

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;

ν_β là số sóng của kiểu dao động;

P_0 là công suất của tia laser.

Mặt cắt ngang σ , 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, phần 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:

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

Từ các phương trình nêu trên, ta thấy tín hiệu của pic tỷ lệ thuận với nồng độ. Mỗi 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 đo 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 $(\nu_L - \nu_\beta)^4$ 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 bằng 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 bằng 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 lục) 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 cẩn 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 do 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 mảng 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.

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 gộp 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.

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 tròn 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	Điện 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

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 tái 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 trực tiếp 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. Dung sai bước sóng có thể thay đổi tùy theo áp dụng cụ thể.

Hiệu chuẩn cường độ (trục y)

Việc hiệu chỉnh trực tiếp 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 ra

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 nảy 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 quy 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 thăm 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 nhiều 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 trí 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 chỉ 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:

$$\beta\Delta\bar{\nu}$$

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.

$\Delta\bar{\nu}$ 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 $\text{cm}^{-1} = 100 \text{ m}^{-1}$.

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.