

浅谈分光光度计的精度暨验证

PerkinElmer 上海 孙明

分子光谱仪中的紫外/可见分光光度计和傅立叶变换红外光谱仪都是很常用的分析仪器，对于这两种仪器，通常我们应该非常关注仪器的横坐标精度和纵坐标精度这两个性能，因为我们的测定结果就是以横坐标**波长**和纵坐标**吸光度（或透过率）**这两个参数的组合来表示的。如果横坐标不准或者纵坐标不准，测试的结果就会有问题了。

那么我们在验收或日常操作使用中如何评估和检验这两个指标呢？

校验仪器的波长准确度和吸光度准确度最基础也是最好的方法就是找一个已知吸光度准确值和/或波长准确值的标样（基准物），用待校验的仪器去测定该标样，把测定的结果和已知的值对比，看相符合的程度。基准物是不是能方便地获得和使用以及所能够达到的准确度水平是不一样的。最好的基准物是物质的基本性质，比如氘灯或汞灯的发射谱线，常用作紫外/可见分光光度计的横坐标基准。另一类基准物是一些已经准确研究测定其性质的固体物，如聚苯乙烯薄膜，常用作傅立叶变换红外光谱仪的横坐标基准；钦玻璃（氧化钦玻璃），常用作紫外/可见分光光度计的横坐标基准。由权威机构标定的基准物就称为相应的基准，比如NIST标定的聚苯乙烯薄膜标样就称为NIST的一级标准。除此以外，一些已知吸光度准确值的一定浓度的液体标样也常用作基准物，如用于测定吸光度的重铬酸钾等。

现在的问题是我们通常在仪器的性能指标里所看到的**横坐标精度**和**纵坐标精度**是不是就是**波长准确度**和**吸光度准确度**这两个指标呢？

不一定！实际上我们可能涉及到的是四个指标，而且由于翻译或人为的原因，在目前一般的仪器性能指标的表述中这四个指标的名称和含义还可能各不相同。这造成很多人在选型和使用中的困惑。我们所说的横坐标精度和纵坐标精度实际上可能是下列的准确度或精密度指标：

- **波长准确度（Wavelength Accuracy）**
- **波长精密度（Wavelength Precision）**
- **吸光度准确度（Absorbance Accuracy）**
- **吸光度精密度（Absorbance Precision）**

实际上准确度和精密度是两个不同的概念，我们可以对照我们日常使用的尺来阐述一下：

如图有两把直尺，一把是普通的文具尺，另一把是工程师用的钢直尺。哪一把更精密呢？钢直尺有更精细的刻线，允许做更精细的测量，甚至可以到**0.25mm**。相比于那把最小只有**1mm**刻度的塑料尺，它是更精密的测量工具。

另一方面，哪一把尺更精确些呢？我们来看看尺上刻的其他标记：在钢直尺上刻着：“在**20°C**标定”，这意味着这把尺在这个温度时是最准确的（在这个温度时它测量的结果最接近真实的长度）。所以我

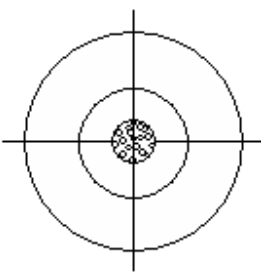
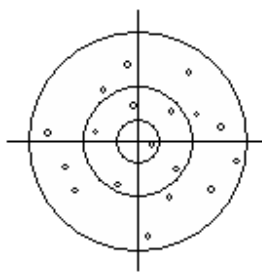
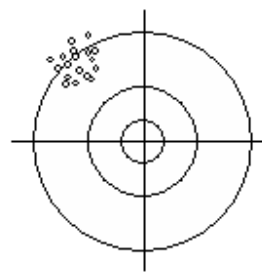


们敢断定钢直尺在常温时通常是更准确的。但是不要忘记两把尺的准确度都在变化，特别是随着温度变化。当温度升高时它们会延伸，当温度下降时它们会收缩。因为这两把尺是用不同的材料制造的，在温度变化时它们伸缩的效果会不同，在某些时候比如低温时，塑料尺甚至可以比钢直尺更准确。

搞糊涂了吗？读一读下面的定义吧：

精密度 (Precision) : 一个测量一致地重复的能力。或者一个值可靠地测量时的有效数字的位数。

准确度 (Accuracy) : 一个测量的值与真值匹配的能力。

Type of Error		Random	Systematic
			
Precision	Good	Poor	Good
Accuracy	Good	Good	Poor

请注意，精密度本身就包含了两种定义，一个是测量的重复性，而另一个是测量的有效数字的位数。而后一个定义太容易忽悠人了。人们似乎往往忽略了**可靠地测量**这几个字的意思。

在紫外/可见分光光度计的指标中，**波长准确度和精密度**常常用波长准确度和波长重复性来表示。如果一台紫外/可见分光光度计的指标分别是：

波长准确度 优于 $\pm 0.1 \text{ nm}$

波长重复性 优于 $\pm 0.05 \text{ nm}$

那么在采用氘灯 656.1 nm 的发射谱线作为基准时，波长准确度优于 $\pm 0.1 \text{ nm}$ 的意思就是仪器对氘灯 656.1 nm 谱线的测量值会落在在 $656.0 \text{ nm} \sim 656.2 \text{ nm}$ 之间；而波长重复性优于 $\pm 0.05 \text{ nm}$ 的意思是重复测量 656.1 nm 谱线十次，其平均偏差小于 $\pm 0.05 \text{ nm}$ 。由于使用了波长准确度和波长重复性这样准确的描述，一般不会弄错。

对比这两个指标我们还发现这两个数据虽然含义不一样，但在数值上还是很接近的，实际上好的重复性（精密度）是好的准确度的基础。偶尔也可以看到有些仪器标示的是“波长精度”指标，通常是说可以显示几位有效数字的精密度，多半已经有些忽悠人的味道了。

但是对傅立叶变换红外光谱仪来说，事情变得有点复杂了。

傅立叶变换红外光谱仪通常给出的只是“波长精度”指标，甚而什么都不给。而“波长精度”又几乎无一例外地是 0.01 cm^{-1} ，这是因为傅立叶变换红外光谱仪通常使用氦氖激光来作波长校正的，或者简单说傅立叶变换红外光谱仪是用激光的波长来

做横坐标的刻度的，所以精密度（有效数字的位数）自然就很好而且很一致，但它是用有效数字的位数表示的精密度而不是波长准确度指标，更糟糕的是这个值还是无法验证的，它只是一个最小分度值而已。

那么可以验证的指标是什么呢？当然是波长准确度了。对于傅立叶变换红外光谱仪的波长准确度，我们通常用0.04mm左右的聚苯乙烯薄膜作横坐标基准来标定，校验时常用到的峰值有：

- **3060 cm^{-1}**
- **2851 cm^{-1}**
- **1601.3 cm^{-1}**
- **1583.0 cm^{-1}**
- **1028.3 cm^{-1}**
- **907 cm^{-1}**

假如我们购买了NIST的一级标准，标准附带的证书上会给出若干个不同位置的峰的峰值和不确定度，NIST聚苯乙烯膜的峰值不确定度通常是 $\pm 0.3 \text{ cm}^{-1}$ 。这样，在校验时最好的情况下是仪器的测量值都落在标准物的偏差范围内，此时波长准确度等于标准的偏差即 $\pm 0.3 \text{ cm}^{-1}$ 。如果希望仪器的波长准确度达到与仪器的波长精密度相当的水平，也就是 0.01 cm^{-1} 的水平，你必须使用更准确的标样来标定仪器，比如说使用已知峰值准确到小数点以后第二位的（偏差 0.01 cm^{-1} ）气体标样来标定。

一般情况下，傅立叶变换红外光谱仪的测量值离标准物的偏差范围一定的范围内都算合格，我们通常按 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 来验收，比如对于 $3060 \pm 0.3 \text{ cm}^{-1}$ ，测量值为 3061 cm^{-1} ，仪器的横坐标准确度近似为 $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ 。也就是说傅立叶变换红外光谱仪的波长准确度要远差于波长精密度指标，同时， 0.01 cm^{-1} 这个精密度指标还不等同于重复性指标，拿一片标准聚苯乙烯薄膜在同样条件下间隔10分钟重复做10次测量，我们会发现你的傅立叶变换红外光谱仪的波长重复性对于不同的峰通常会在 0.01 cm^{-1} 到 0.1 cm^{-1} 之间，有时甚至更差。

综上所述，由于傅立叶变换红外光谱仪的波长精密度相对于波长准确度来说要好得多，所以傅立叶变换红外光谱仪的波长准确度主要取决于标定时采用的标准，然而如果测试的仪器质量较差致使仪器的波长重复性较差的话，则将主要取决于标定仪器的波长重复性。

那么这些在红外光谱里有什么意义呢？

精密度是我们使用同一个光谱仪在同样条件下进行同样的测试时获得结果的一致性的尺度。准确度反映了不同的光谱仪测量时与真值符合的有多好。好的准确度是比较从不同的光谱仪获得的数据质量的价值中枢。对于傅立叶变换红外光谱仪来说，比较容易获得好的波长精密度（短期重现性），而较难获得好的波长准确度（长期的重现性，或者仪器与仪器之间与真值匹配的程度）。这是因为傅里叶变换红外使用激光来作波长校正，所以精密度天然就很好。然而，降低准确度的效应就很多，比如：激光以某一角度透过干涉仪，而红外光束要比激光发散得多，并且红外光束可能由于样品位置影响和光束偏转的影响。

所以，不要被搞糊涂。很容易在刻度尺上加更多的刻度，也很容易在吸收光谱峰上显示更多的小数点位数，但给出一个可以上溯到标准物的准确的光谱峰位置则完全是另外一回事。或者换一句话说，你可以很容易地读取一个峰位置精确到小数点

后面若干位，但实际上这个光谱峰位置是不准确的。

不管是做定性分析或者做定量分析，准确的横坐标测量值和纵坐标测量值都是你获得正确结果的基础。所以你有必要经常地校验你的仪器。