

PHỤ LỤC 3

3.1 CÂN VÀ XÁC ĐỊNH KHỐI LƯỢNG

Xác định khối lượng là bước thường xuyên trong quy trình phân tích. Cân là thiết bị phòng thí nghiệm cần thiết trong hầu hết các phép phân tích. Tuy nhiên, phép cân lại là nguồn phổ biến gây sai số khó phát hiện.

Quy trình mô tả dưới đây áp dụng trực tiếp trên các cân điện tử.

Quy trình xác định khối lượng có thể chia thành ba bước cơ bản: Chuẩn bị cân, kiểm tra cân và cân xác định khối lượng.

Chuẩn bị cân

Bước ban đầu là chọn, trang bị các dụng cụ thí nghiệm thích hợp, như các đồ đựng vật cân (giấy cân, phễu cân...), bình chứa, kẹp gấp, pipet, thìa có kích cỡ phù hợp...

Sử dụng đồ đựng có kích cỡ không vượt quá tải trọng của cân và phải đảm bảo sạch, khô.

Chuẩn bị các mẫu cân và các hóa chất cần thiết, nếu có yêu cầu, pha các dung dịch, thuốc thử.

Mẫu cân có thể yêu cầu nghiền mịn hoặc sấy khô. Một vài mẫu cân phải được làm nóng hoặc bảo quản trong thiết bị làm lạnh. Trước khi cân, mẫu cân phải đảm bảo được cân bằng nhiệt với nhiệt độ của cân. Để tránh sự ngưng tụ hơi ẩm, các mẫu cân làm lạnh phải được để tới nhiệt độ phòng trước khi mở nắp bình đựng.

Kiểm tra cân

Cân phải được kiểm tra trước khi tiến hành cân để loại các sai số có thể xảy ra. Người sử dụng cân cần kiểm tra môi trường cân, hiệu chuẩn cân và kiểm tra độ không đảm bảo đo của cân.

Môi trường cân

Cân phải được đặt ở vị trí thích hợp có mức rung động đủ thấp, không có luồng khí và có nguồn điện ổn định.

Cân và khu vực làm việc chung quanh phải được giữ gọn gàng và sạch sẽ. Nên dùng bàn chải lông mịn làm sạch đĩa cân trước khi cân.

Khi cân được di chuyển đến nơi khác, cân phải để cân ổn định tới nhiệt độ của môi trường mới và phải hiệu chuẩn lại cân.

Hiệu chuẩn cân

Mở nguồn và để cân ổn định trong ít nhất 1 h trước khi tiến hành hiệu chuẩn (các cân vi phân tích cần để ổn định 24 h để đạt sự cân bằng).

Các cân phân tích điện tử có hệ thống nội chuẩn dựa trên tải trọng xác định.

Sự hiệu chuẩn được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ phòng.

Độ không đảm bảo đo của cân

Cách giảm độ trôi

Độ trôi là một trong những sai số thường gặp và cũng là yếu tố có thể làm giảm hoặc loại bỏ dễ dàng nhất.

Kiểm tra mẫu thử, cân phân tích và môi trường phòng thí nghiệm để loại bỏ các nguyên nhân sau đây có thể gây sai số: Cửa buồng cân mở.

Nhiệt độ của cân và mẫu cân không đồng nhất.

Mẫu cân tăng hoặc giảm khối lượng.

Cân mới được di chuyển nhưng chưa được để cân bằng với môi trường hoặc chưa được hiệu chuẩn lại.

Có các luồng gió trong phòng thí nghiệm.

Nhiệt độ trong phòng thí nghiệm thay đổi.

Cân không đặt thật thẳng bằng.

Các hoạt động trong phòng thí nghiệm gây rung động.

Ảnh hưởng của các bộ phận cơ học xảy ra trong suốt quá trình cân.

Hiện tượng trễ cơ học

Hiện tượng trễ của cân là do sự căng quá mức các lò xo, chủ yếu gây bởi việc cân quá tải hoặc bởi đánh rơi vật nào đó lên đĩa cân.

Quy trình đảm bảo chất lượng cho sự đo độ trôi của cân

Sau một khoảng thời gian vận hành cân, độ trôi của cân được kiểm tra bằng việc cân khối lượng quả cân chuẩn đã được nối chuẩn. Việc kiểm tra này nên thực hiện sau khi cân đã được hiệu chuẩn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, trước khi cân mẫu đầu tiên trong ngày hoặc sau một sự cố có thể làm sai lệch cân (mất nguồn điện, di chuyển cân đến vị trí khác...).

Quả cân chuẩn phải có khối lượng hằng định và không vượt quá mức trọng tải của cân. Mỗi cân nên được cung cấp một quả cân chuẩn, đựng trong hộp bảo vệ và đặt cạnh cân.

Cần thực hiện những quy trình sau đây để làm giảm các sai số cân và khả năng sai số do độ trôi:

Đảm bảo nối nguồn điện cho cân, kiểm tra bọt nước thăng bằng của cân.

Hiệu chuẩn cân phân tích hoặc cân vi phân tích.

Hàng ngày, người đầu tiên sử dụng cân phải kiểm tra cân bằng cách cân khối lượng quả cân chuẩn, ghi chép khối lượng này vào sổ theo dõi để so sánh với các lần cân trước.

Nếu sự chênh lệch lớn hơn giới hạn cho phép của cân phân tích và cân vi phân tích, phải báo cáo để sửa chữa.

(Quả cân chuẩn phải được bảo quản, tránh sự tiếp xúc với những chất gây ô nhiễm trong không khí, có thể làm sạch bằng một miếng vải gạc được làm ẩm bằng một lượng nhỏ dung môi thích hợp như ether ethylic).

Cân phân tích

Chọn một quả cân chuẩn có khối lượng phù hợp để kiểm tra cân phân tích. Nếu có thể, cài đặt cân để đọc tới số thập phân thứ 5. Vận hành cân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Dùng kẹp gấp quả cân chuẩn đặt cẩn thận lên đĩa cân, tránh để rơi xuống đĩa cân. Đặt quả cân vào chính giữa đĩa cân để loại trừ độ lệch góc. Nếu không có sự trôi, khối lượng của quả cân chuẩn sẽ hằng định.

Định kỳ sử dụng quả cân chuẩn cố định sẽ phát hiện được độ trôi của cân (nếu có). Việc kiểm tra độ trôi được thực hiện bằng cách cân ở những vị trí nhạy nhất. Mức dao động khối lượng thu được không được vượt quá $\pm 0,2$ mg. Ví dụ: Với quả cân 20 g, nếu giá trị trung bình đọc được là 19,9984 g, khối lượng dao động từ 19,9982 đến 19,9986 g là chấp nhận được. Vì vậy phải đọc kết quả nhiều lần trước khi thiết lập dung sai.

Cân vi phân tích

Tiến trình như hướng dẫn cho cân phân tích nhưng dùng một quả cân chuẩn thích hợp cho loại cân này.

Ví dụ: Có thể dùng quả cân chuẩn 100 mg cho cân có mức trọng tải là 150 mg hoặc có thể dùng quả cân chuẩn 10 mg cho một cân siêu vi phân tích có mức trọng tải là 15 mg.

(Người sử dụng cân phải biết trọng tải tối đa của cân để chọn quả cân chuẩn thích hợp).

Cân biểu thị khối lượng bằng miligam. Ghi chép khối lượng ngay sau khi kết quả đọc ổn định một vài giây. Sự biến thiên khối lượng phải trong giới hạn phù hợp với tiêu chuẩn kỹ thuật của nhà sản xuất nhưng không được lớn hơn 0,1 % lượng mẫu cân.

Ví dụ: Nếu cân các mẫu 10 mg, sự biến thiên khối lượng của quả cân chuẩn phải không vượt quá 0,01 mg.

Cân xác định khối lượng mẫu

Trong bước cuối này, chọn phần thập phân của kết quả cân theo yêu cầu của quy trình phân tích. Phần lớn các phép phân tích trong dược phẩm sử dụng một lượng nhỏ mẫu thử, nên yêu cầu giá trị đọc trên cân cài đặt tới số thập phân thứ năm để đạt độ đúng cần thiết.

Số thập phân thứ tư thích hợp hơn với các khối lượng mẫu cân gần bằng gam.

Không cân mẫu quá lâu để tránh những thay đổi gây ra bởi sự tương tác với nước trong không khí và khí carbonic.

Giới hạn trọng tải

Chọn cân phù hợp với khối lượng phải cân và độ đúng cần thiết. Mỗi cân có một giới hạn trọng tải, không nên vượt quá. Mỗi nhà sản xuất cân đã xác định trọng tải tối đa của cân và giới hạn này thay đổi với từng loại cân. Người sử dụng nên biết giới hạn trọng tải để tránh làm hỏng cân.

Dụng cụ chứa mẫu

Những dụng cụ chứa mẫu cân thông thường là lọ cân, thuyền cân (phễu cân), giấy cân, bình nón... Dụng cụ chứa mẫu thích hợp phụ thuộc vào khối lượng và trạng thái mẫu cân (lỏng, rắn, bột...). Phải chọn dụng cụ chứa mẫu thích hợp cho từng mẫu cân. Khối lượng dụng cụ chứa cộng khối lượng mẫu cân phải không vượt quá trọng tải tối đa của cân. Kích cỡ, hình dáng của dụng cụ chứa phải phù hợp với đĩa cân và không gian buồng cân để không ảnh hưởng đến các thao tác cân. Quan trọng là dụng cụ chứa mẫu phải sạch và khô.

Cần sử dụng găng tay, kẹp gấp và các dụng cụ để lấy các dụng cụ chứa vì mồ hôi từ tay có thể ảnh hưởng tới khối lượng cân.

Thuyền cân thường được sử dụng nhiều nhất vì nó vừa là dụng cụ chứa vừa là phễu giúp chuyển dễ dàng mẫu cân

vào bình. Thuyền cân có nhiều cỡ khác nhau, nên chọn cỡ phù hợp cho từng trường hợp.

Giấy cân thường sử dụng để cân chất rắn. Giấy cân được cầm bằng tay, phải cẩn thận để tránh làm rơi, đổ mẫu cân.

Các phương pháp cân

Những phương pháp sau đây thường được sử dụng và cho kết quả phân tích tốt.

Phương pháp 1

Cân trừ bì: Đặt dụng cụ chứa rỗng lên chính giữa đĩa cân và nhấn phím cân trừ bì để khối lượng của dụng cụ chứa không hiển thị nữa (giá trị 0). Cho mẫu cân vào dụng cụ chứa và ghi nhận khối lượng mẫu cân. Chuyển lượng mẫu cân vào bình định mức rồi cân lại dụng cụ chứa ban đầu. (Chú ý không thay đổi sự cài đặt cân trừ bì của cân giữa 2 lần cân này). Khối lượng đọc được ở lần cân thứ 2 chính là lượng mẫu thử không chuyển hết vào bình định mức (còn dính lại trên dụng cụ chứa mẫu cân) và được trừ vào khối lượng mẫu cân đọc được ở lần cân thứ nhất để xác định khối lượng mẫu thử đã được chuyển vào bình.

Phương pháp 2

Cân không trừ bì: Cho mẫu thử vào dụng cụ chứa và đặt lên chính giữa đĩa cân. Ghi nhận khối lượng cân và chuyển mẫu thử vào bình định mức, cân lại dụng cụ chứa ban đầu. Khối lượng đọc được ở lần cân thứ 2 là tổng khối lượng của dụng cụ chứa mẫu và lượng mẫu cân không được chuyển hết vào bình (còn dính lại trên dụng cụ chứa mẫu cân). Hiệu của khối lượng cân ban đầu và khối lượng cân lần 2 là khối lượng mẫu thử đã chuyển vào bình định mức.

Phương pháp 3

Phương pháp này được xem như là phương pháp chuyển toàn lượng. Mẫu cân được cho vào dụng cụ chứa đã cân bì, xác định khối lượng mẫu cân bởi sự chênh lệch giữa khối lượng cân đọc được và khối lượng cân bì. Toàn bộ lượng mẫu thử được chuyển hết vào bình bằng cách dùng một dung môi để hoà tan mẫu và tráng dụng cụ chứa mẫu.

Quy trình xử lý mẫu cân an toàn

Các thao tác an toàn khi cân: Người tiến hành cân cần đọc kỹ các thông báo về mẫu thử, các tài liệu an toàn về hóa chất, nguyên vật liệu... trước khi cân.

Những nguyên liệu, hóa chất nguy hiểm (chất độc, chất ăn mòn, chất dễ cháy, chất nổ, chất gây dị ứng, chất phóng xạ...) phải đặt ở nơi riêng biệt, kín, có hệ thống lọc khí thích hợp.

Sử dụng khẩu trang che mũi và miệng để ngăn ngừa việc hít các bụi hóa chất. Cần dùng găng tay để tránh sự tiếp xúc với da và cũng để ngăn ngừa hơi ẩm, mồ hôi bám trên dụng cụ chứa khi cân mẫu. Trong suốt quá trình cân, người tiến hành cân phải tiếp xúc với các chất liệu nguyên chất ở nồng độ cao, do đó phải luôn luôn quan tâm đến biện pháp bảo đảm an toàn.

Quy trình cân được thực hiện với nhiều loại mẫu thử khác nhau như chất rắn, bột mịn, chất lỏng (nhớt hoặc không nhớt, bay hơi hoặc không bay hơi)... nên mỗi loại mẫu thử yêu cầu những thao tác riêng biệt.

Cân chất rắn

Chất rắn có 2 dạng: Dạng khối lượng lớn có bột hay không có bột trên bề mặt và dạng bột mịn hay những tinh thể nhỏ. Khi cân chất rắn có khối lượng lớn và có bột trên bề mặt, dùng giấy cân để bảo vệ cân, còn không có bột trên bề mặt, có thể đặt trực tiếp lên đĩa cân (ví dụ: viên bao).

Mẫu chất rắn phải lấy bằng kẹp gấp, không lấy bằng tay.

Hiện tượng tích điện:

Dạng bột mịn có xu hướng tích điện, làm các tiểu phân bay xung quanh. Hiện tượng này phải được loại bỏ trước khi cân. Có thể dùng thiết bị chống tích điện để làm giảm đến mức tối thiểu vấn đề này.

Hiện tượng tích điện phụ thuộc vào độ ẩm tương đối của phòng thí nghiệm. Trong điều kiện nào đó, có thể sự tích điện được tạo ra bởi loại quần áo mà người thao tác cân đang mặc. Điện tích này khi phóng điện gây những sai số lớn về khối lượng.

Quy trình cân:

Đặt dụng cụ chứa mẫu lên đĩa cân, đóng cửa buồng cân và cân theo chỉ dẫn "Các phương pháp cân". Cần thận trọng thêm mẫu cân dạng bột bằng một thìa xúc vào dụng cụ chứa cho tới khi đạt lượng mong muốn. Thao tác cẩn thận để tránh rơi vãi ra ngoài. Đóng cửa buồng cân và ghi khối lượng mẫu cân ngay khi cân ổn định.

Sự rơi vãi:

Nếu chất rắn bị rơi vãi ra ngoài, lấy dụng cụ chứa ra, loại bỏ hoàn toàn các chất liệu rơi đổ trên cân, làm sạch bên trong, bên ngoài buồng cân, bàn cân, tránh để người sau tiếp xúc với các chất liệu rơi vãi.

(Chú ý: Không cho trở lại lọ chứa mẫu các mẫu cân dư).

Cân chất lỏng

Chất lỏng có thể bay hơi hoặc không bay hơi và nhớt hoặc không nhớt. Mỗi loại có những chú ý riêng biệt.

Cân theo hướng dẫn "Các phương pháp cân", chú ý thêm các phần sau:

Chất lỏng luôn luôn được cân vào đồ đựng (chứa) có nắp để tránh sự bay hơi. Tốt nhất chất lỏng nên được cho vào bình cân ở bên ngoài cân để tránh đổ tràn trên cân.

(Chú ý: Chất lỏng đổ tràn trong buồng cân có thể gây những hư hỏng nghiêm trọng cho cân và khó lau chùi sạch).

Chất lỏng không nhớt có thể được lấy bằng một pipet Pasteur có gắn một quả bóp cao su nhỏ như ống nhỏ giọt. Chất lỏng được rót vào bình, đậy nắp và đặt lên cân.

Một lượng nhỏ chất lỏng nhớt có thể được lấy bằng cách chạm một đầu thủy tinh tới bề mặt chất lỏng rồi cẩn thận chạm que này tới thành bình cân mẫu để một ít chất lỏng được chuyển qua.

Cân các chất liệu ăn mòn

Nhiều hóa chất có tính ăn mòn, như các muối. Các chất liệu có tính ăn mòn không nên để rơi đổ trên đĩa cân hoặc bên trong buồng cân. Cần thận trọng khi cân các chất liệu này.

Kết luận

Thực hiện chặt chẽ theo các quy trình chỉ dẫn trên, nhân viên phòng thí nghiệm có thể loại bỏ nhiều sai số trong quá trình tiến hành cân. Tuy nhiên, phải có cán bộ kỹ thuật có

chuyên môn bảo trì và hiệu chuẩn cân định kỳ. Phải dùng các quả cân chuẩn đã được liên kết với chuẩn quốc gia. Điều này là rất quan trọng.

3.2 NHIỆT KẾ

Các thiết bị đo nhiệt độ thích hợp cho các thử nghiệm trong Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc phải đạt các yêu cầu kỹ thuật trong hệ thống nhiệt kế chuẩn quốc gia.

Các thiết bị đo nhiệt độ có thể là nhiệt kế thủy tinh - chất lỏng, nhiệt kế hiển số hoặc nhiệt kế đồng hồ.

Nhiệt kế hiển số hoặc nhiệt kế đồng hồ gồm một đầu dò nhiệt độ. Đầu dò được gắn với một đồng hồ đo có khả năng chuyển tín hiệu ôm hoặc milivôn sang đại lượng nhiệt độ. Phần đầu dò nhiệt độ được nhúng ngập trong môi trường cần đo được làm bằng chất liệu trơ.

Việc chuẩn hóa nhiệt kế được thực hiện định kỳ theo tần suất xác định nổi với thang nhiệt độ chuẩn quốc gia. Cần chú ý điều kiện, thiết bị cụ thể được sử dụng để chọn thiết bị đo nhiệt độ phù hợp.

Các nhiệt kế thủy tinh - chất lỏng được chuẩn hóa theo 3 cách: Nhúng sâu toàn phần, nhúng từng phần hoặc nhúng sâu hoàn toàn. Vì vậy khi sử dụng các nhiệt kế này cần tuân thủ theo điều kiện đã được chuẩn hóa. Việc chuẩn hóa các nhiệt kế được thực hiện định kỳ theo tần suất xác định nổi với thang nhiệt độ chuẩn quốc gia.

Việc chuẩn hóa nhiệt kế thủy tinh - chất lỏng loại nhúng sâu toàn phần được thực hiện bằng cách nhúng sâu nhiệt kế vào môi trường đo tới phần trên của cột chất lỏng, phần còn lại của thân nhiệt kế ở nhiệt độ phòng.

Việc chuẩn hóa nhiệt kế thủy tinh - chất lỏng loại nhúng từng phần được thực hiện bằng cách nhúng nhiệt kế ở một độ sâu cố định, phần thân nhiệt kế còn lại ở nhiệt độ phòng. Loại nhiệt kế này được khắc vạch quy định độ sâu được nhúng trong môi trường đo nhiệt độ.

Việc chuẩn hóa nhiệt kế thủy tinh - chất lỏng loại nhúng sâu hoàn toàn được thực hiện bằng cách cho toàn bộ nhiệt kế vào môi trường cần đo nhiệt độ.

Nếu cần sử dụng trong những điều kiện khác với điều kiện chuẩn hóa thì cần phải hiệu chỉnh để có giá trị đo đúng.

3.3 DỤNG CỤ ĐO THỂ TÍCH

Hầu hết các dụng cụ đo thể tích dùng trong phân tích được chuẩn hóa dung tích ở 20 °C, mặc dù nhiệt độ phòng thí nghiệm và nhiệt độ quy định cho các phép thử và định lượng thường là 25 °C. Sự khác nhau này không quan trọng, miễn là nhiệt độ phòng thí nghiệm tương đối hằng định. Khi cần tiến hành thử nghiệm đúng ở 20 °C thì yêu cầu này được ghi trong chuyên luận riêng.

Để giảm thiểu sai số phép đo thể tích, dụng cụ đo thể tích, nguyên vật liệu và dung môi dùng pha chế dung dịch, khu vực pha chế và việc điều chỉnh thể tích cuối cùng phải được duy trì ở cùng một nhiệt độ.

Để đạt được độ chính xác yêu cầu trong nhiều phương pháp định lượng có các phép đo thể tích chính xác, cần lựa chọn và dùng các dụng cụ đo thể tích thích hợp. Chọn kích cỡ của buret phù hợp sao cho thể tích dung dịch chuẩn độ không ít hơn 30 % thể tích danh định của buret. Muốn đo thể tích một dung dịch chuẩn độ dưới 10 ml thì phải dùng buret 10 ml hoặc microburet.

Dùng sai thể tích đối với các loại bình định mức, các pipet chính xác có bầu, pipet chia độ và các buret là dụng cụ đã được Tổ chức Tiêu chuẩn hóa quốc tế (ISO) thừa nhận và được ghi trong các bảng kèm theo dưới đây.

Khi sử dụng các pipet chính xác có bầu và pipet chia độ được chuẩn hóa theo kiểu đổ ra "TD" (to deliver) phải giữ pipet thẳng đứng và đầu pipet phải chạm vào thành bình hứng rồi cho chất lỏng chảy ra.

Các số đọc thể tích trên buret phải được lượng giá tới 0,01 ml đối với buret 25 ml và 50 ml, và tới 0,005 ml đối với buret 5 ml và 10 ml.

Trong các trường hợp đặc biệt như đo thể tích chất lỏng nhớt như sirô, dùng pipet được chuẩn hóa theo kiểu đổ vào "TC" (to contain) hoặc bình định mức. Sau khi đã đổ chất lỏng ra, phải rửa sạch thành trong của dụng cụ và gộp nước rửa vào phần chất lỏng đã lấy.

Bình định mức

Dung tích (ml)	Sai số cho phép (ml)
5	± 0,025
10	± 0,025
25	± 0,04
50	± 0,06
100	± 0,10
200	± 0,15
250	± 0,15
500	± 0,25
1000	± 0,40
2000	± 0,60

Pipet chính xác có bầu (kiểu đổ ra)

Dung tích (ml)	Sai số cho phép (ml)
0,5	± 0,005
1	± 0,007
2	± 0,01
5	± 0,015
10	± 0,02
20	± 0,03
25	± 0,03
50	± 0,05
100	± 0,08
200	± 0,10

Pipet chia độ

Dung tích (ml)	Sai số cho phép (ml)
1	± 0,006
2	± 0,01
5	± 0,03
10	± 0,05
25	± 0,1

Buret

Thể tích xác định (ml)	Phân độ (ml)	Sai số cho phép (ml)
10 (micro buret)	0,02	± 0,02
25	0,10	± 0,03
50	0,10	± 0,05

3.4 PHẪU LỌC THỦY TINH XÓP

Bảng 3.4.1 - Đường kính lỗ xóp của phễu lọc thủy tinh xóp

Đường kính lỗ xóp (μm)	Cách dùng chính
Nhỏ hơn 2,5	Lọc vi khuẩn
4 đến 10	Lọc cực mịn, phân tách các vi sinh vật có đường kính lớn.
10 đến 40	Lọc dùng trong phân tích, lọc thủy ngân rất mịn, phân tán rất nhỏ các khí.
40 đến 100	Lọc mịn, lọc thủy ngân, phân tán nhỏ các khí.
100 đến 160	Lọc các chất thô, phân tán và rửa khí, làm giá lọc cho các vật liệu lọc khác.
160 đến 500	Lọc các chất rất thô, phân tán và rửa khí.

Bảng 3.4.2 - Bảng so sánh độ xóp của các phễu lọc xóp

Số độ xóp	Đường kính tối đa của các lỗ xóp (μm)	Đức	Pháp	Anh
1,6	dưới 1,6	5f	-	-
-	1 đến 2,5	5	-	5
4	1,6 đến 4	-	-	-
-	4 đến 6	-	5	-
10	4 đến 10	4f	-	4
16	10 đến 16	4	4	-
40	16 đến 40	3	3	3
-	40 đến 50	-	-	2
100	40 đến 100	2	2	-
-	100 đến 120	-	-	1
160	100 đến 160	1	1	-
-	150 đến 200	0	0	-
250	160 đến 250	-	-	-
-	200 đến 500	-	00	-

(Những giới hạn chỉ dẫn là gần đúng)

3.5 CỖ BỘT VÀ RÂY

Bột

Các cỡ bột được quy định dựa vào các số của rây. Trừ khi có chỉ dẫn khác, khi quy định dùng một rây để xác định cỡ bột thì không được có dưới 97 % khối lượng thuốc bột qua được cỡ rây đó. Khi quy định dùng hai rây để xác định cỡ bột thì để một rây lên trên rây kia và tiến hành rây; không được có dưới 95 % khối lượng thuốc bột qua rây có số rây cao hơn và không được quá 40% khối lượng thuốc bột qua rây có số rây thấp hơn.

Người ta dùng những ký hiệu sau đây để quy định các cỡ bột: Bột thô (1400/ 355) là bột mà không ít hơn 95 % phần từ qua được rây số 1400 và không quá 40 % qua được rây số 355. Bột nửa thô (710/ 250) là bột mà không ít hơn 95 % phần từ qua được rây số 710 và không quá 40 % qua được rây số 250.

Bột nửa mịn (355/ 180) là bột mà không ít hơn 95 % phần từ qua được rây số 355 và không quá 40 % qua được rây số 180.

Bột mịn (180/ 125) là bột mà không ít hơn 95 % phần từ qua được rây số 180 và không quá 40 % qua được rây số 125.

Bột rất mịn (125/ 90) là bột mà không ít hơn 95 % phần từ qua được rây số 125 và không quá 40 % qua được rây số 90.

Rây

Lưới rây có thể dệt bằng sợi kim loại hoặc sợi các vật liệu khác thích hợp và dệt thành những mắt vuông. Lưới của rây dùng để rây bột thuốc được phân loại bằng những con số, chúng biểu thị kích thước lỗ rây quy định tính bằng milimét (Bảng 3.5). Vật liệu để làm lưới rây không được tạo ra một phản ứng nào với những bột đem rây. Khi rây, tránh kéo dài thời gian vì sẽ làm tăng độ mịn của bột. Khi không dùng vào mục đích phân tích, có thể dùng rây có mắt tròn, có đường kính trong bằng 1,25 lần chiều rộng mắt vuông của rây có cỡ tương ứng.

Bảng 3.5 - Cỡ rây (kim loại)

Số rây*	Cỡ mắt rây (mm)	Đường kính sợi dây (mm)
2000	2,000	0,900
1400	1,400	0,710
710	0,710	0,450
500	0,500	0,315
355	0,355	0,224
250	0,250	0,160
180	0,180	0,125
150	0,150	0,100
125	0,125	0,090
90	0,090	0,063
75	0,075	0,050
45	0,045	0,032

Đối với bột thô hoặc nửa thô thì lấy 25 g tới 100 g bột để thử. Cho vào rây thích hợp, lắc rây theo chiều ngang quay tròn ít nhất 20 min và rây tới khi xong. Cân đúng số lượng còn lại ở trên rây và số thu được trong hộp hứng.

Đối với bột nửa mịn, mịn hay rất mịn thì tiến hành như bột thô, nhưng mẫu bột lấy để thử không quá 25 g và lắc rây ít nhất 30 min rồi rây tới khi xong.

Trường hợp phải rây những chất có dầu hay những bột khác có xu hướng bít mắt rây thì trong quá trình rây thỉnh thoảng chải cẩn thận mắt rây, tách rời những đồng tụ lại khi rây.

* Số rây biểu thị kích thước đo bằng μm của mắt rây.

Những quy định mắt rây bằng sợi kim loại chủ yếu được lựa chọn trong tiêu chuẩn ISO 565 - 1975.

Ghi chú: Đối với được liệu có khi cần dùng các cỡ rây to hơn so với bảng cỡ rây trên, trong trường hợp này chỉ cần nêu rõ kích thước của cỡ mắt rây.

3.6 RỬA DỤNG CỤ THỦY TINH

Độ sạch của dụng cụ thủy tinh đem dùng có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả của một phép thử hoặc một phép định lượng. Các dụng cụ thủy tinh như cốc vại có mỏ, buret, pipet, bình nón, bình cầu v.v... đều phải thật sạch, đặc biệt là khi được dùng để định lượng bằng phương pháp vi sinh vật, thử chất gây sốt, hoặc khi dùng để lấy một thể tích nhỏ chất lỏng hay dung dịch.

Một trong những chất làm sạch dụng cụ thủy tinh tốt nhất là acid nitric đun nóng. Hỗn hợp acid cromic cũng là tác nhân làm sạch rất tốt dùng để loại sạch chất hữu cơ khỏi bề mặt thủy tinh mà không phải đun nóng. Hỗn hợp này được pha chế bằng cách hòa tan 200 g *natri dicromat* (TT) hoặc *kali dicromat* (TT) vào khoảng 100 ml nước, làm lạnh trong nước đá rồi thêm từ từ 1500 ml *acid sulfuric* (TT), vừa thêm vừa khuấy. Việc pha chế phải được thực hiện trong cốc vại bằng thủy tinh boro-silicat và cần đeo kính bảo hộ khi thêm acid. Hỗn hợp acid cromic là chất rất ăn mòn và hút nước, vì thế, phải được bảo quản trong những bình thủy tinh có nút mài và để ở nơi an toàn. Khi để yên, tinh thể acid cromic có thể được tạo thành, tách ra khỏi hỗn hợp, khi đó cần gạn để loại đi. Nếu hỗn hợp acid cromic có màu xanh thì không dùng nữa.

Dụng cụ thủy tinh được xử lý bằng hỗn hợp acid cromic cần phải rửa bằng nước rất nhiều lần để tránh acid cromic bị hút bám lên bề mặt. Không dùng hỗn hợp này để làm sạch những bình đựng dùng cho các phép đo quang học.

Mặc dù hỗn hợp acid cromic là chất làm sạch rất tốt, nhưng nó cũng được khuyến cáo không sử dụng ở nhiều phòng thí nghiệm vì acid cromic có trong danh sách chất thải độc hại nguy hiểm của cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (EPA). Để rửa sạch dụng cụ thủy tinh, người ta còn có thể dùng những dung dịch tẩy rửa tổng hợp hoặc những hóa chất tẩy có tính kiềm như *trinitri phosphat*; dùng những chất này cũng có yêu cầu phải rửa nhiều lần bằng nước.

Tất cả dụng cụ thủy tinh cuối cùng đều được tráng bằng nước cất và làm khô trước khi dùng.

PHỤ LỤC 4

4.1 PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ TỪ NGOẠI VÀ KHẢ KIẾN

Phương pháp quang phổ hấp thụ từ ngoại và khả kiến còn được gọi là phương pháp quang phổ hấp thụ điện từ, là một trong các phương pháp phân tích dựa trên sự hấp thụ bức xạ điện từ.

Xác định độ hấp thụ

Độ hấp thụ A của một dung dịch là logarit thập phân của nghịch đảo độ truyền quang T khi cho ánh sáng đơn sắc đi qua. Nó được biểu thị bằng phương trình:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Trong đó:

I là cường độ ánh sáng đơn sắc sau khi đã truyền qua dung dịch;

I_0 là cường độ ánh sáng đơn sắc tới;

T là độ truyền quang.

Ngoại trừ sự có mặt của các yếu tố lý - hóa học khác, độ hấp thụ A tỷ lệ với độ dài quang trình d của ánh sáng truyền qua dung dịch (bề dày lớp dung dịch) và nồng độ c của dung dịch chất khảo sát. Sự phụ thuộc này được biểu thị bằng phương trình:

$$A = \epsilon \times c \times d$$

Trong đó:

ϵ là độ hấp thụ mol;

d được biểu thị bằng cm;

c biểu thị bằng mol/lít.

Độ hấp thụ của dung dịch chất tan ở nồng độ 1 % (kl/tt) hay 10 g/l trong một cốc đo có chiều dày 1 cm và đo ở một bước sóng xác định là độ hấp thụ riêng của chất tan và được ký hiệu là A (1 %, 1 cm). Độ hấp thụ riêng của chất tan được tính bằng công thức:

$$A (1\%, 1 \text{ cm}) = \frac{10 \times \epsilon}{M}$$

Trong đó:

M là khối lượng phân tử của chất thử.

Độ hấp thụ riêng của một chất trong một dung môi xác định và đo ở một bước sóng xác định là một đặc tính của chất đó. Trừ những chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, người ta đo độ hấp thụ ở độ dài sóng quy định và sử dụng quang trình dài 1 cm ở 19 °C đến 21 °C.

Ngoại trừ các chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, các phép đo được tiến hành so sánh với dung môi hoặc với hỗn hợp dung môi đã dùng để chuẩn bị mẫu thử. Độ hấp thụ của dung môi hoặc hỗn hợp dung môi đo đối chiếu với không khí không được vượt quá 0,4 và tốt nhất là dưới 0,2. Khi vẽ phổ hấp thụ, đặt độ hấp thụ hoặc hàm số của độ hấp thụ

trên trục tung và đặt độ dài sóng hoặc hàm số của độ dài sóng trên trục hoành.

Khi một chuyên luận riêng đưa ra một trị số riêng lẻ cho vị trí của một cực đại, điều này được hiểu là trị số khảo sát được có thể lệch không quá ± 2 nm.

Thiết bị

Máy quang phổ thích hợp dùng cho việc đo phổ vùng từ ngoại và khả kiến bao gồm một hệ thống quang học có khả năng cung cấp ánh sáng đơn sắc trong dải từ 200 nm đến 800 nm và một thiết bị phù hợp để đo độ hấp thụ. Hai công đo dùng cho dung dịch thử và dung dịch đối chiếu cần phải có đặc tính quang học như nhau. Khi đo trên máy tự ghi hai chùm tia, cốc đựng dung dịch đối chiếu được đặt ở bên có chùm tia đối chiếu đi qua.

Kiểm tra độ dài sóng

Kiểm tra thang độ dài sóng bằng cách sử dụng cực đại hấp thụ của dung dịch holmi perchlorat. Vạch phổ của đèn nguồn hydro hoặc đèn deuterium và các vạch phổ của đèn hơi thủy ngân được chỉ ra ở dưới đây:

Giới hạn sai lệch cho phép là ± 1 nm ở vùng từ ngoại và ± 3 nm ở vùng khả kiến.

241,15 nm (Ho)	404,66 nm (Hg)
253,70 nm (Hg)	435,83 nm (Hg)
287,15 nm (Ho)	486,00 nm (D β)
302,25 nm (Hg)	486,10 nm (H β)
313,16 nm (Hg)	536,30 nm (Ho)
334,15 nm (Hg)	546,07 nm (Hg)
361,50 nm (Ho)	576,96 nm (Hg)
365,48 nm (Hg)	579,07 nm (Hg)

Kiểm tra độ hấp thụ

Kiểm tra độ hấp thụ của dung dịch kali dicromat ở các độ dài sóng chỉ ra ở Bảng 4.1. Trong bảng mỗi độ dài sóng có một giá trị chính xác của độ hấp thụ riêng A (1 %, 1 cm) và các giới hạn cho phép. Dung sai độ hấp thụ là 0,01.

Để kiểm tra độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm, 257 nm, 313 nm và 350 nm, dùng một dung dịch kali dicromat được chuẩn bị theo cách sau: Hòa tan 57,0 mg đến 63,0 mg kali dicromat đã được sấy ở 130 °C đến khối lượng không đổi trong một lượng *dung dịch acid sulfuric 0,005 M* để tạo thành vừa đủ 1000 ml dung dịch. Để kiểm tra độ hấp thụ ở bước sóng 430 nm, hòa tan 57,0 mg đến 63,0 mg kali dicromat đã được sấy ở 130 °C đến khối lượng không đổi trong một lượng *dung dịch acid sulfuric 0,005 M* để tạo thành vừa đủ 100 ml dung dịch.

Bảng 4.1

Độ dài sóng (nm)	A (1 %, 1 cm)	Giới hạn cho phép
235	124,5	122,9 - 126,2
257	144,5	142,8 - 146,2
313	48,6	47,0 - 50,3
350	107,3	105,6 - 109,0
430	15,9	15,7 - 16,1

Giới hạn ánh sáng lạc

Ánh sáng lạc có thể được phát hiện ở độ dài sóng đã cho bằng kính lọc thích hợp, hoặc dung dịch hóa chất thích hợp, ví dụ độ hấp thụ của *dung dịch kali clorid 1,2 % (TT)* trong một cốc đo có quang trình dài 1 cm phải tăng rõ rệt giữa bước sóng 220 nm và bước sóng 200 nm và phải lớn hơn 2,0 ở độ dài sóng 198 nm khi so sánh với *nước cất*.

Độ phân giải (cho phân tích định tính)

Khi có quy định trong chuyên luận, tiến hành kiểm tra độ phân giải của máy như sau: Ghi phổ của *dung dịch toluen 0,02 % (tt/tt)* trong *hexan (TT)*. Giá trị tối thiểu của tỷ số giữa độ hấp thụ ở cực đại 269 nm và độ hấp thụ ở cực tiểu 266 nm được quy định trong chuyên luận riêng.

Độ rộng khe phổ (cho phân tích định lượng)

Để tránh sai số gây ra bởi độ rộng khe phổ, khi sử dụng một máy có độ rộng khe phổ thay đổi ở độ dài sóng đã chọn thì độ rộng khe phổ phải nhỏ so với nửa độ rộng của băng hấp thụ. Nhưng độ rộng này phải đủ lớn để thu được giá trị cao của cường độ ánh sáng tới I_0 và việc thu hẹp độ rộng khe phổ đó phải không làm cho độ hấp thụ đọc được tăng lên.

Cốc đo (cồng đo)

Dung sai về độ dài quang trình của cốc đo là $\pm 0,005$ cm. Khi đã được nạp đầy cùng một dung môi, các cốc đo có ý định sử dụng để chứa dung dịch mẫu thử và để chứa dung dịch mẫu trắng phải có độ truyền quang như nhau. Nếu tiêu chuẩn này không được đáp ứng thì cần có sự hiệu chỉnh thích hợp.

Các cốc đo cần được làm sạch và thao tác thận trọng.

Phương pháp phổ đạo hàm

Phương pháp phổ đạo hàm là sự chuyển dạng của phổ hấp thụ sang phổ đạo hàm bậc một, bậc hai hoặc bậc cao hơn. Phổ đạo hàm bậc một là đồ thị của gradient đường cong hấp thụ (tốc độ của sự thay đổi độ hấp thụ theo độ dài sóng, $dA/d\lambda$) theo độ dài sóng. Phổ đạo hàm bậc hai là đồ thị của độ cong của phổ hấp thụ ($d^2A/d\lambda^2$) theo độ dài sóng. Nếu độ hấp thụ tuân theo định luật Lambert Beer, đạo hàm bậc hai tại bất kỳ độ dài sóng λ nào cũng liên quan tới nồng độ bởi phương trình sau:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A(1\%, 1\text{cm})}{d\lambda^2} \times c \times d$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ ở bước sóng;

A (1 %, 1cm) là độ hấp thụ riêng ở bước sóng λ ;

c là nồng độ của chất hấp thụ biểu thị dưới dạng % (kl/tt);

d là bề dày của lớp chất hấp thụ tính bằng cm.

Thiết bị

Là một máy quang phổ đáp ứng các yêu cầu về kiểm tra độ dài sóng, kiểm tra độ hấp thụ đã nói ở trên và được ghép nối thêm một modul vi phân trở - tụ cho tín hiệu tương tự, hoặc một vi phân kế kỹ thuật số, hoặc một thiết bị khác

thích hợp, tạo ra được phổ đạo hàm bậc hai. Máy được sử dụng theo sự hướng dẫn của hãng sản xuất.

Một vài phương pháp tạo phổ đạo hàm bậc hai đưa đến sự trôi sóng so với vị trí của độ dài sóng ở phổ bậc không, điều này cần được tính đến khi cần thiết. Trừ khi có những chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, độ rộng khe phổ của máy phải được điều chỉnh như chỉ dẫn trong mục độ rộng khe phổ ở trên.

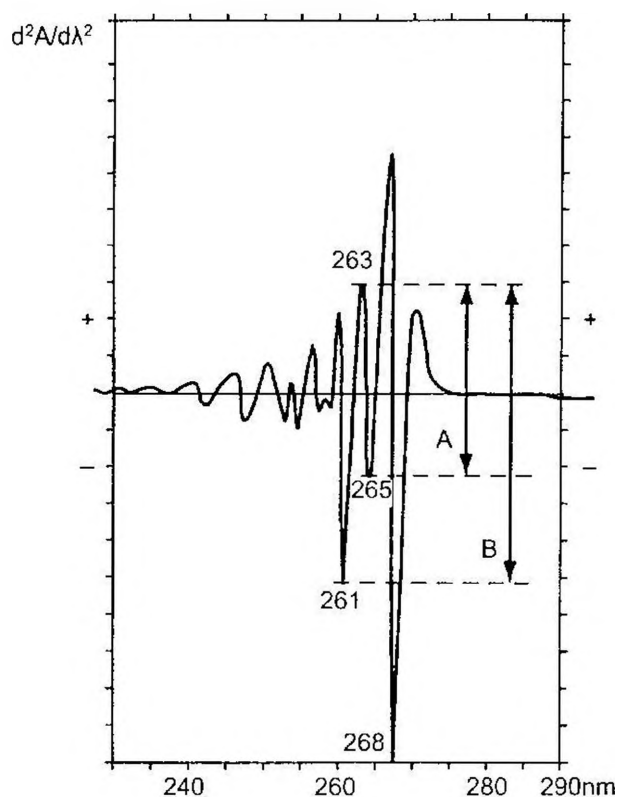
Các công đo phải đáp ứng các yêu cầu quy định trong mục Công đo.

Nhiệt độ của tất cả các dung dịch dùng trong phép thử không được khác nhau quá 0,5 °C.

Độ phân giải

Khi được quy định trong chuyên luận riêng, ta ghi phổ đạo hàm bậc hai của *dung dịch toluen 0,020 % (tt/tt)* trong *methanol (TT)* trong dải độ dài sóng từ 255 nm đến 275 nm, dùng *methanol (TT)* trong công đôi chiếu. Phổ phải thấy rõ một cực trị âm nhỏ ở giữa hai cực trị âm lớn trong khoảng 261 nm và 268 nm như Hình 4.1.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tỷ lệ A/B (xem Hình 4.1) không được nhỏ hơn 0,2.



Hình 4.1

4.2 PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI

Máy quang phổ

Máy quang phổ hồng ngoại dùng để ghi phổ trong vùng từ 4000 cm^{-1} đến 650 cm^{-1} (từ $2,5\text{ }\mu\text{m}$ đến $15,4\text{ }\mu\text{m}$) hoặc trong một vài trường hợp tới 200 cm^{-1} ($50\text{ }\mu\text{m}$). Máy quang phổ chuyển dạng Fourier sử dụng bức xạ đa sắc và tính toán phổ theo dải tần số từ các dữ liệu gốc bằng chuyển dạng Fourier. Các máy quang phổ với hệ thống quang học tạo bức xạ đơn sắc trong vùng đo cũng có thể được sử dụng. Thông thường phổ được xem là hàm số của độ truyền quang T ; T là tỷ số của cường độ bức xạ truyền qua và cường độ bức xạ tới.

Độ hấp thụ ánh sáng (A) là logarit thập phân của nghịch đảo độ truyền quang.

$$A = \log_{10} \left(\frac{I}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Trong đó:

$T = I/I_0$;

I_0 là cường độ ánh sáng tới;

I là cường độ ánh sáng truyền qua.

Chuẩn bị mẫu

Để ghi phổ truyền quang hay phổ hấp thụ, chất thử được chuẩn bị theo một trong các phương pháp sau:

Chất lỏng

Đo phổ của một chất lỏng dưới dạng phim giữa 2 tấm phẳng trong suốt đối với bức xạ hồng ngoại hay trong cốc đo có bề dày thích hợp và cũng trong suốt đối với bức xạ hồng ngoại.

Các chất lỏng hay chất rắn chuẩn bị dưới dạng dung dịch. Chuẩn bị dung dịch thử với dung môi thích hợp. Chọn nồng độ và bề dày của cốc đo thích hợp để có thể ghi được một phổ tốt. Nói chung, có thể thu được kết quả tốt với nồng độ từ 1,0 % đến 10 % và bề dày của cốc đo từ 0,5 mm đến 0,1 mm.

Các chất rắn

Đo phổ của chất rắn được phân tán trong một chất lỏng (bột nhão) hay trong một chất rắn thích hợp (đĩa halid). Nếu có quy định trong chuyên luận riêng, làm một phim mỏng từ khối chất rắn nóng chảy giữa hai tấm phẳng trong suốt với bức xạ hồng ngoại.

Bột nhão

Nghiền một lượng nhỏ chất thử với một lượng tối thiểu parafin lỏng hoặc chất lỏng khác phù hợp. Dùng từ 5 mg đến 10 mg chất thử là vừa đủ để tạo một bột nhão phù hợp. Ép bột nhão giữa hai tấm phẳng trong suốt với bức xạ hồng ngoại.

Viên nén (đĩa halid)

Trừ khi có chỉ dẫn khác, nghiền 1 mg đến 2 mg chất thử với 300 mg đến 400 mg bột mịn kali bromid (IR) hoặc kali clorid (IR) đã sấy khô. Lượng này thường đủ để tạo một viên nén có đường kính 10 mm đến 15 mm và cho phổ có cường độ phù hợp. Nghiền hỗn hợp cẩn thận và rai đều nó trong một khuôn thích hợp. Nén khuôn có hỗn hợp chất thử tới áp suất khoảng 800 MPa trong điều kiện

chân không. Một vài yếu tố có thể tạo nên viên nén không tốt như: Nghiền không kỹ hay nghiền quá kỹ, độ ẩm, các tạp chất trong môi trường phân tán. Viên nén không đạt yêu cầu nếu kiểm tra bằng mắt thấy viên nén không đồng nhất và không trong suốt hay độ truyền quang ở khoảng 2000 cm^{-1} ($5\text{ }\mu\text{m}$) nhỏ hơn 60 % khi không có băng hấp thụ đặc hiệu ở vùng này và không có bù trừ bên tia đối chiếu, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Các chất khí

Ghi phổ các khí trong cốc đo trong suốt với bức xạ hồng ngoại và có quang trình 50 mm đến 100 mm. Đối với các chất khí có hệ số hấp thụ hồng ngoại nhỏ hoặc có ở dạng vết, ta dùng các cốc đo có hệ thống gương, tạo nên sự phản xạ bên trong cốc nhiều lần và do đó có thể đạt quang trình 1 m hoặc thậm chí đến 10 m hoặc hơn nữa.

Tạo chân không trong cốc đo và nạp đầy khí đến áp suất yêu cầu nhờ một nút xoay hoặc một van kim với đường chuyển khí thích hợp nối cốc đo với bình chứa khí cần khảo sát. Nếu cần điều chỉnh áp lực trong cốc đo đến áp suất khí quyển, dùng một khí trong suốt với bức xạ hồng ngoại, ví dụ khí nitrogen hay argon. Để tránh ảnh hưởng sự hấp thụ của hơi nước, carbon dioxyd hoặc những khí khác có mặt trong bầu khí quyển, đặt một cốc đo tương tự như cốc đo đựng khí cần khảo sát bên tia đối chiếu. Cốc đo này đã được hút chân không hoặc được nạp khí trong suốt với bức xạ hồng ngoại.

Ghi phổ bằng phản xạ toàn phần suy giảm

Đặt mẫu thử tiếp xúc trực tiếp với lăng kính phản xạ toàn phần suy giảm.

Ghi phổ bằng phản xạ nhiều lần

Khi có chỉ định trong chuyên luận riêng, chuẩn bị chất thử theo các phương pháp sau:

Dung dịch

Hòa tan chất thử trong dung môi thích hợp theo những điều kiện đã được quy định trong chuyên luận riêng. Làm bay hơi dung dịch trên tấm thali bromo-iodid hoặc tấm phẳng khác phù hợp.

Chất rắn

Đặt chất thử trên tấm thali bromo-iodid hoặc trên tấm phẳng khác phù hợp sao cho có sự tiếp xúc đồng đều.

Định tính

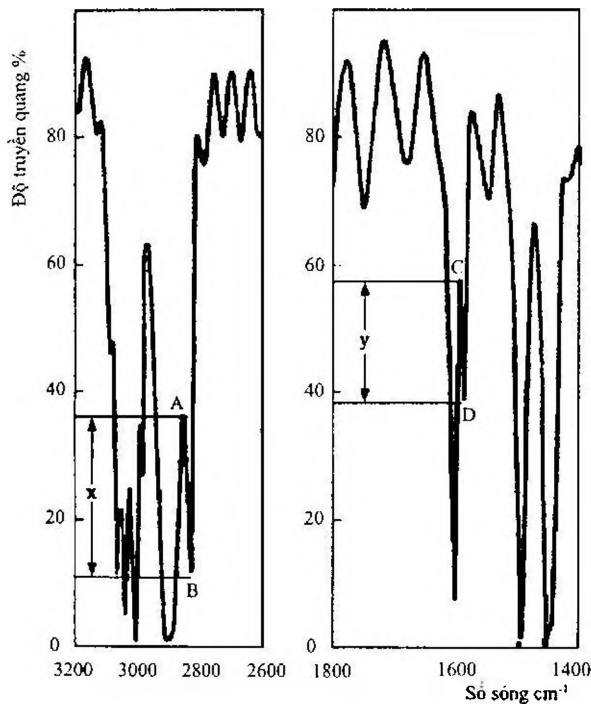
Định tính bằng các chất đối chiếu hóa học

Chuẩn bị chất thử và chất đối chiếu theo cùng một quy trình và ghi phổ từ 4000 cm^{-1} đến 650 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ đến $15,4\text{ }\mu\text{m}$) trong những điều kiện như nhau. Cực tiểu độ truyền qua (cực đại hấp thụ) trong phổ của chất thử và chất đối chiếu phải tương ứng về vị trí và cường độ. Khi phổ của chất thử và của chất đối chiếu ở dạng rắn có sự khác nhau về vị trí của cực tiểu độ truyền qua (cực đại hấp thụ), phải xử lý chất thử và chất đối chiếu theo cùng một cách sao cho chúng kết tinh hay tạo thành cùng dạng, hay tiến hành như mô tả trong chuyên luận riêng rồi mới ghi phổ.

Định tính bằng phổ đối chiếu

Kiểm tra độ phân giải của máy

Ghi phổ của phim polystyren có bề dày 35 μm . Hiệu số x (Hình 4.2) giữa phần trăm truyền quang tại cực đại truyền qua A ở 2870 cm^{-1} ($3,48\text{ }\mu\text{m}$) và tại cực tiểu truyền qua B ở 2851 cm^{-1} ($3,51\text{ }\mu\text{m}$) phải lớn hơn 18. Hiệu số y giữa phần trăm truyền quang ở cực đại truyền qua C tại 1589 cm^{-1} ($6,29\text{ }\mu\text{m}$) và ở cực tiểu độ truyền qua D tại 1583 cm^{-1} ($6,32\text{ }\mu\text{m}$) phải lớn hơn 10.



Hình 4.2 - Phổ của polystyren dùng để kiểm tra độ phân giải

Kiểm tra thang số sóng

Có thể kiểm tra thang số sóng bằng cách dùng phim polystyren. Phim này có các cực tiểu truyền qua (cực đại hấp thụ) ở các số sóng (tính bằng cm^{-1}) như Bảng 4.2.

Bảng 4.2 - Cực tiểu độ truyền qua của phim polystyren và các giới hạn cho phép

Cực tiểu độ truyền qua (cm^{-1})	Giới hạn cho phép (cm^{-1})
3060,0	$\pm 1,5$
2849,5	$\pm 2,0$
1942,9	$\pm 1,5$
1601,2	$\pm 1,0$
1583,0	$\pm 1,0$
1154,5	$\pm 1,0$
1028,3	$\pm 1,0$

Phương pháp

Chuẩn bị chất thử theo chỉ dẫn đi kèm với phổ đối chiếu. Tiến hành trong điều kiện giống như khi kiểm tra độ phân giải, ghi phổ của chất thử và chồng phổ lên các băng của polystyren ở $2849,5\text{ cm}^{-1}$ ($3,51\text{ }\mu\text{m}$), $1601,2\text{ cm}^{-1}$ ($6,25\text{ }\mu\text{m}$) và $1028,3\text{ cm}^{-1}$ ($9,72\text{ }\mu\text{m}$). So sánh phổ chất thử với phổ đối chiếu và với các băng của polystyren như chỉ dẫn trên. Dùng các vị trí của băng polystyren để làm chuẩn, vị trí của các băng có giá trị trong phổ của chất thử và phổ đối chiếu phải tương ứng trong khoảng 0,5 % thang số sóng. Cường độ tương đối của các băng phải phù hợp giữa 2 phổ.

Phương pháp quang phổ cận hồng ngoại

Phương pháp quang phổ cận hồng ngoại là kỹ thuật đặc biệt hữu ích để định tính các chất hữu cơ. Mặc dù các phổ chỉ giới hạn trong các cộng hưởng của C - H, N - H, O - H và S - H, thường chúng cho các thông tin có giá trị. Tuy vậy, các phổ phụ thuộc vào một số thông số như kích thước hạt, tính đa hình, vết dung môi, độ ẩm ... mà những thông số này không thể luôn được kiểm soát. Vì lý do này, không thể so sánh trực tiếp phổ của chất thử với phổ đối chiếu mà cần xử lý dữ liệu bằng phương pháp toán học đã được thẩm định.

4.3 PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HUỖNH QUANG

Phương pháp quang phổ huỳnh quang là phương pháp phân tích dựa trên phép đo cường độ huỳnh quang phát ra từ một chất hóa học khi nó được kích thích do hấp thụ bức xạ từ ngoại, khả kiến hoặc các bức xạ điện từ khác. Trong phương pháp này, cường độ huỳnh quang của chất thử được so sánh với cường độ huỳnh quang của chất chuẩn đo trong cùng điều kiện.

Máy

Vận hành máy quang phổ huỳnh quang theo chỉ dẫn của hãng sản xuất máy.

Phương pháp tiến hành

Chuẩn bị dung dịch như mô tả trong chuyên luận, chuyển dung dịch vào cốc đo của máy quang phổ huỳnh quang và chiếu vào nó bức xạ kích thích với bước sóng đơn sắc đã được ghi trong chuyên luận. Đo cường độ huỳnh quang của dung dịch ở bước sóng phát huỳnh quang được ghi trong chuyên luận.

Để định lượng, đưa vào máy cốc đựng dung môi hoặc hỗn hợp dung môi dùng để hòa tan mẫu thử và điều chỉnh máy về điểm "0". Đưa dung dịch chuẩn đã được chuẩn bị như mô tả trong chuyên luận vào máy và điều chỉnh độ nhạy của máy để kết quả đọc trên thang đo lớn hơn 50. Nếu thay đổi khe sáng khi điều chỉnh lần thứ hai thì phải đặt lại điểm 0 và cường độ huỳnh quang của chuẩn cũng phải được đo lại. Cuối cùng, đưa mẫu thử vào máy, đo cường độ huỳnh quang và tính nồng độ của dung dịch thử theo công thức sau:

$$C_x = (I_x \times C_s) / I_s$$

Trong đó:

C_s và C_x lần lượt là nồng độ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử;

I_s và I_x lần lượt là cường độ huỳnh quang của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Khi cường độ huỳnh quang không thật sự tỷ lệ thuận với nồng độ, việc định lượng có thể được thực hiện dựa trên đồ thị chuẩn.

Trong một số trường hợp, phép định lượng có thể được so sánh với một mẫu chuẩn đối chiếu có bản chất hóa học khác mẫu thử (Ví dụ: Thủy tinh phát huỳnh quang hoặc dung dịch một chất phát huỳnh quang khác với mẫu thử). Trong trường hợp này, nồng độ của chất thử phải được xác định bằng đồ thị chuẩn đo trong cùng điều kiện với mẫu thử.

4.4 PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ NGUYÊN TỬ PHÁT XẠ VÀ HẤP THỤ

Các phương pháp quang phổ nguyên tử phát xạ và hấp thụ được sử dụng để xác định nồng độ của các nguyên tố bằng phép đo cường độ phát xạ hoặc hấp thụ ánh sáng ở bước sóng đặc trưng bởi hơi nguyên tử của nguyên tố được hóa hơi từ chất cần phân tích, ví dụ, bằng cách đưa một dung dịch của chất phân tích vào ngọn lửa.

Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử

Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử là phương pháp xác định nồng độ của một nguyên tố trong một chất bằng cách đo cường độ của một trong các vạch phát xạ của hơi nguyên tử của nguyên tố được hóa hơi từ chất đó. Việc xác định nồng độ nguyên tố được tiến hành ở bước sóng tương ứng với các vạch phát xạ này.

Thiết bị

Máy quang phổ phát xạ nguyên tử bao gồm các bộ phận chủ yếu là bộ phận hóa hơi nguyên tử của các nguyên tố cần xác định (ngọn lửa, plasma, hồ quang điện v.v...), bộ đơn sắc hóa và bộ phận phát hiện. Nếu bộ phận hóa hơi là ngọn lửa, nước là dung môi được lựa chọn để pha dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Tuy nhiên, dung môi hữu cơ cũng được sử dụng nếu đảm bảo chắc chắn rằng nó không ảnh hưởng đến độ ổn định của ngọn lửa.

Phương pháp tiến hành

Vận hành máy quang phổ phát xạ nguyên tử theo như chỉ dẫn của hãng sản xuất về cách đặt bước sóng quy định. Đưa dung dịch mẫu trắng vào bộ phận hóa hơi nguyên tử và hiệu chỉnh tín hiệu đọc được về "0". Đưa dung dịch chuẩn đặc nhất vào buồng hóa hơi nguyên tử và hiệu chỉnh độ nhạy của máy để có trị giá đọc thích hợp.

Việc định lượng được thực hiện bằng cách so sánh các dung dịch thử chưa biết nồng độ với các dung dịch chuẩn của nguyên tố cần xác định bằng phương pháp xác định trực tiếp (phương pháp 1) hoặc bằng phương pháp thêm chuẩn (phương pháp 2).

Sử dụng phương pháp 1, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Phương pháp 1: Phương pháp xác định trực tiếp

Chuẩn bị dung dịch chất để thử (dung dịch thử) như được mô tả trong chuyên luận riêng sao cho nồng độ của nguyên tố cần xác định nằm trong khoảng nồng độ của các dung dịch chuẩn. Chuẩn bị không ít hơn ba dung dịch chuẩn của nguyên tố cần xác định có nồng độ nằm trong khoảng phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và cường độ vạch phát xạ của nguyên tố cần phân tích. Bất kỳ thuốc thử nào được dùng trong việc chuẩn bị các dung dịch thử đều phải được thêm vào các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu trắng ở cùng nồng độ. Đưa dung dịch mẫu trắng vào máy, điều chỉnh tín hiệu đọc được về "0". Đưa lần lượt dung dịch thử và từng dung dịch chuẩn vào máy, ít nhất mỗi dung dịch làm ba lần, ghi lại kết quả đọc ổn định. Rửa máy bằng dung dịch mẫu trắng sau mỗi lần đo cho đến khi tín hiệu trở về giá trị đọc ban đầu của mẫu trắng. Từ cường độ vạch phát xạ đọc được của các dung dịch chuẩn, thiết lập đường chuẩn biểu thị sự thay đổi cường độ vạch phát xạ theo nồng độ nguyên tố cần xác định và từ đường chuẩn này xác định nồng độ nguyên tố trong dung dịch thử.

Phương pháp 2: Phương pháp thêm chuẩn

Cho vào ít nhất ba bình định mức có dung tích như nhau, các thể tích bằng nhau của dung dịch chất đem thử (dung dịch thử) được chuẩn bị như chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vào tất cả các bình, trừ một bình, các thể tích lớn dần của dung dịch chuẩn có nồng độ đã biết của nguyên tố cần xác định sao cho nồng độ của nguyên tố này trong các bình đều nằm trong khoảng tuyến tính giữa nồng độ và cường độ phát xạ. Pha loãng các dung dịch có chứa trong bình đến vừa đủ thể tích bằng dung môi.

Đưa dung dịch mẫu trắng (dung môi) vào máy, điều chỉnh tín hiệu đọc được về "0". Đưa lần lượt từng dung dịch thử và từng dung dịch chuẩn vào máy, ít nhất mỗi dung dịch làm ba lần, ghi lại kết quả đọc ổn định. Rửa máy bằng dung dịch mẫu trắng sau mỗi lần đo cho đến khi tín hiệu trở về giá trị đọc ban đầu của mẫu trắng. Tính phương trình hồi quy của đường chuẩn bằng cách dùng phương pháp bình phương tối thiểu và từ đường thẳng này, xác định nồng độ của nguyên tố cần định lượng trong dung dịch thử. Một cách khác, vẽ đồ thị biểu diễn sự liên quan giữa giá trị đọc được và lượng thêm vào của nguyên tố cần xác định. Nối các điểm trên đồ thị và kéo dài về phía trái cho đến khi nó gặp trục nồng độ. Khoảng cách giữa điểm này và điểm giao nhau của trục tọa độ là nồng độ của nguyên tố cần xác định trong dung dịch thử.

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử là phương pháp xác định nồng độ của nguyên tố trong một chất bằng cách đo độ hấp thụ bức xạ bởi hơi nguyên tử tự do của nguyên tố đó được hóa hơi từ chất thử. Việc định lượng được tiến hành ở bước sóng của một trong những vạch hấp thụ của nguyên tố cần xác định.

Thiết bị

Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử chủ yếu bao gồm nguồn bức xạ, bộ phận hóa hơi nguyên tử của nguyên tố cần xác định (ngọn lửa, lò graphit v.v...), bộ đơn sắc hóa và bộ phận phát hiện.

Phương pháp đưa các chất vào để phân tích phụ thuộc vào kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu. Nếu nguyên tử hóa bằng ngọn lửa, các chất sẽ được hóa hơi và nước là dung môi được chọn để chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử, tuy nhiên các dung môi hữu cơ cũng có thể được sử dụng nếu đảm bảo chắc chắn là dung môi không ảnh hưởng đến độ ổn định của ngọn lửa. Nếu nguyên tử hóa không ngọn lửa (sử dụng lò graphit), các chất đưa vào có thể được hòa tan trong nước hoặc trong dung môi hữu cơ.

Quá trình hóa hơi nguyên tử cũng có thể được tạo ra bên ngoài máy quang phổ, ví dụ, phương pháp hóa hơi lạnh cho thủy ngân hoặc một số hydrid. Đối với thủy ngân, nguyên tử được hóa hơi bằng sự khử hóa học và hơi nguyên tử được dẫn bằng một dòng khí trơ đến một cốc đo đặt trên trục quang của máy. Các hydrid được dẫn bằng hỗn hợp khí đốt hoặc bằng khí trơ đến một cốc đo đã được đốt nóng, tại đây chúng được nguyên tử hóa.

Phương pháp tiến hành

Vận hành máy quang phổ hấp thụ nguyên tử theo các chỉ dẫn của hãng sản xuất máy về cách đặt bước sóng quy định. Đưa dung dịch mẫu trắng vào buồng hóa hơi nguyên tử và hiệu chỉnh kết quả sao cho độ hấp thụ đọc được trên máy bằng "0". Đưa dung dịch chuẩn có nồng độ lớn nhất vào máy và hiệu chỉnh độ nhạy để đạt được một phép đo độ hấp thụ thích hợp.

Việc định lượng được thực hiện bằng cách so sánh với các dung dịch chuẩn đã biết nồng độ của nguyên tố cần xác định bằng phương pháp xác định trực tiếp (phương pháp 1) hoặc bằng phương pháp thêm chuẩn (phương pháp 2).

Sử dụng phương pháp 1 trừ khi có chỉ dẫn khác.

Phương pháp 1: Phương pháp xác định trực tiếp

Chuẩn bị dung dịch chất đề thử (dung dịch thử) như được mô tả trong chuyên luận riêng sao cho nồng độ của nguyên tố cần xác định nằm trong khoảng nồng độ của các dung dịch chuẩn. Chuẩn bị không ít hơn ba dung dịch chuẩn của nguyên tố cần xác định có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ của nguyên tố cần phân tích. Bất kỳ thuốc thử nào được dùng trong việc chuẩn bị các dung dịch thử đều phải được thêm vào các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu trắng ở cùng nồng độ. Đưa dung dịch mẫu trắng vào máy, điều chỉnh tín hiệu đọc được về "0". Đưa lần lượt dung dịch thử và từng dung dịch chuẩn vào máy, ít nhất mỗi dung dịch làm ba lần, ghi lại kết quả đọc ổn định. Rửa máy bằng dung dịch mẫu trắng sau mỗi lần đo cho đến khi tín hiệu trở về giá trị đọc ban đầu của mẫu trắng. Nếu sử dụng kỹ thuật nguyên tử hóa không ngọn lửa, lò graphit phải được đốt lại giữa các lần phân tích. Từ cường độ vạch hấp thụ đọc được của các dung dịch chuẩn, thiết lập đường chuẩn biểu thị sự thay đổi cường độ vạch hấp thụ theo nồng độ nguyên tố cần xác

định và từ đường chuẩn này xác định nồng độ nguyên tố trong dung dịch thử.

Phương pháp 2: Phương pháp thêm chuẩn

Cho vào ít nhất ba bình định mức có dung tích như nhau, các thể tích bằng nhau của dung dịch chất đem thử (dung dịch thử) được chuẩn bị như chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vào tất cả các bình, trừ một bình, các thể tích lớn dần của dung dịch chuẩn có nồng độ đã biết của nguyên tố cần xác định sao cho nồng độ của nguyên tố cần xác định trong các bình đều nằm trong khoảng tuyến tính giữa nồng độ và cường độ hấp thụ. Pha loãng các dung dịch có chứa trong bình đến vừa đủ thể tích bằng dung môi.

Đưa dung dịch mẫu trắng vào máy, điều chỉnh tín hiệu đọc được về "0". Đưa lần lượt dung dịch thử và từng dung dịch chuẩn vào máy, ít nhất mỗi dung dịch ba lần, ghi lại kết quả đọc ổn định. Rửa máy bằng dung dịch mẫu trắng sau mỗi lần đo cho đến khi tín hiệu trở về giá trị đọc ban đầu của mẫu trắng. Nếu sử dụng kỹ thuật nguyên tử hóa không ngọn lửa, lò graphit phải được đốt lại giữa các lần phân tích.

Tính phương trình hồi quy của đường chuẩn bằng cách dùng phương pháp bình phương tối thiểu và từ đường thẳng này, xác định nồng độ của nguyên tố cần định lượng trong dung dịch thử. Một cách khác, vẽ đồ thị biểu diễn sự liên quan giữa giá trị đọc được và lượng thêm vào của nguyên tố cần xác định. Nối các điểm trên đồ thị và kéo dài về phía trái cho đến khi nó gặp trục nồng độ. Khoảng cách giữa điểm này và điểm giao nhau của trục tọa độ là nồng độ của nguyên tố cần xác định trong dung dịch thử.

4.5 PHỔ KHỐI**Nguyên tắc**

Chất phân tích được chuyển sang thể khí và ion hoá, tạo thành các ion dương hoặc âm. Phương pháp phổ khối dựa trên việc đo trực tiếp tỷ số m/z , là tỷ số giữa khối lượng m và điện tích z của ion chất phân tích. Tỷ số này được trình bày dưới dạng đơn vị khối lượng nguyên tử ($1 \text{ a.m.u} = 1/12$ khối lượng của ^{12}C) hay dalton ($1 \text{ Da} =$ khối lượng nguyên tử hydro).

Trong máy phổ khối, các ion được tạo thành trong nguồn ion, được gia tốc rồi được tách trong bộ phân tích trước khi đến detector. Tất cả quá trình trên được thực hiện trong một buồng được hút chân không đến khoảng 10^{-3} đến 10^{-6} Pa .

Phổ thu được biểu diễn cường độ tương đối của các ion khác nhau phụ thuộc vào tỷ số m/z của các ion đó. Tín hiệu tương ứng với một ion là một nhóm các pic tương ứng với phân bố thống kê của các đồng vị khác nhau của ion đó. Đó là hình ảnh đồng vị của ion và trong đó pic của đồng vị có cường độ lớn nhất của một nguyên tử được gọi là pic đơn đồng vị.

Từ phổ khối ta có được những thông tin định tính (xác định khối lượng phân tử và thông tin về cấu trúc có được nhờ các mảnh thu được) hay định lượng (dùng chuẩn nội hay chuẩn ngoại) với giới hạn phát hiện trong khoảng từ picomol (10^{-12} mol) đến femtomol (10^{-15} mol).

Nạp mẫu

Cần phải đưa mẫu vào máy sao cho không ảnh hưởng nhiều đến chân không trong máy. Một phương pháp thường dùng là nạp trực tiếp mẫu lỏng; mẫu được đặt lên đầu một thanh hình trụ (trong một chén thạch anh, trên một sợi hay trên một bề mặt kim loại). Thanh này được đưa vào máy phổ khối sau khi đi qua một chốt chân không mà ở đây được duy trì một chân không đầu tiên, có áp suất trung gian giữa áp suất khí quyển và áp suất của chân không thứ hai ở trong máy.

Trong những hệ thống nạp mẫu khác, các thành phần trong hỗn hợp mẫu thử được tách trên một máy khác (như máy sắc ký) trước khi đi vào trong máy khối phổ được ghép nối với máy đó.

Sắc ký khí - khối phổ

Trong sắc ký khí - khối phổ, một đầu của cột sắc ký (mao quản hay bán mao quản) được đưa trực tiếp vào trong nguồn ion của máy khối phổ.

Sắc ký lỏng - khối phổ

Sự kết hợp sắc ký lỏng - khối phổ là kỹ thuật đặc biệt hữu ích trong việc phân tích các hợp chất phân cực, là những chất ít bay hơi hay rất dễ phân hủy bởi nhiệt, không phân tích được bằng sắc ký khí - khối phổ.

Khó khăn trong kỹ thuật sắc ký lỏng - khối phổ là làm thế nào thu được các ion ở thể khí từ pha lỏng, vì vậy cần có những giao diện đặc biệt như:

Nạp trực tiếp: Pha động từ đầu cột sắc ký đi ra, được phun sương và dung môi được bay hơi ở trước nguồn ion của máy khối phổ.

Giao diện chùm hạt: Pha động với lưu lượng tới khoảng 0,6 mL/min được phun sương và loại dung môi trong một buồng nhỏ, chỉ còn lại các hạt chất phân tích trung hòa điện đi tới nguồn ion của máy khối phổ; kỹ thuật này được dùng cho các hợp chất có độ phân cực tương đối thấp và khối lượng phân tử nhỏ hơn 1000 Da.

Giao diện băng chuyển: Pha động với lưu lượng tới khoảng 1 mL/min được đưa lên một băng chuyển; sau khi dung môi bay hơi, các chất phân tích được lần lượt đưa tới nguồn ion và được ion hóa ở đó; kỹ thuật này ít phù hợp cho các chất rất phân cực hay dễ phân hủy nhiệt.

Các kiểu ghép nối khác (phun điện, phun nhiệt, ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển) được coi như thực chất là các kỹ thuật ion hóa và sẽ được mô tả trong phần các kiểu ion hóa.

Sắc ký chất lỏng siêu tới hạn - khối phổ

Trong kỹ thuật sắc ký chất lỏng siêu tới hạn - khối phổ, pha động (thường là carbon dioxyd siêu tới hạn) khi đi qua một van chiết nóng nằm giữa cột sắc ký và nguồn ion sẽ chuyển sang thể khí.

Điện di mao quản - khối phổ

Trong kỹ thuật điện di mao quản - khối phổ, dịch rửa giải từ cột mao quản được đưa vào nguồn ion và trong một số trường hợp một dung môi khác được thêm vào để đạt được

lưu lượng cỡ vài $\mu\text{L}/\text{min}$. Kỹ thuật này có hạn chế là lượng mẫu nhỏ và cần dùng dung môi bay hơi.

Các kiểu ion hóa**Bắn phá điện tử**

Mẫu thử ở trạng thái khí được ion hóa dưới tác động của một chùm electron có năng lượng lớn hơn năng lượng ion hóa của mẫu (thường là 70 eV). Bên cạnh các ion phân tử M^+ , sẽ hình thành các mảnh đặc trưng cho cấu trúc của phân tử. Kỹ thuật này bị hạn chế chủ yếu vì phải hóa hơi mẫu. Vì vậy nó không phù hợp cho các chất phân cực, dễ phân hủy nhiệt hay có khối lượng phân tử lượng lớn.

Kiểu ion hóa bằng bắn phá điện tử phù hợp cho kỹ thuật ghép nối khối phổ với sắc ký khí và đôi khi với sắc ký lỏng.

Ion hóa hóa học

Trong kiểu ion hóa này, người ta dùng một thuốc thử ở thể khí như methan, amoniac, nitrogen oxyd, nitrogen dioxyd hay oxygen. Phổ khối thu được sẽ đặc trưng bởi các ion kiểu $(M+H)^+$ hay $(M-H)^+$ hay các ion cộng hợp giữa chất phân tích và khí thuốc thử. Các mảnh hình thành ít hơn so với kiểu bắn phá điện tử. Một biến thể khác của kỹ thuật này được dùng khi chất phân tích dễ bị phân hủy nhiệt; trong trường hợp này, mẫu được đưa lên một sợi dây và bay hơi rất nhanh do hiệu ứng nhiệt Joule-Thomson (ion hóa hóa học giải hấp).

Ion hóa bằng bắn phá nguyên tử nhanh (FAB) hay ion nhanh (khối phổ ion thứ cấp lỏng - LSIMS)

Trong kỹ thuật này, mẫu thử được hòa tan trong một chất nền nhớt như glycerin, rồi cho lên một bề mặt kim loại và được bắn phá bởi một chùm nguyên tử trung hòa như argon hay xenon, hoặc bằng các ion cesi động năng cao.

Kết quả là sẽ xuất hiện các ion kiểu $(M+H)^+$ hay $(M-H)^+$ hay các ion cộng hợp hình thành từ chất nền hay mẫu thử. Kiểu ion hóa này rất thích hợp cho các chất phân cực hay dễ phân hủy nhiệt, cho các chất có phân tử lượng tới 10 000 Da. Kỹ thuật này có thể dùng kết hợp với sắc ký lỏng trong đó pha động được cho thêm 1 % đến 2 % glycerin; tuy vậy lưu lượng pha động phải rất thấp (vài $\mu\text{L}/\text{min}$).

Ion hóa điện trường và khử hấp điện trường

Trong kỹ thuật này, mẫu thử được bay hơi gần một sợi dây wolfram có phủ các vi kim (ion hóa điện trường) hay được đặt lên sợi dây (giải hấp điện trường). Mẫu thử được ion hóa dưới tác động của một điện áp khoảng 10 kV đặt giữa sợi dây và một đối diện cực. Hai kỹ thuật này chủ yếu tạo nên các ion phân tử M^+ , các ion $(M+H)^+$ và được dùng cho các chất có độ phân cực thấp và/hay dễ phân hủy nhiệt.

Ion hóa khử hấp bằng laser có nền hỗ trợ (MALDI)

Ở đây, mẫu thử trong một nền thích hợp được đặt lên một giá đỡ kim loại và được ion hóa bởi một chùm xung tia laser có bước sóng trong vùng từ tử ngoại đến hồng ngoại (các xung này rất ngắn, chỉ kéo dài trong một pico giây đến vài nano giây). Kiểu ion hóa này đóng vai trò thiết yếu

trong việc phân tích các chất có khối lượng phân tử rất cao (trên 100 000 Da) nhưng chỉ dùng cho các máy có bộ phân tích thời gian bay (xem thêm ở dưới đây).

Phun điện

Kiểu ion hóa này được thực hiện ở áp suất khí quyển. Các mẫu thử trong dung dịch được đưa vào nguồn ion qua một ống mao quản mà ở đầu ống này có một điện thế cỡ 5 kV. Có thể dùng một khí để phun sương. Lưu lượng khí có thể từ vài $\mu\text{L}/\text{min}$ đến 1 mL/min. Kỹ thuật này phù hợp cho các chất phân cực và cho việc nghiên cứu các phân tử sinh học có khối lượng tới 100 000 Da. Có thể dùng trong ghép nối với sắc ký lỏng hay điện di mao quản.

Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (APCI)

Ion hóa được thực hiện ở áp suất khí quyển nhờ tác động của một điện cực có điện thế nhiều kilo vôn đặt trên đường đi của pha động; pha động được phun sương bằng hiệu ứng nhiệt và một luồng khí nitrogen. Các ion hình thành có một điện tích và là ion kiểu $(M+H)^+$ trong chế độ phân cực dương và kiểu $(M-H)^-$ trong phân cực âm. Kiểu ion hóa này có thể áp dụng cho kết nối với sắc ký lỏng ở lưu lượng pha động cao đến 2 mL/min. Mẫu thử trong pha động có nước, các dung môi hữu cơ và một chất điện ly dễ bay hơi (thường là amoni acetat), sau khi đi qua một mao quản kim loại có nhiệt độ được kiểm soát, được đưa vào nguồn ion dưới dạng phun sương. Lưu lượng thích hợp là trong khoảng 1 - 2 mL/min. Các ion của chất điện ly sẽ ion hóa các chất phân tích. Quá trình ion hóa này có thể được thay thế hay tăng cường bằng sự phóng điện ở khoảng 800 vôn, đặc biệt là khi tất cả là dung môi hữu cơ. Kỹ thuật này phù hợp cho việc ghép nối khối phổ với sắc ký lỏng.

Bộ phân tích khối

Các bộ phân tích khối (hay bộ phân tích) có hiệu năng khác nhau chủ yếu do hai thông số:

- dải khối, tức là dải đo tỷ số m/z ;
- độ phân giải, tức là khả năng tách hai ion có cường độ bằng nhau và có tỷ số m/z khác nhau ΔM , và phần xen phủ giữa hai pic được đo bằng chiều cao của hõm tính theo phần trăm; ví dụ, độ phân giải $(M/\Delta M)$ là 1000 với hõm 10 % cho ta biết có thể tách hai tỷ số m/z 1000 và 1001 với đáy hõm có cường độ 10 % trên đường nền.

Tuy vậy, trong một số trường hợp (bộ phân tích thời gian bay, tứ cực hay bẫy ion) độ phân giải được định nghĩa là tỷ số giữa khối lượng phân tử và chiều rộng của pic ở nửa chiều cao (ứng với hõm 50 %).

Bộ phân tích tứ và phân tích tĩnh điện

Các ion tạo thành trong nguồn ion được gia tốc bởi một điện áp V, được hội tụ về bộ phân tích tứ có từ trường B hay bộ phân tích tĩnh điện có điện trường tĩnh điện E, tùy theo cấu hình của máy. Các ion này đi theo một quỹ đạo bán kính r, theo định luật Laplace:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

Có hai kiểu quét để thu nhận và đo các ion khác nhau sinh ra trong nguồn ion: quét B với V cố định và quét V với B cố định. Bộ phân tích tứ thường được tiếp nối bởi một ngăn điện có tác dụng như một bộ lọc động năng, làm tăng đáng kể độ phân giải của máy. Độ phân giải tối đa của một máy loại này (loại hai ngăn) nằm trong khoảng 10 000 đến 150 000 nhờ đó, trong hầu hết các trường hợp, cho phép tính toán đủ chính xác các tỷ số m/z để xác định được thành phần nguyên tố của các ion. Với các ion có điện tích bằng 1, dải khối là từ 2 000 Da đến 15 000 Da. Một số ion có thể phân hủy nhanh chóng vì là kết quả của sự chuyển dịch kém bền hoặc do va chạm với một khí trong những vùng vô trường giữa nguồn ion và detector [phân ly do hoạt hóa bởi va chạm (CAD)].

Xem xét những sự phân hủy này là rất có ích cho việc xác định cấu trúc cũng như đặc tính của một chất cụ thể trong hỗn hợp, việc xem xét này cần đến kỹ thuật khối phổ tiếp nối. Có nhiều kỹ thuật như vậy có thể áp dụng, tùy theo sự phân hủy xảy ra ở vùng nào:

- kiểu ion con (xác định các ion phân hủy của ion mẹ): $B/E = \text{hằng số}$, gọi là MIKES (Mass-analysed Ion Kinetic Energy Spectroscopy - Phổ động năng ion phân tích khối);
- kiểu ion mẹ (xác định tất cả các ion mà khi phân hủy cho một ion có tỷ số m/z xác định): $B^2/E = \text{hằng số}$;
- kiểu mất mảnh trung hòa (kiểu mảnh mất, neutral-loss mode, phát hiện tất cả các ion cùng mất một mảnh): $B/E(1-E/E_0)^{1/2} = \text{hằng số}$, trong đó E_0 là điện áp nền của ngăn điện.

Bộ phân tích tứ cực

Bộ phân tích này gồm có bốn thanh kim loại song song hình trụ hay có tiết diện hình hyperbol. Chúng được đặt đối xứng hai bên đường đi của các ion; các cặp đối diện với nhau qua trục đối xứng của các thanh điện cực thì được nối điện với nhau. Điện thế của hai cặp thanh điện cực là đối nhau. Điện thế này là tổ hợp của một thành phần một chiều và một thành phần xoay chiều.

Các ion hình thành trong nguồn ion được truyền đi và tách bằng cách thay đổi thế đặt trên các điện cực sao cho tỷ số giữa thế một chiều và thế xoay chiều là hằng số. Bộ tứ cực thường có dải khối từ 1 a.m.u. đến 2 000 a.m.u., một số có thể tới 4 000 a.m.u.. Mặc dù các bộ tứ cực có độ phân giải thấp hơn các bộ phân tích tứ, nhưng chúng cho ta hình ảnh đơn đồng vị của các ion một điện tích trên toàn dải phổ. Có loại dùng bộ phân tích gồm ba tứ cực xếp nối tiếp nhau Q_1 , Q_2 , Q_3 (gọi là bộ ba tứ cực hay tứ cực chấp ba) để ghi phổ. Tứ cực Q_2 là ngăn để cho các ion va chạm, tạo ra các ion mảnh nhỏ hơn, như vậy thực ra Q_2 không có vai trò phân tích; khí dùng cho va chạm thường là khí argon.

Các kiểu quét thông dụng nhất là:

- kiểu ion con: Q_1 tách lấy ion có m/z , ion này được đưa vào Q_2 và được phân mảnh do va chạm, các mảnh tạo thành được phân tích trong Q_3 ;
- kiểu ion mẹ: Q_1 quét một dải khối xác định, Q_3 chỉ lọc lấy một ion có m/z nhất định. Như vậy chỉ những ion nào phân hủy sinh ra mảnh ion chọn bởi Q_3 là được phát hiện;

kiểu mảnh mắt: Q_1 và Q_3 quét một dải khối nào đó trong khoảng tương ứng với các ion mất một mảnh đặc trưng cho một chất hay một nhóm chất.

Cũng có thể ghi phổ khối dùng phối hợp bộ tứ cực với bộ phân tích từ hay tĩnh điện; đó là các máy khối phổ lai.

Bộ phân tích bẫy ion

Bộ phân tích này về nguyên tắc cũng giống như bộ tứ cực, nhưng sử dụng điện trường ba chiều. Bộ phân tích kiểu này cho phép thu được phổ các ion hình thành qua nhiều thế hệ (MS^n) hay gọi là phổ MS nhiều lần.

Bộ phân tích cộng hưởng cyclotron ion

Ở đây, các ion hình thành trong một ngăn và được đưa vào một từ trường đều, mạnh, chuyển động trên quỹ đạo tròn với tần số có thể tỷ lệ thuận với tỷ số m/z của chúng nhờ áp dụng thuật toán chuyển hóa Fourier.

Hiện tượng này được gọi là cộng hưởng cyclotron ion. Các bộ phân tích kiểu này gồm có những nam châm siêu dẫn và có độ phân giải cao (tới 1 000 000 và hơn nữa) cũng như cho ta phổ MS^n , nhưng đòi hỏi phải có chân không cao tức là áp suất rất thấp (cỡ 10^{-7} Pa).

Bộ phân tích thời gian bay

Ở đây, các ion hình thành trong nguồn ion được gia tốc ở điện áp 10 kV đến 20 kV. Chúng đi qua một bộ phân tích gồm ống vô trường thường được gọi là ống bay, dài khoảng 25 cm đến 1,5 m. Thời gian t cần cho một ion đi đến detector tỷ lệ thuận với căn bậc hai của tỷ số m/z . Về lý thuyết, dải khối của bộ phân tích này là vô hạn; nhưng trên thực tế nó bị hạn chế bởi sự ion hóa hay phương pháp khử hấp. Bộ phân tích thời gian bay chủ yếu dùng cho các chất có khối lượng phân tử cao (đến vài trăm ngàn dalton). Kỹ thuật này rất nhạy (đến vài picomol). Độ chính xác của phép đo và độ phân giải có thể được cải thiện nếu dùng gương tĩnh điện (reflectron).

Thu nhận tín hiệu

Chủ yếu có ba kiểu thu tín hiệu.

Kiểu toàn phổ

Toàn bộ tín hiệu thu được trên một dải khối được ghi lại. Phổ trình bày sự phụ thuộc của cường độ tương đối của các ion khác nhau vào tỷ số m/z của các ion đó. Kết quả thu được chủ yếu có ý nghĩa định tính. Việc sử dụng thư viện phổ đối chiếu cho phép ta định tính nhanh chóng.

Kiểu đo mảnh (theo dõi ion chọn lọc)

Tín hiệu thu được là của một ion (theo dõi một ion, SIM) hay nhiều ion (theo dõi nhiều ion, MIM) đặc trưng cho chất được phân tích. Giới hạn phát hiện có thể được thu nhỏ đáng kể trong kiểu thu tín hiệu này. Có thể tiến hành các phép thử định lượng hay bán định lượng nhờ dùng các chất chuẩn ngoại hay chuẩn nội (ví dụ, dùng chuẩn deuteri hóa). Không thể tiến hành các phép thử này với các bộ phân tích thời gian bay.

Kiểu đo mảnh phổ khối hai lần (theo dõi nhiều phản ứng, MRM)

Kiểu đo này cho phép theo dõi chọn lọc sự phân hủy đơn phân tử hay đôi phân tử của một tiền ion đã chọn, đặc trưng cho chất phân tích. Độ chọn lọc và tính đặc hiệu của kiểu thu tín hiệu này cho phép đạt đến độ nhạy rất cao, làm cho kiểu đo này trở thành một phép đo thích hợp nhất trong các nghiên cứu định lượng nếu dùng chất chuẩn nội thích hợp (như chuẩn deuteri hóa). Kiểu phân tích này có thể thực hiện trên máy có ba tứ cực ghép nối tiếp, các bộ phân tích bẫy ion hay cộng hưởng cyclotron.

Hiệu chuẩn

Việc hiệu chuẩn cho phép ta gán một giá trị m/z tương ứng với một tín hiệu thu được. Trên nguyên tắc, việc hiệu chuẩn được thực hiện nhờ sử dụng một chất đối chiếu. Nếu dùng chuẩn ngoại, phổ chất đối chiếu được ghi riêng; nếu dùng chuẩn nội thì chất đối chiếu được trộn với chất đem thử. Số ion hay số điểm chuẩn cần thiết (để việc hiệu chuẩn đáng tin cậy) phụ thuộc vào kiểu bộ phân tích và độ chính xác mong muốn, ví dụ như khi dùng bộ phân tích từ thì càng làm nhiều điểm càng tốt vì ở đây tỷ số m/z biến đổi theo hàm số mũ với giá trị từ trường.

Phát hiện tín hiệu và xử lý dữ liệu

Các ion sau khi được tách trong bộ phân tích, được chuyển thành tín hiệu điện trong một hệ thống phát hiện như một nhân quang hay một nhân electron. Các tín hiệu được khuếch đại trước khi được chuyển lại thành tín hiệu số để xử lý dữ liệu cho phép hiệu chuẩn, dựng thành phổ, tự động định lượng, lưu trữ, đưa vào thư viện phổ hay sử dụng thư viện phổ. Máy tính được dùng để kiểm soát các thông số vật lý điều hành hoạt động của cả hệ thống máy.

4.6 PHỔ KHỐI - PLASMA CẢM ỨNG (ICP-MS)

Phổ khối-plasma kết hợp cảm ứng, gọi tắt là Phổ khối-plasma cảm ứng (ICP-MS) là một phương pháp phổ khối với nguồn ion hóa là plasma kết hợp cảm ứng (inductively-coupled plasma-ICP).

Nguyên lý cơ bản của sự hình thành ICP được mô tả dưới đây:

Plasma cảm ứng ICP là một nguồn khí trơ (thường là khí argon) được ion hóa cao độ, có số ion và số electron bằng nhau và được duy trì bằng một trường điện từ tần số radio (RF). Khi mẫu thử tiếp xúc với ICP, nhiệt độ cao của plasma sẽ khử dung môi, hóa hơi, kích thích và ion hóa các nguyên tử trong mẫu. Giới hạn phát hiện của phương pháp ICP-MS đạt tới cỡ nanogram/lít. Plasma được hình thành khi một dòng khí mang chạy qua "ngọn đèn" hay "torch" gồm 3 ống đồng tâm bằng thạch anh. Một cuộn dây kim loại cuốn quanh đầu trên của đèn và được nối với một nguồn phát tần số radio. Cuộn dây này được cấp một công suất thường là 700 - 1500 W, tạo nên một từ trường cảm ứng dao động ứng với tần số của nguồn tần số

radio, thường là 27 MHz, 40 MHz. Plasma hình thành khi khí mang được kích thích bởi một nguồn phóng điện, sinh ra các ion và electron mầm. Trong từ trường cảm ứng, các phân tử tích điện (ion và electron) bị ép chạy qua con đường hình vành khuyên khép kín. Do cản trở dòng chảy của chúng, quá trình sinh nhiệt xảy ra và tạo thêm ion.

Quá trình hình thành plasma xảy ra hầu như tức thời và plasma đạt được toàn bộ cường độ và kích thước. Sự dao động với tần số radio của công suất đặt trên cuộn dây tạo ra điện trường và từ trường tần số tại khu vực phía trên phần đầu của đèn. Khi tia lửa điện (được tạo ra bởi ống Tesla hay một thiết bị kích thích khác) tác động lên luồng khí mang đi qua đèn, thì một số electron bị bật khỏi các nguyên tử khí mang. Các electron này bắt gặp từ trường cảm ứng và tăng tốc. Sự tăng năng lượng cho các electron nhờ cuộn dây điện này được gọi là sự kết hợp cảm ứng (inductive coupling). Các electron năng lượng cao này lại va đập với các nguyên tử khí mang khác làm bật ra thêm nhiều electron hơn nữa. Sự ion hóa (do va đập) của khí mang tiếp tục xảy ra theo một phản ứng dây chuyền, làm cho khí mang biến thành một thực thể plasma bao gồm các nguyên tử, các electron, và các ion khí mang. Plasma được duy trì trong phạm vi đèn và cuộn dây nhờ năng lượng có tần số radio được liên tục truyền cho plasma qua quá trình kết hợp cảm ứng. ICP được thấy như một plasma hình lông chim mạnh mẽ và sáng chói. Phần đáy của plasma có hình vòng xuyến, được gọi là vùng cảm ứng, là vùng ở đó có quá trình truyền năng lượng cảm ứng từ cuộn dây cho plasma. Mẫu thử được đưa qua vùng cảm ứng này vào trung tâm của plasma.

Trong ICP-MS, plasma sẽ ion hóa các nguyên tố có trong mẫu. Các ion này được đưa vào máy phổ khối và được tách theo tỷ số khối/điện tích (m/z). Hầu hết các máy phổ khối có một hệ từ cực hoặc một nam châm. Các ion đi từ plasma qua bộ phận giao diện [gồm một côn lấy mẫu (sampler cone) và một côn gạn lọc (skimmer cone)] tới bộ quang học ion. Bộ quang học ion này gồm có một thấu kính tĩnh điện, thấu kính này đưa các ion từ một vùng có áp suất khí quyển sang bộ phận lọc khối có chân không được duy trì ở mức bằng 10^{-8} Pa hoặc nhỏ hơn, nhờ một bơm turbo phân tử. Sau khi được lọc, các ion có tỷ số khối/điện tích được chọn đi tới detector (là một nhân quang, một cốc Faraday hay các dynod), tại đây các dòng ion được chuyển thành tín hiệu điện. Nguyên tố được định lượng dựa trên số ion đi tới detector và tạo ra các xung điện trong một đơn vị thời gian.

Trong máy phổ ICP-MS còn có một hệ thống nạp mẫu và bộ xử lý dữ liệu như trong máy phổ ICP-AES.

Thiết bị

Một máy ICP-MS bao gồm các thành phần chủ yếu sau:
 Bộ nạp mẫu gồm một bơm nhu động để bơm dung dịch đến bộ phận phun sương với tốc độ dòng không đổi;
 Bộ sinh tần số radio;
 Bộ đèn plasma (plasma torch);
 Giao diện có hai côn để chuyển các ion đến bộ quang học ion;

Máy phổ khối;
 Detector;
 Bộ thu nhận dữ liệu.

Yếu tố ảnh hưởng

Vấn đề chính là nhiễu khối lượng, đặc biệt là trong khoảng giữa của dải khối (ví dụ 40 - 80 đơn vị a.m.u), các phân tử có cùng khối lượng che phủ đáng kể tín hiệu khối của ion phân tích. Tổ hợp các ion nguyên tử cũng dẫn đến các nhiễu đa nguyên tử hay nhiễu phân tử (như ảnh hưởng của $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ lên ^{56}Fe hay của $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ lên ^{80}Se). Nền mẫu cũng có thể ảnh hưởng lên một số chất phân tích. Một số nền mẫu có tác động lên sự hình thành giọt sương hay lên nhiệt độ ion hóa trong plasma. Những hiện tượng này có thể làm mất các tín hiệu của chất phân tích. Có thể tránh ảnh hưởng vật lý bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn nội hay thêm chuẩn. Nguyên tố dùng làm chuẩn nội tùy thuộc vào nguyên tố cần đo: ví dụ có thể dùng ^{59}Co và ^{115}In làm chuẩn nội.

Đặc tính hàng đầu của một thiết bị ICP-MS là độ phân giải, tức là hiệu lực tách hai khối gần nhau. Về mặt này, các máy dùng từ cực kém hơn các máy dùng nam châm.

Tiến hành

Chuẩn bị mẫu và nạp mẫu

Việc chuẩn bị mẫu thường có bước phá hủy nền mẫu bằng một phương pháp phù hợp như dùng lò vi sóng. Ngoài ra cần đảm bảo nồng độ chất phân tích nằm trong khoảng làm việc của máy (bằng cách pha loãng hay làm đậm đặc dung dịch mẫu) và đảm bảo dung dịch mẫu có thể được phun sương ổn định.

Nhiều hệ thống nạp mẫu cho phép sử dụng các acid đậm đặc, nhưng acid sulfuric và acid phosphoric có thể ảnh hưởng đến đường nền. Vì thế nên dùng acid nitric và acid hydrochloric.

Nếu có bộ nạp mẫu và đèn plasma làm bằng vật liệu chịu acid hydrofluoric (như polymer perfluoroalkoxy) thì có thể dùng acid hydrofluoric. Khi lựa chọn phương pháp nạp mẫu, cần tính đến yêu cầu về độ nhạy, độ ổn định, tốc độ, cỡ mẫu, khả năng chống ăn mòn và chống bị tắc. Một bộ phun sương phun ngang kết hợp với một buồng phun và đèn plasma có thể đáp ứng với hầu hết các yêu cầu. Dung dịch mẫu thường được bơm bằng bơm nhu động với tốc độ khoảng 20 - 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Khi có sử dụng dung môi hữu cơ thì khi đưa oxygen vào phải tránh lớp dung môi hữu cơ.

Chọn điều kiện làm việc

Cần tuân theo các điều kiện thao tác chuẩn do nhà sản xuất thiết bị đưa ra. Thông thường, có các nhóm điều kiện thao tác khác nhau cho các dung dịch trong nước và dung dịch trong dung môi hữu cơ. Cần lựa chọn dùng các thông số làm việc:

Lựa chọn các côn bằng vật liệu thích hợp (côn lấy mẫu và côn gạn lọc);
 Lựa chọn tốc độ dòng khí mang (các ống ngoài, giữa và trong của đèn);

Lựa chọn công suất của dòng tần số radio (RF);
 Lựa chọn tốc độ bơm;
 Lựa chọn một hay nhiều đồng vị của nguyên tố cần đo.

Lựa chọn đồng vị

Có nhiều tiêu chí để lựa chọn chất đồng vị. Để đạt được độ nhạy tối đa, chọn đồng vị có mật độ cao nhất. Ngoài ra, nên chọn một đồng vị ít chịu ảnh hưởng bởi các phân tử khác trong nền mẫu và của khí mang. Trong phần mềm của nhà sản xuất thiết bị ICP-MS thường có sẵn thông tin về ảnh hưởng của các phân tử có cùng khối lượng và các ion đa nguyên tử thuộc nhiều loại khác nhau như các hydrid, các oxyd, các clorid, v.v.

Kiểm tra hiệu năng của máy

Tính phù hợp của hệ thống

Trước khi chạy mẫu, phải chỉnh máy để có thể theo dõi và điều chỉnh các phép đo. Kiểm tra độ đúng của khối, dùng một dung dịch chứa nhiều đồng vị phù hợp kín thang khối, ví dụ dung dịch có chứa ^9Be , ^{59}Co , ^{89}Y , ^{115}In , ^{140}Ce và ^{209}Bi . Ghi lại độ nhạy, độ ổn định ngắn hạn và dài hạn. Tối ưu hóa các thông số máy (điều kiện plasma, các thấu kính ion, thông số tứ cực) để thu được số lần đếm cao nhất có thể. Chỉnh độ phân giải và trục khối (sử dụng một dung dịch Li, Y và Tl) để đạt được một đáp ứng chấp nhận được trên một dải khối rộng.

Phải đánh giá hiệu lực phân hủy các oxyd của plasma để giảm thiểu ảnh hưởng của oxyd. Tỷ số Ce/CeO và/hoặc Ba/BaO là một chỉ thị tốt và chỉ số này cần nhỏ hơn khoảng 3 %.

Giảm thiểu sự hình thành các ion hai điện tích với Ba và Ce. Tỷ số tín hiệu của các ion hai điện tích trên nguyên tố phân tích phải nhỏ hơn 2 %.

Kiểm tra độ ổn định dài hạn bằng cách chạy một dung dịch chuẩn trước và sau khi chạy một chuỗi dung dịch mẫu và kiểm tra xem muối đọng trên các côn có làm giảm tín hiệu đo trong quá trình chạy hay không.

Thẩm định phương pháp

Các phương pháp được mô tả trong các chuyên luận phải có hiệu năng đạt yêu cầu trong các kiểm tra định kỳ với khoảng cách thời gian thích hợp.

Độ tuyến tính

Chuẩn bị và chạy ít nhất 4 dung dịch chuẩn nằm trong khoảng hiệu chuẩn và một mẫu trắng. Với mỗi dung dịch làm lặp lại ít nhất 5 lần.

Đường chuẩn được tính toán bằng phương pháp hồi quy bình phương tối thiểu, dựa trên tất cả các dữ liệu thu được. Đường hồi quy, các trị giá trung bình, các dữ liệu đo, và khoảng tin cậy phải được ghi lại. Phương pháp có giá trị sử dụng khi:

Hệ số hồi quy đạt tối thiểu là 0,99;

Các điểm thực nghiệm thu được tại mỗi nồng độ chuẩn phải phân bố ngẫu nhiên hai bên đường chuẩn.

Tính các trị giá trung bình và độ lệch chuẩn tương đối tại mức nồng độ chuẩn thấp nhất và cao nhất.

Nếu tỷ số giữa hai độ lệch chuẩn tính được nhỏ hơn 0,5 hay lớn hơn 2,0 thì có thể tính lại theo phương pháp hồi quy tuyến tính hữu trọng (hay hồi quy tuyến tính có trọng số - weighted linear regression) để có được đường chuẩn chính xác hơn. Áp dụng cả hai hàm hữu trọng bậc 1 và bậc 2 để biết được dùng hàm nào là thích hợp nhất.

Nếu các trị giá trung bình so với đường chuẩn cho thấy có độ lệch khỏi sự tuyến tính thì phải dùng phép hồi quy tuyến tính hai chiều.

Độ đúng

Nên kiểm tra độ đúng bằng cách sử dụng chất đối chiếu có chứng chỉ (CRM). Nếu không thể làm việc đó thì tiến hành thử độ thu hồi.

Độ thu hồi

Với phép thử định lượng, cần đạt độ thu hồi 90 % đến 110 %. Khi xác định một lượng vết nguyên tố, phải đạt độ thu hồi từ 80 % đến 120 % trị giá lý thuyết. Có thể xác định độ thu hồi trên một dung dịch đối chiếu (dung dịch trong nền mẫu) có cho thêm một lượng đã biết của chất phân tích (khoảng nồng độ có phải phù hợp với mẫu đem phân tích).

Độ lặp lại

Độ lặp lại (độ lệch chuẩn tương đối) không được lớn hơn 3 % trong các phép định lượng và 5 % trong phép thử xác định tạp chất.

Giới hạn định lượng

Kiểm tra để đảm bảo rằng giới hạn định lượng nhỏ hơn giá trị cần đo (ví dụ dùng phương pháp 10 σ).

4.7 PHỔ HUỖNH QUANG TIA X

Khi nguyên tử của một nguyên tố nhận được năng lượng của một chùm tia X chiếu vào (tia X sơ cấp), nguyên tử đó có thể mất đi một electron lớp trong của nó (ví dụ lớp K) và bị ion hóa, để lại một chỗ khuyết (trong lớp K). Trong một khoảng thời gian rất ngắn sau đó, một electron lớp ngoài (có năng lượng cao hơn) có thể rơi vào chỗ khuyết ở lớp trong và phát ra một tia X khác, đó là tia X huỳnh quang.

Phổ huỳnh quang tia X là một kỹ thuật phân tích dựa trên việc đo cường độ bức xạ huỳnh quang phát ra bởi một nguyên tố có nguyên tử số từ 11 đến 92 được kích thích bởi một bức xạ tia X sơ cấp liên tục.

Cường độ huỳnh quang của một nguyên tố không chỉ phụ thuộc vào nồng độ nguyên tố đó có trong mẫu mà còn phụ thuộc vào sự hấp thụ bức xạ tới và bức xạ huỳnh quang bởi nền mẫu.

Ở mức nồng độ vết, khi đường chuẩn tuyến tính, cường độ bức xạ huỳnh quang phát ra bởi một nguyên tố trong một nền mẫu xác định, ở một bước sóng xác định, sẽ tỷ lệ thuận với nồng độ của nguyên tố đó và tỷ lệ nghịch với hệ số hấp thụ khối (*mass absorption coefficient*) của nền mẫu tại bước sóng đó.

Tiến hành

Chuẩn bị và sử dụng thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu lỏng được đặt trực tiếp vào máy; mẫu rắn phải được ép thành viên trước, đôi khi mẫu rắn còn phải trộn thêm với một chất kết dính trước khi ép viên.

Để xác định được nồng độ của một nguyên tố có trong mẫu, cần đo tốc độ xung thật (net impulse rate) tạo nên bởi một hay nhiều mẫu chuẩn có hàm lượng đã biết của nguyên tố đó trong các nền mẫu xác định và tính hoặc đo hệ số hấp thụ khối của nền mẫu cần phân tích.

Hiệu chuẩn

Từ một dung dịch hay một dãy các dung dịch hiệu chuẩn của nguyên tố phân tích trong các nền mẫu khác nhau, ta có thể tính được độ dốc b_0 của đường chuẩn theo phương trình sau:

$$b_0 \frac{1}{\mu_M} = \frac{I_C^N}{C}$$

Trong đó:

μ_M là hệ số hấp thụ của nền mẫu M, đã được tính hay đo;
 I_C^N là tốc độ xung thật;
 C là nồng độ của nguyên tố cần định lượng trong dung dịch chuẩn.

Hệ số hấp thụ khối của nền mẫu

Nếu biết công thức phân tử của mẫu phân tích, có thể tính hệ số hấp thụ khối dựa trên thành phần nguyên tố và bảng hệ số hấp thụ khối của nguyên tố.

Nếu không biết thành phần nguyên tố, có thể đo cường độ I_U của tia X tán xạ (tán xạ Compton) và tính hệ số hấp thụ khối của nền mẫu theo μ_{MP} phương trình:

$$\frac{1}{\mu_{MP}} = a + bI_U$$

Trong đó:

μ_{MP} là hệ số hấp thụ khối của nền mẫu,
 I_U là cường độ tia X tán xạ.

Xác định tốc độ xung thật của nguyên tố phân tích trong mẫu

Tính tốc độ xung thật I_{EP}^N của nguyên tố phân tích dựa trên cường độ của vạch huỳnh quang và cường độ của vạch (hay các vạch) nền do các tạp nhiễm có trong bất kỳ ống nào.

Tính hàm lượng vết của nguyên tố

Nếu nồng độ của nguyên tố nằm trong phần tuyến tính của đường chuẩn thì ta có thể tính được nồng độ C của nguyên tố đó theo công thức sau:

$$C = \frac{I_{EP}^N}{b_0 \frac{1}{\mu_{MP}}} \times f$$

Trong đó:

f là hệ số pha loãng.

4.8 PHỔ RAMAN

Phổ Raman là phổ dao động nên có liên quan đến phổ hồng ngoại (IR) và cận hồng ngoại hay hồng ngoại gần (NIR). Hiệu ứng Raman là kết quả của một sự thay đổi độ phân cực của các liên kết phân tử trong một kiểu dao động xác định và được đo dưới dạng tia tán xạ không đàn hồi.

Ta có thể thu được một phổ Raman khi kích thích mẫu phân tích lên đến một trạng thái ảo bằng một nguồn sáng đơn sắc, đặc biệt là nguồn laser. Tia tán xạ đàn hồi (không có thay đổi bước sóng) được gọi là tán xạ Rayleigh và không được quan tâm trong phổ Raman, trừ việc nó được dùng để đánh dấu bước sóng tia laser.

Tuy vậy, nếu mẫu từ trạng thái kích thích rơi về một mức năng lượng dao động khác với ban đầu thì tia tán xạ sẽ có chuyển dịch về năng lượng (có thay đổi về bước sóng). Sự chuyển dịch này trùng với hiệu năng lượng giữa các trạng thái năng lượng dao động đầu và cuối. Đây là tia "tán xạ không đàn hồi" và được gọi là tán xạ Raman. Chỉ có khoảng 1 trong số $10^6 - 10^8$ các photon đi tới là cho tán xạ Raman. Vì thế, các tia laser được sử dụng trong các phổ kế Raman. Nếu photon tán xạ Raman có năng lượng thấp thì nó được gọi là tán xạ Stokes. Nếu nó có năng lượng cao thì được gọi là tán xạ đối Stokes. Trên thực tế, hầu như tất cả các phép đo có ý nghĩa về mặt phân tích đều sử dụng sự tán xạ Raman chuyển dịch Stokes.

Một phổ Raman trông rất giống như một phổ hồng ngoại tuyến tính về độ hấp thụ. Cường độ tia Raman (số photon Raman đếm được), được vẽ đối chiếu với độ chuyển dịch năng lượng. Trục hoành thường được ghi là "Chuyển dịch Raman/cm⁻¹" hay "Số sóng/cm⁻¹". Độ chuyển dịch Raman thường được biểu thị theo số sóng và bằng giá trị tuyệt đối của hiệu giữa số sóng của pic và số sóng của tia laser. Phổ Raman được biện giải theo cách như với phổ hồng ngoại giữa tương ứng. Các vị trí của các số sóng (chuyển dịch Raman) cho một kiểu dao động xác định là đúng với các số sóng của các dải tương ứng của một phổ hấp thụ hồng ngoại. Tuy nhiên, các pic mạnh trong phổ Raman lại ứng với các pic yếu trong phổ hồng ngoại, và ngược lại. Vì thế, hai kỹ thuật phổ Raman và hồng ngoại thường được cho là hai kỹ thuật bổ sung cho nhau.

Kỹ thuật phổ Raman có ưu điểm là thường cho kết quả đo đúng và nhanh mà không cần phải phá hủy mẫu và không cần chuẩn bị mẫu hoặc chỉ cần chuẩn bị tối thiểu; mẫu có thể là chất rắn, nửa rắn, lỏng và đôi khi là chất khí. Phổ Raman cung cấp thông tin về các kiểu dao động cơ bản của phân tử trong mẫu thử mà nhờ đó ta có thể hiểu thêm cả về mẫu thử lẫn quá trình chế biến. Tín hiệu chủ yếu nằm trong vùng khả kiến và cận hồng ngoại, nên có thể ghép nối có hiệu quả với sợi quang học. Điều này cũng có nghĩa là có thể thu nhận tín hiệu từ bất kỳ một môi trường nào trong suốt đối với tia laser, như thủy tinh, chất dẻo, hay các mẫu trong môi trường nước. Hơn nữa, vì trong phổ Raman thường dùng các tia khả kiến hay cận hồng ngoại để kích thích, nên các bộ phận quang học có thể làm bằng

thạch anh hoặc thủy tinh thường. Về mặt thiết bị, các hệ thống máy hiện đại dễ sử dụng và cho kết quả phân tích đáng tin cậy và nhanh, trong thời gian tính bằng giây đến phút. Tuy thế, cần chú ý là tia laser năng lượng cao, nhất là trong vùng cận hồng ngoại, rất nguy hiểm, không được nhìn vào. Các đầu dò bằng sợi quang cần được sử dụng thận trọng, và tuân thủ các qui định hiện hành về tia laser và các loại laser.

Bên cạnh phổ Raman “thường”, còn có nhiều kỹ thuật Raman chuyên biệt khác như Raman cộng hưởng (RR), phổ Raman nhạy bề mặt (SERS), phổ Raman quang hoạt (ROA) và nhiều kỹ thuật khác. Các kỹ thuật này ít được dùng trong ngành dược nên sẽ không được đề cập đến ở đây.

CÁC PHÉP ĐO RAMAN ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG

Có hai nhóm phép đo thường được thực hiện bằng kỹ thuật phổ Raman là định tính và định lượng.

Định tính bằng phổ Raman

Phổ Raman cho các thông tin về các nhóm chức hóa học có trong mẫu. Vì phổ Raman là đặc trưng cho một hợp chất nhất định nên phép đo Raman định tính có thể được dùng như một phép thử định tính một chất cũng như dùng để suy đoán cấu trúc phân tử của chất đó.

Định lượng bằng phổ Raman

Sử dụng một thiết bị có detector đo công suất quang (như máy quang phổ Raman chuyên dạng Fourier, FT-Raman), có thể định lượng bằng phổ Raman dựa trên mối quan hệ giữa tín hiệu S_ν tại một số sóng đã cho ν , và nồng độ chất phân tích C:

$$S_\nu = K \sigma_\nu (\nu_L - \nu_R)^4 P_0 C$$

Trong đó:

K là một hằng số phụ thuộc vào đường kính của chùm tia laser, hệ thu quang, thể tích mẫu và nhiệt độ;

σ_ν là mặt cắt ngang Raman của một kiểu dao động nhất định;

ν_L là số sóng của tia laser;

ν_R là số sóng của kiểu dao động;

P_0 là công suất của tia laser.

Mặt cắt ngang σ_ν đặc trưng cho bản chất của kiểu dao động nhất định đó. Thể tích mẫu được xác định bởi kích thước tiêu điểm của chùm tia laser trên mẫu, phản quang học dùng để hội tụ, và tính chất quang học của bản thân mẫu.

Kích thước của điểm chiếu laser trên mẫu có thể thay đổi từ dưới 1 μm cho một vi đầu dò đến 6 mm cho một hệ mẫu diện tích lớn. Với các phổ kế Raman có thể đo số photon trên một giây (như các phổ kế Raman có bộ ghép-thay đổi (change-coupled device [CCD]-Raman spectrometers) thì dùng phương trình sau:

$$S_\nu = K \sigma_\nu \nu_L (\nu_L - \nu_R)^3 P_0 C$$

Từ các phương trình nêu trên, ta thấy tín hiệu của pic tỷ lệ thuận với nồng độ. Mối quan hệ tuyến tính này là cơ sở cho đa số các áp dụng định lượng của phổ Raman.

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN VIỆC ĐỊNH LƯỢNG

Các yếu tố do mẫu

Các yếu tố thuộc về mẫu quan trọng nhất có thể gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc định lượng bằng phổ Raman là sự huỳnh quang, sự làm nóng mẫu, sự hấp thụ bởi nền mẫu hay bản thân mẫu và ảnh hưởng bởi sự phân cực. Nếu nền mẫu có chất huỳnh quang thì tín hiệu đo được thường có phần đóng góp của sự huỳnh quang đó. Chỉ có thể quan sát được sự huỳnh quang nếu bước sóng của tia laser kích thích xen phủ lên một dải hấp thụ của chất huỳnh quang. Huỳnh quang có thể được quan sát thấy như là một nền rộng và dốc nằm dưới đường cong phổ Raman. Sự huỳnh quang làm cho đường nền bị chênh và làm giảm tỷ số tín hiệu trên nhiễu. Khoảng bước sóng và cường độ huỳnh quang phụ thuộc vào thành phần hóa học của vật liệu huỳnh quang. Vì huỳnh quang thường có hiệu suất mạnh hơn so với tán xạ Raman, nên chỉ một chút tạp huỳnh quang cũng có thể làm cho tín hiệu Raman suy giảm đáng kể. Có thể làm giảm ảnh hưởng của huỳnh quang bằng cách sử dụng nguồn kích thích có bước sóng dài hơn như 785 nm hoặc 1064 nm (bước sóng dài hơn thì số sóng nhỏ hơn). Tuy nhiên, nên nhớ rằng cường độ của tín hiệu Raman là tỷ lệ với $(\nu_L - \nu_R)^4$ vì thế ưu điểm của việc sử dụng tia laser kích thích có bước sóng dài để làm giảm thiểu huỳnh quang đã bù trừ phần nào cho sự làm yếu tín hiệu Raman của bước sóng dài. Tỷ số tín hiệu trên nhiễu lớn nhất có thể đạt được bằng cách cân bằng các yếu tố như sự loại bỏ huỳnh quang, cường độ tín hiệu và đáp ứng của detector.

Huỳnh quang ở chất rắn đôi khi có thể được làm yếu đi bằng cách phơi mẫu dưới bức xạ laser trong một khoảng thời gian trước khi đo. Sự giảm huỳnh quang này là không rõ rệt khi lượng chất huỳnh quang không phải ở dạng vết hoặc khi mẫu là chất lỏng.

Sự làm nóng mẫu bởi tia laser có thể tạo ra một số hiệu ứng khác nhau như sự nóng chảy, thay đổi trạng thái thù hình, cháy mẫu. Mẫu dễ bị nóng nhất khi điểm chiếu trên mẫu có kích thước nhỏ tức là khi dùng vi đầu dò. Nóng mẫu thường là một vấn đề đối với các vật liệu có màu, có tính hấp thụ mạnh hay các hạt rất nhỏ có khả năng truyền nhiệt thấp. Ảnh hưởng do làm nóng mẫu thường quan sát được dưới dạng sự thay đổi phổ Raman theo thời gian, hoặc khi kiểm tra mẫu bằng mắt. Để giảm thiểu sự nóng mẫu do tia laser, bên cạnh việc làm giảm luồng laser, có thể sử dụng nhiều phương pháp khác như di chuyển mẫu hay di chuyển tia laser trong khi đo hay cải thiện sự truyền nhiệt từ mẫu bằng cách nhúng vào chất lỏng.

Tín hiệu Raman có thể được hấp thụ bởi nền mẫu hoặc bản thân mẫu. Điều này xảy ra nhiều hơn với các hệ máy FT-Raman bước sóng dài. Ở đây, tín hiệu Raman có thể xen phủ với một dải hấp thụ hòa cao (overtone) trong NIR. Hiệu ứng này phụ thuộc vào bộ quang của hệ thống cũng như cách trình bày mẫu, sự khác nhau của kích thước hạt trong chất rắn. Dù sao, những hiệu ứng này là không nghiêm trọng như trong phổ NIR.

Cuối cùng, nên biết rằng bức xạ laser là phân cực và các phổ Raman của các chất kết tinh và các mẫu định hướng

khác có thể khác nhau đáng kể, phụ thuộc vào cách mẫu được định vị. Nếu máy phổ Raman có thể cho bức xạ phân cực phẳng trên mẫu thì nên dùng một bộ trộn (scrambler) phân cực trong việc phân tích mẫu hàng ngày.

Các yếu tố đo lấy mẫu

Thuật ngữ lấy mẫu ở đây có thể được hiểu là phương cách lấy thông tin từ mẫu.

Kỹ thuật phổ Raman là một kỹ thuật nền tảng không, nghĩa là khi không có mẫu thì tín hiệu tại detector bằng không. Trong phổ hấp thụ thì ngược lại, khi không có mẫu thì tín hiệu tại detector lại là cực đại ($T = 100\%$). Các kỹ thuật nền tảng không vốn rất nhạy, chỉ một thay đổi nhỏ về nồng độ chất trong mẫu cũng sẽ có một thay đổi cường độ tín hiệu theo tỷ lệ tương ứng. Các nguồn sáng khác (như tia laser) cũng có thể làm thay đổi tín hiệu đo được. Ngoài ra, một tín hiệu nền lớn do huỳnh quang tạo ra sẽ làm tăng mức nhiễu. Vì thế, việc dùng tín hiệu Raman tuyệt đối để xác định trực tiếp một chất phân tích có thể sẽ rất khó khăn. Các yếu tố khác là sự thay đổi độ đục và độ không đồng nhất trong mẫu, sự thay đổi công suất laser chiếu lên mẫu và sự thay đổi vị trí của mẫu. Có thể giảm thiểu những ảnh hưởng này bằng cách lấy mẫu một cách ổn định, có tính đại diện. Thiết kế cân thận thiết bị cũng có thể giảm bớt nhưng không thể loại bỏ được hoàn toàn những ảnh hưởng đó.

Có nhiều cách để hạn chế sự dao động của kết quả do thăng giáng cường độ tuyệt đối gây nên. Cách thông dụng và hiệu quả nhất là thêm chất chuẩn nội và sử dụng các pic được tách khỏi chất chuẩn đó; cũng có thể dùng một dải hình thành do một phần của phân tử như một vòng thơm mà mặt cắt ngang Raman của nó không thay đổi theo cách chuẩn bị mẫu. Với phổ của một dung dịch, có thể sử dụng một pic dung môi tách biệt vì dung môi tương đối ít thay đổi từ mẫu này sang mẫu khác. Cũng vậy, với một chế phẩm, có thể dùng pic của một tá dược nếu pic đó là đáng

kể so với pic chất phân tích. Với giả thiết là những thay đổi định hướng của tia laser hay của mẫu có ảnh hưởng đồng đều lên toàn phổ, thì toàn bộ một phổ cũng có thể sử dụng như một phổ đối chiếu.

Một yếu tố quan trọng thứ hai đo lấy mẫu cần được xem xét là tạp nhiễm phổ. Tán xạ Raman là một hiệu ứng yếu, có thể bị che lấp bởi một số yếu tố bên ngoài. Các nguồn tạp nhiễm thông thường là những dị biệt của giá mẫu (như bình chứa hay giá thể/cơ chất) và ánh sáng môi trường xung quanh. Những vấn đề này có thể được xác định và giải quyết qua các thực nghiệm thận trọng.

THIẾT BỊ

Các bộ phận

Tất cả các thiết bị phổ Raman hiện đại đều có quá trình đo bao gồm việc chiếu một chùm tia laser lên mẫu, thu nhận các tia tán xạ, loại bỏ các tia tán xạ Rayleigh, tách các tia Raman theo bước sóng, và cho kết quả là một phổ Raman. Để có thể thực hiện các công việc trên, tất cả các máy phổ Raman trên thị trường đều có các bộ phận chính sau đây:

- Nguồn laser kích thích
- Bộ phận lấy mẫu
- Bộ phận lọc/loại bỏ tán xạ tại bước sóng laser
- Bộ xử lý bước sóng
- Detector và màng điện tử

Nguồn laser kích thích

Bảng 4.8 chỉ ra nhiều nguồn laser thông dụng trong ngành Dược hoặc trong phổ Raman. Các laser UV cũng được dùng cho các ứng dụng chuyên biệt khác, nhưng chúng có những điểm bất lợi cho các phép đo phân tích. Vì ngày càng có nhiều áp dụng mới của laser UV được đưa ra, có khả năng là chúng cũng sẽ được dùng trong kỹ thuật phổ Raman.

Bảng 4.8 - Các nguồn laser được ứng dụng trong ngành Dược

Laser λ , nm (số nguyên gần nhất)	Loại	Công suất tại nguồn laser	Dải bước sóng (Vùng Stokes, độ dịch chuyển 100 cm ⁻¹ đến 3000 cm ⁻¹)	Chú thích
Laser cận hồng ngoại (NIR)				
1064	Hộp trộn bộ (Nd:YAG)	Cho đến 3 W	1075 – 1563	Thường được dùng trong các máy chuyển dạng Fourier
830	Diod	Cho đến 300 mW	827 – 980	Diện hình là có giới hạn đến 2000 cm ⁻¹ ; chuyển dịch Raman do đáp ứng phổ CCD; ít phổ biến hơn các laser khác
785	Diod	Cho đến 500 mW	791 – 1027	Nguồn laser tán sắc được sử dụng rộng rãi nhất
Laser khả kiến				
632,8	He – Ne	Cho đến 500 mW	637 – 781	Nguyên cơ huỳnh quang tương đối thấp
532	Bộ đôi (Nd:YAG)	Cho đến 1 W	535 – 632,8	Nguyên cơ huỳnh quang cao
514,5	Ar ⁺	Cho đến 1 W	517 – 608	Nguyên cơ huỳnh quang cao
488 – 632,8	Ar ⁺	Cho đến 1 W	490 – 572	Nguyên cơ huỳnh quang cao

Bộ phận lấy mẫu

Có nhiều thiết kế khác nhau, trong đó có giao diện quang học trực tiếp, kính hiển vi, đầu dò sợi quang (loại không tiếp xúc hoặc loại quang học nhúng) và khoang chứa mẫu (bao gồm giá đỡ mẫu chuyên dụng và bộ phận thay đổi mẫu tự động). Đầu quang học lấy mẫu cũng có thể được thiết kế để có thể thu được một phổ Raman phụ thuộc vào sự phân cực và như vậy thường có thêm thông tin. Việc lựa chọn thiết bị lấy mẫu thường tùy thuộc vào chất phân tích và mẫu. Tuy nhiên cũng cần xem xét đến những vấn đề như thể tích mẫu lấy, tốc độ đo, an toàn laser, sự đồng nhất của mẫu để chọn bộ lấy mẫu tối ưu cho một ứng dụng cụ thể.

Bộ phận lọc

Tán xạ Rayleigh tại bước sóng của tia laser có cường độ lớn hơn nhiều bậc so với tín hiệu Raman và cần phải được loại bỏ trước khi đến detector. Lọc Notch được dùng phổ biến và vừa có kích thước nhỏ, vừa cho phép loại bỏ hết tán xạ Rayleigh. Phương pháp lọc truyền thống dùng các bộ đơn sắc nhiều cấp tuy vẫn còn nhưng ít được sử dụng. Ngoài ra, tùy theo bố trí hình học để thu góp tín hiệu của máy, có thể cần dùng nhiều bộ lọc hay lá chắn để che chắn mẫu khỏi các bức xạ bên ngoài (như ánh sáng trong phòng, các vạch plasma laser).

Bộ xử lý bước sóng

Thang bước sóng có thể được mã hóa hoặc bởi một bộ đơn sắc quét, một bộ đa sắc cách tử (trong các phổ kế Raman-CCD) hay một giao thoa kế hai chùm tia (trong các phổ kế FT-Raman). Thiết bị phù hợp để sử dụng phải có thể dùng cho các phép đo định tính. Nhưng để đo định lượng, cần lựa chọn máy cẩn thận vì sự tuyến tính của độ tán sắc và của đáp ứng có thể không đồng đều trên toàn thang phổ.

Detector

Chuỗi CCD trên nền silic là detector phổ biến nhất cho các máy tán sắc. Chuỗi CCD được làm mát cho phép đo trên thang phổ với độ chuyển dịch Raman từ 4500 - 100 cm^{-1} với nhiễu thấp khi sử dụng hầu hết các nguồn laser khả kiến như Nd:YAG, 532 nm (frequency-doubled neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet) hay heli-neon, 632,8 nm. Với diod laser 785 nm, dải sóng giảm xuống còn khoảng 3100 - 100 cm^{-1} . Với các CCD dùng phổ biến nhất, độ đáp ứng bước sóng đạt đỉnh khi dùng nguồn laser thông dụng 632,8 nm của laser khí He-Ne hay 785 nm của laser diod. Các máy FT thường sử dụng các detector một kênh germani hay indi-gali-arsenid (InGaAs) có đáp ứng trong vùng cận hồng ngoại để hợp với bước sóng kích thích 1064 nm của laser Nd:YAG.

Hiệu chuẩn

Ghi chú: Các phương pháp hiệu chuẩn thiết bị dưới đây nhằm cung cấp thông tin tham khảo.

Việc hiệu chuẩn máy Raman bao gồm ba phần: bước sóng sơ cấp (trục x), bước sóng tia laser và cường độ (trục y).

Hiệu chuẩn bước sóng sơ cấp (trục x)

Trong trường hợp các máy Raman FT, việc hiệu chuẩn bước sóng sơ cấp được thực hiện ít nhất đến mức gần đúng đầu tiên, với nguồn laser He-Ne nội tại. Hầu hết các thiết bị tán sắc đều sử dụng đèn phát xạ nguyên tử để hiệu chuẩn bước sóng sơ cấp. Với các máy phù hợp cho phép đo phân tích Raman, nhà cung cấp sẽ đưa ra một quy trình hiệu chuẩn trục x mà người sử dụng có thể thực hiện được. Với các máy tán sắc Raman, phương pháp hiệu chuẩn dựa trên nhiều vạch phát xạ nguyên tử được dùng nhiều hơn. Giá trị của cách hiệu chuẩn này có thể kiểm tra qua hiệu chuẩn bước sóng laser tiếp theo bằng cách sử dụng một chuẩn độ chuyển dịch Raman thích hợp. Với các thiết bị tán sắc quét, có thể cần hiệu chuẩn thường xuyên hơn và cần kiểm tra độ chính xác (precision) trong cả hai phương thức vận hành tĩnh tại và vận hành quét.

Hiệu chuẩn bước sóng tia laser

Bước sóng laser dao động có thể tác động lên cả độ chính xác của bước sóng lẫn độ chính xác của tín hiệu quang của máy. Ngay cả những nguồn laser ổn định nhất vẫn có thể cho các tia có bước sóng khác nhau đôi chút. Vì vậy cần khẳng định bước sóng để đảm bảo độ đúng của vị trí độ chuyển dịch Raman cho các máy Raman FT hay Raman tán sắc. Để làm được việc này, có thể dùng một vật liệu chuẩn của độ chuyển dịch Raman như mô tả trong ASTM E1840-96 (2002)¹ hay một vật liệu được kiểm tra thích hợp.

Ghi chú:

Các giá trị chuẩn đáng tin cậy của độ chuyển dịch Raman cho các thuốc thử thường dùng, dạng lỏng hay rắn cần cho việc hiệu chuẩn số sóng cho các phổ kế Raman được cung cấp trong ASTM E1840-96 (2002) đã nêu. Các giá trị này có thể được dùng cùng với các vạch phát xạ có độ đúng và độ chính xác cao của đèn hồ quang áp suất thấp, các vạch này có sẵn để dùng trong hiệu chuẩn máy Raman.

Các vật liệu tinh khiết phổ có thể mua tại các nhà cung cấp phù hợp. Một số máy có thể dùng một chuẩn Raman có sẵn bên cạnh quang trình ban đầu. Thiết bị chuẩn ngoại tải lập đúng quang trình của tia tán xạ (Khi sử dụng các chuẩn hóa học, cần chú ý tránh làm nhiễm tạp và khẳng định tính ổn định của chuẩn).

Trừ khi máy dùng là loại có hiệu chuẩn liên tục, ngay trước khi đo bước sóng laser, nên hiệu chuẩn trục bước sóng sơ cấp theo quy trình của nhà cung cấp máy. Trong hiệu chuẩn ngoại, nên đặt chuẩn độ chuyển dịch ở nơi đặt mẫu và tiến hành đo, sử dụng các thông số thu nhận tín hiệu thích hợp. Nên đánh giá trung tâm của pic trên một dải mạnh, phân giải tốt trong vùng phổ cần quan tâm. Có thể xác định vị trí pic bằng phương pháp thủ công hoặc dùng một thuật toán xác định pic đáng tin cậy. Phần mềm do người bán máy cung cấp có thể cho phép đo bước sóng laser và hiệu chỉnh bước sóng laser một cách thích hợp sao cho pic này nằm đúng vị trí. Nếu người bán máy không cung cấp phần mềm có chức năng này thì phải điều chỉnh bước sóng laser bằng tay. Tùy theo loại laser, bước sóng laser có thể thay đổi theo nhiệt độ, dòng, và thể. Dùng sai bước sóng có thể thay đổi tùy theo áp dụng cụ thể.

Hiệu chuẩn cường độ (trực y)

Việc hiệu chỉnh trực đo cường độ tín hiệu có thể quyết định sự định lượng thành công, nhờ có một số phương pháp phân tích {như đo lường hóa học (chemometrics)} và chuyển phương pháp giữa các máy. Cả hai loại phổ kế Raman FT và Raman tán xạ nên được hiệu chuẩn theo các quy trình tương tự. Dung sai chấp nhận được của độ chính xác cường độ tín hiệu (photometric precision) cho một phép đo cụ thể cần được đánh giá trong giai đoạn xây dựng phương pháp. Để hiệu chuẩn đáp ứng quang của một máy Raman, nên dùng một nguồn phát xạ băng rộng. Có hai phương pháp được chấp nhận là: Phương pháp A sử dụng một đèn wolfram phát ánh sáng trắng đã được hiệu chuẩn. Nhiều nhà cung cấp máy cũng cung cấp các chuẩn hiệu chuẩn độ bức xạ được nối chuẩn đến các phòng thí nghiệm đo lường quốc gia. Phương pháp này được áp dụng cho tất cả các bước sóng laser kích thích thông thường được nêu trong Bảng 1. Phương pháp B sử dụng các vật liệu chuẩn (SRM) do các phòng thí nghiệm đo lường quốc gia cung cấp. Một số chuẩn huỳnh quang bằng thủy tinh kích thích (doped-glass) có sẵn trên thị trường.

Phương pháp A:

Nguồn được đặt vào vị trí của mẫu, với tia laser tắt và đo đáp ứng detector (sử dụng các thông số thích hợp cho máy). Đầu ra của nguồn được sử dụng để hiệu chuẩn phải được biết. Phải xác định tỷ số giữa đáp ứng đo được và đáp ứng thực và lập ra một hồ sơ hiệu chỉnh. Việc hiệu chỉnh phải được áp dụng cho tất cả các phổ thu được từ máy đó. Hầu hết các nhà cung cấp sẽ cung cấp cả nguồn hiệu chuẩn và phần mềm thích hợp. Nếu nhà sản xuất không cung cấp quy trình hay phương pháp thì người sử dụng có thể dùng một nguồn được hiệu chuẩn và một phần mềm thích hợp. Nếu dùng một phương pháp của nhà sản xuất thì cần chú ý đến tính giá trị hợp lệ của nguồn và quy trình hiệu chuẩn. Người dùng phải có được tài liệu thích hợp từ nhà sản xuất để đảm bảo là cách làm đã được thẩm định đánh giá.

Phương pháp B:

Đặt chuẩn huỳnh quang vào chỗ đặt mẫu. Với nguồn laser bật, ghi phổ của vật liệu chuẩn SRM (có các thông số thích hợp cho máy). Đầu ra của nguồn được sử dụng để hiệu chuẩn phải được biết. Phải xác định tỷ số giữa đáp ứng đo được và đáp ứng thực, và lập ra một hồ sơ hiệu chỉnh. Việc hiệu chỉnh phải được áp dụng cho tất cả các phổ thu được từ máy đó. Hầu hết các nhà cung cấp sẽ cung cấp cả nguồn hiệu chuẩn và phần mềm thích hợp. Nếu nhà sản xuất không cung cấp quy trình hay phương pháp thì người sử dụng có thể dùng một vật liệu chuẩn và một phần mềm thích hợp. Nếu dùng một phương pháp của nhà sản xuất thì cần chú ý đến tính giá trị hợp lệ của vật liệu chuẩn và quy trình hiệu chuẩn. Người dùng phải có được tài liệu thích hợp từ nhà sản xuất để đảm bảo là cách làm đã được thẩm định đánh giá.

Hiệu chuẩn ngoại

Nên sử dụng chuẩn ngoại để hiệu chuẩn đầy đủ chức năng của máy, nhằm chứng minh tính phù hợp của các máy trong phòng thí nghiệm, ngay cả khi máy có phương pháp

hiệu chuẩn nội bộ. Việc sử dụng chuẩn ngoại không loại bỏ yêu cầu phải có các quy trình kiểm tra nội bộ; mà là để có tư liệu về sự phù hợp của thiết bị cho mục đích hoặc phép phân tích cụ thể. Với các thiết bị được lắp đặt tại một dây chuyền hay trong một lò phản ứng, là nơi không thể thường xuyên đặt một chuẩn ngoại và ngay cả với các máy có hiệu chuẩn nội bộ thì việc so sánh hiệu năng của phương pháp hiệu chuẩn nội và ngoại cũng phải được định kỳ kiểm tra. Mục đích của việc này là để kiểm tra những thay đổi trong các thành phần mà có thể không có được trong phương pháp hiệu chuẩn nội (thấu kính quá trình, đầu dò sợi quang, v.v.), ví dụ như việc hiệu chuẩn quang của hệ quang.

ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CÁC PHỔ KẾ RAMAN

Có thể đánh giá phổ kế Raman thông qua: Tính phù hợp của hệ thống, đánh giá vận hành và kiểm tra hiệu năng (xem mục Định nghĩa các thuật ngữ và ký hiệu). Mục đích của việc đánh giá tính phù hợp là để đảm bảo rằng công nghệ của thiết bị là phù hợp cho phương pháp định áp dụng. Mục đích của việc đánh giá vận hành là để đảm bảo rằng máy phù hợp cho mục đích sử dụng và qua đánh giá lại định kỳ, máy sẽ tiếp tục hoạt động tốt trong thời gian dài. Cần thường xuyên kiểm tra hiệu năng của máy khi máy được dùng cho một phép đo định tính hay định lượng cụ thể.

Vì có nhiều cách đo phổ Raman khác nhau, nên trong việc đánh giá vận hành và kiểm tra hiệu năng có thể dùng những chuẩn ngoại mà có thể dùng cho một máy bất kỳ. Như với bất kỳ một phổ kế nào, phổ kế Raman cần được đánh giá về cả độ chính xác số sóng (cho trục x và độ chuyển dịch từ nguồn kích thích) cũng như độ chính xác đo quang (trục tín hiệu y).

Trong kiểm tra hiệu năng, có thể sử dụng sự đánh giá mức độ phù hợp (quality-of-fit) với phổ quét ban đầu hay một nhóm phổ quét (thường được tập hợp trong các máy không quét). Trong một phép phân tích như thế, có thể cho rằng các phổ chuẩn thu được trên một máy mới hay máy mới được sửa chữa và được vận hành đúng cách là đại diện cho các phổ tốt nhất có thể có được. Việc so sánh các phổ thu được qua thời gian với các chuẩn tương đồng (hoặc là chuẩn gốc hay các chuẩn mới cùng loại, khi có quan ngại về độ ổn định của chuẩn) là cơ sở để đánh giá độ ổn định lâu dài của hệ đo phổ Raman.

Tần số thử nghiệm

Việc đánh giá thiết bị được tiến hành theo từng khoảng thời gian xác định hay sau khi sửa chữa, thay đổi cấu hình quang học như thay nguồn laser, thay detector hay thay các lọc. Việc đánh giá lại toàn bộ thiết bị có thể không cần thiết khi thay đổi các phụ tùng như vi đầu dò, buồng chứa mẫu, đầu dò sợi quang cố định. Trong những trường hợp này có thể chỉ cần tiến hành đánh giá hiệu năng là đủ; và nên làm theo chỉ dẫn cụ thể của nhà cung cấp về các yêu cầu đánh giá cho một loại máy xác định. Các phép thử bao gồm thử độ chính xác bước sóng (của trục x và độ chuyển dịch từ nguồn kích thích), và độ chính xác đo quang (của trục tín

hiệu y). Các phép thử đánh giá thiết bị đòi hỏi phải đạt yêu cầu về dung sai cho ứng dụng phân tích cụ thể.

Việc kiểm tra hiệu năng được thực hiện trên thiết bị được cấu hình cho các phép đo phân tích và được thực hiện thường xuyên hơn đánh giá thiết bị. Kiểm tra hiệu năng bao gồm việc đo độ không đảm bảo của bước sóng và độ chính xác của thang cường độ. Trước khi thu thập dữ liệu cho một ngày cần tiến hành các phép thử độ chính xác bước sóng và độ chính xác thang cường độ là cần thiết. Hiệu năng được kiểm tra bằng cách so các phổ thu được với các phổ thu được trong lần đánh giá thiết bị trước.

Đánh giá vận hành thiết bị (thẩm định vận hành)

Trong đánh giá vận hành cũng như đánh giá hiệu năng, điều quan trọng cần lưu ý là các tiêu chuẩn cần đạt được nên chỉ là các yêu cầu chung. Các tiêu chuẩn cụ thể cho các máy và các áp dụng cụ thể có thể thay đổi theo phương pháp phân tích được sử dụng và độ đúng mong muốn của kết quả cuối cùng. Các vật liệu chuẩn ASTM được chỉ định với quy ước là trong một số trường hợp (đặc biệt là các áp dụng trực tuyến ở xa) việc sử dụng một trong số các vật liệu chuẩn này là không thực tế và có thể dùng các vật liệu khác đã được kiểm tra thích hợp. Trong trường hợp này, điều quan trọng là cần lưu ý các thông số cụ thể như nhiễu của phổ kế, các giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và độ rộng chấp nhận được của dải phổ cho một áp dụng đã cho sẽ phải được xác định trong quá trình xây dựng phương pháp phân tích. Các giá trị cụ thể cho phép thử như độ lớn của nhiễu và độ rộng của chùm tia của phổ kế sẽ phụ thuộc vào thiết bị sử dụng và mục đích được đưa ra. Vì vậy, những phép thử thiết bị cụ thể cho các thông số nói trên sẽ không được trình bày trong chương này.

Độ đúng bước sóng (trục x)

Điều quan trọng là đảm bảo độ đúng của trục bước sóng thông qua hiệu chuẩn để duy trì tính toàn vẹn của vị trí các pic Raman. Việc hiệu chuẩn bước sóng của phổ kế Raman gồm có hai phần: Hiệu chuẩn trục bước sóng sơ cấp và hiệu chuẩn bước sóng laser. Sau khi hiệu chuẩn trục bước sóng sơ cấp và bước sóng laser có thể xác định độ không đảm bảo đo bước sóng của thiết bị. Để hoàn thiện có thể sử dụng một chuẩn của độ dịch chuyển Raman, ví dụ như chuẩn ASTM hay một vật liệu đã được kiểm tra phù hợp khác. Nên chọn một chuẩn với các dải có mặt trên toàn thang phổ Raman để có thể đánh giá độ không đảm bảo bước sóng của thiết bị tại nhiều vị trí trên phổ. Dung sai của độ chính xác bước sóng cho một thiết bị nên được đánh giá trong giai đoạn xây dựng phương pháp.

Ghi chú: Với các thiết bị tán sắc quét, việc hiệu chuẩn có thể cần thực hiện thường xuyên hơn và có thể cần kiểm tra độ chính xác trong cả hai kiểu vận hành tĩnh và vận hành quét.

Độ chính xác đo quang

Độ dao động của laser, tính theo tổng photon phát ra, xảy ra giữa hai lần đo có thể gây nên sự thay đổi độ chính xác

đo quang của thiết bị. Điều không may là rất khó tách được những thay đổi của đáp ứng đo quang (gắn với dao động của tổng photon phát ra) khỏi các biến động do cảm ứng bởi mẫu và lấy mẫu. Đây là một lý do vì sao không nên thực hiện các phép đo Raman tuyệt đối và vì sao những yêu cầu về độ chính xác đo quang được quy định tương đối lỏng lẻo. Nên đánh giá dung sai độ chính xác đo quang của một thiết bị ngay trong giai đoạn xây dựng phương pháp.

Đánh giá hiệu năng (thẩm định hiệu năng)

Mục tiêu của việc đánh giá hiệu năng là để đảm bảo rằng thiết bị đang hoạt động đúng trong giới hạn đã chỉ ra về độ chính xác bước sóng, độ chính xác đo quang và độ nhạy. Trong một số trường hợp, thiết bị đã được thiết kế để dùng cho một phép đo cụ thể (ví dụ, để đặt trong trong dây chuyền một lò phản ứng), thì không thể hoặc không cần đo bước sóng và tín hiệu đo quang, sử dụng các chuẩn đánh giá đã nêu. Nếu như việc đánh giá vận hành đã chứng minh rằng máy là phù hợp cho mục đích sử dụng, thì có thể dùng một chuẩn bên ngoài duy nhất để thường xuyên kiểm tra lại chức năng của máy (ví dụ, sau khi làm sạch lò phản ứng, kiểm tra tín hiệu của dung môi xử lý cả về độ chính xác bước sóng và độ chính xác đo quang). Chuẩn kiểm tra hiệu năng phải phù hợp với khuôn hình của mẫu đang phân tích càng nhiều càng tốt và phải dùng các thông số thu nhận phổ giống nhau. Các phép đo định lượng của một phổ chuẩn kiểm tra hiệu năng sẽ kiểm tra cả độ chính xác bước sóng (trục x và bước sóng laser) và độ chính xác tín hiệu đo quang. Nếu việc so sánh một chuỗi các phổ là tốt thì điều đó chứng minh rằng thiết bị đang tiếp tục hoạt động tốt.

Độ chính xác bước sóng

Độ chính xác bước sóng được xác định bằng cách thu thập dữ liệu của một phổ của một vật liệu chuẩn độ dịch chuyển Raman đã chọn, trong một khoảng thời gian bằng với thời gian dùng để thử độ ổn định đo quang. Nếu thuận tiện thì các mẫu đã nghiền bột nên được đóng gói lại (repack) giữa hai loạt đo. Vị trí các pic trên toàn bộ vùng phổ đáng quan tâm được dùng để tính độ chính xác. Hiệu năng được kiểm tra bằng cách đối chiếu vị trí các pic với vị trí thu được trong lần đánh giá thiết bị trước và không được sai khác quá $\pm 0,3 \text{ cm}^{-1}$ so với độ lệch chuẩn, mặc dù tiêu chuẩn này có thể điều chỉnh theo độ đúng yêu cầu cho phép đo.

Độ chính xác đo quang

Độ chính xác đo quang phải được đo bằng cách thu thập các dữ liệu phổ của một vật liệu chuẩn kiểm tra thích hợp, trong một thời gian đã định. Sau khi hiệu chỉnh đường nền, phải dùng một thuật toán thích hợp để tính diện tích một số các dải trên vùng phổ quan tâm. Diện tích của dải mạnh nhất được cho là 1 và các dải (envelopes) khác được chuẩn hóa theo dải này. Hiệu năng được kiểm tra bằng cách so sánh diện tích các dải hiện đo được với các diện tích tương ứng đã thu được trong lần đánh giá thiết bị trước đó. Sự sai khác không được vượt quá 10 % mặc dù chỉ tiêu này có thể được điều chỉnh theo yêu cầu về độ đúng của phép đo.

Độ chính xác và độ đúng của công suất laser đầu ru
 Phép thử này chỉ được áp dụng cho các thiết bị Raman có máy đo công suất laser nội tại và tự động. Thiết bị không có máy này thì phải sử dụng một máy đo công suất laser đã được hiệu chuẩn của một nhà cung cấp có uy tín. Đầu ra của laser phải được thiết lập sao cho có tính đại diện và đáp ứng được các yêu cầu của phép đo phân tích và của công suất laser được đo. Đầu ra phải được đo và kiểm tra đối chiếu với đầu ra đo được khi đánh giá thiết bị. Công suất (tính theo miliwatt hay watt) phải không sai khác quá 25 % so với mức khi đánh giá. Nếu sai khác lớn hơn thì thiết bị cần được bảo dưỡng (vì sự sai khác này có thể chỉ ra rằng, bên cạnh những điều khác, có sự lệch lạc lớn của hệ thống hoặc này sinh hư hỏng của nguồn laser). Với các thiết bị có máy đo công suất laser bên trong, độ đúng của các giá trị do máy đo công suất laser bên trong cho ra phải được so sánh với một máy đo công suất bên ngoài đã hiệu chuẩn trong khoảng thời gian không quá 12 tháng. Giá trị tính được của máy bên trong phải được so với giá trị của máy bên ngoài. Hiệu năng được kiểm tra bằng cách so sánh giá trị hiện có với giá trị thu được trong lần đánh giá thiết bị trước đây. Nhà sản xuất thiết bị có thể cung cấp một phần mềm để việc phân tích này được dễ dàng. Nếu thiết kế của thiết bị không cho phép sử dụng một máy đo công suất bên ngoài thì khi đó nhà cung cấp phải đưa ra tài liệu đảm bảo chất lượng của thiết bị và cung cấp một quy trình được khuyến cáo để có thể thực hiện được việc phân tích nói trên cùng với kỳ bảo dưỡng đã định.

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP

Việc thẩm định các phương pháp phổ Raman được làm theo các qui định chung đối với các tiêu chí về độ đúng, độ chính xác v.v. Tuy nhiên, nhiều tiêu chí trong đó bị ảnh hưởng bởi các biến đặc trưng của phổ Raman. Huỳnh quang có thể là biến đầu tiên có thể ảnh hưởng đến tính phù hợp của một phương pháp. Sự có mặt của các tạp huỳnh quang trong mẫu có thể rất khác nhau và có ít ảnh hưởng đến tính chấp nhận được của vật liệu. Phương pháp phải đủ linh hoạt để chấp nhận được các chế độ lấy mẫu cần áp dụng để giảm thiểu ảnh hưởng của các tạp này. Độ tuyến tính của detector phải được khẳng định trên thang các mức tín hiệu có thể có. Huỳnh quang có thể đẩy cao cả đường nền lẫn nhiễu so với khi thẩm định; trong trường hợp này, phải làm giảm huỳnh quang hoặc phải sửa đổi phương pháp cho phù hợp với mức huỳnh quang cao. Khi nhiễu đường nền tăng cao sẽ có tác động tiêu cực đến độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp. Vì huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến kết quả định lượng do chuyển dịch đường nền, nên phải khẳng định việc định lượng là có thể chấp nhận được ở các mức khử quang (photobleaching) khác nhau. Tác động của laser lên mẫu phải được xác định. Với các phép đo dùng các công suất laser và thời gian tiếp xúc với tia khác nhau, việc kiểm tra mẫu bằng mắt và kiểm tra định tính của phổ Raman sẽ khẳng định được là mẫu không bị biến đổi (không tính đến sự khử quang). Để khẳng định trong phổ Raman, các biến đặc trưng là sự chuyển dịch vị

tri của pic, những thay đổi chiều cao pic và độ rộng dải và những thay đổi không mong đợi của cường độ nền. Độ chính xác của phương pháp cũng phải tính đến vị trí của mẫu. Cách trình bày mẫu là một yếu tố trọng yếu cho cả chất lỏng lẫn chất rắn và phải được kiểm soát chặt chẽ hoặc phải tính đến trong mô hình hiệu chuẩn. Độ nhạy cảm của vị trí mẫu thường có thể được hạn chế bằng cách chuẩn bị mẫu thích hợp hoặc bằng hình học của giá đỡ mẫu, nhưng nó còn thay đổi từ máy này sang máy khác tùy theo cấu hình quang học của bộ thu nhận và kích thích.

ĐỊNH NGHĨA CÁC THUẬT NGỮ VÀ KÝ HIỆU

Mô hình hiệu chuẩn (calibration model) là một biểu thức toán học của sự liên hệ giữa đáp ứng của một máy phân tích và các tính chất của mẫu.

Độ rộng dải phổ (instrument bandpass) hay **Độ phân giải** (resolution) là thước đo khả năng tách các bức xạ có bước sóng gần nhau của một phổ kế.

Đánh giá vận hành (operational qualification) là quá trình làm việc và ghi chép để chứng minh rằng máy hoạt động theo đúng các chỉ tiêu kỹ thuật của máy và có thể đáp ứng được mục đích sử dụng. Cần thực hiện việc này sau khi có bất kỳ sự thay đổi có ý nghĩa nào như lắp đặt, đổi chỗ, sửa chữa quan trọng, v.v.

Đánh giá hiệu năng (performance qualification) là quá trình sử dụng một hay nhiều vật liệu đối chiếu ổn định và có các đặc tính xác định rõ để kiểm chứng hiệu năng làm việc ổn định của máy. Trong việc đánh giá này có thể sử dụng các chuẩn khác nhau cho các đặc tính hiệu năng khác nhau. **Phổ Raman** (Raman spectra)² là đồ thị chi trên trục tung năng lượng bức xạ, hay số photon, tán xạ bởi mẫu khi có tương tác giữa dao động phân tử trong mẫu và một bức xạ đơn sắc có tần số cao hơn nhiều so với tần số dao động. Trục hoành thường là hiệu số số sóng giữa ánh sáng tới và ánh sáng tán xạ.

Tán xạ Raman (thường) (Nomal Raman scattering)² là sự tán xạ không đàn hồi của ánh sáng xảy ra khi có thay đổi độ phân cực của các liên kết liên quan trong một dao động phân tử. Phổ Raman (thường) xuất hiện khi mẫu được kích thích bởi một bức xạ không cộng hưởng với sự chuyển dịch điện tử trong mẫu.

Độ chuyển dịch số sóng Raman (Raman wavenumber shift)²:

$$\beta \Delta \tilde{\nu}$$

Trong đó:

β là mặt cắt ngang Raman vi phân, có giá trị dương với tán xạ Stokes và âm với tán xạ đối Stokes.

$\Delta \tilde{\nu}$ là hiệu của số sóng của vạch kích thích và số sóng của tia tán xạ, với đơn vị SI là m^{-1} . Đơn vị thường dùng là $cm^{-1} = 100 m^{-1}$.

Ghi chú:

¹ ASTM E1840-96 (2002) *Hướng dẫn về các chuẩn độ dịch chuyển dùng cho hiệu chuẩn phổ kế. Standard Guide for Raman Shift Standards for Spectrometer Calibration.*

² Chalmers, J., Griffiths, P., Eds. *Sổ tay phổ dao động (Handbook of Vibrational Spectroscopy)*, 2002.

PHỤ LỤC 5

CÁC KỸ THUẬT TÁCH SẮC KÝ

Các kỹ thuật tách sắc ký là những phương pháp tách trong đó các thành phần của mẫu được phân bố vào hai pha: một pha tĩnh và một pha động. Pha tĩnh có thể là một chất rắn, cũng có thể là một chất lỏng được giữ trên một chất rắn hay một gel. Pha tĩnh có thể được nhồi vào cột, hoặc trải thành một lớp, hay phân tán thành một lớp phim v.v... Pha động có thể là chất khí, chất lỏng hay chất lưu siêu tới hạn (còn được gọi là chất lỏng siêu tới hạn). Sự tách sắc ký có thể dựa trên các cơ chế khác nhau như hấp phụ, phân bố khối lượng (hay phân chia), trao đổi ion, hoặc dựa trên sự khác nhau về tính chất lý hóa của các phân tử như kích thước, khối lượng, thể tích v.v...

Phụ lục này chỉ đề cập đến các định nghĩa và phép tính các thông số thông thường trong kỹ thuật sắc ký, các yêu cầu thường được áp dụng cho sự phù hợp của hệ thống sắc ký. Nguyên lý, thiết bị và phương pháp tách được trình bày trong các phép thử chung sau đây:

- Phương pháp sắc ký giấy (Phụ lục 5.1)
- Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2)
- Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3)
- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)
- Phương pháp sắc ký rây phân tử (Phụ lục 5.5)

Định nghĩa

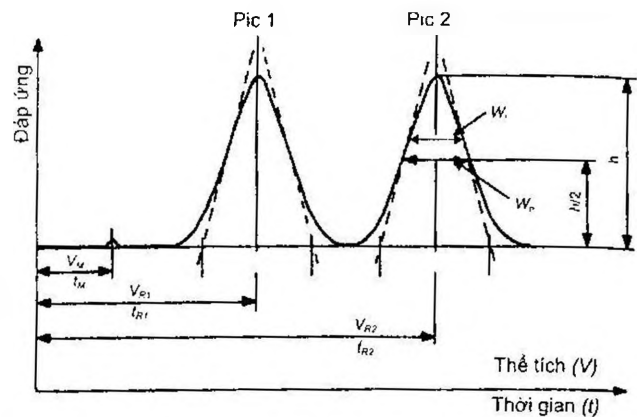
Các định nghĩa sau đây được dùng trong các chuyên luận để tính toán các thông số về tính phù hợp của hệ thống và các tiêu chuẩn chấp nhận. Một số thiết bị có phần mềm của nhà sản xuất dùng để tính toán một vài thông số như tỷ số tín hiệu trên nhiễu và độ phân giải có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, người sử dụng có trách nhiệm đảm bảo rằng các phương pháp dùng trong phần mềm đó phù hợp với yêu cầu của bộ tiêu chuẩn này; nếu không, phải điều chỉnh cho phù hợp.

Sắc ký đồ

Sắc ký đồ là một đồ thị hay một cách trình bày khác mô tả sự thay đổi đáp ứng của detector (hay nồng độ của chất hay một đại lượng khác làm thước đo nồng độ của chất) theo thời gian, thể tích hay khoảng cách. Một sắc ký đồ lý tưởng có dạng một chuỗi các pic kiểu Gauss trên một đường nền (Hình 5.1).

Thời gian lưu (t_R)

Là thời gian cần thiết để rửa giải một chất (Hình 5.1, đường nền biểu thị bằng phút).



Hình 5.1

Pic

Pic, hay còn gọi là đỉnh, là phần sắc ký đồ ghi lại đáp ứng của detector khi một chất (hoặc 2 hay nhiều chất không tách ra khỏi nhau) được rửa giải khỏi cột.

Pic có thể được xác định bằng diện tích pic, hoặc chiều cao pic (h) và chiều rộng pic ở nửa chiều cao (w_h), hoặc chiều cao pic (h) và chiều rộng pic giữa các điểm uốn (w_i). Ở các pic có dạng hình Gauss (Hình 5.1), có mối quan hệ biểu thị bằng phương trình sau:

$$w_h = 1,18 \times w_i$$

Thể tích lưu (V_R)

Là thể tích pha động cần thiết để rửa giải một chất. Thể tích lưu có thể tính được từ thời gian lưu và tốc độ dòng (ml/min) theo công thức:

$$V_R = t_R \times F$$

Trong đó:

F là lưu lượng dòng (hay tốc độ dòng) của pha động (ml/min).

Thời gian chết (t_M) (hold-up time)

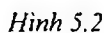
Là thời gian cần thiết để rửa giải một chất không bị lưu giữ (Hình 5.1, đường nền biểu thị bằng phút). Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử (xem Hình 5.2), thời gian chết được ký hiệu là t_0 .

Thể tích chết (V_M) (hold-up volume)

Là thể tích pha động cần thiết để rửa giải một chất không bị lưu giữ. Nó có thể được tính từ thời gian chết (t_M) và tốc độ dòng F (số ml pha động trong 1 min) theo công thức sau:

$$V_M = t_M \times F$$

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử (xem Hình 5.2), thể tích chết được ký hiệu là V_0 .



Hệ số phân bố khối lượng (D_m) hay còn gọi là thừa số dung lượng (k'), hoặc thừa số lưu giữ (k), được định nghĩa và tính theo công thức sau:

$$D_m = k' = k = \frac{m_s}{m_M} = K_C \frac{V_s}{V_M}$$

Thừa số lưu giữ k của một chất có thể được xác định trên sắc ký đồ theo công thức:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thời gian toàn bộ của pha động là thời gian lưu của một chất mà kích thước phân tử nhỏ hơn kích thước các lỗ nhỏ nhất của gel (Hình 5.2).

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thể tích toàn bộ của pha động là thể tích lưu của một chất mà kích thước phân tử nhỏ hơn kích thước các lỗ nhỏ nhất của gel. Nó có thể được tính từ thời gian toàn bộ của pha động (t_r) và tốc độ dòng F (ml.min) theo công thức sau:

$$V_i = I_i \times F$$

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thời gian lưu của chất không bị lưu giữ là thời gian lưu của một chất mà kích thước phân tử lớn hơn kích thước các lỗ lớn nhất của gel (Hình 5.2).

Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, thể tích lưu của chất không bị lưu giữ là thể tích lưu của một chất mà kích thước phân tử lớn hơn kích thước các lỗ lớn nhất của gel. Có thể tính thể tích lưu của chất không bị lưu giữ từ thời gian lưu của chất không bị lưu giữ (t_0) và tốc độ dòng F (ml/min) theo công thức sau:

$$V_0 = t_0 \times \mathbb{F}$$

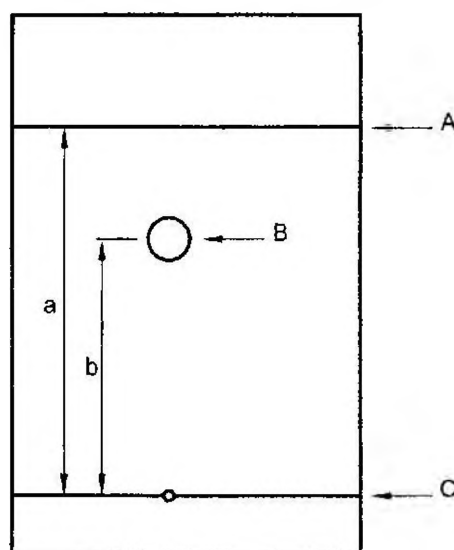
Trong phương pháp Sắc ký rây phân tử, đặc tính rữa giải của một chất có thể được biểu thị dưới dạng hằng số phân bố (còn gọi là hệ số phân bố) K_0 và được tính theo công thức:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_c - t_0}$$

Thừa số chậm R_r , hay còn gọi là hệ số di chuyển R_r , được dùng trong sắc ký trên mặt phẳng (sắc ký lớp mỏng, sắc ký giấy) là tỷ số giữa khoảng cách từ điểm chấm mẫu đến tâm của vết sắc ký và khoảng cách di chuyển của dung môi tính từ điểm chấm mẫu (Hình 5.3).

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

a là quãng đường di chuyển của tuyến dung môi.



C. Vạch xuất phát

Hình 5.3

Số đĩa lý thuyết (N)

Tùy thuộc vào kỹ thuật sử dụng, hiệu năng của cột (hay hiệu lực biểu kiến của cột) biểu thị dưới dạng số đĩa lý thuyết, có thể tính được từ những dữ liệu thu được dưới điều kiện đẳng nhiệt, đẳng dòng hoặc đẳng mật độ (isodense), theo công thức sau, trong đó các giá trị t_R và w_h có cùng đơn vị đo:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Trong đó:

t_R là thời gian lưu của pic tương ứng với chất phân tích;

w_h là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic.

Số đĩa lý thuyết thay đổi theo chất, theo cột, nhiệt độ cột, pha động và thời gian lưu.

Thể tích lưu trú (D) (Dwell volume)

Thể tích lưu trú (còn gọi là thể tích trễ gradient) là thể tích giữa điểm mà các chất rời giải của pha động gặp nhau và đỉnh của cột. Nó có thể được xác định bằng cách sau:

Cột: Thay cột sắc ký bằng một ống mao quản thích hợp (ví dụ ống 1 m $\times$ 0,12 mm).

Pha động: Pha động A: Nước cất;

Pha động B: Dung dịch acetone 0,1 % (tt/tt).

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 - 20	100 $\rightarrow$ 0	0 $\rightarrow$ 100
20 - 30	0	100

Tốc độ dòng: Đặt tốc độ dòng sao cho có áp suất ngược thích hợp (back-pressure) (ví dụ 2 ml/min).

Phát hiện: Quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng ở 265 nm. Xác định thời điểm ($t_{0,5}$) tính bằng phút khi độ hấp thụ tăng lên đạt 50 % (Hình 5.4).

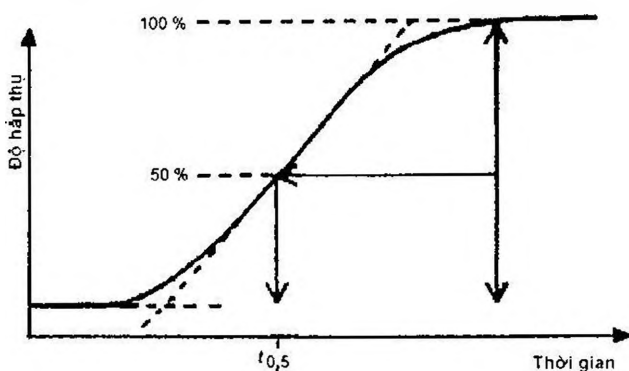
$$D = t_D \times F$$

Trong đó:

$t_D = t_{0,5} - 0,5t_G$ (tính bằng phút);

t_G là thời gian gradient đã xác định trước (= 20 min);

F là tốc độ dòng (tính bằng ml/min).



Hình 5.4

Hệ số đối xứng (A_s)

Hệ số đối xứng của một pic (Hình 5.5) được tính theo công thức sau:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \times d}$$

Trong đó:

$w_{0,05}$ là chiều rộng của pic ở 1/20 chiều cao của pic;

d là khoảng cách tính từ đường thẳng đứng đi qua đỉnh pic đến cạnh phía trước của pic ở 1/20 chiều cao của pic.

Khi $A_s = 1,0$ thì pic hoàn toàn đối xứng. Khi $A_s > 1,0$ thì pic bị kéo đuôi. Khi $A_s < 1,0$ thì pic bị doãng về phía trước.

Độ phân giải (R_s)

Độ phân giải (R_s) giữa hai pic của hai chất (Hình 5.5) được tính theo công thức sau:

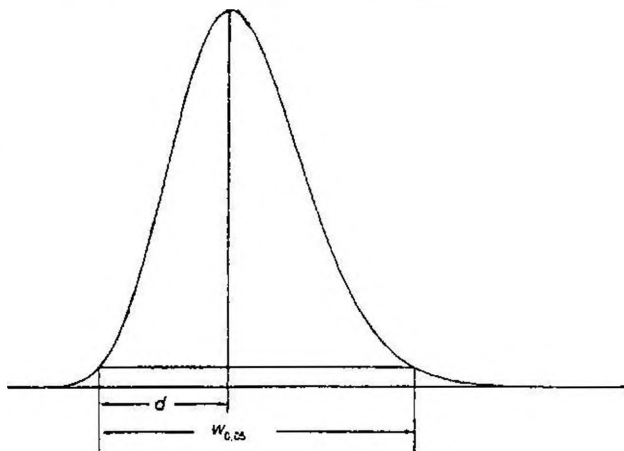
$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Trong đó:

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1}, t_{R2} là thời gian lưu của các pic tương ứng;

w_{h1}, w_{h2} là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic.



Hình 5.5

Trong phương pháp định lượng bằng sắc ký trên mặt phẳng dùng phép đo mật độ, khoảng cách di chuyển được dùng thay cho thời gian lưu và độ phân giải giữa các pic của 2 chất có thể được tính theo công thức sau:

$$R_s = \frac{1,18 \times a \times (R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Trong đó:

R_{F1}, R_{F2} là thừa số chậm của các pic tương ứng;

w_{h1}, w_{h2} là chiều rộng pic ở nửa chiều cao pic;

a là khoảng cách di chuyển của tuyến dung môi.

Tỷ số đỉnh - hõm (p/v)

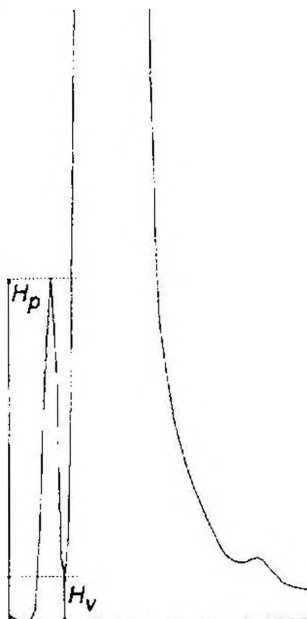
Tỷ số đỉnh - hõm (p/v) có thể được dùng như một thông số về tính phù hợp của hệ thống trong phép thử các tạp chất liên quan khi hai pic không được tách đến đường nền (Hình 5.6).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

Trong đó:

H_p là chiều cao của đỉnh pic nhỏ so với đường nền ngoại suy;

H_v là chiều cao của đáy hõm tách hai pic lớn và nhỏ so với đường nền ngoại suy.



Hình 5.6

Độ lưu giữ tỷ đối (r)

Độ lưu giữ tỷ đối (r) có thể ước lượng theo công thức sau:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

Trong đó:

t_{Ri} là thời gian lưu của pic chất được quan tâm;

t_{Rst} là thời gian lưu của pic chất đối chiếu (thường là pic tương ứng với chất cần thử);

t_M là thời gian chết.

Độ lưu giữ tỷ đối chưa hiệu chỉnh (r_G) được tính theo công thức:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Trừ khi có hướng dẫn khác, các giá trị độ lưu giữ tỷ đối cho trong các chuyên luận là độ lưu giữ tỷ đối chưa hiệu chỉnh.

Trong sắc ký trên mặt phẳng, các thừa số chậm R_{Fst} và R_{Fi} được dùng thay cho các thời gian lưu t_{Rst} và t_{Ri} .

Tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N)

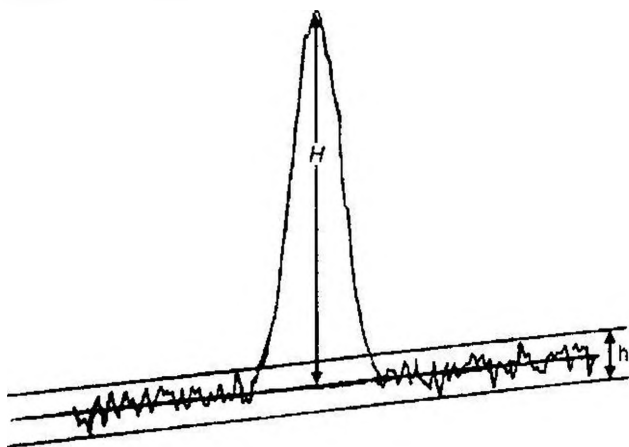
Nhiều có ảnh hưởng đến độ chụm của phép định lượng. Tỷ số tín hiệu trên nhiễu được tính theo công thức:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

Trong đó:

H là chiều cao pic (Hình 5.7) tương ứng với chất được khảo sát trên sắc đồ thu được với dung dịch chất đối chiếu đã định; chiều cao này đo từ đỉnh pic đến đường nền ngoại suy được xác định trên một khoảng bằng ít nhất 5 lần chiều rộng của pic ở nửa chiều cao pic;

h là khoảng dao động của nhiễu đường nền trên sắc đồ thu được sau khi tiêm một mẫu trắng; khoảng dao động này được xác định trên một quãng đường bằng ít nhất 5 lần chiều rộng của pic ở nửa chiều cao pic trên sắc đồ thu được khi tiêm dung dịch chất đối chiếu đã định và nếu có thể thì quãng đường này phân bố đều hai bên vị trí của pic của chất khảo sát.



Hình 5.7

Độ lặp lại

Độ lặp lại của đáp ứng được biểu thị dưới dạng phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của một dãy kết quả của ít nhất 3 lần tiêm hoặc nạp liên tiếp dung dịch chất đối chiếu và được tính theo công thức:

$$RSD(\%) = \frac{100}{\bar{y}} \times \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Trong đó:

y_i là các giá trị cá thể dưới dạng diện tích pic, hay chiều cao pic, hoặc tỷ số các diện tích trong phương pháp nội chuẩn;

$\bar{y}$ là trung bình của các giá trị cá thể;

n là số các giá trị cá thể.

Tính phù hợp của hệ thống

Các bộ phận khác nhau của thiết bị sắc ký cần phải được kiểm tra hiệu chỉnh để có thể đạt được hiệu năng theo yêu cầu khi tiến hành phép thử hay định lượng.

Các phép thử tính phù hợp của hệ thống là phần không thể thiếu của một phương pháp và được dùng để đảm bảo hệ thống sắc ký có hiệu năng phù hợp. Hiệu lực biểu kiến, thừa số lưu giữ (hệ số phân bố khối lượng), độ phân giải, độ lưu giữ tỷ đối và hệ số đối xứng là những thông số thường được dùng để đánh giá hiệu năng của cột. Các yếu tố có thể ảnh hưởng đến đặc tính sắc ký bao gồm:

Thành phần, nồng độ ion, nhiệt độ và pH biểu kiến của pha động;

Tốc độ dòng, kích thước cột, nhiệt độ cột và áp suất;
Các đặc tính của pha tĩnh bao gồm loại chất mang, độ xốp (cỡ lỗ), cỡ hạt, kiểu các hạt, diện tích bề mặt riêng;
Pha đảo và các pha tĩnh có biến đổi bề mặt khác như biến đổi hoá học (được biểu thị bởi end-capping, carbon loading v.v...).

Các yêu cầu sau đây và các yêu cầu bổ sung trong chuyên luận cụ thể phải được đáp ứng, trừ khi có chỉ dẫn khác:

Trong phép thử các tạp chất liên quan hay định lượng, hệ số đối xứng của pic chính trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu phải trong khoảng từ 0,8 đến 1,5, trừ khi có chỉ dẫn khác;

Trong phép định lượng hoạt chất mà giá trị xác định là 100 % chất tinh khiết, độ lệch chuẩn tối đa được phép $[RSD(\%)_{\max}]$ cho các lần tiêm lặp lại của dung dịch đối chiếu được tính theo công thức sau:

$$RSD(\%)_{\max} = \frac{K \times B \times \sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

Trong đó:

K là một hằng số (= 0,349) thu được từ biểu thức

$$K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$$

mà $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ biểu thị độ lệch chuẩn tương đối yêu cầu cho 6 lần

tiêm với B = 1,0;

B là giới hạn trên được cho trong chuyên luận riêng trừ đi 100 %;

n là số lần tiêm lặp lại dung dịch đối chiếu ($3 \leq n \leq 6$);

$t_{90\%,n-1}$ là giá trị t-Student ở mức xác suất 90 % (hai phía) với bậc tự do n - 1.

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, độ lệch chuẩn tương đối được phép tối đa không được vượt quá giá trị tương ứng ghi trong Bảng 5.1. Yêu cầu này không áp dụng cho phép thử các tạp chất liên quan.

Bảng 5.1 - Yêu cầu về độ lặp lại

B (%)	Số lần tiêm lặp lại			
	3	4	5	6
	Độ lệch chuẩn tương đối được phép tối đa			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Trong phép thử các tạp chất liên quan, giới hạn định lượng (tương ứng với tỷ số tín hiệu trên nhiễu bằng 10) phải bằng hoặc nhỏ hơn giới hạn được bỏ qua.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống là đòi hỏi cho quá trình tiến hành sắc ký. Tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau như tần suất sử dụng và kinh nghiệm với hệ thống sắc ký, người phân tích sẽ lựa chọn một quy trình kiểm chứng thích hợp về tính phù hợp này.

Điều chỉnh các điều kiện sắc ký

Mức độ điều chỉnh các thông số khác nhau để thỏa mãn tính phù hợp của hệ thống sắc ký mà không làm thay đổi cân bản phương pháp được liệt kê dưới đây. Việc điều chỉnh các điều kiện rửa giải gradient thì khắt khe hơn so với rửa giải đẳng dòng vì nó có thể dẫn tới sự chuyển dịch các pic đến một bước khác của quá trình gradient. Điều này dẫn đến việc xác định không đúng vị trí các pic, làm che lấp pic hoặc làm chuyển dịch pic tới mức chất phân tích được rửa giải ra sau thời gian đã định. Những thay đổi khác với những điểm đã được qui định đòi hỏi phải thẩm định lại phương pháp. Những điều kiện sắc ký được mô tả đều đã được thẩm định khi biên soạn xây dựng chuyên luận.

Các phép thử tính thích hợp của hệ thống được đưa vào để đảm bảo yêu cầu chia tách cho phép thử hay phép định lượng đạt chất lượng mong muốn. Tuy nhiên, vì pha tĩnh chỉ được mô tả một cách chung chung và trên thị trường lại có nhiều loại pha tĩnh có những đặc tính sắc ký khác nhau, nên có thể cần điều chỉnh một số điều kiện sắc ký để đạt yêu cầu của tính phù hợp hệ thống. Đặc biệt trong phương pháp sắc ký pha đảo, việc thay đổi các thông số sắc ký không phải lúc nào cũng cho kết quả thỏa đáng. Trong trường hợp này, có thể phải thay cột khác cùng loại, ví dụ cột silica gel gắn với nhóm octadecylsilyl (C_{18}) khác mà có thể cho kết quả mong muốn. Với các thông số quan trọng, việc điều chỉnh được xác định rõ ràng trong chuyên luận để đảm bảo tính phù hợp của hệ thống.

Sắc ký lớp mỏng và sắc ký giấy

Thành phần của pha động: Lượng thành phần dung môi nhỏ có thể điều chỉnh ± 30 % nồng độ tương đối hay ± 2 % nồng độ tuyệt đối tùy theo khoảng giá trị nào lớn hơn. Ví dụ với dung môi thành phần nhỏ là 10 % của pha động thì thay đổi 30 % tương đối nghĩa là nồng độ trong khoảng 7 % đến 13 % trong khi thay đổi 2 % nồng độ tuyệt đối nghĩa là nồng độ trong khoảng 8 % đến 12 %; như vậy, khoảng theo nồng độ tương đối lớn hơn: nếu thành phần dung môi nhỏ là 5 % thì thay đổi 30 % tương đối nghĩa là trong khoảng 3,5 % đến 6,5 % và thay đổi 2 % nồng độ tuyệt đối nghĩa là trong khoảng 3 % đến 7 %, trong trường hợp này khoảng theo nồng độ tuyệt đối lớn hơn. Không thành phần dung môi nào được thay đổi lớn hơn 10 % nồng độ tuyệt đối.

pH của thành phần nước trong pha động được thay đổi $\pm 0,2$ đơn vị pH trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận, hoặc thay đổi $\pm 1,0$ đơn vị pH khi nghiên cứu các chất không ion hóa.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động được thay đổi ± 10 %.

Thể tích mẫu chấm sắc ký điều chỉnh trong khoảng 10 % đến 20 % của thể tích quy định nếu sử dụng bản mỏng cỡ hạt nhỏ (2 μm đến 10 μm).

Khoảng dịch chuyển của tuyến dung môi không được dưới 50 mm và với bản mỏng hiệu năng cao thì không được dưới 30 mm.

Sắc ký lỏng rửa giải đẳng dòng

Thành phần pha động: Lượng thành phần dung môi nhỏ có thể điều chỉnh $\pm 30\%$ nồng độ tương đối hay $\pm 2\%$ nồng độ tuyệt đối tùy theo khoảng giá trị nào lớn hơn (xem ví dụ ở trên). Không thành phần dung môi nào được thay đổi lớn hơn 10% nồng độ tuyệt đối.

pH của thành phần nước trong pha động: Chỉ điều chỉnh thay đổi $\pm 0,2$ đơn vị pH trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận, hoặc thay đổi $\pm 1,0$ đơn vị pH khi nghiên cứu các chất không ion hóa.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động được thay đổi $\pm 10\%$.

Tốc độ dòng: $\pm 50\%$; có thể chấp nhận một sự điều chỉnh lớn hơn khi thay đổi kích thước cột (xem công thức ở dưới).

Các thông số cột:

Pha tĩnh:

Không thay đổi bản chất của nhóm thể trong pha tĩnh (ví dụ không thay C_{18} bằng C_8);

Kích thước hạt: Cho phép giảm tối đa 50% ; không được phép tăng.

Kích thước cột:

Chiều dài: $\pm 70\%$;

Đường kính trong: $\pm 25\%$.

Khi kích thước cột thay đổi, tốc độ dòng có thể phải điều chỉnh theo công thức sau:

$$F_2 = F_1 \times \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

Trong đó:

F_1 là tốc độ dòng được chỉ ra trong chuyên luận, tính theo ml/min;

F_2 là tốc độ dòng hiệu chỉnh, tính theo ml/min;

l_1 là chiều dài cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm;

l_2 là chiều dài cột được sử dụng, tính bằng mm;

d_1 là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm;

d_2 là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Nhiệt độ: Được điều chỉnh $\pm 10^\circ\text{C}$ khi có quy định nhiệt độ tiên hành sắc ký, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Bước sóng của detector phát hiện: Không được điều chỉnh.

Thể tích tiêm: Có thể giảm đi miễn là khả năng phát hiện và độ lặp lại của pic cần xác định thỏa mãn yêu cầu; không cho phép tăng thể tích tiêm.

Sắc ký lỏng rửa giải gradient

Việc điều chỉnh các điều kiện cho hệ thống sắc ký rửa giải gradient đòi hỏi cần cẩn thận hơn so với hệ thống sắc ký đẳng dòng.

Thành phần của pha động dùng rửa giải gradient: Những điều chỉnh nhỏ về thành phần của pha động và chương trình dung môi có thể được chấp nhận, miễn là:

Các yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống được thỏa mãn;
Các pic chính được rửa giải trong vòng $\pm 15\%$ của thời gian lưu quy định;

Thành phần cuối cùng của pha động không yếu hơn về lực rửa giải so với thành phần quy định.

Khi không thể đạt được thỏa mãn các yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống thì nên xem xét về thể tích lưu trữ (dwell volume) hoặc thay đổi cột tách.

Thể tích lưu trữ (Dwell volume): Cấu hình của thiết bị dùng có thể làm thay đổi đáng kể độ phân giải, thời gian lưu và thời gian lưu tỷ đối được quy định; đó là do thể tích lưu trữ quá lớn. Các chuyên luận thường đưa vào một giai đoạn đẳng dòng trước khi bắt đầu chương trình gradient để làm thích ứng với các thời điểm gradient; điều này giúp xem xét sự khác nhau giữa thể tích lưu trữ của hệ thống thiết bị được sử dụng để phát triển phương pháp và hệ thống đang được sử dụng. Người sử dụng có trách nhiệm điều chỉnh khoảng thời gian của giai đoạn đẳng dòng cho phù hợp với thiết bị được sử dụng. Nếu thể tích lưu trữ được dùng khi xây dựng chuyên luận được chỉ ra trong chuyên luận, các thời điểm (t min) ghi trong bảng chương trình dung môi có thể được thay thế bằng các thời điểm điều chỉnh (t_c min) và được tính bằng công thức sau:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

Trong đó:

D là thể tích lưu trữ, tính bằng ml;

D_0 là thể tích lưu trữ khi phát triển phương pháp, tính bằng ml;

F là tốc độ dòng tính bằng ml/min.

Giai đoạn đẳng dòng bổ sung cho mục đích trên đây có thể bỏ qua nếu các số liệu thẩm định để áp dụng phương pháp không có giai đoạn này.

pH của thành phần nước trong pha động không được phép điều chỉnh.

Nồng độ muối trong thành phần đệm của pha động cũng không được phép điều chỉnh.

Tốc độ dòng: Có thể điều chỉnh tốc độ dòng khi kích thước cột tách thay đổi (xem công thức ở dưới).

Các thông số về cột:

Pha tĩnh:

Không thay đổi bản chất của nhóm thể trong pha tĩnh (ví dụ không thay C_{18} bằng C_8);

Kích thước tiểu phân không được thay đổi.

Kích thước cột:

Chiều dài: $\pm 70\%$;

Đường kính trong: $\pm 25\%$.

Khi kích thước cột thay đổi, tốc độ dòng có thể phải điều chỉnh dựa theo công thức sau:

$$F_2 = F_1 \times \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

Trong đó:

F_1 là tốc độ dòng ghi trong chuyên luận, tính bằng ml/min;

F_2 là tốc độ dòng được điều chỉnh, tính bằng ml/min;

l_1 là chiều dài cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm;

l_2 là chiều dài cột được sử dụng, tính bằng mm;

d_1 là đường kính trong của cột ghi trong chuyên luận, tính bằng mm;

d_2 là đường kính trong của cột được sử dụng, tính bằng mm.

Nhiệt độ: Được điều chỉnh $\pm 5^\circ\text{C}$ khi nhiệt độ vận hành sắc ký được quy định trong chuyên luận, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Bước sóng phát hiện của detector: Không được điều chỉnh.

Thế tích tiêm: Có thể giảm đi miễn là khả năng phát hiện và độ lặp lại của pic cần xác định thỏa mãn yêu cầu; không cho phép tăng thế tích tiêm.

Sắc ký khí

Các thông số về cột:

Pha tĩnh:

Kích thước tiểu phân: Có thể giảm tối đa 50 %; không được phép tăng lên (cột nhồi);

Bề dày lớp phim: Cho phép thay đổi từ -50 % đến +100 % (cột mao quản).

Kích thước cột:

Chiều dài: $\pm 70\%$;

Đường kính trong: $\pm 50\%$.

Tốc độ dòng: $\pm 50\%$.

Nhiệt độ: $\pm 10\%$.

Thế tích tiêm và thế tích chia dòng: Có thể được điều chỉnh, miễn là khả năng phát hiện và độ lặp lại là thỏa mãn yêu cầu.

Sắc ký lỏng siêu tới hạn

Thành phần pha động: Đối với cột nhồi, lượng hợp phần dung môi nhỏ có thể được điều chỉnh $\pm 30\%$ tương đối hay $\pm 2\%$ tuyệt đối, tùy theo khoảng giá trị nào lớn hơn; không cho phép thay đổi đối với hệ thống cột mao quản.

Bước sóng phát hiện của detector không được thay đổi.

Các thông số về cột:

Pha tĩnh: Kích thước tiểu phân: Có thể giảm tối đa 50 %; không được phép tăng lên (cột nhồi).

Kích thước cột:

Chiều dài: $\pm 70\%$;

Đường kính trong: $\pm 25\%$ cho cột nhồi và $\pm 50\%$ cho cột mao quản.

Tốc độ dòng: $\pm 50\%$.

Nhiệt độ: Cho phép $\pm 5^\circ\text{C}$ khi nhiệt độ vận hành sắc ký được quy định trong chuyên luận.

Thế tích tiêm: Có thể được điều chỉnh, miễn là khả năng phát hiện và độ lặp lại là thỏa mãn yêu cầu, không được phép tăng lên.

Định lượng

Các pic của dung môi và thuốc thử hoặc xuất hiện từ pha động hay nền mẫu thì bỏ qua trong quá trình định lượng.

Độ nhạy 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 chuẩn. Hệ số hiệu chỉnh là nghịch đảo của hệ số đáp ứng.

Phương pháp chuẩn ngoại: Nồng độ các thành phần cần phân tích được xác định bằng cách so sánh (các) đáp ứng pic của dung dịch thử đối với đáp ứng pic của dung dịch chất đối chiếu.

Phương pháp chuẩn nội: Chất chuẩn nội phải là một chất có thể tách khỏi chất khảo sát. Thêm cùng lượng chuẩn nội vào dung dịch thử và dung dịch chất đối chiếu. Chất chuẩn nội không được có phản ứng với chất khảo sát, phải bền và không chứa tạp có thời gian lưu tương tự thời gian lưu chất khảo sát. Nồng độ chất khảo sát được xác định dựa vào việc so sánh tỷ số diện tích pic (hay chiều cao pic) giữa chất khảo sát và chuẩn nội trong dung dịch thử với tỷ số diện tích pic (hay chiều cao pic) giữa chất khảo sát và chuẩn nội trong dung dịch chất đối chiếu.

Phương pháp chuẩn hóa: Còn gọi là quy trình chuẩn hóa. Hàm lượng phần trăm của một hay nhiều thành phần trong mẫu thử được tính bằng cách xác định diện tích một pic hay nhiều pic dưới dạng phần trăm của tổng diện tích tất cả các pic trừ các pic của dung môi hay thuốc thử và các pic ở mức hay dưới mức có thể bỏ qua.

Phương pháp đường chuẩn: Còn gọi là quy trình hiệu chuẩn. Xác định mối quan hệ giữa tín hiệu đo được hay đánh giá được (y) và lượng (nồng độ, khối lượng, v.v...) của chất (x) rồi tính hàm hiệu chuẩn (phương trình đường chuẩn). Tính kết quả phân tích từ tín hiệu của chất phân tích (được đo hay được đánh giá) theo phương pháp hàm số ngược.

Trong các phép thử tạp chất liên quan, người ta dùng hoặc phương pháp chuẩn ngoại với một dung dịch thử được pha loãng để so sánh, hoặc dùng phương pháp chuẩn hóa, khi hệ số đáp ứng nằm ngoài khoảng 0,8 đến 1,2, thì phải áp dụng những hệ số hiệu chỉnh được chỉ ra trong chuyên luận. Khi trong chuyên luận có quy định phép thử các tạp chất liên quan là tổng các tạp chất hay khi phải định lượng một tạp chất thì điều quan trọng là phải chọn một ngưỡng thích hợp và các điều kiện thích hợp cho việc lấy tích phân các diện tích pic. Trong các phép thử như vậy thì ngưỡng bỏ qua (nghĩa là các diện tích pic bằng hoặc dưới ngưỡng này không phải tính đến) thường là 0,05 %. Như vậy, ngưỡng đặt cho hệ thống thu thập dữ liệu ít nhất phải là nửa ngưỡng bỏ qua. Việc lấy tích phân các diện tích pic của các tạp không được tách hoàn toàn khỏi pic chính nên được thực hiện theo phương pháp ngoại suy từ hôm tới hôm (vạch tiếp tuyến).

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 để 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 gạt, sau khi lắc đều, để yên. Nếu có tách lớp thì gạt 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 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 vịn 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, trợ tâm 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 μm đến 5,0 μm 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 trợ 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 μm đến 180 μm và 125 μm đến 150 μm .

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 bọt 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

Ổn 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 qui 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 ổn 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 khi đưa mẫu trực tiếp vào cột sau khi đạt được trạng thái cân bằng trong buồng ổn 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. Đậy kín lọ và đặt trong buồng ổn 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 ổn 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 chảy 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.

Pha tĩnh

Có nhiều loại pha tĩnh có thể được sử dụng trong sắc ký lỏng, bao gồm:

- Silica (silic dioxyd), nhôm oxyd hoặc than graphit xốp thường được dùng trong sắc ký pha thuận mà quá trình phân tách dựa trên sự khác nhau về khả năng hấp phụ hoặc (và) phân bố khối lượng;
- Nhựa hoặc polymer có chứa các nhóm chức acid hoặc base, sử dụng trong sắc ký trao đổi ion mà trong đó sự chia tách được thực hiện dựa trên sự cạnh tranh giữa các ion cần tách và các ion trong pha động;
- Silica xốp hoặc polymer, sử dụng trong sắc ký rây phân tử, ở đó sự chia tách dựa trên sự khác nhau về kích thước phân tử, tương ứng với sự loại trừ không gian;
- Rất nhiều chất mang biến đổi hóa học được chế tạo từ polymer, silica gel hoặc than graphit xốp được dùng trong sắc ký lỏng pha đảo mà ở đó sự chia tách về nguyên tắc cơ bản dựa trên sự phân bố phân tử các chất giữa pha động và pha tĩnh;
- Pha tĩnh loại biến đổi hóa học đặc biệt, ví dụ dẫn xuất của cellulose hoặc amylose, protein hoặc peptid, cyclodextrin v.v... dùng để tách các đồng phân đối quang (sắc ký đối quang).

Phần lớn sự chia tách dựa trên cơ chế phân bố, sử dụng silica biến đổi hóa học làm pha tĩnh và các dung môi phân cực làm pha động. Bề mặt của chất mang, ví dụ như các nhóm silanol của silica được phản ứng với các thuốc thử silan khác nhau tạo thành các dẫn xuất silyl có liên kết cộng hóa trị, che phủ một số lượng khác nhau các vị trí hoạt động trên bề mặt chất mang. Bản chất của các pha liên kết là tham số quan trọng để xác định các tính chất tách của hệ sắc ký.

Các pha liên kết dùng phổ biến là:

Octyl	= Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C ₈
Octadecyl	= Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Phenyl	= Si-(CH ₂) _n -(C ₆ H ₅)	C ₆ H ₅
Cyanopropyl	= Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
Aminopropyl	= Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	= Si-(CH ₂) ₃ -OCH(OH)-CH ₂ -OH	

Trừ khi có tiêu chuẩn riêng của nhà sản xuất, thông thường các cột sắc ký pha đảo dựa trên silica được coi là ổn định đối với pha động có pH từ 2,0 tới 8,0. Cột chứa than graphit xốp hoặc các hạt vật liệu polymer như styren - divinylbenzen copolymer ổn định ở một khoảng pH rộng hơn.

Phân tích sử dụng sắc ký pha thuận với pha tĩnh là silica không bị biến đổi, than graphit xốp hoặc silica biến đổi hóa học làm cho phân cực (ví dụ cyanopropyl hoặc diol) và pha động không phân cực được sử dụng trong một số trường hợp.

Đối với sự tách nhằm mục đích phân tích, kích thước hạt của pha tĩnh phổ biến nhất từ 3 µm đến 10 µm. Các hạt có thể hình cầu hoặc không có hình dạng nhất định, có độ xốp khác nhau và diện tích bề mặt đặc hiệu. Những tham số này cấu thành biểu hiện sắc ký của từng pha tĩnh cụ thể. Trong trường hợp pha đảo, các yếu tố bổ sung như bản chất của pha tĩnh, mức độ liên kết, ví dụ như độ dài mạch carbon liên kết, hoặc các nhóm hoạt động bề mặt của pha tĩnh có được che phủ hết hay không. Sự kéo đuôi pic, đặc biệt của các chất base, có thể xảy ra khi có mặt các nhóm silanol bề mặt của silica.

Cột được làm bằng thép không gỉ trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, có chiều dài và đường kính trong (Ø) khác nhau được sử dụng cho phân tích sắc ký. Cột với đường kính trong nhỏ hơn 2 mm thường được coi là vi cột. Nhiệt độ của pha động và cột phải được giữ ổn định trong suốt thời gian phân tích. Phần lớn quá trình tách được thực hiện ở nhiệt độ phòng, nhưng cột có thể được làm nóng nhằm thu được hiệu quả cao hơn. Tuy nhiên, nhiệt độ cột cũng không được phép vượt quá 60 °C vì khả năng phân hủy của pha tĩnh hoặc sự thay đổi thành phần của pha động có thể xảy ra.

Pha động

Đối với sắc ký pha thuận, thường sử dụng dung môi ít phân cực. Sự có mặt của nước trong pha động phải được hạn chế và kiểm tra chặt chẽ nhằm thu được kết quả tái lặp lại. Đối với sắc ký lỏng pha đảo, sử dụng pha động chứa nước, có hoặc không có dung môi hữu cơ.

Các thành phần của pha động thường được lọc nhằm loại bỏ các tiểu phân lớn hơn 0,45 µm. Pha động chứa nhiều thành phần được chuẩn bị bằng cách đóng các thể tích qui định (trừ khi có chỉ định về khối lượng) của các thành phần riêng lẻ rồi sau đó trộn lẫn với nhau. Ngoài ra, dung môi cũng có thể được cấp qua các bơm riêng lẻ, điều khiển bằng các van chia tỷ lệ, để có thể trộn lẫn theo các tỷ lệ mong muốn. Dung môi thường được loại khí trước khi bơm bằng cách sục khí heli, lắc siêu âm hoặc sử dụng hệ thống lọc màng lọc/chân không trực tuyến nhằm tránh sự tạo bọt khí trong cốc đo của detector.

Dung môi dùng để chuẩn bị pha động thường không được chứa các chất làm ổn định và phải trong suốt (không hấp thụ quang) ở vùng bước sóng phát hiện, nếu như sử dụng detector từ ngoại. Dung môi và những thành phần khác được dùng phải có chất lượng phù hợp. Khi cần điều chỉnh pH chỉ thực hiện với thành phần nước của pha động mà không điều chỉnh với hỗn hợp. Nếu sử dụng dung dịch đệm, cần phải rửa hệ thống bằng hỗn hợp nước và dung môi hữu cơ (5 % v/v) nhằm ngăn chặn sự kết tinh muối sau khi kết thúc quá trình sắc ký.

Pha động có thể chứa những thành phần khác, ví dụ một ion trái dấu trong sắc ký tạo cặp ion hoặc một chất chọn lọc đối quang trong trường hợp sắc ký sử dụng pha tĩnh không chọn lọc đối quang.

Detector

Detector hấp thụ từ ngoại/khả kiến gồm cả detector chuỗi diod là được sử dụng phổ biến nhất. Detector huỳnh quang, detector khúc xạ vi sai, detector điện hóa, detector khối phổ, detector tán xạ ánh sáng bay hơi, detector phóng xạ hoặc các loại detector đặc biệt khác cũng có thể được sử dụng.

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 qui định, ở nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ qui 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

Qui 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 qui định trong chuyên luận riêng. Pha động là hỗn hợp dung môi được đui khi bằng bơm chân không hoặc bằng một thiết bị đui 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 qui định dung 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 qui 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 qui 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 gán 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 (C₈);

Pha tĩnh C, hạt silica được biến đổi hóa học, gắn với nhóm octadecylsilyl (C₁₈).

5.4 PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỚP MỎNG

Phương pháp sắc ký lớp mỏng được dùng để định tính, thử tính 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_f 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_f : 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_r . Hệ số dịch chuyển tương đối R_r 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 phiên kính cần dùng và có nắp đậy kín.

Đèn từ 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 phiên kính phai 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 phiên kính 20 cm × 20 cm (hay phiên 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 *mức 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 đòn 180° về phía trái và chờ cho đến khi dịch treo chảy ra thì bắt đầu trải. Khi đã trải đến phiên cuối cùng lật tay đòn về phía phải để giữ cho dịch treo không chảy xuống.

Để nguyên các phiên 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. Bảo 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 cân 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 qui 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 μ l) cho lớp mỏng thông thường và 1 μ l đến 2 μ 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_t . Các phân tử có kích thước lớn hơn kích thước lỗ xốp lớn nhất chỉ đi 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_0 (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 phân 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 qui 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 điện 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 thấu thể. Khối lượng phân tử của thành phần quan tâm có thể được ước lượng từ đường chuẩn. Việc xây dựng đường chuẩn chỉ có giá trị đối với một hệ cụ thể trong những điều kiện thí nghiệm xác định.

Sự phân bố polymer theo kích thước phân tử

Sắc ký rây phân tử có thể được sử dụng để xác định sự phân bố các polymer theo kích thước phân tử. Tuy nhiên, việc so sánh mẫu sẽ chỉ có ý nghĩa nếu kết quả thu được là cùng một điều kiện thí nghiệm. Nguyên liệu sử dụng để xây dựng đường chuẩn và phương pháp xác định sự phân bố dựa theo kích thước phân tử của các polymer được ghi trong chuyên luận riêng.

Phân bố khối lượng phân tử trong dextran

Kiểm tra bằng phương pháp sắc ký rây phân tử.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,200 g mẫu thử vào pha động và pha loãng tới 10 ml bằng pha động.

Dung dịch đánh dấu: Hòa tan 5 mg dextrose chuẩn và 2 mg chất đối chiếu hóa học dextran V_0 trong 1 ml pha động.

Dung dịch hiệu chuẩn: Hòa tan riêng rẽ 15 mg các chất đối chiếu hóa học dextran 4, dextran 10 dùng cho hiệu chuẩn và 20 mg các chất đối chiếu hóa học dextran 40, dextran 70, dextran 250 dùng cho hiệu chuẩn trong 1 ml pha động.

Dung dịch kiểm tra tính phù hợp của hệ thống:

Hòa tan 20 mg chất đối chiếu dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng (đối với dextran 40) hoặc 20 mg dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng (đối với dextran 60 và dextran 70) vào 1 ml pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột (0,3 m × 10 mm) nhồi agarose loại liên kết chéo dùng trong sắc ký hoặc một dây các cột (0,3 m × 10 mm) nhồi gel polyether hydroxyl hóa dùng trong sắc ký.

Pha động: Dung dịch chứa 7 g natri sulfat khan và 1 g clorobutanol trong 1 lít nước.

Tốc độ dòng: 0,5 ml/min đến 1 ml/min, giữ ổn định với sai số ± 1 %/h.

Detector khúc xạ ánh sáng vi sai.

Buồng tiêm mẫu dung tích 100 µl đến 200 µl.

Duy trì hệ thống hoạt động ở nhiệt độ ổn định (± 0,1°C).

Chuẩn hóa hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại vài lần một thể tích nhất định dung dịch đánh dấu. Trên sắc ký đồ sẽ xuất hiện 2 pic, pic đầu tương ứng chất đối chiếu dextran V_0 và pic thứ 2 là của dextrose. Từ thể tích rửa giải của pic tương ứng với dextran V_0 , tính thể tích trống V_0 và từ pic tương ứng với dextrose, tính được thể tích thẩm thấu V_t .

Tiêm một thể tích nhất định các dung dịch chuẩn. Vẽ cân thận đường nền của mỗi sắc ký đồ. Phân chia mỗi sắc ký đồ thành p phần (ít nhất là 60) bằng những đường gạch thẳng dọc bằng nhau (tương ứng với những thể tích rửa giải).

Trong mỗi phần, i tương ứng với một thể tích rửa giải V_i , đo chiều cao (y_i) của đường sắc ký đồ phía trên đường nền và tính hệ số phân bố K_i theo công thức:

$$\frac{(V_i - V_0)}{(V_t - V_0)} \quad (1)$$

Trong đó:

V_0 là thể tích trống của cột, được xác định bởi pic tương ứng với chất đối chiếu hóa học dextran V_0 trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch đánh dấu;

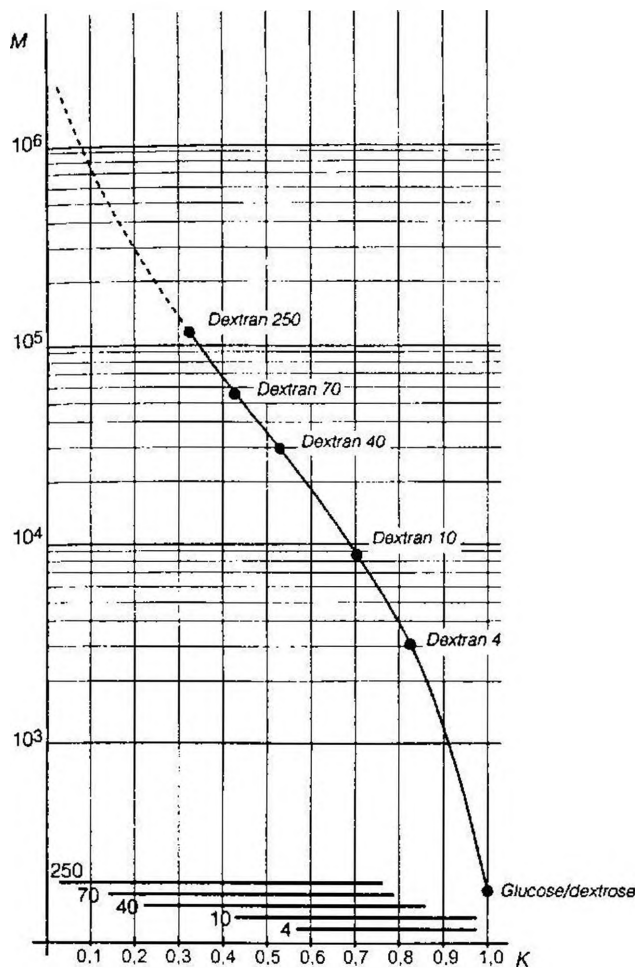
V_t là thể tích thẩm thấu của cột, được xác định bởi pic tương ứng với dextrose trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch đánh dấu;

V_i là thể tích rửa giải của phần i trong sắc ký đồ thu được với mỗi dung dịch chuẩn.

Tiến hành hiệu chuẩn sử dụng một trong những phương pháp dưới đây:

Vẽ đường cong chuẩn

Với mỗi chất đối chiếu hóa học dextran dùng cho hiệu chuẩn, tính hệ số phân bố K_{max} tương ứng với chiều cao cực đại của đường sắc ký, sử dụng công thức (1). Trên giấy kẻ ô bán logarit đặt các giá trị của K_{max} (trục x) tương ứng với khối lượng phân tử ghi trên nhãn của mỗi chất dextran hiệu chuẩn và của dextrose; những giá trị này được lấy tại điểm cao nhất của đường sắc ký (M_{max}). Vẽ đường cong chuẩn đầu tiên qua những điểm thu được, ngoại suy từ điểm K_{max} thu được với chất đối chiếu hóa học dextran 250 dùng cho hiệu chuẩn tới giá trị K thấp nhất thu được từ chất đối chiếu hóa học này (xem Hình 5.5.1). Sử dụng đường cong chuẩn đầu tiên này, chuyển tất cả các giá trị K_i ở mỗi sắc ký đồ sang khối lượng phân tử tương ứng M_i để thu được sự phân bố khối lượng phân tử. Tính khối lượng phân tử trung bình M_w cho mỗi loại dextran đối chiếu hóa học sử dụng phương trình (3) dưới đây. Nếu giá trị thu được đối với M_w không khác hơn 5 % so với giá trị công bố của mỗi dextran và mức khác biệt trung bình là ± 3 %, đường cong chuẩn được chấp nhận. Nếu không đạt yêu cầu đó, chuyển dịch đường cong chuẩn dọc theo trục y và lặp lại tiến trình này cho tới khi các giá trị M_w thu được và giá trị công bố không khác nhau lớn hơn 5 %.



Hình 5.5.1- Ví dụ về đường cong chuẩn. Đường chấm chấm tương ứng với phần đường cong ngoại suy. Đường nằm ngang ở dưới cùng của đồ thị thể hiện độ rộng và vị trí của đường sắc ký thu được tương ứng với mỗi dextran chuẩn.

Tính qua đường cong chuẩn

Tính từ phương trình (2) và (3) dưới đây, sử dụng phương pháp thích hợp¹, các giá trị b_1, b_2, b_3, b_4 và b_5 cho phép thu được giá trị M_w nằm trong khoảng 5 % của tất cả những giá trị công bố từ mỗi dextran chuẩn và khối lượng phân tử của dextrose nằm trong khoảng 180 ± 2 .

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)} \quad (2)$$

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^p y_i} \quad (3)$$

Trong đó:

p là số phân đoạn chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao của đường sắc ký phía trên đường nền trong phân đoạn i ;

M_i là khối lượng phân tử trong phân đoạn i .

Tính phù hợp của hệ thống

Tìm một thể tích nhất định dung dịch thử tính phù hợp hệ thống thích hợp.

Khối lượng phân tử trung bình của chất đối chiếu hóa học dextran dùng cho thử hiệu năng

Tính khối lượng phân tử trung bình M_w như đã trình bày trong phần hiệu chuẩn hệ sắc ký, sử dụng đường cong chuẩn hoặc các giá trị thu được ở trên đối với b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 . Phép thử chỉ có giá trị khi M_w nằm trong khoảng 41 000 đến 47 000 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng) và 67 000 đến 75 000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng).

Khối lượng phân tử trung bình của dextran phân đoạn cao 10 %

Tính M_w đối với dextran phân đoạn cao 10 % được rửa giải qua phần thứ n sử dụng công thức:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^n y_i} \quad (4)$$

Với n được xác định như sau:

$$\sum_{i=1}^n y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (6)$$

Trong đó:

p là số phân chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao đường sắc ký phía trên đường nền trong phân i ;

M_i là khối lượng phân tử của phân i .

Phép thử chỉ có giá trị khi M_w của dextran phân đoạn cao nằm trong khoảng: 110 000 đến 130 000 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho hiệu chuẩn) và 190 000 đến 230 000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho hiệu chuẩn).

Khối lượng phân tử trung bình của dextran phân đoạn thấp 10 %

Tính M_w đối với dextran phân đoạn thấp 10 % rửa giải trong và sau phân thứ m theo công thức sau:

$$M_w = \frac{\sum_{i=m}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=m}^p y_i} \quad (7)$$

Trong đó:

m được xác định như sau:

$$\sum_{i=m}^p y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^p y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right) \quad (9)$$

p là số phần chia trong sắc ký đồ;

y_i là chiều cao đường sắc ký phía trên đường nền trong phần i ;

M_i là khối lượng phân tử của phần i .

Phép thử chỉ có giá trị khi M_w của dextran phân đoạn thấp 10 % là: 6 000 đến 8 500 (chất đối chiếu hóa học dextran 40 dùng cho chuẩn hiệu năng) và 7 000 đến 11 000 (chất đối chiếu hóa học dextran 60/70 dùng cho chuẩn hiệu năng).

Sự phân bố khối lượng phân tử của dextran được phân tích

Tiêm một thể tích nhất định dung dịch (1) và tính M_w của phân bố tổng khối lượng phân tử, M_w của dextran phân đoạn cao 10 % và M_w của dextran phân đoạn thấp 10 % như chỉ dẫn trong phần thử tinh phù hợp của hệ thống.

¹ Phương pháp lập như phương pháp Gauss – Newton cải tiến bởi Hartley là phù hợp [Xem O Hartley, *Technometrics*, 3 (1961) and G Nilsson and K Nilsson, *J. Chromat.* 101, 137 (1974)]. Một chương trình đường cong thích hợp xử lý tương quan hồi quy không tuyến tính chạy trên máy tính điện tử có thể được sử dụng.

5.6 PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI

Điện di là hiện tượng liên quan đến sự di chuyển của các protein, các colloid, các phân tử, hay các tiểu phân tích điện hòa tan hoặc phân tán trong dung dịch điện giải khi có dòng điện đi qua.

Điện di được chia thành hai loại tùy theo thiết bị sử dụng: Điện di dung dịch tự do hay điện di với sự chuyển dịch của các lớp biên và điện di vùng.

Trong phương pháp điện di dung dịch tự do, dung dịch đậm của các protein trong một ống hình chữ U dưới tác dụng của dòng điện sẽ hình thành nên các lớp protein có linh độ giảm dần. Chỉ phần di chuyển nhanh nhất của protein sẽ tách rõ rệt khỏi các protein khác, kiểm tra sự dịch chuyển của các lớp biên bằng hệ thống quang học sẽ cung cấp các dữ liệu để tính toán linh độ điện di và các thông tin về mặt định tính và định lượng của thành phần hỗn hợp protein.

Trong điện di vùng, mẫu được đưa vào dưới dạng một dải hẹp hay điểm trong cột, trên tấm phẳng, hay trên một lớp phim chứa đậm. Sự di chuyển của các thành phần trong các dải hẹp cho phép tách hoàn toàn chúng. Có thể tránh sự chồng lấn giữa các dải hẹp do sự đối lưu nhiệt bằng cách đưa chất điện giải vào các nền (matrix) xốp như chất rắn dạng bột, hay nguyên liệu dạng sợi như giấy, hay gel như tinh bột, agar hoặc polyacrylamid.

Các phương pháp điện di vùng có ứng dụng rộng rãi. Điện di gel, đặc biệt là điện di đĩa được sử dụng để tách protein do khả năng cho độ phân giải cao.

Sự di chuyển điện di của các tiểu phân của một chất nhất định phụ thuộc vào tính chất của tiểu phân mà chủ yếu là điện tích, kích thước hay khối lượng phân tử và hình dạng của các tiểu phân cũng như các tính chất và các thông số

thực nghiệm của hệ thống. Những thông số này bao gồm: pH, nồng độ ion, độ nhớt và nhiệt độ của chất điện giải, mật độ hoặc độ liên kết chéo của các matrix nền như gel và điện thế áp đặt.

Ảnh hưởng của điện tích, kích thước tiểu phân, độ nhớt của chất điện giải và biến thiên điện thế

Các tiểu phân tích điện sẽ di chuyển về phía điện cực ngược dấu với chúng. Sự di chuyển của các phân tử tích cả điện dương và điện âm phụ thuộc vào điện tích mạng. Tốc độ di chuyển tỷ lệ thuận với độ lớn của điện tích mạng trên tiểu phân và tỷ lệ nghịch với kích thước tiểu phân, mà kích thước tiểu phân lại có liên quan trực tiếp với phân tử lượng. Những tiểu phân hình cầu lớn, khi định luật Stoke có giá trị, linh độ điện di μ_0 sẽ tỷ lệ nghịch với bán kính của tiểu phân theo phương trình:

$$\mu_0 = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

Trong đó v là vận tốc của tiểu phân, E là thế đặt lên chất điện giải, Q là điện tích của tiểu phân, r là bán kính tiểu phân và η là độ nhớt của dung dịch chất điện giải.

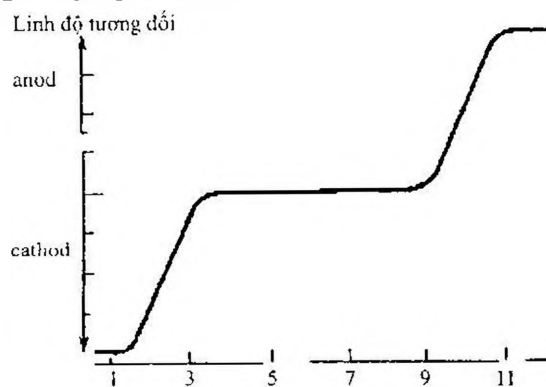
Phương trình này chỉ có giá trị giới hạn ở độ pha loãng nhất định và không có sự hiện diện của các nền như giấy hoặc gel. Các ion và peptid có trọng lượng phân tử lớn hơn 5000, đặc biệt khi có mặt môi trường nền, không tuân theo định luật Stoke và linh độ điện di của chúng được biểu thị bằng phương trình:

$$\mu_0 = \frac{Q}{A\pi^2\eta}$$

Trong đó A là thừa số hình dạng, thay đổi trong khoảng từ 4 - 6, biểu thị sự phụ thuộc tỷ lệ nghịch của linh độ điện di đối với bình phương bán kính tiểu phân. Về mặt khối lượng phân tử, linh độ điện di sẽ tỷ lệ nghịch với căn bậc ba của bình phương khối lượng phân tử.

Ảnh hưởng của pH

Hướng và tốc độ di chuyển của phân tử có nhiều nhóm chức có thể bị ion hóa như acid amin và protein sẽ phụ thuộc vào pH của dung dịch chất điện giải. Ví dụ: Linh độ điện di của acid amin đơn giản như glycine sẽ thay đổi theo giá trị pH gần đúng như trong Hình 5.6.1.



Hình 5.6.1

Giá trị pK_a bằng 2,2 và 9,9 trùng với điểm uốn trên biểu đồ. Do nhóm chức bị ion hóa 50 % ở giá trị $pH = pK_a$, nên linh độ điện di ở những điểm này sẽ bằng 1/2 giá trị quan sát được khi cation và anion bị ion hóa hoàn toàn lần lượt ở pH rất thấp và pH rất cao. Ion lưỡng cực tồn tại ở khoảng pH trung gian là những chất trung hòa về điện và có linh độ điện di bằng 0.

Ảnh hưởng của lực ion và nhiệt độ

Linh độ điện di sẽ giảm khi tăng lực ion của chất điện giải nền. Hoạt độ ion μ được xác định theo phương trình:

$$\mu = 0,5 \sum C_i Z_i^2$$

Trong đó C_i là nồng độ ion (mol/l), Z_i là hóa trị và tổng được tính với tất cả các ion trong dung dịch. Đối với dung dịch đệm có cả anion và cation hóa trị 1 thì lực ion được xác định bằng nồng độ mol.

Lực ion của chất điện giải dùng trong điện di nói chung nằm trong dãy từ khoảng 0,01 đến 0,10. Hoạt độ ion thích hợp phụ thuộc một phần vào thành phần của mẫu thử, do đó dung lượng đệm phải đủ lớn để duy trì pH hằng định trên diện tích của các dải hợp phần. Các dải hợp phần trở nên sắc nét hơn và hẹp hơn khi lực ion tăng.

Nhiệt độ ảnh hưởng gián tiếp lên linh độ, vì độ nhớt η của chất điện giải nền phụ thuộc vào nhiệt độ. Độ nhớt của nước sẽ giảm theo tỷ lệ khoảng 3 %/°C trong vùng từ 0 °C đến 5 °C và tỷ lệ giảm này sẽ thấp hơn khi ở nhiệt độ phòng. Bởi vậy, linh độ điện di sẽ tăng cùng với sự tăng nhiệt độ của chất điện giải.

Nhiệt giải phóng là đáng kể khi dòng điện chạy qua chất điện giải. Nhiệt này tăng cùng với sự tăng thể tích và lực ion tăng. Ở các thiết bị lớn, cho dù có bộ phận làm lạnh, nhiệt giải phóng vẫn tạo nên sự biến thiên về nhiệt độ ở bề điện di, dẫn đến làm biến dạng các dải phân cách. Bởi vậy, cần quan tâm thiết kế các dụng cụ đặc biệt tính đến lực ion và thể tích.

Ảnh hưởng của môi trường nền, dòng điện thẩm

Khi dòng điện chạy qua chất điện giải chứa trong ống thủy tinh hoặc chứa giữa các bản thủy tinh hoặc bản plastic thì xuất hiện dòng chất điện giải hướng về phía đầu một điện cực, gọi là dòng điện thẩm. Dòng điện thẩm được hình thành do điện tích trên bề mặt của thành dụng cụ phát sinh do quá trình ion hóa các nhóm chức trong vật liệu hay do các ion hấp phụ trên thành buồng điện di chứa các chất điện giải. Hiệu ứng này thường tăng khi buồng điện di chứa các chất xốp như gel, được sử dụng để làm ổn định cho chất điện giải nền và để phòng hiện tượng xáo trộn các dải phân tách do sự đối lưu nhiệt và hiện tượng khuếch tán. Dung dịch ngay sát trên bề mặt sẽ hình thành điện tích bằng nhưng ngược dấu với điện tích trên bề mặt và điện trường đi qua buồng điện di sẽ tạo nên sự chuyển động của dung dịch về phía điện cực ngược dấu.

Các chất thường được sử dụng làm môi trường nền trong điện di vùng sẽ tạo điện tích âm trên bề mặt, dòng điện thẩm của chất điện giải sẽ di chuyển về phía cathod. Vì

vậy tất cả các vùng, bao gồm cả các chất trung tính sẽ di chuyển về phía cathod trong quá trình điện di.

Mức độ thẩm thấu sẽ thay đổi khi các chất nền thay đổi. Độ thẩm thấu thay đổi đáng kể đối với gel agar và thay đổi không đáng kể đối với gel polyacrylamid.

Sự rây phân tử

Khi không có sự hiện diện của môi trường nền hay trong trường hợp môi trường rất xốp thì sự tách điện di của các phân tử là do sự khác nhau về tỷ lệ của điện tích với kích thước phân tử. Nếu có sự hiện diện của chất nền, sự khác nhau về khả năng hấp phụ hay ái lực của phân tử đối với môi trường tạo nên hiệu ứng sắc ký có thể làm tăng hiệu quả tách.

Hiệu ứng rây phân tử sẽ xuất hiện nếu môi trường nền là các loại gel có sự phân nhánh nhiều đến mức tạo thành các lỗ xốp để tách các phân tử theo kích thước. Hiệu ứng này tương đương hiệu ứng thu được trong quá trình tách thẩm thấu gel hay sắc ký rây phân tử, nhưng trong điện di gel hiệu ứng này chồng lên quá trình tách điện di. Có thể nhận thấy sự rây phân tử do cản trở không gian đối với sự di chuyển của các phân tử lớn. Các phân tử nhỏ di chuyển qua các lỗ xốp có kích thước lớn, nên sự điện di qua gel không bị cản trở. Khi kích thước phân tử tăng, một số ít hơn các lỗ xốp cho phép các phân tử đi qua, làm chậm sự di chuyển của các phân tử có trọng lượng phân tử lớn.

Điện di gel

Quá trình sử dụng một gel như agar (thạch), tinh bột hay polyacrylamid làm môi trường nền được hiểu theo nghĩa rộng là điện di gel. Phương pháp này đặc biệt thuận lợi cho sự tách các protein. Sự tách này đạt được tùy thuộc vào tỷ lệ điện tích đối với kích thước phân tử đi đôi với hiệu ứng rây phân tử phụ thuộc chủ yếu vào khối lượng phân tử.

Gel polyacrylamid được sử dụng nhiều do có một số thuận lợi. Nó có đặc tính ít hấp phụ và tạo nên hiệu ứng dòng điện thẩm không đáng kể. Các gel với dải rộng các lỗ xốp có kích thước khác nhau có thể được điều chế bằng cách thay đổi nồng độ gel tổng cộng (dựa trên monomer kết hợp với các yếu tố tạo mạch nhánh) và phần trăm của chất tạo mạch nhánh dùng để tạo gel. Lượng các chất được biểu thị bằng phương trình sau:

$$T(\%) = \frac{a+b}{V} \cdot 100$$

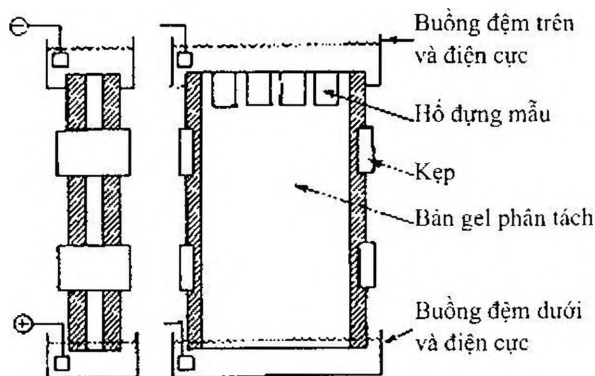
$$C(\%) = \frac{b}{a+b} \cdot 100$$

Trong đó T là nồng độ gel tổng cộng (%), C là phần trăm tác nhân tạo mạch nhánh dùng để tạo gel, V là thể tích (mL) của đệm dùng điều chế gel, a và b là khối lượng (g) của monomer (acrylamid) và tác nhân tạo mạch nhánh (thường dùng N,N'-metylenbisacrylamid) dùng điều chế gel. Các gel thích hợp có nồng độ trong khoảng 3 % - 30 %. Tổng tác nhân tạo mạch nhánh thường chiếm khoảng 1/10

đến 1/20 lượng monomer ($C =$ từ 10 % đến 5 %), tỷ lệ phần trăm nhỏ hơn được dùng cho giá trị cao hơn của T . Trong quá trình điều chế gel, bề của dụng cụ điện di chứa dung dịch nước của monomer và tác nhân tạo mạch nhánh, thường được cân bằng bằng dung dịch đệm đến pH mong muốn trong những lần chạy cuối và được polymer hóa tại chỗ bằng quá trình gốc tự do. Quá trình polymer hóa được kích hoạt bởi quá trình hóa học, thông thường sử dụng amoni persulfat kết hợp với N,N,N',N' -tetramethyldiamin hay quang hóa hỗn hợp riboflavin và N,N,N',N' -tetramethyldiamin. Quá trình polymer hóa bị cản trở bởi các phân tử oxy và môi trường acid. Lựa chọn thành phần của gel và điều kiện polymer hóa phải bảo đảm chất lượng của gel.

Thiết bị cho điện di gel

Nói chung bề hay môi trường để thực hiện quá trình điện di có thể được đặt theo phương thẳng đứng hay nằm ngang tùy theo thiết kế của thiết bị. Để so sánh sự tách có thể thực hiện trong một số ống riêng biệt hay đưa các mẫu khác nhau vào các hồ kề bên nhau vào khuôn hay cắt vào phiến của gel. Phiến gel thẳng đứng như mô tả trong Hình 5.6.2 thuận lợi cho sự so sánh trực tiếp một số mẫu.



Hình 5.6.2 - Thiết bị điện di gel phiến thẳng đứng

Tốt nhất là sự so sánh các mẫu trong cùng một bản gel, như vậy sẽ đồng nhất hơn về mặt thành phần so với các khuôn gel trong nhiều bể điện di.

Đặc tính của nhiều loại thiết bị là phải hàn kín buồng đệm phía dưới với chân đế của bể điện di, cho phép mức đệm trong buồng đệm phía dưới bằng mức đệm trong buồng đệm phía trên để loại trừ áp suất thủy tĩnh trên gel. Ngoài ra có một vài bộ phận tuần hoàn làm lạnh cả hai mặt bể điện di gel.

Để điều chế gel, buồng gel được đẩy bằng nắp thích hợp có chứa dung dịch monomer, tác nhân tạo mạch nhánh và chất xúc tác. Một cái lược có răng với kích thước thích hợp được đặt lên phía trên và cho phép quá trình polymer hóa xảy ra hoàn toàn. Sau khi lấy lược ra sẽ tạo thành các hồ trên bản gel được polymer hóa.

Trong điện di gel đơn giản, chỉ sử dụng một dung dịch đệm cho vào buồng đệm phía trên và phía dưới giống nhau. Sau khi cho dung dịch đệm vào buồng đệm, mẫu được hòa tan

trong nước đường hay dung dịch đặc và hơi nhớt khác để đề phòng sự khuếch tán. Sau đó mẫu được đưa vào đáy các hồ đựng mẫu bằng bơm tiêm hay micropipet và bắt đầu thực hiện quá trình điện di.

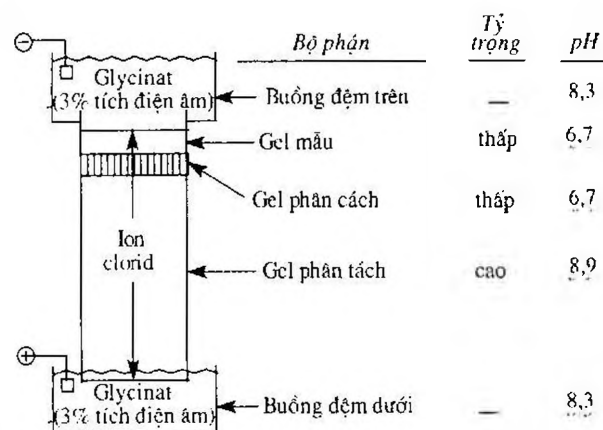
Điện di đĩa

Điện di gel polyacrylamid sử dụng một dãy không liên tục các đệm và cũng thường sử dụng nhiều lớp gel không liên tục, được gọi là điện di đĩa. Tên của phương pháp xuất phát từ dạng hình dạng đĩa của các dải hẹp được tạo thành. Do tạo thành các dải hẹp, nên kỹ thuật này có độ phân giải đặc biệt cao và thường được sử dụng trong phân tích đặc tính của hỗn hợp protein và phát hiện tạp chất mà có thể có linh độ gần thành phần chính.

Cơ sở của điện di đĩa được trình bày trong phần sau có liên quan đến các hệ anion thích hợp cho việc phân tách protein mang điện tích âm. Để hiểu được điện di đĩa cần phải có kiến thức chung về điện di và dụng cụ đã được mô tả.

Cơ sở của điện di đĩa

Độ phân giải cao thu được trong điện di đĩa phụ thuộc vào việc sử dụng hệ đệm không liên tục về pH và thành phần. Thường phối hợp hai hoặc ba gel khác nhau về tỷ trọng. Hệ thống điển hình được mô tả trong Hình 5.6.3.



Hình 5.6.3 - Thuật ngữ, pH đệm và thành phần đệm cho điện di đĩa acrylamid

Gel phân tách có chiều cao vài cm với tỷ trọng cao ($T = 10\% - 30\%$) được polymer hóa trong đệm tris-clorid trong bể của thiết bị. Trong quá trình polymer hóa đệm được phủ lên một lớp nước mỏng để đề phòng hiện tượng tạo thành mặt khum trên bề mặt của gel. Lớp nước phủ lên sau đó được loại đi, lớp gel mỏng tỷ trọng thấp ($T = 3\%$), có bề dày 3 mm đến 10 mm được gọi là khoảng trống hay gel phân cách, được polymer hóa trong đệm tris-clorid trên mặt của gel phân tách. Lớp nước phủ phía trên lại tiếp tục được sử dụng để tạo mặt phẳng. Mẫu được trộn với một lượng nhỏ dung dịch monomer dùng để tạo gel phân cách, đổ lên mặt của gel phân cách và được polymer hóa. pH của gel phân tách thường là 8,9, trong khi

đó pH của gel phân cách và gel chứa mẫu là 6,7. Tất cả ba loại gel này được điều chế dùng clorid làm anion. Dung dịch đệm chứa trong buồng chứa đệm phía trên và phía dưới có pH là 8,3 và được điều chế từ tris và glycine. Ở pH này khoảng 3 % phân tử glycine mang điện tích âm. Khi đặt điện thế lên hệ thống, lớp tiếp giáp glycinate-clorid sẽ di chuyển theo hướng đi xuống và về phía anod. Lớp tiếp giáp bắt đầu ở vị trí lớp tiếp xúc của buồng chứa đệm phía trên và đỉnh của lớp gel chứa mẫu. Tại đây ion clorid do có kích thước nhỏ nên sẽ di chuyển nhanh hơn bất kỳ protein nào hiện diện trong mẫu. pH của lớp gel mẫu và lớp gel phân cách được chọn phải thấp hơn giá trị pKa cao của glycine khoảng 3 đơn vị. Do vậy, khi băng qua các lớp gel này, chỉ có khoảng 0,1 % phân tử glycine tích điện âm. Cho nên, glycine sẽ di chuyển chậm hơn clorid. Khuynh hướng dịch chuyển nhanh hơn của clorid khỏi glycinate làm giảm nồng độ nơi tiếp giáp, tạo nên sự giảm thể nhiều hơn ở lớp tiếp giáp, điều này làm cho glycinate bắt kịp ion clorid. Trong điều kiện này, lớp tiếp giáp rất hẹp được duy trì, và khi đó nó di chuyển qua lớp gel mẫu thử và lớp gel phân cách, các protein trong mẫu thử ở lớp tiếp giáp sắp xếp thành lớp rất mỏng theo thứ tự về linh độ. Quá trình này là nguồn gốc của việc các đĩa được phân tách. Các protein được sắp xếp theo trình tự khi tiếp xúc với gel phân tách tỷ trọng cao, chúng sẽ di chuyển chậm lại do quá trình rây phân tử. pH cao hơn trong gel phân tách làm cho glycinate di chuyển nhanh hơn, đến mức độ làm cho lớp tiếp xúc của các đệm không liên tục sẽ vượt qua các protein và cuối cùng sẽ tiếp xúc với đáy của gel phân tách. Trong chu trình này, các đĩa protein tiếp tục phân tách bằng quá trình điện di và quá trình rây phân tử trong gel phân tách. Kết thúc quá trình tách, pH của gel phân tách sẽ tăng từ giá trị ban đầu là 8,9 lên khoảng pH 9,5.

Linh độ tương đối

Bromophenol xanh thường được sử dụng như là một chuẩn để tính toán linh độ tương đối của các dải phân tách và để quan sát các quá trình tách. Nó có thể được thêm vào trong hồ đệm mẫu hoặc trộn lẫn với mẫu, hoặc đơn giản được thêm vào dung dịch đệm ở buồng chứa đệm phía trên. Linh độ tương đối M_B được tính toán như sau:

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

Trong đó:

a là khoảng cách từ mốc xuất phát đến vùng mẫu và b là khoảng cách từ mốc xuất phát đến vùng bromophenol xanh.

Quan sát các vùng phân tách

Do polyacrylamid trong suốt, nên các dải protein có thể được quan sát bằng đo mật độ quang với ánh sáng UV. Các vùng có thể cố định bằng cách nhúng vào các dung dịch làm tủa protein như acid phosphotungstic hoặc acid trichloroacetic 10 %. Các thuốc thử hiện màu được sử dụng bao gồm naphthalen đen (amido đen) và Coomassie lam sáng R250. Những vùng được cố định hay có màu có thể được quan sát một cách thuận lợi và được chụp ảnh với ánh sáng truyền qua từ nguồn phát tia X.

Những điều an toàn cần chú ý

Thế sử dụng trong điện di có thể gây sốc chết người. Nguy cơ này sẽ tăng do sử dụng dung dịch đệm nước và điều kiện môi trường làm việc ẩm ướt.

Bộ phận cung cấp nguồn của thiết bị cần được bao lại trong các lồng kim loại có dây nối đất hoặc cần được chế tạo bằng các vật liệu cách điện, các lồng kim loại này cần có chốt tự cắt nguồn khi mở nắp thiết bị.

Vì sự nguy hiểm của thế cao áp, nhân viên phòng thí nghiệm cần làm quen với thiết bị trước khi sử dụng chúng.

5.7 PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN

Điện di là hiện tượng di chuyển của tiểu phân tích điện hòa tan hay phân tán trong chất điện giải khi có dòng điện đi qua. Cation di chuyển về phía cực âm (cathod), anion di chuyển về phía cực dương (anod). Các phân tử không tích điện không bị hút về phía hai điện cực.

Trong phương pháp điện di mao quản (CE) việc sử dụng mao quản để làm kênh di chuyển cho phép thực hiện quá trình tách điện di trên một thiết bị có thể so sánh với thiết bị của sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tuy nhiên, vẫn còn những khác biệt rõ rệt về cách vận hành, những điểm thuận lợi và không thuận lợi so với sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quá trình vận hành của CE điển hình với mao quản mà mặt trong thành mao quản không có lớp bao và mao quản chứa dung dịch “đệm làm việc”, thì nhóm silanol hiện diện trên thành phía trong của mao quản thủy tinh sẽ giải phóng ion hydrogen vào dung dịch đệm và bề mặt thành mao quản sẽ tích điện âm ngay cả ở pH rất thấp. Cation hay các chất hòa tan tích điện dương một phần trong môi trường bị hút tĩnh điện vào thành mao quản tích điện âm tạo nên một lớp điện tích kép. Quá trình điện di bắt đầu bằng cách đặt thế trên chiều dài cột mao quản làm cho phân tử dung dịch của lớp điện tích kép di chuyển về phía đầu cathod của mao quản kéo theo khối dung dịch. Sự chuyển động của khối dung dịch dưới tác dụng của lực điện trường được gọi là dòng điện thẩm (electroosmotic flow - EOF). Mức độ ion hóa của nhóm silanol trên thành mao quản phụ thuộc chủ yếu vào pH của dung dịch đệm làm việc và các chất điều chỉnh được thêm vào chất điện giải. Ở pH thấp, nhóm silanol nói chung có độ ion hóa thấp và dòng EOF nhỏ. Ở pH cao hơn, nhóm silanol bị ion hóa nhiều hơn và dòng EOF tăng. Trong một số trường hợp, các dung môi hữu cơ như methanol hay acetonitril được cho thêm vào dung dịch đệm để làm tăng độ tan của các chất hòa tan và các chất phụ gia hay để ảnh hưởng đến mức độ ion hóa của mẫu. Nói chung, việc thêm các chất điều chỉnh hữu cơ sẽ làm giảm dòng EOF. Detector được đặt về phía đầu cathod của mao quản. Dòng EOF thường lớn hơn linh độ điện di. Do vậy, ngay cả anion cũng bị đẩy về phía cathod và detector. Khi sử dụng đệm phosphat pH 7,0 ở mao quản không có lớp bao, thông thường trình tự xuất hiện các chất tan trong điện di đó là các cation, các chất trung tính và các anion.

Hiện nay, có 5 loại chủ yếu của điện di mao quản:

Điện di mao quản vùng (capillary zone electrophoresis - CZE) còn gọi là điện di dung dịch tự do hay điện di mao quản dòng tự do.

Sắc ký mixen điện động, còn gọi là sắc ký điện động mixen (micellar electrokinetic chromatography - MEKC).

Điện di mao quản gel (capillary gel electrophoresis - CGE). Điện di mao quản hội tụ đẳng điện (capillary isoelectric focusing - CIEF)

Điện di mao quản đẳng tốc (capillary isotachopheresis - CITP).

Trong **điện di mao quản vùng**, quá trình tách được kiểm soát bằng sự khác nhau về linh độ tương đối của từng thành phần trong mẫu thử hoặc dung dịch thử. Linh độ là hàm số của điện tích chất phân tích và kích thước trong điều kiện nhất định của phương pháp. Chúng được tối ưu hóa bằng cách kiểm soát các thành phần của đệm, pH và lực ion.

Trong **sắc ký mixen điện động**, các chất hoạt động bề mặt được thêm vào dung dịch đệm làm việc ở nồng độ lớn hơn nồng độ mixen tới hạn. Các chất phân tích có thể phân bố trong pha tĩnh giả do mixen tạo thành. Kỹ thuật này thường được ứng dụng để tách các chất trung tính và các ion.

Trong **điện di mao quản gel**, tương tự như lọc gel, sử dụng các mao quản chứa gel để tách các phân tử, dựa trên cơ sở sự khác nhau tương đối về khối lượng phân tử hay kích thước phân tử. Nó được dùng chủ yếu để tách các protein, peptid và các oligomer. Các gel có ưu điểm là làm giảm dòng EOF và đồng thời làm giảm một cách đáng kể sự hấp phụ protein trên thành phía trong của mao quản, do đó làm giảm đáng kể hiệu ứng bất đối của pic.

Trong **điện di mao quản hội tụ đẳng điện**, các chất được tách trên cơ sở sự khác nhau tương đối về điểm đẳng điện. Nó được thực hiện bằng cách biến đổi pH đệm để thu được các vùng mẫu thử ở trạng thái bền (pH thấp ở anod và pH cao ở cathod). Quá trình biến đổi được xác lập bằng cách đặt thể vào mao quản chứa hỗn hợp thành phần của các chất mang bao gồm các chất lưỡng cực có giá trị pI khác nhau.

Trong **điện di mao quản đẳng tốc** sử dụng hai đệm bao quanh các vùng chất phân tích. Cả anion và cation có thể tách thành những vùng rõ rệt. Ngoài ra, nồng độ chất phân tích như nhau trong mỗi vùng. Như vậy, chiều dài của mỗi vùng sẽ tỷ lệ thuận với lượng chất phân tích.

Hai kỹ thuật điện di mao quản thường được sử dụng nhiều nhất là điện di mao quản vùng và sắc ký mixen điện động. Chúng được đề cập một cách tóm tắt trong các phần sau.

Nguyên lý của điện di mao quản vùng

Điện di mao quản vùng sử dụng nguyên lý của điện di và điện thẩm để tách các tiểu phân tích điện.

Linh độ điện di của ion (μ_{EP}), được biểu diễn bằng phương trình:

$$\mu_{EP} = q / (6\pi\eta r)$$

Trong đó q là điện tích của ion, η là độ nhớt dung dịch và r là bán kính của ion hydrat hóa. Từ mối liên hệ này suy ra, chất phân tích kích thước nhỏ, điện tích lớn có linh độ lớn. Chất phân tích kích thước lớn, điện tích nhỏ có linh độ thấp.

Tốc độ di chuyển (v_{EP}), tính bằng cm/s, được biểu thị bằng phương trình:

$$v_{EP} = \mu_{EP} (V / L)$$

Trong đó μ_{EP} là linh độ điện di, V là điện thế đặt và L là chiều dài (cm) tổng cộng của mao quản.

Tốc độ của EOF (v_{EO}), tính bằng cm/s, được biểu diễn bằng phương trình:

$$v_{EO} = \mu_{EO} (V / L)$$

Trong đó μ_{EO} là linh độ của EOF (hệ số của dòng EOF) và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Thời gian (t), tính bằng giây, cần thiết cho chất tan di chuyển trên toàn bộ chiều dài hiệu dụng (l) của mao quản (từ đầu vào đến detector), t được biểu thị bằng hệ thức sau:

$$t = l / [E(\mu_{EP} + \mu_{EO})] = lL / [V(\mu_{EP} + \mu_{EO})]$$

Trong đó E là cường độ điện trường và các ký hiệu khác được định nghĩa như ở trên.

Hiệu lực của hệ thống điện di có thể liên quan đến linh độ, dòng EOF và được biểu thị bằng số đĩa lý thuyết (N), được tính bằng phương trình:

$$N = (\mu_{EP} + \mu_{EO}) V / (2D)$$

Trong đó D là hệ số khuếch tán của chất hòa tan và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Độ phân giải (R) của hai chất hòa tan được rửa giải kế tiếp nhau, có thể xác định bằng phương trình:

$$R = 0,18 (\mu_{EP1} - \mu_{EP2}) [V / D(\bar{\mu}_{EP} + \mu_{EO})]^{\frac{1}{2}}$$

Trong đó: μ_{EP1} và μ_{EP2} là linh độ của hai chất hòa tan;

$\bar{\mu}_{EP}$ là linh độ trung bình của hai chất tan và các ký hiệu khác được định nghĩa như trên.

Nguyên lý của sắc ký mixen điện động

Trong MEKC, môi trường chất điện giải nền có chứa chất hoạt động bề mặt ở nồng độ cao hơn nồng độ mixen tới hạn (CMC). Trong môi trường nước, các chất hoạt động bề mặt tự ngưng kết và hình thành mixen gồm nhóm có đầu thân nước tạo nên một lớp áo bên ngoài và nhóm có đuôi không thân nước tạo nhân không phân cực ở bên trong mixen để cho các chất tan có thể phân bố. Nói chung, các mixen có những anion trên bề mặt ngoài, dưới tác dụng của điện thế áp đặt chúng di chuyển theo hướng ngược lại so với dòng EOF. Kiểu phân bố này tương tự với phân bố trong chiết xuất với dung môi hay trong sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo. Sự phân bố khác nhau của các phân tử trung tính vào pha động nước và pha "tĩnh giả" mixen là cơ sở duy nhất cho quá trình tách. Dung dịch đệm và các mixen tạo thành hệ thống hai pha, chất tan có thể phân bố giữa hai pha này.

Hệ thống mixen thích hợp cho MEKC phải đáp ứng các tiêu chuẩn sau: Chất hoạt động bề mặt tan tốt trong đệm và dung dịch mixen đồng nhất và trong suốt đối với detector UV. Chất hoạt động bề mặt phổ biến nhất cho MEKC là natri dodecyl sulfat (chất hoạt động bề mặt anion). Những chất hoạt động khác bao gồm cetyltrimethylamoni bromid

(chất hoạt động bề mặt cation) và các muối mật (chất hoạt động bề mặt chiral). Độ chọn lọc của hệ thống MEKC chủ yếu tùy thuộc vào bản chất của chất hoạt động bề mặt. Dung môi hữu cơ thường thêm vào trong đệm MEKC để điều chỉnh hệ số dung lượng, tương tự như trong tách bằng sắc ký lỏng pha đảo. MEKC có thể sử dụng để tách các đồng phân đối quang. Để tách các đồng phân, trong dung dịch đệm được thêm vào các chất phụ gia chiral hoặc chất hoạt động bề mặt chiral như muối mật.

Kiến thức chung về sắc ký cột cổ điển sẽ hỗ trợ cho sự hiểu biết nguyên lý MEKC. Tuy vậy, trong MEKC, các mixen không thuần túy là pha tĩnh. Bởi vậy, lý thuyết sắc ký cột cần thiết phải được điều chỉnh. Sự điều chỉnh cơ bản đối với nguyên lý của MEKC là bản chất xác định của cửa sổ tách đối với các phân tử trung tính.

Thời gian lưu (t_R) đối với các chất trung tính được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$t_R = (1 + k')t_0 / [1 + (t_0 / t_{MC})]$$

Trong đó, t_0 là thời gian yêu cầu đối với chất không lưu giữ đi qua chiều dài hiệu dụng của cột mao quản, t_{MC} là thời gian cần để mixen đi qua mao quản, k' là hệ số dung lượng và t_R luôn luôn ở giữa giá trị t_0 và t_{MC} .

Hệ số dung lượng (k') đối với các chất trung tính được tính theo phương trình:

$$k' = (t_R / t_0 - 1) / (1 - t_R / t_{MC})$$

Trong đó các ký hiệu được định nghĩa như trên.

Để áp dụng cho mục đích thực tiễn, k' được tính bằng phương trình:

$$k' = t_R / t_0 - 1$$

Trong đó t_R là thời gian được đo từ thời điểm đặt thế (hoặc điểm bắt đầu tiêm mẫu) đến thời điểm ứng với đỉnh pic tối đa, t_0 được đo từ điểm đặt thế (hoặc điểm bắt đầu tiêm mẫu) đến điểm biên phía trước của pic dung môi hay đến tín hiệu của chất không lưu giữ. k' trong MEKC có ý nghĩa nhất định và là đặc trưng của một chất tan nhất định trong hệ MEKC. Những bản luận khác của k' được trình bày trong phần tính phù hợp hệ thống trong mục các thông số làm việc.

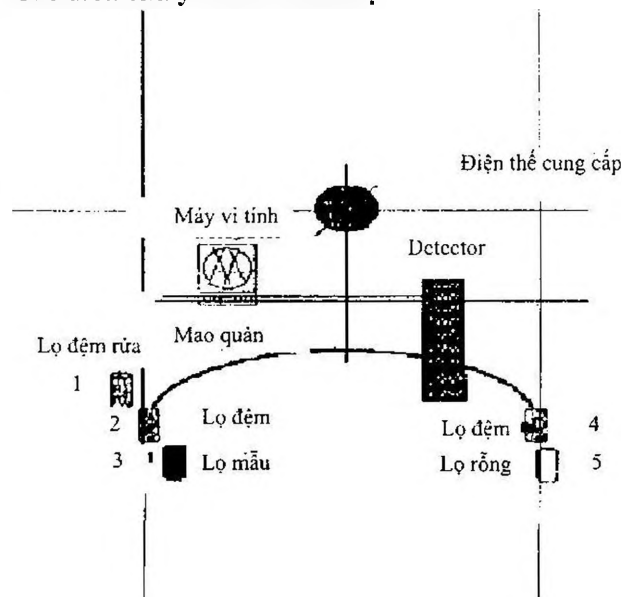
Độ phân giải (R_s) đối với các chất trung tính được tính bằng phương trình:

$$R_s = \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right] \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k'_2}{(1 + k'_2)} \right] \left[\frac{(1 - (t_0 / t_{MC}))}{(1 + (t_0 / t_{MC})k'_1)} \right]$$

Trong đó α là độ chọn lọc, bằng tỷ số của k'_2 đối với k'_1 trong điều kiện cụ thể cho việc tách hai chất tan. Nếu hai chất tan rửa giải gần nhau ($\alpha \leq 1,1$), có thể dùng một trong hai trị giá k' . Phương trình chứng tỏ rằng, cũng như với sắc ký kinh điển, độ phân giải trong MEKC có thể được cải thiện qua việc kiểm soát hiệu lực của hệ thống, độ chọn lọc, sự lưu giữ và bản chất hóa học của các chất hoạt động bề mặt. Hạng từ cuối cùng của phương trình chính là khoảng rửa giải giới hạn. Mặc dầu MEKC đặc biệt hữu hiệu trong tách các chất trung tính, kỹ thuật này cũng có

thể được áp dụng cho việc tách các chất tan tích điện. Quy trình sau đây liên quan đến sự phối hợp cơ chế tách giữa sắc ký và điện di. Tương tác giữa chất tan tích điện và mixen có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự tách. Các ion có thể hình thành nếu như điện tích trên chất hoạt động bề mặt và chất tan là trái dấu nhau. Trong trường hợp ngược lại, chất hoạt động bề mặt và chất tan đẩy nhau. Sự khác biệt này có thể ảnh hưởng có ý nghĩa đến sự tách của các phân tử tích điện.

Các điều chú ý đối với thiết bị



Hình 5.7 - Cấu hình thiết bị CE điển hình

Hệ thống CE điển hình (Hình 5.7) bao gồm một mao quản bằng silica nung chảy có đường kính trong từ 50 μm đến 100 μm và chiều dài từ 20 cm đến 100 cm. Các đầu mao quản được nhúng vào các bình điện giải riêng biệt. Nguồn cung cấp điện một chiều có khả năng tạo điện áp cao từ 0 kV đến 30 kV. Thêm vào đó một detector, bộ phận tiêm mẫu tự động và thiết bị ghi dữ liệu là đủ một hệ thiết bị CE. Hệ thống cung cấp dung dịch đệm tự động và hệ thống kiểm soát bằng máy vi tính, ghi nhận dữ liệu hay kiểm soát nhiệt độ cho cả mao quản và bộ phận tiêm mẫu tự động có thể thấy ở các thiết bị có mặt trên thị trường.

Những điều cần quan tâm đầu tiên đối với thiết bị là kiểu mao quản, cấu hình, cách tiêm mẫu, nguồn cung cấp điện và kiểu detector.

Các loại mao quản và cấu hình thiết bị

Mao quản dùng trong CZE thường được làm bằng silica nung chảy và không có lớp bao mặt trong mao quản. Một vài thiết bị có cấu hình với cột mao quản để tự do, nghĩa là mao quản không đưa vào bên trong hộp chứa. Trong hầu hết các thiết bị trên thị trường, mao quản được đặt vào trong một hộp chứa. Cả hai cấu hình đều có những ưu và nhược điểm riêng. Điều quan trọng là khả năng của thiết bị có thể tương thích được các loại mao quản khác nhau với chiều dài và đường kính mao quản khác nhau. Mao quản

với chất bao mặt trong khác nhau hiện nay cũng có mặt trên thị trường. Bởi vậy, khả năng tương thích với các loại cột khác nhau rất quan trọng. Các chất bao mặt trong mao quản có thể được sử dụng để thay đổi cường độ hay hướng của dòng EOF hay làm giảm sự hấp phụ của mẫu. Nếu sử dụng mao quản có chất bao mặt trong, phải có ghi các chi tiết về chất bao và nhà cung cấp trong phương pháp. Mao quản từ nhà cung cấp khác cũng có thể được sử dụng nếu chúng thích hợp.

Kỹ thuật đưa mẫu và tiêm mẫu

Cách đưa mẫu vào trong mao quản bao gồm tiêm kiểu di chuyển điện (kiểu điện động) và tiêm áp suất âm và tiêm áp suất dương (kiểu thủy tĩnh).

Để tiêm kiểu di chuyển điện, dung dịch mẫu được đưa vào mao quản bằng cách nhúng mao quản và điện cực vào trong lọ mẫu và đặt lên đó một điện thế cao trong thời gian ngắn. Mẫu đi vào mao quản bằng sự phối hợp của điện di và dòng EOF. Bởi vậy, các chất phân tích có linh độ khác nhau đi vào trong mao quản ở mức độ khác nhau. Độ dẫn của mẫu thử và chất chuẩn cũng ảnh hưởng đến dòng EOF và thể tích tiêm.

Tiêm áp suất âm là đặt áp suất âm ở đầu mao quản có detector và hút dung dịch mẫu vào đầu tiêm của mao quản. Tiêm áp suất dương là tạo áp suất lên lọ chứa mẫu, đẩy mẫu vào trong mao quản. Tiêm áp suất có thể đưa tất cả các thành phần của mẫu vào trong mao quản ở cùng một mức độ, nói chung là cho độ tái lập tốt nhất và là cách tiêm thường được áp dụng nhất. Thể tích mẫu phụ thuộc vào chiều dài và đường kính trong của mao quản và điện thế hay áp suất áp đặt. Thể tích mẫu đặc trưng được tiêm vào trong mao quản khoảng từ 1 nl đến 20 nl.

Mỗi một phương pháp tiêm mẫu có những ưu và nhược điểm riêng, tùy thuộc vào thành phần của mẫu, kiểu tách và áp dụng phương pháp. Không có kiểu tiêm mẫu nào nói trên có độ tái lập như bộ tiêm mẫu của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao hiện đang có mặt trên thị trường. Tùy theo hoàn cảnh cụ thể, cần thiết phải sử dụng chất chuẩn nội cho các phương pháp cụ thể khi cần sự tiêm mẫu chính xác.

Cung cấp nguồn điện

Hầu hết các thiết bị CE có mặt trên thị trường có nguồn điện một chiều, nó có khả năng tạo nguồn điện thay đổi từ từ hay từng nấc đảm bảo duy trì được điện thế mong muốn một cách ổn định. Điều này sẽ đảm bảo có được đường nền tương đối phẳng.

Một đặc điểm thiết yếu khác của nguồn điện là khả năng sử dụng nguồn này để đưa mẫu vào đầu cathod hay anod của mao quản. Bởi vì trên thực tế không thể thay đổi vị trí detector từ đầu này đến đầu kia của thiết bị, mà chỉ có thể ấn định đầu tiêm mẫu ở phía cathod hay anod.

Các kiểu detector

Nói chung hệ thống CE thường ghép với các detector UV-VIS và detector huỳnh quang cảm ứng laser. Detector quét phổ UV hay detector dãy diod có thể thấy ở nhiều thiết bị CE hiện có mặt trên thị trường.

Sự ghép nối CE với phổ khối cho phép thu được thông tin về cấu trúc kết hợp các dữ liệu điện di.

Phát hiện bằng detector huỳnh quang sẽ làm tăng độ nhạy phát hiện đối với mẫu chứa một lượng rất nhỏ chất cần phân tích có khả năng hấp thụ UV. Việc ghép một nhóm huỳnh quang với những chất không hấp thụ UV có thể là có ích. Các chất không hấp thụ UV hoặc không phát quang có thể được phát hiện bằng cách thêm trực tiếp vào dung dịch đệm các chất mang màu hay chất có huỳnh quang. Các chất không hấp thụ được phát hiện nhờ sự mất tín hiệu so với chất nền hấp thụ hay huỳnh quang. Detector đo độ dẫn và đo amper có thể được sử dụng, nhưng nói chung chúng không thông dụng ở các thiết bị có mặt trên thị trường.

Những điểm cần chú ý khi phân tích mẫu

Một vài thông số như kích thước mao quản, điện thế, lực ion và pH được tối ưu hóa để đạt độ phân giải và sự tách phù hợp. Cần tránh sự thay đổi nhiệt độ vì sẽ ảnh hưởng đến độ nhớt của dung dịch đệm và ảnh hưởng cả đến dòng EOF và linh độ của chất tan.

Kích thước mao quản

Những thay đổi về đường kính và chiều dài mao quản có thể ảnh hưởng đến độ phân giải điện di. Chiều dài mao quản tăng sẽ kéo dài thời gian di chuyển, thông thường sẽ tăng độ phân giải và làm giảm dòng điện. Đường kính mao quản tăng thường làm tăng dòng điện và tạo ra gradient nhiệt độ bên trong cột, dẫn đến làm giảm độ phân giải. Ngược lại, giảm đường kính trong của mao quản sẽ làm giảm sinh nhiệt và cho độ phân giải tốt hơn. Tuy nhiên, ở mao quản có đường kính lớn hơn sẽ có thuận lợi là tiêm được lượng mẫu nhiều hơn và cải thiện được tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu.

Ảnh hưởng điện thế

Khi đặt một điện thế cao hơn, xảy ra sự tăng sinh nhiệt của dung dịch đệm làm việc bên trong mao quản vì có dòng điện đi qua dung dịch đệm. Hiệu ứng nhiệt này còn gọi là nhiệt Jun cần phải được kiểm soát vì trở kháng, hằng số điện môi và độ nhớt phụ thuộc vào nhiệt độ và làm thay đổi tốc độ dòng EOF và linh độ của chất tan.

Nói chung, sự tăng điện thế sẽ làm tăng hiệu lực tách và độ phân giải đến điểm mà nhiệt Jun không phát tán được. Độ phân giải tối đa có thể đạt được bằng cách duy trì điện thế ở dưới mức xảy ra sự phát nhiệt Jun và sự khuếch tán trở thành yếu tố giới hạn.

Ảnh hưởng của lực ion

Kiểm soát lực ion cho phép điều chỉnh độ phân giải, hiệu lực tách và độ nhạy. Tăng lực ion nói chung sẽ cải thiện độ phân giải, hiệu lực tách và hình dạng pic. Độ nhạy có thể được cải thiện do có sự tụ hợp tốt hơn. Tuy nhiên, bởi vì dòng điện sinh ra tỷ lệ thuận với nồng độ đệm, nhiệt sinh ra nhiều hơn khi lực ion của đệm tăng, do đó cần hạn chế tăng lực ion.

Ảnh hưởng của pH

Độ phân giải, độ nhạy và hình dạng pic có thể thay đổi một cách rõ rệt khi có sự thay đổi pH vì thông số này ảnh hưởng đến mức ion hóa của chất tan và dòng EOF. Dòng EOF cao ở pH cao và thấp ở pH thấp đối với cột mao quản bằng silica nung chảy không có lớp bao mặt trong.

Các thông số vận hành

Các bước cơ bản trong quá trình vận hành hệ thống CE là thiết lập hệ thống, quy trình rửa cột mao quản, chuẩn bị mẫu, thử tính phù hợp hệ thống, phân tích mẫu, xử lý dữ liệu và tắt hệ thống.

Thiết lập hệ thống

Cần quan tâm đến khả năng tách, độ phân giải, lực ion của dung dịch đệm và ảnh hưởng pH để chọn cột có kích thước và lớp bao bề mặt cho phù hợp. Điều chế dung dịch đệm có thành phần, lực ion và pH thích hợp, loại khí nếu cần thiết và lọc qua lọc thích hợp.

Tất cả dung môi, bao gồm cả nước cần dùng loại tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng hay CE.

Quy trình rửa mao quản

Sự ổn định về thời gian di chuyển và độ phân giải có thể thu được nếu tuân theo quy trình rửa cột mao quản nhất định. Quy trình rửa và cân bằng mao quản phải phù hợp với các chất phân tích, các nền mẫu (matrix) và phương pháp phân tích. Bởi vậy, những quy trình này được xây dựng như là một phần của phương pháp và được quy định trong từng chuyên luận riêng. Rửa cột có thể dùng *dung dịch acid phosphoric 0,1 M, nước và dung dịch natri hydroxyd 0,1 M*. Trước khi bắt đầu quá trình phân tích mẫu, cột mao quản có thể được rửa với năm lần thể tích cột bằng dung dịch đệm làm việc dùng cho quá trình phân tích. Khi thay đổi thành phần đệm, nên rửa cột mao quản với năm lần thể tích cột bằng dung dịch đệm làm việc mới để làm sạch đệm của lần phân tích trước. Khi sử dụng cột mao quản mới bằng silica nung chảy không có lớp bao, thông thường yêu cầu phải hoạt hóa các nhóm silanol trên bề mặt mao quản. Quá trình này bao gồm việc tráng rửa kỹ với *dung dịch natri hydroxyd*. Đối với các loại mao quản có lớp bao bên trong, quy trình rửa cột cần theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vì rửa cột không đúng cách có thể làm phá hủy lớp bao bên trong cột. Cột có thể được chỉ định chuyên dùng cho những loại đệm hay cho những phương pháp phân tích cụ thể để đề phòng nhiễu chéo.

Tiến hành phân tích mẫu

Để có được độ phân giải, độ nhạy và sự tách tốt với pic có hình dạng đẹp cần phải lựa chọn cột mao quản, chất điện giải và quy trình tiêm mẫu phù hợp. Khi cần thì sử dụng nội chuẩn để có được độ chính xác khi tiêm mẫu. Khi lựa chọn nội chuẩn cần quan tâm đến khả năng tách khỏi chất cần phân tích. Sự hoàn hảo của hệ thống có thể được cải thiện bằng cách rửa mao quản giữa các lần tiêm và cung cấp đệm mới cho hai lọ đệm dùng áp đặt thể trong quá trình tách (lọ 1 và 4 trong Hình 5.7). Có thể tiêm lặp lại từ

cùng lọ mẫu thử miễn là tránh được sự nhiễu chéo. Nếu có sự nhiễu chéo xảy ra, nên rửa đầu mao quản nơi tiêm mẫu bằng cách nhúng nhanh nó vào trong một lọ có chứa đệm trước khi nhúng vào trong lọ chứa mẫu hay lọ chứa chất điện giải.

Các thông số vận hành được quy định cụ thể trong từng chuyên luận nhằm làm giảm ảnh hưởng của điện thế, lực ion và pH. Thiết bị được lắp đặt để phân tích mẫu với cột mao quản và điều kiện tiêm mẫu phù hợp nằm trong khoảng tuyến tính động học của detector. Sự chính xác về độ di chuyển có thể đạt được bằng cách chọn chất pha loãng mẫu, chất điện giải và điều kiện xử lý cột mao quản phù hợp. Khi tiến hành phân tích chú ý tránh hiện tượng đưa lượng mẫu quá tải vào cột vì điều này sẽ làm giảm hiệu lực và độ tái lập.

Tính phù hợp của hệ thống

Các thông số được đo đạc có thể bao gồm độ lặp của bộ phận tiêm mẫu, độ chọn lọc và hiệu lực của hệ thống, và sự đối xứng của pic. Độ phân giải giữa các chất phân tích và các chất khác có thể được xác định bằng cách sử dụng các chất chuẩn hỗn hợp.

Các thông số tiêu biểu dùng để xác định tính phù hợp hệ thống bao gồm độ lệch chuẩn tương đối (RSD), hệ số dung lượng (k'), số đĩa lý thuyết (N), độ nhạy (giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng), số đĩa lý thuyết tính trên 1 mét (n), hệ số đối xứng (T) và độ phân giải (R).

Hình dạng pic được kiểm tra chặt chẽ, pic lý tưởng phải đối xứng, không có vai và không kéo đuôi. Nếu những điều kiện này không đạt, cần phải tiến hành điều chỉnh trước khi tiến hành phân tích. Việc tích phân pic cũng phải được kiểm tra chặt chẽ để đảm bảo tín hiệu đáp ứng của pic được định lượng chính xác.

Tiêm lặp lại dung dịch chuẩn với nồng độ biết trước để xác định độ tái lập của hệ thống CE. Dữ liệu tiêm lặp lại từ 5 lần hoặc nhiều hơn được sử dụng để tính toán RSD. Trừ khi có quy định trong chuyên luận riêng, độ lệch chuẩn tương đối cho sự tiêm lặp lại không được quá 3,0 %. Giá trị của độ chính xác nhỏ nhất có thể được quy định riêng trong phương pháp CE, đặc biệt khi xác định các thành phần dạng vết. Việc tính toán các thông số điện di trong MEKC, cũng như các phương pháp khác của CE có thể cần đến sự kết hợp các mối quan hệ giữa sắc ký và điện di. Vì vậy, hệ số dung lượng (k') cho sự di chuyển của chất trung tính trong MEKC có thể tính bằng phương trình:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \times \left(1 - \frac{t_R}{t_{MC}}\right)}$$

Trong đó t_R , t_0 , và t_{MC} lần lượt là thời gian di chuyển của chất cần phân tích, của dung dịch (EOF) và của mixen. Số đĩa lý thuyết (N), là thước đo hiệu lực của hệ thống và được tính bằng phương trình:

$$N = 16(t_R/W)^2 \text{ hay } N = 5,54(t_R/W_{1/2})^2$$

Trong đó W là độ rộng pic của chất cần phân tích đo được ở đường nền, $W_{1/2}$ là độ rộng pic của chất cần phân tích đo được ở phân nửa chiều cao của pic và t_R là thời gian di chuyển của chất phân tích.

Số đĩa lý thuyết tính trên mét (n) là thước đo hiệu lực của cột mao quản được xem như là hàm số về độ rộng pic ở đường nền và có thể tính toán bằng công thức:

$$n = 1600(t_R/W)^2/L$$

Trong đó L tính bằng cm là chiều dài tổng cộng của mao quản, các ký hiệu khác được định nghĩa như trên. Hệ số đối xứng pic (T) của chất cần phân tích là thước đo sự đối xứng của pic, nó thể hiện độ lệch của pic so với pic đối xứng lý tưởng. Hệ số này được tính bằng phương trình:

$$T = W_{0.05}/2f$$

Trong đó $W_{0.05}$ là chiều rộng pic đo ở 5 % chiều cao của pic tính từ đường nền, f là chiều rộng nửa bên trái của pic đo ở 5 % chiều cao pic tính từ đường nền. Hệ số 1,0 chỉ rằng pic là đối xứng. Nếu các hiệu ứng phân tán điện di xảy ra, thì chúng có thể tạo ra pic không đối xứng. Điều này có thể xảy ra khi dung nồng độ mẫu thử cao như trong phân tích tạp chất. Trường hợp pic bất đối xứng cũng có thể chấp nhận được miễn là đạt được độ lặp và chúng không ảnh hưởng đến độ chọn lọc về tách.

Hệ số phân giải (R) đo khả năng của hệ thống CE tách các chất cần phân tích di chuyển kế tiếp nhau. Độ phân giải được xác định cho tất cả các chất cần phân tích, với pH của đệm được điều chỉnh nếu cần thiết để đáp ứng các yêu cầu về tính phù hợp hệ thống. Nó có thể được tính bằng phương trình:

$$R = 2(t_2 - t_1)/(W_1 + W_2)$$

Trong đó t_2 và t_1 lần lượt là thời gian di chuyển (đo được ở cực đại của pic) của pic đi sau và pic trước. W_2 và W_1 lần lượt là chiều rộng của hai pic đo được ở đường nền.

Phân tích mẫu

Sau khi xác định tính phù hợp hệ thống, có thể tiêm dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn có thể tiêm trước hay sau mẫu thử và tiêm xen kẽ trong suốt quá trình phân tích.

Xử lý dữ liệu

Diện tích pic được chuẩn hóa theo thời gian thường được sử dụng trong định lượng. Các dữ liệu được xác định bằng cách chia diện tích pic đã tích phân được cho thời gian di chuyển của chất phân tích. Điều này làm giảm sai số do trong CE, không giống như trong sắc ký lỏng, mỗi chất cần phân tích di chuyển qua detector với một tốc độ khác nhau. Trừ khi sự chuẩn hóa này được thực hiện, những chất di chuyển chậm hơn sẽ có diện tích lớn bất thường so với diện tích của những thành phần di chuyển nhanh.

Tắt hệ thống

Sau khi phân tích, cột mao quản được rửa theo sự hướng dẫn được quy định riêng trong từng chuyên luận hay theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Ví dụ: Cột mao quản có thể được rửa bằng nước cất để loại các thành phần đệm và sau đó được nạp không khí hoặc khí nitrogen lấy từ lọ rỗng. Thông thường, lọ đích và lọ nguồn (lọ 4 và lọ 2 trong Hình 5.7) là các lọ được bỏ dung dịch đệm đi và được tráng kỹ bằng nước khử khoáng.

PHỤ LỤC 6

6.1 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ KHÚC XẠ

Chỉ số khúc xạ (n) của một chất so với không khí là tỷ lệ giữa sin của góc tới và sin của góc khúc xạ của chùm tia sáng truyền từ không khí vào chất đó.

Chỉ số khúc xạ thay đổi theo bước sóng ánh sáng được dùng để đo và nhiệt độ. Chỉ số khúc xạ có giá trị để định tính và đánh giá sơ bộ mức độ tinh khiết của mẫu đo.

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, chỉ số khúc xạ được đo ở $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ với tia sáng có bước sóng tương ứng với vạch D của natri (589,3 nm), ký hiệu n_D^{20} .

Máy

Khúc xạ kế dùng để xác định góc tới hạn của môi trường. Phần chủ yếu của khúc xạ kế là một lăng kính có chỉ số khúc xạ biết trước đặt tiếp xúc với môi trường được khảo sát.

Hầu hết khúc xạ kế được thiết kế để sử dụng nguồn sáng trắng, khi sử dụng nguồn sáng trắng, khúc xạ kế được trang bị hệ thống bộ chỉnh và được hiệu chuẩn lại để cho kết quả đọc tương ứng với vạch D của đèn natri.

Thang đo chỉ số khúc xạ phải đọc được các giá trị với ít nhất 3 số lẻ thập phân.

Nhiệt kế chia độ tới $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc nhỏ hơn.

Để đạt được độ chính xác, cần thiết phải hiệu chuẩn lại máy với các chất chuẩn do nhà sản xuất cung cấp hay bằng cách xác định chỉ số khúc xạ của nước cất tại $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ là 1,3325 và tại $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ là 1,3330.

6.2 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ pH

pH là một số biểu thị quy ước nồng độ ion hydrogen của dung dịch nước. Trong thực hành, định nghĩa trên là một định nghĩa thực nghiệm. pH của một dung dịch liên quan với pH của một dung dịch đối chiếu theo biểu thức sau:

$$\text{pH} = \text{pH}_s - \left[\frac{(E - E_s)}{k} \right]$$

Trong đó:

E là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch được khảo sát;

E_s là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch đã biết pH (dung dịch đối chiếu);

pH_s là pH của dung dịch đối chiếu;

k là hệ số có giá trị thay đổi theo nhiệt độ ghi ở Bảng 6.2.1.

Bảng 6.2.1 - Giá trị của k ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	k (V)
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

Máy

Trị số pH của một dung dịch được xác định bằng cách đo thế hiệu giữa điện cực chỉ thị nhạy cảm với ion hydrogen (thường là điện cực thủy tinh) và một điện cực so sánh (ví dụ điện cực calomel bão hòa).

Máy đo là một điện thế kế có trở kháng đầu vào gấp ít nhất 100 lần trở kháng của các điện cực sử dụng. Nó thường được phân độ theo đơn vị pH và có độ nhạy đủ để phát hiện được những thay đổi cỡ 0,05 đơn vị pH hoặc ít nhất 0,003 V. Các điện cực thủy tinh phù hợp và các kiểu máy đo pH kể cả máy đo pH hiện số đều phải đáp ứng yêu cầu trên.

Vận hành máy đo pH và hệ thống điện cực theo sự chỉ dẫn của hãng sản xuất.

Tất cả các phép đo đều cần phải tiến hành trong cùng một điều kiện nhiệt độ khoảng từ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, trừ những trường hợp có quy định khác trong chuyên luận riêng.

Hiệu chuẩn máy: Dùng dung dịch đệm chuẩn D ghi trong Bảng 6.2.2 là chuẩn thứ nhất, đo và chỉnh máy để đọc được trị số pH của chuẩn ghi ở bảng tương ứng với nhiệt độ của dung dịch.

Dùng một dung dịch đệm chuẩn thứ hai (chọn một trong các dung dịch quy định ghi ở Bảng 6.2.2) để chỉnh thang đo.

Trị số pH đo được của dung dịch đệm chuẩn thứ ba, dung dịch có trị số pH nằm giữa trị số pH của đệm chuẩn thứ nhất và thứ hai, phải không được sai khác nhiều hơn 0,05 đơn vị pH so với trị số pH tương ứng ghi trong Bảng 6.2.2.

Phương pháp đo

Nhúng các điện cực vào trong dung dịch cần khảo sát và đo trị số pH ở cùng nhiệt độ đo của các dung dịch đệm chuẩn khi hiệu chuẩn máy.

Khi máy được dùng thường xuyên, việc kiểm tra thang đo pH phải được thực hiện định kỳ. Nếu máy không thường xuyên dùng, việc kiểm tra cần thực hiện trước mỗi phép đo. Tất cả các dung dịch và dịch treo của chế phẩm khảo sát và các dung dịch đệm chuẩn phải được pha chế với nước không có carbon dioxyd (TT).

Khi đo các dung dịch có pH trên 10,0 phải đảm bảo rằng điện cực thủy tinh đang dùng là phù hợp, chịu được các điều kiện kiềm và cần áp dụng hệ số điều chỉnh trong phép đo.

Sau cùng đo lại trị số pH của dung dịch đệm chuẩn dùng để hiệu chuẩn máy và điện cực. Nếu sự khác nhau giữa lần đọc này và trị số gốc của dung dịch đệm chuẩn ấy lớn hơn 0,05 thì các phép đo phải làm lại.

Bảng 6.2.2 - pH của dung dịch đệm chuẩn ở nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	Dung dịch đệm								
t ^o	A	B	C	D	E	F	G	H	I
15°	1,67	-	3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12	12,81
20°	1,68	-	3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06	12,63
25°	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01	12,45
30°	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97	12,29
35°	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93	12,13
$\Delta pH/\Delta t$	+ 0,001	- 0,0014	- 0,0022	+ 0,0012	- 0,0028	- 0,0028	- 0,0082	- 0,0096	0,034

$\Delta pH/\Delta t$ là độ lệch pH trên 1 °C.

Các dung dịch đệm chuẩn

Dung dịch đệm A: Hòa tan 12,61 g kali tetraoxalat (TT) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,05 M).

Dung dịch đệm B: Lắc kỹ một lượng thừa kali hydro (+)-tartrat (TT) với nước không có carbon dioxyl (TT) ở 25 °C. Lọc hoặc để lắng gạn. Pha ngay trước khi dùng.

Dung dịch đệm C: Hòa tan 11,41 g kali dihydrocitrat (TT) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,05 M). Pha ngay trước khi dùng.

Dung dịch đệm D: Hòa tan 10,13 g kali hydrophthalat (TT) (đã sấy khô trước ở 110 °C ± 2 °C trong 1 h) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,05 M).

Dung dịch đệm E: Hòa tan 3,39 g kali dihydrophosphat (TT) và 3,53 g dinatri hydrophosphat khan (TT) (cả hai đã được sấy khô trước ở 120 °C ± 2 °C trong 2 h) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,025 M cho mỗi muối).

Dung dịch đệm F: Hòa tan 1,18 g kali dihydrophosphat (TT) và 4,30 g dinatri hydrophosphat khan (TT) (cả hai đã được sấy khô trước ở 120 °C ± 2 °C trong 2 h) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,0087 M và 0,0303 M cho mỗi muối theo thứ tự kể trên).

Dung dịch đệm G: Hòa tan 3,80 g natri tetraborat (TT) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,01 M). Bảo quản tránh carbon dioxyl của không khí.

Dung dịch đệm H: Hòa tan 2,64 g natri carbonat khan (TT) và 2,09 g natri hydrocarbonat (TT) trong nước không có carbon dioxyl (TT) vừa đủ để có 1000 ml dung dịch (0,025 M cho mỗi muối).

Dung dịch I: Lắc kỹ một lượng dư calci hydroxyl (TT) trong nước không có carbon dioxyl (TT) và để yên ở 25 °C, gạn lấy phần dịch trong. Bảo quản tránh carbon dioxyl.

6.3 XÁC ĐỊNH ĐỘ NHỚT CỦA CHẤT LỎNG

Độ nhớt của chất lỏng là một đặc tính của chất lỏng liên quan chặt chẽ đến lực ma sát nội tại cản lại sự di động tương đối của các lớp phân tử trong lòng chất lỏng đó.

Độ nhớt động lực hay độ nhớt tuyệt đối, ký hiệu là η , là lực tiếp tuyến trên một đơn vị diện tích bề mặt, được biết như một ứng suất trượt τ (biểu thị bằng pascal), cần thiết để di chuyển một lớp chất lỏng 1 m² song song với mặt phẳng trượt ở tốc độ (v) là 1 m/s so với lớp chất lỏng song song ở một khoảng cách (x) là 1 m.

Tỷ lệ dv/dx là gradient vận tốc cho tốc độ trượt D , biểu thị là nghịch đảo của giây (s⁻¹) và $\eta = \tau/D$.

Đơn vị của độ nhớt động lực là pascal giây (Pa·s) hoặc newton giây trên mét vuông (N·s/m²) và ước số hay dùng là milipascal giây (mPa·s). Ngoài ra người ta còn dùng đơn vị độ nhớt cơ bản là poise (P) và ước số hay dùng là centipoise (cP).

$$1 \text{ Pa}\cdot\text{s} = 1000 \text{ mPa}\cdot\text{s} = 1 \text{ N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$$

$$1 \text{ P} = 0,1 \text{ Pa}\cdot\text{s} = 100 \text{ cP} = 100 \text{ mPa}\cdot\text{s}$$

Độ nhớt động lực của nước cất ở 20 °C xấp xỉ bằng 1 centipoise.

Độ nhớt động học (ν) là tỷ số giữa độ nhớt động lực và khối lượng riêng (ρ) của chất lỏng (biểu thị bằng kg/m³), cả hai đều được xác định ở cùng nhiệt độ t .

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

Đơn vị độ nhớt động học là m²/s, ước số là mm²/s. Ngoài ra người ta còn dùng đơn vị độ nhớt động học là stocker (St) và ước số hay dùng là centistocker (cSt).

$$1 \text{ St} = 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$$

$$1 \text{ cSt} = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s} = 1 \text{ mm}^2/\text{s}$$

Độ nhớt động học của nước cất ở 20 °C xấp xỉ bằng 1 cSt. Khi tính độ nhớt động học của một chất lỏng theo stocker hay centistocker, đi từ độ nhớt động lực tính theo poise hay centipoise thì khối lượng riêng của chất lỏng đó phải tính theo g/cm³.

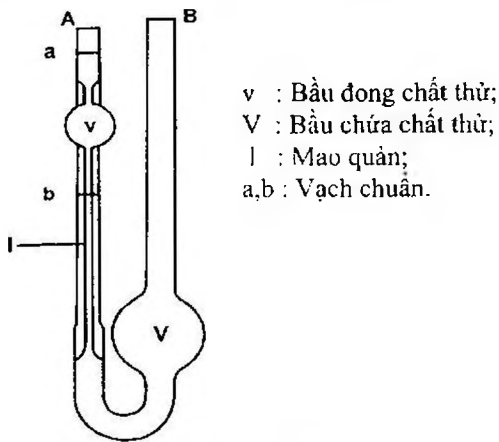
Độ nhớt thay đổi rõ rệt khi nhiệt độ thay đổi. Nhiệt độ tăng thì độ nhớt giảm và ngược lại. Vì vậy, phải xác định độ nhớt của chất lỏng ở nhiệt độ ổn định, dao động không quá ± 0,1 °C.

Phương pháp xác định độ nhớt của chất lỏng

Phương pháp I: Phương pháp đo thời gian chảy của chất lỏng qua ống mao quản

Nhiều nhớt kế mao quản với những kích thước khác nhau, thích hợp cho việc xác định độ nhớt của các chất lỏng khác

nhau. Mỗi loại có một hằng số dụng cụ (k) riêng. Trong số những nhớt kế mao quản, nhớt kế Ostwald thường hay được sử dụng nhất (Hình 6.3.1).



Hình 6.3.1 - Nhớt kế Ostwald.

Cách xác định độ nhớt bằng nhớt kế Ostwald

Dùng pipet dài để chuyển qua miệng ống B chất lỏng cần xác định độ nhớt đã được ổn định nhiệt độ ở $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (trừ khi có chỉ dẫn khác) vào bầu chứa V, sao cho không dính hoặc chỉ dính rất ít chất lỏng đem thử vào thành ống B ở phía trên bầu V. Đặt nhớt kế thẳng đứng và chìm hết bầu V trong môi trường điều nhiệt ở nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (trừ khi có chỉ dẫn khác) trong 30 min. Sau đó dùng quả bóp cao su (phụ kiện của dụng cụ đo độ nhớt) thổi từ miệng ống B để chất lỏng dâng lên quá ngăn chuẩn a thì ngừng bơm, bỏ quả bóp cao su khỏi miệng ống B để chất lỏng đem thử chảy tự do về bầu V. Ghi thời gian cần thiết để vòng khum dưới của chất lỏng đem thử chuyển dịch từ ngăn a đến ngăn b. Làm như vậy 5 lần, lấy trung bình cộng của các kết quả đo được làm thời gian t cần xác định. Sai số các kết quả đo không vượt quá 0,5 %. Để đỡ mắc sai số lớn, cần chọn nhớt kế thích hợp sao cho thời gian t không được dưới 200 s.

Tính độ nhớt lực học η hoặc độ nhớt động học ν lần lượt theo công thức sau:

$$\eta = k \times \rho \times t \quad (1)$$

$$\nu = k \times t \quad (2)$$

Trong đó:

η là độ nhớt động lực (mPa.s hoặc cP);

ν là độ nhớt động học (mm^2/s hoặc cSt);

k là hằng số dụng cụ đo;

ρ là khối lượng riêng của chất lỏng đem thử (g/cm^3);

t là thời gian chảy (s).

Khi không có giá trị k, có thể tự xác định hằng số k bằng cách dùng một chất lỏng đã biết trước độ nhớt η hoặc ν và tính k theo công thức (1) hoặc (2). Nhớt kế đã bị sửa chữa thì khi sử dụng lại, phải được chuẩn lại. Nếu dùng nhớt kế mao quản với máy đo tự động thì vận hành máy theo quy trình hướng dẫn của hãng sản xuất máy. Thời gian cần thiết để chất lỏng đem thử chuyển dịch từ ngăn a đến ngăn b sẽ được tự động ghi lại.

Phương pháp II: Phương pháp đo thời gian rơi của trái cầu
Phương pháp này thích hợp cho các chất lỏng trong suốt và có độ nhớt cao (từ 8 poise đến 1000 poise).

Dụng cụ: (Hình 6.3.2) Gồm 1 ống thử a, dài 30 cm, đường kính trong là $2\text{ cm} \pm 0,05\text{ cm}$. Trên thành ống có khắc 5 ngăn vòng quanh, mỗi ngăn cách nhau 5 cm. Ống thử a được đặt trong bình điều nhiệt b có chứa nước, phía trên có nắp đậy. Trên nắp có các lỗ để đặt nhiệt kế chia độ đến $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, que khuấy c và phễu g. Trái cầu là những viên bi bằng thép có đường kính 0,15 cm. Viên bi sẽ được thả vào ống thử a qua một ống nhỏ d có đường kính trong là 0,3 cm. Ống d có một lỗ ngang cao hơn mực chất thử trong ống a, đầu dưới của ống d ở ngang ngăn trên cùng của ống a và thấp hơn mặt chất thử 3 cm.

Khi không có dụng cụ như trên có thể dùng các nhớt kế khác có tính năng tương tự, đảm bảo cung cấp giá trị độ nhớt với độ chính xác và độ đúng như những nhớt kế đã mô tả ở trên (ví dụ: Nhớt kế Hoppler).

Phương pháp đo: Đổ chất lỏng cần xác định độ nhớt vào ống thử a sao cho mực chất lỏng cao hơn đầu dưới của ống d 3 cm. Đặt các viên bi vào một ống thử nghiệm nhỏ lỏng qua lỗ đặt phễu g. Giữ chất lỏng cân thử và các viên bi trong môi trường điều nhiệt có nhiệt độ ở $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 30 min (trừ khi có chỉ dẫn khác). Sau đó thả từng viên bi vào trong chất lỏng đem thử qua ống d. Ghi thời gian rơi của 5 viên bi từ ngăn thứ hai đến ngăn thứ năm (15 cm). Lấy trung bình cộng của 5 lần đo này làm thời gian t cần xác định.

Tính độ nhớt động lực η của chất lỏng đem thử theo công thức:

$$\eta = k \times t (\rho_k - \rho)$$

Trong đó:

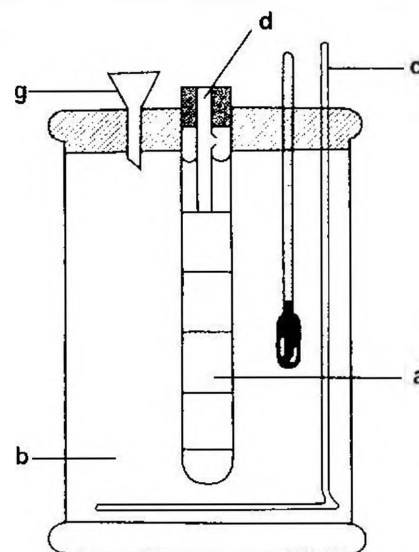
η là độ nhớt động lực (mPa.s hoặc cP);

k là hằng số của viên bi;

ρ_k là khối lượng riêng của viên bi (g/cm^3);

ρ là khối lượng riêng của chất lỏng đem thử (g/cm^3);

T là thời gian rơi của viên bi (s).



Hình 6.3.2 - Dụng cụ đo độ nhớt bằng cách đo thời gian rơi của trái cầu

Phương pháp III

Thiết bị thường dùng là loại nhót kế quay, dựa trên việc đo lực trượt trong môi trường lỏng được đặt giữa hai ống hình trụ đồng trục, một ống được quay nhờ motor, còn ống kia quay được do sự quay của ống thứ nhất tác động vào. Dưới những điều kiện như vậy, độ nhót (hay độ nhót biểu kiến) trở thành phép đo (M) độ lệch của góc đối với ống hình trụ thứ 2, tương ứng với momen lực, biểu thị bằng N-m. Đối với lớp chất lỏng rất mỏng, độ nhót động lực η , biểu thị bằng Pa-s được tính theo công thức:

$$\eta = \frac{1}{\omega} \left(\frac{M}{4\pi h} \right) \left(\frac{1}{R_A^2} - \frac{1}{R_B^2} \right)$$

Trong đó:

h là độ cao tính bằng m của ống hình trụ thứ 2 được nhúng trong chất lỏng;

R_A và R_B là đường kính tính bằng m của hai ống hình trụ (R_A nhỏ hơn R_B);

ω là vận tốc góc tính bằng rad/s.

Hằng số k của máy được tính ở các tốc độ quay khác nhau bằng cách sử dụng các chất lỏng có độ nhót chuẩn.

Các máy luôn được cung cấp một bảng có các hằng số liên quan đến diện tích bề mặt của các ống trụ được dùng và tốc độ quay của chúng. Độ nhót được tính theo công thức:

$$\eta = k(M/\omega)$$

Cách đo: Đo độ nhót theo sự chỉ dẫn cách vận hành nhót kế quay. Nhiệt độ đo được chỉ dẫn trong chuyên luận. Nếu không thể đạt được tốc độ trượt chính xác như chỉ dẫn thì đặt tốc độ trượt cao hơn một chút và thấp hơn một chút sau đó dùng phương pháp nội suy để tính độ nhót.

6.4 XÁC ĐỊNH GÓC QUAY CỰC VÀ GÓC QUAY CỰC RIÊNG

Góc quay cực của một chất là góc của mặt phẳng phân cực bị quay đi khi ánh sáng phân cực đi qua chất đó nếu là chất lỏng, hoặc qua dung dịch chất đó nếu là chất rắn.

Chất làm quay mặt phẳng phân cực theo cùng chiều kim đồng hồ được gọi là chất hữu tuyến, ký hiệu là (+). Chất làm quay mặt phẳng phân cực ngược chiều kim đồng hồ được gọi là chất tả tuyến, ký hiệu là (-).

Nếu không có hướng dẫn riêng, góc quay cực α được xác định ở nhiệt độ 20 °C và với chùm tia đơn sắc có bước sóng ứng với vạch D (589,3 nm) của đèn natri qua lớp chất lỏng hay dung dịch có bề dày 1 dm.

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{20}$ của một chất lỏng là góc quay cực đo được khi chùm ánh sáng D truyền qua lớp chất lỏng đó có bề dày là 1 dm ở 20 °C chia cho tỷ trọng tương đối của chất ở cùng nhiệt độ.

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{20}$ của một chất rắn là góc quay cực đo được khi chùm ánh sáng D truyền qua lớp dung dịch có bề dày là 1 dm và có nồng độ là 1 g/ml, ở 20 °C. Góc quay cực riêng của chất rắn luôn được biểu thị cùng với dung môi và nồng độ dung dịch đo.

Phân cực kế

Các phân cực kế thường dùng nguồn sáng là đèn hơi natri hay hơi thủy ngân. Trong một số trường hợp cần thiết phải sử dụng phân cực kế quang điện cho phép đo ở các bước sóng riêng biệt. Phân cực kế phải cho phép đọc chính xác tới gần 0,01°. Thang đo phải thường xuyên được kiểm định bằng các bản thạch anh chuẩn. Độ tuyến tính của thang đo phải được kiểm tra bằng các dung dịch sucrose.

Cách tiến hành

Xác định góc quay cực của chất thử ở nhiệt độ 19,5 °C đến 20,5 °C, nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng dùng tia D của ánh sáng đèn natri phân cực. Có thể đo ở nhiệt độ khác nếu chuyên luận riêng chỉ ra cách hiệu chỉnh nhiệt độ cho góc quay cực đo được. Tiến hành đo ít nhất 5 lần và lấy giá trị trung bình. Xác định điểm "0" của phân cực kế với ống đo trống khi đo chất lỏng và với ống đo chứa đầy dung môi khi đo dung dịch chất rắn.

Tính góc quay cực riêng theo các biểu thức sau:

Cho chất lỏng:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times d}$$

Cho chất rắn:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times c} \times 1000$$

Trong đó:

α là góc quay cực đo được;

l là chiều dài ống đo của phân cực kế, tính bằng dm;

d là tỷ trọng tương đối của chất lỏng;

c là nồng độ của chất thử (rắn) trong dung dịch (g/l).

Căn cứ vào góc quay cực đo được, có thể tính nồng độ g/l của chất thử trong dung dịch theo biểu thức:

$$c \text{ (g/l)} = \frac{\alpha}{l \times [\alpha]_D^{20}} \times 1000$$

hoặc nồng độ % (kl/kl) của chất thử trong dung dịch theo biểu thức:

$$c \text{ (% kl/kl)} = \frac{\alpha}{l \times \rho_{20} \times [\alpha]_D^{20}} \times 100$$

Trong đó:

ρ_{20} là khối lượng riêng (g/cm³) của dung dịch ở 20 °C.

6.5 XÁC ĐỊNH KHỐI LƯỢNG RIÊNG VÀ TỶ TRỌNG**Khối lượng riêng**

Khối lượng riêng của một chất ở nhiệt độ t (ρ_t) là khối lượng một đơn vị thể tích của chất đó, xác định ở nhiệt độ t :

$$\rho_t = \frac{M}{V}$$

Trong đó:

M là khối lượng của chất, xác định ở nhiệt độ t ;

V là thể tích chất, xác định ở nhiệt độ t , được tính từ khối lượng nước cân trong không khí ở nhiệt độ t .

Khối lượng của 1 lít nước, có tính đến ảnh hưởng của sức đẩy của không khí, ở nhiệt độ xác định được đưa ra trong bảng sau.

Nhiệt độ (°C)	Khối lượng của một lít nước (g)
20	997,18
25	996,02
30	994,62

Trong hệ đơn vị quốc tế SI, đơn vị của khối lượng riêng là kg/m^3 . Trong ngành dược thường xác định khối lượng riêng ở nhiệt độ 20 °C (ρ_{20}) có tính đến ảnh hưởng của sức đẩy của không khí (tức là quy về giá trị xác định trong chân không) và dùng đơn vị kg/l hoặc g/ml .

Tỷ trọng tương đối

Tỷ trọng tương đối d_{20}^{20} của một chất là tỷ số giữa khối lượng của một thể tích cho trước của chất đó, và khối lượng của cùng thể tích nước cất, tất cả đều cân ở 20 °C.

Tỷ trọng biểu kiến

Đại lượng "tỷ trọng biểu kiến" được dùng trong các chuyên luận ethanol, ethanol 96 % và loãng hơn..., là khối lượng cân trong không khí của một đơn vị thể tích chất lỏng. Tỷ trọng biểu kiến được biểu thị bằng đơn vị kg/m^3 và được tính toán theo biểu thức sau đây:

$$\text{Tỷ trọng biểu kiến} = 997,2 \times d_{20}^{20}$$

Trong đó:

d_{20}^{20} là tỷ trọng tương đối của chất thử.

997,2 là khối lượng cân trong không khí của 1 m^3 nước, tính bằng kg .

Xác định tỷ trọng tương đối d_{20}^{20} của một chất lỏng

Xác định tỷ trọng của một chất lỏng theo phương pháp được chỉ rõ trong chuyên luận. Nếu chuyên luận không chỉ rõ dùng phương pháp nào để xác định tỷ trọng một chất lỏng, có thể dùng một trong các phương pháp sau đây:

Phương pháp dùng picnomet: Cân chính xác picnomet rỗng, khô và sạch. Đổ vào picnomet mẫu thử đã điều chỉnh nhiệt độ thấp hơn 20 °C, chú ý không để có bọt khí. Giữ picnomet ở nhiệt độ 20 °C trong khoảng 30 min. Dùng một băng giấy lọc để thấm hết chất lỏng thừa trên vạch mức, làm khô mặt ngoài của picnomet, cân rồi tính khối lượng chất lỏng chứa trong picnomet. Tiếp đó đổ mẫu thử đi, rửa sạch picnomet, làm khô bằng cách tráng ethanol rồi tráng acetone, thổi không khí nén hoặc không khí nóng đuổi hết hơi acetone, sau đó xác định khối lượng nước cất chứa trong picnomet ở nhiệt độ 20 °C như làm với mẫu thử. Tỷ số giữa khối lượng mẫu thử và khối lượng nước cất thu được là tỷ trọng d_{20}^{20} cần xác định.

Phương pháp này cho kết quả với 4 chữ số lẻ thập phân.

Phương pháp dùng cân thủy tĩnh Mohr-Westphal: Đặt cân trên mặt phẳng nằm ngang. Mắc phao vào đòn cân, đặt phao chìm trong nước cất ở nhiệt độ 20 °C và chỉnh thăng bằng bằng các con mã đặt ở các vị trí thích hợp,

thu được giá trị M. Lấy phao ra, thấm khô rồi đặt lại phao chìm trong chất lỏng cần xác định tỷ trọng, ở cùng nhiệt độ 20 °C, chú ý sao cho phần dây treo chìm trong chất lỏng một đoạn bằng đoạn đã chìm trong nước cất. Chỉnh lại thăng bằng bằng các con mã đặt ở vị trí thích hợp, thu được giá trị M_1 . Tỷ số M_1/M là tỷ trọng d_{20}^{20} cần xác định.

Phương pháp này cho kết quả với 3 chữ số lẻ thập phân.

Phương pháp dùng tỷ trọng kế: Lau sạch tỷ trọng kế bằng ethanol hoặc ether. Dùng đĩa thủy tinh trộn đều chất lỏng cần xác định tỷ trọng. Đặt nhẹ nhàng tỷ trọng kế vào chất lỏng đó sao cho tỷ trọng kế không chạm vào thành và đáy của dụng cụ đựng chất thử. Chỉnh nhiệt độ tới 20 °C và khi tỷ trọng kế ổn định, đọc kết quả theo vòng khum dưới của mức chất lỏng. Đối với chất lỏng không trong suốt, đọc theo vòng khum trên.

Phương pháp này cho kết quả với 2 hoặc 3 chữ số lẻ thập phân.

Xác định tỷ trọng d_{20}^{20} của mỡ, sáp, nhựa, nhựa thơm

Dùng picnomet: Đầu tiên cân chính xác picnomet rỗng (M_1) rồi cân picnomet đổ đầy nước cất ở 20 °C (M_4). Sau đó đổ nước đi, làm khô picnomet, dùng ống hút hoặc phễu cuống nhỏ, cho vào trong picnomet mẫu thử đã được đun chảy khoảng 1/3 đến 1/2 thể tích của picnomet. Để 1 h trong nước nóng, không đẩy nút. Làm nguội đến 20 °C, đẩy nút. Lau khô mặt ngoài picnomet rồi lại cân (M_2). Cuối cùng thêm nước cất đến vạch, lau khô mặt ngoài picnomet rồi lại cân (M_3). Chú ý không được để bọt khí còn lại giữa lớp nước và mẫu thử.

Tính kết quả theo công thức:

$$d_{20}^{20} = \frac{M_2 - M_1}{(M_4 + M_2) - (M_1 + M_3)}$$

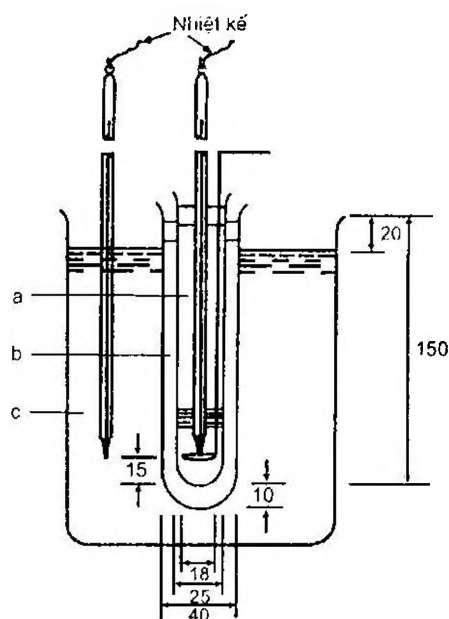
6.6 XÁC ĐỊNH NHIỆT ĐỘ ĐÔNG ĐẶC

Nhiệt độ đông đặc là nhiệt độ cao nhất giữ nguyên không đổi trong quá trình chuyển từ trạng thái lỏng sang trạng thái rắn.

Dụng cụ (Hình 6.6)

Một ống nghiệm (a) 150 mm × 25 mm đặt vào bên trong một ống nghiệm lớn (b) khoảng 160 mm × 40 mm. Hai ống nghiệm không chạm vào nhau và cách nhau một lớp không khí. Ống nghiệm bên trong được đẩy bằng một nút có mang một que khuấy và một nhiệt kế (dài khoảng 175 mm, chia độ tới 0,2 °C), được cố định sao cho bầu nhiệt kế cách đáy ống khoảng 15 mm. Que khuấy được làm bằng một đĩa thủy tinh hoặc bằng thép, đầu dưới uốn thành một vòng tròn có đường kính khoảng 18 mm, vuông góc với que khuấy.

Ống nghiệm (a) và ống bọc nó (b) được giữ ở giữa một cốc hình vại (c) có dung tích 1 L, chứa một chất lỏng làm lạnh thích hợp. Mức chất lỏng làm lạnh cách miệng ống khoảng 20 mm. Một nhiệt kế hỗ trợ được giữ trong chất lỏng làm lạnh.



Hình 6.6 - Dụng cụ xác định nhiệt độ đông đặc
(kích thước tính bằng mm)

Cách tiến hành

Lấy một lượng chế phẩm (đã được làm nóng chảy nếu cần thiết), cho vào ống nghiệm (a) của dụng cụ sao cho bầu thủy ngân của nhiệt kế ngập trong lớp chế phẩm và xác định sơ bộ khoảng nhiệt độ đông đặc bằng cách làm lạnh nhanh. Đặt ống nghiệm (a) đã chứa chế phẩm vào trong một bể cách thủy có nhiệt độ trên nhiệt độ đông đặc dự kiến khoảng 5 °C cho đến khi các tinh thể chế phẩm chảy hoàn toàn. Làm đầy cốc (c) bằng nước hoặc dung dịch bão hòa natri clorid ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ đông đặc dự kiến khoảng 5 °C. Lồng ống nghiệm (a) vào ống nghiệm (b) và đặt vào cốc (c). Khuấy liên tục, nhẹ nhàng và cứ 30 s lại đọc nhiệt độ trên nhiệt kế một lần. Lúc đầu nhiệt độ hạ thấp dần, rồi giữ nguyên một thời gian hoặc tăng một chút, rồi giữ nguyên không đổi trong suốt thời gian đông. Để tránh hiện tượng chậm đông, khi gần đến điểm đông, có thể cho vào ống nghiệm một tinh thể nhỏ chế phẩm đã có sẵn, hoặc cọ nhẹ thành trong của ống nghiệm.

6.7 XÁC ĐỊNH NHIỆT ĐỘ NÓNG CHẢY, KHOẢNG NÓNG CHẢY VÀ ĐIỂM NHỎ GIỌT

Khoảng nóng chảy (gọi tắt là khoảng chảy) của một chất là khoảng nhiệt độ đã hiệu chỉnh, kể từ khi chất rắn bắt đầu nóng chảy và xuất hiện những giọt chất lỏng đầu tiên, đến khi chất rắn chuyển hoàn toàn sang trạng thái lỏng. Nhiệt độ nóng chảy (gọi tắt là điểm chảy) của một chất là nhiệt độ đã hiệu chỉnh, tại đó hạt chất rắn cuối cùng của chất thử nghiệm chuyển thành trạng thái lỏng, bắt đầu biến màu, hoá than hoặc sủi bọt.

Khi phải xác định khoảng chảy, nếu nhiệt độ bắt đầu hoặc nhiệt độ kết thúc nóng chảy không xác định rõ ràng, ta có thể chỉ xác định nhiệt độ kết thúc, hoặc nhiệt độ bắt đầu nóng chảy. Nhiệt độ này phải nằm trong giới hạn quy định trong chuyên luận riêng của chế phẩm.

Để xác định khoảng chảy và điểm chảy, tùy theo tính chất lý học của từng chất, áp dụng một trong các phương pháp 1, 2 hay 3, còn để xác định điểm nhỏ giọt thì sử dụng phương pháp 4.

Phương pháp 1

(Áp dụng cho các chất rắn dễ nghiền nhỏ).

Dụng cụ

Một bình thủy tinh chịu nhiệt, trong bình chứa một chất lỏng thích hợp, thường dùng là dầu parafin, hoặc để xác định ở nhiệt độ cao dùng dầu silicon, lượng chất lỏng đủ để nhúng chìm được nhiệt kế và mẫu thử sao cho bầu thủy ngân cách đáy bình 2 cm.

Một dụng cụ khuấy có khả năng duy trì sự đồng nhất về nhiệt độ trong chất lỏng.

Một nhiệt kế đã được hiệu chuẩn và chia độ đến 0,5 °C, có khoảng nhiệt độ đo từ thấp nhất đến cao nhất không được quá 100 °C.

Ống mao quản, hàn kín một đầu, dài 6 cm đến 8 cm, đường kính trong 1,0 mm ± 0,1 mm, thành ống dày khoảng 0,10 mm đến 0,15 mm.

Nguồn nhiệt, có thể điều chỉnh được.

Dụng cụ có thể được hiệu chuẩn với các chất chuẩn có điểm chảy được chứng nhận của Tổ chức Y tế thế giới hay những chất thích hợp khác.

Cách xác định

Nghiền thành bột mịn chất thử đã làm khô 24 h ở áp suất 1,5 kPa đến 2,5 kPa trong bình với chất hút ẩm thích hợp, hoặc sấy khô 2 h ở 100 °C đến 105 °C, trừ trường hợp có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Cho bột vào ống mao quản, lèn bột bằng cách gõ nhẹ ống mao quản xuống mặt phẳng cứng để có một lớp chế phẩm cao 4 mm đến 6 mm.

Đun nóng bình đựng chất lỏng đến khi nhiệt độ thấp hơn điểm chảy dự kiến của chất thử khoảng 10 °C, điều chỉnh nhiệt độ sao cho nhiệt độ tăng 1 °C trong 1 min (trừ trường hợp có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng), hoặc cho nhiệt độ tăng 3 °C trong 1 min khi thử các chất không bền vì nhiệt. Khi nhiệt độ đạt thấp hơn điểm chảy dự kiến khoảng 5 °C, lấy nhiệt kế ra, nhanh chóng buộc ống mao quản có chế phẩm vào nhiệt kế, sao cho lớp chế phẩm ngang với phần giữa bầu thủy ngân của nhiệt kế. Đặt lại nhiệt kế vào bình. Nhiệt độ mà tại đó nhìn thấy cột chất thử xẹp xuống, so sánh với một điểm nào đó trên thành ống, được xác định là điểm bắt đầu nóng chảy và nhiệt độ mà tại đó chất thử trở thành chất lỏng hoàn toàn, được xác định là điểm cuối của sự chảy hay điểm chảy.

Hiệu chỉnh nhiệt độ quan sát được nếu nhiệt kế đo có sai số với nhiệt kế chuẩn và sự khác biệt nếu có giữa nhiệt độ của

đoạn cột thủy ngân ở ngoài chất lỏng trong điều kiện thí nghiệm và của đoạn cột thủy ngân ngoài chất lỏng trong điều kiện hiệu chuẩn. Nhiệt độ của đoạn cột thủy ngân ở ngoài chất lỏng được xác định bằng cách đặt bầu thủy ngân của nhiệt kế phụ ở điểm giữa của phần cột thủy ngân lộ ra ngoài chất lỏng của nhiệt kế chính.

Tính nhiệt độ đã hiệu chỉnh theo công thức sau:

$$T \text{ hiệu chỉnh} = T + 0,00016N (T_s - t)$$

Trong đó:

T là nhiệt độ đọc trên nhiệt kế chính;

T_s là nhiệt độ trung bình của đoạn cột thủy ngân ở ngoài chất lỏng của nhiệt kế chính trong điều kiện chuẩn hoá;

t là nhiệt độ của đoạn cột thủy ngân ở ngoài chất lỏng đọc trên nhiệt kế phụ tại điểm chảy;

N là số khoảng chia độ ($^{\circ}\text{C}$) của đoạn cột thủy ngân của nhiệt kế chính ở ngoài chất lỏng.

Phương pháp 2

(Áp dụng cho các chất không nghiền thành bột được như mỡ, sáp, acid béo, parafin rắn, lanolin và chất tương tự, không tan trong nước).

Dụng cụ

Dùng dụng cụ như phương pháp 1, riêng ống mao quản hơi hai đầu, dài 80 mm đến 100 mm, đường kính trong 0,8 mm đến 1,2 mm, thành dày 0,1 mm đến 0,3 mm.

Cách xác định

Cẩn thận làm chảy chất thử ở nhiệt độ thấp tối thiểu. Cắm ống mao quản vào chất thử sao cho lấy được một cột chất thử cao 10 mm không có bọt. Dùng khăn sạch lau sạch phía ngoài mao quản, để nguội ở 10°C hay thấp hơn trong 24 h, hoặc để tiếp xúc với nước đá ít nhất 2 h.

Đổ nước cất vào cốc thủy tinh đến chiều cao 6 cm. Treo nhiệt kế vào giá và nhúng vào chính giữa cốc nước. Đun nóng cốc nước đến nhiệt độ thấp hơn điểm chảy dự kiến 10°C , lấy nhiệt kế ra, nhanh chóng buộc mao quản vào nhiệt kế bằng phương tiện thích hợp sao cho cột chất thử ngang với phần giữa bầu thủy ngân của nhiệt kế, điều chỉnh nhiệt kế để đầu dưới của ống mao quản cách đáy cốc 1 cm. Điều chỉnh tốc độ gia nhiệt không quá 1°C trong một phút. Trong lúc đó luôn khuấy nước nhẹ nhàng và quan sát cột chất thử, khi cột chất thử bắt đầu dâng lên trong ống mao quản thì đọc nhiệt độ. Kết quả đọc giữa 2 lần đo liên tiếp không được chênh lệch nhau quá $0,5^{\circ}\text{C}$. Lấy kết quả trung bình. Nhiệt độ này được coi là điểm chảy và phải nằm trong khoảng nóng chảy quy định của chuyên luận.

Phương pháp 3

(Áp dụng cho chất rắn dễ nghiền nhỏ, giống như phương pháp 1).

Dụng cụ

Một khối kim loại (như đồng) không bị ăn mòn bởi chất thử nghiệm, khả năng truyền nhiệt tốt, bề mặt trên được

đánh bóng cẩn thận. Khối kim loại này được đun nóng toàn khối và đồng đều bằng một dụng cụ như đèn ga nhỏ điều chỉnh được hay dụng cụ đun nóng bằng điện có thể điều chỉnh chính xác. Khối kim loại có một khoang hình ống nằm song song, bên dưới và cách bề mặt đánh bóng khoảng 3 mm, có kích thước thích hợp để chứa được một nhiệt kế thủy ngân, đặt ở vị trí giống vị trí khi hiệu chuẩn. Dụng cụ được hiệu chuẩn bằng một chất chuẩn thích hợp đã ghi trong phương pháp 1.

Cách xác định

Đun nóng khối kim loại với một tốc độ thích hợp tới nhiệt độ dưới điểm nóng chảy dự kiến khoảng 10°C thì điều chỉnh nhiệt độ tăng $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tại những khoảng thời gian đều nhau, thả một vài hạt chất thử đã được làm khô bằng phương pháp thích hợp hay theo sự chỉ dẫn trong chuyên luận và nghiền thành bột mịn lên bề mặt khối kim loại gần vị trí của bầu thủy ngân của nhiệt kế, lau sạch bề mặt sau mỗi lần thử nghiệm. Ghi lại nhiệt độ mà tại đó chất thử tan chảy lần đầu tiên ngay khi nó chạm tới bề mặt kim loại (t_1) và ngừng đun ngay. Trong khi để nguội dần, lại thả một vài hạt chất thử trong khoảng thời gian đều đặn, lau sạch bề mặt sau mỗi lần thử. Ghi lại nhiệt độ mà tại đó chất thử ngừng tan chảy ngay khi tiếp xúc với bề mặt tấm kim loại (t_2). Điểm chảy tức thời được tính theo công thức:

$$(t_1 + t_2)/2$$

Phương pháp 4

Xác định điểm nhỏ giọt (áp dụng cho vaselin và những chất tương tự).

Điểm nhỏ giọt là nhiệt độ mà tại đó giọt đầu tiên của chất thử nóng chảy rơi xuống từ một cái chén nhỏ trong điều kiện xác định dưới đây:

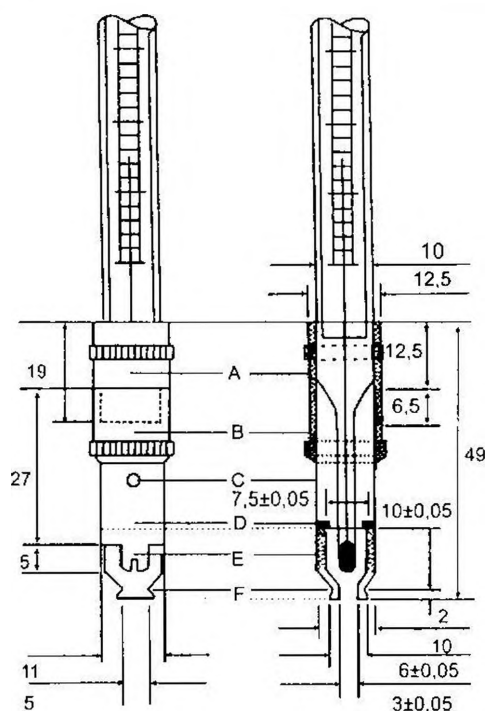
Dụng cụ (Hình 6.7)

Một ống kim loại (A) bao bọc nhiệt kế thủy ngân và được vặn vào một ống kim loại thứ hai (B), một chén nhỏ bằng kim loại (F) được gắn cố định vào phần dưới của ống (B) bằng hai cái đai xiết chặt (E), vị trí chính xác của chén được xác định bằng hai giá đỡ (D) dài 2 mm và cũng dùng để giữ cho nhiệt kế ở chính giữa. Có một lỗ (C) xuyên qua thành của ống kim loại thứ 2 (B), được dùng để cân bằng áp suất.

Bề mặt lỗ thoát ở đáy chén phải phẳng và vuông góc với thành trong của nó. Nhiệt kế có đường kính trong của bầu thủy ngân từ 3,3 mm đến 3,7 mm, dài 5,7 mm đến 6,3 mm, được chuẩn hoá từ 0°C đến 110°C chia vạch 1 mm tương ứng 1°C . Dụng cụ được đặt theo chiều dọc của một ống có kích thước khoảng $20 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$, được cố định bằng một cái nút và nhiệt kế xuyên qua nút theo một đường rãnh. Miệng lỗ thoát của chén cách đáy của ống khoảng 15 mm. Ống được nhúng vào một cái cốc vại có dung tích 1 L, chứa nước sao cho đáy của ống cách đáy của cốc khoảng 25 mm, mặt thoáng của nước bằng với đầu trên của ống kim loại thứ nhất (A). Một dụng cụ khuấy được dùng để giữ cho nhiệt độ của nước đồng nhất.

Cách xác định

Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận, đổ chất thử tới miệng chén mà không làm nóng chảy nó, dùng thìa xúc hóa chất để loại bỏ những phần dư ở miệng và đáy chén. Ấn chén vào vị trí của nó trong lớp vỏ kim loại (B) cho tới khi chạm tới giá đỡ, dùng thìa xúc bột chất thử do nhiệt kế đẩy ra. Đun nóng cốc nước, khi nhiệt độ đạt tới thấp hơn nhiệt độ nóng chảy hay nhỏ giọt khoảng 10 °C thì điều chỉnh tốc độ tăng nhiệt độ khoảng 1 °C/min và ghi nhiệt độ giọt chất lỏng đầu tiên rơi xuống. Tiến hành ít nhất 3 lần, mỗi lần thử với mẫu thử mới. Sự khác biệt giữa các lần đọc không quá 3 °C. Nhiệt độ trung bình của 3 lần xác định là điểm chảy hay điểm nhỏ giọt của mẫu thử.



Hình 6.7- Dụng cụ xác định điểm nhỏ giọt
(kích thước tính bằng mm)

6.8 XÁC ĐỊNH NHIỆT ĐỘ SÔI VÀ KHOẢNG CHUNG CẮT

Nhiệt độ sôi của một chất lỏng là nhiệt độ đã hiệu chỉnh, tại đó áp suất hơi của chất lỏng đạt tới 101,3 kPa.

Xác định nhiệt độ sôi**Dụng cụ** (Hình 6.8)

Bình chung cất: Bình chung cất đáy tròn, bằng thủy tinh chịu nhiệt có dung tích 50 ml đến 60 ml, cổ bình cao 10 cm đến 12 cm, đường kính trong của cổ bình từ 14 mm đến 16 mm, ở khoảng giữa chiều cao của cổ bình có một ống nhánh dài 10 cm đến 12 cm, đường kính trong 5 mm và tạo với phần dưới của cổ bình một góc 70° đến 75°.

Ống ngưng ruột thẳng: Một ống thủy tinh thẳng dài 55 cm đến 60 cm, phần được cung cấp nước lạnh dài khoảng

40 cm. Ở cuối ống ngưng lắp một ống nối cong để dẫn chất lỏng cất được vào bình hứng.

Bình hứng: Là một ống đồng thích hợp có dung tích 25 ml đến 50 ml, chia độ đến 0,5 ml.

Nguồn nhiệt có thể điều chỉnh được cường độ đốt nóng, có thể dùng bếp khí đốt, đèn cồn. Khi dùng bếp khí đốt hay đèn cồn phải dùng một lưới thép có phủ chất chịu nhiệt hình vuông, mỗi chiều dài 14 cm đến 16 cm, ở giữa có một lỗ tròn sao cho khi đặt bình cất vào, phần lọt xuống dưới lưới thép có phủ chất chịu nhiệt có dung tích 3 ml đến 4 ml. Nhiệt kế đã hiệu chuẩn chia độ đến 0,5 °C hoặc tới 0,2 °C. Lắp nhiệt kế ở đúng giữa cổ bình và để đáy của bầu thủy ngân ngang với mức thấp nhất của cổ bình.

Cách xác định

Cho vào bình cất 20 ml chất thử, thêm vào bình cất vài viên bi thủy tinh hay đá bọt. Đun nóng bình nhanh cho đến sôi. Đọc nhiệt độ khi giọt chất lỏng đầu tiên hứng được. Hiệu chỉnh nhiệt độ đọc được với áp suất khí quyển bằng công thức sau:

$$t_1 = t_2 + k(101,3 - b)$$

Trong đó:

t_1 là nhiệt độ đã được hiệu chỉnh;

t_2 là nhiệt độ đọc được ở áp suất b ;

b là áp suất không khí tại thời điểm thử nghiệm (tính theo kPa);

k là hệ số hiệu chỉnh có giá trị như ở bảng dưới đây:

Nhiệt độ sôi (°C)	Hệ số hiệu chỉnh
Dưới 100 °C	0,30
Trên 100 °C tới 140 °C	0,34
Trên 140 °C tới 190 °C	0,38
Trên 190 °C tới 240 °C	0,41
Trên 240 °C	0,45

Xác định khoảng chưng cất

Khoảng chưng cất của một chất lỏng là khoảng nhiệt độ được hiệu chỉnh ở áp suất 101,3 kPa, trong khoảng đó một chất lỏng hay một phần xác định chất lỏng chưng cất được trong điều kiện dưới đây:

Dụng cụ

Dụng cụ giống như dụng cụ xác định điểm sôi, chỉ khác là bình cất có dung tích 200 ml và nhiệt kế lắp sao cho đầu trên của bầu thủy ngân thấp hơn thành dưới của ống nhánh 5 mm. Nhiệt kế được chia vạch tới 0,2 °C và có khoảng thang đo được 50 °C. Trong khi chưng cất bình và cổ bình được bảo vệ để tránh gió lùa bằng một tấm màn chắn thích hợp. Hứng dịch cất vào một ống đồng 50 ml chia độ tới 1 ml. Làm lạnh ống ngưng bằng nước tuần hoàn đối với các chất chưng cất dưới 150 °C.

Cách xác định

Cho vào bình cất 50 ml chất lỏng thử nghiệm, thêm vài viên đá bọt. Đun bình sao cho chất lỏng sôi nhanh và ghi nhiệt độ tại đó giọt chất lỏng đầu tiên cất được nhỏ vào ống

đong. Điều chỉnh nguồn nhiệt để có tốc độ cất 2 ml/min đến 3 ml/min và ghi lại nhiệt độ mà tất cả chất thử hay một phần quy định chất thử ở 20 °C được chưng cất hết. Hiệu chỉnh nhiệt độ đọc được với áp suất khí quyển bằng công thức sau:

$$t_1 = t_2 + k (101,3 - b)$$

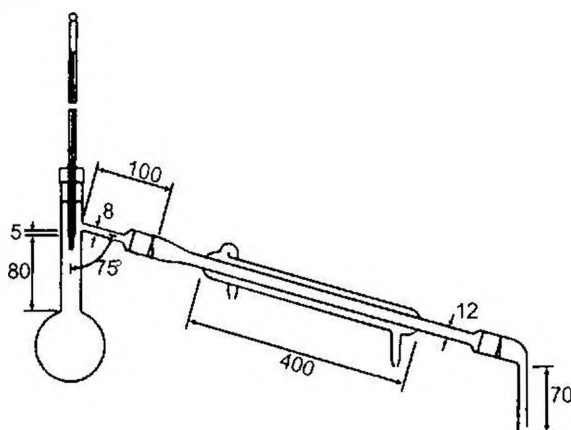
Trong đó:

t_1 là nhiệt độ đã được hiệu chỉnh;

t_2 là nhiệt độ đọc được ở áp suất b ;

b là áp suất không khí tại thời điểm thử nghiệm (tính theo kPa);

k là hệ số hiệu chỉnh ở bảng trong mục Xác định điểm sôi, nếu không có hệ số nào khác được quy định trong chuyên luận riêng.



Hình 6.8 - Dụng cụ xác định điểm sôi, khoảng chưng cất (kích thước tính bằng mm).

6.9 XÁC ĐỊNH ĐỘ THẨM THẤU

Xác định độ thẩm thấu là một phương pháp đo nồng độ thẩm thấu của dung dịch mẫu thử từ phép đo của độ hạ băng điểm.

Khi một dung dịch và một dung môi tinh khiết được ngăn cách nhau bởi một màng bán thấm, thì dung môi có thể đi qua tự do nhưng chất tan thì không thể, một phần của dung môi tinh khiết sẽ đi qua màng sang bên ngăn của dung dịch. Sự chênh lệch áp suất giữa hai ngăn đồng thời với việc di chuyển của dung môi qua màng được định nghĩa là áp suất thẩm thấu. Áp suất thẩm thấu là một đặc tính vật lý phụ thuộc vào tổng các dạng tiểu phân có mặt, bao gồm cả các phân tử trung hòa và các ion và không phụ thuộc vào bản chất chất tan. Các đặc tính của dung dịch như áp suất thẩm thấu, độ hạ băng điểm, độ tăng điểm sôi... không phụ thuộc vào bản chất của chất tan mà phụ thuộc vào tổng số của tất cả các dạng tiểu phân được gọi là các đặc tính phụ thuộc số lượng của dung dịch.

Áp suất thẩm thấu của một dung dịch polymer có thể đo trực tiếp như là sự chênh lệch áp suất thủy tĩnh giữa hai ngăn được cách nhau bởi một màng bán thấm, ví dụ màng

cellulose. Tuy nhiên, nó không áp dụng đối với dung dịch có chứa các phân tử nhỏ có thể đi qua màng bán thấm. Mặc dù áp suất thẩm thấu của một dung dịch như vậy không thể đo được trực tiếp, hướng và mức độ của việc di chuyển dung môi qua màng sinh học có thể được dự đoán trước từ tổng số tất cả các tiểu phân có mặt khi dung dịch được đặt dưới các điều kiện sinh lý. Các đặc tính phụ thuộc số lượng khác của dung dịch như độ hạ băng điểm, độ tăng điểm sôi, độ hạ áp suất hơi... có thể thu được trực tiếp bằng cách theo dõi sự thay đổi của nhiệt độ và áp suất.... Những đặc tính này phụ thuộc vào tổng các dạng ion và phân tử trung hòa trong dung dịch cũng như áp suất thẩm thấu và nồng độ các hạt phân tử được định nghĩa như là nồng độ thẩm thấu. Nồng độ thẩm thấu có thể được định nghĩa bằng hai cách, một là nồng độ dựa trên khối lượng (độ thẩm thấu ξ_m , mol/kg) và cách khác là nồng độ dựa trên thể tích (độ thẩm thấu ξ_v , mol/l). Trong thực tế, cách thứ hai thuận tiện hơn. Phương pháp đo độ hạ băng điểm thường được dùng để xác định nồng độ thẩm thấu, trừ khi có chỉ dẫn khác. Phương pháp dựa trên sự phụ thuộc tuyến tính của độ hạ băng điểm ΔT (°C) với độ thẩm thấu ξ_m (mol/kg) được biểu thị theo phương trình sau:

$$\Delta T = K \cdot \xi_m$$

Trong đó: K là hằng số của độ hạ băng điểm mol và bằng 1,86 °C kg/mol, khi dung môi là nước. Vì hằng số K được định nghĩa dựa trên nồng độ phân tử gam, nồng độ thẩm thấu mol có thể thu được từ phương trình trên. Trong khoảng nồng độ thẩm thấu loãng, độ thẩm thấu ξ_m (mol/kg) có thể coi bằng độ thẩm thấu ξ_v (mol/l). Bởi vậy, độ thẩm thấu thông thường (mol/l) và đơn vị osmol (Osm) được chấp nhận trong phương pháp thử này.

Một Osm có nghĩa là có một số lượng tiểu phân bằng với số Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ /mol) chứa trong 1 L dung dịch. Nồng độ thẩm thấu thường được biểu thị bằng đơn vị miliosmol (mOsm, mosmol/l).

Thiết bị

Thẩm thấu kế gồm một cốc đo chứa một thể tích xác định của dung dịch mẫu thử, một bộ phận giữ cốc đo, một bể làm lạnh có bộ phận điều chỉnh nhiệt độ và một nhiệt điện trở để phát hiện nhiệt độ.

Cách tiến hành

Một thể tích xác định của dung dịch thử được đưa vào cốc đo theo quy định đối với từng loại thiết bị.

Thiết bị trước tiên phải được hiệu chuẩn bằng phương pháp hiệu chuẩn hai điểm dùng các dung dịch chuẩn.

Để hiệu chuẩn, chọn hai dung dịch chuẩn khác nhau để nồng độ thẩm thấu của dung dịch thử nằm trong khoảng đó. Ngoài các dung dịch chuẩn được cho trong bảng dưới đây, nước có thể được dùng như là một dung dịch chuẩn (0 mOsm) để đo các dung dịch có độ thẩm thấu thấp (0 mOsm đến 100 mOsm). Sau khi rửa cốc đựng mẫu và nhiệt điện trở như chỉ dẫn trong từng thiết bị riêng, đo độ hạ băng điểm của dung dịch thử. Dùng phương trình đã nêu trên để tính độ thẩm thấu của dung dịch.

Trong trường hợp dung dịch có độ thẩm thấu lớn hơn 1000 mOsm, cần hòa loãng mẫu bằng cách thêm nước cất. Do độ thẩm thấu của dung dịch pha loãng như chỉ dẫn ở trên. Trong trường hợp này, cần chỉ rõ độ thẩm thấu đã được tính đối với mẫu thử là độ thẩm thấu biểu kiến thu được bằng phương pháp pha loãng. Khi áp dụng phương pháp pha loãng, độ pha loãng nên được chọn để độ thẩm thấu đo được gần với độ thẩm thấu của dung dịch nước muối sinh lý.

Trong trường hợp mẫu thử ở trạng thái rắn như là thuốc đông khô, chuẩn bị dung dịch thử bằng cách hòa tan chất rắn trong dung môi thích hợp như chỉ dẫn.

Sự thích hợp của thiết bị

Sau khi hiệu chuẩn thiết bị, phép thử độ thích hợp phải được làm bằng cách lặp lại phép đo độ thẩm thấu đối với một dung dịch chuẩn không ít hơn 6 lần. Trong khi làm phép thử này nên chọn độ thẩm thấu của dung dịch thử và dung dịch chuẩn gần giống nhau.

Trong phép thử này, độ lặp lại của giá trị đo và độ lệch trung bình nên nhỏ hơn 2,0 % và 3,0 % tương ứng.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn để hiệu chuẩn thẩm thấu kế

Cân chính xác một lượng natri clorid chuẩn (đã được nung trước ở 500 °C đến 650 °C trong 40 min đến 50 min và để nguội trong bình hút ẩm) theo chỉ dẫn trong Bảng 6.9 và hòa tan natri clorid trong chính xác 100 g nước để làm dung dịch chuẩn.

Bảng 6.9 - Lượng natri clorid để pha dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn để hiệu chuẩn thẩm thấu kế (mosmol/kg)	Lượng natri clorid (g)
100	0,309
200	0,626
300	0,946
400	1,270
500	1,593
700	2,238
1000	3,223

Tỷ số thẩm thấu

Trong phương pháp thử này tỷ số thẩm thấu được định nghĩa là tỷ số độ thẩm thấu của dung dịch thử đối với dung dịch natri clorid đẳng trương. Tỷ số có thể được dùng để đo độ đẳng trương của dung dịch thử. Vì độ thẩm thấu của dung dịch natri clorid đẳng trương (NaCl 0,900 g/100 ml) C_S (mOsm) được coi như là hằng số (286 mOsm), độ thẩm thấu của dung dịch thử là C_T (mOsm), tỷ số thẩm thấu được tính theo phương trình:

$$\text{Tỷ số thẩm thấu} = \frac{C_T}{C_S}$$

C_S : 286 mOsm

Khi phép đo được tiến hành bằng phương pháp pha loãng, vì mẫu thử có độ thẩm thấu lớn hơn 1000 mOsm, độ thẩm

thấu biểu kiến của dung dịch mẫu C_T có thể được tính theo phương trình:

$$n \times C'_T = C_T$$

Trong đó:

n là độ pha loãng;

C'_T là độ thẩm thấu đo được của dung dịch loãng.

Trong phép tính này, đã chấp nhận giả thiết có sự tương quan tuyến tính giữa độ thẩm thấu và nồng độ dung dịch. Bởi vậy, khi có bước pha loãng, cần phải chỉ rõ độ pha loãng là n lần.

6.10 XÁC ĐỊNH ĐIỆN DẪN SUẤT

Điện dẫn suất (còn gọi là Độ dẫn điện riêng) là giá trị nghịch đảo của điện trở suất.

Một dây dẫn có độ dài L (cm) và thiết diện S (cm²) thì điện trở của nó được tính theo công thức:

$$R = \rho \frac{L}{S}$$

Trong đó:

ρ là điện trở suất.

Đơn vị của điện trở R là ôhm (Ω), của điện trở suất ρ là ôhm·cm ($\Omega\cdot\text{cm}$).

Đơn vị của độ dẫn điện là simen (S). Simen là nghịch đảo của ôhm: $1\text{ S} = 1/\Omega$.

Điện dẫn suất là nghịch đảo của ρ , có thứ nguyên là $\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ hoặc S/cm ($\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Điện dẫn suất (κ) của một dung dịch được biểu thị bằng độ dẫn điện của một lớp dung dịch giữa 2 mặt đối nhau của một khối lập phương có cạnh 1 cm.

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Ngoài đơn vị simen trên centimét, $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, điện dẫn suất κ còn được biểu thị bằng microsimen trên centimét, $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Nếu không có chỉ dẫn riêng, nhiệt độ để xác định κ là 25 °C. Thiết bị và cách tiến hành mô tả dưới đây được áp dụng để đo các mẫu có điện dẫn suất lớn hơn $10\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Việc đo điện dẫn suất của nước được đề cập trong các chuyên luận tương ứng.

Thiết bị

Thiết bị đo (là độ dẫn điện kế hay điện trở kế) được dùng để đo điện trở của cột chất lỏng giữa các điện cực của tế bào đo được nhúng trong chất lỏng cần đo. Thiết bị này dùng dòng điện xoay chiều để tránh ảnh hưởng của sự phân cực tại điện cực và được trang bị một đầu dò nhiệt độ và bộ phận bù chính nhiệt độ. Tế bào đo gồm hai điện cực platin song song được phủ lớp bột đen platin, cách nhau một khoảng cách L ; mỗi điện cực có diện tích bề mặt S . Cả hai điện cực được bảo vệ bằng một ống thủy tinh.

Một số loại tế bào đo khác với mô tả trên cũng có thể được sử dụng.

Hằng số C của tế bào đo được biểu thị bằng cm^{-1} theo phương trình:

$$C = \alpha \frac{L}{S}$$

Trong đó:

α là hệ số không có thứ nguyên, đặc trưng cho thiết kế của tế bào.

Thuốc thử dùng để xác định hằng số tế bào

Chuẩn bị 3 dung dịch chuẩn kali clorid có chứa lần lượt 0,7455 g, 0,0746 g và 0,0149 g kali clorid (TT) trong 1000 g dung dịch, dùng nước không có carbon dioxyd (TT) được điều chế từ nước cất có điện dẫn suất không quá $2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Điện dẫn suất và điện trở suất của 3 dung dịch này ở 20°C cho trong Bảng 6.10.

Bảng 6.10 - Điện dẫn suất và điện trở suất của các dung dịch kali clorid

Nồng độ (g/1000 g)	Điện dẫn suất ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Điện trở suất ($\Omega\cdot\text{cm}$)
0,7455	1330	752
0,0746	133,0	7519
0,0149	26,6	37594

Nếu điện dẫn suất được xác định ở nhiệt độ khác 20°C , dùng phương trình sau để hiệu chỉnh điện dẫn suất của các dung dịch kali clorid cho trong bảng 6.10. Phương trình này chỉ có giá trị khi nhiệt độ trong khoảng 15°C đến 25°C

$$\kappa_T = \kappa_{20} [1 + 0,021(T - 20)]$$

Trong đó:

T là nhiệt độ quy định trong chuyên luận;

κ_T là điện dẫn suất của kali clorid ở $T^\circ\text{C}$;

κ_{20} là điện dẫn suất của kali clorid ở 20°C .

Cũng có thể sử dụng những dung dịch chuẩn khác được xác nhận cung cấp trên thị trường, nhất là đối với các tế bào đo có hằng số 0,1 cm^{-1} .

Cách tiến hành

Xác định hằng số tế bào

Chọn một tế bào đo thích hợp với tính chất và độ dẫn điện của dung dịch thử.

Điện dẫn suất của dung dịch cần đo càng cao thì cần chọn tế bào đo có hằng số C càng cao (có p thấp) để giá trị R đo được càng lớn càng tốt đối với máy đo. Các tế bào đo thường dùng có hằng số theo thứ tự là 0,1 cm^{-1} ; 1 cm^{-1} và 10 cm^{-1} .

Dùng một dung dịch chuẩn, ví dụ, dung dịch kali clorid nồng độ thích hợp, để xác định hằng số tế bào. Nên chọn dung dịch chuẩn có điện dẫn suất gần với giá trị điện dẫn suất dự kiến của dung dịch cần đo. Rửa tế bào vài lần với nước cất và ít nhất hai lần với dung dịch chuẩn kali clorid trên. Đo điện trở của tế bào với dung dịch kali clorid ở nhiệt độ $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, hoặc ở nhiệt độ quy định trong chuyên luận. Hằng số C (cm^{-1}) của tế bào đo được tính bởi công thức sau:

$$C = R_{\text{KCl}} \times \kappa_{\text{KCl}}$$

Trong đó:

R_{KCl} là điện trở đo được của dung dịch chuẩn kali clorid tính bằng mega ôm (M Ω);

κ_{KCl} là điện dẫn suất của dung dịch chuẩn kali clorid tính bằng $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;

Hằng số C đo được của tế bào phải nằm trong khoảng $\pm 5\%$ của giá trị đã cho.

Xác định điện dẫn suất của dung dịch thử

Sau khi hiệu chuẩn máy với một trong số các dung dịch chuẩn, rửa tế bào đo vài lần với nước cất và ít nhất hai lần với dung dịch mẫu thử ở $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, hoặc ở nhiệt độ quy định trong chuyên luận. Tiến hành tiếp theo các phép đo điện trở như quy định trong chuyên luận; từ điện trở đo được và hằng số tế bào xác định được ở trên, tính ra điện dẫn suất của dung dịch mẫu thử.

6.11 XÁC ĐỊNH KHỐI LƯỢNG RIÊNG CỦA CHẤT RẮN

Khối lượng riêng có liên quan đến sự phân bố không gian của chất trong một nguyên liệu.

Khối lượng riêng của chất rắn thường được biểu thị bằng số g/cm^3 , khác với chất lỏng, khối lượng riêng thường được biểu thị bằng g/ml ở một nhiệt độ quy định.

Khối lượng riêng của một tiểu phân chất rắn có thể có các giá trị khác nhau phụ thuộc vào phương pháp đo thể tích tiểu phân đó. Cần phân biệt ba loại khối lượng riêng khác nhau:

Khối lượng riêng thực của một chất là khối lượng trung bình tính trên một đơn vị thể tích, không tính đến tất cả các khoảng trống không có vai trò cơ bản trong việc sắp xếp các phân tử. Đó là một đặc tính bên trong của chất, bởi vậy nó không phụ thuộc vào phương pháp xác định. Khối lượng riêng thực của một tinh thể hoàn chỉnh có thể được xác định từ kích thước và cấu trúc của đơn vị cấu tạo.

Khối lượng riêng đo bằng picnomet được đo bằng picnomet sử dụng khí. Đó là một phép đo khối lượng riêng thuận tiện đối với các bột dược phẩm. Trong một picnomet khí, thể tích bị chiếm chỗ bởi một khối lượng bột đã biết được xác định bằng cách đo thể tích của khí được thay thế vào chỗ của bột. Tỷ số giữa khối lượng và thể tích là khối lượng riêng đo bằng picnomet.

Khối lượng riêng đo bằng picnomet bằng khối lượng riêng thực trừ khi nguyên liệu có chứa những khoảng trống mà chất khí không thể thâm nhập vào được hoặc các lỗ hổng bị bịt kín mà khí dùng trong phương pháp này không thể lọt vào được.

Khối lượng riêng hạt tính cả những lỗ hổng hờ nhỏ hơn một kích cỡ giới hạn vào thể tích của tiểu phân. Giới hạn kích cỡ phụ thuộc vào phương pháp đo. Một kỹ thuật đo chung là đo độ xốp bằng thủy ngân, tại đó kích cỡ lỗ giới hạn phụ thuộc vào áp suất khuếch tán tối đa. Vì thể tích lỗ hổng được tính thêm vào, nên khối lượng riêng hạt không bao giờ lớn hơn khối lượng riêng thực.

Một khái niệm có liên quan là *khối lượng riêng khí động lực*, đó là khối lượng riêng của tiểu phân với một thể tích được xác định bằng sự bao bọc tiểu phân bằng khí động lực trong một dòng chảy. Cả hai loại lỗ hồng kín và hở đều được tính đến nhưng các lỗ hở được làm đầy bằng chất lỏng tràn vào. Bởi vậy, khối lượng riêng khí động lực phụ thuộc vào khối lượng riêng của chất lỏng dùng trong phép thử nếu tiểu phân là xốp.

Tóm lại, khối lượng riêng đo bằng picnomet khí và khối lượng riêng thực đều chỉ khối lượng riêng, nếu cần có thể phân biệt dựa vào phương pháp đo.

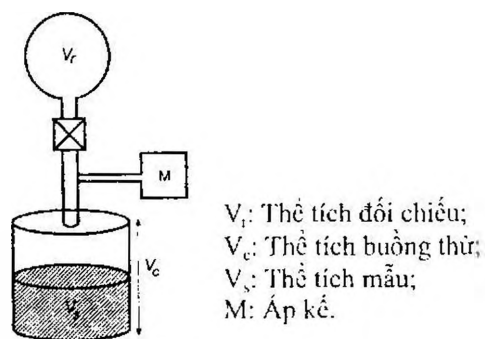
Khối lượng riêng của một nguyên liệu phụ thuộc vào trạng thái tập hợp phân tử. Đối với chất khí và chất lỏng, khối lượng riêng chỉ phụ thuộc vào nhiệt độ và áp suất. Đối với chất rắn, khối lượng riêng sẽ rất khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc kết tinh và độ kết tinh.

Nếu chất rắn ở thể vô định hình, khối lượng riêng của nó có thể phụ thuộc vào quá trình tinh chế và xử lý. Bởi vậy, không giống như chất lỏng, khối lượng riêng của hai chất rắn tương đương về mặt hóa học có thể khác nhau và sự khác nhau này phản ánh sự không giống nhau về cấu trúc trạng thái rắn. Khối lượng riêng của các hạt thành phần là một đặc tính lý học quan trọng của bột dược phẩm.

Ngoài các định nghĩa trên về khối lượng riêng của tiểu phân, còn có *khối lượng riêng toàn khối* bao gồm cả thể tích trống giữa các hạt được tạo thành trong khối bột. Do đó, khối lượng riêng toàn khối phụ thuộc vào cả hai: Khối lượng riêng của các tiểu phân bột và sự sắp xếp của các tiểu phân bột.

Đo khối lượng riêng bằng picnomet khí

Đo bằng picnomet khí là một phương pháp thuận tiện và thích hợp để xác định khối lượng riêng của các tiểu phân bột. Một loại picnomet khí đơn giản được mô tả như trong Hình 6.11.



Hình 6.11 - Sơ đồ picnomet khí

Mẫu thử có khối lượng w và thể tích V_s được đặt trong một buồng thử kín có thể tích của buồng rỗng là V_c . Áp suất đối chiếu của hệ thống là P_i được xác định bằng áp kế khi mở van nối thể tích đối chiếu với buồng thử. Sau đó van được đóng để tách riêng thể tích đối chiếu V_r khỏi buồng thử. Buồng thử được nén với một áp suất ban đầu P_i . Sau

đó van lại được mở để nối thể tích đối chiếu V_r với buồng thử và áp suất cuối cùng sẽ giảm xuống còn P_f . Thể tích của mẫu thử V_s được tính theo công thức:

$$V_s = V_c - \frac{V_r}{\frac{P_i - P_f}{P_f - P_i} - 1} \quad (1)$$

Khối lượng riêng ρ được tính theo phương trình:

$$\rho = \frac{w}{V_s} \quad (2)$$

Các chi tiết thiết kế thiết bị có thể khác nhau, nhưng tất cả các picnomet khí đều dựa trên việc đo sự thay đổi áp suất khi một thể tích đối chiếu được thêm vào hoặc giảm đi ở buồng thử.

Khối lượng riêng đo được là khối lượng riêng trung bình của các tiểu phân bột. Kết quả đo khối lượng riêng này sẽ mắc sai số nếu chất khí trong phép thử bị hấp phụ vào bột hoặc có các tạp chất bay hơi thoát ra ngoài trong quá trình đo. Sự hấp phụ chất khí có thể loại bỏ được bằng cách chọn loại khí thử thích hợp. Khí heli nói chung hay được chọn cho phép đo này. Các tạp chất bay hơi có trong bột có thể được loại ra khỏi bột bằng cách dùng khí heli áp suất không đổi trước khi đo. Đôi khi bột có thể được khử khí dưới chân không.

Hai lần đọc kết quả liên tiếp của thể tích mẫu thử phải nằm trong khoảng 0,2 % nếu các chất lạ bay hơi không có ảnh hưởng đến phép đo. Vì các chất bay hơi có thể thoát ra trong lúc đo, nên khối lượng của mẫu thường cân sau khi đo thể tích bằng picnomet.

Cách đo

Phải đảm bảo rằng thể tích đối chiếu và thể tích hiệu chuẩn dùng cho picnomet khí đã được xác định bằng một quy trình thích hợp. Khí dùng trong phép thử là heli trừ khi một loại khí khác được quy định trong chuyên luận riêng. Nhiệt độ picnomet khí nên duy trì trong khoảng 15 °C và 30 °C và không nên thay đổi quá 2 °C trong cả quá trình đo.

Cho mẫu thử đã được chuẩn bị như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng vào buồng đo. Dùng một lượng bột như hướng dẫn đối với picnomet. Đậy kín buồng thử, đẩy qua hệ thống picnomet dòng khí thử như trong hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu mẫu phải khử khí dưới chân không, làm như quy định trong chuyên luận riêng và hướng dẫn sử dụng của picnomet.

Lập lại phép đo trên cùng mẫu bột cho đến khi các kết quả đo liên tiếp của thể tích mẫu V_s khớp trong khoảng 0,2 %. Cân lượng bột có trong cốc. Tính khối lượng riêng ρ của mẫu theo phương trình (2) ở trên.

6.12 PHÂN TÍCH NHIỆT

Phân tích nhiệt là một nhóm các kỹ thuật xác định những thay đổi tính chất vật lý của một chất theo sự thay đổi nhiệt độ. Các kỹ thuật thông dụng nhất đều áp dụng phương

pháp đo sự biến thiên khối lượng hoặc biến thiên năng lượng của mẫu thử.

Phép đo nhiệt trọng lượng (nhiệt khối)

Phép đo nhiệt trọng lượng (TGA) là kỹ thuật đo khối lượng của một chất khi thay đổi nhiệt độ theo một chương trình nhiệt độ được kiểm soát.

Thiết bị

Bộ phận chính của một cân nhiệt gồm một thiết bị làm nóng hoặc làm lạnh theo chương trình nhiệt độ đặt trước, một giá giữ mẫu trong môi trường không khí được kiểm soát, một cân điện tử và một máy ghi. Trong một số trường hợp, máy còn có thể gắn với một thiết bị cho phép phân tích các sản phẩm bay hơi.

Kiểm tra nhiệt độ

Kiểm tra thang nhiệt độ bằng một chất thích hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hiệu chuẩn cân điện

Đặt một lượng thích hợp chất đối chiếu phù hợp có chứng chỉ vào giá giữ mẫu và xác định khối lượng. Đặt tốc độ tăng nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất và bắt đầu tăng nhiệt độ. Ghi lại biểu đồ nhiệt trọng lượng với nhiệt độ hoặc thời gian trên trục hoành, tăng từ trái qua phải và khối lượng trên trục tung, tăng từ dưới lên trên. Dùng tăng nhiệt độ ở khoảng 230 °C. Đo trên đồ thị sự chênh lệch giữa các đường ổn định khối lượng - nhiệt độ hoặc đường ổn định khối lượng - thời gian ở giai đoạn đầu và giai đoạn cuối, tương ứng với sự mất khối lượng. Giá trị khối lượng mất đi của chất đối chiếu được ghi trên nhãn.

Tiến hành

Tiến hành quá trình trên đối với chất khảo sát, áp dụng các điều kiện được ghi trong chuyên luận. Tính khối lượng mất đi từ sự chênh lệch đo được trên đồ thị, biểu thị ra phần trăm theo khối lượng.

Nếu sử dụng máy đều đặn, phải định kỳ kiểm tra nhiệt độ và hiệu chuẩn. Nếu không dùng máy thường xuyên, kiểm tra nhiệt độ và hiệu chuẩn trước mỗi lần đo.

Vì yếu tố không khí môi trường ảnh hưởng nhiều đến kết quả đo nên các thông số như áp suất hoặc tốc độ, thành phần khí cần được ghi lại mỗi khi đo.

Phép đo nhiệt lượng quét vi sai

Đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) là một kỹ thuật cho phép nhận biết những hiện tượng năng lượng xảy ra trong quá trình làm nóng hoặc làm lạnh của một chất (hoặc hỗn hợp nhiều chất) và xác định biến thiên enthalpy, nhiệt dung riêng và nhiệt độ ở đó xuất hiện các hiện tượng này.

Kỹ thuật được dùng để xác định chênh lệch tốc độ nhiệt giải phóng hoặc hấp thu bởi chất khảo sát so sánh với mẫu đối chiếu theo sự thay đổi của nhiệt độ. Có hai kiểu thiết bị DSC. Kiểu thứ nhất áp dụng kỹ thuật bù năng lượng để giữ chênh lệch nhiệt độ giữa mẫu thử và mẫu đối chiếu bằng không. Kiểu thứ hai giữ tốc độ tăng nhiệt đều đặn

và phát hiện sự chênh lệch nhiệt độ giữa mẫu thử và mẫu đối chiếu.

Thiết bị

Thiết bị bù năng lượng DSC gồm một lò nhiệt có giá giữ mẫu hai ngăn: Ngăn để mẫu thử và ngăn để mẫu đối chiếu. Thiết bị đo dòng nhiệt DSC gồm một lò nhiệt có một ngăn để đặt chén đựng mẫu thử và chén đựng mẫu đối chiếu. Một thiết bị đặt chương trình nhiệt độ, một detector nhiệt và một hệ thống ghi nối với máy tính. Các phép đo được thực hiện trong điều kiện không khí môi trường được kiểm soát.

Hiệu chuẩn thiết bị

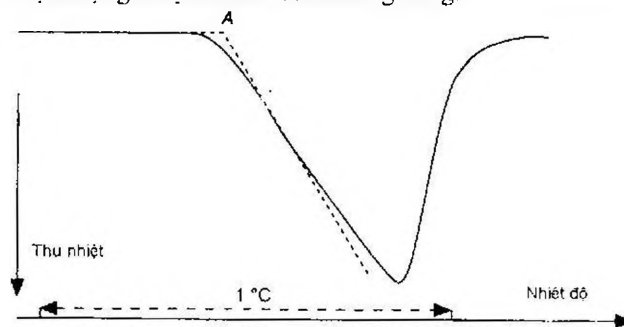
Dùng indii có mức tinh khiết cao hoặc vật liệu thích hợp có chứng chỉ về hiệu chuẩn nhiệt độ và biến thiên enthalpy theo hướng dẫn của nhà sản xuất, có thể dùng kết hợp hai kim loại indii và kẽm để kiểm tra độ tuyến tính.

Tiến hành

Cân một lượng thích hợp chất khảo sát vào một dụng cụ chịu nhiệt phù hợp. Đặt vào ngăn giữ mẫu. Đặt nhiệt độ đầu, nhiệt độ kết thúc và tốc độ tăng nhiệt theo các điều kiện được ghi trong chuyên luận riêng.

Bắt đầu phép phân tích và ghi biểu đồ phân tích nhiệt vi sai với nhiệt độ hoặc thời gian trên trục hoành (giá trị tăng từ trái qua phải) và biến thiên năng lượng trên trục tung (cho biết thay đổi thu nhiệt hay tỏa nhiệt).

Hiện tượng nhiệt xuất hiện ở nhiệt độ tương ứng với giao điểm (A) của đường nền kéo dài và tiếp tuyến tại điểm dốc nhất (điểm uốn) của đường cong (Hình 6.12.1). Kết thúc hiện tượng nhiệt là đỉnh của đường cong.



Hình 6.12.1 - Biểu đồ nhiệt

Enthalpy của hiện tượng tỷ lệ với diện tích dưới đường cong giới hạn bởi đường nền.

Hệ số tỷ lệ được xác định từ phép đo nhiệt nóng chảy của một chất đã biết (ví dụ indii) trong cùng điều kiện đo.

Mỗi biểu đồ nhiệt có thể kèm theo những thông số sau đây: Các điều kiện áp dụng, ghi chép của lần hiệu chuẩn cuối cùng, lượng mẫu, định tính (bao gồm tính chất nhiệt), bao bì, môi trường không khí (thành phần tính chất, tốc độ dòng, áp suất), chiều và tốc độ thay đổi nhiệt độ, độ nhạy của máy đo và máy ghi.

Áp dụng

Khảo sát các hiện tượng chuyển pha

Xác định biến thiên nhiệt độ, nhiệt dung và enthalpy của các quá trình chuyển pha xảy ra với một chất theo sự biến đổi của nhiệt độ như sau:

Chuyển pha rắn - rắn	biến đổi thù hình - đa hình tạo thành thủy tinh loại dung môi biến đổi vô định hình - kết tinh
Chuyển pha rắn - lỏng	nóng chảy
Chuyển pha rắn - khí	thăng hoa
Chuyển pha lỏng - rắn	đông đặc kết tinh lại
Chuyển pha lỏng - khí	bay hơi

Biến đổi thành phần hóa học

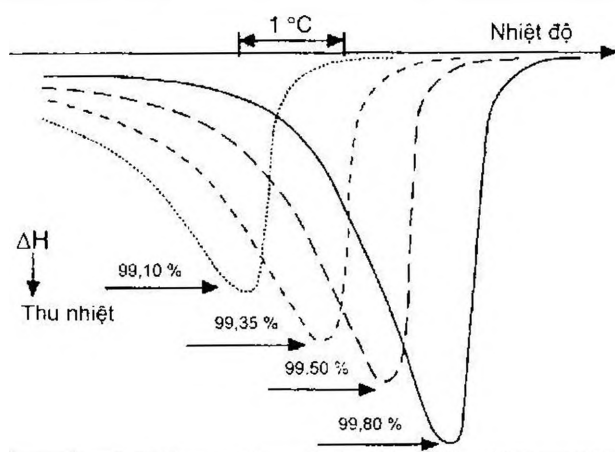
Đo nhiệt lượng hoặc nhiệt độ của phản ứng trong các điều kiện thực nghiệm nhất định, từ đó xác định động học của phản ứng phân hủy hoặc quá trình loại dung môi.

Áp dụng đối với biểu đồ pha

Thiết lập biểu đồ pha đối với một hỗn hợp rắn. Việc thiết lập này có thể là một bước quan trọng trong tiến trình công thức hóa sơ bộ và tối ưu hóa quá trình đông khô.

Xác định độ tinh khiết

Việc đo nhiệt nóng chảy và điểm chảy bằng DSC cho phép xác định hàm lượng tạp chất của một chất chỉ bằng một biểu đồ nhiệt đơn lẻ, với một vài miligam mẫu và không cần thiết phải lập lại phép đo chính xác của nhiệt độ thực. Theo lý thuyết, điểm chảy của một chất tinh khiết, kết tinh hoàn toàn ở áp suất hằng định có nhiệt nóng chảy đặc trưng ΔH_f dao động trong một khoảng rất hẹp, tương ứng với điểm chảy T_0 . Sự dãn rộng khoảng này là một dấu hiệu khá nhạy về sự có mặt của các tạp chất. Do đó, các mẫu của cùng một chất, với lượng tạp chất thay đổi vài phần nghìn, cho những biểu đồ nhiệt khác nhau rõ rệt (Hình 6.12.2).



Hình 6.12.2 - Biểu đồ nhiệt biểu thị mức độ tinh khiết

Việc xác định mức độ tinh khiết mol bằng DSC dựa trên việc sử dụng phép tính gần đúng dạng tích phân của phương trình Van't Hoff áp dụng cho nồng độ (không phải hoạt độ) trong hệ 2 thành phần

$$[\ln(1 - x_2) = -x_2 \text{ và } T \times T_0 = T_0^2]$$

$$T = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \times x_2 \quad (1)$$

Trong đó:

x_2 là phân số mol của tạp chất, nghĩa là số mol tạp chất chia cho tổng số mol trong pha lỏng ở nhiệt độ (kelvin);

T_0 là điểm chảy của chất tinh khiết hóa học, đơn vị kelvin;

ΔH_f là nhiệt nóng chảy mol của chất khảo sát, đơn vị Jun.mol⁻¹;

R là hằng số khí lý tưởng, đơn vị Jun.kelvin⁻¹.mol⁻¹.

Từ đây, việc xác định độ tinh khiết bằng DSC giới hạn trong việc xác định các tạp chất tạo thành hỗn hợp eutectic với thành phần chính và biểu thị ra phân số mol ít hơn 2 % trong chất cần khảo sát.

Phương pháp này không áp dụng đối với:

Các chất vô định hình;

Các chất solvat hóa và đa hình không bền trong khoảng nhiệt độ khảo sát;

Các tạp chất tạo thành các dung dịch rắn với thành phần chính;

Các tạp chất không tan trong pha lỏng hoặc trong quá trình tan chảy của thành phần chính.

Trong quá trình làm nóng chất khảo sát, tạp chất chảy hoàn toàn ở nhiệt độ eutectic của hỗn hợp. Trên nhiệt độ này, pha rắn chỉ chứa chất tinh khiết. Khi nhiệt độ tăng dần từ nhiệt độ eutectic đến điểm chảy của chất tinh khiết, phân số mol của tạp chất trong chất lỏng giảm đều đặn bởi vì lượng chất tinh khiết chảy lỏng tăng dần. Ở tất cả mọi nhiệt độ trên điểm eutectic:

$$x_2 = \frac{1}{F} \times x_2^* \quad (2)$$

Trong đó:

F là phần nóng chảy của mẫu phân tích,

x_2^* là phân số mol của tạp chất trong mẫu phân tích

Khi mẫu chảy hoàn toàn, $F = 1$ và $x_2 = x_2^*$.

Phương trình (2) kết hợp với phương trình (1) thu được:

$$T = T_0 - \frac{x_2^* RT_0^2}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

Giá trị nhiệt nóng chảy thu được bằng cách lấy tích phân pic nóng chảy.

Điểm chảy T_0 của chất tinh khiết được ngoại suy từ đồ thị của $1/F$ theo nhiệt độ biểu thị bằng kelvin. Độ dốc α của đường cong, thu được bằng phương pháp tuyến tính hóa nếu cần thiết, tương ứng với $\frac{x_2^* RT_0^2}{\Delta H_f}$ cho phép tính được

x_2^* . Lấy giá trị x_2^* nhân với 100 cho tỷ lệ phần trăm (tính theo mol) của tổng tạp chất eutectic.

Kính hiển vi nhiệt

Có thể quan sát quá trình chuyển pha bằng kính hiển vi nhiệt. Phương pháp này cho phép khảo sát mẫu dưới kính hiển vi phân cực theo sự thay đổi nhiệt độ được chương trình hóa.

Những khảo sát thu được dưới kính hiển vi nhiệt cho phép xác định rõ bản chất của các hiện tượng được phát hiện bằng phương pháp nhiệt trọng lượng và phân tích nhiệt vi sai.

Thiết bị

Thiết bị bao gồm kính hiển vi gắn với nguồn sáng phân cực, một đĩa nóng, một thiết bị điều khiển chương trình nhiệt độ làm nóng hoặc làm lạnh, một hệ thống máy ghi nhiệt độ chuyển pha. Có thể có thêm máy quay và ghi video.

6.13 XÁC ĐỊNH KHỐI LƯỢNG RIÊNG THÔ VÀ KHỐI LƯỢNG RIÊNG GỖ CỦA BỘT**Khối lượng riêng thô**

Khối lượng riêng thô của bột là tỷ số giữa khối lượng của bột chưa bị dòn nén so với thể tích của nó, bao gồm cả thể tích khoảng trống giữa các hạt bột. Như vậy khối lượng riêng thô phụ thuộc vào khối lượng riêng của các hạt bột và sự sắp xếp không gian giữa các hạt trong khối bột. Mặc dù đơn vị khối lượng riêng là kg/m^3 nhưng khối lượng riêng thô được biểu thị là g/ml vì phép đo thể tích sử dụng ống đong, cũng có thể biểu thị bằng đơn vị g/cm^3 .

Tính chất thô của bột tùy thuộc vào quá trình điều chế, xử lý và bảo quản bột. Các hạt bột có thể bị nén và có khối lượng riêng thô dao động trong một khoảng nhất định, ngoài ra một sự xáo trộn nhỏ trong khối bột cũng có thể làm thay đổi giá trị này. Vì vậy khối lượng riêng thô thường rất khó xác định với độ lặp lại cao và khi báo cáo kết quả nhất thiết phải chỉ rõ cách xác định.

Khối lượng riêng thô của bột có thể được xác định bằng cách đo thể tích của một khối lượng bột biết trước, được rây qua rây và chuyển vào một ống đong chia vạch (Phương pháp 1) hoặc xác định khối lượng bột đã biết thể tích trong một cốc hứng của thể tích kế (Phương pháp 2) hoặc trong một cốc đo (Phương pháp 3).

Phương pháp 1 và 3 là hai phương pháp hay được áp dụng.

Phương pháp 1: Đo thể tích bằng ống đong

Bột cần xác định khối lượng riêng thô được rây qua rây có kích thước lỗ rây không nhỏ hơn 1,0 mm. Nếu cần có thể làm vỡ các hạt bột kết dính một cách nhẹ nhàng sao cho không ảnh hưởng đến tính chất vốn có của bột. Cân khoảng 100 g bột đã rây (m) chính xác tới 0,1 %, chuyển bột một cách nhẹ nhàng, không được dòn nén vào một ống đong khô, có chia vạch dung tích 250 ml và có thể đọc chính xác đến 2 ml. Cần thận san bằng mặt bột, không nén, đọc thể tích biểu kiến (V_0) tại vạch chia độ gần nhất trên ống đong. Tính khối lượng riêng thô ra g/ml áp dụng công

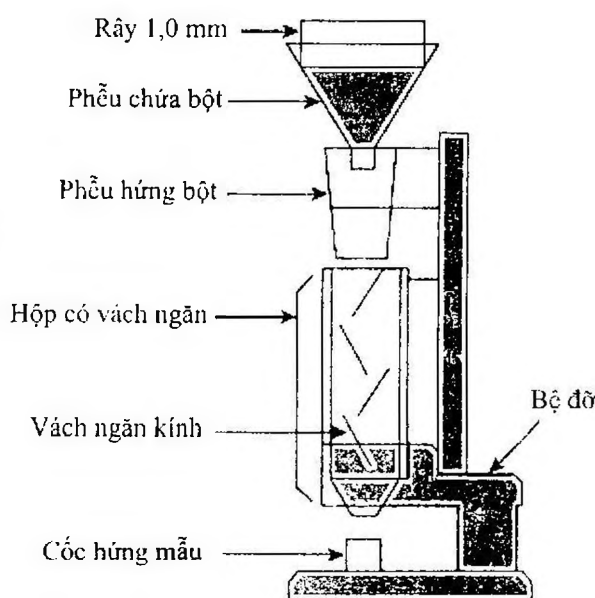
thức m/V_0 . Thông thường, khi xác định tính chất này cần phải lặp lại phép đo nhiều lần.

Nếu khối lượng riêng của bột quá thấp hoặc quá cao, tức là thể tích đo nhỏ hơn 150 ml hoặc lớn hơn 250 ml, thì không thể dùng 100 g mẫu thử. Trong trường hợp này lượng mẫu thử cần lấy sao cho thể tích biểu kiến nằm trong khoảng 150 ml đến 250 ml (thể tích biểu kiến không ít hơn 60 % thể tích của ống đong). Khối lượng mẫu thử cần được ghi kèm với kết quả.

Đối với mẫu thử có thể tích biểu kiến nằm trong khoảng từ 50 ml đến 100 ml có thể dùng ống đong dung tích 100 ml và có thể đọc chính xác đến 1 ml. Thể tích của ống đong cần được ghi rõ khi báo cáo kết quả.

Phương pháp 2: Đo bằng thể tích kế

Thiết bị (Hình 6.13.1): Bao gồm một phễu đặt ở trên, gắn với một rây có kích thước lỗ rây 1,0 mm. Phễu được đặt trên một hộp có 4 vách ngăn bằng kính để bột trượt và chảy qua đó. Đáy hộp có hình phễu giúp gom bột và chuyển bột chảy vào một cốc hứng được gắn ngay phía dưới. Cốc đo có thể hình trụ, thể tích ($25,00 \pm 0,05$) ml và đường kính trong ($30,00 \pm 2,00$) mm hoặc hình khối vuông, thể tích ($16,39 \pm 0,20$) ml và kích thước cạnh trong ($25,4 \pm 0,076$) mm. **Cách tiến hành:** Cho một lượng dư bột chảy qua thiết bị vào một cốc hứng đến khi bột tràn ra ngoài. Dùng ít nhất 25 cm^3 bột cho cốc hình vuông và 35 cm^3 bột cho cốc hình trụ. Cần thận gạt lượng bột dư trên mặt cốc bằng một lưỡi gạt đặt vuông góc và tiếp xúc với mặt trên của cốc. Chú ý không làm nén bột thay làm mất bột trong cốc đo. Gạt bỏ bột dính bên ngoài cốc và xác định khối lượng (m) chính xác tới 0,1 %. Tính khối lượng riêng thô ra g/ml áp dụng công thức m/V_0 (trong đó V_0 là thể tích của cốc). Thực hiện trên 3 mẫu thử khác nhau và tính kết quả trung bình.



Hình 6.13.1 - Thể tích kế

Các phương pháp đo chỉ số nén của bột

Vì các tương tác giữa các hạt bột ảnh hưởng đến khối lượng riêng thô của bột cũng là những tương tác ảnh hưởng đến tính chất chảy của bột, nên việc so sánh khối lượng riêng thô và khối lượng riêng gỗ có thể cung cấp thước đo mức độ quan trọng tương đối của các tương tác này đối với một loại bột. Phép so sánh này được sử dụng như một chỉ số về khả năng chảy của bột, ví dụ chỉ số nén hoặc tỷ số Hausner. Chỉ số nén và tỷ số Hausner là những chỉ số cho biết xu hướng bị nén của bột như mô tả ở trên. Các chỉ số này cho phép xác định khả năng lắng xuống của bột và cho phép đánh giá mức độ quan trọng tương đối của tương tác giữa các hạt. Với bột có tính chất chảy tự do, các tương tác này ít có ý nghĩa và khối lượng riêng thô và khối lượng riêng gỗ có giá trị gần nhau. Đối với bột khả năng chảy kém hơn, tương tác giữa các hạt thường lớn hơn và khối lượng riêng thô và khối lượng riêng gỗ cũng khác nhau nhiều hơn. Sự khác nhau này được phản ánh trong chỉ số nén và tỷ số Hausner.

Chỉ số nén:

$$\frac{100(V_0 - V_f)}{V_0}$$

Trong đó:

V_0 là thể tích biểu kiến khi chưa bị nén.

V_f là thể tích gỗ cuối cùng.

Tỷ số Hausner:

$$\frac{V_0}{V_f}$$

Tùy thuộc vào chế phẩm, chỉ số nén có thể được xác định bằng cách áp dụng V_{10} thay cho V_0 . Nếu V_{10} được áp dụng, cần phải ghi cùng với kết quả.

V_{10} là thể tích đọc được sau 10 lần gõ lên mẫu bột theo phương pháp 1 của mục Xác định khối lượng riêng gỗ.

PHỤ LỤC 7

7.1 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ ACETYL

Chỉ số acetyl là số miligam kali hydroxyd cần thiết để trung hòa acid acetic được giải phóng sau khi thủy phân 1 g chế phẩm đã acetyl hóa.

Cách xác định

- a) Xác định chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm theo Phụ lục 7.7.
- b) Acetyl hóa chế phẩm theo phương pháp sau: Lấy 10 g chế phẩm cho vào bình Kjeldahl dung tích 200 ml, thêm 20 ml *anhydrid acetic* (TT). Lắp ống sinh hàn ngược dùng nguồn làm lạnh là không khí. Đặt bình trên tấm lưới phù chất chịu nhiệt có khoét một lỗ tròn đường kính 4 cm. Đun sôi nhẹ trong 2 h bằng ngọn lửa nhỏ có chiều cao không quá 25 mm và được điều chỉnh để lửa không chạm vào đáy bình. Để nguội, rót vào một cốc to chứa sẵn 600 ml nước, thêm 0,2 g *đá bọt* (TT) và đun sôi 30 min. Làm nguội, chuyển sang bình gạn và gạn bỏ lớp dưới. Rửa chế phẩm đã acetyl hóa ít nhất 3 lần, mỗi lần với 50 ml *dung dịch natri clorid bão hòa* (TT) ấm, cho đến khi nước rửa không còn phản ứng acid với giấy quỳ. Cuối cùng, lắc với 20 ml nước ấm và loại thật kiệt nước. Rót chế phẩm đã acetyl hóa vào một bát sứ nhỏ, thêm 1 g *natri sulfat khan* (TT), khuấy kỹ rồi lọc qua giấy lọc khô gấp nếp.
- c) Xác định chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm đã acetyl hóa theo Phụ lục 7.7.
- d) Tính chỉ số acetyl của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số acetyl} = \frac{(b - a) \times 1335}{1335 - a}$$

Trong đó:

- a là chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm chưa acetyl hóa;
b là chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm đã acetyl hóa.

7.2 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ ACID

Chỉ số acid là số miligam kali hydroxyd cần thiết để trung hòa các acid tự do chứa trong 1 g chế phẩm.

Cách xác định

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cân chính xác khoảng 10 g chế phẩm, thêm 50 ml hỗn hợp đồng thể tích *ethanol 96 %* (TT) và *ether* (TT) đã được trung hòa trước với *dung dịch kali hydroxyd 0,1 N* (CD) hoặc *natri hydroxyd 0,1 N* (CD), dùng 0,5 ml *dung dịch phenolphthalein* (TT₁) làm chỉ thị. Lắc để chế phẩm tan hoàn toàn. Nếu chế phẩm khó tan, có thể đun hồi lưu trên cách thủy. Chuẩn độ bằng *dung dịch kali hydroxyd 0,1 N* (CD), lắc liên tục cho đến khi xuất hiện màu hồng bền vững trong 15 s.

Tính chỉ số acid của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số acid} = \frac{5,610 \times a}{P}$$

Trong đó:

- a là số ml *dung dịch kali hydroxyd 0,1 N* (CD) đã dùng;
P là lượng chế phẩm đem thử (g).

7.3 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ ESTER

Chỉ số ester là số miligam kali hydroxyd cần thiết để xà phòng hóa các ester có trong 1 g chế phẩm.

Cách xác định

- a) Xác định chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm theo Phụ lục 7.7.
- b) Xác định chỉ số acid của chế phẩm theo Phụ lục 7.2.
- Tính chỉ số ester bằng cách lấy chỉ số xà phòng hóa trừ đi chỉ số acid của chế phẩm.

7.4 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ HYDROXYL

Chỉ số hydroxyl là số miligam kali hydroxyd cần thiết để trung hòa acid tổ hợp do acyl hóa 1 g chế phẩm.

Cách xác định

Sử dụng phương pháp A, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

Phương pháp A

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cân chính xác một lượng chế phẩm (theo chỉ dẫn trong Bảng 7.4) cho vào bình acetyl hóa dung tích 150 ml có lắp ống sinh hàn ngược dùng nguồn làm lạnh là không khí, thêm lượng *thuốc thử pyridin - anhydrid acetic* (TT) tương ứng. Đun sôi 1 h trong cách thủy, điều chỉnh để mực nước cao hơn mực chất lỏng trong bình khoảng 2,5 cm. Lấy bình cùng ống sinh hàn ra khỏi nồi cách thủy, để nguội, dùng 5 ml nước rửa ống sinh hàn. Nếu hỗn hợp bị đục, thêm *pyridin* (TT) vừa đủ để làm trong. Ghi lại số ml *pyridin* (TT) đã thêm. Lắc và đun lại trong cách thủy 10 min nữa, rồi lấy ra, để nguội. Rửa ống sinh hàn và thành bình với 5 ml *ethanol 96 %* (TT) đã trung tính trước với *dung dịch phenolphthalein* (TT₁). Chuẩn độ bằng *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N* trong *ethanol* (CD), dùng 0,2 ml *dung dịch phenolphthalein* (TT₁). Song song tiến hành một mẫu trắng. Tính chỉ số hydroxyl của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số hydroxyl} = \frac{(b - a) \times 28,05}{P} + \text{chỉ số acid}$$

Trong đó:

- a là số ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N* trong *ethanol* (CD) đã dùng trong mẫu thử;
b là số ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N* trong *ethanol* (CD) đã dùng trong mẫu trắng;
P là lượng chế phẩm đem thử (g).

Bảng 7.4 - Lượng chế phẩm và lượng thuốc thử tương ứng

Chỉ số hydroxyl	Lượng chế phẩm cần lấy (g)	Lượng thuốc thử Pyridin - anhydrid acetic (ml)
10 - 100	2,0	5,0
100 - 150	1,5	5,0
150 - 200	1,0	5,0
200 - 250	0,75	5,0
250 - 300	0,60 hay 1,20	5,0 hay 10,0
300 - 350	1,0	10,0
350 - 700	0,75	15,0
700 - 950	0,5	15,0

Phương pháp B

Cho lượng chế phẩm đã chỉ dẫn vào bình nón nút mài hoàn toàn khô dung tích 5 ml, thêm 2 ml thuốc thử anhydrid propionic (TT). Đậy nút và lắc nhẹ nhàng cho đến khi chế phẩm tan hoàn toàn. Để yên trong 2 h. Nếu không có chỉ dẫn khác, mở nắp, cho cả bình vào một bình nón rộng miệng dung tích 500 ml, có chứa sẵn 25,0 ml dung dịch anilin trong cyclohexan (TT) và 30 ml acid acetic băng (TT). Lắc tròn, để yên 5 min và chuẩn độ bằng dung dịch acid percloric 0,1 N (CD) cho đến màu xanh ngọc, dùng 0,05 ml dung dịch tím tinh thể (TT) làm chỉ thị. Song song tiến hành một mẫu trắng.

Tính chỉ số hydroxyl của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số hydroxyl} = \frac{(b - a) \times 5,610}{P}$$

Trong đó:

a là số ml dung dịch acid percloric 0,1 N (CD) đã dùng trong mẫu thử;

b là số ml dung dịch acid percloric 0,1 N (CD) đã dùng trong mẫu trắng;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

Xác định hàm lượng (%) nước trong chế phẩm (A) theo Phụ lục 10.3. Tính chỉ số hydroxyl hiệu chỉnh theo công thức sau:

Chỉ số hydroxyl hiệu chỉnh = Chỉ số hydroxyl - $31,1 \times A$.

7.5 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ IOD

Chỉ số iod là số gam halogen, tính theo iod, kết hợp với 100 g chế phẩm trong những điều kiện qui định.

Cách xác định

Sử dụng phương pháp iod bromid, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

Phương pháp iod bromid

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, lấy lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong Bảng 7.5 để thử.

Bảng 7.5 - Lượng chế phẩm cần lấy

Chỉ số iod	Lượng chế phẩm cần lấy (g)
Dưới 20	1,0
20 - 60	0,5 đến 0,25
60 - 100	0,25 - 0,15
Trên 100	0,15 - 0,10

Cân lượng chế phẩm đã chỉ dẫn, cho vào bình nón nút mài đã được làm khô hoặc được tráng bằng acid acetic băng (TT), nếu không chỉ dẫn khác, hòa tan trong 15 ml cloroform (TT). Thêm từ từ 25,0 ml dung dịch iod bromid (TT), đậy nút, nếu không có chỉ dẫn khác, để yên trong chỗ tối 30 min, thỉnh thoảng lắc. Thêm 10 ml dung dịch kali iodid 10 % (TT) và 100 ml nước cất. Chuẩn độ bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD), lắc mạnh cho đến khi dung dịch có màu vàng nhạt, thêm 5 ml dung dịch hồ tinh bột (TT) và tiếp tục chuẩn độ chậm cho đến khi dung dịch mất màu. Song song tiến hành một mẫu trắng.

Tính chỉ số iod của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số iod} = \frac{1,269 \times (b - a)}{P}$$

Trong đó:

a là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD) đã dùng trong mẫu thử;

b là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD) dùng trong mẫu trắng;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

Phương pháp iod monoclorid

Nếu chuyên luận quy định dùng bình định lượng iod, trừ khi có chỉ dẫn khác, dùng loại bình dung tích 250 ml và đáp ứng các tiêu chuẩn quốc gia.

Hòa tan lượng chế phẩm đã chỉ dẫn với 10 ml dicloromethan (TT) trong một bình định lượng iod khô. Thêm 20 ml dung dịch iod monoclorid (TT). Đậy nút đã được làm ướt với dung dịch kali iodid 10 % (TT), để yên 30 min trong chỗ tối ở nhiệt độ 15 °C đến 25 °C. Nhổ 15 ml dung dịch kali iodid 10 % (TT) lên miệng bình và cẩn thận mở nút. Rửa nút, miệng và thành bình với 100 ml nước, lắc đều. Chuẩn độ bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD), lắc mạnh cho đến khi dung dịch có màu vàng nhạt, thêm 0,5 ml dung dịch hồ tinh bột (TT) và tiếp tục chuẩn độ chậm cho đến khi dung dịch mất màu. Song song tiến hành một mẫu trắng.

Tính chỉ số iod của chế phẩm theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số iod} = \frac{1,269 \times (b - a)}{P}$$

Trong đó:

a là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD) đã dùng trong mẫu thử;

b là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CD) dùng trong mẫu trắng;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

Có thể tính lượng chế phẩm đem thử (g) bằng cách lấy 20 chia cho chỉ số iod lý thuyết cao nhất của chế

phẩm. Nếu mẫu thử tiêu thụ quá nửa lượng thuốc thử iod monoclorid cho vào, phải làm lại thí nghiệm với lượng chế phẩm nhỏ hơn.

7.6 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ PEROXYD

Chỉ số peroxyd là số mili đương lượng gam oxygen hoạt tính biểu thị lượng peroxyd chứa trong 1000 g chế phẩm khi được xác định theo các phương pháp dưới đây.

Cách xác định

Sử dụng phương pháp A, khi chuyên luận riêng không qui định phương pháp thử.

Phương pháp A

Cân 5,00 g chế phẩm cho vào bình nón nút mài dung tích 250 ml, thêm 30 ml hỗn hợp gồm 3 thể tích *acid acetic băng* (TT) và 2 thể tích *cloroform* (TT), lắc cho tan và thêm 0,5 ml *dung dịch kali iodid bão hòa* (TT). Lắc đúng 1 min, thêm 30 ml *nước*. Chuẩn độ chậm bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ), liên tục lắc mạnh, cho đến khi màu vàng gần như biến mất. Thêm 0,5 ml *dung dịch hồ tinh bột* (TT) và tiếp tục chuẩn độ, lắc mạnh, đến khi dung dịch mất màu.

Song song tiến hành một mẫu trắng. Lượng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ) đã dùng trong mẫu trắng không được vượt quá 0,1 ml.

Chỉ số peroxyd của chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số peroxyd} = \frac{(a - b) \times 10}{P}$$

Trong đó:

a là số ml *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ) đã dùng trong mẫu thử;

b là số ml *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ) đã dùng trong mẫu trắng;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

Phương pháp B

Tiến hành thử trong điều kiện tránh ánh sáng.

Cân chính xác một lượng chế phẩm (theo chỉ dẫn trong Bảng 7.6.) cho vào bình nón nút mài dung tích 250 ml, thêm 50 ml hỗn hợp gồm 3 thể tích *acid acetic băng* (TT) và 2 thể tích *trimethylpentan* (TT). Đậy nút, lắc cho tan và thêm 0,5 ml *dung dịch kali iodid bão hòa* (TT). Đậy nút, để yên dung dịch trong (60 ± 1) s. Tiếp tục lắc mạnh, rồi thêm 30 ml *nước*. Chuẩn độ chậm bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ), liên tục lắc mạnh cho đến khi màu vàng gần như biến mất. Thêm 0,5 ml *dung dịch hồ tinh bột* (TT) và tiếp tục chuẩn độ, liên tục lắc mạnh, nhất là gần điểm kết thúc để giải phóng hết iod ra khỏi lớp dung môi. Thêm từng giọt *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ) cho đến khi mất màu lam.

Bảng 7.6 - Lượng chế phẩm cần lấy

Chỉ số peroxyd	Lượng chế phẩm cần lấy (g)
0 - 12	2,00 - 5,00
12 - 20	1,20 - 2,00
20 - 30	0,80 - 1,20
30 - 50	0,50 - 0,80
50 - 90	0,30 - 0,50

Tùy thuộc vào lượng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N* (CĐ) đã sử dụng, nếu cần có thể thay thế bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N* (CĐ).

Ghi chú: Đối với chỉ số peroxyd ≥ 70 , khi chuẩn độ đến dung dịch có màu vàng nhạt, chờ 15 s đến 30 s mới thêm *dung dịch hồ tinh bột* (TT), do trimethylpentan có xu hướng nổi lên bề mặt lớp nước và đây là thời gian cần thiết để trộn dung môi với dung dịch định lượng, đồng thời giải phóng hết iod. Nên dùng *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N* (CĐ) khi chỉ số peroxyd lớn hơn 150. Có thể cho lượng nhỏ dung dịch chất nhũ hóa cân bằng ưa nước/ưa dầu cao (như polysorbat 60) 0,5 % đến 1,0 % (kl/kl) vào hỗn hợp phản ứng để làm chậm sự tách pha và đẩy nhanh thời gian giải phóng iod.

Song song tiến hành một mẫu trắng. Nếu lượng *dung dịch natri thiosulfat* dùng trong mẫu trắng vượt quá 0,1 ml, thay các thuốc thử tinh khiết và tiến hành thử nghiệm lại.

Chỉ số peroxyd của chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số peroxyd} = \frac{(a - b) \times 1000 \times c}{P}$$

Trong đó:

a là số ml *dung dịch natri thiosulfat* đã dùng trong mẫu thử;

b là số ml *dung dịch natri thiosulfat* đã dùng trong mẫu trắng;

c là nồng độ đương lượng của *dung dịch natri thiosulfat*;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

7.7 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ XÀ PHÒNG HÓA

Chỉ số xà phòng hóa là số mili gam kali hydroxyd cần thiết để trung hòa các acid tự do và để xà phòng hóa các ester chứa trong 1 g chất thử.

Cách xác định

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, lấy lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong Bảng 7.7 để thử.

Bảng 7.7 - Lượng chế phẩm cần lấy

Chỉ số xà phòng hóa	Lượng chế phẩm cần lấy (g)
3 - 10	12,0 15,0
10 - 40	8,0 - 12,0
40 - 60	5,0 - 8,0
60 - 100	3,0 - 5,0
100 - 200	2,5 - 3,0
200 - 300	1,0 2,0
300 - 400	0,5 1,0

Cân chính xác lượng chế phẩm đã chỉ dẫn cho vào bình nón nút mài dung tích 250 ml. Thêm 25,0 ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CD)* và vài viên bi thủy tinh. Lắp ống sinh hàn ngược và, trừ khi có chỉ dẫn khác, đun sôi 30 min trên cách thủy, thỉnh thoảng lắc. Thêm 1 ml *dung dịch phenolphthalein (TT)* và chuẩn độ ngay (khi dung dịch còn đang nóng) bằng *dung dịch acid hydrocloric 0,5 N (CD)*. Song song tiến hành một mẫu trắng. Chỉ số xà phòng hóa của chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số xà phòng hóa} = \frac{28,05 \times (b - a)}{P}$$

Trong đó:

a là số ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CD)* đã dùng trong mẫu trắng;

b là số ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CD)* đã dùng trong mẫu thử;

P là lượng chế phẩm đem thử (g).

7.8 XÁC ĐỊNH CHẤT KHÔNG BỊ XÀ PHÒNG HÓA

Chất không bị xà phòng hóa, được tính bằng tỷ lệ phần trăm (kl/kl), là phần không bay hơi ở 100 °C đến 105 °C thu được khi chiết chế phẩm đã được xà phòng hóa với một dung môi hữu cơ.

Cách xác định

Dùng phương pháp 1, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

Phương pháp 1

Cân chính xác khoảng 2,0 g đến 2,5 g chế phẩm cho vào bình dung tích 250 ml, thêm 25 ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (TT)* và đun sôi 1 h dưới ống sinh hàn ngược trên cách thủy, thỉnh thoảng lắc. Chuyển dung dịch sang bình gạn, tráng rửa bình với 50 ml nước và khi dung dịch còn đang ấm, chiết bằng cách lắc mạnh 3 lần, mỗi lần với 50 ml *ether không có peroxyd (TT)*, dùng 50 ml ether đầu để tráng rửa bình. Tập trung dịch chiết ether vào một bình gạn khác chứa sẵn 20 ml nước. Nếu dịch chiết ether có chứa các tiểu phân rắn lơ lửng, lọc qua giấy lọc loại không có chất béo, rồi rửa giấy lọc bằng *ether không có peroxyd (TT)*. Lắc nhẹ bình gạn trong vài phút, để yên cho tách lớp và loại bỏ lớp nước. Rửa dịch chiết ether bằng cách lắc mạnh 2 lần, mỗi lần với 20 ml nước và sau đó 3 lần, mỗi lần với 20 ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (TT)*, lắc mạnh và rửa với 20 ml nước sau mỗi lần xử lý. Cuối cùng rửa nhiều lần, mỗi lần với 20 ml nước, cho đến khi nước rửa không còn phản ứng kiềm với *dung dịch phenolphthalein (TT)*. Chuyển dịch chiết ether vào một bình đã cân bì và tráng bình gạn bằng *ether không có peroxyd (TT)*. cất bay hơi ether, rồi thêm 3 ml *aceton (TT)*. Dùng luồng không khí nhẹ nhàng đuổi hết dung môi ra khỏi bình được ngâm ngập trong nước đang sôi, để nghiêng và quay tròn. Sấy bình đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ không quá 80 °C.

Hòa tan cân trong bình với 10 ml *ethanol 96 % (TT)* mới đun sôi và đã được trung tính với *dung dịch phenolphthalein (TT)*. Chuẩn độ bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N trong ethanol (CD)* với chỉ thị là *dung dịch phenolphthalein (TT)*. Nếu lượng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N trong ethanol (CD)* tiêu thụ không quá 0,1 ml, khối lượng cân cần được là lượng chất không bị xà phòng hóa. Tỷ lệ phần trăm chất không bị xà phòng hóa có trong chế phẩm. Nếu lượng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N trong ethanol (CD)* tiêu thụ quá 0,1 ml, phải làm lại thí nghiệm.

Phương pháp 2

Cân chính xác lượng chế phẩm theo chỉ dẫn (P g) cho vào một bình dung tích 250 ml, thêm 50 ml *dung dịch kali hydroxyd 2 M trong ethanol (TT)* và đun 1 h dưới ống sinh hàn ngược trên cách thủy, thỉnh thoảng lắc. Làm nguội tới nhiệt độ dưới 25 °C và chuyển dung dịch sang một bình gạn, tráng rửa với 100 ml nước, rồi chiết cân thận 3 lần, mỗi lần với 100 ml *ether không có peroxyd (TT)*. Tập trung dịch chiết ether vào một bình gạn khác chứa sẵn 40 ml nước, lắc nhẹ vài phút, để yên cho tách lớp và loại bỏ lớp nước. Rửa dịch chiết ether 2 lần, mỗi lần với 40 ml nước và sau đó 3 lần, mỗi lần với 40 ml *dung dịch kali hydroxyd 3 % (TT)*, rửa với 40 ml nước sau mỗi lần xử lý. Cuối cùng rửa nhiều lần, mỗi lần với 40 ml nước, cho đến khi nước rửa không còn phản ứng kiềm với *dung dịch phenolphthalein (TT)*. Chuyển dung dịch ether vào bình đã cân bì, rửa bình gạn với *ether không có peroxyd (TT)*. Cất cân thận cho bay hơi hết ether, thêm 6 ml *aceton (TT)* vào cân. Dùng luồng khí nhẹ nhàng đuổi hết dung môi ra khỏi bình và sấy khô cân đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 100 °C đến 105 °C. Để nguội bình trong bình hút ẩm và cân xác định khối lượng cân (A g).

Tỷ lệ phần trăm chất không bị xà phòng hóa trong chế phẩm = 100 A/P

Hòa tan cân trong 20 ml *ethanol 96 % (TT)* đã được trung hòa trước với *dung dịch phenolphthalein (TT)* và chuẩn độ bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N trong ethanol (CD)*. Nếu lượng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N trong ethanol (CD)* tiêu thụ quá 0,2 ml, cân đã cân không được coi là chất không bị xà phòng hóa và phải làm lại thí nghiệm.

7.9 XÁC ĐỊNH LƯU HUỖNH DIOXYD

Áp dụng phương pháp 1, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Phương pháp 1

Dụng cụ: Bình cầu dung tích 1000 ml đến 1500 ml được lắp với sinh hàn ngược. Đầu trên của sinh hàn nối liền tiếp với hai ống hấp thụ, mỗi ống chứa 10 ml *dung dịch hydrogen peroxyd 20 thể tích (TT)* mới được trung hòa với *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CD)*, dùng *dung dịch xanh bromophenol (TT)* làm chỉ thị. Bình được lắp một vòi sục khí với đầu gần chạm đáy bình.

Cách tiến hành:

Cho 500 ml nước và 20 ml *acid hydrocloric (TT)* vào bình. Sục luồng khí nitrogen hay carbon dioxyd đã đi qua *dung*

dịch natri carbonat 10 % (TT), đun từ từ dung dịch trong bình cho đến sôi. Duy trì luồng khí sục, để dung dịch sôi trong khoảng 10 min, làm nguội bằng cách nhúng bình từ từ vào nước. Mở nắp, cho nhanh lượng chế phẩm đã cân (50 g đến 100 g) vào bình, đun nhẹ và để sôi trong 45 min. Tháo hai ống hấp thụ trước khi ngừng sục khí. Gộp dung dịch trong hai ống hấp thụ và chuẩn độ bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ).

1 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) tương đương với 3,203 mg SO_2 .

Lập lại phép thử trên, nhưng không có chế phẩm. Dung dịch trong ống hấp thụ vẫn phải trung tính.

Phương pháp 2

Cho 150 ml nước vào bình A (Hình 7.9.) và sục khí carbon dioxyd 15 min qua toàn bộ hệ thống với tốc độ 100 ml/min. Lấy 10 ml dung dịch hydrogen peroxyd loãng (TT), thêm 0,15 ml dung dịch xanh bromophenol trong ethanol (TT). Thêm dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) cho đến khi xuất hiện màu tím xanh (không vượt quá điểm tương đương) và chuyển dung dịch thu được vào ống nghiệm D. Duy trì luồng khí sục carbon dioxyd, tháo bình gạn B ra và dùng 100 ml nước chuyển khoảng 25,0 g chế phẩm vào bình A. Qua bình gạn, cho 80 ml dung dịch acid hydrochloric 10 % (TT) vào bình A và đun sôi 1 h. Mở khóa bình gạn, ngừng sục khí, dùng đun nóng và nước sinh hàn. Dùng một ít nước chuyển dung dịch trong ống nghiệm D sang bình nón miệng rộng dung tích 200 ml. Đun 15 min trên cách thủy và để nguội. Thêm 0,1 ml dung dịch xanh bromophenol trong ethanol (TT) và chuẩn độ bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) cho đến khi chuyển màu từ vàng sang xanh tím.

Song song tiến hành một mẫu trắng.

Hàm lượng lưu huỳnh dioxyd (phần triệu) được tính theo công thức sau:

$$32030 = (V_1 - V_2) \times \frac{n}{m}$$

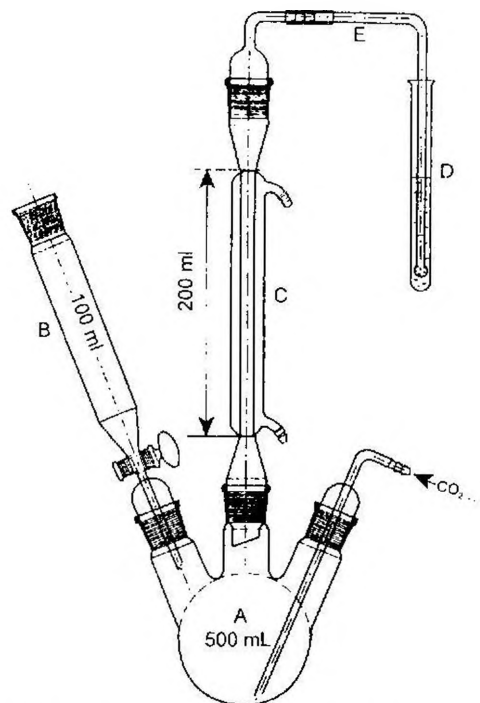
Trong đó:

V_1 là số ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) đã dùng trong mẫu thử;

V_2 là số ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) đã dùng trong mẫu trắng;

n là nồng độ đương lượng thực của dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ);

m là lượng chế phẩm đem thử (g).



Hình 7.9 - Dụng cụ xác định lưu huỳnh dioxyd

7.10 XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT OXY HÓA

Cách xác định

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cân chính xác khoảng 4,0 g chế phẩm cho vào bình nón nút mài dung tích 125 ml, thêm 50,0 ml nước. Đậy nút và lắc 5 min. Chuyển sang ống nút mài dung tích 50 ml và ly tâm. Lấy 25,0 ml dung dịch trong ở trên cho vào bình nón nút mài dung tích 125 ml, thêm 1 ml acid acetic băng (TT) và 0,5 g đến 1,0 g kali iodid (TT). Đậy nút, lắc nhẹ và để yên 25 min đến 30 min trong chỗ tối. Thêm 1 ml dung dịch hồ tinh bột (TT) và định lượng bằng dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ) cho đến khi dung dịch mất màu. Song song tiến hành một mẫu trắng.

1 ml dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ) tương ứng với 34 μg chất oxy hóa, tính theo H_2O_2 .

Hàm lượng chất oxy hóa, tính theo H_2O_2 , không được quá 0,002 % (k/k), trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

7.11 XÁC ĐỊNH CARBON HỮU CƠ TOÀN PHẦN TRONG NƯỚC DÙNG CHO NGÀNH DƯỢC

Lượng carbon hữu cơ toàn phần (TOC) có trong nước dùng cho ngành dược được xác định bằng một phép định lượng gián tiếp các chất hữu cơ. Việc định lượng TOC cũng có thể được dùng để kiểm soát quá trình thực hiện các công đoạn khác nhau trong sản xuất thuốc.

Có nhiều phương pháp xác định TOC. Bởi vậy, thay vì đưa ra một kỹ thuật cụ thể, chuyên luận chung này chỉ mô tả các quy trình được sử dụng để đánh giá phương pháp đã

chọn và xử lý kết quả trong các phép thử giới hạn. Một dung dịch chuẩn được phân tích sau những khoảng thời gian thích hợp, tùy thuộc vào tần suất đo. Dung dịch chuẩn này được pha từ một chất dễ bị oxy hóa (như đường trắng) có nồng độ được điều chỉnh đủ để thiết bị phát hiện được và tương ứng với giới hạn TOC cần đo. Độ thích hợp của hệ thống được xác định bằng việc phân tích dung dịch một chất khó bị oxy hóa hơn (như 1,4-benzoquinon).

Nói chung, các kiểu thiết bị dùng để xác định TOC trong nước dùng cho ngành dược đều hoạt động theo nguyên lý oxy hóa hoàn toàn các phân tử chất hữu cơ trong mẫu nước thử thành carbon dioxyd, sau đó định lượng carbon dioxyd tạo thành và dùng kết quả thu được để tính hàm lượng carbon trong nước.

Thiết bị sử dụng phải phân biệt được carbon hữu cơ và carbon vô cơ (thường tồn tại ở dạng carbonat). Khả năng phân tách phải hiệu quả bằng cách xác định lượng carbon vô cơ rồi tính lượng carbon hữu cơ bằng cách trừ nó khỏi hàm lượng carbon toàn phần. Cũng có thể loại sạch carbon vô cơ khỏi mẫu thử trước khi oxy hóa. Trong trường hợp này có thể có những phân tử carbon hữu cơ cũng bị loại theo, tuy nhiên, những chất hữu cơ đó tồn tại rất ít trong nước dùng cho ngành dược.

Thiết bị

Sử dụng loại thiết bị đã được hiệu chỉnh gần trên dây chuyền hoặc đặt riêng rẽ. Kiểm tra độ thích hợp của hệ thống sau những khoảng thời gian thích hợp như mô tả ở dưới đây. Thiết bị phải có giới hạn phát hiện $\leq 0,05$ mg carbon/l.

Nước TOC

Sử dụng nước tinh khiết cao đạt các tiêu chuẩn sau:

Điện dẫn suất: Không quá $1,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ở 25°C .

TOC: Không quá $0,1$ mg/l.

Tùy thuộc vào loại thiết bị sử dụng, hàm lượng kim loại nặng và đồng có thể phải được không chế. Cần tuân theo các hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị.

Chuẩn bị đồ thủy tinh

Sử dụng đồ thủy tinh được rửa sạch cẩn thận bằng phương pháp thích hợp để loại bỏ các chất hữu cơ. Cuối cùng, dùng nước TOC để tráng lại.

Dung dịch chuẩn

Hòa tan đường trắng, đã được sấy khô 3 h ở 105°C , trong nước TOC để thu được dung dịch chứa $1,19$ mg đường trắng/L ($0,50$ mg carbon/L).

Dung dịch thử

Thực hiện tất cả các biện pháp cần thiết để tránh ô nhiễm. Lấy đầy nước cần thử vào một bình kín. Kiểm tra nước càng nhanh càng tốt để giảm thiểu ô nhiễm do đồ chứa và nút đáy của nó.

Dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống

Hòa tan 1,4-benzoquinon trong nước TOC để thu được dung dịch có nồng độ $0,75$ mg 1,4-benzoquinon/L ($0,50$ mg carbon/L).

Kiểm soát nước TOC

Sử dụng nước TOC thu được vào cùng thời điểm lấy để pha chế dung dịch chuẩn và dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống.

Các dung dịch kiểm tra

Ngoài việc kiểm soát nước TOC, chuẩn bị các dung dịch trắng thích hợp hay các dung dịch cần thiết khác để hiệu chỉnh đường nền theo hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị. Tiến hành thử các mẫu trắng thích hợp để chỉnh thiết bị về không.

Độ thích hợp của hệ thống

Tiến hành thử và ghi lại đáp ứng của các dung dịch sau: Nước TOC (R_N), dung dịch chuẩn (R_C) và dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống (R_{TH}). Tính tỷ lệ phần trăm hiệu quả đáp ứng theo công thức sau:

$$RE = \frac{R_{TH} - R_N}{R_C - R_N} \times 100$$

Hệ thống được coi là thích hợp nếu RE nằm trong khoảng $85,0\%$ đến $115,0\%$.

Cách tiến hành

Tiến hành kiểm tra mẫu nước thử và ghi lại đáp ứng (R_T). Mẫu nước thử được coi là đạt yêu cầu khi $R_T \leq R_C - R_N$.

Có thể áp dụng phương pháp này khi sử dụng thiết bị đặt trong dây chuyền đã được hiệu chỉnh đúng mức và có độ thích hợp hệ thống chấp nhận được. Vị trí đặt thiết bị phải được lựa chọn để đảm bảo các đáp ứng là đại diện cho nước được sử dụng.

PHỤ LỤC 8

8.1 CÁC PHẢN ỨNG ĐỊNH TÍNH

Acetat

A. Đun nóng chế phẩm với cùng một lượng *acid oxalic* (TT). Hơi xông ra có mùi *acid acetic*.

B. Hòa tan khoảng 30 mg chế phẩm trong 3 ml *nước* hoặc lấy 3 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm lần lượt 0,25 ml *dung dịch lanthan nitrat 5 %* (TT), 0,1 ml *dung dịch iod 0,1 N* và 0,05 ml *dung dịch amoniac 2 M* (TT) và đun nóng hỗn hợp cân thận đến sôi, sau vài phút xuất hiện tủa màu xanh lam hay màu xanh lam thẫm.

Nhóm acetyl

Lấy một ống nghiệm (kích thước 18 mm × 180 mm), cho vào khoảng 15 mg chế phẩm hay một lượng theo chỉ dẫn trong chuyên luận và 0,15 ml *acid phosphoric* (TT). Đậy ống nghiệm bằng một nút có mang bên trong một ống nghiệm nhỏ hơn (kích thước 10 mm × 100 mm), ống nghiệm này chứa nước để làm sinh hàn. Cho một giọt *dung dịch lanthan nitrat 5 %* (TT) bám vào thành đáy ngoài của ống nghiệm nhỏ (sao cho giọt thuốc thử này không bị rơi xuống ống nghiệm chứa chế phẩm trong suốt quá trình thí nghiệm, nếu rơi phải làm lại thí nghiệm từ đầu). Đặt thiết bị trong cách thủy sôi 5 min (trừ trường hợp chế phẩm khó thủy phân), sau đó lấy ống nghiệm nhỏ ra, gạt chất lỏng thu được ở đáy ngoài ống nghiệm vào một tấm sứ trắng đã chứa sẵn 0,05 ml *dung dịch iod 0,02 N* (TT), thêm vào cạnh đó 0,05 ml *dung dịch amoniac 2 M* (TT). Sau 1 min đến 2 min, ở vòng tiếp xúc giữa hai dung dịch xuất hiện màu xanh lam dần dần thẫm lên và bền trong một thời gian ngắn.

Đối với các chế phẩm khó thủy phân, tiến hành theo chỉ dẫn ở trên, nhưng đun hỗn hợp từ từ tới sôi trên ngọn lửa, thay cho việc đun trong cách thủy.

Alcaloid

Hòa tan vài mg chế phẩm hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận trong 5 ml *nước*, thêm *dung dịch acid hydrochloric 2 M* (TT) đến khi có phản ứng acid, thêm 1 ml *thuốc thử Dragendorff* (TT), xuất hiện tủa màu cam hay đỏ cam.

Amin thơm bậc nhất

Acid hóa một lượng dung dịch chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận bằng *dung dịch acid hydrochloric 2 M* (TT) hoặc hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *dung dịch acid hydrochloric 2 M* (TT). Thêm 0,2 ml *dung dịch natri nitrit 10 %* (TT), sau 1 min đến 2 min thêm 1 ml *dung dịch 2-naphthol trong kiềm* (TT). Hỗn hợp có màu cam thẫm hay màu đỏ và thường có tủa cùng màu.

Amoni (muối)

A. Hòa tan khoảng 0,02 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc lấy một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 2 ml *dung dịch natri hydroxyd 2 M* (TT), đun nóng, sẽ xông ra khí có mùi đặc biệt và làm xanh giấy quỳ đỏ đã thấm nước.

B. Hòa tan khoảng 10 mg chế phẩm trong 5 ml *nước* hay một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 0,2 ml *thuốc thử Nessler* (TT), hỗn hợp có màu vàng hay tủa vàng nâu.

Arseniat

A. Đun cách thủy 5 ml dung dịch chế phẩm 5 % hoặc 5 ml dung dịch chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận với cùng thể tích *dung dịch hypophosphit* (TT) (thuốc thử Tilé), sẽ cho tủa màu nâu.

B. Hòa tan khoảng 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc lấy 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 1 ml *dung dịch bạc nitrat 2 %* (TT) sẽ tạo thành tủa màu nâu đỏ, tủa này tan khi thêm một lượng *dung dịch acid nitric loãng* (TT) hoặc một lượng *dung dịch amoniac*.

C. Hòa tan khoảng 0,20 g chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc lấy 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 5 ml *dung dịch amoni clorid* (TT), 1 ml *dung dịch amoniac* và vài giọt *dung dịch magnesi sulfat 5 %* (TT) sẽ cho tủa kết tinh trắng.

Arsenit

A. Phản ứng A trong mục arseniat.

B. Hòa tan khoảng 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc lấy 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch bạc nitrat 2 %* (TT) sẽ tạo thành tủa màu trắng hơi vàng, tủa này tan khi thêm một lượng *dung dịch amoniac* hoặc một lượng *dung dịch acid nitric loãng* (TT).

C. Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước*, hoặc lấy 2 ml dung dịch chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 1 ml *dung dịch đồng sulfat* (TT), tủa màu xanh lục sẽ được tạo thành, tách tủa và đun với *dung dịch natri hydroxyd*, tủa sẽ chuyển thành màu nâu đỏ.

Bạc (muối)

A. Hòa tan khoảng 10 mg chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc lấy một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 3 giọt *dung dịch acid hydrochloric 10 %* (TT) sẽ xuất hiện tủa trắng lớn nhỏ, tủa này không tan trong *dung dịch acid nitric loãng* (TT) nhưng tan trong *dung dịch amoniac 6 M* (TT).

B. Hòa tan 20 mg chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc lấy một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 2 ml *dung dịch amoniac 6 M* (TT) và vài giọt *formaldehyd* (TT), đun nóng dung dịch sẽ có tủa bạc kim loại bám vào thành ống nghiệm (phản ứng tráng gương).

Barbiturat

A. Lấy khoảng 5 mg chế phẩm, hòa tan trong 3 ml *dung dịch cobalt (II) acetat 0,2 %* trong *methanol* (TT), thêm

20 mg đến 30 mg *natri tetraborat* (TT) đã được tán mịn, đun sôi sẽ xuất hiện màu xanh tím.

B. Barbiturat có hydro ở nhóm NH không bị thay thế: Hòa tan khoảng 5 mg chế phẩm trong 3 ml *methanol* (TT), thêm 0,1 ml dung dịch có chứa 10 % *cobalt (II) nitrat* (TT) và 10 % *calci clorid* (TT). Trộn đều, vừa lắc vừa thêm 0,1 ml dung dịch *natri hydroxyd* 2 M (TT) sẽ xuất hiện màu và tủa xanh tím.

Bari (muối)

A. Lấy một lượng dung dịch muối bari như chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm vài giọt dung dịch *acid sulfuric loãng* (TT) sẽ xuất hiện tủa trắng, tủa này không tan trong dung dịch *acid hydrochloric* 10 % (TT) và dung dịch *acid nitric loãng* (TT).

B. Dùng một dây bạch kim hoặc đũa thủy tinh lấy một lượng chất thử đốt trên ngọn lửa không màu, ngọn lửa sẽ nhuộm thành màu xanh lục hơi vàng, khi nhìn qua kính thủy tinh màu lục ngọn lửa sẽ có màu xanh lam.

Benzoat

A. Lấy 1 ml dung dịch trung tính 10 % chế phẩm trong nước hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 0,5 ml dung dịch *sắt (III) clorid* 10,5 % (TT) sẽ xuất hiện tủa màu vàng thẫm, tủa này tan trong *ether* (TT).

B. Lấy khoảng 0,2 g chế phẩm hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận vào một ống nghiệm, làm ẩm bằng 0,2 ml đến 0,3 ml *acid sulfuric* (TT) và đun nóng nhẹ ở đáy ống nghiệm, sẽ có tinh thể màu trắng thăng hoa bám ở thành trong của ống.

C. Hòa tan 0,5 g chế phẩm trong 10 ml nước hoặc dùng 10 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 0,5 ml *acid hydrochloric* (TT), sẽ cho tủa. Kết tinh lại tủa trong nước ấm rồi làm khô dưới áp suất giảm, tủa thu được có nhiệt độ nóng chảy từ 120 °C đến 124 °C (Phụ lục 6.7).

Bismuth (muối)

A. Thêm 10 ml dung dịch *acid hydrochloric* 10 % (TT) vào 0,5 g chế phẩm hoặc dùng 10 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Đun sôi trong 1 min, để nguội rồi lọc nếu cần. Thêm 20 ml nước vào 1 ml dung dịch thu được ở trên, xuất hiện tủa trắng hay hơi vàng, tủa này sẽ chuyển thành nâu khi thêm 0,05 ml đến 0,1 ml dung dịch *natri sulfid* (TT).

B. Thêm 10 ml dung dịch *acid nitric* 2 M (TT) vào 40 mg đến 50 mg chế phẩm hoặc dùng 10 ml chế phẩm đã được xử lý theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Đun sôi trong 1 min, để nguội rồi lọc nếu cần. Thêm 2 ml dung dịch *thioure* 10 % (TT) vào 5 ml dịch lọc thu được ở trên, xuất hiện màu vàng da cam hay tủa da cam. Thêm 4 ml dung dịch *natri fluorid* 2,5 % (TT), dung dịch không được mất màu trong vòng 30 min.

Borat

A. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm vào 0,1 ml *acid sulfuric* (TT) trong một chén sứ, thêm 3 ml *methanol* (TT), trộn đều rồi châm lửa vào hỗn hợp, hỗn hợp cháy với ngọn lửa màu lục.

B. Lấy 5 ml dung dịch chế phẩm 10 %, thêm 0,5 ml dung dịch *acid hydrochloric loãng* (TT) và 0,5 ml cồn nghệ (TT), sẽ cho màu nâu; thêm 1 ml dung dịch *natri hydroxyd* 10 % (TT), màu nâu chuyển thành lam hay lục.

Bromid

A. Hòa tan một lượng chế phẩm có chứa khoảng 3 mg ion bromid trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa bằng dung dịch *acid nitric loãng* (TT) và thêm 0,4 ml dung dịch *bạc nitrat* 4 % (TT). Lắc và để yên, có tủa màu vàng nhạt lớn dần tạo thành. Lọc lấy tủa, rửa tủa ba lần, mỗi lần với 1 ml nước. Phân tán tủa trong 2 ml nước, thêm 1,5 ml dung dịch *amoniac* 10 M (TT), tủa khó tan.

B. Hòa tan một lượng chế phẩm có chứa khoảng 5 mg ion bromid trong 2 ml nước hoặc lấy một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, acid hóa dung dịch bằng *acid sulfuric loãng* (TT), thêm 1 ml nước clor (TT) và 2 ml *cloroform* (TT), lắc. Lớp cloroform sẽ có màu đỏ đến màu nâu đỏ.

Carbonat và hydrocarbonat

A. Cho vào ống nghiệm khoảng 0,1 g chế phẩm, thêm 2 ml nước hoặc lấy 2 ml dung dịch chế phẩm đã được chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 2 ml dung dịch *acid acetic* 2 M (TT). Đậy ngay nút đã lắp sẵn một ống thủy tinh nhỏ uốn góc. Đun nhẹ ống nghiệm, khí thoát ra được dẫn vào một ống nghiệm khác có chứa sẵn 5 ml dung dịch *bào hòa calci hydroxyd* (TT), sao cho đầu ống thủy tinh nhỏ phải ngập trong dung dịch này, tủa trắng tạo thành, tủa này tan trong *acid hydrochloric* (TT) quá thừa.

B. Cho vào ống nghiệm khoảng 0,1 g chế phẩm, thêm 2 ml nước hoặc lấy 2 ml dung dịch chế phẩm đã được chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 2 ml dung dịch *magnesi sulfat* (TT), nếu là carbonat sẽ cho tủa trắng, nếu là hydrocarbonat sẽ không tạo tủa nhưng khi đun sôi cũng cho tủa trắng.

Calci (muối)

A. Lấy khoảng 20 mg chế phẩm hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận, hòa tan trong 5 ml dung dịch *acid acetic* 5 M (TT), thêm 0,5 ml dung dịch *kali ferocyanid* (TT), dung dịch vẫn trong, thêm khoảng 50 mg *amoni clorid* (TT), tạo thành tủa kết tinh trắng.

B. Thêm vào dung dịch chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận vài giọt dung dịch *amoni oxalat* 4 % (TT), tạo thành tủa trắng, tủa này ít tan trong dung dịch *acid acetic* 6 M (TT), nhưng tan trong *acid hydrochloric* (TT).

Chì (muối)

A. Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 1 ml dung dịch *acid acetic* 5 M (TT) hoặc lấy 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 2 ml dung dịch *kali cromat* 5 % (TT), tủa vàng sẽ tạo thành, tủa này tan trong dung dịch *natri hydroxyd* 10 M (TT).

B. Hòa tan 50 mg chế phẩm trong 1 ml dung dịch *acid acetic* 5 M (TT) hoặc 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 10 ml nước và 0,2 ml dung dịch *kali*

iodid 10 % (TT), tủa màu vàng sẽ tạo thành; đun sôi 1 min đến 2 min cho tủa tan ra, để nguội, tủa lại xuất hiện có dạng những mảnh vàng lấp lánh.

Citrat

A. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 2 ml nước, nếu cần có thể trung tính hòa dung dịch bằng amoniac (TT), hoặc dùng một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml dung dịch calci clorid 10 % (TT), dung dịch vẫn trong. Đun sôi dung dịch sẽ xuất hiện tủa trắng, tủa này tan trong dung dịch acid acetic 6 M (TT).

B. Hòa tan một lượng chế phẩm tương đương với khoảng 50 mg acid citric trong 5 ml nước hoặc lấy 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,5 ml acid sulfuric (TT), 1 ml dung dịch kali permanganat (TT) và đun nóng đến khi mất màu. Thêm 0,5 ml dung dịch natri nitroprusiat 10 % trong dung dịch acid sulfuric 1 M, 4 g acid sulfamic (TT) và từng giọt amoniac (TT) đến khi acid sulfamic tan hết, khi cho thừa amoniac, xuất hiện màu tím chuyển dần thành xanh tím.

Clorat

A. Thêm vài giọt acid sulfuric (TT) vào 0,1 g chế phẩm, có tiếng nổ lép lép và khí màu vàng lục bay ra.

B. Hòa tan khoảng 0,05 g chế phẩm trong 5 ml nước, thêm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 2 % (TT), không xuất hiện tủa. Khi thêm 2 giọt đến 3 giọt dung dịch natri nitrit (TT) và 2 giọt đến 3 giọt acid nitric loãng (TT), sẽ có tủa trắng tạo thành, tủa này tan trong dung dịch amoniac 6 M (TT).

Clorid

A. Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng với 2 mg ion clorid trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa bằng dung dịch acid nitric 2 M (TT), thêm 0,4 ml dung dịch bạc nitrat 2 % (TT). Lắc và để yên, có tủa màu trắng, lớn nhón tạo thành. Lọc lấy tủa, rửa tủa 3 lần, mỗi lần với 1 ml nước, phân tán tủa trong 2 ml nước và thêm 1,5 ml dung dịch amoniac 10 M (TT), tủa tan dễ dàng.

B. Cho vào ống nghiệm một lượng chế phẩm tương ứng khoảng từ 10 mg đến 20 mg ion clorid hay một lượng theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml dung dịch kali permanganat 5 % (TT) và 1 ml acid sulfuric (TT), đun nóng, sẽ giải phóng khí clor có mùi đặc biệt, khí này làm xanh giấy tím hồ tinh bột có kali iodid (TT) đã thấm nước.

Đồng (muối)

A. Hòa tan khoảng 10 mg chế phẩm trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm vài giọt dung dịch kali ferocyanid (TT), sẽ có tủa màu nâu đỏ không tan trong acid acetic (TT).

B. Hòa tan khoảng 10 mg chế phẩm trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vài giọt dung dịch amoniac (TT), sẽ có tủa màu xanh, tủa này tan trong thuốc thử quá thừa tạo thành dung dịch màu xanh lam thẫm.

Ester

Lấy khoảng 30 mg chế phẩm, hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 0,5 ml dung dịch chứa 7 % hydroxylamin hydroclorid (TT) trong methanol (TT) và 0,5 ml dung dịch kali hydroxyd 10 % trong ethanol (TT). Đun sôi, để nguội, acid hóa dung dịch bằng dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT), rồi thêm vài giọt dung dịch sắt (III) clorid 1 %, sẽ xuất hiện màu đỏ hay màu đỏ có ánh lam.

Iodid

A. Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng khoảng 4 mg ion iodid trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa bằng dung dịch acid nitric 2 M (TT), thêm 0,4 ml dung dịch bạc nitrat 4 % (TT). Lắc và để yên, có tủa màu vàng nhạt, lớn nhón tạo thành. Lọc lấy tủa, rửa tủa 3 lần, mỗi lần với 1 ml nước. Phân tán tủa trong 2 ml nước, thêm 1,5 ml dung dịch amoniac 10 M (TT), tủa không tan.

B. Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng với 4 mg ion iodid trong 2 ml nước, hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vài giọt dung dịch sắt (III) clorid 3 % (TT), 2 giọt acid hydrocloric (TT), 1 ml cloroform (TT) và lắc, để yên. Lớp cloroform có màu tím.

Kali (muối)

A. Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml nước hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml dung dịch natri carbonat 10 % (TT) rồi đun nóng, không tạo thành tủa. Thêm vào trong lúc nóng 0,05 ml dung dịch natri sulfid (TT), không tạo thành tủa. Làm nguội trong nước đá và thêm 1,5 ml dung dịch acid tartaric 20 % (TT) và để yên, tạo thành tủa kết tinh màu trắng.

B. Hòa tan khoảng 40 mg chế phẩm trong 1 ml nước hoặc dùng 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml dung dịch acid acetic 2 M (TT) và 1 ml dung dịch natri cobaltinitrit 10 % (TT) mới pha, tạo thành tủa màu vàng hay da cam.

Kẽm (muối)

Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 5 ml nước hoặc dùng 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,2 ml dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT), tạo thành tủa trắng, tủa này tan khi tiếp tục thêm 2 ml dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT). Thêm 10 ml dung dịch amoni clorid 10 % (TT), dung dịch vẫn trong, thêm 0,1 ml dung dịch natri sulfid (TT), tủa bông trắng được tạo thành.

Lactat

Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng khoảng 5 mg acid lactic trong 5 ml nước, hoặc lấy 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml nước brom (TT) và 0,5 ml dung dịch acid sulfuric 1 M (TT). Đun trong cách thủy đến khi mất màu, thỉnh thoảng khuấy bằng đũa thủy tinh. Thêm 4 g amoni sulfat (TT) và trộn đều. Thêm từng giọt theo thành ống 0,2 ml dung dịch có chứa 10 % natri nitroprusiat (TT) trong dung dịch acid sulfuric 1 M

(chú ý không trộn) và 1 ml *amoniac đậm đặc (TT)*. Để yên 30 min, sẽ xuất hiện một vòng màu lục giữa bề mặt của hai chất lỏng.

Magnesi (muối)

Hòa tan khoảng 15 mg chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc lấy 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch amoniac 6 M (TT)*, tạo thành tủa trắng, tủa này tan khi thêm 1 ml *dung dịch amoni clorid (TT)*. Thêm 1 ml *dung dịch dinatri hydrophosphat 9 %*, sẽ có tủa kết tinh màu trắng.

Natri (muối)

A. Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml dung dịch đã được chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 2 ml *dung dịch kali carbonat 15 % (TT)* và đun đến sôi. Không được có tủa tạo thành. Thêm 4 ml *dung dịch kali pyroantimonat (TT)* và đun đến sôi. Để nguội trong nước đá, nếu cần có thành cốc bằng đĩa thủy tinh. Tủa trắng được tạo thành.

B. Dùng một dây bạch kim hay đĩa thủy tinh, lấy một hạt chất thử hay một giọt dung dịch chế phẩm, đưa vào ngọn lửa không màu. ngọn lửa sẽ nhuộm thành màu vàng.

Nhôm (muối)

Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm từng giọt *dung dịch amoniac (TT)* cho tới khi tạo tủa keo trắng, tủa này chuyển thành đỏ khi thêm vài giọt *dung dịch alizarin S (TT)*.

Nitrat

A. Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm từ từ 2 ml *acid sulfuric (TT)*, trộn và để nguội. Cho cẩn thận (không trộn) dọc theo thành ống nghiệm 1 ml *dung dịch sắt (II) sulfat 1,5 % (TT)*. Ở miền tiếp giáp giữa hai chất lỏng có một vòng màu nâu.

B. Trộn 0,1 ml *nitrobenzen (TT)* với 0,2 ml *acid sulfuric (TT)*, thêm một lượng chế phẩm đã tán nhỏ tương ứng với khoảng 1 mg ion nitrat hoặc một lượng dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, để yên 5 min, làm lạnh trong nước đá vài min, vừa lắc vừa thêm từ từ 5 ml *nước*, sau đó 5 ml *dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT)* và 5 ml *aceton (TT)*, lắc rồi để yên. Lớp chất lỏng ở trên có màu tím thâm.

Oxalat

A. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc dùng 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,5 ml *dung dịch calci clorid 10 % (TT)*, tủa màu trắng tạo thành, tủa tan trong acid vô cơ, không tan trong *dung dịch acid acetic 6 M (TT)*.

B. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc dùng 5 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa dung dịch bằng *dung dịch acid sulfuric 10 % (TT)*, dung dịch này sẽ làm mất màu *dung dịch kali permanganat 5 % (TT)* khi đun nóng.

Peroxyd

A. Nhỏ 1 giọt dung dịch chế phẩm vào 10 ml *dung dịch acid sulfuric 2 % (TT)*, thêm 2 ml *ether (TT)* và 1 giọt *dung dịch kali dicromat 5 % (TT)*, lắc, lớp ether có màu xanh.

B. Lấy 1 ml dung dịch chế phẩm, acid hóa nhẹ bằng *dung dịch acid sulfuric 10 % (TT)*, thêm từng giọt *dung dịch kali iodid (TT)*, sẽ giải phóng iod, làm xanh hồ tinh bột (TT).

Phosphat

A. Hòa tan khoảng 50 mg chế phẩm trong 3 ml *nước* hoặc dùng 3 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa dung dịch bằng *dung dịch acid nitric loãng (TT)*, thêm 2 ml *dung dịch amoni molybdat (TT)* sẽ hiện tủa màu vàng.

B. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Trung tính hóa dung dịch bằng *dung dịch acid nitric loãng (TT)* hoặc *dung dịch natri hydroxyd (TT)*. Thêm 1 ml *dung dịch bạc nitrat 4 % (TT)* sẽ tạo tủa màu vàng, màu của tủa không thay đổi khi đun sôi, tủa tan khi thêm *dung dịch amoniac 10 M (TT)*.

Salicylat

A. Lấy 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,5 ml *dung dịch sắt (III) clorid 10,5 % (TT)*, xuất hiện màu tím, màu không bị mất khi thêm 0,1 ml *dung dịch acid acetic 5 M (TT)*.

B. Hòa tan khoảng 0,5 g chế phẩm trong 10 ml *nước* hoặc dùng 10 ml dung dịch theo chỉ dẫn của chuyên luận. Thêm 0,5 ml *acid hydrochloric (TT)*, sẽ xuất hiện tủa kết tinh màu trắng. Lọc lấy tủa, rửa tủa bằng *nước* đến phản ứng trung tính với giấy quỳ và làm khô trong bình hút ẩm có chứa *acid sulfuric (TT)*. Nhiệt độ nóng chảy của tủa từ 156 °C đến 161 °C (Phụ lục 6.7).

Sắt (II) (muối)

Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng với 10 mg sắt (II) trong 1 ml *nước*, hoặc dùng 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch kali fericyanid 5 % (TT)*, tủa màu xanh lam tạo thành, tủa này không tan trong *dung dịch acid hydrochloric 2 M (TT)*.

Sắt (III) (muối)

A. Hòa tan một lượng chế phẩm có chứa khoảng 0,1 mg sắt (III) trong 3 ml *nước* hoặc dùng 3 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch acid hydrochloric 2 M (TT)* và 1 ml *dung dịch kali thiocyanat (TT)*, dung dịch có màu đỏ. Dùng 2 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1 ml dung dịch thu được ở trên. Một ống cho thêm 5 ml *alcol amylic (TT)* hoặc *ether (TT)*, lắc và để yên, lớp dung môi có màu hồng. Cho vào ống nghiệm kia 3 ml *dung dịch thủy ngân (II) clorid 5 % (TT)*, màu đỏ sẽ biến mất.

B. Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng với 1 mg sắt (III) trong 1 ml *nước* hoặc dùng 1 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch kali ferocyanid (TT)* tủa màu xanh lam tạo thành, tủa này không tan trong *dung dịch acid hydrochloric 2 M (TT)*.

Silicat

Trong một chén nung bằng chì hay bằng bạch kim, dùng một sợi dây đồng trộn đều một lượng chất đề thử với 10 mg *natri fluorid* (TT) và 0,2 ml *acid sulfuric đậm đặc* (TT). Đặt chén bằng một nắp nhựa dẻo trong, mỏng; dưới nắp nhựa có một giọt nước. Đun nóng nhẹ, sẽ thấy xuất hiện một vòng màu trắng xung quanh giọt nước.

Stibi (antimony, hợp chất)

Hòa tan bằng cách đun nóng nhẹ khoảng 10 mg chế phẩm trong 10 ml *dung dịch natri kali tartrat 5 %* và để nguội. Lấy 2 ml *dung dịch* này hoặc 2 ml *dung dịch* chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận, nhỏ vào đó từng giọt *dung dịch natri sulfid* (TT), tủa màu đỏ cam tạo thành, tủa này sẽ tan khi thêm *dung dịch natri hydroxyd 2 M* (TT).

Sulfat

A. Hòa tan 45 mg chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc dùng 5 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 1 ml *dung dịch acid hydrochloric 2 M* (TT) và 1 ml *dung dịch bari clorid 5 %* (TT), sẽ có tủa màu trắng tạo thành.

B. Thêm 0,1 ml *dung dịch iod 0,1 N* vào hỗn dịch thu được ở phản ứng trên, hỗn dịch có màu vàng (phân biệt với sulfit và dithionit) nhưng mất màu khi thêm từng giọt *dung dịch thiếc (II) clorid* (TT) (phân biệt với iodat). Đun sôi hỗn hợp, không được tạo thành tủa có màu (phân biệt với selenat và tungstat).

Sulfid

Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch acid hydrochloric 10 %* (TT), khí bay ra có mùi của hydrosulfid, khí này sẽ làm nâu hoặc đen *giấy tẩm dung dịch chì acetat* (TT) đã thấm *nước*.

Bisulfit và sulfit

A. Hòa tan khoảng 0,1 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch acid sulfuric 10 %* (TT). Đun nóng nhẹ, sẽ có khí lưu huỳnh dioxyd bay ra và làm đen *giấy tẩm dung dịch thủy ngân (II) nitrat* (TT).

B. Nhỏ từng giọt *dung dịch iod 0,1 N* vào *dung dịch* chế phẩm, màu của *dung dịch iod* sẽ mất.

Tartrat

A. Hòa tan khoảng 15 mg chế phẩm trong 5 ml *nước* hoặc dùng 5 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,05 ml *dung dịch sắt (II) sulfat 1 %* và 0,05 ml *dung dịch hydrogen peroxyd 10 tt* (TT); màu vàng không bền vững được tạo thành, sau khi màu vàng biến mất, thêm từng giọt *dung dịch natri hydroxyd 2 M* (TT), xuất hiện màu tím hay đỏ tía.

B. Lấy 0,1 ml *dung dịch* chế phẩm chứa khoảng 15 mg acid tartric trong 1 ml hoặc dùng 0,1 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 0,1 ml *dung dịch kali bromid 10 %* (TT), 0,1 ml *dung dịch resorcin 2 %* (TT) và 3 ml *acid sulfuric* (TT). Đun trên cách thủy 5 min đến 10 min sẽ

xuất hiện màu xanh lam thẫm. Để nguội và rót *dung dịch* vào *nước*, màu chuyển thành đỏ.

Thiosulfat

A. Hòa tan 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vài giọt *dung dịch iod 0,1 N*, màu của iod biến mất.

B. Hòa tan 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm vài giọt *dung dịch acid hydrochloric 10 %* (TT), có tủa màu trắng dần chuyển thành màu vàng và có khí lưu huỳnh dioxyd bay ra làm đen *giấy tẩm dung dịch thủy ngân (II) nitrat* (TT).

C. Hòa tan 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước* hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1 ml *dung dịch bạc nitrat 4 %* (TT), tủa màu trắng xuất hiện, chuyển nhanh sang màu vàng rồi dần dần sang màu đen.

Thủy ngân (muối)

A. Nhỏ 2 giọt đến 3 giọt *dung dịch* thử lên một miếng *đồng phôi* (TT) đã được cọ sạch, sẽ xuất hiện vết hoen màu xám tối; vết này sáng ra khi được lau nhẹ. Đốt nóng phôi đồng đó trong ống nghiệm thì vết hoen sẽ mất.

B. Hòa tan khoảng 0,10 g chế phẩm trong 2 ml *nước*, nếu là thủy ngân oxyd thì hòa tan trong 2 ml *dung dịch acid hydrochloric 10 %* (TT), hoặc dùng 2 ml *dung dịch* theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm từng giọt *dung dịch kali iodid* (TT) sẽ cho tủa màu đỏ, tủa tan trong thuốc thử quá thừa [đối với muối thủy ngân (II)].

Nếu là muối thủy ngân (I), khi thêm từng giọt *dung dịch kali iodid* (TT) sẽ cho tủa màu vàng, sau đó chuyển sang màu lục.

Nhóm xanthin

Trộn vài miligam chế phẩm hoặc lấy một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận với 0,1 ml *dung dịch hydrogen peroxyd 100 tt* (TT) và 0,3 ml *dung dịch acid hydrochloric 2 M* (TT), đun trên cách thủy tới khô, sẽ có cặn màu đỏ hơi vàng, thêm 0,1 ml *dung dịch amoniac 2 M* (TT), màu của cặn sẽ chuyển thành tím đỏ.

8.2 ĐỊNH TÍNH CÁC PENICILIN**Phương pháp sắc ký lớp mỏng**

Tiến hành phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4), bản mỏng (pha tĩnh) là silica gel H đã được silan hoá.

Chăm riêng biệt lên bản mỏng 2 µl mỗi *dung dịch* sau:

Dung dịch 1: *Dung dịch* thử.

Dung dịch 2 và 3: Các *dung dịch* có chứa các chất đối chiếu tương ứng trong Bảng 8.2.

Sau khi triển khai sắc ký, để khô bản mỏng ngoài không khí, đặt bản mỏng vào bình có hơi iod cho đến khi xuất hiện các vết. Quan sát các vết dưới ánh sáng ban ngày. Trên sắc ký đồ, vết chính thu được của *dung dịch* (1) phải tương ứng về vị trí, màu sắc và kích thước với vết thu được của *dung dịch* (2). Đối với benzathin penicilin và procain penicilin,

Bảng 8.2 - Định tính các penicilin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tên mẫu	Dung môi để hoà tan	Nồng độ %	Chất đối chiếu trong dung dịch 2	Chất đối chiếu trong dung dịch 3	Pha động	Yêu cầu đối với phép thử
Amoxycilin natri	A	0,25	Amoxycilin trihydrat	Amoxycilin trihydrat + Ampicilin trihydrat	B	A
Amoxycilin trihydrat	A	0,25	Amoxycilin trihydrat	Amoxycilin trihydrat + Ampicilin trihydrat	B	A
Ampicilin	A	0,25	Ampicilin khan	Ampicilin khan + Amoxycilin trihydrat	B	A
Ampicilin natri	A	0,25	Ampicilin trihydrat	Ampicilin trihydrat + Amoxycilin trihydrat	B	A
Ampicilin trihydrat	A	0,25	Ampicilin trihydrat	Ampicilin trihydrat + Amoxycilin trihydrat	B	A
Benzathin penicilin	C	0,5	Benzathin benzylpenicilin	—	A*	B
Benzylpenicilin kali	D	0,5	Benzylpenicilin kali	Benzylpenicilin kali + Phenoxymethylpenicilin kali	A	A
Benzylpenicilin natri	D	0,5	Benzylpenicilin natri	Benzylpenicilin natri + Phenoxymethylpenicilin kali	A	A
Cloxacilin natri	D	0,5	Cloxacilin natri	Cloxacilin natri + Dicloxacilin natri + Flucloxacilin natri	A	C
Dicloxacilin natri	D	0,5	Dicloxacilin natri	Cloxacilin natri + Dicloxacilin natri + Flucloxacilin natri	A	C
Flucloxacilin natri	D	0,5	Flucloxacilin natri	Cloxacilin natri + Dicloxacilin natri + Flucloxacilin natri	A	C
Phenoxymethylpenicilin	E*	0,5	Phenoxymethylpenicilin	Phenoxymethylpenicilin kali + Benzylpenicilin kali	A	A
Phenoxymethylpenicilin kali	D	0,5	Phenoxymethylpenicilin kali	Phenoxymethylpenicilin kali + Benzylpenicilin kali	A	A
Procain penicilin	E	0,5	Procain benzylpenicilin	—	A*	B

dung dịch 1 phải có 2 vết chính tương ứng về vị trí, màu sắc và kích thước với 2 vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch 2. Phép thử chỉ có giá trị khi đạt các yêu cầu được chỉ ra trong Bảng 8.2.

Các hệ dung môi khai triển (Pha động)

A: Hỗn hợp của dung dịch amoni acetat 15,4 % (TT) và aceton (TT) (70 : 30), được điều chỉnh tới pH 5,0 bằng acid acetic khan (TT) nếu như không có các chỉ dẫn khác trong bảng [A*: Điều chỉnh pH của pha động tới 7,0 bằng amoniac (TT)].

B: Hỗn hợp của dung dịch amoni acetat 15,4 % (TT) và aceton (TT) (90 : 10) được điều chỉnh tới pH 5,0 bằng acid acetic khan (TT).

Dung môi

A: Dung dịch natri hydrocarbonat 4,2 % (TT).

B: Hỗn hợp aceton - methanol (1 : 1).

C: Methanol.

D: Nước.

E: Aceton (E*: Dùng nước là dung môi cho dung dịch 3).

Yêu cầu đối với phép thử

A: Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ dung dịch (3) tách ra 2 vết rõ ràng, riêng biệt.

B: Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ dung dịch (2) tách ra 2 vết rõ ràng, riêng biệt.

C: Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ dung dịch (3) tách ra 3 vết rõ ràng, riêng biệt.

8.3 PHẢN ỨNG MÀU CỦA CÁC PENICILIN VÀ CEPHALOSPORIN

A. Cho 2 mg chế phẩm vào một ống nghiệm (kích thước 15 cm × 1,5 cm), làm ẩm với 0,05 ml nước, thêm 2 ml acid sulfuric (TT). Lắc đều hỗn hợp và quan sát màu của dung dịch. Đặt ống nghiệm trong cách thủy sôi trong 1 min và lại quan sát màu. Dung dịch có màu tương ứng trong Bảng 8.3.

B. Lặp lại cách thử như phản ứng A, nhưng thay 2 ml acid sulfuric (TT) bằng 2 ml dung dịch formaldehyd trong acid sulfuric (TT). Dung dịch có màu tương ứng trong Bảng 8.3.

Bảng 8.3 - Phản ứng màu của các penicilin và cephalosporin

Tên mẫu	Acid sulfuric (TT)	Acid sulfuric (TT) sau 1 min ở 100°C	Dung dịch formaldehyd trong acid sulfuric (TT)	Dung dịch formaldehyd trong acid sulfuric (TT) sau 1 min ở 100 °C
Amoxicilin natri			Hầu như không màu	Vàng sẫm
Amoxicilin trihydrat			Hầu như không màu	Vàng sẫm
Ampicilin			Hầu như không màu	Vàng sẫm
Ampicilin natri			Hầu như không màu	Vàng sẫm
Ampicilin trihydrat			Hầu như không màu	Vàng sẫm
Benzathin penicilin			Hầu như không màu	Nâu đỏ
Benzylopenicilin kali			Hầu như không màu	Nâu đỏ
Benzylopenicilin natri			Hầu như không màu	Nâu đỏ
Cefaclor			Hầu như không màu	Vàng nâu
Cefadroxil			Vàng	Da cam
Cefixim			Vàng	Da cam
Cefotaxim natri			Vàng sáng	Nâu
Cefradin			Vàng nhạt	Vàng sẫm
Cephalexin			Vàng nhạt	Vàng sẫm
Cephaloridin	Vàng nhạt	Hầu như không màu	Đỏ	Đỏ nâu
Cephalothin natri	Vàng (màu chuyển nhanh)	Hồng nâu	Đỏ	Đỏ nâu
Cloxacilin natri			Vàng xanh lá nhạt	Vàng
Dicloxacilin natri			Vàng xanh lá nhạt	Vàng
Flucloxacilin natri			Vàng xanh lá nhạt	Vàng
Phenoxymethyl penicilin			Nâu đỏ	Nâu đỏ sẫm
Phenoxymethyl penicilin kali			Nâu đỏ	Nâu đỏ sẫm
Procaïn penicilin	Hầu như không màu	Hầu như không màu	Hầu như không màu	Nâu đỏ