

分光光度法基本原理简介

分光光度法 (spectrophotometry) 是基于物质分子对光的选择性吸收而建立起来的分析方法。

按物质吸收光的波长不同,可分为紫外分光光度法、可见分光光度法及红外分光光度法。

特点:

- * 灵敏度较高,适用于微量组分 ($1\sim 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的测定;
- * 误差较大,相对误差达到2~5%。

1

1. 物质的颜色与吸收光的关系

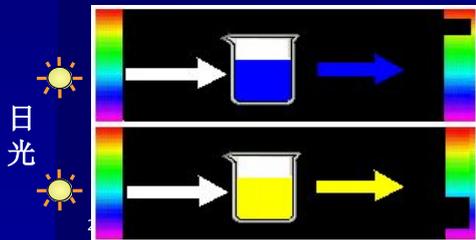
电磁波谱:	X射线	0.1~100 nm
	远紫外光	10~200 nm
	近紫外光	200~400 nm
	可见光	400~760 nm
	近红外光	750~2500 nm
	中红外光	2500~5000 nm
	远红外光	5000~10000 nm
	微波	0.1~100 cm
	无线电波	1~1000 m



日光: 紫 蓝 青 绿 黄 橙 红

2

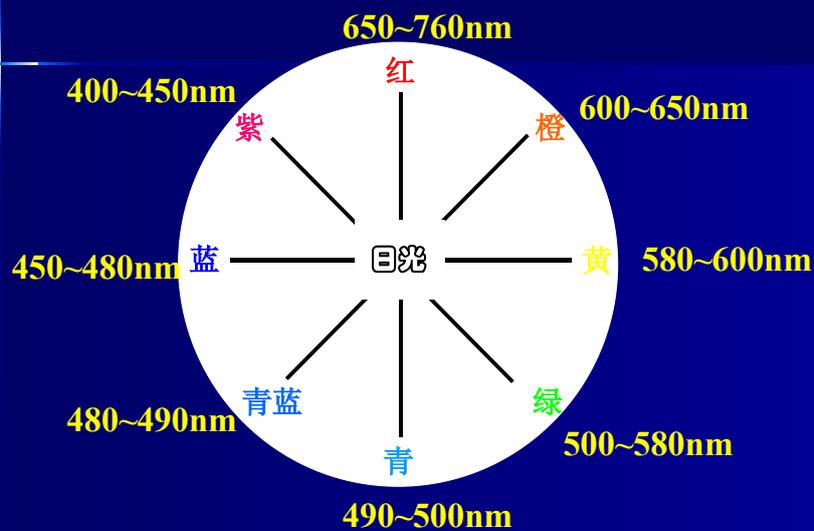
- ♥ **复合光**: 由各种单色光组成的光。如白光(太阳光)
- ♥ **单色光**: 只具有一种波长的光。 要求: $\Delta\lambda = \pm 2\text{nm}$ 。
- ♥ **互补色光**: 如果把两种适当颜色的光按一定的强度比例混合也可以得到白光, 这两种光就叫互补色光。
- ♥ **物质的颜色是由于物质对不同波长的光具有选择性的吸收作用而产生的**。如: CuSO_4 呈蓝色。
- ♥ 物质呈现的颜色和吸收的光颜色之间是**互补关系**。



光的互补: 蓝 \leftrightarrow 黄

3

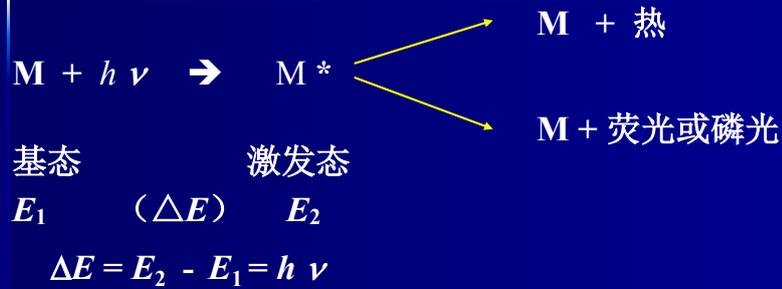
互补光



2014-11-3

4

2. 物质的吸收曲线



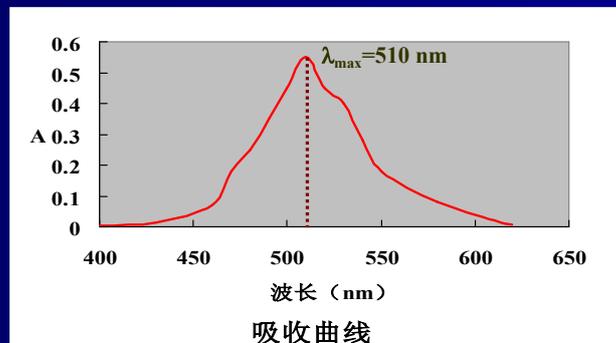
各能级是量子化；选择性吸收；

分子结构的复杂性使其对不同波长光的吸收程度不同；

2014-11-3

5

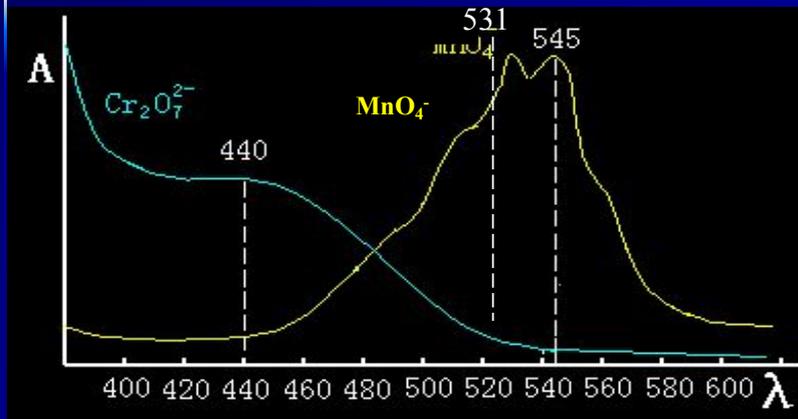
用不同波长的单色光照射，测定吸光度，如果以波长 λ 为横坐标，吸光度为纵坐标即可得一条曲线称为吸收曲线（ $\lambda \sim A$ 曲线）。



吸收曲线清楚地描述了物质对光的吸收情况。

6

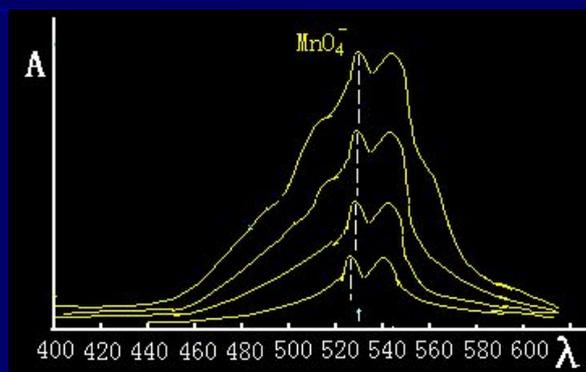
♥ (1) 不同物质吸收曲线的形状和吸收波长不同。



吸收曲线

7

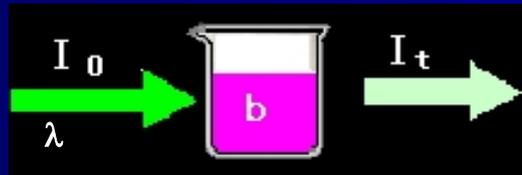
♥ (2) 同一物质对不同波长光的吸光度不同；同一物质不同浓度，其吸收曲线形状相似。



♥ 吸收曲线是**特性**的，可以提供物质的结构信息，作为**物质定性分析**的依据之一；吸收曲线是定量分析中选择入射光波长的**重要依据**。⁻³

8

3. 光的吸收定律——朗伯-比耳定律



吸光度 A ：物质对光的吸收程度。

定义： $A = \lg(I_0/I_t)$

A 越大，表示对光的吸收越大，透过光越弱。

9



1760年朗伯(Lambert)阐明了光的吸收程度和吸收层厚度的关系： $A \propto b$

• 1852年比耳(Beer)又提出了光的吸收程度和吸收物浓度之间也具有类似的关系： $A \propto c$

二者的结合称为朗伯—比耳定律， $A \propto bc$

10

朗伯—比耳定律数学表达式:



$$A = \lg (I_0/I_t) = \epsilon b c$$

式中: A , 吸光度, 无量纲; b , 液层厚度(光程长度), cm; c , 溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ϵ 称为**摩尔吸光系数**, $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 仅与入射光波长、溶液的性质及温度有关, 与浓度无关。

上式表明: **当一束单色光通过溶液时, 其吸光度与溶液浓度和宽度的乘积成正比。**

11

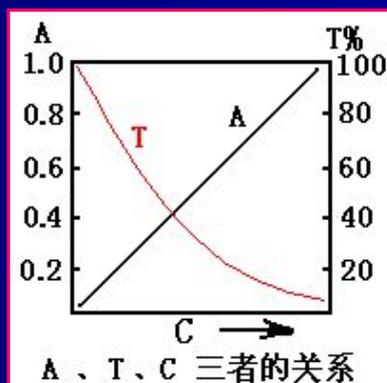
透光度(透光率) T : 透过光和入射光强度之比, 即

$$T = I_t/I_0 \times 100\%$$

T 越大, 表示对光的吸收越小。

T 、 A 、 c 间的关系:

$$A = \lg (I_0/I_t) = -\lg T = \epsilon b c$$



12

吸光度具有加和性：

在多组分体系中，吸光度具有加和性，即：

$$\begin{aligned} A(\text{总}) &= A_1 + A_2 + \dots + A_n \\ &= \varepsilon_1 b c + \varepsilon_2 b c + \dots + \varepsilon_n b c \end{aligned}$$

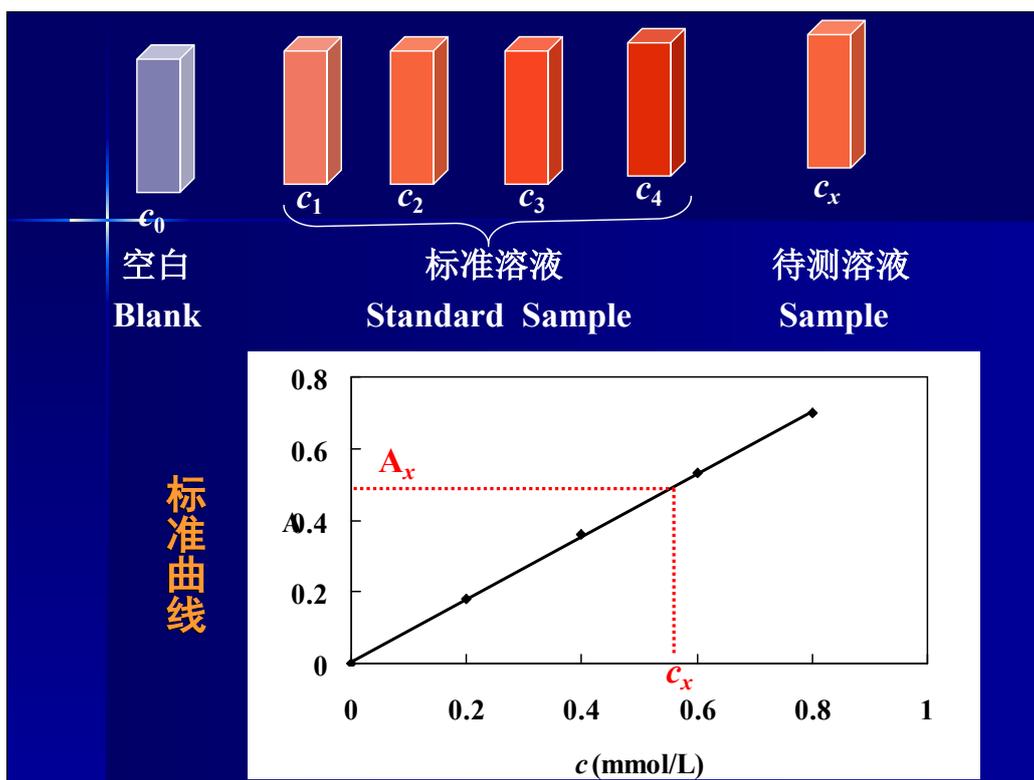
13

4. 定量测定方法——标准曲线法

其方法和步骤是：

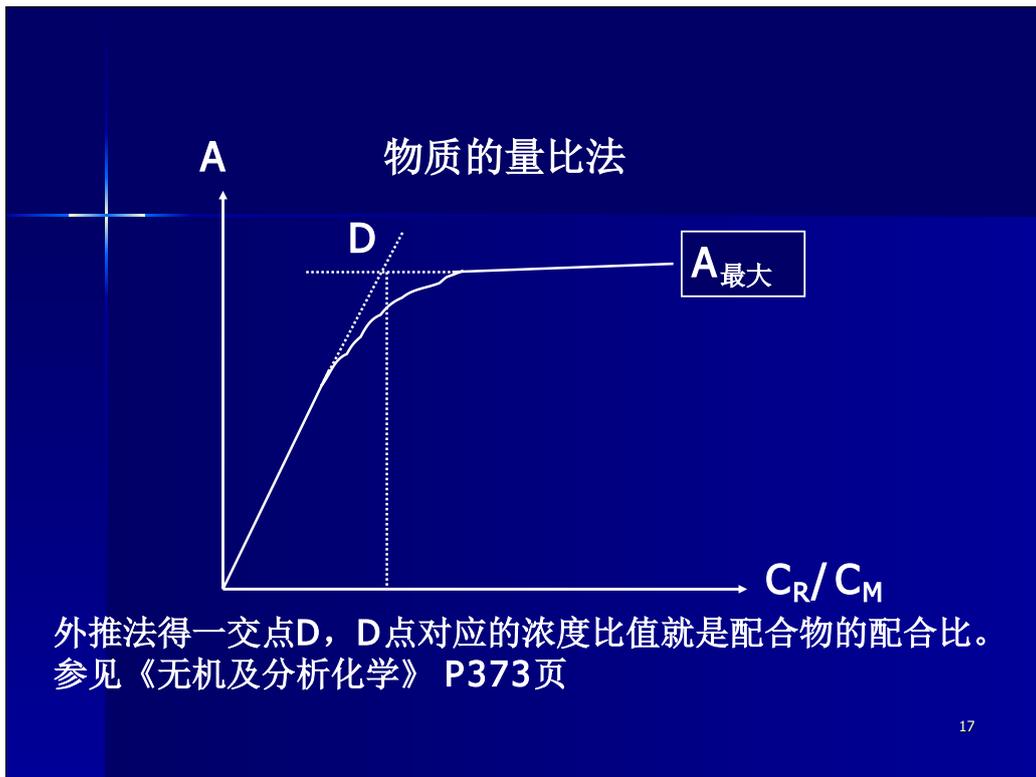
- 1) 配制一组浓度不同的标准溶液(c_1 、 c_2 ……)；
- 2) 在一定波长下，分别测定其吸光度(A_1 、 A_2 ……)。
- 3) 以 A 为纵坐标，浓度 c 为横坐标，绘制曲线，得到一条通过原点的直线，称为**标准曲线** (A - c 曲线)。
- 4) 用完全相同的方法和步骤测定待测溶液的吸光度 A_x ，从标准曲线上找出对应的浓度 c_x 值 ($A_x \Rightarrow c_x$)。

14



5. 配合物配位比的测定

物质的量比法: 固定一种组分如金属离子M的浓度，改变配位剂R（显色剂）的浓度，得到一系列比值不同的溶液，并以相应的试剂空白作参比溶液，分别测定其A。以A为纵坐标，配位剂与金属离子的浓度比值为横坐标作图。当配位剂减少时，金属离子没有完全被配合。随着配位剂的增加，生成的配合物便不断增多。当金属离子全部被配位剂配合后，再增加配位剂，其吸光度亦不会增加了。图中的转折点不敏锐，这是由于配合物解离造成的。利用外推法可得一交叉点D，D点所对应的浓度比值就是配合物的配合比。



6. 紫外—可见分光光度计



a. 目视比色法

用眼睛比较溶液颜色的深浅以确定物质浓度的方法称为目视比色法。

特点：设备简单、操作简便；无需单色光；准确度不高。

b. 分光光度计



仪器基本组成



a. 光源

在整个紫外光区或可见光谱区可以发射连续光谱，具有足够的辐射强度、较好的稳定性、较长的使用寿命。



可见光区：**钨灯**作为光源，其辐射波长范围在320~2500 nm。

紫外区：**氢、氘灯**。发射185~400 nm的连续光谱。

19

b. 单色器

又称**波长控制器**，其作用是将光源发射的复合光分解成单色光，并可从中选出一任波长单色光的光学系统。包括**狭缝**、**色散元件**和**准光装置**。色散元件的作用是将复合光分解成单色光，有**棱镜**或**光栅**两种。



20

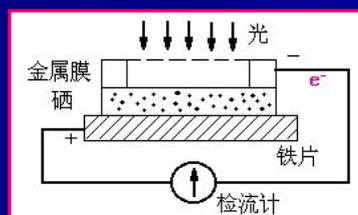
c. 样品室

样品室放置各种类型的吸收池（比色皿）和相应的池架附件。
吸收池主要有石英池和玻璃池两种。



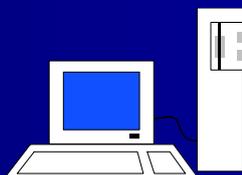
d. 检测器

利用光电效应将透过吸收池的光信号变成可测的电信号，常用的有光电池、光电管或光电倍增管。



e. 结果显示记录系统

检流计、数字显示、微机进行仪器自动控制和结果处理



21

7. 显色与测量条件的选择

- 1) 显色反应
- 2) 显色反应条件的选择
- 3) 测量条件的选择



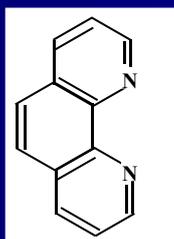
1) 显色反应

显色反应——使无色或浅色的待测组分转变为有色化合物的反应。

显色剂——可与待测组分反应形成有色化合物。

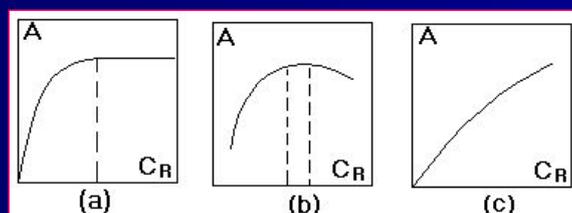


R为邻二氮菲



2) 显色反应条件的选择

a. 显色剂用量——选择吸光度最大且基本恒定（曲线变化平坦处）的显色剂用量。



b. 反应体系的酸度——选择吸光度最大且基本恒定（曲线变化平坦处）所对应的pH范围。

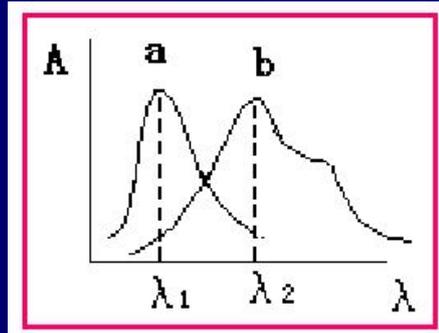
c. 显色时间与温度

d. 溶剂 一般尽量采用水相测定。

3) 测定条件的选择

a. 选择适当的入射波长

一般选 λ_{\max} 为入射光波长。如果 λ_{\max} 处有共存组分干扰时，则应考虑选择灵敏度稍低但能避免干扰的入射光波长。



25

b. 选择合适的参比溶液

• 为什么需要使用参比溶液？

使测得的吸光度真正反映待测溶液吸光强度。

$$A = \underline{A_1} + \underline{A_2} + \dots + A(x), \quad \underline{A_1} + \underline{A_2} + \dots = 0, \quad A = A(x)。$$

参比溶液的选择一般遵循以下原则：

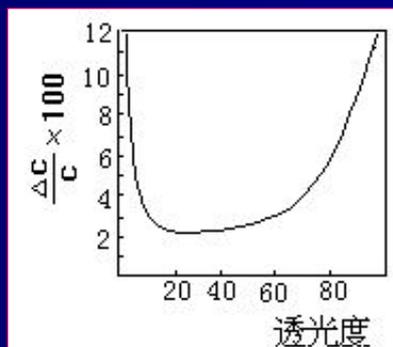
- (1) 若仅待测组分与显色剂反应产物有吸收，用**纯溶剂（水）**作参比溶液；
- (2) 若显色剂或其它所加试剂在测定波长处略有吸收，而试液本身无吸收，用“**试剂空白**”（不加试样溶液）作参比溶液；
- (3) 若待测试液在测定波长处有吸收，而显色剂等无吸收，则可用“**试样空白**”（不加显色剂）作参比溶液；

26

c. 控制适宜的吸光度（读数范围）

用仪器测定时应尽量使溶液透光度值在 $T=15\sim65\%$ ，相应地吸光度 $A=0.80\sim0.20$ 。

当溶液的吸光度或透光率不在此范围时，可以通过**改变溶液浓度**及**选择不同厚度的比色皿**来控制。



27

实验 分光光度法测定铁的含量

一、实验目的

1. 了解分光光度法测铁的基本原理；
2. 学习分光光度法中显色与测量条件的优化与选择；
3. 学习标准曲线的绘制以及试样测定方法；
4. 了解分光光度计的性能、结构及使用方法。

28

二、实验原理

$$A = \epsilon bc$$

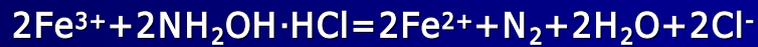
在一定实验条件下, $A = kc$, A_x 值 $\Rightarrow c_x$ 值。

pH3~9, Fe^{2+} 与Phen反应:



(注: $\text{Fe}^{3+} + 3\text{R} \rightarrow [\text{Fe}(\text{3R})]^{3+}$, 兰色, $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$)

用盐酸羟胺还原, 再显色反应, 则可以测得溶液中总铁含量:

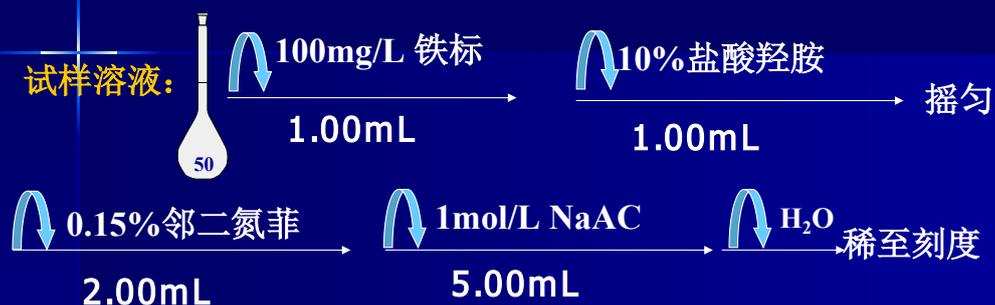


不用盐酸羟胺还原, 测定出的为亚铁的含量。

29

三、实验步骤

1. 吸收曲线的制作



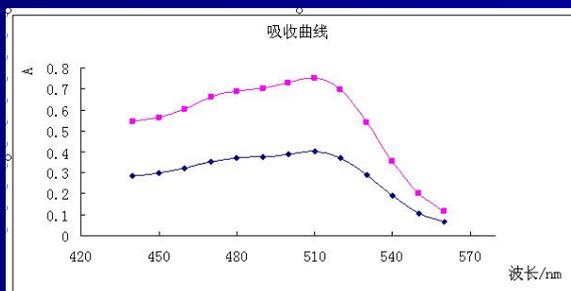
试剂溶液: 不加铁标, 其余同上配制。

30

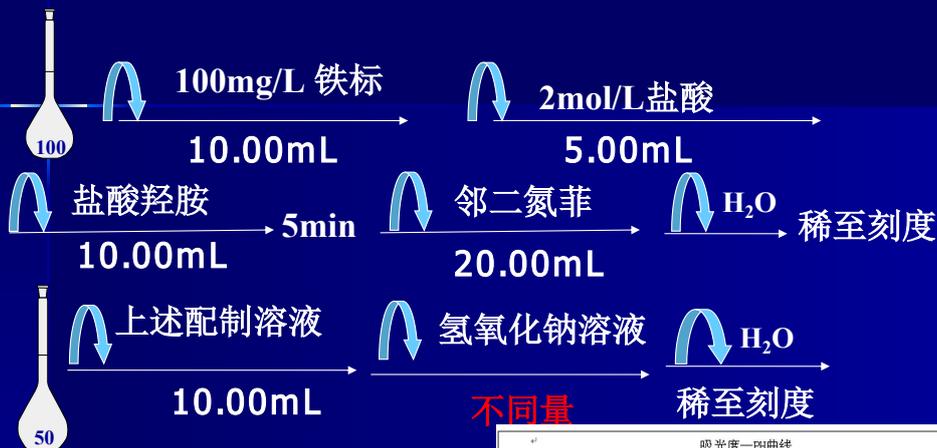
三、实验步骤（二）吸收曲线的绘制

吸收曲线的绘制(补充)—选择测定铁的最佳波长；
在分光光度计上，用1cm的比色皿，在440-560nm
间，每隔10nm测定一次5号试液的吸光度。以波长
为横坐标，吸光度为纵坐标，绘出吸收曲线。(可以
选择2-3个不同浓度)

注意：测定时每改变一次吸收波长，均要用参比溶液调节仪器的透光率100%和0%。

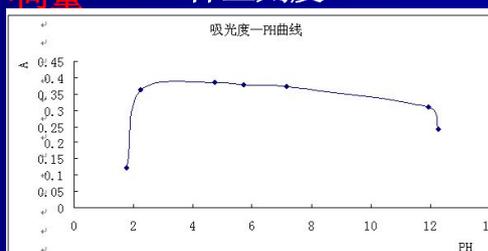


2. 溶液pH的影响



以水为参比，测A，并测定pH值，作A-pH关系曲线，选择合适的pH范围。

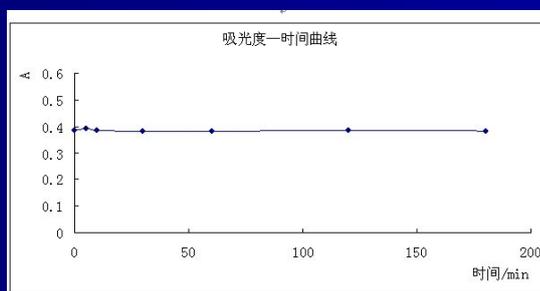
增加一个点：6.3mL NaOH



3. 稳定性实验

试样溶液同实验1

以试剂溶液作参比，在508 nm处，测定不同显色时间下的吸光度，并且绘制A-t曲线，考察反应时间的影响以及有色溶液的稳定性。



4. 显色剂浓度的影响

试样溶液中除了邻二氮菲的加入量不同外，其余配制方法同实验1。

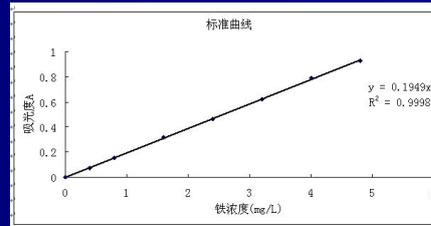
以试剂溶液作参比，在508 nm处，测定不同显色浓度下的吸光度，并且绘制A-V曲线，考察显色剂浓度的影响。

5. 配合物组成的确定（采用讲义上两种方法）

注意：溶液重新配制，加水之前先用2滴管乙醇溶解；

6. 标准溶液曲线的制作

按照书P249配制0#~8#溶液，以0#为参比溶液，测定1#~8#溶液的吸光度值，并且绘制A~c标准曲线。



7. 未知样中铁含量的测定

按照书中的方法配制试样溶液，测定其吸光度值，从标准曲线中查得相应铁含量。

35

四、实验注意事项

- 1、移液管专管专用；注意刻度移液管的使用方法，要求每次从零刻度放至所需的体积；
- 2、注意溶液的添加顺序，按书上表格从左到右，不能随意颠倒，加入盐酸羟氨后反应5min，再加NaAc和邻二氮菲（准确移取和不需准确移取的！）。
- 3、进入仪器室，手机必须关机！否则数据不稳定。
- 4、制作标准曲线时，先找吸光度接近的比色皿（用水，T模式下调零，再调100%；再转化为A模式测定。然后用1#为参比溶液，测定其他的吸光度。

36

实验数据处理

- 所有曲线用EXCELL或ORIGIN作图，打印后贴在实验报告上。