

# 光谱带宽与分析测试误差的关系

李昌厚

(中国科学院 上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要: 研究了光谱带宽与分析测试误差的关系. 从理论上阐明了光谱带宽会引起吸收光谱仪器的分析测试误差, 并给出了计算公式. 用青霉素钠、青霉素钾的分析测试数据和文献报道的数据, 进一步说明了光谱带宽对分析测试误差的影响. 分析测试工作者一定要特别重视对光谱带宽的选择.

关键词: 光谱带宽; 比耳定律; 吸光度; 分析测试误差

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2004)02-0065-03

影响吸收光谱仪器(VIS-可见分光光度计、UVS-紫外可见分光光度计、AAS-原子吸收分光光度计等)定量分析误差的因素很多,如:杂散光<sup>[1]</sup>、噪声<sup>[2]</sup>、基线平直度<sup>[3]</sup>等等.光谱带宽是影响吸收光谱仪器定量分析误差的主要因素之一.并且,目前国内广大分析工作者还远远没有认识这个问题.本文将讨论光谱带宽对吸收光谱仪器定量分析误差的影响.

## 1 理论推导

VIS、UVS、AAS的定量分析理论基础是比耳定律<sup>[4]</sup>.比耳定律可描述为:当一束平行单色光通过某一均匀的有色溶液时,该溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度(光程)的乘积成正比.比耳定律的数学表达式是:

$$A = \log I_0/I = \epsilon bc \quad (1)$$

式中:  $A$  为吸光度;  $I_0$  为入射光强度;  $I$  为透射光强度;  $\epsilon$  为被测物质的摩尔吸光系数,单位为  $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ;  $b$  为光程长度,单位为  $\text{cm}$ ;  $C$  为被测物质的浓度  $\text{mol/L}$ .如被分析测试的物质已定,则摩尔吸光系数  $\epsilon$  已定;若使用的仪器已定,则比色皿已定,则光程  $b$  已定;那么,吸光度  $A$  与被测物质的浓度  $C$  成正比(即  $A$  与  $C$  成线性关系).

从理论上讲,比耳定律只适用于单色光,但在实际的吸收光谱仪器中,绝对不可能从光谱仪器的单

色器上得到真正的单色光,只能得到波长范围很窄的光谱带.因此,进入被测样品的光仍然是在一定波段范围内的复合光.由于物质对不同波长的光具有不同的吸光度,因此,在实际工作中即使用很高级的吸收光谱分光光度计、采用很小的光谱带宽,仍然会产生吸光度测量误差.

作者研究表明:假设光谱带宽为  $\Delta \lambda$ ,它所对应的波长范围为  $\lambda_1 \sim \lambda_2$ ;对  $\lambda_1$  而言,设其入射光强度为  $I_{01}$ ,透射光强度为  $I_1$ ,摩尔吸光系数为  $\epsilon_1$ ,吸光度为  $A_1$ ,则:

$$A_1 = \log I_{01}/I_1 = \epsilon_1 bc; I_1 = I_{01} \times 10^{-\epsilon_1 bc}$$

对  $\lambda_2$  而言,设其入射光强度为  $I_{02}$ ,透射光强度为  $I_2$ ,摩尔吸光系数为  $\epsilon_2$ ,吸光度为  $A_2$ ,则:

$$A_2 = \log I_{02}/I_2 = \epsilon_2 bc, I_2 = I_{02} \times 10^{-\epsilon_2 bc}$$

因在实际测量时,对应  $\Delta \lambda$  的入射光强度为  $I_{01} + I_{02}$ ,透射光强度为  $I_1 + I_2$ .因此,吸光度值为:

$$A = \log [I_{01} + I_{02}] / (I_1 + I_2) = \log [ (I_{01} + I_{02}) / (I_{01} \times 10^{-\epsilon_1 bc} + I_{02} \times 10^{-\epsilon_2 bc}) ] \quad (2)$$

若  $\epsilon_1 = \epsilon_2 = \epsilon$ ,则(2)式可写成:

$$A = \log [I_{01} + I_{02}] / (I_{01} + I_{02}) \times 10^{-\epsilon bc} = \log (1/10^{-\epsilon bc}) = \log 10^{\epsilon bc} = \epsilon bc. \text{ 此时, } A \text{ 与 } c \text{ 成线性关系.}$$

但实际上,摩尔吸光系数  $\epsilon$  是有色物质的与波长有关的特征常数,对同一有色物质而言,不同波长有不同的  $\epsilon$  值.在实际测量中,常取某一光谱带宽

$\Delta \lambda$ , 它对应的波长范围为  $\lambda_1 \sim \lambda_2$ ,  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  各对应  $\varepsilon_1$  和  $\varepsilon_2$ , 但  $\varepsilon_1$  和  $\varepsilon_2$  不可能完全相等. 所以, 在吸收光谱仪器中, 对某一光谱带宽的入射光,  $A$  与  $c$  不可能真正成线性关系, 因此, 由于光谱带宽的影响, 产生了比耳定律偏离, 或产生了分析测量误差.

设  $\varepsilon_1 > \varepsilon_2$ , 并且, 对选定的仪器而言, 常规分析时, 光程  $b$  是常数, 被分析样品的浓度是变数; 若将 (1) 式相对  $bc$  微分<sup>[6]</sup>, 则:

$$dA/d(bc) = \varepsilon_1 - [(I_{02}/I_{01}) \times (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \times 10^{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)bc}] / [1 + (I_{02}/I_{01}) \times 10^{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)bc}] \quad (3)$$

当试样的吸光度非常小时 ( $bc \rightarrow 0$ ), 则:

$$dA/d(bc) = [\varepsilon_1 + (I_{02}/I_{01}) \times \varepsilon_2] / [1 + (I_{02}/I_{01})] \quad (4)$$

当试样的吸光度很大时 ( $bc \rightarrow \infty$ ), 式 (3) 中的  $10^{\varepsilon_1 bc} \gg 10^{\varepsilon_2 bc}$ , 则:

$$dA/d(bc) = \varepsilon_2 \quad (5)$$

因光谱带宽  $\Delta \lambda$  一般都很小, 所以,  $\Delta \lambda$  对应的  $\lambda_1 \sim \lambda_2$  的光强度一般也相差甚微, 或者说几乎相等. 则:

( $I_{02}/I_{01}) = 1$ ; 则: (4) 式可写成:

$$dA/d(bc) = (\varepsilon_1 + \varepsilon_2)/2 \quad (6)$$

从 (5)、(6) 两式, 可以清楚看出: 在低吸收时, 仪器测得的  $A - C$  曲线的极限斜率是  $\varepsilon_1$  和  $\varepsilon_2$  的均值; 而在高吸收时, 极限斜率是  $\varepsilon_2$ . 显然,  $\varepsilon_2 < [(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)/2] < \varepsilon_1$ . 因此, 在低吸收时, 测量误差较小, 在

高低吸收时, 测量误差较大. 这是光谱带宽影响的结果.

光谱带宽对吸收光谱测量误差的影响可以根据下式<sup>[7]</sup>计算:

$$A_{obs} = \log \int I_{\lambda} S_{\lambda} d\lambda - I_{\lambda} S_{\lambda} 10^{-A} d\lambda \quad (9)$$

式 (9) 中:  $A_{obs}$  为实测吸光度值;  $I_{\lambda}$  为入射光强度;  $S_{\lambda}$  为光接收器的光谱灵敏度;  $A$  为吸光度理论值.

公式 (9) 说明了实测吸光度值不但与吸收曲线 ( $A - C$  曲线) 的形状有关, 而且与光源的波长分布、光接收器的光谱响应特性有关. 在实际测量中, 对已选定的仪器来说, 在同一光谱带宽内, 入射光强度和光接收器的光谱灵敏度是一个常数.

## 2 应用实例

设吸收峰的形状是按高斯曲线分布, 在仪器的出射狭缝上的光能量分布呈三角形 (峰形呈高斯曲线分布和光能量呈三角形为理想条件), 则可根据 (9) 式计算实测吸光度值  $A_{obs}$  与光谱带宽 ( $SBW$ ) 在吸收极大值时的关系 (见表 1).

表 1 中  $RBW$  为相对带宽;  $RBW = SBW/NBW$ ;  $NBW$  为被测样品的吸收带半宽度, 指样品的吸收值达到最高峰值之半的两点间的波长间隔.  $A_{obs}$  为

表 1 与在理想条件下,  $A_{obs}$  与  $SBW$  在吸收极大时的关系<sup>[7]</sup>

Table 1 The relationship between  $A_{obs}$  and  $SBW$

RBW	$A_{obs}/A$	RBW	$A_{obs}/A$	RBW	$A_{obs}/A$
0.010 0	0.999 5	0.060 0	0.998 3	0.200 0	0.981 9
0.020 0	0.999 5	0.070 0	0.997 7	0.300 0	0.960 4
0.030 0	0.999 5	0.080 0	0.997 0	0.400 0	0.932 1
0.040 0	0.999 2	0.090 0	0.996 2	0.500 0	0.898 7
0.050 0	0.998 8	0.100 0	0.995 4		

吸光度实际测量值.  $A$  为吸光度理论值.

表 1 可供分析工作者用来修正实验值. 但只适用于吸光度实际测量值小于 1.0 时的情况. 因为一般的常规分析中, 被测样品的实际测量吸光度值基本上都小于 1.0. 所以, 表 1 具有实际参考价值.

有学者对光谱带宽与分析测试误差的关系进行过研究; 如 Owen<sup>[8]</sup> 研究后指出: 当仪器的光谱带宽 ( $SBW$ ) 与被测样品的自然带宽 ( $NBW$ , 即吸收带半

宽度, 一般为 20 nm) 之比小于或等于 1 时 (即  $SBW/NBW \leq 1$  时), 该光谱仪器可满足 99% 的样品的分析测试工作, 且分析测试的准确度在 99.5% 以上. 这也是我国和世界各国药典规定用于药检的紫外可见分光光度计的光谱带宽要求  $\leq 2$  nm 的原因.

曾有文献 [5, 6] 报道过光谱带宽对分析测试误差的影响, 此不赘述.

笔者研究过光谱带宽对青霉素钠、青霉素钾定

量分析的影响,发现青霉素钠定量分析的最佳光谱带宽与药典规定不一致(药典规定:取本品加水制成 1 mL 含 1.80 mg 的溶液,……,用 1 nm 光谱带宽、在 264 nm 处测试,吸光度应为 0.80~0.88);笔者在药典规定的条件下,将光谱带宽从 1 nm 开始减小,一直减到 0.3 nm,其峰高一直在增高,但低于 0.3 nm 时,峰高就开始下降.这说明青霉素钠的最佳光谱带宽是 0.3 nm,而不是 1 nm.

根据表 1 计算:当 SBW 小于 2 nm 时,SBW 引起的相对误差小于 0.5%;但是,当 SBW 为 5 nm 时,分析测试的相对误差将达到 2.7%.有些药厂用 SBW 为 5 nm 的 UVS 来作质量控制,其仪器本身的误差就远远超过我国药典规定的 1% 的要求,这必须引起我国广大药检工作者重视.

### 3 结论

SBW 是非常重要的关键技术指标.它直接影响分析测试的误差.虽说,绝大部分样品的紫外可见吸收光谱的吸收峰不大尖锐,2 nm 的光谱带宽完全可满足分析测试要求,但有少部分样品,如青霉素钠、青霉素钾、细胞色素 C 等的吸收峰很尖锐,不能用 2 nm 的光谱带宽测试,否则,一些小的尖锐峰会消失,而大的尖锐峰的测量值会偏低,使分析测量误差增大.因此,一定要特别重视 SBW 对分析测试误差

的影响.在购买仪器和在分析工作中要认真选择 SBW.只有这样,才能提高分析测试结果的可靠性,才能更快提高我国分析测试技术的水平.

### 参考文献:

- [ 1 ] 李昌厚,孙吟秋.杂散光与吸光度误差和吸光度真值关系的研究[J].仪器仪表学报,2001,22(1):54.
- [ 2 ] 李昌厚,孙吟秋.光度噪声与吸光度误差和吸光度真值关系的研究[J].世界仪表与自动化(增刊),1999,257.
- [ 3 ] Owen T. Fundamentals of UV-Visible spectroscopy[J]. 1996,58-106.
- [ 4 ] 李昌厚.略比耳定律及有关问题[J].光学仪器,1994,2:22.
- [ 5 ] NBS, Accuracy in Analytical Spectrophotometer, NBS Special publication 260-81, Library of Congress., Catalogue number 83-600512[S]. 1983.
- [ 6 ] Jarnutowski R J. Technical information (Selecting a spectrophotometer How to Evaluate a Spectrophotometer)[J]. S89-8604-CG-5, printed in U. S. A., 1989, 2.
- [ 7 ] 洪吟霞.分光光度计[M].北京:机工业出版社,1982,137.
- [ 8 ] Owen A J. The Feature of Diode Array Technology in UV/VIS Spectrophotometer[M]. Hong Kong, 1998, 15.

## Study on Relationship Between the Spectrum Band Width and the Absorbance Error

LI Chang-hou

(Shanghai Research Center of Biotechnology Academia Sinica, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** The relationship between spectrum band width and absorbance error was discussed. Spectrum band width give rise to absorbance test error for some of absorbance spectrum instrument. The test data of author and Owen, as well as calculating formula were given. Meanwhile the importance of select SBW was also suggested.

**Key words:** spectrm band width; Beer law; absorbance; analysis test error

**Classifying number:** O657.7