

Detector: ion hóa ngọn lửa.

Duy trì nhiệt độ cột ở 50 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 180 °C với tốc độ 5 °C/min, sau đó lại tăng đến 230 °C với tốc độ 30 °C/min và giữ ở 230 °C trong 5 min. Nhiệt độ detector là 250 °C, nhiệt độ buồng tiêm là 150 °C.

Tiêm một lượng thích hợp pha hơi của dung dịch đối chiếu (b), chẳng hạn 1 ml. Điều chỉnh độ nhạy của hệ thống sao cho chiều cao các pic cho bởi ethylen oxyd và acetaldehyd trong sắc ký đồ đạt ít nhất 15 % thang đo. Thử nghiệm không có hiệu lực nếu hệ số phân giải giữa pic cho bởi acetaldehyd và pic cho bởi ethylen oxyd nhỏ hơn 2,0 và pic của dioxan và ethylene oxyd được phát hiện với tỷ lệ tín hiệu/nhiều nhỏ hơn 5.

Tiêm lần lượt những lượng thích hợp pha hơi của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), chẳng hạn 1 ml (hoặc bằng lượng dung dịch đối chiếu (b) đã tiêm).

Tiêm lặp lại như trên thêm 2 lần nữa.

Diện tích trung bình của pic ethylen oxyd và dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử không được lớn hơn một nửa (1/2) diện tích trung bình của pic tương ứng trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a) (1 phần triệu ethylen oxyd và 50 phần triệu dioxan).

Kiểm tra độ tin cậy

Tính hiệu số của diện tích pic, theo từng cặp, cho bởi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), lần lượt ứng với ethylen oxyd và với dioxan. Thử nghiệm chỉ có hiệu lực nếu độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với ethylen oxyd không lớn hơn 15 % và độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với dioxan không lớn hơn 15 %.

Nếu lượng cân mẫu thử và chất đối chiếu nằm ngoài khoảng 0,995 g đến 1,005 g cần phải hiệu chỉnh kết quả cho thích hợp.

Hàm lượng ethylen oxyd tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$A_T \times C / [(A_C \times M_T) - (A_T \times M_C)]$$

Trong đó:

A_T là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

A_C là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

M_T là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;

M_C là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng ethylen oxyd cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

Và hàm lượng dioxan tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$D_T \times C / [(D_C \times M_T) - (D_T \times M_C)]$$

Trong đó:

D_T là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

D_C là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

M_T là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;
 M_C là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng dioxan cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

10.16 ĐỊNH LƯỢNG *N,N*-DIMETHYLANILIN

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Phương pháp 1

Dung dịch chuẩn nội: Hòa tan 50 mg *N,N*-diethylanilin (TT) trong 4 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT), pha loãng bằng nước tới 50 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100 ml bằng nước.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,50 g chế phẩm trong 30,0 ml nước, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch tới 26 °C đến 28 °C. Thêm 1,0 ml dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT). Lắc cho tan hoàn toàn. Thêm 2,0 ml trimethylpentan (TT). Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 50,0 mg *N,N*-dimethylanilin (TT) trong 4,0 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT), pha loãng bằng nước tới 50,0 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100,0 ml bằng nước. Tiếp tục pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được tới 30,0 ml bằng nước, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 1,0 ml dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT), 2,0 ml trimethylpentan (TT). Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

Điều kiện sắc ký

Cột mao quản bằng silica nung chảy, dài 25 m, đường kính trong 0,32 mm, phủ lớp polymer liên kết mạng polymethylphenylsiloxan dày 0,52 µm.

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký khí, tỷ lệ chia dòng 1 : 20, áp suất đầu cột 5 kPa, lưu lượng 20 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa.

Bộ chia dòng (split-liner) là một cột dài khoảng 1 cm, nhồi diatomit dùng cho sắc ký khí tẩm 10 % (kl/kl) polydimethylsiloxan.

Nhiệt độ: Duy trì nhiệt độ cột 150 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 275 °C với tốc độ 20 °C/min, rồi giữ ở 275 °C trong 3 min. Nhiệt độ detector 300 °C, nhiệt độ buồng tiêm 220 °C.

Thể tích tiêm: 1 µl.

Thời gian lưu của *N,N*-dimethylanilin khoảng 3,6 min; của *N,N*-diethylanilin khoảng 5,0 min.

Phương pháp 2

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch naphtalen (TT) 0,005 % trong cyclohexan (TT).

Dung dịch thử: Hòa tan 1,00 g chế phẩm với 5 ml dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) trong ống thủy tinh có nút mài, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đậy kín, lắc mạnh trong 1 min. Ly tâm nếu cần, dùng lớp trên.

Dung dịch đối chiếu: Thêm 2 ml acid hydrochloric (TT) và 20 ml nước vào 50,0 mg *N,N*-dimethylanilin (TT), lắc

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.