

第七章 吸光光度法

吸光光度法：基于物质对光的选择性吸收而建立的分析方法，包括比色法和分光光度法。

分光光度法的优点：灵敏、准确、快速、选择性好、适于微量组分的测定。

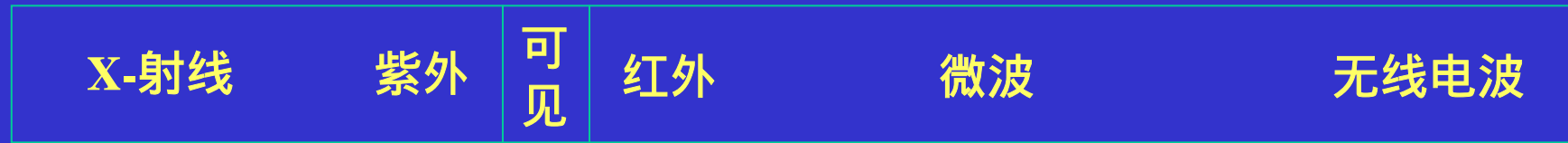
§ 7-1 吸光光度法的基本原理

一、物质对光的选择性吸收

光是一种电磁波，根据波长或频率大小分为X射线、紫外、可见、红外、微波和无线电波。

$$E = h\nu = h \frac{c}{n\lambda}$$

10^{-2} nm 10^0 nm 10^2 nm 10^4 nm 0.1 cm 10 cm 10^3 cm 10^5 cm



紫外： 200-400nm

可见： 400-750nm

红外： 0.75-50 μ m

单色光： 单一波长的光。

复合光： 由不同波长的光组成的

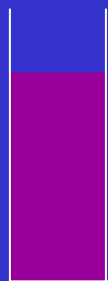
光。

互补色光 白光是由两种适当颜色的光按一定强度、比例混合而成的，这二种颜色的光称为互补色光，如黄色与兰色，黄绿色与紫色。

不同颜色的可见光波长及其互补光

颜色	/nm	互补色光
紫	400—500	黄绿
蓝	450—480	黄
绿蓝	480—490	橙
蓝绿	490—500	红
绿	500—560	红紫
黄绿	560—580	紫
黄	580—610	蓝
橙	610—650	绿蓝
红	650—760	蓝绿

黄绿



溶液呈现它所吸收光的互补色光的颜色。

由于不同物质微粒具有不同的量子能级，其能量差也不同，因此物质对光的吸收具有选择性。

吸收光谱曲线：

以波长为横坐标，吸光度为纵坐标得到的一条曲线。它反映某溶液对不同波长单色光的吸收程度。在最大吸收波长处测定吸光度，则灵敏度最高。

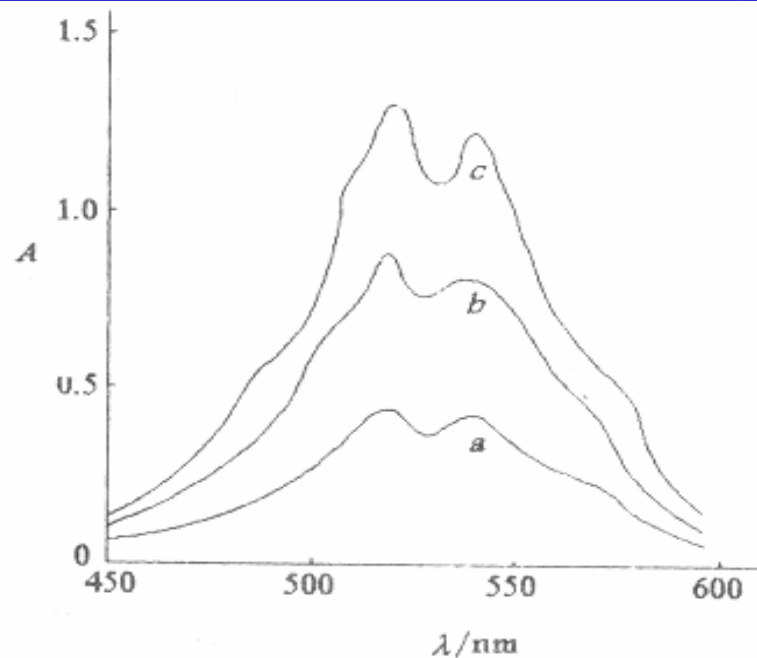
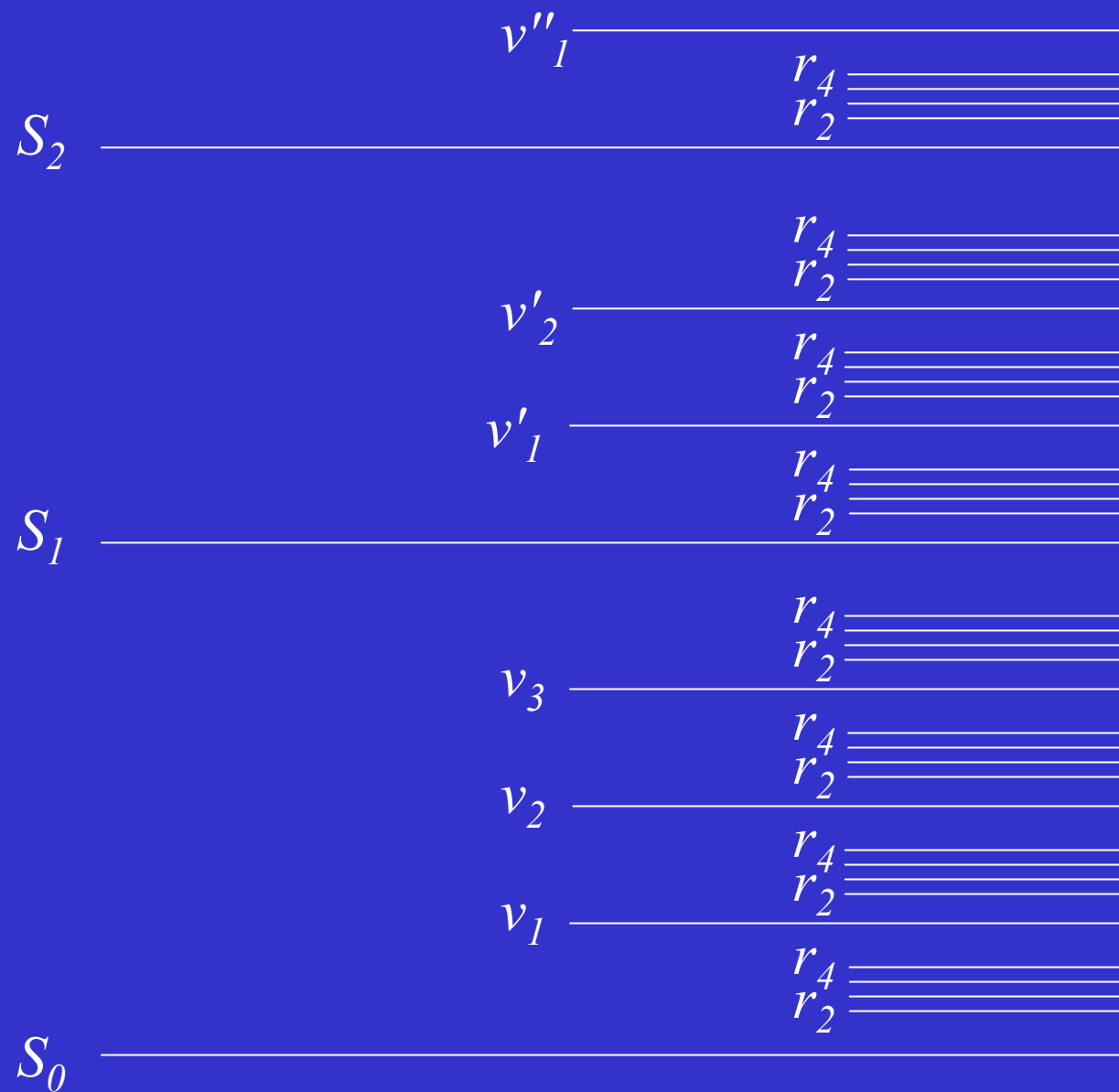


图 7-2 不同浓度 KMnO_4 溶液的吸收曲线

- 1、 $\lambda_{\text{最大}}$ 与 c 无关
- 2、 $A \propto c$ (一定 c 范围内)

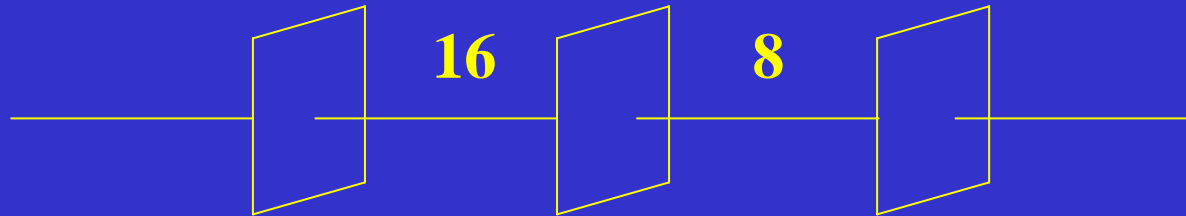
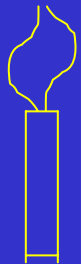


分子能级示意图

二、吸收的基本定律

1、朗伯—比尔定律

32烛光



分级消光现象

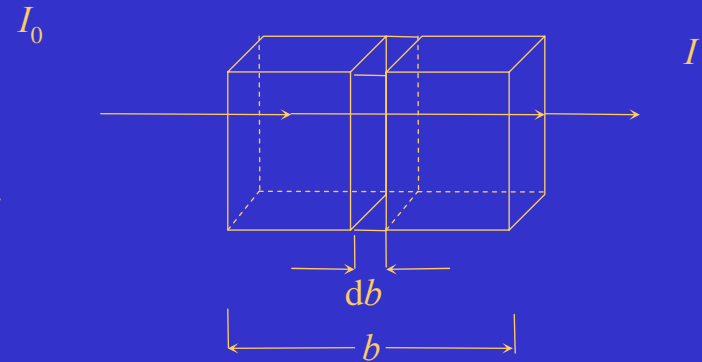
1760年，Lambert用实验指出，当光通过透明介质时，光的减弱程度与光通过介质的光程成正比。

1850年，Beer研究证明了，光的吸收程度与透明介质中光所遇到的吸光质点的数目成正比，在溶液中即可与吸光质点的浓度成正比。

$$A=Kbc$$

透光率 $T = \frac{I}{I_0}$

吸光度 $A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} = -\lg T$



设薄层厚度 db , 面积 S , 照到薄层上的光强 I_b , 通过薄层后光减弱了 dI_b 。

$$dV = S \times db$$

吸光质点数 $dn = k' \times c \times dV = k' \times S \times c \times db$

$$dI_b \propto I_b \quad dI_b \propto dn$$

$$-dI_b = k'' \times I_b \times dn = K'' \times I_b \times k' \times c \times S \times db = k''' I_b c db$$

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_b}{I_b} = \int_0^b K''' c db = K''' bc$$

$$A = Kbc$$

$$-\ln \frac{I}{I_0} = K''' bc$$

$$-\lg \frac{I}{I_0} = Kbc$$

2、光度分析的灵敏度

(1) 摩尔吸光系数

$$A = Kbc \quad b: \text{cm}, \quad c: \text{mol/L}$$

$$A = \varepsilon bc \quad \varepsilon: \text{摩尔吸光系数, 只与波长有关, 单位: L/cm}\cdot\text{mol}。$$

物理意义：一定 λ 下， $b=1\text{cm}$ ， $c=1\text{mol/L}$ 时的吸光度。

实际工作中，不能用 $c=1\text{mol/L}$ 的溶液测吸光度。在 $b=1\text{cm}$ 时，做工作曲线，斜率为 ε 。

一般 $\varepsilon: 10^5$ 已很灵敏。

(2) 桑德尔灵敏度指数： S ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

在 λ_{max} 时 $A=0.001$ 下，单位截面积光程内所能检出吸光物质的最低含量。

S 与 ε 关系

$$A = 0.001 = \varepsilon bc \quad bc = \frac{0.001}{\varepsilon}$$

$$S = b(\text{cm}) \times c(\text{mol}/\text{dm}^3) \times M(\text{g}/\text{mol}) \times 10^6 \mu\text{g}/\text{g}$$

$$= \frac{0.001 \times M \times 10^3}{\varepsilon}$$

$$= \frac{M}{\varepsilon} \quad (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$$

<例> Fe^{2+} 与邻二氮菲生成红色络合物，其 ϵ 为 1.1×10^4 ， Fe^{2+} 与磺基水杨酸络合物，其 ϵ 为 5.8×10^3 ，则前者的灵敏度高。

双硫脲与Pb的 ϵ_{Pb} 为 6.8×10^4 则

$$S = \frac{207}{\epsilon} = 0.0030 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

双硫脲与Cu的 ϵ_{Cu} 为 4.52×10^4 则

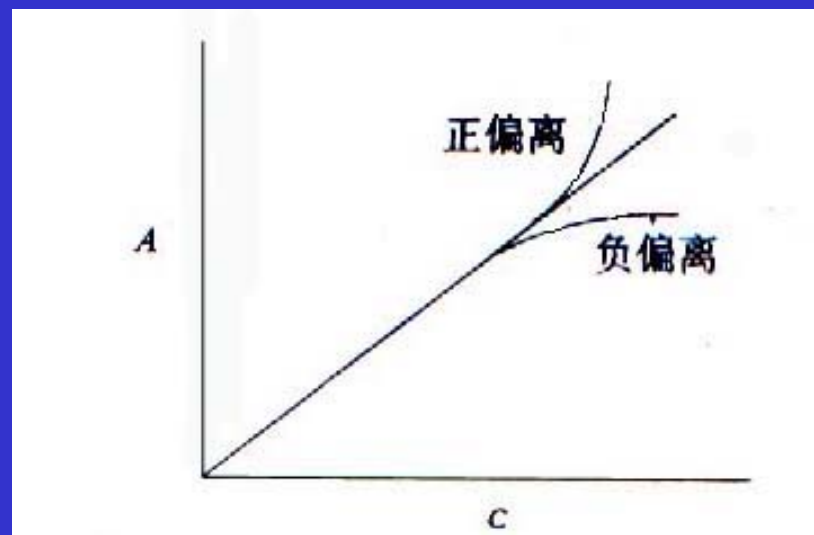
$$S = \frac{63.5}{\epsilon} = 0.0014 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ 灵敏度高}$$

3 . 吸光度的加和性

共存的两种吸光物质对同一波长的光的吸光度值分别为 A_1 、 A_2 ，则总吸光度为；

$$A = A_1 + A_2 = \epsilon_1 b c_1 + \epsilon_2 b c_2$$

4. 偏离朗伯比尔定律的原因



(1) 非单色光

$$A_1 = \varepsilon_1 bc = \lg \frac{I_{01}}{I_1} \quad I_1 = 10^{-\varepsilon_1 bc} I_{01}$$

$$A_2 = \varepsilon_2 bc = \lg \frac{I_{02}}{I_2} \quad I_2 = 10^{-\varepsilon_2 bc} I_{02}$$

$$A = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2} = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{10^{-\varepsilon_1 bc} I_{01} + 10^{-\varepsilon_2 bc} I_{02}}$$

若 $\varepsilon_1 = \varepsilon_2$ 则 $A = \varepsilon bc$ 若 $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_2$ A 与 c 不成线性关系。

(2) 溶液本身物理化学性质引起

- 介质非均匀性
- 溶液本身离解、缔合、络合



橙

黄

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 与 CrO_4^{2-} 颜色不同，当 $[\text{H}^+]$ 增加时，平衡左移。

§ 7-2 光度分析方法及仪器

一、目视比色法：

比较透过光的强度。

标准色阶：在相同条件下显色，目视比较。

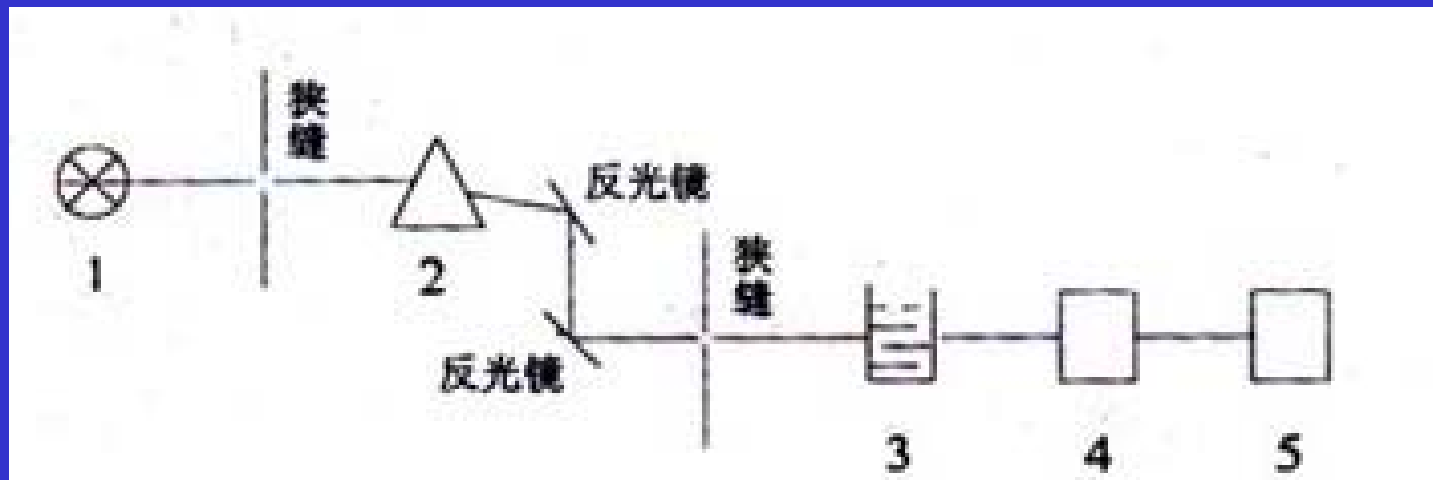
灵敏度高、准确度低，不同人看，结果不同。
不符合朗伯比尔定律的也可用目视比色法，因比较透过光。

二、光电比色法：

比较溶液对某一波长光的吸收情况。比目视比色法的准确度和选择性好

三、分光光度法：

与光电比色法的原理相同，只是二者获得单色光的方法不同，前者使用滤光片，后者使用棱镜、光栅。因而分光光度法比光电比色法的准确度和选择性好。



光度分析光路示意图

1. 光源, 2. 单色器, 3. 吸收池, 4. 检测器, 5. 指示器

1、光源：钨丝灯：可见、红外 400-1000nm

氢灯或氘灯：紫外 160-350nm

2、单色器：

(1) 滤光片：有色的玻璃片或薄膜，利用颜色互补原理。

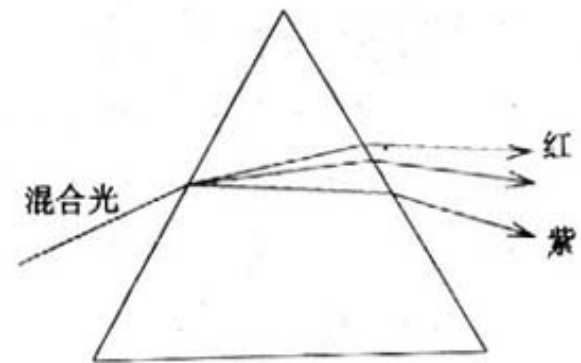
(2) 棱镜：根据物质的折射率与光的波长有关。

玻璃棱镜：可见，石英棱镜：紫外、可见。

(3) 光栅：在玻璃片或金属片
上刻划均匀的

线，

1200 条/ 1mm，
干涉、衍射原理。



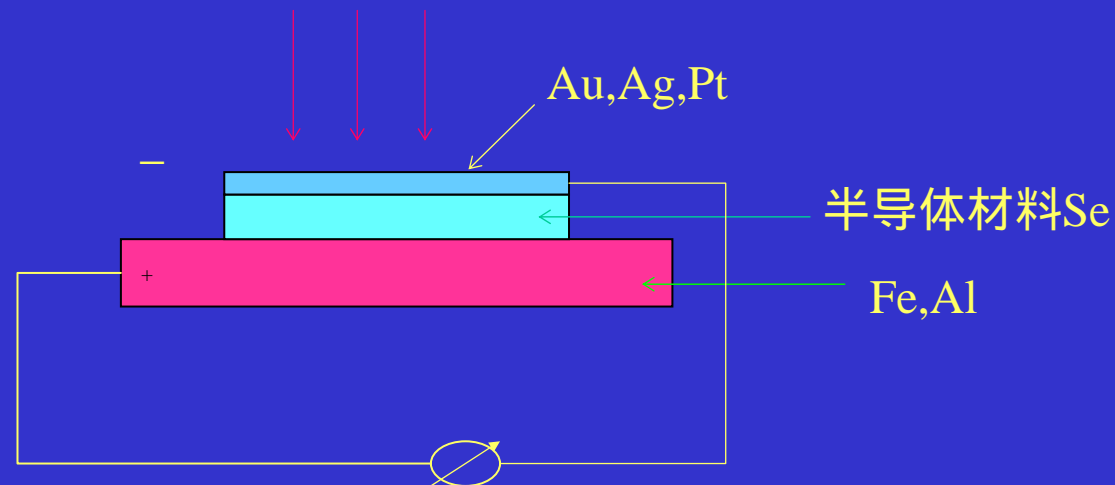
棱镜的色散作用

3、吸收池：玻璃：可见；石英：紫外，可见。

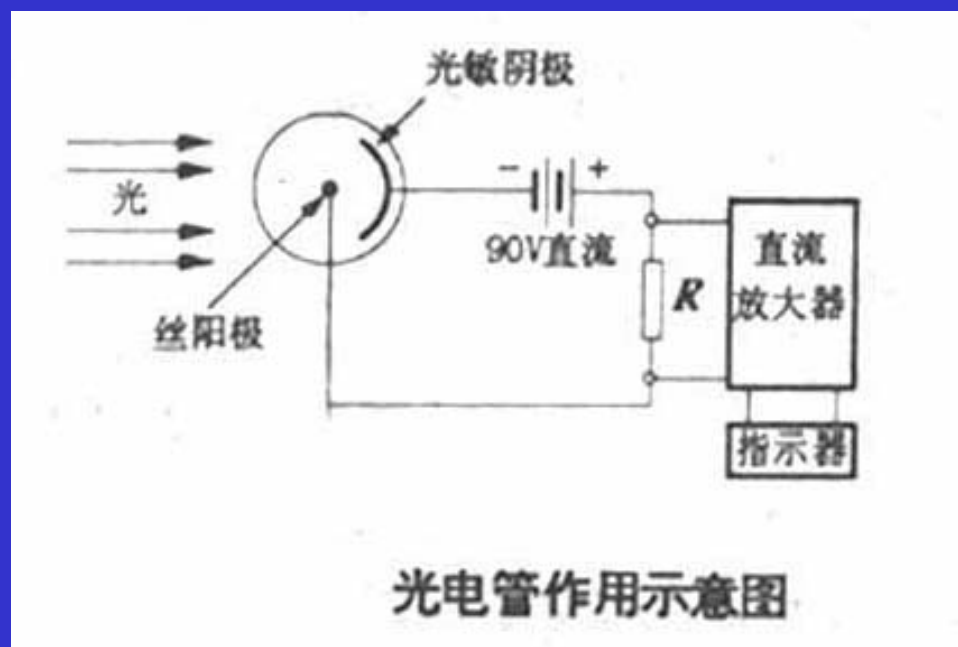
4、检测器：光电转换器件。利用光电效应，光照产生光电流，测光电流的大小。

(1) 硒光电池：

光照到 Se 上产生电子，Au 薄膜带负电，Fe 或 Al 带正电。
感光范围 300~800nm，500~600nm 最灵敏，
有疲劳现象，光照时间长不灵敏，所以用后马上关掉。



(2) 光电管：比硒光电池灵敏度高，无疲劳现象。



(3) 光电倍增管

5、显示器

检流计：72型；

数字显示：722型；

数字打印：UV-240。

§ 7-3 显色反应及条件

一、显色反应

将待测组分转变为有色化合物的反应称为显色反应



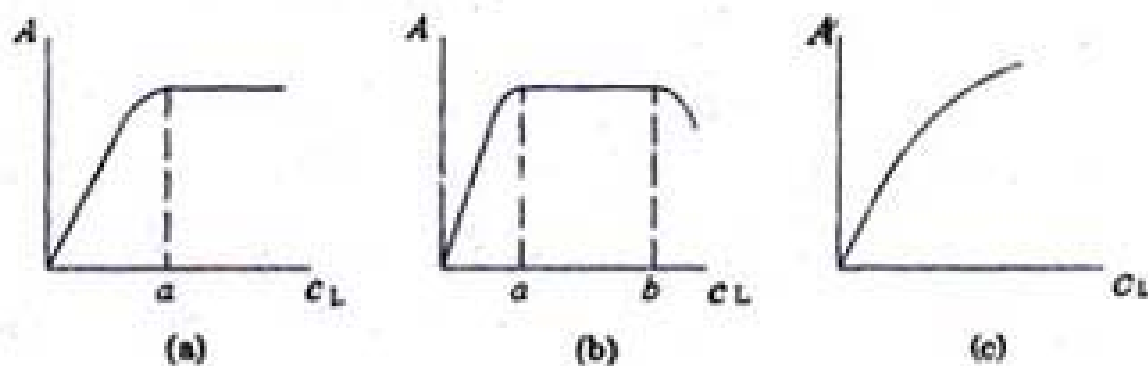
- 要求
- (1) 选择性好
 - (2) 灵敏度高, $>10^4$
 - (3) 有色络合物ML要稳定(不分解)
 - (4) ML组成要一定(只ML无 ML_n)
 - (5) ML与L颜色差别大

反衬度 $= \frac{ML_{\max}}{L_{\max}} > 60nm$,
否则对测定有干扰。

二、影响显色反应的因素

1. 显色剂的浓

度： $M+L \rightleftharpoons ML$ 每次加入量严格准确控制



加入显色剂量的影响

2. 溶液的酸度：



- (1) 影响显色剂的浓度
- (2) 影响M的存在状态
- (3) 影响ML的组成和稳定性

如 Fe^{3+} —磺基水杨酸:

pH	组成	颜色
2-3	1 : 1	紫红
4-8	1 : 2	橙
8-10	1 : 3	黄色

3. 温度:

通过实验确定温度范围，通常在室温下进行。

4. 溶剂：

一般螯合物在有机溶剂中溶解度大，提高显色反应的灵敏度。例如： $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ ，在水中大部分离解，几乎无色；在丙酮中呈兰色。

5. 时间：

颜色稳定的时间通过条件实验确定。

6. 干扰组

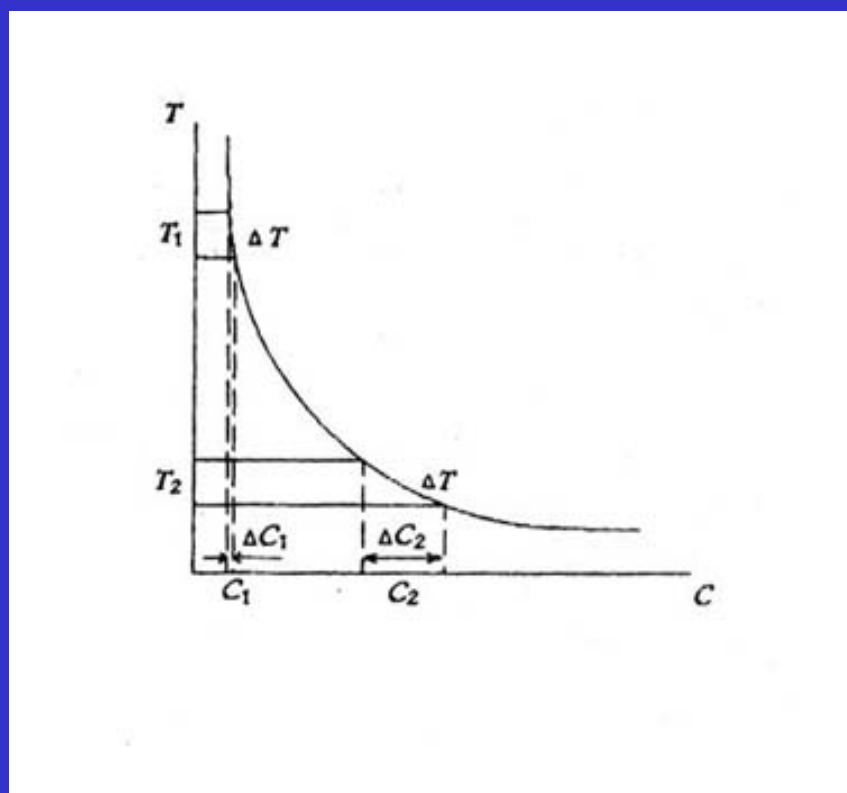
分： 干扰组分有色或干扰组分与L生成有色络合物，产生正干扰，A值增大；干扰组分与L或M生成无色络合物，则会使M或L的浓度降低，产生负干扰，A值减少。

消除干扰：

- (1) 控制一定酸度，使干扰组分不生色
- (2) 加掩蔽剂，与干扰组分生成无色物
- (3) 选择适当的波长
- (4) 选择适当的参比液
- (5) 分离掉干扰组分

§ 7-4 光度分析的准确度

由仪器本身决定的，对一台仪器来说读数误差 ΔT 为定值。



一定的 T 对应的 c 不同，相对误差 $\frac{\Delta c}{c}$ 不同

c 小, T 引起的 c 小, $\frac{\Delta c}{c}$ 大;
 c 大, T 引起的 c 大, $\frac{\Delta c}{c}$ 大。

$$A = -\lg T \quad dA = -\frac{0.434dT}{T}$$

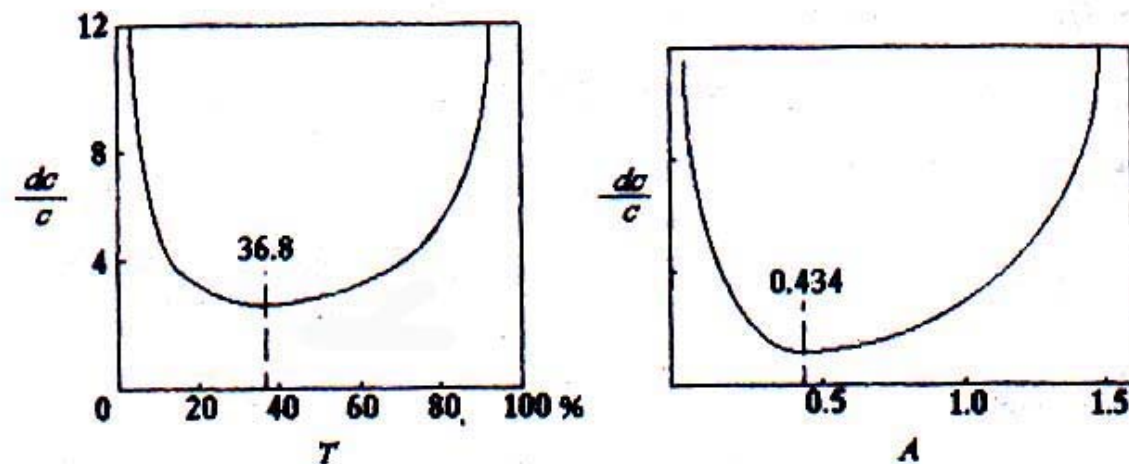
$$\frac{dA}{A} = -\frac{0.434dT}{T \cdot (-\lg T)} = \frac{0.434dT}{T \cdot \lg T}$$

相对误差 : $RE = \frac{\Delta c}{c} = \frac{\Delta A}{A} = \frac{dA}{A} = \frac{0.434dT}{T \cdot \lg T}$

分母最大时, RE 最小。

$$\frac{d(T \cdot \lg T)}{dT} = 0 \Rightarrow \ln T + 1 = 0 \Rightarrow \lg T = -0.434$$

即 $A=0.434$ 时 RE 最小。



$\frac{dc}{c}$ - T 图及 $\frac{dc}{c}$ - A 图

$T=0.01$ 时, $RE = \pm 2.7\%$,

所以光度分析法 RE 大, 一般5%左右。

A 在0.1—1 或 T 在10 —80% 范围内时, RE 较小(<5%)。

§ 7-5 光度分析的应用

一、多组分的测定：

两组分x, y

(1) x, y 互不干扰

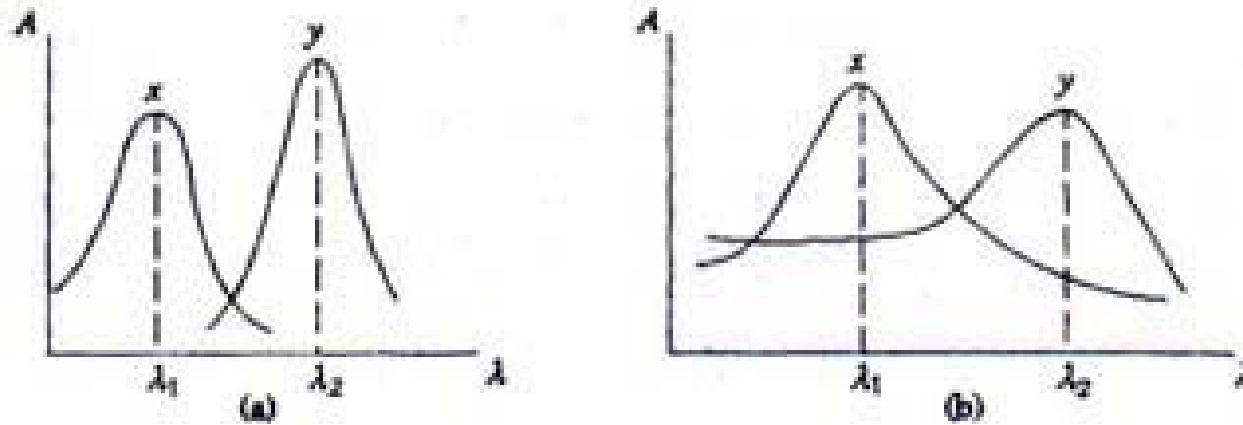
$$\begin{cases} A_1 = \varepsilon^x_{\lambda 1} \cdot b \cdot c_x \\ A_2 = \varepsilon^y_{\lambda 2} \cdot b \cdot c_y \end{cases}$$

(2) x 干扰 y, y 不干扰 x

$$\begin{cases} A^x_1 = \varepsilon^x_{\lambda 1} \cdot b \cdot c_x \\ A^{x+y}_2 = \varepsilon^x_{\lambda 2} b c_x + \varepsilon^y_{\lambda 2} \cdot b \cdot c_y \end{cases}$$

(3) x , y 互相干扰

$$\begin{cases} A^{x+y}_{\lambda_1} = \varepsilon^x_{\lambda_1}bc_x + \varepsilon^y_{\lambda_1}bc_y \\ A^{x+y}_{\lambda_2} = \varepsilon^x_{\lambda_2}bc_x + \varepsilon^y_{\lambda_2}bc_y \end{cases}$$

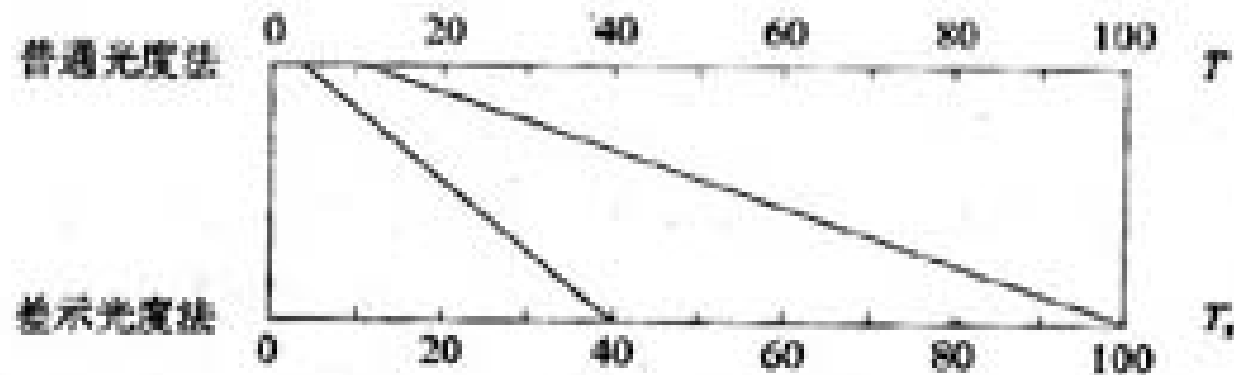


多组分的吸收光谱

二、差示分光光度法

高吸光度法：

选比 c_x 浓度稍小的 c_s 为参比，调透光率100%，相当于标尺扩大10倍。



差示光度法示意图

$$A_x = bc_x = -\lg T_x \quad A_s = bc_s = -\lg T_s$$

$$A_r = A_x - A_s = b(c_x - c_s) = b c = -\lg T_r$$

$$T_r = \frac{T_x}{T_s} \quad dA_r = bdc \quad dA_r = -\frac{0.434dT_r}{T_r}$$

$$A_x = -\lg T_x = bc_x \quad c_x = \frac{-\lg T_x}{\epsilon b}$$

$$\frac{\epsilon bdc}{c_x} = -\frac{0.434dT_r}{T_r \cdot \frac{-\lg T_x}{\epsilon b}}$$

$$\text{差示: } \frac{dc}{c_x} = \frac{0.434dT_r}{T_r \lg T_x} \quad \text{普通: } \frac{dc}{c_x} = \frac{0.434dT}{T_x \lg T_x}$$

$T_r > T_x$ 差示的误差

小。

<例> $T_x=2.0\%$ $T_s=10\%$ $T=\pm 0.5\%$ 以试剂为参比

$$\text{解: } \frac{dc}{c} = \frac{0.433 \times (\pm 0.5\%)}{0.02 \times \lg 0.02} = \pm 6.4\%$$

以 T_s 为参比

$$\frac{dc}{c} = \frac{0.434dT_r}{T_r \lg T_x} = \frac{0.434(\pm 0.5\%)}{0.2 \times \lg 0.02} = \pm 0.64\%$$

$$T_r = \frac{T_x}{T_s} = 20\%$$

三、弱酸（碱）离解常数的测定



$$c_{\text{HA}} = [\text{HA}] + [\text{A}^-] = c_{\text{HA}} \cdot \delta_{\text{HA}} + c_{\text{HA}} \delta_{\text{A}^-}$$

当 $b=1\text{cm}$ 时，

$$\begin{aligned} A &= \varepsilon_{\text{HA}} [\text{HA}] + \varepsilon_{\text{A}^-} [\text{A}^-] \\ &= \varepsilon_{\text{HA}} c_{\text{HA}} \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} + \varepsilon_{\text{A}^-} \cdot c_{\text{A}^-} \cdot \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \\ &= A_{\text{HA}} \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} + A_{\text{A}^-} \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \end{aligned}$$

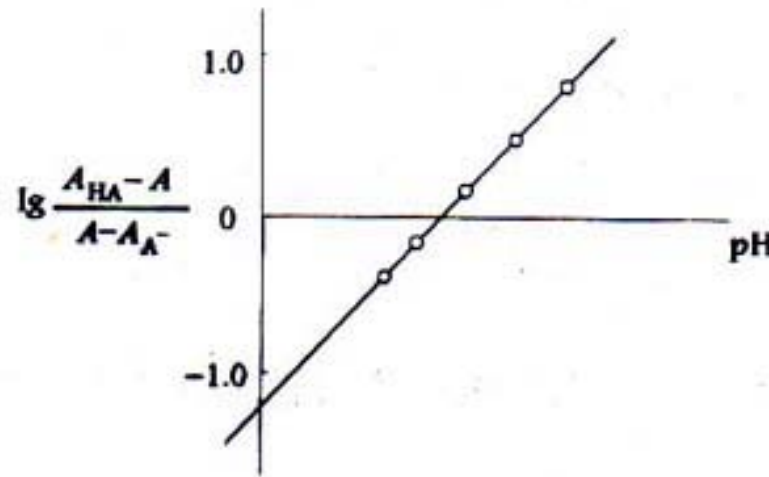
高酸度： $A_{\text{HA}} = \varepsilon_{\text{HA}} \cdot c_{\text{HA}}$

低酸度： $A_{\text{A}^-} = \varepsilon_{\text{A}^-} \cdot c_{\text{A}^-}$

$$A([\text{H}^+] + K_a) = A_{\text{HA}}[\text{H}^+] + A_{\text{A}^-} \cdot K_a$$

$$K_a = \frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{\text{A}^-}} [\text{H}^+] \quad \text{p}K_a = \lg \frac{A - A_{\text{A}^-}}{A_{\text{HA}} - A} + \text{pH}$$

配制一系列 c_{A} 相等，pH 不同的溶液测出 A_{HA} 、 A_{A^-} ，
由实验值计算出 K_a ，或用作图法求 $\text{p}K_a$ 值



<例> 在下列不同pH缓冲溶液中，甲基橙的
 $c=2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $b=1 \text{ cm}$, $\lambda=520 \text{ nm}$, 测得结果如下：

pH	0.88	1.17	2.99	3.41	3.95	4.89	5.50
A	0.890	0.890	0.692	0.552	0.385	0.260	0.260

解： $A_{\text{HA}}=0.890$ $A_{\text{A}^-}=0.260$

$$(\text{pKa})_1 = \frac{0.629 - 0.260}{0.890 - 0.692} + 2.99 = 3.33$$

$$(\text{pKa})_2 = \frac{0.552 - 0.60}{0.890 - 0.552} + 3.41 = 3.35$$

$$(\text{pKa})_3 = \frac{0.385 - 0.260}{0.890 - 0.385} + 3.95 = 3.34$$

$$\overline{\text{pKa}} = 3.34$$

$\lg \frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{\text{A}^-}}$ 对pH作图, 直线与pH轴交点的pH值即为pKa值。

四、络合物的组成和稳定常数的测定

(一) 摩尔比法



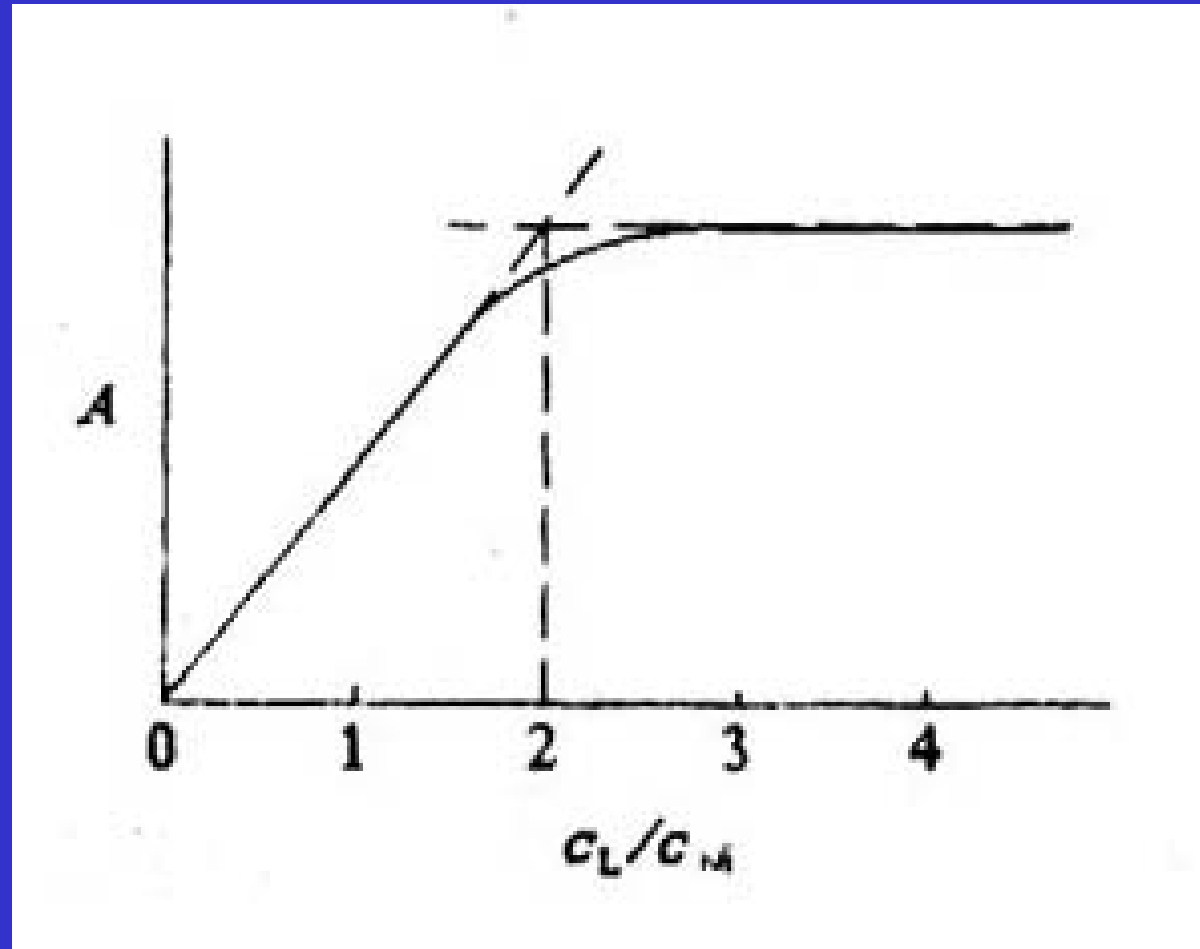
固定 c_M ，改变 c_L 以 $A \sim \frac{c_L}{c_M}$ 作图

1. 组成测定：

斜线部分 当 $\frac{c_L}{c_M} < n$ 时， $A = \varepsilon \cdot b \frac{c_L}{n}$ (M部分络合， c_L 不够)

平台部分 当 $\frac{c_L}{c_M} > n$ 时， $A = \varepsilon \cdot bc_M$ (M全部络合， ML_n 离解忽略)

两直线延长线的交点处对应的横坐标 $\frac{c_L}{c_M} = n$



2. 稳定常数的测定

$$K_{\text{稳}} = \frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}][\text{L}]^n} \quad A = b[\text{ML}_n]$$

$$[\text{M}] = c_{\text{M}} - [\text{ML}_n] = c_{\text{M}} - \frac{A}{\varepsilon \cdot b}$$

$$[\text{L}] = c_{\text{L}} - n[\text{ML}_n] = c_{\text{L}} - n \frac{A}{\varepsilon \cdot b}$$

$$K_{\text{稳}} = \frac{\frac{A}{\varepsilon b}}{\left(c_{\text{M}} - \frac{A}{\varepsilon b}\right) \left(c_{\text{L}} - n \frac{A}{\varepsilon b}\right)^n}$$

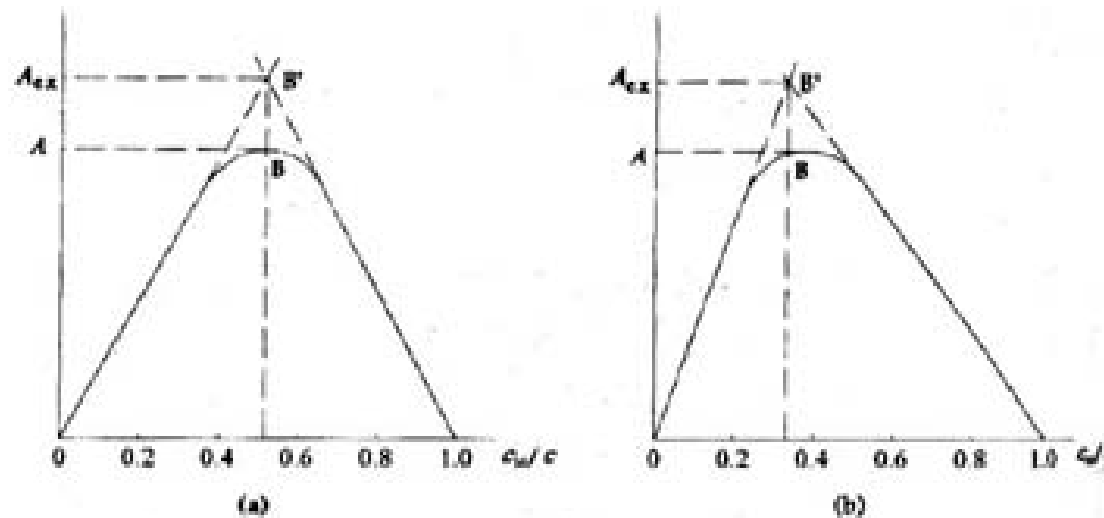
(A为拐点处值)

(二)、等摩尔连续变化法

在 c_M+c_L 为定值的条件下，改变 c_M 、 c_L 的相对比例，配制系统溶液，测其吸光度。

c_M	1	2	3	4	...	9	10
c_L	9	8	7	6	...	1	0

以 $A \sim c_M/c$ 作图：



等摩尔连续变化法曲线

1. 组成的测定

A值最大时对应的比值 $\frac{c_M}{c}$ 即为络合物的组成比。

$\frac{c_M}{c_L} = 0.5$, $\frac{c_M}{c_L} = 1$, 络合物组成为ML

$\frac{c_M}{c_L} = 0.33c$, $\frac{c_M}{c_L} = \frac{0.33}{0.67}$, 络合物组成为ML₂.

2. 稳定常数的测定

$$A = b[\text{ML}_n]$$

$$A_{\text{ex}} = bc_M$$

(A_{ex} 由外推得到, 为ML_n完全不离解时的A值)

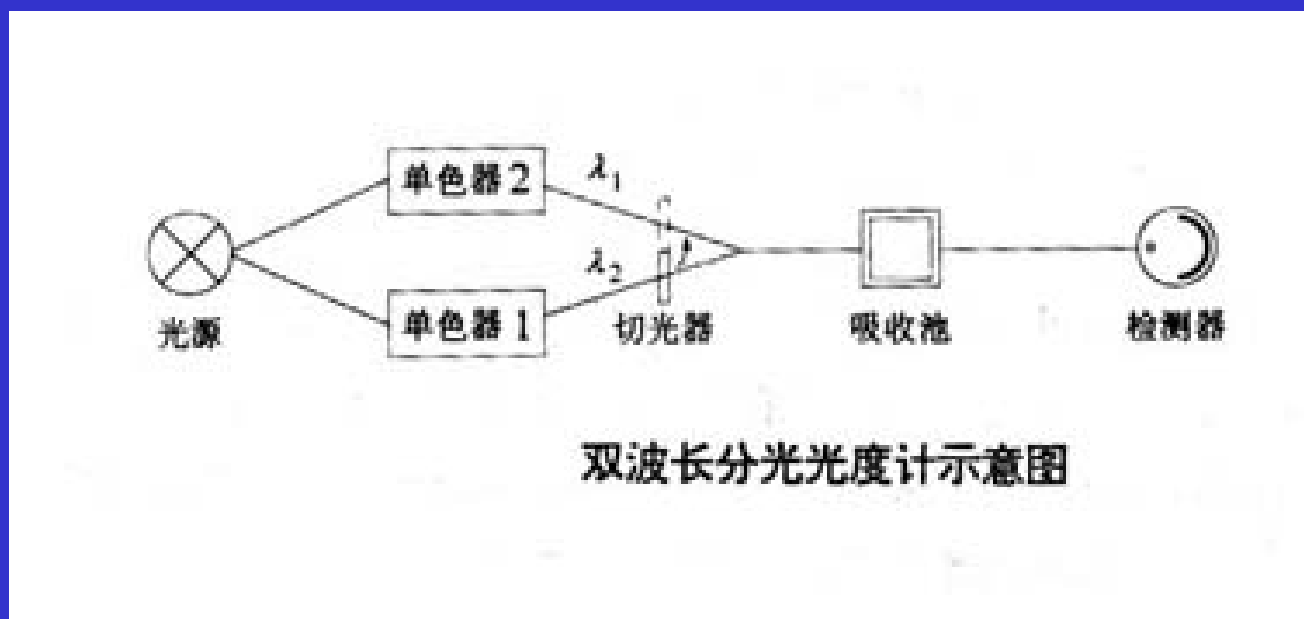
$$\frac{A}{A_{\text{ex}}} = \frac{[\text{ML}_n]}{c_{\text{M}}} \quad [\text{ML}_n] = \frac{A \cdot c_{\text{M}}}{A_{\text{ex}}}$$

$$[\text{M}] = c_{\text{M}} - [\text{ML}_n] = c_{\text{M}} - \frac{A}{A_{\text{ex}}} \cdot c_{\text{M}}$$

$$[\text{L}] = c_{\text{L}} - n[\text{ML}_n] = c_{\text{M}} - n \frac{A}{A_{\text{ex}}} \cdot c_{\text{M}}$$

$$K_{\text{穩}} = \frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}][\text{L}]^n} = \frac{\frac{A}{A_{\text{ex}}} \cdot c_{\text{M}}}{\left(c_{\text{M}} - \frac{A}{A_{\text{ex}}} \cdot c_{\text{M}}\right) \left(c_{\text{L}} - n \frac{A}{A_{\text{ex}}} c_{\text{M}}\right)^n}$$

五、双波长分光光度法



$$A_1 = \epsilon_1 b c_x \quad A_2 = \epsilon_2 b c_x$$

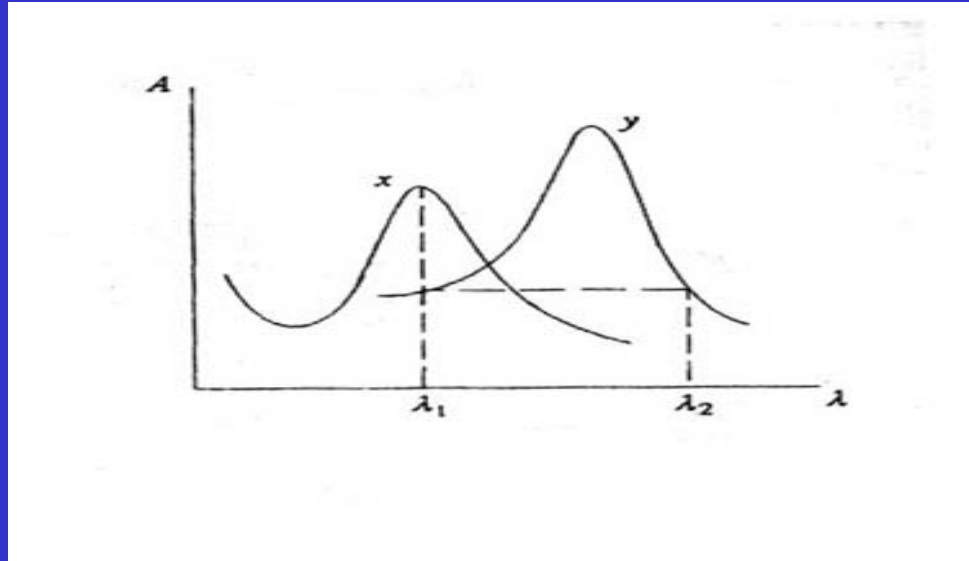
测定的是 A

单一组分：

$$A = A_1 - A_2 = (\epsilon_1 - \epsilon_2) b c_x = \epsilon b c_x$$

A 与 c_x 是线性关系

两组分：x, y



测X：选 λ_1 为测定波长； λ_2 为参比波长

$$A_{\lambda_2} = A_{\lambda_2}^x + A_{\lambda_2}^y$$

$$A_{\lambda_1} = A_{\lambda_1}^x + A_{\lambda_1}^y \quad A_{\lambda_2}^y = A_{\lambda_1}^y$$

双波长光度计，测得的是 A 。

$$A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} = A_{\lambda_1}^x - A_{\lambda_2}^x = (\epsilon_{\lambda_1}^x - \epsilon_{\lambda_2}^x)bc_x$$

A 与 c_x 是线性关系

