

Áp dụng phương pháp sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng vào giảng dạy hoá học phổ thông

Trần Mạnh Cường

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên; Khoa hóa học

Chuyên ngành: Hóa Phân tích; Mã số: 60.44.29

Người hướng dẫn: PGS.TS. Đào Hữu Vinh

Năm bảo vệ: 2011

Abstract. Trình bày tổng quan: sơ lược về lịch sử phát triển sắc ký; định nghĩa, nguyên tắc của sắc ký và phân loại các phương pháp sắc ký; cơ sở lý thuyết về sắc ký; sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography); sắc ký giấy (paper chromatography); sắc ký hấp phụ lỏng (trên cột); khái quát về chất diệp lục (chlorophyll) và carotenoid; khái quát về ion Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} và muối của chúng. Tiến hành thực nghiệm: các hoá chất và thiết bị cần thiết; chế tạo bản mỏng từ tinh bột sắn dây; chiết dịch từ lá xanh; tiến hành sắc ký cột; tiến hành sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography); tiến hành sắc ký giấy (paper chromatography). Tìm hiểu các kết quả thu được sau khi tiến hành thực nghiệm: tách chất màu trong lá xanh, tách các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ...

Keywords. Hóa phân tích; Phương pháp sắc ký cột; Phương pháp sắc ký lớp mỏng; Sắc ký

Content:

A. Lý do chọn đề tài

Sắc ký là một phương pháp phân tích chất hiện đại có ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực của cuộc sống. Học sinh phổ thông ở nhiều nước trên thế giới đã được học về sắc ký, nhưng ở nước chưa dạy sắc ký cho học sinh phổ thông. Đề tài “**Áp dụng phương pháp sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng vào giảng dạy hóa học phổ thông**” là đề tài đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu về khả năng đưa nội dung sắc ký vào dạy ở trường THPT ở nước ta.

B. Mục đích nghiên cứu

Khảo sát để lựa chọn ra những thí nghiệm sắc ký có thể áp dụng dạy cho học sinh phổ thông ở Việt Nam.

C. Tóm tắt luận văn

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Sơ lược về lịch sử phát triển sắc ký [15, 18, 19]

Năm 1903 nhà thực vật học người Nga Michael Tsvet đã dùng cột nhôm oxit (có tài liệu nói cột canxi cacbonat) làm pha tĩnh và pha động là ete dầu hoả tách thành công chlorophyll từ lá cây. Ông đã giải thích hiện tượng bằng ái lực hấp phụ khác nhau của các sắc tố và đặt tên phương pháp này là phương pháp sắc ký (chromatography), sắc ký nghĩa là ghi màu vì đã tách được những chất có màu.

Sự phát triển phong phú của sắc ký đã làm cho danh từ “sắc ký” không còn đúng theo ý nghĩa ban đầu của nó. Tuy nhiên tất cả các phương pháp sắc ký đều có những nét chung nhất: quá trình tách dựa trên sự chuyển dịch của hỗn hợp chất phân tích qua lớp chất bất động (pha tĩnh) là chất rắn hoặc chất lỏng mang trên chất rắn hoặc giấy và sự chuyển dịch đó được thực hiện bằng một chất khí hoặc chất lỏng (pha động).

1.2. Định nghĩa, nguyên tắc và phân loại các phương pháp sắc ký [10, 15]

1.2.1. Định nghĩa

Sắc ký là quá trình tách liên tục từng vi phân hỗn hợp các chất do sự phân bố không đồng đều của chúng giữa pha tĩnh và pha động đi xuyên qua pha tĩnh.

1.2.2. Nguyên tắc của sắc ký

Nguyên tắc chung của mọi phương pháp sắc ký là dựa trên sự phân bố các chất giữa hai pha: một pha thường cố định gọi là pha tĩnh (stationary phase) và một pha chuyển động gọi là pha động (mobile phase).

1.2.3. Phân loại các phương pháp sắc ký

1.2.3.1. Phân loại theo trạng thái liên hợp của pha động và pha tĩnh

Gồm sắc ký lỏng và sắc ký khí.

1.2.3.2. Phân loại theo cơ chế của quá trình tách

Gồm Sắc ký hấp phụ, sắc ký phân bố, sắc ký trao đổi ion và Sắc ký rây phân tử.

1.2.3.3. Phân loại theo cách hình thành sắc đồ.

Gồm phương pháp tiền lưu, phương pháp đẩy, phương pháp rửa giải.

1.2.3.4. Phân loại theo thiết bị hình thành sắc đồ.

Gồm sắc ký cột và sắc ký phẳng.

1.3. Sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography) [15, 18]

Sắc ký lớp mỏng hay còn gọi là sắc ký phẳng là kỹ thuật phân bố rắn – lỏng. Trong đó pha động là chất lỏng được đi xuyên qua một lớp chất hấp thụ tro như silicagel hoặc nhôm oxit, chất hấp thụ này được tráng thành một lớp mỏng, đều phủ lên một nền phẳng như tấm kính, tấm nhôm, hoặc tấm plastic. Sắc ký lớp mỏng được dùng trong cả phân tích định tính và phân tích định lượng. Hệ số di chuyển R_f là đại lượng đặc trưng quan trọng về mức độ tách. Hệ số di chuyển R_f được tính theo công thức:

$$R_f = \frac{l}{l_0} \text{ hoặc } R_f = \frac{v}{v_0}$$

Trong đó l là khoảng cách từ tuyến xuất phát tới tâm vết sắc ký, l_0 là khoảng cách từ tuyến xuất phát tới tuyến dung môi, v là tốc độ di chuyển của chất tan và v_0 là tốc độ của dung môi. Như vậy R_f chỉ có giá trị từ 0 đến 1. Khi $R_f = 0$ thì chất tan hoàn toàn không di chuyển, còn khi $R_f = 1$ thì chất tan di chuyển bằng tốc độ của dung môi.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến R_f nhưng quan trọng là:

- + Chất lượng và hoạt tính chất hấp thụ
- + Bề dày của lớp mỏng
- + Chất lượng và độ tinh khiết của pha động

1.4. Sắc ký giấy (paper chromatography) [15, 19]

Là một phương pháp sắc ký dùng giấy hấp thụ để phân tích một lượng nhỏ chất lỏng mang (chất hoà tan) và lấy ra khi vạch chất hoà tan tiến gần đến đầu kia của một băng giấy. Trong quá trình sắc ký các cấu tử được tách dọc theo lớp mỏng của tờ giấy. Đặc trưng cho sự chuyển động của các chất trên giấy là hệ số di chuyển R_f như sau:

$$R_f = \frac{l}{l_0} ; \text{ hoặc } R_f = \frac{\text{tốc độ chuyển động của một cấu tử}}{\text{tốc độ chuyển}}$$

động của tuyến pha động

Trong đó l là đoạn đường đi của cấu tử, l_0 là đoạn đường đi của dung môi. Nếu R_f lớn quá thì không tách được các chất, R_f bé quá thì tách chậm.

1.5. Sắc ký hấp phụ lỏng trên cột (Adsorption liquid chromatography on columns) [15, 19]

Phương pháp sắc ký hấp phụ lỏng dựa trên tính chất hấp phụ khác nhau của các cấu tử trong hỗn hợp cần tách. Giữa nồng độ chất trong dung dịch và nồng độ chất bị hấp phụ trên bề mặt chất hấp phụ có một cân bằng động, cân bằng đó phụ thuộc vào nhiệt độ. Sự phụ thuộc của lượng chất bị hấp phụ vào nồng độ của nó trong dung dịch ở một nhiệt độ không đổi được đặc trưng bởi

đường đẳng nhiệt hấp phụ. Căn cứ vào đường đẳng nhiệt hấp phụ ta có thể chọn được điều kiện sắc ký thích hợp.

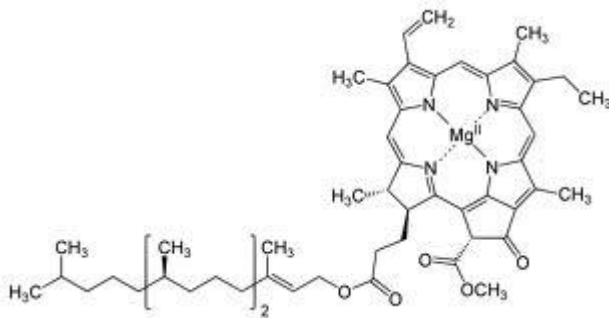
Trong sắc ký hấp phụ lỏng trên cột thì phương pháp rửa giải có ứng dụng rộng rãi nhất. Phải chọn tốc độ tối ưu đối với dung môi rửa giải để đảm bảo thiết lập cân bằng hấp phụ, đồng thời giảm độ khuếch tán dọc.

1.6. Khái quát về chất diệp lục (chlorophyl) và carotenoit (xanthophyl và caroten) [5, 9, 16]

1.6.1. Chất diệp lục (diệp lục tố, chlorophyl)

Có 5 loại chlorophyl là chlorophyl a, b, c₁, c₂ và d (có tài liệu chia thành chlorophyl a,b,c,d và e), ở thực vật bậc cao chlorophyl a và b rất phổ biến.

Công thức của chlorophyl a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$)



Công thức của chlorophyl b là ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), diệp lục b chỉ khác diệp lục a là nhóm CH_3 ở nhân pyron thứ hai được thay bằng nhóm $CH=O$.

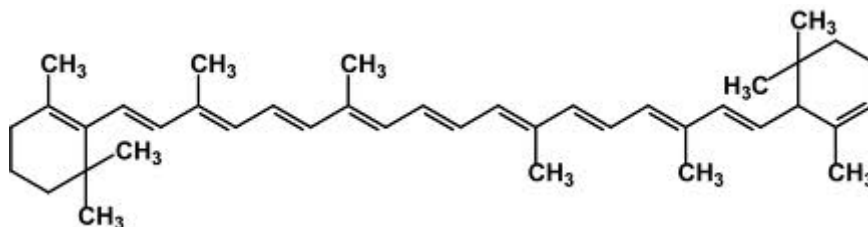
Chlorophyl không tan trong nước, chỉ tan trong các dung môi hữu cơ. Vì vậy khi muốn tách chlorophyl ra khỏi lá, bắt buộc phải dùng một dung môi hữu cơ như: ete, cồn, benzen hay axeton, ...

1.6.2. Carotenoit

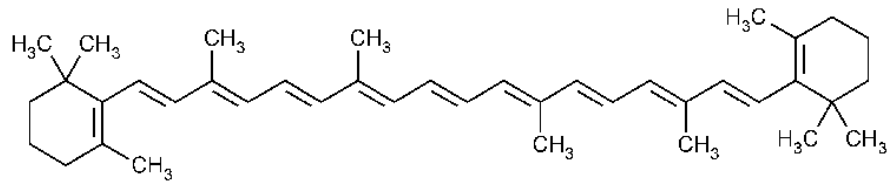
Nhóm carotenoit gồm 2 nhóm nhỏ là Caroten và xanthophyl

* **Caroten** - $C_{40}H_{56}$ là hidrocarbon chưa bão hoà, không tan trong nước mà chỉ tan trong các dung môi hữu cơ. Caroten có màu vàng da cam. Trong thực vật thường có 3 loại caroten: alpha, beta, gama caroten.

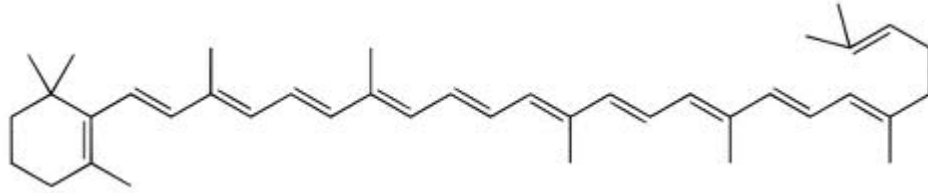
Công thức cấu tạo của alpha caroten($C_{40}H_{56}$):



Công thức cấu tạo của beta caroten($C_{40}H_{56}$):

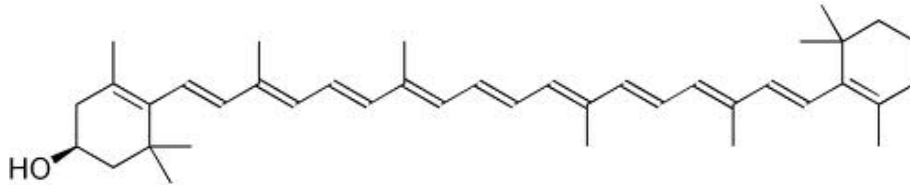


Công thức cấu tạo của gamma caroten ($C_{40}H_{56}$):

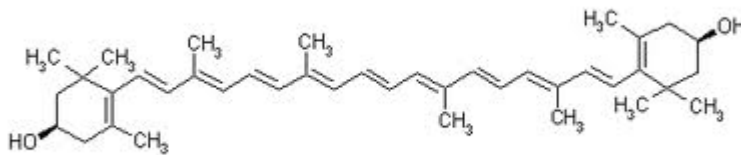


* **Xanthophyl** - $C_{40}H_{56}O_n$ ($n = 1-6$) là dẫn xuất (dạng oxi hoá) của caroten. Các nguyên tử oxi liên kết trong các nhóm: hidroxy, cacboxy, axetoxy, metoxy, epoxy, ... Vì oxi từ 1 đến 6 nên có nhiều loại xanthophyl ví dụ:

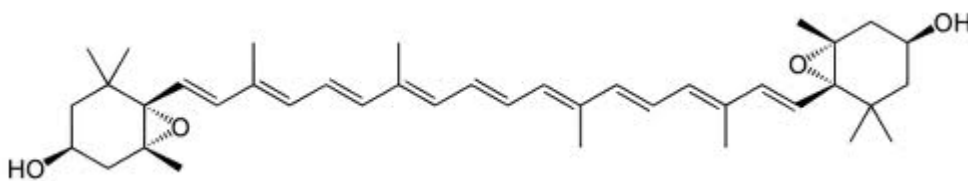
- Criphthoxanthin ($C_{40}H_{56}O$)



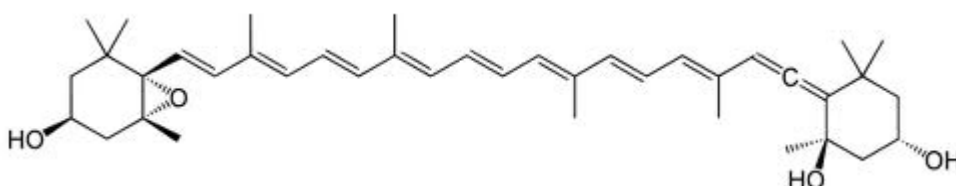
- Lutein ($C_{40}H_{56}O_2$)



- Violaxanthin ($C_{40}H_{56}O_4$)



- Neoxanthin ($C_{40}H_{56}O_4$)



Sự phân cực của diệp lục a, diệp lục b, caroten và xanthophyl

Màu sắc và mức độ phân cực của phân tử các chất đó tăng dần theo thứ tự từ trên xuống như sau:

Bảng màu sắc và thứ tự phân cực của các loại diệp lục, caroten và xanthophyl

chất	màu sắc
caroten	vàng
pheophytin	màu xanh lá cây ô liu
chất diệp lục a	màu xanh xanh
chất diệp lục b	màu vàng xanh
lutein	màu vàng
violaxanthin	màu vàng
neoxanthin	màu vàng

1.6.3. Các phương pháp sắc ký đã dùng để tách các diệp lục và carotenoid

- Theo [15] có thể tách các chất màu thực vật trong lá xanh bằng sắc ký cột với pha tĩnh là bột CaCO_3 hoặc bột đường, chiết mẫu bằng hỗn hợp xăng - benzen (tỉ lệ thể tích 9:1), rửa cột bằng hỗn hợp xăng-benzen (tỉ lệ thể tích 10:1). Picmen sẽ thành 3 vùng màu vàng là carotenoid, màu xanh chlorophyl a và màu xanh vàng là chlorophyl b.

- Theo [16] dùng sắc ký giấy với dung môi là ete dầu hoả tách được: clorophin b, clorophin a, xanthophyl, caroten (theo thứ tự từ dưới lên). Trong thời gian 20-30 phút.

- Theo [12] cho mẫu chiết từ lá, hoa hoặc quả các thực vật bằng n – hexan chạy HPLC với hệ dung môi (gồm axeton nitrin : metanol : clorofoc = 70 : 27 : 3) tách và xác định được hàm lượng các carotenoid: beta-caroten, lutein, lycopen.

- Theo [24] có thể tách các chất màu ở lá xanh bằng SKLM với pha động là hỗn hợp 100 ml ete dầu hoả, 11ml isopropanol và 5 giọt nước.

- Theo [25] sử dụng SKLM silicagel với pha động là hỗn hợp của ete dầu hoả, axeton, xyclohexan, etyl axetat và metanol tách được các chất màu trong lá cây rau bina (rau chân vịt) trong 10 phút.

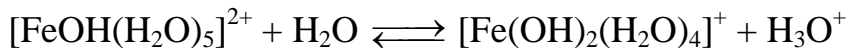
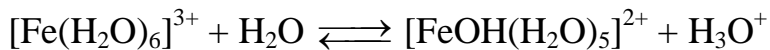
- Theo [21] sử dụng SKLM silicagel với pha động là hỗn hợp của ete dầu hoả và axeton tỉ lệ 4:1 tách được các chất màu trong lá xanh từ trên xuống là Caroten (vàng), Pheophytin (xanh ô-liu), diệp lục a (màu xanh lá cây), diệp lục b (xanh-vàng), Lutein (vàng), violaxanthin (vàng), neoxanthin (vàng).

- Theo [26] sử dụng SGK với pha động là hỗn hợp của ete dầu hoả và axeton tỉ lệ 7:3 hoặc 8:2 hoặc 9:1 tách được các chất màu trong lá xanh.

1.7. Khái quát về ion Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} và muối của chúng [3, 7]

1.7.1. Sơ lược về muối sắt(III) và ion Fe^{3+}

$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ màu tím nhạt. Khi kết tinh từ dung dịch, muối sắt(III) thường ở dạng tinh thể hidrat ví dụ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ màu nâu vàng, Muối sắt(III) thủy phân mạnh hơn muối sắt(II) nên dung dịch có màu vàng nâu và có phản ứng axit mạnh; tùy theo nồng độ, pH của dung dịch có thể vào khoảng 2-3:



Chỉ trong dung dịch có phản ứng axit mạnh ($\text{pH} < 1$) sự thủy phân mới bị đẩy lùi. Ngược lại khi thêm kiềm hoặc đun nóng dung dịch, phản ứng thủy phân xảy ra đến cùng tạo thành kết tủa (gel) hoặc dung dịch keo (sol) của sắt(III) hidroxit bao gồm những phức chất hidroxơ nhiều nhân do hiện tượng ngưng tụ tạo nên.

Hay viết gọn là: $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} \rightarrow [(\text{H}_2\text{O})_4\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$
 $\rightarrow [(\text{H}_2\text{O})_4\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$

Và ở trên 700°C Fe_2Cl_6 bị phân hủy thành monome FeCl_3 .

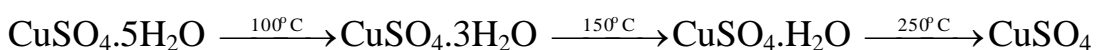
1.7.2. Sơ lược về muối đồng(II) và ion Cu^{2+}

Trong nước khi có NH_3 ion Cu^{2+} tạo phức chất với NH_3 bằng cách thay thế lần lượt các phân tử H_2O trong ion $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (màu xanh lam) bằng các phân tử NH_3 nhưng việc thay thế phân tử NH_3 thứ năm và thứ sáu là rất khó hơn nữa hai phân tử H_2O còn lại liên kết rất yếu với ion Cu^{2+} nên ion phức của Cu^{2+} với NH_3 thường được biểu diễn là $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ (xanh chàm).

Đihidrat đồng(II) clorua là những tinh thể màu lục cũng có kiến trúc lập phương lệch như đồng(II) clorua khan nhưng trong đó mỗi nguyên tử đồng được phối trí bởi bốn nguyên tử Cl và hai phân tử nước:

Dung dịch đậm đặc của $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở trong nước vẫn có màu lục nhưng dung dịch loãng có màu lam, màu đặc trưng của ion $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Khi đun nóng 150°C thì $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mất nước thành muối khan.

Đồng(II) sunfat (CuSO_4) là bột màu trắng, hút mạnh hơi ẩm của không khí tạo thành hidrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ màu lam. Khi đun nóng, pentahidrat mất dần nước và đến 250°C biến thành muối khan:

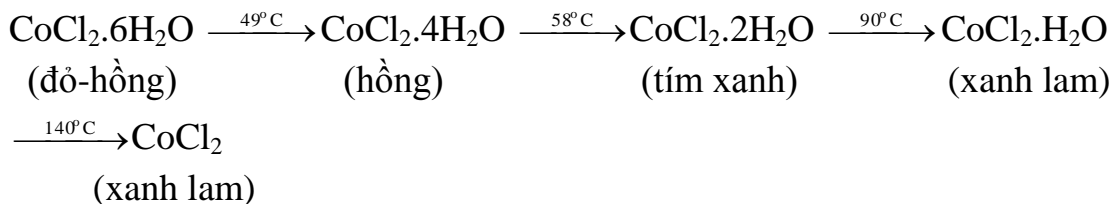


Đồng(II) axetat là chất dạng tinh thể màu lục, dễ tan trong nước. Nó có cấu tạo dạng đime $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]_2$ trong đó nguyên tử Cu ở trạng thái lai hoá d^2sp^3 , những nhóm CH_3COO^- là cầu nối giữa hai nguyên tử Cu.

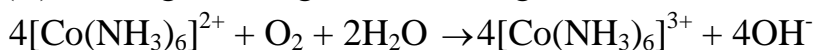
1.7.3. Sơ lược về muối coban(II) và ion Co^{2+}

CoCl_2 màu xanh lam còn $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ màu đỏ-hồng. Khi tan trong nước ion Co^{2+} tạo ion bát diện $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ có màu đặc trưng là đỏ - hồng, ion $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ tồn tại trong một số tinh thể hydrat như $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ màu đỏ - hồng, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ màu đỏ - hồng. Trong nước ion $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ thủy phân một phần làm cho dung dịch có phản ứng axit yếu. CoCl_2 màu xanh lam, nóng chảy ở 727°C và sôi ở 1049°C . Khi nhiệt phân tinh thể hydrat $\text{CoX}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ cũng như muối hydrat khác của Co(II) xảy ra hiện tượng mất nước dần kèm theo sự đổi màu từ đỏ - hồng đến xanh lam.

Ví dụ:



Ion Co^{2+} tạo nên nhiều phức chất bát diện với số phối trí là 6 ví dụ amoniacat coban(II) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ có màu nâu vàng, $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ có màu đặc trưng là đỏ - hồng, Ion Co^{2+} cũng tạo nên nhiều phức tứ diện ví dụ như: $[\text{CoCl}_4]^{2-}$, $[\text{Co}(\text{OH})_4]^{2-}$. Phức chất bát diện của Co(II) có màu đỏ-hồng còn phức chất tứ diện của Co(II) có màu xanh lam. Trong dung dịch nước, amoniacat coban(II) dễ dàng tác dụng với oxi không khí tạo thành amoniacat coban(III):



1.7.4. Sơ lược về muối Niken(II) và ion Ni^{2+}

Trong nước ion Ni^{2+} hydrat hóa tạo ion bát diện $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ có màu lục và ion này thủy phân một phần làm dung dịch có phản ứng axit yếu. Trong tinh thể hydrat có trường hợp không có ion $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ví dụ trong $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. NiCl_2 màu vàng. Ion Ni^{2+} tạo phức chất bát diện ví dụ $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ đều thuận từ. Muối Ni(II) khan kết hợp với khí NH_3 tạo nên muối phức amoniacat chứa ion bát diện $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ có màu tím với K_b là $1,02 \cdot 10^8$, $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ được tạo nên cả trong dung dịch, sự thay thế nước trong $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ bằng NH_3 đã làm màu biến đổi từ lục sang tím.

1.7.5. Các phương pháp sắc ký đã được dùng để tách ion Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}

- Theo [15] có thể dùng cột anoinit để tách hỗn hợp 2 loại ion Fe^{3+} - Zn^{2+} , Cu^{2+} - Zn^{2+} , Co^{2+} - Zn^{2+} hoặc Ni^{2+} - Zn^{2+} ra khỏi nhau trong dung dịch nước dựa vào khả năng tạo phức $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ của ion Zn^{2+} trong dung dịch HCl 0,5 – 1,0M và bị cột giữ lại. Rửa cột bằng dung dịch HCl 1,0M các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} hoặc Ni^{2+} sẽ ra khỏi cột.

- Theo [15]

+ SKLM kết tủa trên lớp silicagel chứa 14% oxim tách và bán định lượng được Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} .

- Theo [26] SKG với pha động là hỗn hợp HCl đặc, etanol và butanol trong khoảng 75 – 90 phút tách được các ion Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ .

- Theo [27] SKG với pha động là hỗn hợp HCl đặc, etanol và butanol trong khoảng 75 phút tách được các ion Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ag^+ .

- Theo [28] SKG với pha động là hỗn hợp 6ml HCl 8M và 19ml axeton tách được các ion Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ra khỏi dung dịch muối nitrat trong nước

- Theo [29] SKG với pha động là hỗn hợp 10ml HCl 7,2M và 30ml butan-2-ol tách được các ion Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ra khỏi dung dịch muối tan trong nước của chúng.

CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM

2.1. Chế tạo bản mỏng từ tinh bột sắn dây

Lấy tinh bột sắn dây, thạch cao nung, keo dán dạng nước và nước cất theo tỉ lệ thể tích tương ứng 4 : 1 : 0,5 : 3,5 trộn đều trong cốc thủy tinh được vữa. Lấy thìa nhựa đưa vữa lên tấm kính (khoảng 3,0 - 3,5 ml vữa cho 10 cm² kính), dùng thìa gạt và nhẹ nhàng nghiêng tấm kính về các phía cho vữa phủ đều lên tấm kính rồi để lên giá phẳng cho khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 giờ.

2.2. Chiết dịch từ lá xanh

Lấy 10 gam lá rau muống còn tươi (khoảng 30 lá) hoặc lá xanh khác cắt nhỏ cho vào cối sứ (bỏ gân lá), trộn thêm 2 gam bột CaCO_3 để trung hoà dịch axit của tế bào, có thể cho một ít bột thủy tinh cho dễ nghiền. Nghiền các mẫu lá đến khi thành một thể đồng nhất, cho 15 - 20 ml axeton 80% hoặc cồn etylic 90° vào cối sứ khuấy đều và để 5 phút rồi lọc bằng bông trên phễu thủy tinh, dung dịch thu được trộn với 2,0 ml toluen rồi chiết bằng phễu chiết lấy phần trên (màu xanh đậm) được dịch mẫu.

2.3. Tiến hành sắc ký cột

Sử dụng buret chuẩn độ loại 25 ml làm cột sắc ký, pha tĩnh là silicagel kích thước hạt 40 – 60 mesh, bột CaCO_3 , bột đường glucozo, tinh bột sắn dây. Nạp silicagel vào buret đạt chiều cao cột khoảng 10 – 12 cm, bột đường glucozo 25 – 30 cm, còn bột canxi cacbonat nạp 15 – 20 cm là được.

Dung môi sử dụng là các hệ: ete dầu hỏa – axeton; toluen – axeton; toluen – cồn etylic tuyệt đối; axeton – HCl đặc; NH_4NO_3 4M – NH_3 4M; CH_3COOH 1,5M – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1,5M.

Cho 3 - 5 giọt mẫu trực tiếp vào cột không để xáo trộn bề mặt lớp silicagel (pha tĩnh) hoặc mẫu dính lên thành thủy tinh phía trên của buret.

Sau khi hoàn tất việc nạp mẫu rồi thì lót 1 miếng bông hoặc phủ 0,3 cm cát sạch ở bên trên mẫu để khi nạp dung môi vào lớp silicagel (p) và mẫu không bị xáo trộn.

để tốc độ chảy của dung môi khoảng 12 – 15 giọt/phút.

2.4. Tiến hành sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography)

Bình khai triển là bình thủy tinh hình trụ cao 25 cm đường kính miệng 10 cm, có nắp đậy kín. Bão hòa hơi dung môi trong bình bằng cách lót giấy lọc xung quanh thành trong của bình, rồi rót một lượng vừa đủ dung môi vào bình, lắc rồi để giấy lọc thấm đều dung môi. Lượng dung môi sử dụng sao cho sau khi thấm đều giấy lọc còn lại một lớp dày khoảng 5 mm đến 10 mm ở đáy bình. Đậy kín nắp bình và để yên 10 phút ở nhiệt độ phòng.

Sử dụng bản mỏng TLC silicagel 60 F₂₅₄ của hãng Merck được cắt bằng kéo thành bản hình chữ nhật có kích thước 3,5 cm x 12 cm và bản tự chế tạo từ tinh bột sắn dây kích thước 4 cm x 12 cm.

Sử dụng ống thủy tinh mao quản hoặc micropipet để đưa mẫu lên bản mỏng. Thể tích dung dịch từ 0,001ml đến 0,005ml đối với trường hợp đưa mẫu lên bản mỏng dưới dạng điểm và từ 0,1 - 0,2ml khi đưa mẫu lên bản mỏng dưới dạng vạch. Đường xuất phát phải cách mép dưới của bản mỏng 1,5cm - 2cm và cách bề mặt dung môi từ 0,8 - 1 cm. Các vết chấm phải nhỏ, có đường kính 2 - 6mm và cách nhau 15mm. Các vết ở bìa phải cách bờ bên của bản mỏng ít nhất 1cm để tránh hiệu ứng bờ.

Đặt bản mỏng gần như thẳng đứng với bình triển khai, các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi khai triển. Đậy kín bình và để yên ở nhiệt độ không đổi. Khi dung môi đã triển khai trên bản mỏng được một đoạn, lấy bản mỏng ra khỏi bình, đánh dấu mức dung môi, làm bay hơi dung môi còn đọng lại trên bản mỏng rồi chụp ảnh, đo khoảng di chuyển của dung môi và các chất cần tách. Tính hệ số R_f .

Với tách chất màu thực vật trong lá xanh làm với các hệ dung môi khác nhau, trong mỗi hệ dung môi khảo sát ở nhiều tỉ lệ để tìm ra tỉ lệ tối ưu. Đối với tách các ion kim loại cần khảo sát bằng chấm các mẫu riêng trước khi sử dụng mẫu hỗn hợp.

2.5. Tiến hành sắc ký giấy (paper chromatography)

Sử dụng giấy sắc ký loại 3S và giấy lọc đường kính 12cm được cắt thành hình chữ nhật kích thước 3,5 x 10cm. Cần dùng kẹp nhỏ để giữ mép trên của giấy sắc ký tránh bị gập giấy trong quá trình chạy sắc ký.

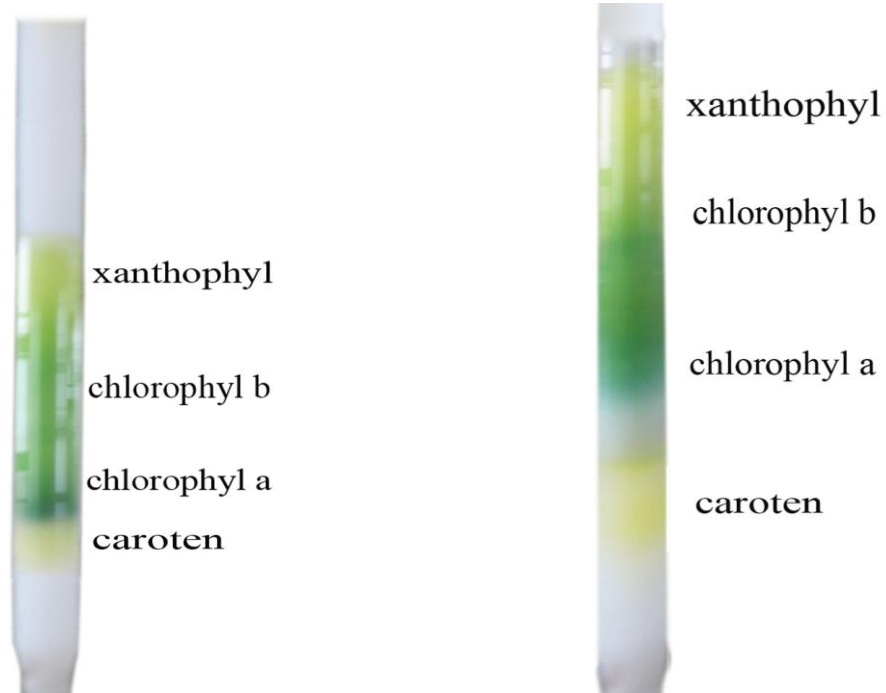
Các bước tiến hành cụ thể tương tự triển khai SKLM.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sắc ký cột

3.1.1. Tách chất màu trong lá xanh

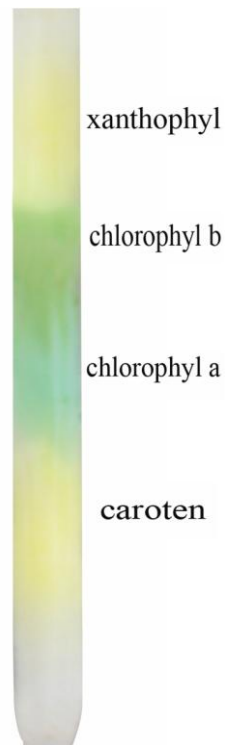
a) Pha tĩnh là silicagel.



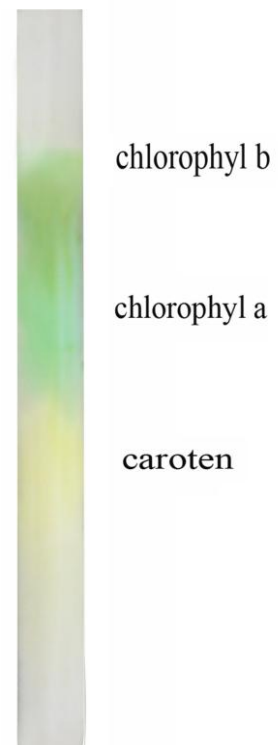
**dung môi ete dầu hoả - axeton (9:1)
thời gian 15 phút**

**dung môi toluen – axeton (9:1)
thời gian 18 phút**

b) Pha tĩnh là bột canxi cacbonat.

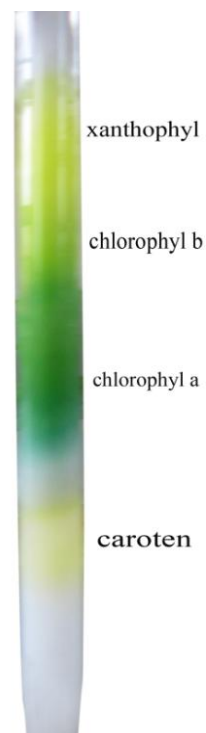


**dung môi ete dầu hoả-axeton (9,5:0,5)
thời gian 20 phút**



**dung môi toluen-axeton (9,5:0,5)
thời gian 20 phút**

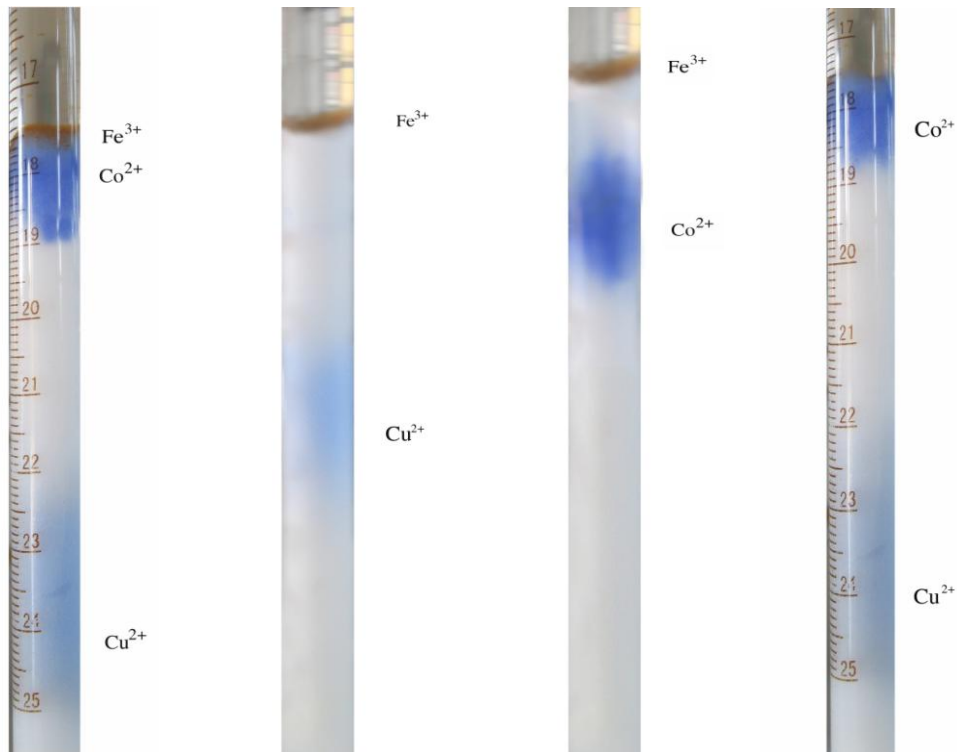
c) Pha tĩnh là glucozơ.



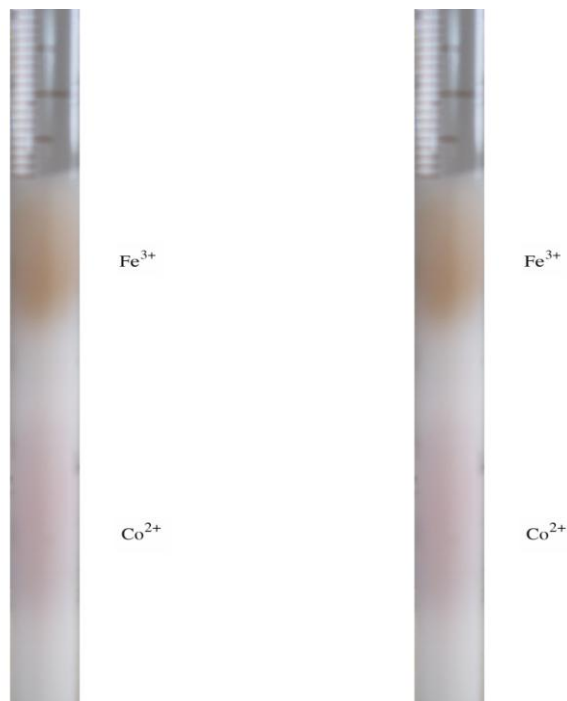
dung môi: ete dầu hoả - axeton (9,5:0,5), thời gian 20 phút.

3.1.2. Tách các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+}

a) Pha tĩnh là silicagel, pha động là hệ dung môi: NH_4NO_3 4M – NH_3 4M (9:1), thời gian 15 phút, chiều dài cột 15 cm.



b) Pha tĩnh là silicagel, pha động là hệ dung môi: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1,5M - CH_3COOH 1,5M (4:6), thời gian 15 - 20 phút, chiều dài cột 15 cm.



3.1.3. Kết luận

Với sắc ký cột chúng tôi đã lựa chọn được 7 thí nghiệm đơn giản có thể áp dụng vào dạy ở trường trung học phổ thông gồm:

- 5 thí nghiệm tách chất màu trong lá xanh:
- 2 thí nghiệm tách hỗn hợp các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} và Co^{2+} trong dung dịch nước ở dạng muối nitrat hoặc muối clorua:

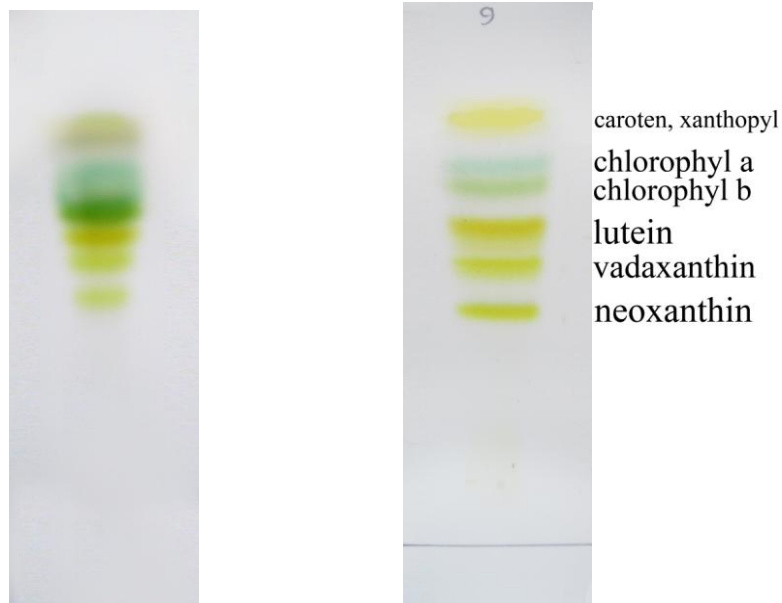
3.2. Sắc ký lớp mỏng

3.2.1. Tách chất màu trong lá xanh

a) Bản mỏng silicagel của hãng Merck, hệ dung môi: ete dầu hoả - axeton (5:5), thời gian 10 phút.

Giá trị R_f của các chất màu trong lá xanh, với trường hợp tách tốt nhất.

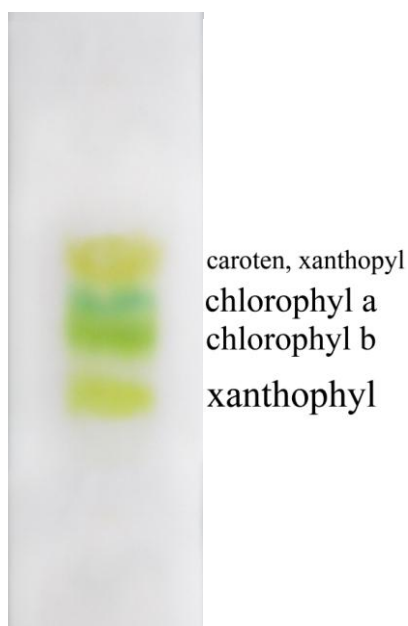
V ete dầu hoả : V axeton	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
5 : 5	10	Vàng	0,98
		Xanh tươi	0,82
		Xanh vàng	0,78
		Vàng	0,75
		Vàng	0,68
		Vàng	0,58



b) Bản mỏng tự chế tạo từ tinh bột sắn dây, hệ dung môi ete dầu hoả - axeton (8:2), thời gian 10 phút.

Giá trị R_f của các chất màu trong lá xanh, với trường hợp tách tốt nhất.

V ete dầu hoả : V axeton	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
8 : 2	10	Vàng	0,90
		Xanh tươi	0,51
		Xanh vàng	0,41
		Vàng	0,30

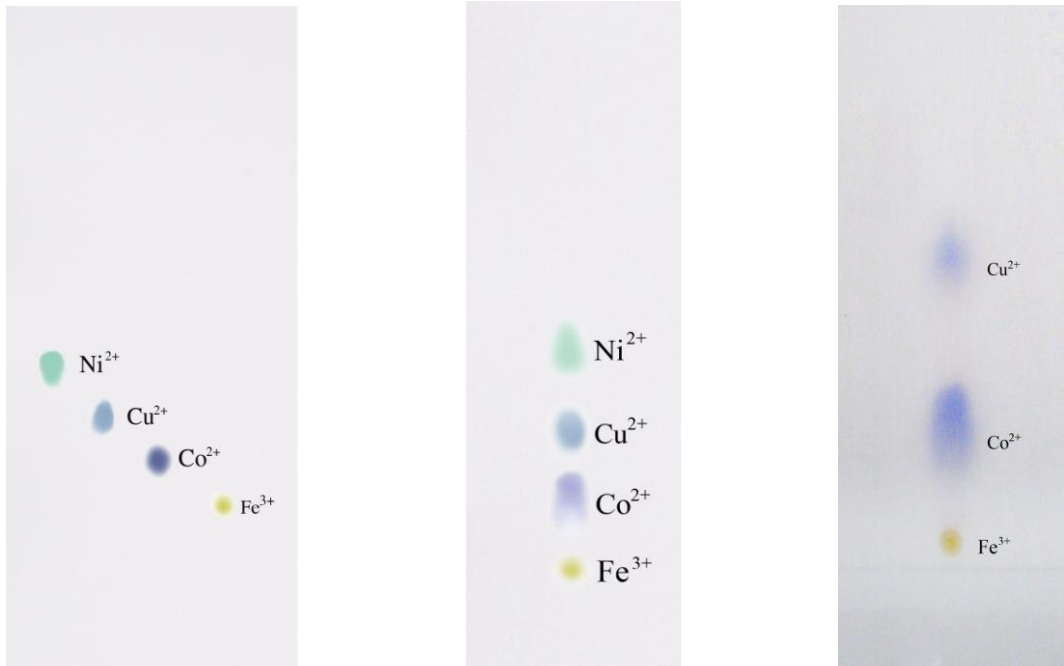


3.2.2. Tách các ion kim loại Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} .

a) Bản mỏng silicagel của hãng Merck, hệ dung môi: NH_3 4M – NH_4NO_3 4M (1:9), thời gian 10 phút.

Giá trị R_f của các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , với trường hợp tách tốt nhất.

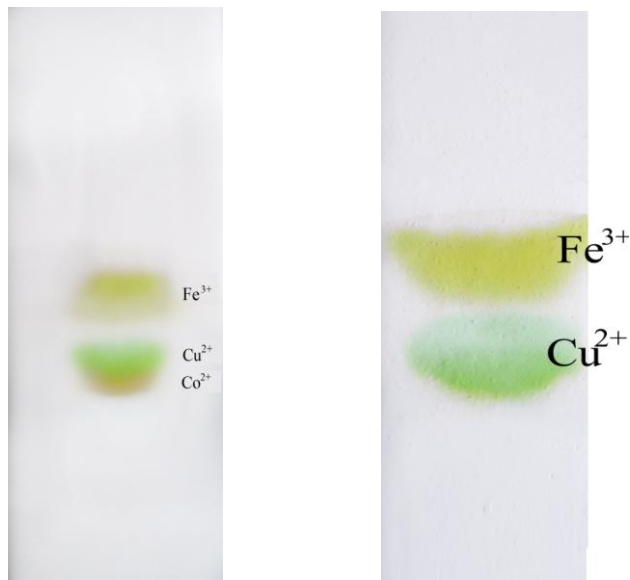
V NH_3 : V NH_4NO_3	R_f			
	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
1:9	0,0	0,26	0,12	0,42



b) Bản mỏng chế tạo từ tinh bột sắn dây, hệ dung môi: axeton – HCl đặc (9:1), thời gian 10 – 13 phút.

Giá trị R_f của các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , với trường hợp tách tốt nhất.

V axeton : V HCl đặc	R_f		
	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Co^{2+}
9:1	0,83	0,55	0,46



3.2.3. Kết luận

Với sắc ký lớp mỏng chúng tôi đã lựa chọn được 2 thí nghiệm tách chất màu trong lá xanh và 2 thí nghiệm tách các ion kim loại có thể áp dụng vào dạy ở trường THPT.

3.3. Sắc ký giấy

3.3.1. Tách chất màu trong lá xanh

a) Giấy sắc ký 3S, hệ dung môi ete dầu hoả - axeton (9:1), thời gian 10 phút.

Giá trị R_f của các chất màu trong lá xanh, với trường hợp tách tốt nhất.

V ete dầu hoả : V axeton	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
9:1	10	Vàng	0,86
		Vàng	0,64
		Xanh	0,54
		Xanh vàng	0,45



caroten

xanthophyl

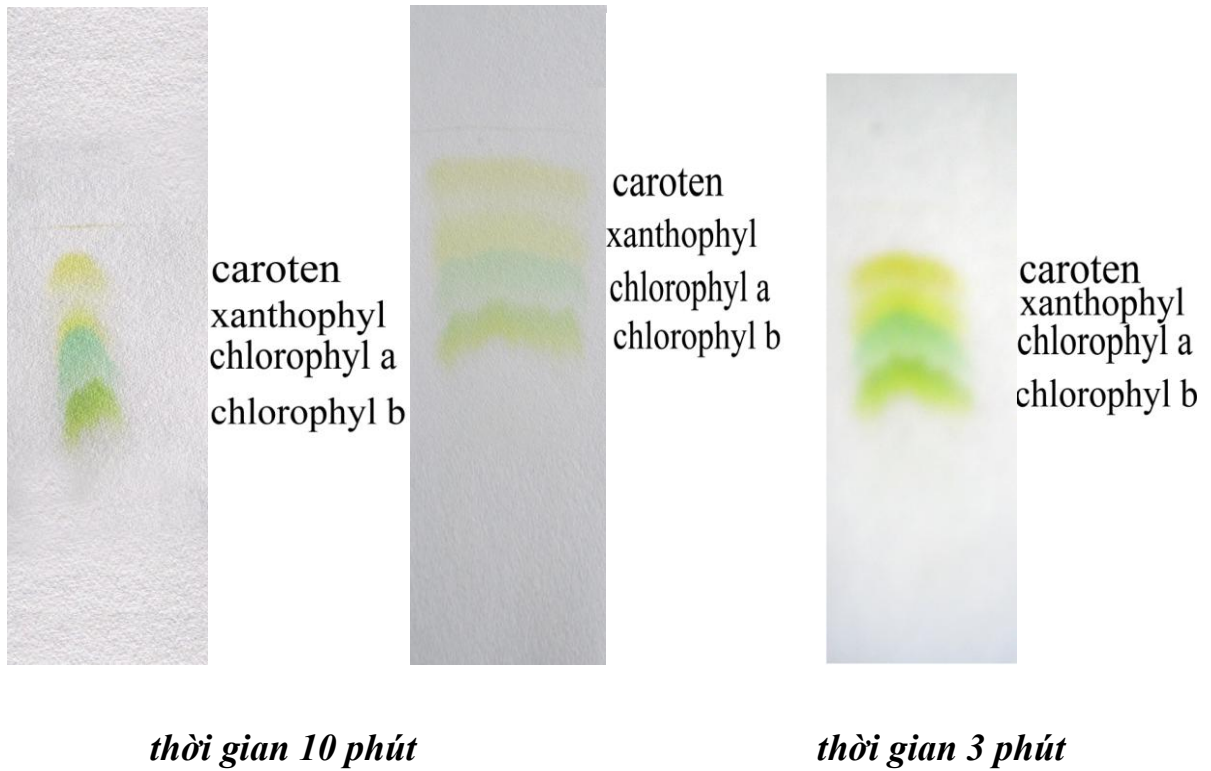
chlorophyl a

chlorophyl b

b) Giấy sắc ký là giấy lọc, hệ dung môi ete dầu hoả - axeton (8:2), thời gian 3 – 10 phút.

Giá trị R_f của các chất màu trong lá, với trường hợp tách tốt nhất.

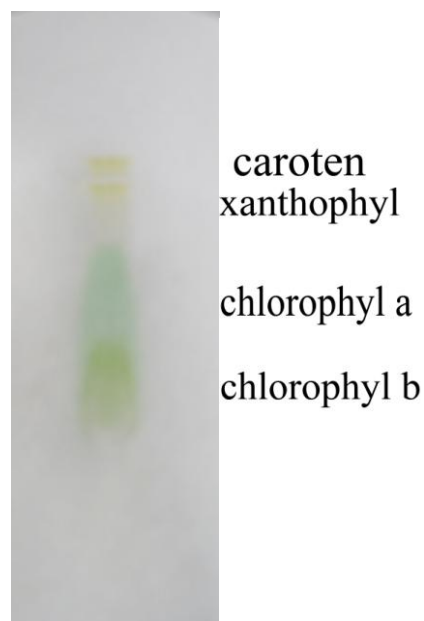
V ete dầu hoả : V axeton	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
8:2	10	Vàng	0,95
		Vàng	0,76
		Xanh tươi	0,67
		Xanh vàng	0,54



c) Giấy sắc ký 3S, dung môi toluen

Giá trị R_f của các chất màu trong lá xanh với giấy sắc ký 3S, dung môi toluen.

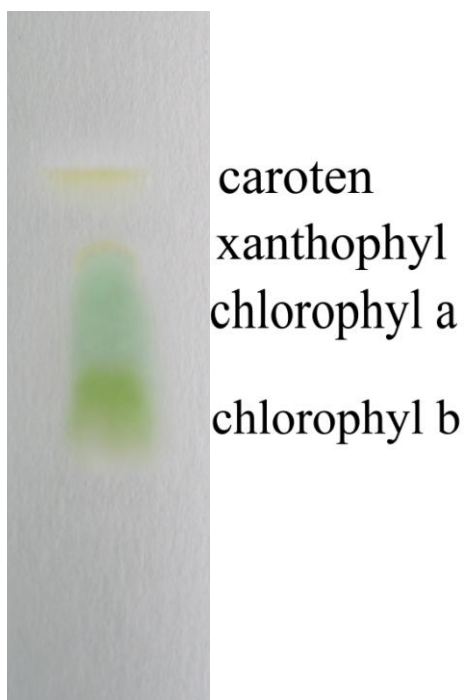
toluen	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
10:0	8	Vàng	0,97
		Vàng	0,92
		Xanh tươi	0,46
		Xanh vàng	0,35



d) Giấy sắc ký là giấy lọc, dung môi toluen

Giá trị R_f của các chất màu trong lá xanh với giấy lọc, dung môi toluen.

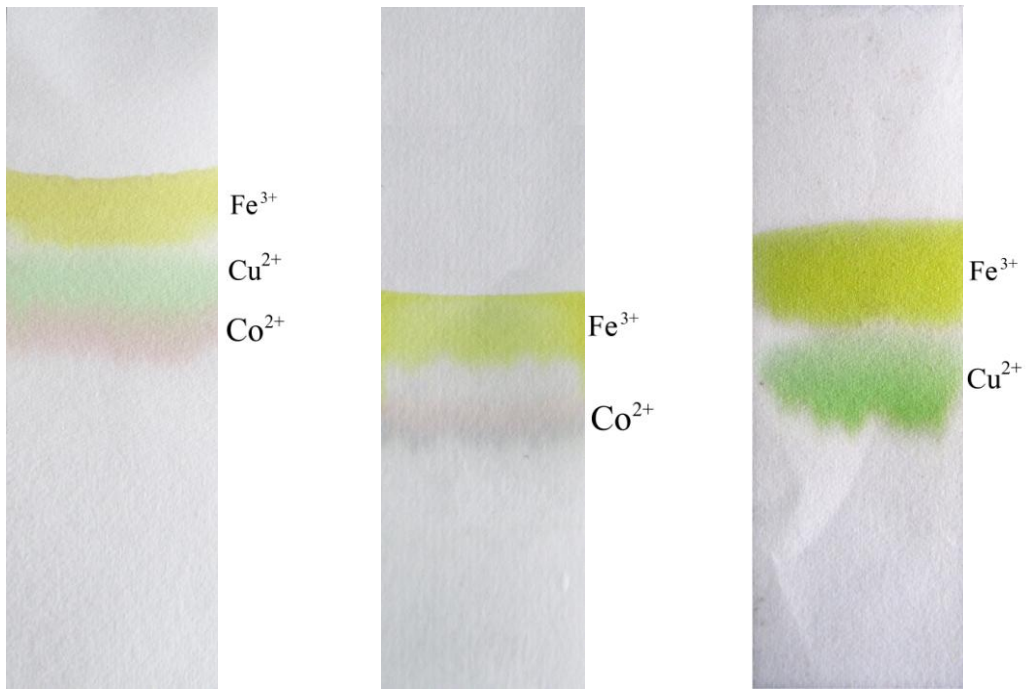
V toluen :V cồn etylic	T.gian (phút)	Các vệt màu	R_f
10:0	8	Vàng	0,98
		Vàng	0,93
		Xanh tươi	0,46
		Xanh vàng	0,36

**3.3.2. Tách các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} và Co^{2+}**

a) Giấy sắc ký 3S, hệ dung môi: axeton - HCl đặc (9:1), thời gian 20 phút.

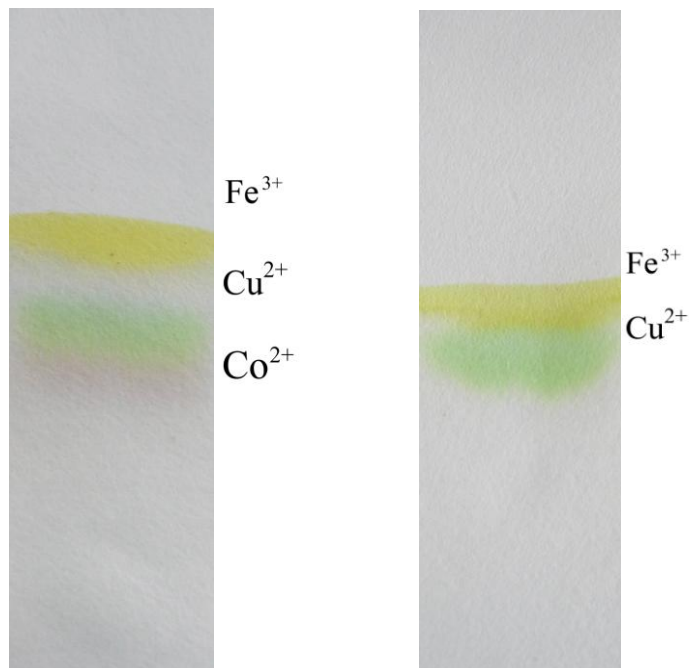
Giá trị R_f của các ion Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , với trường hợp tách tốt nhất.

V axeton : V HCl đặc	R_f		
	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Co^{2+}
9:1	0,92	0,72	0,66



b) Giấy sắc ký là giấy lọc, hệ dung môi: axeton - HCl đặc (9:1), thời gian 10 – 15 phút.

V axeton : V HCl đặc	R _f		
	Fe ³⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺
9:1	0,94	0,73	0,67



3.3.3. Kết luận

Với sắc ký giấy chúng tôi đã lựa chọn được 4 thí nghiệm tách chất màu trong lá xanh và 2 thí nghiệm tách các ion kim loại có thể áp dụng vào dạy ở trường THPT.

KẾT LUẬN CHUNG

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã lựa chọn ra được 17 thí nghiệm sắc ký gồm sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng và sắc ký giấy, có thể tách các chất màu trong lá xanh hoặc các ion kim loại loại Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} . Các thí nghiệm này đều dễ thực hiện, thời gian ngắn, không cần sử dụng thuốc thử hiện màu, chỉ sử dụng các hóa chất dễ tìm kiếm hầu hết ít hoặc không độc hại.

Trong số 17 thí nghiệm trên chúng tôi cũng đã chọn ra được 4 thí nghiệm tốt nhất có thể sử dụng dạy ở trường THPT ở nước ta đó là:

+ Tách chất màu trong lá xanh bằng sắc ký cột, với pha tĩnh là glucozơ, pha động là hệ dung môi: ete dầu hoả-axeton (9,5:0,5).

+ Tách hỗn hợp các ion Fe^{3+} - Cu^{2+} - Co^{2+} bằng sắc ký cột, với pha tĩnh là silicagel, pha động là hệ dung môi: NH_4NO_3 4M - NH_3 4M (9:1).

+ Tách hỗn hợp các ion Fe^{3+} - Cu^{2+} - Co^{2+} - Ni^{2+} bằng sắc ký lớp mỏng, với bản mỏng silicagel của hãng Merck, hệ dung môi: NH_4NO_3 4M - NH_3 4M (9:1).

+ Tách chất màu trong lá xanh bằng sắc ký giấy, với giấy sắc ký là giấy lọc, hệ dung môi: ete dầu hoả - axeton (8:2).

Chúng tôi cũng đã cải tiến thay thế bản mỏng silicagel trong sắc ký lớp mỏng bằng bản mỏng tự chế tạo từ tinh bột sắn dây, thay thế silicagel nhồi cột trong sắc ký cột bằng glucozơ hoặc bột canxi cacbonat, thay thế giấy sắc ký trong sắc ký giấy bằng giấy lọc. Các sự cải tiến đó có ưu điểm là thay thế các hóa chất, thiết bị đắt tiền, bằng những hóa chất, thiết bị rẻ tiền, sẵn có ở Việt Nam hoàn toàn không độc hại, mà vẫn đảm bảo hiệu quả tách sắc ký và chuyển tải được cho học sinh những kiến thức cơ bản nhất về bản chất, nguyên lý và ứng dụng của sắc ký.

References :

I. Tiếng việt

1. Nguyễn Bá Hoài Anh (2003), *đại cương về sắc ký lỏng*, NXB Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2. Nguyễn Bá Hoài Anh (2003), *các quá trình tách trong sắc ký lỏng*, NXB Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh..

3. Nguyễn Tinh Dung (2003), *Hoá Học phân tích, phần III: các phương pháp phân tích hoá học*, NXBGD, Hà Nội.

4. Lê Văn Đăng (2005), *chuyên đề một số hợp chất thiên nhiên*, NXB Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

5. Trần Đăng Kế, Nguyễn Như Khanh (1995), *Sinh lý thực vật*, NXB Giáo dục.

6. Nguyễn Thanh Khuyến (2000), *Các phương pháp sắc ký*, Trung tâm sắc ký thành phố Hồ Chí Minh.
7. Hoàng Nhâm (2004), *Hoá học vô cơ tập ba*, NXB Giáo dục.
8. Nguyễn Thị Thu Nga (2005), *giáo trình thực hành hoá học phân tích*, NXBGD, Hà Nội.
9. Vũ Thanh Tâm, Hoàng Minh Tấn, Vũ Văn Vụ (1993), *Sinh lý học thực vật*, NXB Giáo dục.
10. Nguyễn Văn Ri (2009), *Các phương pháp tách*, khoa Hoá, Trường ĐHKHTN ĐHQG Hà Nội.
11. Nguyễn Văn Ri (2006), *hướng dẫn thực hành bộ môn hoá phân tích*, khoa hoá trường ĐHKHTN ĐHQG Hà Nội.
12. “Tập chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 23 (2007) 130-134”
13. Phạm Hùng Việt (2001), *sắc ký khí cơ sở lý thuyết và khả năng ứng dụng*, NXB ĐHQG Hà Nội.
14. Phạm Hùng Việt (2003), *Cơ sở lý thuyết của phương pháp sắc ký*, NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.
15. Đào Hữu Vinh (chủ biên), Nguyễn Xuân Dũng, Trần Thị Mỹ Linh, Phạm Hùng Việt (1985), *Các phương pháp sắc ký*, NXB khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
16. Nguyễn Duy Minh, Nguyễn Như Khanh (1982), *Thực hành sinh lý thực vật*, NXB Giáo dục.

II. Tiếng Anh

17. Bowen, W. R. and Baxter, W. D (1980), *Experimental Cell Biology, An Integrated Laboratory*, Macmillan Publishing Co, Inc, New York.
18. D. Kealey, P. J. Haines (2002), *Analytical Chemistry*, printed in the united States of America.
19. Daniel C. Harris (2007), *Quantitative Chemical Analysis*, printed in the united States of America.
20. I.M. Hais, K. Macek (1963), *Paper chromatography*. Czechoslovak Academy of Sciences. Prague.
21. Verlag chemie Academic press (1966), N.Y. *Thin Layer Chromatography*.
22. E. Hoftman (1967), *Chromatography*, Reynold. N.Y. 1967.
23. Jeff Altig (2009), “*Paper Chromatography of a Metal Cation Mixture*”, *CHEM 121L*, volume 50, issue 5, pp. 134 – 139.

24. Peter Keusch (2003), “*Separation of Plant Pigments by Thin Layer Chromatography (TLC)*”, *Organic Chemistry Demonstration Experiments on VideoChemistry Visualized*, University of Regensburg, vol. 40, issue 1, p. 36 - 40.

25. Anwar, M. H (1963), “*Separation of plant pigments by thin layer chromatography*”, *Journal of Chemical Education*, vol. 40, issue 1, p. 29.

26. Rollins, Charles (1963), “*Thin layer chromatographic separation of leaf pigments: A rapid demonstration*” *Journal of Chemical Education*, vol. 40, issue 1, p. 32

27. A. S. Ritchie (1961), “*A paper chromatographic scheme for the identification of metallic ions*” *J. Chem. Educ.*, 38 (8), p 400.

28. S. Lincoln, R. A. Pohl and D. T. Haworth (1970), “*A thin-layer chromatography experiment for general chemistry*”, *J. Chem. Educ.*, 47 (5), p 401.

29. David J. Rakestraw , Rebecca J. Whelan , Theresa E. Hannon and Richard N. Zare (2004), “*Application of Ion Chromatography to the Investigation of Real-World Samples*”, *J. Chem. Educ.*, 81 (9), p 1299

