

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.

Pha tĩnh

Pha tĩnh chứa trong cột có thể là:

Cột mao quản làm bằng silica nung chảy, pha tĩnh phủ trên thành cột.

Cột nhồi chứa hạt chất mang, trơ tẩm pha tĩnh lỏng.

Cột nhồi chứa pha tĩnh rắn.

Cột mao quản có đường kính trong từ 0,1 mm đến 0,53 mm và dài từ 5 m đến 60 m. Pha tĩnh là một lớp phim bề dày từ 0,1 μ m đến 5,0 μ m có thể gắn kết về hóa học vào bề mặt bên trong.

Cột nhồi làm bằng thủy tinh hay kim loại, thông thường dài từ 1 m đến 3 m, đường kính trong từ 2 mm đến 4 mm. Pha tĩnh thường là chất polymer xốp hoặc chất mang rắn phủ pha tĩnh lỏng.

Trong phân tích các hợp chất phân cực ở cột nhồi với pha tĩnh có dung lượng thấp, tính phân cực thấp, chất mang phải trơ để tránh làm cho pic không đối xứng. Hoạt tính chất mang có thể được giảm đi bằng cách silan hóa trước khi phủ pha tĩnh lên. Thường dùng diatomit nung, rửa với acid. Các chất mang thường có các kích thước hạt khác nhau, thường sử dụng nhất các hạt từ 150 μ m đến 180 μ m và 125 μ m đến 150 μ m.

Pha động

Thời gian lưu và hiệu lực cột phụ thuộc vào tốc độ dòng khí mang: Thời gian lưu tỉ lệ thuận với chiều dài cột và độ phân giải tỉ lệ thuận với căn bậc hai chiều dài cột. Đối với cột nhồi, lưu lượng khí mang tính bằng ml/min ở áp suất khí quyển và nhiệt độ phòng. Lưu lượng đo ở đầu ra của detector bằng dụng cụ đo cơ học có chia độ hoặc ống đo tốc độ dòng dùng bột xà phòng ở nhiệt độ cột đang phân tích. Tốc độ dài của dòng khí mang đi qua cột nhồi tỉ lệ nghịch với căn bậc hai đường kính trong của cột ở một thể tích dòng xác định. Lưu lượng 60 ml/min trong cột đường kính trong 4 mm và lưu lượng 15 ml/min trong cột đường kính trong 2 mm cùng cho tốc độ dòng như nhau, do đó thời gian lưu tương đương nhau.

Thường dùng heli và nitrogen làm khí mang cho cột nhồi và nitrogen, heli và hydrogen cho cột mao quản.

Detector

Thường dùng detector ion hóa ngọn lửa, ngoài ra còn dùng detector dẫn nhiệt, nitrogen-phosphor (electron nhiệt hay nhiệt điện tử), cộng kết điện tử, phổ khối, phổ hồng ngoại FTIR và các loại detector khác tùy theo mục đích phân tích.

Các đại lượng đặc trưng cho quá trình sắc ký

Xem Phụ lục 5. Các kỹ thuật tách sắc ký.

Phương pháp tiến hành

Ôn định cột, buồng tiêm và detector ở nhiệt độ và tốc độ dòng khí mang quy định trong chuyên luận cho đến khi đường nền ổn định.

Chuẩn bị các dung dịch thử và đối chiếu theo quy định của chuyên luận. Các dung dịch phải không được có các tiểu phân rắn. Dùng dung dịch chuẩn để xác định các điều kiện đo phù hợp đặt trên thiết bị và thể tích dung dịch mẫu tiêm

cần dùng để tạo ra một đáp ứng phù hợp. Tiến hành các lần tiêm lặp lại để kiểm tra độ lặp lại của đáp ứng và kiểm tra số đĩa lý thuyết, nếu có yêu cầu.

Tiêm các dung dịch thử và ghi lại sắc ký đồ thu được. Tiến hành tiêm lại nhiều lần để kiểm tra độ lặp lại của đáp ứng. Xác định diện tích pic của các thành phần cần quan tâm khi không có chỉ dẫn khác. Cũng có thể xác định chiều cao của pic tương ứng với các thành phần chất cần quan tâm khi hệ số đối xứng từ 0,80 đến 1,20. Từ những giá trị thu được tính ra hàm lượng của một thành phần hay nhiều thành phần có trong mẫu đem thử.

Khi dùng một chất làm chuẩn nội, pic của chất này không được che phủ pic của mẫu thử. Nếu có pic bị ảnh hưởng cần phải có sự bổ chính thích hợp. Trong những áp dụng có yêu cầu chương trình nhiệt độ, phải tính kết quả theo diện tích pic.

Trừ những chỉ dẫn khác quy định trong chuyên luận riêng, dùng nitrogen làm khí mang và detector ion hóa ngọn lửa. Thỉnh thoảng cần tiến hành xác định bằng kỹ thuật tiêm on-column, trong đó mẫu được tiêm trực tiếp vào chất nhồi cột không sử dụng bộ phận nạp mẫu gia nhiệt. Khi mẫu thử là chất không bay hơi được tiêm vào cột, nên dùng tiền cột phù hợp, loại có thể thay đổi được.

Thuốc thử

Các thuốc thử và các dung môi sử dụng trong việc chuẩn bị các dung dịch khảo sát cần có chất lượng phù hợp cho phân tích trên sắc ký khí. Có rất nhiều chất hóa học được dùng làm pha tĩnh như các polyethylen glycol, các ester và các amid có phân tử lượng cao, các hydrocarbon, các silicon dạng gom hay dạng lỏng (polysiloxan đã được thế bằng nhóm methyl, phenyl, nitril, vinyl hoặc fluoroalkyl, hoặc hỗn hợp của chúng) và các vi hạt rỗng cấu tạo đa nhân thơm liên kết chéo. Pha tĩnh phù hợp khi nồng độ của nó, bản chất và bậc của chất mang rắn theo đúng quy định của chuyên luận riêng. Cột phải luyện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong đa số các trường hợp, tên thương mại của cột ghi trong chuyên luận là phù hợp cho mục đích phân tích nhưng có thể dùng cột có tên thương mại khác tương đương.

Chuẩn nội

Các thuốc thử được dùng làm chuẩn nội không được chứa bất kỳ tạp chất nào gây ra các pic có ảnh hưởng tới việc xác định các thành phần của mẫu thử đã mô tả trong chuyên luận riêng.

Chuẩn hóa

Trong một số trường hợp, cần tiến hành xác định bằng phương pháp quy về 100 % để đánh giá một hoặc nhiều thành phần hoặc các tạp chất liên quan. Trong những trường hợp này, tổng diện tích của một pic hay các pic của các thành phần hoặc các tạp chất liên quan được biểu thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với tổng diện tích của tất cả các pic thu được từ mẫu đem thử. Trong quá trình xác định, cần sử dụng bộ khuếch đại để mở rộng thang đo và bộ tính tích phân tự động.

Thế tích tiêm

Khi thế tích tiêm không quy định trong chuyên luận riêng, nên chọn một thế tích phù hợp để áp dụng. Chọn thế tích tiêm phụ thuộc vào đáp ứng của phép phân tích, detector sử dụng, hiệu lực cột và toàn bộ hiệu năng của hệ thống sắc ký. Khi không có chỉ dẫn, thường dùng thế tích tiêm là 1 μ l, tuy nhiên cần kiểm tra sự thích hợp trong điều kiện cụ thể.

Pic phụ (pic thứ cấp)

Có thể cần chất đối chiếu để xác định pic phụ. Pic phụ là một pic có trên sắc ký đồ nhưng không phải là pic chính hay pic chuẩn nội hoặc pic của dung môi và các thuốc thử tạo dẫn xuất.

Sắc ký khí head-space

Sắc ký khí head-space là phương pháp đặc biệt thích hợp để tách và xác định các chất bay hơi hiện diện trong mẫu rắn hay lỏng. Phương pháp dựa trên sự phân tích pha hơi sau khi đạt được trạng thái cân bằng với pha rắn hoặc pha lỏng.

Thiết bị

Máy sắc ký khí kết nối với bộ phận nạp mẫu tự động có thiết bị kiểm soát nhiệt độ và áp suất. Trong trường hợp cần thiết, có thể gắn thêm bộ phận đuổi dung môi.

Đưa mẫu vào lọ đựng mẫu có nắp đậy gắn với hệ thống van có thể cho phép khí mang đi qua. Đặt lọ đựng mẫu trong buồng ôn nhiệt ở nhiệt độ tùy theo bản chất của mẫu và duy trì nhiệt độ này trong thời gian sao cho đạt được trạng thái cân bằng giữa pha rắn hoặc lỏng và pha hơi.

Đưa khí mang vào lọ đựng mẫu và sau thời gian quy định, mở van tương ứng để khí khuếch tán vào cột sắc ký mang theo các chất bay hơi cần phân tích.

Nếu không có bộ phận nạp mẫu tự động, có thể dùng bơm tiêm (syringe) mẫu khí đưa mẫu trực tiếp vào cột sau khi đạt được trạng thái cân bằng trong buồng ôn nhiệt đặt riêng. Cần lưu ý tránh những yếu tố làm thay đổi trạng thái cân bằng.

Phương pháp tiến hành

Dùng các dung dịch đối chiếu để xác định tính thích hợp của cài đặt thiết bị để cho đáp ứng đạt yêu cầu.

Định lượng trực tiếp

Lần lượt cho mẫu thử và mẫu đối chiếu vào các lọ đựng mẫu đồng nhất như quy định trong chuyên luận riêng, tránh tiếp xúc giữa mẫu thử và thiết bị lấy mẫu. Đặt kín lọ và đặt trong buồng ôn nhiệt đã đặt nhiệt độ và áp suất như trong chuyên luận riêng. Sau khi đạt được trạng thái cân bằng, tiến hành sắc ký theo điều kiện quy định trong chuyên luận riêng.

Phương pháp thêm chuẩn

Lần lượt cho cùng một thể tích mẫu thử vào các lọ đựng mẫu đồng nhất. Thêm vào mỗi lọ một lượng thích hợp dung dịch đối chiếu của chất cần xác định có hàm lượng đã biết trước để có một dãy dung dịch có nồng độ tăng dần một cách đều đặn.

Đậy kín lọ và đặt trong buồng ôn nhiệt đã đặt nhiệt độ và áp suất như trong chuyên luận riêng. Sau khi đạt được trạng thái cân bằng, tiến hành sắc ký theo điều kiện quy định trong chuyên luận riêng.

Lập phương trình tuyến tính của đồ thị bằng phương pháp bình phương tối thiểu và tìm được từ đó nồng độ của chất cần xác định trong dung dịch. Theo một cách khác, vẽ đồ thị trung bình các nồng độ xác định được theo lượng dung dịch đối chiếu thêm vào. Kéo dài đường nối các điểm trên đồ thị cho đến khi gặp trục nồng độ. Khoảng cách giữa điểm này và giao điểm của các trục thể hiện nồng độ chất cần xác định trong dung dịch.

Phương pháp rút ra liên tục

Nếu được quy định, phương pháp rút ra liên tục được mô tả đầy đủ trong chuyên luận riêng.

5.3 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG

Sắc ký lỏng là phương pháp tách sắc ký các chất dựa trên sự phân bố khác nhau của chúng giữa hai pha không trộn lẫn, trong đó pha động là một chất lỏng chảy qua pha tĩnh chứa trong cột.

Sắc ký lỏng được tiến hành chủ yếu dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố khối lượng, trao đổi ion, loại trừ theo kích thước hoặc tương tác hóa học lập thể.

Thiết bị

Thiết bị bao gồm một hệ thống bơm, bộ phận tiêm mẫu, cột sắc ký (bộ phận điều khiển nhiệt độ có thể được sử dụng nếu cần thiết), detector và một hệ thống thu dữ liệu (hay một máy tích phân hoặc một máy ghi đồ thị). Pha động được cung cấp từ một hoặc vài bình chứa và chảy qua cột, thông thường với tốc độ không đổi và sau đó chạy qua detector.

Hệ thống bơm

Hệ thống bơm trong sắc ký lỏng phải giữ cho pha động luôn chảy với một lưu lượng không đổi. Những biến đổi áp suất sẽ được giảm thiểu, ví dụ cho dung môi chảy qua một thiết bị giảm xung. Ống dẫn và hệ thống nối phải là loại chịu được áp suất sinh ra do hệ thống bơm. Các bơm có thể được lắp với thiết bị loại bỏ bọt khí.

Hệ thống điều khiển bằng bộ vi xử lý có khả năng cung cấp pha động hoặc hằng định (rửa giải đẳng dòng) hoặc thay đổi tỷ lệ thành phần (rửa giải gradient) theo một chương trình xác định. Trong trường hợp rửa giải gradient, hệ thống bơm lấy các dung môi từ một vài bình chứa và các dung môi có thể được trộn lẫn ở áp suất thấp hoặc áp suất cao.

Bộ phận tiêm mẫu

Dung dịch mẫu thử được đưa vào dòng pha động hoặc vào vị trí gần đầu hoặc đầu cột nhờ một bộ phận tiêm mẫu có khả năng hoạt động ở áp suất cao. Có thể dùng vòng chứa mẫu thử, có thể tích cố định hoặc thiết bị có thể tích thay đổi, có thể vận hành bằng tay hoặc tự động. Khi tiêm mẫu bằng tay có thể gây ra sai số do thể tích tiêm vào vòng chứa mẫu không đủ.