

# 第一节 吸光光度法基本原理

物质在光的照射下呈现其特有的颜色是物质对不同波长的光选择吸收所致。利用物质对光的选择性吸收，不但可以进行定性分析，还可以进行定量分析。在一定波长下，被测溶液对光的吸收程度与溶液中组分的浓度之间存在定量关系，可进行该组分的含量测定，这种定量测定方法称为**吸光光度法**或**分光光度法**。

根据所选用的光的波长区域不同可将光谱分析法分为：

**红外吸收光谱**：分子振动光谱，吸收光波长范围2.5~1000 $\mu\text{m}$ ，主要用于有机化合物结构鉴定。

# 第一节 吸光光度法基本原理

**紫外吸收光谱：**电子跃迁光谱，吸收光波长范围200~400 nm（近紫外区），可用于结构鉴定和定量分析。

**可见吸收光谱：**电子跃迁光谱，吸收光波长范围400~750 nm，主要用于有色物质的定量分析。

吸光光度法的特点是（1）**灵敏度高**，可测下限为 $10^{-5}$ mol/L左右，可用于微量分析。（2）**准确度高**，相对测定误差在2%-5%，能满足微量分析的要求。（3）**操作简便、快速**，应用广泛。

# 第一节 吸光光度法基本原理

**紫外吸收光谱：**电子跃迁光谱，吸收光波长范围200~400 nm（近紫外区），可用于结构鉴定和定量分析。

**可见吸收光谱：**电子跃迁光谱，吸收光波长范围400~750 nm，主要用于有色物质的定量分析。

吸光光度法的特点是（1）**灵敏度高**，可测下限为 $10^{-5}$ mol/L左右，可用于微量分析。（2）**准确度高**，相对测定误差在2%-5%，能满足微量分析的要求。（3）**操作简便、快速**，应用广泛。

# 一、光的选择性吸收

当光通过一透明的物质时，具有某种能量的光子被吸收，而另一些能量的光子则不被吸收，光子是否被物质所吸收，既决定于物质的内部结构，也决定于光子的能量。

物质的颜色是由于物质对不同波长的光具有选择性吸收而产生的。

物质的颜色显示其吸收光的互补色。

# 一、光的选择性吸收

当光通过一透明的物质时，具有某种能量的光子被吸收，而另一些能量的光子则不被吸收，光子是否被物质所吸收，既决定于物质的内部结构，也决定于光子的能量。

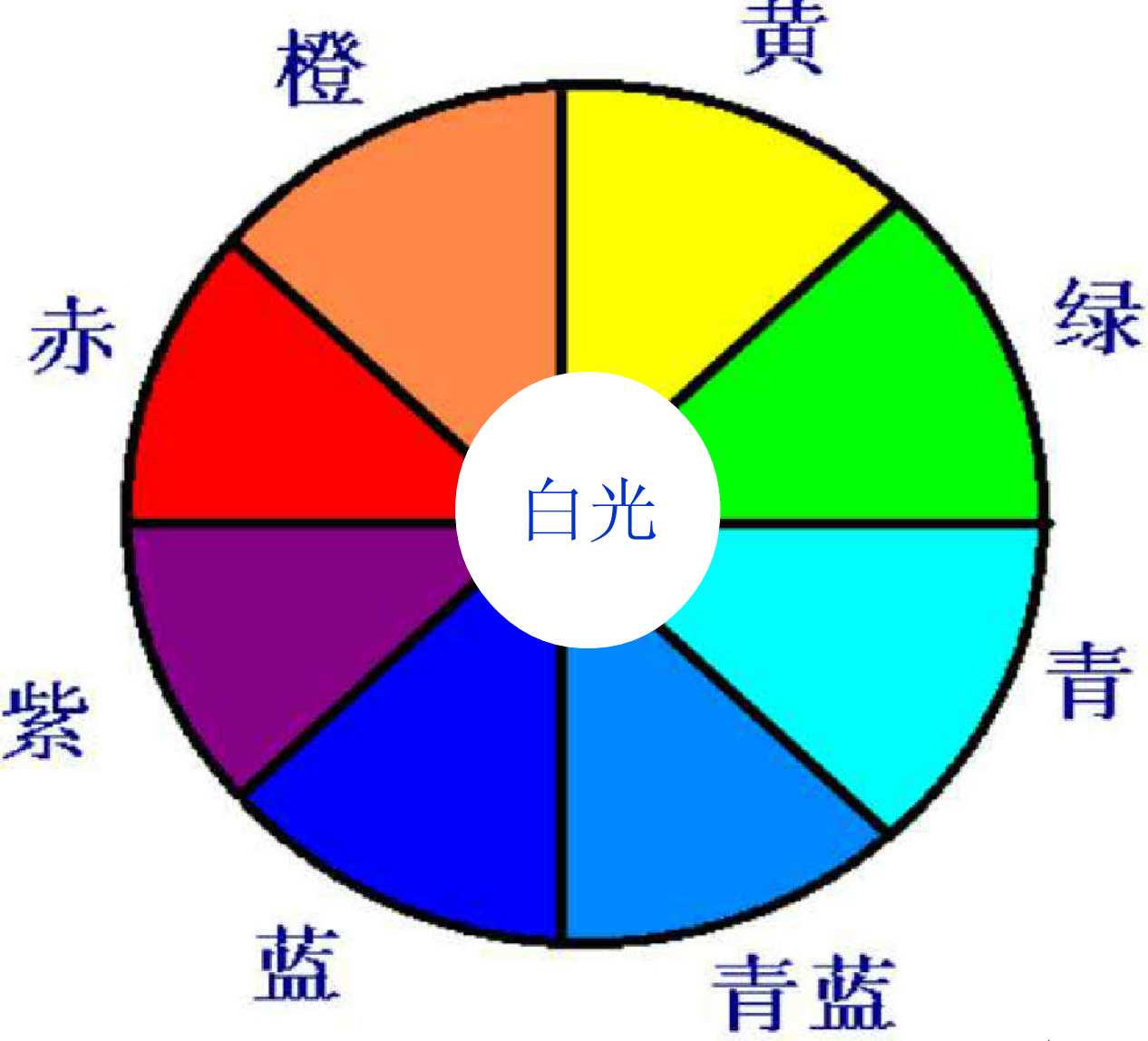
物质的颜色是由于物质对不同波长的光具有选择性吸收而产生的。

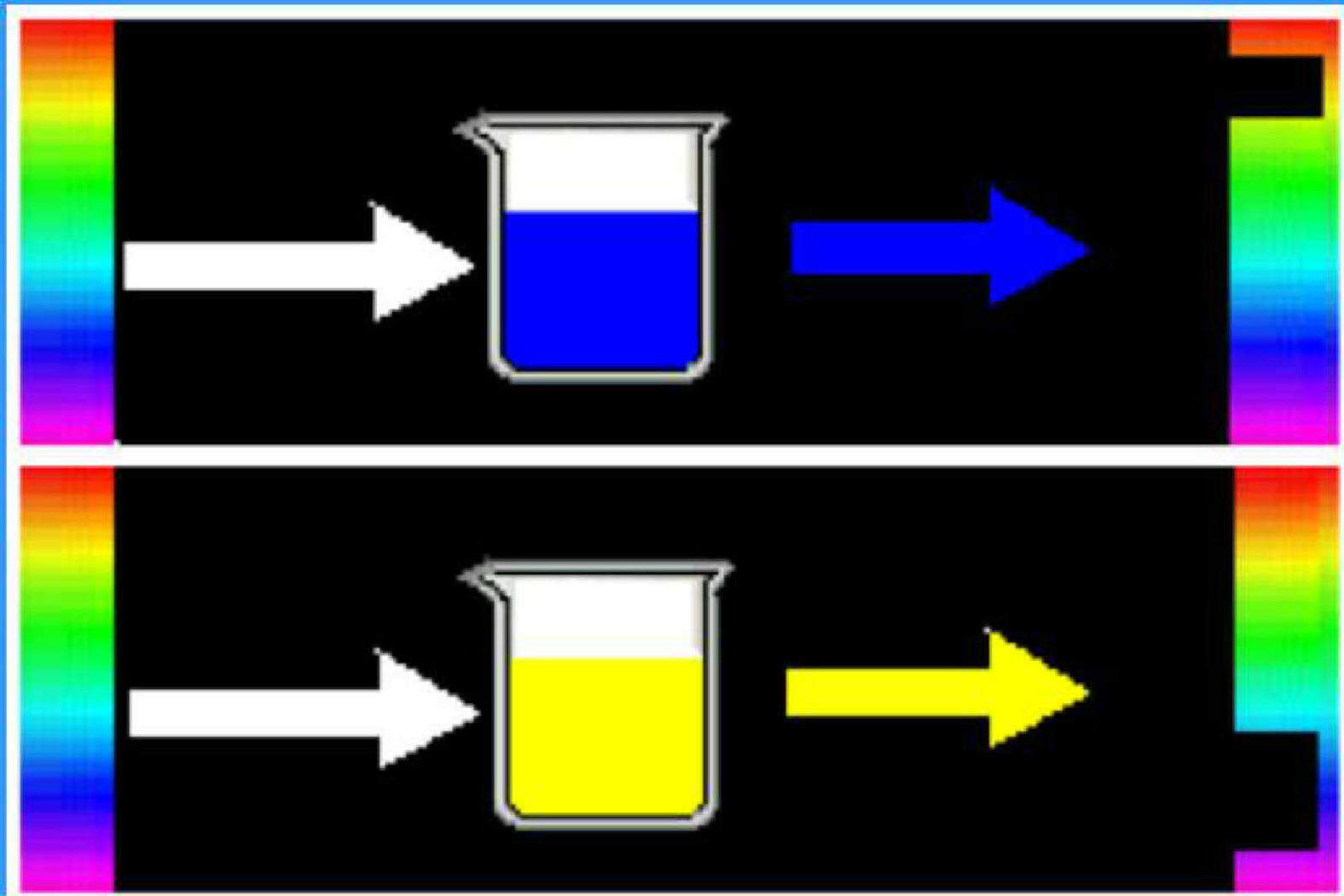
物质的颜色显示其吸收光的互补色。

互补色光示意图

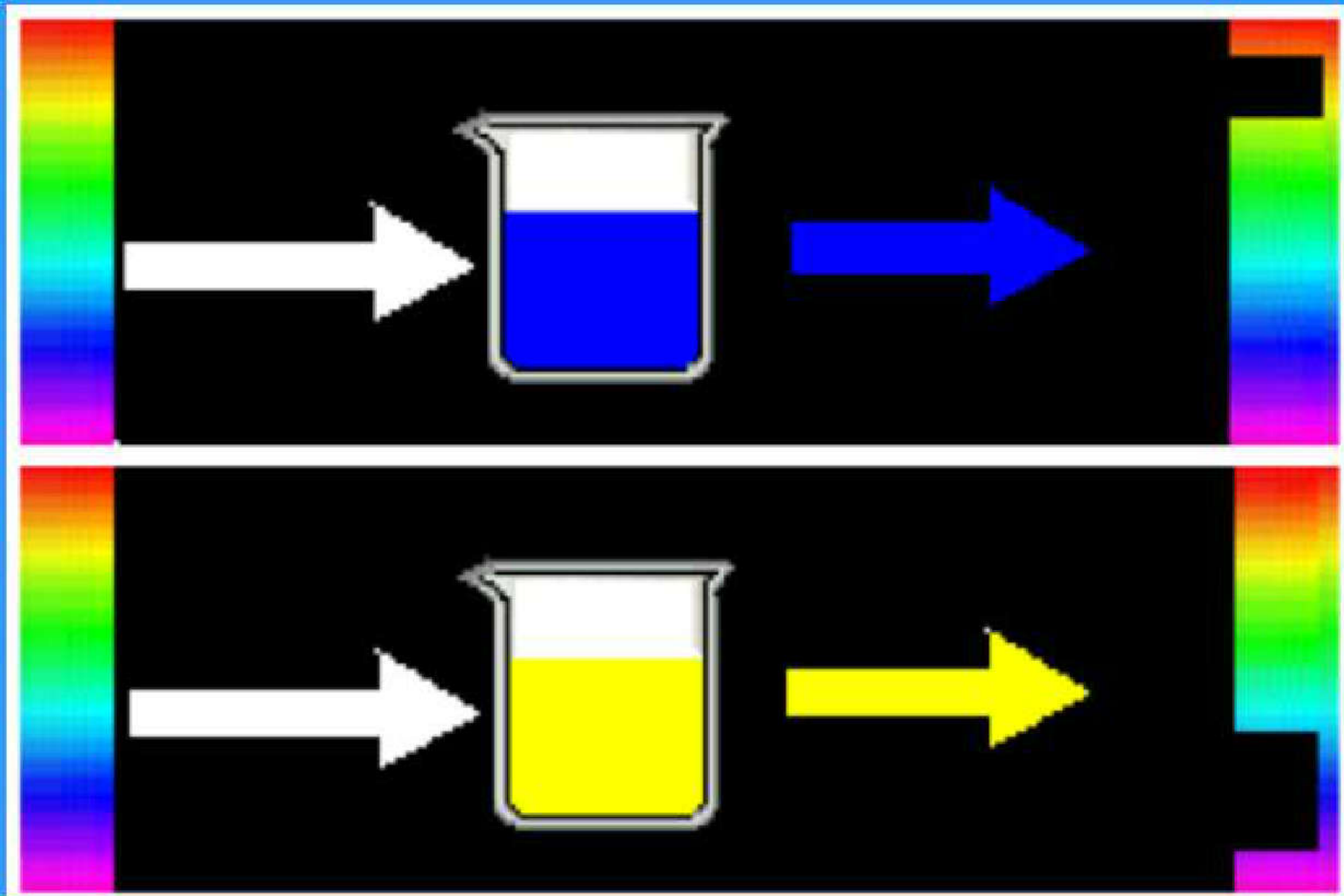


互补色光示意图









表一

物质的颜色与吸收光颜色的互补关系

物质颜色	吸收光	
	颜色	波长 $\mu\text{m}$
黄绿	紫	400-450
黄	蓝	450-480
橙	绿蓝	480~490
红	蓝绿	490-500
紫红	绿	500-560
紫	黄绿	560-580
蓝	黄	580-600
绿蓝	橙	600-650
蓝绿	红	650-750

表一

物质的颜色与吸收光颜色的互补关系

物质颜色	吸收光	
	颜色	波长 $\mu\text{m}$
黄绿	紫	400-450
黄	蓝	450-480
橙	绿蓝	480~490
红	蓝绿	490-500
紫红	绿	500-560
紫	黄绿	560-580
蓝	黄	580-600
绿蓝	橙	600-650
蓝绿	红	650-750

## 二、光的吸收曲线

用不同波长的单色光照射某一物质，测定其吸光度 $A$ ，以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制曲线，用以描述物质对不同波长光的吸收能力。从中发现物质能够产生最大吸收的光的波长。

$$A \sim \lambda (\text{nm})$$

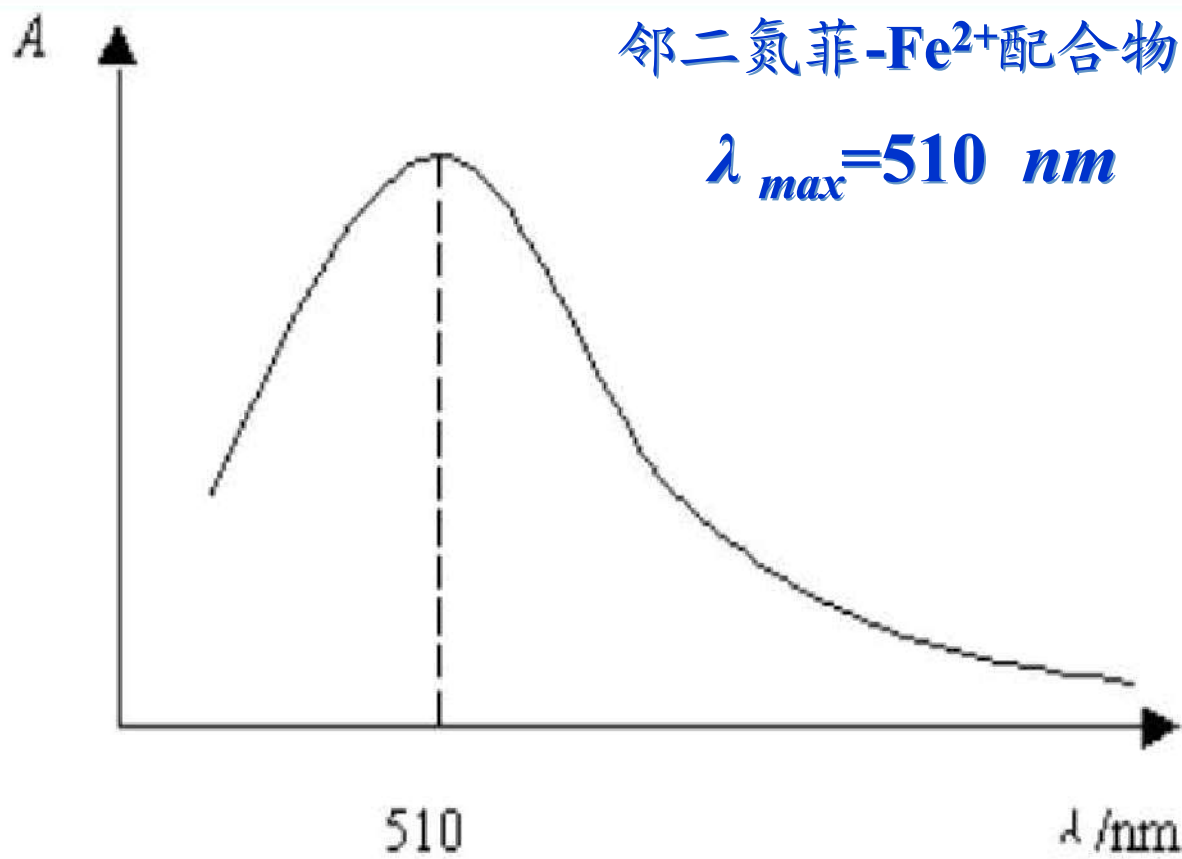
## 二、光的吸收曲线

用不同波长的单色光照射某一物质，测定其吸光度 $A$ ，以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制曲线，用以描述物质对不同波长光的吸收能力。从中发现物质能够产生最大吸收的光的波长。

$$A \sim \lambda (\text{nm})$$

邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>配合物

$\lambda_{max} = 510 \text{ nm}$

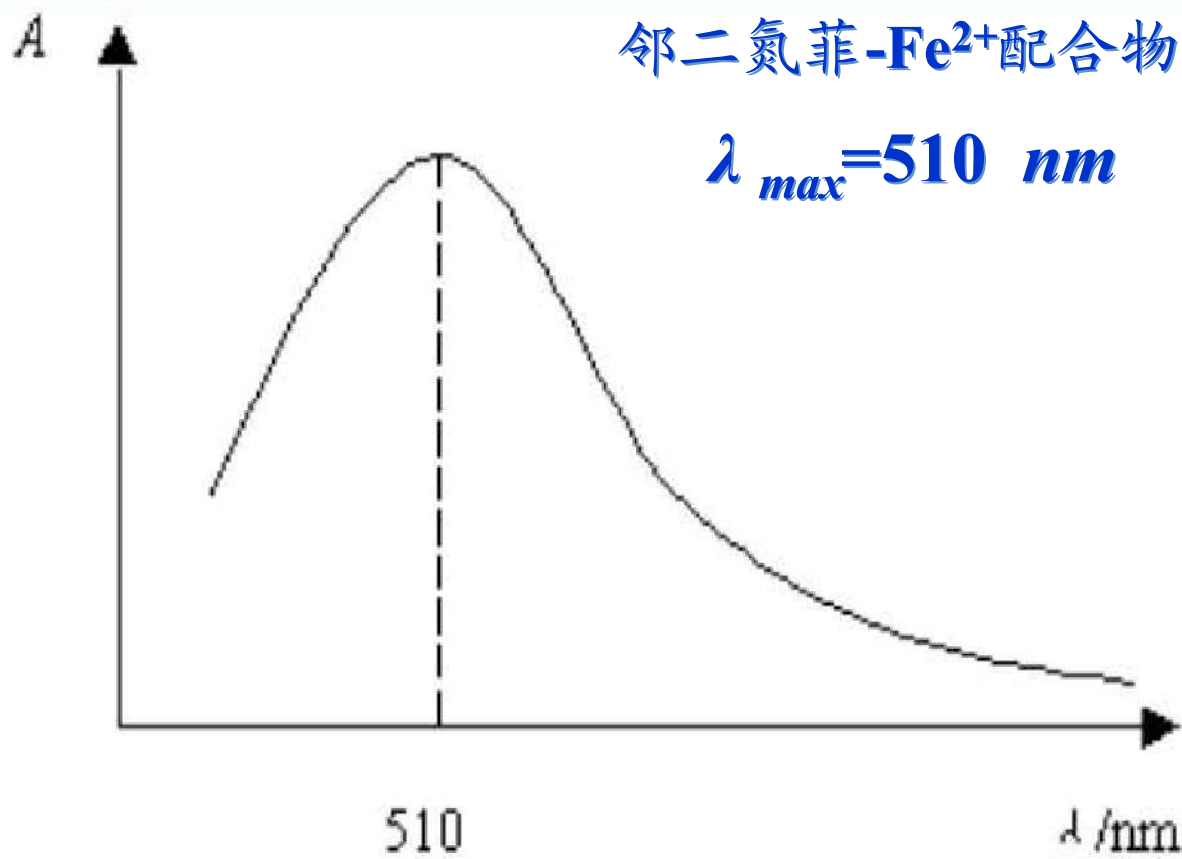


吸  
收  
曲  
线



邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>配合物

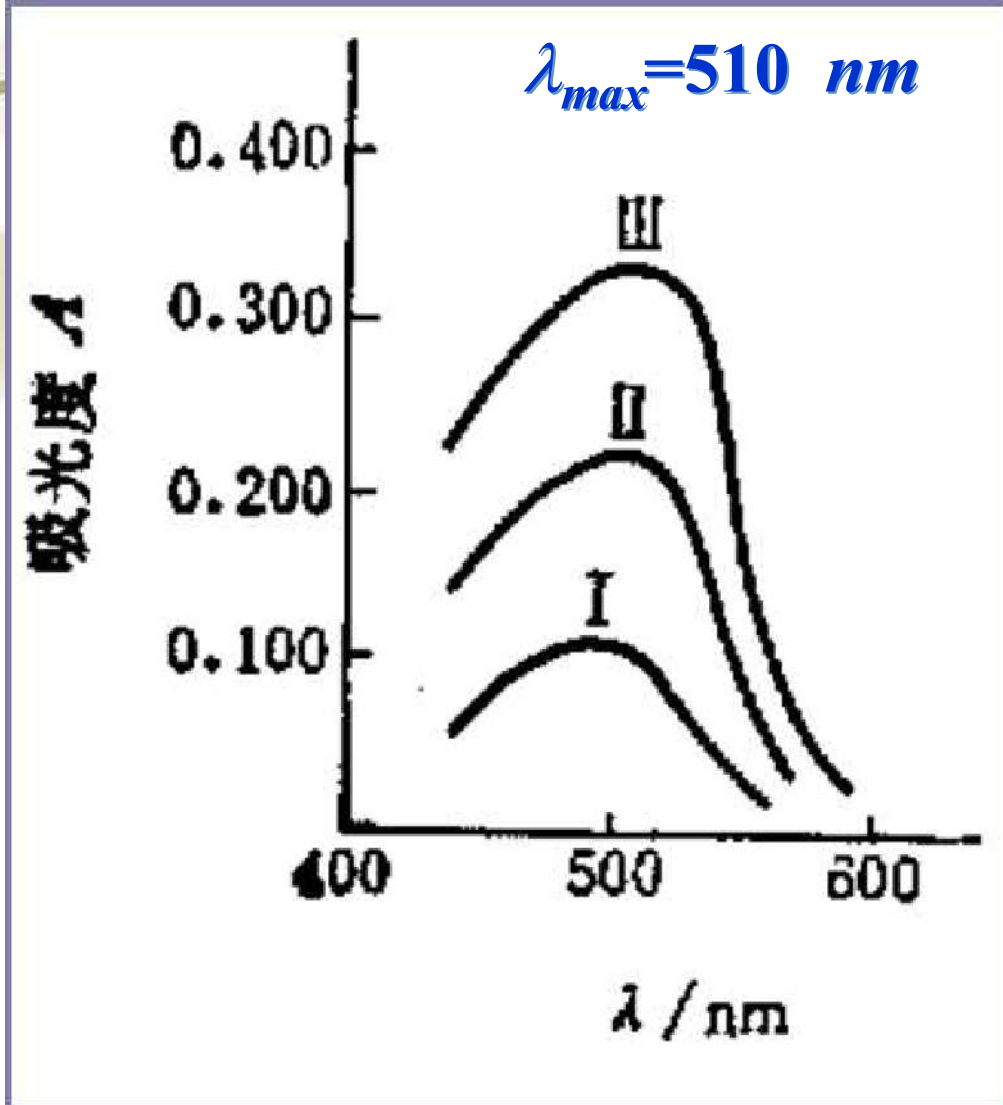
$\lambda_{max} = 510 \text{ nm}$



吸  
收  
曲  
线

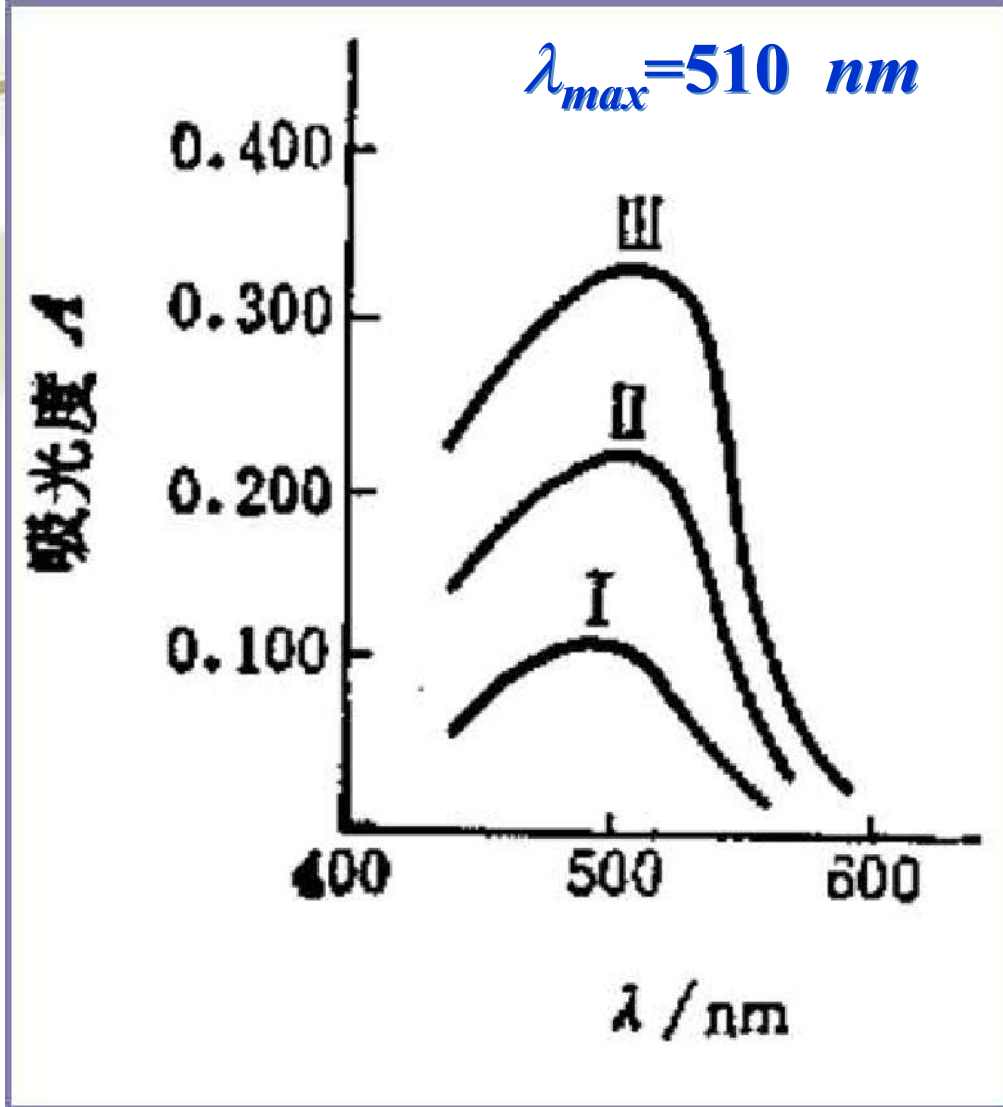


吸  
收  
曲  
线





吸  
收  
曲  
线



A

$\lambda_{max} = 525 \text{ nm}$

$\text{MnO}_4^-$

400 420 440 460 480 500 520 540 560 580 600  $\lambda$

A

$\lambda_{max} = 525 \text{ nm}$

$\text{MnO}_4^-$

400 420 440 460 480 500 520 540 560 580 600  $\lambda$

## 吸收曲线的讨论:

(1) 同一种物质对不同波长光的吸光度不同。吸光度最大处对应的波长称为最大吸收波长 $\lambda_{max}$ 。

在 $\lambda_{max}$ 处吸光度随浓度变化的幅度最大，所以测定最灵敏。

吸收曲线是定量分析中选择入射光波长的重要依据。

## 吸收曲线的讨论:

(1) 同一种物质对不同波长光的吸光度不同。吸光度最大处对应的波长称为最大吸收波长 $\lambda_{max}$ 。

在 $\lambda_{max}$ 处吸光度随浓度变化的幅度最大，所以测定最灵敏。

吸收曲线是定量分析中选择入射光波长的重要依据。

(2) 不同浓度的同一种物质，其吸收曲线形状相似， $\lambda_{max}$  不变。而对于不同物质，它们的吸收曲线形状和  $\lambda_{max}$  则不同。

吸收曲线可以提供物质的结构信息，并作为物质定性分析的依据之一。

(3) 从吸收曲线形状可以解释物质的颜色。物质的颜色与吸收光颜色互为补色。

(2) 不同浓度的同一种物质，其吸收曲线形状相似， $\lambda_{max}$  不变。而对于不同物质，它们的吸收曲线形状和  $\lambda_{max}$  则不同。

吸收曲线可以提供物质的结构信息，并作为物质定性分析的依据之一。

(3) 从吸收曲线形状可以解释物质的颜色。物质的颜色与吸收光颜色互为补色。

# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

物质吸光的定量依据为Lambert - Beer定律，表明物质对**单色光**吸收的强度与溶液的浓度和液层厚度的定量关系。

$$A = \lg (I_0/I) = K b c$$

$$A = \lg (I_0/I) = \varepsilon b c$$

$$\text{或: } A = \lg (I_0/I) = a b c$$

**A**: 吸光度;  **$I_0$** : 入射光强度; **I**: 透射光强度;

**b**: 液层厚度(光程长度), 通常以cm为单位;

**$\varepsilon$** : 摩尔吸光系数, 单位 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;

**c**: 溶液的浓度c单位 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

**a**: 吸光系数, 单位 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; 溶液的浓度c单位 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

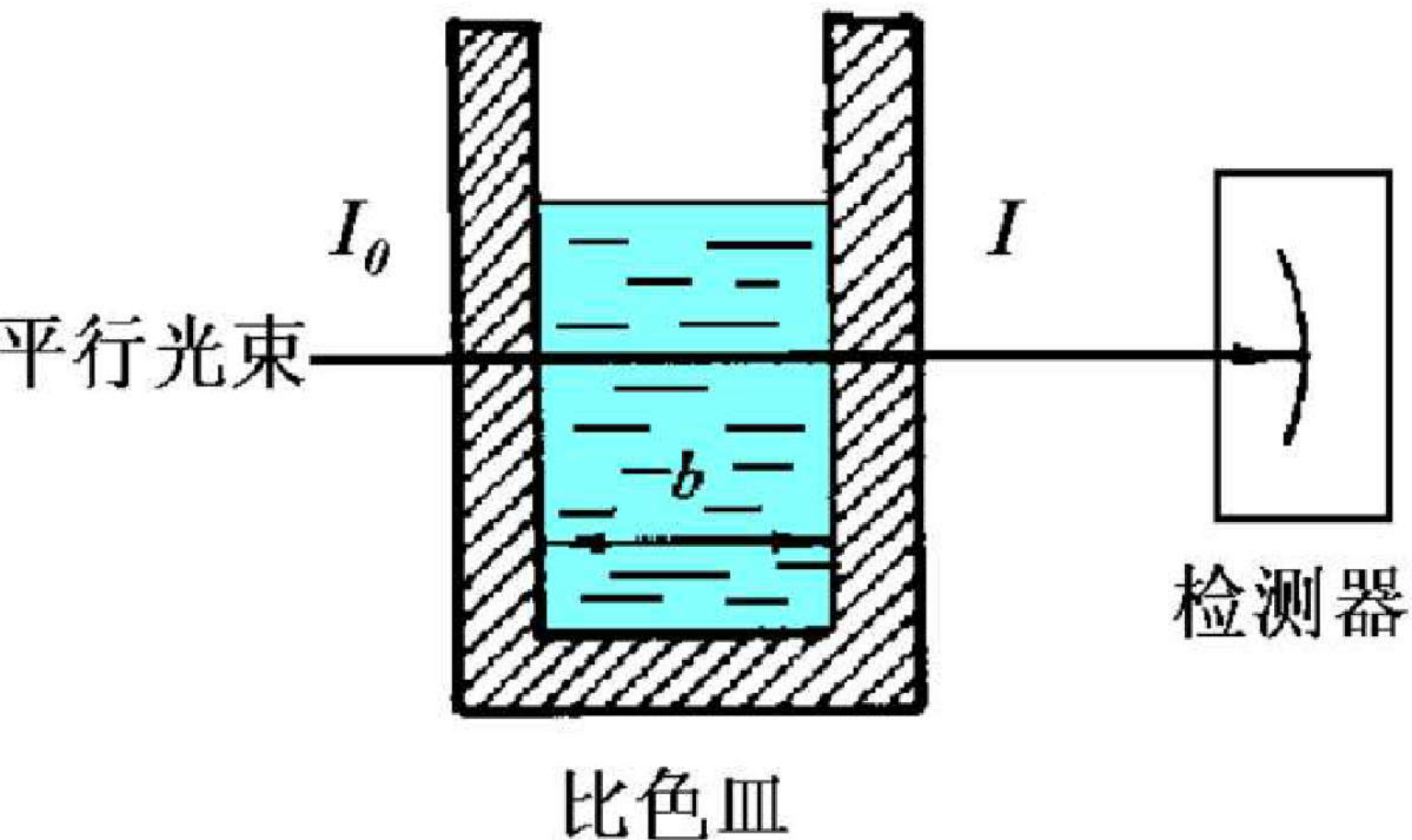
物质吸光的定量依据为Lambert - Beer定律，表明物质对**单色光**吸收的强度与溶液的浓度和液层厚度的定量关系。

$$A = \lg (I_0/I) = K b c$$

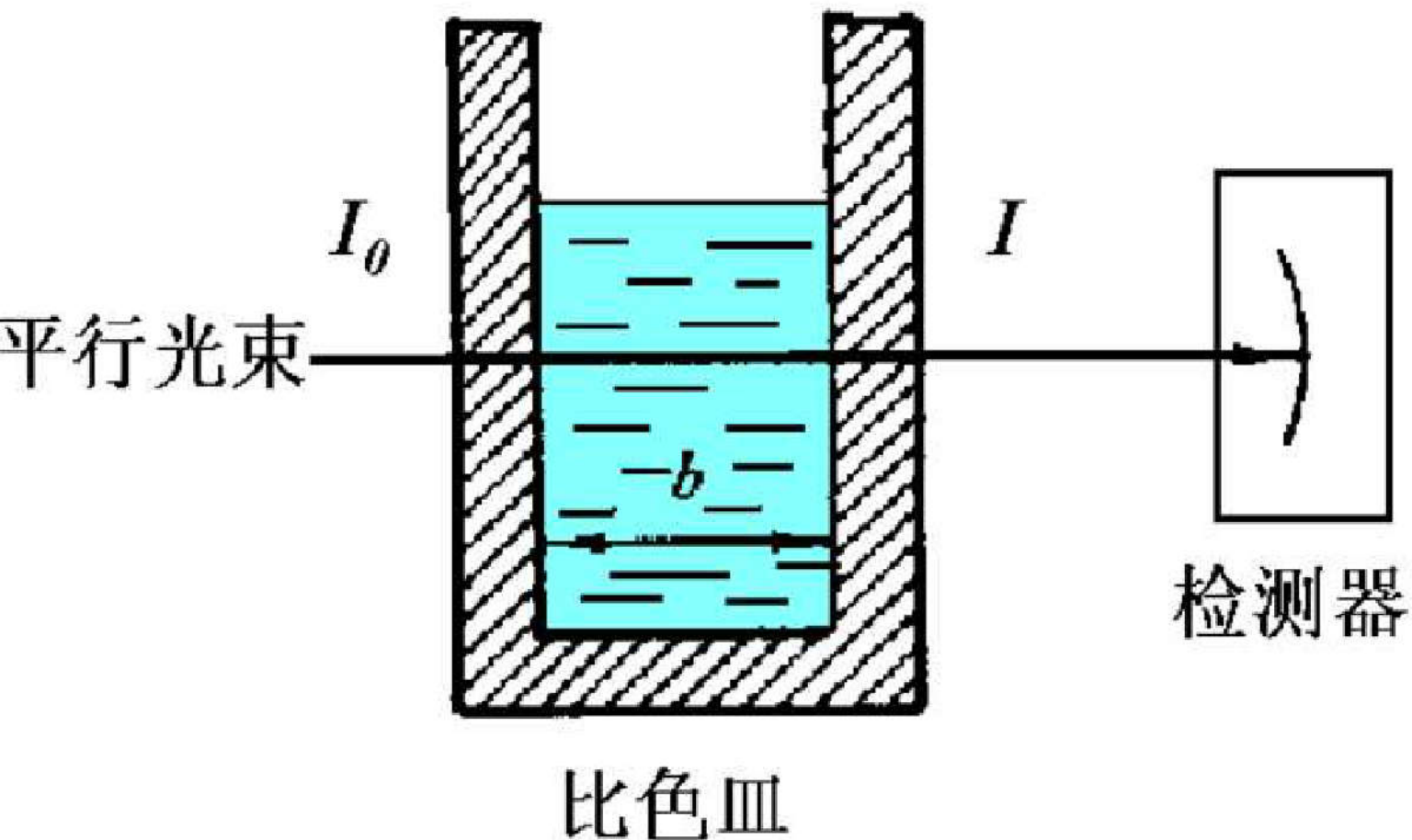
$$A = \lg (I_0/I) = \varepsilon b c$$

$$\text{或: } A = \lg (I_0/I) = a b c$$

- A**: 吸光度;  **$I_0$** : 入射光强度; **I**: 透射光强度;  
**b**: 液层厚度(光程长度), 通常以cm为单位;  
 **$\varepsilon$** : 摩尔吸光系数, 单位 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  
**c**: 溶液的浓度c单位 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  
**a**: 吸光系数, 单位 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; 溶液的浓度c单位 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



## 样品溶液吸收光示意图



## 样品溶液吸收光示意图

# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

朗伯-比耳定律是吸光光度法的理论基础和定量测定的依据。广泛地应用于紫外光、可见光、红外光区的吸收测量，也适用于原子吸收测量。

**摩尔吸光系数  $\epsilon$  ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )** 在数值上等于吸光物质浓度为  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、液层厚度为  $1\text{cm}$  时该溶液在某一波长下的吸光度。 $\epsilon$  是吸收物质在一定波长和溶剂条件下的特征常数，不随浓度  $c$  和光程长度  $b$  的改变而改变。在温度和波长等条件一定时， $\epsilon$  仅与吸收物质本身的性质有关。

吸光系数  $a$  ( $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) 相当于浓度为  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，液层厚度为  $1\text{cm}$  时该溶液在某一波长下的吸光度。

# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

朗伯-比耳定律是吸光光度法的理论基础和定量测定的依据。广泛地应用于紫外光、可见光、红外光区的吸收测量，也适用于原子吸收测量。

**摩尔吸光系数  $\epsilon$  ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )** 在数值上等于吸光物质浓度为  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、液层厚度为  $1\text{cm}$  时该溶液在某一波长下的吸光度。 $\epsilon$  是吸收物质在一定波长和溶剂条件下的特征常数，不随浓度  $c$  和光程长度  $b$  的改变而改变。在温度和波长等条件一定时， $\epsilon$  仅与吸收物质本身的性质有关。

吸光系数  $a$  ( $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) 相当于浓度为  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，液层厚度为  $1\text{cm}$  时该溶液在某一波长下的吸光度。

# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

$\epsilon$ 可作为定性鉴定的参数。

同一吸收物质在不同波长下的 $\epsilon$ 值是不同的。在最大吸收波长 $\lambda_{max}$ 处的摩尔吸光系数，常以 $\epsilon_{max}$ 表示。

$\epsilon_{max}$ 表明了该吸收物质最大限度的吸光能力，也反映了光度法测定该物质可能达到的最大灵敏度。

$\epsilon_{max}$ 越大表明该物质的吸光能力越强，用光度法测定该物质的灵敏度越高。

# 三、光的吸收基本定律

## 朗伯一比耳定律

$\epsilon$ 可作为定性鉴定的参数。

同一吸收物质在不同波长下的 $\epsilon$ 值是不同的。在最大吸收波长 $\lambda_{max}$ 处的摩尔吸光系数，常以 $\epsilon_{max}$ 表示。

$\epsilon_{max}$ 表明了该吸收物质最大限度的吸光能力，也反映了光度法测定该物质可能达到的最大灵敏度。

$\epsilon_{max}$ 越大表明该物质的吸光能力越强，用光度法测定该物质的灵敏度越高。

## 三、光的吸收基本定律

### 朗伯一比耳定律

应当指出，溶液中吸光物质的浓度常因离解等化学反应而改变，故计算其摩尔吸光系数时，必须知道吸光物质的平衡浓度。在实际工作中，通常不考虑这种情况，而以被测物质的总浓度计，故测得的实为条件摩尔吸光系数，以 $\epsilon'$ 表示。

$\epsilon > 10^5$ : 超高灵敏;

$\epsilon = (6 \sim 10) \times 10^4$ : 高灵敏;

$\epsilon = (2 \sim 6) \times 10^4$ : 中等灵敏;

$\epsilon < 2 \times 10^4$ : 不灵敏。



## 三、光的吸收基本定律

### 朗伯一比耳定律

应当指出，溶液中吸光物质的浓度常因离解等化学反应而改变，故计算其摩尔吸光系数时，必须知道吸光物质的平衡浓度。在实际工作中，通常不考虑这种情况，而以被测物质的总浓度计，故测得的实为条件摩尔吸光系数，以 $\epsilon'$ 表示。

$\epsilon > 10^5$ : 超高灵敏;

$\epsilon = (6 \sim 10) \times 10^4$ : 高灵敏;

$\epsilon = (2 \sim 6) \times 10^4$ : 中等灵敏;

$\epsilon < 2 \times 10^4$ : 不灵敏。

例：用PAN[1—(2—吡啶偶氮)—2—萘酚]为显色剂的分光光度法测定铅，100 mL溶液中含铅0.020 mg，用 $L = 2\text{cm}$ ，在 $\lambda_{\text{max}} = 520\text{ nm}$ 下测得透光率 $T = 20\%$ ，试计算此有色化合物的摩尔消光系数 $\varepsilon$ 。

(吸光度 $A$ 与透光度 $T$ 的关系： $A = -\lg T$ )

$$\text{解： } c_{\text{Pb}} = \frac{0.020 \times 10^{-3} \times 1000}{207.2 \times 100} = 9.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$A = -\lg T = -\lg(0.20) = 0.70$$

$$\varepsilon = \frac{0.70}{2 \times 9.6 \times 10^{-6}} = 3.6 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol cm})$$

例：用PAN[1—(2—吡啶偶氮)—2—萘酚]为显色剂的分光光度法测定铅，100 mL溶液中含铅0.020 mg，用 $L = 2\text{cm}$ ，在 $\lambda_{\text{max}} = 520\text{ nm}$ 下测得透光率 $T = 20\%$ ，试计算此有色化合物的摩尔消光系数 $\varepsilon$ 。

(吸光度 $A$ 与透光度 $T$ 的关系： $A = -\lg T$ )

$$\text{解： } c_{\text{Pb}} = \frac{0.020 \times 10^{-3} \times 1000}{207.2 \times 100} = 9.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$A = -\lg T = -\lg(0.20) = 0.70$$

$$\varepsilon = \frac{0.70}{2 \times 9.6 \times 10^{-6}} = 3.6 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol cm})$$

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

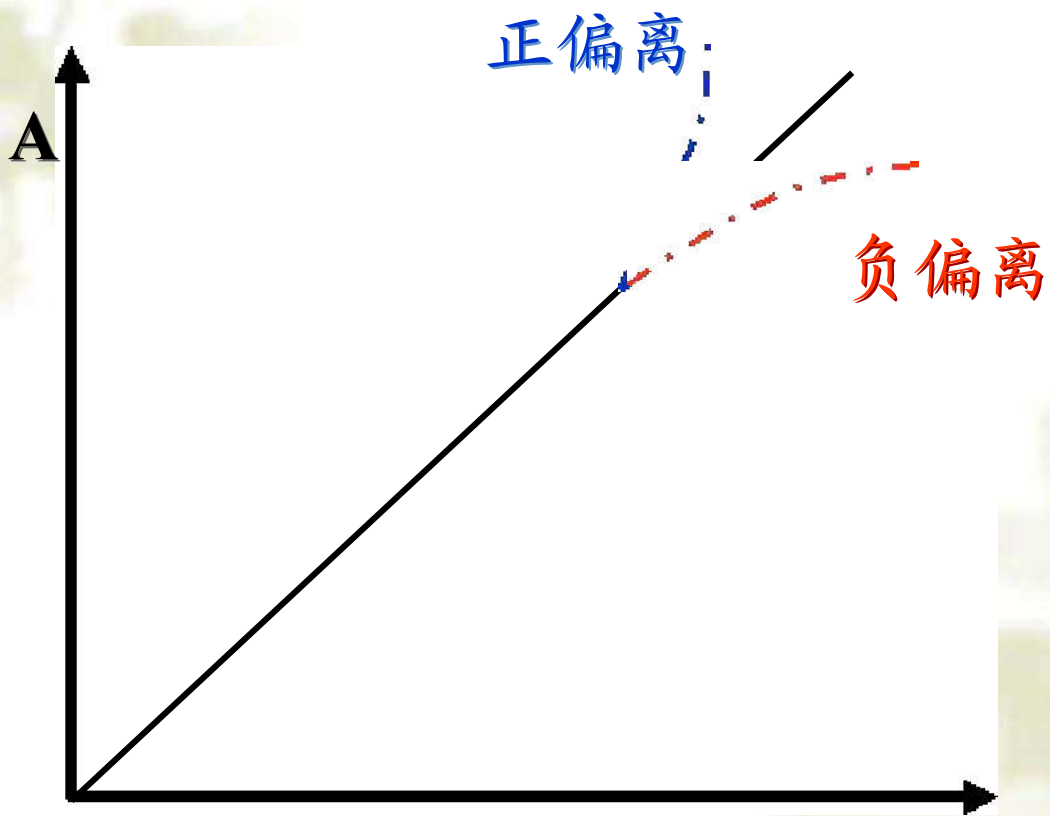
在吸光光度分析中,通常固定吸收池的厚度不变,用分光光度计测量一系列标准溶液的吸光度。根据朗伯-比耳定律。吸光度与吸光物质的浓度成正比,故以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标作图,应得到一条通过原点的直线,称为标准曲线或工作曲线。

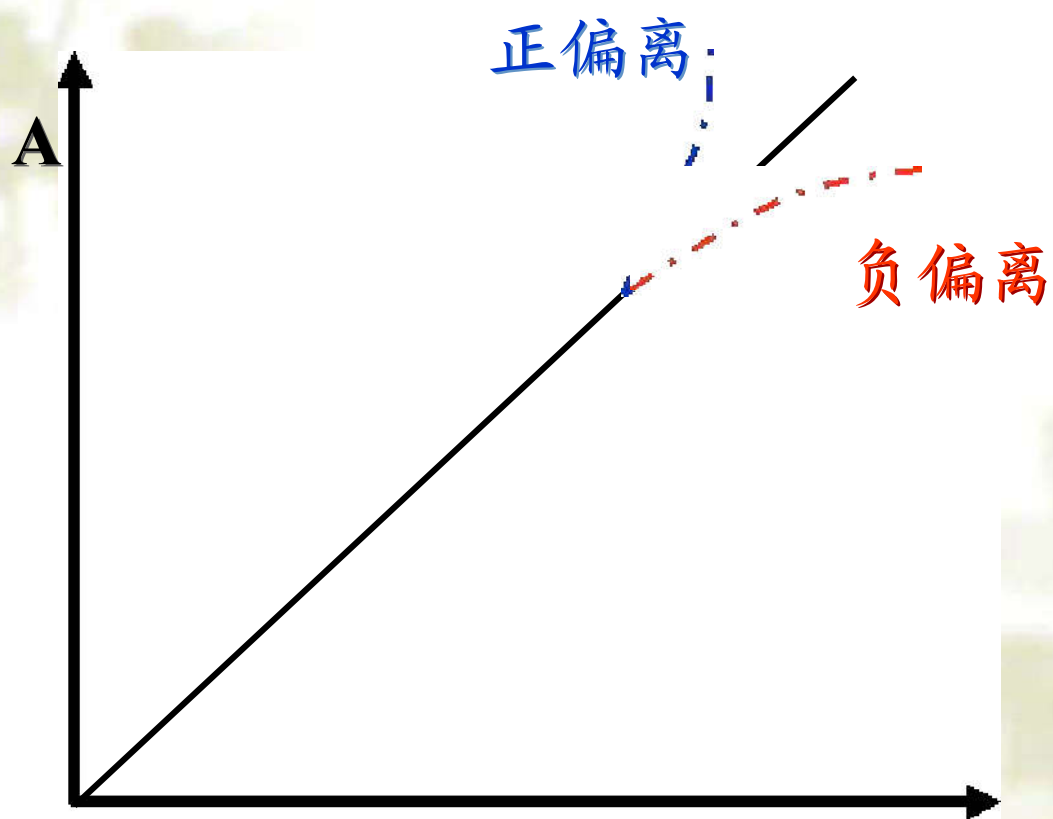
但在实际工作中,经常发现标准曲线不成直线的情况,特别是当吸光物质的浓度比较高时,明显地看到标准曲线向浓度轴弯曲的情况(个别情况向吸光度轴弯曲)。这种情况称为偏离朗伯-比耳定律。在一般情况下,如果偏离朗伯-比耳定律的程度不严重,即标准曲线弯曲程度不严重,该曲线仍可用于定量分析。

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

在吸光光度分析中,通常固定吸收池的厚度不变,用分光光度计测量一系列标准溶液的吸光度。根据朗伯-比耳定律。吸光度与吸光物质的浓度成正比,故以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标作图,应得到一条通过原点的直线,称为标准曲线或工作曲线。

但在实际工作中,经常发现标准曲线不成直线的情况,特别是当吸光物质的浓度比较高时,明显地看到标准曲线向浓度轴弯曲的情况(个别情况向吸光度轴弯曲)。这种情况称为偏离朗伯-比耳定律。在一般情况下,如果偏离朗伯-比耳定律的程度不严重,即标准曲线弯曲程度不严重,该曲线仍可用于定量分析。





## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

造成工作曲线偏离朗伯—比耳定律的原因主要有以下几点：

**(1)** 由于介质不均匀性引起的偏离：当被测试液是胶体溶液，乳浊液或悬浮物质时，入射光通过溶液后，除了一部分被试液吸收外，还有一部分因散射现象而损失，使透光率减少、实测吸光度增加，导致偏离朗伯-比耳定律。

**(2)** 由于溶液中的化学反应引起的偏离：溶液中吸光物质可因浓度的改变，而发生离解、缔合、溶剂化以及配合物组成等的变化，使吸光物质存在形式发生变化，从而使吸光物质对光吸收的选择性和吸光强度也发生相应的变化。



## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

造成工作曲线偏离朗伯—比耳定律的原因主要有以下几点：

(1) 由于介质不均匀性引起的偏离：当被测试液是胶体溶液，乳浊液或悬浮物质时，入射光通过溶液后，除了一部分被试液吸收外，还有一部分因散射现象而损失，使透光率减少、实测吸光度增加，导致偏离朗伯-比耳定律。

(2) 由于溶液中的化学反应引起的偏离：溶液中吸光物质可因浓度的改变，而发生离解、缔合、溶剂化以及配合物组成等的变化，使吸光物质存在形式发生变化，从而使吸光物质对光吸收的选择性和吸光强度也发生相应的变化。

如亚甲蓝阳离子水溶液中，单体的最大吸收在660 nm处，而二聚体的最大吸收在610 nm处。随着浓度的增大，660 nm处吸收峰减弱，而610 nm处吸收峰增强，吸收光谱形状改变。由于产生化学反应改变离子浓度，使吸光度与浓度成正比的关系发生偏离。又如重铬酸钾的水溶液存有如下平衡



溶液中 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 及 $\text{CrO}_4^{2-}$ 的相对浓度，与溶液的稀释程度及酸度有关，由于 $\text{CrO}_4^{2-}$ 的 $\lambda_{\text{max}}$ 为450 nm， $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 的 $\lambda_{\text{max}}$ 为370 nm，两者的浓度变化，必然会导致偏离朗伯—比尔定律。

如亚甲蓝阳离子水溶液中，单体的最大吸收在660 nm处，而二聚体的最大吸收在610 nm处。随着浓度的增大，660 nm处吸收峰减弱，而610 nm处吸收峰增强，吸收光谱形状改变。由于产生化学反应改变离子浓度，使吸光度与浓度成正比的关系发生偏离。又如重铬酸钾的水溶液存有如下平衡



溶液中 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 及 $\text{CrO}_4^{2-}$ 的相对浓度，与溶液的稀释程度及酸度有关，由于 $\text{CrO}_4^{2-}$ 的 $\lambda_{\text{max}}$ 为450 nm， $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 的 $\lambda_{\text{max}}$ 为370 nm，两者的浓度变化，必然会导致偏离朗伯—比尔定律。

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

(3) 由于非单色光引起的偏离：朗伯-比耳定律仅适用于入射光是单一波长的情况。而仪器所需波长的单色光通过单色器从连续光谱中分离出来，其波长宽度决定于棱镜或光栅的分辨率和狭缝的宽度。

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质上都是具有某一波段的复合光。由于物质对不同波长光的吸收程度的不同，因而导致对朗伯-比耳定律的偏离。

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

(3) 由于非单色光引起的偏离：朗伯-比耳定律仅适用于入射光是单一波长的情况。而仪器所需波长的单色光通过单色器从连续光谱中分离出来，其波长宽度决定于棱镜或光栅的分辨率和狭缝的宽度。

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质上都是具有某一波段的复合光。由于物质对不同波长光的吸收程度的不同，因而导致对朗伯-比耳定律的偏离。

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

分光光度计得到的入射光的波长范围称为谱带宽度，常用半波宽度来表示。单色光谱带宽度愈窄，单色光纯度愈高，但仍然不是单一波长的光。

物质对光的吸收大都有一个较宽的波段范围，在吸收峰附近常有一吸收强度相差较小的区域，吸光物质在此区域内各波长的吸光系数比较接近。若选用的单色谱带在此区域内，则得到良好的线性关系。

## 四、偏离朗伯-比耳定律的原因

分光光度计得到的入射光的波长范围称为谱带宽度，常用半波宽度来表示。单色光谱带宽度愈窄，单色光纯度愈高，但仍然不是单一波长的光。

物质对光的吸收大都有一个较宽的波段范围，在吸收峰附近常有一吸收强度相差较小的区域，吸光物质在此区域内各波长的吸光系数比较接近。若选用的单色谱带在此区域内，则得到良好的线性关系。

End of Slide Show

Powered By **PRESENTATIONPRO**



End of Slide Show

Powered By **PRESENTATIONPRO**