

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

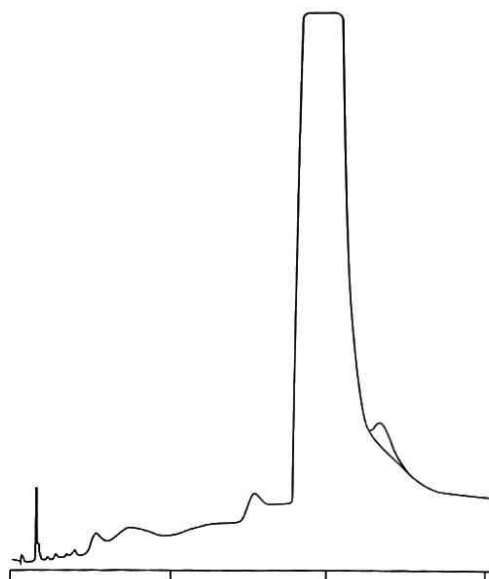
Việc lấy tích phân tính diện tích pic của bất kỳ tạp chất nào có pic không tách biệt hoàn toàn khỏi pic chính thường được thực hiện bằng phương pháp kẻ tiếp tuyến (tangential skim) (Hình 5.9).

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 gạt 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.

Chuẩn bị dung môi: Thành phần và tỷ lệ các dung môi được quy định trong các chuyên luận. Việc trộn các thành phần được tiến hành trong bình gạn, sau khi lắc đều, để yên. Nếu có tách lớp thì gạn lấy lớp pha thân nước, thường là lớp dưới, làm dung môi pha tĩnh để bão hòa giấy sắc ký sau khi đã chấm các chất phân tích, còn lớp trên dùng làm dung môi pha động. Nếu dung môi không tách lớp thì dùng chính dung môi đó để bão hòa giấy sắc ký.

Chuẩn bị giấy: Giấy sắc ký là loại giấy đặc biệt dành riêng cho sắc ký, có bề dày thích hợp. Tùy theo kích thước của bình và số lượng các vết cần chấm mà cắt những khổ giấy hình chữ nhật thích hợp, chiều dài dọc theo thớ giấy. Chiều rộng phải nhỏ hơn chiều dài của máng dung môi nhưng không được nhỏ hơn 2,5 cm. Bề dài phải tính sao cho khi treo giấy vào bình không được để đầu dưới chạm vào máng dung môi trong khi bão hòa dung môi. Trường hợp bình sắc ký có hình chuông úp thì giấy phải cuộn tròn và cố định bằng móc thủy tinh hoặc khâu bằng chỉ. Đường kính của cuộn giấy phải nhỏ hơn đường kính của đĩa để giấy nhằm tránh giấy chạm vào thành đĩa.

Chấm sắc ký: Kẻ một đường chỉ mảnh song song với mép giấy (đường vạch để chấm sắc ký) theo chiều rộng và cách mép giấy 3 cm đối với sắc ký đi lên để sao cho các vết chấm không bị ngập vào dung môi, 6 cm đối với sắc ký đi xuống để vạch chấm không trùng với đĩa thủy tinh đỡ giấy mà thấp hơn 2 cm khi đặt giấy treo vào máng ở phần trên của bình.

Dùng micropipet chia độ tới 0,001 ml đến 0,002 ml hoặc mao quản có dung tích xác định (2 μ l; 5 μ l; 10 μ l) để chấm các dung dịch chất cần sắc ký thành vết có đường kính không quá 8 mm. Muốn giữ đường kính của vết chấm nhỏ, phải chấm nhanh nhiều lần, đợi giọt trước khô mới chấm tiếp.

Lượng chấm và nồng độ dung dịch chất thử được quy định trong chuyên luận.

Khi chấm nhiều vết trên một dải giấy thì vết chấm nọ phải cách vết chấm kia ít nhất là 30 mm.

Triển khai sắc ký

Phương pháp sắc ký đi lên: Rót dung môi làm pha động vào máng dung môi để được một lớp dung môi cao 2,5 cm, và trong trường hợp pha tĩnh được chỉ định (là phần tách lớp phía dưới khi trộn hỗn hợp dung môi) thì rót pha tĩnh vào khe giữa máng dung môi và thành bình sắc ký. Đậy kín nắp bình, để yên trong 24 h ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C và duy trì ở nhiệt độ này trong quá trình tiếp theo. Sau đó treo giấy đã chuẩn bị vào bình, đậy nắp, để yên tiếp 90 min. Tiếp theo dùng tay vận ở ngoài bình để hạ tờ giấy sắc ký vào máng dung môi sao cho vạch chấm không ngập vào dung môi. Triển khai sắc ký đến một thời gian hoặc một khoảng cách quy định trong chuyên luận. Lấy giấy ra, đánh dấu ngay giới tuyến dung môi và để khô ngoài không khí hoặc làm khô bằng không khí nóng của máy quạt sấy. Phải chú ý tránh ánh sáng trong suốt quá trình triển khai. Làm hiện vết bằng cách phun thuốc thử màu thích hợp, hoặc soi dưới đèn tử ngoại theo quy định của chuyên luận. Tính giá trị R_f và đánh giá kết quả.

Phương pháp sắc ký đi xuống: Cũng tiến hành tương tự như sắc ký đi lên, chỉ khác các điểm sau đây:

Rót dung môi làm pha tĩnh vào đáy bình, tạo một lớp cao khoảng 2 cm; đặt giấy vào máng dung môi ở phần trên bình, dùng một đĩa thủy tinh để chèn giấy, gác đầu giấy treo qua đĩa thủy tinh để không cho giấy chạm vào mép máng và chạm vào thành bình. Sau thời gian để bão hòa bình và giấy theo quy định như trên, rót pha động vào máng đựng dung môi ở phía trên. Thường sắc ký đi xuống được áp dụng cho các hỗn hợp khó tách và phải chạy sắc ký liên tục nên phải tính kết quả theo R_r .

5.2 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ

Sắc ký khí là một phương pháp tách dựa trên sự phân bố khác nhau của các chất giữa hai pha không trộn lẫn vào nhau, trong đó pha động là chất khí (khí mang) đi qua pha tĩnh chứa trong cột. Sắc ký khí được áp dụng để tách những chất hoặc dẫn xuất của chúng mà có thể hóa hơi ở nhiệt độ phân tích. Phương pháp sắc ký khí dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố hoặc loại theo kích thước (dùng rây phân tử).

Thiết bị

Thiết bị gồm nguồn cung cấp khí, bộ phận tiêm mẫu, cột sắc ký chứa trong buồng ổn nhiệt, hệ thống phát hiện và ghi sắc đồ. Khí mang đi qua cột với tốc độ và áp suất có kiểm soát và đi qua detector. Nhiệt độ của cột hoặc được giữ ở một giá trị không đổi hoặc thay đổi theo một chương trình quy định trong chuyên luận riêng.

Sự đặc thù về thiết kế của máy sắc ký khí có thể yêu cầu phải thay đổi điều kiện sắc ký đã ghi trong chuyên luận riêng. Trong những trường hợp có thay đổi như thế, phải cho những kết quả tương tự. Nếu cần, điều chỉnh tốc độ dòng khí mang để cải thiện chất lượng sắc ký đồ hoặc để thay đổi thời gian lưu của các pic quan tâm.

Bộ phận tiêm mẫu

Tiêm mẫu trực tiếp: Là kiểu tiêm mẫu thường dùng trừ khi có chỉ dẫn khác. Có thể tiêm mẫu trực tiếp vào đầu cột bằng bơm tiêm (syringe) hoặc dùng van tiêm mẫu hoặc đưa vào buồng hóa hơi có thể có gắn thêm bộ chia dòng.

Tiêm pha hơi: Có thể thực hiện bằng hệ thống tiêm mẫu head-space tĩnh hay động.

Hệ thống tiêm mẫu head-space động (kỹ thuật bẫy và làm sạch): Bao gồm thiết bị nhúng chìm vào dung dịch cho các chất bay hơi bám vào cột hấp phụ ở nhiệt độ thấp. Các chất lưu giữ được giải hấp phụ vào pha động bằng cách làm nóng nhanh cột hấp phụ.

Hệ thống tiêm mẫu head-space tĩnh: Bao gồm buồng ổn nhiệt mẫu có kiểm soát nhiệt độ trong đó đặt lọ đựng mẫu chứa mẫu rắn hoặc lỏng trong thời gian cố định để cho các thành phần bay hơi đạt được trạng thái cân bằng giữa pha hơi và pha lỏng hoặc rắn. Sau khi đạt được trạng thái cân bằng, một lượng mẫu khí xác định trước được đưa vào máy sắc ký khí.