

4.2 PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI

NGUYÊN TẮC

Quang phổ hồng ngoại (infrared - IR), hay quang phổ hấp thụ hồng ngoại, quang phổ IR, dựa trên tương tác giữa bức xạ IR với chất phân tích. Sự tương tác với bức xạ hồng ngoại làm cho phân tử chất phân tích sẽ hấp thụ bức xạ IR ở các tần số thích hợp để tăng trạng thái dao động của các nhóm chức hoặc kích thích các dao động nội phân tử và liên phân tử lên mức cao hơn tạo ra một phổ hấp thụ IR với các dải đặc trưng tương ứng với các nhóm chức của phân tử.

Vùng bước sóng IR có thể được chia ra thành 3 phân vùng là hồng ngoại gần (cận hồng ngoại), hồng ngoại giữa và hồng ngoại xa với các dải bước sóng lần lượt là 0,8 - 2,5 μm , 2,5 - 25 μm và 25 - 1000 μm . Tuy nhiên, trong quang phổ IR số sóng hay được sử dụng hơn bước sóng, và được tính toán theo công thức sau:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \times 10^4$$

Trong đó $\tilde{\nu}$ là số sóng tính theo cm^{-1} và λ là bước sóng tính theo μm . Theo đó, dải từ 12.500 - 4000 cm^{-1} là hồng ngoại gần, dải từ 4000 - 400 cm^{-1} là hồng ngoại giữa và dải từ 400 - 10 cm^{-1} là hồng ngoại xa.

Chuyên luận này chỉ đề cập đến phổ hồng ngoại giữa, dải từ 4000 - 400 cm^{-1} (2,5 - 25 μm), nên hồng ngoại được nhắc đến ở tất cả các nội dung sau đây được hiểu là hồng ngoại giữa. Ở vùng hồng ngoại này, các dao động phân tử cơ bản của các nhóm chức xuất hiện trên phổ dưới dạng các dải hấp thụ. Vùng số sóng dưới 1500 cm^{-1} còn được gọi là “vùng vân tay”, vì vùng phổ này rất phức tạp và chứa nhiều thông tin đặc trưng cho phân tử chất phân tích. Vùng hồng ngoại gần là nơi xuất hiện tín hiệu của các bội tần và sự kết hợp tín hiệu của các dao động cơ bản, chủ yếu của các liên kết C-H, N-H và O-H tạo nên. Vùng hồng ngoại xa là nơi xuất hiện tín hiệu của các dải hấp thụ liên quan tới cấu trúc mạng tinh thể, liên kết hydro, các dao động biến dạng góc của các nguyên tử có nguyên tử khối lớn và chuyển động xoay của phân tử.

ỨNG DỤNG

Vì các dải hấp thụ trên phổ IR đặc trưng cho các nhóm chức cấu thành hợp chất, phương pháp quang phổ IR được sử dụng rộng rãi để định tính các hợp chất và cung cấp thông tin về cấu trúc của chúng. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng nhằm mục đích định lượng, các ứng dụng định lượng đòi hỏi thiết lập một mối quan hệ toán học giữa cường độ bức xạ được mẫu hấp thụ và nồng độ của thành phần cần định lượng trong mẫu.

Quang phổ IR được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược để phân tích hóa học và vật lý trong phòng thí nghiệm, và có nhiều ứng dụng đa dạng trong quy trình sản xuất.

Quang phổ IR cho phép ứng dụng Công nghệ phân tích quy trình (Process Analytical Technology - PAT) như là một phần của chiến lược kiểm soát tiên tiến.

Phân tích hóa học:

- Định tính dược chất, tá dược, chế phẩm, sản phẩm trung gian, hóa chất và vật liệu bao gói.
- Kiểm tra chất lượng dược chất, tá dược, chế phẩm, sản phẩm trung gian và vật liệu bao gói, bao gồm so sánh phổ giữa các lô và đánh giá khi thay đổi nhà cung cấp.
- Định lượng dược chất trong nền mẫu, xác định hàm lượng nước và dung môi.
- Định lượng tạp chất (VD: trong các loại khí, vật liệu vô cơ).
- Theo dõi phản ứng (VD: trong tổng hợp hữu cơ).

Phân tích vật lý:

- Xác định các dạng thù hình của chất rắn như tính đa hình.

HẠN CHẾ

Những hạn chế cần chú ý khi sử dụng quang phổ IR bao gồm:

- Có thể phải sử dụng thêm kỹ thuật phân tích bổ sung khác để định tính một chất.
- Không phân biệt được các đồng phân đối quang tinh khiết của một chất.
- Có thể không phải là phương pháp phù hợp cho phân tích vết.
- Điều kiện chuẩn bị mẫu (VD: sử dụng lực cơ học, dung môi) có thể làm thay đổi dạng kết tinh của một chất có tính đa hình.
- Trường hợp các mẫu không đồng nhất, lượng mẫu hạn chế có thể gây khó khăn cho quy trình phân tích.

CÁC CHẾ ĐỘ ĐO

Đo phổ IR dựa trên quá trình cho bức xạ xuyên qua hoặc chiếu vào một mẫu và đo mức suy giảm của bức xạ ra khỏi mẫu ở các bước sóng khác nhau. Hai quá trình này tương ứng với hai chế độ đo chính là truyền qua (transmission) và phản xạ toàn phần suy giảm (attenuated total reflection - ATR). Ngoài ra, với các ứng dụng cụ thể còn có các chế độ đo khác như khuếch tán (diffuse) và phản xạ bề mặt (specular reflection).

Chế độ truyền qua

Chế độ này dựa trên việc xác định độ truyền qua hay còn gọi là độ truyền quang (transmittance - T), là khả năng của mẫu truyền bức xạ IR tại một bước sóng (số sóng) cụ thể. Độ truyền qua được xác định như sau:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Trong đó:

I_0 : cường độ của bức xạ tới.

I : cường độ của bức xạ truyền qua.

Phổ thu được thể hiện sự thay đổi của độ truyền qua (T) trên trục y theo bước sóng hoặc số sóng trên trục x. Phổ có thể được biểu diễn theo độ hấp thụ (absorbance - A) trên trục y. Độ hấp thụ (A) có quan hệ với độ truyền qua (T) theo công thức sau:

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

Trong đó:

- a: hệ số hấp thụ mol của mẫu (cm².mol⁻¹).
- b: độ dày của mẫu (cm).
- c: nồng độ mẫu (mol.cm⁻³).

Chế độ phản xạ toàn phần suy giảm (ATR)

Chế độ ATR dựa trên hiện tượng phản xạ nội bộ toàn phần. Mẫu có chỉ số khúc xạ n₂ được tiếp xúc với một tinh thể (kim cương, germani, kẽm selenid hoặc vật liệu thích hợp khác) có chỉ số khúc xạ n₁ lớn hơn n₂. Một chùm tia IR được truyền qua tinh thể. Khi góc α tạo bởi tia tới và bề mặt tiếp xúc giữa mẫu và tinh thể vượt quá góc tới hạn α_c, về lý thuyết toàn bộ bức xạ tới sẽ được phản xạ (phản xạ nội bộ toàn phần).

Tuy nhiên, có một phần nhỏ bức xạ không tuân theo quy luật trên, chúng xâm nhập vào mẫu và bị hấp thụ một phần năng lượng. Do đó, bức xạ phản xạ toàn phần bị suy giảm so với bức xạ ban đầu và tạo ra một phổ hấp thụ đặc trưng cho mẫu phân tích. Trong thực tế, quá trình phản xạ nội bộ có thể được tiến hành liên tục nhiều lần để khuếch đại cường độ hấp thụ, mặc dù một số thiết bị chỉ cho phép thu tín hiệu phản xạ một lần duy nhất.

Độ sâu xâm nhập d_p thường cỡ vài micromet và được tính toán cho một bước sóng λ cụ thể theo công thức sau:

$$d_p = \frac{\lambda / n_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 \alpha - (n_2 / n_1)^2}}$$

Trong đó:

- d_p: độ sâu xâm nhập.
 - λ: bước sóng.
 - α: góc tới.
 - n₁, n₂: chỉ số khúc xạ của vật liệu làm tinh thể và mẫu.
- Do mối quan hệ giữa các thông số này, trong chế độ ATR cường độ hấp thụ lớn hơn tại vùng bước sóng lớn hơn (số sóng nhỏ hơn) và có xảy ra hiện tượng dịch chuyển các dải phổ so với phổ ở chế độ truyền qua. Do đó, không nên so sánh trực tiếp phổ ATR với phổ truyền qua khi định tính các chất.

THIẾT BỊ

Máy quang phổ IR phổ biến nhất là máy quang phổ chuyển dạng Fourier (Fourier - transform Infrared hay FT-IR) có cấu tạo bao gồm:

- Một nguồn sáng đa sắc thích hợp (ví dụ: thanh gốm dẫn điện).
- Một giao thoa kế.

- Một bộ phận mang mẫu.
- Một bộ phận phát hiện (detector).
- Một phần mềm thích hợp để điều khiển máy quang phổ, đánh giá phổ và xử lý dữ liệu.

Có thể sử dụng các loại máy quang phổ dựa trên những nguyên lý khác nếu đáp ứng các yêu cầu về kiểm soát hiệu năng của thiết bị.

Máy quang phổ IR cũng có thể được sử dụng kết hợp với kính hiển vi để nghiên cứu một phần nhỏ của mẫu hoặc hình ảnh hóa học của mẫu.

Quang phổ IR có thể được kết nối với các kỹ thuật phân tích khác như phân tích nhiệt hay sắc ký.

KIỂM SOÁT HIỆU NĂNG THIẾT BỊ

Độ đúng của thang số sóng và độ phân giải phổ là các thông số tối quan trọng và cần được kiểm tra. Các phép thử mô tả dưới đây có thể được sử dụng để kiểm tra hiệu năng và thẩm định thiết bị. Cũng có thể sử dụng các phép thử này để đánh giá tính phù hợp của hệ thống.

Các thông số này được kiểm tra bằng cách sử dụng các vật liệu chuẩn thích hợp. Các vật liệu chuẩn này được lựa chọn và sử dụng tùy thuộc vào chế độ đo (ví dụ: truyền qua hay ATR).

Với phân tích định lượng, cần xác lập các tiêu chí đánh giá thích hợp để kiểm soát cường độ hấp thụ.

THANG SỐ SÓNG

Thang số sóng thường được kiểm tra bằng cách sử dụng một lớp phim polystyren thể hiện các dải hấp thụ IR tại các số sóng trong Bảng 4.2.1.

Bảng 4.2.1 - Vị trí dải và các giới hạn dao động chấp nhận được của phim polystyren dùng để kiểm tra độ đúng của số sóng

Vị trí dải (cm ⁻¹)		Dao động cho phép (cm ⁻¹)
Truyền qua	ATR	
906,6	906,1	± 1,0
1028,3	1027,7	± 1,0
1601,2	1601,0	± 1,0
3060,0	3059,7	± 1,0

Với các chế độ đo không phải truyền qua hay ATR, vật liệu đối chiếu do người sử dụng máy xác định.

ĐỘ PHÂN GIẢI PHỔ

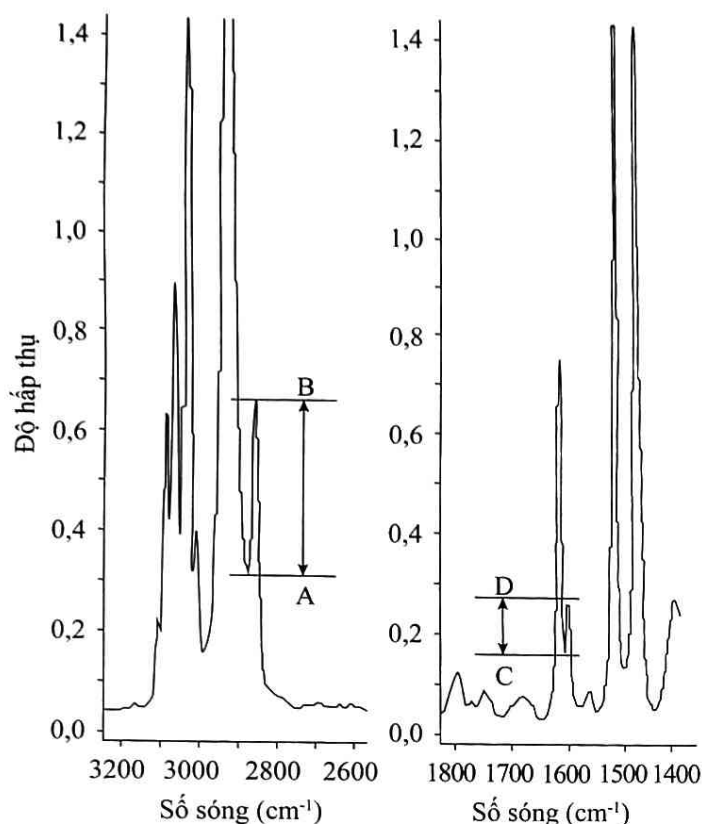
Phổ đo ở chế độ truyền qua

Độ phân giải phổ thường được kiểm tra bằng cách sử dụng một phim polystyren dày khoảng 35 μm.

Tiêu chí chấp nhận (xem Hình 1). Chênh lệch giữa các giá trị độ hấp thụ tại cực tiểu hấp thụ ở 2870 cm⁻¹ (A) và cực đại hấp thụ ở 2849,5 cm⁻¹ (B) phải lớn hơn 0,33; chênh lệch giữa các giá trị độ hấp thụ tại cực tiểu hấp thụ ở 1589 cm⁻¹ (C) và cực đại hấp thụ ở 1583 cm⁻¹ (D) phải lớn hơn 0,08.

Phổ đo ở chế độ ATR

Cần xác định các tiêu chí đánh giá thích hợp cho kiểm tra độ phân giải phổ theo tiêu chuẩn của từng máy quang phổ. Với các chế độ đo không phải truyền qua hay ATR, vật liệu đối chiếu do người sử dụng máy xác định.



Hình 4.2.1 - Phổ hấp thụ IR đặc trưng của polystyren dùng để đánh giá độ phân giải phổ.

QUY TRÌNH ĐO PHỔ

CHUẨN BỊ MẪU VÀ ĐƯA MẪU VÀO MÁY

Quy trình chuẩn bị mẫu và đưa mẫu vào máy thay đổi tùy theo trạng thái vật lý của mẫu và chế độ đo.

Chế độ truyền qua được áp dụng với các mẫu trong suốt như các chất lỏng tinh khiết, dung dịch, chất khí hay bột nhão được chuẩn bị phù hợp hoặc đĩa muối halogen kim loại kiểm được chuẩn bị phù hợp. Đối với chất lỏng và chất khí, có thể sử dụng buồng đo có độ dày cố định hoặc điều chỉnh được, có vách trong suốt với bức xạ IR. Với đĩa muối halogen kim loại kiểm, sử dụng những bộ phận đựng mẫu chuyên biệt.

Chế độ đo phản xạ như ATR thích hợp để đo nhiều loại mẫu ở trạng thái rắn và lỏng.

Lưu ý, một số phương thức chuẩn bị mẫu (ví dụ tạo bột nhão và đĩa ở chế độ truyền qua hay mẫu rắn ở chế độ ATR) có bước nghiền và/hoặc sử dụng áp lực có thể gây ra các thay đổi cấu trúc tinh thể không mong muốn.

Chế độ truyền qua

Chuẩn bị mẫu đo bằng một trong các phương pháp dưới đây tùy thuộc vào trạng thái của mẫu (rắn, lỏng hay khí).

Nếu không có chỉ dẫn khác, các dải đo được trên phổ của mẫu thử phải có độ truyền qua tối thiểu không dưới 5 %.

Chất lỏng: Đo phổ chất lỏng dưới dạng một lớp phim giữa hai tấm phẳng trong suốt với bức xạ IR hoặc trong buồng đo có độ dày phù hợp và trong suốt với bức xạ IR.

Chất lỏng hoặc chất rắn được pha thành dung dịch:

Chuẩn bị một dung dịch chất cần đo trong một dung môi thích hợp. Chọn nồng độ và buồng đo có độ dày phù hợp để thu được phổ đạt yêu cầu. Nói chung, khoảng nồng độ từ 10 - 100 g/L với buồng đo có độ dày từ 0,5 - 0,1 mm cho kết quả tốt. Độ hấp thụ của dung môi thường được hiệu chỉnh bằng cách đo lần lượt phổ của dung môi và dung dịch mẫu thử rồi trừ các dải hấp thụ của dung môi khỏi phổ của dung dịch mẫu thử.

Chất rắn phân tán trong nền rắn (đĩa): Nghiền mịn chất cần đo, cần cân nhắc tới những thay đổi có thể xảy ra (ví dụ dạng tinh thể) và trộn với một lượng thích hợp *kali bromid (TT)* hoặc *kali clorid (TT)* đã được nghiền mịn và làm khô, trừ khi có chỉ dẫn cụ thể khác. Thông thường, một hỗn hợp gồm vài miligam (1 - 2 mg) chất cần đo phổ trong vài trăm miligam (300 - 400 mg) muối halogen là đủ để tạo thành một đĩa đường kính 10 - 15 mm và cho một phổ có cường độ thích hợp. Nếu chất cần đo phổ là muối clorid, khuyến cáo sử dụng *kali clorid (TT)*. Cần thận nghiền mịn hỗn hợp, rải đều lên một khuôn thích hợp và nén bằng một lực thích hợp. Lực nén khoảng 800 MPa thường là đủ để tạo thành đĩa.

Với chất không ổn định trong điều kiện khí quyển bình thường hay chất dễ hút ẩm, có thể cần dập đĩa trong chân không. Một số yếu tố có thể dẫn tới đĩa tạo thành không đạt yêu cầu như nghiền chưa đủ mịn hay quá nhiều, độ ẩm hoặc tạp chất trong môi trường phân tán. Chẳng hạn, nước có mặt trong mẫu hoặc trong kali bromid có thể làm đĩa bị đục và tạo ra phổ truyền qua có cường độ thấp. Cần loại bỏ đĩa nếu đánh giá cảm quan cho thấy đĩa không trong suốt một cách đồng nhất hay trong trường hợp phổ đo được không có một dải hấp thụ đặc trưng, độ truyền qua thấp hơn 60 % hoặc độ hấp thụ cao hơn 0,22 tại số sóng khoảng 2000 cm⁻¹ (bước sóng khoảng 5 μm) mà không có hiệu chỉnh nền, trừ khi có yêu cầu cụ thể khác.

Chất rắn phân tán trong một chất lỏng (bột nhão): Nghiền mịn một lượng nhỏ chất cần phân tích với một lượng tối thiểu *parafin lỏng (TT)* hay chất lỏng thích hợp khác. Một hỗn hợp gồm vài miligam (5 - 10 mg) chất cần phân tích trong một giọt *parafin lỏng (TT)* thường đủ để tạo ra một bột nhão phù hợp. Ép bột nhão giữa hai tấm phẳng trong suốt với bức xạ IR. Bột nhão bị loại bỏ nếu cảm quan cho thấy không trong suốt một cách đồng nhất hoặc nếu phổ đo được có các đặc điểm như:

- Độ truyền qua thấp tại 4000 cm⁻¹.
- Đường nền dốc mạnh giữa 4000 và khoảng 2500 cm⁻¹.
- Tỷ lệ cường độ tương đối giữa một số dải hấp thụ thấp hơn dự kiến.

Chất rắn nấu chảy: Nếu có chỉ dẫn tại chuyên luận riêng, dùng khối chất rắn nấu chảy tạo thành một lớp phim và gắn cố định lên một khung thích hợp.

Dung dịch bay hơi: Nếu có chỉ dẫn tại chuyên luận riêng, hòa tan chất cần phân tích trong một dung môi thích hợp. Bay hơi dung môi trên một giá mang thích hợp để tạo thành phim và gắn cố định lớp phim lên một khung thích hợp.

Chất khí: Sử dụng một buồng đo thích hợp trong suốt với bức xạ IR. Hút không khí ra khỏi buồng đo, sử dụng một đường dẫn khí giữa buồng đo và bình chứa chất khí cần kiểm tra, mở van khóa hoặc van kim để nạp khí cần đo vào buồng đo tới áp suất mong muốn.

Nếu cần, điều chỉnh áp suất trong buồng đo theo áp suất khí quyển bằng một chất khí trong suốt với bức xạ IR (như nitrogen hoặc argon), hoặc dùng không khí không có carbon dioxyl.

Cần tuân thủ một quy trình đo phù hợp để hiệu chỉnh ảnh hưởng của hơi nước, carbon dioxyl hay các khí khác trong không khí.

Chế độ ATR

ATR phù hợp cho mẫu lỏng và rắn, không đòi hỏi quy trình chuẩn bị mẫu ngoại trừ các xử lý đơn giản như nghiền mịn các tinh thể lớn hoặc các mẫu thô. Tiến hành đo phổ như sau tùy thuộc thể chất mẫu (lỏng hay rắn).

Mẫu lỏng: Đưa mẫu tiếp xúc với tinh thể.

Mẫu rắn: Đảm bảo chất cần phân tích tiếp xúc gần và đồng nhất với toàn bộ bề mặt tinh thể bằng cách sử dụng áp lực hoặc hòa tan chất cần phân tích trong một dung môi thích hợp, sau đó phủ dung dịch này lên bề mặt tinh thể và bay hơi đến khô.

PHƯƠNG PHÁP

Quang phổ IR được sử dụng chủ yếu để định tính các chất, nhưng cũng có thể được dùng để định lượng. Phân tích định lượng (dựa trên định luật Lambert-Beer) không được mô tả ở đây.

Quy trình đo được thực hiện trên mẫu đã được chuẩn bị phù hợp. Sau đó dữ liệu được xử lý và đánh giá để định tính hay định lượng các chất.

Chất lượng phổ có thể được cải thiện nhờ tiền xử lý bằng toán học. Trong thực tế, việc tiền xử lý phổ bị hạn chế bởi việc chuẩn hóa phổ và việc loại trừ các dải hấp thụ do carbon dioxyl và hơi nước gây nên. Do đó, cần áp dụng cùng cách tiền xử lý cho cả phổ của mẫu thử và phổ của mẫu đối chiếu.

Định tính

Nếu không có chỉ dẫn khác, chuẩn bị chất cần phân tích theo cách phù hợp và đo phổ trong khoảng từ 4000 cm^{-1} đến 650 cm^{-1} .

Phép thử định tính được thực hiện bằng cách so sánh phổ của chất cần phân tích với phổ thu được từ một chất đối chiếu hay với một phổ đối chiếu.

Phổ của một chất đối chiếu có thể được ghi lại để sử dụng ngay hoặc lưu trữ trong thư viện phổ để tham khảo sau này. Có thể sử dụng phổ đã lưu trữ với điều kiện đảm bảo khả năng truy xuất nguồn gốc của lô chất đối chiếu đã sử dụng.

Trong mọi trường hợp, các phổ cần phải được đo theo cùng một quy trình, trong cùng điều kiện tiến hành và đặc biệt là phải cùng chế độ đo.

Khi so sánh phổ đo được ở trạng thái rắn cho thấy có sự khác biệt, có thể xử lý chất cần phân tích và chất đối chiếu theo cùng một cách để chúng kết tinh lại hoặc tạo ra cùng dạng tinh thể, hay tiến hành như mô tả trong chuyên luận, sau đó đo lại phổ. Tuy nhiên, quy trình này chỉ thực hiện khi chuyên luận không quy định dạng cụ thể của một chất có tính chất đa hình.

Có thể phải dùng kết hợp vài quy trình so sánh phổ, cần ghi hồ sơ, biện giải cho phương pháp đã sử dụng và các tiêu chí chấp nhận cụ thể để đưa ra kết luận của phép định tính.

Có thể so sánh phổ bằng cách chồng phổ (trên toàn bộ phổ hay tại vùng quan tâm được chỉ ra trong chuyên luận riêng) hoặc bằng cách sử dụng các tính toán từ phần mềm. Chẳng hạn, có thể thực hiện:

- So sánh trực quan dựa trên vị trí dải và cường độ tương đối trừ khi có quy định cụ thể khác - các cực tiểu truyền qua (hay cực đại hấp thụ) trên phổ của chất cần phân tích tương ứng về vị trí và cường độ tương đối so với trên phổ đối chiếu.

- Tính hệ số tương quan giữa hai phổ - giá trị này được phần mềm tính toán và ngưỡng định tính do người dùng xác lập.

- Đánh giá bằng các phương pháp toán hóa (chemometric) (ví dụ: khoảng cách Euclid, khoảng cách Mahalanobis hoặc các phương pháp phân loại); các phương pháp này yêu cầu người phân tích thiết lập, đánh giá và thẩm định mô hình toán hóa.

Tạp chất trong chất khí

Để phân tích các tạp chất, sử dụng một buồng đo trong suốt với bức xạ IR và có độ dài quang trình thích hợp (ví dụ từ 1 m - 20 m). Làm đầy buồng đo theo hướng dẫn ở mục Chất khí. Để phát hiện và định lượng các tạp chất, tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận riêng.

QUANG PHỔ CẬN HỒNG NGOẠI

Quang phổ cận hồng ngoại (near-infrared - NIR) là một kỹ thuật với phạm vi ứng dụng rộng, đa dạng trong phân tích được. Phổ NIR nằm trong khoảng bước sóng từ 780 nm tới 2500 nm (số sóng từ 12.800 cm^{-1} tới 4000 cm^{-1}). Phổ NIR chủ yếu được tạo ra bởi các bội tần của liên kết C-H, N-H, O-H, S-H và sự kết hợp của các dao động cơ bản ở vùng hồng ngoại giữa (MIR). Phổ NIR chứa những thông tin phức hợp về hóa học và vật lý có thể được trích xuất ra nhờ quy trình xử lý dữ liệu thích hợp bằng toán học. Các

dải hấp thụ NIR yếu hơn nhiều so với các dao động cơ bản ở vùng MIR tạo ra chúng. Vì độ hấp thụ ở vùng NIR thấp, bức xạ có thể xâm nhập sâu tới vài milimet vào trong các vật liệu, bao gồm cả chất rắn. Hơn nữa, nhiều vật liệu như thủy tinh tương đối trong suốt với vùng bức xạ này.

Bên cạnh các quy trình lấy mẫu và đo mẫu thông thường, quy trình đo có thể được thực hiện trực tiếp ngay trên mẫu. Đo phổ NIR có thể được thực hiện ngoài dây chuyền sản xuất (off-line), đo trực tiếp tại chỗ trong phân xưởng (at-line), đo liên tục trên dây chuyền sản xuất đang hoạt động (in-line) hoặc đo mẫu gián đoạn trên dây chuyền sản xuất (on-line) áp dụng trong Công nghệ phân tích quy trình (PAT).

Khi định tính phổ bằng NIR, có thể yêu cầu sử dụng đến các phương pháp toán hóa tích hợp để xử lý phổ.

Trong trường hợp đáp ứng được các yêu cầu về độ đặc hiệu, có thể định tính hoặc đánh giá đặc tính trạng thái rắn bằng cách so sánh trực tiếp phổ NIR chưa xử lý hay tiền xử lý của mẫu phân tích với phổ của mẫu đối chiếu.

Quang phổ NIR có ứng dụng rộng trong phân tích hóa học, vật lý và phân tích quy trình, ví dụ:

Phân tích hóa học:

- Định tính dược chất, tá dược, chế phẩm, sản phẩm trung gian trong quy trình sản xuất, vật liệu hóa học và vật liệu bao gói.

- Đánh giá chất lượng dược chất, tá dược, chế phẩm, sản phẩm trung gian trong quy trình sản xuất và vật liệu bao gói, bao gồm so sánh phổ giữa các lô và đánh giá khi thay đổi nhà cung cấp.

- Định lượng dược chất trong nền mẫu, xác định các chỉ số hóa học như chỉ số hydroxyl, xác định hàm lượng nước tuyệt đối, xác định mức độ hydroxyl hóa và kiểm soát hàm lượng dung môi.

Phân tích vật lý:

- Dạng tinh thể và khả năng kết tinh, tính đa hình, solvat hóa, kích thước tiểu phân.

- Độ rắn, độ cứng.

- Các đặc tính của màng bao phim.

Phân tích quy trình:

- Giám sát các hoạt động như tổng hợp, kết tinh, trộn, sấy, tạo hạt và bao nhằm mục đích kiểm soát quy trình.

- Kiểm soát và phát hiện điểm dừng.

Quy trình đo phổ NIR chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố hóa học và vật lý; độ tái lập và ý nghĩa của kết quả phụ thuộc vào việc kiểm soát các yếu tố này và các kết quả đo thường chỉ có giá trị đối với một mô hình hiệu chuẩn xác định.

THIẾT BỊ

Việc đo phổ NIR dựa vào việc đưa ánh sáng truyền qua hoặc đi vào mẫu và đo mức suy giảm của tia ló (truyền qua hoặc phản xạ). Các máy quang phổ dùng đo phổ NIR gồm một nguồn sáng thích hợp (như đèn thạch anh-wolfram có độ ổn định cao), một bộ đơn sắc hoặc giao thoa kế, và một detector.

Các bộ đơn sắc thông dụng gồm các bộ lọc có thể điều chỉnh quang âm (acousto-optic tunable filter - AOTF), cách tử hay lăng kính. Nhiều máy quang phổ NIR có thiết kế một chùm tia, một số máy sử dụng kỹ thuật nội chuẩn có thiết kế hai chùm tia (như thiết bị chuỗi diod).

Vật liệu làm detector có thể là silicon, chì sulfid, indi gali arsenid. Bộ phận chứa mẫu gồm nhiều loại, ví dụ như: cốc đo (cuvet), đầu dò sợi quang, buồng nhúng truyền qua, lọ borosilicat trung tính, giá đựng mẫu quay hoặc nằm ngang. Lựa chọn bộ phận chứa mẫu dựa vào mục đích sử dụng, đặc biệt chú ý hệ thống chứa mẫu phải tương thích với loại mẫu cần phân tích. Hệ thống máy quang phổ NIR thường bao gồm các bộ phận xử lý và đánh giá dữ liệu (ví dụ: phần mềm và máy tính).

Thường biểu thị đơn vị bước sóng (λ) theo nm và số sóng (ν) theo cm^{-1} tùy thuộc vào kỹ thuật đo và thiết bị. Chuyển đổi giữa nm và cm^{-1} được thực hiện theo công thức sau:

$$\nu_{\text{cm}^{-1}} = 10^7 \times \frac{1}{\lambda_{\text{nm}}}$$

CÁC CHẾ ĐỘ ĐO

Chế độ truyền qua

Độ truyền qua (T) là mức độ giảm của cường độ bức xạ tại bước sóng cụ thể khi bức xạ truyền qua mẫu. Mẫu được đặt trên quang trục giữa nguồn sáng và detector. Cấu hình này giống với cấu hình của nhiều máy quang phổ thông thường. Phổ NIR có thể biểu thị trực tiếp dưới dạng độ truyền qua (T) và/hoặc độ hấp thụ (A) (trục y) so với bước sóng hoặc số sóng (trục x).

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Trong đó:

I_0 : cường độ của bức xạ tới.

I: cường độ của bức xạ truyền qua.

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

Chế độ phản xạ khuếch tán

Chế độ phản xạ khuếch tán đo độ phản xạ, tỷ lệ giữa cường độ ánh sáng phản xạ từ mẫu (I) với cường độ ánh sáng phản xạ từ một bề mặt nền hay bề mặt phản xạ đối chiếu (I_r).

Tùy thuộc vào thành phần hóa học và đặc tính vật lý của mẫu, bức xạ NIR có thể thâm nhập một khoảng nhất định vào trong mẫu, tại đây bức xạ có thể bị hấp thụ bởi các bội tán và sự kết hợp các dao động cơ bản của các chất phân tích có mặt trong mẫu. Bức xạ không bị hấp thụ bị phản xạ một phần từ mẫu tới detector. Phổ phản xạ NIR thường thu được từ tính toán và biểu diễn dưới dạng đồ thị $\log_{10}(1/R)$ (trục y) theo bước sóng hay số sóng (trục x).

$$R = \frac{I}{I_r}$$

PHỤ LỤC 4

Trong đó:

I: cường độ ánh sáng phản xạ khuếch tán từ mẫu.

I_r : cường độ ánh sáng phản xạ từ nền hoặc bề mặt phản xạ đối chiếu.

$$A_R = \log_{10} \left(\frac{1}{R} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_r}{I} \right)$$

Chế độ truyền qua phản xạ

Chế độ này là sự kết hợp giữa độ truyền qua và độ phản xạ. Khi đo độ truyền qua phản xạ (T^*), một tấm gương hay một bề mặt phản xạ khuếch tán được dùng để phản xạ bức xạ truyền qua trở lại qua mẫu, qua đó làm tăng gấp đôi quang trình. Phần bức xạ không được hấp thụ được phản xạ lại từ mẫu tới detector. Phổ có thể được thể hiện trực tiếp dưới dạng đồ thị của độ truyền qua phản xạ T^* và/hoặc độ hấp thụ A (trực y) theo bước sóng hoặc số sóng (trực x).

$$T^* = \frac{I}{I_T}$$

Trong đó:

I: cường độ bức xạ truyền qua phản xạ đo được từ mẫu.

I_T : cường độ bức xạ truyền qua phản xạ của vật liệu đối chiếu làm nền.

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

CHUẨN BỊ MẪU/ĐƯA MẪU VÀO MÁY

Quy trình chuẩn bị mẫu và đưa mẫu vào máy có thể thay đổi tùy thuộc chế độ đo. Các yêu cầu sau đây cần thiết cho tất cả kỹ thuật đưa mẫu:

- Tối ưu hóa thời gian đo và số lần quét để tối ưu hóa tỷ số tín hiệu trên nhiễu.
- Lựa chọn chế độ đo thích hợp nhất cho mẫu dự định đo (truyền qua, phản xạ khuếch tán hay truyền qua phản xạ).
- Lựa chọn hướng đặt mẫu phù hợp nhất (ví dụ: để giảm thiểu tác động của các chỗ lõm trên bề mặt viên nén).
- Lựa chọn dụng cụ thích hợp (ví dụ: buồng đo truyền qua hay đầu dò nhúng).
- Tối ưu hóa độ dày buồng đo trong các chế độ truyền qua và truyền qua phản xạ.
- Lựa chọn vật liệu đối chiếu nền thích hợp về mặt quang phổ.
- Chứng minh rằng vật liệu đối chiếu nền là tin cậy theo thời gian và kết quả đo trên nền có thể tái lập và bền vững theo thời gian.
- Khi đo phổ trên vật liệu hay mẫu đang di chuyển (phân tích trong quy trình sản xuất), cần thu được phổ mang tính đại diện (ví dụ: bằng cách điều chỉnh thời gian đo, số lần quét, cộng các phổ riêng lẻ, tăng kích thước chùm tia, v.v.).
- Đảm bảo cảm biến không bị nhiễm bẩn.
- Cần chứng minh được các điều kiện đo (thời gian, kích thước chùm tia) phù hợp với lượng mẫu tối thiểu.

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM VI

Trong một số điều kiện phân tích quy trình không thể tháo đầu dò để thu thập dữ liệu đối chiếu nền; khi đó cần xem xét tới một số lựa chọn như kỹ thuật nội chuẩn, đo đối chiếu nền bằng một detector thứ hai, v.v. Chỉ những phổ được đo trên nền có cùng đặc tính quang học mới có thể so sánh trực tiếp với nhau.

Chế độ truyền qua

Việc đo độ truyền qua (T) phụ thuộc vào một phổ truyền qua nền để tính toán. Các nền đối chiếu có thể là không khí, một đĩa polymer, một buồng đo rỗng, một dung môi hay một mẫu đối chiếu trong một số trường hợp đặc biệt. Chế độ này thường áp dụng cho mẫu lỏng (pha loãng hoặc không pha loãng), mẫu phân tán, dung dịch và chất rắn (bao gồm viên nén và nang). Để đo truyền qua mẫu rắn, cần sử dụng một dụng cụ đựng mẫu thích hợp. Mẫu lỏng được đo trong buồng đo có chiều dài quang trình thích hợp (thường là 0,5 - 4 mm), trong suốt với bức xạ NIR, hoặc sử dụng một đầu dò sợi quang có cấu tạo phù hợp để nhúng vào mẫu.

Chế độ phản xạ khuếch tán

Chế độ này thường áp dụng cho mẫu rắn. Mẫu được đo trực tiếp, hoặc đựng trong một dụng cụ thích hợp, hoặc qua tiếp xúc trực tiếp với một đầu dò sợi quang. Để theo dõi quy trình, vật liệu có thể được phân tích qua một cửa sổ giao diện được đánh bóng (ví dụ đá saphia), hoặc sử dụng đầu dò tích hợp đo liên tục ngay trên dây chuyền sản xuất (in-line). Cần đảm bảo điều kiện đo cho độ tái lập tốt nhất có thể giữa các mẫu. Quét bức xạ phản xạ trên nền đối chiếu để ghi nhận đường nền, sau đó đo độ phản xạ của mẫu phân tích. Các vật liệu đối chiếu phản xạ thường sử dụng gồm gốm, nhựa dẻo nhiệt và vàng. Có thể sử dụng các vật liệu thích hợp khác.

Chế độ truyền qua phản xạ

Chế độ này thường áp dụng cho chất lỏng, hỗn dịch và các vật liệu nhựa trong suốt. Một gương phản xạ được đặt sau mẫu để tăng gấp đôi chiều dài quang trình. Thiết kế này có thể kết hợp trong máy đo có hệ thống phản xạ và đầu dò sợi quang với cách bố trí nguồn sáng và detector ở cùng một phía so với mẫu. Mẫu được đo qua một buồng đo có gương hoặc một bộ phận phản xạ khuếch tán thích hợp làm bằng kim loại hay một vật liệu trơ (như titan dioxyd khô) không hấp thụ ở vùng NIR. Có thể đo mẫu lỏng sử dụng các đầu dò truyền qua phản xạ tích hợp vào dây chuyền sản xuất.

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI ĐÁP ỨNG PHỔ

Môi trường

Nhiệt độ và độ ẩm môi trường cần được kiểm soát trước khi tiến hành đo phổ.

Vùng đo mẫu

Vùng đo mẫu hoặc đầu dò tiếp xúc với mẫu cần được làm sạch, loại bỏ nhiễm bẩn còn lưu lại trước khi đo. Tương tự,

không được có mẫu đo hay bụi bẩn tích tụ trên giao diện tiếp xúc với mẫu của thiết bị đo liên tục (in-line) hoặc gián đoạn (on-line) trên dây chuyền sản xuất.

Nhiệt độ mẫu

Thông số này quan trọng khi đo phổ mẫu chất lỏng, chênh lệch vài độ có thể dẫn tới thay đổi về phổ gây ảnh hưởng đáng kể tới kết quả phân tích. Nhiệt độ cũng là một thông số quan trọng khi đo phổ các chất rắn và mẫu bột có chứa nước.

Hơi ẩm và dung môi tồn dư

Hơi ẩm và dung môi tồn dư trong mẫu sẽ tạo ra các dải hấp thụ đáng kể ở phân vùng IR gần.

Độ dày mẫu

Độ dày mẫu cần được đánh giá hay kiểm soát, nhất là khi phân tích viên nén và nang ở chế độ truyền qua vì đây là yếu tố gây biến thiên đáp ứng phổ. Để đo mẫu bột nén, thường khi độ dày lớp mẫu tới 5 mm là đạt tới độ dày tối hạn (VD: trong một lọ đựng mẫu).

Các đặc tính quang học của mẫu

Với mẫu rắn, cần xem xét đến đặc tính tán xạ trên bề mặt và toàn khối của mẫu. Với các mẫu không đồng nhất về mặt vật lý, hóa học hay quang học có thể cần tăng kích thước chùm tia hoặc đo mẫu tại nhiều vị trí hay xoay mẫu để thu được phổ mang tính đại diện cho mẫu. Một số yếu tố như mức độ nén hoặc kích thước tiểu phân của mẫu dạng bột và độ hoàn thiện bề mặt của mẫu khi đo có thể dẫn tới khác biệt đáng kể về phổ.

Các dạng của trạng thái rắn

Các dạng của trạng thái rắn (đa hình, ngậm nước, solvat hay vô định hình) ảnh hưởng đến phổ dao động. Do đó có thể phân biệt các dạng kết tinh khác nhau và dạng vô định hình của một chất rắn dựa vào phổ NIR của các dạng này. Trường hợp đồng thời tồn tại nhiều dạng kết tinh, cần đảm bảo rằng các mẫu chuẩn hóa có đủ các dạng kết tinh liên quan đến mẫu dự định đo.

Tuổi của mẫu

Mẫu có thể thay đổi đặc tính hóa học, vật lý hay quang học theo thời gian. Tùy thuộc điều kiện bảo quản, các mẫu rắn có thể hấp thụ nước hay phân hấp thụ nước, và một phần chất ở dạng vô định hình có thể kết tinh. Vật liệu sử dụng để chuẩn hóa trong NIR cần mang tính đại diện cho mẫu dự kiến phân tích cũng như các thay đổi về nền mẫu.

TIỀN XỬ LÝ DỮ LIỆU PHỔ NIR

Trong nhiều trường hợp, nhất là với phổ đo theo chế độ phản xạ, cần thực hiện tiền xử lý phổ bằng toán học trước khi xây dựng mô hình phân loại hay chuẩn hóa.

Mục đích của tiền xử lý là để giảm dao động đường nền, giảm tác động của những dao động đã biết tới các mô hình toán học được sử dụng ở bước kế tiếp để xử lý phổ, hoặc để đơn giản hóa dữ liệu trước khi sử dụng. Trong một số

trường hợp, phổ có thể được chuẩn hóa hay hiệu chỉnh các giá trị phân tán bằng các thuật toán phù hợp (ví dụ như: Standard Normal Variate (SNV) transformation).

Các kỹ thuật tiền xử lý phổ có thể bao gồm sử dụng hàm cửa sổ, giảm nhiễu và tính đạo hàm bậc nhất hoặc đạo hàm bậc hai của phổ. Không khuyến cáo sử dụng đạo hàm bậc cao hơn vì làm tăng nhiễu phổ.

KIỂM SOÁT HIỆU NĂNG MÁY QUANG PHỔ

Sử dụng máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và định kỳ tiến hành đánh giá hiệu năng theo mức độ sử dụng máy và ứng dụng. Với các ứng dụng đo liên tục (in-line) hay gián đoạn (on-line) trực tiếp trên dây chuyền sản xuất, cần có căn cứ khoa học khi sử dụng các phương thức thay thế để kiểm soát hiệu năng máy, chẳng hạn như sử dụng chuẩn tích hợp trong máy hay các kênh đo/đầu dò riêng biệt để đánh giá hiệu năng máy.

Có thể cần kiểm tra tính phù hợp của hệ thống trước khi quét mẫu, và phải kiểm tra các thuộc tính của máy có khả năng tác động tới sự phù hợp của kết quả đo cuối cùng (cơ bản là về nhiễu nền quang học và độ đúng của bước sóng). Tần suất tiến hành kiểm tra hiệu năng cần dựa trên đánh giá rủi ro theo loại máy và môi trường hoạt động. Ví dụ, máy hoạt động trong môi trường khắc nghiệt với dao động đáng kể về nhiệt độ, độ ẩm cần kiểm tra hiệu năng thường xuyên. Cần xem xét tới trường hợp các hệ thống không thể di chuyển, tháo rời như đầu dò liên tục trực tiếp trên dây chuyền sản xuất hay buồng đo kiểu dòng chảy.

Một số dụng cụ được thiết kế riêng theo yêu cầu khách hàng cần có phép thử kiểm tra hiệu năng phù hợp.

Đánh giá và hiệu chuẩn thang bước sóng hoặc thang số sóng (ngoại trừ máy sử dụng kính lọc).

Đánh giá thang bước sóng sử dụng, thường từ 780 đến 2500 nm (12.800 cm^{-1} tới 4000 cm^{-1}) hoặc trong dải phổ dự kiến đo, bằng một hoặc nhiều bước sóng chuẩn thích hợp có các cực đại hay cực tiểu đặc trưng trong dải bước sóng sử dụng. Ví dụ: methylen clorid, talc, các loại đèn tạo bước sóng chuẩn hoặc hỗn hợp oxyd đất hiếm là các vật liệu đối chiếu phù hợp. Có thể sử dụng các chuẩn thích hợp khác. Ghi phổ và xác định vị trí của ít nhất 3 cực trị hấp thụ phân bố trên dải sử dụng.

Máy quang phổ NIR chuyển dạng Fourier có một dải tần số tuyến tính, vì vậy kiểm tra bước sóng tại một tần số là đủ.

Đánh giá và hiệu chuẩn độ tuyến tính quang

Độ tuyến tính quang được đánh giá bằng các vật liệu chuẩn độ truyền qua hoặc chuẩn độ phản xạ với tỷ lệ phần trăm độ truyền qua hoặc độ phản xạ đã biết. Trong chế độ đo độ phản xạ, các chuẩn polyme có phụ gia carbon. Cần đảm bảo rằng độ hấp thụ của vật liệu đối chiếu sử dụng tương ứng với dải làm việc tuyến tính dự kiến của phương pháp. Những lần đánh giá độ tuyến tính quang tiếp theo có thể sử dụng các giá trị độ hấp thụ đo được ban đầu làm giá trị tham chiếu. Các mô hình chuẩn hóa phi tuyến tính và

các đáp ứng phi tuyến tính có thể được dùng nếu người sử dụng am hiểu.

Phổ thu được từ các chuẩn độ phản xạ và chuẩn độ truyền qua có thể bị biến thiên do những khác biệt giữa điều kiện thực nghiệm khi chúng được hiệu chuẩn tại nhà máy sản xuất và khi sử dụng thực tế. Do vậy, các giá trị tỷ lệ phần trăm độ phản xạ được cung cấp với một bộ chuẩn có thể sẽ không có ích trong việc thiết lập một đường hồi quy “tuyệt đối” cho một máy quang phổ cụ thể. Khi các chuẩn không thay đổi về hóa học hoặc vật lý và cùng nền đối chiếu với

nền được sử dụng để thu được các giá trị trong chứng chỉ của chuẩn, những lần đo tiếp theo trên cùng các chuẩn này với điều kiện tương tự, bao gồm cả độ chính xác về vị trí đặt mẫu, sẽ cung cấp thông tin về độ ổn định dài hạn của đáp ứng quang. Dung sai $\pm 2\%$ của độ hấp thụ được chấp nhận là ổn định, việc đánh giá này chỉ cần thiết khi muốn sử dụng phổ mà không cần qua bước tiền xử lý.

Khuyến cáo về các điều kiện sử dụng để kiểm soát hiệu năng máy cho các chế độ đo khác nhau được tóm tắt trong Bảng 4.2.2.

Bảng 4.2.2 - Kiểm soát hiệu năng máy quang phổ

Chế độ đo	Phản xạ	Truyền qua phản xạ	Truyền qua
Đánh giá thang bước sóng (ngoại trừ thiết bị dùng kính lọc)	Dao động cho phép so với giá trị chuẩn: $\pm 1,0$ nm tại 780 nm (± 16 cm^{-1} tại 12.800 cm^{-1}) $\pm 1,0$ nm tại 1200 nm (± 8 cm^{-1} tại 8300 cm^{-1}) $\pm 1,0$ nm tại 1600 nm (± 6 cm^{-1} tại 6250 cm^{-1}) $\pm 1,5$ nm tại 2000 nm (± 4 cm^{-1} tại 5000 cm^{-1}) $\pm 1,5$ nm tại 2500 nm (± 2 cm^{-1} tại 4000 cm^{-1}) Với vật liệu đối chiếu sử dụng, áp dụng giới hạn dao động cho phép tại bước sóng hay số sóng gần nhất với mỗi đỉnh sử dụng. Với các máy chuỗi diod, thường độ phân giải pixel (bước sóng giữa các pixel) có thể lên tới 10 nm. Độ phân giải pixel cần tương thích để khớp với độ phân giải phổ. Thuật toán để tìm các đỉnh có vai trò rất quan trọng với độ đúng bước sóng. Về thực hành, ± 2 nm là phù hợp cho độ đúng bước sóng đỉnh. Hoặc tham khảo tiêu chuẩn của nhà sản xuất máy để đưa ra giới hạn chấp nhận.		
Máy để bàn/di động	Đo <i>talc</i> (TT) qua một môi trường thích hợp hoặc bằng đầu dò sợi quang. <i>Talc</i> có các đỉnh đặc trưng tại 948 nm, 1391 nm và 2312 nm, phù hợp cho hiệu chuẩn. Ngoài ra cũng có thể sử dụng các chuẩn thích hợp khác cho phép đảm bảo độ đúng bước sóng trong vùng làm việc của phương pháp. Chẳng hạn, đo một chuẩn nội polystyren nếu thích hợp, hoặc đo một chuẩn của NIST hay chuẩn có thể truy xuất nguồn gốc khác, và đánh giá 3 đỉnh trong dải bước sóng hiệu chuẩn	Sử dụng trực tiếp một hỗn dịch của 1,2 g titan dioxyd (TT) khô trong 4 ml <i>methylen clorid</i> (TT) với một buồng đo hay một đầu dò. Titan dioxyd không hấp thụ trong vùng NIR. Phổ được ghi với độ rộng dải danh định tối đa của máy là 10 nm tại 2500 nm (16 cm^{-1} tại 4000 cm^{-1}). <i>Methylen clorid</i> có những đỉnh hấp thụ đặc trưng tại 1155 nm, 1366 nm, 1417 nm, 1690 nm, 1838 nm, 1894 nm, 2068 nm và 2245 nm. Chọn 3 đỉnh trong dải bước sóng để hiệu chuẩn. Có thể sử dụng các chuẩn thích hợp khác, như một chuẩn truyền qua phản xạ dạng lỏng trộn với titan dioxyd hoặc một môi trường phản xạ khác.	Có thể sử dụng <i>methylen clorid</i> (TT) có những đỉnh hấp thụ đặc trưng tại 1155 nm, 1366 nm, 1417 nm, 1690 nm, 1838 nm, 1894 nm, 2068 nm và 2245 nm. Chọn 3 đỉnh trong dải bước sóng để hiệu chuẩn. Có thể sử dụng các chuẩn thích hợp khác.
Máy đo tại dây chuyền sản xuất	Nếu về mặt thực hành không thể đo một vật liệu đối chiếu có thể truy xuất nguồn gốc tại điểm đo mẫu, sử dụng chuẩn nội như polystyren, sợi thủy tinh hoặc dung môi và/hoặc hơi nước. Hoặc có thể sử dụng một kênh/đầu dò thứ hai bên ngoài. Với máy biến đổi Fourier, có thể hiệu chuẩn thang số sóng bằng một dải hấp thụ hẹp và tách biệt của hơi nước, như dải hấp thụ tại 7306,74 cm^{-1}, hoặc 7299,45 cm^{-1}, hoặc 7299,81 cm^{-1} hay một dải hấp thụ hẹp của một vật liệu đối chiếu có chứng chỉ.		
Đánh giá độ lặp lại của bước sóng (ngoại trừ máy dùng kính lọc)	Độ lệch chuẩn của bước sóng phải phù hợp với các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất máy, nếu không phải được giải thích hợp lý về mặt khoa học.		
Máy để bàn/di động	Đánh giá độ lặp lại bước sóng bằng một chuẩn ngoại hay chuẩn nội thích hợp		
Máy đo tại dây chuyền sản xuất	Đánh giá độ lặp lại bước sóng bằng một chuẩn ngoại hay chuẩn nội thích hợp		

Chế độ đo	Phản xạ	Truyền qua phản xạ	Truyền qua
Đánh giá độ tuyến tính quang và độ ổn định đáp ứng ⁽¹⁾	Đo 4 chuẩn quang trên dải hấp thụ làm việc của phương pháp		
Máy để bàn/di động	Phân tích 4 chuẩn độ phản xạ, chẳng hạn trong dải từ 10 % - 99 %, bao gồm 10 %, 20 %, 40 % và 80 %. Trong một số trường hợp 2 % có thể phù hợp. So sánh độ hấp thụ đo được với các giá trị độ hấp thụ đối chiếu, chẳng hạn bằng hồi quy tuyến tính. Giới hạn chấp nhận là $1,00 \pm 0,05$ cho độ dốc đường hồi quy và $0,00 \pm 0,05$ cho hệ số chặn trong lần đầu tiên đánh giá độ tuyến tính quang của một máy quang phổ. Những lần đánh giá độ tuyến tính quang tiếp theo có thể sử dụng các giá trị độ hấp thụ đo được lần đầu làm giá trị đối chiếu.	Đo truyền qua phản xạ có thể sử dụng các chuẩn độ phản xạ hay độ truyền qua cùng các tiêu chí thích hợp.	Phân tích 4 chuẩn độ truyền qua để bao phủ các giá trị độ hấp thụ trong dải độ hấp thụ làm việc của các dữ liệu được mô hình hóa. So sánh các giá trị độ hấp thụ đo được với các giá trị độ hấp thụ đối chiếu, chẳng hạn bằng hồi quy tuyến tính. Giới hạn chấp nhận là $1,00 \pm 0,05$ cho độ dốc đường hồi quy và $0,00 \pm 0,05$ cho hệ số chặn trong lần đầu tiên đánh giá độ tuyến tính quang của một máy quang phổ. Những lần đánh giá độ tuyến tính quang tiếp theo có thể sử dụng các giá trị độ hấp thụ đo được lần đầu làm giá trị đối chiếu.
Máy đo tại dây chuyền sản xuất	Nếu không thể đo các chuẩn quang về độ phản xạ và độ truyền qua tại điểm đo mẫu, sử dụng các chuẩn quang được tích hợp sẵn trong máy. Máy đo tại dây chuyền sản xuất có thể sử dụng các chuẩn quang nội để đánh giá độ tuyến tính quang. Trong những trường hợp như vậy tuân theo các giới hạn đánh giá của nhà sản xuất máy.		
Đánh giá nhiễu quang ⁽¹⁾	Xác định nhiễu quang tại một vùng quang có ý nghĩa của phổ bằng cách sử dụng một chuẩn độ phản xạ thích hợp, chẳng hạn như tấm gốm phản xạ trắng hay các chuẩn polyme có phụ gia carbon. Làm theo phương pháp và tiêu chuẩn của nhà sản xuất máy.		
Máy để bàn/di động	Quét chuẩn độ phản xạ có thông lượng thấp (VD: 5 % hoặc 10 %, chuẩn polyme có phụ gia carbon) trên một dải bước sóng thích hợp tương ứng với khuyến cáo của nhà sản xuất máy và tính toán nhiễu quang dưới dạng nhiễu từ đỉnh tới đỉnh.	Quét chuẩn độ truyền qua có thông lượng cao (VD: 90 % hay 99 %, chuẩn polyme có phụ gia carbon) trên một dải bước sóng thích hợp tương ứng với khuyến cáo của nhà sản xuất máy và tính toán nhiễu quang dưới dạng nhiễu từ đỉnh tới đỉnh.	
Máy đo tại dây chuyền sản xuất	Như trên, hoặc nếu không thể về mặt thực hành, sử dụng chuẩn tích hợp trong máy để đánh giá nhiễu và tiêu chuẩn của nhà sản xuất máy.	Như trên, hoặc nếu không thể về mặt thực hành, sử dụng chuẩn tích hợp trong máy để đánh giá nhiễu và tiêu chuẩn của nhà sản xuất máy.	

⁽¹⁾ Không yêu cầu đánh giá độ tuyến tính quang và đánh giá độ nhiễu quang với các máy quang phổ sử dụng các phương pháp để thực hiện thử định tính đơn giản không sử dụng độ hấp thụ quang như một phần của mô hình phân tích (VD: đánh giá tương quan đơn giản với các bước sóng hấp thụ).

PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH (THỬ ĐỊNH TÍNH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TRƯNG)

Thiết lập một thư viện phổ đối chiếu

Ghi phổ của một số lượng thích hợp các mẫu đại diện của chất đã biết, có thể truy xuất nguồn gốc, và thể hiện những biến đổi điển hình cho chất cần phân tích (VD: các dạng của trạng thái rắn, kích thước tiểu phân, v.v.). Các thư viện được thiết lập sử dụng mẫu đại diện trong các điều kiện môi trường thích hợp. Bộ phổ thu được thể hiện các thông tin có thể được dùng để định tính mẫu cần phân tích. Bộ sưu tập phổ trong thư viện có thể đại diện theo các cách

khác nhau được xác định bởi kỹ thuật toán sử dụng cho việc định tính. Những cách này có thể là:

- Tất cả các phổ đơn lẻ đại diện cho chất cần định tính.
 - Một phổ trung bình của các lô đã đo cho mỗi hợp chất hóa học.
 - Nếu cần thiết, một mô tả về sự biến thiên trong phổ của chất.
- Số lượng chất trong thư viện phụ thuộc vào ứng dụng cụ thể. Tất cả phổ trong thư viện được sử dụng cần có chung:
- Khoảng phổ và số điểm dữ liệu.
 - Kỹ thuật đo.
 - Cách tiền xử lý dữ liệu.

Nếu thiết lập các nhóm thành phần (thư viện thành phần), các tiêu chí trên được áp dụng độc lập cho mỗi nhóm. Các thư viện thành phần được thẩm định riêng rẽ. Phải lưu giữ các dữ liệu phổ gốc sử dụng để thiết lập thư viện phổ. Cần thận trọng khi thực hiện bất cứ biến đổi toán học nào, bởi có thể tạo nên các đặc trưng giả hay làm mất thông tin cốt yếu (quan trọng với các phương pháp định tính). Độ thích hợp của thuật toán sử dụng cần được chứng minh bằng thẩm định phương pháp đạt yêu cầu và trong mọi trường hợp cần lưu hồ sơ giải thích cho sự hợp lý của việc sử dụng biến đổi.

So sánh trực tiếp phổ của chất cần phân tích và phổ đối chiếu

So sánh trực tiếp phổ của chất cần phân tích và phổ của một chất đối chiếu nhằm mục đích định tính hóa học hay định tính vật lý có thể không đòi hỏi phải dùng thư viện phổ đối chiếu khi độ đặc hiệu cho phép.

Đánh giá dữ liệu

So sánh trực tiếp phổ đại diện của chất cần phân tích được thực hiện với phổ đối chiếu đơn lẻ hoặc phổ đối chiếu trung bình của tất cả các chất trong cơ sở dữ liệu dựa trên mối tương quan toán học của chúng hay các thuật toán thích hợp khác.

Có thể sử dụng một bộ phổ đối chiếu đã biết và độ biến thiên quanh giá trị trung bình của bộ phổ này với một thuật toán để phân loại; hoặc có thể so sánh trực quan bằng cách chồng dữ liệu phổ nếu độ đặc hiệu cho phép.

Hiện có sẵn các kỹ thuật khác nhau, như PCA (principal component analysis), cluster analysis và SIMCA (soft independent modelling by class analogy).

Độ tin cậy của kỹ thuật được chọn cho một ứng dụng cụ thể cần được thẩm định như sau:

Thẩm định mô hình

Các phương pháp định tính sử dụng so sánh phổ trực tiếp cần được thẩm định theo các quy trình thẩm định phương pháp định tính.

Các thông số cần thẩm định với phương pháp định tính là độ thô và độ đặc hiệu.

PHÂN TÍCH GIỚI HẠN

So sánh tương đối các phổ

Không cần lập một đường chuẩn khi so sánh một tập hợp phổ nhằm mục đích phân tích giới hạn, chẳng hạn như độ hấp thụ cực đại hay cực tiểu tại đó một chất phân tích hấp thụ. Ngoài ra, có thể kiểm soát điểm dừng của quá trình sấy trong quy trình sản xuất bằng việc định tính ở một bước sóng hấp thụ đặc trưng. Cần chứng minh dải phổ và phương thức tiền xử lý (nếu có) là phù hợp với mục đích.

Độ đặc hiệu

Cần chứng minh khả năng phân biệt tương đối của phép thử giới hạn. Mức độ đặc hiệu của phép thử phụ thuộc vào ứng dụng và các yếu tố nguy cơ được kiểm soát. Dao động

về nồng độ nền trong dải làm việc của phương pháp không được ảnh hưởng tới quy trình đo.

PHÂN TÍCH XU HƯỚNG

So sánh tương đối các phổ

Không nhất thiết phải có một đường chuẩn khi so sánh một tập hợp phổ cho mục đích phân tích xu hướng, ví dụ, phương pháp tiếp cận khối chuyển động để ước tính các thông số thống kê như trung bình, trung vị và độ lệch chuẩn đã được áp dụng trong phân tích dữ liệu để theo dõi mức độ đồng nhất của quy trình trộn. Cần sử dụng khoảng phổ và thuật toán thích hợp cho phân tích xu hướng.

Độ đặc hiệu.

Cần chứng minh khả năng phân biệt tương đối cho phân tích xu hướng. Mức độ đặc hiệu của phép thử phụ thuộc vào ứng dụng và các yếu tố nguy cơ được kiểm soát. Dao động về nồng độ nền trong dải làm việc của phương pháp không được ảnh hưởng tới quy trình phân tích xu hướng.

PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG

Thiết lập một thư viện phổ đối chiếu cho một mô hình đường chuẩn

Đường chuẩn được thiết lập bằng quy trình xây dựng một mô hình toán để liên hệ giữa đáp ứng phổ từ một mẫu được thu nhận bằng một thiết bị phân tích với các đặc tính của mẫu. Có thể sử dụng bất cứ mô hình hồi quy nào có thể được xác định rõ ràng bằng biểu thức toán học và cho kết quả phù hợp. Ghi phổ trong khoảng cần đo của một số lượng thích hợp mẫu đại diện với các giá trị của thuộc tính quan tâm đã có sẵn hay sẽ được thiết lập sau này (VD: hàm lượng nước). Số lượng mẫu để thiết lập mô hình đường chuẩn sẽ phụ thuộc vào mức độ phức tạp của nền mẫu và các yếu tố ảnh hưởng (VD: nhiệt độ, kích thước tiểu phân, v.v.). Tất cả mẫu phải cho kết quả định lượng nằm trong một khoảng làm việc của đường chuẩn được xác định bởi mục đích dự kiến của phương pháp.

Các thuật toán hay được sử dụng là hồi quy tuyến tính đa biến (multiple linear regression - MLR), hồi quy thành phần chính (principal component regression - PCR), và hồi quy bình phương nhỏ nhất riêng phần (partial least square regression - PLS). Với mô hình đường chuẩn thiết lập bằng PLS hoặc PCR, các hệ số hồi quy và/hoặc trọng số cần được lập biểu đồ và các vùng có hệ số hồi quy hoặc trọng số lớn cần được so sánh với phổ của chất phân tích. Biểu đồ dự đoán tổng bình phương của sai số phần dư (predicted residual error sum of squares - PRESS) (hay tương tự) rất có ích trong việc hỗ trợ tối ưu hóa số yếu tố của PCR hay PLS.

Tiền xử lý dữ liệu

Lựa chọn bước sóng hoặc loại trừ một số dải bước sóng có thể làm tăng độ đúng và độ thô của mô hình hồi quy. Có thể áp dụng các kỹ thuật nén bước sóng (trung bình hóa bước sóng) khi tiền xử lý dữ liệu.

Thẩm định các thông số mô hình

Các đặc tính hiệu năng về phân tích cần chứng minh khi thẩm định các phương pháp NIR cũng tương tự như các đặc tính yêu cầu cho mọi quy trình phân tích. Các tiêu chí chấp nhận cụ thể cho mỗi thông số thẩm định cần phù hợp với mục đích sử dụng của phương pháp. Các thông số thẩm định cho phương pháp định lượng gồm độ đúng, độ tuyến tính, độ chính xác (lặp lại và chính xác trung gian), độ vững chắc và độ đặc hiệu.

ĐÁNH GIÁ MÔ HÌNH LIÊN TỤC TRONG QUÁ TRÌNH SỬ DỤNG

Các mô hình NIR đã được thẩm định để sử dụng cần phải liên tục đánh giá hiệu năng trong quá trình sử dụng và theo dõi các thông số thẩm định.

CHUYÊN CƠ SỞ DỮ LIỆU

Khi các cơ sở dữ liệu được chuyển sang một máy mới, cần xem xét đến khoảng phổ, số điểm dữ liệu, độ phân giải phổ và các thông số khác. Cần áp dụng các quy trình và tiêu chí để chứng minh mô hình vẫn còn giá trị với cơ sở dữ liệu mới hay máy mới.

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 tử 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.

Đề 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).