

· 讲 座 ·

关于751G紫外分光光度计的波长校正

浙江省药品检验所 高毓嵩

紫外分光光度法在药品分析中应用甚多,中国药典,英国药典等对药品的定量采用直接给出吸收系数相比较计算的办法,简化了操作。省去了标准品(对照品)。但因药典所给的吸收系数是在仪器的准确度和精密度符合要求的条件下测得的,因此在测定样品前应定期对仪器进行校正检定,包括波长,分辨率,吸收度,杂散光与吸收池误差等。

(一) 波长对测定结果的影响: 仪器所示波长是否精密准确,对测定结果有很大影响,一般定量时在最大吸收峰顶上如较平坦,波长稍有偏差($\pm 1-2\text{nm}$),对结果影响尚不大。而当吸收峰顶比较锐或在吸收曲线的斜坡上测定,则波长误差对吸收度会产生较大的影响,如维生素A的三点校正法定量,要在最大吸收峰两侧(肩部)测定计算;细胞色素C定量药典规定,在最大吸收处每隔 0.5nm 读取,直至读到最大吸收度,以防止仪器因波长相差而导致结果不正确;又在制订新药质量标准时,对紫外吸收峰波长位置的确定等。为此必须对仪器波长进行严格的校正。

(二) 校正波长的方法: 有放射灯谱线法(汞灯,氢(氘)灯),有色玻璃的吸收曲线(钡玻璃,铍玻璃)和溶液法(苯的无水乙醇溶液,氧化钡的高氯酸溶液)。

我们在工作中体会到,经常使用的仪器,由于温度变化、转动等对机械部分的影响,仪器的波长会略有变动,可用氢(氘)灯谱线

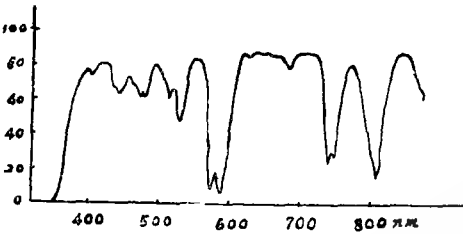
进行波长校正,但对于新按装验收的仪器,波长的校正必须顺序进行,因波长相差较大时,直接用灯的谱线校正时不易找到正确的位置(因该仪器不记录光谱图,同时氢灯除用于校正的谱线外,还有其他弱的谱线,容易混淆),具体可参照仪器说明书,一般步骤如下:

(1) 检查光斑: 校正时使用钨灯光斑,将狭缝开至最大($1.5-2\text{mm}$),波长转到 580nm ,置于暗电流控制闸门前的白纸上应有黄色光斑,表示波长相差不会超过 10nm 。如果光斑是绿色的,乃至蓝色的,则要调节波长刻度校正螺钉(即调整准直镜的角度),反时针方向稍微旋转使光斑成黄色,如果光斑是桔黄或红色的。则顺时针方向稍微旋转调整螺钉,使光斑成黄色,这是波长相差在 10nm 以上时的情况。

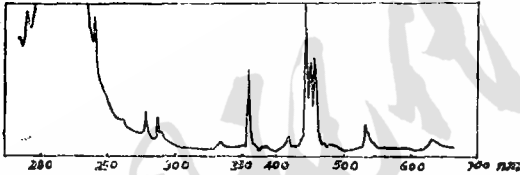
(2) 沿光片校正波长。铍玻璃的 741nm 和 808nm 二根吸收峰线,在 741 和 808nm 附近逐点测出其透过率,看它的吸收峰是否与规定相符,如果实际测得的是 735nm 和 802nm ,则稍微顺时针转动波长校正螺钉,反之如实测下来是 746nm 和 813nm ,则要反时针转动校正螺钉(如旋转校正螺钉觉得太紧不易控制时,可以略松开一些校正螺钉上面的紧固螺帽,反时针是松开,但不能太松,待校正完毕后再紧固,因太松后再紧固时,可能波长又要变动)。

钡玻璃在 $279.3, 287.6, 333.8, 360.8,$

418.5 与 536.4nm 有尖锐吸收峰, 常可用 360.8nm 吸收峰来校正 (我们有时也可用易得的维生素B₁₂注射液, 在361nm吸收峰处作稍微粗略的核对, 再以灯谱线校正)。实际工作中也遇到在361nm波长处相差1nm时, 则在741nm附近可产生几个nm的相差, 这是由于稜镜分光的仪器非均排光谱所致, 应加以注意。



铈 镨光学片吸收光谱图



铈 光学片吸收光谱图

(3) 氢(氘)灯精确校正波长(波长相差在 3nm 内时), 氢(氘)灯均为紫外分光光度计的光流, 在紫外区发射呈连续光谱, 氘灯与氢灯相比具有强度高, 稳定性好, 寿命长等优点, 近代的仪器中多采用氘灯。在接近紫外区起的可见光范围内, 则呈一些分立的, 不连续的谱线, 可以校正波长, 核对波长的方法药典采用仪器氢灯的379.79, 486.13与 656.28nm 三条谱线进行。氘灯可用 486.02 与 656.10nm 的谱线。可按仪器说明书, 开启氘灯10分钟, 用蓝敏光电管, 波长放在 480nm, 调节暗电流使O位计指针在O, 拉开暗电流闸门, 调节狭缝使O位计指示在O, 缓缓转动波长旋钮从 480nm→490nm, 看O位计指针偏左到底, 则将狭缝关小, 使O位计指针回到O, 再缓慢转动波长读数,

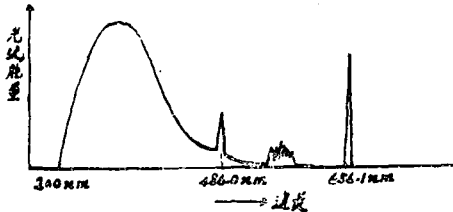
如O位计指针又偏转向左尽头时 (表示谱线的能量渐强), 要继续关小狭缝, 这样反复进行, 直到O位计停在偏左的顶峰(端), 读出波长盘刻度值(指针向左偏转最大时的波长读数), 与 486.13nm 相比较之差值也即仪器的波长误差。可微微旋动校正螺钉, 得到精确的波长值。如果误差较小, 可不需调整。还可再转到波长656.28nm 处, 用红敏光电管再核对一下。另外在486.13nm 过去一点约493nm 处亦有一谱线出现, 要注意防止搞错。

7520数字分光光度计: 用氢灯校正波长时, 调节暗电流使数字表示值在O, 拉开暗电流闸门, 调节狭缝及灵敏度旋钮, 使数字表示值在50%左右, 缓缓转动波长旋钮从 480nm→490nm, 看数字表上显示出某一最大数字, 此时波长盘上刻线所对之 nm 与486.13 相比较之差值也即仪器的波长误差。

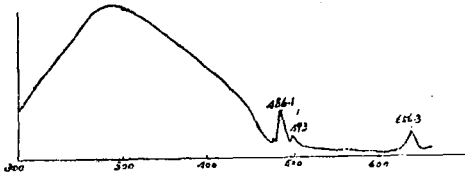
074.1	080.3	082.5	073.2
-------	-------	-------	-------

484.5nm 485.0nm 485.3nm 485.8nm

象上述情况波长读数应为485.3nm 与校正谱线 486.13nm, 误差 0.83nm, 可顺时针微微旋动校正螺钉。



氘灯能量曲线图



氘灯光谱相对能量曲线