

**Các đại lượng đặc trưng cho quá trình sắc ký**  
Xem phần chung Phụ lục 5. Các kỹ thuật tách sắc ký.

### Phương pháp tiến hành

Làm cân bằng cột với pha động và tốc độ dòng theo quy định, ở nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ quy định trong chuyên luận riêng, cho đến khi đường nền ổn định. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và dung dịch thử theo yêu cầu. Các dung dịch phải không được có các tiểu phân rắn.

### Hiệu năng

Quy định về tính phù hợp của hệ thống được mô tả trong Phụ lục 5. Các kỹ thuật tách sắc ký. Xác định và điều chỉnh các thông số của hệ thống sắc ký có thể được thực hiện nhằm đáp ứng các yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống cũng được trình bày trong Phụ lục này.

Thành phần và tốc độ dòng của pha động được quy định trong chuyên luận riêng. Pha động là hỗn hợp dung môi được đuổi khí bằng bơm chân không hoặc bằng một thiết bị đuổi khí khác phù hợp nhưng không ảnh hưởng đến thành phần của hỗn hợp.

Trong quá trình định lượng, khi trong chuyên luận riêng không quy định dùng chuẩn nội, nên sử dụng bộ phận tiêm mẫu có thể tích cố định. Trong một số trường hợp ngoại lệ, khi trong chuyên luận chỉ dẫn tính theo chiều cao pic thì không cần quan tâm đến hệ số đối xứng.

Cột sắc ký thường được làm bằng thép không gỉ có kích thước (chiều dài × đường kính trong) được quy định trong chuyên luận riêng. Trong chuyên luận riêng, khi pha tĩnh được ký hiệu bằng một chữ cái thì tra cứu ở phần Nguyên vật liệu nêu ở dưới đây. Đường kính danh nghĩa của hạt pha tĩnh được để trong ngoặc đơn ngay sau ký hiệu chữ cái cụ thể. Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, quá trình sắc ký được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ không đổi trong môi trường phòng thí nghiệm. Khi sử dụng các pha động có pH cao với cột có bản chất là silica nên sử dụng một tiền cột ở trước cột phân tích.

Trừ khi có các chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, hệ thống detector gồm một detector đo quang gắn với một cốc đo có thể tích nhỏ (khoảng 10 µl là phù hợp). Phải đặt bước sóng theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Khi dùng một máy sắc ký có thiết kế riêng biệt có thể phải thay đổi các điều kiện sắc ký đã ghi trong chuyên luận riêng. Trong trường hợp này, người phân tích cần đảm bảo rằng những thay đổi đó cho kết quả tương đương.

### Thế tích tiêm

Khi thế tích tiêm không quy định trong chuyên luận riêng, nên chọn một thế tích tiêm 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 20 µl, 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 của chuẩn nội hoặc pic của dung môi hay của các thuốc thử tạo dẫn xuất.

### Nguyên vật liệu

Các dung môi và thuốc thử dùng để pha các dung dịch sử dụng trong phân tích phải có chất lượng thích hợp cho sắc ký lỏng.

Khi chuyên luận riêng quy định pha tĩnh được gắn với một chữ cái (A hoặc B hoặc C) là muốn nói tới các pha tĩnh như mô tả dưới đây:

Pha tĩnh A, hạt silica;

Pha tĩnh B, hạt silica được biến đổi hóa học, gắn với nhóm octylsilyl (C<sub>8</sub>);

Pha tĩnh C, hạt silica được biến đổi hóa học, gắn với nhóm octadecylsilyl (C<sub>18</sub>).

## 5.4 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỚP MỎNG

Phương pháp sắc ký lớp mỏng được dùng để định tính, thử tinh khiết và đôi khi để bán định lượng hoặc định lượng hoạt chất thuốc.

Sắc ký lớp mỏng là một kỹ thuật tách các chất được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh trên đó đã chấm hỗn hợp các chất cần tách. Pha tĩnh là chất hấp phụ được chọn phù hợp theo từng yêu cầu phân tích, được trải thành lớp mỏng đồng nhất và được cố định trên các phiến kính hoặc phiến kim loại. Pha động là một hệ dung môi đơn hoặc đa thành phần được trộn với nhau theo tỷ lệ quy định trong từng chuyên luận. Trong quá trình di chuyển qua lớp hấp phụ, các cấu tử trong hỗn hợp mẫu thử được di chuyển trên lớp mỏng, theo hướng pha động, với những tốc độ khác nhau. Kết quả thu được là một sắc ký đồ trên lớp mỏng. Cơ chế của sự tách có thể là cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion, sàng lọc phân tử hay sự phối hợp đồng thời của nhiều cơ chế tùy thuộc vào tính chất của chất làm pha tĩnh và dung môi làm pha động.

Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của chất phân tích là hệ số di chuyển R<sub>f</sub> được tính bằng tỷ lệ giữa khoảng dịch chuyển của chất thử và khoảng dịch chuyển của dung môi:

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

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.

R<sub>f</sub>: Chỉ có giá trị từ 0 đến 1.

Ngoài ra, khi sắc ký liên tục không xác định được tuyến dung môi, vị trí vết chất thử trên sắc đồ có thể xác định bằng hệ số dịch chuyển tương đối R<sub>r</sub>. Hệ số dịch chuyển tương đối R<sub>r</sub> được xác định bằng tỷ số giữa khoảng cách dịch chuyển của vết chất thử và khoảng cách dịch chuyển của vết chất chuẩn đối chiếu được sắc ký trong cùng điều kiện và trên cùng bản mỏng với mẫu thử:

$$R_r = \frac{a}{c}$$

Trong đó:

a là khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết mẫu thử;  
c là khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết chất chuẩn.  
Giá trị  $R_r$  có thể lớn hay nhỏ hơn 1.

### Cách tiến hành

#### Dụng cụ

Bình triển khai, thường bằng thủy tinh trong suốt có kích thước phù hợp với các phiến kính cần dùng và có nắp đậy kín.

Đèn tử ngoại, phát các bức xạ có bước sóng ngắn 254 nm và bước sóng dài 365 nm.

Dụng cụ để phun thuốc thử.

Tủ sấy điều nhiệt để hoạt hóa và sấy bản mỏng và sắc ký đồ, hoặc để sấy nóng đối với một số phản ứng phát hiện.

Tủ hút hơi độc.

Máy sấy dùng để sấy khô sắc ký đồ và cho phép chấm nhanh nhiều lần những dung dịch pha loãng chất cần phân tích.

Một máy ảnh tốt có thể chụp lưu giữ sắc ký đồ ở ánh sáng ban ngày với khoảng cách 30 cm đến 50 cm.

Tủ lạnh để bảo quản những thuốc thử dễ hỏng.

Micropipet nhiều cỡ từ 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl đến 20 µl, các ống mao quản hoặc dụng cụ thích hợp.

Bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ có chất phát quang thích hợp.

Trường hợp phòng thí nghiệm không có điều kiện trang bị các loại bản mỏng tráng sẵn thì tự chuẩn bị lấy bản mỏng với các dụng cụ sau đây:

Các tấm kính phẳng có kích thước phù hợp đã được xử lý trước bằng hóa chất rồi rửa sạch bằng nước và sấy khô.

Thiết bị trải chất hấp phụ lên tấm kính thành một lớp mỏng đồng đều, có chiều dày thích hợp.

Giá để xếp các tấm kính đã trải.

#### Chuẩn bị bản mỏng

Sắp xếp các bản mỏng và chuẩn bị thiết bị: Các phiến kính phải được lau chùi cẩn thận và tẩy sạch hoàn toàn các chất béo bằng cách ngâm trong dung dịch sulfocromic. Sau đó, rửa dưới tia nước máy rồi tráng nước cất và làm khô trên giá ở nhiệt độ thường hay trong tủ sấy. Đặt lên khung trải 5 phiến kính 20 cm × 20 cm (hay phiến kính 10 cm × 20 cm) dày bằng nhau. Điều chỉnh độ dày của lớp hấp phụ bằng các thông số trên thiết bị trải.

Điều chế vữa của chất hấp phụ: Chất hấp phụ được chọn lọc sao cho phù hợp với yêu cầu phân tích như: Silica gel G, kieselguhr, cellulose, nhôm oxyd, trong số đó silica gel G được dùng thông dụng nhất. Trộn 25 g silica gel G với 50 ml nước cất và nhào trong cối hoặc lắc mạnh trong bình nón có dung tích 200 ml đến 250 ml, nút kín, trong 30 s đến 45 s. Dịch treo tạo được ở dạng lỏng và đồng nhất. Rót ngay vào thiết bị trải đã điều chỉnh độ dày cho bản mỏng khoảng 0,25 mm (nếu không có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng). Sau khi rót dịch treo vào thiết bị trải, lật tay tròn

180° về phía trái và chờ cho đến khi dịch treo chảy ra thì bắt đầu trải. Khi đã trải đến phiến cuối cùng lật tay tròn về phía phải để giữ cho dịch treo không chảy xuống.

Để nguyên các phiến kính tại chỗ khoảng 10 min tới khi mặt trên hết bóng, hoặc để khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng.

**Hoạt hóa:** Cho các bản mỏng đã khô mặt vào tủ sấy và sấy ở 105 °C đến 110 °C trong 30 min (nếu không có chỉ dẫn ở chuyên luận riêng). Để nguội rồi bảo quản trong bình hút ẩm. Khi dùng, nếu cần thì hoạt hóa lại bằng cách sấy ở 105 °C đến 110 °C trong 1 h rồi cạo bỏ một dải chất hấp phụ dọc hai bên cạnh của tấm kính.

**Chuẩn bị bình khai triển:** Các bình khai triển thường là bình thủy tinh, hình hộp hay hình trụ, có nắp đậy kín, kích thước thay đổi tùy theo yêu cầu của các bản mỏng sử dụng. Bão hòa hơi dung môi vào khí quyển 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 1 h ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C. Muốn thu được những kết quả lặp lại, ta chỉ nên dùng những dung môi thật tinh khiết, loại dùng cho sắc ký. Những dung môi dễ bị biến đổi về hóa học chỉ nên pha trước khi dùng. Nếu sử dụng những hệ pha động phức tạp phải chú ý đến những thành phần dễ bay hơi làm thay đổi thành phần của hệ pha động dẫn đến hiện tượng không lặp lại của trị số  $R_f$ .

**Chấm chất phân tích lên bản mỏng:** Lượng chất hoặc hỗn hợp chất đưa lên bản mỏng có ý nghĩa quan trọng đối với hiệu quả tách sắc ký, đặc biệt ảnh hưởng rất lớn đến trị số  $R_f$ . Lượng chất quá lớn làm cho vết sắc ký lớn và kéo dài, khi đó, vết của các chất có trị số  $R_f$  gần nhau sẽ bị chồng lấp. Lượng chất nhỏ quá có thể không phát hiện được do độ nhạy của thuốc thử không đủ (thông thường độ nhạy của các thuốc thử trên 0,005 µg). Lượng mẫu thông thường cần đưa lên bản mỏng là 0,1 µg đến 50 µg ở dạng dung dịch trong dung môi thích hợp. Thể tích dung dịch từ 0,001 ml đến 0,005 ml đối với trường hợp đưa mẫu lên bản mỏng dưới dạng điểm và từ 0,1 ml đến 0,2 ml khi đưa mẫu lên bản mỏng dưới dạng vạch như trong trường hợp sắc ký điều chế. Đối với các dung dịch có nồng độ rất loãng thì có thể làm giàu trực tiếp trên bản mỏng bằng cách chấm nhiều lần ở cùng một vị trí và sấy khô sau mỗi lần chấm. Đường xuất phát phải cách mép dưới của bản mỏng 1,5 cm đến 2 cm và cách bề mặt dung môi từ 0,8 cm đến 1 cm. Các vết chấm phải nhỏ, có đường kính 2 mm đến 6 mm và cách nhau 15 mm. Các vết ở bìa phải cách bờ bên của bản mỏng ít nhất 1 cm để tránh hiệu ứng bờ. Khi làm sắc ký lớp mỏng bán định lượng, độ chính xác của kết quả phân tích phụ thuộc rất nhiều vào độ chính xác của lượng chất thử đưa lên bản mỏng, tức là thể tích dung dịch chấm lên bản mỏng. Do đó, với những trường hợp phân tích bán định lượng phải dùng các mao quản định mức chính xác. Khi không cần định lượng dùng micropipet hoặc ống mao quản thường.

**Triển khai sắc ký:** Đặt bản mỏng vào bình triển khai. Chú ý lượng dung môi dùng sao cho để các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi. Đậy kín bình và để triển khai ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C và tránh ánh sáng mặt trời. Nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 3/4 bản mỏng, lấy bản mỏng ra khỏi bình, đánh dấu mức dung môi, làm bay hơi dung môi còn đọng lại trên bản mỏng rồi hiện vết theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Quan sát các vết xuất hiện, tính giá trị  $R_f$  hoặc  $R_r$  và tiến hành định tính, phát hiện tạp chất hoặc định lượng như quy định trong chuyên luận riêng.

#### CHÚ Ý:

Khi phân tích bằng sắc ký lớp mỏng luôn phải chấm chất đối chiếu bên cạnh vết chất thử với lượng tương tự như dự đoán có trong vết chất thử để so sánh kết quả về màu sắc, kích thước và giá trị  $R_f$  hoặc  $R_r$  trong cùng điều kiện.

Hiệu năng của bản mỏng được kiểm tra như sau: Chấm một thể tích thích hợp (10  $\mu$ l) cho lớp mỏng thông thường và 1  $\mu$ l đến 2  $\mu$ l cho loại bản mỏng có kích thước hạt mịn dung dịch thử hiệu năng lớp mỏng gồm lục bromocresol, da cam methyl, đỏ methyl và sudan G đỏ (thuốc thử). Tiến hành sắc ký với hệ dung môi *methanol - toluen* (20 : 80). Kết quả trên sắc ký đồ phải có 4 vết tách rõ ràng có  $R_f$  như sau: Lục bromocresol: < 0,15; da cam methyl: 0,1 đến 0,25, đỏ methyl: 0,35 đến 0,55 và sudan G đỏ: 0,75 đến 0,98.

### 5.5 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ RẦY PHÂN TỬ

Sắc ký rây phân tử là phương pháp chia tách các phân tử trong dung dịch dựa trên kích thước của chúng. Trong trường hợp pha động là một dung môi hữu cơ, kỹ thuật được gọi là sắc ký thẩm qua gel, còn trường hợp pha động là nước thì kỹ thuật được gọi là sắc ký lọc trên gel. Mẫu được đưa vào cột chứa đầy gel hoặc một loại vật liệu xốp, và được pha động dẫn chạy qua cột. Sự chia tách theo kích thước được thực hiện nhờ sự trao đổi lặp đi lặp lại các phân tử chất tan giữa dung môi pha động và cùng dung môi đó được pha tĩnh giữ ở trong các lỗ xốp của gel. Khoảng kích thước lỗ của vật liệu nhồi trong cột sẽ xác định khoảng kích thước phân tử được chia tách qua quá trình sắc ký.

Những phân tử có kích thước đủ nhỏ để có thể đi vào trong tất cả khoảng không gian của lỗ xốp được rửa giải trong thể tích thẩm tổng  $V_r$ . Các phân tử có kích thước lớn hơn kích thước lỗ xốp lớn nhất chỉ di chuyển được dọc theo cột qua các khoảng trống giữa các hạt vật liệu nhồi mà không bị giữ lại, được rửa giải trong thể tích loại trừ  $V_o$  (thể tích trống). Sự chia tách theo kích thước phân tử xảy ra giữa thể tích trống và tổng thể tích thẩm, chia tách hiệu quả thường được thực hiện ở hai phần ba đầu tiên của khoảng này.

#### Thiết bị

Thiết bị bao gồm một cột sắc ký có kích thước phù hợp, nếu cần thiết phải khống chế nhiệt độ, được nhồi đầy vật liệu chia tách có thể phân loại theo các khoảng kích thước

phân tử phù hợp. Kích thước của cột (chiều cao  $\times$  đường kính trong) được quy định ở chuyên luận riêng. Pha động chạy qua cột ở tốc độ không đổi dưới tác dụng của trọng lực hoặc nhờ một bơm. Một đầu của cột được nối với một thiết bị phù hợp để cấp mẫu theo kiểu bộ phận điều chỉnh lưu lượng dòng, một bơm tiêm đi qua vách hoặc một van tiêm và có thể được nối với một bơm điều khiển lưu lượng dòng dung dịch rửa giải. Một cách khác là mẫu có thể được tiêm vào trực tiếp trên bề mặt lớp gel hoặc dưới dung dịch rửa giải nếu như mẫu có tỷ trọng lớn hơn dung dịch rửa giải.

Đường ra của cột được nối với một detector có gắn với một máy ghi tự động để theo dõi nồng độ tương đối của các thành phần trong mẫu. Detector thường được thiết kế dựa trên các tính chất hấp thụ quang, khúc xạ ánh sáng hay phát quang. Bộ phận thu hứng phản đoạn tự động có thể được lắp trong trường hợp cần thiết. Vật liệu trong cột có thể là một chất mang mềm như gel nở hay một chất mang cứng cấu tạo từ thủy tinh, silic hoặc một hợp chất cao phân tử liên kết chéo tương thích dung môi. Chất mang cứng thường đòi hỏi hệ thống điều áp để tăng tốc độ phân tách. Pha động thường được chọn theo loại mẫu, môi trường phân tách và phương pháp phát hiện.

Vật liệu nhồi cần được xử lý và được nạp vào cột như mô tả trong chuyên luận hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### Hiệu năng

Hệ thống sắc ký phải thỏa mãn quy định về tính phù hợp của hệ thống được mô tả trong phần Các kỹ thuật tách sắc ký (Phụ lục 5). Việc điều chỉnh các thông số của hệ sắc ký có thể được thực hiện nhằm đáp ứng các yêu cầu về sự phù hợp của hệ thống cũng được trình bày trong phụ lục này.

#### Xác định tỷ lệ thành phần tương đối

Tiến hành phương pháp theo các điều kiện ghi trong chuyên luận riêng. Nếu có thể, theo dõi quá trình rửa giải một cách liên tục và ghi lại diện tích của các pic tương ứng. Nếu mẫu được xác định dựa vào tính chất hóa lý mà tất cả các thành phần của mẫu đều cho một đáp ứng tương đương (ví dụ cùng có một hệ số hấp thụ riêng), thì lượng tương đối của mỗi thành phần có thể được xác định bằng cách tính tỷ lệ diện tích mỗi pic thu được trên tổng diện tích pic của những thành phần quan tâm. Nếu sự đáp ứng khác nhau, tính tỷ lệ thành phần tương đối bằng cách dựa vào đường chuẩn của các dung dịch chuẩn được ghi trong chuyên luận riêng hoặc bằng phương pháp khác được ghi trong chuyên luận riêng.

#### Xác định khối lượng phân tử

Thực hiện phương pháp với dung dịch thử và các dung dịch chuẩn theo quy trình ghi trong chuyên luận riêng. Xây dựng một đồ thị biểu thị sự phụ thuộc giữa thể tích lưu của các chất chuẩn dùng cho hiệu chuẩn và hàm logarit của khối lượng phân tử của chúng. Đường chuẩn thường xấp xỉ với một đường thẳng nằm giữa giới hạn loại trừ và giới hạn thẩm tổng thể. Khối lượng phân tử của thành phần