

số tín hiệu trên nhiễu và độ phân giải có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, người sử dụng có trách nhiệm đảm bảo rằng các phương pháp tính toán dùng trong phần mềm đó phù hợp với yêu cầu của bộ tiêu chuẩn này; nếu không, phải điều chỉnh cho phù hợp.

Sắc đồ

Sắc đồ là một đồ thị hay một cách trình bày khác mô tả sự thay đổi đáp ứng của detector (hay nồng độ của chất hay một đại lượng khác làm thước đo nồng độ của chất) theo thời gian, thể tích hay khoảng cách. Một sắc đồ lý tưởng có dạng một chuỗi các pic kiểu Gauss trên một đường nền (Hình 5.1).

Pic

Pic, hay còn gọi là đỉnh, là phần sắc đồ ghi lại đáp ứng của detector khi một chất (hoặc 2 hay nhiều chất không tách ra khỏi nhau) được rửa giải khỏi cột.

Pic có thể được xác định bằng diện tích pic, hoặc chiều cao pic (h) và chiều rộng pic ở nửa chiều cao (w_h), hoặc chiều cao pic (h) và chiều rộng pic giữa các điểm uốn (w_i). Ở các pic có dạng hình Gauss (Hình 5.1), có mối quan hệ biểu thị bằng phương trình sau:

$$w_h = 1,18 \times w_i$$

Thời gian lưu (t_R)

Thời gian tính từ thời điểm tiêm mẫu đến thời điểm xuất hiện đỉnh pic đáp ứng (Hình 5.1, đường nền tính bằng phút hoặc giây).

Thể tích lưu (V_R)

Là thể tích pha động cần thiết để rửa giải một chất. Thể tích lưu có thể tính được từ thời gian lưu và tốc độ dòng (ml/min) theo công thức:

$$V_R = t_R \times F$$

Trong đó:

F là lưu lượng dòng (hay tốc độ dòng) của pha động (ml/min).

PHỤ LỤC 5

CÁC KỸ THUẬT TÁCH SẮC KÝ

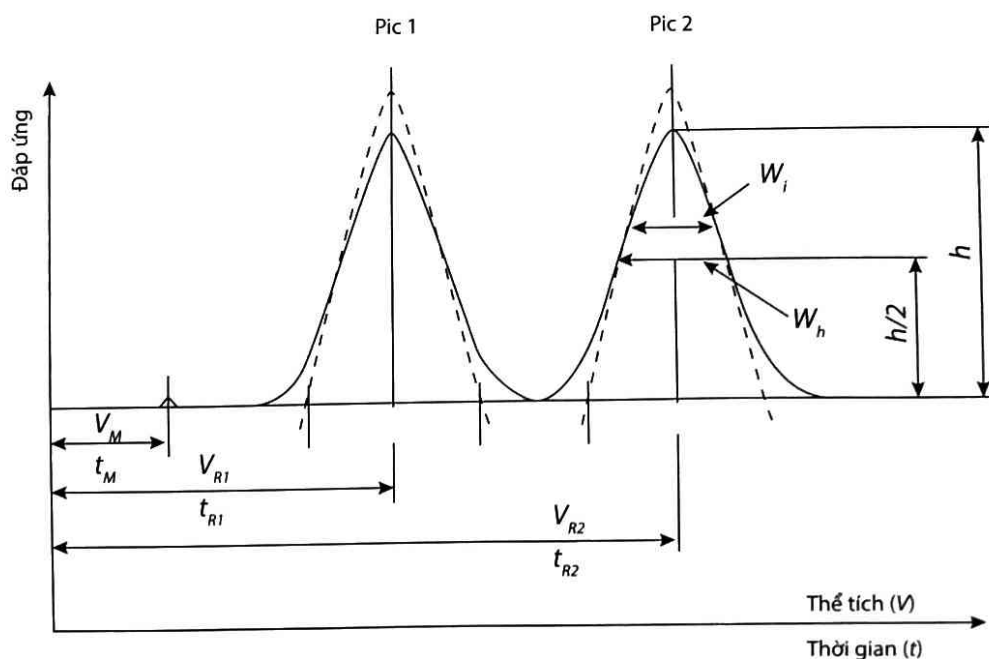
Các kỹ thuật tách sắc ký là những phương pháp tách trong đó các thành phần của mẫu được phân bố vào hai pha: một pha tĩnh và một pha động. Pha tĩnh có thể là một chất rắn, cũng có thể là một chất lỏng được giữ trên một chất rắn hay một gel. Pha tĩnh có thể được nhồi vào cột, hoặc trải thành một lớp, hay phân tán thành một lớp phim, v.v... Pha động có thể là chất khí, chất lỏng hay chất lưu siêu tới hạn (còn được gọi là chất lỏng siêu tới hạn). Sự tách sắc ký có thể dựa trên các cơ chế khác nhau như hấp phụ, phân bố khối lượng (hay phân chia), trao đổi ion, hoặc dựa trên sự khác nhau về tính chất lý hóa của các phân tử như kích thước, khối lượng, thể tích, v.v...

Phụ lục này chỉ đề cập đến các định nghĩa và phép tính các thông số thông thường trong kỹ thuật sắc ký, các yêu cầu thường được áp dụng cho sự phù hợp của hệ thống sắc ký. Nguyên lý, thiết bị và phương pháp tách được trình bày trong các phép thử chung sau đây:

- Phương pháp sắc ký giấy (Phụ lục 5.1)
- Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2)
- Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3)
- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)
- Phương pháp sắc ký rây phân tử (Phụ lục 5.5)

ĐỊNH NGHĨA

Các định nghĩa sau đây được dùng trong các chuyên luận để tính toán các thông số về sự phù hợp của hệ thống và các tiêu chuẩn chấp nhận. Một số thiết bị có phần mềm của nhà sản xuất dùng để tính toán một vài thông số như tỷ



Hình 5.1

Thời gian chết (t_M) (hold-up time)

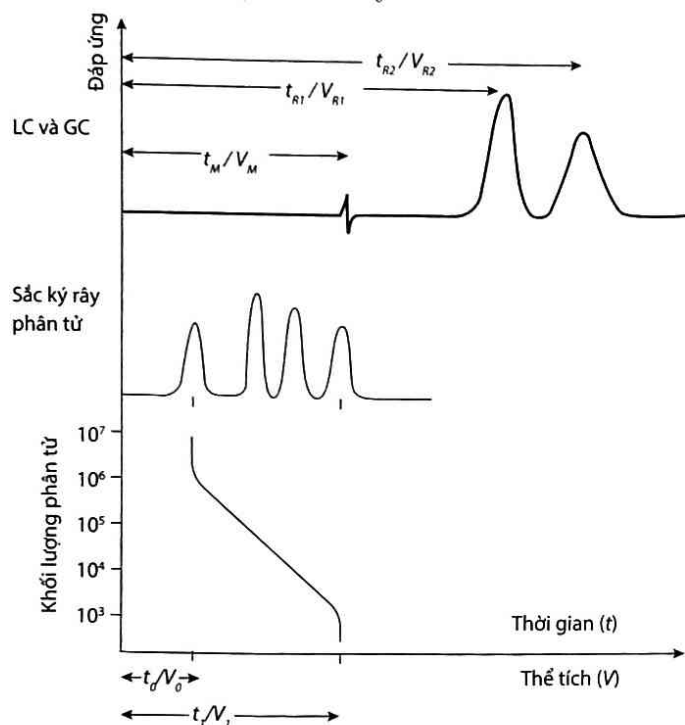
Là thời gian cần thiết để rửa giải một chất không bị lưu giữ (Hình 5.1, đường nền biểu thị bằng phút). Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử (xem Hình 5.2), thời gian chết được ký hiệu là t_0 .

Thể tích chết (V_M) (hold-up volume)

Là thể tích pha động cần thiết để rửa giải một chất không bị lưu giữ. Nó có thể được tính từ thời gian chết (t_M) và tốc độ dòng F (số ml pha động trong 1 min) theo công thức sau:

$$V_M = t_M \times F$$

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử (xem Hình 5.2), thể tích chết được ký hiệu là V_0 .



Hình 5.2

Hệ số phân bố khối lượng

Hệ số phân bố khối lượng (D_m) hay còn gọi là thừa số dung lượng (k'), hoặc thừa số lưu giữ (k), được định nghĩa và tính theo công thức sau:

$$D_m = k' = k = \frac{m_S}{m_M} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

Trong đó:

K_C là hằng số phân bố hay còn gọi là hệ số phân bố cân bằng;

V_S là thể tích pha tĩnh;

V_M là thể tích pha động;

m_S là lượng chất trong pha tĩnh;

m_M là lượng chất trong pha động.

Thừa số lưu giữ k của một chất có thể được xác định trên sắc đồ theo công thức:

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

Thời gian toàn bộ của pha động (t_i)

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thời gian toàn bộ của pha động là thời gian lưu của một chất mà kích thước phân tử nhỏ hơn kích thước các lỗ nhỏ nhất của gel (Hình 5.2).

Thể tích toàn bộ của pha động (V_i)

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thể tích toàn bộ của pha động là thể tích lưu của một chất mà kích thước phân tử nhỏ hơn kích thước các lỗ nhỏ nhất của gel. Nó có thể được tính từ thời gian toàn bộ của pha động (t_i) và tốc độ dòng F (ml/min) theo công thức sau:

$$V_i = t_i \times F$$

Thời gian lưu của chất không bị lưu giữ (t_0)

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thời gian lưu của chất không bị lưu giữ là thời gian lưu của một chất mà kích thước phân tử lớn hơn kích thước các lỗ lớn nhất của gel (Hình 5.2).

Thể tích lưu của chất không bị lưu giữ (V_0)

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thể tích lưu của chất không bị lưu giữ là thể tích lưu của một chất mà kích thước phân tử lớn hơn kích thước các lỗ lớn nhất của gel. Có thể tính thể tích lưu của chất không bị lưu giữ từ thời gian lưu của chất không bị lưu giữ (t_0) và tốc độ dòng F (ml/min) theo công thức sau:

$$V_0 = t_0 \times F$$

Hằng số phân bố (K_0)

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, đặc tính rửa giải của một chất trong một cột sắc ký cụ thể có thể được biểu thị dưới dạng hằng số phân bố (còn gọi là hệ số phân bố) K_0 và được tính theo công thức:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_i - t_0}$$

Thừa số chậm (R_F)

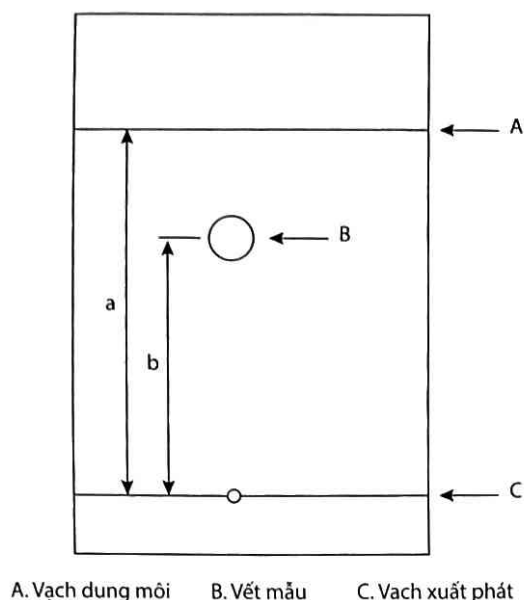
Thừa số chậm R_F , hay còn gọi là hệ số di chuyển R_F , được dùng trong sắc ký trên mặt phẳng (sắc ký lớp mỏng, sắc ký giấy) là tỷ số giữa khoảng cách từ điểm chấm mẫu đến tâm của vết sắc ký và khoảng cách di chuyển của dung môi tính từ điểm chấm mẫu (Hình 5.3).

$$R_F = \frac{b}{a}$$

Trong đó:

b là quãng đường di chuyển của chất phân tích;

a là quãng đường di chuyển của tuyến dung môi.



Hình 5.3

Số đĩa lý thuyết (N)

Tùy thuộc vào kỹ thuật sử dụng, hiệu năng của cột (hay hiệu lực biểu kiến của cột) biểu thị dưới dạng số đĩa lý thuyết, có thể tính được từ những dữ liệu thu được dưới điều kiện đẳng nhiệt, đẳng dòng hoặc đẳng mật độ (isodense), theo công thức sau, trong đó các giá trị t_R và w_h có cùng đơn vị đo:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Trong đó:

t_R là thời gian lưu của pic tương ứng với chất phân tích;

w_h là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic.

Số đĩa lý thuyết thay đổi theo chất, theo cột, nhiệt độ cột, pha động và thời gian lưu.

Thể tích lưu trú (D) (Dwell volume)

Thể tích lưu trú (còn gọi là thể tích trễ gradient) là thể tích dung môi chảy qua từ điểm các pha động gặp nhau đến điểm đầu vào của cột, có thể được xác định bằng cách sau: **Cột:** Thay cột sắc ký bằng một ống mao quản thích hợp (ví dụ ống 1 m × 0,12 mm).

Pha động A: Nước dùng cho sắc ký (TT).

Pha động B: Dung dịch chứa acetone (TT) 0,1 % (tt/tt) trong nước dùng cho sắc ký (TT).

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 - 20	100 → 0	0 → 100
20 - 30	0	100

Tốc độ dòng: Đặt tốc độ dòng sao cho có áp suất ngược thích hợp (back-pressure) (ví dụ 2 ml/min).

Phát hiện: Quang phổ tử ngoại ở 265 nm.

Xác định thời điểm ($t_{0,5}$) tính bằng phút khi độ hấp thụ tăng lên đạt 50 % (Hình 5.4).

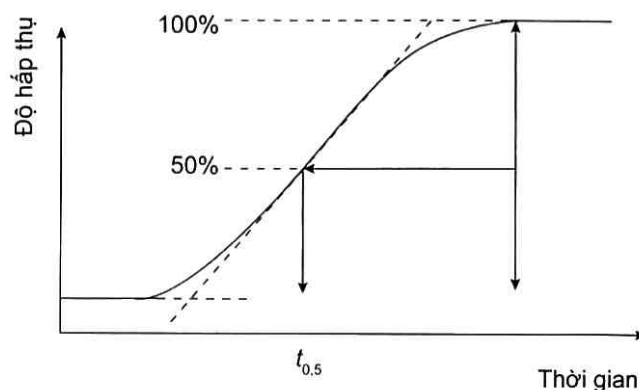
$$D = t_D \times F$$

Trong đó:

$$t_D = t_{0,5} - 0,5t_G \text{ (min);}$$

t_G là thời gian gradient đã xác định trước (= 20 min);

F là tốc độ dòng (ml/min).



Hình 5.4

Ghi chú: Với hệ thống có tiêm mẫu tự động, thể tích lưu trú bao gồm cả thể tích vòng tiêm mẫu.

Hệ số đối xứng (A_s)

Hệ số đối xứng của một pic (Hình 5.5) được tính theo công thức sau:

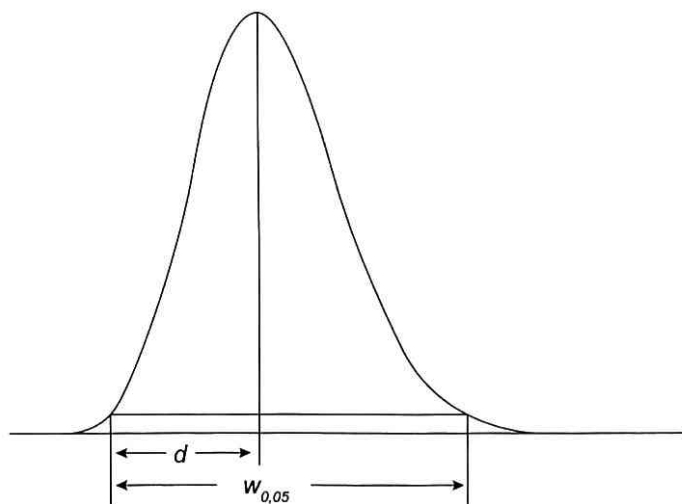
$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \times d}$$

Trong đó:

$w_{0,05}$ là chiều rộng của pic ở 1/20 chiều cao của pic;

d là khoảng cách tính từ đường thẳng đứng đi qua đỉnh pic đến cạnh phía trước của pic ở 1/20 chiều cao của pic.

Khi $A_s = 1,0$ thì pic hoàn toàn đối xứng. Khi $A_s > 1,0$ thì pic bị kéo đuôi. Khi $A_s < 1,0$ thì pic bị doãng về phía trước.



Hình 5.5

Độ phân giải (R_s)

Độ phân giải (R_s) giữa hai pic của hai chất (Hình 5.1) được tính theo công thức sau:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Trong đó:

$$t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} , t_{R2} là thời gian lưu của các pic tương ứng;

w_{h1} , w_{h2} là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic.

Trong kỹ thuật sắc ký trên mặt phẳng, phương pháp định lượng bằng đo mật độ, khoảng cách di chuyển được dùng thay cho thời gian lưu và độ phân giải giữa các pic của 2 chất có thể được tính theo công thức sau:

$$R_s = \frac{1,18 \times a \times (R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Trong đó:

$$R_{F2} > R_{F1}$$

R_{F1} , R_{F2} là thừa số chậm của các pic tương ứng;

w_{h1} , w_{h2} là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic;

a là khoảng cách di chuyển của tuyến dung môi.

Tỷ số đỉnh - hõm (p/v)

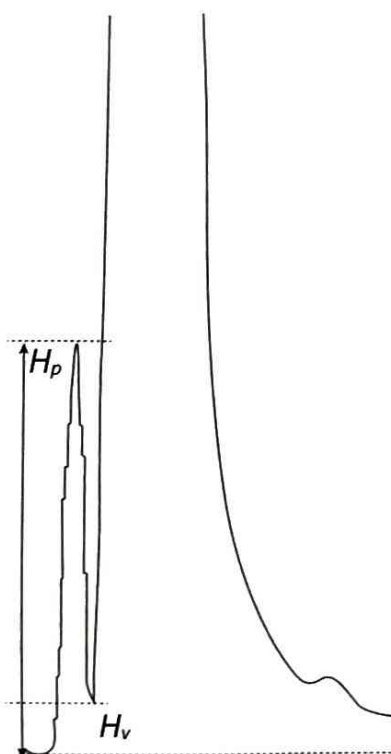
Tỷ số đỉnh - hõm (p/v) có thể được dùng như một thông số về tính phù hợp của hệ thống trong phép thử các tạp chất liên quan khi hai pic không được tách đến đường nền (Hình 5.6).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

Trong đó:

H_p là chiều cao của đỉnh pic nhỏ so với đường nền ngoại suy;

H_v là chiều cao của đáy hõm tách hai pic lớn và nhỏ so với đường nền ngoại suy.



Hình 5.6

Độ lưu giữ tương đối (r)

Độ lưu giữ tương đối (r) có thể ước lượng theo công thức sau:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

Trong đó:

t_{Ri} là thời gian lưu của pic chất được quan tâm;

t_{Rst} là thời gian lưu của pic chất đối chiếu (thường là pic tương ứng với chất cần thử);

t_M là thời gian chết.

Độ lưu giữ tương đối chưa hiệu chỉnh (r_G) được tính theo công thức:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Trừ khi có hướng dẫn khác, các giá trị độ lưu giữ tương đối cho trong các chuyên luận là độ lưu giữ tương đối chưa hiệu chỉnh.

Trong sắc ký trên mặt phẳng, các thừa số chậm R_{Fst} và R_{Fi} được dùng thay cho các thời gian lưu t_{Rst} và t_{Ri} .

Tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N)

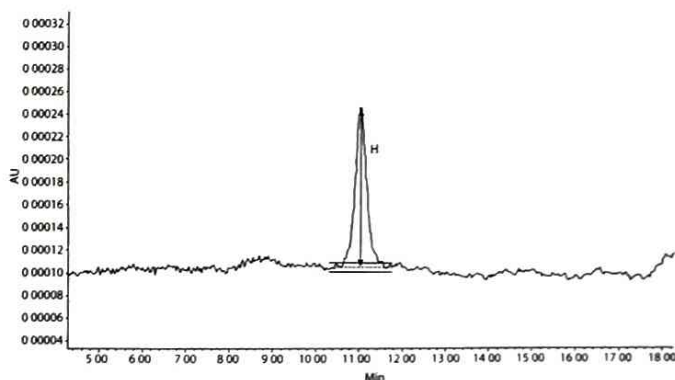
Nhiều có ảnh hưởng đến độ chụm và độ đúng của phép định lượng. Tỷ số tín hiệu trên nhiễu được tính theo công thức:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

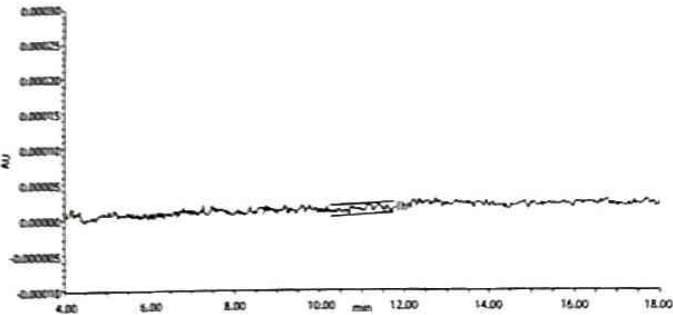
Trong đó:

H là chiều cao pic (Hình 5.7) tương ứng với chất được khảo sát trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch chất đối chiếu; chiều cao này đo từ đỉnh pic đến đường nền ngoại suy được xác định trên một khoảng bằng ít nhất 5 lần chiều rộng của pic ở nửa chiều cao pic;

h là khoảng dao động (Hình 5.8) của nhiễu đường nền trên sắc ký đồ thu được sau khi tiêm một mẫu trắng; khoảng dao động này được xác định trên một quãng đường bằng ít nhất 5 lần chiều rộng của pic ở nửa chiều cao pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu và nếu có thể thì quãng đường này phân bố đều hai bên vị trí nơi pic xuất hiện.



Hình 5.7 - Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu



Hình 5.8 - Sắc ký đồ dung dịch mẫu trắng

Độ lặp lại của hệ thống

Độ lặp lại của đáp ứng được biểu thị dưới dạng phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của một dãy kết quả của ít nhất 3 lần tiêm hoặc nạp liên tiếp dung dịch chất đối chiếu, và được tính theo công thức:

$$RSD (\%) = \frac{100}{\bar{y}} \times \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

trong đó:

y_i là các giá trị đơn lẻ dưới dạng diện tích pic, hay chiều cao pic, hoặc tỷ số các diện tích trong phương pháp nội chuẩn;

$\bar{y}$ là trung bình của các giá trị đơn lẻ;

n là số các giá trị đơn lẻ.

TÍNH PHÙ HỢP CỦA HỆ THỐNG

Nội dung này chỉ dành cho sắc ký lỏng và sắc ký khí.

Các bộ phận khác nhau của thiết bị sắc ký cần phải được kiểm tra hiệu chỉnh để có thể đạt được hiệu năng theo yêu cầu khi tiến hành phép thử hay định lượng.

Các phép thử tính phù hợp của hệ thống là phần không thể thiếu của một quy trình phân tích và để đảm bảo hệ thống sắc ký có hiệu năng phù hợp. Số đĩa lý thuyết của cột, thừa số lưu giữ (hệ số phân bố khối lượng), độ lặp lại của hệ thống, tỷ số tín hiệu/nhiều, độ phân giải/tỷ số đỉnh-hõm và hệ số đối xứng là những thông số thường được dùng để đánh giá hiệu năng của hệ thống sắc ký.

Với trường hợp sắc ký phức tạp (như cho chế phẩm sinh học), khi có chỉ rõ trong chuyên luận riêng, tính phù hợp của hệ thống sắc ký có thể được đánh giá bằng cách so sánh dữ liệu trực quan.

Các yếu tố có thể ảnh hưởng đến đặc tính sắc ký bao gồm:

- Thành phần và nhiệt độ pha động, lực ion và pH của thành phần nước trong pha động.
- Tốc độ dòng, kích thước cột, nhiệt độ cột và áp suất.
- Các đặc tính của pha tĩnh bao gồm loại chất mang, kích thước lỗ xốp, cỡ hạt, kiểu các hạt, diện tích bề mặt riêng.
- Pha đảo và các biến đổi bề mặt khác của pha tĩnh, mức độ biến đổi hoá học của pha tĩnh (được biểu thị bởi end-capping, carbon loading, v.v...).

Các giá trị thời gian lưu và độ lưu giữ tương đối nêu ra trong chuyên luận riêng chỉ với mục đích cung cấp thông tin, trừ

khi có chỉ dẫn khác. Không có giới hạn chấp nhận áp dụng cho độ lưu giữ tương đối (thời gian lưu giữ tương đối).

Việc tuân thủ các tiêu chí về tính phù hợp của hệ thống là bắt buộc trong suốt quy trình sắc ký. Không có phân tích mẫu nào được chấp nhận khi tính phù hợp của hệ thống chưa được chứng minh.

Các yêu cầu sau đây phải được đáp ứng cùng với các yêu cầu khác được chỉ ra trong chuyên luận riêng. Khi có yêu cầu cụ thể về tính phù hợp của hệ thống được nêu trong chuyên luận riêng, chúng sẽ thay thế các yêu cầu tương ứng được đề cập trong Phụ lục này.

Độ lặp lại của hệ thống

Độ lặp lại của hệ thống áp dụng cho trường hợp định lượng được chất hoặc tá dược:

Dạng hợp chất tinh khiết với giá trị xác định là 100 %, nếu không có yêu cầu nào đặc biệt, độ lệch chuẩn tối đa được phép ($RSD(\%)_{max}$) cho các lần tiêm lặp lại của dung dịch đối chiếu được tính theo công thức sau:

$$RSD (\%)_{max} = \frac{K \times B \times \sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

Trong đó:

K là một hằng số ($= 0,349$) thu được từ biểu thức:

$$K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$$

$\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ là biểu thị độ lệch chuẩn tương đối yêu cầu cho 6 lần tiêm với $B = 1,0$;

B là giới hạn trên được cho trong chuyên luận riêng trừ đi 100 %;

n là số lần tiêm lặp lại dung dịch đối chiếu ($3 \leq n \leq 6$);

$t_{90\%,n-1}$ là giá trị t-Student ở mức xác suất 90 % (hai phía) với bậc tự do $n - 1$.

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, $RSD(\%)_{max}$ không được vượt quá giá trị tương ứng ghi trong Bảng 5.1. Yêu cầu này không áp dụng cho phép thử các tạp chất liên quan.

Bảng 5.1 - Yêu cầu về độ lặp lại

B (%)	Số lần tiêm lặp lại (n)			
	3	4	5	6
Độ lệch chuẩn tương đối được phép tối đa (%)				
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Độ nhạy của hệ thống

Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu được sử dụng để xác định độ nhạy của hệ thống. Giới hạn định lượng (tương ứng với tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu bằng 10) phải bằng hoặc nhỏ hơn ngưỡng báo cáo.

Để xác định tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu, tiêm dung dịch chất cần kiểm tra ở nồng độ tương ứng với ngưỡng báo cáo (ví dụ: 0,05 %). Hoặc, trường hợp định lượng tạp chất không

xác định, sử dụng dung dịch đối chiếu dùng cho định lượng tạp (ví dụ: dung dịch 0,10 % của nồng độ dung dịch thử) và ngoại suy đáp ứng của pic ở ngưỡng báo cáo (ví dụ: một nửa diện tích pic của dung dịch đối chiếu 0,10 %).

Hệ số đối xứng

Yêu cầu hệ số đối xứng của pic chính trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu phải trong khoảng từ 0,8 đến 1,8, trừ khi có chỉ dẫn khác đối với các pic định lượng.

ĐIỀU CHỈNH CÁC ĐIỀU KIỆN SẮC KÝ

Các điều kiện sắc ký được mô tả trong chuyên luận đều đã được thẩm định khi xây dựng chuyên luận. Dưới đây liệt kê các thông số sắc ký và mức độ có thể điều chỉnh mà không làm thay đổi căn bản quy trình phân tích trong dược điển. Những thay đổi khác với những điểm đã được quy định yêu cầu phải thẩm định lại phương pháp.

Điều chỉnh nhiều thông số có thể gây tác động tích lũy đến hiệu năng của hệ thống và người dùng phải đánh giá đúng tình trạng này. Điều này đặc biệt quan trọng trong các trường hợp đã có thông tin rõ ràng, cụ thể về đặc điểm phân tách của mẫu. Trong những trường hợp đó, cần tiến hành đánh giá nguy cơ.

Mọi điều chỉnh phải được thực hiện trên cơ sở là quy trình được điển.

Nếu có điều chỉnh quy trình được điển, có thể phải tiến hành thêm đánh giá tính phù hợp. Để đánh giá tính phù hợp của quy trình đã điều chỉnh, cần đánh giá các đặc tính phân tích liên quan có nguy cơ bị tác động bởi sự thay đổi. Khi quy trình phân tích đã được điều chỉnh theo các yêu cầu nêu dưới đây thì không được phép điều chỉnh thêm nếu không thẩm định lại phù hợp.

Khi đánh giá tính phù hợp của quy trình đã điều chỉnh, phải tuân thủ các yêu cầu về độ phù hợp hệ thống của phép thử hoặc phép định lượng đã đặt ra.

Việc điều chỉnh các điều kiện rửa giải gradient (HPLC) hoặc chương trình nhiệt độ (GC) thì khắt khe hơn so với rửa giải đẳng dòng (HPLC) hoặc đẳng nhiệt (GC), vì nó có thể dẫn tới sự chuyển dịch các pic đến một giai đoạn khác của quá trình gradient hoặc ở nhiệt độ rửa giải khác, điều này có khả năng gây ra sự chồng rửa giải một phần hoặc hoàn toàn của các pic liên kề hoặc sự đảo ngược pic, dẫn đến việc xác định không đúng vị trí các pic, làm che lấp pic hoặc làm chuyển dịch pic khiến quá trình rửa giải các chất xảy ra ngoài khung thời gian đã định.

Đối với một số thông số, việc điều chỉnh được xác định rõ ràng trong chuyên luận để đảm bảo tính phù hợp của hệ thống.

Sắc ký lớp mỏng

Thành phần của pha động: các thành phần dung môi nhỏ có thể điều chỉnh $\pm 30\%$ tương đối hay $\pm 2\%$ tuyệt đối so với tỷ lệ ban đầu tùy theo khoảng giá trị nào lớn hơn; không thành phần dung môi nào được thay đổi tỷ lệ lớn hơn 10 % tuyệt đối. Thành phần dung môi nhỏ là thành phần chiếm

tỷ lệ trong pha động nhỏ hơn hoặc bằng $(100/n)\%$ trong đó n là tổng số loại dung môi có trong pha động.

Ví dụ một dung môi thành phần nhỏ chiếm 10 % pha động thì thay đổi 30 % tương đối nghĩa là sau khi thay đổi tỷ lệ chiếm được phép trong khoảng 7 - 13 % pha động, trong khi 2 % tuyệt đối nghĩa là sau khi thay đổi tỷ lệ chiếm phải trong khoảng 8 - 12 % pha động; như vậy, khoảng theo tỷ lệ tương đối lớn hơn. Nếu thành phần dung môi nhỏ là 5 % thì thay đổi 30 % tương đối nghĩa là trong khoảng 3,5 - 6,5 % và thay đổi 2 % tuyệt đối nghĩa là trong khoảng 3 - 7 %, trong trường hợp này khoảng theo tỷ lệ tuyệt đối lớn hơn.

pH của thành phần nước trong pha động: Chỉ điều chỉnh thay đổi $\pm 0,2$ đơn vị pH trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động được thay đổi $\pm 10\%$.

Thể tích mẫu chấm sắc ký điều chỉnh trong khoảng 10 % đến 20 % của thể tích quy định nếu sử dụng bản mỏng cỡ hạt nhỏ (2 μm đến 10 μm).

Sắc ký lỏng rửa giải đẳng dòng

Thông số cột và tốc độ dòng

Pha tĩnh: Không thay đổi bản chất của nhóm thể trong pha tĩnh (ví dụ không thay C18 bằng C8); các đặc tính hóa lý khác của pha tĩnh (như chất mang, sự biến đổi bề mặt và mức độ biến đổi hóa học) phải tương tự nhau; được phép thay đổi từ cột hạt xốp hoàn toàn (TPP) sang cột hạt xốp bề mặt (SPP) miễn là đáp ứng được các yêu cầu nêu trên.

Chiều dài cột và kích thước hạt: kích thước hạt và/hoặc chiều dài của cột có thể thay đổi miễn là tỷ lệ giữa chiều dài cột (L) và kích thước hạt (dp) không đổi hoặc trong khoảng từ -25 % đến +50 % của tỷ lệ L/dp của cột chỉ ra ban đầu trong chuyên luận. Để áp dụng điều chỉnh kích thước hạt từ cột hạt xốp hoàn toàn đến cột hạt xốp bề mặt, có thể sử dụng các kết hợp khác của L và dp với điều kiện là số đĩa lý thuyết (N) nằm trong khoảng từ -25 % đến +50 % so với cột quy định.

Những thay đổi này có thể chấp nhận được miễn là các yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống được đáp ứng và độ chọn lọc cũng như thứ tự rửa giải của các tạp xác định cần kiểm soát được chứng minh là tương đương.

Đường kính trong: Đường kính trong của cột có thể được điều chỉnh ngay cả khi không có sự thay đổi về kích thước hạt và/hoặc chiều dài của cột.

Cần chú ý khi việc điều chỉnh dẫn đến thể tích pic nhỏ hơn, do kích thước hạt nhỏ hơn hoặc đường kính trong nhỏ hơn, tình huống này cần điều chỉnh để giảm thiểu sự mở rộng dải ngoài cột bởi các yếu tố như kết nối thiết bị, thể tích buồng đo mẫu và tốc độ bơm mẫu, thể tích tiêm.

Khi kích thước hạt thay đổi, cần điều chỉnh tốc độ dòng, vì các cột có hạt nhỏ hơn sẽ yêu cầu vận tốc tuyến tính cao hơn để có cùng hiệu suất (chiều cao đĩa lý thuyết giảm). Khi đường kính cột và kích thước hạt thay đổi, tốc độ dòng được điều chỉnh theo công thức sau:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

Trong đó:

F_1 là tốc độ dòng được chỉ ra trong chuyên luận, tính theo ml/min.

F_2 là tốc độ dòng hiệu chỉnh, tính theo ml/min.

dc_1 là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dc_2 là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

dp_1 là kích thước hạt của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dp_2 là kích thước hạt của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Khi thay đổi từ các hạt $\geq 3 \mu\text{m}$ thành hạt $< 3 \mu\text{m}$ trong rửa giải đẳng dòng, có thể tăng tốc độ dòng với điều kiện là hiệu suất của cột không giảm quá 20 %. Tương tự, khi thay đổi từ các hạt $< 3 \mu\text{m}$ thành hạt $\geq 3 \mu\text{m}$, giảm tốc độ dòng để tránh giảm hiệu suất của cột hơn 20 %.

Sau khi điều chỉnh do thay đổi chiều dài cột, kích thước hạt và đường kính trong cột, tốc độ dòng có thể thay đổi thêm tối đa $\pm 50 \%$.

Nhiệt độ cột: $\pm 10^\circ\text{C}$ khi có quy định nhiệt độ tiến hành sắc ký, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Có thể cần phải điều chỉnh thêm các điều kiện của quy trình phân tích (pha động, nhiệt độ, pH,...) trong phạm vi cho phép được mô tả trong phần Tính phù hợp của hệ thống và Điều chỉnh các điều kiện sắc ký trong Phụ lục này.

Pha động

Thành phần pha động: Lượng thành phần dung môi nhỏ có thể điều chỉnh $\pm 30 \%$ tương đối (xem ví dụ trong phần Sắc ký lớp mỏng); không thành phần dung môi nào được thay đổi lớn hơn 10 % tuyệt đối.

pH của thành phần nước trong pha động: $\pm 0,2$ đơn vị pH trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động: $\pm 10 \%$.

Tốc độ dòng: $\pm 50 \%$ khi chiều dài cột, kích thước hạt và đường kính trong cột không thay đổi.

Bước sóng của detector: Không được điều chỉnh.

Thể tích tiêm

Khi chiều dài cột và đường kính trong cột thay đổi, có thể sử dụng công thức sau để điều chỉnh thể tích tiêm:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

Trong đó:

V_{inj1} là thể tích tiêm được chỉ ra trong chuyên luận, tính theo μl .

V_{inj2} là thể tích tiêm hiệu chỉnh, tính theo μl .

L_1 là chiều dài cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

L_2 là chiều dài cột được sử dụng, tính bằng mm.

dc_1 là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dc_2 là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Công thức này không thể áp dụng khi thay đổi từ cột hạt xốp hoàn toàn (TPP) sang cột hạt xốp bề mặt (SPP).

Ngay cả khi không có bất kỳ thay đổi nào về thông số cột, thể tích tiêm vẫn có thể thay đổi miễn là các tiêu chí về Tính phù hợp của hệ thống vẫn đảm bảo trong giới hạn chấp nhận đã được thiết lập. Khi giảm thể tích tiêm, cần đặc biệt chú ý đến (giới hạn) phát hiện và độ lặp lại đáp ứng của pic cần xác định. Được phép tăng thể tích tiêm miễn là độ tuyến tính và độ phân giải của các pic cần xác định vẫn đạt yêu cầu.

Sắc ký lỏng rửa giải gradient

Việc điều chỉnh các điều kiện cho hệ thống sắc ký rửa giải gradient đòi hỏi thận trọng hơn so với hệ thống sắc ký đẳng dòng.

Thông số cột và tốc độ dòng

Pha tĩnh: Không thay đổi bản chất của nhóm thể trong pha tĩnh (ví dụ không thay C18 bằng C8); các đặc tính hóa lý khác của pha tĩnh (chất mang, biến đổi bề mặt và mức độ biến đổi hóa học) phải tương tự nhau; được phép thay đổi từ cột hạt xốp hoàn toàn (TPP) sang cột hạt xốp bề mặt (SPP) miễn là đáp ứng được các yêu cầu nêu trên.

Chiều dài cột và kích thước hạt: kích thước hạt và/hoặc chiều dài của cột có thể thay đổi miễn là tỷ lệ giữa chiều dài cột (L) và kích thước hạt (dp) không đổi hoặc trong khoảng từ -25% đến $+50 \%$ của tỷ lệ L/dp của cột chỉ ra trong chuyên luận. Để áp dụng điều chỉnh kích thước hạt từ cột hạt xốp hoàn toàn thành hạt xốp bề mặt, có thể kết hợp L và dp miễn là tỷ lệ $(t_R/W_h)^2$ nằm trong khoảng -25% đến $+50 \%$ so với cột chỉ ra trong chuyên luận, đối với tất cả các pic được sử dụng để xác định thông số phù hợp của hệ thống.

Những thay đổi này có thể chấp nhận được miễn là các yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống được đáp ứng và độ chọn lọc cũng như thứ tự rửa giải của các tạp xác định cần kiểm soát được chứng minh là tương đương.

Đường kính trong: Đường kính trong của cột có thể được điều chỉnh ngay cả khi không có sự thay đổi về kích thước hạt và/hoặc chiều dài của cột.

Cần chú ý khi việc điều chỉnh dẫn đến thể tích pic nhỏ hơn, do kích thước hạt nhỏ hơn hoặc đường kính trong nhỏ hơn, tình huống này cần điều chỉnh để giảm thiểu sự mở rộng dải ngoài cột bởi các yếu tố như kết nối thiết bị, thể tích buồng đo mẫu và tốc độ bơm mẫu và thể tích tiêm.

Khi kích thước hạt thay đổi, cần điều chỉnh tốc độ dòng, vì các cột có hạt nhỏ hơn sẽ yêu cầu vận tốc tuyến tính cao hơn để có cùng hiệu suất (chiều cao đĩa lý thuyết giảm). Khi đường kính cột và kích thước hạt thay đổi, tốc độ dòng được điều chỉnh theo công thức sau:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

Trong đó:

F_1 là tốc độ dòng được chỉ ra trong chuyên luận, tính theo ml/min.

F_2 là tốc độ dòng hiệu chỉnh, tính theo ml/min.

dc_1 là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dc_2 là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

dp_1 là kích thước hạt của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dp_2 là kích thước hạt của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Sự thay đổi về kích thước cột (chiều dài cột, kích thước hạt, đường kính trong) dẫn tới thay đổi về thể tích cột, tác động đến thể tích gradient là yếu tố kiểm soát độ chọn lọc. Gradient dung môi được điều chỉnh theo thể tích cột bằng cách thay đổi thể tích gradient sao cho tỷ lệ với thể tích cột. Điều này áp dụng cho mọi giai đoạn gradient. Vì thể tích gradient là thời gian gradient (t_G) nhân với tốc độ dòng (F), thời gian gradient cho từng đoạn gradient cần được điều chỉnh để duy trì tỷ lệ cố định giữa thể tích gradient và thể tích cột (được biểu thị bằng $L \times dc^2$). Do đó, thời gian gradient mới (t_{G2}) có thể được tính toán từ thời gian gradient ban đầu (t_{G1}), tốc độ dòng chảy và thông số cột theo công thức sau:

$$t_{G2} = t_{G1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

Tóm lại, sự thay đổi các điều kiện rửa giải gradient yêu cầu 3 bước:

- (1) Điều chỉnh chiều dài cột và kích thước hạt theo L/dp ;
- (2) Điều chỉnh tốc độ dòng cho các thay đổi về kích thước hạt và đường kính cột; và
- (3) Điều chỉnh thời gian gradient của từng giai đoạn cho các thay đổi về chiều dài cột, đường kính và tốc độ dòng. Ví dụ sau đây minh họa điều chỉnh các điều kiện sắc ký lỏng rửa giải gradient:

Thông số	Giá trị ban đầu	Giá trị sau khi thay đổi	Ghi chú
Chiều dài cột (L) (mm)	150	100	
Đường kính cột (dc) (mm)	4,6	2,1	
Kích thước hạt (dp) (μm)	5	3	
L/dp	30,0	33,3	(1)
Tốc độ dòng (F) (ml/min)	2,0	0,7	(2)
Hệ số điều chỉnh gradient (t_{G2}/t_{G1})		0,4	(3)

Thông số	Giá trị ban đầu	Giá trị sau khi thay đổi	Ghi chú
Điều kiện gradient			
B (%)	Thời gian (min)	Thời gian (min)	
30	0	0	
30	3	$(3 \times 0,4) = 1,2$	
70	13	$[1,2 + (10 \times 0,4)] = 5,2$	
30	16	$[5,2 + (3 \times 0,4)] = 6,4$	

(1) L/dp tăng 11 % nằm trong khoảng -25 % đến +50 %;

(2) Dùng công thức $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$;

(3) Dùng công thức $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$.

Nhiệt độ cột: $\pm 5^\circ\text{C}$ khi có quy định nhiệt độ tiến hành sắc ký, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Có thể cần điều chỉnh thêm các điều kiện của quy trình phân tích (pha động, nhiệt độ, pH...) trong phạm vi cho phép được mô tả trong phần Tính phù hợp của hệ thống và Điều chỉnh các điều kiện sắc ký trong Phụ lục này.

Pha động

Thành phần pha động/gradient: Việc điều chỉnh thành phần của pha động và gradient có thể được chấp nhận với điều kiện:

- Đáp ứng được tiêu chí về tính phù hợp của hệ thống.
- Thời gian lưu của các pic chính nằm trong khoảng $\pm 15\%$ so với thời gian lưu thu được ở điều kiện ban đầu. Yêu cầu này không áp dụng khi thay đổi chiều dài cột, kích thước hạt và đường kính trong cột.
- Thành phần của pha động và gradient đảm bảo có sự lưu giữ nhất định các pic ra sớm và rửa giải hoàn toàn các pic ra muộn.

pH của thành phần nước trong pha động: $\pm 0,2$ đơn vị pH trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động: $\pm 10\%$.

Khi không thể đạt được tính phù hợp của hệ thống, tốt hơn nên cân nhắc về thể tích lưu trú hoặc thay đổi cột.

Thể tích lưu trú

Cấu hình của các thiết bị sử dụng có thể làm thay đổi đáng kể đến độ phân giải, thời gian lưu và thời gian lưu tương đối được quy định. Nếu điều này xảy ra, có thể là do thay đổi thể tích lưu trú. Các chuyên luận thường đưa vào một giai đoạn đẳng dòng trước khi bắt đầu chương trình gradient để có thể điều chỉnh thời điểm gradient phù hợp; điều này giúp loại bỏ sự khác nhau giữa thể tích lưu trú của hệ thống thiết bị được sử dụng khi phát triển phương pháp và hệ thống đang sử dụng thực tế. Người dùng có trách nhiệm điều chỉnh khoảng thời gian của giai đoạn đẳng dòng cho phù hợp với thiết bị phân tích sử dụng. Nếu có thông tin về thể tích lưu trú được sử dụng trong quá trình xây dựng chuyên luận, thì các điểm thời gian ($t - \text{min}$) được nêu trong bảng gradient có thể được thay thế bằng các điểm thời gian điều chỉnh ($t_c - \text{min}$), được tính theo phương trình sau:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

Trong đó:

D: thể tích lưu trữ (ml).

D₀: thể tích lưu trữ đã dùng khi phát triển phương pháp ban đầu (ml).

F: tốc độ dòng (ml/min).

Giai đoạn đẳng dòng bổ sung cho mục đích trên đây có thể bỏ qua nếu các số liệu thăm định để áp dụng phương pháp không có giai đoạn này.

Bước sóng của detector: Không được điều chỉnh.

Thể tích tiêm

Khi thay đổi chiều dài cột và đường kính trong cột, có thể sử dụng công thức sau để điều chỉnh thể tích tiêm:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

Trong đó:

V_{inj1} là thể tích tiêm được chỉ ra trong chuyên luận, tính theo µl.

V_{inj2} là thể tích tiêm hiệu chỉnh, tính theo µl.

L₁ là chiều dài cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

L₂ là chiều dài cột được sử dụng, tính bằng mm.

dc₁ là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm.

dc₂ là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Công thức này không thể áp dụng khi thay đổi từ cột hạt xếp hoàn toàn (TPP) sang cột hạt xếp bề mặt (SPP).

Ngay cả khi không có bất kỳ thay đổi nào về thông số cột, thể tích tiêm vẫn có thể thay đổi miễn là các tiêu chí về Tính phù hợp của hệ thống vẫn đảm bảo trong giới hạn chấp nhận được đã thiết lập. Khi giảm thể tích tiêm, cần đặc biệt chú ý đến (giới hạn) phát hiện và độ lặp lại đáp ứng của pic cần xác định. Được phép tăng thể tích tiêm miễn là độ tuyến tính và độ phân giải của các pic cần xác định vẫn đạt yêu cầu.

Sắc ký khí

Các thông số về cột

Pha tĩnh:

Kích thước hạt có thể giảm tối đa 50 %; không được phép tăng lên (cột nhồi);

Bề dày lớp phim: từ -50 % đến +100 % (cột mao quản).

Kích thước cột:

Chiều dài: từ -70 % đến +100 %

Đường kính trong: ± 50 %.

Nhiệt độ cột: ± 10 %.

Chương trình nhiệt độ: Cho phép điều chỉnh nhiệt độ như đã nêu ở trên; cho phép điều chỉnh tốc độ gia nhiệt và thời gian duy trì nhiệt độ lên tới ± 20 %.

Tốc độ dòng: ± 50 %.

Thể tích tiêm và tỷ lệ chia dòng: Có thể thay đổi với điều kiện tính phù hợp của hệ thống vẫn nằm trong giới hạn

chấp nhận đã thiết lập. Khi thể tích tiêm giảm hoặc tỷ lệ chia dòng tăng lên, cần đặc biệt chú ý đến (giới hạn) phát hiện và độ lặp lại của (các) đáp ứng pic. Cho phép tăng thể tích tiêm hoặc giảm tỷ lệ chia dòng với điều kiện là độ tuyến tính và độ phân giải của (các) pic vẫn thỏa mãn.

Nhiệt độ buồng tiêm và nhiệt độ đường dẫn trong điều kiện head-space: ± 10 °C, miễn là không xảy ra hiện tượng phân hủy hoặc ngưng tụ.

ĐỊNH LƯỢNG

Phương pháp chuẩn ngoại

Sử dụng đường chuẩn: Chuẩn bị các dung dịch đối chiếu trong khoảng nồng độ đã được chứng minh là tuyến tính và tiến hành tiêm một thể tích cố định các dung dịch đối chiếu này. Dựa vào sắc ký đồ thu được, vẽ đường chuẩn xác định mối tương quan giữa diện tích pic hoặc chiều cao pic thu được (trục tung) và lượng (nồng độ, khối lượng, v.v...) của chất đối chiếu (trục hoành). Phương trình của đường chuẩn thường được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính.

Sau đó, chuẩn bị dung dịch thử theo quy trình trong chuyên luận riêng. Tiến hành sắc ký dung dịch thử trong cùng điều kiện với các dung dịch đối chiếu để chuẩn bị đường chuẩn. Từ diện tích pic hoặc chiều cao pic của chất cần phân tích, xác định hàm lượng chất cần phân tích trong dung dịch thử bằng phương trình đường chuẩn đã xây dựng.

Sử dụng điểm chuẩn: Trong chuyên luận riêng, chuẩn bị một dung dịch đối chiếu có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp và dung dịch thử có nồng độ chất cần phân tích gần với nồng độ của dung dịch đối chiếu. Tiến hành sắc ký trong các điều kiện đã nêu trong chuyên luận, tính lượng chất cần phân tích dựa vào các đáp ứng pic thu được. Trong phương pháp này, tất cả các quy trình, chẳng hạn như quy trình tiêm, phải thực hiện trong các điều kiện không đổi.

Phương pháp chuẩn nội

Sử dụng đường chuẩn: Trong phương pháp chuẩn nội, chất chuẩn nội là chất ổn định có thời gian lưu gần với thời gian lưu của chất phân tích và pic chuẩn nội tách biệt rõ ràng với tất cả các pic khác trong sắc ký đồ.

Chuẩn bị các dung dịch đối chiếu có chứa một lượng chất chuẩn nội cố định và các lượng khác nhau của chất chuẩn của chất cần phân tích. Dựa vào sắc ký đồ thu được khi tiêm một thể tích cố định các dung dịch đối chiếu, tính tỷ lệ giữa diện tích pic hoặc chiều cao pic của chất chuẩn với chất chuẩn nội.

Xây dựng đường chuẩn xác định mối tương quan giữa tỷ lệ diện tích hoặc chiều cao pic này (trục tung) so với lượng chất chuẩn (hoặc tỷ lệ giữa lượng chất chuẩn/lượng chất chuẩn nội) (trục hoành). Phương trình của đường chuẩn thường được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính.

Chuẩn bị dung dịch thử theo quy trình trong chuyên luận riêng, có chứa cùng lượng chất chuẩn nội như trong dung dịch đối chiếu đã dùng để xây dựng đường chuẩn.

Tiến hành sắc ký dung dịch thử trong điều kiện như dung dịch đối chiếu. Từ tỷ lệ diện tích pic hoặc chiều cao pic của chất cần phân tích so với chất chuẩn nội, xác định hàm lượng chất cần phân tích trong dung dịch thử bằng phương trình đường chuẩn đã xây dựng.

Sử dụng điểm chuẩn: Trong chuyên luận riêng, chuẩn bị một dung dịch đối chiếu có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp và dung dịch thử có nồng độ chất cần phân tích gần với nồng độ của dung dịch đối chiếu (cả hai đều chứa một lượng cố định chất chuẩn nội). Tiến hành sắc ký trong các điều kiện đã nêu trong chuyên luận, tính lượng chất cần phân tích bằng cách so sánh các tỷ lệ thu được.

Phương pháp chuẩn hóa

Trong trường hợp đã chứng minh được tính tuyến tính của các pic, các chuyên luận riêng có thể quy định hàm lượng phần trăm của chất cần phân tích được tính bằng cách xác định diện tích của pic tương ứng theo tỷ lệ phần trăm trên tổng diện tích tất cả các pic, ngoại trừ những pic do dung môi hoặc thuốc thử, pic của pha động hoặc nền mẫu và những pic nhỏ hơn hoặc bằng ngưỡng báo cáo.

CÁC VẤN ĐỀ KHÁC

Đáp ứng của detector

Độ nhạy của detector là tín hiệu đầu ra tính trên một đơn vị nồng độ hay một đơn vị khối lượng chất có trong pha động đi vào detector. Hệ số đáp ứng tương đối của detector, thường được gọi là hệ số đáp ứng, biểu thị độ nhạy của một detector đối với một chất khi so sánh với một chất khác. Hệ số hiệu chỉnh là nghịch đảo của hệ số đáp ứng. Trong các phép thử Tạp chất liên quan, phải sử dụng hệ số hiệu chỉnh nêu trong chuyên luận riêng để tính toán (khi hệ số đáp ứng nằm ngoài phạm vi 0,8 - 1,2).

Các pic gây nhiễu

Bỏ qua các pic do dung môi và thuốc thử hoặc phát sinh từ pha động hoặc nền mẫu.

Xác định pic

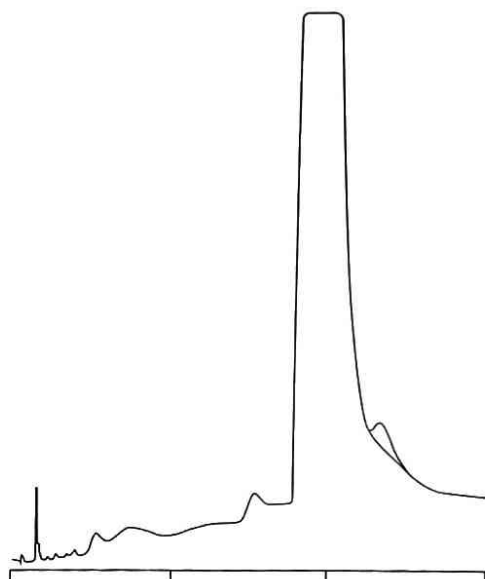
Việc lấy tích phân tính diện tích pic của bất kỳ tạp chất nào có pic không tách biệt hoàn toàn khỏi pic chính thường được thực hiện bằng phương pháp kẻ tiếp tuyến (tangential skim) (Hình 5.9).

Ngưỡng báo cáo

Khi phép thử Tạp chất liên quan quy định giới hạn về tổng tạp chất hoặc định lượng một tạp chất, điều quan trọng là phải chọn ngưỡng báo cáo thích hợp và chọn các điều kiện tích phân phù hợp để tính diện tích pic. Trong các phép thử như vậy, ngưỡng báo cáo thường là 0,05 %.

Tính phù hợp của hệ thống

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, độ lệch chuẩn tương đối tối đa cho phép đối với 6 lần tiêm lặp lại dung dịch đối chiếu không được quá 2,0 %. Yêu cầu này chỉ áp dụng cho phép thử Định lượng của các thuốc thành phẩm hóa được.



Hình 5.9

5.1 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ GIẤY

Phương pháp sắc ký giấy, cũng như phương pháp sắc ký lớp mỏng, được áp dụng trong kiểm nghiệm chất lượng thuốc để định tính, thử tinh khiết và đôi khi để bán định lượng và định lượng.

Sự tách các chất bằng phương pháp sắc ký giấy dựa chủ yếu trên sự khác nhau về hệ số phân bố của chúng giữa hai pha lỏng: Một pha tĩnh và một pha động. Pha tĩnh ở đây là nước có sẵn trong sợi cellulose của giấy, hoặc thành phần thân nước từ hỗn hợp dung môi của pha động được hút chọn lọc vào giấy. Pha động là một hệ dung môi thích hợp cho sự tách đã được quy định trong các chuyên luận. Mức độ di chuyển của một chất được đặc trưng bởi hệ số di chuyển (R_f) và tính bằng tỷ lệ giữa khoảng cách di chuyển của chất đó và khoảng cách di chuyển của dung môi:

$$R_f = a/b$$

Trong đó:

a là khoảng cách di chuyển của chất phân tích;

b là khoảng cách di chuyển của dung môi tính từ điểm chấm mẫu.

Giá trị R_f bao giờ cũng nhỏ hơn 1.

Trong trường hợp sắc ký liên tục không còn xác định được giới tuyến của dung môi, người ta dùng hệ số di chuyển R_r . R_r là tỷ số giữa khoảng cách di chuyển của chất phân tích và khoảng cách di chuyển của chất dùng làm chuẩn so sánh. Giá trị R_r có thể nhỏ hơn hay lớn hơn 1.

Cách tiến hành

Chuẩn bị bình sắc ký: Bình sắc ký là những bình thủy tinh hình trụ hoặc hình hộp dẹt, có kích thước thích hợp, có nắp đậy kín. Nắp có lỗ ở giữa để lắp bình gạn có khóa đựng dung môi. Trong bình có các giá đỡ máng đựng dung môi và treo giấy sắc ký được thiết kế thích hợp cho kiểu sắc ký đi lên hay sắc ký đi xuống.