



**VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA**  
**NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD CONTROL**

# **CÁC CHÚ Ý VÀ NHỮNG VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI SỬ DỤNG UV-VIS**

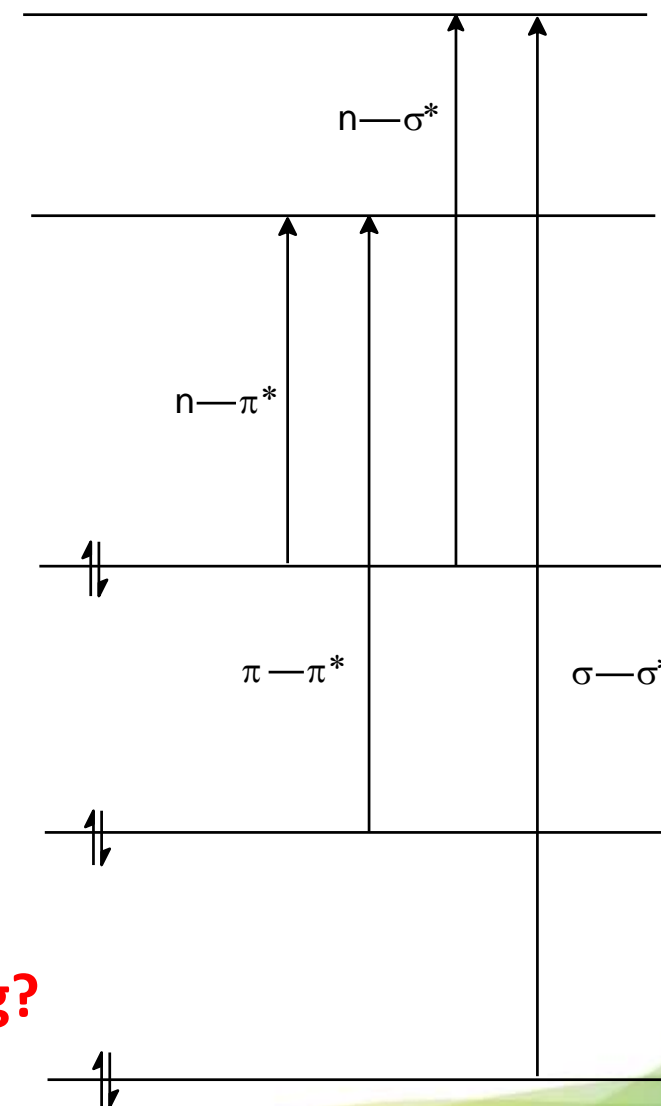
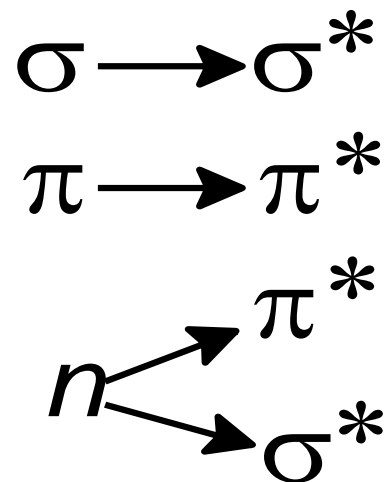
PGS. TS. Nguyễn Thị Ánh Hương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

# SỰ XUẤT HIỆN PHỔ - CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT



Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis: tổ hợp sự chuyển mức năng lượng của các điện tử hoá trị trong liên kết  $\sigma$ ,  $\pi$  và đôi điện tử  $n$ , cùng với sự quay và dao động của phân tử khi chiếu chùm tia sáng kích thích phù hợp trong vùng UV-Vis



**Những chất như thế nào sẽ cho phổ UV-Vis?**

**Những chất không cho phổ UV-Vis có đo được không?**

# CÁC CHẤT KHÔNG CÓ PHỔ UV-VIS



- Chất phân tích **có phổ UV-Vis**: mẫu phải đưa về **trạng thái lỏng** (dung dịch đồng thể), bằng cách **hoà tan mẫu phân tích trong một dung môi phù hợp**, có thể là nước/đệm hay dung môi hữu cơ. Tuy nhiên cần chú ý: dung môi hoà tan chất phân tích phải không có phổ UV-Vis trong vùng phổ của chất phân tích, gây ảnh hưởng đến phép đo.
- Nếu chất phân tích **không có phổ UV-Vis** (ví dụ: các ion kim loại), thì phải cho chất đó **tác dụng với một thuốc thử quang phù hợp**, để tạo ra một sản phẩm (thường là hợp chất phức bền) có phổ UV-Vis theo một phản ứng có tính chất định lượng trong các điều kiện thích hợp. Sau đó kích thích và **đo phổ UV-Vis của sản phẩm này**.

# THUỐC THỬ/PHỐI TỬ DÙNG TRONG UV-VIS



Một thuốc thử quang (L) muốn dùng được trong phân tích phổ UV-Vis cần **đáp ứng các điều kiện** sau:

- **Phản ứng được với chất phân tích**, có tính chất **hoàn toàn định lượng** và chỉ tạo ra một **sản phẩm bền duy nhất** (hợp chất hay ion phức) có phổ UV-Vis. Nghĩa là phản ứng xảy ra chỉ một chiều và không có phản ứng phụ khác kèm theo.
- Sản phẩm sinh ra của phản ứng phải cho phổ UV-Vis **càng nhạy càng tốt**, để có thể xác định được **hàm lượng nhỏ và vết** của chất phân tích.
- Sản phẩm sinh ra phải **ổn định**, có thành phần **xác định**, **không phân ly và bền** trong một thời gian nhất định, đủ để có thể thực hiện được phép đo phổ UV-Vis và **tính đúng được nồng độ chất phân tích**.



# ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



$$A_{\lambda} = \varepsilon.L.C^b$$

A: Độ hấp thụ quang

$\lambda$ : Bước sóng chùm sáng kích thích (nm)

L: Bề dày lớp dung dịch (bề dày cuvet) (cm)

C: Nồng độ dung dịch (M)

b: Hệ số phụ thuộc vào bản chất và nồng độ của mỗi chất hấp thụ quang ( $0 < b \leq 1$ )

Khi  $b = 1 \rightarrow A = \varepsilon.L.C$

$\varepsilon$ : Hệ số tắt phân tử/hệ số hấp thụ quang riêng phần phân tử gam của chất, đặc trưng cho mỗi chất

Nếu nồng độ chất trong cuvet  $C_X = 1 \text{ M}$  và  $L = 1 \text{ cm}$ , thì ta có:  $A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda}$

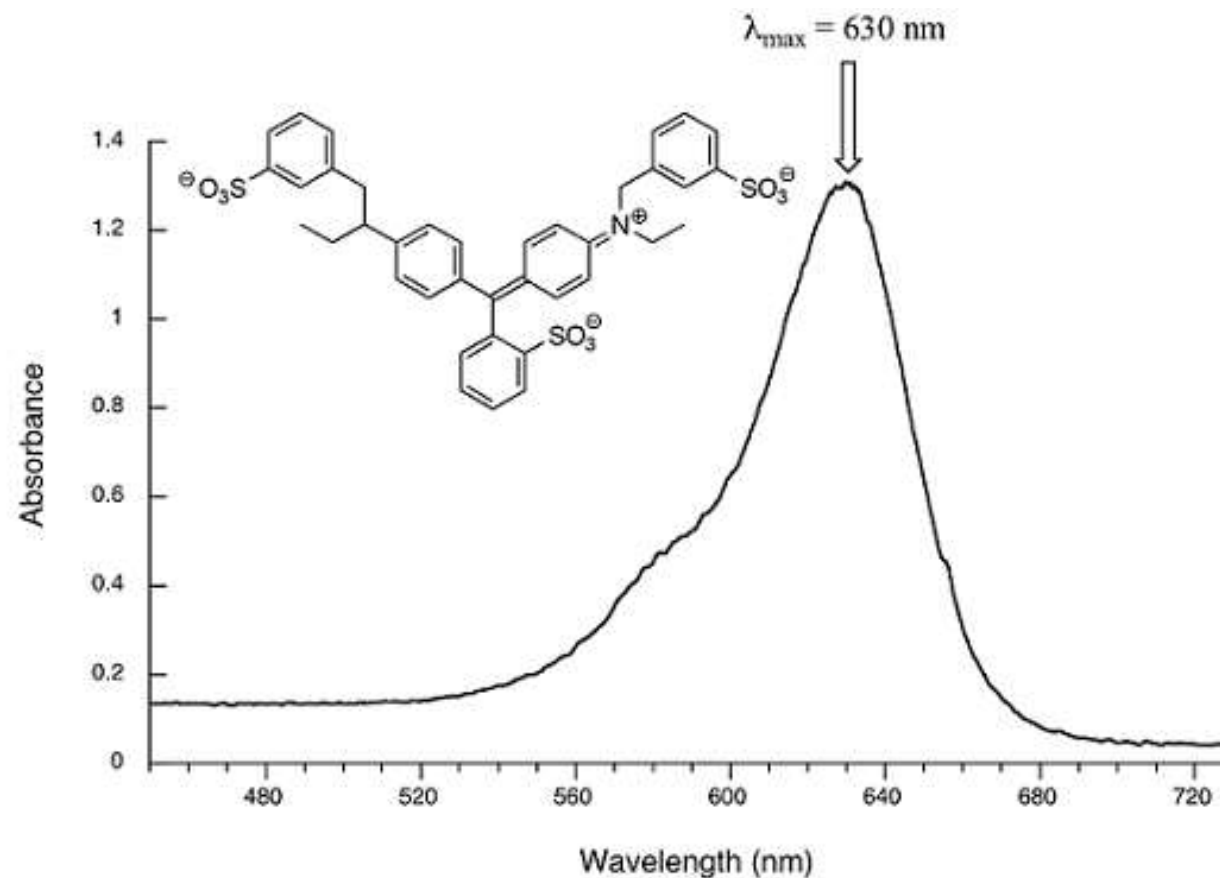
 **Những sai lệch đối với Định luật hấp thụ quang sẽ dẫn đến sai số trong phương pháp UV-Vis?**

# CÁC TÍNH CHẤT CỦA ĐỘ HẤP THỤ QUANG



Độ hấp thụ quang phụ thuộc vào bước sóng:  $A = f(\lambda)$

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

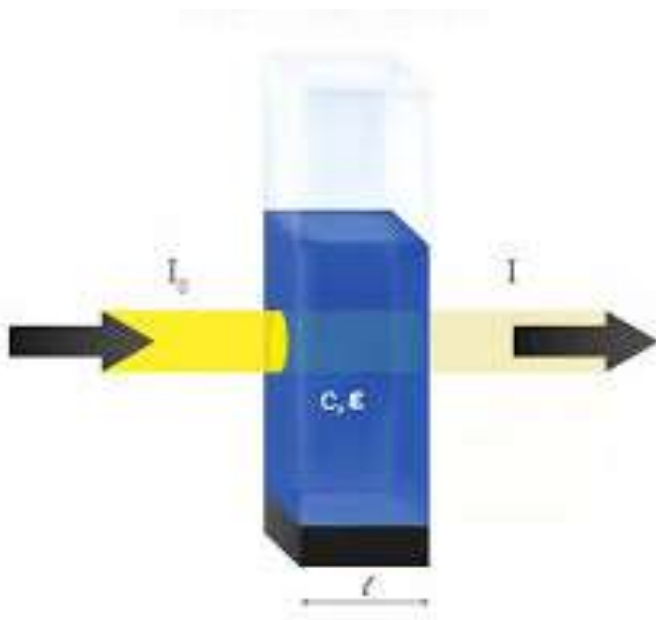


**Cần tìm ra bước sóng phù hợp (bước sóng cực đại  $\lambda_{\max}$ ) để thu được độ hấp thụ quang cực đại  $A_{\max}$**

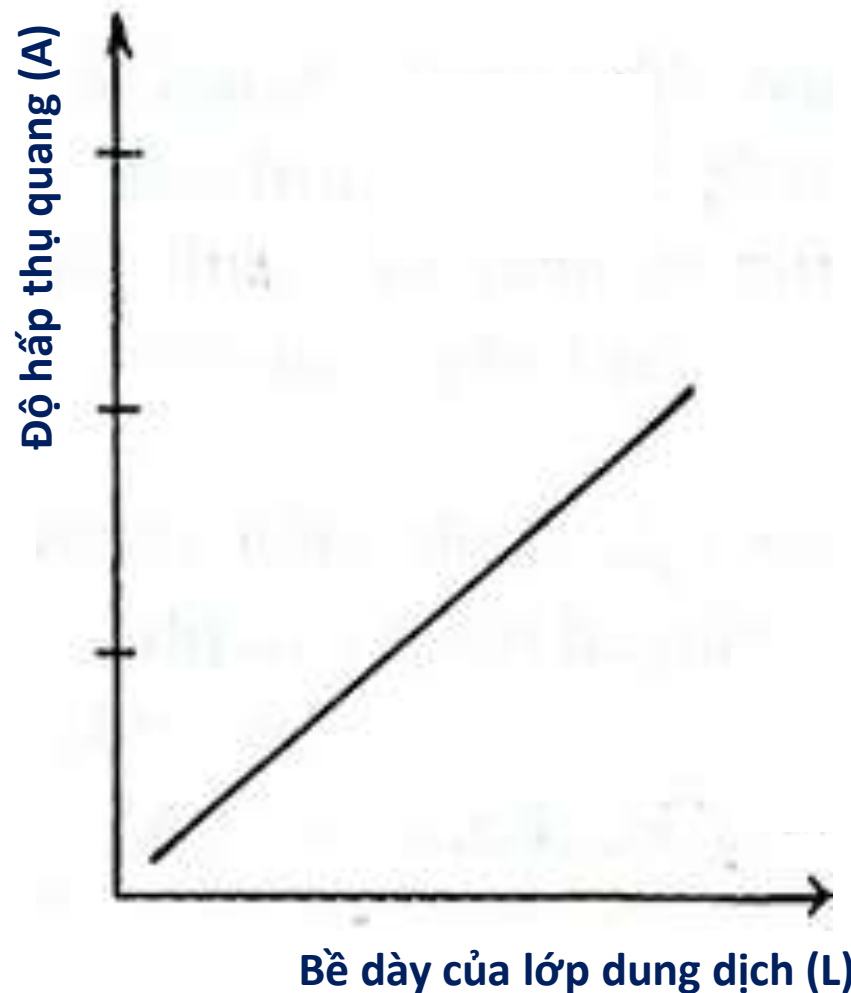
# CÁC TÍNH CHẤT CỦA ĐỘ HẤP THỤ QUANG



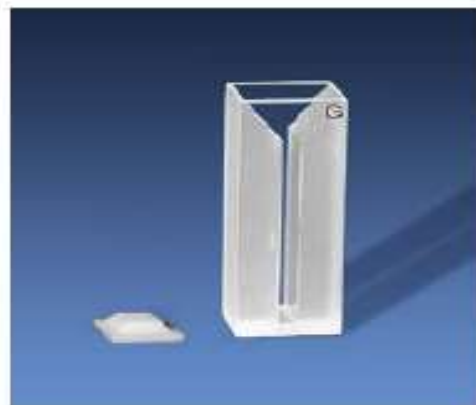
Độ hấp thụ quang phụ thuộc vào bước sóng:  $A = f(\lambda)$



**Bề dày lớp dung dịch càng tăng thì độ hấp thụ quang càng lớn**  
**Để thuận tiện:  $L = 1 \text{ cm}$**



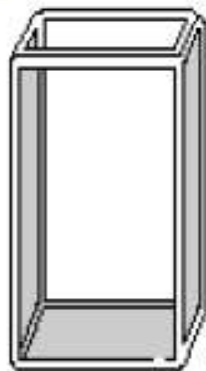
# MỘT SỐ LOẠI CUVET DÙNG TRONG UV-VIS



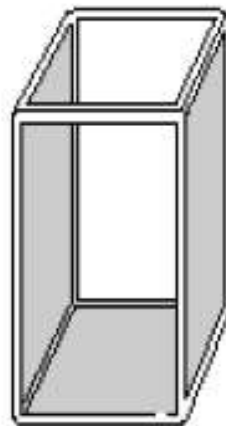
2.5mm



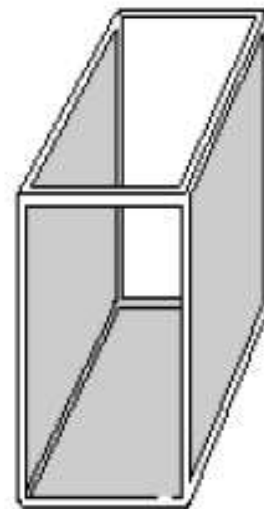
5mm



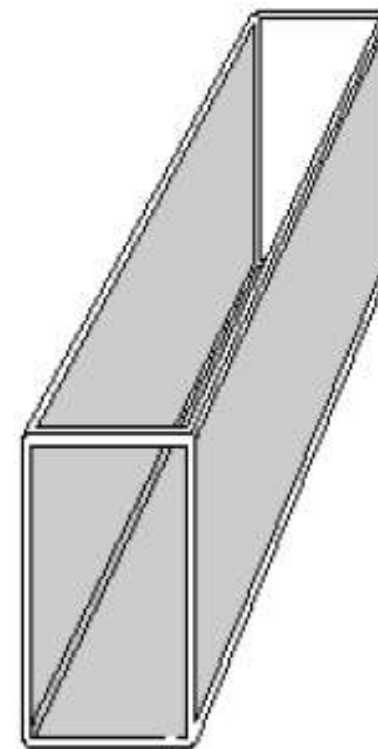
10mm



20mm



40mm



100mm



**Để thuận tiện, thường dùng cuvet có  $L = 1\text{ cm}$**



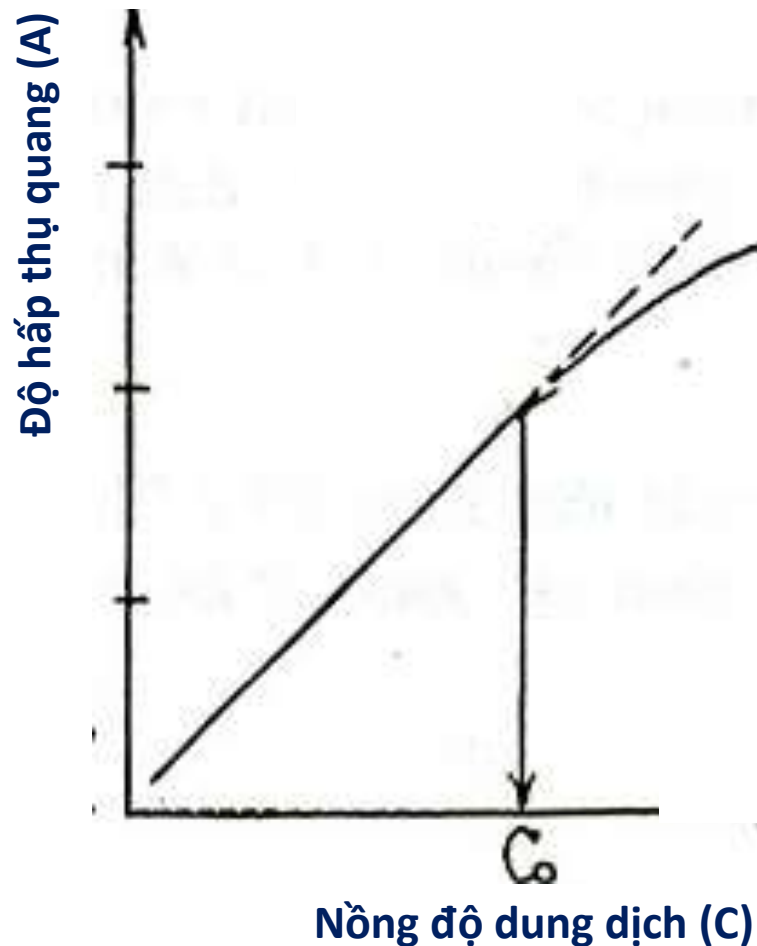
# CÁC TÍNH CHẤT CỦA ĐỘ HẤP THỤ QUANG



Độ hấp thụ quang phụ thuộc vào nồng độ:  $A = f(C)$

Với mọi chất có phổ hấp thụ phân tử vùng UV-Vis, luôn tìm được một giá trị nồng độ  $C_0$  để:

- Với mọi  $C_X < C_0$ : thì  $b = 1$ , quan hệ giữa độ hấp thụ quang  $A_\lambda$  và nồng độ  $C_X$  của chất trong cuvet là tuyến tính và phương trình độ hấp thụ quang có dạng  $y = ax$ .
- Với mọi  $C_X > C_0$ : thì  $0 < b < 1$  ( $b$  tiến dần về 0, khi  $C_X$  tăng), và quan hệ giữa độ hấp thụ quang  $A_\lambda$  và nồng độ  $C_X$  của chất trong cuvet là không tuyến tính.



**➔ Cần tìm giá trị  $C_0$  để thu được khoảng tuyến tính cho việc định lượng:  $A = k.C$  ( $y = a.x$ )**

# CÁC TÍNH CHẤT CỦA ĐỘ HẤP THỤ QUANG



Độ hấp thụ quang có tính chất cộng tính

## \* Dung dịch hỗn hợp

$$A_{dd} = (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$$

$$A_{dd} = (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2 + \dots + \epsilon_n C_n) \cdot L$$

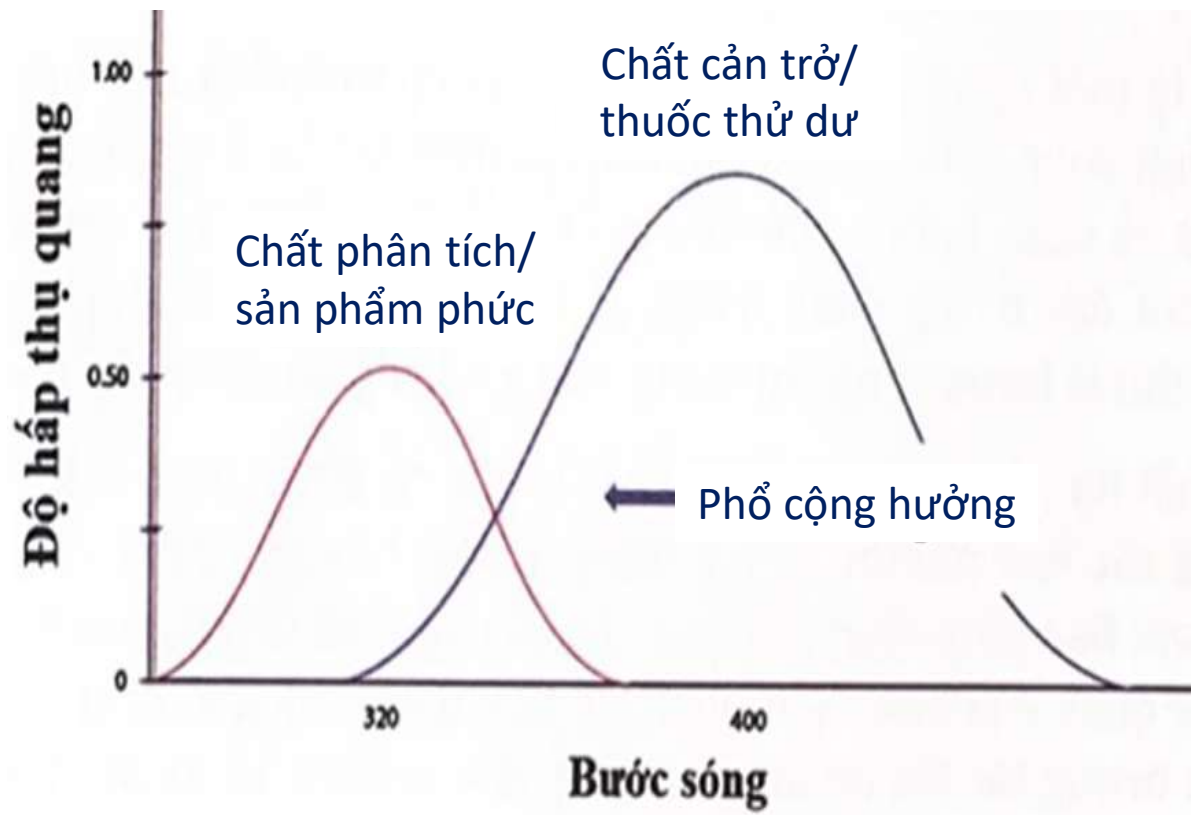
Từ đó có hệ phương trình:

$$A_{\lambda_1} = (\epsilon_{11} C_{11} + \epsilon_{12} C_{12} + \dots + \epsilon_{1n} C_{1n}) \cdot L \quad (1)$$

$$A_{\lambda_2} = (\epsilon_{21} C_{21} + \epsilon_{22} C_{22} + \dots + \epsilon_{2n} C_{2n}) \cdot L \quad (2)$$

... ..

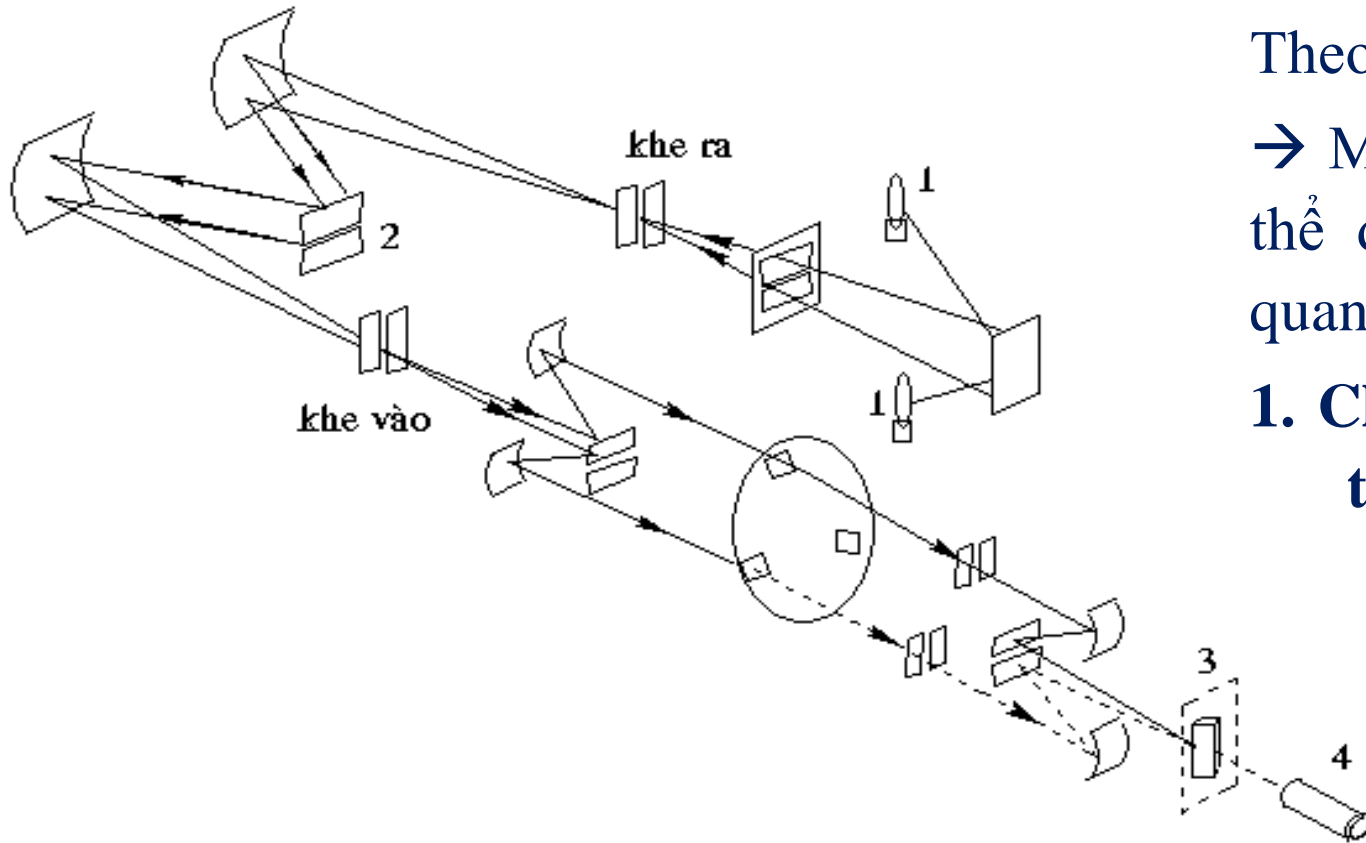
$$A_{\lambda_n} = (\epsilon_{n1} C_{n1} + \epsilon_{n2} C_{n2} + \dots + \epsilon_{nn} C_{nn}) \cdot L \quad (n)$$



## Cần chú ý khi:

- Trong dung dịch có nhiều cấu tử/chất phân tích có phổ gần nhau
- Khi sử dụng các thuốc thử/phối tử sẽ có phổ gần với phức

# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



Theo định luật hấp thụ quang:  $A = f(\lambda, L, C)$ .

→ Mọi sự sai lệch của ba tham số này đều có thể dẫn đến làm sai lệch quy luật hấp thụ quang.

**1. Chùm sáng chiếu vào cuvet không hoàn toàn đơn sắc.**

**→ Hệ thiết bị phải có bộ phận phân giải quang tốt (sử dụng cách tử), chọn lọc được các tia sáng có bước sóng phù hợp với chất phân tích, cho độ nhạy cao**

# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



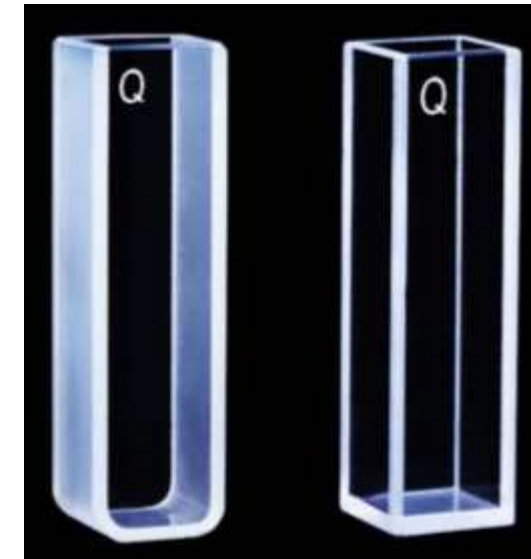
2. Các điều kiện đo độ hấp thụ quang  $A$ , ví dụ bề dày  $L$  của cuvet, độ trong suốt của bề mặt cuvet không thật đồng nhất, bề mặt cuvet gây các hiện tượng quang học phụ, như tán xạ, hấp thụ,.....



Cuvet nhựa



Cuvet thủy tinh



Cuvet thạch anh

**Cần sử dụng đúng vật liệu, chất lượng và phương thức chế tạo cuvet tốt nhất nhằm hạn chế các tín hiệu quang nhiễu và tăng cường độ nhạy cho phép phân tích**

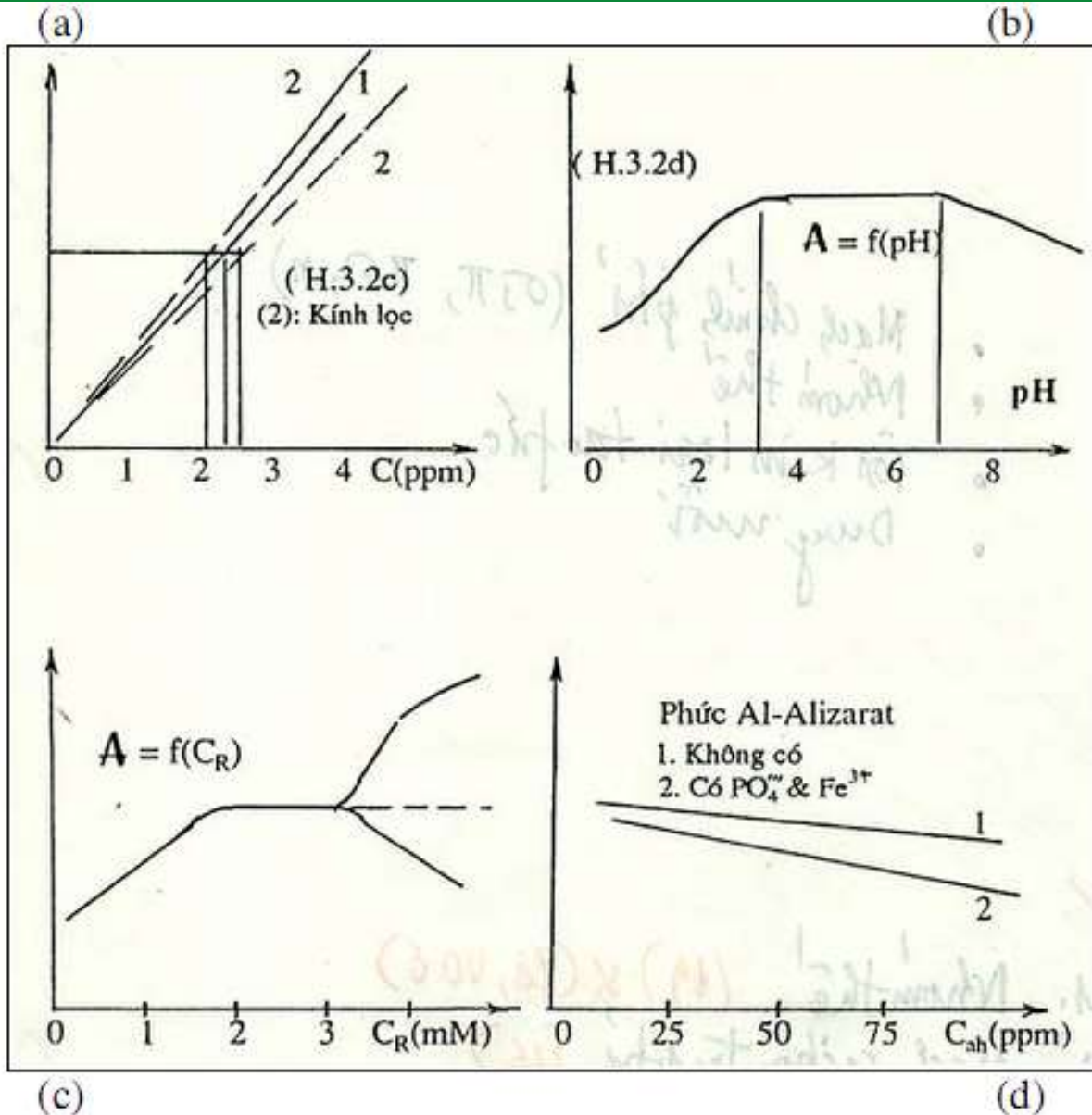
# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



## 3. Các yếu tố làm sai lệch nồng độ C thực của chất phân tích khi đo độ hấp thụ quang phân tử A. Nguyên nhân của các sai lệch này có thể bao gồm:

- Sự phân li của phân tử chất phân tích: độ phân ly  $\alpha = f(C) \rightarrow$  ở nhiệt độ và các điều kiện khác nhau thì  $\alpha$  sẽ khác nhau.  
 **$\rightarrow$  Để khắc phục yếu tố này, các hợp chất đo quang phải là các hợp chất bền, hay các phức bền. Tức là độ phân ly của chúng phải rất nhỏ, không đáng kể và càng nhỏ thì càng tốt.**
- Môi trường pH của dung dịch mẫu: yếu tố này ảnh hưởng đến sự hình thành, độ bền và sự tồn tại của các hợp chất trong dung dịch mẫu đo, nhất là các hợp chất có chứa các gốc acid hay base yếu.  
 **$\rightarrow$  Khảo sát tìm điều kiện pH sao cho kết quả độ hấp thụ quang lớn nhất và ổn định nhất**
- Sự tồn tại, lượng dư nhiều hay ít của thuốc thử tạo phức sinh ra hợp chất cần đo quang.  
 **$\rightarrow$  Khảo sát lượng thuốc thử phù hợp nhất (ít quá sẽ không đủ để tạo phức, nhiều quá sẽ gây ảnh hưởng đến kết quả độ hấp thụ quang của phức có chứa chất phân tích)**
- Sự có mặt của các ion và các chất lạ khác có trong dung dịch mẫu: yếu tố này rất phức tạp, phụ thuộc nền mẫu  
 **$\rightarrow$  Cần được xem xét/khảo sát trong mỗi trường hợp cụ thể, nếu có ảnh hưởng cần phải loại trừ bằng phương thức phù hợp.**

# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



(a)- Do nguồn không đơn sắc.

(b)- Do môi trường, pH dung dịch đo.

(c)- Do thuốc thử dư nhiều.

(d)- Do các ion khác có trong mẫu.

# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



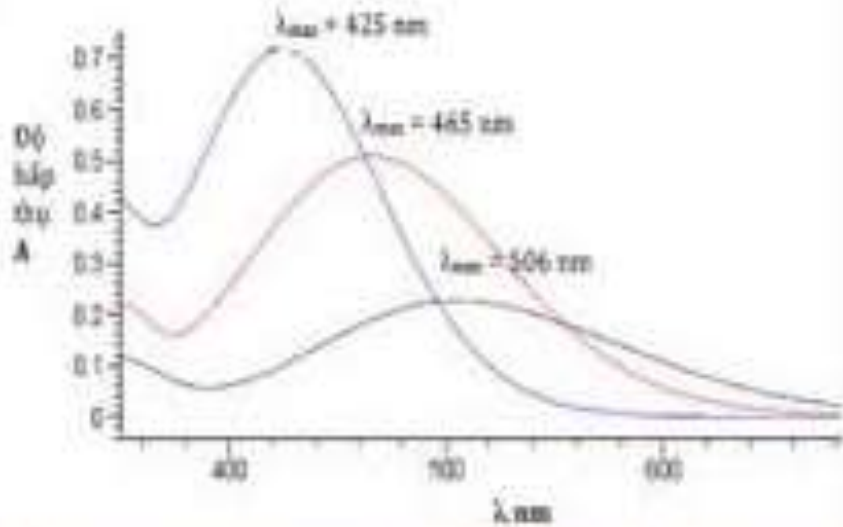
**4. Trong một mức độ nhất định, độ hấp thụ A của các chất có phụ thuộc vào nhiệt độ, hoặc chất phân tích/sản phẩm phức bị phân hủy khi nhiệt độ tăng/cao.**

→ Cần khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đối với mỗi phép đo UV-Vis của các chất phân tích nhất định, nếu cần, phải ổn định nhiệt độ trong suốt quá trình đo phổ UV-Vis.

**5. Các bộ phận trong hệ quang của máy đo phổ hấp thụ, như sự hấp thụ, sự tán xạ, sự phản xạ ánh sáng của các thấu kính, lăng kính, cách tử, các hệ gương, và tính không thật đồng nhất cao của chúng.**

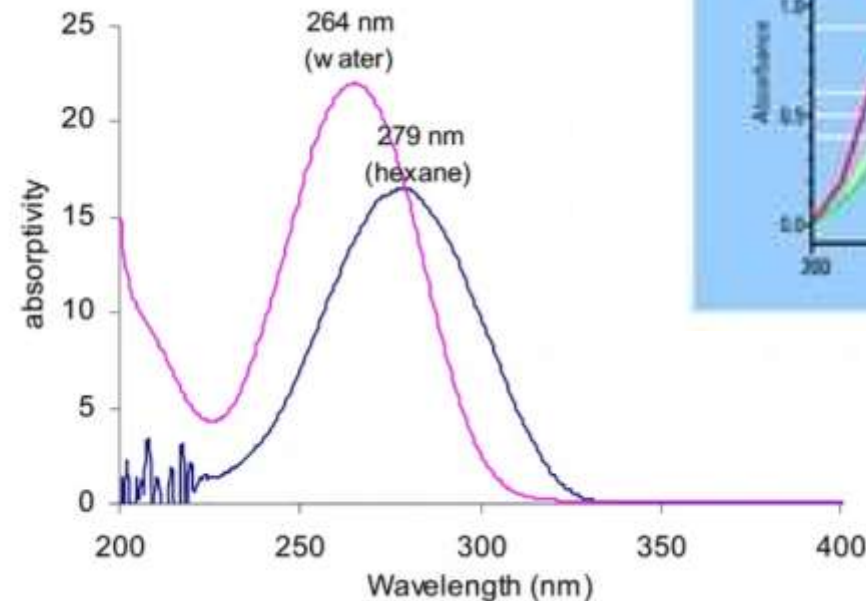
→ Các yếu tố này, khi chế tạo máy đo quang UV-Vis, các hãng đã cố gắng hết mức để hạn chế đến mức nhỏ nhất, mà có thể bỏ qua được. Điều này phụ thuộc vào mỗi máy đo phổ UV-Vis và mỗi hãng chế tạo (chất lượng của máy đo UV-Vis) khác nhau sẽ có các phương thức bổ chính nền khác nhau nhằm hạn chế ảnh hưởng này

# CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY SAI LỆCH ĐỊNH LUẬT HẤP THỤ QUANG



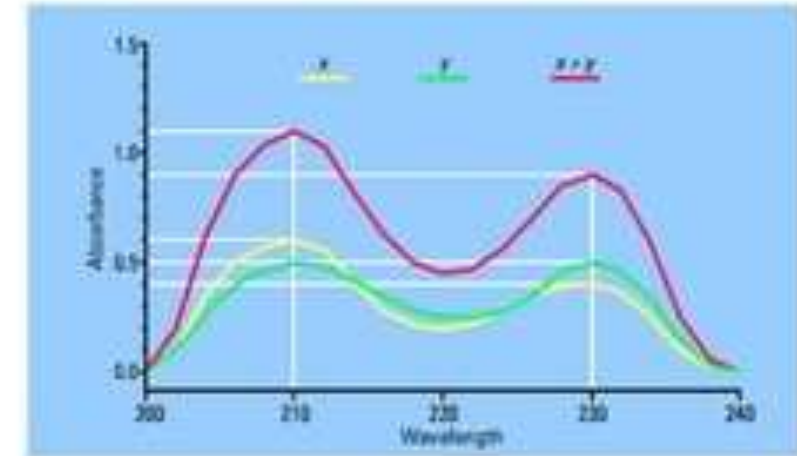
Phổ hấp thụ của phức  $\text{Fe}^{3+}$  ở các miền pH khác nhau

**Ảnh hưởng của pH: phổ UV-Vis của phức  $\text{Fe}^{3+}$  ở các pH khác nhau**



**Ảnh hưởng của dung môi: phổ UV-Vis của aceton trong dung môi nước và hexan**

**Ảnh hưởng của sự chen lấn phổ**





# CÁC CHÚ Ý KHI ĐO TRÊN THIẾT BỊ UV-VIS



## Trước khi đo

- Cần đảm bảo rằng cuvet sạch sẽ, các giọt nước trên thành bên trong/ngoài cần được lau bằng giấy chuyên dụng. Không được dùng tay lau trực tiếp, dễ gây thương tích cho tay người sử dụng và/hoặc xước cuvet.
- Mẫu nên chiếm từ 66% đến dưới 80% tổng thể tích của cuvet là tốt nhất. Không nên để quá nhiều để dẫn đến việc mẫu trong cuvet tràn ra ngoài và làm ăn mòn thiết bị, nếu ít quá sẽ không đo được hoặc cho kết quả không chính xác.

## Trong quá trình đo

- Khi thiết bị đang hoạt động, không được mở nắp khoang chứa mẫu.
- Khi thiết bị quang phổ đang hoạt động, tuyệt đối không để dung môi lỏng lên bề mặt của thiết bị. Nếu có rò rỉ chất lỏng, cần phải được làm sạch kịp thời.

# CÁC CHÚ Ý KHI ĐO TRÊN THIẾT BỊ UV-VIS




## Sau khi đo

- Khi đo xong, chất thải lỏng trong cuvet cần được xử lý kịp thời, làm sạch các cuvet bằng nước cất và sấy khô tự nhiên hoặc bằng thiết bị chuyên dụng,
- Tắt nguồn máy sau khi sử dụng theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Sử dụng thiết bị quang phổ trong điều kiện môi trường nhất quán, yếu tố nhiệt độ và không khí cần đảm bảo đúng như hướng dẫn của nhà sản xuất khuyến cáo.
- Thường xuyên hiệu chuẩn thiết bị quang phổ nhằm đảm bảo hạn chế tối đa sai số, cho kết quả chính xác nhất.


# CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI ĐO UV-VIS



Vấn đề	Giải pháp
Không sử dụng đúng cuvet khi đo ở các vùng phổ khác nhau	<ul style="list-style-type: none"><li>- Vùng UV: cuvet thạch anh</li><li>- Vùng Vis: cuvet thạch anh, thủy tinh, nhựa</li></ul>
Không phân biệt được mặt trong và mặt nhám ở một số cuvet, đặc biệt là cuvet nhựa, làm kết quả bị sai lệch	<p>Phân biệt dựa vào mũi tên trên cuvet: mặt có mũi tên là mặt trong</p> 

# CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI ĐO UV-VIS



Vấn đề	Giải pháp
Kết quả không khác nhau qua các nồng độ đo hoặc kết quả đo không tuyến tính khi đo dãy dung dịch chuẩn	Có thể do tráng cuvet chưa được cẩn thận, sau mỗi lần đo cần tráng lại bằng dung môi phù hợp (nước) và dung dịch mẫu đo tiếp theo
Thể tích mẫu quá ít	Cần cho mẫu vào khoảng 2/3 đến 3/4 cuvet 

# CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI ĐO UV-VIS



Vấn đề	Giải pháp
Kết quả bị nhiễu, tín hiệu không lặp lại	Có thể do dung dịch mẫu đo có bọt khí
Kết quả đo bất thường, không cho giá trị đúng	Đặt sai chiều của cuvet khi đo mẫu với máy UV-Vis → Mặt trong là mặt ánh sáng truyền qua



# CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI ĐO UV-VIS



Vấn đề	Giải pháp
Kết quả bị thay đổi theo thời gian	<ul style="list-style-type: none"><li>- Một số dung dịch dễ bay hơi → cần sử dụng dụng cụ cuvet có nắp tránh bị bay hơi</li><li>- Một số phức không bền, bị phân ly → cần nghiên cứu độ bền của phức theo thời gian và đo trong khoảng thời gian phức bền</li></ul>
Kết quả đo bị nhiễu nền hoặc nồng độ cao hơn	Khi đo mẫu cần có mẫu trắng (mẫu blank) để bù trừ nền: nền dung môi, thuốc thử và cả nền mẫu
Chưa phân biệt được vị trí đặt mẫu blank và mẫu đo, thao tác khi đo ở máy UV-Vis	<ul style="list-style-type: none"><li>- Với máy 1 chùm tia: đo và “zero” mẫu blank và sau đó đo tiếp các dung dịch mẫu</li><li>- Với máy 2 chùm tia: cần giữ nguyên cuvet chứa mẫu blank và thay đổi các dung dịch đo ở cuvet còn lại</li></ul>

# CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP KHI ĐO UV-VIS



Vấn đề	Giải pháp
Đôi khi nồng độ không tuyến tính với A theo phương trình $A = \epsilon bc$	Cần khảo sát có thể nồng độ tuyến tính theo quan hệ: $\log C$ tuyến tính với A, ...
Tín hiệu cao quá hoặc thấp quá	Nếu nồng độ dung dịch cao quá hoặc thấp quá, ngoài khoảng đường chuẩn/khoảng tuyến tính thì tăng nồng độ (làm giàu) hoặc pha loãng dung dịch đo
Tín hiệu thấp hơn bình thường	<ul style="list-style-type: none"><li>- Có thể do phức màu bị ảnh hưởng bởi ánh sáng, cần để trong bình tối màu hoặc bọc bằng giấy bạc</li><li>- Có thể do đèn giảm năng lượng, cần phải đảm bảo nguồn điện ổn định, hạn chế số lần bật tắt, nên kiểm tra số giờ sử dụng của đèn để đảm bảo cường độ ánh sáng phù hợp</li></ul>

# KẾT LUẬN



- Phương pháp UV-Vis có **nguyên tắc cơ bản, dễ thực hiện**, cho độ chính xác và độ nhạy phù hợp
- Trong quá trình đo phổ UV-Vis cần **tuân thủ các bước** theo nguyên tắc của phương pháp.
- Cần **chú ý các sai lệch của độ hấp thụ quang**, các chú ý trong quá trình đo tùy thuộc vào đối tượng chất phân tích và nền mẫu.
- Với mỗi trường hợp đo quang cụ thể của các chất phân tích cần **xem xét tất cả các yếu tố trên**, để tìm ra các **điều kiện thích hợp nhất** cho phép đo phổ UV-Vis, nhằm loại trừ các ảnh hưởng và đạt độ chính xác cao của phép phân tích.





**XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN!**