



第二节 吸光光度分析的基本原理

- 一、光吸收的基本定律
- 二、偏离**L-B**定律的原因
- 三、光度测量误差及实验条件的选择



一、光吸收的基本定律

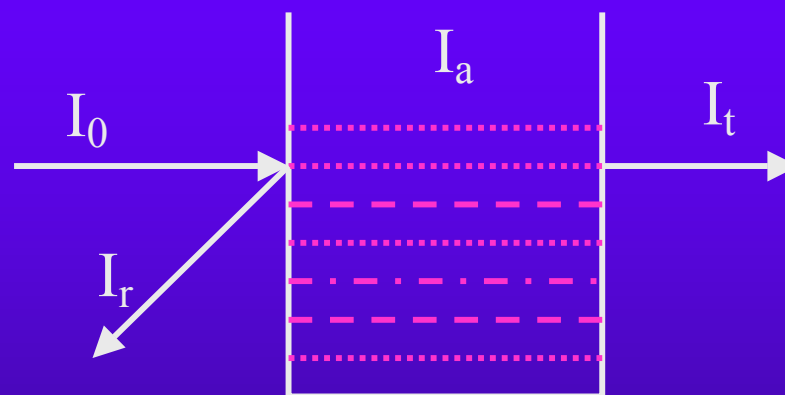
1729年——波格(Bouguer)发现并建立了吸光度与光通过介质厚度的关系。

1760年——朗伯(Lambert)用数学表达式表示了这种关系。

1852年——比耳(Beer)确定了吸光度与溶液浓度及液层厚度之间的关系，建立了光吸收的基本定律。



- ◆ 当一束单色光垂直照射到任何均匀的非散射的介质（固、液、气）时，有一部分被吸收（ I_a ）一部分透过溶液（ I_t ）还有一些部分被样品池表面反射（ I_r ），若入射光强为 I_o ，则 $I_o = I_a + I_t + I_r$





由于光垂直照射，另吸光光度分析中，测量时采用的是相同的样品池，故反射光 I_r 很小（ $I_0 \times 4\%$ ），且基本不变，即对空白及样品测定时， I_r 基本相等，故可忽略其影响。

$$I_0 = I_a + I_t$$

人们将透射光强度（ I_t ）与入射光强度（ I_0 ）之比定义为透光率或透光度（ T ）

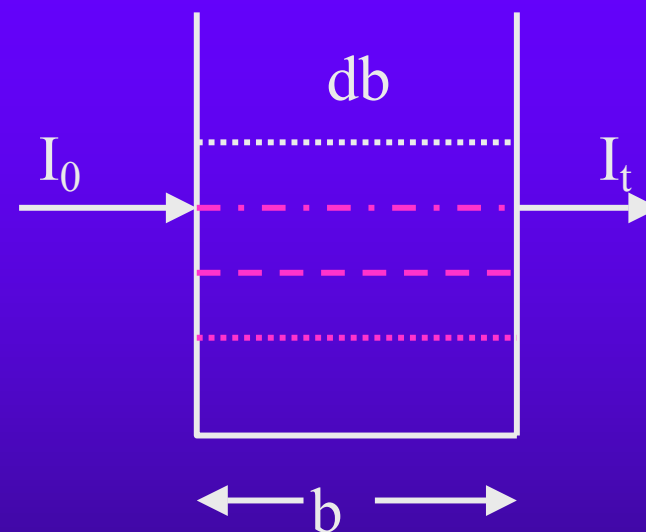
$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

显然， T 越大，说明对光的吸收越弱；相反， T 越小，对光的吸收越强。实验证明，溶液对光的吸收程度与溶液的浓度、液层的厚度及入射光的波长等因素有关，若何持入射光波长一定，光的吸收程度与溶液浓度及液层厚度有关。



1. 朗伯定律

- ◆ 设某一波长的单色光，通过液层厚度为 b 的均匀溶液，溶液浓度一定，若将溶液分成无限小的相等的薄层 db ，当光通过 db 后，若光强减弱 dI ，则：





$$- dI \propto I \cdot db$$

$$- dI = k_1 I \cdot db$$

$$\text{即, } -\frac{dI}{I} = k_1 \cdot db$$

$$\int_{I_0}^{I_t} -\frac{dI}{I} = \int_0^b k_1 db$$

$$\ln \frac{I_0}{I_t} = k_1 b$$

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = \frac{k_1}{2.303} b = k_2 b$$

当溶液浓度一定时，入射光强度与透射光强度之比的对数，即透光率倒数的对数（ $\lg \frac{I_0}{I_t}$ ）与液层厚度成正比。人们定义：

定义 —— 溶液对单色光的吸收程度为**吸光度**。

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



$$\therefore A = \lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{1}{T} = k_2 b$$

k_2 ——与入射光波长，溶液性质及浓度、温度有关，当 λ 及其它三者一定时， A 与 b 成正比。

2.比耳定律

当一束单色光通过液层厚度一定的均匀溶液时，溶液中的吸光物质的浓度增大 dC ，则透射光强度将减弱 dI ， $-dI$ 与入射光光强度 I 与 dc 的积成正比。

$$\therefore -dI \propto I \cdot dc \quad -\frac{dI}{I} = k_3 \cdot dc$$

同样：
$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = k_4 \cdot C$$

这是吸光度与浓度的定量关系，是紫外—可见分光光度分析的**定量依据**，称**Beer定律**， k_4 ——与入射光波长、溶液性质、液层厚度及温度有关，故当上述条件一定时，吸光度与溶液浓度成正比。

3.朗伯--比耳定律

若同时考虑液层厚度和溶液浓度对吸光度的影响，即把朗伯定律和比耳定律合并起来得：

$$A = k b C$$

K——与入射光波长、溶液性质及温度有关的常数

当一束波长为 λ 的单色光通过均匀溶液时，其吸光度与溶液浓度和光线通过的液层厚度的乘积成正比。

即为朗伯——比耳定律。

其中K的取值与C、b的单位不同而不同。

若C以g/L表示，b以cm表示。

则K以a表示，称吸光系数，单位 L/g.cm

$$\therefore A = a b C$$



- ◆ 若C以 $mol \cdot L^{-1}$ ，b以cm表示，则K以 ϵ 表示，称摩尔吸光系数，单位为L/molcm，它表示吸光物质浓度为1mol/L，液层厚度为1cm时溶液对某单色光的吸收能力。

$$A = \epsilon b C$$

- ◆ 显然，我们不可能直接测定 $1 mol L^{-1}$ 的高浓度样品，求算某吸光物质的摩尔吸光系数 ϵ ，而是通过测定低浓度溶液的吸光度A，计算出 ϵ 。

- ◆ 例：已知 Fe^{2+} 的浓度为 $500 \mu g/l$ 的溶液，用邻二氮菲作显色剂进行分光光度测定，样品池厚 $2cm$ ，在波长为 $515nm$ 处测得吸光度 $A=0.19$ ，求该吸光物质的 ϵ

解： $M=55.85$

$$[Fe^{2+}] = \frac{500 \times 10^{-6}}{55.85} = 8.9 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$$

$$A = 0.19 = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c} = \frac{0.19}{2 \times 8.9 \times 10^{-6}} = 1.1 \times 10^4 (L/mol \cdot cm)$$

- ◆ 摩尔吸光系数表示吸光物质对光的吸收能力，所示 ϵ 又是衡量紫外—可见分光光度分析灵敏度的重要标志。

$\epsilon > 10^4 L/mol \cdot cm$ —灵敏 $\epsilon < 10^3 L/mol \cdot cm$ —不灵敏



桑德尔 (Sandell) 灵敏度

当产生0.001的吸光度时对应的单位截面积光程内吸光物质的量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

$$\text{即: } A=0.001 = \varepsilon b C$$

$$b \cdot C = \frac{0.001}{\varepsilon} \rightarrow \text{cm} \times \mu\text{g} / \text{cm}^3$$

$$\therefore b \cdot C = \text{cm} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \rightarrow \text{cm} \cdot \text{mol} / (1000\text{cm}^3)$$

$$S = \frac{bc}{1000} \cdot M(\text{g}) / \text{cm}^2 = \frac{bc}{1000} \times M \times 10^6 \mu\text{g} / \text{cm}^2$$

$$\therefore S = \frac{bc}{1000} \cdot M \times 10^6 = M / \varepsilon$$



4. 吸光度的加和性原理

假设某一波长为 λ ，强度为 I_0 的单色光通过几个相同厚度的不同溶液，每种溶液的 mol 吸光系数和浓度分别为：

$$\varepsilon_1、\varepsilon_2、\dots\varepsilon_n, C_1、C_2\dots C_n \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

光线通过每个溶液后其透射光光强为：

$$I_1、I_2\dots I_n.$$

则：波长为 λ 的光通过 n 个溶液后的总吸光度

$$A = \lg \frac{I_0}{I_n} \quad \left(T = \frac{I_n}{I_0} \right)$$

通过各溶液时产生吸光度分别为：

$$A_1 = \lg \frac{I_0}{I_1} \quad A_2 = \lg \frac{I_1}{I_2} \dots \dots A_n = \lg \frac{I_{n-1}}{I_n}$$

$$A_1 + A_2 \dots + A_n = \lg \frac{I_0}{I_1} + \lg \frac{I_1}{I_2} + \dots \dots + \lg \frac{I_{n-1}}{I_n}$$

$$= \lg \frac{I_0 \times I_1 \times I_2 \dots \dots I_{n-1}}{I_1 \times I_2 \dots \dots I_n} = \lg \frac{I_0}{I_n} = A$$

$$\therefore A = A_1 + A_2 + \dots A_n = \sum_i A_i$$

这即为吸光度的加和性原理，把L-B定律代入，

$$\text{则： } A = \varepsilon_1 b C_1 + \varepsilon_2 b C_2 + \dots \dots \varepsilon_n b C_n$$



二、偏离L-B定律的原因

在紫外—可见分光光度分析中，当吸光物质的浓度大到一定程度时，明显地看到偏离工作曲线的情况，大多数情况下，产生负偏离（向浓度轴弯曲），少数情况也产生正偏离（向A轴弯曲）。

那么，产生这种偏离的原因是什么呢？
二方面因素——物理因素和化学因素。



1、物理因素

①由于入射光的非单色性引起的偏离

严格地说，朗伯—比耳定律要求入射光为单色光，而在紫外—可见分光光度分析中，使用的是连续光源，经单色器分光后，用狭缝调节光谱带的宽度，即分光后的出射光仍是一个“复合光”，只是这种光的波长范围很窄而已，所以说，单色光并非是一条几何线。

由于入射光的非单色性将导致对L-B定律的偏离。



假设入射光包含两种波长 λ_1 、 λ_2 的光，它们的入射光强度分别为 I_{01} 、 I_{02} ，透射光强为 I_1 、 I_2 ，则：吸光物质

对 λ_1 的的吸收：
$$A_1 = \varepsilon_1 bc = \lg \frac{I_{01}}{I_1}$$

对 λ_2 的的吸收：
$$A_2 = \varepsilon_2 bc = \lg \frac{I_{02}}{I_2}$$

假设 λ_1 、 λ_2 的入射光强度 $I_{01} = I_{02} = I_0$ ，同时假设检测器对 λ_1 、 λ_2 的灵敏度相同，则：平均吸光度 $A_{\text{平}}$



$$A_{\text{平}} = \frac{1}{2}(A_1 + A_2) = \frac{1}{2}(\lg \frac{I_{01}}{I_1} + \lg \frac{I_{02}}{I_2}) = \frac{1}{2}(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)bc$$
$$= \frac{1}{2} \lg \frac{I_0^2}{I_1 \cdot I_2}$$

$A_{\text{平}}$ 与吸光物质的浓度和液层厚度的乘积成正比，即依然符合L-B定律，只不过此时的摩尔吸光系数为 $\varepsilon = \frac{1}{2}(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)$

然而，实际测得的并非 $A_{\text{平}}$ ，而是

$A_{\text{测}}$ ， $A_{\text{测}}$ 几何？

$$A_{\text{测}} = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2} = \lg \frac{2I_0}{I_1 + I_2}$$

$A_{\text{测}}$ 是否也符合朗伯—比耳定律?

假设 λ_2 通过溶液后被吸收得多一些,

即: $I_2 < I_1 \quad I_1 - I_2 > 0$

平方: $I_1^2 - 2I_1I_2 + I_2^2 > 0$

$$I_1^2 + 2I_1I_2 + I_2^2 > 4I_1I_2$$

$$(I_1 + I_2)^2 > 4I_1I_2$$

又等式两边用 I_0^2 相除:

$$\left(\frac{I_0}{I_1 + I_2}\right)^2 < \frac{I_0^2}{4I_1I_2}$$



$$\left(\frac{2I_0}{I_1 + I_2}\right)^2 < \frac{I_0^2}{I_1 \cdot I_2}$$

取对数: $2\lg \frac{2I_0}{I_1 + I_2} < \lg \frac{I_0^2}{I_1 \cdot I_2}$

不等式左边为 $A_{\text{测}}$ ，右为 $A_{\text{平}}$

$$\therefore A_{\text{测}} < A_{\text{平}}$$

结论: 当非单色光入射时，实际测得的吸光度值往往比平均吸光度小，故引起负偏离，而且，单色光的纯度越差，偏离越严重，并且，随浓度或液层厚度增大，偏离增大。



$$A_{\text{测}} = \lg \frac{2I_0}{I_1 + I_2} = \lg \frac{2}{\frac{I_1}{I_0} + \frac{I_2}{I_0}} = \lg \frac{2}{10^{-\varepsilon_1 bc} + 10^{-\varepsilon_2 bc}}$$

$A_{\text{测}}$ 与C成非线性关系，而且 ε_1 ， ε_2 相差越大，这种偏离越严重。

为何紫外—可见分光光度仍广泛应用于定量分析呢？

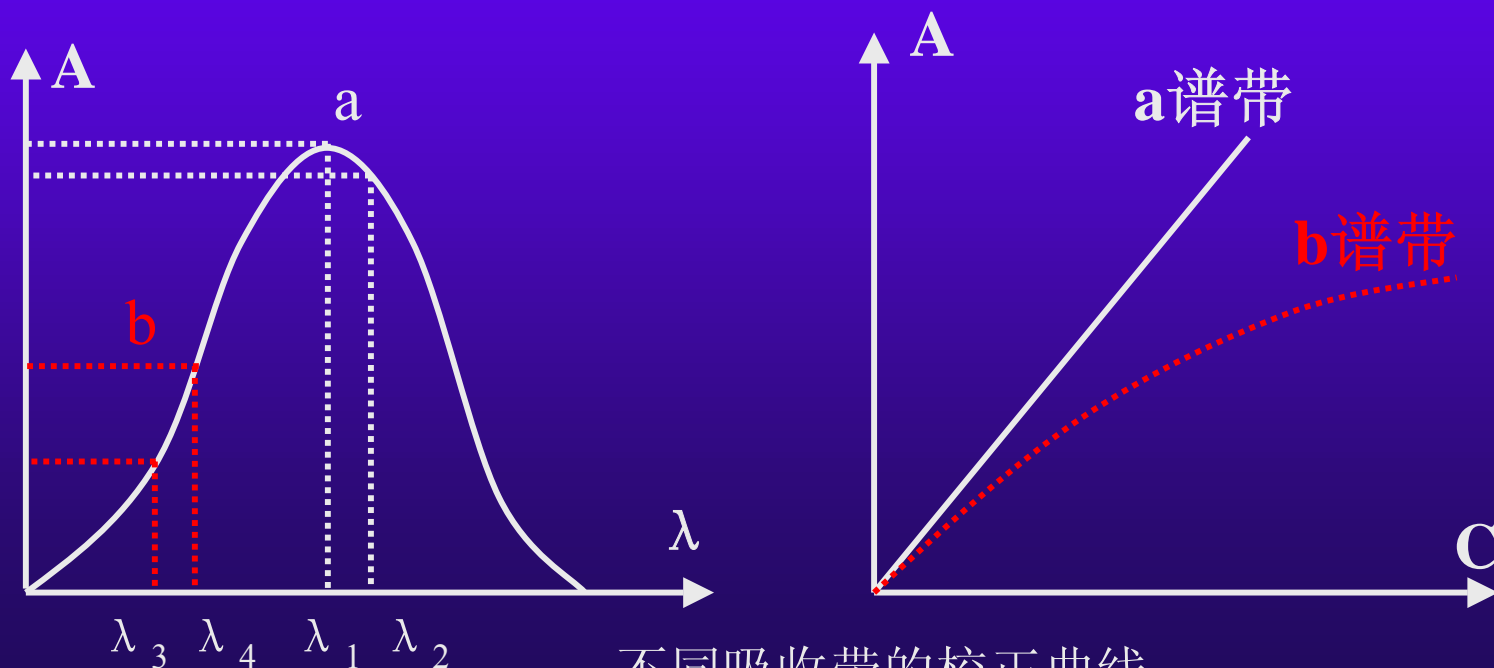
当 $\varepsilon_1 = \varepsilon_2$ 时

$$A_{\text{测}} = \varepsilon_1 bc = \varepsilon_2 bc$$

这时 $A_{\text{测}}$ 与C符合朗伯比耳定律，这说明什么？说明在入射谱线的波长范围内（ $\lambda_1 \rightarrow \lambda_2$ ），摩尔吸光系数必须恒定，即在相同条件下，溶液对该波段（ $\lambda_1 \rightarrow \lambda_2$ ）的任一波长的光的吸收应恒定。



我们在选择入射光波长时，不应选择吸收曲线的上升或下降区域，或者单色光的谱线宽度太大。所以在进行紫外—可见分光光度分析中，通常选择最大吸收波长 λ_{\max} 作为入射线。



不同吸收带的校正曲线



②非垂直入射、入射光被散射引起的偏离

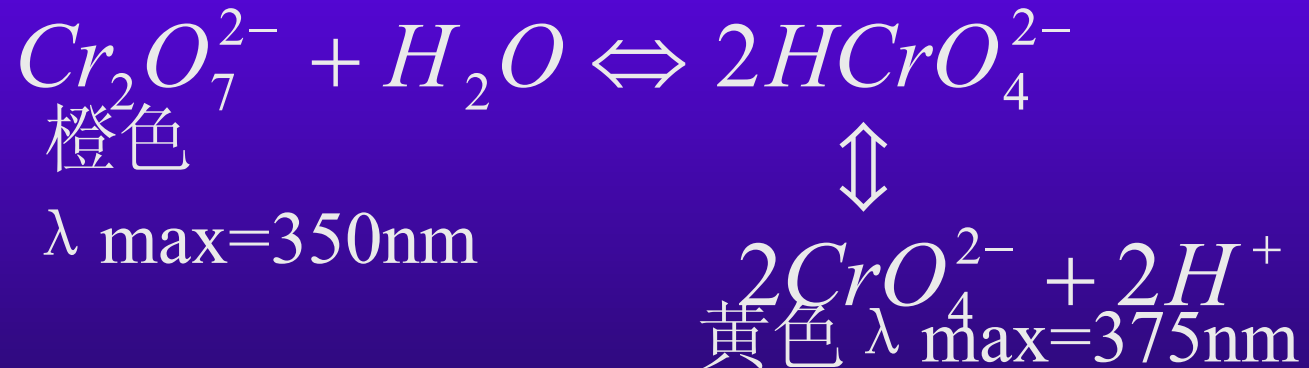
- ◆ 在紫外-可见分光光度分析中，由于溶液的不均匀，如被测液为胶体、浮浊液或悬浊液时，除有部分入射光被溶液吸收外，还有一部分因散射而损失，使吸光度增大，产生正偏离。
- ◆ 另外，由于入射光不是垂直通过样品池，使光成实际走过的光程大于样品池厚度，产生正偏差。

2、化学因素

溶液中吸光物质因离解、缔合、形成新的化合物或同溶剂反应，产生互变异构体等，而导致吸收曲线的形状、最大吸收波长（ λ_{\max} ）、吸收强度等发生变化，引起对L-B定律的偏离。

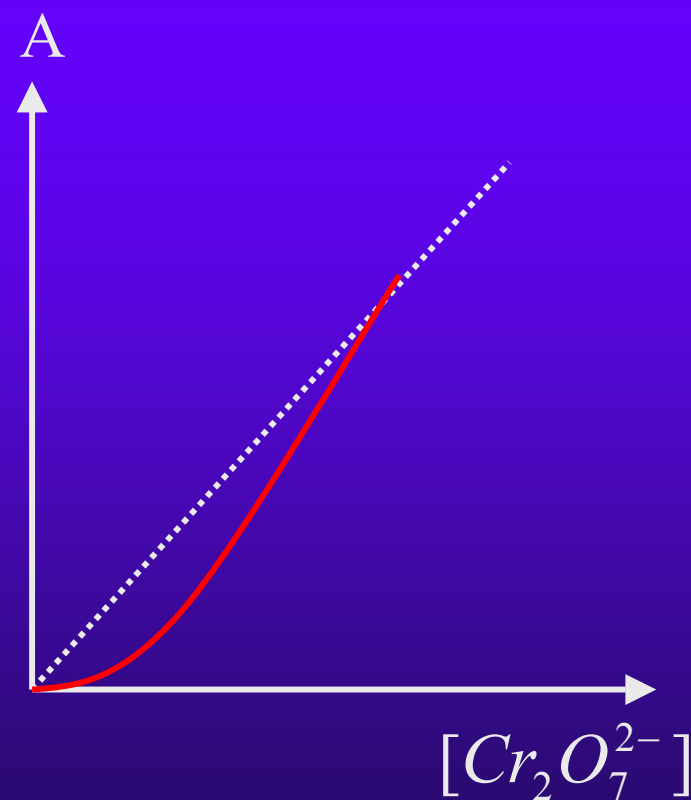
①平衡效应

最典型的是 $K_2Cr_2O_7$ 溶液中发生的平衡效应。





测得不同浓度的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液对 $\lambda_{max}=350nm$ 光的吸光度随 $K_2Cr_2O_7$ 浓度的变化如图，当 $K_2Cr_2O_7$ 的浓度较稀时，A—C工作曲线严重弯曲，这是因 $[Cr_2O_7]^-$ 较低时，上述平衡右移，使 $[CrO_4]$ 增大，而 $[Cr_2O_7^{2-}]$ 降低。



平衡效应的影响



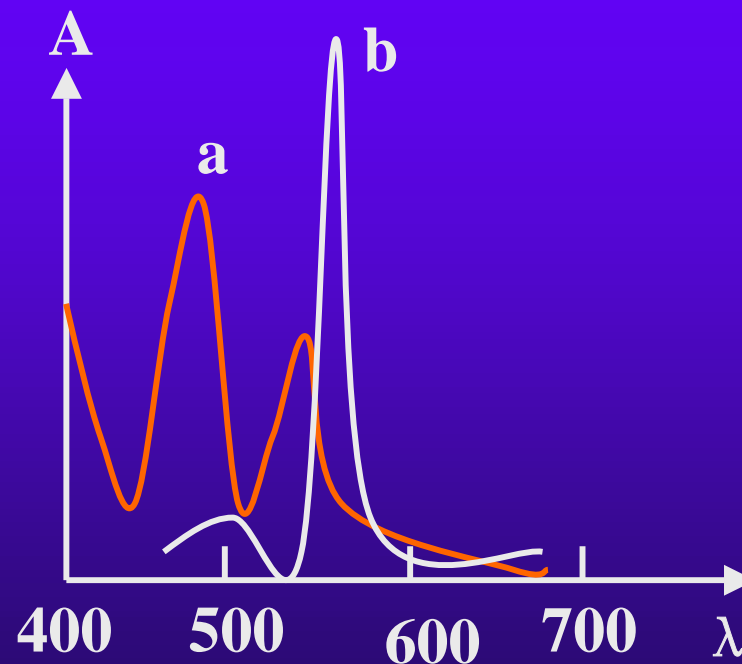
②酸效应

被测组分通过显色反应，生成一种吸光物质，而溶液的酸度往往会影响吸光物质的产生、分解和性质，而使吸收曲线的形状和最大吸收波长发生变化，从而导致对朗伯—比耳定律的偏离。

③溶剂效应

有时溶剂会影响吸光物质的性质及吸收特性。例如： I_2 在 CCl_4 中呈紫色，其最大吸收波长在**570nm**左右，在乙醇中呈红棕色，其最大吸收波长为**490nm**左右。

- a——以乙醇为溶剂
- b——以 CCl_4 为溶剂





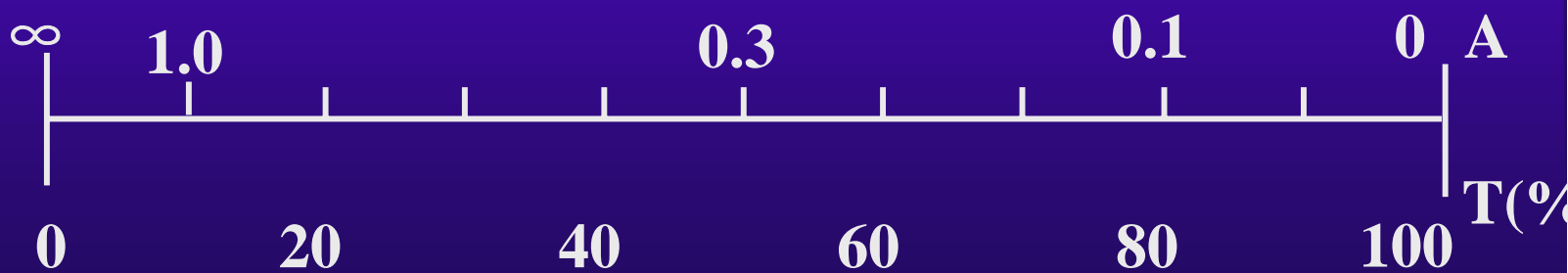
三、光度测量误差及实验条件的选择

1、光度测量误差

若光电流的测量误差为 ΔI \longrightarrow 光强测定误差的 ΔI \longrightarrow 透光率的测定误差为 ΔT ；对于同一台仪器， ΔT 一般为一定值——0.01—0.02。

但是 $A = -\lg T$

即：相同的 ΔT ，由于 A 值不同引起吸光度的误差也不同。检流计的标尺显示 ΔA 随 A 增大而增大。



由于: $A \propto C$

$\therefore \Delta C \propto \Delta A$ 即: $\Delta C = K' \cdot \Delta A$

显然: 若C较低时, A很小, 因 ΔT 引起的 ΔA 很小 \longrightarrow ΔC 很小, 然而,
 $\frac{\Delta C}{C} \times 100\%$ 仍很大。

若C较大时, A很大, 故 ΔA 、 ΔC 均较大, 相对误差 $\frac{\Delta C}{C} \times 100\%$ 也较大。

结论: 紫外—可见分光光度分析中, 样品浓度过高或过低均会引起较大误差。



到底被测物在什么浓度下或什么浓度范围内时，紫外—可见分光光度分析的透光率测定误差引起的浓度测定的相对误差小些呢？

$$A = -\lg T = abc = K' \cdot C$$

$$K' = \frac{A}{C}$$

$$A = -\frac{1}{2.3} \ln T = K' \cdot C$$

$$dA = -0.434 \frac{dT}{T} = K' \cdot dC$$



把 $K' = \frac{A}{C}$ 代入上式：

$$dA = -0.434 \frac{dT}{T} = \frac{dC}{C} \cdot A$$

$$\therefore \frac{dA}{A} = -0.434 \frac{dT}{TA} = \frac{dC}{C}$$

$$\therefore \frac{dC}{C} \times 100\% = \frac{0.434 dT}{T \cdot \lg T} \times 100\%$$

浓度测量误差不仅与仪器光度测量误差dT有关，而且与T有关。



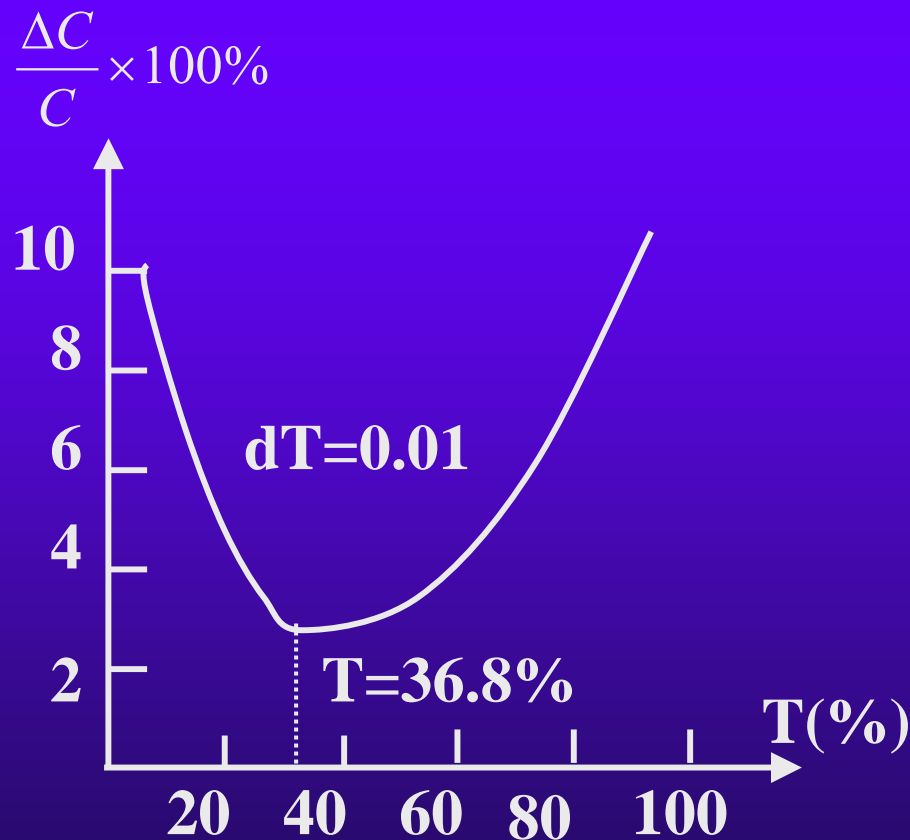
浓度测量误差 ($\frac{\Delta C}{C} \times 100\%$) 不仅与仪器光度测量误差 dT 有关, 而且与 T 有关, 设 $dT=0.01$, 作出 $\frac{\Delta C}{C} \times 100\%$ — T 的关系曲线, 当: $T = 0.368$ 时,

即:

$A = -\lg T = 0.434$ 时, 浓度测定误差最小。故通常取

$T = 15\%—65\%$,

即: $A=0.2—0.8$ 为紫外—可见分光光度分析的吸光度范围或称浓度范围。





2、实验条件的选择

①入射光波长

为了提高测定的灵敏度，入射光的波长应选择被测物的最大吸收波长 λ_{\max} ，如果 λ_{\max} 有干扰，可选择另一条灵敏度稍低，但能避免干扰的谱线，所以，适当选择入射光的波长，不仅能提高测定的灵敏度，还能提高测定的准确度。

②控制适当的吸光度范围0.2—0.8

可从二个方面着手解决：

- a: 控制被测物浓度 ($A = \varepsilon bC$)
- b: 改变吸收池厚度



③选择适当的狭缝宽度

狭缝宽度过大——入射光的单色性差
狭缝宽度太小——入射光的光强减弱
均会造成灵敏度降低，最佳选择是产生最小误差情况下的最大狭缝。

④选择适当的参比溶液作空白

用参比溶液调节仪器的零点（满度）以消除由于样品池及溶剂、干扰物质对入射光的反射和吸收带来的误差，故不同情况应选择不同的空白。





- a、若被测液 (M)，显色剂(R)及其它试剂均为无色， H_2O 作空白。
- b、若显色剂与其它试剂均无色，而被测液中其它离子有色时，不加显色剂的可被测液作参比。
- c、若显色剂、其它试剂及被测液均有色，可在被测液中加入掩蔽剂，使被测组分掩蔽起来而不与显色剂作用，然后再加入显色剂的溶液作参比溶液，这样，可以消除一些共有离子的干扰。



⑤采用适当手段消干扰离子的干扰

a、掩蔽

在被测液中加入能与干扰物质产生稳定的无色络合物的试剂，使干扰物不与显色剂作用，如以 SCN^- 作显色剂测定 Co^{2+} 时， Fe^{3+} 的干扰可用加入 F^- 消除

b、改变干扰物的存在形态。

例如：铬菁R与 Al^{3+} 作用生成紫红色水溶性配合物， $\lambda_{max}=535nm$ ， $\epsilon = 6.5 \times 10^4 L/mol.cm$
 Fe^{3+} 对 Al^{3+} 的测定有干扰，可用抗坏血酸或其它还原剂将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ，即使 Fe^{3+} 含量为 Al^{3+} 的一百倍也不干扰。



c.分析物与干扰物分离

有时用上述方法也不能排除干扰时，只好通过前处理，使分析物与干扰物相互分离，然后再进行分析，常用的分离方法有：萃取法、离子交换法、电解法、色谱法。

⑥被测溶液的酸度

酸度对吸光光度分析的影响很复杂，它可以影响配合反应的进行程度，改变金属离子的存在形式和显色剂的颜色，为了选择合成的pH，必须综合考虑各方面的影响。

显色剂大多是有机弱酸，存在离解平衡。



然后与金属离子配合



K_{MR} 为MR的不稳定常数

当溶液的酸度增大时，配合物将被分解：



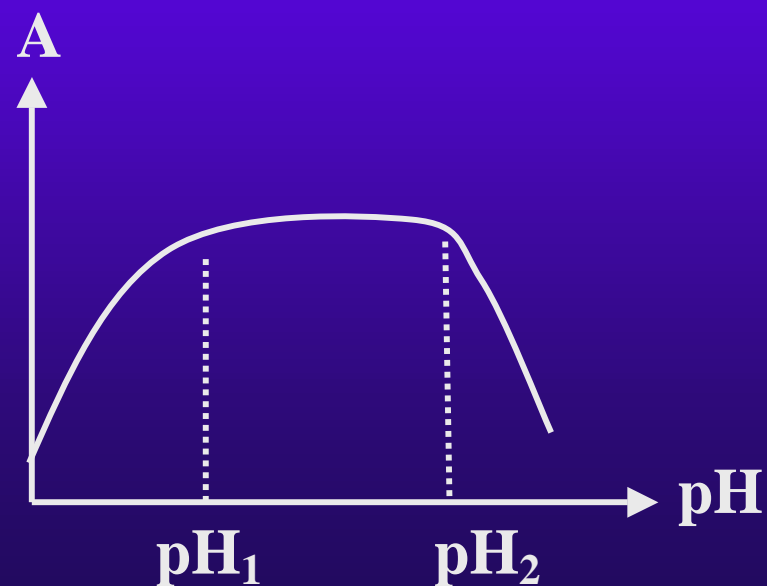


$$K = \frac{[HR] \cdot [M]}{[MR] \cdot [H^+]} = \frac{[HR] \cdot [M][R]}{[MR] \cdot [H^+] \cdot [R]} = \frac{K_{MR}}{K_{HR}}$$

$$\therefore [H^+] = [HR] \cdot \frac{K_{HR}}{K_{MR}} \cdot \frac{[M]}{[MR]}$$

当[HR]一定时，不同酸度下的 $\frac{[M]}{[MR]}$ 与pH有关，选择合适的酸度有利于灵敏度的提高。

通常，适宜酸度是通过实验作A—pH曲线确定的。





⑦显色剂的用量

为了使显色反应尽可能的完全，使测定有尽可能大的灵敏度，通常，加入比理论值稍过量的显色剂是必要的，那么，是否加得越多越好呢？不！加得太多，一则没有必要，二则会引起一些副反应，而使测定产生误差。

通常通过在固定被测离子浓度及其它条件的情况下，改变显色剂浓度 C_R ，作 $A \sim \text{pH}$ 曲线确定显色剂的用量

⑧显色反应时间和温度

不同显色反应的速度是不同的，而且反应温度对反应的速度以及反应产物等均有影响，故在分析前，必须对反应时间和温度的影响加以研究，有些难以控制时间的显色反应，需用流动注射分析法。