

# 第6章 吸光光度法

---

## Spectrophotometry

## 6.1 吸光光度法概述

### 6.1.1 吸光光度法分类及特点

#### 1、分类：

吸光光度法

比色法

紫外吸光光度法

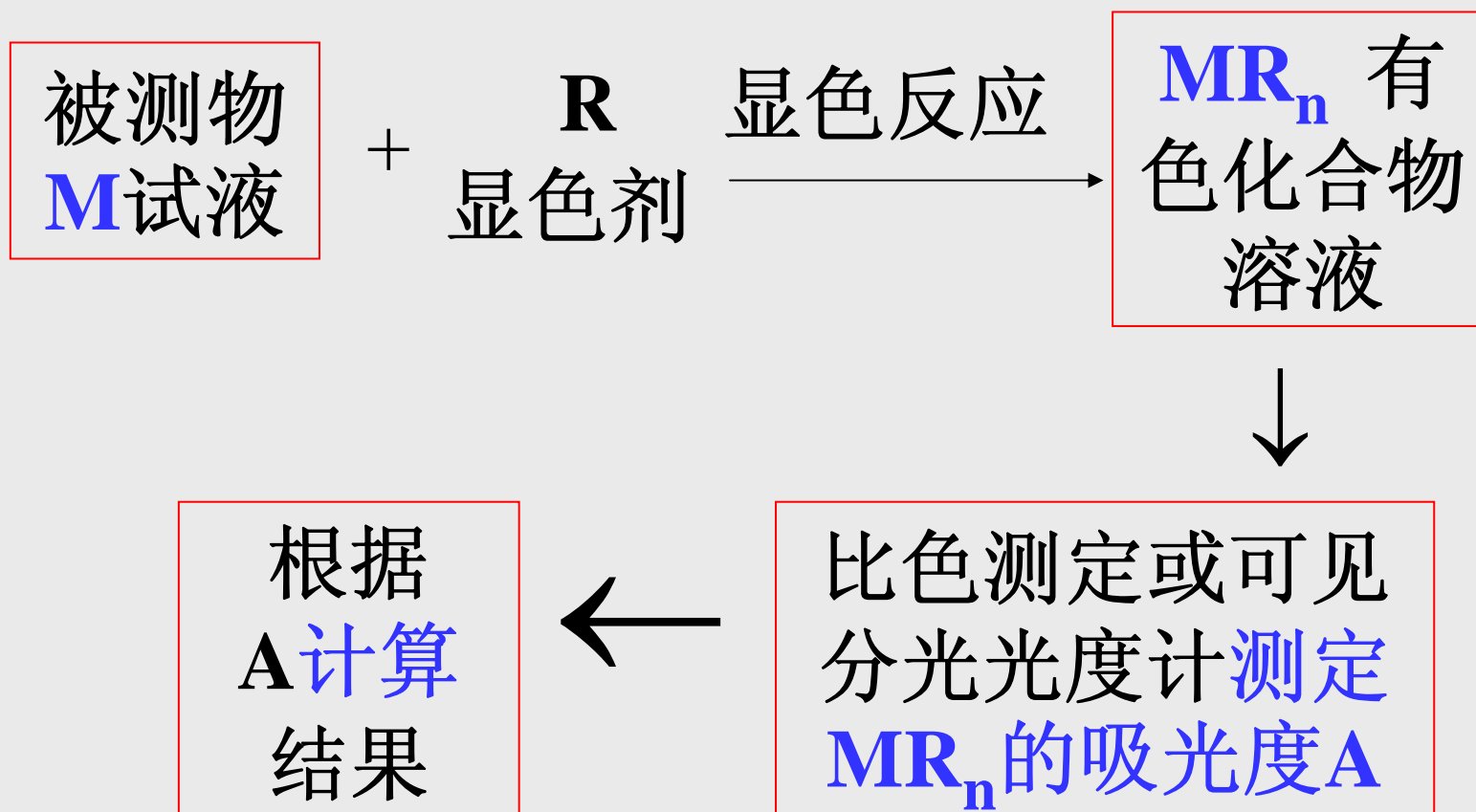
可见吸光光度法

红外光谱法

## 2、特点:

- (1)灵敏度高: 测定含量为  $1\% \sim 10^{-3}\%$  的微量组分及测定含量为  $10^{-4}\% \sim 10^{-5}\%$  的痕量组分。
- (2)准确度较高:  
比色法 相对误差  $5\% \sim 10\%$  ;  
分光光度法 相对误差  $2\% \sim 5\%$  。
- (3)应用广泛, 操作简便、快速。

## 6.1.2 比色法和可见吸光光度法测定过程



## 6.1.3 有色化合物颜色和吸收光谱

### 1、可见光区的各种光：

可见光：

波长大约在 **400 ~ 750 nm**

范围内，人眼能感觉到的光。

由七种色光组成。

## ■ 色 光:

有颜色的光。每种色光具有一定的波长范围，如绿色光：

**500 ~ 560nm,**

黄色光：**580 ~ 600nm 。**

## ■ 单色光:

只具有一种波长的光。

如波长为 **470 nm** 的光就是单色光。

**互补色光与白光：**两种色光如按照一定比例混合，可成为白光，则这两种色光称为互补色光。

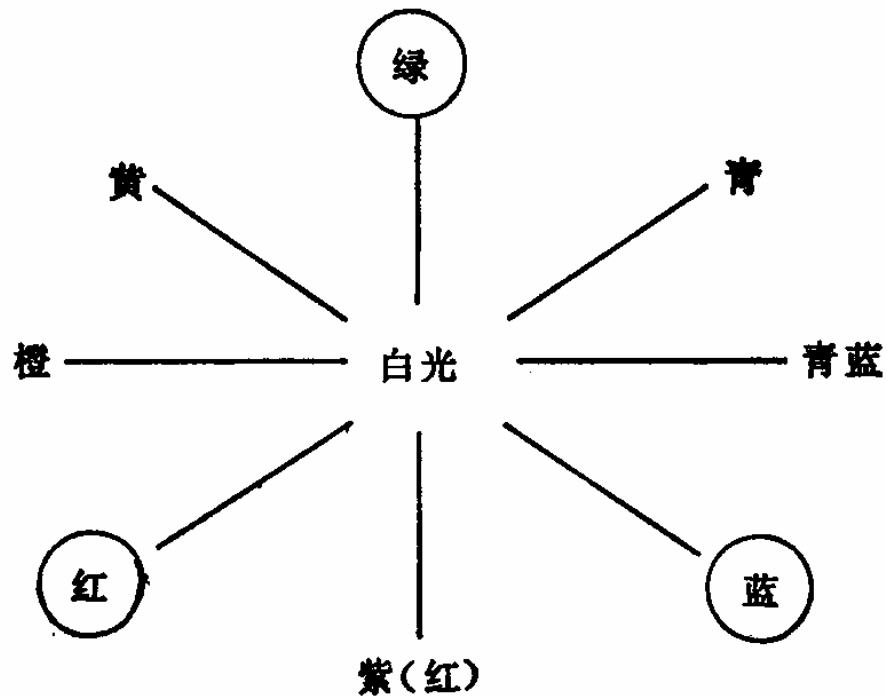


图 18-3 互补色光示意图

## 2、有色化合物溶液的颜色

- 溶液中有色化合物分子中的价电子由于  $d-d$  能级跃迁，可以选择性吸收不同波长的互补色光中的一种色光而让另一种色光透过溶液，被人眼所感觉。故有色化合物的颜色为透过光的颜色。



### 3、有色化合物的吸收光谱：

是分子吸收光谱，即分子中价电子能级跃迁而产生的吸收光谱。

根据  $E = \frac{hc}{\lambda}$  **E**为光量子能量

**c** 为光速，  $\lambda$ 为波长， **h**为普朗克常数

根据

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

由d—d 能级跃迁所需能量  $E$  可计算出有色化合物吸收的光的波长  $\lambda$ 。

由  $\lambda$  的范围可知，

有色化合物的吸收光谱位于可见光部分。

## 4、吸收光谱(absorption spectrum)

曲线或光吸收曲线

(1)定义:

通过测量某种物质对不同波长单色光的吸光度。

然后以波长为横坐标，

吸光度为纵坐标 所绘出的曲线。

# 例如 $\text{KMnO}_4$ 溶液的光吸收曲线

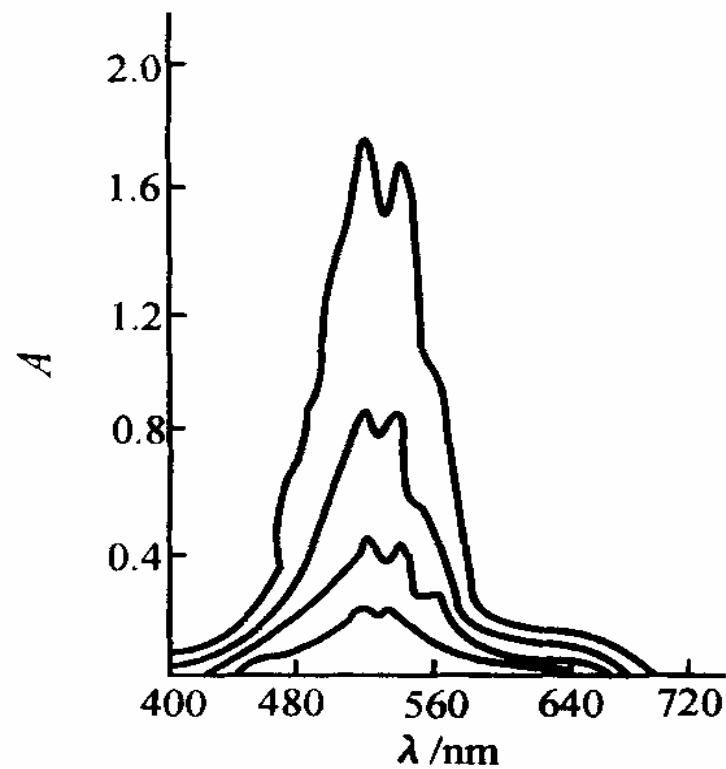


图 6-2  $\text{KMnO}_4$  溶液的光吸收曲线

## (2) 光吸收曲线的用途:

可清楚描述物质对光的吸收情况。

可查找出最大吸收波长(即吸光度最大处的波长), 用于分光光度测定。

最大吸收波长用  $\lambda_{\max}$  表示。

(3)特点：光吸收  
曲线的形状和  
 $\lambda_{\max}$  不随有色  
化合物溶液浓度  
的改变而改变。  
 $\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$   
(绿色光)

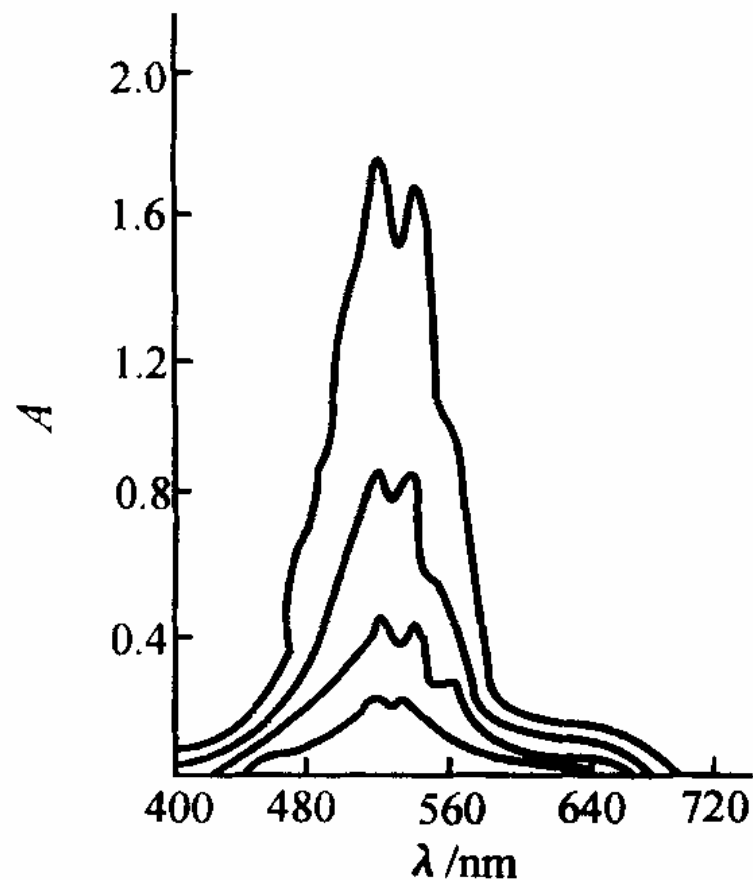


图 6-2  $\text{KMnO}_4$  溶液的光吸收曲线

## 6.1.4 光吸收的基本定律

### 1、朗伯—比尔(Lambert—Beer)定律

#### ①光通过溶液的情况：

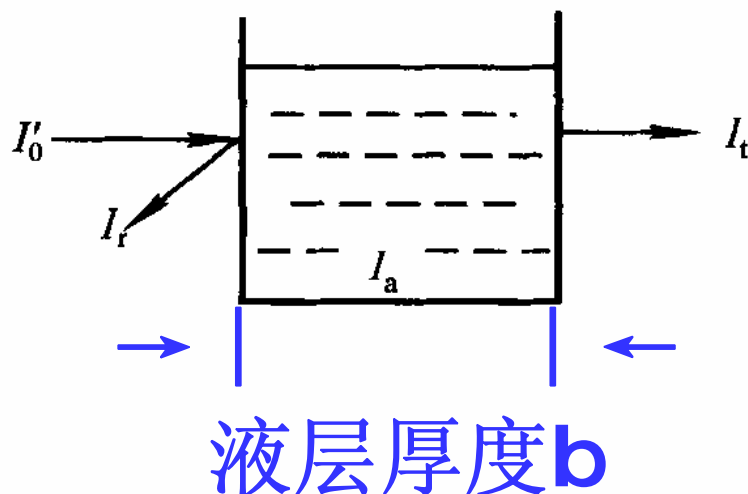


图 6-3 光通过溶液的情况

$I_a$  为吸收光强度

$I_t$  为透过光强度

$I_r$  为反射光强度

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

因为  $I_r$  在测定试样和空白溶液时其影响可相互抵消，故  $I'_o = I_a + I_t + I_r$   
可简化为

$$I_o = I_a + I_t \quad (I_o \text{ 表示入射光强度})$$

②透射比T (Transmittance) 的定义

$$T = \frac{I_t}{I_o} \quad \text{T 用百分数表示大小。}$$

取值：从0 ~ 100%



③吸光度**A** (**Absorbance**) 的定义:

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t}$$

因为  $T = \frac{I_t}{I_0}$  所以  $A = \lg \frac{1}{T} = -\lg T$

<b>T:</b>	<b>0</b>	<b>10%</b>	<b>100%</b>
<b>A:</b>	<b><math>\infty</math></b>	<b>1</b>	<b>0</b>

- 吸光度**A**具有加和性

若溶液中含有多组分有色化合物

$$MR_1, MR_2, \dots \dots MR_n$$

它们都会对同一波长的光有吸收作用。

若各组分的吸光质点彼此不发生作用，  
则溶液的总吸光度

$$A = A_1 + A_2 + \dots \dots + A_n$$

④ **Lambert—Beer** 定律的数学表达式:

$$A = K b c \dots\dots\dots (1)$$

**K**为比例常数,

**b**为液层厚度, **c**为溶液浓度

(1)式表明: 当一束单色光通过含有吸光物质的溶液后, **溶液的吸光度 A 与吸光物质的浓度 c 及吸收层厚度 b 成正比。**

■ 由数学表达式  $A = K b c$

■ 可知  $K$  和  $b$  一定时， $A$  与  $c$  成正比；

已知吸光度  $A$  即可求出浓度  $c$ 。

因此，**Lambert — Beer** 定律是进行定量分析的理论基础。

⑤ Lambert—Beer 定律的**应用式**:

当  $A = K b c$  式中的  $b$  用  $\text{cm}$  为单位,  
 $c$  用  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为单位时,  $K$  用  $\epsilon$  表示;

■ 得  $A = \epsilon b c$   $\epsilon$  称为摩尔吸收系数  
可知  $\epsilon = \frac{A}{bc}$   $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

$\epsilon$  与吸光物质的性质、入射光波长  
及温度等因素有关。

⑥吸光光度分析的灵敏度：

a. 用  $\epsilon$  表示： $\epsilon$  愈大，测定灵敏度愈高；

b. 用桑德尔（Sandell）灵敏度  $S$  表示：

$S$  是指当仪器的检测极限为  $A=0.001$  时，

单位截面积光程内所能检测出来的吸光物质的最低含量。 $S$  的单位为： $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

■ C. **S** 和  $\varepsilon$  的关系:

$$S = \frac{M}{\varepsilon} \quad \mathbf{M} \text{ 为物质的摩尔质量}$$

■ **S** 与  $\varepsilon$  关系式的推导:

根据 **S** 的定义和  $\mathbf{A = \varepsilon b c}$  可得

$$\mathbf{A = 0.001 = \varepsilon b c}$$

因为  $A = 0.001 = \varepsilon b c$

所以 
$$c = \frac{0.001}{\varepsilon b} \quad (1)$$

将单位代入(1)式右端

$$c = \frac{0.001}{b \text{ cm}} \cdot \frac{\text{mol} \cdot \text{cm}}{\varepsilon L} = \frac{0.001}{\varepsilon b} \cdot \frac{\text{mol}}{L}$$



■ 即

$$c = \frac{0.001 \text{ mol}}{\varepsilon b} \cdot \frac{1}{L}$$

根据 **S** 的概念和单位进行变化

$$c = \frac{0.001 \text{ mol}}{\varepsilon b} \cdot \frac{M \text{ g}}{L} \cdot \frac{10^6 \mu \text{ g}}{\text{g}}$$

■ 即 
$$c = \frac{0.001}{\varepsilon b} \cdot M \cdot 10^6 \cdot \frac{\mu g}{L}$$

**S** 的概念:  $\mu g / cm^2$  ( $A = 0.001$ )

所以

$$c = \frac{0.001}{\varepsilon b} \cdot M \cdot 10^6 \cdot \frac{\mu g}{1000 cm^3 / b cm}$$

■ 即 
$$c = \frac{0.001}{\varepsilon b} \cdot M \cdot 10^6 \cdot \frac{\mu g \cdot b \text{ cm}}{1000 \text{ cm}^3}$$

所以 
$$c = \frac{M}{\varepsilon} \mu g / \text{cm}^2 \quad (\mathbf{A=0.001})$$

根据 **S** 的概念,得

$$S = \frac{M}{\varepsilon} \mu g / \text{cm}^2$$

## 6.1.5 吸光光度法及仪器

### 1、可见吸光光度法：

仪器设备：

容量瓶或比色管、分光光度计

方法：标准曲线法

标准曲线法的依据： $A = \epsilon b c$

## 标准曲线:

用标准溶液配制一系列浓度  $c$  (标) 不同的有色化合物溶液, 并测定吸光度  $A$ (标), 然后用  $A$ (标) 对  $c$  (标) 作图,

可得一条过原点的直线. ( $A = \varepsilon b c$ )

该直线称为标准曲线。

标准曲线法示例：测定试液中 $\text{Fe}^{2+}$ 含量。

■ 显色反应为



**phen**为1,10-邻二氮菲

**$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$**  显深红色

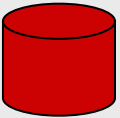
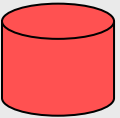
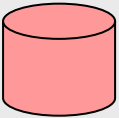
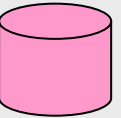
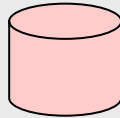
反应条件：**pH 5~6**

■ 标准曲线法示例（接上页）：

① 用 $\text{Fe}^{2+}$ 含量不同的标准溶液配制

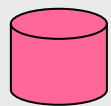
$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ 溶液，

然后于  $\lambda = 510 \text{ nm}$  处测定吸光度 $A(\text{标})$ 。

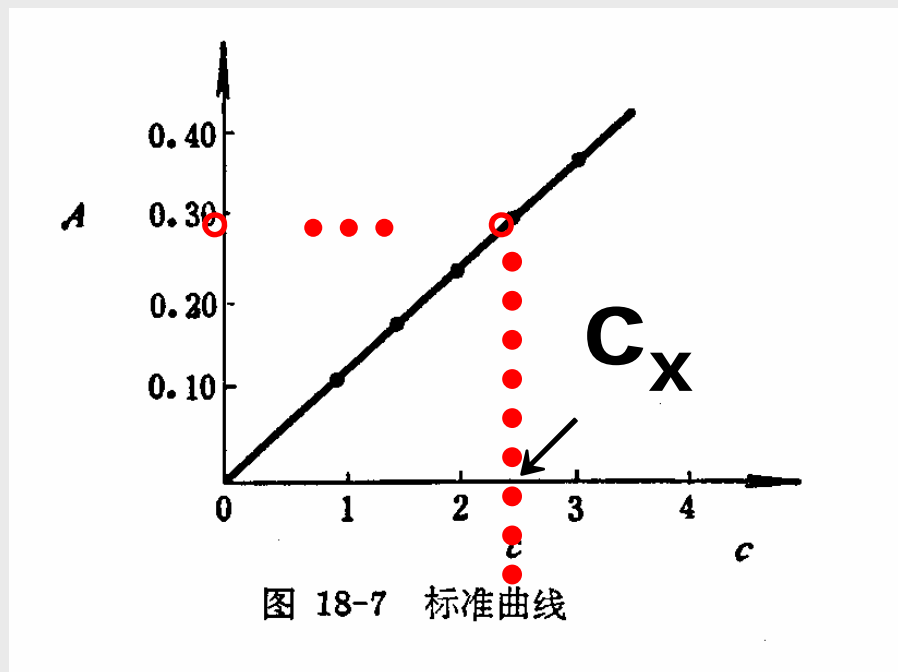
标样					
$\text{Fe}^{2+} (\mu\text{g})$	10	8	6	4	2
吸光度 $A(\text{标})$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$

②根据上述测定值，以 **A** 为纵坐标，浓度 **c** 为横坐标，  
绘制标准曲线。

③用同样方法配置  
试样的有色溶液  
并测定吸光度 **A<sub>x</sub>**。



**A<sub>x</sub>**



④在标准曲线上根据 **A<sub>x</sub>** 查找对应的 **C<sub>x</sub>**。



### 3、分光光度计(spectrophotometers) 的基本部件

(1) 光源: 6~12 V 钨丝灯

(2) 单色器: 棱镜或光栅

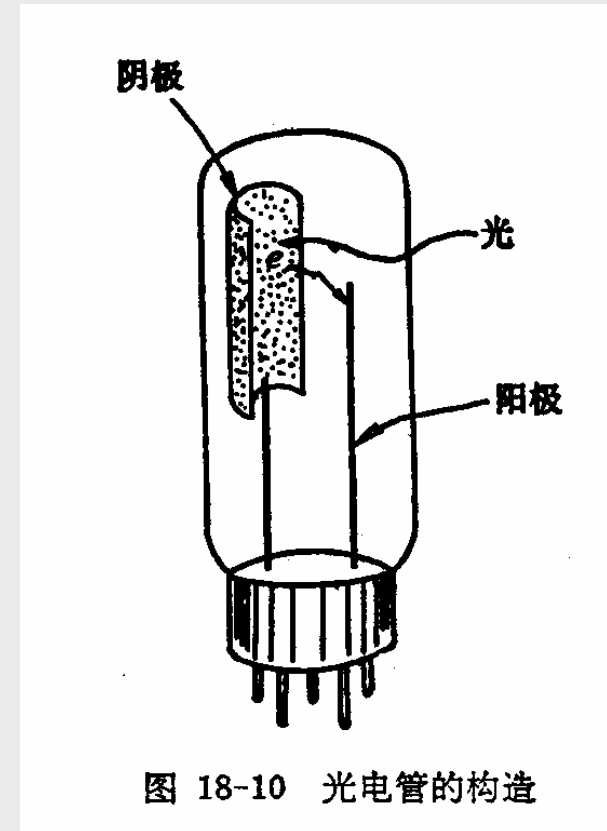
(3) 比色皿: 盛放试液的容器,  
有玻璃和石英两种。  
又称吸收池。

**(4) 检测器:**

光电管或  
光电倍增管。

**(5) 显示装置:**

检流计、微安表、  
数字显示记录仪



## 721 型分光光度计基本部件示意图

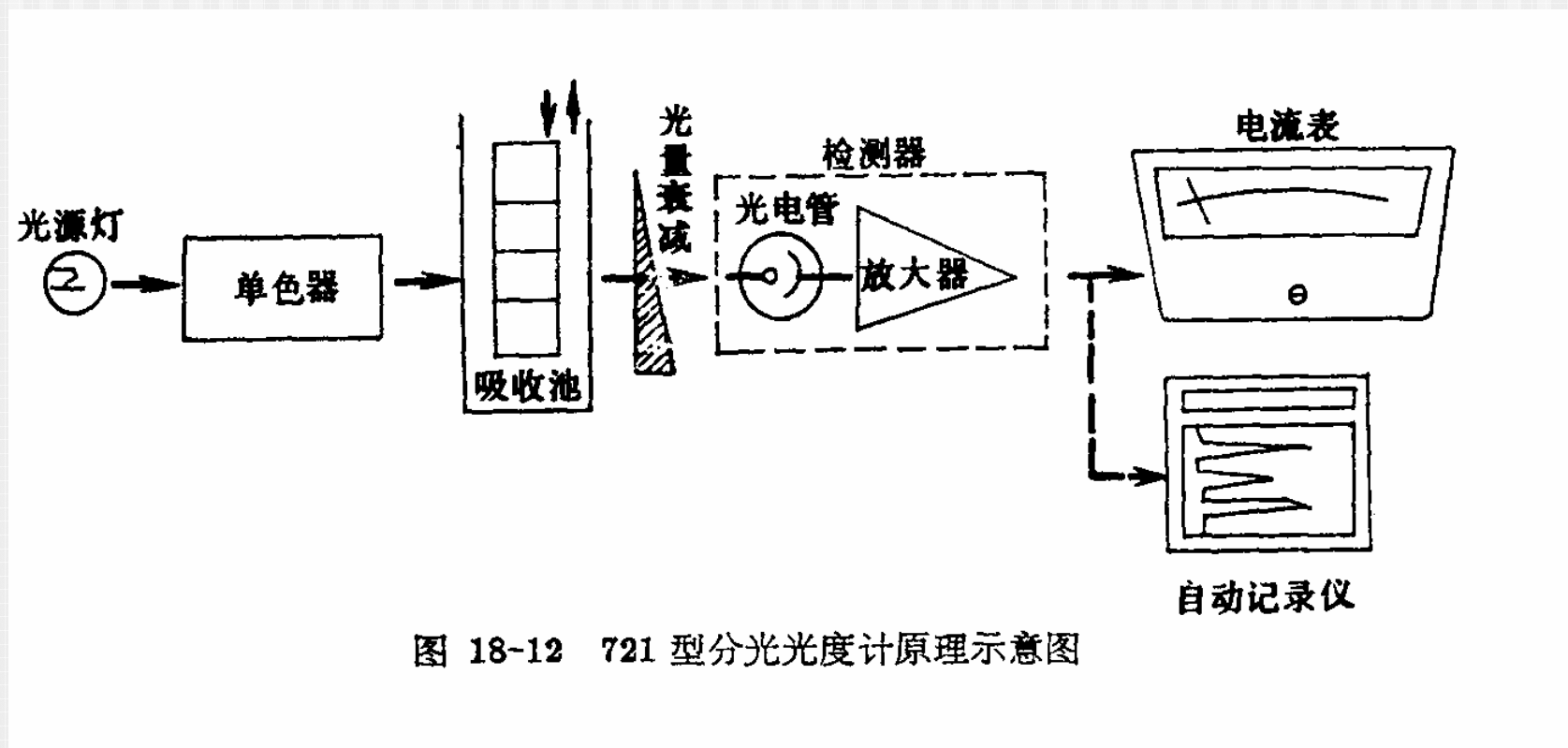


图 18-12 721 型分光光度计原理示意图

## 6.2 光度分析法的设计

### 6.2.1 显色反应

#### 1、显色反应的选择：

显色反应可表示为： $M + n R = MR_n$

**M**:被测物； **R**:显色剂； **MR<sub>n</sub>**:有色化合物

显色反应的类型 { 氧化还原反应  
络合反应(主要类型)

■ 吸光光度法对显色反应的要求

①选择性好；灵敏度足够高， $\varepsilon > 10^4$

②有色化合物的组成恒定；

③有色化合物的化学性质应稳定；

④有色化合物与显色剂的颜色差别要大，

$$\Delta\lambda = \lambda_{\max}(MR_n) - \lambda_{\max}(R) > 60 \text{ nm}$$

## 2、显色剂：

---

### ①无机显色剂：

**KSCN**：测 **Fe**、**Mo**、**W**、**Nb** 等

钼酸铵：测 **P**、**As** 等

过氧化氢：测 **Ti**、**V** 等

## ②有机显色剂:

分子  
结  
构

含有生色团(即含不饱和键的基团)

如偶氮基, 对醌基和羰基等.

含有助色团(含孤对电子的基团)

如氨基、羟基和卤代基等。

## 有机显色剂的种类：

**OO**型螯合剂：如 磺基水杨酸

**NN**型螯合剂：

如 丁二酮肟； **1, 10**—邻二氮菲

含**S**显色剂：如 二苯硫脲

偶氮类螯合剂：偶氮胂**III**（铀试剂  
**III**）

三苯甲烷类螯合剂：铬天青**S**，结晶紫



### 3、多元络合物( $MR_A R_B$ )的种类

#### a. 三元混配络合物:

如  $V(v) - H_2O_2 - PAR$

#### b. 离子缔合物:

$[Ag(phen)_2]^+ \cdot [BPR]^-$

#### c. 金属离子—络合剂—表面活性剂体系

如 稀土元素— $XO$ — $CPB$ 体系

### d. 杂多酸:

磷酸盐  
或硅酸盐  
或砷酸盐

+ 钼酸盐  
(过量) →

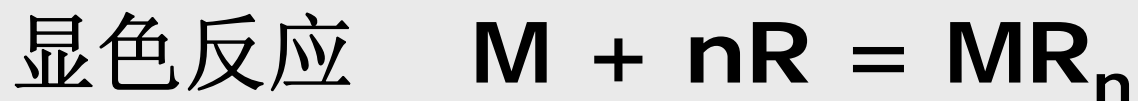
杂多酸  
阴离子

(如  $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$   
12-磷钼酸阴离子)

磷钼蓝  
或硅钼蓝  
或砷钼蓝  
进行光度测定

← 适当酸度 + 还原剂  
如  $\text{SnCl}_2$

## 6.2.2 显色条件的选择



通过实验选择显色反应的显色条件

- 1、溶液的酸度
- 2、显色剂的用量
- 3、显色反应时间
- 4、显色反应温度
- 5、溶剂
- 6、干扰及其消除

## 6.2.3 测量波长和吸光度范围的选择

### 1、测量波长的选择

“最大吸收原则”  
或“吸收最大，  
干扰最小”原则。

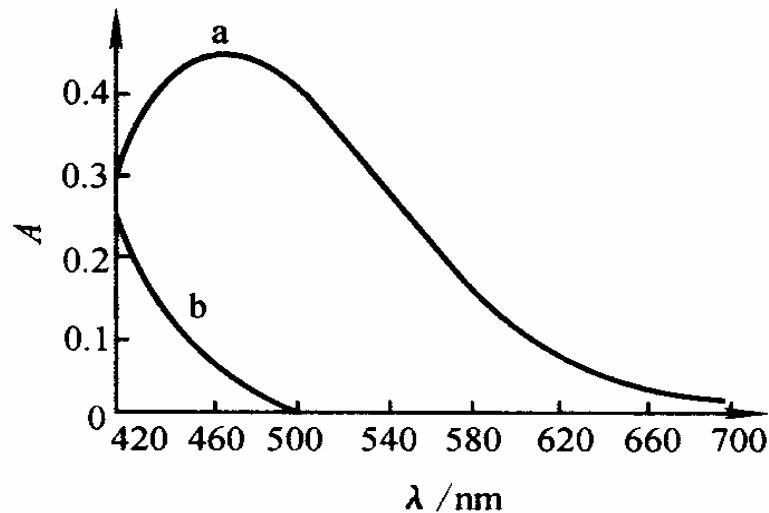


图 6-7 吸收曲线

a. 丁二酮肟镍 b. 酒石酸铁

## 2、吸光度范围的选择

- 一般控制标准溶液和被测试液的吸光度在 **0.2 ~ 0.8** 范围内，才能保证测量的相对误差较小。
- **原因** 浓度测量的相对误差  $E_r$  与透射比  $T$ （或吸光度）有关。

- $E_r$  与透射比  $T$  的关系:

$$E_r = \pm \frac{1}{T \ln T} \%$$

由该式可计算不同  $T$  时的  $|E_r|$  ,  
作  $|E_r| - T$  曲线图。

由图可得适宜的 ( $|E_r| < 3.6\%$ )  
透射比  $T$  和吸光度  $A$  的范围。

## $|E_r| - T$ 曲线图

$|E_r| < 3.6\%$  时

$T: 15\% \sim 65\%$

$A: 0.8 \sim 0.2$

图中曲线最低点

$|E_r| = 2.7\%$  即

$|E_r|$  最小时,

$T = 36.8\%$

或  $A = 0.434$ 。

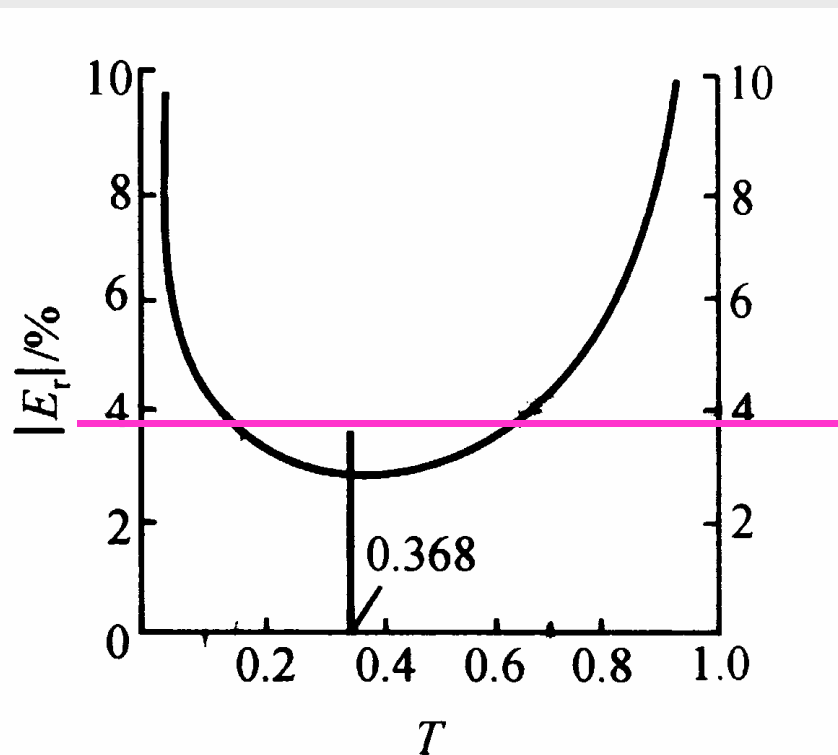


图 6-11  $|E_r| - T$  关系图

## 6.2.4 参比溶液的选择

1、参比溶液：光度测量时用来调节仪器的零点的一种溶液。

2、参比溶液的用途

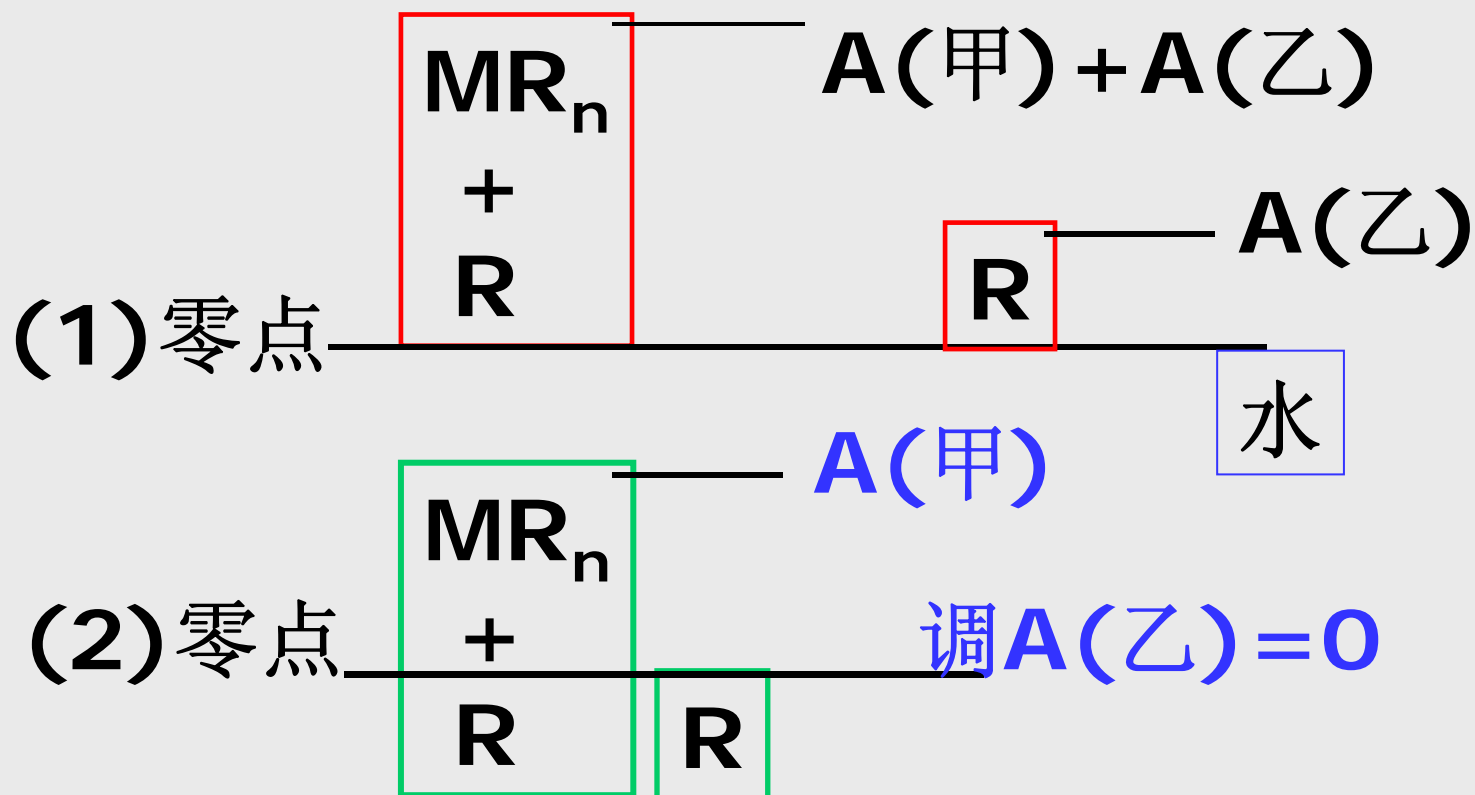
消除由于吸收池壁及溶剂对入射光的反射和吸收带来的误差，并扣除干扰的影响。如参比溶液选择不

当，

会使标准曲线不通过原点。



- 以  $M + nR$  (过量, 乙色) =  $MR_n$  (甲色) 为例, 说明参比溶液的重要性。



### 3、参比溶液的选择方法

试液

显色剂

参比溶液

无色

无色

蒸馏水

有色

无色

不加显色剂的试液

无色

有色

试剂空白

有色

有色

试液 + 掩蔽剂  
(使试液无色) + 显色剂

## 6.3 对朗伯—比尔定律的偏离

### 1、偏离现象：标准曲线不成直线。

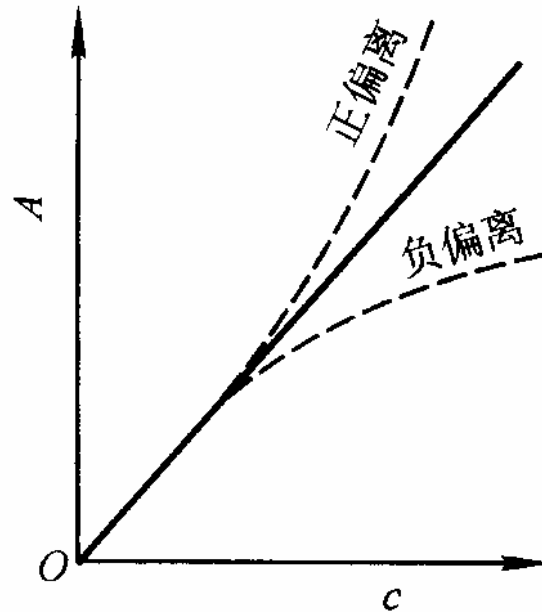


图 6-8 标准曲线及对朗伯—比尔定律的偏离

## 2、偏离原因：（1）非单色光引起的偏离

由于单色器色散能力的限制和出口狭缝需要保持一定的宽度，所以目前各种分光光度计得到的入射光，实际上都是具有某一波段的复合光。

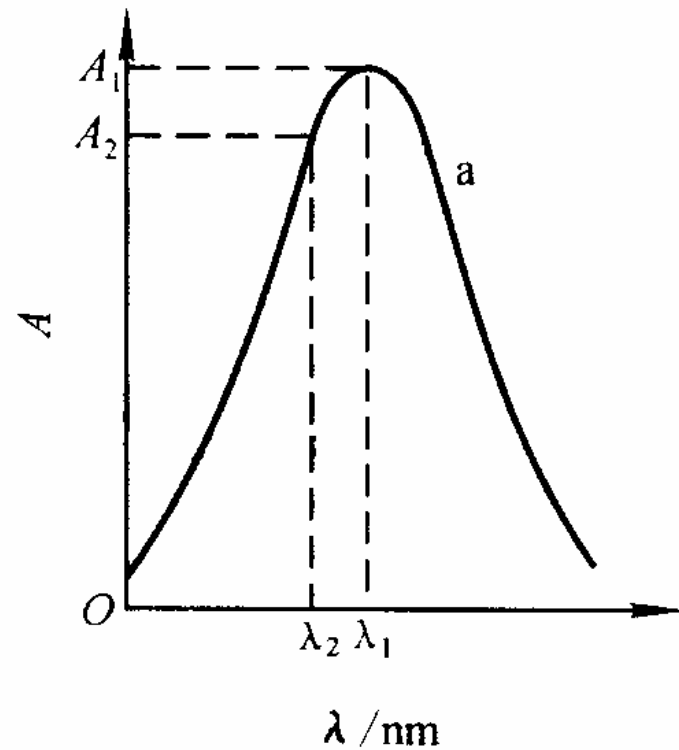


图 6-9 非单色光的影响

## (2) 介质不均匀引起的偏离

如被测溶液不均匀(胶体溶液、乳浊液或悬浮液)，入射光会因散射现象而损失使透射比减少，实测吸光度增加产生正偏离。

## (3) 由于溶液本身的化学反应引起的偏离

溶液中的吸光物质因解离、络合或缔合使浓度发生改变，而使吸光度发生变化所产生的偏离。

## 6.4 其它吸光光度法及 可见吸光光度法的应用

### 6.4.1 示差吸光光度法

#### 1、示差吸光光度法分类

高浓度示差吸光光度法

低浓度示差吸光光度法

精密示差吸光光度法

## 2、高浓度示差吸光光度法与

可见吸光光度法的区别：

在于采用的参比溶液不同

高浓度示差吸光光度法，采用比待测溶液浓度稍低的标准溶液作参比溶液。故可测定高浓度组分。

### 3、示差吸光光度法原理

设用作参比的标准溶液浓度为 $C_0$  (已知),

待测试液浓度为 $C_x$ , 且 $C_x$ 大于 $C_0$ 。

根据**Lambert—Beer**定律:

$$A_x = \varepsilon c_x b \quad A_0 = \varepsilon c_0 b$$

当以标准溶液为参比时

$$A_{\text{相对}} = \Delta A = A_x - A_0 = \varepsilon b (C_x - C_0)$$



即  $A_{\text{相对}} = \Delta A = \varepsilon b(C_x - C_o)$   
 $= \varepsilon b\Delta c = \varepsilon bc_{\text{相对}}$

所以  $\Delta A = \varepsilon b\Delta c$

根据测得的 $\Delta A$ 即可求出相应的 $\Delta C$

因为  $\Delta C = C_x - C_o$

所以待测试液的浓度  $C_x$  为:

$$C_x = C_o + \Delta C$$

## 6.4.2 可见吸光光度法的应用

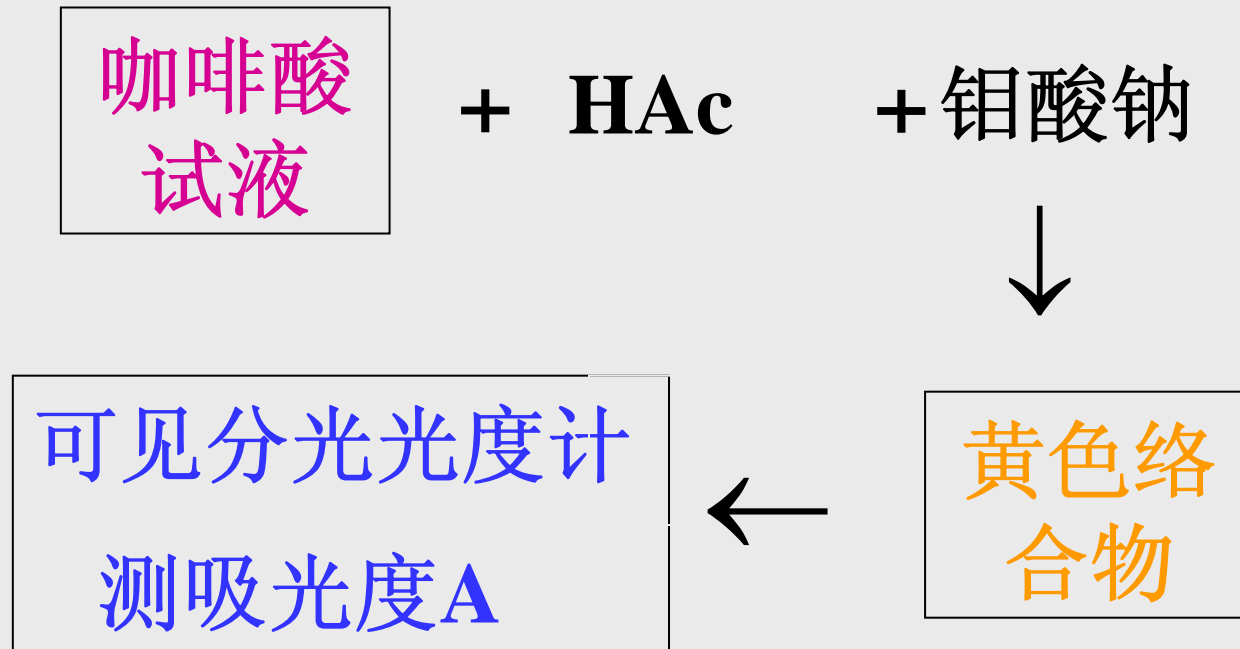
### 1、物质含量的测定

#### (1) 咖啡酸的测定:

咖啡酸是一些药用植物中有止血和升白血球作用的成分。

化学名为**3-(3,4-二羟基苯)丙烯酸**。

## 咖啡酸的测定



在波长420nm处以试剂空白作参比

## (2) 红细胞膜胆固醇含量的测定

胆固醇  
Cholesterol

+  $\text{FeCl}_3 + \text{NH}_3 + \text{HAc} +$   
 $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
(乙酸铁铀试剂)

+  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   
+  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (铁矾)

测吸光度A  
波长560  
nm试剂空  
白作参比

↓  
← 胆固醇—铁络合物(紫色)

### (3) 酪氨酸 (Tyrosine) 含量测定

酪氨酸 +  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  + 苯酚试剂

显色一小时 ↓  $40^\circ\text{C}$

兰色络合物

分光光度计测 **A**  
(波长 **680 nm** , 试剂空白作参比)

## 2、在科学研究中的应用

- 弱酸弱碱解离常数的测定:

根据 
$$pK_a = -\lg \frac{(A_{HB} - A)}{(A - A_{B^-})} + pH$$

- 络合物组成的测定

- (1) 饱和法 (摩尔比法)

- (2) 连续变化法 (等摩尔系列法)

## 第 6 章要点

- 1、了解光吸收曲线的概念及最大吸收波长的概念。
- 2、掌握吸光度与透射比的关系及换算。
- 3、熟练运用朗伯 - 比尔定律求物质的浓度、吸光度等。
- 4、掌握吸光光度法测定中的标准曲线法和选择参比溶液的方法。

## 第 6 章 作业

- P 238 习题 No.3, No. 4, No.5
  - P 239 No. 9(题中‘应该用什么参比溶液’改为‘应该**分别**用什么参比溶液’)
- No. 11
- No. 14(改错：题中‘现称取 0.00500 g某加合物’改为‘现称取 **0.0500** g 某加合物’)

[第7章.ppt](#)