

第6章 吸光光度法

教学目的：掌握光度法的基本原理，了解光度分析条件的控制，分光光度法的应用范围。

教学重点：Beer 定律；光度分析的应用。

教学难点：光吸收原理；光度分析的准确度。

吸光光度法：基于物质对光的选择性吸收而建立起来的分析方法，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。

6.1 概述

6.1.1 吸光光度法的特点

1. 光的基本性质

紫外光：200-400nm 可见光：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：按一定比例混合，能够组成白光的两种光互称为互补色光。见 p216。

溶液呈现的颜色是它吸收光的互补色。

两互补色按一定比例混合后，可得到白色。

2. 吸收光谱产生的原因

由于不同的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。分子能级图，p215，图 6-1。

吸收光谱曲线：A~C 曲线。它反映某溶液对不同单色光的吸收程度，在最大吸收波长处测定吸光度，则灵敏度最高。

a. λ_{\max} 与 c 无关 b. $A \propto c$

6.1.2 光吸收的基本定律

1. 朗伯-比尔定律

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。1852 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，在溶液中即与吸光质点的浓度成正比。

$$\text{吸光度: } A = \lg \frac{I_0}{I} = Kbc \quad \text{透光率: } T = \frac{I}{I_0}$$

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

2. 摩尔吸收系数和桑德尔灵敏度

(1) 摩尔吸收（光）系数 ϵ

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

$$A = \epsilon bc \quad \epsilon: \text{摩尔吸收系数, 只与波长有关. 单位: } \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

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($A=0.2-0.7$)。 ϵ 能反映方法的灵敏度，光度法测定 ϵ ： 10^4 ，一般 $\epsilon: 10^5$ 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测出来的吸光物质的最低含量。

S 与 ϵ 的关系: $A=0.001=\epsilon bc$, $bc=0.001/\epsilon$

$$S=b(\text{cm}) \times c(\text{mol/dm}^3) \times M(\text{g/mol}) \times 10^6 \mu\text{g/g} = \frac{0.001 \times M \times 10^3}{\epsilon} = \frac{M}{\epsilon} (\mu\text{g/cm}^2)$$

<例> Fe^{2+} 与邻二氮菲生成红色络合物, $\epsilon=1.1 \times 10^4$, **灵敏度高**

Fe^{2+} 与磺基水杨酸络合物, $\epsilon=5.8 \times 10^3$,

双硫腙与Pb的 $\epsilon=6.8 \times 10^4$, $S=M/\epsilon=207/6.8 \times 10^4=0.0030(\mu\text{g/cm}^2)$

双硫腙与Cu的 $\epsilon=4.52 \times 10^4$, $S=M/\epsilon=63.5/4.52 \times 10^4=0.0014(\mu\text{g/cm}^2)$ **灵敏度高**

3. 吸光度的加和性

共存的多种吸光物质对同一波长光吸收的光度值分别为 A_1, A_2, \dots, A_n , 则总吸光度为:

$$A=A_1+A_2+\dots+A_n \quad (\text{据此可进行多组分的测定})$$

6.1.3 比色法和吸光光度法及其仪器

1. 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。

特点: 灵敏度高, 准确度低, 不同人看, 结果不同, 不符合朗伯-比尔定律也可用目视比色法, 因为比较的是透过光。

2. 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。

3. 吸光光度法: 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, 后者使用光栅、棱镜, 因而比光电比色法的准确度和选择性好。

4. 分光光度计及其基本部件: 光源—单色器—比色皿(吸收池)—检测器—显示器

(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

a. 滤光片: 有机玻璃片或薄膜, 利用颜色互补原理。

b. 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

c. 光栅: 在玻璃片或金属片上刻划均匀的线, 1200 条/mm, 衍射、干涉原理

(3) 吸收池: 玻璃: 可见, 石英: 紫外、可见

(4) 检测器: 光电转换器件(光电管、光电倍增管, 光电二极管阵列)。利用光电效应, 光照产生光电流, 测定光电流的大小。

(5) 显示器: 检流计: 72 型。数字显示: 722 型。数字打印: UV-240。

6.2 光度分析法的设计

6.2.1 显色反应: 将待测组分转化成有色化合物的反应。 $M+L=ML$

1. 要求: (1) 选择性好; (2) 灵敏度高, $\epsilon > 10^4$; (3) 有色化合物 ML 要稳定, 不分解;

(4) ML 的组成要一定(只 ML 无 ML_n); (5) ML 与 L 颜色差别大, 吸收峰波长差: $\Delta\lambda > 60\text{nm}$ 。

2. 显色剂: 满足以上要求。有机显色剂

6.2.2 显色条件的选择

1. 溶液的酸度: $M+L=ML$ (显色剂 L 存在酸效应 $\alpha_{L(H)}$)

a. 影响显色剂的溶度

b. 影响 M 的存在状态

c. 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	棕褐
8-10	1: 3	黄色

2. 显色剂用量: 显色剂过多有时会引起副反应, 加入量要严格控制, 可通过实验确定。

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。如 $\text{Cu}(\text{SCN})_4^{2-}$ 在水中大部分离解，几乎无色；在丙酮中呈蓝色。
5. 显色时间：通过实验找出适宜的显色时间。
6. 干扰组分：共存组分与显色剂生成有色络合物，正干扰；生成无色络合物，负干扰。
干扰的消除：
- (1) 制一定酸度，使干扰组分不生色。
 - (2) 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) 分离干扰组分

6.2.3 测量波长和吸光度范围的选择

1. 测量波长的选择

(1)“最大吸收原则”：选择被测物质的最大吸收波长的光作为入射光。(无干扰)(2)“吸收最大，干扰最小”：在最大波长处有其他物质干扰时。如图 6-7

2. 吸光度范围的选择：A:0.2-0.8 (T 为 65%-15%) (相对误差较小)

6.2.4 参比溶液的选择

1. M、L 均无色，可用蒸馏水作参比。
2. L 无色，M 有色，可用不加显色剂的被测试液作参比溶液。
3. L 有色，M 无色，可选择不加试样溶液的试剂空白作参比溶液。
4. L、M 均有色，可将一份试液加入适当掩蔽剂，将被测组分掩蔽起来，使之不再与显色剂作用，而显色剂及其他试剂均按试液测定方法加入，以此作为参比溶液。
5. 改变加入试剂的顺序，使被测组分不发生显色反应，可以此溶液作为参比溶液消除于扰。

6.2.5 标准曲线的制作

配制一系列标准溶液，作 A-c 曲线，待测组分的含量可以从标准曲线上查出。

6.3 光度分析法的误差

6.3.1 对朗伯-比尔定律的偏离

1. 非单色光

$$A_1 = \varepsilon_1 bc = \lg \frac{I_{01}}{I_1}, I = 10^{-\varepsilon_1 bc} I_{01} \quad A_2 = \varepsilon_2 bc = \lg \frac{I_{02}}{I_2}, I_2 = 10^{-\varepsilon_2 bc} I_{02}$$

$$A = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2} = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{10^{-\varepsilon_1 bc} I_{01} + 10^{-\varepsilon_2 bc} I_{02}} \quad \text{若 } \varepsilon_1 = \varepsilon_2, \text{ 则 } A = \varepsilon bc, \text{ 若 } \varepsilon_1 \neq \varepsilon_2, \text{ A 与 c 不成线性关系}$$

2. 介质不均匀引起的偏离

3. 由于溶液本身的化学反应引起的偏离。溶液本身离解、缔合、络合

6.3.2 吸光度测量的误差

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 ΔT ，对应的 Δc 不同，相对误差 $\Delta c/c$ 不同。

c 小， ΔT 引起的 Δc 小， $\Delta c/c$ 大； c 大， ΔT 引起的 Δc 大， $\Delta c/c$ 大。

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

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

6.4 其他吸光光度法和光度分析法的应用

6.4.1 示差吸光光度法

1. 原理(高浓度示差吸光光度法)

选用比 c_x 浓度稍小的 c_0 为参比, 调透光率100%, 相当于标尺扩大10倍。

$$\left. \begin{aligned} A_x &= \varepsilon c_x b \\ A_0 &= \varepsilon c_0 b \end{aligned} \right\} \Rightarrow A_{\text{相对}} = \Delta A = A_x - A_0 = \varepsilon b(c_x - c_0) = \varepsilon b \Delta c = \varepsilon b c_{\text{相对}}, \text{定量基础: } \Delta A = \varepsilon b(c_x - c_0) = \varepsilon b \Delta c$$

a. 先做 $\Delta A \sim \Delta c$ 标准曲线; b. 测待测溶液的 ΔA ; c. 从标准曲线查出相应的 Δc ; d. $c_x = c_0 + \Delta c$
 设普通光度法和示差光度法的测量误差为 $x\%$ 普通光度法结果: $c_x \pm c_x \cdot x\%$, 示差光度法结果: $c_x \pm (c_x - c_0) \cdot x\%$

6.4.2 双波长吸光光度法

- 原理: 当没有合适的参比溶液时可选择双波长吸光光度法; 广泛运用于环境试样和生物试样的分析
- 应用: (1) 混浊试液中组分的测定; (2) 单组分的测定; (3) 两组分共存时的分别测定。

6.4.3 酸(碱)离解常数的测定



在某波长 λ 下, 测量溶液吸光度(设酸HB和碱 B^- 均有吸收, 液层厚度 $b=1\text{cm}$)则

$$A = \varepsilon_{HB} [HB] + \varepsilon_{B^-} [B^-] = \varepsilon_{HB} \frac{c_{HB} [H^+]}{K_a + [H^+]} + \varepsilon_{B^-} \frac{c_{HB} K_a}{K_a + [H^+]}$$

$$A_{HB} = \varepsilon_{HB} c, A_{B^-} = \varepsilon_{B^-} c \Rightarrow pK_a = pH - \lg \frac{(A_{HB} - A)}{(A - A_{B^-})}$$

6.4.4 络合物组成的测定

(1) 饱和法(又称摩尔比法)

固定一种组分(通常是金属离子M)的浓度, 改变络合剂(R)的浓度, 得到一系列[R]/[M]比值不同的溶液, 并配制相应的试剂空白作参比液, 分别测定其吸光度。

以吸光度 A 为纵坐标, [R]/[M] 为横坐标作图。

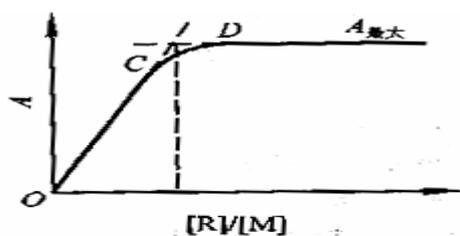


图 6-16 饱和法

(2) 连续变化法(又称等摩尔系列法)

$c_M + c_R = c$, 改变 c_M 和 c_R 的相对量, 配制一系列溶液, 在有色络合物的最大吸收波长处测量这一系列溶液的吸光度。当溶液中络合物 MR_n 浓度最大时, c_R/c_M 比值为 n 。

当 c_M/c 为 0.5 时, 络合比为 1:1;

当 c_M/c 为 0.33, 络合比为 1:2;

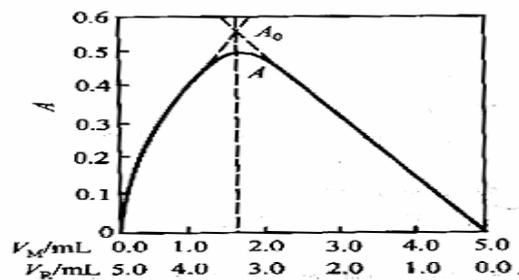


图 6-17 连续变化法

作业: P₂₃₈ 3, 5, 6 P₂₃₉ 8, 11, 12 P₂₄₀ 15, 17, 19