và đo diện tích của nó:

$$\text{Hệ số đáp ứng } f_i = \text{nồng độ/ diện tích } S_i \quad (9.15)$$

$$\text{Nồng độ của một thành phần } j = \text{diện tích pic } S_j \times f_j \quad (9.16)$$

Công thức (9.14) sẽ trở thành:

$$\% A = \frac{S_A \cdot f_A}{S_1 f_1 + S_2 f_2 + \dots + S_n f_n} \quad (9.17)$$

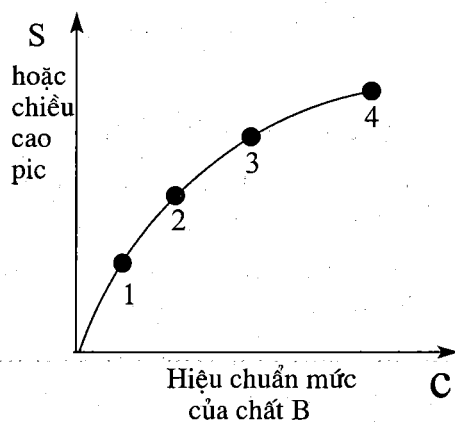
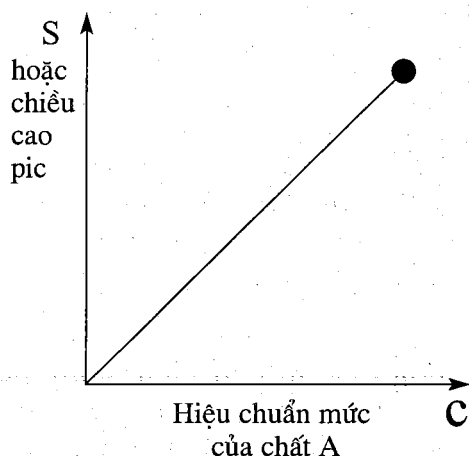
Các hệ số đáp ứng f_i của n thành phần (trong phương trình 9.17) được tính theo phương trình (9.15). Từ đây tính ra %A.

Phương pháp vừa trình bày được gọi là hiệu chuẩn đơn mức xác định hệ số f_i . Ngoài ra, người ta còn dùng phương pháp hiệu chuẩn đa mức (multilevel calibration procedure).

Cách thực hiện: Ví dụ phân tích hỗn hợp có 3 thành phần A, B và C, cần pha chế một số dung dịch hoà tan 3 thành phần trên theo nồng độ tăng dần:

Dung dịch	Nồng độ mg/L		
	A	B	C
1	1,0	0,50	1,5
2	1,5	1,0	2,0
3	2,0	1,5	3,0
4	3,0	2,0	4,0

Chạy sắc ký 4 dung dịch đã hoà tan 3 thành phần, xây dựng đường cong diện tích (S) hoặc chiều cao pic (h) của từng thành phần theo nồng độ của nó. Ta có đường cong hiệu chuẩn 4 mức. Hệ số f_i của mỗi thành phần thay đổi theo nồng độ C_i của nó trong mẫu phân tích.



Hình 9.13. Hiệu chuẩn đơn mức cho chất A và hiệu chuẩn bốn mức cho chất B.

Để xác định hệ số f_i của từng thành phần trong mẫu phân tích khi sử dụng hiệu chuẩn đa mức, người ta có thể chọn 3 cách:

1. So sánh diện tích hay chiều cao pic cần xác định với điểm gần nhất trên đường cong hiệu chuẩn.
2. Hồi qui tuyến tính (tính hệ số f_i theo độ dốc của đường hồi qui tuyến tính).
3. Hồi qui không tuyến tính (tính hệ số f_i theo phương trình bậc hai hay bậc cao hơn).

Một số phương pháp chính thức của các cơ quan, tổ chức quốc gia hoặc quốc tế yêu cầu dùng hiệu chuẩn đa mức. Phương pháp này chứng tỏ ưu việt trong hai trường hợp:

- Nồng độ cần xác định gần với giới hạn phát hiện (LOD)
- Phân tích dùng các detector nhạy (ECD, NPD) nhưng có khoảng tuyến tính hẹp.

4.3. Phạm vi ứng dụng

Sắc ký khí được ứng dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực:

- **Môi trường:** Dùng sắc ký khí xác định:
 - + Hydrocarbon mạch thẳng, hydrocarbon thơm (benzen, toluen, xylen, hợp chất đa vòng thơm - PAH, ...)
 - + Các chất bảo vệ thực vật: Thuốc trừ sâu cơ clor, cơ phosphor, các chất diệt cỏ.
 - + Dioxin và các chất tương tự.
- **Thực phẩm và hương liệu:** Các chất dầu mỡ, tinh dầu, chất thơm, acid hữu cơ, đồ uống, các sản phẩm thiên nhiên.

- **Công nghệ hoá học:** Các alcol, aldehyd, amin, các hợp chất thơm, ether và các dung môi.
- **Công nghệ dầu khí:** Khí đốt, hydrocarbon nhẹ, dầu hoả, các sản phẩm dầu mỏ.
- **Sinh học, y học:** Dược phẩm, các chất có hoạt tính sinh học.

5. SẮC KÝ KHÍ - RẮN

Sắc ký khí - rắn dựa trên sự hấp phụ của chất khí trên bề mặt chất rắn. Hệ số phân bố trong trường hợp này nói chung lớn hơn trong sắc ký khí - lỏng. Vì vậy sắc ký khí - rắn thường được dùng để tách các chất khí không bị lưu giữ bởi cột khí - lỏng như: không khí, H_2S , CS_2 , NO_x , CO , CO_2 ...

- Cột: Hai loại cột thường dùng:
 - + Cột nhồi: Chất hấp phụ rắn
 - + Cột mao quản: Cột mao có lớp chất mang xấp ở mặt trong đôi khi cũng được gọi là cột PLOT (porous layer open tubular column)
- Chất hấp phụ:

Hai loại chất rắn thường dùng trong sắc ký khí - rắn làm chất hấp phụ là: các chất rây phân tử và polymer xốp.

- + Các chất rây phân tử:

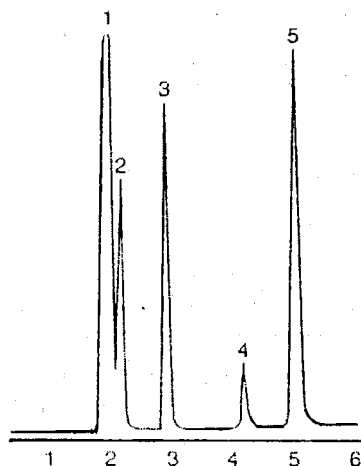
Đây là gel nhôm silicat kích thước lỗ xốp (pore) của nó phụ thuộc vào cation liên kết có mặt. Các sản phẩm thương mại có kích thước hạt $40 \div 60$ mesh đến $100 \div 120$ mesh. Rây phân tử được phân loại theo đường kính cực đại của phân tử có thể đi qua lỗ xốp trên hạt. Kích thước lỗ xốp là 1, 5, 10 và 13 Å ($1\text{Å} = 0,1\text{nm}$). Các phân tử nhỏ hơn kích thước này sẽ thâm nhập vào hạt và bị hấp phụ ở đó. Các phân tử lớn hơn sẽ đi qua. Như vậy rây phân tử được dùng để tách các phân tử nhỏ khỏi phân tử lớn.

Người ta dùng các chất rây phân tử để tách các chất như CO , CO_2 , H_2 , N_2 , CH_4 ... trong khí thải động cơ.

- + Polymer xốp:

Các hạt polymer SDB (styren - divinyl benzen) có kích thước đồng nhất, được kiểm soát bởi hàm lượng divinyl benzen (làm nhiệm vụ liên kết ngang trong bộ khung polymer). Hàm lượng này dao động trong khoảng $1 \div 30\%$.

Polymer xốp thường được dùng để tách các chất khí phân cực như H_2O , H_2S , NO_x , CO_2 , methanol, vinyl clorid...



Thời gian

Hình 9.14. Sắc ký đồ khí rắn trên cột PLOT

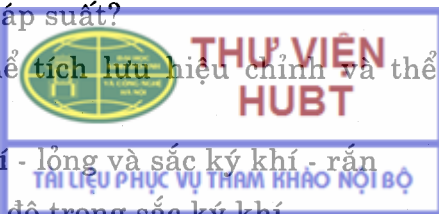
- | | | |
|--------------|-----------|------------------|
| 1. Không khí | 2. Methan | 3. Carbon dioxyd |
| 4. Ethylen | 5. Ethan | |

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Đức Huệ (2005), *Các phương pháp phân tích hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, chương 6, trang 407 - 445.
2. Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical Analysis*, 5th edition, W.H.Freeman and Company, New York, p.p 675 - 693.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 9.1. Giải thích nguyên tắc tách các thành phần trong mẫu bằng sắc ký khí. Tại sao cần xem xét đến áp suất?
- 9.2. Định nghĩa: thể tích lưu, thể tích lưu hiệu chỉnh và thể tích lưu riêng. Ý nghĩa của hệ số nén.
- 9.3. Sự khác nhau giữa sắc ký khí - lỏng và sắc ký khí - rắn
- 9.4. Giải thích chương trình nhiệt độ trong sắc ký khí.
- 9.5. Phân biệt cách tiêm mẫu chia dòng và không chia dòng.
- 9.6. Cách tiêm thẳng vào cột (on - column) có ưu điểm gì so với cách tiêm chia dòng hoặc không chia dòng.
- 9.7. Phân biệt 3 loại cột mao quản: WCOT, SCOT và PLOT



- 9.8. Tại sao hiện nay người ta dùng phổ biến cột mao quản WCOT. Ưu điểm của nó.
- 9.9. Cột silica nung chảy có ưu điểm gì.
- 9.10. So sánh đánh giá bốn loại detector: TCD, FID, NPD và ECD.
- 9.11. Giải thích bốn yêu cầu của pha tĩnh trong sắc ký khí.
- 9.12. Trình bày đặc điểm của hai nhóm chất làm pha tĩnh trong sắc ký khí: dẫn chất siloxan và PEG.
- 9.13. Giải thích kỹ thuật lấy mẫu không gian hơi, giải hấp phụ và nhiệt phân.
- 9.14. Tại sao máy sắc ký khí thường được kết nối với MS và máy IR?
- 9.15. Trong sắc ký khí thường dùng kỹ thuật chuẩn hoá diện tích. Giải thích đánh giá.
- 9.16. Thời gian lưu khi sắc ký hỗn hợp như sau: không khí 18 giây, methyl acetat 1,98 phút, methyl propionat 2,24 phút, methyl butyrat 7,93 phút. Bề rộng 3 pic cuối theo thứ tự là: 0,19; 0,23 và 0,79 phút. Tính:
- a) k' cho mỗi chất,
 - b) α cho cặp 2 chất cạnh nhau,
 - c) Số đĩa lý thuyết trung bình $\bar{N}$ và chiều cao đĩa $\bar{H}$,
 - d) Độ phân giải R_s cho mỗi cặp cạnh nhau.



SẮC KÝ LỎNG

MỤC TIÊU

1. Giải thích được nguyên tắc hoạt động của máy HPLC.
2. Giới thiệu được các loại pha tĩnh thường dùng trong LC và vai trò của chương trình dung môi.
3. Trình bày được nguyên tắc hoạt động của 4 detector: UV-VIS, huỳnh quang, tán xạ bay hơi và đo dòng.
4. Mô tả được năm kỹ thuật của HPLC: sắc ký phân bố, sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại cỡ, sắc ký ái lực.
5. Đánh giá được ưu thế của sắc ký lỏng siêu tới hạn và sắc ký lớp mỏng.

Sắc ký lỏng là kỹ thuật tách trong đó pha động là chất lỏng, pha tĩnh có thể là chất rắn hoặc chất lỏng. Khác với sắc ký khí và sắc ký lỏng siêu tới hạn, sắc ký lỏng có thể tiến hành trên cột hoặc trên mặt phẳng (trên giấy, trên lớp mỏng). Sắc ký cột đã được dùng từ lâu, đó là loại hình sắc ký phát minh đầu tiên. Sau đó người ta không ngừng cải tiến để tăng hiệu lực cột, tách được nhiều thành phần trong hỗn hợp. *Sắc ký lỏng hiệu năng cao* ra đời. Bên cạnh đó còn có *sắc ký lớp mỏng*. Loại hình sắc ký này được dùng ngày càng phổ biến và thay thế dần cho sắc ký giấy để sàng lọc và định tính nhanh các chất trong mẫu.

Trong chương này sẽ nghiên cứu kỹ hai loại hình sắc ký đang được dùng phổ biến hiện nay: sắc ký lỏng hiệu năng cao và sắc ký lớp mỏng. Ngoài ra giới thiệu thêm sắc ký lỏng siêu tới hạn - một loại sắc ký trung gian giữa GC và LC.

1. SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

HPLC là một kỹ thuật tách trong đó các chất phân tích di chuyển qua cột chứa các hạt pha tĩnh. Tốc độ di chuyển khác nhau liên quan đến hệ số phân bố của chúng giữa hai pha tức là liên quan đến ái lực tương đối của các chất này với pha tĩnh và pha động. Thứ tự rửa giải các chất ra khỏi cột vì vậy phụ thuộc vào các yếu tố đó. Thành phần pha động đưa chất phân tích di chuyển qua cột cần được điều chỉnh để rửa giải các chất phân tích với thời gian hợp lý.

1.1. Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao

Do bản chất hoá học của các chất phân tích rất khác nhau nên có nhiều kỹ thuật để tách định lượng bằng sắc ký lỏng (xem mục 8.1). Tuy vậy nguyên tắc cấu tạo của một máy sắc ký lỏng đều giống nhau, có cùng một số bộ phận kết nối với nhau (hình 10.1):

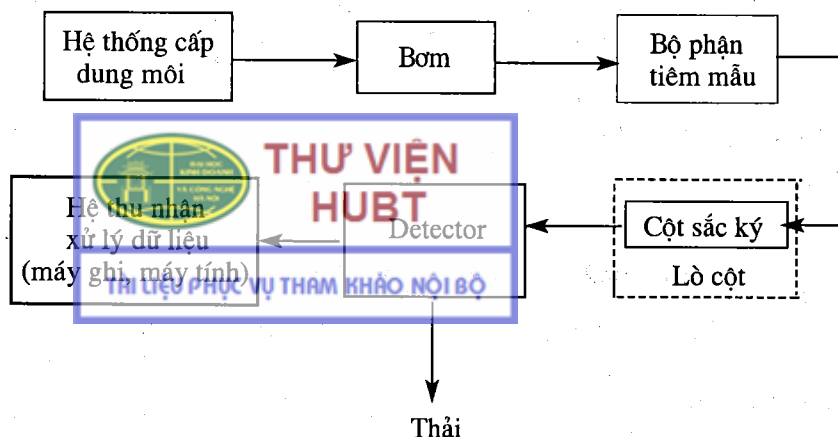
- Hệ thống cấp pha động,
- Bơm sắc ký lỏng,
- Bộ phận tiêm mẫu,
- Cột và pha tĩnh,
- Detector,
- Hệ thu nhận và xử lý dữ liệu.

1.1.1. Hệ thống cấp pha động

Pha động trong sắc ký lỏng thường là hai dung môi hoà tan vào nhau để có khả năng tách với độ phân giải phù hợp. Trước khi sử dụng, cần lọc (màng lọc $0,45\mu\text{m}$) và đuổi khí hoà tan trong pha động. Khí hoà tan có thể làm biến dạng pic, giảm hiệu lực cột, làm nhiễu đường nền. Có thể loại khí hoà tan bằng cách: chạy siêu âm, sục khí trơ như heli...

Pha động thường được chứa trong bình thuỷ tinh. Có hai cách dùng pha động rửa giải:

- *Đẳng dòng* (isocratic): Thành phần pha động không thay đổi trong quá trình sắc ký
- *Gradient*: Pha động là hỗn hợp của nhiều dung môi, thường là 2 ÷ 4 loại được đựng trong các bình khác nhau. Tỷ lệ các thành phần thay đổi trong quá trình sắc ký theo chương trình đã định (chương trình dung môi).



Hình 10.1. Sơ đồ khối của một máy sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Có hai kiểu thực hiện chương trình dung môi: trộn các dung môi ở áp suất thấp hoặc ở áp suất cao.

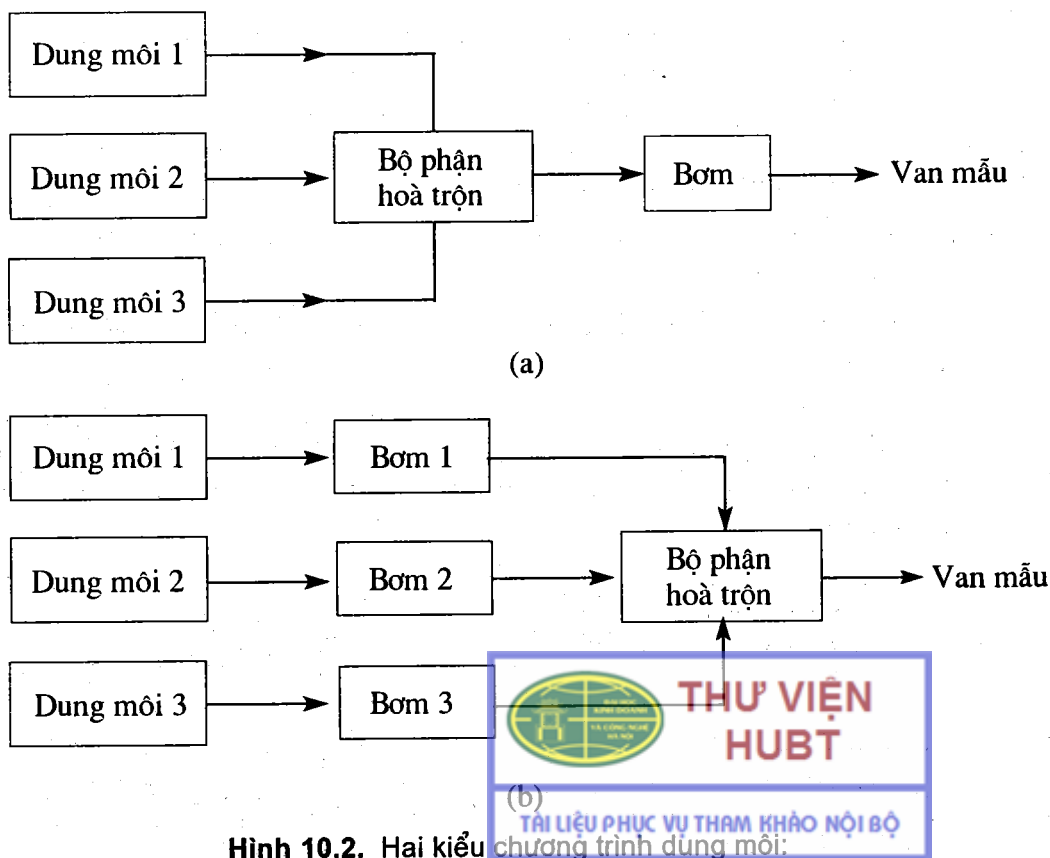
– Chương trình dung môi áp suất thấp (hình 10.2a)

Ba dung môi đựng trong ba bình riêng. Mỗi bình có van riêng lấy lượng dung môi xác định đưa vào bình hoà trộn, sau đó chỉ dùng một bơm đưa pha động vào van tiêm mẫu.

Ưu điểm của chương trình này là chỉ dùng một bơm, tuy nhiên hệ thống ba van lấy ba dung môi cũng phức tạp và chi phí cũng không kém nhiều so với chương trình thứ hai.

– Chương trình dung môi áp suất cao (hình 10.2b)

Điểm khác chủ yếu là mỗi dung môi có một bơm riêng; việc hoà trộn được thực hiện ở áp suất cao. Chương trình này có tốn kém và công kênh hơn loại hoà trộn ở áp suất thấp. Tuy nhiên nó có độ đúng và độ lặp lại cao hơn.



Hình 10.2. Hai kiểu

a) Áp suất thấp

b) Áp suất cao

1.1.2. Hệ thống bơm

❶ Hệ thống bơm trong sắc ký lỏng cần đáp ứng các yêu cầu sau:

- Có khả năng hoạt động ở áp suất đầu vào khoảng 5000 psi trở lên (1psi = 0,068 atm; 1 atm = 1,01 bar; 1 atm = 101,01kPa),
 - Đảm bảo bơm lưu lượng lặp lại trong khoảng 0,01 ÷ 5,0 mL/phút,
- Có thể chịu được tác động của nhiều loại dung môi (không bị ăn mòn).

Những máy sắc ký lỏng hiện đại có cấu hình hoàn thiện hơn. Khoảng bơm có lưu lượng dao động từ 2 - 3 μ L/phút đến 20 mL/phút, áp suất có thể đến 10 000 psi (700 bar). Hệ thống này không chỉ thích hợp cho mục đích phân tích với cột có đường kính trong bé (microbore) mà còn có thể dùng cho sắc ký điều chế (cột có đường kính $\geq$ 2 cm). Ngoài ra, khi làm việc với mẫu sinh học, một số protein tiếp xúc với thép không gỉ (vật liệu chế tạo bơm) có thể bị biến tính. Vì vậy cần vật liệu tương hợp sinh học (bio - compatible material) để sản xuất các bộ phận này (ví dụ bơm, van mẫu, cột... được chế tạo từ kim loại titan).

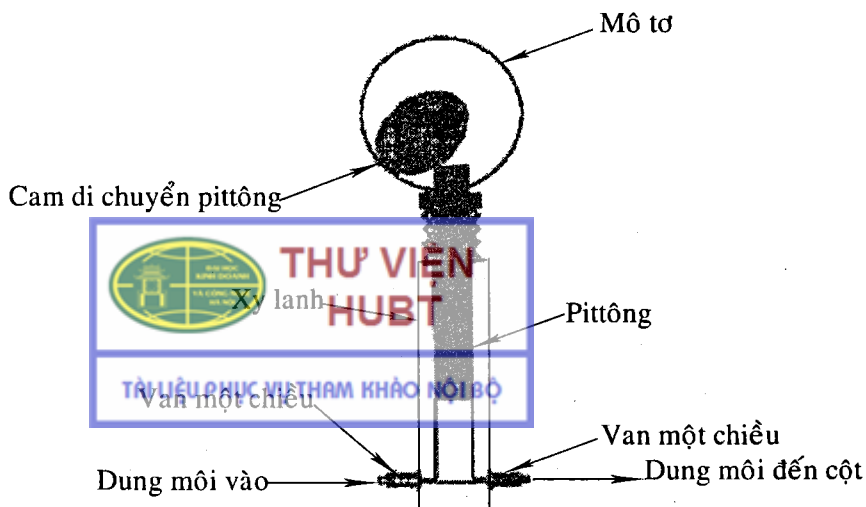
❷ **Về mặt kết cấu:** hiện có ba loại thường gặp:

- **Bơm đẩy một pittông** (single piston pump):

Loại bơm này có một pittông bằng lam ngọc (sapphire), đường kính 3 - 4 mm, dài khoảng 4cm, di chuyển trong xy lanh thép không gỉ dung tích thường 250 μ L. Dung tích này có thể giảm xuống còn 2 - 5 μ L để dùng cho cột đường kính nhỏ.

Bơm đẩy một pittông cho lưu lượng dòng 0,02 ÷ 2,00 mL/phút hoặc 0,20 ÷ 10,0 mL/phút ở áp suất 6 000 psi.

Nhược điểm: Khi dùng bơm một pittông, trong dòng chảy xuất hiện xung dòng (flow pulses). Chúng có thể gây nhiễu detector, làm giảm độ nhạy của nó. Để loại trừ hoặc giảm thiểu xung người ta dùng bơm đẩy kéo và bơm làm đầy nhanh.



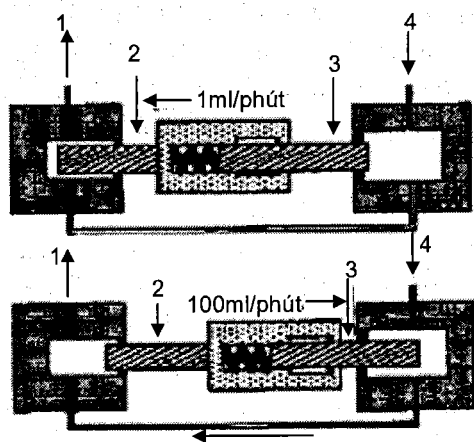
Hình 10.3. Bơm đẩy một pittông.

– **Bơm làm đầy nhanh** (Rapid Refill pump):

Bơm này có hai xy lanh dùng chung một pittông. Hình 10.4 mô tả dung môi pha động đang vào cột: Pittông đang di chuyển về bên trái, pha động đang được bơm vào cột. Cùng lúc đó pha động từ hệ cấp đi vào buồng bên phải.

Khi pittông di chuyển trở lại về bên phải, lượng pha động buồng phải được đẩy về buồng bên trái với tốc độ lớn hơn 100 lần so với tốc độ của pha động đi vào cột.

Vì vậy giảm xung rờ rệt ở chu kỳ làm đầy buồng bên trái. Nếu dùng chương trình dung môi thì buồng phải được làm đầy hỗn hợp, sau đó chuyển sang làm đầy buồng trái.



1. Vào cột
2. Pittông đưa dung môi vào cột
3. Pittông lấy dung môi vào bơm
4. Dung môi vào

Hình 10.4 . Bơm làm đầy nhanh.

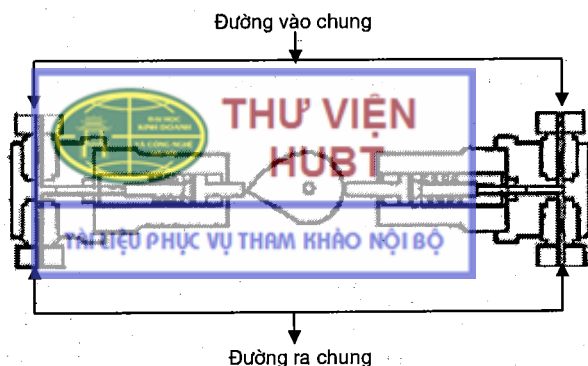
Đây là hệ thống bơm thường dùng, rẻ hơn loại bơm kép (với hai bơm một pittông).

– **Bơm kép đẩy kéo** (twin - headed reciprocating pump)

Đây là hệ thống kết nối hai bơm một pittông do hãng Waters thiết kế và sử dụng lần đầu tiên.

Hai bơm nối đầu với nhau. Có đường pha động vào và đường đến cột chung nhau. Khi pittông của bơm bên trái tiến lên đẩy pha động vào cột, đồng thời pittông của bơm bên phải hút pha động từ hệ cấp vào đầy bơm.

Sau đó khi pittông bơm bên phải tiến lên đẩy pha động vào cột, đồng thời kéo pittông bơm bên trái lùi lại lấy pha động vào. Quá trình đẩy kéo pittông cứ thế tiếp tục.

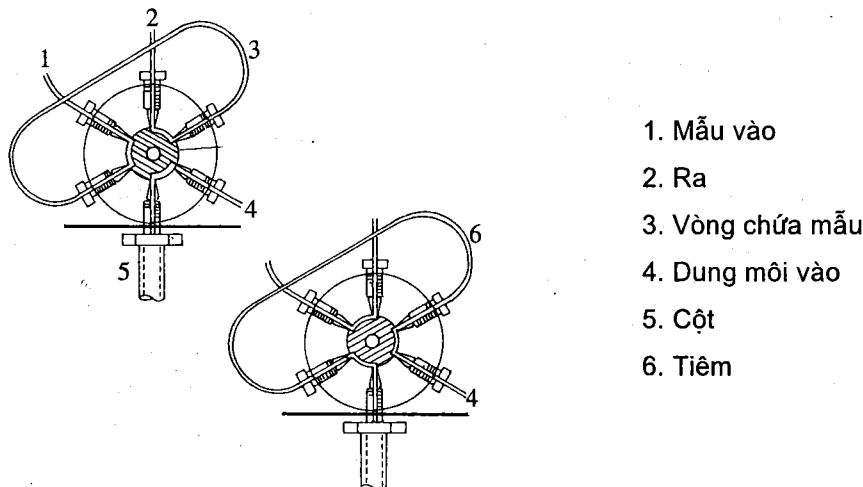


Hình 10.5. Bơm kép đẩy kéo.

1.1.3. Hệ tiêm mẫu

Mẫu lỏng hoặc dung dịch được tiêm thẳng vào pha động cao áp ngay ở đầu cột mà không cần dùng dòng bằng một *van tiêm* có vòng chứa mẫu (sample loop). Vòng chứa mẫu có dung tích khác nhau: thường dùng loại $0,50 \div 20 \mu\text{L}$. Có vòng mẫu lớn hơn.

Khi dùng van tiêm sẽ dễ dàng tự động hóa. Phần mềm máy tính dễ dàng điều khiển và kiểm soát hệ bơm mẫu tự động (autosampler). Sai số tiêm mẫu dùng van khoảng 0,5%.



Hình 10.6. Van tiêm mẫu.

Ngoài ra, đôi khi người ta tiêm mẫu bằng bơm tiêm qua tấm đệm ở đầu cột. Khi tiêm phải dừng dòng (stop flow) và áp suất trong cột không cao (dưới 1500 psi). Cách tiêm này có độ lặp lại thấp, sai số lớn hơn nhiều so với khi dùng van tiêm.

1.1.4. Cột và pha tĩnh

Cột sắc ký lỏng hiệu năng cao thường được chế tạo bằng thép không gỉ, thủy tinh hoặc chất dẻo có chiều dài $10 \div 30 \text{ cm}$, đường kính trong $4 \div 10 \text{ mm}$ (hình 10.7).

- *Cột nhồi* thường có hạt cỡ 5 hoặc $10 \mu\text{m}$. Số đĩa lý thuyết dao động 40000 đến 60000/m. Gần đây người ta có loại cột nhỏ (microcolumn) với đường kính trong $1 \div 2 \text{ mm}$, dài $3 \div 7,5 \text{ cm}$. Loại cột này được nhồi hạt cỡ 3 hoặc $5 \mu\text{m}$. Có trị số n đến 100 000 đĩa/m. Ưu điểm nổi bật của chúng là chạy sắc ký tốn ít dung môi và ít thời gian.

Chất nhồi cột cho sắc ký lỏng được chế tạo từ silica (silic dioxyd) bằng cách làm kết tụ các hạt silica để tạo ra các hạt có kích thước lớn hơn và đường kính đều nhau. Các hạt silica gel hình thành thường được bao một lớp mỏng hữu cơ liên kết (hóa học hoặc vật lý) với bề mặt.

Ngoài ra, còn có các chất nhồi khác như nhôm oxyd, polyme xốp, nhựa trao đổi ion... tùy thuộc vào loại hình sắc ký.

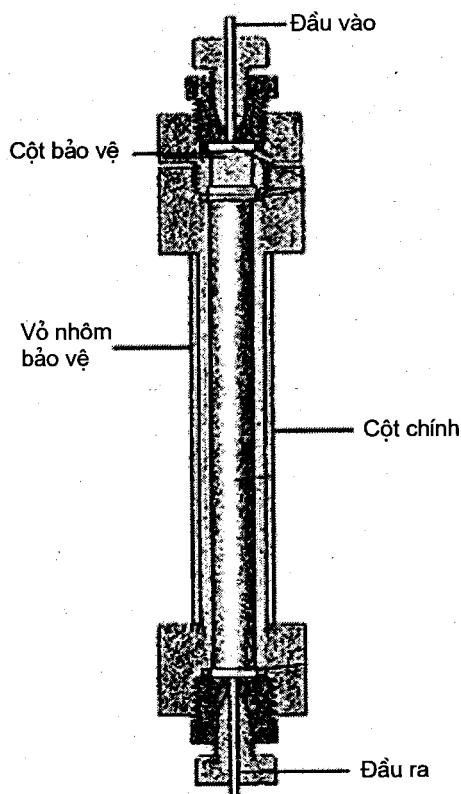
– *Cột bảo vệ* (guard column):

Cột bảo vệ được đặt trước cột sắc ký để loại các chất có mặt trong pha động và trong mẫu phân tích làm giảm tuổi thọ của cột sắc ký.

Cột bảo vệ ngắn hơn cột sắc ký, được nhồi hạt cùng loại nhưng kích thước hạt lớn hơn.

– *Điều nhiệt cột*:

Trong sắc ký lỏng, khác với sắc ký khí, vận hành thiết bị thường ở nhiệt độ phòng không cần điều nhiệt cột. Tuy nhiên các máy sắc ký lỏng hiện đại thường được trang bị thêm hệ thống điều nhiệt cột có thể đến 150°C với độ chính xác đến $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.



Hình 10.7. Cột sắc ký có kèm cột bảo vệ.

1.1.5. Detector

Phát hiện các chất phân tích có thể dựa vào:

- Đáp ứng chọn lọc với chất phân tích khi detector hấp thụ bức xạ UV hoặc huỳnh quang,
- Tính chất chung của chất phân tích trong pha động, như detector chỉ số khúc xạ, độ dẫn điện.

Detector trong sắc ký lỏng cần đáp ứng các yêu cầu sau:

- Đáp ứng nhanh và lặp lại,
- Độ nhạy cao, có thể phát hiện chất phân tích ở khối lượng hoặc nồng độ thấp,
- Vận hành ổn định, sử dụng dễ dàng,
- Khoảng hoạt động tuyến tính rộng,
- Ít thay đổi theo nhiệt độ và tốc độ dòng.

Hiện có nhiều detector, nhưng thường sử dụng 6 loại detector thuộc 2 nhóm quang học và điện hóa:



- 1 - Detector hấp thụ UV-VIS
- 2 - Detector huỳnh quang
- 3 - Detector chỉ số khúc xạ
- 4 - Detector tán xạ bay hơi
- 5 - Detector đo dòng
- 6 - Detector độ dẫn

❶ *Detector hấp thụ UV-VIS:*

Đây là detector được dùng phổ biến nhất trong sắc ký lỏng dựa trên sự hấp thụ bức xạ UV-VIS (trong khoảng 190 - 800 nm) của các chất phân tích. Tế bào đo ở trong detector là một ống hình trụ đường kính 1 mm, chiều dài 10 mm.

Ba cấu hình của detector hấp thụ UV - VIS:

– *Detector đo ở bước sóng cố định:*

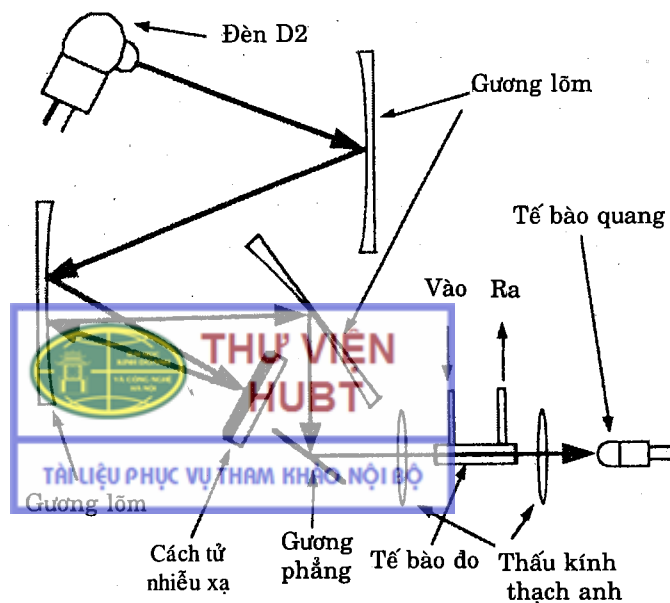
Nguồn sáng là đèn thuỷ ngân và đèn Wonfram cùng với kính lọc để chọn một số bước sóng như 254, 280, 334 và 436 nm.

Detector loại này kém linh hoạt trong sử dụng nhưng rẻ tiền.

– *Detector đo ở bước sóng thay đổi:*

Có thể đo ở bất kỳ bước sóng nào trong vùng UV-VIS, cho phép lựa chọn bước sóng có đáp ứng tối ưu của detector đối với chất phân tích.

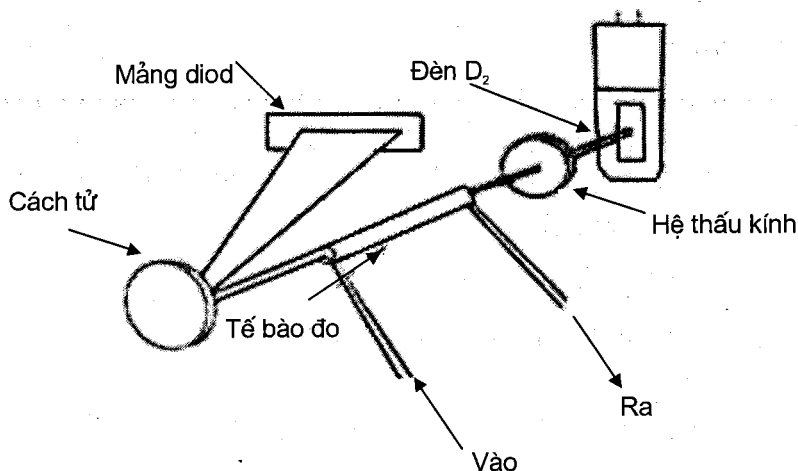
Hệ thống tạo bước sóng đơn sắc bao gồm nguồn sáng đèn D_2 và đèn Wonfram cùng thiết bị đơn sắc hoá được kết nối với ống nhân quang (hình 10.8).



Hình 10.8. Sơ đồ detector đo ở bước sóng thay đổi.

– *Detector mảng diod (Diode array detector - DAD):*

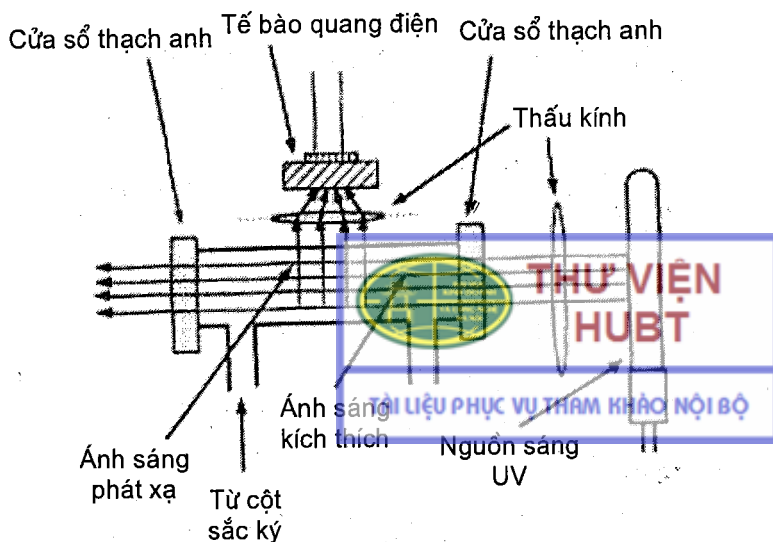
Detector có một hoặc hai mảng diod để nhận bức xạ đã tán sắc từ một cách tử kẻ vạch bằng laser (holographic grating). Quang phổ và sắc ký đồ có thể được hiển thị trên màn hình nhờ phần mềm của hệ thống xử lý tín hiệu bằng máy tính. Có thể gọi DAD là detector sóng quét bên cạnh detector đo ở bước sóng cố định hoặc thay đổi. Mặt khác, hệ thống này có thể cho đồ thị 3D: độ hấp thụ, bước sóng và thời gian. Hình 10.9 là sơ đồ cấu tạo detector mảng diod.



Hình 10.9. Sơ đồ detector mảng diod (DAD).

② *Detector huỳnh quang (Fluorescence detector)*

Có thể sử dụng thiết bị huỳnh quang kính lọc (filter fluorimeter) hoặc quang phổ huỳnh quang (spectrofluorimeter) cho detector huỳnh quang.



Hình 10.10. Sơ đồ detector huỳnh quang sử dụng đèn thủy ngân có bước sóng kích thích 254nm.

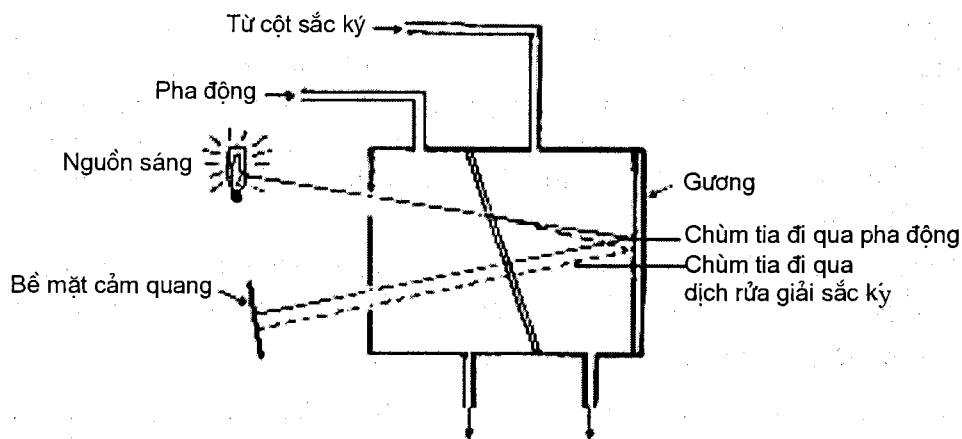
Loại detector này chọn lọc hơn và nhạy hơn (có thể đến 1000 lần) detector hấp thụ UV. Nó đáp ứng với các chất phát huỳnh quang như: hợp chất thơm đa vòng, dẫn chất quinolin, steroid và alcaloid. Có thể dùng thuốc thử tạo huỳnh quang để làm dẫn chất hoá (trước cột hoặc sau cột) của chất phân tích. Do có độ nhạy cao nên detector huỳnh quang được sử dụng cho phân tích vết trong kiểm soát môi trường, giám định pháp y...

③ Detector chỉ số khúc xạ (Refractive Index Detector - RID)

Đây là detector vạn năng đáp ứng với hầu hết chất phân tích nhưng độ nhạy kém hơn detector hấp thụ UV có thể đến 1000 lần. Hoạt động của detector theo nguyên lý đo vi sai. Tín hiệu đo là sự khác nhau giữa chỉ số khúc xạ (RI) của pha động và của pha động hoà tan chất phân tích. Tín hiệu này có thể có giá trị dương hoặc âm.

Detector khúc xạ rất nhạy với nhiệt độ và khó sử dụng cho rửa giải theo chế độ gradient vì khó so sánh trị số RI của mẫu và pha động khi thành phần pha động thay đổi.

Detector khúc xạ vừa kém nhạy, lại có khoảng tuyến tính hẹp nên phạm vi sử dụng bị hạn chế.

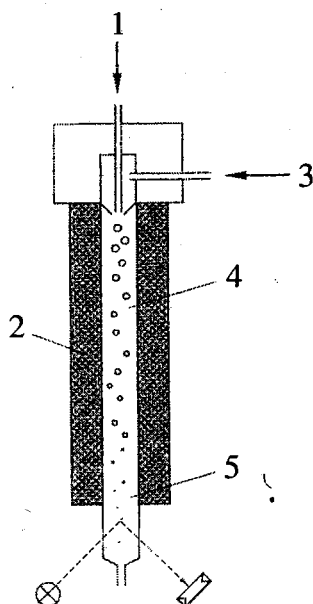


Hình 10.11. Sơ đồ detector khúc xạ.

④ Detector tán xạ bay hơi: (Evaporative Light Scattering Detector - ELSD):

Đây là detector vạn năng đáp ứng với bất kỳ chất phân tích nào kém bay hơi hơn so với pha động của sắc ký lỏng. Trên hình 10.12 là sơ đồ cấu tạo một detector tán xạ bay hơi.

Dịch rửa giải từ cột sắc ký đi vào đầu detector được trộn lẫn với khí nitơ ở trong bộ phận phun sương (nebulizer). Hỗn hợp đi qua một kim nhỏ được phân tán thành đám sương mù (droplet) kích thước đều nhau. Ở đây dung môi được bay hơi loại khỏi hạt sương, hạt rắn mịn được tạo thành. Các hạt rắn này đi cắt ngang chùm tia laser. Chùm tia laser bị tán xạ bởi các hạt rắn được phát hiện nhờ ống nhân quang.



1. Dung dịch rửa giải,
2. Bản gia nhiệt,
3. Khí phun sương,
4. Hạt sương,
5. Hạt.

Hình 10.12. Sơ đồ cấu tạo của một detector tán xạ bay hơi.

Như vậy chất phân tích được phát hiện nhờ ánh sáng tán xạ tạo ra tín hiệu điện. Đáp ứng của detector liên quan đến khối lượng của chất phân tích - nghĩa là diện tích pic sắc ký tỷ lệ thuận với khối lượng. Trong khi đó ở detector UV, diện tích pic tỷ lệ với hệ số hấp thụ: khối lượng nhỏ của một chất hấp thụ mạnh UV có thể cho tín hiệu hấp thụ mạnh hơn một chất có khối lượng lớn nhưng hấp thụ yếu.

Detector này khác với detector khúc xạ, thích hợp với chế độ rửa giải gradient; khác với detector UV, độc lập với độ hấp thụ UV và nhóm chức.

❶ **Detector điện hóa** (Electrochemical detector)

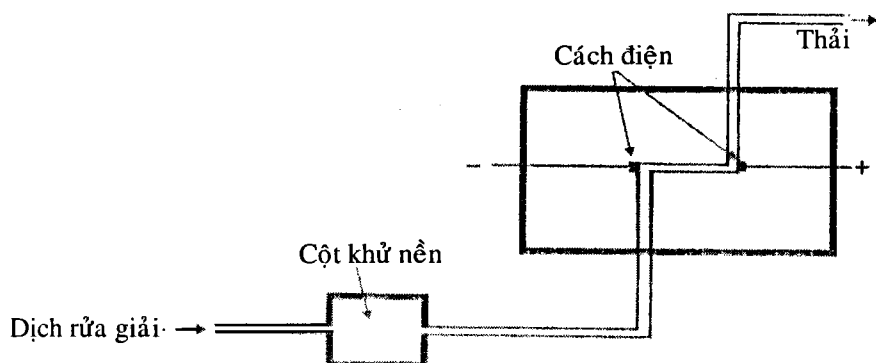
Detector điện hoá phát hiện các chất phân tích dựa vào độ dẫn điện của pha động có mặt các chất phân tích ion hoặc dòng điện tạo thành do phản ứng oxy hoá khử ở điện thế xác định.

– **Detector độ dẫn** (conductivity detector):

Hình 10.13 trình bày sơ đồ cấu tạo của một detector đo độ dẫn điện.

Dịch rửa giải từ cột trước khi đến buồng đo được dẫn qua bộ phân khử ion nền (suppressor). Đây là một cột ngăn được cài vào sau cột phân tích của máy sắc ký lỏng, được gọi là **cột khử**, có nhiệm vụ loại các ion của pha động, nhưng giữ lại các ion phân tích. Cột khử được nhồi các nhựa trao đổi ion thích hợp.

Detector độ dẫn đặc biệt thích hợp cho sắc ký ion (IC) trong đó chất phân tích là ion mang điện tích.

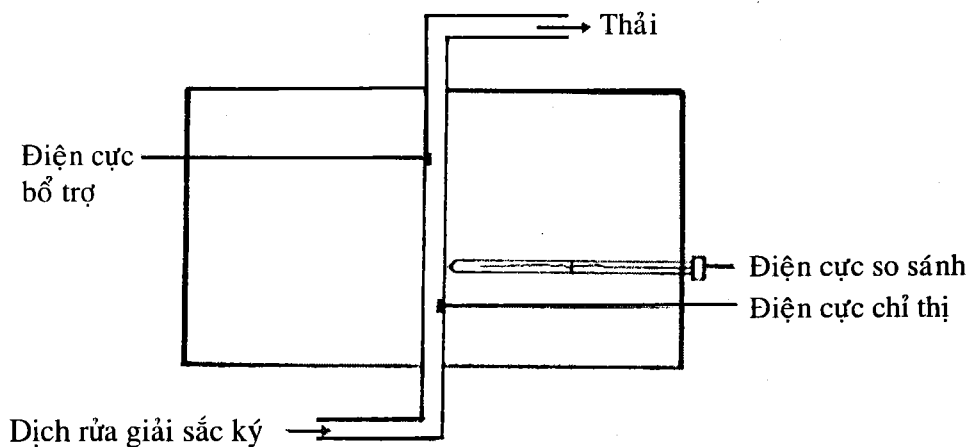


Hình 10.13. Sơ đồ cấu tạo detector độ dẫn.

– *Detector đo dòng (amperometric detector):*

Hình 10.14 mô tả sơ đồ cấu tạo một detector đo dòng. Nó có ba điện cực:

- + Điện cực công tác ở đây xảy ra phản ứng oxy hoá hoặc khử, được chế tạo bằng carbon thủy tinh (glassy carbon), bạch kim, vàng.
- + Điện cực so sánh thường là điện cực bạc clorid,
- + Điện cực hỗ trợ thường là thép không gỉ.



Hình 10.14. Sơ đồ cấu tạo detector đo dòng.

Các điện cực này được cài vào dòng pha động. Điện cực chỉ thị được phân cực bằng một điện thế để tạo ra dòng oxy hoá. Tín hiệu dòng này được đo và gửi tới hệ thống xử lý dữ liệu. Đây là detector vào loại nhạy nhất. Tuy nhiên nhược điểm của nó là điện cực dễ bị nhiễm bẩn.

Bảng 10.1 tóm tắt một số đặc điểm của 6 loại detector thường dùng trong sắc ký lỏng hiệu năng cao.

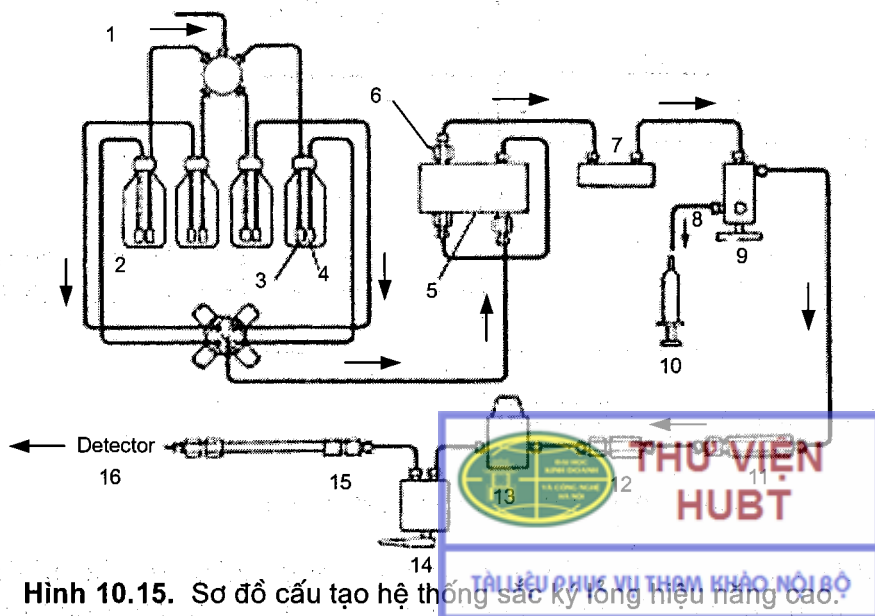
Bảng 10.1. Một số đặc điểm của detector trong sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Loại detector	Độ nhạy (mg/mL)	Khoảng tuyến tính	Đặc điểm	Rửa giải gradient
Hấp thụ UV-VIS - Đo quang (kính lọc) - Đo quang phổ - Màng diod	$5 \cdot 10^{-7}$ $5 \cdot 10^{-7}$ $> 2 \cdot 10^{-7}$	10^{+4} 10^{+5} 10^{+5}	Sử dụng rất phổ biến, chọn lọc với các chất có cấu trúc hoặc nhóm chức chưa bão hoà. Ít thay đổi với tốc độ dòng và nhiệt độ.	+
Huỳnh quang	10^{-9}	10^4	Đặc biệt rất nhạy, chọn lọc	+
Chỉ số khúc xạ	$5 \cdot 10^{-4}$	10^4	Vạn năng, độ nhạy vừa phải. Thay đổi nhiều theo nhiệt độ (cần kiểm soát đến $\pm 0,001^\circ\text{C}$)	-
Tán xạ bay hơi	$2 \cdot 10^{-4}$	10^4	Vạn năng, độ nhạy vừa phải, đáp ứng với khối lượng.	+
Đo độ dẫn	10^{-5}	10^4	Có thay đổi theo nhiệt độ và tốc độ dòng. Không dùng cho gradient. Chỉ thích hợp với chất tan ion.	-
Đo ampe	10^{-9}	10^5	Rất nhạy, chọn lọc. Điện cực dễ bị nhiễm bẩn.	-

Ghi chú: +: Dùng được chế độ gradient

-: Không thích hợp cho rửa giải gradient

Hình 10.15 trình bày sơ đồ cấu tạo một hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao của hãng Perkin Elmer.



Hình 10.15. Sơ đồ cấu tạo hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.

- | | | |
|------------------------|------------------|----------------------------|
| 1. Nguồn heli | 2. Bình dung môi | 3. Đầu phun |
| 4. Đầu lọc | 5. Bơm | 6. Van kiểm tra |
| 7. Khử xung | 8. Đầu thải | 9. Van xả |
| 10. Bơm rửa giải | 11. Lọc dung môi | 12. Điều hoà áp suất ngược |
| 13. Chuyển đổi áp suất | 14. Van tiêm mẫu | 15. Cột |
| 16. Tới detector | | |

1.2. Các kiểu sắc ký lỏng hiệu năng cao

Sắc ký lỏng hiệu năng cao có thể thực hiện theo nhiều kỹ thuật khác nhau tùy thuộc vào đặc điểm cấu tạo của chất phân tích và yêu cầu của công việc. Có thể thống kê các kỹ thuật sắc ký lỏng theo mức độ phổ biến trong thực tế:

- Sắc ký phân bố (bao gồm cả sắc ký cặp ion)
- Sắc ký hấp phụ
- Sắc ký trao đổi ion
- Sắc ký loại cỡ
- Sắc ký ái lực
- Sắc ký các đồng phân quang học

Pha tĩnh cho hầu hết các kỹ thuật sắc ký lỏng ở trên là dẫn chất khác nhau của siloxan hoặc polymer (polysaccharid, polystyren) tùy thuộc vào kỹ thuật. Pha tĩnh thường là hạt hình cầu đường kính 3 - 10 μm . Kích thước hạt càng nhỏ, chiều cao H của đĩa càng giảm nên số đĩa lý thuyết càng tăng. Nhưng mặt khác, kích thước hạt nhỏ, lực cản đối với dòng pha động lớn. Vì vậy hạt càng nhỏ đòi hỏi áp suất đầu vào càng lớn.

Pha động là vấn đề mấu chốt cho sắc ký phân bố, sắc ký hấp phụ và trao đổi ion, là thứ yếu cho các kỹ thuật còn lại. Bảng 10.2 thống kê một số tính chất của dung môi thường dùng trong sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Bảng 10.2. Một số tính chất của dung môi dùng trong sắc ký lỏng.

TT	Tên dung môi	Giới hạn dưới đo UV (nm)	Chỉ số khúc xạ	Điểm sôi (0°C)	Độ nhớt CP, 25°C	Độ phân cực (P)*
1	n-hexan	190	1,372	69	0,3	0,1
2	Benzen	280	1,498	80	0,60	2,7
3	Methylen clorid	233	1,421	40	0,41	3,1
4	n-propanol	240	1,385	97	1,90	4,0
5	Tetrahydrofuran	212	1,405	66	0,46	4,0
6	Ethyl acetat	256	1,370	77	0,43	4,4
7	Cloroform	245	1,448	61	0,53	4,1
8	Aceton	330	1,356	56	0,30	5,1
9	Ethanol	210	1,359	78	1,08	4,3
10	Acid acetic	210	1,370	118	1,1	6,0
11	Acetonitril	190	1,341	82	0,34	5,8
12	Methanol	205	1,326	65	0,54	5,1
13	Nước	190	1,333	100	0,89	10,2

* Chỉ số độ phân cực Snyder

Giới hạn đo hấp thụ UV và chỉ số khúc xạ là yếu tố quan trọng khi dùng detector UV và detector khúc xạ. Chỉ số P' là thông số đánh giá độ phân cực của dung môi giúp ta lựa chọn pha động cho sắc ký phân bố hiệu năng cao.

1.2.1. Sắc ký phân bố hiệu năng cao

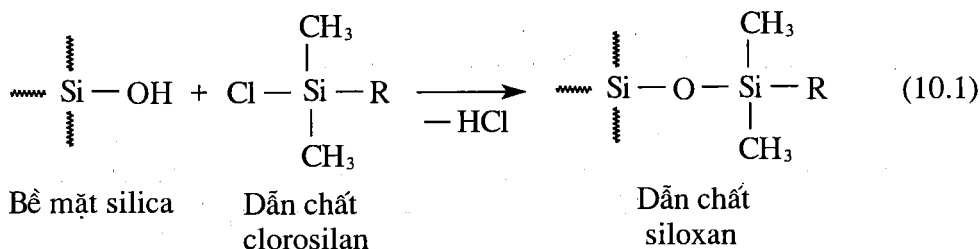
Sắc ký lỏng phân bố là kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất hiện nay. Có thể phân thành hai dạng tùy thuộc vào pha tĩnh:

- Sắc ký lỏng - lỏng: Pha tĩnh là lớp chất lỏng bao quanh các hạt chất mang rắn, đó là chất nhồi cột. Quá trình lưu giữ chất phân tích liên quan đến sự phân bố giữa 2 pha lỏng.
- Sắc ký pha liên kết (Bonded-phase chromatography – BPC):

Ở đây, pha tĩnh có liên kết hóa học với bề mặt chất mang rắn (silica, alumina...). Trước đây, sắc ký phân bố chủ yếu là sắc ký lỏng - lỏng. Hiện nay do những ưu điểm của nó, sắc ký pha liên kết chiếm ưu thế, thay thế cho sắc ký lỏng - lỏng. Cho nên sau đây chỉ trình bày nguyên tắc sắc ký pha liên kết tách các chất.

① Pha tĩnh:

Loại pha tĩnh phổ biến nhất được chế tạo từ silic dioxyd (silica). Nhóm OH trên bề mặt hạt silica phản ứng với dẫn chất clorosilan tạo ra dẫn chất siloxan.



Ở đây R có thể là mạch thẳng có 18 hoặc 8 carbon hoặc các nhóm chức hữu cơ khác như amin mạch thẳng, nitril, hydrocarbon thơm. Tính chất phân cực của pha tĩnh thay đổi tùy thuộc vào gốc R. Dựa vào gốc R này người ta phân ra hai nhóm:

- Pha tĩnh không phân cực (nonpolar phases): R là
- $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{CH}_3$: gốc octadecyl
- $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_3$: gốc octyl
- $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{C}_6\text{H}_5$: gốc phenyl propyl

Tính không phân cực giảm dần từ C_{18} đến phenyl propyl.

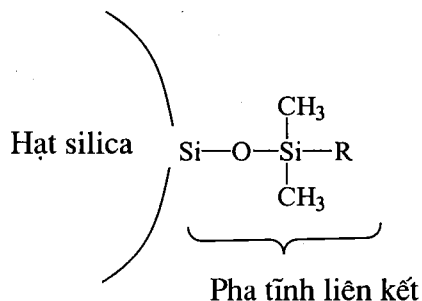
- Pha tĩnh phân cực (polar phases): R là:
- $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{CN}$: cyano



- $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2$: amino

- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$: diol

Độ phân cực tăng dần từ -cyano đến diol. Hạt silica mang gốc R khác nhau có điện tích riêng khá lớn (vài trăm m^2 một gam) thường chỉ bền vững trong khoảng pH 2 ÷ 8. Ngoài khoảng này liên kết siloxan bị thủy phân. Trừ một số dạng đặc biệt có thể ổn định ở pH 9 ÷ 10. Vì vậy sắc ký các base ở pH 8 ÷ 12 thường dùng cột polyme.

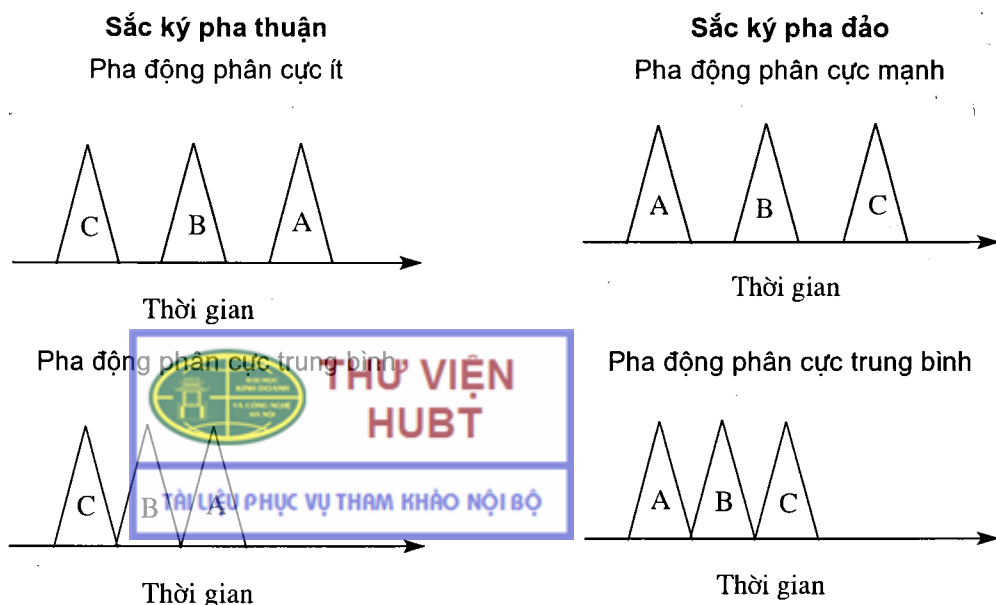


Chất nhồi cột pha liên kết thường là hạt hình cầu đường kính 3 ÷ 10 μm , có độ phân cực khác nhau. Cho nên người ta phân ra hai loại: sắc ký pha thuận và sắc ký pha đảo.

❶ Sắc ký pha thuận và pha đảo:

Hai dạng sắc ký này khác nhau phụ thuộc vào độ phân cực tương đối của pha động và pha tĩnh.

Những công trình nghiên cứu đầu tiên về sắc ký, người ta dùng pha tĩnh lỏng phân cực như triethylen glycol, nước. Còn pha động là dung môi ít phân cực hơn như hexan, iso propyl ether. Do lịch sử phát minh sắc ký người ta gọi đây là *sắc ký pha thuận* (normal-phase chromatography). Sau đó qua quá trình phát triển, người ta dùng pha tĩnh không phân cực như hydrocarbon, pha động phân cực hơn pha tĩnh như nước, acetonitril. Loại hình sắc ký này với độ phân cực của pha tĩnh và pha động ngược với sắc ký pha thuận. Cho nên người ta gọi đó là sắc ký pha đảo (reversed-phase chromatography).



Hình 10.16. Minh họa quan hệ giữa độ phân cực và thời gian lưu.

Trong sắc ký pha thuận, chất ít phân cực nhất được rửa giải đầu tiên. Khi tăng độ phân cực của pha động, thời gian lưu giảm dần. Trong sắc ký pha đảo thì ngược lại: các chất phân cực nhất được rửa giải đầu tiên. Khi tăng độ phân cực của pha động, thời gian lưu tăng lên. Hình 10.16 minh họa mối quan hệ giữa độ phân cực và thời gian lưu cho hai loại sắc ký với độ phân cực của ba chất phân tích theo thứ tự $A > B > C$.

Độ phân cực của dung môi pha động dựa vào trị số P' trong bảng 10.2. Trị số P' càng cao độ phân cực càng mạnh.

③ Chọn pha tĩnh và pha động:

Trong sắc ký có ba thành phần tương tác với nhau: pha tĩnh, pha động và chất phân tích. Để có thể tách bằng sắc ký phân bố thành công cần chọn điều kiện để cân bằng lực tương tác giữa ba thành phần này. Độ phân cực của các thành phần là chỉ tiêu mô tả định tính lực tương tác.

- Với pha tĩnh: Dựa vào nhóm thế R của dẫn chất siloxan.
- Với pha động: Dựa vào trị số P' (bảng 10.2)
- Với chất phân tích: Dựa vào nhóm chức. Độ phân cực của nhóm chức hữu cơ nhìn chung, tăng dần theo thứ tự:

Hydrocarbon mạch thẳng < olefin < hydrocarbon thơm < dẫn chất halogen < sulfid < ether < dẫn chất nitro < ester $\cong$ aldehyd $\cong$ ceton < alcol $\approx$ amin < sulfon < sulfoxid < amid < acid carbonxylic < nước.

Để tách sắc ký người ta có thể lựa chọn theo một trong 2 nguyên tắc sau:

1. Độ phân cực của chất phân tích hợp (matching) với độ phân cực của pha tĩnh và khác xa độ phân cực của pha động.
2. Độ phân cực của chất phân tích hợp với độ phân cực của pha động và khác nhiều với độ phân cực của pha tĩnh.

Nhiều tác giả nhận thấy chọn theo nguyên tắc 1 có xác suất thành công nhiều hơn. Còn theo nguyên tắc 2 thì pha tĩnh khó cạnh tranh các chất phân tích với pha động nên thời gian lưu quá ngắn.

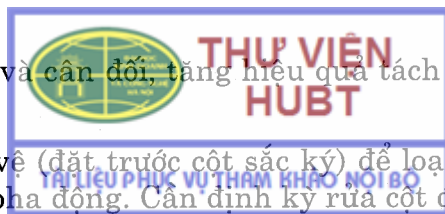
Trên đây là hai nguyên tắc định hướng lựa chọn pha tĩnh và pha động cho chất phân tích.

④ Tinh cân đối của pic sắc ký:

Để đảm bảo cho pic sắc ký nhọn và cân đối, tăng hiệu quả tách cần lưu ý một số điểm sau đây:

- **Cột sắc ký:** nên dùng cột bảo vệ (đặt trước cột sắc ký) để loại tạp chất có mặt trong mẫu hoặc trong pha động. Cần định kỳ rửa cột để loại các chất được hấp phụ mạnh trên pha tĩnh.
- **Pha động:**

Độ tinh khiết của dung môi pha động tác động mạnh đến chất lượng pic. Cần dùng dung môi tinh khiết cho sắc ký.



Nếu là tách pha thuận cần chú ý đến hàm lượng nước. Để đẩy nhanh tạo lập cân bằng giữa pha tĩnh và pha động lúc rửa giải, một số tác giả cho rằng các dung môi pha động cần được bão hoà nước 50%. Thường người ta thêm vài mL nước vào dung môi khan, lắc đều, để phân lớp. Lấy thể tích dung môi đã bão hoà nước và thêm vào đó đồng thể tích dung môi khan.

- Để giảm thiểu hiện tượng kéo đuôi (tailing) tăng tính cân đối của pic, người ta thường thêm vào pha động triethylamin 30 mM khi sắc ký các base amin. Triethylamin sẽ liên kết với một số vị trí hoạt động trên bề mặt silica nên ngăn cản lưu giữ chất phân tích ở các vị trí đó. Nếu sắc ký các hợp chất acid có thể giảm thiểu kéo đuôi bằng cách thêm amoni acetat 30 mM. Với hỗn hợp chưa rõ thành phần, thường dùng muối triethylamoni acetat 30 mM, hoặc dimethyloctylamin 10 mM. Đôi khi còn dùng dimethyloctylamoni acetat.

Người ta cho rằng các chất phụ gia kể trên sẽ đẩy nhanh cân bằng khi thay đổi dung môi.

- Thể tích ngoài cột (extra column volume) của hệ sắc ký được gọi là thể tích chết (dead volume): thể tích từ lúc tiêm mẫu đến lúc phát hiện. Thể tích này càng nhỏ, pic sắc ký càng ít bị giãn. Vì vậy, người ta dùng detector, các ống nối nhỏ đến mức có thể để giảm thiểu thể tích ngoài cột.

Theo một số tác giả, sắc ký phân bố pha đảo chiếm đến 75% khối lượng sắc ký. Vì vậy cần thiết tóm tắt một số yêu cầu cần thiết cho triển khai loại hình sắc ký này.

❶ Triển khai sắc ký pha đảo:

Sắc ký pha đảo được sử dụng để phân tích hỗn hợp các chất hữu cơ có khối lượng phân tử nhỏ ($M < 2000$), trung tính, phân cực. Để triển khai sắc ký thường thực hiện các bước:

- Xác định mục tiêu của phân tích,
- Chọn kỹ thuật xử lý mẫu để tách các chất phân tích,
- Chọn detector thích hợp,
- Chọn điều kiện sắc ký.

Hai nội dung đầu thuộc các chương khác, detector đã được trình bày ở mục 10.1.1. Sau đây sẽ đề cập đến việc lựa chọn điều kiện cho sắc ký pha đảo.

- Xác định một vài thông số sắc ký:

Hệ số dung lượng k' là thước đo thời gian lưu t_R , giá trị thích hợp dao động trong khoảng 1 - 5. Nếu giá trị quá nhỏ pic đầu tiên dễ bị biến dạng (do dính với pha động), nếu lớn quá thời gian phân tích sẽ kéo dài.

Độ phân giải của hai pic cạnh nhau khoảng $R \geq 2$ để đảm bảo tách hoàn toàn.

Áp suất vận hành thiết bị không nên lớn quá để đảm bảo tuổi thọ của bơm, van, hệ lấy mẫu tự động.

Có thể tóm tắt 3 thông số chính cho sắc ký:

- + $1 \leq k' \leq 5$
- + Độ phân giải $R \geq 2$
- + Hệ số bất đối xứng: $0,9 \leq AF \leq 1,5$

– *Chọn dung môi:*

Ba dung môi thường dùng là: acetonitril (MeCN), methanol (MeOH) và tetrahydrofuran (THF).

Để làm pha động thường chọn hỗn hợp 1 ÷ 2 dung môi trên với nước dung dịch đệm nhằm đảm bảo tương tác với chất tan để tách pha đảo hỗn hợp nhiều chất.

- + Hỗn hợp thường dùng nhất là MeCN với nước. Acetonitril có ưu điểm là độ nhớt thấp nên có thể sắc ký ở áp suất thấp. Mặt khác, có thể đo độ hấp thụ UV đến 190 nm.
- + Methanol được lựa chọn thứ hai, vì độ nhớt cao hơn và giới hạn đo ở vùng UV là 205 nm.
- + THF ít dùng hơn vì ổn định kém hơn (dễ bị oxy hoá), cân bằng với pha tĩnh chậm hơn.

– *Nhiệt độ:*

Thay đổi nhiệt độ của cột có thể tác động đến thời gian lưu của các chất trong hỗn hợp. Nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt đối với các hợp chất ion, các hợp chất có nhiều nhóm thế phân cực. Điều lưu ý là nếu tăng nhiệt độ thì cần giảm pH < 6 để không xảy ra sự hòa tan pha tĩnh silica. Mặt khác khi nhiệt độ trên 60°C có thể làm phân huỷ pha tĩnh, thay đổi thành phần pha động.

Bảng 10.3. Điều kiện triển khai sắc ký pha đảo.

Pha tĩnh	C ₁₈ hoặc C ₈ loại hạt hình cầu đường kính 5 µm. Dạng EC (endcapped) ưa dùng hơn.*
Cột	Hạt 5 µm: 150 mm × 4,6 mm Hạt 3,5 µm: 75 mm × 4,6 mm
Tốc độ dòng	1 ÷ 2,0 mL/phút
Pha động	CH ₃ CN - H ₂ O cho chất phân tích trung tính, CH ₃ CN - dung dịch đệm nước cho phân tích ion, nước với hàm lượng CH ₃ CN dao động trong khoảng 5 ÷ 100% cho rửa giải gradient.
Mẫu phân tích	25 - 50 µL (có 25 ÷ 50 µg mỗi chất)
Nhiệt độ	35 - 40°C nếu có lò cột

* Nhóm - OH còn sót lại trên bề mặt hạt silica được siloxan hóa với clorosilan.

Trên đây là một số định hướng để lựa chọn điều kiện sắc ký. Vấn đề còn phức tạp hơn nếu dùng pha động gồm nhiều dung môi, rửa giải gradient và cần xem xét đến tương tác của hai pha với các chất phân tích. Thông qua thực nghiệm để tối ưu hoá điều kiện sắc ký là công việc cần thiết.

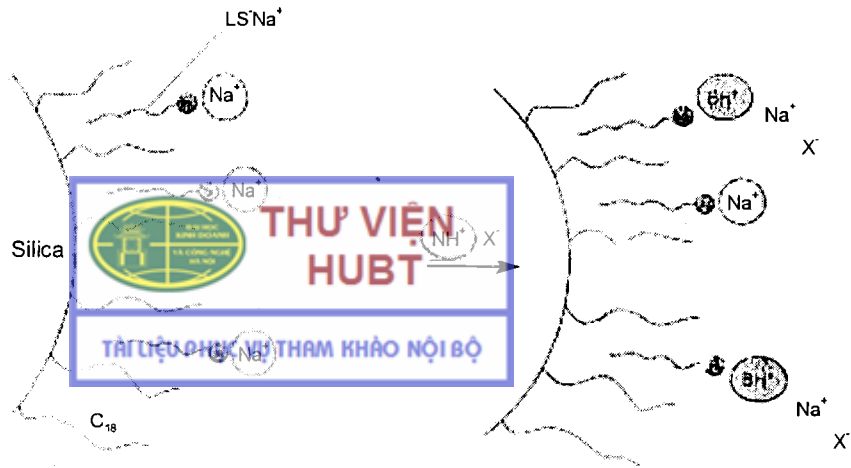
6 Ứng dụng của sắc ký phân bố:

Như trên đã trình bày sắc ký phân bố pha liên kết - trong đó có sắc ký pha đảo - được sử dụng phổ biến để phân tích hỗn hợp các chất thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau. Bảng 10.4 minh họa ứng dụng của sắc ký phân bố cho nhiều loại hình mẫu phân tích khác nhau.

Bảng 10.4. Ứng dụng của sắc ký phân bố hiệu năng cao.

Lĩnh vực	Đối tượng phân tích
Dược	Kháng sinh, các chất giảm đau, an thần, steroid
Hoá sinh	Aminoacid, protein, lipid, carbohydrat
Thực phẩm	Chất làm ngọt, chất phụ gia, các chất chống oxy hóa, aflatoxin
Hóa công nghiệp	Hợp chất thơm, chất màu, hoạt động bề mặt
Môi trường	Các chất trừ sâu diệt cỏ, dẫn chất phenol, PCB, PAH
Hóa pháp lý	Các chất độc, thuốc ngủ, rượu trong máu
Y học lâm sàng	Acid mật, các chất chuyển hóa của thuốc, thuốc trong dịch sinh học.

Sắc ký phân bố pha đảo bao gồm cả sắc ký cặp ion. Để tách hỗn hợp các cation người ta đưa vào một anion, một đối ion vào pha động. Ví dụ natri laurylsulfat $C_{12}H_{25}OSO_3Na^+$ (Na^+LS^-). Chất này liên kết với pha tĩnh không phân cực và chuyển nó sang dạng trao đổi ion. Khi chất phân tích BH^+X^- đi qua cột, cặp ion BH^+LS^- được hình thành và lưu giữ trên pha tĩnh. Quá trình rửa giải đưa chất phân tích ra khỏi cột theo nguyên tắc sắc ký phân bố pha đảo.



Hình 10.17. Nguyên tắc sắc ký cặp ion.

Nếu cần phân tích hỗn hợp các anion, người ta đưa một cation, ví dụ muối amoni bậc bốn $R_4N^+X^-$ vào pha động. Đó là thuốc thử tạo cặp ion.

Sắc ký cặp ion phức tạp hơn sắc ký phân bố pha đảo, bởi vì:

- Cân bằng giữa pha tĩnh và thuốc thử tạo cặp ion diễn ra chậm
- Sự hình thành cặp ion phụ thuộc vào pH dung dịch, nồng độ thuốc thử tạo cặp, nhiệt độ.

Do quá trình cân bằng diễn ra chậm nên người ta khuyên không nên dùng rửa giải gradient cho sắc ký phân bố cặp ion.

1.2.2. Sắc ký hấp phụ hiệu năng cao

Các công trình nghiên cứu đầu tiên về sắc ký là quá trình hấp phụ của chất phân tích trên bề mặt chất rắn. Pha tĩnh là chất rắn phân cực. Chất phân tích tranh chấp với pha động ở các vị trí hấp phụ trên bề mặt pha tĩnh. Lưu giữ chất phân tích là do lực *hấp phụ*.

❶ Pha tĩnh:

Hai chất thường được sử dụng phổ biến làm pha tĩnh là silic oxyd (silica) và nhôm oxyd (alumina).

- *Silica*: nguyên liệu chất nhồi cho sắc ký pha thuận. Trên bề mặt có nhóm silanol ở dạng tự do (có ái lực hấp phụ mạnh nhất). Ngoài ra còn ở dạng liên kết giữa các nhóm hoặc với phân tử nước. Tuy có ưu điểm là hấp phụ mạnh, dùng được cho nhiều trường hợp, nhưng ổn định chỉ trong khoảng hẹp của pH (từ 2 đến 8). Để khắc phục nhược điểm này người ta tìm các chất khác.
- *Alumina*: có độ ổn định pH rộng hơn 2 ÷ 12. Sau khi xử lý kiềm có thể dùng alumina cho tách các base hữu cơ (anilin, pyridin và dẫn chất của chúng).
- Hơn mười năm lại đây người ta đang nghiên cứu sử dụng titan oxyd và zirconi oxyd làm chất hấp phụ. Cả hai đều ở dạng oxyd base không tan trong môi trường kiềm. Hơn nữa chúng ổn định trong môi trường acid đến pH=1. Chất phân tích có tính base được lưu giữ trên pha tĩnh titan oxyd (titania) hoặc zirconi oxyd (zirconia) có thể rửa giải với hỗn hợp nước bão hòa dicloromethan.

❷ Pha động:

Trong sắc ký hấp phụ thành phần pha động ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số phân bố của chất phân tích. Để rửa giải các chất đã bị hấp phụ, người ta dùng pha động có *sức rửa giải* (eluent strength) khác nhau. Bảng 10.4 tóm tắt giá trị ϵ_0 - thể hiện sức rửa giải - của các dung môi đối với chất hấp phụ là alumina và silica. Trị số ϵ_0 càng lớn, sức rửa giải càng mạnh. Nếu pha động gồm nhiều dung môi, dựa vào phân số mol của từng dung môi để tính trị số ϵ_0 của hệ.

Bảng 10.5. Sức rửa giải của một số dung môi trong sắc ký hấp phụ.

Tên dung môi	ϵ_0 silica	ϵ_0 alumina
n - hexan	0	0,01
n - heptan	0	0,01
Cyclohexan	-	0,04
Carbon tetraclohid	0,11	0,17
Isopropyl ether	0,32	0,28
Cloroform	0,26	0,36
1,2 dicloroethan	0,34	0,44
Tetrahydrofuran	0,53	0,51
Ethyl acetat	0,48	0,60
Acetonitril	0,52	0,55
Dioxan	0,51	0,61
Tert - butanol	-	0,70
n - butanol	-	0,82
i - propanol	0,60	0,82
Ethanol	-	0,88
Methanol	0,70	0,95
Nước	-	> 0,95

3 Ứng dụng:

Các chất phân tích có khối lượng phân tử dưới 5 000, ít tan trong nước hoặc trong hỗn hợp nước - dung môi hữu cơ không thích hợp với sắc ký pha đảo. Người ta cần dùng sắc ký pha thuận, đặc biệt là sắc ký hấp phụ để tách hỗn hợp các chất này.

- Sắc ký hấp phụ có thể mạnh trong việc tách các đồng phân vị trí các hợp chất hữu cơ. Ví dụ:

+ Có thể dùng silica để tách nhiều hỗn hợp:

1-cyanonaphthalen và acetonaphthalen,

1,7 dimethoxynaphthalen và 2-methoxynaphthalen,

acetophenon và 3-nitro acetophenon,

1-nitronaphthalen và 1,5-dinitronaphthalen,

chỉ với một pha động là pentan có 23% CH_2Cl_2 .

+ Có thể dùng alumina để tách hỗn hợp:

. Quinolin và iso quinolon với pha động là benzen,

. m-dibromobenzen và p-dibromobenzen, pha động là pentan.

- Ngoài ra sắc ký hấp phụ còn được ứng dụng nhiều trong phân tích các chế phẩm dầu mỏ, thực phẩm, dược phẩm có thể nêu ra 2 ví dụ liên quan đến tách hỗn hợp của nhiều chất trong cùng nhóm.
- + Phân tích 7 dẫn chất của phenothiazin: 3-chlorophenothiazin, levomepromazin, clorpromazin, dimethothiazin, propericiazin, pipothiazin và oxomemazin, với 2 hệ pha động:
 - A: iso octan - diisopropyl oxyd (1:1)
 - B: methanol - diisopropyl oxyd (1:1)
- + Phân tích 4 đồng phân: α , β , γ và δ tocopherol trong dầu ngũ cốc (corn-oil).

1.2.3. Sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao

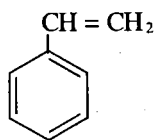
Sắc ký trao đổi ion dựa vào lực hút của ion chất tan và vị trí mang điện tích trên pha tĩnh. Chất trao đổi anion có nhóm mang điện tích dương trên pha tĩnh hút anion chất tan. Chất trao đổi cation có nhóm mang điện tích âm sẽ hút cation chất tan. Chất trao đổi anion và chất trao đổi cation là polymer không tan trong nước mang các nhóm trao đổi ion được gọi là *chất trao đổi ion* (ion exchangers) hoặc nhựa trao đổi ion (ion - exchange resins).

❶ Nhựa trao đổi ion:

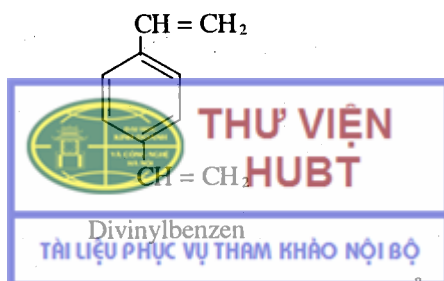
Đó là vật liệu polymer có chứa các nhóm ion. Có 2 loại:

- Nhựa trao đổi cation: loại acid mạnh mang nhóm acid sulfonic ($R-SO_3^- H^+$), loại yếu mang nhóm acid carboxylic ($R-COOH$).
- Nhựa trao đổi anion có nhóm base amin liên kết với phân tử polymer. Chất trao đổi base mạnh có nhóm amin bậc bốn $[RN(CH_3)_3^+ OH^-]$, dạng base yếu có nhóm amin bậc hai hoặc bậc ba.

Copolymer styren và divinylbenzen (nhựa SDB) được dùng phổ biến làm chất nhồi cột sắc ký, cột chiết pha rắn và cũng là nguyên liệu chế tạo nhựa trao đổi ion.

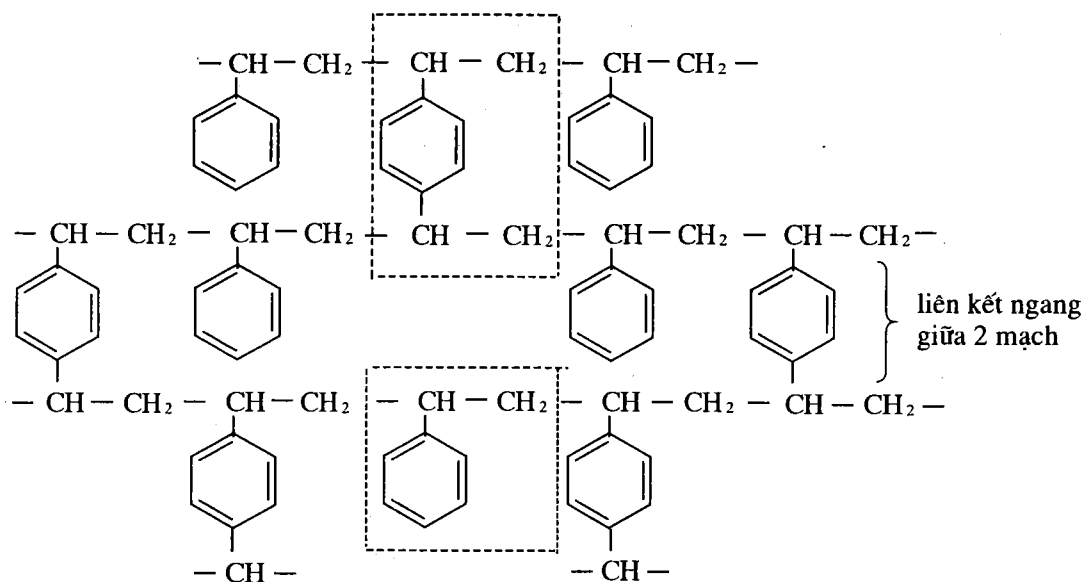


Styren



Divinylbenzen là cầu nối, liên kết ngang giữa các mạch thẳng polymer (hình 10.18).

Hàm lượng divinylbenzen trong nhựa SDB thay đổi trong khoảng 1 ÷ 16%. Vòng benzen có gắn các nhóm chức khác nhau sẽ biến copolymer thành chất trao đổi cation hoặc anion.



Hình 10.18. Copolymer styren - divinylbenzen (SDB).

Nhựa trao đổi cation: vị trí para của monomer styren có nhóm $-SO_3H$. Nếu ở đây gắn nhóm $-CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$ ta có nhựa trao đổi anion.

Nếu thay styren bằng acid methacrylic khi chế tạo copolymer ta có nhựa mang nhóm $-COOH$.

Bảng 10.6 thống kê một số nhóm hoạt động của nhựa trao đổi ion.

Bảng 10.6. Một số nhóm hoạt động của nhựa trao đổi ion.

Loại	Viết tắt	Tên	Cấu tạo
1. Trao đổi cation	P	Sulfopropyl	$-O(CH_2)_3 - SO_3H$
- Acid mạnh	SE	Sulfoethyl	$-O(CH_2)_2 - SO_3H$
- Acid trung bình	P	Phosphat	$-OPO_3H$
- Acid yếu	CM	Carboxymethyl	$-OCH_2 - COOH$
2. Trao đổi anion			
- Base mạnh	TEAE	Triethylaminoethyl	$-O(CH_2)_2 N^+(CH_2CH_3)_3$
	QAE	Diethyl (2 hydroxy propyl) quaternary amino	$-O(CH_2)_2 N^+(CH_2CH_3)_2$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad CH_2CH(OH) - CH_3$
- Base trung bình	DEAE	Diethylaminoethyl	$-O(CH_2)_2 N(CH_2CH_3)_2$
- Base yếu	PAB	p - amino benzyl	$-O - CH_2 - C_6H_4 - NH_2$

2 Cân bằng trao đổi ion:

Ta khảo sát nhựa RNa^+ trao đổi cation với Li^+ :



Áp dụng định luật tác dụng khối lượng:

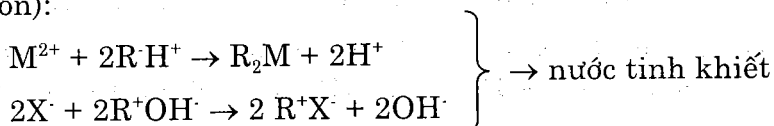
$$K = \frac{[R^+Li^+][Na^+]}{[R^+Na^+][Li^+]} \quad (10.2)$$

Hằng số cân bằng K được gọi là *hệ số chọn lọc*, bởi vì nó đánh giá tính chọn lọc tương đối của nhựa trao đổi cation với Li^+ . Nhìn chung nhựa trao đổi ion liên kết mạnh với ion điện tích lớn. Ví dụ thứ tự chọn lọc cation: giảm theo điện tích của chúng.

$La^{3+} > Ce^{3+} > Eu^{3+} > Sc^{3+} > Al^{3+} \gg Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}, Mg^{2+} > UO_2^{2+} \gg Ti^+ > Ag^+ > Co^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$.

③ Ứng dụng của nhựa trao đổi ion:

- Dùng cân bằng trao đổi ion để tinh chế nguyên liệu loại tạp chất. Ví dụ loại các ion kim loại M^{2+} và anion X^- để điều chế nước tinh khiết (nước khử ion):



- Dùng nhựa trao đổi ion để tăng nồng độ của các thành phần vi lượng trong dung dịch đủ cho phân tích.
- Áp dụng cho sắc ký:

Trong sắc ký ion, chất phân tích ion được đưa vào đầu cột đã nhồi nhựa trao đổi ion thích hợp. Rửa giải được thực hiện bằng một dung dịch có ion đủ sức đẩy ion phân tích đang bị lưu giữ ra khỏi bề mặt nhựa. Ví dụ một anion A^n , ion phân tích trao đổi với nhựa anion:



Dùng dung dịch base loãng rửa giải nhựa, ta giải phóng ion A^n và đưa nhựa về dạng base (thực hiện phản ứng nghịch).

Nếu hỗn hợp có nhiều thành phần do hệ số phân bố khác nhau nên quá trình rửa giải cho ta các phân đoạn thành phần khác nhau. Năm 1975 người ta đã sử dụng thành công phép đo độ dẫn để phát hiện và xác định nồng độ các ion trong dịch rửa giải. Detector độ dẫn ra đời, trở thành kỹ thuật quan trọng để phân tích các ion vô cơ và hữu cơ (xem thêm mục detector độ dẫn).

1.2.4. Sắc ký lỏng hiệu năng cao trên gel

Trong kỹ thuật sắc ký này, pha tĩnh là gel polysaccharid, polyacrylamid thường được dùng phổ biến để xác định sự phân bố khối lượng phân tử của polymer. Trong tài liệu đôi khi người ta phân biệt:

- Sắc ký thẩm gel (GPC: gel-permeation chromatography): là sắc ký dùng gel để tách các polymer hòa tan trong dung môi (organosoluble polymers). Dung pha động kỵ nước.
- Sắc ký lọc gel (GFC: gel filtration chromatography): sắc ký dùng gel để tách các polymer sinh học (biopolymers). Dung pha động ưa nước.

Cả hai loại hình này đều có cùng nguyên lý tách các chất dựa vào kích thước phân tử. Vì vậy có tên gọi chung là sắc ký loại cỡ (SEC: size exclusion chromatography) hoặc sắc ký loại phân tử (MEC: molecular exclusion chromatography).

❶ Phương trình rửa giải:

Sắc ký lỏng trên gel không có liên kết hoặc tương tác hấp phụ với pha tĩnh như ba loại kỹ thuật đã nêu. Quá trình tách các chất dựa vào kích thước phân tử. Có thể phân thành 3 nhóm:

- Phân tử có kích thước lớn hơn kích thước cực đại của lỗ xốp trong pha tĩnh, sẽ bị loại hoàn toàn, được rửa giải ngay lúc ban đầu ở thể tích V_0 .
- thể tích rỗng giữa các hạt gel ở trong cột.
- Các phân tử có kích thước nhỏ hơn kích thước nhỏ nhất của lỗ xốp sẽ khuếch tán hoàn toàn qua pha tĩnh trong thể tích V_t .
- Các phân tử có kích thước trung gian được tách dần theo mức độ khuếch tán qua pha tĩnh: phân tử lớn hơn sẽ ra trước, phân tử nhỏ hơn sẽ ra sau trong thể tích V_p của pha động nằm giữa V_0 và V_t .

Hình 10.19 trình bày đường chuẩn loại cỡ và sắc ký đồ tách tương ứng của hỗn hợp ứng với 4 phân đoạn.

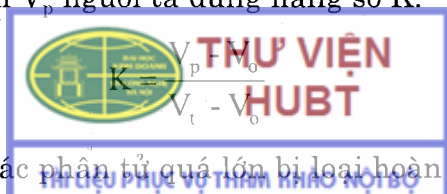
Trục tung: logarit khối lượng phân tử của chất phân tích.

Trục hoành: thể tích lưu điểm A: loại hoàn toàn, điểm B: thẩm thể tích hoàn toàn.

Thể tích giữa điểm A và B là thẩm chọn lọc theo kích thước phân tử.

Thể tích V_p ($V_0 < V_p < V_t$) còn được gọi là *thể tích làm việc* (working volume) của cột.

Để đặc trưng cho quá trình rửa giải các chất có kích thước trung gian trong thể tích V_p người ta dùng hằng số K:

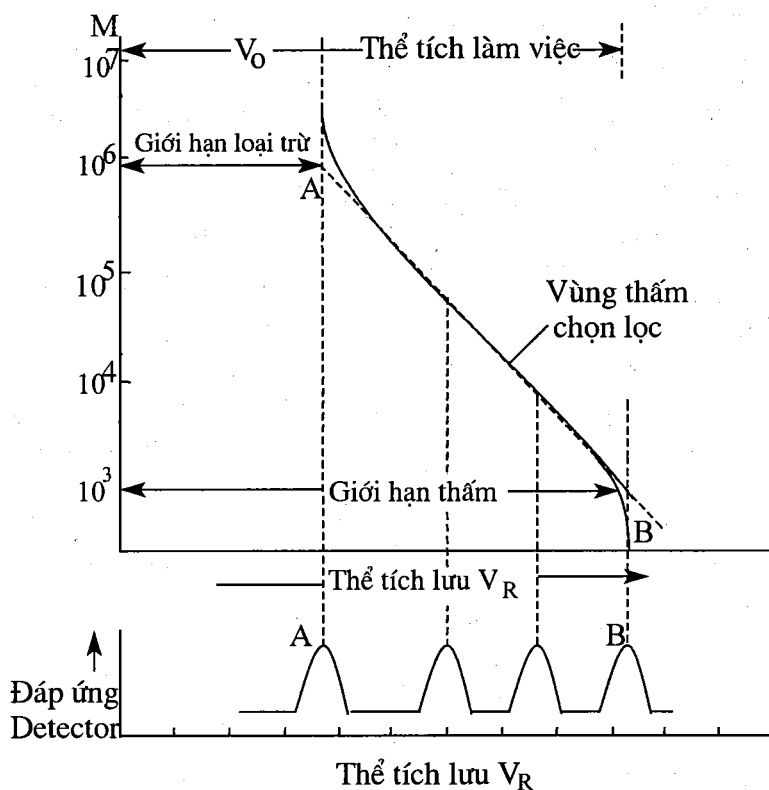


$$K = \frac{V_p - V_0}{V_t - V_0} \quad (10.4)$$

- Với các phân tử quá lớn bị loại hoàn toàn $V_p = V_0$ nên $K = 0$

- Với các phân tử quá nhỏ, thẩm thấu hoàn toàn $V_p \cong V_t$ nên $K \cong 1$

Các phân tử trung gian thẩm thấu chọn lọc qua gel sẽ có hằng số K dao động giữa 0 và 1. Nếu bên cạnh cơ chế loại cỡ, còn có thêm cơ chế hấp phụ trong quá trình tách rửa giải, hằng số K có thể lớn hơn 1.



Hình 10.19. Đường chuẩn loại cỡ của polymer.

Để xác định thể tích V_0 , người ta thường cho qua cột một chất có khối lượng phân tử lớn, trơ. Chất màu xanh Dextran 2000 có khối lượng $M = 2 \cdot 10^6$ thường được dùng cho mục đích này.

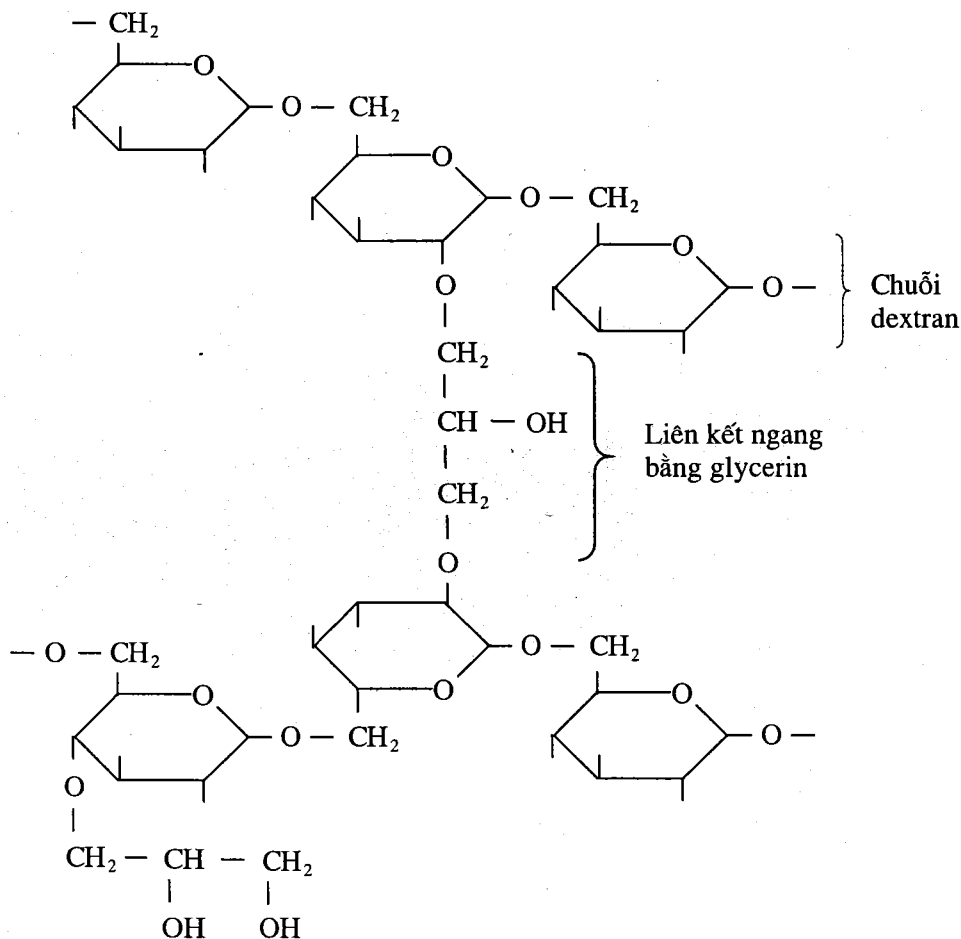
❶ Các loại gel thường dùng:

Trong sắc ký điều chế loại phân tử hai polymer thường dùng là polysaccharid và polyacrylamid.

– Polysaccharid:

Thường dùng cellulose và dextran, là polymer của D - glucose. Để tạo lỗ xốp có kích thước khác nhau, người ta dùng các chất khác nhau để liên kết các chuỗi polysaccharid. Hình 10.20 vẽ sơ đồ liên kết của sephadex - các chuỗi dextran liên kết với nhau bằng glycerin - một sản phẩm thương mại do hãng Pharmacia Fine Chemical Co sản xuất.

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ



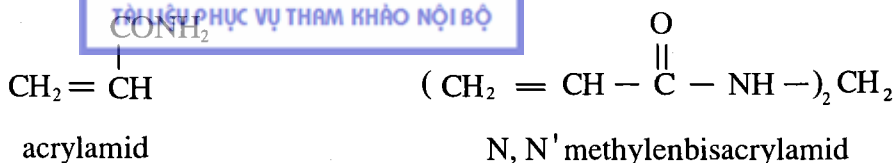
Hình 10.20. Phân tử sephadex: các chuỗi dextran kết nối với nhau bằng phân tử glycerin.

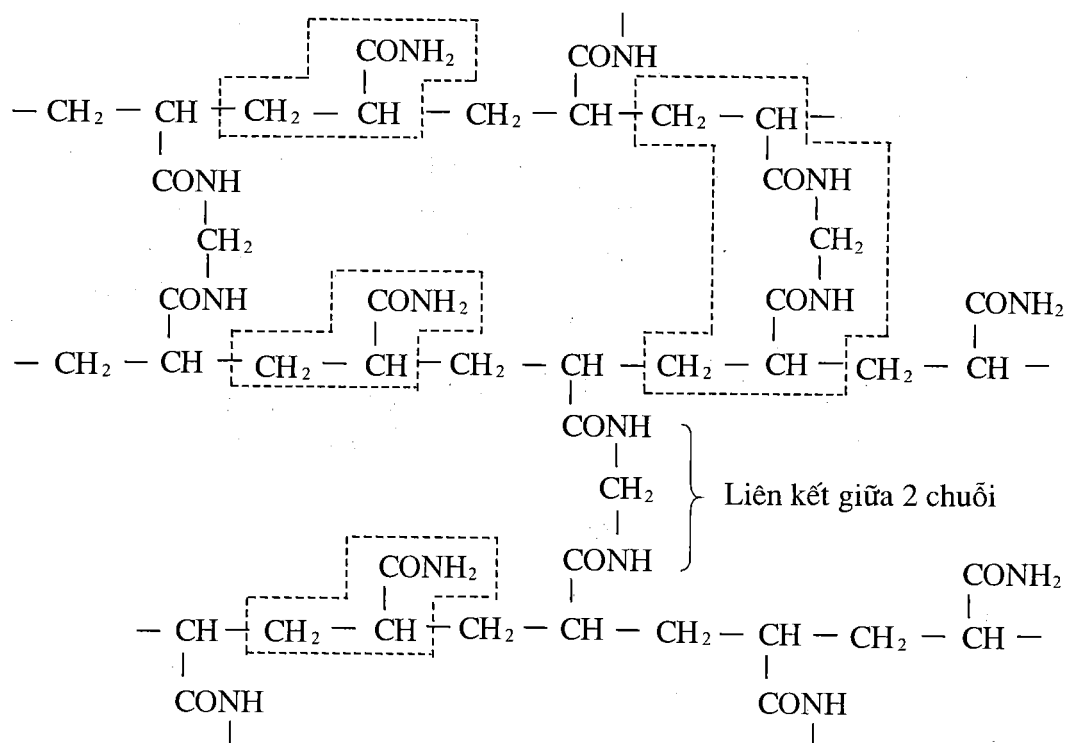
Tương tự như copolymer SDB, các nhóm OH trong polysaccharid trên có thể liên kết với các nhóm chức khác nhau như: $-(RH_2)_3-SO_3H$, $-CH_2COOH$, $-CH_2N^+(CH_3)_3$,... sẽ tạo ra các chất trao đổi ion.

Khi dùng cho sắc ký trên gel, tùy loại sephadex ta có các phân đoạn khác nhau của khối lượng phân tử M từ 700 đến 4 triệu (bảng 10.7)

– Polyacrylamid:

Chuỗi polyacrylamid được liên kết với nhau bằng phân tử N, N' methylenbisacrylamid.





Hình 10.21. Cấu trúc của polyacrylamid.

Sản phẩm Bio-gel do hãng Bio-Rad Laboratories sản xuất cho sắc ký lọc gel có phân đoạn khối lượng M rất khác nhau: từ 100 đến 150 triệu (bảng 10.7).

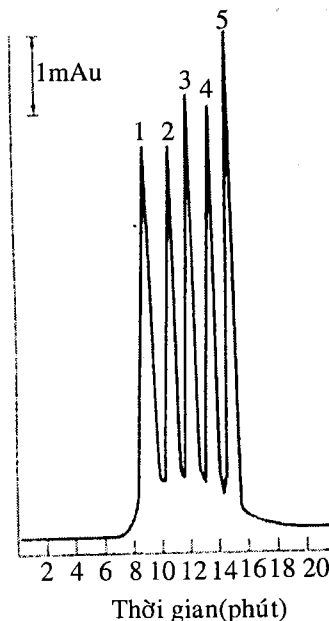
Trong sắc ký lỏng phân tích loại cỡ thường dùng các hạt hình cầu polystyren với kích thước lỗ xốp dao động trong khoảng từ 5 đến hàng trăm nm, hoặc hạt silica kích thước lỗ $13 \div 100$ nm.

③ Ứng dụng:

Lọc gel được dùng chủ yếu để tách các chất có khối lượng phân tử M rất khác nhau. Với mỗi pha tĩnh có sự phụ thuộc tuyến tính giữa $\lg M$ và thể tích lưu V_R trong một khoảng nhất định. Có thể đánh giá M của chất phân tích bằng cách so sánh thể tích lưu của nó với thể tích lưu của chất chuẩn.

Hình 10.22 là sắc ký đồ tách 5 enzym có khối lượng M khác nhau bằng sắc ký loại cỡ trên cột silica TSK 3000 SW, đo ở 280 nm.

1. Glutamat dehydrogenase: (290.000)
 2. Lactat dehydrogenase: (140.000)
 3. Erolase kinase: (67.000)
 4. Adenylat kinase: (32.000)
 5. Cytochrom C: (12.400)
- (Số trong ngoặc là khối lượng phân tử tương ứng).



Hình 10.22. Sắc ký đồ 5 protein bằng sắc ký loại phân tử.

Bảng 10.7. Pha tĩnh cho sắc ký điều chế trên gel.

Tên	Phân đoạn khối lượng M cho protein	Tên	Phân đoạn khối lượng M cho protein
Sephadex G - 10	đến 700	Bio-gel P - 2	100 - 1.800
Sephadex G - 15	đến 1.500	Bio-gel P - 4	800 - 4.000
Sephadex G - 25	1.000 - 5.000	Bio-gel P - 6	1.000 - 6.000
Sephadex G - 50	1.500 - 30.000	Bio-gel P - 10	1.500 - 20.000
Sephadex G - 75	3.000 - 80.000	Bio-gel P - 30	2.500 - 40.000
Sephadex G - 100	4.000 - 150.000	Bio-gel P - 60	3.000 - 60.000
Sephadex G - 150	5.000 - 300.000	Bio-gel P - 100	5.000 - 100.000
Sephadex G - 200	5.000 - 600.000	Bio-gel P - 150	15.000 - 150.000
Sephacryl S - 200	5.000 - 250.000	Bio-gel P - 200	30.000 - 200.000
Sephacryl S - 300	10.000 - 500.000	Bio-gel P - 300	60.000 - 400.000

Ghi chú: Sephadex và Sephacryl đều là sản phẩm của hãng Pharmacia Fine Chemical Co.

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

1.2.5. Sắc ký ái lực (affinity chromatography)

Sắc ký ái lực là một kỹ thuật sắc ký lỏng dùng một thuốc thử liên kết đặc biệt để làm sạch hoặc phân tích các thành phần trong hỗn hợp. Lưu giữ chất phân tích là do tương tác thuận nghịch và chọn lọc của các cặp có trong cơ thể

sống như: kháng nguyên - kháng thể, enzym - cơ chất, hormon - receptor... Để thực hiện sắc ký ái lực, người ta cố định một thành phần của cặp trên một chất mang rắn làm pha tĩnh đưa vào cột. Thành phần được cố định ở pha tĩnh được gọi là *phối tử ái lực* (affinity ligand). Mẫu phân tích có thành phần thứ hai được đưa vào cột nhờ một pha động. Pha động thường có pH xác định, lực ion và thành phần dung môi phù hợp, được gọi là *dung dịch đệm liên kết* (application buffer). Khi mẫu phân tích qua cột các thành phần khác do khuếch tán dễ dàng nên được rửa giải vào *pic các chất không lưu giữ*. Chỉ có tương tác đặc hiệu giữa 2 thành phần của cặp xảy ra: tạo liên kết giữa thành phần chọn lọc và phối tử ái lực trong cột. Nhờ một *dung dịch đệm rửa giải* phá vỡ liên kết trên và đưa thành phần chọn lọc ra khỏi cột. Phát hiện và định lượng nhờ một detector thích hợp.

❶ *Phối tử ái lực:*

Điểm mấu chốt quyết định thành công của kỹ thuật tách ái lực là phối tử được cố định trên pha tĩnh. Bảng 10.8 thống kê một số phối tử thường dùng. Nhiều chất có nguồn gốc sinh học, chỉ liên kết với một hoặc một vài phân tử có cấu trúc rất gần nhau. Chúng được gọi là *phối tử có tính đặc hiệu cao* (high - specificity ligands).

Bảng 10.8. Một số phối tử dùng trong sắc ký ái lực.

Phối tử	Chất liên kết
1. <i>Phối tử nguồn gốc sinh học</i> - Kháng thể - Chất ức chế, cơ chất, cofactor, coenzym - Các chất lecitin - Protein A/ protein G	- Kháng nguyên (thuốc, hormon, protein...) - Enzym - Đường, glucoprotein, glucolipid - Kháng thể
2. <i>Phối tử hóa học</i> - Boronat - Chất màu triazin - Phức cang của kim loại	- Đường, glucoprotein, các hợp chất diol - Protein có liên kết nucleotid, các enzym - Acid amin, peptid, protein

❷ *Các chất mang:*

Các chất mang được dùng để cố định *phối tử ái lực* làm pha tĩnh cho cột sắc ký. Yêu cầu đối với chất mang:

- Không có liên kết đặc hiệu với các thành phần trong mẫu, nhưng dễ điều chỉnh liên kết với phối tử.
- Ổn định trong điều kiện sắc ký (áp suất, tốc độ dòng, dung môi...),
- Dễ kiểm, dễ sử dụng khi triển khai sắc ký.

Bảng 10.9 giới thiệu một số chất mang hiện có trên thị trường.



Bảng 10.9. Một số chất mang cho sắc ký ái lực.

Loại nguyên liệu	Tên thương mại (nhà cung cấp)
1. Carbohydrat - Agarose và Agarose liên kết - Cellulose và cellulose biến tính	Affinica Agarose (Shleicher & Schull) Avid Gel Ax (BioProbe) Bio - Gel A, Affi - Gels (BioRad) Sepharose Fast Flow (Pharmacia LKB) Nagel Affinity Matrix (Nalge) Generic brands (BioRad, Sigma)
2. Chất vô cơ: Silica	AvidGel CPG (BioProbe) Protein - Pak Affinity Packing (Waters)
3. Chất hữu cơ tổng hợp - Copolymer Agarose - acrylamid - Copolymer Dextran - acrylamid - Dẫn chất polyacrylamid - Dẫn chất polymethacrylat	Ultrogel AcA, Magnogel AcA (IBF) Sephacryl (Pharmacia LKB) AvidGel T (BioProbe), Bio - Gel P, Affi-Gels (BioRad) AvidGel F (BioProbe), Eupergit (Richard Sci), Hema-AFC (Alltech)

Có nhiều kỹ thuật khác nhau để gắn kết phối tử ái lực trên chất mang. Phần lớn dựa vào các nhóm chức có mặt trong phối tử (amin, aldehyd, hydroxy của carboxylat...) để tạo liên kết bền vững dùng làm pha tĩnh cho sắc ký.

❸ Các loại hình sắc ký ái lực:

- **Sắc ký ái lực sinh học** (Bioaffinity Chromatography):

Loại hình này được nghiên cứu và triển khai đầu tiên trong sắc ký ái lực. Năm 1910 Starkenstein đã dùng tinh bột để tinh chế enzym α - amylase. Đây là công trình đầu tiên áp dụng sắc ký ái lực sinh học - kỹ thuật này hiện vẫn có ý nghĩa rất quan trọng trong tinh chế enzym. Ví dụ:

- + Dùng nucleotid mono-, di- và triphosphat để tinh chế các enzym kinase.
- + Dùng pyridoxal phosphat để tách tyrosin và aspartat aminotransferase.
- + Dùng RNA và DNA tinh chế polymerase và nuclease.

Cho đến nay đã thống kê được khoảng 300 qui trình áp dụng thực tế thuộc loại này.

- **Sắc ký ái lực miễn dịch** (Immunoaffinity chromatography):

Trong sắc ký này phối tử là kháng thể hoặc kháng nguyên. Đây là một loại hình của sắc ký ái lực sinh học. Do tính đặc hiệu cao của tương tác kháng thể - kháng nguyên và khả năng tạo kháng thể của nhiều loại chất đã làm cho loại hình sắc ký này trở thành một công cụ phổ biến và quan trọng trong tinh chế và phân tích các chất có nguồn gốc sinh học, cho nên được xếp riêng thành một mục.

Trước đây, người ta chủ yếu dùng các chất mang như agarose có hoạt tính thấp để tinh chế sản phẩm. Gần đây với nhiều chất mang hoàn thiện hơn (dẫn chất silica, thủy tinh...) cùng với các phối tử là kháng nguyên hoặc kháng thể đã hình thành *sắc ký ái lực miễn dịch hiệu năng cao*. Nó được sử dụng nhiều để định lượng các chất trong công nghệ sinh học, hóa lâm sàng, nghiên cứu phát triển thuốc.

– *Sắc ký ái lực phối tử - phẩm màu* (Dye - Ligand Affinity chromatography):

Trong kỹ thuật này một chất phẩm tổng hợp loại triazin hoặc triphenylmethan được dùng làm phối tử ái lực. Nó liên kết với nucleotid hoặc các yếu tố liên quan cho nên có thể dùng để tinh chế enzym hoặc các phân tử sinh học khác. Hiện đã có trên 500 hợp chất được phân lập và tinh chế theo kỹ thuật này.

1.2.6. *Sắc ký các đồng phân quang học* (chiral chromatography)

Trong kỹ thuật này với mục đích là tách các đồng phân quang học (enantiomers), người ta dùng pha tĩnh là các chất có tính liên kết chọn lọc với các đồng phân này. Nhiều pha tĩnh đã được nghiên cứu triển khai, hiện đã có mặt trên thị trường. Phổ biến nhất là pha tĩnh silica có gắn hợp chất cyclodextrin. Năng lượng liên kết của cyclodextrin (liên kết hydro, liên kết π - π và tương tác lưỡng cực) với các đồng phân đối quang (enantiomers) khác nhau nên khả năng lưu giữ chúng trên pha tĩnh khác nhau. Vì vậy các đồng phân này sẽ cho thời gian lưu khác nhau khi rửa giải sắc ký. Độ phân giải của cột chịu ảnh hưởng nhiều của các thông số pha động như pH, lực ion, thành phần dung môi và nhiệt độ.

Tách các đồng phân quang học có ý nghĩa rất lớn trong nghiên cứu cũng như sản xuất thuốc. Tuy nhiên cột sắc ký chọn lọc đồng phân quang học đắt tiền, có hạn chế trong sử dụng. Hiện nay kỹ thuật điện di mao quản được sử dụng phổ biến hơn, kinh tế hơn.

1.3. Xu hướng nghiên cứu hiện đại trong sắc ký lỏng

Trong sắc ký lỏng cột chứa pha tĩnh là bộ phận trung tâm quyết định khả năng tách thông qua số đĩa lý thuyết N . Giá trị của nó tỷ lệ thuận với chiều dài L và tỷ lệ nghịch với đường kính hạt d_p .

Xu hướng nghiên cứu đầu tiên là giảm kích thước hạt. Ví dụ từ hạt 5 μm giảm xuống còn 1,7 μm (giảm 3 lần) thì:

- Số đĩa N tăng lên 3 lần,
- Độ phân giải sẽ tăng theo $\sqrt{N}$, tức là tăng 1,7 lần,
- Bề rộng của pic sắc ký sẽ giảm 1,7 lần.

Do giảm kích thước hạt, nên có đòi hỏi mới đối với thiết bị như: áp suất, hệ thu nhận và xử lý dữ liệu... Có thể tóm tắt một số đặc điểm của thế hệ sắc ký lỏng mới: sắc ký lỏng siêu hiệu năng UPLC (Ultra performance LC).



- Kích thước hạt pha tĩnh: 1,7 - 1,8 μm .
- Áp suất đầu vào có thể đến 15.000 psi (1064 bar).
- Thể tích hệ thống giảm tối thiểu: dùng cột nhỏ hơn, thể tích pha động ít hơn. Ví dụ: Cột của hãng Waters (Mỹ): 30 mm x 2,1 mm; hạt 1,7 μm .
- Lượng mẫu tiêm ít: chỉ 1 - 2 μL .
- Thời gian chạy sắc ký ngắn: 1 - 2 phút.

Do thời gian ngắn nên hệ thống sắc ký cần tái lập nhanh cân bằng, phần mềm thu nhận và xử lý số liệu đảm bảo sự hoàn thiện phù hợp.

Bên cạnh việc giảm kích thước hạt, hãng Agilent Technology (Mỹ) giảm cả đường kính cột để giảm tiếp thể tích của hệ thống, giảm thời gian phân tích, tăng độ nhạy của sắc ký. Dựa vào đường kính cột, phân ra 3 loại hình sắc ký phân tích bên cạnh sắc ký điều chế:

Bảng 10.10. Bốn loại hình sắc ký lỏng.

Loại hình sắc ký Thông số	Sắc ký lỏng mao quản	Vi sắc ký lỏng	Sắc ký lỏng truyền thống	Sắc ký lỏng điều chế
Đường kính trong cột (mm)	0,2 - 1,0	1,0 - 2,0	2,1- 4,6	≥ 22
Tốc độ dòng $\mu\text{L}/\text{phút}$	1,0	100	1 000	10.10^3
Kích thước hạt (μm)	1,5 - 5	1,5 - 5	3 - 10	

Gần đây, đã ra đời *sắc ký lỏng nano* với đường kính cột $< 0,2$ mm. Kỹ thuật sắc ký này thường gắn với khối phổ kèm chip sắc ký.

2. SẮC KÝ LỎNG SIÊU TỐI HẠN

(SFC: supercritical fluid chromatography)

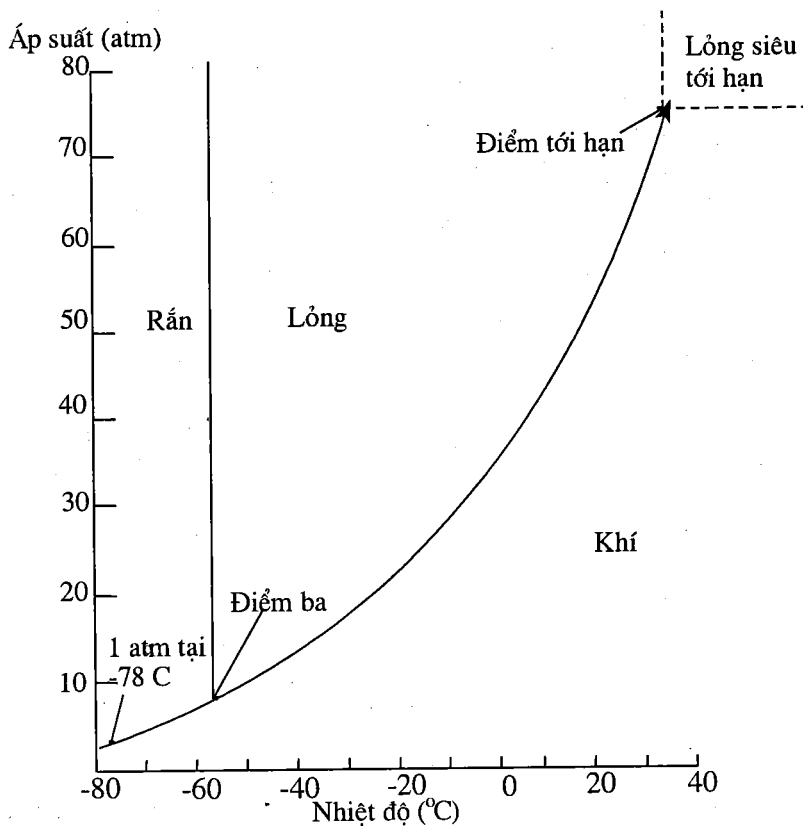
Đây là một kỹ thuật sắc ký trung gian giữa sắc ký lỏng và sắc ký khí bởi vì dung môi pha động là một chất lỏng siêu tới hạn.

2.1. Trạng thái siêu tới hạn

Khảo sát giản độ pha của khí CO_2 . Ở nhiệt độ - 78°C, CO_2 khí cân bằng với CO_2 rắn ở áp suất 1 atm. Chất rắn CO_2 thăng hoa chuyển sang chất khí không qua trạng thái lỏng.

Giản độ pha cho ta mối quan hệ của ba trạng thái vật lý (rắn, lỏng, khí) với nhiệt độ và áp suất của hệ.

Trên giản đồ hình thành 3 vùng riêng biệt thể hiện 3 trạng thái khí, lỏng và rắn của CO_2 .



Hình 10.23. Biểu đồ pha của khí CO₂

Ở điểm ba (triple point) ứng với $t^{\circ} = -56,6^{\circ}\text{C}$. Từ nhiệt độ này trở lên sẽ tồn tại áp suất tương ứng để tồn tại 2 pha lỏng và khí của CO₂. Ví dụ:

- Ở 0°C : Lỏng cân bằng với khí ở 34,4 atm.
- Ở $+31,3^{\circ}\text{C}$: Lỏng cân bằng với khí ở 72,9 atm.

Đây là điểm tới hạn (critical point)

Nếu nhiệt độ và áp suất của hệ vượt quá nhiệt độ và áp suất tới hạn tương ứng thì chỉ tồn tại một pha: Đây là pha lỏng siêu tới hạn.

Bảng 10.11 cho ta nhiệt độ và áp suất tới hạn của một số hợp chất.

Bảng 10.11. Điểm tới hạn của một số chất.

Hợp chất	Nhiệt độ tới hạn ($^{\circ}\text{C}$)	Áp suất tới hạn (atm)	Tỷ trọng tới hạn g/cm ³
Carbon dioxyd	31,3	72,9	0,448
Amoniac	132,3	111,3	0,24
Nước	374,4	226,8	0,344
Methanol	240,5	78,9	0,272
Dietyl ether	193,6	36,3	0,267

2.2. Một số đặc điểm của chất lỏng siêu tới hạn

Trạng thái siêu tới hạn của một chất có một số đặc điểm vật lý khác với đặc điểm của nó ở trạng thái khí hoặc lỏng.

- Tỷ trọng: Chất lỏng siêu tới hạn có tỷ trọng dao động từ 0,2÷0,5g/cm³. Có thể hòa tan được các chất không bay hơi. Ví dụ, CO₂ lỏng siêu tới hạn có thể hòa tan được:
 - + Alkan mạch thẳng có 5 → 22 nguyên tử carbon,
 - + Di n - alkylphthalat trong đó nhóm alkyl có 4 - 16 carbon,
 - + Một số hợp chất đa vòng thơm (pyren, biphenyl...).
- Hệ số khuếch tán của chất phân tích trong chất lỏng siêu tới hạn thường tăng lên (vài chục lần trở lên) so với trong chất lỏng.

Bảng 10.12 minh họa một số tính chất vật lý của ba trạng thái: khí, lỏng và lỏng siêu tới hạn.

Bảng 10.12. Một số tính chất của ba trạng thái

Tính chất \ Trạng thái	Khí	Lỏng siêu tới hạn	Lỏng
Tỷ trọng (g/cm ³)	(0,6 ÷ 2).10 ⁻³	0,2 ÷ 0,5	0,6 ÷ 1,6
Hệ số khuếch tán (cm ² /sec)	(1 ÷ 4).10 ⁻¹	10 ⁻³ ÷ 10 ⁻⁴	(0,2 ÷ 2).10 ⁻⁵
Độ nhớt [g/(cm.sec)]	(1 ÷ 3).10 ⁻⁴	(1 ÷ 3).10 ⁻⁴	(0,2 ÷ 3).10 ⁻²

- Nhiệt độ tới hạn của một số chất lỏng dùng trong sắc ký dao động trong một khoảng rộng: 30°C ÷ 200°C. Trong số đó một số chất có nhiệt độ và áp suất tới hạn nằm trong điều kiện vận hành của thiết bị sắc ký lỏng.

2.3. Máy sắc ký lỏng siêu tới hạn

Máy sắc ký lỏng siêu tới hạn có thiết kế tương tự HPLC ngoại trừ có thêm bộ phận đo và kiểm soát áp suất của cột. Từ giữa những năm 80 của thế kỷ trước đã có thiết bị sắc ký lỏng siêu tới hạn trên thị trường.

Có thể thay đổi tỷ trọng của chất lỏng siêu tới hạn bằng cách thay đổi áp suất. Tỷ trọng của chúng tăng nhanh và không tuyến tính với tăng áp suất. Người ta điều chỉnh tăng áp suất để tăng tỷ trọng chất lỏng siêu tới hạn, dẫn đến tăng sức rửa giải, giảm thời gian sắc ký. Chính vì vậy hệ bơm pha động cần đảm bảo tốc độ dòng không đổi, sự dao động áp suất cần phải giảm đến mức cực tiểu.

Có thể điều chỉnh quá trình rửa giải của sắc ký lỏng siêu tới hạn tương tự chương trình gradient nhiệt độ trong sắc ký khí và chương trình dung môi trong HPLC.

2.3.1. Cột

Thường dùng cột FSOT tương tự trong sắc ký khí. Chiều dài có thể $10 \div 20$ m, đường kính trong $50 \div 100 \mu\text{m}$.

Có thể dùng cột bao polysiloxan liên kết hóa học với thành trong mao quản. Bề dày lớp film $0,05 \div 4 \mu\text{m}$.

2.3.2. Pha động

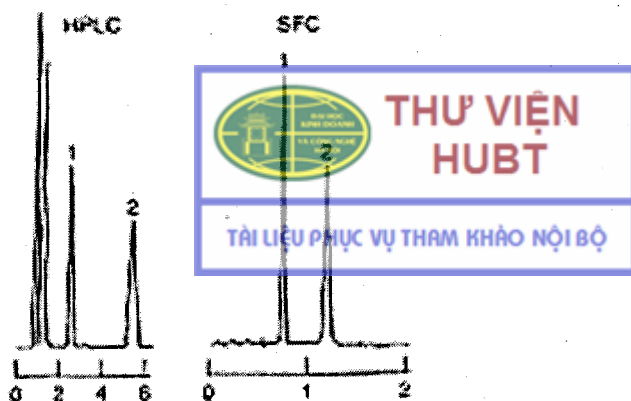
- Thường dùng nhất là carbon dioxyd. Có thể dùng làm dung môi cho nhiều chất hữu cơ. Hơn nữa, đó là một dung môi khá rẻ, không độc, có nhiệt độ và áp suất tối hạn thấp cho phép ta lựa chọn nhiệt độ và áp suất cho sắc ký trong một khoảng rộng. Do CO_2 hòa tan ít các chất phân cực mạnh, nên người ta đưa thêm một tỷ lệ nhỏ ($\approx 1\%$) một dung môi phân cực như methanol, 2 - propanol hoặc acetonitril. Thành phần, áp suất (tỷ trọng), nhiệt độ và tốc độ dòng của pha động cần giữ không đổi trong quá trình sắc ký.
- Ngoài CO_2 người ta còn dùng một số dung môi khác làm pha động cho sắc ký lỏng siêu tới hạn như: ethan, pentan, diethylether và tetrahydrofuran.

2.3.3. Detector

Thường dùng detector vạn năng của GC cho SFC. Thuận tiện nhất là detector ion hóa ngọn lửa. Ngoài ra còn có thể dùng detector UV-VIS, ELSD và TCD.

2.4. Ứng dụng của SFC

Trạng thái lỏng siêu tới hạn là trạng thái trung gian giữa lỏng và khí. Vì vậy SFC là một kỹ thuật kết hợp một số đặc điểm của cả sắc ký lỏng và sắc ký khí. Tương tự sắc ký khí, SFC diễn ra nhanh hơn LC vì độ nhớt thấp hơn, tốc độ khuếch tán cao hơn trong pha động. Hình 10.24 so sánh sắc ký đồ của phân tích hai chất bằng HPLC và SFC:



Hình 10.24. Sắc ký đồ của biphenyl (1) và terphenyl (2) dùng SFC và HPLC.

- SFC: Cột liên kết pha đảo 200 x 4,6 mm, 10 μ m. Pha động CO₂, tốc độ dòng 5,4 mL/ phút, lượng mẫu 3 μ L.
- HPLC: Pha động CH₃COOH:H₂O (65 - 35). Tốc độ dòng 4 mL/phút, lượng mẫu 10 μ L.

Chất phân tích là biphenyl (1) và terphenyl (2). Sắc ký đồ cho ta thấy SFC diễn ra nhanh hơn, do thời gian lưu ngắn hơn nhiều so với HPLC.

Trong thực tế, SFC được dùng để phân tích các chất không thực hiện được bằng HPLC hoặc GC. Đó là các chất không bay hơi, không bền với nhiệt như các sản phẩm chưng cất của than đá, dầu mỏ. Việc tách định lượng các chất này được thực hiện ở nhiệt độ dưới 100°C.

Điều cần ghi nhận là cột sắc ký lỏng siêu tới hạn dễ kết nối hơn nhiều với máy khối phổ so với cột HPLC.

3. SẮC KÝ LỚP MỎNG (TLC: Thin - Layer Chromatography)

Có nhiều điểm tương đồng về pha tĩnh, pha động và ứng dụng của TLC với LC. Ưu điểm chính của kỹ thuật này là thực hiện nhanh, chi phí ít nên được sử dụng phổ biến để nghiên cứu, sàng lọc trong phòng thí nghiệm hóa học, hóa sinh hoặc lâm sàng.

3.1. Nguyên tắc của TLC

Quá trình tách bằng TLC được thực hiện trên một lớp mỏng gồm các hạt kích thước đồng nhất được kết dính trên một giá đỡ bằng thủy tinh, nhôm hoặc chất dẻo. Lớp mỏng kết dính là pha tĩnh. Các hạt trong pha tĩnh làm nhiệm vụ tách có thể theo cơ chế: phân bố, hấp phụ, trao đổi ion... Pha động cũng là những hệ tương tự như trong HPLC.

Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của các chất phân tích là *hệ số lưu giữ* R_f. Trị số của nó được tính bằng tỷ lệ giữa khoảng cách di chuyển của chất phân tích và khoảng cách dịch chuyển của pha động:

$$R_f = \frac{d_R}{d_M} \quad (10.5)$$

Trong đó:

d_R : Khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm vết phân tích (cm),

d_M : Khoảng cách từ điểm xuất phát đến mức dung môi pha động (đo trên cùng đường đi của vết, tính bằng cm),

R_f có giá trị dao động giữa 0 và 1.

3.2. Pha tĩnh của TLC

Pha tĩnh của TLC là các hạt có kích thước 10 - 30 μ m được rải đều và kết dính thành lớp mỏng đồng nhất dày khoảng 250 μ m trên giá đỡ hình vuông. Bản mỏng có sẵn trên thị trường có kích thước khác nhau thường 5÷20cm,

thường khi có đưa thêm các chất phát huỳnh quang không tan vào pha tĩnh để dễ phát hiện chất phân tích.

Bảng 10.13 tóm tắt một số chất thường dùng làm pha tĩnh cho TLC kèm theo cơ chế sắc ký và ứng dụng. Phổ biến nhất là silica (SiO_2) và alumina (Al_2O_3).

Bảng 10.13. Một số chất làm pha tĩnh cho TLC

Pha tĩnh	Cơ chế sắc ký	Ứng dụng phân tích
Silica	Hấp phụ	Acid amin, hydrocarbon, alcaloid, vitamin
Dẫn chất siloxan	Phân bố	Các chất ít phân cực
Cellulose	Phân bố	Acid amin, carbohydrat, nucleotid
Alumina	Hấp phụ	Hydrocarbon, alcaloid, chất màu thực phẩm, lipid
Cát biển	Phân bố	Đường, acid béo
Cellulose trao đổi ion	Trao đổi ion	Acid nucleic, nucleotid, ion kim loại, halogenid
Gel sephadex	Loại cỡ	Polymer, protein, phức kim loại

Nếu không có bản mỏng tráng sẵn, có thể tự chuẩn bị bản mỏng với dụng cụ đơn giản và hóa chất phù hợp.

3.3. Pha động

Pha động cho TLC rất thay đổi tùy thuộc vào cơ chế sắc ký (bảng 10.13). Để tăng cường sức rửa giải, thường kết hợp 2 dung môi. Nguyên lý chia tách dựa vào hệ số phân bố giữa hai pha. Tuy nhiên lựa chọn tối ưu hóa sắc ký thường dựa chủ yếu vào kinh nghiệm. Sau đây là một số gợi ý chung nhất cho pha động TLC:

- Dung môi cần có độ tinh khiết cao.
- Cần điều chỉnh sức rửa giải của pha động để trị số R_f nằm trong khoảng $0,2 \div 0,8$ đạt độ phân giải cực trị.
- Chất phân tích dạng ion hay phân cực được rửa giải tốt bằng dung môi phân cực như hỗn hợp n - butanol - nước. Thêm một ít acid acetic hoặc amoniac vào nước sẽ làm tăng độ tan của base hoặc acid tương ứng.
- Khi dùng silicagel hoặc các chất hấp phụ phân cực khác, độ phân cực của pha động sẽ quyết định tốc độ di chuyển của chất phân tích và trị số R_f của chúng. Nếu thêm một ít dung môi ít phân cực như ether ethylic vào dung môi không phân cực như methylbenzen sẽ làm tăng đáng kể trị số R_f .
- Sức rửa giải của dung môi trong sắc ký lỏng hấp phụ (bảng 10.5) hoàn toàn có thể sử dụng cho TLC với pha tĩnh là silica hoặc alumina.

3.4. Kỹ thuật TLC

Bản sắc ký thường có kích thước khác nhau. Hai loại thông dụng là 5×20 cm và 20×20 cm. Sau khi chọn bản mỏng phù hợp, thực hành TLC gồm có 4 bước sau:

- Đưa mẫu phân tích lên bản mỏng.
- Khai triển sắc ký với pha động phù hợp.
- Phát hiện các vết trên sắc ký đồ.
- Thu nhận và xử lý số liệu thực nghiệm.

3.4.1. Đưa chất phân tích lên bản mỏng

Lượng hỗn hợp các chất đưa lên bản mỏng có ý nghĩa rất quan trọng đối với hiệu quả tách sắc ký, ảnh hưởng đến trị số R_f . Nếu lượng chất quá lớn, vết sắc ký lớn và kéo dài, khi đó các vết có trị số R_f gần nhau sẽ chồng lên nhau không tách riêng được. Nếu lượng quá nhỏ có thể không phát hiện được vết (do thuốc thử không đủ độ nhạy).

Lượng mẫu đưa lên bản mỏng khoảng $0,1 - 50 \mu\text{g}$ được pha trong dung môi thích hợp (ether, cloroform, nước,...). Thể tích dung dịch chấm $1 \div 5 \mu\text{L}$ đối với sắc ký phân tích và $0,1 - 0,2 \text{ mL}$ đối với sắc ký điều chế.

Đường xuất phát (để chấm sắc ký) cách mép dưới bản mỏng khoảng $1,5 \div 2,0 \text{ cm}$ và cách bề mặt pha động $0,8 \div 1,0 \text{ cm}$. Các vết chấm phải nhỏ, đường kính $2 - 6 \text{ mm}$ và cách nhau khoảng 15 mm . Các vết ở bìa phải cách bờ khoảng 1 cm . Trong trường hợp bản định lượng phải dùng mao quản định mức chính xác vì độ tin cậy của kết quả phụ thuộc vào lượng chất phân tích đưa lên bản mỏng.

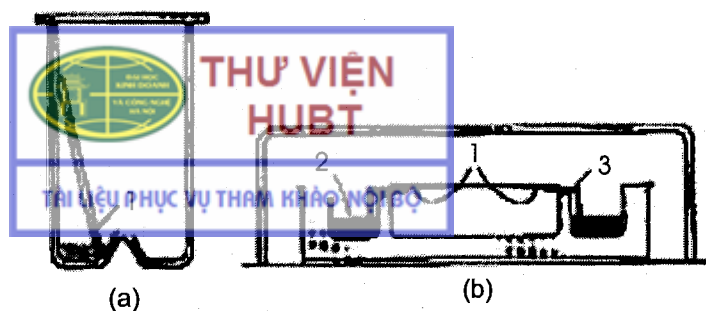
3.4.2. Khai triển sắc ký

Thiết bị khai triển sắc ký thường là bình thủy tinh có nắp đậy kín, kích thước phù hợp với bản mỏng (thường cao hơn bản mỏng $4 - 5 \text{ cm}$). Để tăng độ bão hòa dung môi pha động trong bình (nhất là đối với dung môi có độ nhớt cao, khó bay hơi) người ta đặt một tờ giấy lọc áp sát thành bình.

Sau khi chấm mẫu sắc ký, bản đã khô (đã bay hết dung môi) được cho vào bình sắc ký đã bão hòa pha động. Mép dưới bản mỏng được nhúng vào pha động nhưng vết chấm còn cách bề mặt pha động khoảng 1 cm .

Có nhiều cách khai triển sắc ký, nhưng thường gặp 3 cách:

❶ Sắc ký lên (hình 10.25a)



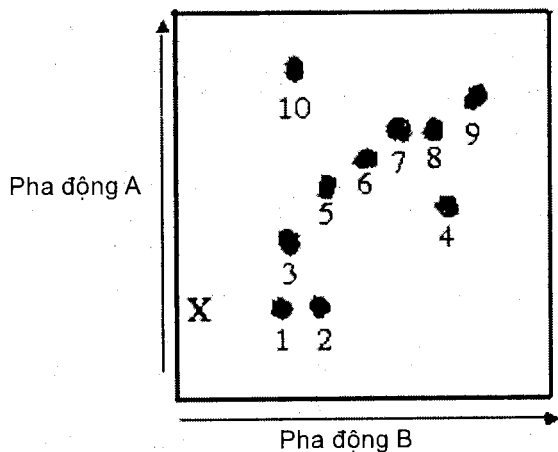
Hình 10.25. Hai kiểu khai triển sắc ký lớp mỏng.

a) Sắc ký lên

b) Sắc ký ngang

② **Sắc ký ngang** (hình 10.25b): Mẫu phân tích được đưa lên ở hai bờ đối diện (1) của bản mỏng, pha động (2) từ hai phía chạy vào giữa bản. Có bậc (3) để dẫn pha động đi vào bản mỏng.

③ **Sắc ký hai chiều**: Trong trường hợp này bản mỏng hình vuông, vết chấm sắc ký ở một góc bản mỏng (dấu x ở hình 10.26). Đầu tiên chạy sắc ký với pha động A, làm khô bản mỏng, quay 90° chạy với pha động B. Làm khô bản mỏng. Ở đây mẫu acid amin nên phun thuốc thử Ninhydrin để phát hiện vết trên sắc ký đồ.



Hình 10.26. Sắc ký lớp mỏng hai chiều các acid amin

Bản mỏng silicagel.

Pha động A: Toluene - cloroetanol - pyridin.

Pha động B: Cloroform - alcol benzylic - acid acetic.

Có 10 vết acid amin hiện trên sắc ký đồ.

3.4.3. Phát hiện vết trên sắc ký đồ

Dựa vào tính chất lý hóa khác nhau của chất phân tích để lựa chọn cách phát hiện thích hợp các vết sắc ký.

Sau đây là một số kỹ thuật thường gặp:

– *Phun thuốc thử hiện màu:*

Dùng thuốc thử tạo màu với chất phân tích. Đôi khi người ta làm nóng bản mỏng để tăng tốc độ phản ứng tạo màu và cường độ vết màu. Bảng 10.14 tóm tắt một số thuốc thử tạo màu trong TLC.



Bảng 10.14. Một số thuốc thử tạo màu trong TLC.

Thuốc thử	Màu của vết	Ứng dụng phân tích
1. Thuốc thử chung - Acid phosphomolybdic - Acid sulfuric đặc - Hơi iod	Xanh tối Nâu - đen Nâu	Nhiều chất hữu cơ Tất cả các chất hữu cơ Nhiều chất hữu cơ
2. Thuốc thử chọn lọc - Ninhydrin - 2,4 - dinitrophenylhydrazon - Xanh hoặc lục bromocresol - 2,7 Fluorescein - Vanilin/acid sulfuric - Rhodamin B - Anisaldehyd/ SbCl_3 - Diphenylamin/ Zn^{2+}	Hồng - tím Da cam, đỏ Vàng Vàng - lục Xanh - lục - hồng Huỳnh quang đỏ Nhiều màu Nhiều màu	Acid amin, các nhóm chức amin Các hợp chất carbonyl Các acid hữu cơ Nhiều chất hữu cơ Alcol, ceton Các chất lipid Các chất steroid Các chất bảo vệ thực vật

– Soi dưới đèn U.V:

Nhiều vết chất hữu cơ trên sắc ký đồ trở nên tối hoặc phát quang sáng khi soi dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm hoặc 366 nm. Một số bản trắng sẵn có chất phát quang không tan đưa vào pha tĩnh nên phát huỳnh quang.

– Dùng densitometer:

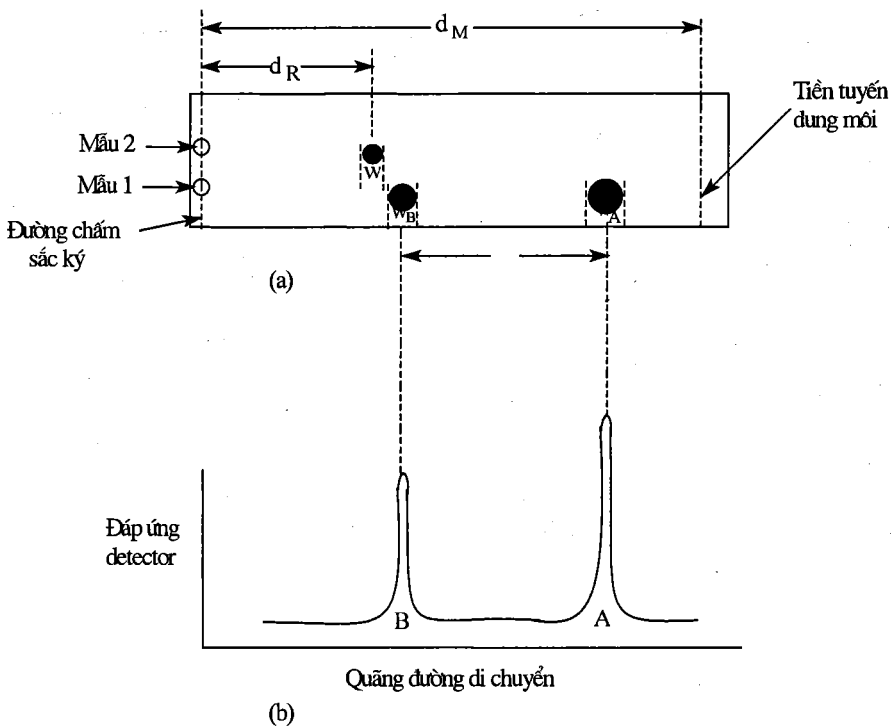
Thiết bị này đo cường độ tia phản xạ từ bề mặt bản mỏng khi soi dưới đèn UV - VIS. Chất phân tích hấp thụ bức xạ được ghi lại thành pic sắc ký.

3.5. Vài thông số đặc trưng của TLC

Các thông số đặc trưng cho sắc ký (mục 8.2) có thể áp dụng cho TLC với một vài thay đổi cho phù hợp.

3.5.1. Hệ số dung lượng

Hình 10.27 minh họa sắc ký bản mỏng và sắc ký đồ của 2 chất A và B từ hai mẫu phân tích S_1 và S_2 .



Hình 10.27. Sắc ký đồ lớp mỏng.

Quãng đường di chuyển của chất trong S_2 là d_R và của dung môi là d_M . Ở đây t_M và t_R là thời gian tương ứng để pha động và chất tan di chuyển được một quãng đường là d_R . Thời gian chất tan lưu giữ trong pha động bằng quãng đường d_R chia cho tốc độ thẳng của pha động u :

$$t_M = \frac{d_R}{u} \quad (10.6)$$

Chất tan không đạt đến tiền tuyến dung môi, nhưng thời gian di chuyển của chất tan sẽ là:

$$t_R = \frac{d_M}{u} \quad (10.7)$$

Thay thế hai phương trình (10.6) và (10.7) vào phương trình (8.10) ta có:

$$k' = \frac{d_M - d_R}{d_R} \quad (10.8)$$

Có thể biểu thị k' theo hệ số R_f (phương trình 10.5), bằng cách chia cả tử và mẫu số của phương trình (10.8) cho d_M :

$$k' = \frac{1 - d_R/d_M}{d_R/d_M} = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (10.9)$$

3.5.2. Chiều cao đĩa H

Theo hình 10.27 số đĩa lý thuyết N là:

$$N = \left(\frac{d_R}{W} \right)^2 \quad (10.10)$$

W là đường kính của vết sắc ký.

Chiều cao đĩa H là:

$$H = \frac{d_R}{N} = \frac{W^2}{16 d_R} \quad (10.11)$$

3.6. Ứng dụng của TLC

TLC là một kỹ thuật được sử dụng trong nhiều lĩnh vực hóa học, dược phẩm, hoá sinh, lâm sàng vào 3 mục đích sau:

3.6.1. Định tính

Thường dựa vào trị số R_f của mẫu thử và mẫu chuẩn chạy sắc ký trong cùng điều kiện. Đôi khi do sắc ký liên tục không xác định được tuyến dung môi pha động, người ta dùng hệ số lưu giữ tương đối R_r để đặc trưng cho chất phân tích:

$$R_r = \frac{d_{R,x}}{d_{R,c}} \quad (10.12)$$

$d_{R,x}$: Đường đi của chất phân tích (cm),

$d_{R,c}$: Đường đi của chất chuẩn (cm),

R_r càng gần 1 chất phân tích và chất chuẩn càng đồng nhất.

3.6.2. Thử tinh khiết

Dùng TLC để kiểm tra mức độ tinh khiết của các hợp chất thể hiện ở các vết lặn trên sắc ký đồ. Trong các Dược điển thường qui định kiểm tra tạp chất có mặt trong dược chất bằng sắc ký lớp mỏng.

3.6.3. Định lượng

Có hai cách để định lượng các chất trong vết sắc ký:

- Tách chiết chất phân tích trong vết sắc ký bằng dung môi thích hợp. Sau khi làm sạch dịch chiết, định lượng chất phân tích bằng một kỹ thuật thích hợp (phổ hấp thụ, huỳnh quang, cực phổ...). Phương pháp này hiện nay ít dùng vì có nhiều trở ngại, lại mất nhiều thời gian.
- Định lượng trực tiếp trên bản mỏng:

Đo diện tích hay cường độ màu của vết sắc ký. Hiện nay dùng 2 kỹ thuật:

- Densitometer: chiếu chùm tia vào vết sắc ký và đo cường độ hấp thụ hoặc huỳnh quang.

- Xử lý ảnh với camera kỹ thuật số:

Quét bản mỏng với hệ thống phân tích hình ảnh, nhất là camera kỹ thuật số có độ phân giải cao để thu nhận hình ảnh của vết sắc ký. Xử lý dữ liệu ảnh bằng máy tính.

Hiện nay để tăng độ tin cậy của kết quả phân tích, người ta đưa vào thị trường bản mỏng hiệu năng cao (high - performance plates). Bản này được tráng lớp pha tĩnh mỏng hơn (dày khoảng 100 μm) với bột mịn có kích thước hạt 5 μm độ đồng đều cao hơn. Khi dùng bản mỏng này, độ nhạy và độ phân giải được tăng cường bởi vì:

- Vết sắc ký nhỏ hơn,
- Thời gian sắc ký ngắn hơn,
- Lượng dung môi dùng ít hơn.

Pha tĩnh dùng silica và pha liên kết siloxan cho sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) có sẵn trên thị trường. Tuy vậy trong kỹ thuật này - kể cả HPTLC - sai số của phương pháp dao động trong khoảng 5 - 10%. Nguồn sai số chủ yếu ở khâu đưa mẫu lên bản mỏng.

3.7. Đánh giá TLC

3.7.1. TLC có một số ưu điểm so với GC và HPLC

- Thiết bị đơn giản, chi phí thấp, thực hiện nhanh,
- Phát hiện được tất cả các chất kể cả các chất không di chuyển theo pha động (nằm ở điểm xuất phát).
- Thực hiện tách dễ dàng các mẫu có nhiều thành phần: Có thể thực hiện sắc ký đồng thời 10 - 20 mẫu hoặc hơn, so sánh trực tiếp mẫu thử với mẫu chuẩn.

3.7.2. Nhược điểm

- Độ lặp lại thấp của trị số R_f do thành phần pha động thay đổi trong quá trình khai triển sắc ký
- Tăng giãn rộng pic do khuếch tán vì tốc độ dòng pha động thấp.



TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Hoàng Minh Châu, Từ Văn Mặc, Từ Vọng Nghi (2002), *Cơ sở hoá học phân tích*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội; trang 341 - 376.
2. Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical Analysis*, 5th edition, W.H.Freeman and Company, New York, p.p 713 - 768.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 10.1. So sánh sắc ký cột cổ điển với sắc ký lỏng hiệu năng cao về nguyên lý tách, cột sắc ký và ứng dụng.
- 10.2. Giải thích nguyên tắc các kỹ thuật sắc ký sau:
- a) Khí lỏng
 - b) Lỏng phân bố
 - c) Lỏng hấp phụ
 - d) Lỏng siêu tới hạn
 - e) Lọc gel
 - f) Ái lực
- 10.3. Giải thích sắc ký pha thuận, sắc ký pha đảo. Cho ví dụ.
- 10.4. Khi sắc ký pha thuận cho biết thứ tự rửa giải của:
- a) n - hexan, n - hexanol, benzen
 - b) ethyl acetat, diethyl ether, nitrobutan
- 10.5. Nếu dùng sắc ký pha đảo thứ tự rửa giải sẽ như thế nào ở bài tập 10.4.
- 10.6. Cho biết sự khác nhau về tính chất và vai trò của pha động trong GC, HPLC và SFC. Sự khác nhau đó ảnh hưởng đến đặc trưng của 3 kỹ thuật trên.
- 10.7. Trình bày ưu điểm của loại cột vi sắc ký.
- 10.8. Giải thích nguyên tắc hoạt động của ba loại detector thường dùng trong HPLC: hấp thụ UV - VIS, huỳnh quang và điện hoá
- 10.9. Điểm khác nhau cơ bản giữa sắc ký lỏng phân bố và sắc ký hấp phụ là gì?
- 10.10. Điểm khác nhau cơ bản giữa sắc ký ion và sắc ký lọc gel?
- 10.11. Đặc điểm và ứng dụng của sắc ký ái lực.
- 10.12. Đặc điểm và ứng dụng của sắc ký lỏng siêu tới hạn.
- 10.13. Mô tả nguyên tắc hoạt động của 2 loại bơm trong HPLC.
- 10.14. Cho biết những ưu điểm của SFC so với:
- a) HPLC
 - b) GC
- 10.15. Hai chất A và B có thời gian lưu tương ứng là 16,40 và 17,63 phút. Chất không lưu giữ qua cột mất 1,30 phút. Bề rộng chân pic cho A là 1,11; cho B là 1,21 phút. Tính:
- a) Độ phân giải của cột
 - b) Số đĩa lý thuyết trung bình của cột, biết cột dài 30,0 cm
 - c) Chiều cao đĩa
 - d) Chiều dài của cột để đạt độ phân giải 1,5
 - e) Thời gian cần để rửa giải chất B ở cột dài hơn.

- 10.16. Giải thích và chỉ rõ thứ tự rửa giải khi tách pha thuận của:
- a) n - hexan, n - hexanol, benzen;
 - b) ethyl acetat, diethyl ether, nitromethan.
- 10.17. Nếu dùng kỹ thuật tách pha đảo thì thứ tự rửa giải ở bài 10.16 là thế nào? Giải thích.
- 10.18. Giải thích những ưu điểm của CO_2 siêu tới hạn khi được dùng làm pha động trong SFC.
- 10.19. Máy SFC có đặc điểm gì khác với máy GC và HPLC.
- 10.20. Đặc điểm nào của chất lỏng siêu tới hạn là quan trọng đối với sắc ký? Giải thích.
- 10.21. Với CO_2 siêu tới hạn, hãy cho biết tác động đến thời gian lưu trong SFC khi:
- a) Tăng tốc độ dòng (nhiệt độ và áp suất không đổi)
 - b) Tăng áp suất (nhiệt độ và tốc độ dòng không đổi)
 - c) Tăng nhiệt độ (áp suất và tốc độ dòng không đổi)
- 10.22. Cơ chế tách trong sắc ký lớp mỏng.
- 10.23. Khai triển sắc ký lớp mỏng và cách phát hiện các vết sắc ký trên sắc đồ.
- 10.24. Đánh giá phạm vi ứng dụng của sắc ký lớp mỏng.



ĐIỆN DI MAO QUẢN

MỤC TIÊU

1. Giới thiệu được nguyên tắc và hoạt động của hệ thống CE.
2. Trình bày được vai trò của EOF và các yếu tố tác động đến đại lượng này.
3. Giải thích được bốn kiểu CE: CZE, MEKC, CGE và CEC.
4. Mô tả được ứng dụng và ưu thế của kỹ thuật CE.

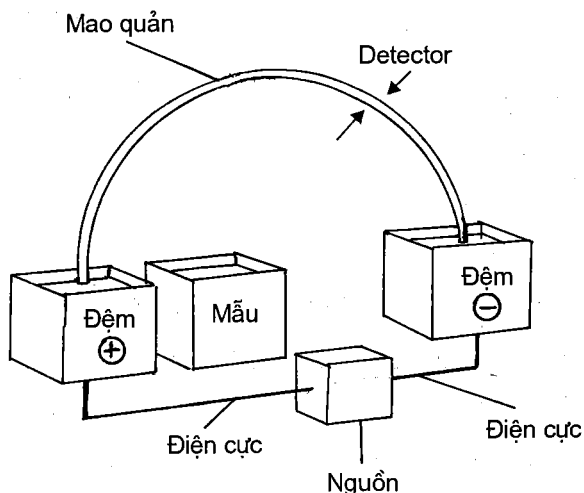
Điện di là sự di chuyển của các ion trong dung dịch dưới tác động của điện trường. Phân tích điện di dùng để tách hỗn hợp nhiều ion dựa trên sự *di chuyển khác nhau* của chúng trong dung dịch. Kỹ thuật này do Tiselius A.W.K (Thụy Điển) phát minh năm 1937 thông qua phân tích hỗn hợp protein trong dung dịch đậm. Tác giả nhận thấy rằng tốc độ và hướng di chuyển của các protein phụ thuộc vào điện tích và linh độ của chúng. Với phát minh này Tiselius được tặng giải thưởng Nobel hóa học năm 1948.

Tuy nhiên quá trình điện di trong dung dịch tự do như trên bị hạn chế bởi sự khuếch tán nhiệt và đối lưu. Để giảm thiểu những hạn chế này người ta thực hiện điện di trên gel như gel polyacrylamid hoặc agarose. Điện di trên gel dưới dạng bản mỏng hoặc cột được dùng để tách các phân tử sinh học khối lượng phân tử lớn như protein, acid nucleic. Tuy được sử dụng khá rộng rãi nhưng điện di trên gel chỉ dùng để định tính, hơn nữa thời gian phân tích kéo dài, hiệu quả thấp. Để tăng cường hiệu quả và phạm vi ứng dụng (cả cho định tính và định lượng), người ta đã cải tiến thực hiện quá trình điện di trong một mao quản nhỏ loại trừ được hiện tượng đối lưu, nhưng vẫn có thể điện di trên gel. Kỹ thuật *điện di mao quản* ra đời gắn liền với công trình nghiên cứu đầu tiên của S.Hjerten năm 1960. Năm tiếp theo với những đóng góp về mặt kỹ thuật của Virtanen, Mikkers, Lukacs và nghiên cứu về lý thuyết của J.W. Jorgenson, từ đầu thập kỷ 90 (của thế kỷ XX) điện di mao quản đã thực sự trở thành một kỹ thuật phân tích có ưu thế (điện di mao quản hiệu năng cao -HPCE). Đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng liên quan đến CE.

1. NGUYÊN TẮC CỦA CE

Điện di mao quản (CE) là một kỹ thuật tách các chất trong mao quản silica dài 25 - 100 cm, đường kính trong 25 - 100 μm , đường kính ngoài 300 -

400 μm . Điện thế một chiều áp vào hai đầu mao quản 10 - 30 KV (cường độ điện trường có thể đến 500V/cm) tạo ra quá trình chia tách: các chất phân tích được phát hiện khi di chuyển về một đầu mao quản nhờ một detector thích hợp. Hình 11.1 mô tả sơ đồ một hệ thống điện di mao quản.



Hình 11.1. Sơ đồ hệ thống điện di mao quản.

1.1. Điện di

Khi có một điện trường tác động lên các ion trong dung dịch, cation di chuyển về phía catod, anion di chuyển về phía anod. Tốc độ di chuyển của một ion v_i (cm/s) được xác định bằng:

$$v_i = \mu_{ep} E \quad (11.1)$$

Ở đây:

μ_{ep} : Linh độ điện di của ion chất tan ($\text{cm}^2/(\text{V.s})$),

E : Cường độ điện trường (V/cm).

Linh độ μ_{ep} là cơ sở tách bằng điện di, phụ thuộc vào nhiều yếu tố của môi trường điện di, thể hiện ở:

- Lực điện F_e (C.V/cm) gây ra sự chuyển động của các ion:

$$F_e = q \cdot E \quad (11.2)$$

- Lực ma sát của môi trường điện di cho ion dạng hình cầu:

$$F_f = - 6 \pi \eta r_i v_i \quad (11.3)$$

(có dấu trừ là do F_e qui ước lấy dấu dương (+), lực F_f ngược chiều với F_e nên lấy dấu âm -). Ở đây:

η : Độ nhớt của dung dịch trong mao quản (cpoise),

r_i và v_i : Bán kính (cm) và tốc độ di chuyển của ion (cm/s).

q : Điện tích của ion (C).

Quá trình điện di đạt trạng thái ổn định khi hai lực trên (F_e và F_f) bằng nhau:

$$q E = 6 \pi \eta r_i v_i \quad (11.4)$$

Thay trị số v_i ở phương trình (11.1) vào (11.4) ta có:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (11.5)$$

Từ (11.1) và (11.5) cho thấy: nếu tỷ số điện tích/bán kính (q/r) càng cao thì linh độ μ_{ep} càng lớn và tốc độ di chuyển của ion v_i cũng càng lớn. Ion điện tích lớn, kích thước nhỏ sẽ có tốc độ cao nhất và di chuyển nhanh nhất qua mao quản. Phân tử trung hoà, không mang điện tích ($q = 0$) không di chuyển. Độ nhớt η của dung dịch tăng sẽ làm giảm linh độ của tất cả các ion.

Linh độ điện di phụ thuộc vào bản chất của ion, thường có trong sổ tay như là một hằng số vật lý. Hằng số này được xác định bằng cách ngoại suy đến độ pha loãng vô tận. Bên cạnh đó, còn có *linh độ hiệu dụng* (effective mobility) được xác định bằng thực nghiệm. Trị số của nó không chỉ phụ thuộc vào bản chất của ion mà còn phụ thuộc vào điều kiện điện di như: pH, thành phần đệm...

1.2. Dòng điện thẩm

Khác với điện di trên gel cổ điển, trong CE dòng điện thẩm (EOF: electroosmotic flow hoặc electroendosmotic flow) là một thành phần cơ bản, tạo nên sự di chuyển của toàn bộ dung dịch trong mao quản bắt nguồn từ điện tích bề mặt trong của thành mao quản.

1.2.1. Nguồn gốc EOF

Khi điện di với mao quản silica, các nhóm silanol (SiOH) ở trên thành trong của mao quản sẽ giải phóng ra H^+ vào dung dịch và bề mặt thành mao quản sẽ mang điện tích âm. Quá trình giải phóng H^+ phụ thuộc vào hằng số cân bằng K . Với mao quản silica, khó xác định chính xác trị số K , nhưng thực nghiệm chỉ rõ dòng EOF có giá trị đáng kể khi pH dung dịch trên 4. Các vật liệu không ion hóa như Teflon dùng làm mao quản cũng cho dòng EOF, vì nó hấp phụ các anion.

Do bề mặt thành trong mao quản mang điện tích âm, nên đối ion (chủ yếu là cation) do lực hút tĩnh điện sẽ tạo thành một *lớp điện kép* để cân bằng điện tích và tạo nên một hiệu điện thế ở vùng sát thành mao quản gọi là *thế Zeta*. Khi áp thế vào mao quản, các cation trong lớp điện kép khuếch tán sẽ di chuyển về phía catod. Nhưng các cation này bị solvat hóa nên kéo cả khối dung dịch trong mao quản đi về catod. Sự di chuyển của khối dung dịch trong mao quản silica dưới tác dụng của điện trường được gọi là *dòng điện thẩm EOF*. Hình 11.2 mô tả quá trình hình thành dòng EOF.

Tốc độ và linh độ của dòng EOF được biểu thị bằng hai công thức sau:

$$v_{eo} = (e\zeta/\eta) \cdot E \quad (11.6)$$

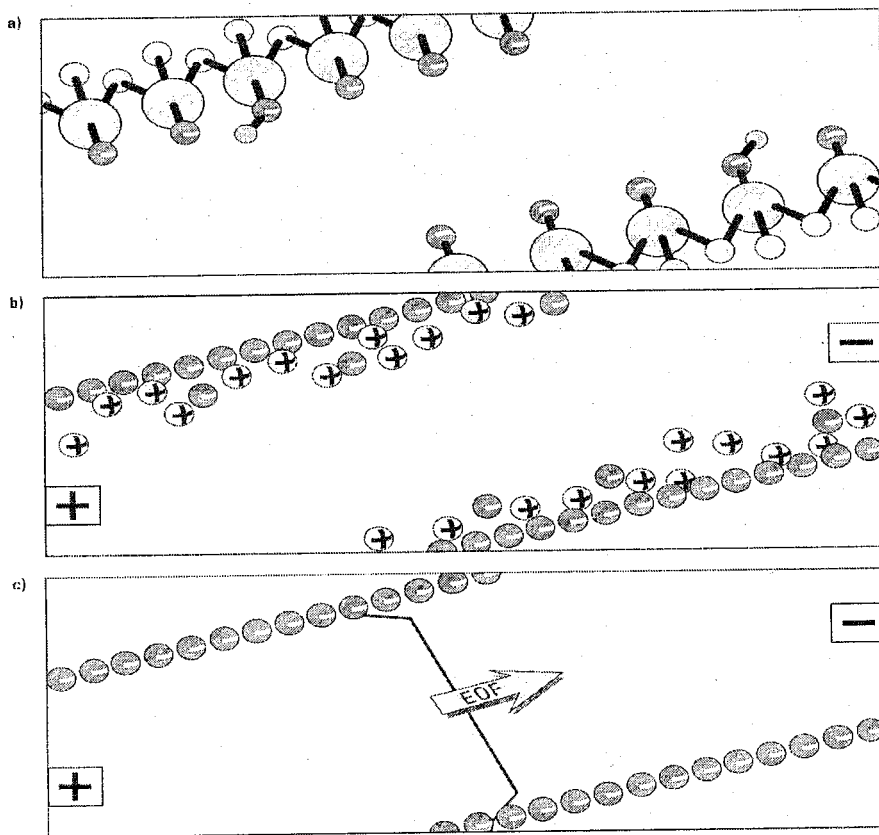
$$\mu_{eo} = e\zeta/\eta \quad (11.7)$$

Ở đây:

μ_{eo} : "Linh độ" dòng EOF ($\text{cm}^2/\text{V.s}$),

ζ : Thế Zeta (V),

e : Hằng số điện môi của dung dịch điện li.



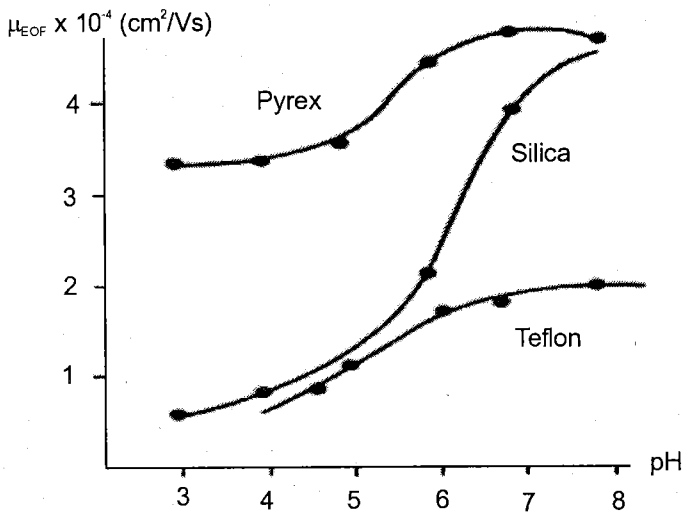
Hình 11.2. Sự hình thành dòng EOF.

- Bề mặt mao quản silica tích điện âm (SiO^-),
- Các cation hydrat hóa tập trung gần bề mặt mao quản,
- Khối dung dịch trong mao quản di chuyển về catot dưới tác dụng của điện trường (dòng EOF).

Thế Zeta ζ được xác định chủ yếu bằng điện tích bề mặt trong của thành mao quản. Điện tích phụ thuộc vào pH, vì vậy trị số EOF thay đổi theo pH. Ở pH càng cao, các nhóm silanol mất proton H^+ càng nhiều nên trị số dòng EOF càng lớn. Phụ thuộc vào điều kiện điện di cụ thể, trong khoảng pH 2 ÷ 12 dòng EOF có thể thay đổi đến 10 lần. Hình 11.3 minh họa sự thay đổi dòng EOF theo pH dung dịch điện di cho ba loại vật liệu mao quản: tetra, silica và Pyrex (một loại thủy tinh).

Ngoài pH dung dịch điện di, dòng EOF sẽ thay đổi khi:

- Lực ion của dung dịch tăng lên, làm giảm thế Zeta nên dòng EOF giảm.
- Trong một số trường hợp dung dịch đậm nước có thêm một số dung môi hữu cơ như methanol, acetonitril (để dễ hòa tan chất phân tích), hằng số điện môi của dung dịch điện di giảm xuống kéo theo sự giảm của EOF.

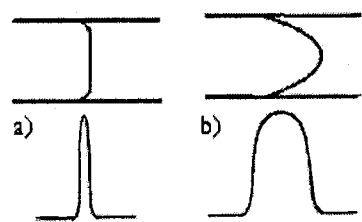


Hình 11.3. Tác động của pH lên dòng EOF

1.2.2. Hai đặc điểm của EOF

- Đặc điểm đầu tiên của EOF là tạo nên một dòng chuyển khối phẳng trong mao quản. Bởi vì lực tạo ra sự di chuyển của EOF phân bố đồng nhất dọc theo mao quản, cho nên không có sụt áp trong mao quản: dòng đồng nhất từ đầu đến cuối (mao quản). Nếu dùng bơm đẩy dung dịch như trong LC thì dòng chảy sẽ có dạng parabol (do hiệu ứng thành: các phân tử giữa dòng di chuyển với tốc độ cực đại, các phân tử gần thành di chuyển với tốc độ chậm hơn nhiều: tốc độ $\rightarrow 0$).

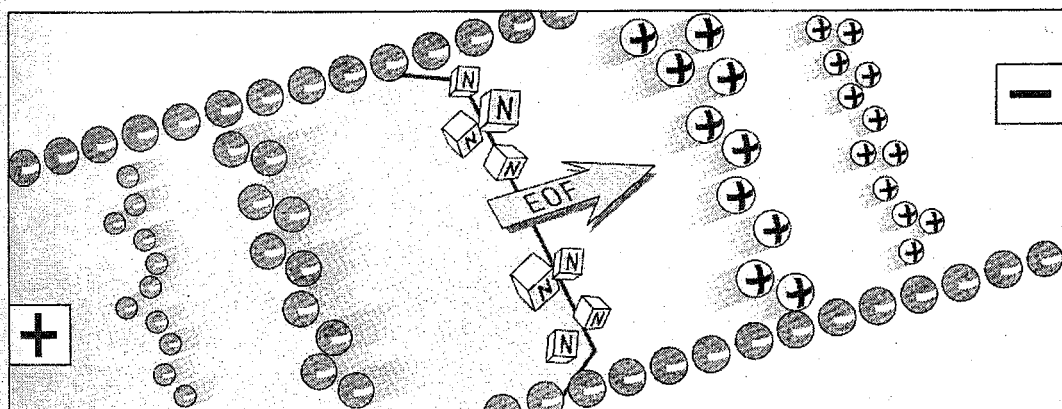
Hình 11.4 minh họa tính chất của dòng dung dịch di chuyển trong điện di mao quản (a) và trong sắc ký lỏng (b) cùng với ảnh hưởng độ rộng của pic chất tan.



Tuy nhiên tính chất tạo dòng chuyển khối phẳng của dung dịch điện di chỉ xuất hiện khi đường kính trong mao quản (d_i) dưới 200 μm . Nếu $d_i \gg 200 \mu\text{m}$, sức căng bề mặt không đủ tạo ra sự di chuyển đồng nhất giữa phần chất lỏng ở giữa và ở gần thành mao quản.

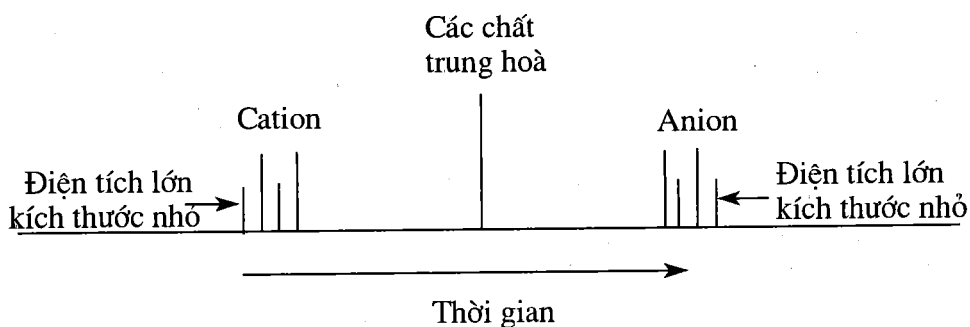
Hình 11.4. Tính chất của dòng và pic của chất tan trong điện di (a) và

- Đặc điểm thứ hai của EOF là đưa tất cả các tiểu phân có mặt trong dung dịch điện di, bất kể có điện tích hay không, di chuyển theo cùng một hướng. Với điều kiện thông thường (thành mao quản tích điện âm), dòng này di chuyển về catod. Các anion cũng sẽ di chuyển về phía catod vì tốc độ EOF thường lớn hơn nhiều so với tốc độ điện di (hình 11.5).



Hình 11.5. Sự di chuyển của ion và phân tử trong mao quản

Cation di chuyển nhanh nhất do lực điện di và EOF cùng hướng, tiếp theo là các chất không mang điện tích (trên hình vẽ là N) di chuyển theo EOF nhưng không tách khỏi nhau được. Cuối cùng là anion. Trên điện di đồ thứ tự rửa giải theo thời gian như sau: cation có điện tích lớn kích thước nhỏ ra trước nhất, anion có điện tích lớn và kích thước nhỏ ra cuối cùng (hình 11.6).



Hình 11.6. Thứ tự rửa giải trên điện di đồ.

1.2.3. Kiểm soát EOF

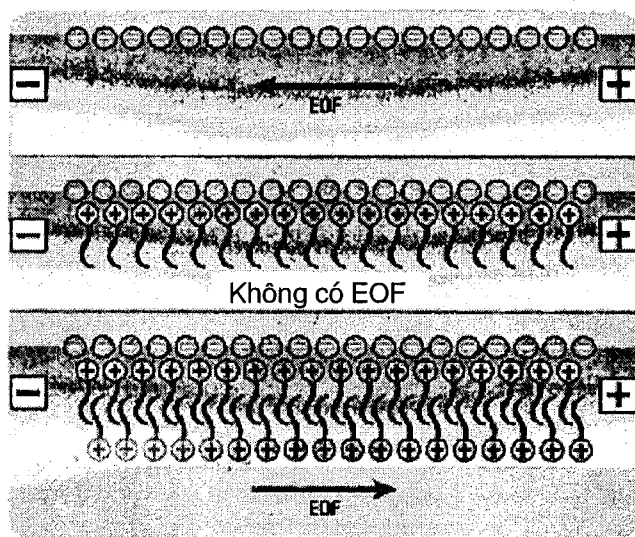
EOF là một trong các thông số cơ bản quyết định quá trình điện di, vì vậy cần phải được kiểm soát. Ở pH cao, EOF có thể quá nhanh sẽ rửa giải các chất khỏi mao quản khi chưa kịp tách khỏi nhau. Ngược lại ở pH thấp, thành mao quản mang điện tích âm có thể hấp phụ cation nhờ điện tích điện. Điều này có thể gây khó khăn khi điện di tách protein base. Ngoài ra trong một số kỹ thuật CE thường cần giảm EOF.

Để kiểm soát dòng điện thẩm thường tìm cách thay đổi điện tích bề mặt mao quản hoặc độ nhớt của dung dịch điện di. Có thể thống kê một số yếu tố làm tăng EOF:

- Tăng thế áp vào hai đầu mao quản,
- Tăng pH của dung dịch điện di (trong khoảng 2 ÷ 12),
- Tăng nhiệt độ điện di,
- Giảm nồng độ các chất trong dung dịch (giảm lực ion)

Ngoài ra biến đổi thành mao quản có thể giảm, loại trừ hoặc đổi chiều của EOF. Trên hình 11.6 mô tả rửa giải theo thứ tự : cation, các chất trung hoà, cuối cùng anion. Nếu bây giờ cần phân tích anion, thời gian rửa giải có thể giảm xuống bằng cách đổi chiều EOF và đổi cực của thế áp mao quản. Thứ tự rửa giải sẽ là: anion, các chất trung hoà, rồi đến cation.

Để làm đổi chiều EOF, người ta thường thêm vào dung dịch một muối alkyl amoni bậc 4. Đầu thân nước mang điện tích dương sẽ cố định với nhóm SiO^- của thành mao quản nhờ tương tác ion. Phần kỵ nước của hydrocarbon sẽ liên kết (tương tác kỵ nước) với các phân tử muối alkyl amoni tự do. Đầu mang điện tích dương của muối này sẽ hút các anion của dung dịch. Các anion hydrat hóa này sẽ di chuyển về phía anod kéo toàn bộ khối dung dịch trong mao quản đi theo, tạo ra EOF di chuyển về phía anod (hình 11.7).



Hình 11.7. Loại trừ và đổi chiều EOF nhờ các chất hoạt động bề mặt cation.

Các muối alkyl amoni bậc bốn thường dùng cho đổi chiều EOF:

- Cetyl trimethyl amoni bromid (CTAB) hoặc clorid (CTAC)
- Tetradecyl trimethyl amoni bromid (TTAB)
- Có thể dùng diethylen triamin (DETA).

2. CÁC THÔNG SỐ ĐẶC TRƯNG

Các thông số đặc trưng cho CE tương tự các thông số cho sắc ký cột. Điện di mao quản vùng CZE (capillary zone electrophoresis) là một kỹ thuật đơn giản nhất của CE. Sau đây sẽ trình bày vài thông số đặc trưng của CZE.

2.1. Thời gian di chuyển t_M

Thời gian cần thiết để một chất tan di chuyển từ khi đưa vào mao quản đến thời điểm được phát hiện bởi detector được gọi là *thời gian di chuyển* t_M .

Quãng đường di chuyển là chiều dài hiệu dụng của mao quản (chiều dài từ điểm tiêm mẫu đến điểm phát hiện). Tốc độ di chuyển bao gồm hai thành phần:

- Tốc độ điện di của ion:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \mu_{ep} \cdot \frac{V}{L} \quad (11.8)$$

- Tốc độ điện thẩm, tốc độ EOF:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \mu_{eo} \cdot \frac{V}{L} \quad (11.9)$$

Thời gian di chuyển của ion chất tan sẽ là:

$$t_M = \frac{L_{HD}}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{L_{HD}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot E} = \frac{L_{HD}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V} \quad (11.10)$$

Ở đây: L_{HD} : chiều dài hiệu dụng của mao quản (cm),

V : thế áp vào hai đầu mao quản có chiều dài là L (cm)

$\mu_{ep} + \mu_{eo} = \mu_a$: là linh độ biểu kiến.

Điều lưu ý là linh độ điện di và linh độ điện thẩm có thể cùng hướng và khác hướng tùy thuộc vào điện tích ion. Với cation hai linh độ μ_{ep} và μ_{eo} cùng hướng nên chúng cùng dấu $\mu_a > \mu_{ep}$. Với anion, μ_{ep} khác hướng μ_{eo} nên chúng khác dấu. Ở pH cao tốc độ $v_{eo} \gg v_{ep}$ nên anion sẽ di chuyển về catod đến cuối cùng. Nhưng khi pH thấp, tốc độ v_{eo} yếu, anion không bao giờ đạt đến catod. Trong trường hợp này để tách các anion cần đổi cực mao quản: detector ở phía anod.

2.2. Số đĩa lý thuyết N

Sau khi đưa mẫu vào mao quản, mỗi chất tan ion của mẫu sẽ di chuyển trên nền chất điện ly tạo ra một vùng độc lập, thể hiện trên điện di đồ là một pic. Bề rộng của pic khác nhau tùy thuộc vào nhiều yếu tố.

- Trong HPLC hiện tượng giãn pic được mô tả bằng phương trình thực nghiệm Van Deemter (chương 8, phương trình 8.25):

$$H = A + \frac{B}{u} + C.u$$

- Trong CE, mao quản rộng, không có chất nhồi cột, cho nên:
 - + Số hạng A bắt nguồn từ khuếch tán Eddy tạo ra do chất nhồi cột sẽ bị loại trừ.
 - + Không có pha tĩnh nên không có hiệu ứng chuyển khối. Số hạng C.u không còn.

Như vậy từ phương trình Van Deemter ta thấy chiều cao của đĩa H liên quan đến khuếch tán dọc theo cột: số hạng B/u. Cho nên sai lệch chuẩn của pic liên quan đến hệ số khuếch tán D:

$$\sigma = \sqrt{2 D t} \quad (11.11)$$

Ở đây: D là hệ số khuếch tán (cm^2/s) của chất phân tích di chuyển ra khỏi cột với thời gian t. Đưa phương trình (11.10) vào (11.11) ta có:

$$\sigma^2 = 2 D \cdot \frac{L_{HD} L}{\mu_a \cdot V} \quad (11.12)$$

Từ chương 8 phương trình (8.17) và (8.18) viết cho CE:

$$N = \frac{L_{HD}^2}{\sigma^2} \quad (11.13)$$

Thay phương trình (11.12) vào phương trình (11.13) sẽ có kết quả:

$$N = \frac{\mu_a V L_{HD}}{2 D L} = \frac{\mu_a E L_{HD}}{2 D} \quad (11.14)$$

Như vậy để tăng số đĩa lý thuyết cần tăng cường độ điện trường E. Mặt khác với những chất khối lượng phân tử cao như protein, polypeptid..., có hệ số D nhỏ sẽ cho giá trị N lớn hơn nhiều so với các phân tử nhỏ. Bảng 11.1 cho thấy hệ số D phân bố trong một khoảng rất rộng.

Bảng 11.1. Một vài hệ số khuếch tán trong nước ở 25°C

Tên chất	D.10 ⁵ (cm ² /s)
HCl	3,05
NaCl	1,48
Glycin	1,06
Citrat	0,66
Cytocrom C	0,11
Hemoglobin	0,069

Số đĩa lý thuyết cũng có thể được xác định trực tiếp từ điện di đồ:

$$N = 16 \frac{t_M^2}{w^2}$$

$$N = 5,54 \frac{t_M^2}{w_{1/2}^2} \quad (11.15)$$

Ta đã nhận thấy sự giãn pic điện di chỉ liên quan đến khuếch tán theo chiều dài mao quản. Trong thực tế, một số hiện tượng khác như: sự thoát nhiệt do hiệu ứng Joule, hấp phụ mẫu trên thành mao quản, sự chênh lệch độ dẫn điện giữa mẫu phân tích và đệm, kích thước detector cũng góp phần đáng kể làm giãn rộng pic.

2.3. Độ phân giải

Độ phân giải của 2 thành phần có thể biểu thị bằng giá trị R:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta\mu}{\mu} \quad (11.16)$$

Ở đây: $\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$

$$\bar{\mu} = \frac{1}{2}(\mu_2 + \mu_1)$$

Đưa phương trình (11.14) vào phương trình (11.16) ta có:

$$R = \frac{1}{4\sqrt{2}} \cdot \Delta\mu \left(\frac{V}{D(\bar{\mu} + \mu_{eo})} \right)^{1/2}$$

$$R = 0,177 \cdot \Delta\mu \left(\frac{V}{D(\bar{\mu} + \mu_{eo})} \right)^{1/2} \quad (11.17)$$

Ở trên ta thấy số đĩa lý thuyết N (biểu thị hiệu lực tách) tăng tỷ lệ với điện thế V. Nhưng với R, nó tỷ lệ với $\sqrt{V}$. Tăng thế V quá cao sẽ tạo nhiều nhiệt. Vì vậy người ta không tận dụng ưu thế này.

Từ phương trình (11.17) cho thấy độ phân giải cực đại thu được khi μ và μ_{eo} bằng nhau nhưng ngược dấu - tức là ion chuyển động ngược hướng với EOF nhưng cùng tốc độ. Trong trường hợp này thời gian phân tích sẽ rất lớn. Vì vậy cần lựa chọn điều kiện để cân bằng độ phân giải và thời gian phân tích.

3. CÁC KIỂU ĐIỆN DI MAO QUẢN

Điện di mao quản khá đa dạng, có thể thực hiện theo nhiều kiểu khác nhau. Mỗi kiểu có cơ chế tách riêng của nó. Bảng 11.2 tóm tắt 4 kiểu điện di.

Bảng 11.2 . Kiểu điện di và cơ chế tách

Kiểu điện di	Cơ chế tách
1. Điện di mao quản vùng CZE (capillary zone electrophoresis)	Linh độ khác nhau của các ion trong dung dịch tự do.
2. Sắc ký điện động mixen MEKC (micellar electrokinetic chromatography)	Tương tác sơ nước/ion với hạt mixen trong dung dịch
3. Điện di mao quản gel CGE (capillary gel electrophoresis)	Kích thước và điện tích (molecular sieve)
4. Điện sắc ký mao quản CEC (capillary electrochromatography)	Sự phân bố và linh độ khác nhau của các chất.

3.1. CZE

Ở mục 11.2 đã trình bày các thông số đặc trưng cho CZE - một kiểu điện di đơn giản nhất, với cơ sở chia tách là linh độ điện di khác nhau của các ion trong mao quản silica nung chảy (thành mao quản mang điện tích âm) và dòng điện thẩm di chuyển về phía catod. Thứ tự rửa giải là: cation, tiếp theo là phân tử trung hoà, sau cùng là anion.

Người ta có thể thay đổi điều kiện CZE để phục vụ cho mục đích phân tích cụ thể. Ví dụ:

- Đưa chất hoạt động bề mặt cation để đổi chiều EOF, kết hợp với đổi cực điện di sẽ tách các anion nhanh hơn,
- Đưa các chất chọn lọc chiral như cyclodextrin vào dung dịch điện di để tách hỗn hợp racemic định lượng được đồng phân quang học.

Ngoài ra còn có thể đưa thêm các chất vào dung dịch điện di tạo ra các kiểu điện di khác nhau.

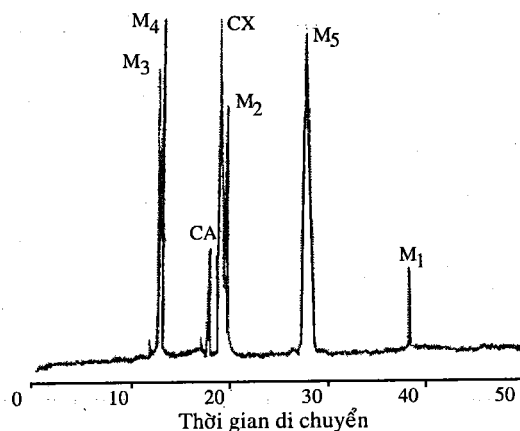
Ứng dụng của CZE:

CZE là một kỹ thuật tách được dùng để phân tích hỗn hợp các chất thuộc nhiều lĩnh vực:

- Sinh học: Phân tích các peptid, protein, đặc biệt với glucoprotein.
- Xác định được chất và các chất chuyển hóa của chúng.

Hình 11.8 minh họa phân tích Cefixim (một kháng sinh họ cephalosporin thế hệ III) và các chất chuyển hóa của nó (trên hình vẽ ký hiệu từ M_1 đến M_5). Năm chất chuyển hóa rất thân nước, nên rất khó chiết toàn lượng bằng dung môi hữu cơ. Cũng vì vậy sắc ký pha đảo không thể định lượng được. Nhưng với kỹ thuật CZE có thể tách định lượng các chất này trong nước tiểu.

- CZE còn được dùng để phân tích các chất ô nhiễm môi trường.



Hình 11.8. Điện di đồ nước tiểu có cefixim (CX) và các chất chuyển hóa của nó (M_1 đến M_5) và acid cinnamic (CA).

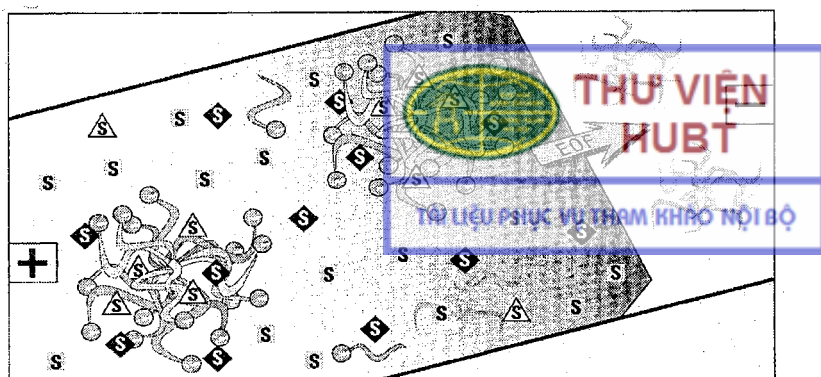
Điều kiện điện di: Đệm phosphat 50 mM pH 6,8; $V = 15$ kV, $L_{HD} = 50$ cm, $id = 50$ μ m, $\lambda = 280$ nm.

3.2. MEKC

MEKC có khi còn được viết tắt là MECC (micellar electrokinetic capillary chromatography) là một kỹ thuật bổ sung cho CZE: tách được ion và cả phân tử trung hoà điện bằng cách thêm các chất hoạt động bề mặt vào dung dịch điện di ở nồng độ trên nồng độ mixen tới hạn (critical micelle concentration - CMC). Chất hoạt động bề mặt thường dùng natri dodecylsulfat (SDS): $Na^+C_{12}H_{25}OSO_3^-$ có CMC = 9 mM.

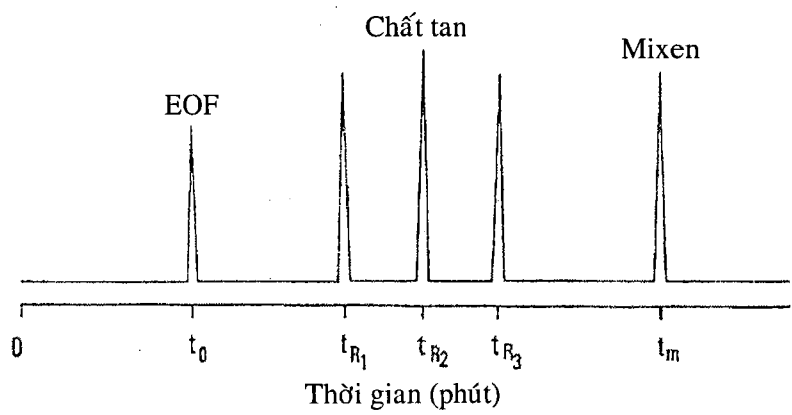
3.2.1. Nguyên tắc

Khi dung dịch điện di không có SDS, tất cả các phân tử trung hoà đạt đến detector trong cùng một thời gian. Khi cho thêm SDS nồng độ trên 9 mM, các hạt mixen hình cầu SDS được tạo thành trong dung dịch với phần sơ nước hướng vào trung tâm (để tránh tương tác với đệm thân nước), phần đầu mang điện tích âm hướng ra ngoài về phía dung dịch đệm (hình 11.9).



Hình 11.9. Hạt mixen anion và quá trình tách trong MEKC

Các phân tử trung hoà sẽ phân bố cân bằng giữa dung dịch đệm và hạt mixen (phân bố ở trong và ngoài mixen). Nếu chất tan (trên hình vẽ ký hiệu là S) tương tác càng nhanh với mixen (tức là lưu lại trong mixen càng lâu) thời gian di chuyển càng dài. Nếu chất tan không tương tác với mixen thì được rửa giải với EOF, thời gian dịch chuyển t_0 . Các chất (cả ion và phân tử trung hoà) sẽ được rửa giải giữa thời gian di chuyển t_0 của EOF và thời gian di chuyển t_m của hạt mixen. Người ta gọi khoảng thời gian đó là cửa sổ thời gian (time window). Khoảng thời gian này thường ngắn. Vì vậy để tăng hiệu lực tách - tức là kéo dài cửa sổ thời gian - người ta tìm cách giảm t_0 và tăng thời gian t_m (dùng các mixen có linh độ thấp).



Hình 11.10. Thời gian rửa giải các chất trung hoà trong MEKC.

Người ta gọi là kỹ thuật này là sắc ký điện động mixen bởi vì hạt mixen được coi là một pha tĩnh giả (pseudostationary phase). Việc tách các chất trung hoà dựa trên cơ sở sự phân bố của chúng giữa dung dịch và pha tĩnh giả. Có thể thay đổi sự phân bố trên bằng nhiều cách khác nhau, như:

- Thay đổi pH và nồng độ của dung dịch điện di,
- Thay đổi bản chất vật lý của mixen (kích thước, điện tích hoặc hình dạng của nó) bằng cách dùng các chất hoạt động bề mặt khác nhau (tương tự thay đổi pha tĩnh trong LC)
- Thay đổi nhiệt độ điện di.

3.2.2. Hai thông số đặc trưng của MEKC

Quá trình tách các phân tử trung hoà trong MEKC, tương tự trong LC. Vì vậy ta áp dụng các biểu thức đặc trưng trong chương 8 cho trường hợp này.

- Hệ số dung lượng k' :

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)} = K \cdot \frac{V_s}{V_M} \tag{11.18}$$

Ở đây: t_r : Thời gian di chuyển của chất tan,

t_o : Thời gian di chuyển của chất không lưu giữ, được xác định bằng cách tiêm chất đánh giá EOF không liên kết với mixen, ví dụ như methanol.

t_m : Thời gian di chuyển của mixen, được đo bằng cách tiêm một chất đánh dấu mixen như sudan III, khi di chuyển nó luôn luôn nằm trong mixen.

K: Hệ số phân bố của chất tan trong và ngoài mixen,

V_s : Thể tích của pha mixen,

V_M : Thể tích của pha động.

- Độ phân giải R_s :

Độ phân giải của hai chất có pic cạnh nhau trong MEKC được tính theo công thức:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \left(\frac{1 - t_o/t_m}{1 + (t_o/t_m) k'_1} \right) \quad (11.19)$$

Ở đây:

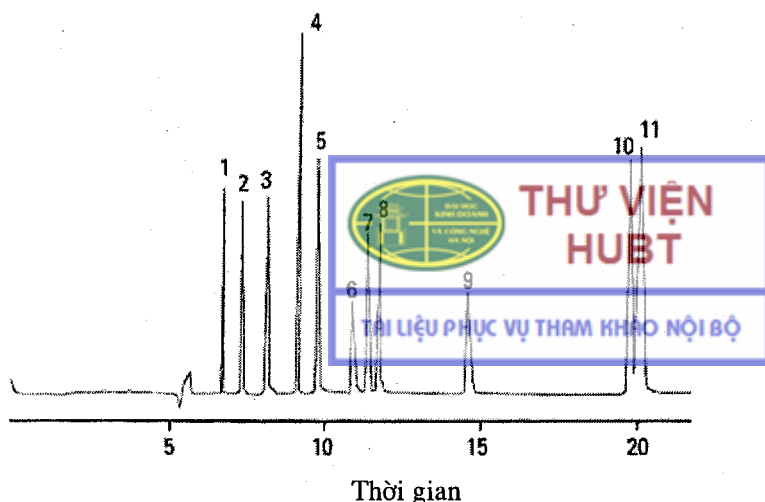
α là độ chọn lọc, $\alpha = k'_2/k'_1$,

k'_2 và k'_1 là hệ số dung lượng của hai chất.

3.2.3. Ứng dụng của MEKC

MEKC là một kiểu điện di có nhiều ứng dụng bởi vì có thể tách định lượng các chất trung hoà và mang điện tích, có đặc tính sơ nước và thân nước như acid amin, nucleotid, vitamin, hydrocarbon thơm. Với chế phẩm được có thể dùng MEKC để xác định hoạt chất trong các loại viên, dung dịch tiêm.

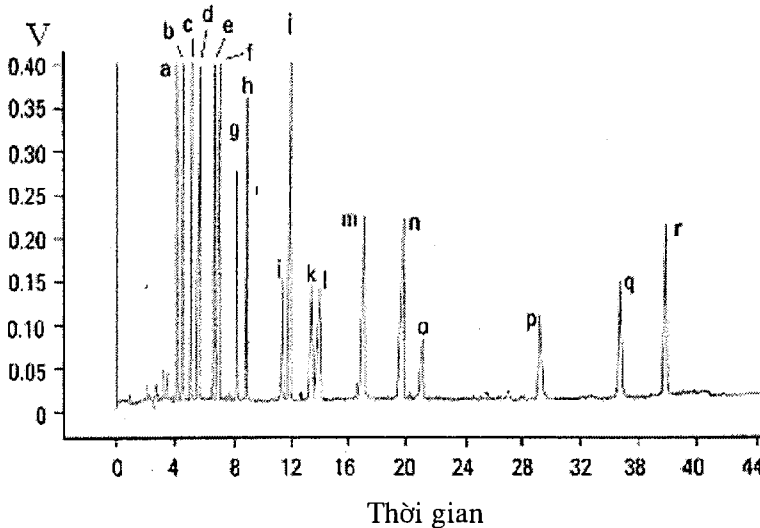
Hình 11.11 và hình 11.12 minh họa ứng dụng của MEKC trong phân tích dược.



Hình 11.11. Phân tích một số chất hạ nhiệt giảm đau.

Điều kiện điện di: Đệm phosphat - borat 20 mM, SDS 100 mM, pH 9,
 $V = 20 \text{ KV}$, $l = 65 \text{ cm}$, $id = 50 \mu\text{m}$, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

- | | | |
|------------------|---------------------|-------------------------|
| 1. Acetaminophen | 2. Cafein | 3. Sulpyrin |
| 4. Naproxen | 5. Guaifenesin | 6. Tạp |
| 7. Phenacetin | 8. Ethenzamid | 9. 4-Isopropylantipyrin |
| 10. Noscadin | 11. Chlorpheniramin | |



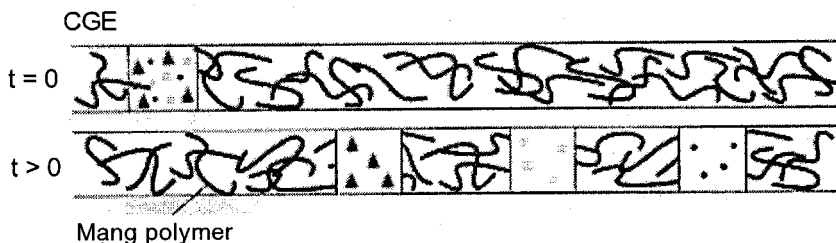
Hình 11.12 . Phân tích một số chất ma túy hướng thần.

Điều kiện điện di: Đệm phosphat 8,5 mM; borat 8,5 mM; SDS 85 mM;
 acetonitril 15%, pH 8,5; $V = 20 \text{ KV}$, $L_{HD} = 25 \text{ cm}$, $id = 50 \mu\text{m}$, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

- | | | |
|---------------|----------------|---------------------|
| a. Psilocybin | b. Morphin | c. Phenobarbital |
| d. Psilocin | e. Codein | f. Methaqualon |
| g. LSD | h. Heroin | i. Amphetamin |
| j. Librium | k. Cocain | l. Methamphetamin |
| m. Lorazepam | n. Diazepam | o. Fentanyl |
| p. PCP | q. Cannabidiol | r. Δ^9 - THC |

3.3. CGE

CGE là một biến thể phát triển từ điện di trên gel đã được sử dụng trên ba thập kỷ để phân tích các chất sinh học khối lượng phân tử lớn trong hóa sinh. Ở đây gel đóng vai trò như một môi trường đối lưu trong môi trường điện di. Trong CGE, các chất phân tích di chuyển qua mạng polymer trong mao quản đóng vai trò như một rây phân tử: các chất càng lớn càng nằm lại phía sau, các chất càng bé càng tiến xa hơn (hình 11.13).



Hình 11.13. Tách theo kích thước phân tử trong CGE.

Dùng thuật ngữ điện di mao quản trên gel - CGE - dễ gây hiểu nhầm. Thay từ gel bằng mạng polymer sẽ rõ ràng hơn. Polymer dùng ở đây có thể là:

- + Polymer có liên kết ngang: polyacrylamid/bis-acrylamid
- + Polymer mạch thẳng: polyacrylamid, hydroxyalkylcellulose, dextran.
- + Agarose

CGE được dùng để tách các phân đoạn DNA, tách protein.

3.4. CEC

CEC là một kỹ thuật tách mới xuất hiện gần đây, lai tạo của CE và HPLC. Khác với MEKC, trong CEC mao quản được nhồi một pha tĩnh thật, thường là silica C18 như trong sắc ký lỏng. Nhưng nhờ có thể áp vào mao quản nên pha động di chuyển qua mao quản nhờ dòng điện thẩm (EOF). Do không dùng áp suất đẩy pha động qua cột nên không có hiện tượng sụt áp liên quan đến kích thước hạt. Có thể nói CEC là một kỹ thuật sắc ký trong đó pha động đi qua cột nhờ dòng EOF nên tạo cho kỹ thuật này tách rất hiệu quả, khắc phục giới hạn dung lượng pic (số đĩa lý thuyết) của HPLC.

Hiện nay CEC là một lĩnh vực nghiên cứu sôi động, ưu việt hơn HPLC ở hiệu quả, có tính chọn lọc với chất tan ion hoá. Nhiều vấn đề đang đặt ra cần giải quyết. Bảng 11.3 so sánh số đĩa lý thuyết N của sắc ký lỏng mao quản và CEC với ba loại kích thước hạt.

Bảng 11.3. Số đĩa lý thuyết N trong CEC và sắc ký lỏng mao quản.

Kích thước hạt (μm)	Sắc ký lỏng mao quản		CEC	
	Chiều dài (cm)	N	Chiều dài (cm)	N
5	50	55 000	50	115 000
3	25	45 000	50	170 000
1,5	10	30 000	50	250 000

Ghi chú: Sắc ký lỏng mao quản là sắc ký lỏng dùng cột mao quản có đường kính trong $i_d = 0,2 \div 1 \text{ mm}$.

• Ứng dụng của CEC:

Tuy đang trên đường nghiên cứu, phát triển nhưng CEC đã được ứng dụng trong phân tích thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau:

- Phân tích được: dùng phân tích được chất thuộc nhiều nhóm khác nhau.
- Phân tích các phân tử sinh học, các đồng phân quang học. Thường kết nối CEC với MS và quang phổ.

4. THIẾT BỊ CE

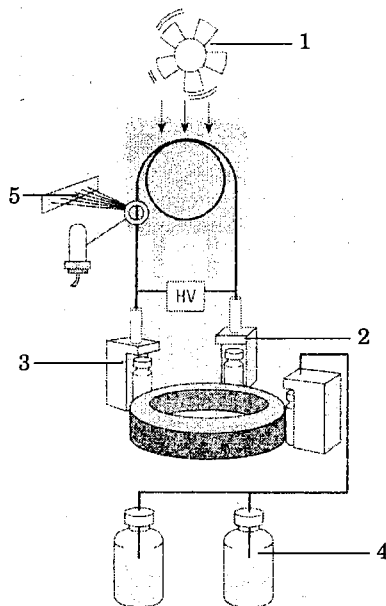
Hình 11.14 trình bày sơ đồ bố trí của hệ thống CE. Thực nghiệm CE thường được tiến hành theo 4 bước:

- Thay dung dịch đệm đầu vào bằng dung dịch mẫu phân tích,
- Bơm mẫu vào mao quản,
- Đưa trở lại dung dịch đệm đầu vào,
- Áp thế vào mao quản.

Sau một thời gian điện di các pic xuất hiện.

4.1. Tiêm mẫu

Trong CE lượng mẫu tiêm rất nhỏ (1-50 nl), phụ thuộc vào chiều dài và đường kính mao quản. Lượng mẫu tiêm nhỏ có ưu điểm là một lượng mẫu có thể tiêm vào nhiều lần. Nhưng mặt khác, cũng do thể tích tiêm nhỏ nên khó tăng độ nhạy, sai số tương đối của phép đo sẽ lớn.



Hình 11.14. Sơ đồ hệ thống CE

1. Điều nhiệt mao quản,
2. Dung dịch mẫu,
3. Dung dịch đệm,
4. Dung dịch đệm dự trữ,
5. Detector (DAD).

Có 2 cách tiêm chính: Tiêm thủy động lực và tiêm điện động.

4.1.1. Tiêm thủy động lực (Hydrodynamic injection):

Đây là cách tiêm phổ biến nhất được thực hiện bằng cách tăng áp suất ở đầu mao quản nhúng vào bình đựng mẫu hoặc tạo chân không ở bình đầu ra. Có thể dùng nguyên tắc xi phông nâng cao bình đựng mẫu và hạ thấp bình đầu ra (hình 11.15).

- Thể tích tiêm mẫu V khi dùng chênh lệch áp suất được tính theo phương trình Hagen-Poiseuille:

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (11.20)$$

Ở đây: ΔP : Chênh lệch áp suất ở 2 đầu mao quản,

d: Đường kính trong của mao quản,

t: Thời gian tiêm,

η : Độ nhớt của dung dịch trong mao quản,

L: Chiều dài tổng cộng của mao quản.

Thường tiêm ở áp suất $25 \div 100$ mbar, thời gian $2 \div 5$ giây.

- Nếu dùng nguyên tắc xi phong thì chênh lệch áp suất ở hai đầu mao quản của phương trình (11.20) được tính theo biểu thức sau:

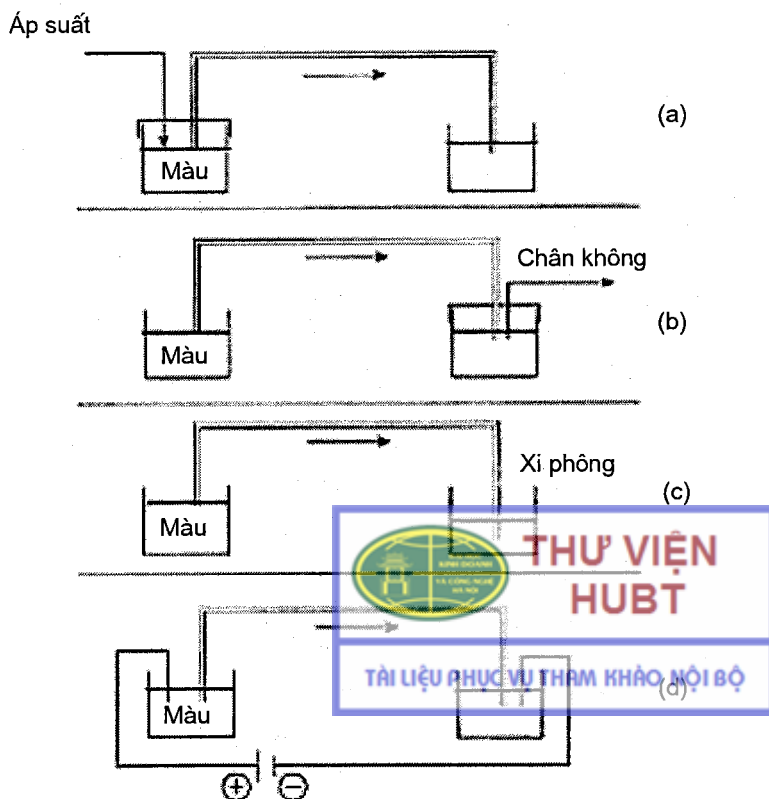
$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (11.21)$$

ρ : Tỷ trọng của dung dịch đậm,

Δh : Chênh lệch chiều cao ở hai đầu mao quản,

g: Hằng số gia tốc trọng trường.

Khi tiêm mẫu bằng xi phong thường dùng $\Delta h = 5 \div 10$ cm, thời gian $10 \div 30$ giây. Cách tiêm này chỉ dùng khi hệ thống CE không tiêm được mẫu bằng áp suất.



Hình 11.15. Sơ đồ hai cách tiêm mẫu trong CE.
a,b,c: Ba kiểu tiêm thủy động lực, d: Tiêm điện động.

4.1.2. Tiêm điện động (Electrokinetic injection):

Người ta dùng điện trường nhỏ hơn 3 ÷ 5 lần so với điện trường lúc điện di để tiêm mẫu. Ở đây chất phân tích đi vào mao quản bằng cả di chuyển và lực đẩy của EOF. Vì vậy lượng mẫu tiêm phụ thuộc vào linh độ điện di của chất phân tích: linh độ ion càng lớn, lượng mẫu nạp vào càng nhiều. Lượng mẫu Q (khối lượng g hoặc mol) được tính theo biểu thức:

$$Q = \frac{\mu_{eo} + \mu_{ep}}{L} V \pi r^2 C t \quad (11.22)$$

Ở đây: V : Điện thế tiêm mẫu,

r : Bán kính mao quản,

C : Nồng độ chất phân tích,

t : Thời gian tiêm mẫu,

L : Chiều dài tổng cộng của mao quản.

4.2. Mao quản

Tương tự như cột mao quản GC, mao quản của CE được chế tạo từ silica nung chảy, có chất bảo vệ polyimid ở ngoài. Mao quản có đường kính trong (id) 10 ÷ 200 μm , thường dùng 25 ÷ 75 μm , đường kính ngoài 300 ÷ 400 μm . Chiều dài hiệu dụng (l) thay đổi: 10 cm với mao quản nhồi đầy gel, 80 ÷ 100 cm cho CZE với mẫu phức tạp.

4.2.1. Xử lý mao quản

Xử lý tốt mao quản sẽ cho dữ liệu lặp lại. Duy trì bề mặt mao quản ổn định là vấn đề quan trọng nhất trong CE. Trở ngại chính là sự hấp phụ mẫu phân tích trên bề mặt mao quản sẽ làm mất tính ổn định của nó. Vì vậy xử lý mao quản là phải loại các chất hấp phụ trên bề mặt, làm mới lại và tạo điều kiện cho silanol điện ly, tạo bề mặt mao quản mang điện tích.

Thường người ta xử lý mao quản mới bằng kiểm: đầu tiên rửa bằng dung dịch NaOH 1M trong 15 phút, sau đó bằng dung dịch NaOH 0,1M trong 15 phút, cuối cùng rửa bằng đệm điện di 10 phút. Với cột đã sử dụng thường rửa bằng dung dịch NaOH 0,1M trong 2 phút, sau đó rửa với dung dịch đệm tối thiểu 5 phút.

Khi điện di với đệm pH 4 ÷ 6, cân bằng giữa thành cột và dung dịch đệm rất chậm. Cho nên cần xử lý cột thường xuyên với dd NaOH 0,1M nếu thời gian di chuyển không lặp lại.

4.2.2. Điều nhiệt mao quản

Nhiệt độ mao quản cần được kiểm soát chặt chẽ, dao động của nhiệt độ không quá $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Thường dùng 2 cách để điều nhiệt mao quản:

- Điều nhiệt dùng chất lỏng,
- Điều nhiệt bằng dòng không khí. Tốc độ dòng không khí bằng 10m/ giây thường đủ để giải nhiệt cho CE.

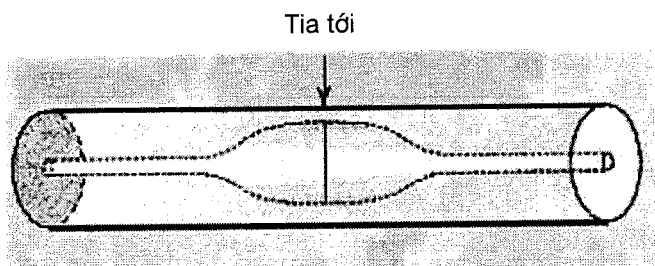
4.2.3. Cấp thế cho mao quản

Thế một chiều áp vào mao quản tối đa bằng 30 kV, dòng dao động 50 ÷ 100 mA, cực đại có thể đến 200 ÷ 300 mA. Thế cấp dao động $\leq 0,1\%$ sẽ bảo đảm độ lặp lại cho thời gian di chuyển.

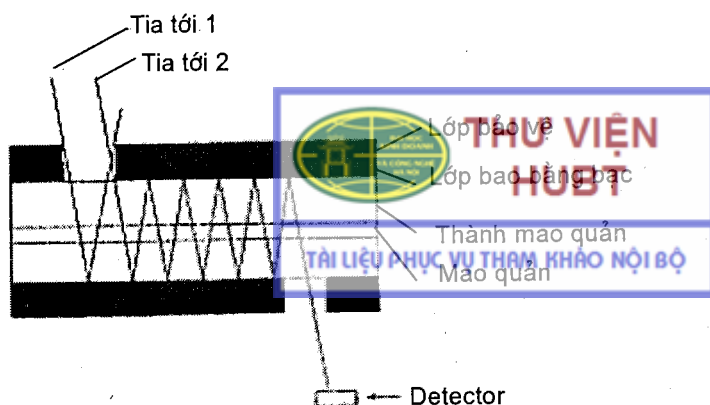
4.3. Detector

Detector trong CE là một thách thức kỹ thuật vì kích thước nhỏ của mao quản. Tuy lượng mẫu chỉ cần nanolit, nhưng đòi hỏi nồng độ phải khá cao. Cho nên nhiều khi phải tìm cách tăng nồng độ của dung dịch phân tích. Nhiều thiết kế nhằm tạo ra đáp ứng tối đa của detector. Ví dụ với detector UV- VIS người ta tăng quang trình bằng hai cách:

- Làm phình to mao quản ở vị trí detector.(hình 11.16),
- Phản xạ nhiều lần từ thành mao quản được phủ bởi một lớp bạc kim loại (hình 11.17).



Hình 11.16. Mao quản phình to.



Hình 11.17. Chùm tia UV-VIS phản xạ nhiều lần.

Bảng 11.4 thống kê một số detector dùng trong CE.

Bảng 11.4. Một số detector dùng trong CE.

Detector	Giới hạn phát hiện (nồng độ mol)	Đánh giá
Hấp thụ uv-vis	$10^{-5} \div 10^{-8}$	Phân tích nhiều chất
Huỳnh quang	$10^{-7} \div 10^{-9}$	Nhạy. Thường cần làm dẫn chất hoá
Đo ampe	$10^{-10} \div 10^{-11}$	Nhạy, chọn lọc. Có đòi hỏi chặt chẽ vận hành
Độ dẫn điện	$10^{-7} \div 10^{-8}$	Vận năng
Phổ khối	$10^{-8} \div 10^{-9}$	Nhạy, cho thông tin về cấu trúc.

Ghi chú: Giới hạn phát hiện với giả thiết mẫu tiêm 10 nL

4.4. Hệ thống thu nhận dữ liệu

Hệ thống CE hiện đại thường kèm máy tính cùng với phần mềm điều khiển hoạt động của thiết bị, thu nhận dữ liệu, tính toán các thông số phân tích và trình bày báo cáo kết quả.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical analysis*, fifth edition, W.H.Freeman and company, New York; Chapter 26, p.p 769 – 784.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 11.1. Trình bày nguyên tắc của điện di và điện di mao quản. So sánh những điểm giống nhau và khác nhau.
- 11.2. Phân biệt dòng điện di và dòng điện thẩm. Vai trò của chúng trong CE.
- 11.3. Đặc điểm của EOF trong CE.
- 11.4. Giải thích ba thông số đặc trưng: t_m , số đĩa N và độ phân giải của CZE.
- 11.5. Tại sao trong CZE có độ phân giải cao hơn HPLC.
- 11.6. Nguyên nhân chính gây ra giải p
- 11.7. Nguyên tắc tách các phân tử trung hòa trong MEKC.
- 11.8. Tại sao gọi hạt mixen trong MEKC là pha tĩnh giả.
- 11.9. Giải thích biểu thức tính hệ số dung lượng k' và độ phân giải R_s trong MEKC.

- 11.10. Phân biệt điện di trên gel cổ điển với điện di mao quản gel CGE.
- 11.11. Hãy so sánh CEC với HPLC, CEC với CE.
- 11.12. So sánh hai cách tiêm mẫu trong CE. Đánh giá.
- 11.13. Tại sao cần điều nhiệt cho mao quản trong CE.
- 11.14. Trong điện di khi nào cần đổi chiều dòng EOF, giảm trị số EOF.
- 11.15. Đánh giá số lượng của CEC và CE.



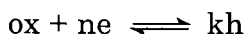
PHÂN TÍCH ĐO ĐIỆN THẾ

MỤC TIÊU

1. Giới thiệu được mạch điện hóa và nguyên tắc của phân tích đo thế.
2. Giải thích được đặc điểm hai loại điện cực chỉ thị: điện cực kim loại, điện cực màng (màng thủy tinh, màng lỏng, màng tinh thể) và tế bào đo khí.
3. Trình bày được ứng dụng của phân tích đo thế trực tiếp và chuẩn độ đo thế.

1. NGUYÊN TẮC

Phân tích đo điện thế là phương pháp xác định nồng độ các chất dựa vào sự thay đổi của thế điện cực được nhúng vào dung dịch phân tích. Phương pháp này ra đời sau khi có phương trình Nernst mô tả sự phụ thuộc định lượng của thế điện cực E vào hoạt độ các cấu tử của một bán phản ứng oxy hóa khử:



$$E = E^{\circ} + \frac{R.T}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{kh}}} = E^{\circ} + \frac{R.T}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]f_{\text{ox}}}{[\text{kh}]f_{\text{kh}}} \quad (12.1)$$

Ở đây:

E° : Điện thế oxy hóa - khử tiêu chuẩn của cặp ox-kh (V),

R: Hằng số khí lý tưởng ($8,314\text{J}^{\circ}\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$),

T: Nhiệt độ tuyệt đối ($^{\circ}\text{K}$),

F: Số Faraday (96485 coulomb),

n: Số electron tham gia trong cặp ox-kh,

$a_{\text{ox}}, a_{\text{kh}}$: Hoạt độ dạng oxy hóa và dạng khử,

$f_{\text{ox}}, f_{\text{kh}}$: Hệ số hoạt độ dạng oxy hóa và dạng khử,

$[\text{ox}], [\text{kh}]$: Nồng độ cân bằng dạng oxy hóa và dạng khử (mol/L).

Thay giá trị các hằng số R, F, nhiệt độ 25°C ($T = 298,15^{\circ}\text{K}$), đổi logarit Neper thành logarit thập phân ($\ln a = 2,303.\lg a$) chấp nhận hệ số hoạt độ $f_{\text{ox}} = f_{\text{kh}} \approx 1$, ta có phương trình Nernst ở dạng nồng độ cân bằng:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{[ox]}{[kh]} \quad (12.2)$$

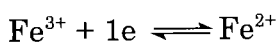
- Với điện cực là thanh kim loại M (ví dụ Ag, Cu, Cd, Pb, Zn...) nhúng vào dung dịch muối của nó thì:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,0592}{n} \lg [M^{n+}] \quad (12.3)$$

- Với dung dịch chứa 2 dạng ion có mức độ oxy hóa khác nhau của cùng một kim loại M, ví dụ M^{n+} và M^{m+} ($m > n$), phương trình Nernst có dạng:

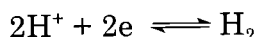
$$E = E^{\circ} + \frac{0,0592}{m-n} \lg \frac{[M^{m+}]}{[M^{n+}]} \quad (12.4)$$

Trong trường hợp này, người ta dùng một kim loại quý (bạch kim, vàng) nhúng vào dung dịch hòa tan 2 dạng M^{m+} và M^{n+} để tạo thành điện cực oxy hóa khử. Ví dụ:



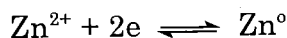
$$E = E^{\circ} + 0,0592 \lg \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]}$$

- Nếu trong phương trình (12.1) có chất khí tham gia vào bán phản ứng, thì áp suất riêng phần P của khí đó (tính bằng atm) thay cho hoạt độ của nó.



$$E = E^{\circ} + \frac{0,0592}{2} \lg \frac{[H^{+}]^2}{P_{H_2}} \quad (12.5)$$

- Khi có một chất rắn hay chất lỏng tinh khiết có thừa trong bán phản ứng, hoặc dung môi thì nồng độ của chúng được chấp nhận là 1.



$$E = E^{\circ} + \frac{0,0592}{2} \lg [Zn^{2+}] \quad (12.6)$$

Thế điện cực đo được từ hai phương trình (12.3) và (12.4) là số liệu cho phân tích đo điện thế.

2. CÁCH XÁC ĐỊNH THẾ ĐIỆN CỰC

Cho đến nay, chưa có phương pháp thực nghiệm nào đo giá trị tuyệt đối của thế điện cực. Để giải quyết khó khăn này người ta dùng cách so sánh. Chọn một điện cực có thế không đổi, ổn định làm điện cực chuẩn và đo sức điện động của pin galvanic tạo thành từ 2 điện cực: điện cực chuẩn và điện cực khảo sát. Điện cực hydro được chọn làm điện cực chuẩn và chấp nhận thế của



nó bằng không. Sức điện động (sđđ) của mạch điện hóa này (gồm điện cực hydro chuẩn và điện cực khảo sát) đặc trưng cho thế của điện cực khảo sát.

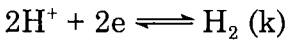
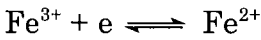
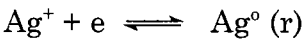
Trước khi nghiên cứu cách xác định thế điện cực, ta đi qua mạch điện hóa.

2.1. Mạch điện hóa (Electrochemical cell)

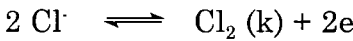
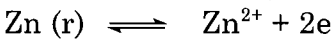
2.1.1. Cấu tạo

Mạch điện hóa được hình thành từ hai điện cực nhúng vào một dung dịch điện ly. Một điện cực được gọi là anod, ở đó xảy ra quá trình oxy hoá, điện cực kia là catod, ở đó xảy ra quá trình khử. Ví dụ:

– Quá trình khử catod:

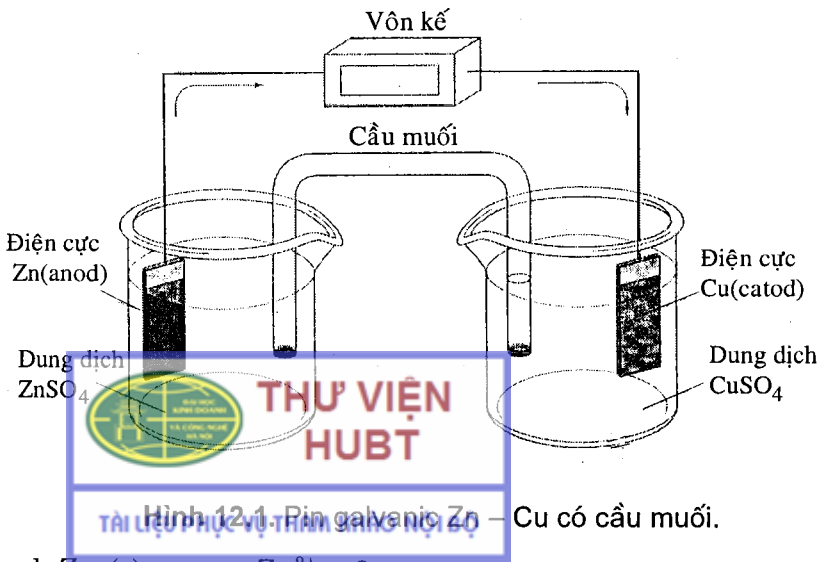


– Quá trình oxy hóa anod:

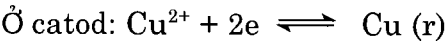


Ghi chú: r: thể rắn; k: thể khí;

Hình 12.1. trình bày một mạch điện hóa - pin galvanic - gồm điện cực Zn (anod) và điện cực Cu (catod).



Hình 12.1 - Pin galvanic Zn - Cu có cầu muối.



Electron từ anod Zn chuyển qua mạch ngoài sang catod Cu khi đóng mạch.

2.1.2. Phân loại mạch điện hóa

- Có thể phân mạch điện hóa ra hai loại:
 - + Mạch (pin) galvanic: Tạo ra năng lượng điện (nguồn điện),
 - + Mạch điện phân: Tiêu thụ năng lượng điện.

Hai loại này có thể chuyển đổi cho nhau. Ví dụ, pin galvanic ở hình 12.1 có sđđ là 1V. Bây giờ người ta cài vào mạch trên nguồn một chiều lớn hơn 1V, buộc electron di chuyển theo hướng ngược lại: Cu sẽ hòa tan tạo ra Cu^{2+} (oxy hóa anod), Zn^0 sẽ tạo thành (từ Zn^{2+}) trên điện cực (khử catod).

Mạch điện phân là cơ sở cho các kỹ thuật phân tích: cực phổ, von - ampe, đo coulomb.

2.1.3. Sơ đồ mạch điện hóa

Các nhà hóa học qui ước cách viết một mạch điện hóa như sau:

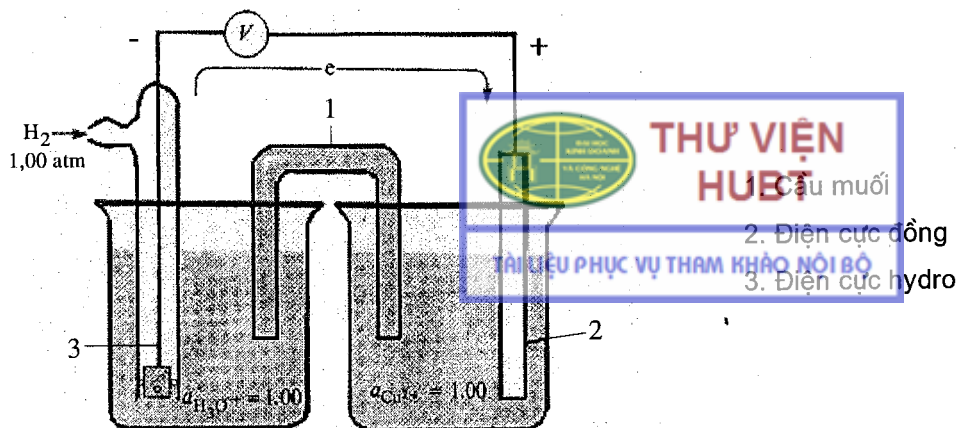
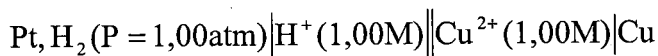
- Anod và các thông tin liên quan đến nó được viết ở bên trái. Catod được viết ở bên phải.
- Ranh giới giữa hai pha ở đây có phát triển thể được ghi bằng một vạch thẳng đứng.
- Nếu mạch có cầu muối được chỉ dẫn bằng 2 vạch song song thẳng đứng.

Có thể viết pin Daniell ở hình 12.1 như sau:



2.2. Cách xác định thế điện cực

Như trên đã trình bày, để đo thế điện cực của một bán phản ứng, người ta dùng mạch galvanic với điện cực hydro chuẩn làm so sánh. Trên hình 12.2 minh họa mạch điện hóa xác định điện thế của điện cực Cu. Có thể viết sơ đồ mạch:



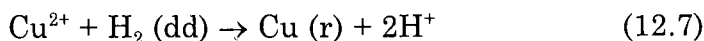
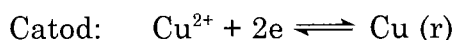
Hình 12.2. Sơ đồ pin galvanic đo thế điện cực Cu.

Cầu muối hình chữ U chứa dung dịch bão hòa của muối kali (ví dụ KCl) để giảm thiểu thể khuếch tán xuất hiện ở bề mặt tiếp xúc giữa hai dung dịch chất điện ly khác nhau, hoặc hai dung dịch cùng một chất điện ly nhưng nồng độ khác nhau.

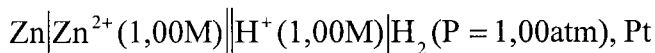
Điện cực hydro chuẩn là một bản kim loại platin mỏng phủ lớp bạch kim đen được nhúng vào dung dịch nước có $a_{H^+} = 1,00$ và áp suất riêng phần của khí hydro trên bề mặt dung dịch là 1atm.

Điện cực Cu gồm một sợi kim loại Cu nhúng vào dung dịch $CuSO_4$ có $a_{Cu^{2+}} = 1,00$. Cu có tính khử kém hơn hydro, nên đóng vai trò là catod trong mạch.

Phản ứng điện hóa ở hai điện cực:



Với các kim loại hoạt động hơn hydro như Zn, Cd,... Các kim loại này giữ vai trò anod, còn điện cực hydro sẽ là catod. Mạch điện hóa như sau:



Theo qui ước của IUPAC (Stockholm 1953) dấu của thể điện cực được xác định chính bằng dấu của điện cực này khi ghép với điện cực hydro chuẩn của mạch galvanic. Như vậy các kim loại hoạt động hơn hydro là dấu âm của mạch, thể của chúng sẽ mang dấu âm, các kim loại kém hoạt động hơn hydro, thể của chúng sẽ mang dấu dương.

3. ĐIỆN CỰC SO SÁNH

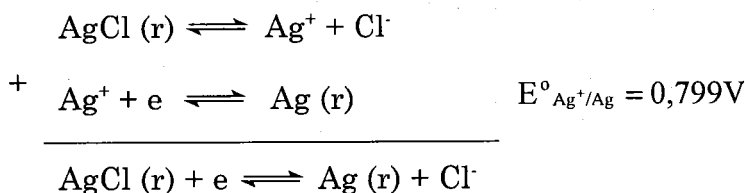
Trong nghiên cứu điện hoá, đã lựa chọn điện cực hydro chuẩn làm điện cực so sánh để thiết lập thang điện thế oxy hóa khử. Tuy nhiên, điện cực chuẩn hydro đòi hỏi những yêu cầu kỹ thuật chặt chẽ, không thích hợp với ứng dụng trong phân tích. Vì vậy, người ta lựa chọn những điện cực bền theo thời gian, lắp lại và tro với các thành phần trong dung dịch nghiên cứu. Hai điện cực calomel và bạc clorid đã ứng dụng được những yêu cầu này.

3.1. Điện cực bạc clorid

Điện cực này được chế tạo bằng sợi kim loại Ag có phủ lớp AgCl nhúng vào dd KCl. Hoạt độ của ion Ag^+ trong dd này được tính từ biểu thức tích số tan của AgCl:

$$T_{AgCl} = a_{Ag^+} \cdot a_{Cl^-} \Rightarrow a_{Ag^+} = \frac{T_{AgCl}}{a_{Cl^-}}$$

Ở đây a_{Cl^-} là hoạt độ của ion Cl^- trong dung dịch KCl. Quá trình khử catod bao gồm 2 phản ứng:



Viết phương trình Nernst cho quá trình này ở 25°C:

$$\begin{aligned} E_{\text{Ag}^+/\text{AgCl}} &= E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} + 0,0592 \cdot \lg a_{\text{Ag}^+} \\ &= E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} + 0,0592 \cdot \lg(T_{\text{AgCl}}/a_{\text{Cl}^-}) \\ &= \underbrace{E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} + 0,0592 \cdot \lg T_{\text{AgCl}}}_{E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{AgCl}}} - 0,0592 \cdot \lg a_{\text{Cl}^-} \end{aligned}$$

Hai số hạng đầu không đổi. Cho nên thế của điện cực bạc clorid phụ thuộc vào hoạt độ của ion Cl^- . Thay giá trị của $E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}$ và T_{AgCl} , ta có:

$$\begin{aligned} E_{\text{Ag}^+/\text{AgCl}} &= E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{AgCl}} - 0,0592 \cdot \lg a_{\text{Cl}^-} \\ &= 0,222 - 0,0592 \cdot \lg a_{\text{Cl}^-} \quad (12.8) \end{aligned}$$

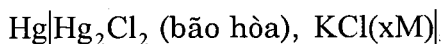
Thường dùng điện cực bạc clorid với dd KCl bão hòa hoặc 3,5M (xem bảng 12.1)

Bảng 12.1. Thế của điện cực so sánh (V).

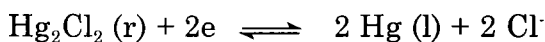
Nhiệt độ °C	Điện cực calomel			Điện cực bạc clorid	
	0,10M	3,5M	bão hoà	3,5M	bão hoà
15	0,3362	0,254	0,2251	0,212	0,209
20	0,3359	0,252	0,2479	0,208	0,204
25	0,3356	0,250	0,2444	0,205	0,199
30	0,3351	0,248	0,2411	0,201	0,194

3.2. Điện cực calomel

Điện cực calomel được chế tạo từ Hg kim loại, calomel (Hg_2Cl_2) và KCl:

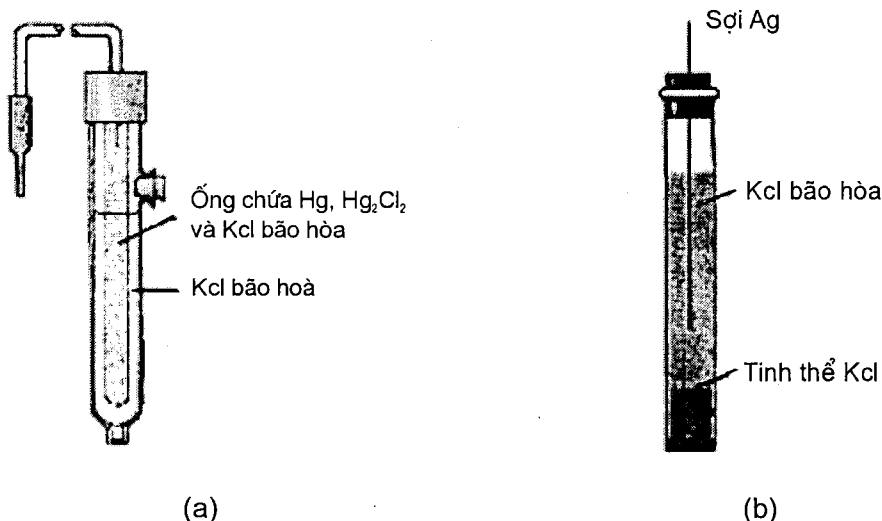


Hoạt độ của ion Hg_2^{2+} được tính từ biểu thức tích số tan của Hg_2Cl_2 tương tự như điện cực bạc clorid. Thế của điện cực calomel dựa vào bán phản ứng:



Cần lưu ý là tất cả điện cực đều có calomel bão hòa, chỉ nồng độ KCl khác nhau: 0,10M; 3,5M và bão hòa (bảng 12.1).

Trong phân tích đo điện thế thường người ta không quan tâm đến giá trị điện thế của điện cực so sánh, điều quan trọng là điện thế này phải không thay đổi. Vì vậy, người ta hay dùng điện cực so sánh loại bão hòa.



Hình 12.3. Điện cực so sánh calomel (a) và bạc clorid (b).

4. ĐIỆN CỰC CHỈ THỊ KIM LOẠI

Để sử dụng phương trình (12.3) và (12.4) cho phân tích đo điện thế cần chọn các điện cực chỉ thị thích hợp để tạo ra mạch galvanic. Điện cực chỉ thị cần đáp ứng các yêu cầu sau:

- Phải đáp ứng nhanh và lặp lại khi thay đổi nồng độ của chất cần phân tích.
- Đảm bảo độ bền hóa học, không tác dụng với các cấu tử khác trong dung dịch nghiên cứu.
- Có thể phân điện cực chỉ thị đo thế thành 2 nhóm: điện cực kim loại và điện cực màng. Bảng 12.2 giới thiệu điện cực chỉ thị kim loại. Với các điện cực này phải đảm bảo điều kiện nghiên cứu.

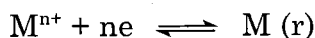
Bảng 12.2. Các loại điện cực chỉ thị kim loại

Loại	Mô tả	Ví dụ
Điện cực kim loại		
- Loại 1	Kim loại/ion kim loại	Ag/Ag^+
- Loại 2	Kim loại/muối kim loại bão hòa/anion	$\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$
- Oxy hóa - khử	Kim loại quý/cặp oxy-kh	$\text{Pt}/\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$ $\text{Pt}/\text{H}^+, \text{H}_2$

4.1. Điện cực loại một

Điện cực được chế tạo từ một bản hoặc dây kim loại nhúng vào dung dịch muối hòa tan của nó. Ví dụ: Ag/AgNO_3 ; $\text{Cd}/\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Tuy nhiên chỉ một số kim loại như bạc, thủy ngân, cadimi, kẽm, chì tạo được điện cực loại một, đáp ứng yêu cầu thuận nghịch và cho kết quả lặp lại. Nhiều kim loại khác như crom, coban, niken, sắt không cho kết quả lặp lại; điện cực nhôm không thuận nghịch (do tạo lớp oxyd mỏng trên bề mặt điện cực). Với một số kim loại, người ta dùng hỗn hợp kim loại thay cho kim loại để chế tạo điện cực - điện cực hỗn hợp - cho kết quả lặp lại tốt hơn.

Điện cực loại một được dùng để xác định nồng độ ion kim loại trong dung dịch:



Thế của điện cực chỉ thị E_i sẽ là:

$$E_i = E^\circ + \frac{0,0592}{n} \lg[\text{M}^{n+}] \quad (12.9)$$

(E° là điện thế chuẩn của cặp oxy hóa khử M^{n+}/M)

Đặt $pM = -\lg[\text{M}^{n+}]$ và thay vào phương trình trên, ta có:

$$pM = n(E^\circ - E_i)/0,0592 \quad (12.10)$$

Giá trị pM của ion kim loại M^{n+} thay đổi theo với điện thế E_i .

4.2. Điện cực loại hai

Các kim loại không chỉ được dùng làm điện cực chỉ thị đo thế cho ion của chúng mà còn đáp ứng với cả nồng độ anion. Các anion này tạo ra kết tủa ít tan hoặc phức chất rất bền vững.

- Hai điện cực so sánh bạc clorid và calomel thuộc điện cực loại hai. Ví dụ với điện cực bạc clorid:



Phương trình Nernst cho cân bằng trên:

$$E_i = E^\circ_{\text{AgCl}} - 0,0592 \lg[\text{Cl}^-] \quad (12.11)$$

Thay $p\text{Cl} = -\lg[\text{Cl}^-]$, ta có:

$$p\text{Cl} = (E_i - E^\circ_{\text{AgCl}})/0,0592$$

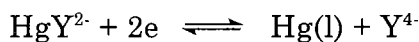
Giá trị $p\text{Cl}$ tỷ lệ thuận với thế điện cực E_i . Hai điện cực bạc clorid và calomel chỉ thị cho anion Cl^- .

- Điện cực thủy ngân complexonat:

Hg có thể dùng làm điện cực chỉ thị cho anion của complexon III: anion Y^{4-} . Điện cực này được hình thành khi kim loại Hg nhúng vào dung dịch có



phức thủy ngân complexonat HgY^{2-} hòa tan. Quá trình điện cực cho bán phản ứng này (ở 25°C) được mô tả như sau:



Điện thế E_i của điện cực chỉ thị:

$$E_i = E^\circ_{\text{HgY}^{2-}} - \frac{0,0592}{2} \lg \frac{a_{\text{Y}^{4-}}}{a_{\text{HgY}^{2-}}}$$

Khi phức HgY^{2-} có nồng độ thấp trong dung dịch, với hằng số bền của phức rất lớn ($K = 6,3 \cdot 10^{21}$), phức bền vững, nên hoạt độ của nó $a_{\text{HgY}^{2-}}$ gần như không đổi trên một khoảng rộng của hoạt độ Y^{4-} . Cho nên:

$$E_i = E^\circ_{\text{HgY}^{2-}} + \frac{0,0592}{2} \lg a_{\text{HgY}^{2-}} - \frac{0,0592}{2} \lg a_{\text{Y}^{4-}}$$

$$E_i = K - \frac{0,0592}{2} \lg a_{\text{Y}^{4-}} \quad (12.12)$$

Điện cực này chỉ thị cho $a_{\text{Y}^{4-}}$, có thể dùng để phát hiện điểm kết thúc phản ứng trong chuẩn độ complexon III.

4.3. Điện cực oxy hóa khử

Điện cực này được chế tạo từ một bản hay dây kim loại quý như bạch kim, vàng, palladi nhúng vào dung dịch hòa tan cả dạng oxy hóa và dạng khử của một cặp oxy hóa khử: ví dụ $\text{Pt/Ce}^{4+}, \text{Ce}^{3+}$

$$E_i = E^\circ + 0,059 \lg \frac{[\text{Ce}^{4+}]}{[\text{Ce}^{3+}]} \quad (12.13)$$

Cần nhấn mạnh rằng quá trình chuyển electron ở điện cực này thường xảy ra chậm, không đảm bảo tính thuận nghịch. Cho nên cần kiểm tra khi sử dụng điện cực chỉ thị oxy hóa khử.

5. ĐIỆN CỰC MÀNG

Ở mục 4 (trang 245), ta thấy điện thế của điện cực kim loại phát sinh ra từ phản ứng oxy hóa - khử xảy ra trên bề mặt kim loại. Trong điện cực màng chỉ thị, điện thế được hình thành từ cân bằng qua màng phân cách giữa dung dịch chuẩn ở trong màng và dung dịch phân tích ở ngoài màng. Dựa vào cấu tạo của màng có thể phân điện cực màng thành 3 nhóm lớn:

1. Điện cực màng tinh thể

- Loại đơn tinh thể: Ví dụ LaF_3 , điện cực đo F^- ,
- Loại đa tinh thể hay tinh thể hỗn hợp:

Ví dụ: Ag_2S , điện cực đo S^{2-} và Ag^+ .

2. Điện cực màng không tinh thể

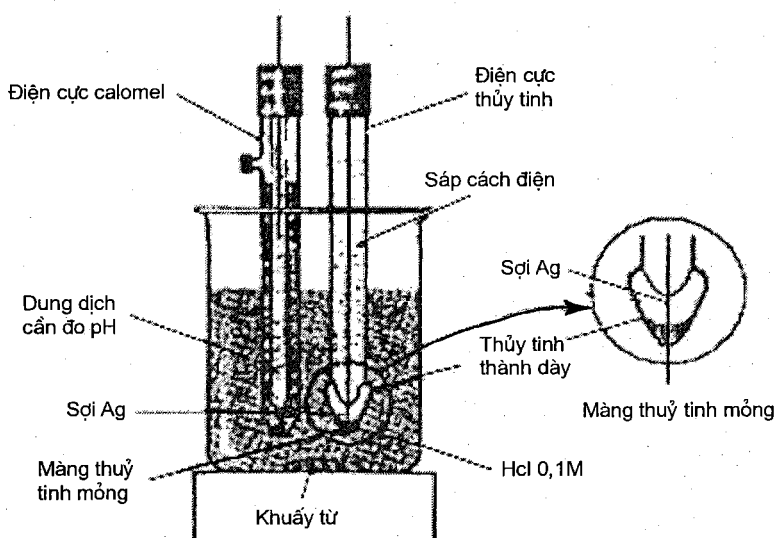
- Màng rắn thủy tinh: Điện cực chọn lọc H^+ , Na^+ ...
- Màng lỏng: Điện cực chọn lọc Ca^{2+} .

3. Nhóm tế bào đo khí CO_2 , NH_3 ,...

Ta xem xét kỹ hơn một vài loại điện cực màng thường gặp trong thực tế phân tích.

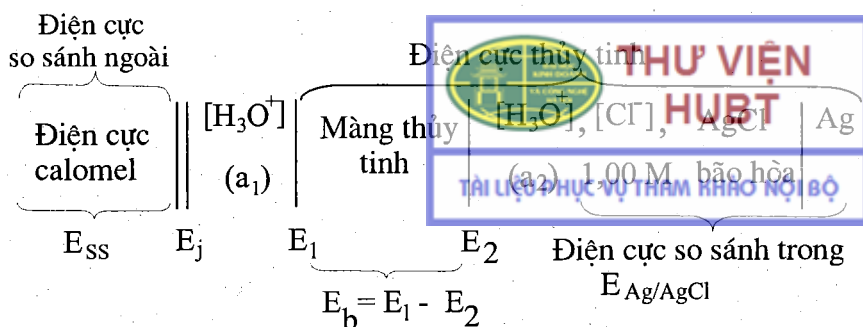
5.1. Điện cực thủy tinh đo pH

Điện cực bao gồm một bầu thủy tinh mỏng bên trong có điện cực bạc clorid và dung dịch HCl nồng độ xác định. Khi đo pH người ta sử dụng cặp điện cực calomel - thủy tinh nhúng vào dung dịch cần đo (hình 12.4).



Hình 12.4. Hệ điện cực calomel - thủy tinh đo pH.

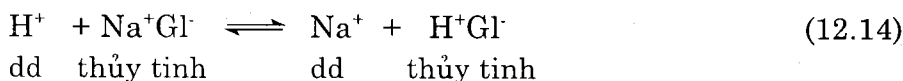
Có thể vẽ sơ đồ mạch đo pH ở trên như sau:



Dung dịch cần đo pH có hoạt độ ion H_3O^+ là a_1 .

- **Màng thủy tinh:**

- Thành phần thủy tinh của màng quyết định tính chọn lọc của nó. Thủy tinh có khoảng 22% Na_2O , 6% CaO và 72% SiO_2 chọn lọc với ion H^+ cho đến $\text{pH} \approx 9$. Ở $\text{pH} > 9$ nó đáp ứng với cả ion Na^+ và một số ion điện tích + 1. Hiện nay người ta còn dùng công thức khác: thay natri và calci bằng lithi và bari để chế tạo thủy tinh có tính chọn lọc cao hơn và bền hơn.
- Khi hai mặt của màng thủy tinh được hydrat hóa sẽ xuất hiện quá trình trao đổi ion giữa các cation + 1 trong màng thủy tinh và proton của dung dịch.



Gl^- là các vị trí mang điện tích âm ở bề mặt thủy tinh.

- Màng thủy tinh dẫn điện là nhờ sự di chuyển của ion Na^+ ở trong màng thủy tinh và ion H^+ ở bề mặt hydrat hóa (gel interfaces). Bề dày của màng thủy tinh dao động trong khoảng $0,03 \div 0,1\text{mm}$, có điện trở $50 \div 500\text{M}\Omega$.

- **Thế màng**

Sơ đồ cuối trang 246 chỉ rõ 4 thế phát triển trong mạch đo pH với điện cực thủy tinh.

- *Thế khuếch tán E_j* (junction potential): Thế này luôn có mặt trong mạch đo thế bất nguồn từ:
 - + Vận tốc khuếch tán khác nhau qua bề mặt ngăn cách,
 - + Phân bố nồng độ cation và anion không đều dọc theo bề mặt ngăn cách của hai dung dịch.
 - + Chênh lệch nồng độ hai dung dịch ở hai bên màng.

Tùy thuộc điện tích của ion, linh độ của chúng, nồng độ của dung dịch cũng như bản chất của dung môi; điện thế E_j thay đổi trong giới hạn rộng, có thể đến hàng chục mV. Sử dụng cầu muối là một biện pháp giảm thiểu ảnh hưởng của thế E_j đến phép đo sdd. Ở đây việc liên kết giữa hai điện cực trong mạch galvanic không thực hiện trực tiếp, mà qua trung gian nhờ một dung dịch chất điện ly nồng độ cao như KCl , NH_4NO_3 hoặc KNO_3 . Thường dùng nhất là cầu muối KCl bão hòa.

- *Thế tiếp xúc E_b* (boundary potential)

E_b bắt nguồn từ thế E_1 và thế E_2 xuất hiện ở 2 bên màng: Trị số E_1 được xác định bằng tỷ số hoạt độ H^+ trong dung dịch phân tích và hoạt độ H^+ trong lớp bề mặt hydrat hóa của điện cực. Còn trị số E_2 liên quan đến tỷ số hoạt độ H^+ của dung dịch trong bầu thủy tinh và hoạt độ H^+ ở lớp bề mặt bên trong của bầu thủy tinh.

$$E_1 = j_1 + 0,0592 \lg a_1/a_1'$$

$$E_2 = j_2 + 0,0592 \lg a_2/a_2'$$

Ở đây: j_1 và j_2 là hai hằng số,

a_1 và a_2 là hoạt độ ion H^+ tương ứng của dung dịch cần đo và dung dịch trong bầu thủy tinh,

a_1' và a_2' là hoạt độ ion H^+ ở lớp bề mặt hydrat hóa của 2 phía: phía trong và phía ngoài ngoài bầu thủy tinh.

Mặt khác, nếu tất cả ion Na^+ trên hai bề mặt đã được thay thế bằng ion H^+ , thì $j_1 = j_2$ và hai hoạt độ a_1' và a_2' cũng bằng nhau, ta có:

$$E_b = E_1 - E_2 = 0,0592 \lg a_1/a_2 \quad (12.15)$$

Nếu bảo đảm hai bề mặt hydrat hóa giống nhau thì thế E_b chỉ phụ thuộc vào hoạt độ H^+ của dung dịch cần đo a_1 , còn hoạt độ a_2 trong bầu thủy tinh không thay đổi nên ta có thể viết rút gọn lại:

$$E_b = L' - 0,0592 \text{ pH} \quad (12.16)$$

Ta nhận thấy thế E_b thay đổi theo trị số pH của dung dịch cần đo.

– *Thế của hai điện cực so sánh:* E_{ss} là thế của điện cực calomel còn $E_{Ag/AgCl}$ là thế của điện cực bạc clorid trong điện cực thủy tinh.

– *Thế bất đối xứng E_{as} :*

Ngoài bốn trị số điện thế trên hình 12.4, khi đo pH với điện cực thủy tinh, còn có thế bất đối xứng E_{as} . Thế này bắt nguồn từ sự không đồng nhất giữa 2 mặt: mặt trong và mặt ngoài của điện cực thủy tinh, do quá trình sản xuất và sử dụng tạo nên. Để giảm thiểu ảnh hưởng của E_{as} , cần hiệu chuẩn điện cực với các dung dịch chuẩn pH.

Từ khảo sát ở trên, ta thấy điện thế của điện cực thủy tinh E_{tt} có ba thành phần.

$$E_{tt} = E_b + E_{Ag/AgCl} + E_{as}$$

Thay giá trị E_b từ phương trình (12.16) ta thu được:

$$\begin{aligned} E_{tt} &= L' + 0,0592 \lg a_1 + E_{Ag/AgCl} + E_{as} \\ E_{tt} &= L - 0,0592 \text{ pH} \end{aligned} \quad (12.17)$$

Trị số L là tổ hợp của ba hằng số: L' , E_{as} và $E_{Ag/AgCl}$. Phương trình (12.17) tương tự như phương trình (12.11) và (12.12).

5.2. Điện cực thủy tinh cho ion kim loại M^+

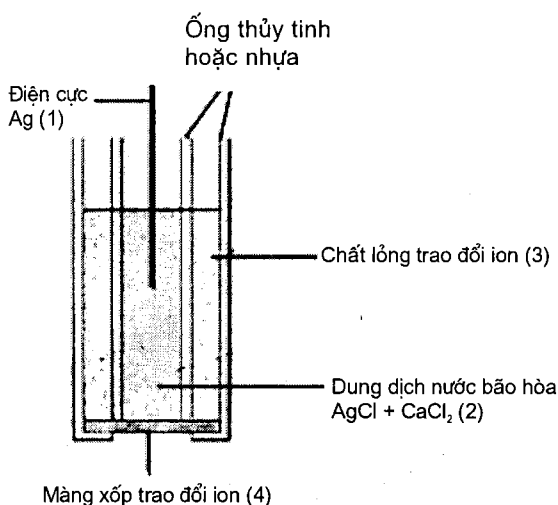
Một số nghiên cứu thay đổi thành phần thủy tinh chọn lọc với các ion khác ngoài proton. Thủy tinh có thêm Al_2O_3 hoặc B_2O_3 cho kết quả mong

muối, đáp ứng với nhiều ion điện tích +1 như Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ . Hiện một số điện cực thủy tinh loại này đã có mặt trên thị trường.

5.3. Điện cực màng lỏng

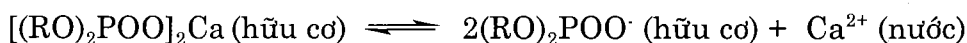
Bên cạnh màng rắn, người ta còn dùng loại màng lỏng là một lớp chất hữu cơ lỏng không hòa lẫn với nước. Thế được phát triển qua ranh giới tiếp xúc giữa một bên dung dịch hòa tan ion cần phân tích và bên kia chất lỏng trao đổi ion liên kết chọn lọc với ion phân tích.

Hình 12.5 mô tả sơ đồ cấu tạo điện cực màng lỏng Ca^{2+} . Ở bên trong có một điện cực bạc clorid (1) nhúng vào dung dịch có hòa tan CaCl_2 (2). Màng lỏng là chất lỏng trao đổi ion. Đó là muối calci dialkyl phosphat (rất ít tan trong nước), được hòa tan trong dung môi hữu cơ (3). Dung dịch này ngăn cách với dung dịch phân tích bằng màng xốp trao đổi ion (4)



Hình 12.5. Sơ đồ điện cực màng lỏng calci

Cân bằng trao đổi ion Ca^{2+} ở một phía của màng:



R là gốc alkyl có 8 ÷ 16 carbon. Thế xuất hiện qua màng tương tự như điện cực thủy tinh, phụ thuộc vào hoạt độ ion ở 2 phía của màng a_1 và a_2 (phương trình 12.15). Nhưng nồng độ ion Ca^{2+} trong điện cực không đổi nên thế tiếp xúc E_b phụ thuộc chỉ vào hoạt độ ion Ca^{2+} trong dung dịch phân tích.

$$E_b = K' + \frac{0,0592}{2} \lg a_{\text{Ca}^{2+}}$$

$$= K' - \frac{0,0592}{2} p\text{Ca} \quad (12.18)$$

K' là hằng số. Phương trình (12.18) tương tự phương trình (12.16) của điện cực thủy tinh.

Điện cực màng lỏng Ca^{2+} là một công cụ giá trị phục vụ nghiên cứu y sinh học, xác định hoạt độ của ion Ca^{2+} . Bởi vì ion này có vai trò quan trọng trong hoạt động của các cơ quan thần kinh, cơ tim, thận và hình thành xương trong cơ thể người.

5.4. Điện cực màng tinh thể

Trong màng rắn thủy tinh tồn tại những vị trí mang điện tích âm dẫn điện chọn lọc đối với một số cation +1. Tương tự như vậy, màng có vị trí mang điện tích dương sẽ đáp ứng chọn lọc với anion. Từ đây xuất phát ý tưởng chế tạo các màng có muối ít tan, bởi vì muối này sẽ liên kết chọn lọc với anion của nó. Vấn đề đặt ra là tìm cách chế tạo màng bền vững, dẫn điện tốt và không bị ăn mòn trong quá trình sử dụng.

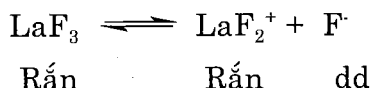
5.4.1. Màng đa tinh thể

Màng này được chế tạo từ các hạt (pellets) muối bạc ít tan halogenid (AgX) hoặc sulfid (Ag_2S) chọn lọc với anion X^- và S^{2-} tương ứng.

Màng tinh thể hỗn hợp của PbS , CdS và CuS với Ag_2S tạo cho màng chọn lọc với Pb^{2+} , Cd^{2+} và Cu^{2+} . Ion Ag^+ trong các màng này đủ linh động để dẫn điện qua môi trường rắn. Thế xuất hiện qua điện cực màng tinh thể tương tự như qua điện cực màng lỏng.

5.4.2. Màng đơn tinh thể

Điện cực fluorid là điện cực điển hình được chế tạo từ đơn tinh thể lantan fluorid LaF_3 có thêm muối europi fluorid EuF_2 , có thể chọn lọc với anion F^- qua màng LaF_3 tương tự như đối với màng thủy tinh:



Mức độ hình thành điện tích dương LaF_2^+ của màng tùy thuộc vào nồng độ của anion F^- trong dung dịch.

Điện cực F^- có thể hoạt động trong khoảng nhiệt độ rộng, có thể đến 80°C với dung dịch có pH 5÷8. Đáp ứng tuyến tính đến 10^{-6}M (0,02ppm).

Bảng 12.3 giới thiệu khoảng nồng độ tuyến tính của ion (pI) có thể đo được của một số điện cực màng chọn lọc ion.



Bảng 12.3. Một số điện cực màng chọn lọc ion.

Ion	Khoảng nồng độ (pI)	Ion cản trở chính
<i>Màng lỏng:</i>		
Ca ²⁺	0 ÷ 7	Pb ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺ , Hg ²⁺ , Sr ²⁺
K ⁺	0 ÷ 6	Co ⁺ , NH ₄ ⁺ , Ti ⁺
Cl ⁻	0 ÷ 5,3	I ⁻ , OH ⁻ , SO ₄ ²⁻
NO ₃ ⁻	0 ÷ 5,2	ClO ₄ ⁻ , I ⁻ , ClO ₃ ⁻ , CN ⁻ , Br ⁻
ClO ₄ ⁻	0 ÷ 5,2	I ⁻ , ClO ₃ ⁻ , CN ⁻ , Br ⁻
<i>Màng rắn:</i>		
Cd ²⁺	1 ÷ 7	Fe ²⁺ , Pb ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Cu ²⁺
Pb ²⁺	1 ÷ 6	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Cu ²⁺
Cu ²⁺	1 ÷ 8	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Cd ²⁺
Cl ⁻	0 ÷ 4,3	CN ⁻ , I ⁻ , Br ⁻ , S ²⁻
CN ⁻	2 ÷ 6	S ²⁻
F ⁻	bão hòa ÷ 6	OH ⁻
I ⁻	0 ÷ 7,3	
SCN ⁻	0 ÷ 5,3	I ⁻ , Br ⁻ , CN ⁻ , S ²⁻

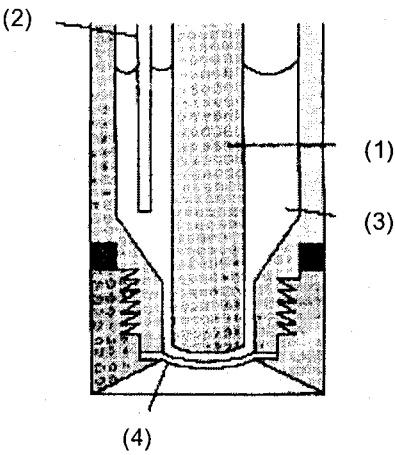
5.5. Tế bào đo khí

Hình 12.6 giới thiệu nguyên tắc cấu tạo một tế bào đo khí. Tế bào là một ống có hai điện cực: một điện cực chỉ thị (1) và một điện cực so sánh (2).

Hai điện cực nhúng vào một dung dịch điện ly (3). Ở đáy ống có một màng mỏng, thấm khí nhưng không thấm nước ngăn cách với dung dịch cần đo (4).

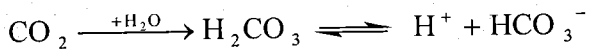
Khí CO₂ hoặc NH₃ được khuếch tán vào dung dịch ngoài màng. Trong trường hợp này điện cực chỉ thị (1) là điện cực thủy tinh. Khí CO₂ sẽ tạo cân bằng qua màng với 3 giai đoạn:

1. Khí CO₂ khuếch tán từ dung dịch ngoài màng vào tế bào đo cho đến khi nồng độ ở dung dịch hai phía màng như nhau.



Hình 12.6. Sơ đồ nguyên tắc cấu tạo tế bào đo khí

2. Trong dung dịch CO_2 sẽ tạo acid H_2CO_3 điện ly thành ion:



$$K_2 = (a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{HCO}_3^-}) / a_{\text{H}_2\text{CO}_3}$$

Nhưng $a_{\text{H}_2\text{CO}_3}$ phụ thuộc vào lượng CO_2 hòa tan tức là áp suất của nó p_{CO_2} trong mẫu. Cho nên có thể viết hằng số cân bằng cho giai đoạn 2:

$$K = (a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{HCO}_3^-}) / p_{\text{CO}_2} \quad (\text{mẫu đo}) \quad (12.19)$$

3. Nếu dung dịch trong màng có hoạt độ ion HCO_3^- không đổi (ví dụ cho muối NaHCO_3 nồng độ cao) thì hoạt độ ion H^+ của dung dịch trong màng sẽ là:

$$\begin{aligned} a_{\text{H}^+} &= (K / a_{\text{HCO}_3^-}) \cdot p_{\text{CO}_2} \quad (\text{mẫu đo}) \\ &= K_g \cdot p_{\text{CO}_2} \end{aligned} \quad (12.20)$$

Thay giá trị của a_{H^+} từ (12.20) vào phương trình (12.17) của điện cực thủy tinh, ta có:

$$\begin{aligned} E_{\text{tt}} &= L + 0,0592 \cdot \lg (K_g \cdot p_{\text{CO}_2}) \\ &= L' + 0,0592 \cdot \lg p_{\text{CO}_2} \end{aligned} \quad (12.21)$$

Như vậy, điện cực thủy tinh chỉ thị cho lượng CO_2 đã khuếch tán vào dung dịch đo. Bằng cách đo pH dung dịch có thể xác định được nồng độ CO_2 .

Việc xác định nồng độ khí NH_3 cũng theo nguyên tắc tương tự khí CO_2 . Cần nhấn mạnh rằng sdd của cặp điện cực thủy tinh - điện cực so sánh nhúng vào dung dịch trong tế bào đo thay đổi phụ thuộc vào nồng độ khí CO_2 hoặc NH_3 trong dung dịch ngoài màng thấm khí. Đây là một tế bào đo khí - pin galvanic - không phải là một điện cực đo khí.

Bảng 12.4 thống kê một số tế bào đo khí hiện có trên thị trường, hoạt động theo nguyên tắc tương tự với CO_2 : một điện cực màng chỉ thị kết hợp một điện cực so sánh.

Bảng 12.4. Một số tế bào đo khí.

Khí	Cân bằng ở dung dịch trong màng	Điện cực đo
NH_3	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	Thủy tinh, pH
CO_2	$\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{HCO}_3^-$	Thủy tinh, pH
HCN	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{CN}^-$	Ag_2S , pCN
HF	$\text{HF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{F}^-$	LaF_3 , pF
H_2S	$\text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}_3\text{O}^+ + \text{S}^{2-}$	Ag_2S , pS
SO_2	$\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$	Thủy tinh, pH

6. SO SÁNH ĐIỆN THẾ

Sử dụng phương trình Nernst để xác định nồng độ ion tham gia phản ứng có thể được thực hiện theo hai cách:

- Đo so sánh: Dựa vào sđđ của mạch galvanic tính ra nồng độ của ion.
- Chuẩn độ đo điện thế (đo gián tiếp): Dựa vào sự biến đổi của sức điện động (ΔE) trong quá trình chuẩn độ để xác định điểm kết thúc phản ứng và tính ra nồng độ ion.

Trước kia, khi có điện cực thủy tinh, so sánh điện thế được dùng để đo pH của dung dịch. Ngày nay với việc xuất hiện nhiều loại điện cực chọn lọc, nên kỹ thuật này đã trở nên phổ biến hơn.

6.1. Nguyên tắc chung

Xác định nồng độ của một ion hay phân tử được thực hiện bằng cách so sánh thế của điện cực chỉ thị trong dung dịch thử với thế của nó trong một hay một số dung dịch chuẩn của chất phân tích.

Theo qui ước của IUPAC: Trong đo điện thế, điện cực chỉ thị luôn luôn được chấp nhận là catod, còn điện cực so sánh là anod. Thế của mạch đo E_m - tức là sđđ của pin galvanic - là tổng thế của hai điện cực và thế khuếch tán E_j :

$$E_m = E_i - E_{ss} + E_j \quad (12.22)$$

- Theo phương trình (12.10) và (12.17), thế của điện cực chỉ thị E_i cho cation M^{n+} có dạng:

$$E_i = L - \frac{0,0592}{n} \text{pM} \quad (12.23)$$

L là hằng số (đối với điện cực chọn lọc) hoặc là điện thế tiêu chuẩn E° (đối với điện cực kim loại). Đưa phương trình (12.23) vào phương trình (12.22) và sắp xếp lại ta được:

$$\text{pM} = -\lg a_M = \frac{E_m - (E_j - E_{ss} + L)}{0,0592/n}$$

Ba số hạng trong ngoặc là hằng số được ký hiệu là hằng số K :

$$\text{pM} = -\frac{E_m - K}{0,0592/n} \quad (12.24)$$

- Đối với anion A^{n-} dựa vào phương trình (12.11) và (12.12) ta có thể viết:

$$E_i = E^\circ + \frac{0,0592}{n} \text{pA}$$

Đưa phương trình này vào phương trình (12.22), sắp xếp lại ta có:

$$pA = \frac{E_m - K}{0,0592/n} \quad (12.25)$$

6.1.1. Hiệu chuẩn điện cực

Hai phương trình (12.24) và (12.25) được dùng để tính pM và pA trong phép đo so sánh. Cần đánh giá bằng thực nghiệm trị số K với một hay một số dung dịch chuẩn của chất phân tích. Người ta gọi là hiệu chuẩn điện cực. Thực tế là xác định hằng số K trong hai phương trình trên. Với giả thiết rằng trị số K không thay đổi khi dung dịch phân tích được đưa vào mạch đo thay cho dung dịch chuẩn, có thể tính được pM hoặc pA của dung dịch phân tích.

Ví dụ: Hiệu chuẩn một điện cực chọn lọc Mg^{2+} với dung dịch chuẩn có hoạt độ ion Mg^{2+} là $a = 1,77 \cdot 10^{-3}M$, thế đo được $E = 0,411V$. Một dung dịch X được đo với điện cực trên cho $E_x = 0,439V$. Tính hoạt độ a_x ?

- Tính giá trị K theo phương trình (12.24):

$$\lg a = -\frac{E_m - K}{0,0592/2} \rightarrow -\lg(1,77 \cdot 10^{-3}) = \frac{K - 0,411}{0,0296}$$

$$\rightarrow K = 0,3295$$

- Tính pM theo (12.24):

$$-\lg a_x = pM = -\frac{0,439 - 0,3295}{0,0296} = -3,699$$

$$\rightarrow a_x = 2,00 \cdot 10^{-4}M$$

6.1.2. Xác định bằng thêm chuẩn

Cách này được thực hiện bằng đo điện thế của dung dịch cần phân tích trước và sau khi thêm một thể tích xác định của dung dịch chuẩn. Để ít làm thay đổi lực ion, người ta thường cho vào dung dịch một lượng lớn chất điện ly.

Ví dụ: Đo sdd của mạch galvanic gồm điện cực calomel và điện cực chọn lọc Pb^{2+} được nhúng vào 50,0mL dung dịch hòa tan Pb^{2+} . Thế đo được $E_1 = -0,4706V$. Sau khi thêm vào 5,00mL dung dịch chuẩn chì nồng độ 0,0200M, thế đo được $E_2 = -0,4490V$. Tính nồng độ M của chì trong mẫu.

Theo phương trình (12.24):

$$-\lg[Pb^{2+}] = -\frac{E_1 - K}{0,0592/2}$$

Sau khi thêm 5,00mL dung dịch chuẩn:

$$-\lg \frac{50,0 \cdot [Pb^{2+}] + 5,00 \cdot 0,0200}{50,0 + 5,00} = -\frac{E_2 - K}{0,0592/2} \quad (b)$$

Lấy hiệu số (b) - (a) ta có:

$$-\lg \frac{[\text{Pb}^{2+}]}{0,909. [\text{Pb}^{2+}] + 1,818.10^{-3}} = -\frac{2(E_2 - E_1)}{0,0592} = 0,7297$$

Từ đây ta có: $[\text{Pb}^{2+}] = 4,08.10^{-4}\text{M}$

6.1.3. Đánh giá

Cách đo so sánh có ưu điểm là thực hiện nhanh, đơn giản và có thể kiểm soát liên tục pM. Tuy nhiên độ tin cậy của phép đo bị hạn chế. Sai số bắt nguồn từ thế khuếch tán E_j . Thế này không kiểm soát được và sai số do nó gây ra không thể được loại trừ hoàn toàn.

6.2. Đo pH với điện cực thủy tinh

Hình 12.4 mô tả mạch đo pH với cặp điện cực calomel - thủy tinh. Giá trị pH đo bằng thực nghiệm, theo IUPAC, dựa trên cơ sở hiệu chuẩn máy đo pH bằng các *dung dịch đệm chuẩn*, tiếp đến là đo pH của dung dịch phân tích. Bảng 12.5 thống kê một số đệm chuẩn theo NIST.

Bảng 12.5. Giá trị pH của một số đệm chuẩn

Thành phần dung dịch	pH ở	
	25°C	30°C
Kali tartrat bão hoà	3,557	3,552
Kali dihydro citrat 0,05M	3,776	3,766
Kali hydro phthalat 0,05M	4,008	4,015
KH_2PO_4 0,025M/ Na_2HPO_4 0,025M	6,865	6,853
Natri tetraborat 0,01M	9,180	9,139
NaHCO_3 0,025M/ Na_2CO_3 0,025M	10,012	9,966

6.2.1. Định nghĩa pH

Khi đo pH theo hệ thủy tinh - calomel nhúng vào dung dịch đệm chuẩn ở 25°C có thể là E_s , theo phương trình (12.24):

$$pH_s = -\frac{E_s - K}{0,0592} \quad (a)$$

Khi thay đệm chuẩn bằng dung dịch X trong hệ thủy tinh - calomel ở trên thì pH_x của dung dịch X là:

$$pH_x = -\frac{E_x - K}{0,0592} \quad (b)$$

Lấy (b) - (a) ta có:

$$pH_x = pH_s - \frac{(E_x - E_s)}{0,0592} \quad (12.26)$$

Phương trình (12.26) được nhiều nước chấp nhận: đó là định nghĩa pH đo bằng thực nghiệm.

6.2.2. Sai số đo pH bằng điện cực thủy tinh

Kiểm soát pH là công việc thường gặp trong phòng thí nghiệm, đặc biệt đối với các phản ứng tạo ra hoặc tiêu thụ H^+ , hoặc đối tượng nghiên cứu chịu tác động của pH. Có thể kể ra đây vài ví dụ:

- Ghi phổ hấp thụ UV-VIS của các chất hữu cơ có tính acid-base,
- Chuẩn độ bằng complexon III,
- Nghiên cứu sự tạo phức kim loại với phối tử acid hữu cơ.

Trong những trường hợp này thường tiến hành thực nghiệm trong môi trường đệm và kiểm soát pH dung dịch. Tuy nhiên việc đo pH có những hạn chế. Có nhiều yếu tố gây sai số cho phép đo, giảm độ tin cậy của kết quả. Những yếu tố đó liên quan đến điện cực, đến dung dịch đệm chuẩn hoặc dung dịch cần đo pH.

▪ Các yếu tố liên quan đến điện cực:

Ba yếu tố chính tác động đến phép đo pH liên quan đến điện cực thủy tinh:

- **Sai số kiềm:** Điện cực thủy tinh trở nên đáp ứng nhạy hơn với các ion kim loại kiềm, làm cho trị số đo pH thấp hơn giá trị thực của nó khi pH của dung dịch đo trên 9. Giới hạn tối đa đo được tùy thuộc vào chất lượng điện cực. Một số hãng sản xuất đã cho ra đời những điện cực thủy tinh có thể đo pH đến 11 ÷ 12 với màng thủy tinh mà một phần của natri và calci đã được thay thế bằng lithi và bari.
- **Sai số acid:** Ở pH < 0,5, trị số pH đo được thường lớn hơn trị số thực của nó. Nguyên nhân chưa được làm rõ.
- **Khử hydrat hóa (dehydration):** Màng thủy tinh bị mất lớp hydrat hóa sẽ gây sai số đo pH.

▪ Yếu tố liên quan đến dung dịch đo

Thế khuếch tán E_j liên quan đến sự khác nhau giữa thành phần của dung dịch đệm chuẩn và dung dịch đo là nguyên nhân quan trọng dẫn đến sự không tin cậy của phép đo pH. Sai lệch này không thể hiệu chỉnh được. Cho nên độ đúng của phép đo khó vượt qua 0,01 đơn vị pH.

Ngoài ra khi đo với các dung dịch trung tính (pH ≈ 7) không được đệm nên cân bằng ở lớp bề mặt màng và trong lòng dung dịch diễn ra rất chậm. Vì vậy cần xử lý điện cực hợp lý và cần đợi thời gian đạt đến cân bằng.



- Sai số liên quan đến đệm chuẩn:

Đệm chuẩn liên quan trực tiếp đến hiệu chuẩn điện cực. Vì vậy sai lệch của đệm chuẩn sẽ gây sai số đo pH. Đó là:

- Pha chế không chính xác đệm chuẩn,
- Thay đổi thành phần do sử dụng, do vi khuẩn tác động đến các chất hữu cơ trong dung dịch đệm.

6.2.3. Đánh giá

Cặp điện cực thủy tinh - calomel thường được dùng để đo pH của dung dịch vì có nhiều ưu điểm:

- Đo được pH của dung dịch hòa tan các chất oxy hoá, chất khử mạnh, các chất khí hoặc protein.
- Đo được dung dịch có độ nhớt cao
- Có thể chế tạo được điện cực rất nhỏ (vi điện cực) để kiểm soát pH của một giọt dung dịch, của mồ hôi trên da, có thể cài vào dòng chảy theo dõi liên tục giá trị pH.

Một số yếu tố tác động đến độ tin cậy của phép đo pH cho nên cần luôn luôn lưu ý lúc thao tác, sử dụng thiết bị.

7. CHUẨN ĐỘ ĐO THỂ

Trong cách đo so sánh cần xác định giá trị tuyệt đối của thế điện cực một cách chính xác để tính ra nồng độ. Trong chuẩn độ đo thế, không cần biết chính xác giá trị điện thế, mà quan tâm đến sự biến đổi của nó để xác định điểm kết thúc của phản ứng chuẩn độ. Vì vậy khi chuẩn độ người ta đưa vào dung dịch một điện cực chỉ thị thích hợp và một điện cực so sánh. Sự thay đổi nồng độ trong quá trình chuẩn độ thể hiện ở sự thay đổi thế của điện cực chỉ thị.

Có thể dùng các phản ứng: trung hoà, oxy hóa khử, tạo phức và kết tủa cho chuẩn độ đo thế.

* Ưu điểm của chuẩn độ đo thế:

Trong cùng điều kiện, chuẩn độ đo thế có ưu điểm hơn chuẩn độ dùng chỉ thị màu hóa học (nhìn mắt).

- Độ nhạy cao hơn, có thể chuẩn độ dung dịch có nồng độ thấp hơn.
- Tránh sai số chủ quan khi phát hiện điểm kết thúc chuẩn độ bằng mắt thường.
- Có thể chuẩn độ dung dịch có màu, đục, chuẩn độ phân riêng hỗn hợp có nhiều thành phần.
- Có thể tự động hóa việc chuẩn độ đo điện thế.

* *Yêu cầu của một phản ứng dùng cho chuẩn độ đo thế:*

Tương tự như trong phương pháp chuẩn độ nhìn mắt, phản ứng hóa học dùng cho chuẩn độ đo thế phải:

- Có tốc độ phản ứng đủ lớn.
- Xảy ra hợp thức theo một chiều xác định.
- Không có phản ứng phụ.

Ngoài ra trong chuẩn độ đo thế cần có điện cực chỉ thị thích hợp để phát hiện bước nhảy thế liên quan đến sự xuất hiện một phản ứng điện hóa khác trên bề mặt điện cực tiếp xúc với dung dịch.

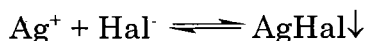
7.1. Chuẩn độ đo thế không dòng ($I=0$)

Đây là kỹ thuật cổ điển: trong quá trình chuẩn độ người ta đo sức điện động của mạch galvanic không có dòng đi qua ($I=0$). Chuẩn độ này có thể thực hiện với các phản ứng có bản chất hóa học khác nhau:

7.1.1. Chuẩn độ acid base: Cần điện cực chỉ thị cho sự thay đổi pH của dung dịch. Thường dùng cặp điện cực thủy tinh - calomel.

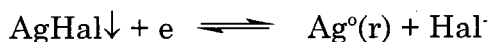
7.1.2. Chuẩn độ kết tủa: Để chuẩn độ halogenid bằng ion Ag^+ người ta dùng điện cực bạc clorid làm chỉ thị.

- Phản ứng hóa học chuẩn độ :



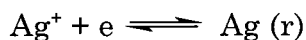
$$T = [\text{Ag}^+][\text{Hal}^-] \quad (12.27)$$

- Phản ứng điện hóa trước điểm tương đương:



$$E_1 = E_1^0 - 0,0592 \lg [\text{Hal}^-] \quad (12.28)$$

- Phản ứng điện hóa sau điểm tương đương:



$$E_2 = E_2^0 + 0,0592 \lg [\text{Ag}^+] \quad (12.29)$$

Do điện cực bạc thuận nghịch với ion Ag^+ , nên ở cùng một nồng độ của ion Ag^+ hai phương trình (12.28) và (12.29) có giá trị như nhau: $E_1 = E_2$ cho nên:

$$E_1^0 = E_2^0 + 0,0592 \lg T \quad (12.30)$$

Như vậy sự khác nhau thế trước và sau điểm tương đương ứng với bước nhảy thế là:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = E_2^0 + 0,0592 \lg [\text{Ag}^+] - (E_2^0 + 0,0592 \lg T) + 0,0592 \lg [\text{Hal}^-]$$

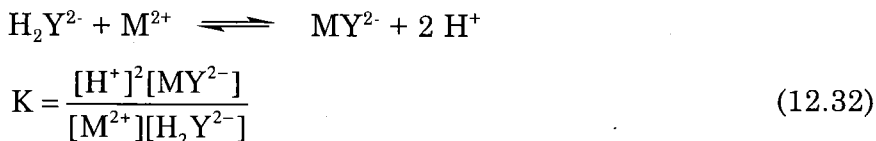
Nếu trước và sau điểm tương đương nồng độ của ion $[\text{Ag}^+] \approx [\text{Hal}^-] = 10^{-4}$ thì:

$$\Delta E = 0,0592 \lg 10^{-8} - 0,059 \lg T \quad (12.31)$$

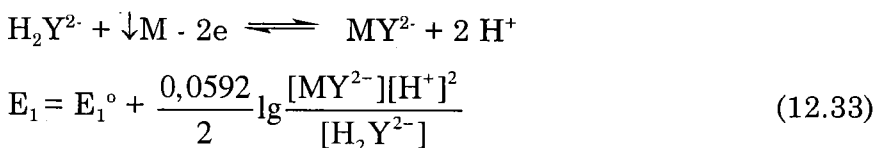
Nếu trị số T càng bé bước nhảy thế ΔE càng lớn.

7.1.3. Chuẩn độ bằng complexon III: Chất này không có phản ứng điện cực, nhưng khi sử dụng điện cực thích hợp sẽ có phản ứng điện hóa trên bề mặt tạo ra thế ổn định.

Ví dụ: Complexon III (H_2Y^{2-}) tạo ra phức bền với nhiều ion kim loại:



Với điện cực kim loại M khi có mặt H_2Y^{2-} phản ứng điện hóa sau đây dễ dàng xảy ra:



Sau khi phản ứng ở (12.32) kết thúc, ion M^{2+} có dư (được thêm vào) cho phản ứng điện cực mới:



Lấy giá trị $[M^{2+}]$ từ phương trình (12.32) thay vào phương trình (12.34) ta có:

$$E_2 = E_2^0 - \frac{0,0592}{2} \lg K + \frac{0,0592}{2} \lg \frac{[MY^{2-}] [H^+]^2}{[H_2Y^{2-}]} \quad (12.35)$$

Do $E_1 = E_2$ nên từ (12.35) và (12.33):

$$E_1^0 = E_2^0 - \frac{0,0592}{2} \lg K$$

Phương trình E_1 (12.33) được dùng để tính thế trước điểm tương đương (khi còn dư H_2Y^{2-}), còn phương trình E_2 (12.35) để tính thế sau điểm tương đương. Trong phương trình (12.35) có giá trị hằng số bền của phức K, nên hằng số bền càng lớn bước nhảy thế càng dài.

$$(\Delta E = E_2^0 - E_1^0 = \frac{0,0592}{2} \lg K)$$

7.2. Cách xác định điểm kết thúc

Có hai phương pháp chính để xác định điểm kết thúc của phản ứng chuẩn độ:

- Phương pháp đồ thị:

Từ các giá trị V và E, vẽ đồ thị của E theo V (V nằm trên trục hoành). Vẽ tiếp tuyến xác định điểm uốn ứng với điểm kết thúc trên đồ thị.

Có thể vẽ đồ thị đạo hàm bậc nhất $\Delta E/\Delta V$ - V.

- Phương pháp tính từ đạo hàm bậc hai:

Bảng 12.5 cho ta ví dụ tính thể tích ứng với điểm kết thúc (V_{kt}) cho một chuẩn độ thế.

Bảng 12.6. Minh họa cách tính V_{kt}

V (mL)	E (Von)	$\Delta E/\Delta V$	$\Delta^2 E/\Delta V^2$
10,90	0,294		
		0,060	
11,00	0,300		0,40
		0,10	
11,10	0,310		2,00
		0,30	
11,20	0,340		6,00
		0,90	
11,30	0,430		- 2,00
		0,70	
11,40	0,500		- 1,00
		0,60	
11,50	0,560		
		0,54	
11,60	0,614		
$V_{kt} = 11,20 + \frac{6,00 \times 0,10}{2,00 + 6,00} = 11,30 - \frac{2,00 \times 0,10}{2,00 + 6,00} = 11,275 \text{ mL}$			

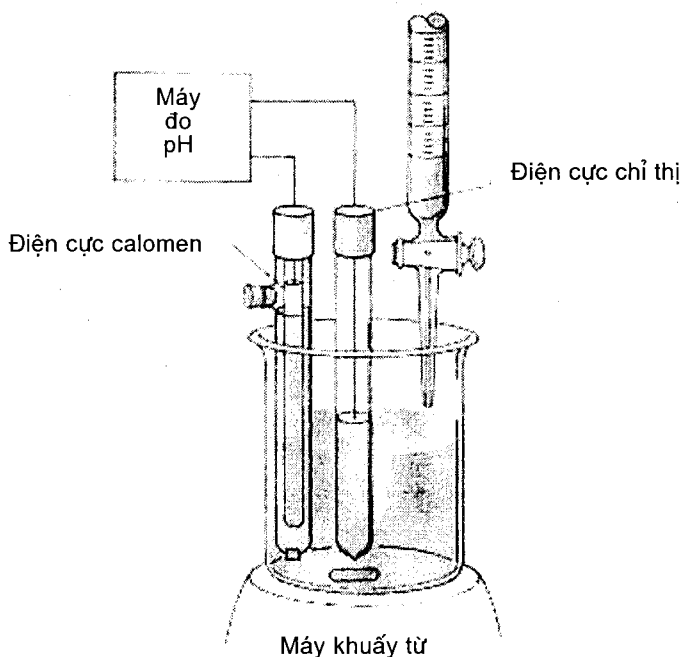
7.3. Chuẩn độ đo thế dòng không đổi ($I \neq 0$)

Với các hệ không thuận nghịch hoặc các cấu tử của hệ thuận nghịch không có dạng liên hợp, thế điện cực thường không ổn định khi chuẩn độ với dòng $I = 0$. Chuẩn độ đo thế với dòng không đổi khắc phục được điểm này.

- **Cách thực hiện:** Bằng nguồn ngoài người ta cho qua điện cực chỉ thị một dòng điện cường độ vài microampe - tức là làm phân cực điện cực - nhờ đó tăng nhanh quá trình cho nhận điện tử trên điện cực - làm quá trình nhanh đạt đến cân bằng. Vì vậy thế ổn định nhanh, lặp lại tốt. Giá trị thế phụ thuộc vào trị số dòng phân cực.

- + Có thể phân cực anod hay phân cực catod, tùy thuộc vào phản ứng hóa học chuẩn độ,

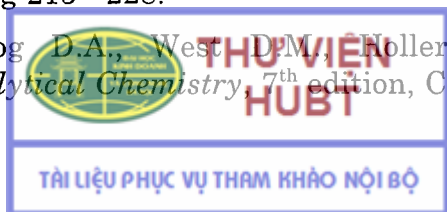
- + Có thể dùng hai điện cực giống nhau trong cùng một dung dịch nhưng phải làm phân cực cả hai điện cực.
- + Dạng đường cong chuẩn độ tương tự như khi dùng chế độ $I = 0$.
- Chuẩn độ đo thế dòng không đổi áp dụng tốt cho hệ không thuận nghịch. Cũng có thể dùng cho cả hệ thuận nghịch, nhưng khi đó cách đo này không có ưu điểm gì hơn cách đo không dòng. Ngoài ra triển khai chuẩn độ còn phức tạp hơn, vì phải dùng nguồn ngoài để phân cực điện cực.



Hình 12.7. Sơ đồ thiết bị chuẩn độ đo thế.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Hoàng Minh Châu, Từ Văn Mặc, Từ Vọng Nghi (2002), *Cơ sở hóa học phân tích*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, chương 13, trang 215 - 228.
2. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1996), *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Chapters 18 and 19, p.p 386 - 430.



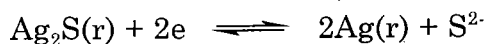
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 12.1. Vẽ sơ đồ giải thích nguyên tắc xác định thế điện cực.
- 12.2. Cho ví dụ phân biệt mạch galvanic và mạch điện phân.

- 12.3. Vai trò của điện cực chỉ thị và điện cực so sánh trong kỹ thuật đo điện thế.
- 12.4. Phân biệt điện cực kim loại và điện cực màng, trình bày những điểm giống nhau và những điểm khác nhau.
- 12.5. Điểm khác nhau của điện cực loại một và điện cực loại hai. Cho ví dụ minh họa.
- 12.6. Giải thích nguyên tắc hoạt động của điện cực màng tinh thể?
- 12.7. Giải thích cấu tạo và thế phát triển ở điện cực màng thủy tinh?
- 12.8. Vẽ sơ đồ giải thích nguyên tắc hoạt động của tế bào đo khí CO_2 .
- 12.9. Trình bày nguyên tắc cách đo so sánh điện thế. Đánh giá ưu nhược điểm của kỹ thuật này.
- 12.10. Giải thích mạch đo pH với cặp điện cực thủy tinh - calomel. Nguyên nhân gây sai số cho phép đo pH?
- 12.11. Giải thích điện cực chỉ thị dùng cho chuẩn độ đo bạc và cho chuẩn độ complexon III.
- 12.12. So sánh hai kỹ thuật: đo so sánh và chuẩn độ đo thế về: nguyên tắc, ứng dụng trong phân tích.
- 12.13. Chuẩn độ đo thế dòng không đổi khác phục nhược điểm gì của chuẩn độ không dòng? Giải thích.

12.14.

a) Tính điện thế tiêu chuẩn cho phản ứng:



Cho biết Ag_2S có $T = 6,0 \cdot 10^{-50}$

b) Vẽ sơ đồ đo thế trực tiếp xác định S^{2-} dùng điện cực chỉ thị bạc (catod) và điện cực calomel bão hòa (anod).

c) Tính pS của một dung dịch bão hòa Ag_2S theo mạch ở câu b có điện thế là - 0,538V.

12.15. Tính thế điện cực oxy hóa - khử khi cho bản mỏng platin nhúng vào các dung dịch sau:

a) $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ 0,00267M + $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0,00932M

b) Na_2SeO_4 0,0175M + H_2SeO_3 0,0347M + HClO_4 $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$

12.16. Cho mạch đo thế sau:

Điện cực calomel bão hòa || dung dịch đệm | điện cực thủy tinh

Khi dung dịch đệm pH 4,006 thế đo được 0,2094V.

Thay dung dịch đệm bằng 2 dung dịch cần đo pH X_1 với điện thế lần lượt là:



X_1 thế đo được - 0,3011V,

X_2 thế đo được + 0,1163V.

Tính pH của 2 dung dịch X_1 và X_2 .

12.17. Cho mạch đo thế dùng điện cực màng chọn lọc Mg^{2+} .

Điện cực calomel bão hòa | MgA_2 ($a_{Mg} = 9,62 \cdot 10^{-3}$) | điện cực màng Mg^{2+} có điện thế 0,367V.

Thay dung dịch MgA_2 trong mạch bằng dung dịch X, thế đo được + 0,544V. Tính pMg của X.

* 12.18. Thiết kế mạch đo hằng số điện ly của acid HA như sau:

Điện cực calomel bão hòa		HA 0,250M NaA 0,180M		H_2 (1atm), Pt
-----------------------------	--	-------------------------	--	------------------

Thế đo được - 0,797V.

Giải thích và tính hằng số điện ly của HA.



PHÂN TÍCH VON - AMPE

MỤC TIÊU

1. Trình bày được bốn loại đường cong phân cực trong phân tích von-ampe: quét thế tuyến tính, xung vi phân, xung sóng vuông và xung tam giác.
2. Giới thiệu được đặc điểm của điện cực nhỏ giọt thuỷ ngân và hai loại điện cực rắn platin và graphit.
3. Mô tả được hoạt động của máy cực phổ cổ điển và dạng von-ampe hiện đại: DPV, SWP và kỹ thuật stripping.
4. Giải thích được ứng dụng của phân tích von-ampe: tế bào đo oxy và chuẩn độ ampe

1. NGUYÊN TẮC

Phân tích von - ampe sử dụng mạch điện phân. Đó là một nhóm các kỹ thuật phân tích điện hóa mà thông tin về chất phân tích được lấy ra từ sự phụ thuộc của cường độ dòng điện vào điện thế trong quá trình điện phân dung dịch phân tích. Sự phụ thuộc ở trên được biểu diễn dưới dạng đường cong von-ampe. Đường cong này được xây dựng trên hệ tọa độ $E - I$, I là cường độ dòng điện qua mạch điện phân, E là điện thế đặt lên hai điện cực.

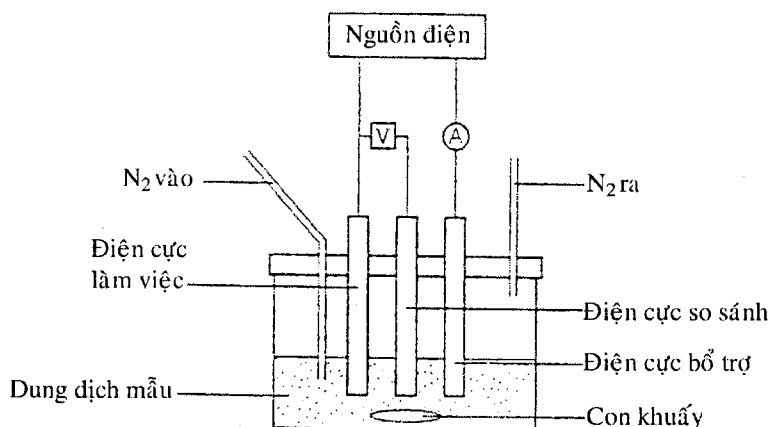
1.1. Mạch điện phân của phân tích von-ampe

Quá trình điện phân được thực hiện trong những điều kiện đặc biệt:

- Có một điện cực công tác (working electrode) có diện tích bề mặt rất bé (cỡ vài mm^2 hoặc nhỏ hơn) - được gọi là vi điện cực. Quá trình oxy hóa hoặc khử các chất diễn ra trên điện cực này. Điện cực thứ hai là điện cực so sánh (reference electrode), thế của nó không thay đổi trong quá trình điện phân. Ngoài ra còn một điện cực thứ ba, đó là điện cực hỗ trợ (auxiliary electrode) để dẫn điện từ nguồn qua dung dịch đến vi điện cực.
- Điện thế đặt lên mạch điện phân tăng dần theo thời gian. Nếu không có phản ứng (oxy hóa hoặc khử) trên điện cực công tác thì điện thế dù thay đổi nhiều cũng sẽ tạo ra dòng điện nhỏ qua mạch. Khi tăng điện

thế đến mức bắt đầu có phản ứng trên vi điện cực: dòng tăng lên nhanh, điện thế ứng với thời điểm đó gọi là *điện thế phân hủy* (decomposition potential). Vi điện cực bị phân cực. Vì vậy đường cong trên hệ tọa độ $E - I$ còn gọi là *đường cong phân cực*.

- Để dễ dàng thu được thông tin về chất phân tích, người ta điện phân dung dịch khi có thừa chất điện ly trợ (chất không cho phản ứng điện cực) gọi là chất *điện ly nền* (supporting electrolyte). Hình 13.1 mô tả sơ đồ kỹ thuật đo von-ampe.



Hình 13.1. Sơ đồ kỹ thuật đo von-ampe

1.2. Điện thế phân cực điện cực

Trong phân tích von - ampe, có thể phân điện thế làm phân cực điện cực công tác (còn được gọi là tín hiệu kích thích: excitation signal) thành 4 dạng:

1.2.1. Thế quét tuyến tính: Điện thế một chiều đưa vào mạch điện phân tăng tuyến tính theo thời gian. Cường độ dòng điện I qua mạch là một hàm của thời gian, cũng là hàm của điện thế phân cực (bảng 13.1a).

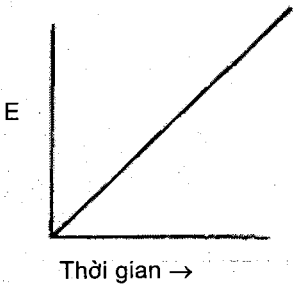
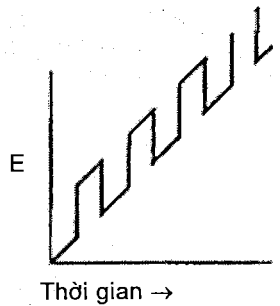
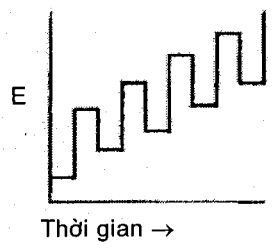
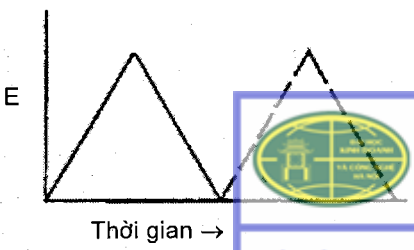
1.2.2. Xung vi phân (bảng 13.1.b): Xung điện một chiều có điện thế nhất định làm phân cực điện cực. Cường độ dòng điện qua mạch được đo trước khi đặt xung và trước khi ngắt xung điện.

1.2.3. Xung sóng vuông: Xung điện xoay chiều dạng sóng vuông có điện thế và tần số xác định đưa vào mạch điện phân (bảng 13.1.c). Cường độ dòng điện qua mạch được ghi ở các thời điểm khác nhau của xung sóng vuông.

1.2.4. Xung tam giác: Thế được quét tuần hoàn giữa hai giá trị: ở giai đoạn đầu điện thế tăng tuyến tính đến giá trị cực đại, ở giai đoạn sau điện thế giảm tuyến tính (với cùng trị số độ dốc) đến giá trị ban đầu. Tần số quét xung tam giác có thể 100 hoặc hơn (bảng 13.1.d).

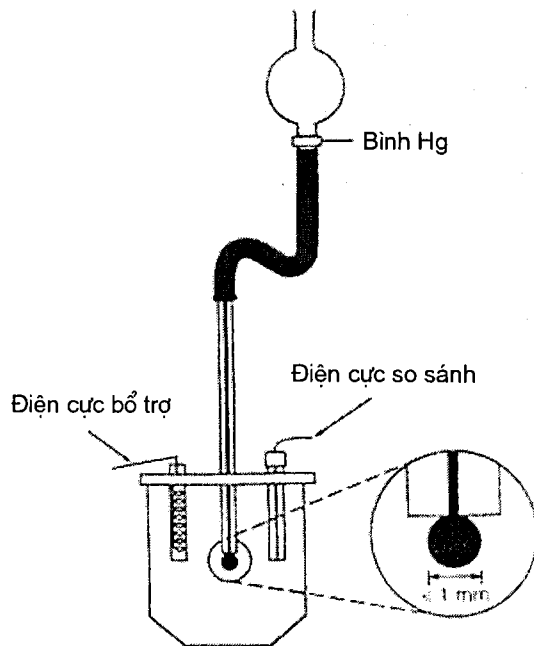
Cột cuối của bảng 13.1 thống kê 4 loại hình của kỹ thuật von-ampe sử dụng 4 loại điện thế phân cực ở trên.

Bảng 13.1. Bốn dạng thế phân cực trong phân tích von-ampe

Tên tín hiệu	Dạng tín hiệu	Tên kỹ thuật
Điện thế tuyến tính (a)		Cực phổ, von-ampe
Xung vi phân (b)		Von-ampe xung vi phân
Xung sóng vuông (c)		Von-ampe sóng vuông
Xung tam giác (d)		Von-ampe tuần hoàn

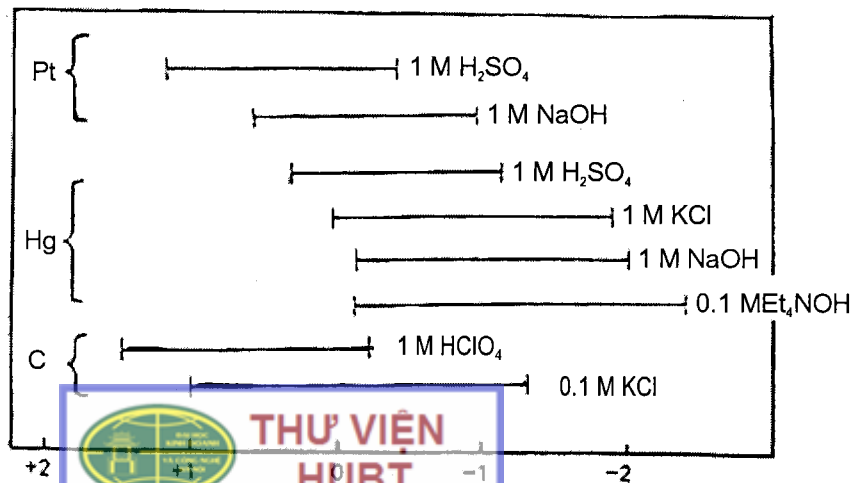
1.3. Điện cực công tác

Nguyên liệu chế tạo vi điện cực trong kỹ thuật đo von-ampe rất khác nhau: kim loại quý (vàng, bạch kim), graphite, được chế tác dưới dạng hình đĩa, hình nhẵn, hình kim. Với nguyên liệu thủy ngân thường dùng dạng giọt (hình 13.2) hoặc màng mỏng.



Hình 13.2. Điện cực giọt thủy ngân trong mạch điện phân.

Khoảng điện thế phân cực dùng trong phân tích von - ampe cho các loại vi điện cực này thay đổi tùy thuộc vào nguyên liệu chế tạo và thành phần dung dịch (hình 13.3).

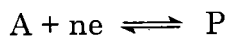


Hình 13.3. Cửa sổ thế của 3 loại điện cực (Pt, Hg, C) trong các dung dịch nền khác nhau (đo với SCE).

Nói chung, trong dung dịch nước, giới hạn điện thế dương bị khống chế bởi phản ứng oxy hóa trên điện cực tạo ra oxy, còn giới hạn về phía âm do phản ứng khử nước tạo ra hydro quyết định. Tuy nhiên, trên điện cực thủy ngân do quá thế hydro trên kim loại này nên điện thế phân cực có thể âm hơn nhiều.

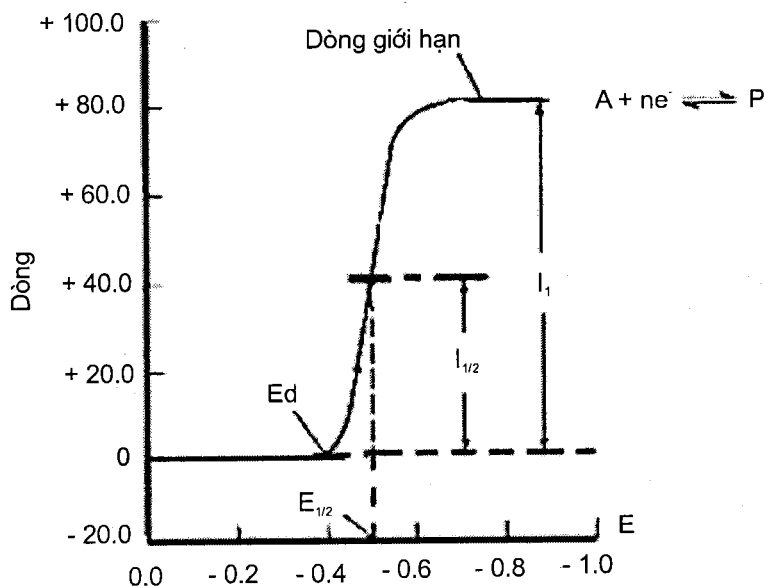
2. VON - AMPE QUÉT THỂ TUYẾN TÍNH

Giả thiết một chất A có tính oxy hóa được hoà tan vào dung dịch nước KCl 0,1M. Nghiên cứu phản ứng khử trên điện cực catod phẳng:



Thế quét tuyến tính về phía âm. Dòng catod - theo qui ước - lấy dấu dương (+). Sóng von-ampe của quá trình khử catod được trình bày ở hình 13.4.

Cường độ dòng qua mạch i tăng dần và đạt giá trị cực đại. Giá trị dòng đó được gọi là *dòng giới hạn* i_l . Nguyên nhân là do chất A đến bề mặt điện cực (nhờ quá trình chuyển khối) đã tham gia hết vào quá trình khử cực.



Hình 13.4. Sóng von-ampe quét thể tuyến tính

Dòng giới hạn i_l tỷ lệ thuận với nồng độ chất khử cực C_A trong dung dịch:

$$i_l = k \cdot C_A \quad (13.1)$$

Trong đó k là hằng số. Phân tích von-ampe định lượng dựa chủ yếu vào phương trình này. Thế ứng với giá trị dòng $i = i_{1/2}$ được gọi là *thế bán sóng* $E_{1/2}$. Thế này đôi khi được dùng để xác định các thành phần có mặt trong dung dịch điện phân. Thế ở đó bắt đầu xuất hiện quá trình khử cực được gọi là *thế phân hủy* E_d .

2.1. Dòng điện qua mạch điện phân

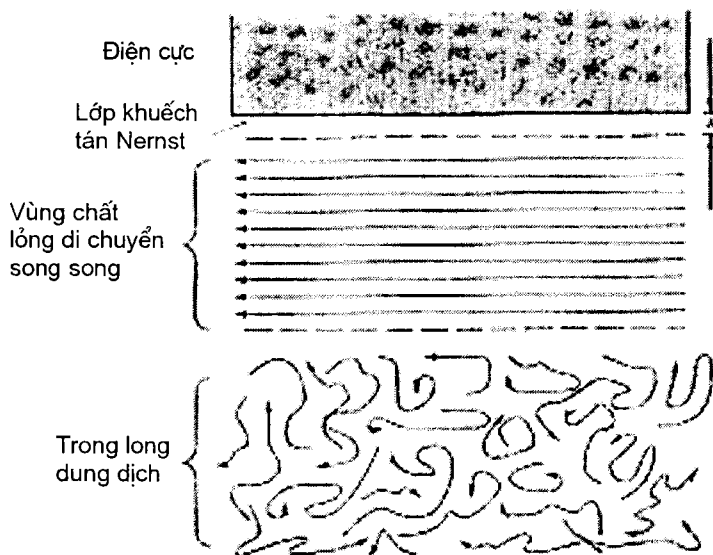
Nghiên cứu quá trình chuyển khối trong dung dịch điện phân khi có sự khuấy trộn cơ học, người ta nhận ra 3 dạng dòng chất lỏng xuất hiện:

- Trong lòng dung dịch chất lỏng chuyển động tự do dưới tác động của quá trình khuấy trộn cơ học.

- Ở gần điện cực có một lớp mỏng dung dịch chuyển động song song với bề mặt của điện cực.
- Ở khoảng cách $\delta = 10^{-2} \div 10^{-3}$ cm từ bề mặt điện cực, dưới tác dụng của lực ma sát giữa chất lỏng và điện cực có một lớp mỏng dung dịch hầu như đứng yên, không chuyển động gọi là *lớp khuếch tán Nernst*.

Dòng điện qua mạch ở bất kỳ một thời điểm được xác định bởi:

- Tốc độ chuyển khối của chất A nhờ khuấy trộn cơ học đến bờ của lớp khuếch tán.
- Tốc độ chuyển A từ bờ lớp khuếch tán đến bề mặt điện cực.



Hình 13.5. Dòng chảy trong quá trình chuyển khối đến bề mặt điện cực.

Mặt khác, từ bề mặt dung dịch sản phẩm P tạo thành của quá trình khử cực khuếch tán theo chiều ngược lại với quá trình khuấy trộn: $A \rightleftharpoons P$. Hai quá trình này tạo nên dòng điện được xác định bởi thế đặt lên vi điện cực.

Sự chênh lệch nồng độ giữa bề mặt điện cực và dung dịch là biến đánh giá định lượng dòng i . Đối với điện cực phẳng, dòng i được định lượng theo phương trình:

$$i = n F A D_A \left(\frac{dC_A}{dx} \right) \quad (13.2)$$

Ở đây:

i : Cường độ dòng qua mạch (A),

n : Số electron ứng với một mol của A,

F : Số Faraday,

A : Diện tích bề mặt của điện cực (cm^2),

D_A : Hệ số khuếch tán của chất A (cm^2/s),

C_A : Nồng độ của chất A (mol/cm^3).

Giá trị gradient nồng độ dC_A/dx (x là khoảng cách từ bề mặt điện cực tính bằng cm) có thể ước lượng bằng tỷ số $(C_A - C_A^0)/\delta$, trong đó C_A và C_A^0 là nồng độ của chất A trong lòng dung dịch và trong lớp khuếch tán tương ứng. Thay giá trị ước lượng dC_A/dx vào (13.2) ta có:

$$i = \frac{nFAD_A}{\delta} \times (C_A - C_A^0) = K_A (C_A - C_A^0) \quad (13.3)$$

Khi $C_A^0 \rightarrow 0$ dòng i trở thành dòng giới hạn i_l , trị số của nó sẽ là:

$$i_l = \frac{nFAD_A}{\delta} \times C_A = K_A C_A \quad (13.4)$$

K_A là hằng số có giá trị $(nFAD_A)/\delta$.

2.2. Liên quan dòng - thế

Thực hiện trừ từng vế hai phương trình (13.4) - (13.3) và sắp xếp lại ta có:

$$C_A^0 = \frac{i_l - i}{K_A} \quad (13.5)$$

Có thể biểu diễn dòng i theo nồng độ của sản phẩm P tương tự phương trình (13.3):

$$i = -\frac{nFAD_P}{\delta} \times (C_P - C_P^0) \quad (13.6)$$

Cần lưu ý hệ số khuếch tán là của P và dấu âm là do tính chất nồng độ của P ngược với A. Khi $C_P \rightarrow 0$:

$$i = -\frac{nFAD_P}{\delta} \times C_P^0 = K_P \cdot C_P^0$$

Như vậy: $C_P^0 = i/K_P$ (13.7)

Ta viết phương trình Nernst cho phản ứng khử của chất A trên điện cực:

$$E = E_A^0 + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{C_A}{C_P} \quad (13.8)$$

Ở đây:

E : thế đặt lên 2 điện cực (điện cực công tác - điện cực so sánh),

E_A^0 : là thế oxy hóa khử tiêu chuẩn của cặp A/P,

C_A và C_P : là nồng độ mol của A và P trong lớp khuếch tán Nernst.

Thay giá trị C_P từ (13.7) và C_A từ (13.5) vào phương trình (13.8) ta có:

$$E = E_A^0 + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{K_P}{K_A} + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{i_l - i}{i} \quad (13.9)$$



Khi $i = i_{1/2}$ thì $E = E_{1/2}$ (thế bán sóng):

$$E = E_{1/2} = E^{\circ}_A + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{K_P}{K_A} \quad (13.10)$$

Đưa giá trị $E_{1/2}$ từ (13.10) vào phương trình (13.9):

$$E = E_{1/2} + \frac{0,0592}{n} \lg \frac{i_1 - i}{i} \quad (13.11)$$

Phương trình này biểu diễn mối quan hệ hàm số $E - i$, được thể hiện bằng sóng von-ampe ở hình 13.4.

Chấp nhận hệ số khuếch tán $K_A \approx K_P$ thì:

$$E_{1/2} = E^{\circ}_A \quad (13.12)$$

Các biểu thức thể hiện mối quan hệ dòng - thế ở trên đúng cho quá trình thuận nghịch. Nhưng phản ứng điện cực của một số chất, nhất là với nhiều chất hữu cơ, thường là không thuận nghịch. Phương trình (13.9) cần có thêm số hạng hiệu chỉnh. Trong trường hợp này thế bán sóng $E_{1/2}$ phụ thuộc vào nồng độ chất tham gia quá trình điện cực. Tuy nhiên dòng khuếch tán i vẫn giữ sự phụ thuộc tuyến tính với nồng độ, không ảnh hưởng đến ứng dụng cho phân tích định lượng.

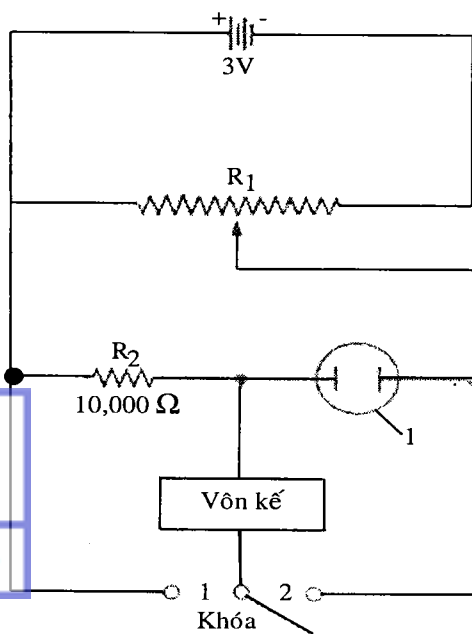
3. CỰC PHỔ

Cực phổ là một dạng đặc biệt của kỹ thuật von-ampe trong đó điện cực nhỏ giọt thủy ngân được dùng làm điện cực công tác. Phương pháp này do nhà hóa học người Tiệp Jaroslav Heyrovsky tìm ra năm 1922. Do sự phát minh và phát triển cực phổ nên năm 1959 J. Heyrovsky được tặng giải thưởng Nobel về hóa học.

3.1. Thiết bị cực phổ

3.1.1. Mạch điện: Hình 13.6 là sơ đồ mạch điện cực phổ đơn giản.

Nguồn điện một chiều $\pm 3V$ để phân cực vi điện cực ở tế bào đo (1). Thế đặt lên tế bào (1) được điều chỉnh qua vị trí con chạy trên R_1 . Von kế không chỉ được dùng để đo thế phân cực mà còn kiểm soát dòng



Hình 13.6. Sơ đồ mạch điện cực phổ

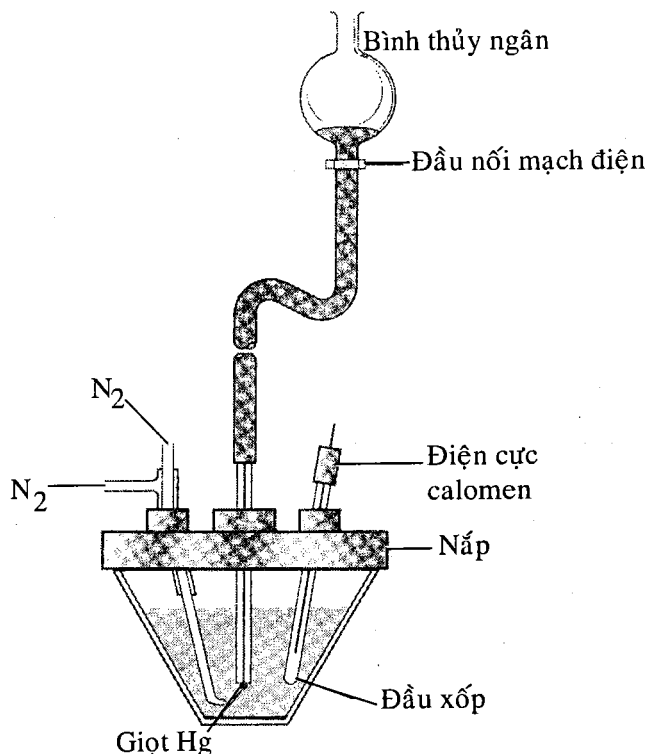
qua mạch bằng cách đo giảm thế qua điện trở R_2 (10000Ω). Cường độ dòng qua mạch dao động từ $0,01\mu A$ đến $100\mu A$.

3.1.2. Điện cực giọt thủy ngân

Hình 13.7 mô tả tế bào đo cho cực phổ.

- Điện cực so sánh calomel bão hoà,
- Khí nitơ sục vào đuôi oxy,

Điện cực nhỏ giọt thủy ngân được tạo thành từ bầu đựng thủy ngân chảy qua một mao quản dài khoảng 10cm, đường kính trong khoảng $0,05mm$.



Hình 13.7. Tế bào đo trong cực phổ.

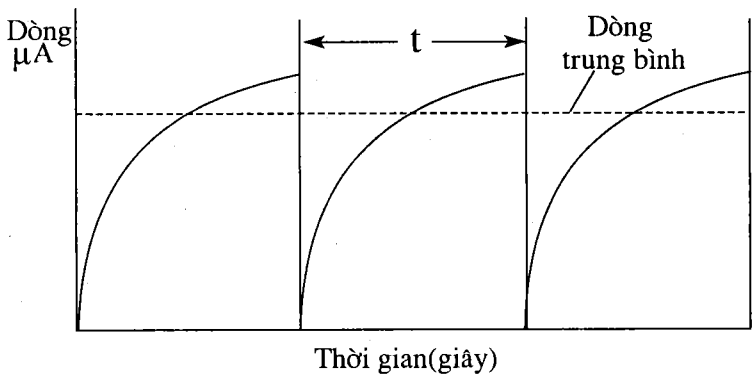
Thời gian nhỏ giọt được điều chỉnh bằng chiều cao của bầu thủy ngân. Đường kính giọt thủy ngân thay đổi trong khoảng $0,1 - 1mm$ với thời gian nhỏ giọt 2÷6 giây. Dòng điện qua điện cực giọt dao động trong khoảng $0 - \pm 100\mu A$.

Các máy cực phổ hiện đại thường dùng tế bào đo có 3 điện cực: điện cực chỉ thị, điện cực so sánh và điện cực hỗ trợ.

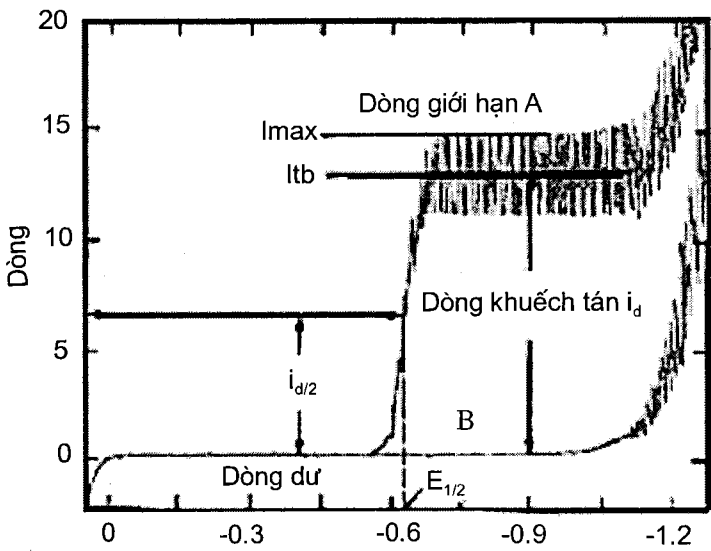
3.2. Dòng khuếch tán cực phổ

Cường độ dòng i tăng dần theo thời gian sống của giọt thủy ngân vì diện tích bề mặt A của điện cực tăng lên. Khi giọt rơi dòng i trở về không (hình

13.8). Dòng trung bình $i_{tb} = \frac{6}{7} i_{max}$. Trên hình 13.9 vẽ sóng cực phổ của dung dịch Cd^{2+} nồng độ $5,0.10^{-4}M$ trong nền HCl $1M$ (đường A) và sóng của nền HCl (đường B).



Hình 13.8. Dòng khuếch tán thay đổi theo thời gian.



Hình 13.9. Sóng cực phổ của dung dịch $Cd^{2+}.5,0.10^{-4}M$ (đường A) và của nền HCl $1M$ (đường B).

Trong cực phổ, không có khuấy trộn cơ học, dòng giới hạn i_l chỉ do sự khuếch tán tạo thành. Vì vậy thường gọi là *dòng khuếch tán* và ký hiệu i_d . Trị số của i_d liên quan đến:

- Sự gia tăng diện tích A của điện cực, nó phụ thuộc vào thời gian nhỏ giọt t (giây).
- Tốc độ thủy ngân chảy qua mao quản m (mg/s),
- Hệ số khuếch tán D của chất khử cực (cm^2/s).

Dòng khuếch tán i_d được tính theo phương trình Ilkovic:

$$i_d = 706 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C$$

Cường độ dòng i_d qua mạch cực phổ (ampe) trong cùng điều kiện tỷ lệ thuận với nồng độ C chất khử cực (mol/cm^3). Nếu dùng nồng độ mol/l và cường độ i_d tính ra μA cũng cho kết quả cùng trị số. Để tính dòng trung bình $\bar{i}_d$ hệ số 607 thay cho 706:

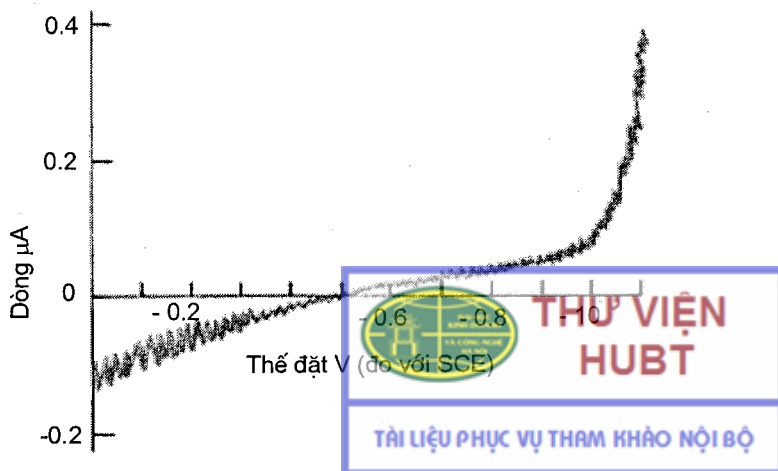
$$\bar{i}_d = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C = KC \quad (13.13)$$

Tích số $m^{2/3} t^{1/6}$ trong phương trình này được gọi là *hằng số mao quản*, đánh giá ảnh hưởng của đặc tính điện cực giọt đến dòng i_d .

3.3. Dòng dư (Residual current)

Hình 13.10 minh họa dòng dư tạo thành khi làm cực phổ dung dịch nền HCl 0,1M. Dòng này bắt nguồn từ:

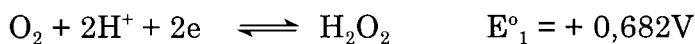
- Quá trình khử các tạp chất có mặt trong dung dịch nền (kim loại nặng trong nước cất, tạp chất trong thuốc thử) và oxy hoà tan.
- Dòng tụ điện (condenser current) tạo thành từ dòng electron tích điện trên giọt thủy ngân (so với dung dịch). Ở thế $E < -0,4\text{V}$ bề mặt giọt thủy ngân tích điện âm sẽ tạo ra *dòng tụ catod* (+). Ngược lại khi thế $E > -0,4\text{V}$ bề mặt giọt thủy ngân tích điện dương, tạo ra *dòng tụ anod* (-). Ở thế $E \approx -0,4\text{V}$ bề mặt giọt không mang điện tích, nên dòng tụ $\rightarrow 0$. Vì dòng tụ tạo ra không do quá trình oxy hóa khử trên điện cực nên dòng tụ còn được gọi là *dòng không faraday* (nonfaradaic current).



Hình 13.10. Dòng dư trong cực phổ dung dịch nền HCl 0,1M.

3.4. Sóng oxy (oxygen waves)

Oxy hòa tan dễ dàng bị khử trên điện cực nhỏ giọt thủy ngân. Dung dịch nước bão hòa không khí cho hai sóng khử:



Hai sóng khử này có chiều cao như nhau. Có thể dùng sóng này để định lượng oxy hòa tan trong dung dịch. Ở đây, sóng khử oxy sẽ cản trở ghi sóng khử của các chất khác trên điện cực nhỏ giọt thủy ngân. Để loại oxy người ta dùng dòng khí trơ (thường là nitơ) sục vào dung dịch trước khi đo và tạo bầu khí quyển nitơ trên bề mặt dung dịch trong quá trình phân tích.

3.5. Các cực đại trên sóng cực phổ

Sóng khử trên điện cực nhỏ giọt thủy ngân đôi khi bị biến dạng do xuất hiện các cực đại lạ. Người ta phân biệt hai dạng cực đại: cực đại loại một và cực đại loại hai. Sự hình thành hai dạng cực đại này liên quan đến sự hấp phụ các ion trên bề mặt điện cực trong quá trình tạo thành giọt thủy ngân.

Để giảm thiểu cực đại xuất hiện trên sóng cực phổ người ta thường cho vào dung dịch phân tích các chất hoạt động bề mặt như: gelatin, agar-agar (thạch), Triton X - 100, đỏ methyl hoặc một số chất màu khác. Cơ chế khử cực đại của các chất này chưa rõ ràng.

3.6. Ưu nhược điểm của điện cực nhỏ giọt thủy ngân

Trước đây điện cực nhỏ giọt thủy ngân được dùng phổ biến trong phép đo von-ampe bởi có nhiều ưu điểm:

- Quá thế khử ion hydro cao khác thường. Theo bảng 13.1, với nền tetraethyl amoni hydroxyd (Et_4NOH) khi dùng điện cực so sánh calomel bão hòa có thể phân cực đến -2,2 V. Trong khi đó nếu dùng điện cực chỉ thị platin trong dung dịch acid ở thế -0,10 V khí hydro đã được giải phóng.
- Điện cực thủy ngân có bề mặt luôn đổi mới, thời gian sống 3 - 6 giây nên tính chất của điện cực dễ lập lại, không phụ thuộc thời gian sử dụng. Trong khi đó các điện cực rắn, do quá trình hấp phụ hoặc khử tạp chất nên bề mặt dễ thay đổi, rất khó làm mới bề mặt.
- Dòng khuếch tán thiết lập nhanh, dễ lập lại.

Tuy nhiên điện cực giọt cũng có một số nhược điểm:

- Hạn chế lớn nhất là điện cực nhỏ giọt thủy ngân dễ bị oxy hóa. Ở thế +0,4V trở lên đã có $\text{Hg}(\text{I})$ tạo thành, thủy ngân kim loại hòa tan biến thành Hg^{2+} , sóng oxy hóa xuất hiện che lấp sóng oxy hóa anod của các chất khác. Vì vậy với điện cực nhỏ giọt thủy ngân, chỉ có thể phân cực tạo sóng anod đến thế +0,3V. Trong trường hợp này điện cực rắn có ưu thế hơn.
- Thứ hai là dòng tự của điện cực nhỏ giọt thủy ngân xuất hiện đã làm giảm giới hạn định lượng: chỉ phân tích được đến 10^{-5}M . Ở nồng độ thấp hơn dòng khuếch tán bé hơn dòng dư. Các kỹ thuật cực phổ mới sẽ khắc phục nhược điểm này.

- Các cực đại thường xuất hiện trên sóng cực phổ. Nguyên nhân tạo thành chưa được biết rõ. Thường dựa vào kinh nghiệm để giảm thiểu trở ngại này.
- Cuối cùng, hơi thủy ngân rất độc, khi làm cực phổ phải tuân thủ các qui tắc an toàn riêng.

3.7. Phân tích sóng cực phổ cổ điển

Cực phổ dòng một chiều - còn gọi là cực phổ cổ điển - được ứng dụng nhiều để phân tích các chất vô cơ và hữu cơ.

3.7.1. Định tính

Trong cực phổ, nếu phản ứng thuận nghịch thì thế $E_{1/2}$ là một giá trị không đổi, là đặc trưng định tính của chất nghiên cứu, chỉ phụ thuộc vào nhiệt độ và dung dịch nền.

- Cách xác định: Thường dùng phương pháp đồ thị. Theo phương trình

(13.11) ta thấy $\lg \frac{i_d - i}{i}$ phụ thuộc tuyến tính vào thế E (trong cực phổ

$\bar{i}_d$ là dòng trung bình i_{tb}). Vì vậy dựa vào dữ liệu thực nghiệm, lập đồ

thị $\lg \frac{i_d - i}{i} - E$, ta sẽ có đường thẳng cắt trục hoành tại điểm $E = E_{1/2}$.

Thường sử dụng trị số $E_{1/2}$ này để xác định điều kiện cho cực phổ định lượng.

- Thực tế hiện nay, các máy cực phổ hiện đại có phần mềm xử lý số liệu, không cần những tính toán như vừa trình bày.

3.7.2. Định lượng

Phương trình (13.13) cho thấy: khi điều kiện ghi phổ như nhau thì $\bar{i}_d$ tỷ lệ thuận với nồng độ chất khử cực:

$$\bar{i}_d = KC$$

Điều kiện ghi phổ như nhau ở đây là hằng số mạch, nhiệt độ, dung dịch nền.

Việc xác định nồng độ của dung dịch phân tích C_x có thể thực hiện theo cách so sánh với một dung dịch chuẩn nồng độ C_R hoặc kỹ thuật thêm chuẩn:

- So sánh:

$$C_x = C_R \frac{\bar{i}_{d,x}}{\bar{i}_{d,R}} \quad (13.14)$$

$\overline{i_{d,x}}$ và $\overline{i_{d,R}}$ là dòng giới hạn của sóng cực phổ của dung dịch phân tích và dung dịch chuẩn tương ứng.

– *Thêm chuẩn:*

$$C_x = C_R \frac{\overline{i_{d,x}}}{\overline{i_{d(x+R)}} - \overline{i_{d,x}}} \quad (13.15)$$

4. ỨNG DỤNG CỦA PHÂN TÍCH VON-AMPE

Trước đây, trong số các phương pháp phân tích von-ampe quét thế tuyến tính thì cực phổ dòng một chiều được sử dụng phổ biến để định lượng các chất vô cơ và một số hợp chất hữu cơ có sóng khử catod trên điện cực nhỏ giọt thủy ngân. Ngày nay, do những ưu điểm nổi bật của các kỹ thuật cực phổ hiện đại nên chúng đã thay thế cực phổ cổ điển.

Hiện nay phân tích von-ampe quét thế tuyến tính còn có 4 ứng dụng quan trọng sau đây:

1. Phát hiện và định lượng các chất có quá trình điện cực trong detector điện hóa của HPLC và trong thiết bị phân tích dòng chảy (FIA-flow-injection analysis).

2. Xác định oxy hòa tan và một số đường đơn có vai trò quan trọng trong hóa sinh.

3. Xác định điểm kết thúc trong chuẩn độ ampe.

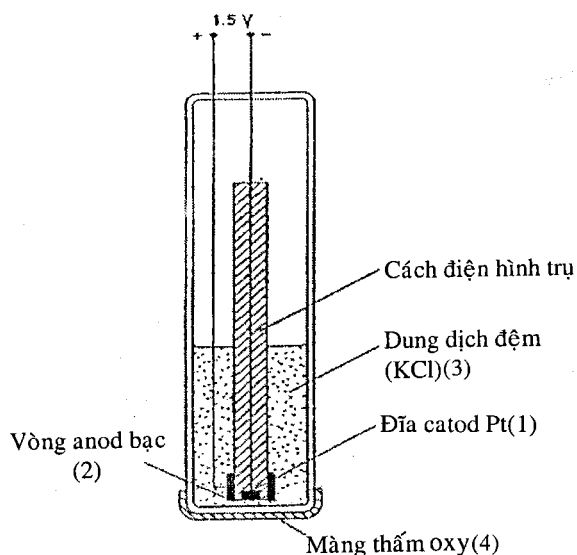
4. Nghiên cứu cơ bản các quá trình điện hóa.

Điểm 1 và điểm 4 nằm ngoài nội dung của chương này. Chúng ta sẽ trình bày sơ lược ở đây nội dung thứ hai và thứ ba.

4.1. Tế bào đo oxy

Xác định oxy hòa tan trong nước có ý nghĩa rất quan trọng trong phân tích nước (nước bề mặt, nước biển, nước thải...) trong công nghiệp và trong nghiên cứu sinh y học. Dựa vào nguyên lý phương pháp von-ampe, năm 1956 L.C.Clark đã phát minh ra tế bào đo oxy và được cấp bằng sáng chế. Hình 13.11 mô tả nguyên tắc cấu tạo của tế bào đo này.

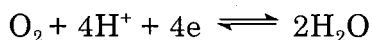
- Điện cực công tác là một bản platin hình đĩa (1) đặt ở giữa chất cách điện hình trụ. Bao xung quanh điện cực này là anod bạc (Ag) hình nhẫn (2).
- Hệ 2 điện cực này được đặt trong bình hình trụ chứa dung dịch đệm KCl (3). Đáy bình có màng thấm oxy bằng Teflon hoặc polyetylen (4).



Hình 13.11. Sơ đồ nguyên tắc cấu tạo của tế bào Clark.

Khi nhúng tế bào đo vào dung dịch, oxy khuếch tán qua màng, sau đó qua lớp dung dịch KCl để tới catod Pt. Phản ứng điện cực xảy ra:

Ở catod:



Ở anod:



Dòng khuếch tán qua tế bào đo tỷ lệ thuận với nồng độ oxy trong dung dịch. Bằng cách hiệu chuẩn tế bào đo, có thể đọc trực tiếp nồng độ oxy (mol/L) trên thiết bị.

Tế bào enzym:

Dựa vào tế bào von-ampe ở trên người ta chế tạo ra tế bào enzym để định lượng một số chất thường gặp trong các phòng thí nghiệm lâm sàng.

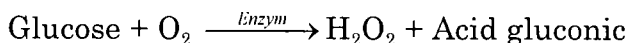
– *Tế bào đo glucose:*

Cấu trúc của tế bào này tương tự tế bào Clark. Riêng màng (4) có cấu trúc phức tạp hơn, gồm 3 lớp:

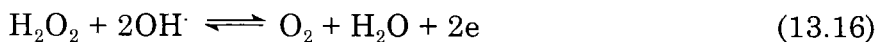
- + Lớp ngoài là màng polycarbonat cho glucose đi qua nhưng ngăn cản protein và các thành phần của mẫu,
- + Lớp giữa là enzym, ở đây là glucose - oxydase,
- + Lớp trong là màng cellulose acetat cho những phân tử nhỏ đi qua.

Khi tế bào nhúng vào dung dịch glucose, chất này khuếch tán qua màng ngoài đến lớp enzym. Ở đây diễn ra phản ứng xúc tác:





Hợp chất H_2O_2 khuếch tán qua màng trong cùng sẽ bị oxy hóa giải phóng oxy



Dòng tạo ra tỷ lệ với lượng glucose trong dung dịch.

- Các tế bào enzym khác dựa trên nguyên tắc von-ampe đo lượng H_2O_2 giải phóng nhờ xúc tác oxy hóa bởi enzym đều có cấu tạo tương tự. Một số tế bào đo hiện có như: sucrose, lactose, ethanol và L-lactat.

4.2. Chuẩn độ ampe

Trong chuẩn độ ampe, điểm kết thúc được xác định bằng cách đo dòng khuếch tán thay đổi phụ thuộc vào thể tích của dung dịch chuẩn độ. Dựa vào dữ liệu thực nghiệm, ta vẽ đồ thị hệ tọa độ: trục hoành là thể tích dung dịch chuẩn độ, trục tung là cường độ dòng i tương ứng. Dùng phương pháp đồ thị để xác định điểm kết thúc của phản ứng chuẩn độ.

Một phản ứng hóa học có thể được dùng trong chuẩn độ ampe cần thỏa mãn hai điều kiện:

- Một trong các chất phản ứng phải được khử trên catod thủy ngân hoặc oxy hóa trên điện cực rắn.
- Trị số dòng khuếch tán tỷ lệ thuận với nồng độ.

Có thể sử dụng phản ứng oxy hóa khử, tạo phức, kết tủa cho chuẩn độ ampe với 2 kiểu kỹ thuật.

- Chuẩn độ với một điện cực chỉ thị
- Chuẩn độ với hai điện cực chỉ thị (còn gọi là “chuẩn độ đến điểm dừng” hay ampe kép)

4.2.1. Chuẩn độ với một điện cực chỉ thị

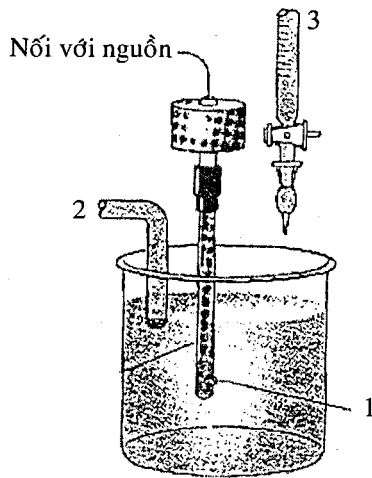
Ở đây điện cực chỉ thị, ngoài điện cực giọt thủy ngân, còn dùng điện cực rắn như: platin, graphit dưới dạng hình kim, đĩa, nhẵn, quay với tốc độ không đổi. Nếu dùng điện cực tĩnh thì phải khuấy trộn dung dịch.

Hình 13.12 mô tả thiết bị chuẩn độ ampe với điện cực quay platin (1) nối với điện cực so sánh qua cầu muối (2). Dung dịch chuẩn độ cho vào bình qua buret (3).

- Dạng đường cong chuẩn độ:

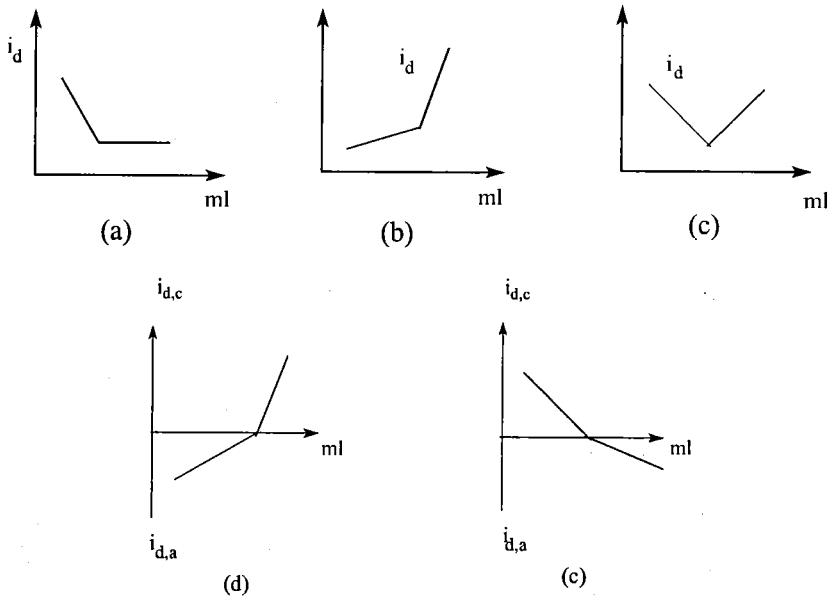
Điểm mẫu chốt là chọn thế phân cực cho điện cực chỉ thị. Thế này phải tạo dòng khuếch tán i của thành phần cho phản ứng điện cực, thường thế hơn $100 \div 300\text{mV}$ so với thế $E_{1/2}$.

Thành phần cho phản ứng điện cực có thể là chất phân tích, thuốc thử hoặc sản phẩm phản ứng.



Hình 13.12. Chuẩn độ ampe với điện cực quay platin.

Hình 13.13 là 5 dạng đường cong chuẩn độ ampe



Hình 13.13. Năm dạng đường cong chuẩn độ ampe

- (a): Chất phân tích cho dòng khử catod.
- (b): Chất chuẩn cho phản ứng trên catod.
- (c): Cả chất phân tích và chất chuẩn cho phản ứng trên điện cực.
- (d): Trên thế đã chọn, chất phân tích cho dòng oxy hóa còn dung dịch chuẩn cho dòng khử ($i_{d,c}$).
- (e): Chất phân tích cho dòng khử $i_{d,c}$, còn dung dịch chuẩn cho dòng oxy hóa $i_{d,a}$.

– Phản ứng hóa học dùng cho chuẩn độ ampe:

Bảng 13.2 thống kê một số thuốc thử và phản ứng thường dùng để chuẩn độ các chất vô cơ và một số chất hữu cơ.

Bảng 13.2. Chuẩn độ ampe một số chất.

Thuốc thử	Loại phản ứng	Điện cực chỉ thị	Các chất được chuẩn độ
K ₂ CrO ₄	Kết tủa	DME	Pb ²⁺ , Ba ²⁺
Pb(NO ₃) ₂	Kết tủa	DME	SO ₄ ²⁻ , MoO ₄ ²⁻ , F ⁻ , Cl ⁻
8 - hydroxy quinolin	Kết tủa	DME	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Al ³⁺ , Bi ³⁺ , Fe ³⁺
Cupferron	Kết tủa	DME	Cu ²⁺ , Fe ³⁺
α- nitroso β-naphtol	Kết tủa	DME	Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pd ²⁺
AgNO ₃	Kết tủa	RPE	Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , CN ⁻ , R-SH
EDTA	Phức	DME	Bi ³⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Ca ²⁺ ...
KBrO ₃ , KBr	Thế, cộng, oxy hóa	RPE	Một số phenol, amin thơm, N ₂ H ₄ , olefin As(III), Sb(III)

Ghi chú: DME: Điện cực nhỏ giọt thủy ngân,

RPE: Điện cực quay platin.

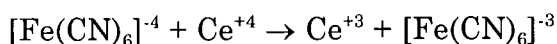
4.2.2. Chuẩn độ với hai điện cực chỉ thị

Khi chuẩn độ với một điện cực chỉ thị và điện cực so sánh, thế của điện cực so sánh không thay đổi. Trong chuẩn độ ampe kép, cả hai điện cực chỉ thị được nhúng trực tiếp vào dung dịch phân tích. Hai điện cực này giống nhau (cả về bản chất kim loại và diện tích bề mặt). Giữa hai điện cực có chênh lệch thế. Trên điện cực xảy ra các phản ứng điện hoá, từ đó có dòng điện qua mạch. Thế phân cực cho hai điện cực không lớn: khoảng 0,01 - 0,1V.

Dòng điện chỉ có trong mạch khi trong dung dịch có chất được khử trên catod và chất được oxy hóa trên anod.

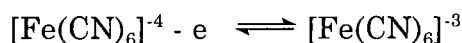
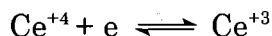
Dạng đường cong chuẩn độ phụ thuộc vào tính chất thuận nghịch của các hệ (chất cần chuẩn độ và chất chuẩn) cũng như trị số thế làm phân cực hai điện cực.

– Ví dụ: Khảo sát chuẩn độ ion hexacyano ferat(II) bằng Ce⁴⁺:



- + Khi chưa thêm Ce⁴⁺, trên anod xảy ra quá trình oxy hóa [Fe(CN)₆]⁻⁴, còn trên catod ion [Fe(CN)₆]⁻³ bị khử. Ion này có lượng rất nhỏ (tạp chất) nên dòng đi qua mạch có giá trị nhỏ.
- + Khi thêm Ce⁴⁺ vào ion [Fe(CN)₆]⁻³ tăng lên nên dòng qua mạch tăng lên. Trị số dòng đạt cực đại khi nồng độ hai ion bằng nhau: tức là chuẩn độ được 50% ion [Fe(CN)₆]⁻⁴. Sau đó nồng độ chất khử bắt đầu giảm kéo theo giảm dòng qua mạch.
- + Ở điểm tương đương dòng i → 0 bởi nồng độ chất khử [Fe(CN)₆]⁻⁴ rất bé.
- + Sau điểm tương đương Ce⁴⁺ có dư trong dung dịch nên trên anod oxy hóa Ce³⁺, còn trên catod khử Ce⁴⁺. Dòng qua mạch lại tăng lên (hình 13.14a).

Ở đây ta có hai hệ thuận nghịch:

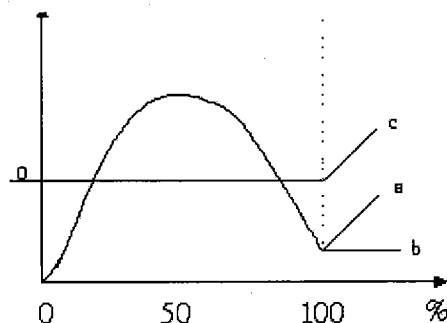


- Nếu chất cần chuẩn độ thuận nghịch, còn dung dịch chuẩn không thuận nghịch thì sau điểm tương đương dòng không tăng. Ví dụ chuẩn độ iod bằng thiosulfat (hình 13.14b).
- Nếu hệ không thuận nghịch được chuẩn độ bằng một hệ thuận nghịch, dòng qua mạch không đáng kể cho đến điểm tương đương. Chỉ sau điểm tương đương dòng mới tăng lên (hình 13.14c). Ví dụ chuẩn độ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bằng dung dịch iod.

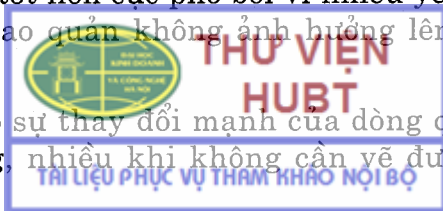
4.2.3. Đánh giá kỹ thuật chuẩn độ ampe

Chúng ta thấy chuẩn độ ampe có nhiều ưu thế hơn so với chuẩn độ đo thế hoặc cực phổ:

- Trong chuẩn độ đo thế, đo độ dẫn hay đo thể tích với chỉ thị nhìn mắt thường phải xây dựng đường cong từ nhiều điểm. ở đây chỉ cần một số điểm trước và sau điểm tương đương. Hơn nữa các điểm này có thể ở xa điểm tương đương.
- Có thể sử dụng các phản ứng acid base, kết tủa, oxy hóa khử cho chuẩn độ ampe.
- Độ nhạy của nó cao hơn phân tích cực phổ. Nếu chuẩn độ theo dòng của dung dịch chuẩn thì nồng độ của nó có thể gấp 10-20 lần nồng độ của ion cần định lượng. Thông thường giới hạn định lượng của chuẩn độ ampe thấp hơn cực phổ: có thể định lượng đến nồng độ 10^{-6} M.
- Độ lặp lại của chuẩn độ ampe tốt hơn cực phổ bởi vì nhiều yếu tố như: bản chất nền, đặc tính của mao quản không ảnh hưởng lên kết quả phép đo.
- Trong chuẩn độ ampe kép, do sự thay đổi mạnh của dòng qua mạch đo ở điểm kết thúc phản ứng, nhiều khi không cần vẽ đường cong chuẩn độ.
- Trong chuẩn độ ampe có thể dùng các thuốc thử hữu cơ, điều mà trong chuẩn độ đo thế khó thực hiện hơn vì không chọn được điện cực chỉ thị thích hợp.



Hình 13.14. Ba dạng đường cong chuẩn độ ampe kép.



5. CÁC KỸ THUẬT VON - AMPE HIỆN ĐẠI

Trong cực phổ cổ điển, dòng qua mạch chỉ nhờ quá trình khuếch tán lại còn bị hạn chế bởi dòng dư nên giới hạn định lượng trong điều kiện thuận lợi nhất cũng chỉ khoảng $10^{-5}M$. Trong kỹ thuật von-ampe điện cực rắn, dòng điện qua mạch nhờ khuếch tán và khuấy trộn cơ học nên giá trị của nó lớn hơn dòng cực phổ (khoảng chục lần). Tuy vậy kỹ thuật này vẫn còn nhiều hạn chế không chỉ ở giới hạn định lượng mà cả khả năng tách và phạm vi ứng dụng.

Nhằm khắc phục những nhược điểm của kỹ thuật von-ampe quét thế tuyến tính, người ta đã có nhiều cải tiến nhằm chủ yếu vào thế phân cực điện cực chỉ thị. Hình 13.2 mô tả 3 loại tín hiệu kích thích được ứng dụng gần đây.

5.1. Von - ampe xung

Kỹ thuật xung do Baker và Jenkins tìm ra năm 1952. Kỹ thuật này đã làm tăng rõ rệt tỷ lệ dòng faraday và dòng không faraday nên có thể định lượng đến mức nồng độ $10^{-8}M$.

Sự khác nhau giữa các kỹ thuật đo là dạng sóng kích thích và chế độ đo dòng. Người ta phân biệt:

- Von - ampe xung thường (NPV: Normal - pulse voltammetry)
- Von - ampe xung vi phân (DPV: Differential - pulse voltammetry)

Kỹ thuật này được áp dụng đầu tiên cho điện cực nhỏ giọt thủy ngân, vì vậy có tên là cực phổ xung. Tuy nhiên cả 2 cách đo trên có thể áp dụng cho điện cực rắn.

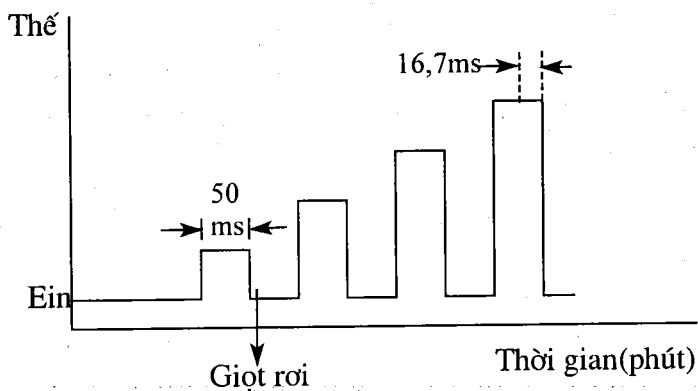
5.1.1. NPV

Một dãy xung có biên độ tăng dần được áp vào gần cuối giọt thủy ngân kế tiếp nhau. Thời gian giữa các xung, điện cực được áp thế không đổi, ở đó không có phản ứng điện cực của chất phân tích. Biên độ xung tăng tuyến tính, dòng đo sau khi đặt xung khoảng 40ms, lúc này dòng tự giảm gần đến 0. Trị số dòng khuếch tán giới hạn i_l được tính theo phương trình Cottrell cải biên:


$$i_l = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \quad (13.17)$$

Ở đây: t_m là khoảng thời gian từ khi áp xung đến lúc đo dòng.

So với cực phổ dòng một chiều, dòng i_l ở đây tăng lên 5 - 10 lần.



Hình 13.15. - Von - ampe xung thường (NPV).

5.1.2. DPV

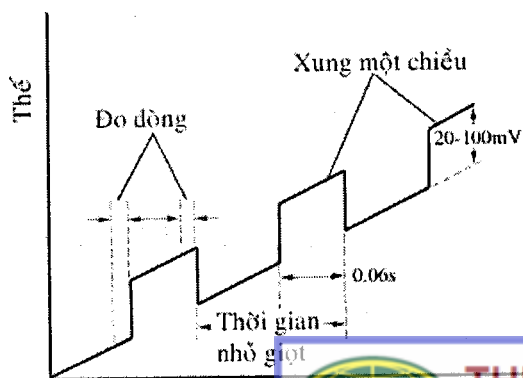
Trong von - ampe xung vi phân, xung được áp vào thế tuyến tính của điện cực nhỏ giọt ngay vào thời gian cuối của giọt.

Dòng được đo hai lần cho một giọt thủy ngân:

Tại t_1 : Thời điểm trước khi áp xung

Tại t_2 : Khoảng 40ms sau khi đặt xung (trước khi giọt rơi)

Hiệu của dòng $\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$ được vẽ theo thế phân cực E. Trên cực phổ đồ xung vi phân xuất hiện cực đại, dòng i_p , chiều cao của nó tỷ lệ thuận với nồng độ C chất phân tích.



Hình 13.16. - Von - ampe xung vi phân (DPV).

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi} t_m} \left(\frac{1-\delta}{1+\delta} \right) \quad (13.18)$$

Ở đây:

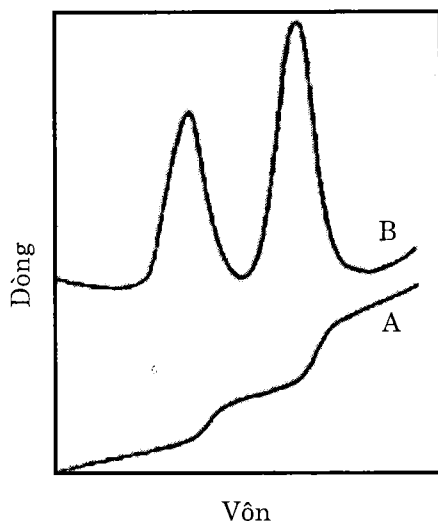
$$\delta = \exp[(nF/RT) (\Delta E/2)]$$

ΔE là biên độ của xung,

Thế E_p ứng với dòng i_p tương tự như $E_{1/2}$ trong cực phổ cổ điển, là đặc trưng định tính cho chất phân tích:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (13.19)$$

Trên hình 13.17 trình bày cực phổ đồ cho xung thường (đường A) và xung vi phân (đường B) của dung dịch có 2 ion Cd^{2+} và Pb^{2+} cùng nồng độ 1mg/l với nền HNO_3 0,1M.



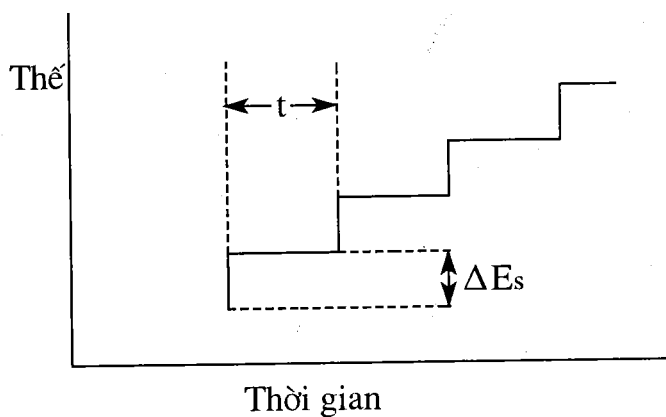
Hình 13.17. Cực phổ đồ xung thường (đường A) và xung vi phân (đường B)

Trong cực phổ xung thường chọn biên độ xung 25 - 50mV, tốc độ quét thế tuyến tính 5mV/S. Có thể đo định lượng phân biệt được khi hai pic cách nhau 50mV. DPV được ứng dụng rất tiện lợi cho phân tích các chất vô cơ và hữu cơ.

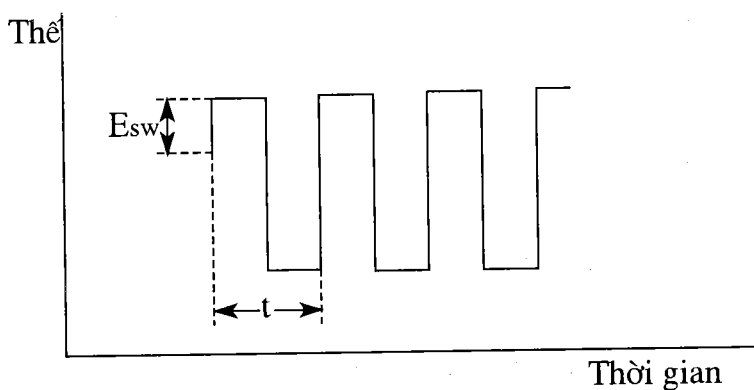
5.2. Von-ampe sóng vuông (SWV)

Von - ampe sóng vuông (square-wave voltametry) là một dạng von -ampe xung sóng vuông kích thích được hình thành bằng cách chồng một xung vuông (hình 13.18b) lên một xung bậc thang (hình 13.18a). Chiều dài mỗi bậc thang cũng là chu kỳ của xung vuông (τ) khoảng 5ms, bước thế của mỗi bậc thang cao $\Delta E_s = 10mV$. Trị số xung vuông thường $2E_{sv}$ là 50mV. Hoạt động ở điều kiện trên, xung có tần số 200Hz, quét thế 1V mất 0,5s. Với hệ thuận nghịch, xung này đủ lớn để sản phẩm tạo thành trong quá trình khử ở phần nửa xung thuận được oxy hóa hết ở phần nửa xung ngược. Ở hình 13.19 ta thấy dòng khử catod i_1 ở nửa xung thuận và dòng anod i_2 ở nửa xung ngược. Hiệu hai dòng $\Delta i = i_1 - i_2$ tỷ lệ với nồng độ chất phân tích. Đỉnh dòng $i_p = \Delta i_{max}$ ứng với thế bán sóng $E_{1/2}$ của hệ.

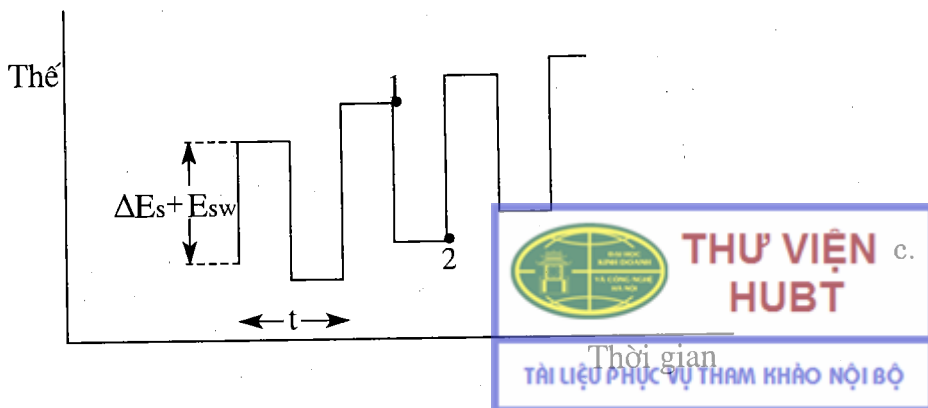
Ưu điểm của kỹ thuật này là tốc độ quét thế nhanh nên mất ít thời gian và độ nhạy lớn.



a.



b.



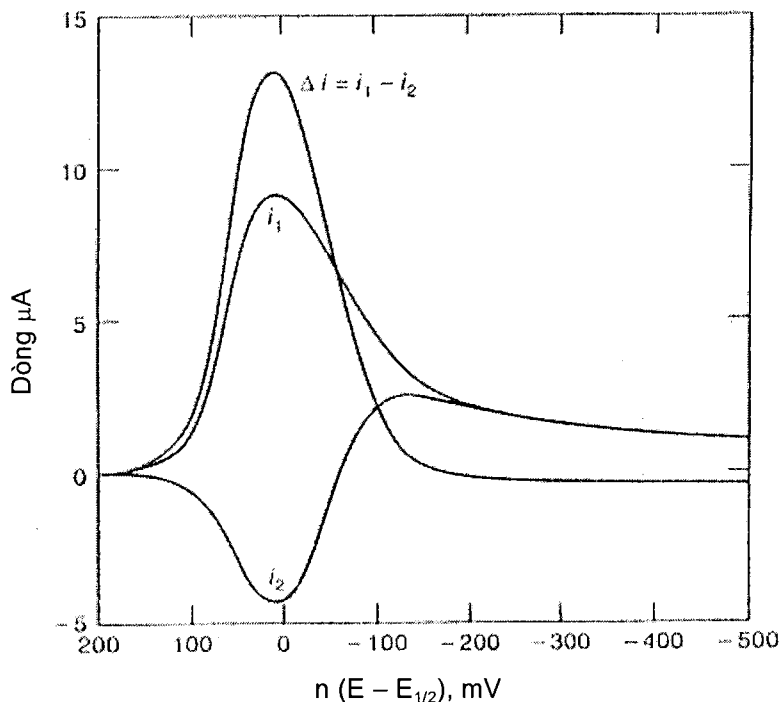
Hình 13.18. Sự hình thành xung sóng vuông:

a) Xung bậc thang,

b) xung vuông,

c) Tín hiệu kích thích trong von - ampe xung sóng vuông:

Dòng đáp ứng $\Delta i = i_1 - i_2$ ứng với hai điểm 1 và 2 (c).



Hình 13.19. Dòng khử catod i_1 và dòng oxy hóa anod i_2 trong von - ampe xung sóng vuông.

5.3. Ứng dụng của von - ampe xung

Hiện nay, von - ampe xung (DPV và SWV) đã thay thế cực phổ dòng một chiều trong định lượng nhiều chất vô cơ và hữu cơ.

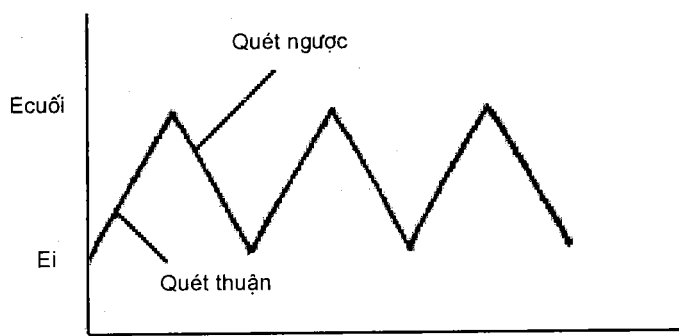
Thường dùng phương pháp thêm chuẩn, sai số khoảng 1 - 3% với nồng độ $10^{-7}M$ và lớn hơn. Cần nhớ rằng chiều cao pic thay đổi theo pH và thành phần nền của dung dịch.

Nhiều chất hữu cơ cho sóng cực phổ. Các nhóm chức aldehyd, ceton, quinon, nitro, nitroso, mercaptan... cho sóng đặc trưng. Ngoài ra một số hợp chất hữu cơ còn cho sóng hydro xúc tác (các amin, dị vòng nitơ...) rất có ích khi phân tích mẫu sinh học.

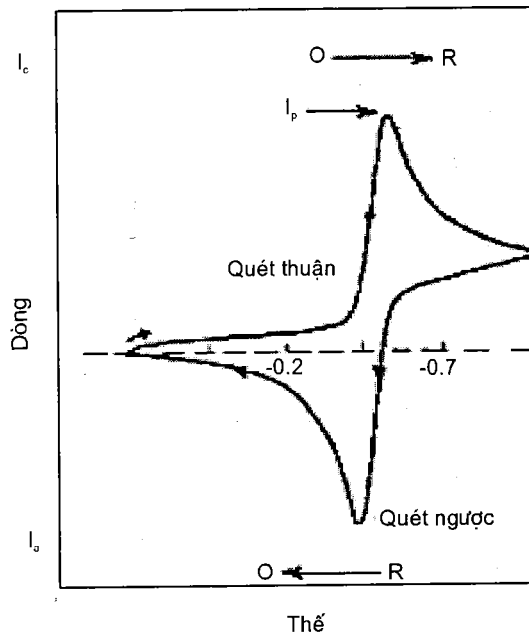
5.4. Von-ampe tuần hoàn (cyclic voltammetry)

Trong kỹ thuật này người ta quét thế một điện cực công tác tĩnh (trong dung dịch không khuấy trộn cơ học) bằng sóng thế tam giác. Trong quá trình quét thế người ta đo dòng qua mạch. Đồ thị $i-E$ tạo nên đường cong von-ampe tuần hoàn. Đường cong này khá phức tạp phụ thuộc vào thời gian và nhiều thông số hóa lý của hệ.

Hình 13.21 mô tả đường cong von-ampe của một hệ thuận nghịch $O \rightleftharpoons R$ trong một chu kỳ quét thế.



Hình 13.20. Quét thế tuần hoàn (ba chu kỳ sóng tam giác)



Hình 13.21. Đường cong von-ampe tuần hoàn của hệ thuận nghịch
 $O + ne \rightleftharpoons R$ với quét thế một chu kỳ

Thế xuất phát E_i của nửa đầu chu kỳ (quét thuận) được chọn sao cho không có dòng khử của dạng oxy hóa O có mặt trong dung dịch. Thế tăng dần đến khi xảy ra quá trình khử, ta có dòng catod i_c . Dòng này đạt cực đại i_p sau đó giảm dần. Sau khi qua vùng thế có quá trình khử catod (ít nhất $90/n$ mV), thế quét đổi hướng sang nửa chu kỳ sau, giảm dần đến khi trở về giá trị ban đầu E_i . Trong quá trình quét ngược, phân tử R (được tạo thành ở nửa chu kỳ quét thuận trước đó đang có mặt ở gần bề mặt điện cực chưa kịp đi vào trong lòng dung dịch) sẽ bị oxy hóa trở lại dạng O . Dòng anod i_a xuất hiện, đạt cực trị rồi giảm dần.

Nếu sản phẩm khử R không bền (tức là không có quá trình chuyển $R \rightarrow O$) thì dòng anod bằng không. Cho nên kỹ thuật von-ampe chu kỳ được dùng phổ biến để thu nhận thông tin định tính của các phản ứng điện hoá: nhiệt động học của quá trình oxy hóa khử, động học của phản ứng dị thể chuyển electron, tác động của môi trường đến phản ứng...

Giải thích đường cong von-ampe tuần hoàn cần dựa vào sự thay đổi nồng độ ở bề mặt điện cực trong quá trình quét thế theo chu kỳ.

Đối với hệ thuận nghịch, dòng cực đại i_p được tính theo phương trình Randles-Sevcik:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} V^{1/2} C \quad (13.20)$$

Ở đây:

n : Số electron cho nhận của hệ thuận nghịch,

A : Diện tích bề mặt điện cực (cm^2),

D : Hệ số khuếch tán (cm^2/s),

V : Tốc độ quét thế (v/s),

C : Nồng độ (mol/cm^3).

Như vậy i_p tỷ lệ thuận với nồng độ và căn bậc hai của tốc độ quét thế V . Tỷ lệ dòng i_p ngược và thuận ($i_{p,r}/i_{p,f}$) sẽ là đơn vị cho cặp thuận nghịch đơn.

Giá trị thế E_p ứng với i_p liên quan đến giá trị E° của cặp oxy hóa khử thuận nghịch:

$$E^\circ = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (13.21)$$

$E_{p,a}$ và $E_{p,c}$ là thế ứng với dòng cực đại anod và dòng cực đại catod. Sự chênh lệch giữa hai giá trị này sẽ là:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0,0592}{n} \quad (13.22)$$

Khác với i_p , cả hai đại lượng $E_{p,a}$ và $E_{p,c}$ đều không phụ thuộc vào tốc độ quét thế V .

Có thể dùng ΔE_p để xác định số electron n cho quá trình điện cực.

5.5. Von-ampe ngược (stripping voltammetry)

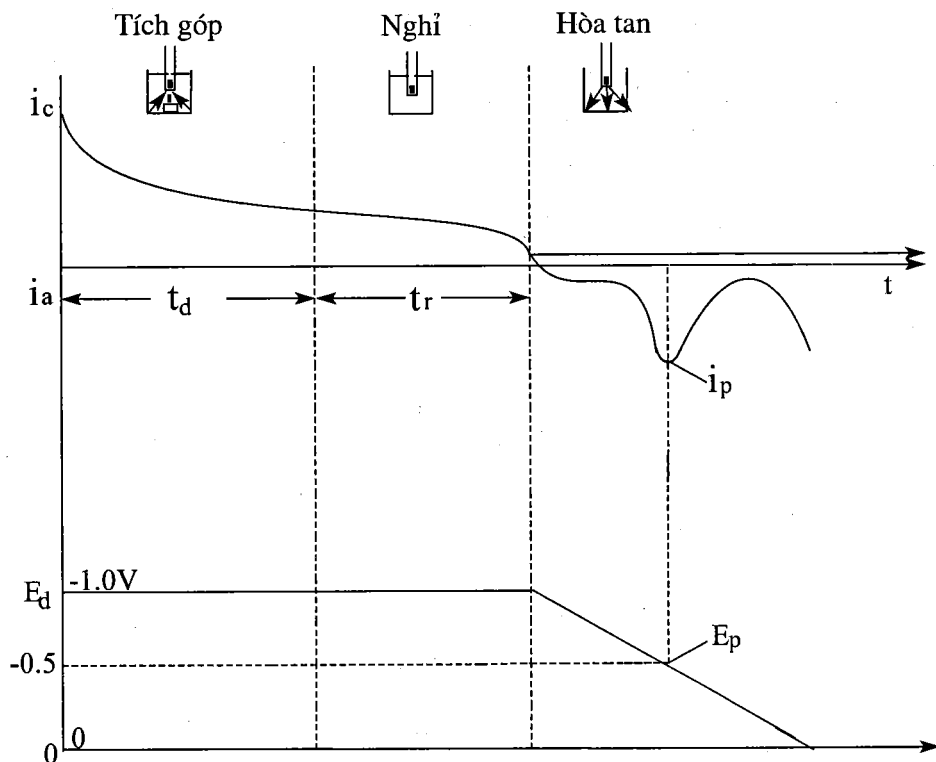
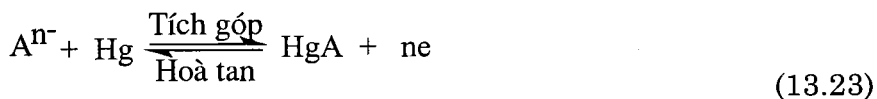
Kỹ thuật von - ampe ngược còn được gọi là von - ampe hoà tan, bao gồm 2 giai đoạn: Đầu tiên là tách điện phân chất phân tích lên vi điện cực diễn ra trong dung dịch khuấy trộn cơ học. Sau một thời gian nhất định, ngừng điện phân. Sau đó chất phân tích đã tách ra trên vi điện cực, được hoà tan trở lại. Dùng một kỹ thuật von - ampe thích hợp để xác định chất phân tích ở giai đoạn sau. Thường dùng cực phổ ngược. Dựa vào bản chất của hai giai đoạn người ta phân ra hai dạng cực phổ ngược.

5.5.1. Cực phổ ngược anod

Ion kim loại được tích góp nhờ điện phân trên điện cực thủy ngân (dạng giọt treo thủy ngân hoặc màng mỏng thủy ngân). Sau đó hoà tan kim loại bằng quét thế anod.

5.5.2. Cực phổ ngược catod

Giai đoạn đầu là tích góp anod của chất phân tích, sau đó là quét thế catod hoà tan trên điện cực thủy ngân.



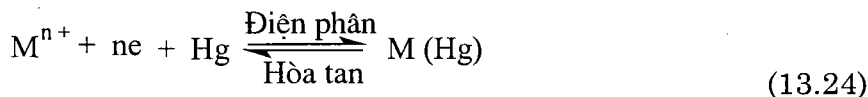
Hình 13.22. Nguyên tắc kỹ thuật cực phổ ngược anod.

Dòng khử catod là thông tin định lượng cho A^{n+} . Các anion Cl^- , Br^- tạo muối không tan $AgCl$, $AgBr$ còn có thể được định lượng trên điện cực đĩa quay bằng bạc theo kỹ thuật von-ampe ngược catod.

Hiện nay kỹ thuật cực phổ ngược anod được dùng rất phổ biến để phân tích vết kim loại hoà tan trong nước. Vì vậy chúng ta trình bày kỹ hơn nguyên tắc của kỹ thuật này.

Giai đoạn đầu ion kim loại M^{n+} nhờ phản ứng khử catod tạo hỗn hống $M(Hg)$. Ở đây kim loại tích góp trên điện cực. Thời gian khử catod t_d thường 12 - 15 phút. Nếu nồng độ M^{n+} thấp thời gian tích góp có thể kéo dài hơn. Trong quá trình điện phân thường dùng khuấy từ trộn đều dung dịch. Thế điện phân E_d giữ không đổi trong thời gian t_d . Thế này âm hơn thế E^0 của cặp M^{n+}/M^0 , số mol của kim loại M tạo thành trong hỗn hống là $i_d t_d / nF$.

- Nếu dùng điện cực giọt treo thủy ngân thì cần có thời gian nghỉ t_r khoảng 30 giây và ngừng khuấy từ để hỗn hống đồng nhất. Nếu dùng màng thủy ngân thì không cần thời gian nghỉ, điện cực tiếp tục quay và chuyển sang giai đoạn hoà tan anod.
- Quét thế tuyến tính về phía dương hơn. Có thể hình dung hai quá trình điện phân và hoà tan như sau:



Trên đường cong $i - E$ của quá trình oxy hóa anod xuất hiện cực đại dòng i_p . Thế E_p ứng với i_p là thông số định tính cho kim loại trong mẫu phân tích. Trị số dòng i_p phụ thuộc vào nhiều yếu tố.

- Với điện cực màng mỏng thủy ngân:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 V^2 A C_{Hg}}{2,7RT} \quad (13.25)$$

Ở đây:

A và l : Diện tích và bề dày của màng thủy ngân,

V : Tốc độ quét thế hoà tan anod,

C_{Hg} : Nồng độ của kim loại M trong hỗn hống:

$$C_{Hg} = \frac{i_l t_d}{n F V_{Hg}} \quad (13.26)$$

Ở đây:

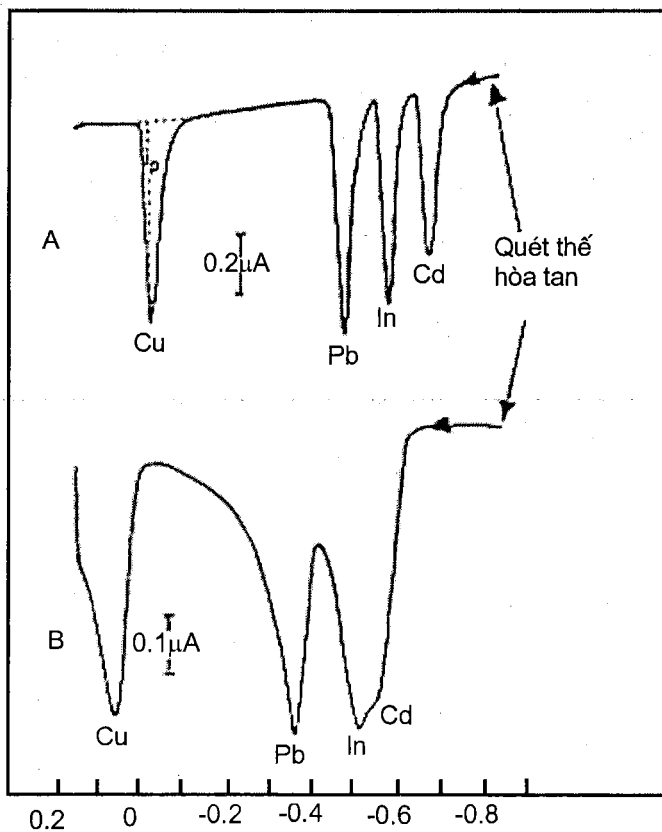
i_l : Dòng giới hạn để khử M^{n+} ,

V_{Hg} : Thể tích của điện cực thủy ngân.

- Với điện cực giọt treo thủy ngân:

$$i_p = 2,72 \cdot 10^{+5} n^{3/2} A D^{1/2} V^{1/2} C_{Hg} \quad (13.27)$$

Điện cực màng mỏng thủy ngân có tỷ số diện tích/thể tích lớn hơn điện cực giọt treo cho nên hiệu quả điện phân cao hơn và nhạy hơn. Hơn nữa điện cực màng mỏng thủy ngân, không can thiệp vào quá trình khuếch tán, toàn bộ kim loại trong thủy ngân tham gia vào quá trình hoà tan anod. Vì vậy pic nhọn hơn, tăng độ phân giải khi phân tích hệ nhiều thành phần (hình 13.23).



Hình 13.23. Cực phổ ngược cho dung dịch có Cu^{2+} , Pb^{2+} , In^{3+} và Cd^{2+} có cùng nồng độ $2,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$

Ở điện cực màng mỏng Hg (đường A) và giọt treo Hg (đường B).

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Hoàng Minh Châu, Từ Văn Mặc, Từ Vọng Nghi (2002), *Cơ sở Hóa học phân tích*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, chương 14 (trang 219 - 250).
2. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J (1996), *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Chapter 21, p.p. 460 - 494.



CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

13.1. Hãy phân biệt:

- Dòng giới hạn, dòng khuếch tán, dòng dư,
- Dòng faraday và dòng không faraday,
- Cực phổ và von-ampe,

- Cực phổ xung vi phân và xung thường,
- Cực phổ xung vi phân và cực phổ sóng vuông,
- Von-ampe tuần hoàn và cực phổ cổ điển.

13.2. Tại sao cần sục nito vào dung dịch phân tích trước khi ghi sóng cực phổ.

13.3. Giải thích nguồn gốc của dòng dư.

13.4. Dữ liệu thực nghiệm cực phổ của 6 dung dịch Pb^{2+} :

Nồng độ (mM/L)	$\bar{i}_d$ (μA)	Nồng độ (mM/L)	$\bar{i}_d$ (μA)
0,510	5,65	3,06	27,91
1,02	10,70	4,08	36,08
2,04	19,08	5,10	45,82

Khi ghi sóng dung dịch nền (không có Pb^{2+}) dòng $i = 1,32\mu\text{A}$. Hãy:

- Vẽ đồ thị dòng $\bar{i}_d$ - nồng độ C của Pb^{2+} ,
- Tính phương trình hồi qui bậc nhất,
- Tính nồng độ Pb^{2+} của 3 dung dịch có dòng $\bar{i}_d$ đo được (μA):

$$X_1 = 2,76, \quad X_2 = 7,75, \quad X_3 = 40,01$$

13.5. Từ dữ liệu của bài 13.4, hãy tính:

- Giá trị trung bình của $K = i_d/C$
- Giá trị lý thuyết của K cho biết:
 - Hệ số khuếch tán $D = 9,8 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$
 - Thời gian nhỏ giọt 2,88s
 - Tốc độ nhỏ giọt 2,53mg/s
- Sai số % của giá trị K lý thuyết

13.6. Dữ liệu thực nghiệm cho 3 điện cực nhỏ giọt thủy ngân

Dữ liệu	Điện cực		
	A	B	C
Tốc độ nhỏ giọt (mg/s)	0,982	3,92	6,96
Thời gian nhỏ giọt (s)	6,53	2,36	1,37
i_d/C ($\mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1}$)		4,86	

Hãy tính tỷ số i_d/C của điện cực A và C.

13.7. Điện cực C trong bài tập 13.6 được dùng để nghiên cứu phản ứng khử của một chất hữu cơ có hệ số $D = 6,2 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$. Dung dịch chất hữu cơ nồng độ $4,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ có dòng $i_d = 8,41\mu\text{A}$. Hãy tính n cho phản ứng.

- 13.8. Một chất hữu cơ có phản ứng khử catod trên điện cực A (bài 13.6). Dung dịch nồng độ $9,6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ cho dòng $i_d = 7,01 \mu\text{A}$. Tính hệ số khuếch tán D.
- 13.9. Phương pháp thêm chuẩn định lượng cực phổ chì: Thêm 5,00mL dung dịch chì chuẩn $8,00 \cdot 10^{-3} \text{M}$ vào 25,00mL dung dịch mẫu. Thêm chất nền và nước đến 50,00mL. Tính nồng độ chì trong 2 dung dịch sau:

Dung dịch thử	Dòng khuếch tán (μA)	
	Dung dịch thử	Dung dịch thử + chuẩn
X_1	78,3	88,7
X_2	41,0	51,4

- 13.10. Giải thích những ưu thế của điện cực nhỏ giọt thủy ngân so với điện cực rắn (platin hoặc graphit).
- 13.11. Trình bày ưu thế của cực phổ sóng vuông so với cực phổ xung vi phân.
- 13.12. Tại sao von-ampe ngược lại nhạy hơn kỹ thuật von-ampe dòng một chiều.
- 13.13. Giải thích đường cong chuẩn độ ampe một điện cực và hai điện cực, thông qua một ví dụ cụ thể.
- 13.14. Trong Dược điển Việt Nam III người ta qui định phân tích các nguyên liệu sulfamid bằng chuẩn độ ampe. Giải thích một chuyên luận của Dược điển.
- 13.15. Người ta định lượng tạp chất niken trong muối coban bằng cực phổ. Cân 2,500g muối coban hoà tan vào muối, thêm HCl và pyridin định mức thành 100,00mL. Lấy 50,00mL ghi cực phổ, dòng $i_d = 1,35 \mu\text{A}$. Thêm vào bình cực phổ 5,00mL dung dịch chuẩn NiCl_2 nồng độ $1,00 \cdot 10^{-2} \text{mol/L}$, dòng i_d đo được $3,80 \mu\text{A}$. Tính hàm lượng nickel trong mẫu muối coban.



KỸ THUẬT XỬ LÝ MẪU

MỤC TIÊU

1. Giải thích được nguyên tắc phân hủy mẫu bằng nhiệt kết hợp với các chất oxy hóa.
2. Trình bày được bốn kỹ thuật loại chất cản trở trong xử lý mẫu: kết tủa, cất, chiết lỏng - lỏng và chiết pha rắn.
3. Đánh giá được ứng dụng của các kỹ thuật này trong xử lý mẫu phục vụ phân tích Được.

Xử lý mẫu là bước đầu tiên nhưng rất quan trọng trong phân tích mẫu. Nó thường là nguồn sai số lớn cho kết quả, thậm chí quyết định sự thành công của phương pháp phân tích. Có thể phân kỹ thuật xử lý mẫu thành hai nhóm:

* *Nhóm hòa tan phân hủy mẫu*: Dùng các tác nhân lý hóa chuyển mẫu có thành phần phức tạp thành dạng đơn giản hơn tạo điều kiện thuận lợi cho phân tích. Ví dụ:

- Dùng các acid để hòa tan mẫu, chuyển các thành phần vào dung dịch.
- Dùng các chất oxy hóa để phân hủy các chất hữu cơ, vô cơ hóa mẫu để phân tích kim loại.

* *Nhóm tách pha*: Dùng các kỹ thuật thích hợp như: cất, kết tủa, chiết xuất... để loại chất cản trở cho xác định chất phân tích hoặc tách chất phân tích ra khỏi mẫu.

Mẫu phân tích thường đa dạng: có thể ở dạng lỏng, khí hoặc rắn; nên mẫu có thể là khoáng, hữu cơ hoặc dạng hỗn hợp khoáng hữu cơ. Tùy thuộc vào đặc điểm của mẫu và mục đích của phân tích để chọn kỹ thuật xử lý mẫu thích hợp. Sau đây sẽ trình bày nguyên tắc của một số kỹ thuật xử lý mẫu thường dùng trong phân tích các chất vô cơ và hữu cơ.

1. HÒA TAN VÀ PHÂN HỦY MẪU

Phần lớn đo lường phân tích được thực hiện trong dung dịch nước. Trong khi đó nhiều mẫu ít tan trong nước, nhiều khi cần dùng đến các tác nhân khác để hòa tan mẫu hoặc phân hủy mẫu. Ở đây sẽ trình bày 4 kỹ thuật phân hủy mẫu rắn hoặc lỏng để chuyển chất phân tích vào dung dịch nước:

- Dùng acid và nhiệt phân hủy mẫu trong bình hở,
- Kỹ thuật vi sóng,
- Đốt chất hữu cơ trong không khí hoặc oxy,
- Nung chảy với các muối.

1.1. Phân hủy bằng nhiệt và acid mạnh

Khi phân hủy mẫu vô cơ trong bình hở thường dùng các acid mạnh ở nhiệt độ là điểm sôi của thuốc thử. Trong quá trình phân hủy mẫu có thể diễn ra phản ứng oxy hoá, thủy phân cắt liên kết ester, amid...

1.1.1. Acid hydrocloric

HCl đậm đặc có nồng độ khoảng 12M, hòa tan được nhiều mẫu vô cơ nhưng ít dùng cho mẫu hữu cơ. Khi đun nóng khí HCl bay hơi làm nồng độ acid giảm nên nhiệt độ sôi giảm dần và giữ không đổi ở 110°C (ứng với nồng độ HCl khoảng 6M).

1.1.2. Acid nitric

HNO₃ đậm đặc đun nóng là chất oxy hóa mạnh, hòa tan hầu hết các kim loại trừ nhôm và crôm. Để vô cơ hóa mẫu hữu cơ thường kết hợp HNO₃ với các acid khác như H₂SO₄, HClO₄ hoặc các tác nhân oxy hóa khác.

1.1.3. Acid sulfuric

H₂SO₄ đậm đặc có nhiệt độ sôi cao (khoảng 340°C) khi đun nóng hòa tan được nhiều chất vô cơ. Với các mẫu hữu cơ cần kết hợp H₂SO₄ với các chất oxy hóa khác.

1.1.4. Acid percloric

HClO₄ thương mại có nồng độ dao động 60 ÷ 72%. Hỗn hợp có điểm sôi hằng định 203°C ứng với nồng độ HClO₄ 72,4%. Dung dịch HClO₄ đậm đặc là chất oxy hóa mạnh, nhưng dễ gây nổ *khi đun nóng hoặc tiếp xúc với các chất hữu cơ, các chất vô cơ dễ bị oxy hóa*. Vì vậy lúc thao tác cần hết sức cẩn thận, phòng chống cháy nổ.

1.1.5. Hỗn hợp oxy hóa

Khi vô cơ hóa mẫu hữu cơ thường dùng các hỗn hợp oxy hóa. Ngoài nước cường thủy (aqua regia) đã biết (3 thể tích HCl đậm đặc + thể tích HNO₃ đậm đặc), người ta thường dùng các hỗn hợp: HNO₃ + HClO₄; HNO₃ + H₂SO₄; H₂SO₄ + H₂O₂; HNO₃ + Br₂.



1.2. Kỹ thuật vi sóng

Các phương pháp đốt nóng truyền thống dùng cho phân hủy mẫu ở trên dựa vào hiện tượng dẫn nhiệt. Nhiệt được truyền từ bên ngoài vào bên trong

mẫu thông qua sự tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp. Năng lượng nhiệt được phân bố khắp toàn bộ vật được đốt nóng nhờ sự chênh lệch nhiệt độ ở hai điểm khác nhau gây ra đối lưu nhiệt. Phương pháp này thường chậm và không ổn định. Để khắc phục nhược điểm này, người ta dùng *vi sóng* đốt nóng thay cho phương pháp truyền thống.

Vi sóng (microwave) là sóng điện từ có bước sóng $1 \div 1000$ mm. Vi sóng dùng trong khoa học và y tế có tần số dao động từ 915 MHz đến 22000MHz. Trong xử lý mẫu thường dùng tần số 2 450 MHz. Ưu điểm của đốt nóng bằng vi sóng:

- Không có quán tính nhiệt (cả khi bắt đầu và kết thúc),
- Đốt nóng nhanh, nhiệt được sinh ra ngay tại trung tâm của mẫu và lan theo hướng từ trong ra ngoài.
- Tác động đặc biệt mạnh với các phân tử có liên kết phân cực.

Khi vô cơ hóa một mẫu thực phẩm hoặc mẫu bùn thải để xác định vi lượng kim loại có thể mất 2 - 4 giờ theo phương pháp truyền thống, nhưng chỉ mất 30 - 40 phút khi dùng vi sóng. Trên thị trường có 3 thiết bị vi sóng dùng cho phân huỷ mẫu.

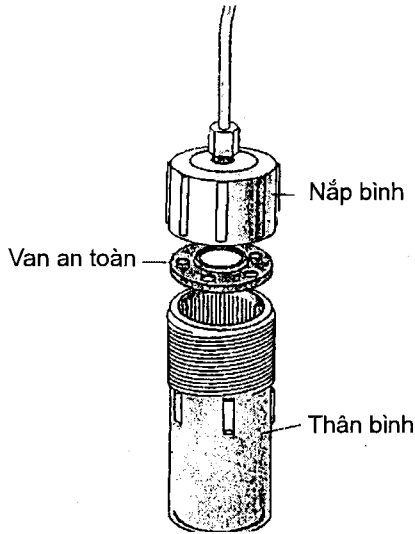
1.2.1. Bình vi sóng (microwave vessel)

Hình 14.1 mô tả sơ đồ cấu tạo của một bình vi sóng. Thân bình được chế tạo từ vật liệu chịu được tác động của acid vô cơ và không hấp thụ vi sóng.

Teflon là vật liệu gần như lý tưởng cho mục đích này. Nhược điểm duy nhất của Teflon là độ chảy ở 300°C. Vì vậy, khi vận hành cần kiểm tra nhiệt độ trong bình khi phân huỷ mẫu với H₂SO₄ (điểm sôi của H₂SO₄ đậm đặc là 340°C).

Ngoài Teflon, người ta còn dùng thạch anh hoặc thủy tinh borosilicat làm vật liệu chế tạo thân bình vi sóng. Loại vật liệu này không chịu được HF - là thuốc thử thường dùng để phân huỷ mẫu silicat và thép khó chảy (refractory alloys).

Bình hoạt động ở áp suất 120 ± 10 psi (1psi $\approx$ 0,068 atm). Thường có lò vi sóng cho 12 bình đồng thời phân huỷ mẫu.



Hình 14.1. Bình vi sóng phân huỷ mẫu

1.2.2. Bom vi sóng (microwave bomb)

Bom vi sóng vận hành ở áp suất 80 atm, nhiệt độ 250°C. Thân bom được chế tạo từ vật liệu polymer không hấp thụ vi sóng. Mẫu được đặt trong cốc Teflon cài vào vòng hình chữ O trong bom.

Bom vi sóng được dùng để phân huỷ mẫu thép khó chảy, không phân huỷ được bằng bình vi sóng ở trên.

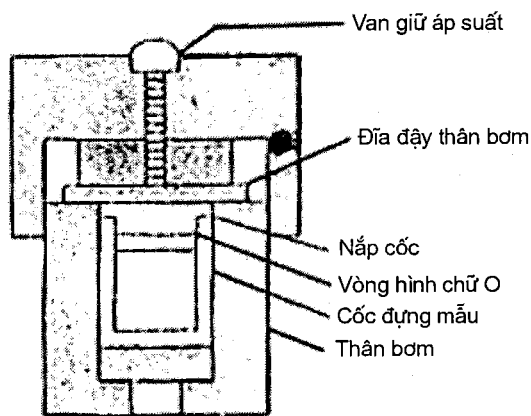
1.2.3. Lò nung vi sóng (microwave furnace)

Lò này có một buồng nhỏ chế tạo từ vật liệu silicon carbid được bao một lớp cách nhiệt bằng thạch anh. Khi cho vi sóng hội tụ vào buồng này, nhiệt độ có thể đạt được 1000°C trong vài phút.

Lò nung vi sóng được dùng để nung chảy hoặc tro hóa khô mẫu hữu cơ. Lò có ưu điểm so với lò nung điện truyền thống ở ba điểm:

- Có thể đạt nhiệt độ cao rất nhanh,
- Khi vận hành không toả nhiệt ra ngoài mỗi khi đưa mẫu vào hoặc lấy mẫu ra khỏi lò.
- Không có cuộn sợi đốt để cấp nhiệt.

Tuy nhiên lò này có dung tích nhỏ, chỉ thích hợp với những chén nung kích thước bé.



Hình 14.2. Bom vi sóng

1.3. Phương pháp đốt phân huỷ mẫu hữu cơ

Phương pháp đốt được sử dụng phổ biến để phân huỷ chất hữu cơ, chuyển chúng thành các chất bay hơi.

1.3.1. Đốt trên ngọn lửa

Cho mẫu vào một chén hoặc đĩa và đun trên ngọn lửa cho đến khi các chất có carbon bị oxy hóa thành khí CO₂. Tiếp theo là phân tích các thành phần không bay hơi bằng cách hòa tan cặn khô trong dung môi thích hợp.

Phương pháp này đơn giản thường dùng để xác định các kim loại trong mẫu. Tuy nhiên một số chất có thể bị mất trong quá trình đốt.

- Tro nhẹ hình thành khi đốt có thể bay ra ngoài do dòng đối lưu hình thành quanh chén đốt.
- Một số kim loại dễ bị bay hơi khi đốt, ví dụ đồng, sắt, vanadi dễ bay hơi khi mẫu phân tích có porphyrin.

1.3.2. Đốt mẫu trong ống

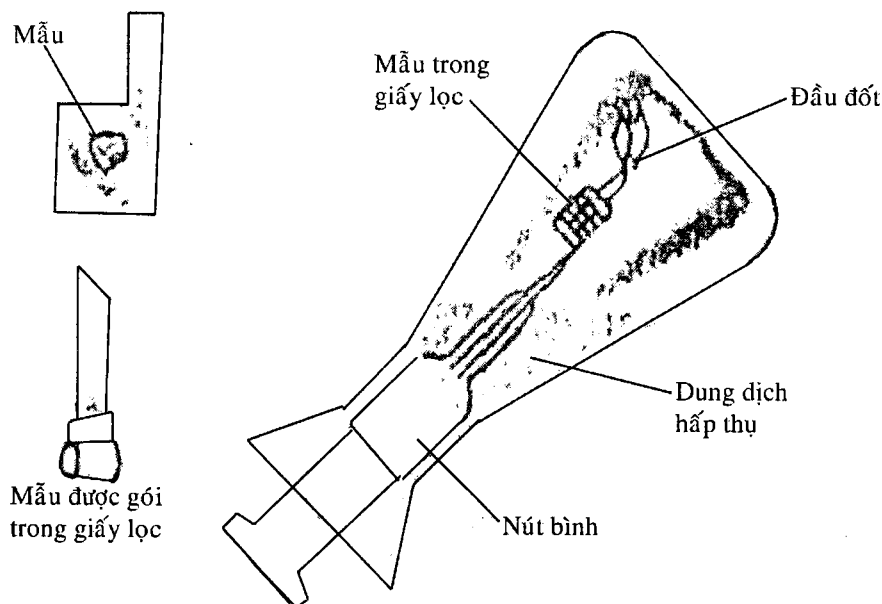
Khi phân tích nguyên tố của chất hữu cơ người ta thường đốt mẫu trong ống có oxy (nhiệt phân - pyrolyse). Ống đựng mẫu có thể là thủy tinh hoặc

thạch anh. Các chất bay hơi từ mẫu được tách riêng và thu nhận để phân tích. Bằng cách này có thể xác định được carbon, hydro, nitơ, các halogen, lưu huỳnh và oxy có trong mẫu. Hiện có những thiết bị tự động phân tích nguyên tố các chất hữu cơ.

1.3.3. Đốt mẫu trong bình kín có oxy

Thường dùng bình đốt Schöniger (hình 14.3). Đây là một bình thủy tinh thành dày dung tích 300 ÷ 1000 mL. Có một giỏ bằng lưới platin nối với nút bình để đựng mẫu (khoảng 2 ÷ 200 mg). Mẫu rắn thường được gói lại bằng giấy lọc không tro.

Trước khi đốt người ta cho một dung dịch hấp thụ (thường là dung dịch Na_2CO_3) vào bình và dùng dòng oxy đuổi không khí ra khỏi bình.



Hình 14.3. Bình đốt Schöniger.

Khi đốt, người ta lật ngược bình và che chắn cẩn thận để đề phòng nguy hiểm nếu nổ bình. Sau khi đốt xong, làm lạnh bình, lấy dung dịch hấp thụ, tráng rửa bình và phân tích thành phần dung dịch.

Thường dùng cách đốt này để xác định: các halogen, lưu huỳnh, phosphor, bor, arsen, selen và nhiều kim loại khác trong mẫu.

1.4. Nung chảy phân hủy mẫu vô cơ

Nhiều chất vô cơ khó tan như silicat, oxyd kim loại, thường được phân huỷ bằng cách nung. Mẫu được trộn với muối kim loại kiềm và nung ở nhiệt độ cao: 300 ÷ 1000°C để chuyển thành các sản phẩm dễ tan trong nước. Các muối kim loại kiềm thường dùng là: Na_2CO_3 , LiBO_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$... Bảng 14.1 giới thiệu một số muối thường dùng cho nung chảy phân huỷ mẫu vô cơ.

Bảng 14.1. Một số chất dùng trong nung chảy phân hủy chất vô cơ

Muối	Nhiệt độ chảy (°C)	Loại chén nung cần dùng	Ứng dụng phân tích
Na_2CO_3	851	Pt	Silicat, silica, nhôm phosphat và sulfat không tan.
$\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{KNO}_3$ (hoặc KClO_3)	-	Pt, Ni	Mẫu cần phải oxy hóa như mẫu có S, As, Sb, Cr...
LiBO_2	849	Pt, Au hoặc glassy carbon	Silicat, nhiều chất vô cơ, gốm.
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$	300	Pt, sứ	Các oxyd ít tan
B_2O_3	577	Pt	Nung chảy silicat và oxyd để xác định kim loại kiềm.

2. KẾT TỬA

Kết tửa là một kỹ thuật thường dùng để tách chất phân tích khỏi mẫu phục vụ định lượng. Trong hóa phân tích I đã giới thiệu cân bằng kết tửa, chuẩn độ kết tửa cũng như phân tích khối lượng. Ở đây chỉ bổ sung thêm vài kỹ thuật cụ thể có thể gặp trong phân tích.

2.1. Điện kết tửa

Người ta dùng mạch điện phân. Kim loại dễ bị khử được tách ra trên điện cực công tác. Những kim loại dễ bị khử hơn kẽm như: nhôm, berili, kim loại kiềm và kiềm thổ thường được tách ra trên điện cực thủy ngân. Có thể dựa vào dữ liệu cực phổ để tính thế cần thiết tách các kim loại này khỏi dung dịch đến nồng độ mong muốn. Ngoài ra có thể dùng kỹ thuật này để phân tích khối lượng bằng cách cân điện cực trước và sau khi điện phân: phân tích điện khối lượng (electrogravimetric analysis).

2.2. Kết tửa protein

Các mẫu dịch động vật (máu, huyết tương, nước tiểu...) thường chứa protein cản trở cho phân tích các chất. Trong trường hợp này, người ta dùng kỹ thuật kết tửa loại protein trước khi phân tích. Khi cần xác định được chất trong dịch sinh học. Các kỹ thuật thường gặp:

2.2.1. Kết tửa bằng acid: Thường dùng nhất là acid trichloroacetic để kết tửa protein. Ngoài ra còn có thể dùng các acid mạnh khác như HClO_4 .

2.2.2. Kết tửa bằng dung môi hữu cơ: Thường dùng methanol, ethanol hoặc acetonitril.

Tuỳ điều kiện phân tích cụ thể, cần chọn kỹ thuật kết tửa thích hợp.

3. KỸ THUẬT CẤT

Có thể dùng kỹ thuật cất để tách các thành phần nếu hệ số phân bố pha hơi - dung dịch của chúng khác nhau nhiều. Bảng 14.2 thống kê một số chất vô cơ có thể tách khỏi mẫu bằng cách cất.

Bảng 14.2. Tách một số chất bằng cách cất

Chất phân tích	Xử lý mẫu	Chất bay hơi	Cách thu mẫu
Carbonat	Acid hóa	CO ₂	CO ₂ + Ba(OH) ₂
Sulfit	Acid hóa	SO ₂	SO ₂ + H ₂ O ₂
Sulfid	Acid hóa	H ₂ S	H ₂ S + Cd ²⁺
Fluorid	Thêm SiO ₂ và acid hóa	H ₂ SiF ₆	Dung dịch kiềm
H ₃ BO ₃	Thêm H ₂ SO ₄ và methanol	B(OCH ₃) ₃	Dung dịch kiềm
NH ₄ ⁺	Thêm NaOH	NH ₃	Dung dịch kiềm
As, Sb	Thêm HCl đậm đặc và H ₂ SO ₄	AsCl ₃ SbCl ₃	Nước

4. CHIẾT LỎNG - LỎNG

Chiết xuất là kỹ thuật được dùng rất phổ biến để chuyển chất phân tích hòa tan trong một dung môi sang một dung môi thứ hai không hòa tan trong dung môi thứ nhất. Trong thực tế thường dùng cân bằng nước - dung môi hữu cơ không tan trong nước để tách và tinh chế chất phân tích.

4.1. Nguyên tắc

4.1.1. Hằng số phân bố D

Một dung dịch nước hòa tan chất A được lắc với một dung môi S (không tan trong nước). Chất A sẽ tan trong hai pha và dẫn đến cân bằng:

A_(n) ⇌ A_(s) (14.1)

Ở đây chỉ số n và s chỉ chất A ở trong pha nước và pha dung môi tương ứng. Ở trạng thái cân bằng giữa hai pha, tỷ số hoạt độ của A ở trong pha nước và pha dung môi ở nhiệt độ xác định là một hằng số, không phụ thuộc vào lượng chất A. Tỷ số đó được gọi là *hằng số phân bố D*. Trong thực hành người ta thường thay hoạt độ bằng nồng độ cân bằng:

D = [A]_s / [A]_n (14.2)

Ở đây [A]_s và [A]_n là nồng độ mol cân bằng của A trong pha dung môi và trong pha nước.

4.1.2. Hệ số phân bố d

Hằng số D là tỷ số nồng độ cân bằng của A trong 2 pha không hòa tan vào nhau. Nếu chất A tồn tại trong pha nước và trong pha dung môi dưới nhiều dạng khác nhau. Ví dụ:

- Trong pha nước: chất A là một acid có thể điện ly thành dạng anion A⁻,
- Trong pha dung môi: chất A có thể nằm ở dạng phức chất, cặp ion,...

Trong trường hợp này người ta dùng hệ số phân bố d. Đó là tỷ số của tổng nồng độ chất A trong pha dung môi và tổng nồng độ chất A trong pha nước.

$$d = \frac{\sum [A]_s}{\sum [A]_n} \quad (14.3)$$

4.1.3. Hiệu suất chiết R

Đặc trưng quan trọng cho chiết xuất là hiệu suất chiết R. Giả sử ta có a₀ milimol của chất A hòa tan trong V_n mL nước. Chiết từ dung dịch này bằng V_s mL dung môi, ví dụ ether hoặc hexan. Khi cân bằng trong pha nước còn lại a₁ milimol và có a₀ - a₁ milimol chuyển vào dung môi. Nồng độ cân bằng sẽ là:

$$[A]_n = a_1 / V_n \quad [A]_s = (a_0 - a_1) / V_s \quad (14.4)$$

Thay giá trị hai phương trình (14.4) vào phương trình (14.2) và sắp xếp lại ta có:

$$a_1 = \left(\frac{r}{D+r} \right) a_0 \quad (14.5)$$

Ở đây $r = V_n / V_s$

Nếu chiết lần thứ hai với thể tích dung môi V_s như lần đầu thì lượng A còn lại trong pha nước là a₂:

$$a_2 = \left(\frac{r}{D+r} \right) a_1 = \left(\frac{r}{D+r} \right)^2 a_0$$

Bằng lập luận tương tự, ở lần chiết thứ n với V_s mL dung môi lượng A còn lại trong pha nước là:

$$a_n = \left(\frac{r}{D+r} \right)^n a_0 \quad (14.6)$$

Từ phương trình này ta có thể tính sai số Δ_n sau n lần chiết:

$$\Delta_n = \frac{a_n}{a_0} = \left(\frac{r}{D+r} \right)^n \quad (14.7)$$

Thay phương trình (14.7) vào phương trình (14.6) ta có:

$$a_n = \Delta_n \cdot a_0$$

Giá trị Δ_n đánh giá phần chất A còn lại sau n lần chiết a_n so với lượng ban đầu a₀ nên được gọi là *sai số chiết*. Hiệu suất chiết n lần R_n sẽ là:

$$R_n = 1 - \Delta_n \quad (14.8)$$

Có thể chuyển phương trình (14.6) sang nồng độ cân bằng bằng cách tính lượng của chất A trong pha nước trước và sau khi chiết.

$$a_n = [A]_n \cdot V_n ; \quad a_o = [A]_o \cdot V_n$$

Thay giá trị a_n và a_o vào phương trình (14.6) ta được:

$$[A]_n = \left(\frac{r}{D+r} \right)^n [A]_o \quad (14.9)$$

Ở đây $[A]_o$ và $[A]_n$ là nồng độ cân bằng của chất A trong pha nước trước khi chiết và sau khi chiết n lần với thể tích dung môi V_s .

Ví dụ 1:

Hệ số phân bố của chất A trong cloroform và nước là 85. Tính nồng độ còn lại trong pha nước của A sau khi chiết từ 50,0 mL dung dịch nước $1,00 \cdot 10^{-3}$ M bằng cloroform:

- a) 1 lần x 50,0 mL,
- b) 2 lần x 25,0 mL,
- c) 5 lần x 10,0 mL.

Thay giá trị vào phương trình (14.9) ta có:

$$a) \quad r = \frac{50}{50} = 1 \rightarrow [A]_1 = \left(\frac{1}{85+1} \right) 1,00 \cdot 10^{-3} = 1,16 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$b) \quad r = \frac{50}{25} = 2 \rightarrow [A]_2 = \left(\frac{2}{85+2} \right)^2 \cdot 1,00 \cdot 10^{-3} = 5,28 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$c) \quad r = \frac{50}{10} = 5 \rightarrow [A]_5 = \left(\frac{5}{85+5} \right)^5 \cdot 1,00 \cdot 10^{-3} = 5,29 \cdot 10^{-10} \text{ M}$$

Từ tính toán ở ví dụ này cho ta thấy: Với cùng một thể tích dung môi chiết, nếu chia ra càng nhiều lần thì hiệu suất chiết càng cao (lượng chất cần chiết nằm lại pha nước càng ít).

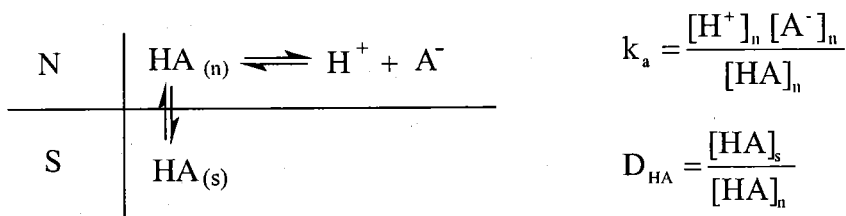
4.2. Các dạng chiết xuất

Trong thực hành chiết xuất, chất được chuyển từ pha nước vào pha dung môi có thể thuộc nhiều loại hình hóa học khác nhau như:

- Các acid, base hoặc chất lưỡng tính,
- Hợp chất nội phức,
- Cặp ion.

4.2.1. Chiết acid

Khi lắc acid HA phân ly trong nước N với một dung môi S, sẽ tồn tại hai cân bằng:



Trước khi chiết, nồng độ toàn phần của acid C_{HA} là:

$$C_{\text{HA}} = [\text{HA}]_n + [\text{A}^-]_n \quad (14.10)$$

Sai khi chiết bằng dung môi S:

$$C_{\text{HA}} = [\text{HA}]_n + [\text{A}^-]_n + [\text{HA}]_s / r \quad (14.11)$$

- Hiệu suất chiết 1 lần R_1 sẽ là:

$$R_1 = \frac{[\text{HA}]_s / r}{[\text{HA}]_s / r + [\text{HA}]_n + [\text{A}^-]_n} \quad (14.12)$$

Chia cả tử và mẫu số của phương trình này cho $[\text{HA}]_s / r$ và đưa giá trị k_a , D_{HA} vào phương trình thu được, sắp xếp lại ta có:

$$R_1 = \frac{1}{1 + \frac{r}{D} (1 + k_a / [\text{H}^+])} \quad (14.13)$$

Hiệu suất chiết acid tỷ lệ thuận với hằng số D và tỷ lệ nghịch với pH của dung dịch nước.

Ví dụ 2: Acid HA có hằng số điện ly $k_a = 1.10^{-5}$ chiết với dung môi có $D = 10$ và tỷ lệ thể tích $r = 1$, thì:

$$\text{pH} = 1 \rightarrow R_1 = 90,9\%$$

$$\text{pH} = 6 \rightarrow R_1 = 47,6\%$$

$$\text{pH} = 4 \rightarrow R_1 = 90,1\%$$

$$\text{pH} = 7 \rightarrow R_1 = 9\%$$

- Có thể tính hiệu suất R_1 từ hệ số phân bố d:

$$d = \frac{[\text{HA}]_s}{[\text{HA}]_n + [\text{A}^-]_n} \quad (14.14)$$

Chia cả tử và mẫu số của phương trình này cho $[\text{HA}]_s$ và thay giá trị k_a vào ta có:

$$d = \frac{D_{\text{HA}}}{1 + k_a / [\text{H}^+]} \quad (14.15)$$

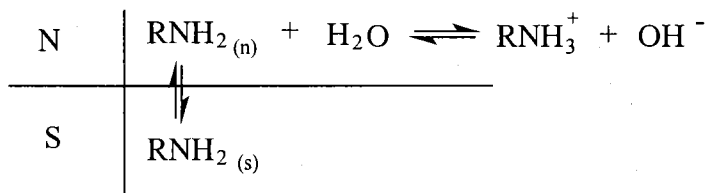
Hiệu suất chiết R_1 là:

$$R_1 = \frac{d}{d + r} \quad (14.16)$$

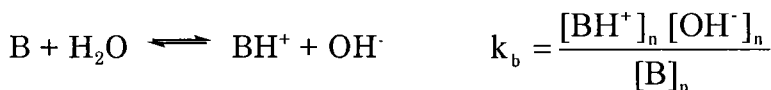


4.2.2. Chiết base yếu

Được chất có tính base như: Các alcaloid, amin bậc I, II, III, các base tổng hợp thường chiết được bằng dung môi hữu cơ.



Trong trường hợp tổng quát, có thể viết:



– Hệ số phân bố d của base B:

$$d = \frac{[\text{B}]_s}{[\text{B}]_n + [\text{BH}^+]_n} \quad (14.17)$$

Chia cả tử và mẫu số của phương trình này cho $[\text{B}]_n$ và thay hằng số k_b vào:

$$d = \frac{D_B}{1 + k_b / [\text{OH}^-]} = \frac{D_B}{1 + k_b \frac{[\text{H}^+]}{k_n}} \quad (14.18)$$

Cặp acid base liên hợp BH^+/B có hằng số k_a là:

$$k_a = \frac{k_n}{k_b}$$

Cho nên:

$$d = \frac{D_B}{1 + [\text{H}^+]/k_a} \quad (14.19)$$

– Hiệu suất chiết của base yếu tính theo biểu thức tương tự cho acid (phương trình 14.16)

Ví dụ 3: Một dẫn chất base tổng hợp B hòa tan trong nước nồng độ 0,1235 g/l (dung dịch A). Lấy 10 mL dung dịch A chiết bằng 5,00 mL toluen. Sau khi chiết, trong pha nước còn lại 0,346 mg B.

- Tính hệ số phân bố d của B,
- Tính hiệu suất chiết khi chiết lại 5 lần trong điều kiện trên.

Hệ số phân bố d:

$$\left. \begin{array}{l} [\text{B}]_n = 0,346/10 \\ [\text{B}]_s = (1,235 - 0,346)/5 \end{array} \right\} d = \frac{[\text{B}]_s}{[\text{B}]_n} = 5,14$$

Hiệu suất chiết: $R_5 = 1 - \Delta_5$

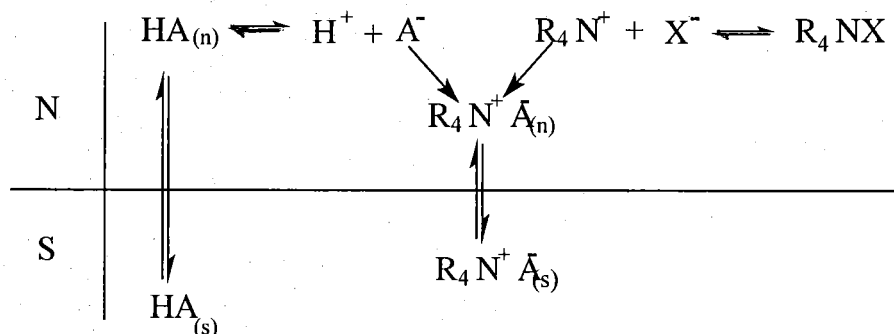
$$\Delta_5 = \left(\frac{r}{d+r} \right)^5 = \left[\frac{2}{(5,14+2)} \right]^5 = 0,00172$$

$$R_5 = (1 - 0,00172) \rightarrow 99,83\%$$

4.2.3. Chiết cặp ion

Trong hóa phân tích I đã giới thiệu sự hình thành cặp ion. Đó là kết hợp của hai ion điện tích trái dấu tạo ra khi chuyển động nhiệt trong dung dịch. Do không mang điện tích, lại mất bớt lớp vỏ hydrat hóa nên nhiều cặp ion dễ tan trong dung môi hữu cơ.

Quá trình chiết cặp ion $R_4N^+A^-$ hình thành từ một acid HA và muối amon bậc bốn R_4NX được hình dung như sau:



Điều kiện cần để tạo cặp ion là phải có các ion trong dung dịch nước. Với acid HA, để ion hóa 1% trở lên pH dung dịch phải:

$$pH \geq pk_a - 2 \quad (14.20)$$

Nếu cation hình thành từ một base B thì:



Để base B ion hóa tạo ra BH^+ 1% trở lên cần:

$$pH \leq 16 - pk_b \quad (14.21)$$

Để có cặp ion BH^+A^- tạo thành trong dung dịch nước từ acid HA và base B thì pH của dung dịch phải ở trong khoảng:

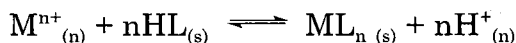
$$pk_a - 2 \leq pH \leq 16 - pk_b \quad (14.22)$$

Để chiết các alcaloid và base hữu cơ tổng hợp, người ta thường chọn chỉ thị màu acid như heliantin, đỏ methyl... để cung cấp anion. Điều kiện chiết cặp ion của các base này là $pH \leq 10$ (vì pk_b dao động 5 ÷ 6). Các chỉ thị acid có vùng chuyển màu khác nhau. Chọn pH có màu dạng base của chỉ thị là tối ưu: Heliantin $pH = 4,4$; Tropeolin OO $pH = 3,2$; đỏ methyl $pH = 6$. Cặp ion tạo thành BH^+In^- có màu vàng, hoặc da cam trong $CHCl_3$ hoặc CH_2Cl_2 .



4.2.4. Chiết nội phức

Người ta thường dùng thuốc thử hữu cơ để chiết các ion kim loại từ dung dịch nước. Thuốc thử hữu cơ HL thường là các chất có tính acid. Phản ứng tạo phức thực hiện trong cân bằng giữa hai pha như sau:



– Hằng số cân bằng cho quá trình chiết này được gọi là *hằng số chiết* K_e :

$$K_e = \frac{[ML_n]_s [H^+]_n^n}{[M^{n+}]_n [HL]_s^n} \quad (14.23)$$

Thuốc thử HL hòa tan trong dung môi tạo phức ML_n đã kéo ion kim loại M^{n+} từ pha nước. Hệ số phân bố d_M của kim loại là:

$$d_M = \frac{[ML_n]_s}{[M^{n+}]_n} = K_e \frac{[HL]_s^n}{[H^+]_n^n} \quad (14.24)$$

Phương trình này được dùng để tính hệ số d khi biết nồng độ HL trong pha dung môi, pH của pha nước và hằng số K_e từ bảng tra cứu.

– Hiệu suất chiết R_1 :

$$R_1 = \frac{d}{d + r}$$

Thay giá trị d_M từ phương trình (14.24) vào phương trình trên ta có hiệu suất chiết một lần:

$$R_1 = \frac{K_e [HL]_s^n}{K_e [HL]_s^n + [H^+]_n^n \cdot r} \quad (14.25)$$

Nếu nồng độ thuốc thử $[HL]$ không đổi thì số hạng ở tử số $K_e [HL]_s^n = Q$ không đổi, nên:

$$R_1 = \frac{Q}{Q + [H^+]_n^n \cdot r} \quad (14.26)$$

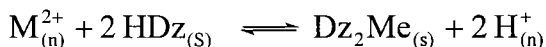
Hiệu suất chiết R_1 càng cao khi nồng độ H^+ trong pha nước càng nhỏ.

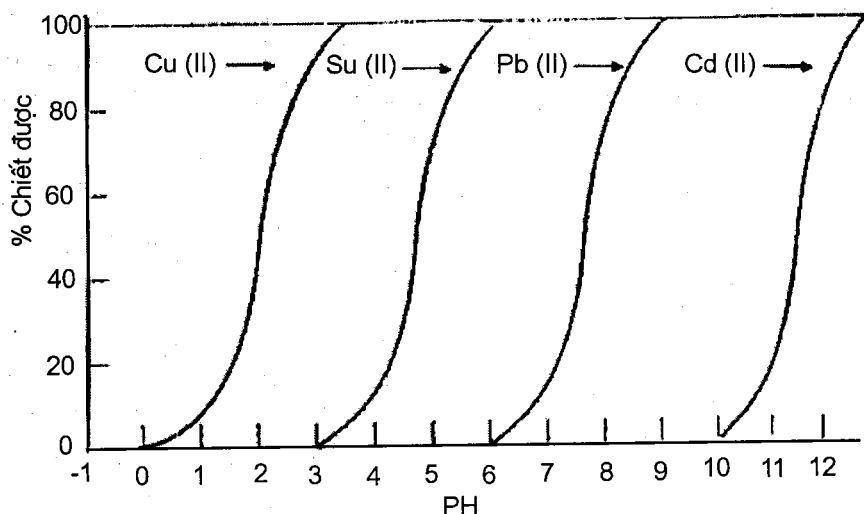
– Nhiều thuốc thử hữu cơ được dùng để chiết các ion kim loại:

Diphenylthiocarbazon (dithizon): được dùng rất phổ biến để chiết ion kim loại bằng dung môi $CHCl_3$ hoặc CCl_4 .

Hình 14.4 cho biết hiệu suất chiết (%) một số ion kim loại dùng thuốc thử dithizon (HDz) và carbon tetrachlorid.

Cân bằng chiết:





Hình 14.4. Hiệu suất chiết một số ion kim loại dùng dithizon và carbon tetraclohid.

Ngoài ra còn nhiều thuốc thử khác như: 8 hydroxy quinolin, acid diethyl dithiocarbamic, o - phenantrolin, kupferon,...

4.3. Kỹ thuật chiết xuất

Về mặt kỹ thuật, có thể có ba phương pháp: chiết gián đoạn, chiết liên tục và chiết ngược dòng.

4.3.1. Chiết gián đoạn

Chiết bằng bình chiết một lần hay nhiều lần lặp lại từ một mẫu. Hiệu suất chiết một lần R_1 và sai số chiết Δ_1 :

$$R_1 = \frac{d}{d+r} \quad \Delta_1 = 1 - R_1 = \frac{r}{d+r}$$

Nên chiết lặp lại n lần như sau:

$$\Delta_n = \left(\frac{r}{d+r} \right)^n \quad R_n = 1 - \Delta_n$$

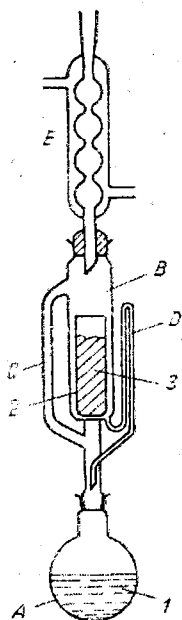
4.3.2. Chiết liên tục

Dung môi liên tục đi qua mẫu chiết ở dạng rắn hoặc lỏng. Chiết liên tục ở qui mô phòng thí nghiệm thường được thực hiện với hai loại dụng cụ:

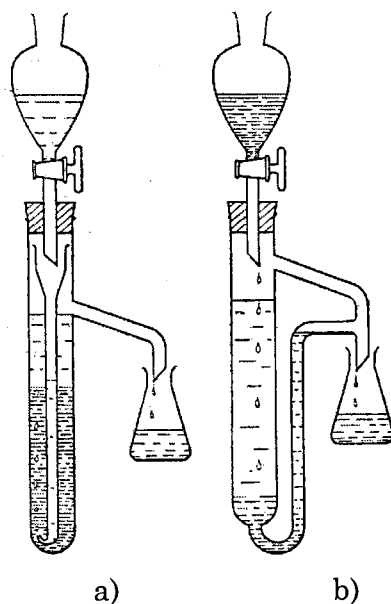
- Bình Soxhlet: Dùng cho mẫu rắn (hình 14.5),
- Bình Lormand: Chiết từ mẫu lỏng với dung môi nhẹ hơn nước (hình 14.6a) và dung môi nặng hơn nước (hình 14.6b).

4.3.3. Chiết ngược dòng

Nguyên tắc cơ bản là dung môi chiết và mẫu chiết đi ngược chiều nhau. Đây là quá trình hai pha liên tục tiếp xúc nhau, pha trộn vào nhau và di chuyển ngược chiều nhau. Kỹ thuật chiết ngược dòng thường được ứng dụng trong công nghiệp để tách các chất.



Hình 14.5. Bình Soxhlet chiết mẫu rắn



Hình 14.6. Bình Lormand chiết mẫu lỏng (nước)

- a) Chiết với dung môi nhẹ hơn nước,
- b) Chiết với dung môi nặng hơn nước.

5. CHIẾT PHA RẮN

Trong mục 14.4 đã thảo luận cân bằng chiết giữa hai pha lỏng không hòa tan vào nhau: cân bằng chiết lỏng - lỏng. Trong mục này sẽ giới thiệu cân bằng chiết lỏng - rắn. Đây là quá trình tách chất phân tích từ mẫu bằng một chất rắn, sau đó rửa giải bằng dung môi thích hợp. Vì vậy tài liệu tiếng Anh gọi đây là chiết pha rắn (solid phase extraction SPE). Thực ra kỹ thuật này đã được sử dụng từ lâu để tinh chế dịch chiết trong cân bằng chiết lỏng - lỏng. Tuy nhiên do sự phát triển của công nghệ hóa học, tạo ra nhiều chất liên kết chọn lọc, hiệu quả, cho nên vài thập kỷ vừa qua chiết pha rắn ngày càng được sử dụng rộng rãi. Nó không chỉ được dùng độc lập như một kỹ thuật tách chiết, mà còn được cài đặt vào hệ thống GC/MS hoặc HPLC/MS tạo thành hệ phân tích hoàn chỉnh: ghép nối kỹ thuật tinh chế và phân tích.

5.1. Các loại pha rắn

Nguyên liệu tạo pha rắn trong SPE, tương tự như trong LC, là dẫn chất polysiloxan, polymer, tạo ra pha liên kết. Ngoài ra còn sử dụng cả pha không liên kết.

5.1.1. Pha liên kết

Phân ra ba dạng: Pha thuận, pha đảo vào trao đổi ion.

Bảng 14.3. Pha liên kết cho SPE

Pha liên kết	Cấu trúc
<i>Pha đảo</i>	
C 18	- (CH ₂) ₁₇ CH ₃
C 8	- (CH ₂) ₇ CH ₃
C 2	- CH ₂ - CH ₃
Cyclohexyl	- CH ₂ - CH ₂ - C ₆ H ₁₁
Phenyl	- CH ₂ - (CH ₂) ₂ - C ₆ H ₅
<i>Pha thuận</i>	
Cyano	- CH ₂ - (CH ₂) ₂ - CN
Amino	- CH ₂ - (CH ₂) ₂ - NH ₂
Diol	- (CH ₂) ₃ - OCH ₂ - CHOH - CH ₂ OH
Silicagel	- SiOH

Ngoài ra pha rắn có thể là nhựa trao đổi ion như:

- Trao đổi mạnh cation (strong cation exchanger SCX): Dẫn chất phenylsulfonic - R - C₆H₄ - SO₃H.
- Trao đổi mạnh anion (strong anion exchanger SAX): Dẫn chất amon bậc bốn R₄N⁺X⁻

Tuy nhiên giữa cột SPE và cột HPLC có nhiều điểm khác nhau (bảng 14.4).

Bảng 14.4. So sánh cột SPE và cột HPLC

Đặc điểm	Cột HPLC	Cột SPE
Vật liệu tạo cột	Thép không gỉ	Nhựa PTFE*, nhựa PE*
Hình dạng hạt	Đồng đều	Không đều
Kích thước hạt	3 - 5 μm	40 μm
Số đĩa N	20 000 ÷ 25 000	< 100
Cơ chế tách	Rửa giải liên tục	Lưu giữ và rửa giải kế tiếp nhau
Sử dụng	Dùng nhiều lần (đến khi hết hiệu lực)	Dùng một lần

* PTFE: poly tetrafluoroethylen

PE: poly ethylen

5.1.2. Pha không liên kết

Ngoài pha liên kết, trong SPE người ta còn dùng pha không liên kết (bảng 14.5).

Bảng 14.5. Pha không liên kết trong SPE

Tên pha	Đặc điểm
Silicagel - SiOH	Hạt 40 μm
Silicagel hoạt tính cao	Hạt 55÷105 μm , lỗ xốp 125 Å
Florisil MgSiO_3	Hạt 50 ÷ 200 μm , lỗ xốp 60 Å
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 Å

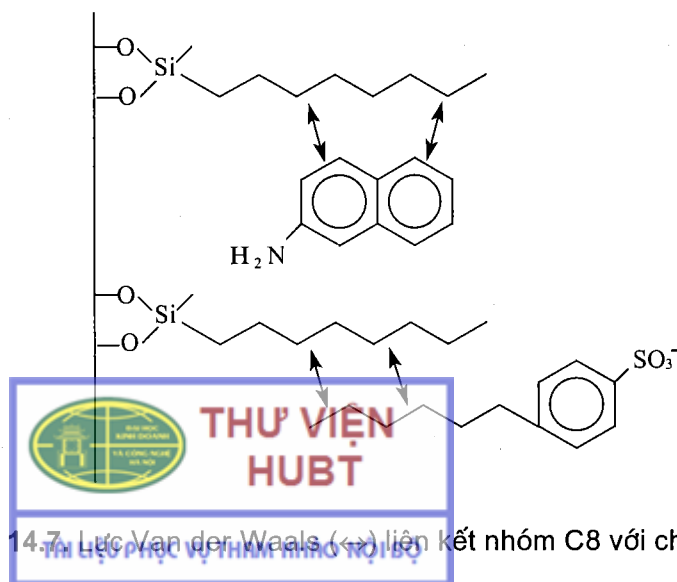
5.2. Cơ chế lưu giữ, rửa giải

Tuỳ tính chất của pha rắn, cơ chế lưu giữ và rửa giải khác nhau.

5.2.1. Pha đảo

Trên chất rắn không phân cực như C8, C18, tương tác giữa chất phân tích và pha liên kết là lực Van der Waals, năng lượng thấp: khoảng 5 kcal/mol. Đó là lực lưu giữ chất phân tích trên cột. Chất phân tích càng sơ nước càng có khuynh hướng nằm lại trên pha liên kết.

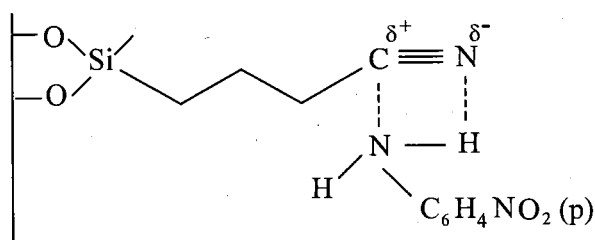
Quá trình rửa giải chất phân tích khá đơn giản: chỉ cần chọn một dung môi phân cực đủ để phá vỡ liên kết do lực Van der Waals lưu giữ chất phân tích. Ba dung môi thường dùng là: methanol, acetonitril và ethyl acetat. Nếu chất phân tích rất sơ nước có thể dùng hỗn hợp ethyl acetat-methylen clorid tỷ lệ 1-1.



Hình 14.7. Lực Van der Waals ($\longleftrightarrow$) liên kết nhóm C8 với chất phân tích.

5.2.2. Pha thuận

Lưu giữ chất phân tích trên chiết pha thuận - pha phân cực - bắt nguồn từ tương tác phân cực. Đó là liên kết hydro, liên kết $\pi - \pi$ hoặc tương tác lưỡng cực - lưỡng cực.



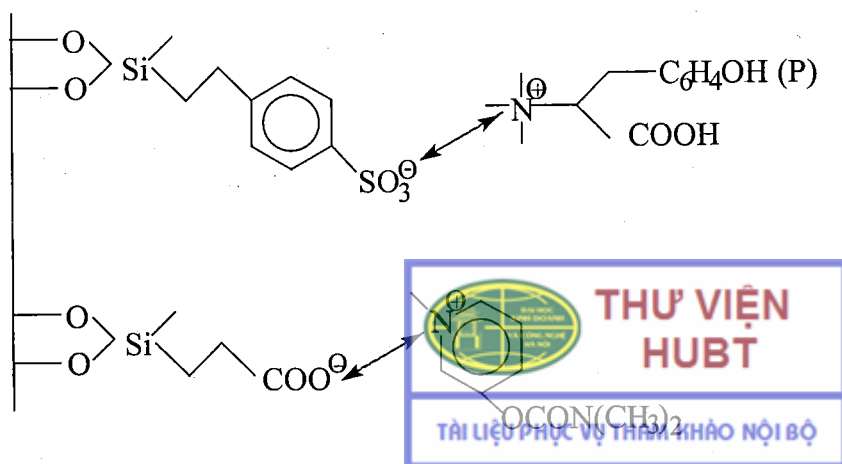
Hình 14.8. Liên kết hydro lưu giữ chất phân tích trên pha liên kết cyanopropyl.

Bên cạnh pha liên kết, trong chiết pha thuận, người ta còn dùng pha không liên kết (bảng 14.5). Các chất phân tích có tính base được lưu giữ mạnh trên bề mặt có tính acid như silica hoặc alumina acid. Ngược lại các chất có tính acid được hấp thụ mạnh trên bề mặt có tính base alumina base. Các hợp chất alcol, aldehyd, dẫn chất halogen hòa tan trong dung môi không phân cực (như hexan) bị hấp thụ mạnh trên silicagel.

Trong chương 10, đã giới thiệu sức rửa giải ϵ_0 của một số dung môi trên pha rắn silica, alumina (bảng 10.5). Trong SPE người ta thường dùng methanol để rửa giải chất phân tích cho nhiều trường hợp.

5.2.3. Trao đổi ion

Cơ chế lưu giữ chất phân tích trên pha rắn là lực hút tĩnh điện (hình 14.9). Để rửa giải chất phân tích thường dùng dung dịch NaOH 0,1M (cho cột anionit) và dung dịch HCl 0,1M (cho cột cationit). Với pha liên kết silica, người ta thường dùng hỗn hợp NaOH 0,1M - acetonitril (tỷ lệ 1 - 1) cho rửa giải các anion hữu cơ, hỗn hợp đệm phosphat - methanol (tỷ lệ 1 - 1) cho rửa giải các acid hữu cơ.



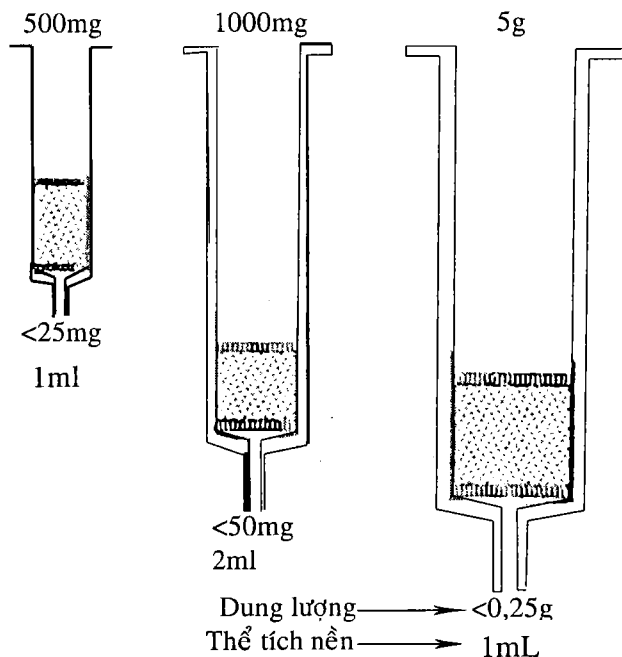
Hình 14.9. Lực hút tĩnh điện lưu giữ chất phân tích trên cột trao đổi ion.

5.3. Thực hành chiết pha rắn

Để xây dựng quy trình chiết pha rắn cho chất phân tích trong mẫu cần thực hiện hai nội dung:

5.3.1. Chọn pha rắn

Dụng cụ chiết pha rắn lưu thông trên thị trường có ba dạng chính: đĩa (disk), ống (cartridge) và bơm (syringe). Phổ biến nhất là ống. Tùy thuộc vào lượng chất phân tích để chọn ống có lượng pha rắn và thể tích rửa giải khác nhau. Lượng pha rắn dao động từ 50 mg đến 10 g, ứng với thể tích nền từ 125 μ L đến 20 mL (hình 14.10).



Hình 14.10. Các loại ống chiết pha rắn.

5.3.2. Qui trình chiết

Qui trình này thường bao gồm 4 bước chính:

1. Xử lý cột bằng các dung môi hoặc dung dịch đệm thích hợp để chuyển pha rắn sang trạng thái có thể lưu giữ chất phân tích trong mẫu.
2. 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.
3. Loại tạp: Dùng dung môi hoặc dung dịch đệm cho qua cột để loại một số tạp chất đã được giữ lại trên pha rắn.
4. Rửa giải: Dùng dung môi thích hợp đẩy chất phân tích khỏi pha rắn. Lấy dịch chiết xác định bằng phương pháp thích hợp.

Để xây dựng 4 bước cho qui trình chiết trên cần nghiên cứu xác định một số vấn đề cụ thể:

- Xác định hiệu quả của dung môi rửa giải chất phân tích.
- Xác định hiệu lực tách chất phân tích của pha rắn.

- Thử chiết phân tích trên mẫu giả.
- Xây dựng khoảng nồng độ tuyến tính cho chiết xuất trên nền mẫu.

Sau đây là qui trình chiết vitamin B₁₂ từ dung dịch nước hoặc nước tiểu:

1. Xử lý cột C18 (khoảng 1g): Dùng methanol và nước, mỗi thứ 2 mL. Tiếp theo với dung dịch NaH₂PO₄ 0,05M (thể tích dùng bằng thể tích của cột chiết),
2. Cho qua cột 10 mL nước tiểu hoặc dung dịch nước vitamin B₁₂.
3. Rửa cột loại tạp chất bằng nước cất (thể tích dùng bằng thể tích của cột). Lưu ý là không để cột khô.
4. Rửa giải vitamin B₁₂ bằng 2 mL hỗn hợp đồng thể tích ethanol - dung dịch NaH₂PO₄ 0,05M, rửa giải tiếp bằng 3 mL nước cất.

5.4. Các kiểu cải tiến của SPE

Trên cơ sở nguyên tắc của SPE người ta cải tiến, phát triển thêm hai kỹ thuật mới: vi chiết pha rắn, tạo hệ phân tán pha rắn.

5.4.1. Vi chiết pha rắn

Vi chiết pha rắn (solid phase microextraction SPME) là một kỹ thuật mới do Pawliszyn và cộng sự sáng chế ở trường Đại học Waterloo (Ontario, Canada) năm 1989.

Nguyên tắc

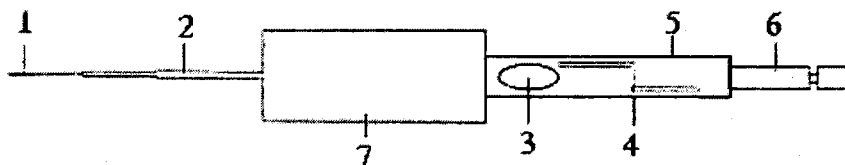
Chất phân tích ít phân cực từ môi trường nước, tùy thuộc vào ái lực với pha rắn giữ cân bằng với một màng bao kỵ nước trên sợi silica nung chảy. Chất tạo màng phổ biến nhất là poly dimethylsiloxan (PDMS) có bề dày thay đổi 7 ÷ 100 μm. Quá trình cân bằng của chất phân tích giữa nước và màng PDMS (pha tĩnh) do sự khuếch tán và hằng số phân bố của chất phân tích chi phối. Thời gian đạt đến cân bằng có thể đến nửa giờ. Chất phân tích lưu giữ trên pha tĩnh được rửa giải bằng nhiệt và định lượng khi đưa sợi silica vào máy GC.

Thiết bị SPME

Sợi silica phủ pha tĩnh PDMS nằm trong lòng một kim được gắn với pittông. Pha tĩnh nhận chất phân tích khi kim đưa sợi pha tĩnh vào tiếp xúc với mẫu.

Hiện nay SPME được dùng phổ biến để tách và định lượng các chất ô nhiễm môi trường nước: chủ yếu là dẫn chất halogen của hydrocarbon mạch thẳng và vòng thơm.

Xu hướng ứng dụng của kỹ thuật này đang rất rộng mở. Người ta đang triển khai SPME cho nhiều ngành: phân tích Dược, giám định pháp y, an toàn thực phẩm.



Hình 14.11. Thiết bị SPME.

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Sợi silica nung chảy bao polymer, | 2. Kim đưa sợi chiết qua vách ngăn, |
| 3. Cửa sổ, | 4. Khe hình chữ Z, |
| 5. Thân hình trụ, | 6. Pittông, |
| 7. Hộp bảo vệ kim và sợi silica. | |

5.4.2. Phân tích hệ phân tán pha rắn mẫu thử

Kỹ thuật tạo hệ phân tán pha rắn - mẫu thử (matrix solid phase dispersion MSPD) được phát triển ở trường Đại học tổng hợp bang Louisiana (Mỹ) nhằm mục đích tách chiết dư lượng thuốc thú y trong thực phẩm.

Nguyên tắc

Trộn cơ học mẫu thử với pha rắn C18. Pha rắn sơ nước dễ trộn lẫn với lipid trong thực phẩm, phân tán mẫu trên bề mặt pha rắn. Dùng dung môi chiết chất phân tích từ hỗn hợp tạo thành.

Thực hành

Lấy khoảng 0,5 g mẫu (sữa, gan, thận, cơ bắp...) trộn với 2 g pha rắn C18. Nghiền kỹ thành hỗn hợp đồng nhất. Chuyển hỗn hợp vào cột thủy tinh hoặc nhựa (hai đầu cột có giấy lọc) và ép chặt. Rửa giải cột bằng dung môi thích hợp, thường dùng acetonitril.

Đánh giá

Có sự tương đồng giữa SPE và MSPD. Tuy nhiên ở MSPD còn có nhiều tương tác như phân bố, hấp phụ, tạo cặp ion tăng hiệu quả của quá trình chiết.

Người ta đã dùng MSPD để tách chiết thuốc thú y từ mẫu thực phẩm như thịt, sữa. Rửa giải bằng acetonitril. Định lượng chất phân tích bằng GC hoặc HPLC.

5.5. Đánh giá về chiết pha rắn

Chiết lỏng - lỏng là kỹ thuật được phổ biến để tách các chất hữu cơ, loại chất cản trở phân tích. Tuy nhiên kỹ thuật này có ba nhược điểm:

- 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 các thiết bị đo như GC, HPLC..., gây cản trở cho quá trình tự động hóa việc phân tích.
- Đôi khi tạo nhũ dịch, làm sai lệch kết quả.

Chiết pha rắn là kỹ thuật mới hơn đã khắc phục những nhược điểm của chiết lỏng - lỏng. Có thể thống kê một số ưu điểm của SPE:

- 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 cơ chế chiết đa dạng, phù hợp hơn với chất phân tích, tính chọn lọc tốt hơn.

Tuy nhiên kỹ thuật SPE vẫn còn bộc lộ một số nhược điểm:

- 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 vẫn còn lớn.

Chính vì những nhược điểm trên, người ta đã và đang nghiên cứu các kỹ thuật mới khắc phục các nhược điểm trên của SPE.

6. CÁC KỸ THUẬT MỚI XỬ LÝ MẪU

Hai kỹ thuật mới ra đời đã chứng tỏ có nhiều ưu việt, tiếp tục được áp dụng và nghiên cứu triển khai. Đó là:

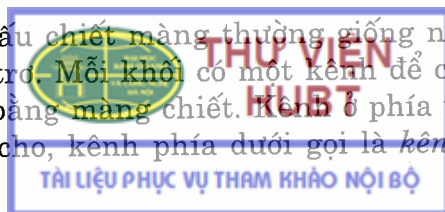
- Chiết màng (membrane extraction),
- Chiết pha rắn in dấu phân tử (molecularly imprinted extraction MIE).

6.1. Chiết màng

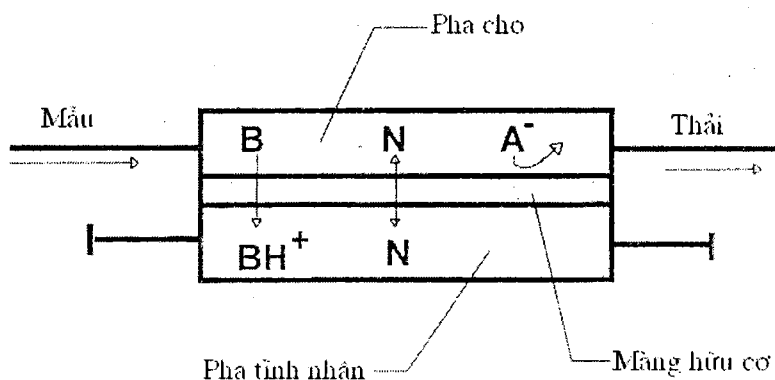
Một số kỹ thuật chiết màng đã được mô tả để xử lý mẫu trong phân tích. Tùy theo vật liệu chế tạo màng, người ta phân ra ba loại:

- Màng lỏng được giữ trên chất mang,
- Màng polymer,
- Màng tách chất khí.

Tuy nhiều loại màng nhưng kết cấu chiết màng thường giống nhau: nó gồm có hai khối chế tạo bằng vật liệu trơ. Mỗi khối có một kênh để cho chất lỏng vào ra. Hai khối ngăn cách nhau bằng màng chiết. Kênh ở phía trên gọi là *kênh cho* (donor channel) hoặc pha cho, kênh phía dưới gọi là *kênh nhận* (acceptor channel).



Hình 14.12 giới thiệu nguyên tắc chiết màng lỏng cho các chất có tính base, ví dụ như các amin.



Hình 14.12. Sơ đồ nguyên tắc chiết màng lỏng.

Mẫu phân tích vào kênh cho đã được điều chỉnh pH để các amin nằm ở dạng phân tử (không mang điện tích). Kênh nhận ở phía bên kia của màng đựng đầy dung dịch đậm acid. Khi mẫu được bơm qua kênh cho, các phân tử amin B được chiết vào màng hữu cơ. Sau khi khuếch tán qua màng B được proton hóa, tạo ra BH^+ và chuyển vào pha nhận. Sau khi chiết, pha này được chuyển tự động vào thiết bị phân tích (hệ on-line) hoặc đem phân tích bằng một kỹ thuật thích hợp.

Kỹ thuật chiết màng lỏng ở trên thích hợp với sắc ký lỏng pha đảo hoặc sắc ký ion. Tùy theo chất phân tích để chọn kênh cho và kênh nhận phù hợp.

Chiết màng có hai ưu điểm:

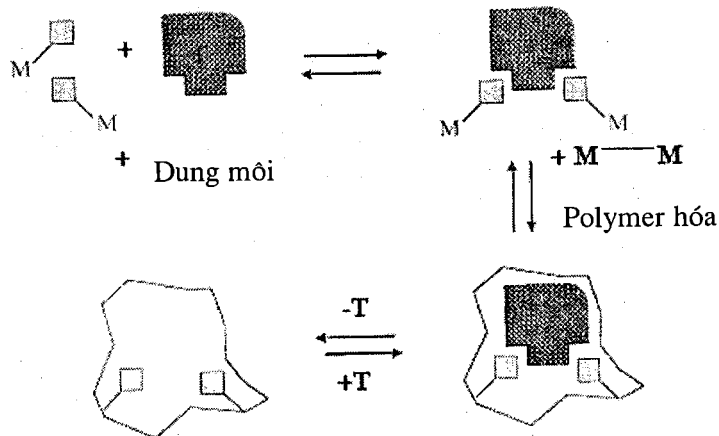
- Thể tích mẫu ít, thường dao động $10 \div 1000 \mu L$,
- Rất phù hợp cho tự động hóa phân tích mẫu.

6.2. Chiết pha rắn in dấu phân tử (MIE)

Đây là kỹ thuật mới phát triển từ SPE ra đời trong mấy năm gần đây đang rất được các nhà hóa học chú ý vì tính chọn lọc của nó. Điểm mấu chốt của kỹ thuật là chế tạo pha rắn dùng cho chiết xuất có in dấu phân tử chất cần phân tích.

6.2.1. Nguyên tắc chế tạo pha rắn

Để chế tạo pha rắn in dấu phân tử, người ta thêm chất phân tích hoặc các hình mẫu của nó (template) có cấu trúc tương tự chất phân tích vào nguyên liệu. Các chất này sẽ tạo ra các vị trí có dấu phân tử trong pha rắn. Sau khi loại các chất này khỏi pha rắn, các vị trí này sẽ liên kết chọn lọc với chất phân tích (hình 14.13).



Hình 14.13. Nguyên tắc ion dấu phân tử

6.2.2. Đánh giá

Hiện nay người ta đã chế tạo một số pha rắn in dấu phân tử cho các chất:

- Dược chất: Diazepam, morphin, propranolol, theophylin.
- Chất diệt cỏ: Simazin, atrazin.

Khi chiết MIE có liên kết chọn lọc tương tự liên kết kháng nguyên kháng thể về hình thức, nhưng thực tế có khác nhau:

- Pha rắn này tái tạo được, tái sử dụng được.
- Độ ổn định cao hơn, có thể dùng nhiều lần.
- Khác với hệ kháng nguyên - kháng thể, pha rắn MIE có thể dùng được ở nhiệt độ cao, trong dung môi khan và khoảng pH rất rộng.
- Kỹ thuật điều chế dễ dàng hơn, mất ít thời gian hơn.

Pha rắn in dấu phân tử là sản phẩm ứng dụng của công nghệ nano trong chiết xuất đã chứng tỏ ưu việt so với các sản phẩm trước nó.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Hoàng Minh Châu, Từ Văn Mặc, Từ Vọng Nghi (2002), *Cơ sở hóa học phân tích*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, chương 22 (trang 329 đến 339).
2. Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical Analysis*, 5th edition, W.H.Freeman and Company, New York, Chapter 28 (pp.817 - 838).

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- 14.1. Sự khác nhau giữa tro hóa ướt và tro hóa khô. Ưu nhược điểm của hai kỹ thuật trên.
- 14.2. Giải thích nguyên tắc phân huỷ chất hữu cơ bằng hỗn hợp oxy hoá. Cho ví dụ.
- 14.3. Trong trường hợp nào có thể xảy ra cháy nổ khi dùng acid perchloric.
- 14.4. Giải thích vai trò của vi sóng để phân huỷ chất vô cơ và hữu cơ. Ưu thế của vi sóng.
- 14.5. Giải thích cách kết tủa protein trong mẫu dịch sinh học.
- 14.6. Sự khác nhau giữa hàng số phân bố và hệ số phân bố. Ý nghĩa của nó.
- 14.7. Các yếu tố nào ảnh hưởng đến chiết các chất acid, base bằng dung môi hữu cơ.
- 14.8. Điều kiện để chiết một chất dưới dạng cặp ion. So sánh cách chiết dưới dạng phân tử.
- 14.9. Cách chiết nội phức có ưu thế gì so với chiết cặp ion. Điều kiện chiết và ứng dụng của nó.
- 14.10. So sánh chiết lỏng - lỏng với chiết pha rắn. Phân tích đánh giá ưu nhược điểm của mỗi kỹ thuật.
- 14.11. So sánh cột chiết pha rắn với cột HPLC.
- 14.12. Giải thích 4 bước của qui trình chiết pha rắn.
- 14.13. Vi chiết pha rắn là gì? So sánh kỹ thuật SPME với SPE.
- 14.14. Ưu điểm nổi bật của chiết pha rắn in dấu phân tử.
- 14.15. Một chất hữu cơ B có hằng số phân bố D nước - dicloromethan là 169. Hãy tính:
 - Nồng độ của B trong pha dung môi, nếu nồng độ trong pha nước sau khi chiết một lần là 0,027M.
 - Nồng độ của B trong dung môi, nếu nồng độ trong nước trước khi chiết là 0,045M.
- 14.16. Lấy 150,0 mL mẫu nước, chiết bằng 50,0 mL dung môi. Lượng chất phân tích trong pha dung môi 0,0376 g. Nếu lượng chất phân tích trong pha nước trước khi chiết là 0,192g. Hãy tính:
 - a) Hệ số phân bố.
 - b) Hiệu suất chiết R_1 .

- 14.17. Hằng số phân bố của chất X trong hệ cloroform - nước là 9,6. Tính nồng độ X còn lại trong pha nước sau khi chiết từ 50,0 mL dung dịch nước có nồng độ X là 0,150M bằng:
- 1 lần x 40,0 mL dung môi.
 - 2 lần x 20,0 mL dung môi.
 - 8 lần x 5,00 mL dung môi.
- 14.18. Cần bao nhiêu mililit cloroform để giảm nồng độ X ở bài 14.17 còn $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ nếu chiết từ 25,0 mL dung dịch nước nồng độ X $5,00 \cdot 10^{-2} \text{M}$ bằng:
- 25 mL dung môi.
 - 10 mL dung môi.
 - 2,00 mL dung môi.
- 14.19. Hằng số phân bố tối thiểu phải là bao nhiêu để chiết được 99% chất tan từ 50,0 mL dung dịch nước nếu chiết bằng:
- 2 lần x 25,0 mL dung môi.
 - 5 lần x 10,0 mL dung môi.
- 14.20. Ion Cu (II) tạo phức CuL_2 và thuốc thử HL. Chiết phức CuL_2 bằng cloroform. Dữ liệu quang phổ cho thấy: khi nồng độ Cu^{2+} trong pha nước $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ chiết xuất bằng cloroform hòa tan HL nồng độ 0,0100M thì nồng độ Cu^{2+} trong hai pha bằng nhau ở pH pha nước 5,65.
- Viết phương trình cân bằng trong hệ với giả thiết CuL_2 trong pha dung môi không phân ly.
 - Tính hằng số K_e .
 - Tính hệ số phân bố khi pH = 6.
 - Nếu 50,0 mL dung dịch nước có nồng độ Cu^{2+} $5,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ở pH 6 được chiết với 25,0 mL cloroform nồng độ HL 0,0100M. Hỏi cần bao nhiêu lần chiết để lấy được tối thiểu 99% Cu^{2+} từ pha nước.



ĐÁP SỐ CÁC BÀI TẬP

Chương 1:

1.12. a) $m = 0,067/\text{ppm}$.

b) và d):

C_x	$\gamma = m/\text{SD}$	CV (%)
2,00	7,1	5,4
6,00	8,0	2,0
10,00	8,0	1,2
14,00	7,9	0,89
18,00	6,1	0,88

c) $C_m = 0,35 \text{ ppm X}$.

Chương 2:

2.12. $667-3337 \text{ cm}^{-1}$

2.13. $1.10^{14} - 1,62.10^{15} \text{ Hz}$

2.14. $2,5 - 16,7 \mu\text{m}$

2.15. Sai

2.16. Đúng

2.17. Đúng

2.18. Sai

2.19. Đúng

2.20. Sai

2.21. Đúng

2.22. Đúng

2.23. Sai

Chương 3:

3.11. a) 86,3% b) 17,4% c) 49,0% d) 61,8%

3.12. a) 0,712 b) 0,064 c) 0,098 d) 1,00

3.13. 2358

3.14. 191

3.15. 56 và 112000

3.16. $E_{280} = 168$ và $E_{420} = 264$

3.17. $C_{\text{theo chuẩn}} = 6,73.10^{-2}\%$ và $C_{\text{ss-C}} = 6,67.10^{-2}\%$,
 $C_{\text{ss-D}} = 6,90.10^{-2}\%$

3.18. $C_x = 1,29.10^{-1}\%$ và $2C_z = 1,41.10^{-1}\%$

3.19. $1,20.10^{-1}\%$

3.21. $5,34.10^{-4}\text{M}$ và $2,85.10^{-5}\text{M}$

3.22. $5,12.10^{-4}\text{M}$ và $3,51.10^{-4}\text{M}$ ($1,02.10^{-2}\%$ và $1,05.10^{-2}\%$)

Chương 5:

5.8.

a) $51 < 52$

b) $53 > 54$

Chương 8:

8.6.

a) $N_A = 2775$,

$N_B = 2472$

$N_C = 2364$

$N_D = 2523$

b) $N = 2,5.10^3$

$H = 0,0097 \text{ cm}$

8.7.

a) $R_s = 0,72$

b) $\alpha_c = 1,08$

8.8.

a) $N^B = 2,7.10^3$

$H = 0,015$

- 8.9. a) $R_s = 1,1$; b) $R_s = 2,7$; c) $R_s = 3,7$
 8.10. a) $k_1' = 4,3$; $k_2' = 4,7$; $k_3' = 6,1$
 b) $k_1 = 14$; $k_2 = 15$; $k_3 = 19$
 c) $\alpha = 1,11$

Chương 9:

- 9.16. a) $k_1' = 5,60$; $k_2' = 6,46$; $k_3' = 25,4$
 b) $\alpha_{2,1} = 1,16$; $\alpha_{3,2} = 3,93$
 c) $\bar{N} = 1,6 \cdot 10^3$ đĩa ; $H = 0,068$ cm
 d) $(R_s)_{2,1} = 1,2$; $(R_s)_{3,2} = 11$

Chương 10:

- 10.15. a) 1,06 ; b) $\bar{N} = 3,4 \cdot 10^3$; c) $8,7 \cdot 10^{-3}$
 d) $L = 60$ cm ; e) 35 phút

Chương 12:

- 12.14. a) - 0,658V
 b) Điện cực calomel bh || Ag_2S bão hoà, S^{2-} (xM) | Ag
 c) $pS = 12,3$
 12.15. a) 0,876 V ($E^0 = + 0,920$)
 b) 0,710 V ($E^0 = + 1,15$)
 12.16. a) 12,629
 b) 5,579
 12.17. 3,962
 $3,3 \cdot 10^{-10}$

Chương 13:

- 13.4. b) $i_d = 1,437 + 8,634$
 c) $X_1 = 0,15$; $X_2 = 0,73$; $X_3 = 4,47$
 13.5. a) $8,72 \mu\text{A mmol}^{-1} \cdot \text{l}$.
 b) $8,42 \mu\text{A}$.
 c) - 3,5%
 13.6. Với A $i_{d/C} = 2,29$
 Với C $i_{d/C} = 6,51$
 13.7. $n = 3,6 \rightarrow n = 4$.
 13.8. $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{S}$.
 13.9. $X_1 = 1,20 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
 $X_2 = 6,31 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
 13.15. 0,11%

Chương 14:

- 14.15. a) 4,6 M ; b) 0,0447 M
 14.16. a) 0,731 ; b) 19,6%
 14.17. a) $1,73 \cdot 10^{-2}$; b) $6,40 \cdot 10^{-3}$; c) $6,89 \cdot 10^{-4}$
 14.18. a) 75 mL ; b) 40 mL ; c) 22 mL
 14.19. a) 18,0 ; b) 7,56
 14.20. b) $K_e = 5,0 \cdot 10^{-8}$; c) $d = 5,01$; d) 4 lần chiết



TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt:

1. Hoàng Minh Châu, Từ Văn Mặc, Từ Vọng Nghi (2002), *Cơ sở hóa học phân tích*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Đức Huệ (2005), *Các phương pháp phân tích hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, Hà Nội.
3. Phạm Luận (1987), *Các phương pháp phân tích phổ hấp thụ nguyên tử*, Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.
4. Từ Văn Mặc (1995), *Phân tích hóa lý*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Ngô Quốc Quýnh, Lê Thanh Hoạch (1984), *Quang học*, Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp.

Tiếng Anh:

6. Beesley T.E., Buglio B., Scott R.P.W. (2001), *Quantitative Chromatographic Analysis*, Marcel Dekker, Inc. , New York - Basel.
7. Brown DW, Floyd AJ and Sainsbury (1988), *Organic spectroscopy*, John Wiley & Sons. Ltd (Chichester New York - Brisbane - Toronto - Singapore).
8. Connor K.A. (1982), *A Textbook of Pharmaceutical Analysis*, 3rd Edition, Wiley Interscience Publication.
9. *Handbook of Instrumental Techniques for analytical chemistry* (1997). Editor Frank A.Settle, Prentice Hall PTR.
10. *Handbook of HPLC* (1998), Edited by Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P., Miller N., Marcel Dekker, Inc, New York – Basel.
11. Harris D.C (1999), *Quantitative Chemical Analysis*, Fifth Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
12. Heigher D. (2000), *High performance capillary electrophoresis, an introduction*, Agilent Technologies.
13. Kealey D., Haines P. (2002), *Instant Note: Analytical Chemistry*, Bios Scientific Publishers Ltd, Kent, UK.
14. Skoog D.A., Leary J.J (1992), *Principles of Instrumental Analysis*, Fourth Edition, Saunders College Publishing.
15. Skoog D.A, West D.M, Holler F.J. (1996), *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Seventh Edition Saunders College Publishing.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

**HÓA PHÂN TÍCH
TẬP II. PHÂN TÍCH DỤNG CỤ**

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

Biên tập : ThS. BS. LÊ THỊ KIM TRANG
Sửa bản in : LÊ THỊ KIM TRANG
Trình bày bìa : NGUYỆT THU
KT vi tính : LÊ THỊ KIM TRANG

GIÁ: 86.000đ



In 1000 cuốn, khổ 19x27cm tại Công ty In Y học. Số đăng ký kế hoạch xuất bản 1183-2012/CXB/2-110/YH. In xong và nộp lưu chiểu quý IV năm 2012.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

Địa chỉ: 352 Đội cấn - Ba Đình - Hà Nội

Tel: 04.37.625922 - 37.625934 - Fax: 04.37625923

Website: www.xuatbanyhoc.vn

E-mail: Xuatbanyhoc@fpt.vn

Chi nhánh: 699 Trần Hưng Đạo - Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh

Điện thoại: 08.9235648 * Fax: 08.9230562

