

Chương 8

PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ VÀ HỆ THỐNG XÉT NGHIỆM HÓA SINH

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. Nguyên lý xét nghiệm của máy xét nghiệm hóa sinh tự động.
2. Cấu trúc cơ bản của máy xét nghiệm hóa sinh tự động.
3. Vận hành, bảo dưỡng cơ bản cho máy xét nghiệm hóa sinh tự động.
4. Một số lỗi thường gặp trong quá trình vận hành máy xét nghiệm hóa sinh tự động và biện pháp khắc phục.
5. Giới thiệu một số hệ thống xét nghiệm hóa sinh.

1. TỔNG QUAN VỀ PHƯƠNG PHÁP

1.1. Khái niệm về phương pháp

Phương pháp quang phổ là phương pháp xác định, định lượng sự tương tác của ánh sáng với các phần tử vật chất và đóng vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Bản chất của sự tương tác này phụ thuộc vào các đặc tính vật lý, hóa học của chúng. Phép đo quang phổ bao gồm quang phổ tán xạ, quang phổ hấp thụ, quang phổ phát xạ...

Phương pháp quang phổ được nói đến trong nội dung bài viết này mang bản chất là quang phổ hấp thụ - một kỹ thuật đo lường ánh sáng hấp thụ khi ánh sáng đi qua một dung dịch chất hay hợp chất. Mọi hợp chất hóa học đều hấp thụ, truyền hoặc phản xạ ánh sáng (bức xạ điện từ) trên một dải bước sóng nhất định. Nguyên tắc cơ bản là mỗi hợp chất hấp thụ hoặc truyền ánh sáng trên một dải bước sóng nhất định. Phép đo quang phổ cho phép phân tích định lượng hữu ích trong các lĩnh vực khác nhau như hóa học, vật lý, hóa sinh, vật liệu và kỹ thuật hóa học và các ứng dụng lâm sàng.

1.2. Lịch sử phương pháp

Những khía cạnh cơ bản của quang học, chẳng hạn như các định luật chi phối sự khúc xạ ánh sáng và bản chất của ánh sáng đã được thiết lập và định nghĩa cụ thể vào những năm 1760, dưới lý thuyết về ánh sáng của Isaac Newton. Vào những năm 1800, khoa học thế giới đã sẵn sàng cho các phép đo chính xác về bước sóng và những khái niệm bước đầu đánh dấu sự ra đời của quang phổ định lượng. Đầu những năm 1920, các nhà khoa học nhận ra rằng điều quan trọng là các kết quả từ phép đo quang phổ không chỉ cung cấp các thông tin định tính mà còn đáng tin cậy và có ý nghĩa về phân tích định lượng. Năm 1925, Hiệp hội Quang học Hoa Kỳ đã thành lập một ủy ban tiến bộ về phép đo quang phổ và ban hành một báo cáo thống

nhất về phương pháp quang phổ, trong báo cáo này các vấn đề còn tồn đọng của phép đo quang phổ vào thời điểm đó được đề cập đến. Bên cạnh việc thiếu tự động hóa rõ ràng, nhiều vấn đề được đề cập đến trong báo cáo còn liên quan đến việc thu thập và phân tích kết quả từ phép đo này.

Máy quang phổ tự động đầu tiên ra đời vào những năm 1928-1928 bởi Hardy và cộng sự của ông tại Học viện Công nghệ Massachusetts. Sau giai đoạn này các ứng dụng của máy quang phổ được phổ biến ngày càng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Thiết bị phân tích quang phổ tự động được thương mại hóa vào những năm 1940 với máy đo quang phổ DU (Model D Ultraviolet) của Arnold Beckman. Thiết bị này cùng với một loạt các hệ thống máy quang phổ cùng thời kỳ được thiết kế lựa chọn các bước sóng phân tích một cách thủ công, đọc trực quan và ghi các giá trị đầu ra của thiết bị để phân tích. Độ phức tạp của các thiết bị phân tích ngày càng tăng lên bao gồm phân tích các tín hiệu huỳnh quang, quét phân tích đồng thời cả bước sóng đầu vào và đầu ra thiết bị. Cùng với sự ra đời của chất bán dẫn, mạch tích hợp và máy tính cá nhân dần làm giảm bớt kích thước và độ phức tạp của các thiết bị đo quang, đồng thời bổ sung khả năng phân tích, lưu trữ và đánh giá dữ liệu thu được. Năm 1979 máy quang phổ mảng diode thương mại đầu tiên được sản xuất với tên gọi HP 8450A bởi Hewlett-Packard. Khác với máy quang phổ của Beckman thiết bị này cung cấp nguồn sáng đầu vào với nhiều bước sóng khác nhau, sự hấp thụ ánh sáng của các phân tử vật chất phụ thuộc vào tính chất của nó, tín hiệu được thu nhận bằng các cách tử mảng diode quang phát hiện vùng bước sóng của quang phổ. Kể từ đó việc chế tạo và ứng dụng của các thiết bị quang phổ đã tăng lên rất nhiều và trở thành một công cụ hữu hiệu được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

2. NGUYÊN LÝ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Cơ sở vật lý và hoá học

Ánh sáng là một dạng phân tử vật chất, vừa có tính chất hạt vừa có tính chất sóng. Về tính chất sóng, ánh sáng có bản chất sóng điện từ, lan truyền trong không gian có vật chất và chân không, vận tốc lan truyền của ánh sáng trong chân không là 3.10^8 m/s. Một đặc trưng quan trọng về bản chất sóng của ánh sáng cũng như quang phổ hấp thụ là bước sóng ánh sáng, còn gọi là độ dài sóng (ký hiệu).

Về tính chất hạt, ánh sáng có bản chất lượng tử được lan truyền trong không gian dưới dạng các hạt photon mang năng lượng. Chuyển động của phân tử vật chất rất phức tạp, bao gồm chuyển động của các nguyên tử, chuyển động dao động và chuyển động quay của bản thân phân tử. Mỗi dạng chuyển động phân tử xảy ra đồng thời và có tương tác lẫn nhau, mỗi dạng đều có năng lượng đặc trưng, với:

$$E_{\text{phân tử}} = E_{\text{nguyên tử}} + E_{\text{dao động}} + E_{\text{quay}}.$$

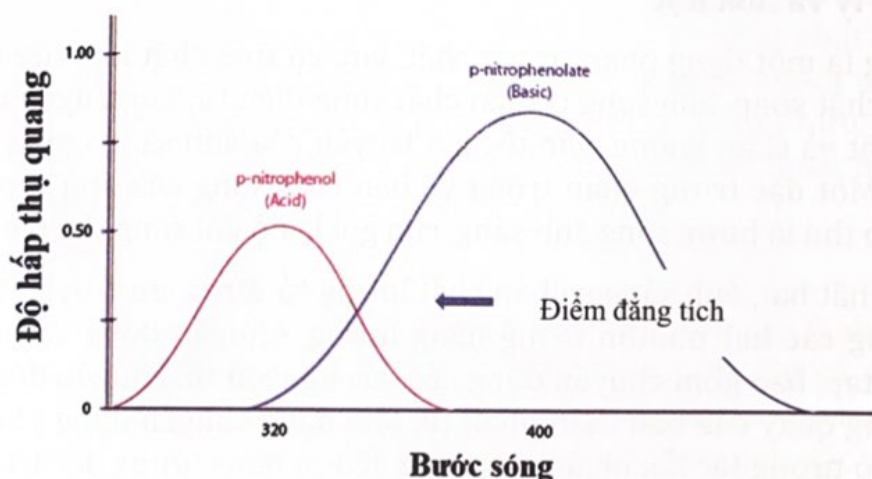
Phân tử vật chất chỉ có thể nhận (thu) hoặc mất (phát) năng lượng theo từng lượng tử một, nghĩa là từng bước tương ứng với chênh lệch giữa các mức năng lượng của phân tử một cách gián đoạn. Sự chuyển dịch giữa các mức năng lượng

điện tử đòi hỏi năng lượng lớn hơn nhiều so với sự chuyển dịch giữa các mức năng lượng giao động, còn sự chuyển dịch giữa các năng lượng giao động lại đòi hỏi mức năng lượng lớn hơn nhiều so với sự chuyển dịch giữa các mức năng lượng quay. Biến thiên năng mức năng lượng điện tử hóa trị của phân tử tương ứng với mức năng lượng của các hạt ánh sáng (photon) có bước sóng trong vùng tử ngoại và khả kiến. Đây là cơ sở lý thuyết của phương pháp quang phổ.

Quang phổ hấp thụ thực chất là quá trình tương tác giữa các hạt photon của ánh sáng với các phân tử vật chất. Khi chiếu chùm tia ánh sáng trắng với các photon có mức năng lượng khác nhau đi qua một dung dịch chất hấp thụ trong suốt, dung dịch chỉ hấp thụ chọn lọc những photon có mức năng lượng phù hợp với năng lượng điện tử, năng lượng giao động và năng lượng quay của nó. Như vậy, các phân tử vật chất cấu trúc khác nhau sẽ cho những phổ hấp thụ với các đỉnh tần số (bước sóng) khác nhau.

Quá trình hấp thụ photon xảy ra trong khoảng thời gian rất ngắn. Sau hấp thụ photon, mức năng lượng của phân tử tăng lên và chuyển sang trạng thái kích thích không bền vững, sau đó, ngay lập tức phân tử giải phóng năng lượng dư thừa và trở về trạng thái bền vững. Năng lượng dư thừa có thể được trả lại dưới dạng bức xạ có ánh sáng bước sóng dài hơn, như ánh sáng huỳnh quang hoặc quang lân, hoặc chuyển thành chuyển động nhiệt của phân tử.

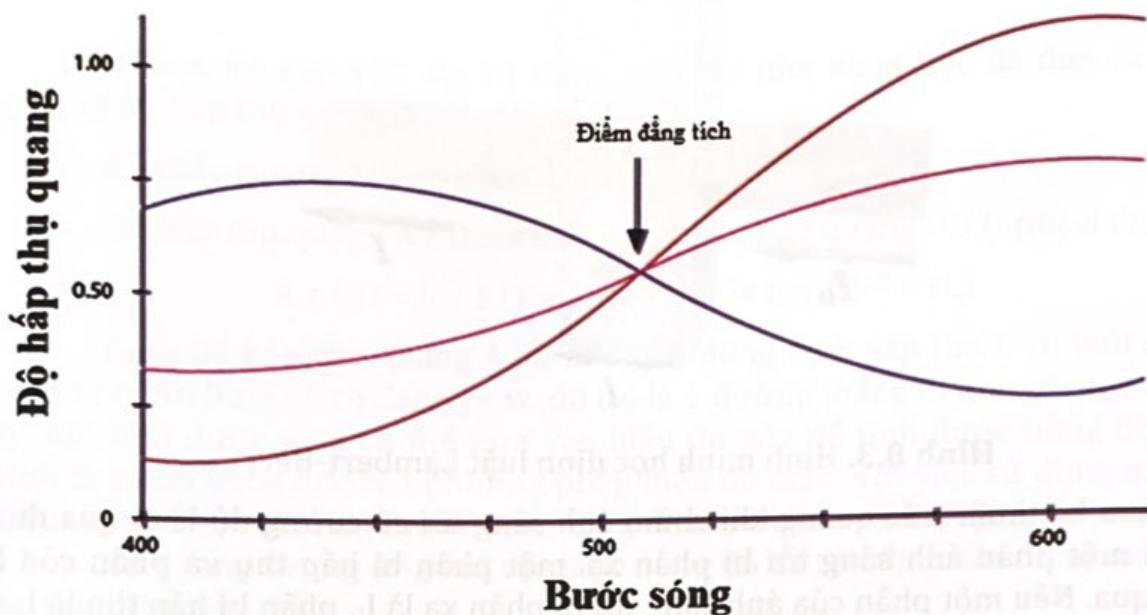
Một máy quang phổ tạo ra nhiều bước sóng vì các hợp chất khác nhau hấp thụ tốt nhất ở các bước sóng khác nhau. Giá trị này được gọi là bước sóng hấp thụ cực đại, đây là bước sóng mà tại đó sự hấp thụ ánh sáng của phân tử vật chất là lớn nhất. Bước sóng hấp thụ cực đại của một chất được xác định thông qua việc khảo sát giá trị độ hấp thụ quang (A =Absorbance) ở các giá trị bước sóng khác nhau. Ví dụ, p-nitrophenol (dạng acid) có độ hấp thụ cực đại ở khoảng 320 nm và p-nitrophenolat (dạng cơ bản) hấp thụ tốt nhất ở 400nm, như thể hiện trong hình 8.1.



Hình 8.1. Độ hấp thụ của hai hợp chất khác nhau

Nhìn vào biểu đồ đo độ hấp thụ và bước sóng, cũng có thể quan sát thấy một điểm đẳng tích. Điểm đẳng tích là bước sóng mà độ hấp thụ của hai chất hoặc nhiều

hơn là như nhau. Sự xuất hiện của điểm đẳng tích trong phản ứng chứng tỏ rằng KHÔNG cần chất trung gian để tạo thành sản phẩm từ chất phản ứng.



Hình 8.2. Điểm đẳng tích

2.2. Định luật Lambert-Beer

2.2.1. Một số khái niệm

2.2.1.1. Độ thấu quang (T-Transmittance)

Khi chiếu một chùm tia đơn sắc có cường độ I_0 qua một dung dịch chất hấp thụ cường độ chùm tia ló I_t . Mối liên quan giữa giá trị I_0 và I_t được biểu thị thông qua giá trị độ truyền qua T. Độ thấu quang được tính bằng công thức:

$$\text{Transmittance (T)} = I_t/I_0$$

Trong đó I_t là cường độ sáng sau khi chùm sáng đi qua cuvet và I_0 là cường độ sáng trước khi chùm sáng đi qua lớp phần tử vật chất.

2.2.1.2. Độ hấp thụ quang (A – Absorbance)

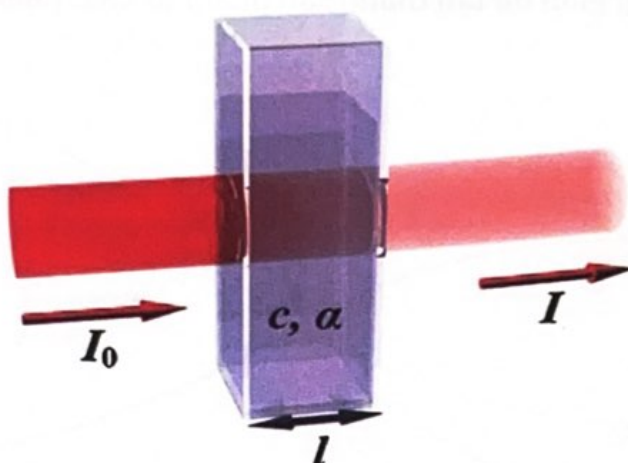
Độ hấp thụ quang (A) là đại lượng đặc trưng cho mức độ hấp thụ photon của các phần tử vật chất được phân tích, được tính toán bằng công thức:

$$\text{Absorbance (A)} = -\log(T) = -\log(I_t/I_0)$$

Độ hấp thụ quang A còn được gọi là mật độ quang (D)

Với lượng hấp thụ đã biết từ phương trình trên, có thể xác định nồng độ chưa biết của mẫu bằng cách sử dụng Định luật Beer-Lambert.

2.2.2. Định luật Lambert-Beer



Hình 8.3. Hình minh họa định luật Lambert-Berr

Theo kỹ thuật trắc quang khi chùm ánh sáng tới có cường độ I_0 đi qua dung dịch thì một phần ánh sáng tới bị phản xạ, một phần bị hấp thụ và phần còn lại truyền qua. Nếu một phần của ánh sáng tới bị phản xạ là I_r , phần bị hấp thụ là I_a và phần bị truyền đi là I_t . Sau đó, chúng ta có thể viết -

$$I_0 = I_r + I_a + I_t$$

Trong máy quang phổ I_r bị loại bỏ vì phép đo I_t và I_0 là đủ cho phép đo I_a . Vì vậy, I_r được giữ không đổi. Mối quan hệ giữa lượng ánh sáng được hấp thụ và nồng độ của chất có thể được thiết lập bằng cách tuân theo hai định luật:

Định luật Beer: Theo định luật này lượng ánh sáng bị hấp thụ tỷ lệ thuận với nồng độ chất tan trong dung dịch đang phân tích.

$$k = \epsilon \cdot C$$

Trong đó: k là hệ số hấp thụ

ϵ là hằng số

C là nồng độ chất tan trong dung dịch

Định luật Lambert: Theo định luật này, lượng ánh sáng được hấp thụ tỷ lệ thuận với chiều dài hoặc độ dày của dung dịch đang phân tích.

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kl}$$

Trong đó: I_0 là cường độ ánh sáng tới

I_t là cường độ chùm tia ló

k là hệ số hấp thụ

l là chiều dày lớp dung dịch mà ánh sáng đi qua

Như vậy, nói một cách đơn giản, máy quang phổ dựa trên Định luật Beer-Lambert phát biểu rằng lượng ánh sáng bị hấp thụ tỷ lệ thuận với nồng độ của chất

tan trong dung dịch và độ dày của dung dịch được phân tích. Được biểu thị bằng công thức:

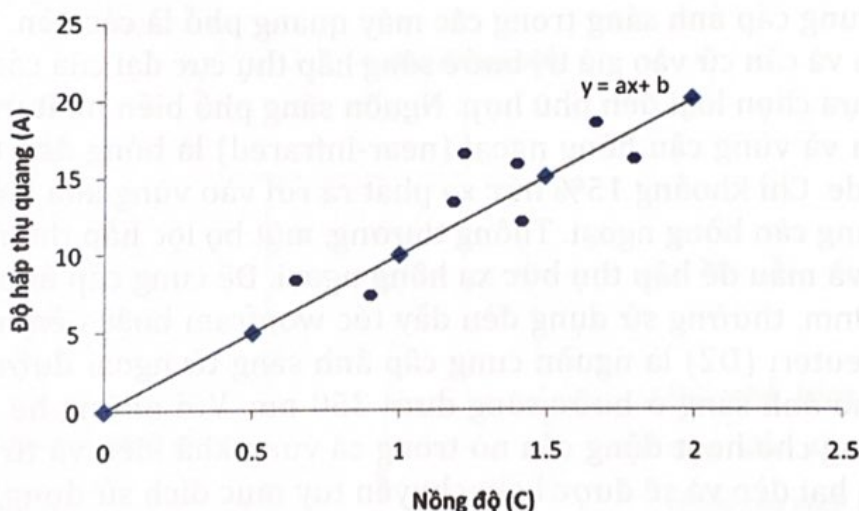
$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot C \cdot l}$$

Để thuận lợi cho việc đo và tính toán, các nhà khoa học đã đưa ra các đại lượng về sự hấp thụ của ánh sáng như:

- Độ thấu quang T: $T = I_t/I_0 = 10^{-\epsilon Cl}$
- Độ hấp thụ quang A (Absorbance) hay mật độ quang OD (optical density):

$$A = OD = \log 1/T = \log 1/10^{-\epsilon Cl} = \log 10^{\epsilon Cl} = \epsilon Cl$$

- Giữa độ hấp thụ quang A và nồng độ dung dịch hấp thụ C có mối quan hệ tuyến tính với hàm số có dạng $y=ax$, đồ thị là 1 đường thẳng đi qua gốc tọa độ. Như vậy, khi biết được A ta có thể dựa vào biểu đồ này để tính được nồng độ C. Đây chính là cơ sở khoa học của phương pháp biểu đồ mẫu. Với việc sử dụng một hoặc nhiều dung dịch chất hấp thụ với các nồng độ khác nhau và thực hiện việc đo giá trị độ hấp thụ quang tương ứng với các mức nồng độ để xác định các điểm tọa độ cho việc thiết lập biểu đồ.



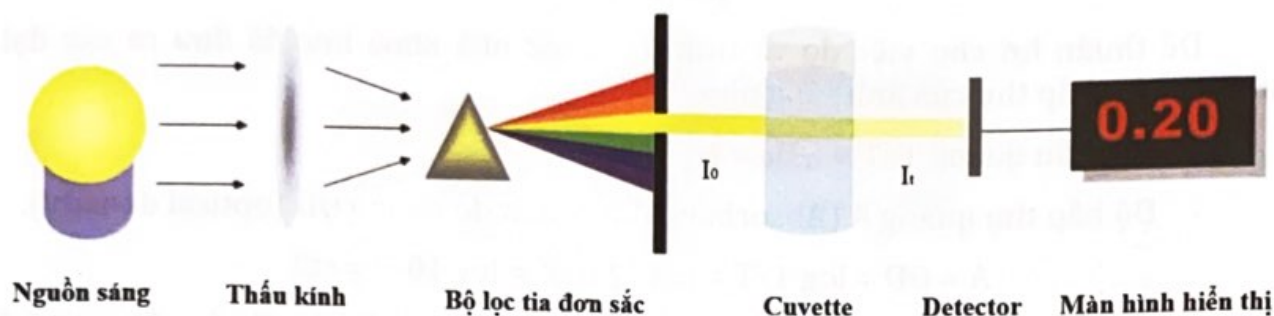
Hình 8.4. Biểu đồ mẫu

- Lưu ý: trong khoảng A hay OD nhỏ hơn 0.6 mật độ quang phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ dung dịch chất hấp thụ, còn khi $A(OD) > 0.6$ không còn thì tính chất tuyến tính không còn nữa nữa do khi dung dịch đặc, các phân tử hấp thụ ánh sáng ở gần nhau, một phần năng lượng hấp thụ sẽ mất đi do va chạm, vì vậy mối tương quan giữa A và C không còn tuyến tính. Vì vậy nếu xác định $OD > 0.6$ ta phải pha loãng dung dịch bằng các dung dịch pha loãng thích hợp với chất cần phân tích, sau đó giá trị nồng độ đo được sẽ phải nhân với độ pha loãng để ra được giá trị nồng độ cuối cùng của chất phân tích.

- Ứng với mỗi chất cần định lượng, hóa chất và phương pháp lựa chọn ánh sáng có bước sóng khác nhau, song cần lựa chọn bước sóng mà tại đó chất cần định lượng có độ hấp thụ cực đại để đảm bảo kết quả xét nghiệm.

3. CẤU TRÚC CƠ BẢN CỦA HỆ THỐNG ĐO QUANG PHỔ

3.1. Máy đo quang phổ (spectrophotometer)

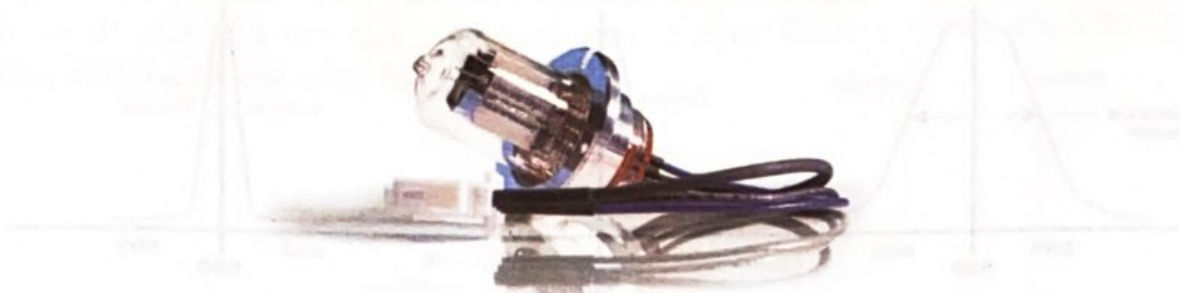


Hình 8.4. Máy quang phổ

Nhìn chung, cấu trúc cơ bản của máy quang phổ bao gồm các bộ phận chính như sau: nguồn sáng, bộ phận lọc tia đơn sắc, buồng đo, bộ phận thu nhận, phân tích và xử lý tín hiệu.

3.1.1. Nguồn sáng

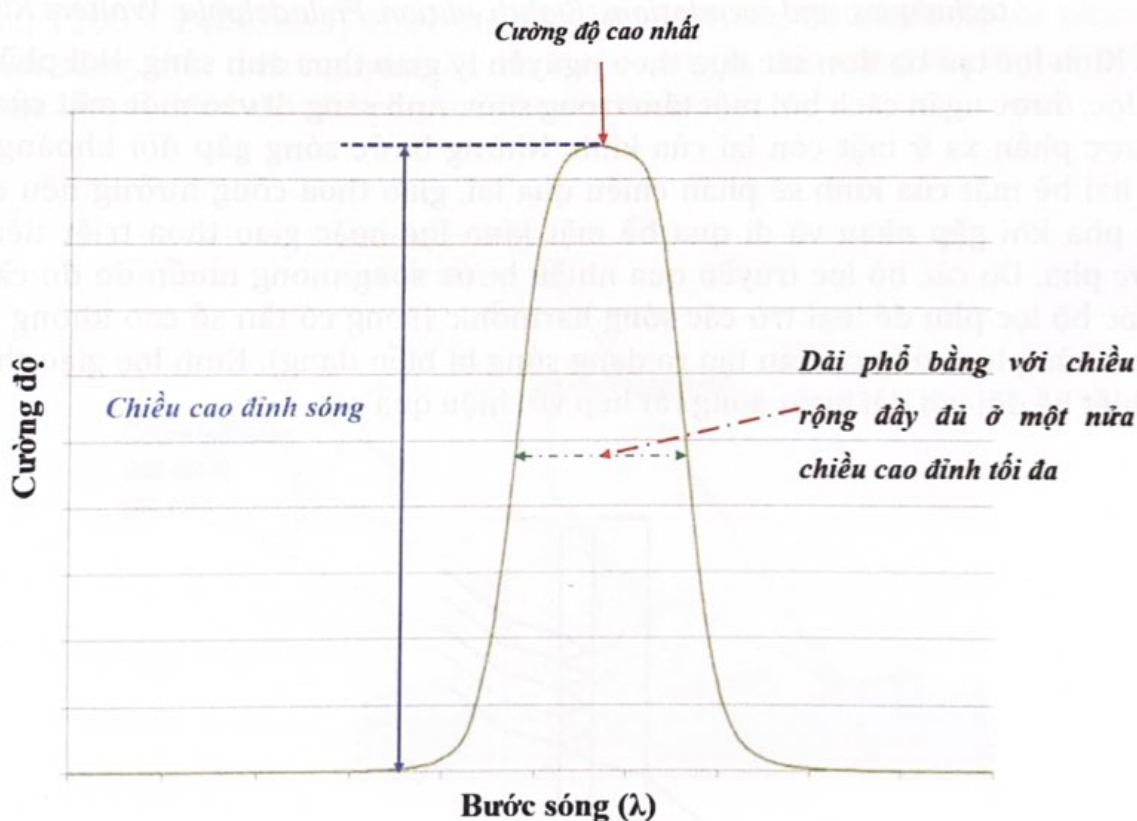
Nguồn cung cấp ánh sáng trong các máy quang phổ là các đèn. Tùy theo mục đích phân tích và căn cứ vào giá trị bước sóng hấp thụ cực đại của các hợp chất cần phân tích để lựa chọn loại đèn phù hợp. Nguồn sáng phổ biến nhất ứng dụng trong vùng khả kiến và vùng cận hồng ngoại (near-infrared) là bóng đèn tungsten hoặc tungsten-iodide. Chỉ khoảng 15% bức xạ phát ra rơi vào vùng khả kiến, còn lại hầu hết rơi vào vùng cận hồng ngoại. Thông thường, một bộ lọc hấp thụ nhiệt được lắp vào giữa đèn và mẫu để hấp thụ bức xạ hồng ngoại. Để cung cấp ánh sáng có bước sóng trên 320nm, thường sử dụng đèn dây tóc wolfram hoặc đèn halogen. Trong khi đó, đèn Deuteri (D2) là nguồn cung cấp ánh sáng tử ngoại được sử dụng phổ biến có thể cho ánh sáng ở bước sóng dưới 350 nm. Với những hệ thống máy sử dụng bước sóng cho hoạt động của nó trong cả vùng khả kiến và tử ngoại thường được bố trí cả hai đèn và sẽ được luân chuyển tùy mục đích sử dụng, hoặc sử dụng đèn có phổ phát xạ rộng ở cả hai vùng khả kiến và tử ngoại. Đèn thủy ngân áp suất thấp phát ra quang phổ vạch với cả vùng UV và vùng khả kiến. Đèn thủy ngân cao áp và trung bình phát ra liên tục từ vùng UV đến giữa vùng khả kiến. Yếu tố quan trọng nhất của nguồn sáng là giới hạn phát xạ, phân phối phổ trong giới hạn, nguồn cung cấp bức xạ, sự ổn định của năng lượng bức xạ và nhiệt độ.



Hình 8.5. Đèn Deuterium Tungsten Halogen

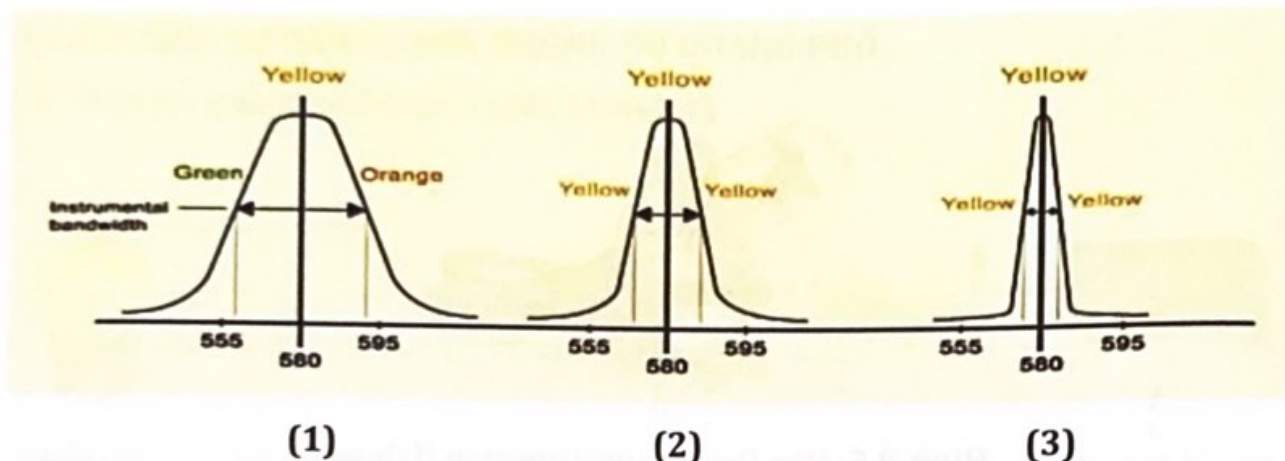
3.1.2. Bộ lọc tia đơn sắc

Sự phân tách ánh sáng thành các tia sáng đơn sắc nhờ bộ phận tạo tia đơn sắc. Mức độ phân tách ánh sáng phụ thuộc chức năng của từng loại bộ phận có thể tách tia đơn sắc và chiều rộng của khe sáng đến và đi. Dải phổ (bandpass) của bộ phận tạo tia đơn sắc được xác định là khoảng giới hạn của bước sóng truyền qua và chiều rộng của dải được tính toán tại vị trí một nửa chiều cao tối đa của cường độ bước sóng.



Hình 8.6. Cách xác định dải phổ (bandpass) của bộ phận tạo tia đơn sắc

Bộ phận tạo tia đơn sắc ít tổn kém nhất là kính lọc (colored-glass filters). Kính lọc thường có một dải bức xạ năng lượng tương đối rộng và có độ truyền thấp. Mặc dù không chính xác nhưng chúng đơn giản, rẻ tiền và dễ dùng.

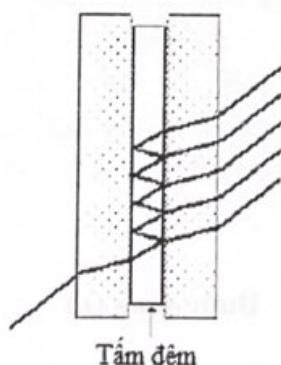


Hình 8.7. Độ rộng vạch phổ khác nhau của các thiết bị (Instrumental bandwidth)

- (1) Độ rộng vạch phổ lớn (50 nm): Có một dải màu của chùm sáng
- (2) Độ rộng vạch phổ trung bình (20 nm): Chùm sáng có một màu, kết quả không chính xác
- (3): Độ rộng vạch phổ hẹp (0.1 nm): Chùm sáng có một màu cho kết quả chính xác

(Nguồn: Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2018). *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer*)

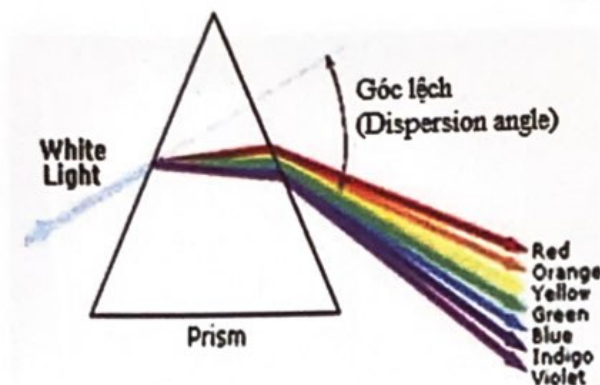
Kính lọc tạo tia đơn sắc dựa theo nguyên lý giao thoa ánh sáng. Hai phần của kính lọc, được ngăn cách bởi một tấm trong suốt. Ánh sáng đi vào một mặt của kính sẽ được phản xạ ở mặt còn lại của kính. Những bước sóng gấp đôi khoảng cách giữa hai bề mặt của kính sẽ phản chiếu qua lại, giao thoa cộng hưởng nếu chúng cùng pha khi gặp nhau và đi qua bề mặt kính lọc hoặc giao thoa triệt tiêu nếu ngược pha. Do các bộ lọc truyền qua nhiều bước sóng mong muốn do đó cần đòi hỏi các bộ lọc phụ để loại trừ các sóng harmonic (sóng có tần số cao không mong muốn chồng lên sóng cơ bản tạo ra dạng sóng bị biến dạng). Kính lọc giao thoa có thể thiết kế đối với dải bước sóng rất hẹp với hiệu quả cao.



Hình 8.8. Nguyên lý tạo tia đơn sắc của kính lọc giao thoa

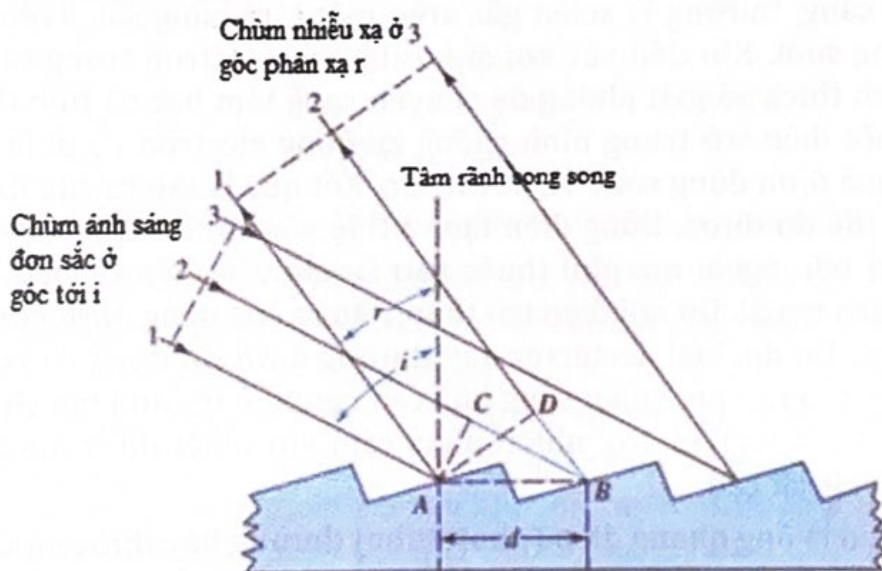
Lăng kính là một dạng tạo tia đơn sắc khác. Một chùm ánh sáng hẹp hội tụ vào lăng kính bị khúc xạ khi nó đi qua. Bước sóng ngắn bị khúc xạ nhiều hơn so với

bước sóng dài (ví dụ ánh sáng violet có bước sóng ngắn hơn ánh sáng đỏ vì vậy cong hơn so với ánh sáng màu đỏ), dẫn đến hiện tượng tán sắc của ánh sáng trắng tạo thành phổ liên tục. Các lăng kính có thể xoay được, chỉ cho phép bước sóng mong muốn qua khe sáng đi.



Hình 8.9. Nguyên lý tạo tia đơn sắc của lăng kính

Cách tử nhiễu xạ (Diffraction gratings) là dạng tạo tia đơn sắc phổ biến nhất được sử dụng, bao gồm nhiều rãnh song song (50 đến 6000 rãnh/mm, thông thường 1200 – 2400/mm) được tạo trên bề mặt bóng. Sự nhiễu xạ, sự phân tách của ánh sáng, dựa trên nguyên tắc các bước sóng bị uốn cong khi đi qua một vật cản (góc nhọn). Mức độ uốn phụ thuộc bước sóng.



Hình 8.10. Nguyên lý của cách tử nhiễu xạ

Góc i tạo bởi tâm của rãnh song song với chùm ánh sáng đơn sắc. Chùm nhiễu xạ được phản ánh ở góc r

3.1.3. Buồng đo

Buồng đo là buồng kín chứa các ống phân tích (Cuvett). Các dung dịch chứa các thành phần cần phân tích (mẫu) được để trong các ống mẫu bằng thủy tinh/nhựa trong suốt, nếu việc phân tích sử dụng tia tử ngoại thì cuvet được sử dụng được làm bằng thạch anh.



Hình 8.11. Cuvet

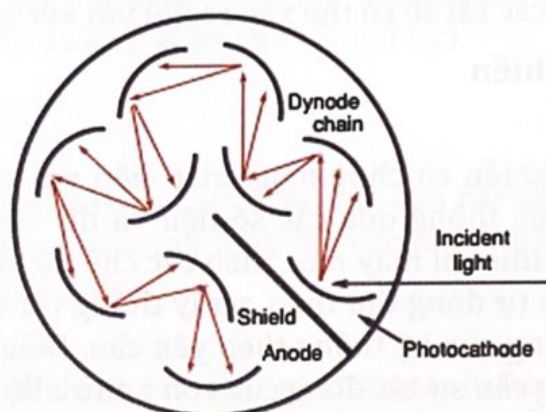
3.1.4. Bộ phận thu nhận và xử lý tín hiệu

Bộ phận tiếp nhận tín hiệu chuyển năng lượng bức xạ điện từ thành năng lượng điện. Loại thứ nhất là tế bào quang điện (photocell). Photocell bao gồm tấm nhạy cảm ánh sáng, thường là selen gắn trên một tấm bằng sắt. Trên cùng là lớp bạc mỏng, trong suốt. Khi tiếp xúc với ánh sáng, các electron trong tấm nhạy cảm ánh sáng bị kích thích và giải phóng để chuyển sang tấm bạc có tính dẫn điện cao. Tại tấm bạc, một điện trở trung bình chống lại dòng electron về phía tấm sắt, tạo thành rào cản giả định dòng chảy về hướng đó. Kết quả là tạo ra sức điện động của riêng nó và có thể đo được. Dòng điện tạo ra tỉ lệ với bức xạ đến. Photocell không cần nguồn điện bên ngoài mà phụ thuộc vào sự chuyển điện tử bên trong tạo ra dòng điện ở mạch ngoài. Do nội điện trở thấp, đầu ra của năng lượng điện không dễ dàng khuếch đại. Do đó, loại detector này thường được sử dụng cho các quang kế có dải phổ rộng, tạo ra mức chiếu sáng khá cao nên không cần khuếch đại tín hiệu. Photocell không đắt và bền, tuy nhiên nhạy cảm với nhiệt độ ở mức rất thấp và mức độ chiếu sáng rất cao

Loại thứ hai là ống quang điện (phototube) thường hay được sử dụng nhất do phổ hoạt động rộng (từ 190-900nm), độ nhạy và tính chọn lọc cao. Phototube tương tự như một lớp rào cản tế bào trong đó vật liệu cảm quang tạo ra các electron khi năng lượng ánh sáng chiếu vào nó. Phototube khác ở chỗ cần có điện áp bên ngoài để hoạt động. Phototube chứa cathode tích điện âm và một anode tích điện dương đặt trong buồng kính. Cực âm là các vật liệu (Ruby, Liti...) mà hoạt động như một điện trở trong bóng tối nhưng phát ra các electron khi tiếp xúc với ánh sáng. Các electron di chuyển qua cực dương tích điện và sẽ quay trở lại thông

qua mạch điện bên ngoài. Các cực âm thường có diện tích bề mặt lớn. Thay đổi vật liệu cathode sẽ thay đổi bước sóng mà tại đó phototube cho đáp ứng cao nhất. Dòng quang điện là tuyến tính, với cường độ ánh sáng chiếu vào cathode khi hiệu điện thế giữa cathode và anode không đổi. Ống chân không trong tube tránh được sự tán xạ của các điện tử do va chạm với phân tử khí.

Loại detector thứ ba là photomultiplier phát hiện và khuếch đại năng lượng bức xạ. Ánh sáng chiếu vào cathode được phủ, phát ra các electron. Các electron bị hút vào các cực dương (anodes) được gọi là dynodes, mỗi dynode có hiệu điện thế dương cao hơn liên tiếp nhau. Những dynode này là vật liệu tạo ra nhiều electron thứ cấp khi bị va chạm bởi các electron độc thân. Sự phát xạ điện tử ban đầu ở cực âm kích hoạt nhiều dòng electron bên trong bản thân ống PM. Do sự khuếch đại của PM gấp 200 lần so với phototube. Ống PM được sử dụng trong thiết bị cực kỳ nhạy cảm với mức ánh sáng thấp trong thời gian rất ngắn. Sự tích lũy electron kích thích anode sản xuất tín hiệu điện, được đo bằng ampe và tỷ lệ với cường độ ban đầu của ánh sáng. Tín hiệu tương tự được chuyển đổi đầu tiên thành điện áp sau đó đến tín hiệu kỹ thuật số thông qua việc sử dụng bộ chuyển đổi. Tín hiệu kỹ thuật số được xử lý điện tử để tạo các số liệu đọc.



Hình 8.12. Các chuỗi dynode trong photomultiplier

(Nguồn: Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2018). *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer*)

Một loại thiết bị khác là photodiodes, tuy không nhạy bằng PM vì thiếu bộ khuếch đại bên trong, nhưng độ tuyến tính, tốc độ và kích thước nhỏ nên hữu ích trong việc khuếch đại khi ánh sáng ở mức vừa phải. Photodiode array (PDA) có khoảng 256 đến 2048 photodiodes trong khoảng tuyến tính. Mỗi photodiodes đáp ứng với một bước sóng cụ thể và kết quả tạo ra phổ UV/khả kiến hiển thị trong ít hơn 1s. Đối với máy quang phổ sử dụng PDA, cách tử được định vị sau cuvet và phân tán bức xạ truyền qua PDA

Đối với quang phổ chùm tia đơn sắc, độ hấp thụ phải được trắng bằng cách sử dụng dung dịch tham chiếu phù hợp không bao gồm chất phân tích. Máy quang phổ chùm tia kép cho phép tự động hiệu chỉnh độ hấp thụ mẫu và dung dịch tham chiếu.

4. HỆ THỐNG MÁY HÓA SINH SỬ DỤNG NGUYÊN LÝ PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

Sự phát triển và ứng dụng ngày càng rộng rãi của các hệ thống máy xét nghiệm dựa trên phương pháp quang phổ cùng với những sự phát triển vượt bậc của khoa học công nghệ, kéo theo những cái tiến về cấu tạo và tính năng của hệ thống. Các nhà sản xuất ngày càng tạo ra nhiều tính năng ưu việt cho hệ thống của mình trong sự cạnh tranh ngày càng lớn trong lĩnh vực xét nghiệm y học. Mặc dù có nhiều sự khác nhau về nhiều tính năng và hiệu suất của các nhà sản xuất khác nhau nhưng về cơ bản cấu trúc của một hệ thống máy xét nghiệm hóa sinh đều được xây dựng dựa trên nguyên lý của phương pháp quang phổ như đã đề cập ở trên với thành phần nòng cốt là bộ phận đo quang.

Về cơ bản thiết bị phân tích dựa trên phương pháp quang phổ được xếp làm hai nhóm chính tự động và bán tự động. Đối với máy phân tích bán tự động các thao tác thực hiện phản ứng được thực hiện thủ công trước khi dung dịch sau phản ứng được đưa lên các máy phân tích để tính toán nồng độ. Với hệ thống máy phân tích tự động các thao tác được thực hiện hoàn toàn tự động với sự hỗ trợ của các hệ thống hỗ trợ quản lý vận hành và thực hiện phân tích bao gồm bộ phận điều khiển, chuyển mẫu, hút mẫu, bộ phận phản ứng, bộ phận đo quang và đọc và phân tích kết quả giúp giảm thiểu các sai số có thể xảy ra đối với kết quả phân tích.

4.1. Bộ phận điều khiển

4.1.1. Vai trò

Bộ phận điều khiển có chức năng giao tiếp với các bộ phận trong hệ thống vận hành của thiết bị, thông qua các số liệu và dữ liệu được thu thập được tiến hành điều chỉnh các thiết bị máy móc theo các chế độ hoạt động đã được cài đặt từ trước. Bộ điều khiển tự động thu thập, xử lý thông tin và tác động lên hệ thống để đáp ứng các hoạt động của hệ thống theo yêu cầu. Điều khiển tự động là quá trình điều khiển mà không cần sự tác động của con người. Bộ phận điều khiển tạo các tín hiệu điều khiển giúp các lệnh được thực hiện một cách tuần tự, tiếp nhận tín hiệu, số liệu từ đó đưa ra phán đoán và phương pháp thích hợp nhất để giải quyết vấn đề thông qua các lập trình có sẵn cho máy trong từng tình huống khác nhau.

4.1.2. Cấu trúc

Bộ phận điều khiển của máy xét nghiệm được cấu trúc bao gồm màn hình điều khiển chứa giao diện vận hành của hệ thống, các bộ vi xử lý và các hệ thống thu nhận và truyền tín hiệu tại các trạm điều khiển.

4.2. Bộ phận chuyển mẫu

4.2.1. Vai trò

Hoạt động của hệ thống vận chuyển và phân phối chịu sự chi phối của hệ thống điều khiển. Tùy theo mong muốn và yêu cầu của người dùng thông qua hệ thống điều khiển thực hiện việc phân phối mẫu đến các vị trí thực hiện phân tích, và ngược lại vận chuyển mẫu đã hoàn thành việc phân tích về vị trí ban đầu để thực hiện việc lưu trữ.

4.2.2. Cấu trúc

Bộ phận vận chuyển và phân phối mẫu hoạt động dưới sự giám sát và điều khiển của thống điều khiển thông qua bộ phận thu nhận tín hiệu của nó. Thông qua các hệ thống robot chuyển mẫu thực hiện việc phân phối mẫu về các module phản ứng để thực hiện việc phân tích.

4.3. Bộ phận hút mẫu

4.3.1. Vai trò

Đây là bộ phận chịu trách nhiệm hút dịch mẫu và chuyển từ ống mẫu sang cuvet. Tùy từng nhà sản xuất thì sẽ có cấu trúc riêng song thường bao gồm 2 bộ phận chính là pipet hút mẫu và khu vực dịch rửa để vệ sinh kim của pipet hút mẫu, nhằm tránh gây nhiễm chéo giữa các mẫu sau mỗi lần hút.

4.3.2. Cấu trúc

Pipet hút mẫu có cấu tạo gồm 1 cánh tay vận chuyển và kim hút. Khi rack vào vị trí hút mẫu, cánh tay vận chuyển sẽ di chuyển và đưa kim hút vào ống mẫu, sau đó hút mẫu và đẩy dịch mẫu vào 1 ô trên đĩa phản ứng. Khi hút, mức dịch mẫu sẽ được nhận biết chính xác bằng cảm biến điện dung cực nhạy, mức độ đông mẫu (clot) nhận biết thông qua áp lực hút. Sau mỗi lần vận chuyển dịch mẫu, kim hút sẽ được rửa lại bằng dịch rửa và đưa về vị trí chờ (Stand by).

4.4. Bộ phận phản ứng

4.4.1. Vai trò

Bộ phận phản ứng là nơi xảy ra các phản ứng của các xét nghiệm phân tích, đóng vai trò quan trọng trong quá trình biến đổi các thành phần cần phân tích để tạo ra sản phẩm có thể đo lường được.

4.4.2. Cấu trúc

Bộ phận này bao gồm khu vực hóa chất có chứa các lọ hóa chất phản ứng, khu vực đĩa phản ứng được chia thành các ô để chứa hóa chất và dịch mẫu, kim hút hóa chất. Tại khu vực này, hóa chất để phản ứng được vận chuyển từ lọ hóa chất sang từng cuvet riêng biệt. Trước khi hút hóa chất, kim hút sẽ được rửa bằng nước khử ion.

Đĩa phản ứng thường bao gồm các thành phần chính:

- Đĩa gồm các ô phản ứng (có thể được ngâm trong nước để ủ).
- Bộ phận trộn có thể bằng cơ học hoặc sóng siêu âm.
- Hệ thống đo quang với khả năng đo liên tục độ hấp thụ quang của hỗn hợp phản ứng của mỗi ô.
- Dung dịch rửa ô phản ứng sau khi đã hoàn tất quá trình đo.
- Đĩa phản ứng được duy trì nhiệt độ trong khoảng 37°C (1°C).

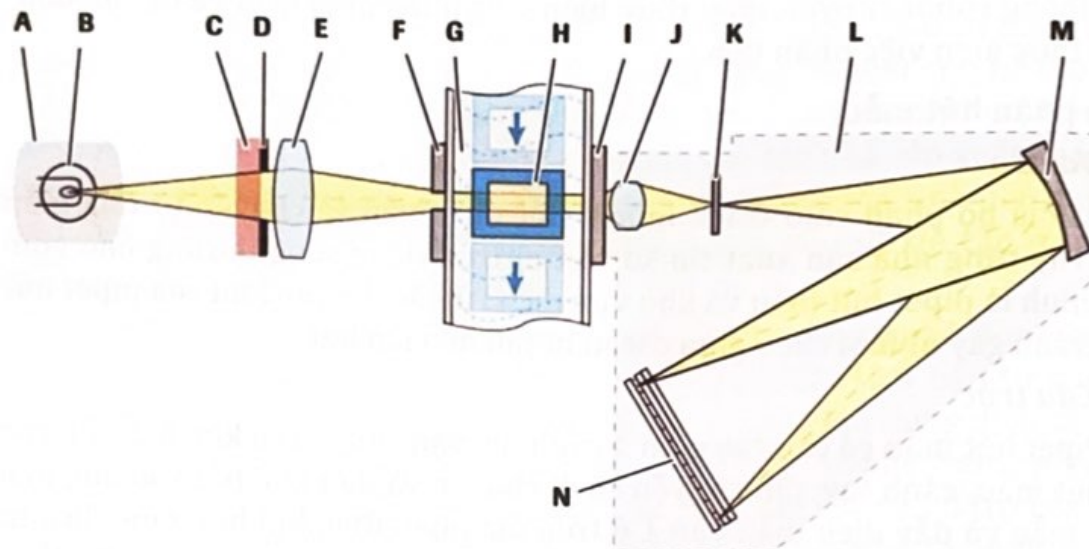
4.5. Bộ phận đo quang

4.5.1. Vai trò

Là bộ phận đóng vai trò trung tâm trong xét nghiệm dựa trên nguyên lý quang phổ. Thông qua bộ phận này nồng độ các chất cần định lượng được xác định gián tiếp thông qua sự thay đổi cường độ ánh sáng được ghi nhận.

4.5.2. Cấu trúc

Cấu trúc của bộ phận đo quang về cơ bản bao gồm các thành phần như đã được mô tả trong nội dung của cấu trúc máy quang phổ.



Hình 8.13. Sơ đồ cấu trúc hệ thống quang học máy xét nghiệm

- | | | |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| A. Đèn quang kế | F. Khe sáng (Đầu vào) | K. Khe sáng |
| B. Lớp áo nước | G. Buồng ủ | L. Bộ phận quan kế |
| C. Bộ lọc tia hồng ngoại | H. Giếng phản ứng | M. Cách tử nhiễu xạ |
| D. Lớp chắn tia | I. Khe sáng (Đầu ra) | N. Đầu dò tín hiệu |
| E. Kính hội tụ | J. Thấu kính | |

4.6. Bộ phận đọc và phân tích kết quả

Các tín hiệu quang được ghi nhận từ bộ phận đo quang, thông qua bộ phận đọc và phân tích kết quả thực hiện việc chuyển đổi các tín hiệu quang học (độ hấp thụ quang) thành các tín hiệu điện (cường độ dòng điện). Nồng độ các chất được tính toán dựa trên các số liệu về chuẩn xét nghiệm (calibration) để tính toán ra được nồng độ dựa trên độ hấp thụ quang của chất cần phân tích.

5. ỨNG DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP TRONG PHÂN TÍCH CÁC CHỈ SỐ HÓA SINH

Bảng 8.1. Các phương pháp đo và xét nghiệm ứng dụng

STT	Phương pháp đo	Xét nghiệm ứng dụng
1	Phương pháp đo điểm cuối	Ure, Creatinin, Glucose, Protein, Albumin, Cholesterol...
2	Phương pháp đo động học	AST, ALT, GGT, Amylase...

5.1. Phương pháp điểm cuối (Endpoint)

Phương pháp này chỉ đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng một lần, đó là lúc phản ứng tạo màu đã xảy ra hoàn toàn, và nồng độ các chất trong dung dịch sau phản ứng đã ổn định. Có thể đo độ hấp thụ ở một bước sóng (monochromatic) hoặc hai bước sóng (bichromatic). Sử dụng dung dịch chuẩn (Standard) để dựng đường chuẩn hay hệ số cài đặt trước.

Chia theo số dung dịch chuẩn sử dụng khi đo ta có 3 loại:

$$C_{\text{sample}} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) C_{\text{standard}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}}$$

5.1.1. Phép đo chỉ sử dụng một dung dịch chuẩn

Nồng độ của mẫu cũng được tính theo công thức:

5.1.2. Phép đo sử dụng nhiều dung dịch chuẩn (multistandard)

Nồng độ của mẫu được xác định từ đường cong chuẩn. Đường cong này dựng được từ các dung dịch chuẩn đã biết trước nồng độ và độ hấp thụ đo được: $(A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \cdot TR$ với TR là chiều của phản ứng (có giá trị là +1 nếu chiều phản ứng tăng và -1 nếu chiều phản ứng giảm). Nồng độ của mẫu được nội suy từ đường cong chuẩn: $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \cdot TR$.

5.1.3. Phép đo sử dụng hệ số

Khi đo không sử dụng các dung dịch chuẩn mà sử dụng một hệ số cho trước để tính ra nồng độ của dung dịch. Nồng độ mẫu được tính theo công thức:

$$C_{\text{sample}} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \cdot F$$

Với F là hệ số cho trước

Chia theo số bước sóng sử dụng khi đo ta có 2 loại:

- *Phép đo một bước sóng*: đo độ hấp thụ của dung dịch Trắng, Chuẩn và Mẫu tại một bước sóng.

- *Phép đo hai bước sóng*: đo độ hấp thụ của Trắng (Blank), Chuẩn (standard) và mẫu (Sample) tại hai bước sóng, một bước sóng chính và một bước sóng phụ, độ hấp thụ của các dung dịch được tính theo công thức sau:

- + $A_{\text{sample}}, A_{\text{standard}}, A_{\text{blank}} = A_{\text{main}} - A_{\text{ref}}$.
- + Trong đó: A: độ hấp thụ.
- + I_{main} : Bước sóng chính.
- + I_{ref} : Bước sóng phụ.

5.2. Phương pháp động học (Kinetic)

Phương pháp động học được sử dụng để đo độ hoạt động của enzym. Đặc điểm của phương pháp này là đo ngay khi bắt đầu phản ứng, sau một khoảng thời gian trễ (Delay time) nào đó, không có thời gian đợi phản ứng ổn định.

5.2.1. Phương pháp đo động học (K)

Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo n lần trong thời gian phản ứng t (Reaction time), khoảng cách giữa n lần đo là t/n giây và tính giá trị chênh lệch của

các độ hấp thụ giữa phép đo sau với phép đo trước, kết quả cuối cùng là tính được giá trị chênh lệch trung bình/phút (DA/min).

Độ hoạt động của enzym được tính theo công thức:

$$\text{Độ hoạt động của Enzym} = DA/\text{min.K}$$

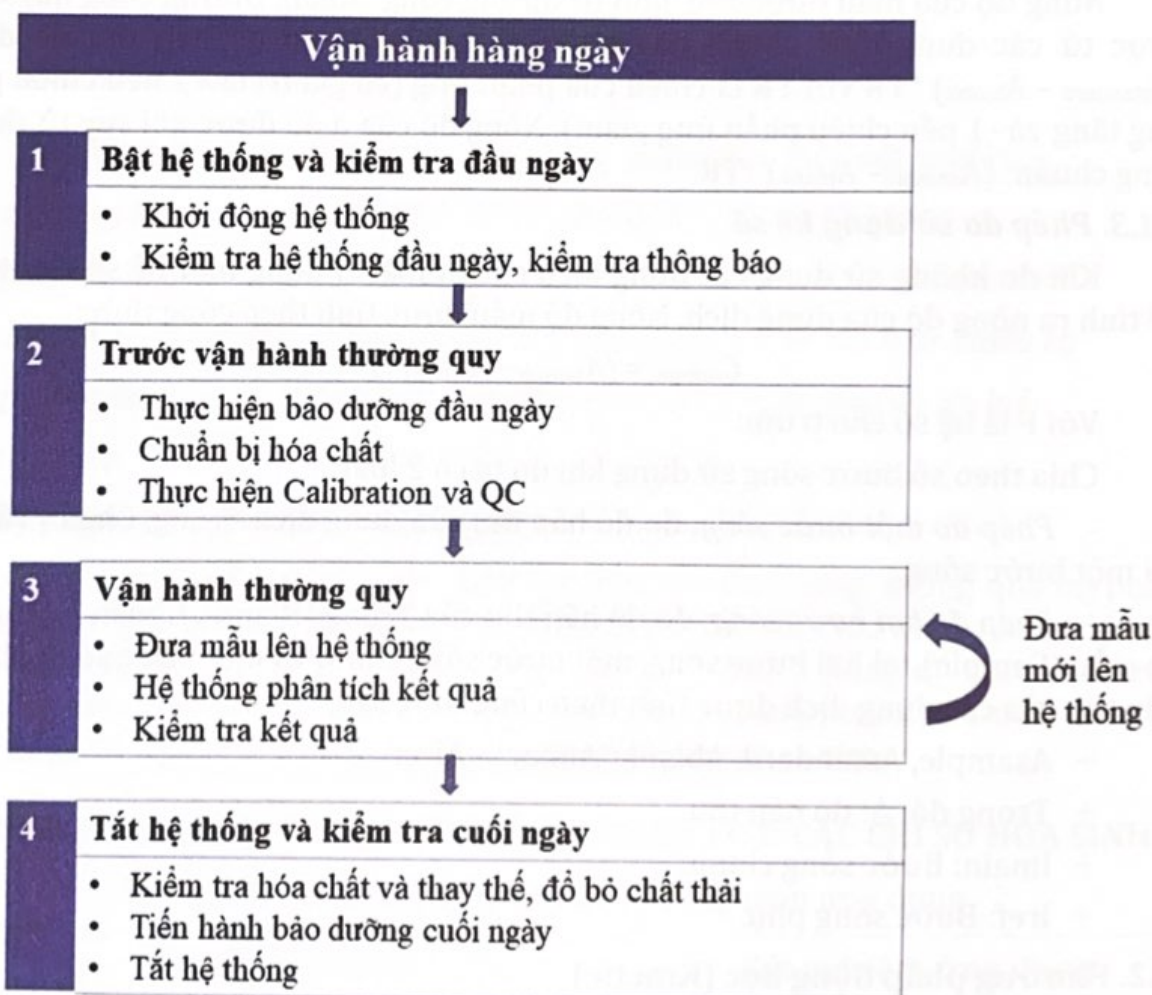
Trong đó, K là hệ số thường được cho trước với từng loại hoá chất.

Đơn vị đo độ hoạt động enzym là U/L, ngoài ra còn sử dụng đơn vị mới là kat (katal) là lượng men xúc tác sự biến đổi 1 mol cơ chất trong 1 giây.

5.2.2. Phương pháp đo thời gian cố định (Fixed Time)

Cũng tương tự như phép đo động học, nhưng chỉ khác là thời gian giữa các lần đo độ hấp thụ là cố định.

6. CÁC BƯỚC VẬN HÀNH CƠ BẢN



Hình 8.14. Các bước vận hành cơ bản của máy xét nghiệm hóa sinh tự động

7. BẢO TRÌ BẢO DƯỠNG TRANG THIẾT BỊ

Vấn đề đảm bảo chất lượng xét nghiệm được thực hiện thông qua một quy trình giám sát, kiểm tra và quản lý tổng thể trong tất cả các bước và các giai đoạn

từ việc chuẩn bị bệnh nhân cho đến giai đoạn phân tích và diễn giải kết quả. Trong nội dung bài học này chúng tôi muốn nhấn mạnh đến những lưu ý cơ bản đối với việc bảo trì, bảo dưỡng cơ bản nhằm duy trì hiệu suất tối ưu cho thiết bị phân tích.

7.1. Bảo dưỡng hàng ngày

7.1.1. Kiểm tra hệ thống

- Kiểm tra các cổng.
- Đưa mẫu ra khỏi khu vực xuất mẫu.
- Đưa hóa chất cần thiết cho việc vệ sinh hệ thống ống dẫn lên hệ thống, thực hiện các chương trình bảo dưỡng đã được xây dựng sẵn trên hệ thống.

7.1.2. Bảo dưỡng khi khởi động

- Kiểm tra hệ thống nước.
- Thay nước và dung dịch rửa.
- Vệ sinh ống dẫn đầu ngày.
- Kiểm tra hệ thống quang phổ.
- Kiểm tra hệ thống tổng thể trên giao diện sử dụng để phát hiện và xử lý kịp thời các vấn đề nếu có.

7.1.3. Bảo dưỡng cuối ngày

- Đổ rác thải, bổ sung hóa chất và dung dịch rửa (nếu cần).
- Vệ sinh kim hút mẫu và kim hút hóa chất.
- Vệ sinh ống dẫn cuối ngày.

7.2. Bảo dưỡng hàng tuần

- Làm sạch trạm rửa bằng dung dịch vệ sinh thích hợp theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Vệ sinh bên ngoài kim hút mẫu, kim hút hóa chất bằng các dung dịch rửa.
- Vệ sinh khu vực ủ.
- Làm sạch bộ phận trộn mẫu.

7.3. Bảo dưỡng hàng tháng

- Vệ sinh hệ thống dẫn nước.
- Thay thế các ô phản ứng và vệ sinh khu vực ủ.
- Làm sạch hệ thống lọc, hút.

7.4. Bảo dưỡng hàng quý

- Vệ sinh hệ thống trộn mẫu.
- Làm sạch hệ thống van lọc nước

7.5. Bảo dưỡng mỗi 6 tháng

- Vệ sinh quạt thông gió.
- Thay thế đèn của hệ thống quang phổ theo khuyến cáo với thời gian sử dụng chung hoặc số giờ vận hành.
- Làm sạch hệ thống lọc nước.

Trong quá trình vận hành, nếu xảy ra sự cố có thể tiến hành bảo dưỡng những công việc cần thiết trước thời hạn định.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên lý của phương pháp quang phổ?
2. Trình bày định luật lambert-Beer và công thức biểu diễn mối liên hệ giữa các đại lượng?
3. Cấu trúc cơ bản của một máy quang phổ bao gồm những bộ phận nào?
4. Trình bày các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng xét nghiệm sử dụng phương pháp đo quang liên quan đến thiết bị phân tích và biện pháp làm hạn chế các vấn đề đó?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beckman, A.O., Gallaway, W. S., Kaye, W., and Ulrich, W. F. " History of Spectrophotometry at Beckman Instruments, Inc.". Analytical Chemistry, 49, pp 280A-300A (1977)
2. Atkins, Peter and Julio de Paula. Physical Chemistry for the Life Sciences. New York: Oxford University Press, 2006.
3. Chang, Raymond. Physical Chemistry for the Biosciences. USA: University Science Books, 2005.
4. Operator Manual Cobas® 8000
5. Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2018). Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer