

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 quy 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 chuyển 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 :

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

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;