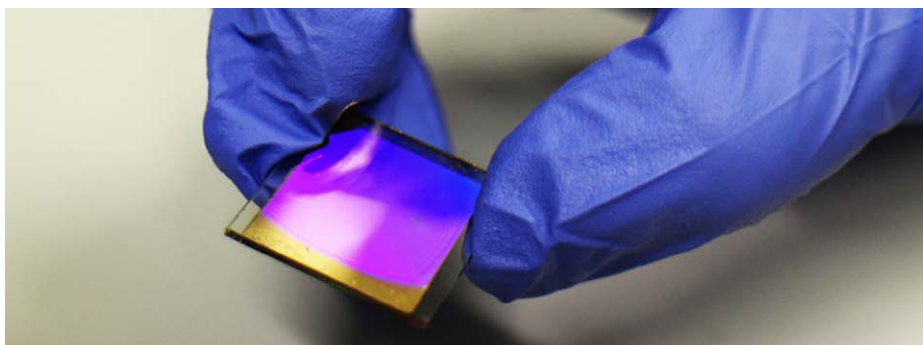


滤光液成分、光谱带宽和光程对 近红外区域杂散光水平的影响

评估 Agilent Cary 5000/7000 UV-Vis-NIR
分光光度计的杂散光水平



作者

Wesam Alwan 和 Travis Burt
安捷伦科技有限公司

摘要

杂散光会影响定量测量的准确度，因此杂散光定量是评估分光光度计性能的一个重要方面。杂散光定义为检测器检测到的指定波长之外波长的光。

通常使用氯仿 (CHCl_3 , 2365 nm) 和水 (H_2O , 1420 nm) 滤光液在红外区域测量 Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR 和 Agilent 7000 全能型分光光度计 (UMS) 上的杂散光水平。由于 Cary 5000/7000 分光光度计中引入了新的 PbS 检测器 (由 PbSmart 控制)，现在可以使用新的杂散光样品。二溴甲烷 (CH_2Br_2 , 1690 nm) 是适用于评估近红外 (NIR) 区域杂散光水平的滤光液。

通过测量二溴甲烷、氯仿和水滤光液，评估了滤光液成分、光程和带宽对分光光度计近红外区域杂散光测试结果的影响。

简介

杂散光是导致分光光度法结果不准确的一个原因，尤其是单色器输出给定波长预期带宽之外的其他波长的光。杂散光水平的升高可能由分光光度计光学元件的缺陷、衍射效应或受污染的内部组件引起。杂散光也可以由分光光度计外部的光产生。例如，来自实验室的环境光可以泄漏到样品室中或通过另一个入射点。

当照射时，仪器内部的检测器不会区分所测量的光源，而是会测量所有入射光。测量的杂散光由两个部分组成。来自仪器中光源的目标带宽和波长之外的光，以及直接或通过简单反射到达检测器的环境光。

杂散光会影响实测吸光度和浓度之间的线性关系，尤其是在吸光度较高的情况下。它会引入系统偏差，降低高浓度下的实测吸光度值（图 1），导致定量数据不准确和误差。这些误差是由于杂散光降低光度选择性并产生非线性光度响应（破坏朗伯-比尔定律关系）。

本技术概述探讨了滤光液类型和方法对杂散光测量的影响，以及由于仪器缺陷造成杂散光误差的原因。考察了滤光液成分、后光束衰减的使用、光程和带宽对分光光度计 NIR 区域杂散光测试结果

的影响。研究中使用 Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR 分光光度计，但研究结果也适用于 Agilent 7000 全能型分光光度计（图 2）。

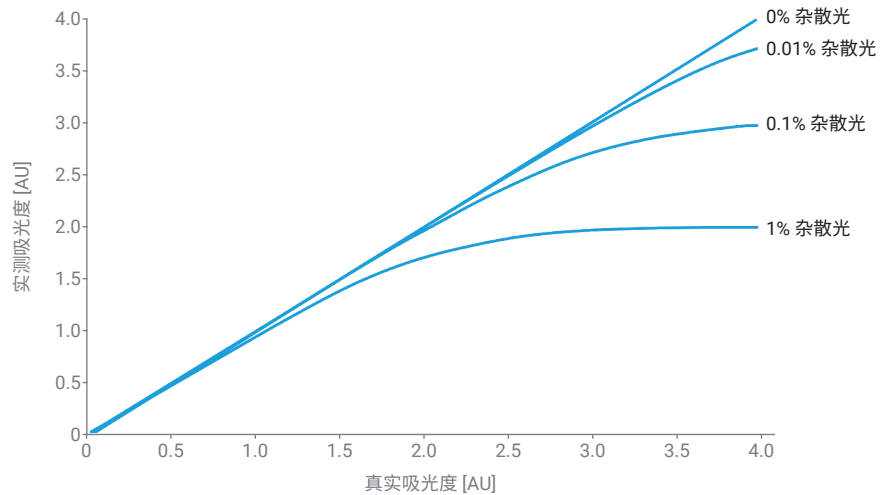


图 1. 杂散光对实测样品吸光度的影响



图 2. Agilent Cary 7000 UV-Vis-NIR 全能型分光光度计

定量分析杂散光的理想滤光液成分

为了测量杂散光，需要使用滤光片/滤光液。理想情况下，滤光片/滤光液会吸收测量波长处的所有光，并透过更长或更短波长的光（图 3）。在此理想滤光片/滤光液的 0%T 点测量透射率 (T) 时，检测到的任何光都是系统的杂散光。

但实际上这样的滤光片/滤光液并不存在，因而通常使用截止滤光片/滤光液来传输高于或低于特定波长的光，并阻挡目标波长范围内的所有光。

理想情况下，杂散光测试使用的液体溶液在指定的波长范围内无透射，因此到达检测器的任何光都表明存在杂散光。将氯化钾 (12 g/L) 水溶液、碘化钠 (10 g/L) 水溶液和亚硝酸钠 (50 g/L) 水溶液等盐溶液分别用作 198、220 和 340 nm 处的标准杂散光滤光液（图 4）。为了评估 NIR 区域的杂散光水平，通常使用截止波长分别约为 2365 和 1420 nm 的氯仿和水标准滤光液。

仪器来源的杂散光

目标波长以外的波长处的电磁辐射会干扰测量结果。辐射可能来自仪器内的不同位置：

- 光从分光光度计外壳的缝隙中穿过
- 系统内部机械表面的光散射
- 光学表面的缺陷，可能导致散射或衍射光

- 仪器的单色器、衍射光栅和光散射部件中的光学组件受到污染
- 仪器内部没有严格管控的黑体辐射源（热辐射）
- 单色器入口处用于阻挡衍射光栅多级（较短波长）反射的消叠级滤光片质量较差

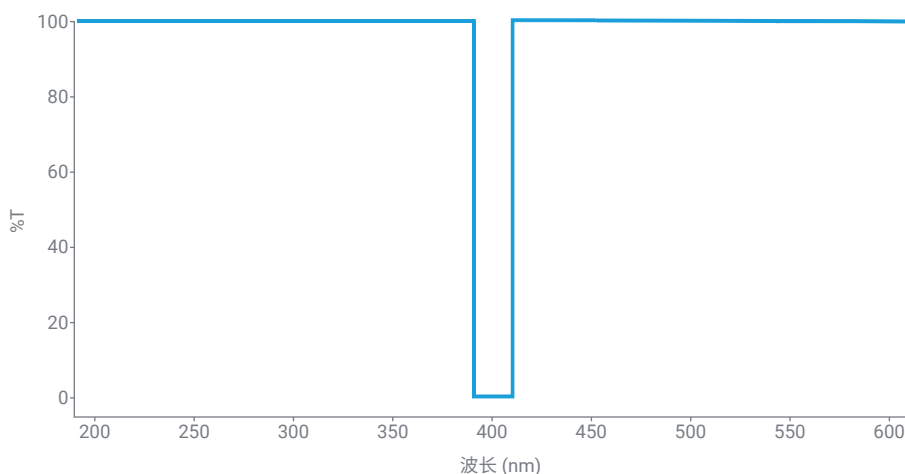


图 3. 杂散光滤光液的理想谱图

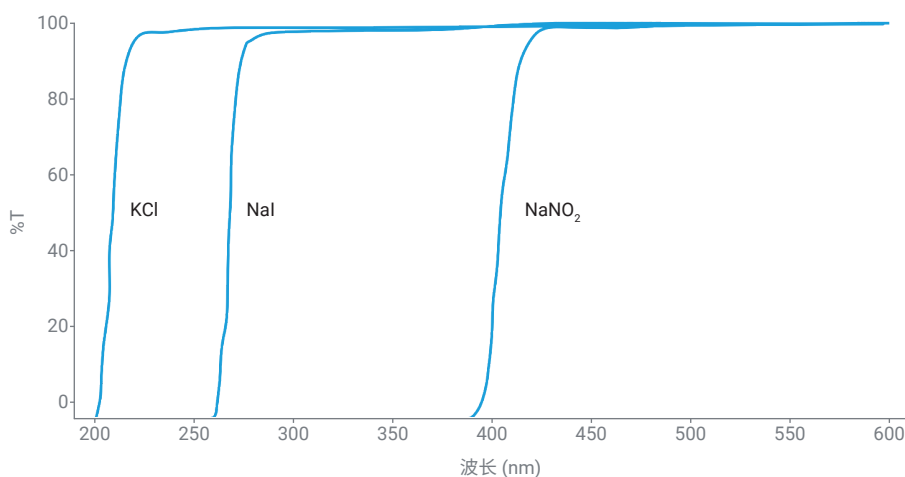


图 4. 氯化钾 (12 g/L) 水溶液、碘化钠 (10 g/L) 水溶液和亚硝酸钠 (50 g/L) 水溶液的谱图

实验部分

仪器

对 Cary 5000/7000 UV-Vis-NIR 分光光度计在 NIR 范围内的杂散光水平进行了评估。滤光液成分为二溴甲烷 (CH₂Br₂)，陷波（高吸光度）波长为 1690 nm (Sigma-Aldrich, CAS 号 74-95-3)。为准确测量杂散光水平，采用了如表 1 所示的方法参数。参数包括光谱带宽 (SBW)、信号采集平均时间 (SAT) 和光程。不同光程的二溴甲烷滤光液在指定波长 1690 nm 附近获得的谱图与杂散光测量的理想谱图相似 (图 3)。谱图证实二溴甲烷适用于 NIR 区域的杂散光测量。

本研究还使用表 1 所述的参数对氯仿和水杂散光滤光液进行了评估。使用氯仿 (Starna Scientific Ltd., RM-CHCl₃) 和水空白 (H₂O) 滤光液分别计算 2365 和 1420 nm 处的杂散光水平。

结果与讨论

本文研究了滤光液成分、SBW 和光程对杂散光值的影响。一开始，使用 10 和 50 mm 光程比色池在指定范围内对二溴甲烷进行波长扫描 (表 1)。在不同的光谱带宽下扫描两种光程，表明了 SBW 对该滤光液的杂散光值的影响。

为了计算杂散光值，需要进行三种测量：100%T、0%T 和滤光液测量。获得这些值后，使用以下公式来估算杂散光值：

$$\text{杂散光 \%T} = ((\text{滤光液 \%T} - 0\%T) / (100\%T - 0\%T)) \times 100$$

使用 10 mm 比色皿和 2 Abs RBA，测得二溴甲烷在 1690 nm 处的杂散光值为 4.08E-04、5.48E-04、1.17E-02、3.40E-01 和 3.28E+00 %T，对应的 SBW 分别为 6、8、12、16 和 20 nm。

如图 5 所示，在较窄的 SBW 下观察到更低的杂散光水平和更尖锐的峰形。随着 SBW 从 6 nm 增加到 20 nm，如预期观察到更宽的峰。增大 SBW 使更多杂散光从峰的边缘通过，降低了 Abs 水平 (%T 升高)。

使用 50 mm 比色皿和 2 Abs RBA，测得二溴甲烷在 1690 nm 处的杂散光值为 2.06E-04、1.83E-04、-9.20E-05、-7.70E-05 和 5.73E-04 %T，对应的 SBW 分别为 6、8、12、16 和 20 nm。负杂散光值表示达到仪器的检测限 (本底噪音)，如图 5 和图 6 所示。使用较长的 SAT 可以避免负杂散光值。

表 1. 用于使用二溴甲烷、氯仿和水滤光液评估 Agilent Cary 5000/7000 UV-Vis-NIR 分光光度计杂散光水平的参数

参数	二溴甲烷 (CH ₂ Br ₂)	氯仿 (CHCl ₃)	水 (H ₂ O)
波长范围 (nm)	1660-1720	2345-2385	1380-1440
信号采集平均时间 (s)	1	1	1
数据间隔 (nm)	1	1	1
光谱带宽 (nm)	6、8、12、16 和 20 (固定)	自动	自动
后光束衰减 (RBA)	2 Abs 网式滤光片	3 Abs 网式滤光片	3 Abs 网式滤光片
比色皿	石英	石英	石英
光程 (mm)	10 和 50	10	10

在 10 mm 比色皿和 3 Abs RBA 条件下使用水 (1420 nm) 和氯仿 (2365 nm) 滤光液测量了低杂散光水平。杂散光值分别为 $3.50E-05$ 和 $2.13E-04$ %T, 如图 7 所示。

图 6 显示使用 50 mm 光程时, 在中心波长 $1690 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ 的 SBW 处, 透射率接近系统的杂散光限值。因此, 使用 10–15 nm 的 SBW 时, 吸收峰的边缘不会影响峰值。对于 10 mm 光程 (图 5), 范围为 $\pm 7 \text{ nm}$, 意味着必须选择更窄的 SBW, 而这将导致信噪比 (SNR) 降低或测量时间延长。

使用相关的光程和光谱带宽, 同时避免检测器饱和或低估杂散光非常重要。应根据仪器性能调整信号采集平均时间, 从而获得低噪音 (避免负 %T 值) 和准确的杂散光值。

在选择合适的方法来估计杂散光水平时, 不受噪音和测量时间影响的结果重现性应该是主要的选择标准。在不同设置下获得的二溴甲烷的杂散光值汇总于表 2。

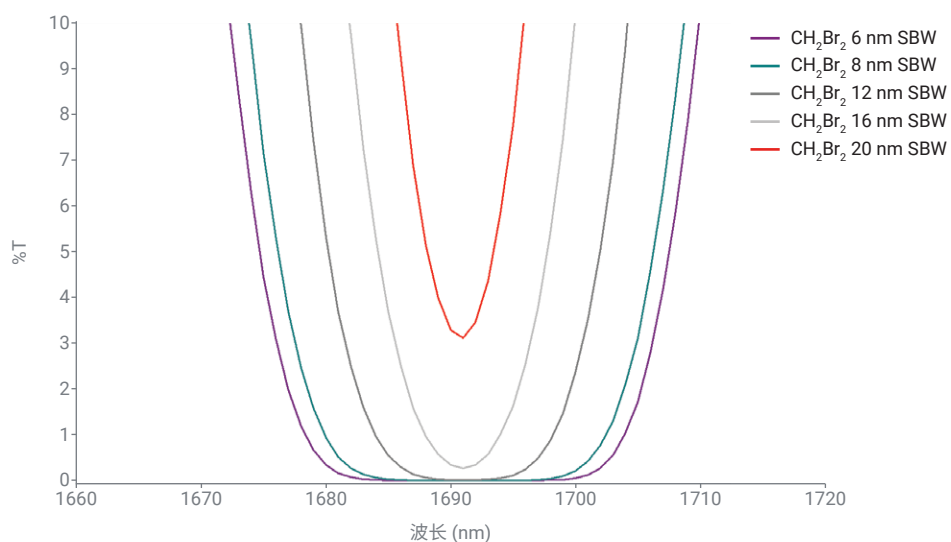


图 5. 使用 10 mm 比色皿和 2 Abs RBA 在不同 SBW (6、8、12、16 和 20 nm) 下获得的二溴甲烷谱图

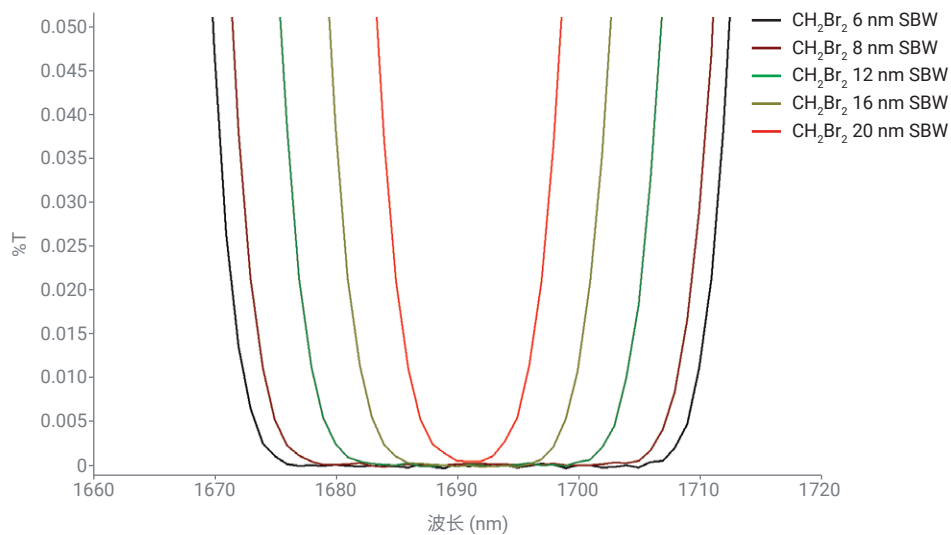


图 6. 使用 50 mm 比色皿和 2 Abs RBA 在不同 SBW (6、8、12、16 和 20 nm) 下获得的二溴甲烷谱图

表 2. 使用不同设置获得的二溴甲烷杂散光值

条目	光程 (mm)	后光束衰减	光谱带宽 (nm)	波长 (nm)	杂散光 (%T)	杂散光 (Abs)
1	10	2 Abs	6	1690	4.08E-04	5.38
2	10	2 Abs	8	1690	5.48E-04	5.26
3	10	2 Abs	12	1690	1.17E-02	3.93
4	10	2 Abs	16	1690	3.40E-01	2.46
5	10	2 Abs	20	1690	3.28E+00	1.48
6	50	2 Abs	6	1690	2.06E-04	5.68
7	50	2 Abs	8	1690	1.83E-04	5.73
8	50	2 Abs	12	1690	-9.20E-05	NA
9	50	2 Abs	16	1690	-7.70E-05	NA
10	50	2 Abs	20	1690	5.73E-04	5.24

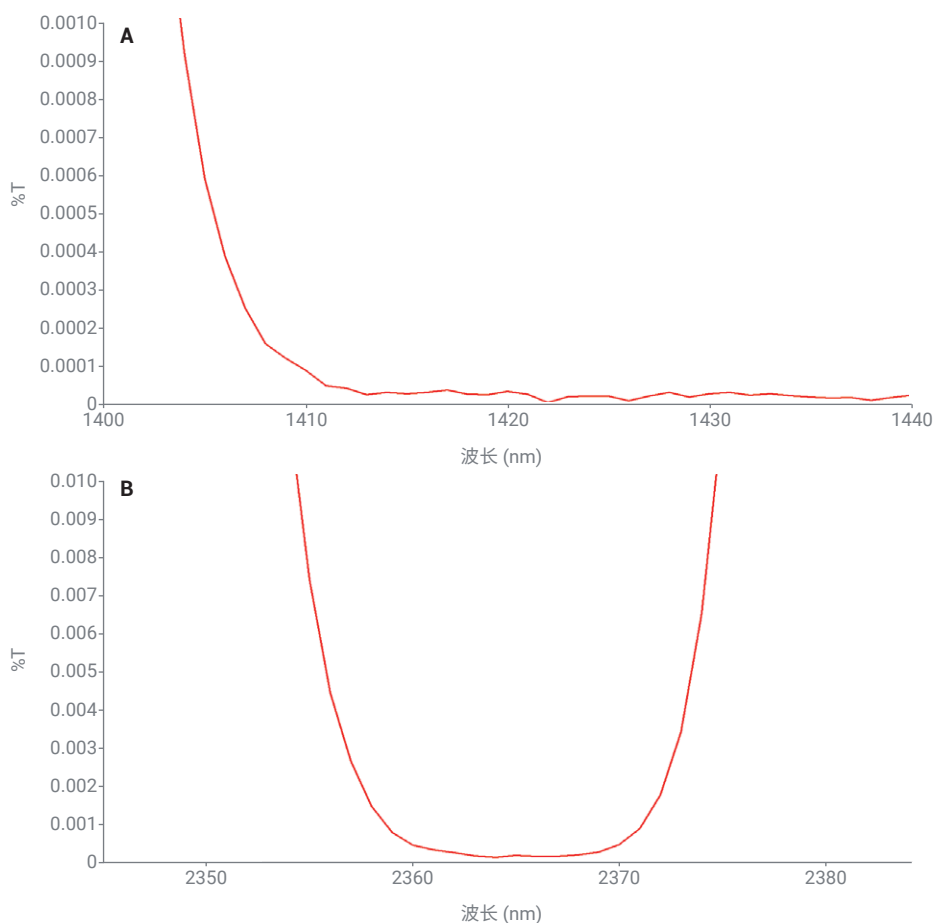


图 7. 使用 10 mm 比色皿、3 Abs RBA 和自动 SBW 通过 Agilent Cary 5000/7000 测量得到的 NIR 杂散光滤光光谱图；(A) 水 (1420 nm)；(B) 氯仿 (2365 nm)

结论

研究表明，许多因素会影响 UV-Vis-NIR 分光光度计测量的杂散光值。这些因素包括光程、光谱带宽、滤光液成分和仪器缺陷。高杂散光水平会导致吸光度读数减小、谱带形状发生变化，并最终导致仪器可测量的最大吸光度降低。

当使用二溴甲烷、氯仿和水滤光液进行评估时，Agilent Cary 5000/7000 分光光度计在 NIR 区域显示出低杂散光水平。即使对于具有高光密度 (OD) 等特性的复杂样品，低杂散光水平也能确保高质量和准确的结果。

www.agilent.com/chem/uv-vis

DE14126734

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2022
2022 年 6 月 6 日, 中国出版
5994-4982ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

