

分光光度法中比色皿的光程长度对实验结果的影响

——以海水中亚硝酸盐氮的测定为例

孙欢¹, 谭晓璇², 屠建波¹, 阚文静¹

(1. 国家海洋局天津海洋环境监测中心站 天津 300457; 2. 自然资源部海洋咨询中心 北京 100161)

摘要:分光光度法是常用的定量分析方法之一,被广泛应用于水环境监测实验中。文章以萘乙二胺分光光度法测定海水中亚硝酸盐氮为例,探索选用不同光程长度的比色皿测定吸光值对物质含量的影响,并通过数理统计方法对实验数据进行分析。研究表明:选用不同光程长度的比色皿测得水样中的物质含量存在差异,即比色皿的光程长度越小,测得的物质含量越高;在相同实验条件下,选用光程长度更小的比色皿,实验的准确性和校准曲线的线性均更好。

关键词:分光光度法;比色皿;光程长度;吸光值;水环境监测

中图分类号:P76;X834;X832

文献标志码:A

文章编号:1005-9857(2021)06-0076-05

Influence of Cuvette's Optical Path Length on Experimental Results by Spectrophotometry: A Case Study of Taking the Determination of Nitrite Nitrogen in Seawater

SUN Huan¹, TAN Xiaoxuan², TU Jianbo¹, KAN Wenjing¹

(1. Tianjin Marine Environmental Monitoring Central Station, SOA, Tianjin 300457, China;

2. Oceanic Consulting Center, MNR, Beijing 100161, China)

Abstract: Spectrophotometry is one of the commonly used quantitative analysis methods. It is widely used in water environment monitoring experiments. In this paper, the determination of nitrite nitrogen in seawater by the naphthalene ethylenediamine spectrophotometric method was a case study, which explored the differences of using cuvettes with different optical path lengths to determine the concentration of substances. The experimental data was analyzed by mathematical statistics. The results showed that the content of substance in samples were different because of different optical path length of cuvettes. The concentration was higher when the cuvette was shorter. In the same condition, the accuracy of the experiment and the linearity of the calibration curve were better when the cuvette was shorter.

Keywords: Spectrophotometry, Cuvette, Optical path length, Light absorption value, Water environment monitoring

收稿日期:2020-08-03;修订日期:2021-05-27

基金项目:山东省海洋生态环境与防灾减灾重点实验室开放基金项目(201907)。

作者简介:孙欢,助理工程师,硕士,研究方向为海水质量评价和海域使用管理

通信作者:谭晓璇,工程师,硕士,研究方向为海洋经济发展

0 引言

分光光度法是最常用的定量分析方法之一,具有分析成本低、灵敏度高和操作快速便捷等特点,目前被广泛应用于水环境监测实验。常用的分光光度法主要包括紫外-可见光分光光度法、红外分光光度法、荧光分光光度法和原子吸收分光光度法。分光光度法测定水样中的物质含量通常根据比色液的颜色选用合适光程长度的比色皿:当比色液的颜色较浅时,应选用光程长度较大的比色皿(如 5 cm);当比色液的颜色较深时,应选用光程长度较小的比色皿(如 1 cm 或 2 cm)^[1]。一些环境监测类的规范对分光光度法中比色皿的光程长度进行限定,如《海洋监测规范》规定荧光分光光度法测定石油类须选用 1 cm 的比色皿,异烟酸-吡唑啉酮分光光度法测定氰化物须选用 3 cm 的比色皿,萘乙二胺分光光度法测定海水中亚硝酸盐氮须选用 5 cm 的比色皿。

目前对分光光度法中比色皿的研究多集中于比色皿的选用对实验造成的误差以及误差消除等方面^[2-8],也有研究验证朗伯-比尔定律即探讨分光光度法中比色皿的光程长度与吸光值的关系,但这些研究均未分析比色皿的光程长度与水样中的物质含量测定结果之间的关系。本研究以萘乙二胺分光光度法测定海水中亚硝酸盐氮为例,探索选用不同光程长度的比色皿进行分光光度法实验测得水样中物质含量的差异性,以期为实际工作和改进实验方法提供参考。

1 实验

1.1 基本原理

在酸性介质中,亚硝酸盐与磺胺发生重氮化反应,其产物再与萘乙二胺偶合,显色生成红色染料;利用紫外分光光度计,于波长 543 nm 处测定比色液的吸光值,代入校准曲线可得水样中亚硝酸盐氮的含量。

1.2 仪器设备和试剂

实验采用 T6 新世纪紫外分光光度计和实验所需玻璃器皿,配制 10 g/L 磺胺溶液和 1 g/L 盐酸萘乙二胺溶液。选用 2 种亚硝酸盐氮标准系列,分别为自然资源部第二海洋研究所的亚硝酸盐氮标准系列(GBW 08640)和坛墨质检标准物质中心的水中亚硝酸盐氮标准溶液(BW 20002-1000-W-50)。

1.3 误差消除

在人员误差方面,实验人员操作仪器设备的熟练程度、测定比色液吸光值的个人习惯以及样品比色液与标准比色液处理流程的差异等原因都可能引起实验的主观误差。本实验的实验人员具有多年海水营养盐分析经验,同时严格按照《海洋监测规范第 4 部分:海水分析》(GB 17378.4—2007)中亚硝酸盐-萘乙二胺分光光度法的分析步骤进行实验。

在系统误差方面,同时选用 1 cm、2 cm 和 5 cm 的 3 种光程长度的比色皿,为避免系统误差,选用校正合格的同一厂家和同一批次的石英比色皿,在测定比色液的吸光值时,分光光度计的比色皿架卡槽宽度应与比色皿的光程长度相适应。

1.4 实验方法

1.4.1 差异性验证实验

为验证选用不同光程长度的比色皿进行分光光度法实验所得水样中物质含量的差异性,采用萘乙二胺分光光度法,分别于 8 月 4 日和 11 月 12 日进行 2 个批次的独立实验,测定天津近岸海域海水样品中亚硝酸盐氮的含量,样品数量分别为 20 个和 12 个。采用亚硝酸盐氮标准系列(GBW 08640)作为实验校准曲线,曲线各点的含量分别为 0 μg/L、7 μg/L、14 μg/L、28 μg/L 和 56 μg/L。待校准曲线与水样显色稳定后,分别选用 1 cm、2 cm 和 5 cm 光程长度的比色皿,依次测定校准曲线各点和水样的吸光值,计算得到水样中亚硝酸盐氮的含量,计算公式为:

$$p = (A - A' - a) / b \times 14 \quad (1)$$

式中: p 为水样中亚硝酸盐氮的含量; A 为水样的吸光值; A' 为分析空白的吸光值; a 为校准曲线的截距; b 为校准曲线的斜率。

计算结果如表 1 和表 2 所示。

1.4.2 准确度对比实验

以相对误差作为判定实验准确度的依据。实验步骤为:①用 1 000 mg/L 的亚硝酸盐氮标准溶液(BW 20002-1000-W-50)配制标准系列,其含量分别为 0 μg/L、20 μg/L、40 μg/L、60 μg/L、80 μg/L、100 μg/L、120 μg/L、140 μg/L、160 μg/L 和 180 μg/L,按照萘乙二胺分光光度法实验步骤显色,分别选用

表 1 第一批水样中亚硝酸盐氮的含量 $\mu\text{g/L}$			
样品编号	比色皿光程长度		
	1 cm	2 cm	5 cm
101	57.1	56.3	55.8
102	48.8	47.9	47.2
103	52.0	51.2	50.7
104	53.9	53.3	52.7
105	73.5	72.7	72.0
106	54.2	53.1	52.3
107	50.5	49.5	48.9
108	59.6	58.9	58.1
109	56.8	55.8	55.2
110	52.2	50.5	50.1
111	46.9	46.1	45.8
112	39.8	38.1	37.7
113	38.4	36.7	36.3
114	24.8	23.1	22.6
115	36.7	34.9	34.5
116	34.7	33.1	32.8
117	31.8	29.9	29.5
118	27.9	26.2	25.6
119	49.4	47.9	47.5
120	46.3	44.1	43.5

表 2 第二批水样中亚硝酸盐氮的含量 $\mu\text{g/L}$			
样品编号	比色皿光程长度		
	1 cm	2 cm	5 cm
201	13.3	12.8	12.6
202	18.4	18.0	17.7
203	24.4	24.1	23.7
204	32.6	32.2	31.7
205	35.5	34.2	33.7
206	30.7	30.2	29.8
207	34.6	34.2	33.7
208	35.5	35.0	34.5
209	31.5	30.9	30.5
210	33.2	32.6	32.2
211	41.2	40.4	39.9
212	42.3	41.7	41.2

1 cm、2 cm 和 5cm 光程长度的比色皿依次测定标准系列各点的吸光值,每个点测量 3 次,得到亚硝酸盐氮标准系列的实测吸光值(表 3),并绘制各光程长度比色皿对应的校准曲线;②以已知亚硝酸盐氮含量为 60 $\mu\text{g/L}$ 、80 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、120 $\mu\text{g/L}$ 和 140 $\mu\text{g/L}$ 的水样作为内控样,经上述实验步骤测定吸光值后,代入相应校准曲线,得到内控样在不同光程长度比色皿测定下的含量实测值;③计算内控样实测值与真值的相对误差。

表 3 亚硝酸盐氮标准系列的实测吸光值									
含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	1 cm 比色皿			2 cm 比色皿			5 cm 比色皿		
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs 1	Abs2	Abs3	Abs1	Abs2	Abs3
0	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006
20	0.071	0.071	0.071	0.141	0.141	0.141	0.351	0.350	0.351
40	0.140	0.140	0.140	0.279	0.279	0.280	0.695	0.695	0.695
60	0.207	0.207	0.207	0.412	0.412	0.412	1.001	1.000	1.000
80	0.257	0.257	0.257	0.500	0.500	0.500	1.243	1.243	1.243
100	0.334	0.334	0.334	0.664	0.666	0.666	1.611	1.613	1.612
120	0.391	0.391	0.390	0.778	0.778	0.778	1.884	1.886	1.885
140	0.455	0.454	0.454	0.904	0.904	0.904	2.187	2.187	2.187
160	0.524	0.525	0.524	1.040	1.040	1.040	2.448	2.448	2.447
180	0.588	0.588	0.588	1.167	1.165	1.165	2.722	2.722	2.724

1.4.3 校准曲线的不确定度分析实验

由式(1)可知,对实验结果产生影响的因子即不确定度来源于温度、水样和分析空白的吸光值以及校准曲线的拟合情况。由于实验已进行过误差

消除,保证相同批次水样由相同实验人员在相同实验条件下测定,水样和分析空白吸光值的不确定度对于实验结果的影响可忽略不计,实验设计仅考虑对校准曲线的影响。实验步骤同准确度对比实验。

2 实验结果与讨论

2.1 实验结果的差异性

由表 1 和表 2 可以看出,不同光程长度的比色皿测得的水样中亚硝酸盐氮的含量不同,含量由高到低所对应的比色皿光程长度依次为 1 cm、2 cm 和 5 cm。为进一步分析不同光程长度的比色皿测得亚硝酸盐氮含量的差异性,采用 Z-score 对实验结果进行标准化。Z-score 是以标准差为尺度,可改变原始指标离散程度的信息(图 1 和图 2)。

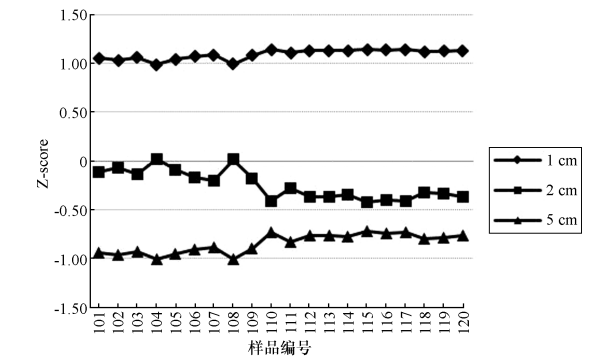


图 1 第一批水样中亚硝酸盐氮含量的 Z-score

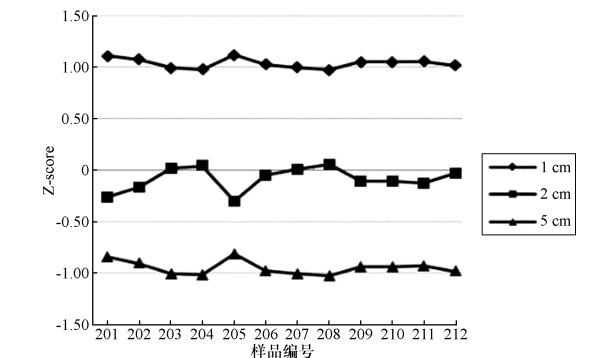


图 2 第二批水样中亚硝酸盐氮含量的 Z-score

经标准化可以看出,不同光程长度比色皿的测定结果之间存在一定的离散,即测定结果存在差异。其中,1 cm 与 2 cm 比色皿测定结果的差异性大于 5 cm 与 2 cm 比色皿测定结果的差异性。

计算实验获得的 32 组数据的相对标准偏差:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}{m-1}}}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:RSD 为相对标准偏差; s 为标准偏差; $\bar{x}$ 为每组数据的平均值; x_i 为实测值; m 为每组数据的个

数, $m=3$ 。
计算结果如表 4 所示。

表 4 实验结果的相对标准偏差

样品编号	RSD/%	样品编号	RSD/%
101	1.13	117	4.19
102	1.73	118	4.44
103	1.24	119	2.10
104	1.19	120	3.30
105	1.00	201	2.70
106	1.80	202	2.11
107	1.64	203	1.37
108	1.27	204	1.51
109	1.46	205	2.66
110	2.22	206	1.41
111	1.22	207	1.35
112	2.88	208	1.40
113	2.99	209	1.66
114	4.94	210	1.58
115	3.28	211	1.52
116	2.98	212	1.34

由表 4 可以看出,各组数据的相对标准偏差均不小于 1%。可见当实验选用的比色皿光程长度不同时,测得水样中的物质含量也存在明显差异。

2.2 实验结果的准确度

经不同光程长度的比色皿测定,并将吸光值代入相应的校准曲线得到内控样的实测值,计算内控样实测值与真值的相对误差:

$$\delta = \frac{\Delta}{L} \times 100\% \quad (3)$$

式中: δ 为相对误差; Δ 为实测值与真值之差; L 为真值。

计算结果如图 3 所示。

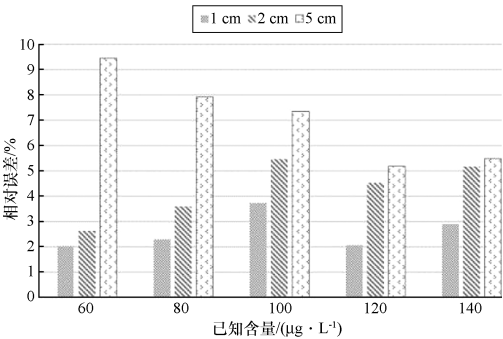


图 3 相对误差的实验结果

由图 3 可以看出,较小光程长度的比色皿测得结果的相对误差较小,即实验的准确度更高。

2.3 校准曲线的不确定度

以 1 cm 比色皿测定的亚硝酸盐氮标准系列吸光值为例,以各点吸光值的平均值与空白吸光值的差值为纵坐标、以亚硝酸盐氮含量为横坐标,绘制校准曲线:

$$y = 0.003\ 2x + 0.005\ 1, R = 0.999\ 7$$

由此得到校准曲线的残余标准偏差:

$$S_{1\text{ cm}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (Bx_i + A)]^2}{n - 2}} = 0.006\ 27$$

式中: S 为残余标准偏差; y_i 为 x_i 点的实测吸光值; B 为曲线斜率; A 为曲线截距; n 为测量校准系列的总次数, $n=30$ 。

同理,2 cm 比色皿测定得到的校准曲线及其残余标准偏差为:

$$y = 0.006\ 4x + 0.009\ 2, R = 0.999\ 5$$

$$S_{2\text{ cm}} = 0.011\ 64$$

5 cm 比色皿测定得到的校准曲线及其残余标准偏差为:

$$y = 0.015\ 0x + 0.055\ 9, R = 0.999\ 2$$

$$S_{5\text{ cm}} = 0.036\ 34$$

因此,在相同实验条件下,选用光程长度更小的比色皿测定比色液的吸光值,可使校准曲线的线性更好。

在校准曲线拟合的影响下,某水样经实验所得结果的不确定度为:

$$u(c_0) = \frac{S}{B} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}}$$

式中: u 为实验结果的不确定度; c_0 为水样中的物质含量; S 为校准曲线的残余标准偏差; B 为曲线斜率; P 为测量水样的次数; n 为测量标准系列的总次数, $n=30$; $\bar{c}$ 为标准系列含量的平均值; c_i 为由实测吸光值反算得到的标准系列含量。

假设某水样经实验测定 2 次吸光值($P=2$),得到其亚硝酸盐氮的含量为 $70\ \mu\text{g/L}$ 。①若选用 1 cm 光程长度的比色皿测定,其不确定度为 $1.44\ \mu\text{g/L}$;

②若选用 2 cm 光程长度的比色皿测定,其不确定度为 $1.33\ \mu\text{g/L}$;③若选用 5 cm 光程长度的比色皿测定,其不确定度为 $1.78\ \mu\text{g/L}$ 。

3 结语

本研究采用分光光度法,选用 3 种光程长度的比色皿测定同一比色液中的物质含量。①实验结果存在差异,即比色皿的光程长度越小,测得的物质含量越高,且 1 cm 与 2 cm 比色皿测定结果之间的差异性大于 5 cm 与 2 cm 比色皿测定结果之间的差异性;②由较小光程长度的比色皿测得结果的相对误差较小,实验的准确度更高;③在相同实验条件下测定校准曲线的吸光值,选用光程长度更小的比色皿的曲线线性更好;④以某水样中亚硝酸盐氮的含量为 $70.0\ \mu\text{g/L}$ 为例,若由光程长度分别为 1 cm、2 cm 和 5 cm 的比色皿测定,其不确定度分别为 $1.44\ \mu\text{g/L}$ 、 $1.33\ \mu\text{g/L}$ 和 $1.78\ \mu\text{g/L}$ 。

与此同时,本实验仍存在局限性,如实验次数和数据量较少、水样中物质含量的区间较小以及计算校准曲线的残余标准偏差时吸光值的测量次数较少,应在今后的研究中改进。

参考文献

[1] 李素辉,张志梅.光度法中比色皿的选择和使用[J].化学分析计量,2001(3):29-35.
[2] 连岩,郭旭强,连肖阳.海水营养盐分析中造成误差的原因及消除方法[J].齐鲁渔业,2006(4):10-11.
[3] 曾映川.如何避免因比色皿造成的测量误差[J].科技信息,2009(7):715.
[4] 李昌厚.石英比色皿配对误差对紫外可见分光光度计测量误差的影响[J].分析仪器,2008(6):43-46.
[5] 毛湘华.比色皿间误差的消除[J].仪器仪表与分析监测,1998(3):60.
[6] 陈泓霖,邱国良.水质监测中易忽视细节问题探讨[J].环境与发展,2019,31(9):183-184.
[7] 蒋磊,傅家乐,陈丽珍.紫外可见分光光度计中紫外区光度准确度测试材料的选用及探讨[J].计量与测试技术,2019,46(8):80-81.
[8] 康恒,庞大威,马芝贤.分光光度法中不同光程长度比色皿间关系验证[J].环境保护与循环经济,2013,33(6):65-66.