

cho tan và pha loãng bằng nước tới 50,0 ml. Pha loãng 5,0 ml dung dịch này tới 250,0 ml bằng nước. Cho 1,0 ml dung dịch thu được vào ống thủy tinh có nút mài, thêm 5 ml dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đậy kín, lắc mạnh trong 1 min, ly tâm nếu cần và dùng lớp trên.

Điều kiện sắc ký: Cột thủy tinh dài 2 m, đường kính trong 2 mm, được nhồi bằng diatomit silan hóa tẩm 3 % (kl/kl) polymethylphenylsiloxan.

Khí mang: Nitrogen dùng cho sắc ký khí, với lưu lượng 30 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa.

Duy trì nhiệt độ cột ở 120 °C, nhiệt độ detector và buồng tiêm ở 150 °C.

Thể tích tiêm: 1 µl.

10.17 ĐỊNH LƯỢNG ACID 2-ETHYLHEXANOIC

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Dung dịch chuẩn nội: Hòa tan 100 mg acid 3-cyclohexyl propionic (TT) trong cyclohexan (TT) và pha loãng vừa đủ 100 ml với cùng dung môi.

Dung dịch thử: Thêm 4,0 ml dung dịch acid hydrochloric 33 % (tt/tt) vào 0,300 g mẫu thử. Lắc mạnh 2 lần, mỗi lần trong 1 min với 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn), sử dụng dịch gộp của các lớp dịch chiết ở trên.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 75,0 mg acid 2-ethylhexanoic (TT) trong dung dịch chuẩn nội và pha loãng vừa đủ 50,0 ml với dung dịch chuẩn nội. Thêm 4,0 ml dung dịch acid hydrochloric 33 % (tt/tt) vào 1,0 ml dung dịch vừa pha. Lắc mạnh trong 1 min. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn). Gạn lấy lớp dịch chiết ở trên. Tiếp tục thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội vào lớp dịch còn lại ở dưới và lắc mạnh trong 1 min. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn), sử dụng dịch gộp của các lớp dịch chiết ở trên.

Điều kiện sắc ký:

Cột silica nung chảy có nòng rộng, chiều dài 10 m, đường kính trong 0,53 mm, phủ lớp pha tĩnh macrogol 20.000 2-nitrotetraphthalat (có bề dày 1,0 µm);

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký, với tốc độ dòng 10 ml/min;

Detector ion hóa ngọn lửa.

Chương trình nhiệt độ như sau:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ (°C/min)	Ghi chú
Cột	0 - 2	40	-	Đẳng nhiệt
	2 - 7,3	40 → 200	30	Nhiệt độ tăng đều
	7,3 - 10,3	200	-	Đẳng nhiệt
Buồng tiêm		200		
Detector		300		

Thể tích tiêm: 1 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.

Phép thử chỉ có giá trị khi độ phân giải giữa pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic (pic đầu tiên) và pic dung dịch chuẩn nội ít nhất là 2,0.

Hàm lượng phần trăm của acid 2-ethylhexanoic được tính theo công thức sau:

$$\frac{A_T \times I_C \times m_C \times 2}{A_C \times I_T \times m_T}$$

Trong đó:

A_T là diện tích pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

A_C là diện tích pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

I_T là diện tích pic tương ứng với chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

I_C là diện tích pic tương ứng với chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

m_T là lượng cân mẫu thử tính bằng gam;

m_C là lượng cân acid 2-ethylhexanoic trong dung dịch đối chiếu, tính bằng gam.

10.18 XÁC ĐỊNH ACID ACETIC TRONG PEPTID TỔNG HỢP

Tiến hành phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động:

Pha động A: Hòa tan 0,7 ml acid orthophosphoric (TT) trong vừa đủ 1000 ml nước; điều chỉnh pH tới 3,0 với dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT).

Pha động B: Methanol dùng cho sắc ký lỏng (TT).

Dung dịch thử: Chuẩn bị như mô tả ở chuyên luận riêng.

Dung dịch đối chiếu: Pha dung dịch acid acetic 0,10 g/l từ acid acetic băng (TT), sử dụng hỗn hợp 5 thể tích pha động B và 95 thể tích pha động A làm dung môi.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (250 mm × 4,6 mm), nhồi pha tĩnh C (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 210 nm.

Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 - 5	95	5
5 - 10	95 → 50	5 → 50
10 - 20	50	50
20 - 22	50 → 95	50 → 5
22 - 30	95	5

Tiến hành sắc ký dung dịch đối chiếu và dung dịch thử.