



工科基础化学系列教材

分光光度分析

赵桦萍 赵立杰 白丽明 主编

哈尔滨工业大学出版社

工科基础化学系列教材

分 光 光 度 分 析

赵桦萍 赵立杰 白丽明 主编

哈爾濱工業大學出版社

内 容 简 介

全书共五章,内容包括分光光度法的基础理论、分析方法和应用等三部分。主要阐述分光光度分析的基础理论,包括吸收定律、光度分析法设计、光度分析法的误差、吸光光度法的灵敏度和测定限、吸光光度分析中标准溶液的配制、分光光度计的结构和类型等;分光光度分析增效体系及其应用;偶氮胂和偶氮膦类显色剂、荧光酮类显色剂、吡啶类试剂、吡啶偶氮类试剂、三氮烯类显色剂的结构及其应用;介绍了一些较新的分光光度测定方法。对动力学分光光度法、固相分光光度法、浮选分光光度法、析相液-液萃取光度法、差示分光光度法、全差示光度法、双波长和三波长分光光度法、导数光度法等原理及应用作了较详细地阐述。

本书可作为大学化学分析专业高年级本科生或研究生的教材,也可作为从事光度分析的科研及生产一线人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分光光度分析/赵桦萍等主编. —哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2007.5

ISBN 7-5603-2427-4

I.分… II.赵… III.分光光度法-化学分析-高等学校-教材 IV.0657.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 059062 号

责任编辑 田 秋

封面设计 卞秉利

出版发行 哈尔滨工业大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街 10 号 邮编 150006

传 真 0451-86414749

网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>

印 刷 哈尔滨市工大节能印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 14 字数 341 千字

版 次 2007 年 5 月第 1 版 2007 年 5 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 7-5603-2427-4/TQ·16

定 价 26.00 元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

前 言

分光光度法是获得物质光吸收特性、定量信息的重要手段。光度法由于具有灵敏度高、选择性好、仪器操作简便、适用面广等特点,在冶金、地质、生物、医学、环境监测、食品卫生等领域已得到广泛应用。

近年来,新显色剂的不断出现、表面活性剂的引入、新的测定方法和计算方法的引用,使该方法的选择性和灵敏度大为提高。

本书是作者在从事多年教学和科研工作的基础上,参阅国内外的文献资料编写的。作者试图在内容上尽量反映国内外最新研究成果,在叙述上力求深入浅出,论证严谨,说理清楚,以期为广大分析化学工作者、青年教师、研究生、大学高年级学生提供一本有益的参考书。

全书共五章,内容包括基础理论、分析方法和应用等三部分。第一章主要阐述分光光度分析的基础理论,包括吸收定律、光度分析法设计、光度分析法的误差、吸光光度法的灵敏度和测定限、吸光光度分析中标准溶液的配制。第二章主要阐述分光光度计的结构和类型等。第三章介绍了分光光度分析增效体系及其应用。第四章分门别类地介绍了偶氮肿和偶氮膦类显色剂、荧光酮类显色剂、卟啉类试剂、吡啶偶氮类试剂、三氮烯类显色剂的结构及其应用。第五章介绍了一些较新的分光光度测定方法,对动力学分光光度法、固相分光光度法、浮选分光光度法、析相液-液萃取光度法、差示分光光度法、全差示光度法、双波长和三波长分光光度法、导数光度法的原理及应用等做了较详细地阐述。

赵粹萍编写第一至第三章,赵立杰编写第四章,白丽明编写第五章及参考文献。

由于作者学术水平有限,经验不足,书中缺点疏漏在所难免,恳请读者批评指正。

编 者
2007 年 1 月

目 录

第一章 吸光光度法的基本原理	(1)
第一节 方法原理简介	(1)
第二节 光度分析法设计	(2)
第三节 光度分析法的误差	(6)
第四节 吸光光度法的灵敏度和测定限	(9)
第五节 吸光光度分析中标准溶液的配制	(13)
第六节 精密测定中比色皿的校正	(23)
第二章 分光光度计	(25)
第一节 紫外-可见光光度计组件	(25)
第二节 近代分光光度计	(43)
第三节 分光光度计的安装和性能测试	(51)
第四节 分光光度计的保养和维护	(57)
第三章 分光光度分析中的增效体系	(59)
第一节 胶束增效体系	(59)
第二节 水溶性大分子化合物增效体系	(66)
第三节 环糊精增效体系	(68)
第四章 光度分析中的显色剂	(72)
第一节 有机显色剂的重要地位及发展	(72)
第二节 偶氮胂和偶氮膦类显色剂	(72)
第三节 荧光酮类显色剂	(98)
第四节 卟啉类试剂	(115)
第五节 吡啶偶氮类试剂	(124)
第六节 三氮烯类显色剂	(135)
第五章 分光光度的测定方法	(145)
第一节 动力学分光光度法	(145)
第二节 速差动力学分光光度法	(151)
第三节 固相分光光度法	(154)
第四节 浮选分光光度法	(156)
第五节 析相液-液萃取光度法	(160)
第六节 差示分光光度法	(161)
第七节 全差示光度法	(166)
第八节 双波长和三波长分光光度法	(168)
第九节 导数光度法	(186)
第十节 全内反射长毛细管吸收池(TR-LCC)分光光度法	(202)
参考文献	(206)

第一章 吸光光度法的基本原理

第一节 方法原理简介

吸收定律

朗伯定律:入射光被溶液吸收的多少与液层厚度成比例。

比耳定律:在单色光条件下,入射光被溶液吸收的多少与溶液的浓度成比例。

这两条定律合在一起叫朗伯 - 比耳定律。

朗伯 - 比耳定律可总结为溶液对光吸收的程度与液层厚度和溶液浓度的乘积成正比。其数学式可表示为

$$\lg \frac{I_0}{I} = abc \quad (1.1)$$

I_0 为入射单色光的强度, I 为透射光的强度, c 为比色皿中有色溶液的浓度, b 为液层厚度。 $\lg(I_0/I)$ 表示光通过溶液时被吸收的程度。如果光完全不被吸收, 则 $I = I_0$, $\lg(I_0/I) = 0$; 如果被吸收程度越大, 则 I 远小于 I_0 , $\lg(I_0/I)$ 值也就越大。一般把 $\lg(I_0/I)$ 称为“消光度”(E) 又称“光密度(D)”或“吸光度(A)”

$$A = abc \quad (1.2)$$

式中 a 为一常数, 称为吸光系数; 如果溶液浓度以摩尔/升表示, 液层厚度以厘米表示, 则此常数称为“摩尔吸光系数”以 ϵ 表示, 即 $A = \epsilon bc$ 。摩尔吸光系数的物理意义是: 一个摩尔浓度的有色溶液放在 1 厘米厚的比色皿中, 在一定波长下测得吸光度的数值。有色化合物颜色愈深则 ϵ 值愈大, 该显色反应也愈灵敏。

如果在比色时, 比色皿厚度确定后 (b 为常数), 则吸光度只与浓度成正比。 $A = \epsilon c$, 此式为比耳定律的数学表达式。它只是在单色光以及比色皿厚度一定时, 在一定浓度范围内才成立。

吸光度具有加和性质, 即混合物的总吸光度应等于各成分的吸光度之总和。

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \cdots$$

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\% = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \epsilon_3 bc_3 + \cdots = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \epsilon_3 c_3 + \cdots) b \quad (1.3)$$

这一性质对多组分测定是有用的。

此外, 吸收强度的变化用透光度 (T) 表示, 即

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\% \quad (1.4)$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} \quad (1.5)$$

透光度不具有加和的性质。

第二节 光度分析法设计

一、显色反应

测定某种物质时,如果待测物质本身有较深的颜色,就可以进行直接测定,但大多数待测物质是无色或很浅颜色的,故需要选适当的试剂与被测离子反应生成有色化合物再进行测定,这是分光光度法测定金属离子最常用的方法。此反应称为显色反应,所用的试剂称为显色剂。

1. 显色反应的选择

按显色反应的类型来分,主要有氧化还原反应和络合反应两大类,而络合反应是最主要的。对于显色反应一般应满足下列要求。

- (1) 选择性好,干扰少,或干扰容易消除。
- (2) 灵敏度足够高,有色物质的 ϵ 应大于 10^4 。
- (3) 有色化合物的组成恒定,符合一定的化学式。对于形成不同络合比的络合反应,必须注意控制实验条件,使生成一定组成的络合物,以免引起误差。
- (4) 有色化合物的化学性质应足够稳定,至少保证在测量过程中溶液的吸光度基本恒定。这就要求有色化合物不容易受外界环境条件的影响,如日光照射、空气中的氧和二氧化碳的作用等,此外,也不应受溶液中其他化学因素的影响。
- (5) 有色化合物与显色剂之间的颜色差别要大,即显色剂对光的吸收与络合物的吸收有明显区别,一般要求两者的吸收峰波长之差 $\Delta\lambda$ (称为对比度) 大于 60 nm。

2. 显色剂

在光度分析中常用的是有机显色剂,有机显色剂及其产物的颜色与它们的分子结构有密切关系。有机显色剂分子中一般都含有生色团和助色团。生色团是某些含有不饱和键的基团如偶氮基、对醌基、和羰基等。这些基团中的 π 电子被激发时所需能量较小,波长 200 nm 以上的光就可以做到,故往往可以吸收可见光而表现出颜色。助色团是某些含孤对电子的基团,如氨基、羟基和卤代基等。这些基团与生色团上的不饱和键作用,可以影响生色团对光的吸收,使颜色加深。

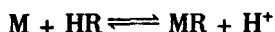
二、显色条件的选择

确定了显色反应以后,还要确定合适的反应条件,这一般是通过实验研究来得到的。这些实验条件包括:溶液酸度,显色剂用量,试剂加入顺序,显色时间,显色温度,有机络合物的稳定性及共存离子的干扰等。

1. 溶液的酸度

酸度对显色反应的影响主要表现为以下几方面。

(1) 影响显色剂的平衡浓度和颜色。显色反应所用的显色剂不少是有机弱酸, 显然, 溶液酸度的变化, 将影响显色剂的平衡浓度, 并影响显色反应的完全程度。例如, 金属离子 M 与显色剂 HR 作用, 生成有色络合物 MR , 即



可见增大溶液的酸度, 将对显色反应不利。

另外, 有一些显色剂具有酸碱指示剂的性质, 即在不同的酸度下有不同的颜色。例如 1-(2-吡啶偶氮) 间苯二酚 (PAR), 当溶液的 $pH < 6$ 时, 它主要以 H_2R 形式 (黄色) 存在; 在 $pH = 7 \sim 12$ 时, 主要以 HR^- 形式 (橙色) 存在; $pH > 13$ 时, 主要以 R^{2-} 形式 (红色) 存在。大多数金属离子和 PAR 生成红色或红紫色络合物, 因而 PAR 只适宜在酸性或弱碱性中进行光度测定。在强碱性溶液中, 显色剂本身已显红色, 光度测定难以进行。又如, 二甲酚橙在 $pH < 6$ 时呈黄色, $pH > 6$ 时呈红色。而二甲酚橙与金属离子生成红色络合物, 因此, 光度测定只能在稀酸或弱酸介质中进行。

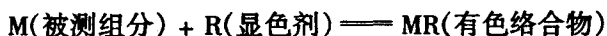
(2) 影响被测金属离子的存在状态。大多数金属离子很容易水解, 当溶液的酸度降低时, 它们在水溶液中除了以简单的金属离子形式存在之外, 还可能形成一系列羟基或多核羟基络离子。酸度更低时, 可能进一步水解生成碱式盐或氢氧化物沉淀。这都影响着显色反应的进行。

(3) 影响络合物的组成。对于某些生成逐级络合物的显色反应, 酸度不同, 络合物的络合比往往不同, 其颜色也不同。例如磺基水杨酸与 Fe^{3+} 的显色反应, 当溶液 pH 为 1.8 ~ 2.5, 4 ~ 8, 8 ~ 11.5 时, 将分别生成络合比为 1:1 (紫红色)、1:2 (棕褐色) 和 1:3 (黄色) 三种颜色的络合物, 故测定时应严格控制溶液的酸度。

显色反应的适宜酸度是通过实验来确定的。具体方法是: 固定溶液中被测组分与显色剂的浓度, 调节溶液不同的 pH , 测定溶液吸光度。用 pH 作横坐标, 吸光度作纵坐标, 作出 pH 与吸光度关系曲线, 从中找出适宜的 pH 范围。

2. 显色剂的用量

显色反应一般可用下式表示为



为了使显色反应进行完全, 一般需加入过量的显色剂。但显色剂不是越多越好。对于有些显色反应, 显色剂加入太多, 反而会引起副反应, 对测定不利。在实际工作中, 通常根据实验结果来确定显色剂的用量。显色剂浓度对显色反应的影响一般有三种可能的情况, 如图 1.1(a)、(b) 和 (c) 所示。

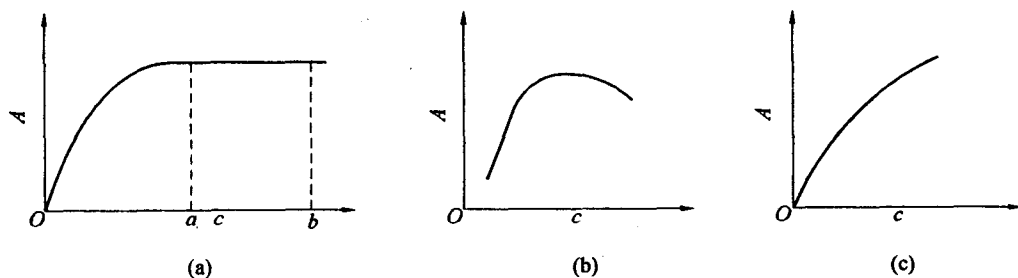


图 1.1 试剂吸光度与显色剂浓度的关系

其中图 1.1(a) 的曲线形状比较常见,当显色剂用量达到某一数值时,吸光度不再增大,出现 ab 平坦部分,这意味着显色剂用量已足够,于是可在 ab 之间选择合适的显色剂用量。图 1.1(b) 与图 1.1(a) 不同之处是平坦部分较窄,即当显色剂浓度继续增大时,试液的吸光度反而下降。例如用 SCN^- 测定 Mo(V) 时, Mo(V) 与 SCN^- 生成 Mo(SCN)_2^+ (浅红)、 Mo(SCN)_3 (橙红)、 Mo(SCN)_6^- (浅红) 配位数不同的络合物,用吸光度法测定时,通常测得的是 Mo(SCN)_3 的吸光度。因此,如果 SCN^- 浓度太高,由于生成浅红色的 Mo(SCN)_6^- 络合物,将使试液的吸光度降低。遇此情况,必须严格控制显色剂的量,否则得不到正确的结果。图 1.1(c) 与前两种情况完全不同,随显色剂用量增大,试液的吸光度也增大。例如用 SCN^- 测定 Fe^{3+} ,随着 SCN^- 浓度的增大,生成颜色越来越深的高配位数络合物 Fe(SCN)_4^- 和 Fe(SCN)_5^{2-} ,溶液颜色由橙黄变至血红色。对于这种情况,只有严格地控制显色剂的用量,才能得到准确的结果。

3. 显色反应时间

有些显色反应瞬间完成,溶液颜色很快达到稳定状态,并在较长时间内保持不变;有些显色反应虽能迅速完成,但有色络合物的颜色很快开始褪色;有些显色反应进行缓慢,溶液颜色需经一段时间后才稳定。因此,必须经实验来确定最合适测定的时间区间。实验方法为:配制一份显色溶液,从加入显色剂起计算时间,每隔几分钟测量一次吸光度,制作吸光度 - 时间曲线,根据曲线来确定适宜时间。

4. 显色反应温度

通常,显色反应大多在室温下进行。但是,有些显色反应必需加热至一定温度才能完成。例如,用硅钼酸法测定硅的反应,在室温下需 10 min 以上才能完成;而在沸水浴中,则只需 30 s 便能完成。许多有色化合物在温度较高时容易分解,如 MnO_4^- 溶液长时间煮沸就会与水中的微生物或有机物反应而褪色。

5. 溶剂

有机溶剂常降低有色化合物的解离度,从而提高显色反应的灵敏度。如在 Fe(SCN)_3 的溶液中加入与水混溶的有机溶剂(如丙酮),由于降低了 Fe(SCN)_3 的解离度而使颜色加深,提高了测定的灵敏度。此外,有机溶剂还可能提高显色反应的速率,影响有色络合物的溶解度和组成等。如用偶氮氯膦 III 法测定 Ca^{2+} ,加入乙醇后,吸光度显著增大。又如,用氯代磺酚 S 法测定铈(V) 时,在水溶液中显色需几小时,加入丙酮后,则只需 30 min。

6. 干扰及其消除方法

试样中存在干扰物质会影响被测组分的测定。例如干扰物质本身有颜色或与显色剂反应,在测量条件下也有吸收,造成正干扰。干扰物质与被测组分反应或与显色剂反应,使显色反应不完全,也会造成干扰。干扰物质在测量条件下从溶液中析出,使溶液变混浊,无法准确测定溶液的吸光度。

为消除以上原因引起的干扰,可采取以下几种方法。

(1) 控制溶液酸度。例如用二苯硫脲法测定 Hg^{2+} 时, Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Bi^{3+} 等均可能发生反应,但如果在稀酸($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$) 介质中进行萃取,则上述离子不再与二苯硫脲作用,从而消除其干扰。

(2) 加入掩蔽剂。选取的条件是掩蔽剂不与待测离子作用,掩蔽剂以及它与干扰物质形成的络合物的颜色应不干扰待测离子的测定。如用二苯硫脲法测 Hg^{2+} 时,即使在 0.5

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 介质中进行萃取,尚不能消除 Ag^+ 和大量 Bi^{3+} 的干扰。这时,加 KSCN 掩蔽 Ag^+ 用 EDTA 掩蔽 Bi^{3+} 可消除其干扰。

(3) 利用氧化还原反应,改变干扰离子的价态。如用铬天青 S 比色测定 Al^{3+} 时, Fe^{3+} 有干扰,加入抗坏血酸将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 后,干扰即消除。

(4) 利用校正系数。例如用 SCN^- 测定钢中钨时,可利用校正系数扣除钒(V)的干扰,因为钒(V)与 SCN^- 生成蓝色 $(\text{NH}_4)_2[\text{VO}(\text{SCN})_4]$ 络合物而干扰测定。实验表明,质量分数为 1% 的钒相当于 0.20% 钨(随实验条件不同略有变化)。这样,在测得试样中钒的量后,就可以从钨的结果中扣除钒的影响。

(5) 利用参比溶液消除显色剂和某些共存有色离子的干扰。例如,用铬天青 S 比色法测定钢中的铝, Ni^{2+} , Co^{2+} 等干扰测定。为此可取一定量试液,加入少量 NH_4F , 使 Al^{3+} 形成 AlF_6^{3-} 络离子而不再显色,然后加入显色剂及其他试剂,以此作参比溶液,以消除 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 对测定的干扰。

(6) 选择适当的波长。例如 MnO_4^- 的最大吸收波长为 525 nm, 测定 MnO_4^- 时,若溶液中有 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 存在,由于它在 525 nm 处也有一定的吸收,故影响 MnO_4^- 的测定。为此,可选用 545 nm 甚至 575 nm 波长进行 MnO_4^- 的光度测定。这时,测定灵敏度虽较低,但却在很大程度上消除了 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 的干扰。

(7) 当溶液中存在有消耗显色剂的干扰离子时,可以通过增加显色剂的用量来消除干扰。

(8) 分离。若上述方法均不能奏效时,只能采用适当的预先分离的方法。

三、测量波长和吸光度范围的选择

1. 测量波长的选择

为了使测定结果有较高的灵敏度,应选择被测物质的最大吸收波长的光作为入射光,这称为“最大吸收原则”。选用这种波长的光进行分析,不仅灵敏度高,而且能够减少或消除由非单色光引起的对朗伯-比尔定律的偏离。

但是,如果在最大吸收波长处有其他吸光物质测定时,则应根据“吸收最大、干扰最小”的原则来选择入射光波长。例如用丁二酮肟光度法测定钢中镍,络合物丁二酮肟镍的最大吸收波长为 470 nm(图 1.2),但试样中的铁用酒石酸钠掩蔽后,在 470 nm 处也有一定吸收,干扰对镍的测定。为避免铁的干扰,可以选择波长 520 nm 进行测定。在 520 nm 虽然测镍的灵敏度有所降低,但酒石酸铁的吸光度很小,可以忽略,因此不干扰镍的测定。

2. 吸光度范围的选择

从仪器测量误差的角度来看,为了使测量结果得到较高的准确度,一般应控制标准溶液和被测试液的吸光度在 0.2 ~ 0.8 范围内。可通过控制溶液的浓度或选择不同厚度

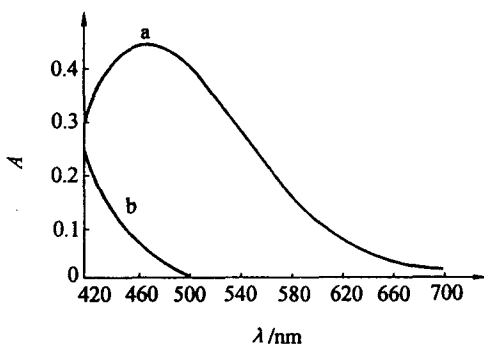


图 1.2 吸收曲线

a—丁二酮肟镍; b—酒石酸铁

的吸收池来达到目的。

四、参比溶液的选择

在进行光度测量时,利用参比溶液来调节仪器的零点,可以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。参比溶液可根据下列情况来选择。

- (1) 当试液及显色剂均无色时,可用蒸馏水作参比溶液。
- (2) 显色剂为无色,而被测试液中存在其他有色离子,可用不加显色剂的被测试液作参比溶液。
- (3) 显色剂有颜色,可选择不加试样溶液的试剂空白作参比溶液。
- (4) 显色剂和试液均有颜色,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,这样就可以消除显色剂和一些共存组分的干扰。
- (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干扰。

五、标准曲线的制作

根据光的吸收定律:吸光度与吸光物质的含量成正比,这是光度法进行定量的基础,标准曲线就是根据这一原理制作的。具体方法为:在选择的实验条件下分别测量一系列不同含量的标准溶液的吸光度,以标准溶液中待测组分的含量为横坐标,吸光度为纵坐标作图,得到一条通过原点的直线,称为标准曲线(或工作曲线)。此时测量待测溶液的吸光度,在标准曲线上就可以查到与之相对应的被测物质的含量。

在实际工作中,有时标准曲线不通过原点。造成这种情况的原因比较复杂,可能是由于参比溶液选择不当,吸收池厚度不等,吸收池位置不妥,吸收池透光面不清洁等原因所引起的。若有色络合物的解离度较大,特别是当溶液中还有其他络合剂时,常使被测物质在低浓度时显色不完全。应针对具体情况进行分析,找出原因,加以避免。

第三节 光度分析法的误差

吸光光度法的误差主要来自两方面:一是偏离朗伯 - 比尔定律;二是吸光度测量引起的误差。

一、对朗伯 - 比尔定律的偏离

在吸光光度分析中,经常出现标准曲线不呈直线的情况,特别是当吸光物质浓度较高时,明显地看到通过原点向浓度轴弯曲的现象(个别情况向吸光度轴弯曲)。这种情况称为偏离朗伯 - 比尔定律(图 1.3)。若在曲线弯曲部分进行定量,将会引起较大的误差。在一般情况下,如果偏离朗伯 - 比尔定律的程度不严重,即标准曲线弯曲程度不严重,该曲线仍可用于定量分析。

偏离朗伯 - 比尔定律的原因主要是仪器或溶液的实际条件与朗伯 - 比尔定律所要求的理想条件不一致。

1. 非单色光引起的偏离

严格说,朗伯 - 比尔定律只适用于单色光,但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人射光实际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 - 比尔定律的偏离。

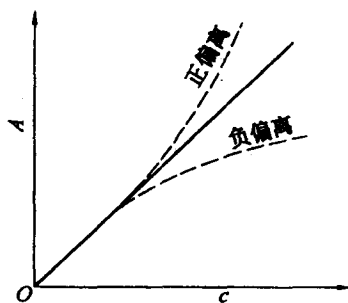


图 1.3 标准曲线及对朗伯 - 比尔定律的偏离

为克服非单色光引起的偏离,应尽量使用比较好的单色器,从而获得纯度较高的“单色光”,使标准曲线有较宽的线性范围。此外,应将入射光波长选择在被测物质的最大吸收处,这不仅保证了测定有较高的灵敏度,而且由于此处的吸收曲线较为平坦,在此最大吸收波长附近各波长的光的 ϵ 值大体相等(图 1.4),由于非单色光引起的偏离要比在其他波长处小得多。另外,测定时应选择适当的浓度范围,使吸光度读数在标准曲线的线性范围内。

2. 介质不均匀引起的偏离

朗伯 - 比尔定律要求吸光物质的溶液是均匀的。如果被测溶液不均匀,是胶体溶液、乳浊液或悬浮液时,入射光通过溶液后,除一部分被试液吸收外,还有一部分因散射现象而损失,使透射比减少,因而实测吸光度增加,使标准曲线偏离直线向吸光度轴弯曲。故在光度法中应避免溶液产生胶体或混浊。

3. 由于溶液本身的化学反应引起的偏离

溶液对光的吸收程度决定于吸光物质的性质和数目,溶液中的吸光物质常因解离、络合、缔合形成新化合物或互变异构等化学变化而改变其浓度,因而导致偏离朗伯 - 比尔定律。

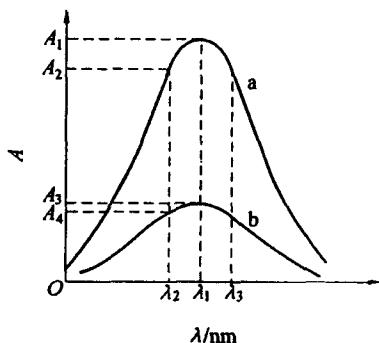


图 1.4 非单色光的影响

(1) 解离。大部分有机酸碱的酸式、碱式对光有不同的吸收性质,溶液的酸度不同,酸(碱)解离程度不同,导致酸式与碱式的比例改变,使溶液的吸光度发生改变。

(2) 络合。如果显色剂与金属离子生成的是多级络合物,且各级络合物对光的吸收性质不同,例如在 $\text{Fe}(\text{III})$ 与 SCN^- 的络合物中, $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 颜色最深, $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ 颜色最浅,故 SCN^- 浓度越大,溶液颜色越深,即吸光度越大。

(3) 缔合。例如在酸性条件下, CrO_4^{2-} 会缔合生成 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$;而它们对光的吸收有很大的不同。

在分析测定中,要控制溶液的条件,使被测组分以一种形式存在,就可以克服化学因素所引起的对朗伯 - 比尔定律的偏离。

二、吸光度测量的误差

在吸光光度分析中,除了各种化学条件所引起的误差外,仪器测量不准确也是误差的主要来源。任何光度计都有一定的测量误差。这些误差可能来源于光源不稳定,实验条件的偶然变动,读数不准确等。在吸光光度分析中,我们一定要考虑到这些偶然误差对测定的影响。

在光度计中,透射比的标尺刻度是均匀的。吸光度与透射比为负对数关系,故它的标尺刻度是不均匀的。因此,对于同一台仪器,读数的波动对透射比来说,应基本上为一定值;而对吸光度来说,它的读数波动则不再为定值。由光度计读数标尺上吸光度与透射比的关系可以看出,吸光度越大,读数波动所引起的吸光度误差也越大(图 1.5)。

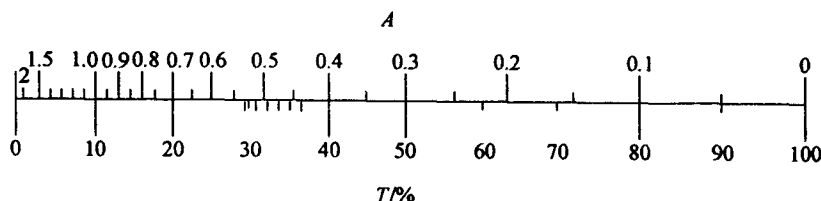


图 1.5 检流计标尺上吸光度与透射比的关系

透射比(或吸光度)在什么范围内具有较小的浓度测量误差呢?首先考虑吸光度 A 的测量误差与浓度 c 的测量误差之间的关系。若在测量吸光度 A 时产生了一个微小的绝对误差 dA ,则测量 A 的相对误差(E_r)为

$$E_r = \frac{dA}{A} \quad (1.6)$$

根据朗伯 - 比尔定律,即

$$A = \epsilon bc$$

当 b 为定值时,两边微分得到

$$dA = \epsilon b dc$$

dc 就是测量浓度 c 的微小的绝对误差。二式相除得到

$$\frac{dA}{A} = \frac{dc}{c} \quad (1.7)$$

可见,由于 c 与 A 成正比,则测量的绝对误差 dc 与 dA 也成正比;而测量的相对误差完全相等。 A 与 T 的测量误差之间的关系为

$$A = -\lg T = -0.434 \ln T$$

微分

$$dA = -0.434 \frac{dT}{T}$$

$$\frac{dA}{A} = \frac{dT}{T \ln T} \quad (1.8)$$

可见,由于 A 与 T 不是正比例关系,它们的测量相对误差并不相等。

于是,由噪音引起的浓度 c 的测量相对误差为

$$E_r = \frac{dc}{c} \times 100\% = \frac{dA}{A} \times 100\% = \frac{dT}{T \ln T} \times 100\% \quad (1.9)$$

由于 T 测量绝对误差或不确定性是固定的,即

$$dT = \Delta T = \pm 0.01$$

故

$$E_r = \frac{\Delta T}{T \ln T} \times 100\% = \pm \frac{1\%}{T \ln T} \quad (1.10)$$

浓度 c 的测量相对误差的大小与透射比 T 本身的大小有着复杂的关系,由式(1.10)可计算不同 T 时的相对误差的绝对值 $|E_r|$,根据计算结果作 $|E_r| - T$ 曲线图,如图 1.6 所示。从图中可见,透射比很小或很大时,浓度测量误差都较大,即光度测量最好选吸光度读数在刻度尺的中间而不要落在标尺的两端。在实际测定时,只要是待测溶液的透射比 T 在 15% ~ 65% 之间,或使吸光度 A 在 0.2 ~ 0.8 之间,才能保证测量的相对误差小。当吸光度 $A = 0.434$ (或透射比 $T = 36.8\%$) 时,测量的相对误差最小。

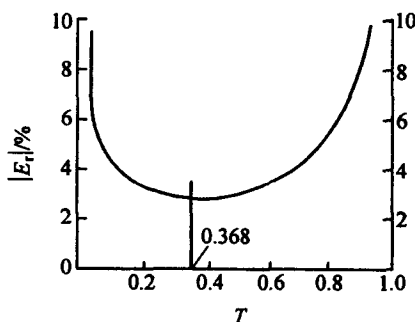


图 1.6 $|E_r| - T$ 关系图

第四节 吸光光度法的灵敏度和测定限

一、显色反应的灵敏度表示

表示显色反应灵敏度的方法有三种。

1. 摩尔吸光系数

有色化合物的摩尔吸光系数 ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), 是衡量显色反应灵敏度最重要的指标。一般认为, $\epsilon > 10^5$ 的方法是超高灵敏的方法, $\epsilon = (6 \sim 10) \times 10^4$ 的方法是高灵敏方法, $\epsilon = (2 \sim 6) \times 10^4$ 的方法是中等灵敏的方法, 而 $\epsilon < 2 \times 10^4$ 则是不灵敏的方法。

2. 比吸光系数 a

a 值相当于浓度为 1 mg/L 的待测物质溶液, 用 1 cm 长的吸收池测得的吸光度, 以 $mL \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ 表示, a 与 ϵ 的关系为

$$a = \epsilon / \text{原子量} \times 1000 \quad (1.11)$$

a 值便于比较原子量(式量)不同的物质的显色反应灵敏度。

3. 桑德尔(Sandell)指数 s

s 值表示用 1 cm 吸收池测得吸光度为 0.001 时, 每毫升溶液中待测物质的微克数, 以 $\mu g \cdot cm^{-2}$ 表示, s 与 ϵ 的关系为

$$s = \frac{F}{\epsilon} \quad (1.12)$$

式中 F 表示待测物质的式量。

二、影响摩尔吸光系数的因素

1. 吸收谱带半宽度对摩尔吸光系数的影响

根据 $A = \epsilon bc$, 如果有色化合物 ϵ 值为 10^5 , 此值相当于 1 mol 有色分子的有效截面为 10^8 cm^2 , 而每个有色分子的平均有效截面为 $10^8 \text{ cm}^2 / (6.023 \times 10^{23}) = 1.7 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 = 1.3 \text{ \AA}^2$, 实际上, 有效截面积为 $1.3 \text{ \AA}^2$ 的有色分子, 其 ϵ 值一般小于 10^5 。由于紫外 - 可见分子吸收光谱是分子中价电子跃迁产生的, 因而真正的光吸收强度并不只与吸收谱带顶峰的 $\epsilon_{\max}$ 有关而与吸收谱带的积分强度有关, 表示积分强度的物理量是振子强度 f

$$f = 4.32 \times 10^{-9} \times \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon d\nu \quad (1.13)$$

若吸收谱带为对称的高斯型带, 式(1.13) 可简化为

$$f = 4.32 \times 10^{-9} \cdot \epsilon_{\max} \cdot \Delta\nu_{1/2} \quad (1.14)$$

比较式(1.13) 和式(1.14), 可得

$$\int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon \cdot d\nu = \epsilon_{\max} \cdot \Delta\nu_{1/2} \quad (1.15)$$

式(1.15) 中, 积分限 ν_1, ν_2 表示吸收带两端边界频率, ϵ 表示不同频率下的摩尔吸光系数, $\Delta\nu_{1/2}$ 表示吸收带半峰宽频率宽度, 即谱带半宽度 [$\epsilon = \frac{1}{2} \epsilon_{\max}$ 时谱带宽度]。显然, 对一确定的谱带, $\int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon \cdot d\nu$ 值是一定的, 而 $\Delta\nu_{1/2}$ 值愈小, $\epsilon_{\max}$ 就愈大, 分光光度法的灵敏度愈高。

2. 摩尔吸光系数与跃迁几率和分子截面积的关系

辐射与物质作用时, 光子必须与分子碰撞才可能被吸收, 若每个分子的平均有效截面积为 a , 吸收光子后跃迁几率为 P , 浓度为 $C \text{ mol/L}$ 的物质置于厚度为 db 的单位截面吸收池中, 则辐射强度减弱为 $-dI$, 即

$$-dI = \frac{1}{3} P \left(\frac{CN_0}{1000} \times db \times 1 \right) a \times I \quad (1.16)$$

式中 N_0 是阿佛加德罗常数, 由于分子的取向不同, 而吸收在一定入射角方向最强, 故引入统计因子 $1/3$ 。

将式(1.16) 两边同除以 I 后积分, 得

$$\int_{I_0}^I - \frac{dI}{I} = \frac{1}{3} PCN_0 a \times \frac{1}{1000} \int_0^b db \quad (1.17)$$

$$\epsilon = \lg \frac{I_0}{I} / (C \cdot b) = \frac{PN_0 a}{3 \times 1000 \times 2.303} = 0.87 \times 10^{20} \text{ Pa} \quad (1.18)$$

式(1.18) 称为 Braude 方程式, 说明摩尔吸光系数与跃迁几率和分子有效截面积成正比。分子的有效截面积可用 X 射线或电子衍射方法测定, 对一般的有机化合物分子, a 值约为

$10\text{\AA}^2$, 如 $P = 1$, 则 $\epsilon \approx 10^5$ 。一般地说, 当 $P = 0.1 \sim 1$, $\epsilon = 10^4 \sim 10^5$; $P = 0.01 \sim 0.1$, $\epsilon = 10^3 \sim 10^4$; $P < 0.01$ 时, $\epsilon < 10^3$ 。

电子跃迁几率取决于选择定则, 遵守选择定则的跃迁几率很高, 其 $\epsilon_{\max}$ 值也较大; 不遵守选择定则的跃迁, 或是不发生跃迁或是跃迁几率很小, 因而 $\epsilon_{\max}$ 值小。选择定则说明, 自旋发生变化的跃迁是禁阻的, 其跃迁几率为 10^{-5} 数量级。由于电子自旋的改变而引起多重态的变化, 因而单重态到三重态的跃迁或三重态到单重态的跃迁都是禁阻跃迁。电子跃迁几率也与轨道空间性质有关, 两轨道空间区域重叠程度越大, 跃迁几率越大。例如, 共轭 π 键体系中, 较高能级的空间轨道与低能级的轨道分布区域靠得较近, 有较大程度的重叠, 电子跃迁几率显著增大, 其摩尔吸光系数较大, 在甲醛分子中, π 和 π^* 轨道处在同一平面内, 并有一定程度的空间重叠, 而 n 轨道则在 π^* 轨道的截面内, 空间重叠小, 因此, 羰基中 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁是允许跃迁, 而 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁是禁阻跃迁。有些大环化合物和多元配合物, 具有较大的分子截面, 如四苯基卟啉分子, 经 X 射线结构分析, 其分子有效截面积为 $100\text{\AA}^2$, 按 Bruade 方程式计算, 其 ϵ 值为 8.7×10^5 , 大多数卟啉金属配合物的摩尔吸光系数在 $(2 \sim 5) \times 10^5$ 。已经发现了许多摩尔吸光系数在 10^5 以上的多元配合物显色体系, 由此可见, 增大有色化合物分子的有效截面积, 可显著地提高摩尔吸光系数。

3. 摩尔吸光系数的测定

根据 $A = \epsilon bc$, b 为定值, $\epsilon = dA/dC$, 即由 $A - C$ 工作曲线斜率计算 ϵ 值, 其中 C 为有色化合物摩尔浓度。但是, 在显色反应中, 当有色化合物的组成和稳定常数尚未准确测定时, 也难于确定反应达到平衡时生成的有色化合物的实际浓度。在实际工作中, 我们常用待测金属离子的总浓度代替反应达到平衡时有色化合物的浓度 $[ML_n]$ 然而, 即使显色剂足够过量, 金属离子也不可能全部转变为有色化合物, 因此, 用上述方法计算出的摩尔吸光系数称为表观摩尔吸光系数, 以 $\bar{\epsilon}$ 表示, 而与真实的摩尔吸光系数 ϵ 相区别, 因 $[ML_n] < C_M$, 故 $\bar{\epsilon} < \epsilon$, 配合物越稳定, $\bar{\epsilon}$ 值越接近于 ϵ , 反之, 配合物稳定性越小, ϵ 和 $\bar{\epsilon}$ 的差值越大。

Комарб 最早提出了一种测定有色配合物真实摩尔吸光系数的方法, 该法是以已知配合物组成为基础。在 $M + nL \rightleftharpoons ML_n$ 显色反应中, 假定生成配位比为 n 的配合物 ML_n , 配制一系列不同的 C_M, C_L 溶液 (C_M, C_L 分别表示金属离子和配位体浓度), 在每种溶液中, 使 $C_L = nC_M$, 任取两种溶液为一组, 则有

$$C'_L = nC'_M \quad \text{生成 } x'(\text{mol/L}) \text{ 配合物, } A' = \epsilon bx'$$

$$C''_L = nC''_M \quad \text{生成 } x''(\text{mol/L}) \text{ 配合物, } A'' = \epsilon bx''$$

$$\text{设} \quad \frac{A'}{A''} = \frac{x'}{x''} = k$$

在第一种溶液中, 有

$$[M]' = C'_M - x'$$

$$[L]' = C'_L - nx' = n(C'_M - x')$$

依质量作用定律, 有

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} = \frac{x'}{(C'_M - x')^{n+1} \cdot n^n} \quad (1.19)$$

同理在第二种溶液中, 有

$$\begin{aligned}
 [M]^n &= C_M'' - x'' \\
 [L]^n &= n(C_M'' - x'') \\
 \beta_n &= \frac{x''}{(C_M'' - x'')^{n+1} \cdot n^n}
 \end{aligned} \quad (1.20)$$

由式(1.19)和式(1.20)得

$$\begin{aligned}
 \frac{x'}{(C_M' - x')^{n+1} \cdot n^n} &= \frac{x''}{(C_M'' - x'')^{n+1} \cdot n^n} \\
 \frac{x'}{x''} &= \frac{(C_M' - x')^{n+1} \cdot n^n}{(C_M'' - x'')^{n+1} \cdot n^n} = k
 \end{aligned} \quad (1.21)$$

因 $x' = A'/\epsilon$ $x'' = A''/\epsilon b$ 代入式(1.21)有

$$\frac{C_M' \epsilon b c - A'}{C_M'' \epsilon b c - A''} = \sqrt[n+1]{k} = R$$

故

$$\epsilon = \frac{A' - RA''}{(C_M' - RC_M'')b} \quad (1.22)$$

在式(1.22)中, A' 、 A'' 、 R 可直接测得 C_M' 、 C_M'' 和 b 为已知,故可算出真实的摩尔吸光系数 ϵ 值,由多组得到的 ϵ 值,计算其平均值。

亦可采用作图处理以求得 ϵ 值。按上述方法,配制一系列溶液,使 $C_L = nC_M$, 溶液中生成 $x \text{ mol/L}$ 的配合物,则

$$\begin{aligned}
 \beta_n &= \frac{x}{(C_M - x)^{n+1} n^n} \\
 C_M - x &= \sqrt[n+1]{\frac{x}{\beta_n \cdot n^n}}
 \end{aligned} \quad (1.23)$$

因 $C_M = A/\bar{\epsilon}b$, 将 $x = A/\epsilon b$ 代入式(1.23)得

$$\frac{1}{\bar{\epsilon}} = \frac{1}{\epsilon} + \sqrt[n+1]{\frac{b^n}{n^n \cdot \epsilon \beta_n}} \cdot \frac{1}{\sqrt[n+1]{A^n}} \quad (1.24)$$

从一系列溶液中测得 A , 计算相应的 $\bar{\epsilon}$ 值,以 $1/\bar{\epsilon}$ 对 $\frac{1}{\sqrt[n+1]{A^n}}$ 作图,得到一直线,直线在纵轴上的截距即为 $1/\epsilon$,从而算出 ϵ 值,本法适用于不稳定有色配合物 ϵ 的测定,而不适用于逐级络合平衡体系。

4. 分光光度法的测定限

根据朗伯-比耳定律, $A = \epsilon b C$ 或 $C = A/(\epsilon b)$ 。显然,欲使待测组分浓度 C 尽可能小,决定于如下三个因素。

(1) 可准确测量的吸光度值 A 愈小。目前,高精度分光光度计可准确测量到 0.11 吸光度单位。并附有量程扩展装置,可将 0.01 扩展至 10、50、100 倍。

(2) 吸收池光程 b 愈长。目前已经研究过用光程为 4.5 ~ 130 m 的毛细管或石英纤维吸收管作气体分子吸收分光光度分析,在溶液分光光度法中有人研究了 1 ~ 4 m 全反射长光路毛细吸收管,用于测定天然水中超痕量磷,测定限可达 0.1 ppt 级,比常规分光光度法灵敏度提高 2 ~ 4 个数量级。在一般情况下,采用体积小,光程为 5 ~ 10 cm 的吸收池已无困难。