

# THỰC HIỆN KIỂM TRA MÁY SẮC KÝ LỎNG

Sắc ký lỏng hiệu năng cao ( HPLC) là một trong những kỹ thuật chính được dùng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm phân tích. Máy sắc ký lỏng đã được phát triển trong ngành Dược, hóa chất , thực phẩm, mỹ phẩm, và môi trường. Để đảm bảo rằng dữ liệu thu được từ máy sắc ký lỏng là tin cậy, hệ thống máy sắc ký lỏng nên được theo dõi thường xuyên từng thời kỳ. Trong qui trình này , vài tiêu chuẩn đánh giá cho một hệ thống HPLC ( bao gồm một bơm bốn kênh, một bộ tự động tiêm mẫu, một detector UV-VIS, và một buồng điều khiển nhiệt độ cho cột) sẽ được thảo luận.

**Bảng 1 : Thực hiện tiêu chuẩn của HPLC**

Môđun HPLC	Thực hiện đặc tính	Kết quả mong đợi
Pump	Độ chính xác tốc độ dòng	$\pm 1\%$ của tốc độ dòng cài đặt
	Độ chính xác của gradient	$\pm 1\%$ tổng hợp của gradient
	Kiểm tra áp suất	Kiểm tra chức năng valve đúng đắn , không có rò rỉ từ bơm
Injector	Độ đúng	RSD < 1%
	Độ tuyến tính	$R^2 \geq 0.999$
	Carryover	< 1%
Detector	Độ chính xác bước sóng	$\pm 2$ nm
	Độ tuyến tính	$R^2 \geq 0.999$
	Nhiều và độ trôi	Noise : $10^{-5}$ AU Drift : $10^{-4}$ AU/Hr

## PUMP :

- **Độ chính xác tốc độ dòng** : Một yêu cầu quan trọng của Modul Pump là có thể duy trì chính xác của tốc độ dòng pha động, mục đích điều này sẽ là cần thiết để đảm bảo sự ổn định và độ lặp lại tác động pha phân tích và pha tĩnh. Sự chính xác kém sẽ ảnh hưởng đến thời gian lưu của sự chia tách.

Độ chính xác của tỉ lệ dòng có thể tính đơn giản bằng cân 4 số lẻ.

Thí dụ : 0.5 ml/phút , cài đặt 10 phút , cân trọng lượng và tính lại trung bình .

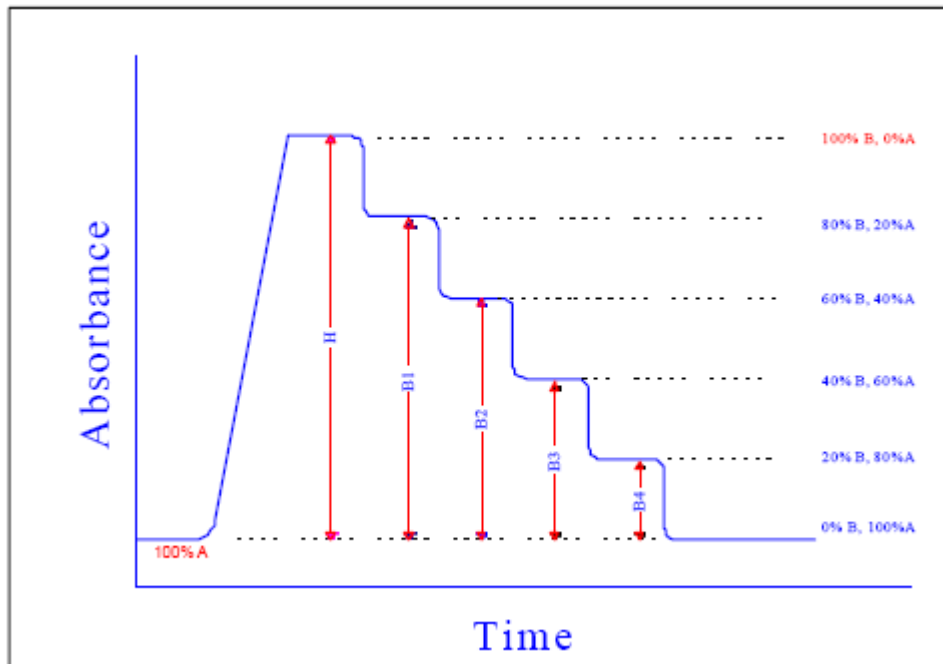
1.0 ml/phút , cài đặt 5 phút

2.0 ml/phút , cài đặt 5 phút

Sau đó vẽ đồ thị của lưu lượng và trọng lượng tương ứng .

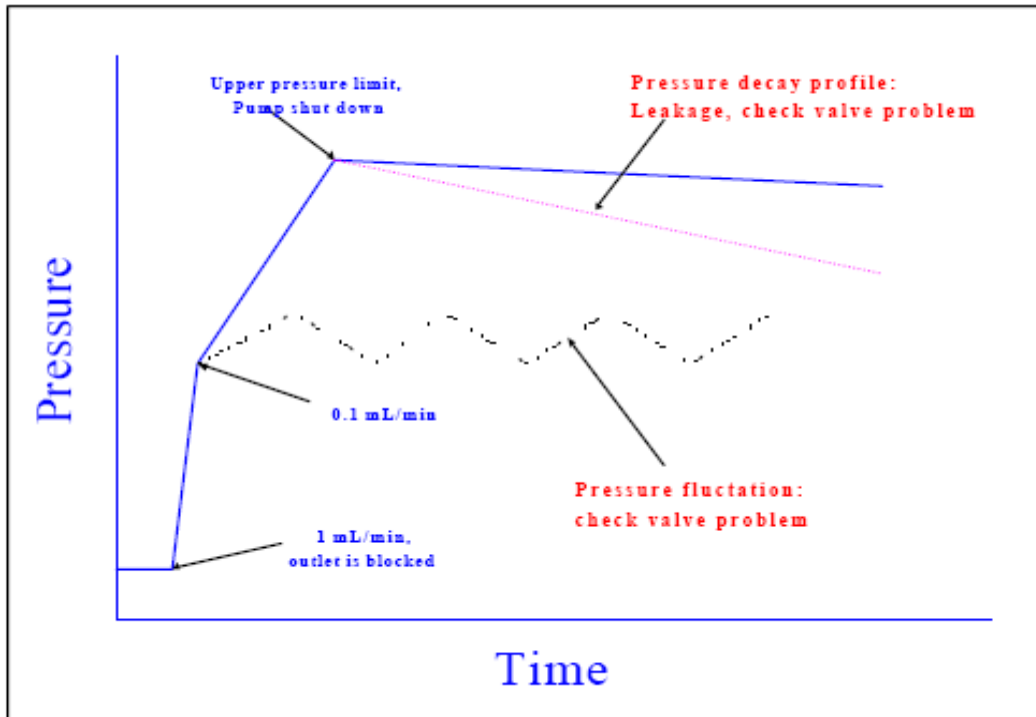
- Độ chính xác Gradient và độ tuyến tính** : Khi phân tích gradient, khả năng của pump là phân phối pha động.  
 Sự chính xác và độ tuyến tính của sự phân phối gradient dung môi có thể kiểm tra gián tiếp bằng cách quan sát sự thay đổi của độ hấp thụ. Kiểm tra này được thực hiện cho hai kênh một lần. Kênh A được dùng là dung môi tinh khiết chẳng hạn như methanol, IPA, nước, trong khi kênh B là một dung môi chứa một vết hấp thụ UV chẳng hạn như 0.5% Acetone trong nước. Không cho hệ thống qua cột tách mà chỉ qua cuộn dây mao quản có áp suất vào khoảng 20 -30 Bar ( 280 psi – 420 psi )  
 100% B, 0% A trong 10 phút  
 80% B, 20 % A trong 10 phút  
 60% B, 40 % A trong 10 phút  
 40% B, 60 % A trong 10 phút  
 20% B, 80 % A trong 10 phút  
 0% B, 80 % A trong 10 phút  
 Đo ở bước sóng 254 nm  
 Nếu hỗn hợp của 20% A và 80% B là chính xác thì chiều cao độ hấp thụ của nó sẽ bằng 80% của chiều cao độ hấp thụ của 100% B  
 Tiếp theo xử lý cho kênh C và D cũng như trên.

**Hình 1** : Độ tuyến chính xác của gradient và độ tuyến tính.



- Kiểm tra áp suất** : Bơm LC phụ thuộc vào chức năng đóng dẫn của check valve và nối đường ống đóng dẫn. Kiểm tra áp suất của bơm sẽ hữu ích về chất lượng để kiểm tra check valve và để xác định có hay không có rò rỉ trong hệ thống. Trước nhất đây ngõ ra của bơm bằng một nút kín và cài đặt bơm tự động ngưng ( Shutdown ) ở áp suất 6.000 psi. Bơm dung môi methanol ở 1 ml/phút. Áp suất trong đầu bơm nhanh vì

ngõ ra bị chặn lại. Khi áp suất tăng đến 3.000 psi, cài tỉ lệ dòng giảm xuống còn 0.1 ml/phút. Lúc này áp suất sẽ tăng từ từ đến áp suất shutdown, nếu check valve có thể giữ pha động trong buồng bơm là mong đợi bình thường như hình 2. Nếu check valve không hoạt động đúng đắn, áp suất sẽ dao động ở trên 3.000 psi thay vì đạt đến áp suất tự động ngưng. Áp suất của bơm giảm chậm từ từ sau khi tự động ngưng.



### INJECTOR MODUN ( Bộ phận tiêm mẫu ):

- Độ đúng** : Khả năng của van tiêm mẫu để đưa cùng một lượng mẫu tiêm lặp lại là quyết định sự đúng và chính xác của diện tích đỉnh hay chiều cao đỉnh hầu so sánh trong định lượng ngoại chuẩn. Nếu sự thay đổi của mẫu và chuẩn được tiêm vào cột không được kiểm soát chặt chẽ, nguyên tắc định lượng ngoại chuẩn là một so sánh tồi. Không thể so sánh đầy đủ ý nghĩa giữa diện tích của mẫu và chuẩn có thể được thực hiện. Sự chính xác tuyệt đối của thể tích tiêm thì không là then chốt bằng số lượng mẫu của chuẩn và mẫu được tiêm vào.  
Độ đúng của van tiêm mẫu có thể biểu thị bằng cách làm ít nhất 6 lần lặp lại tiêm cùng một mẫu. Độ lệch chuẩn tương đối ( RSD ) của diện tích của các lần tiêm được tính toán để đánh giá sự đúng.
- Tuyến tính** : Hầu hết van tiêm mẫu tự động có khả năng thay đổi thể tích tiêm không cần phải thay đổi vòng lúp tiêm. Thay đổi thể tích mẫu sẽ được đưa vào vòng lúp tiêm mẫu bởi ống tiêm bởi ống tiêm hay thiết bị đo khác. Tính đồng dạng của vòng lúp mẫu và khả năng của thiết bị đo đưa những số lượng khác nhau của mẫu trong tỉ lệ thích ứng sẽ ảnh hưởng sự tuyến tính của thể tích tiêm. Độ tuyến tính thì quan trọng đối với những phương pháp mà yêu cầu dùng những thể tích tiêm thay đổi, chẳng hạn như phương pháp cao-thấp trong định lượng không tinh khiết.

- **Nhiễm chéo mẫu trước ( Carryover )** : Không phải nhà cung cấp nào cũng thực hiện kiểm tra này vì nó rất phụ thuộc vào phân tích. Một lượng nhỏ của phân tích có thể nhiễm vào từ mẫu trước đó đi vào mẫu kế tiếp . Sự nhiễm mang sang này sẽ ảnh hưởng đến sự định lượng chính xác của mẫu tiếp theo. Để tránh nhiễm chéo từ mẫu trước, tất cả van tiêm có tiếp xúc với mẫu ( vòng lúp mẫu, kim tiêm ,...) phải được rửa sạch sau mỗi lần tiêm. Hiệu quả của rửa sạch có thể được đánh giá bằng cách tiêm một mẫu trắng sau khi tiêm một mẫu có nồng độ cao trong phân tích. Diện tích của phân tích tìm thấy trong mẫu trắng là phần trăm của diện tích nồng độ mẫu có thể được dùng xác định cấp độ của sự nhiễm mang sang.

## **ĐẦU DÒ TỬ NGOẠI KHẢ KIẾN :**

- **Độ chính xác bước sóng** .

Độ chính xác bước sóng được định nghĩa là độ lệch của bước sóng đo ở một độ hấp thu hay dải phát xạ từ bước sóng đã biết của dải. Vấn tất , độ chính xác và độ nhạy của phép đo sẽ là sai sót nếu độ chính xác bước sóng có vấn đề.

Có nhiều cách để kiểm tra độ chính xác bước sóng của đầu dò tử ngoại và khả kiến. Kiểm tra bước sóng từ bên trong máy, vạch đèn deuterium ở 656 nm, và những dải hấp thu ở 360, 418, 453, và 536 nm trong kính lọc holmium được dùng. Vạch đèn D2 và kính homium thì dễ dùng, nhưng hạn chế chỉ đo trong vùng khả kiến. Kiểm tra bước sóng trong vùng tử ngoại được thực hiện bằng cách bơm đầy flow cell một dung dịch của một cấu tử đã biết độ hấp thu và quét phổ dung dịch cho độ hấp thu cực đại và cực tiểu. Với  $\lambda_{max}$  hay  $\lambda_{min}$  từ phổ thu được so sánh với  $\lambda_{max}$  hay  $\lambda_{min}$  của cấu tử đã biết để xác định độ chính xác của bước sóng. Dung dịch của potassium dichromate trong perchloric acid và holium oxide trong perchloric acid có thể được sử dụng . Tuy nhiên , những dung dịch có tính acid rất khó làm sạch flow cell bằng dòng chảy sau khi đo vì những vết hùynh quang từ dung dịch potassium dichromate. Dung dịch pha loãng caffeine thì dễ dàng chuẩn bị với  $\lambda_{max}$  ở 273 nm và 205 nm và  $\lambda_{min}$  ở 244 nm.

- **Độ tuyến tính** :

Khi phân tích thật sự nồng độ có thể thay đổi, do đó khả năng của một đầu dò là đáp ứng tuyến tính của nồng độ trong một vùng cho phép dựa trên chính xác của diện tích và chiều cao đỉnh để so sánh giữa các chuẩn và các mẫu. Độ tuyến tính của detector có thể kiểm tra bằng cách tiêm một dãy dung dịch chuẩn thay đổi nồng độ . Nồng độ nê từ 0 đến ít nhất là 1.0 AU. Độ hấp thu vượt quá 1.5 AU sẽ ảnh hưởng đến ánh sáng lạc. Vẽ đồ thị giữa nồng độ và độ đáp ứng để tính toán độ tuyến tính dựa vào hệ số tương quan ( $r^2$ ).

Chuẩn bị pha động acetonitrile: 0.1% acid acetic (13:87), 1ml/phút

Bước sóng  $\lambda$  : 273 nm

Nhiệt độ môi trường ( 15 – 27°C ).

Chuẩn caffeine, cân 75mg pha vào trong bình định mức 100 ml (C5), sau đó pha loãng dãy nồng độ gốc này: lấy 5 ml pha vào 100ml (C1), lấy 10ml pha trong 100ml (C2), lấy 20ml/100ml (C3), lấy 30ml/100ml (C4).

Tiêm mẫu 10 $\mu$ L của C1, C2, C3, C4, C5 vào máy và vẽ đồ thị tương ứng với diện tích.

- **Nhiều và độ trôi :**

Không phải tất cả các nhà cung cấp thực hiện kiểm tra này. Với hệ thống cũ có thể không còn đúng tỉ số tín hiệu trên nhiễu như thiết bị mới .

Mạch điện tử , bơm, và nhiễu thiết bị đo quang, đèn yếu, đo flow cell, nhiệt độ không ổn định sẽ góp phần làm nhiễu và trôi detector. Nhiễu cao có thể giảm độ nhạy của detector và như vậy ảnh hưởng đến sự định lượng lượng phân tích nồng độ thấp.

Detector trôi có thể ảnh hưởng đến sự xác định đường nền và tích phân pick. Nhiễu qui trình đánh giá cho nhiễu và độ trôi của detector dựa trên ASTM ( American Society for Testing and Material) Method E 685. Ngày nay hầu hết phần mềm sắc ký đều có khả năng tính toán nhiễu và độ trôi của detector. Đặc biệt , detector nên được làm nóng trước khi kiểm tra, và những bất ổn nhiệt độ nên được tránh trong khi kiểm tra. Điều kiện kiểm tra động, methanol được chảy qua flow cell là 1ml/phút. Áp suất vào khoảng 500 psi để phòng ngừa bọt khí.