

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).

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

Phương pháp 1: Phương pháp xác định trực tiếp

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

Phương pháp 2: Phương pháp thêm chuẩn

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

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

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử

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

Thiết bị

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

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

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

Phương pháp tiến hành

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

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

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

Phương pháp 1: Phương pháp xác định trực tiếp

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

dung dịch chuẩn, thiết lập đường chuẩn biểu thị sự thay đổi cường độ vạch hấp thụ theo nồng độ nguyên tố cần xác định và từ đường chuẩn này xác định nồng độ nguyên tố trong dung dịch thử.

Phương pháp 2: Phương pháp thêm chuẩn

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

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

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

4.5 PHỔ KHỐI

Nguyên tắc

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

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

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

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

Nạp mẫu

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

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

Sắc ký khí - khối phổ

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

Sắc ký lỏng - khối phổ

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

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

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

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

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

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

Sắc ký chất lỏng siêu tới hạn - khối phổ

Trong kỹ thuật sắc ký chất lỏng siêu tới hạn - khối phổ, pha động (thường là carbon dioxyd siêu tới hạn) khi đi qua