

0657.
0955

大型精密仪器

基本知识讲座

第 二 集

广东省科学技术委员会工作条件处编

一九八三年六月

编 者 的 话

大型精密仪器是科研、教学和生产建设的重要工具。为加强大型精密仪器的管理,提高管理人员的业务水平,一九八一年以来,我们在有关单位的大力支持下,先后举办了两期《大型精密仪器基本知识讲座》,受到了各方面的好评。事后,根据一些单位的要求,我们将讲座的内容进行了修订,并于一九八一年编印发行了《大型精密仪器基本知识讲座》第一集。现应广大读者的要求,续印发行《大型精密仪器基本知识讲座》第二集。这一集主要介绍了紫外——可见吸收光谱、红外光谱仪、荧光分光光度计、电感耦合等离子体原子发射光谱、核磁共振波谱仪、表面分析仪、高压液相色谱仪、离子色谱仪、金相显微镜、偏光显微镜、遥感仪器等十一种仪器的原理、结构、性能、用途和使用维护以及国内外的动态等基本知识,近五十万字。主要供仪器管理干部和初学仪器使用的专业人员学习之用,也可供有关科技人员参考。

本书的编辑出版,得到了广东省测试分析研究所、冶金工业部广州有色金属研究院科研办、中山大学设备处等单位和陈捷礼、曾庆湘、吴永兰、张志雄、宋清、伍宣池、刘世伟、李叙林、张兆勋、缪鸿基、关履基等同志的大力支持,分别对讲座内容进行了组稿和校审,提出了许多宝贵意见;在征订发行工作中,还得到了各省、市、自治区科委条件工作部门的大力协助。谨致深切的谢意。

由于水平所限,错误难免,欢迎批评指正。

广东省科学技术委员会工作条件处

1983年6月

目 录

编者的话

紫外——可见吸收光谱	广州市药品检验所	张景钊 (1)
红外光谱仪	冶金工业部广州有色金属研究院	张妙法 (69)
荧光分光光度计	广东省测试分析研究所	纪正训 (108)
电感耦合等离子体原子发射光谱		
.....	冶金工业部广州有色金属研究院	隋诚运 (117)
核磁共振波谱仪	广东省测试分析研究所	罗庆昌 (149)
表面分析仪	广东省测试分析研究所	韩甫田 (172)
高压液相色谱仪	广东省测试分析研究所	黄球艳 (210)
离子色谱仪	广东省测试分析研究所	项培英 (223)
金相显微镜	中山大学	刘显芬 (241)
偏光显微镜	广东省地质局中心实验室	梁兆佳 (268)
遥感仪器	广州地理研究所	梁日万 陈健 (285)

紫外—可见吸收光谱

张景钊

概 述

可见光、紫外线及红外线照射某些物质后，引起物质内部分子、电子或原子核间的运动状态的变化，消耗一部分能量，然后透射出来，再通过棱镜，可得到一组不连续的光谱，此光谱称为吸收光谱(Absorption spectra)。由物质产生吸收光谱的原理建立的分析方法，有比色法及分光光度法(spectrophotometry)。

分光光度法又称吸收光谱法(Absorption spectrometry)，它与比色法相似，也是以朗伯——比尔定律作为基础的。其不同点是比色法是在可见光范围，用滤光片获得一定波段范围的单色光，而分光光度计，是具有单色光器，利用棱镜或光栅获得比较纯的单色光，因此，分光光度法比光电比色法有下列几个优点：

1. 测量范围扩展到紫外线及红外线，所测定的溶液不限于有色溶液。在紫外线可见光范围称紫外线可见光分光光度法，在红外线区范围称红外线分光光度法。

2. 在一定波长范围内可以任意选择适用的波长，测得其吸收光谱曲线，好的分光光度计分散出的单色光较纯，其谱带宽度最多不超过3—5 nm(毫微米)，最狭的在1 nm以下，用这种仪器测出供试液的最大，最小吸收波长与吸收系数之值均为一定，可以直接用作定量分析，鉴别和纯度检查。

3. 可以在同一样品中，同时测定两种或两种以上物质。

4. 取样少，只需2—5 mg。操作简便，分析速度快，精密度一般在2%，如掌握操作条件，可达±1%以内。

关于吸收光谱的研究，早在1833年布儒斯特(Brewester)就对物质的吸收光谱进行了观察和记录，以后密勒(Miller)又在紫外区域进行了系统的工作，他用石英摄谱仪测定了一百多种物质在紫外的吸收情况。并指出物质的吸收情况不仅与其基团有关，而且也与其原子或分子的性质有关。哈脱莱(Hartley)对密勒所用的仪器加以改进，用照相法记录各种溶液在不同波长停止透光时的厚度，并以溶液的厚度和波长为座标绘成曲线。这些曲线表现了吸收带的特性。他所记录的吸收峰的波长虽是可靠的，但光强度的准确度不高。由于测定条件不同，两个不同物质的吸收曲线不能比较，根据许多吸收光谱的特征，贝利(Baly)又发现与吸收光谱相类似的有机物，它们的结构亦相类似，而且应用这个关系可以说明一些化学方法所不能说明的分子结构问题。

直到20世纪初亨利(Henri)等用同一干板，先后拍摄等长度的溶液和溶剂的光谱。

求出两个光谱黑度相等的波长,这样的测定虽然比不上现代的分光光度法,但比起上面所说的“相当厚度法”却有很大的改进。享利首次以克分子吸光系数和波长为座标绘成吸收光谱曲线,他的工作表明了一个化合物的吸收光谱并不是整个分子的特征,而是分子中某个基团的特征。例如简单的酮类,都在270—300nm有一个吸收峰,所有酮类化合物的吸收曲线形状基本相似,不过随着分子量的递增,吸收峰朝着长波方向移动,其强度也随之增加,其他基团也有同样情况。根据早期工作的结果表明,分光光度法已经能够对许多有机物质的结构加以初步解释。并根据所测绘的吸收光谱结合化学物理特性,对有机物进行鉴定。

紫外光谱法用途很广泛,可以鉴定分子结构比较复杂的有机物质,可以测定微量物质的含量,可以研究物质的分子结构和反应的历程,互变异构现象的平衡,立体结构的确定等,它是有机化学研究中一种很有用的工具,在药品鉴定中的甾体,维生素及抗菌素,生物碱,黄酮类等,采用一般化学分析方法比较复杂,可以用紫外光谱法来测定,随着紫外光谱仪器精度不断改进和提高,紫外——可见吸收光谱法也得到了迅速的发展,特别是近几年来,光栅技术和电子计算机的发展,把微型计算机与紫外光谱仪相结合,使能控制仪器的各种性能,提高了仪器的精度。如自动检查校正紫外光谱仪的波长,基线平直度,进入测定参数,自动列出测定参数的表格,自动扫描光谱,打印测定数据,自动浓度运算,并具有储存光谱,差示光谱,导数光谱等功能,大大提高混合物分析的能力,使紫外光谱法在分析工作中更具有显著的优越性,在仪器不断发展改进下,紫外光谱将得到更加广泛的应用,今后在工农业生产及科学研究中也成为相当普及的一种方法。

基 本 原 理

一、光的本性(光谱、波长及其对能量的关系)

一切光线都是一种幅射能,属于电磁波谱的一部分,具有一定波长。人眼能够感觉到的光波,其波长约从400毫微米(紫色)到760毫微米(红色)称为可见光区,在可见光范围内,不同波长具有不同颜色的光,当这些波长的光混合时生成白光,在此以外的光波人眼感觉不到,短于400毫微米叫紫外线,从200毫微米到400毫微米称为近紫外线,可透过石英及空气;从10毫微米到200毫微米称为远紫外线,只有小部分能透过石英,在这范围的光波对空气具有强烈吸收,再短的光波是X—射线和 γ —射线,从760毫微米到100微米称为近红外线,再长为远红外线,可达5毫米,接近于无线电的短波波长。人眼看不见的电磁波可以用仪器检查它的质与量,如照相,光电池,光电管,热电偶等,各种电磁波可依波长的长短次序排列如表1。

当一束平行的白色光射到棱镜上,光线经过棱镜两次折射后,白光将分解为从红到紫的许多带色彩的光,这种现象叫做光的色散,被分散各色光,就在棱镜后的屏上形成按波长次序排列的红、橙、黄、绿、蓝、青、紫光带、这些光带称为光谱,光谱的位置可用波长(λ),波数($\bar{\nu}$)的,频率(ν)表示。

表 1 .

电 磁 波 谱

波长 λ	100nm	200nm	400nm	800nm	25 μ m	50 μ m	30cm
波数 ν	10^5cm^{-1}	10^4cm^{-1}	$2.5 \times 10^4\text{cm}^{-1}$	$1.25 \times 10^4\text{cm}^{-1}$	400cm^{-1}	200cm^{-1}	$3.3 \times 10^{-2}\text{cm}^{-1}$
光谱区域	γ —射线	远紫外区 (真空紫外 线区)	近紫外区 (石英紫外 线区)	可见光区	近红外线区	微波 雷达	无线 电波
激发类型	内层电子 跃迁	← 分子电子跃迁 →			← 分子振动 →	分子 转动	
光谱类型		← 电子光谱 → ← 紫外—可见吸收光谱 →			← 振动光谱 → ← 红外吸收光谱 →	↔ 转动 光谱	

光是宇宙间的一种能量形式，是能量在空间高速传播的一种形式，是电磁波。光具有二象性（两重性）——波动性与粒子性。

光的波动性，光在传播过程中，呈现波动性质，是变化着的电场与变化着的磁场在空间从光源出发由近及远地传播着，这种变化着的电场与磁场在空间的传播就是光波，如图 1。如象向平静的水面投一石块那样，水面上立刻形成石块的落点为中心的波纹，同时向四周传播。

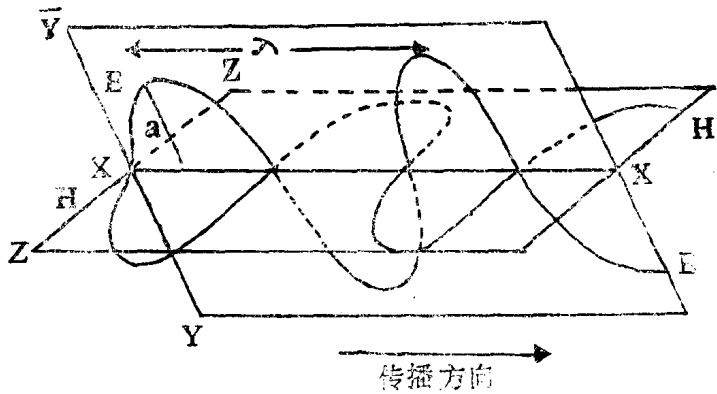


图 1 电磁波在空间传播示意（波长为 λ ，振幅为 a 的平面极化电磁波电矢量 E 和磁矢量 H ）

光波在真空中传播的速度是 30 万公里/秒（ 3×10^{10} 厘米·秒⁻¹），以 C （光速）表示。一定的光波具有一定的波长 λ 和频率 ν ，它们之间的关系如下：

$C = \lambda \nu$ (1)

即 $\lambda = C/\nu$ (2)

波长愈长频率愈低；波长愈短，频率愈高。

波长（ λ ）是相邻两波峰间的距离，波长的单位在可见及紫外区多以毫微米（nm）

或埃 (Å) 表示, 红外区则以微米 (μm) 表示,

$$1 \text{ Å (Angstrom埃)} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm (nanometer, 毫微米)} = 10^{-9} = 10^{-7} \text{ cm} = 1 \text{ mμ} = 10 \text{ Å}$$

$$1 \text{ μm (micrometer, 微米)} = 10^{-6} \text{ m} = 10^{-4} \text{ cm} = 1 \text{ μ (micron微米)}$$

波数 ($\bar{\nu}$) 是每厘米中振动的次数, 是用 cm^{-1} (厘米 $^{-1}$) 为单位, 可用 $1/\lambda$ (cm^{-1}) 求得, 例如波长为 200nm 的光波, 其波数为

$$\bar{\nu} = \frac{1}{200 \times 10^{-7} \text{ 厘米}} = 50000 \text{ cm}^{-1}$$

频率 (ν) 是在 1 秒钟的时间内光波经过某一点的次数, 即每秒振动的次数, 单位是秒 $^{-1}$, 它等于波长除光速, 例如波长为 200nm 的光波, 其频率为

$$\nu = \frac{3 \times 10^{10} \text{ 厘米/秒}}{200 \times 10^{-7} \text{ 厘米}} = 1.5 \times 10^{15} \text{ 秒}^{-1}$$

光的粒子性, 粒子理论认为, 光是具有一定能量的物质微粒而组成, 这种微粒称为光子 (Photons), 每个光子都有一定的能量, 不同的光子具有不同的能量。光和物质发生相互作用时, 主要呈现粒子的性质, 例如, 光子可被物质分子吸收或发射。

光同时具有粒子性与波动性, 两者不是互相对立而是统一的, 光子的能量与其传播频率间的关系可用普朗克 (Plank) 方程式表示:

$$E_1 - E_2 = \Delta E = h\nu = hc/\lambda = hc\bar{\nu} \quad (3)$$

这里 c 是光的速度 3×10^{10} 厘米/秒, (cm/sec)

h 为普朗克 (Plank's) 常数, 6.626×10^{-27} 尔格·秒。 (erg, sec)

E_1, E_2 是分子初态和终态的能量, 以尔格为单位。

ΔE 是分子在初态和终态时能量相差值, 单位可用尔格 (erg), 或 ev (电子伏), $1 \text{ ev} = 1.602 \times 10^{-12} \text{ erg}$, 也可用 Kcal/mol (千卡/克分子), 表示, $1 \text{ Kcal} = 4.18 \times 10^{10} \text{ erg}$ 。

ν, λ 为光子的频率与波长。

例如波长为 200nm 的光, 按 (3) 式计算, 其能量 E 应为:

$$E = \frac{6.626 \times 10^{-27} \text{ erg} \cdot \text{sec} \times 3 \times 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}}{200 \times 10^{-7} \text{ cm}} = 9.939 \times 10^{-12} \text{ erg}.$$

用 ev 表示时, 200nm 波长的能量相当于:

$$E = \frac{9.939 \times 10^{-12} \text{ erg}}{1.602 \times 10^{-12} \text{ erg} \cdot \text{ev}^{-1}} = 6.2 \text{ ev}$$

用 Kcal/mol 表示时, 200nm 波长的能量相当于:

$$E = \frac{9.939 \times 10^{-12} \text{ erg} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{4.18 \times 10^{10} \text{ erg} \cdot \text{Kcal}^{-1}} = 143 \text{ kcal/mol}$$

波长与能量之间的相互关系举例表示如下:

$\lambda \text{ nm}$	180	200	300	400	800
E_{ev}	6.9	6.2	4.45	3.1	1.51
$E_{\text{Kcal/mol}}$	160	143	95	72	35.75

从(3)式表示,光子能量与频率(ν)和波数($\bar{\nu}$)成正比,与波长成反比,光的波长愈长时,频率愈低,其所含量也愈小,反之,波长愈短时,其能量也愈大,在紫外线能量大,在红外线能量小。

二、物质的吸光现象和吸收光谱

1. 发射光谱

当我们将物质加热,或用电弧,电火花放电或其他方法将物质激发时,物质就会放出可见或不可见的光,其所得到的光谱称为发射光谱。发射光谱是物质的特征性质,不同物质有不同的光谱线,同一物质在相同情况下其光谱线的波长是相同的,只是其强度随浓度而改变,从形式上光谱可以分为三类:

(1) **连续光谱**: 是白炽固体或液体所发出的光谱,如开亮电灯就有光射出,此光是不同波长的光波所组成,将此光通过棱镜,照射到白纸上,可以看到红、橙、黄、绿、青、蓝等颜色连续不断,完全明亮的光谱,并没有明晰的线条,这种光谱称为连续光谱。

(2) **明线光谱**: 各种元素化为气体后,在适宜情况下,在完全黑暗或呈连续彩色的背景上出现不连续的明亮线条的光谱,这种光谱叫做明线光谱,光谱中的一些明线通常叫做谱线。我们现在知道,气体的线光谱是由气体的原子产生的,所以线光谱又叫做原子光谱,例如钠焰光谱有两条光谱线, D_1 为589.6nm, D_2 为589.3nm是橙黄色的光。

(3) **带光谱**: 各种化合物的光谱,由数个一定宽度光带与暗区相间组成,这种光谱叫做带光谱,实际上可以认为是许多条密集的线光谱,在带的一边,此等细条愈隔愈近,最后合成一个尖锐明晰的边界,形成光带。带光谱是化合分子产生的,又称为分子光谱。

2. 吸收光谱

如果在能产生连续光谱的光源和棱镜之间放置一个具有吸光特性的物质溶液,则在此连续光谱中出现了暗线和暗带的部分,这种光谱称为吸收光谱。

实验证明,许多物质都具有选择吸收的性质,即吸收某些波长的光,要比吸收另一些波长的光特别多些。凡是有颜色的物质,它的颜色来源都是由于这种选择吸收的结果,例如白光照射在绿色玻璃上,红光和蓝光都被吸收,透过的黄、绿、青等混合光产生绿色的感觉,如果把这些光再照射到红色玻璃则它呈现黑色,因为所有入射光线都被吸收了。

一个自由分子可以有几种不同的运动方式,如图2所示即(1)整个分子的平移,

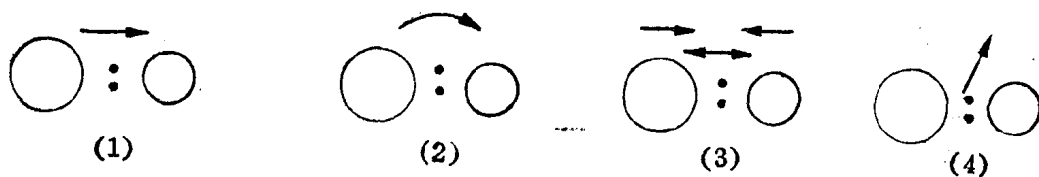


图2 自由分子的几种运动

(2) 整个分子的转动; (3) 分子中各原子核的相对振动; (4) 分子中电子的跳动。其中整个分子平移对分子光谱并没有重要影响, 和光谱有关的能量变化是分子的转动能量, 振动能量及分子的电子跃迁能量。

物质处于不停的运动状态之中, 分子的各种运动都处于一定的能级, 当分子经光照射后, 就吸收了光能, 运动状态从基态跃迁到高能级的激发态, 但当分子由低能阶跃迁到高能阶时, 它只能吸收等于这两个能级之差的能量 ΔE , 由于光子是具有微粒性和波动性, 因而电子跃迁时所需能量与电磁波中某一光子的能量或波长相一致, 因此, 分子中各种能阶跃迁所吸收的能量都可用相应于某频率 ν 或波长 λ 的光子, 连续光谱中某些光子的能量被物质吸收以后, 就形成吸收光谱。分子所吸收的能量 (亦即光子的能量) 和波长的关系

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu = hc/\lambda$$

分子吸收光子后, 依光子能量的大小, 可以引起转动, 振动和电子能阶的跃迁, 而产生不同效应, 分子吸收光谱可以分三类, 如图 3

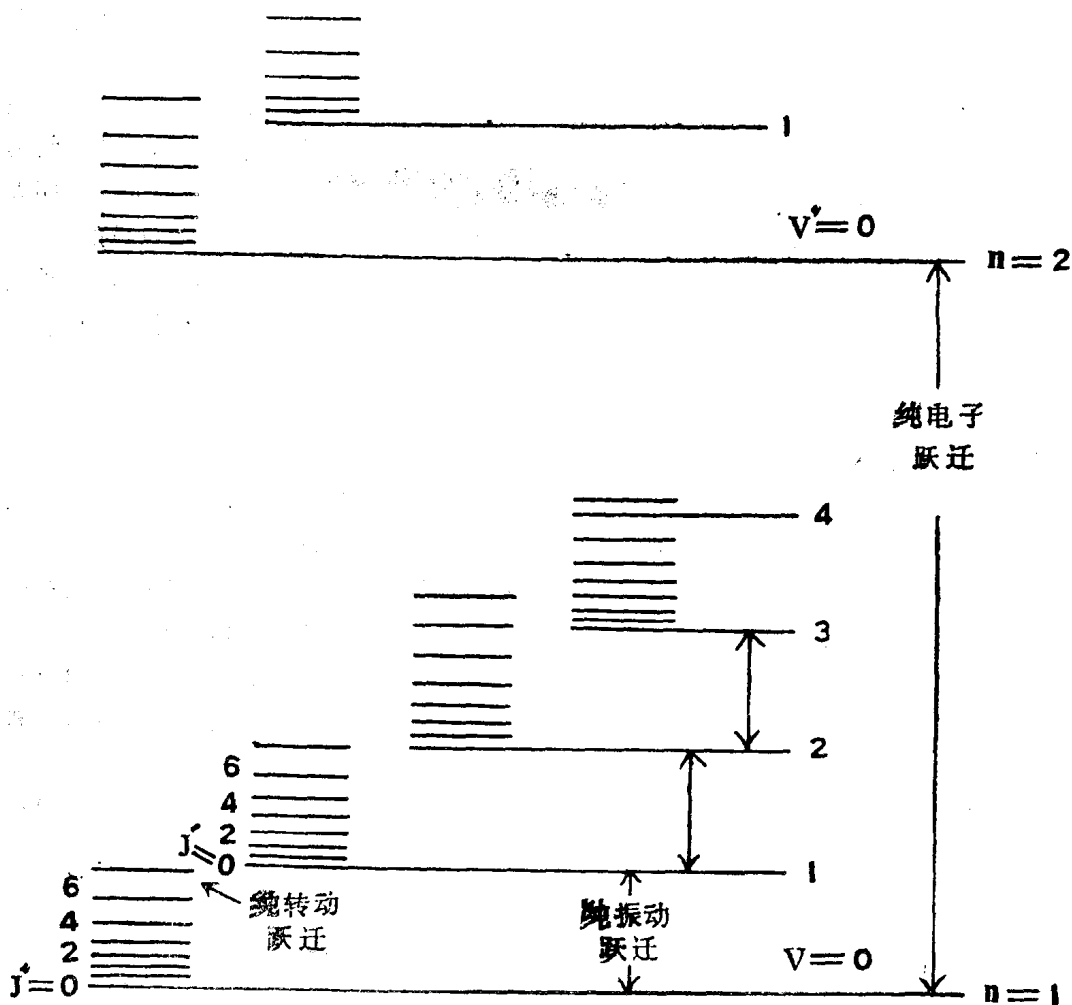


图 3 双原子的三种能随跃迁示意图

(1) **转动吸收光谱**: 分子吸收光子后, 其吸收的光能只引起分子转动能级的跃迁, 即使分子以较低的转动能级激发到较高的转动能级, 而产生转动吸收光谱。这种光谱是由彼此分开的独立线谱所组成, 由于分子转动能级之间能量相差很小, 转动能级间隔约在0.05电子伏以下, 所以转动光谱位于电磁波中的长波部分, 即在远红外线及微波区域内(一般在波长0.1~10cm范围内)。纯粹的转动光谱在化学分析很少应用。

(2) **振动吸收光谱**: 分子吸收光子后, 其所吸收的光能引起振动能级的跃迁, 产生振动吸收光谱。分子中振动能级之间能量差比同一振动能级中转动能级之间的量差大100倍左右, 振动能级间隔约为0.05—1电子伏。振动能级的跃迁常有转动能级的跃迁伴随发生, 它们大都出现于近红外线区, 通常称振动——转动光谱, 振动光谱是由一些谱带所组成, 直接反映了分子结构和性质, 在光谱范围2~25 μm 内, 称红外吸收光谱, 可用红外线分光光度计测定, 我们可以利用它来研究分子结构, 定性和定量分析。

(3) **电子吸收光谱**: 分子吸收光子后, 所吸收的光能使多原子分子的价电子由低态的内层能级跃迁到高能态较外层能级, 而产生电子吸收光谱。使电子能级发生变化所需的能量为使振动能级发生变化所需能量的10~100倍, 电子能级间隔约为1~20电子伏, 出现于紫外可见光范围(100~760毫微米), 实际上分子吸收能量相当复杂, 在每一振动能级中还有一系列转动能级, 电子能级发生变化时常同时发生振动和转动能级的变化, 电子激发时可以从许多可能的振动和转动能级开始, 从每一种初态又可以激发到更高的电子能级中许多可能的振动和转动能级上去, 而振动能级和转动能级的数目又是很多的, 因此从一个电子能级转变到另一个电子能级时产生的谱线不止一条, 而是无数条, 由于两个转动能级之间的能级之间的能量差很小, 所以这些谱线相距很近, 在复杂的分子光谱中或简单分子在液态下摄出来的光谱中, 这些谱带变宽而相互重叠, 因此实际上观测到的是一些谱带。在一般情况下, 很难决定那一条谱线是相当于电子能级电子跃迁时的变化, 因此一般是把吸收带中吸收强度最大的波长 λ_{max} (即吸收峰的波长)表示出来。电子光谱一般包括一系列带系, 不同的带系相当于不同的电子跃迁, 每个谱带是由于振动能级的改变所形成的。

如果吸收光谱以吸收光谱曲线(以吸收度对波长作图所得到的曲线)表示, 则吸收光谱曲线呈现一些峰和谷, 每个峰峦相当于谱带, 在某些情况下, 这些峰峦(谱带)或多或少地表现出明显的齿状的结构。苯、酚和苯胺的吸收光谱, 具有明显的振动的结构, 有机化合物的电子吸收光谱是由于分子中价电子的跃迁所形成的, 因其光谱的波段是处在紫外和可见光区域, 故又称为紫外——可见吸收光谱, 是用紫外——可见光分光光度计来测定。

有机化合物, 凡是含有单个或二个以上结合起来的发色团, 都能在紫外——可见区产生特征吸收, 不含发色团的有机物(包含饱和的有机物)则要在远紫外线(100~200毫微米)才能特征吸收, 因此我们可以利用它研究具有不饱和键的有机化合物的分子结构, 定性和定量分析。

在紫外和可见光区, 灵敏度和精密度较高, 一般每毫升溶液含有几微克物质即可测定。在此区域内, 物质对光的吸收主要系分子中电子的能级跃迁所致, 同时伴随着分子的振动和转动能阶的变化, 电子吸收光谱一般比较简单平缓, 选择性不如红外区, 故主

要用于定量分析及作为物理常数测定。红外光区的灵敏度和精密度较低，一般需要数百微克的样品进行测定，但在此区域中，物质对光的吸收系分子中振动和转动能级的跃迁所引起，红外光谱（或称振动光谱）的特征性很强，特别是在7—15 μm 一段，称为“指纹区”，吸收峰很多，而且尖锐，故主要用于物质的鉴别和分析结构。

三. 分光光度法定性和定量基础

1. 朗伯——皮尔定律（Lambert——Beer's Law）及吸收系数。

当光经过均匀而透明的溶液时，透过光将被减弱，因为有一部分的光在溶液的表面分散或反射，一部分为溶质质点所吸收，只有一部分可透过溶液，今假定 λ 时光强度为 I_0 ，反射的光为 I_R ，被吸收的光为 I_A ，透过去的光为 I_t ，则

$$I_0 = I_R + I_A + I_t$$

如果按照一般化学分析方法，以一个“空白”去校正反射的光，则反射光的损失可以不计，即

$$I_0 = I_A + I_t$$

按照朗伯——皮尔定律，当一束单色光通过被分析物质时，由于被物质吸收，能量减少，被物质吸收的量与波长，物质性质，浓度与光路的长度等有关。在一定波长时被吸收的量与浓度，介质层的长度（光路长度）成正比。

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t} = ECL$$

I_0 ——入射光的强度

I_t ——通过溶液后出射光的强度。

T ——透光率 I_t/I_0 。

C ——溶液的浓度

L ——光路长度（介质的长度）以cm表示。

A ——吸收度（Absorbance），又称消光度（Extinction），或光密度（optical Density）。

如测得某一溶液的百分透光率为50（透光率0.50）， $I_0 = 100$ ， $I_t = 50$ ，则

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \log \frac{100}{50} = \log 100 - \log 50 = 2 - 1.6990 = 0.3010$$

$$\text{或 } A = -\log T = -\log 0.50 = -(\overline{0.6990}) = 0.3010.$$

E ——比例常数，也称吸收系数，是物质的特性，有两种表示方法。

（1）克分子吸收系数（ ϵ 或 E_M ），当光路长度为1厘米，溶液浓度的单位为克分子浓度时，即当每升含1克分子溶质时，所得的吸收系数称为克分子吸收系数。

$$\epsilon = \frac{A}{C(\text{mol}) \times l(\text{cm})}$$

（2）吸收系数 $E \frac{1\%}{1\text{cm}}$ ，当溶液的浓度以百分数表示，即当100ml溶液中含1g

溶质，光路长度为 1 cm 的吸收数值称为吸收系数 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 也称消光系数，亦称百分吸收系数

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{A}{C(\%) \times l(\text{cm})}$$

(3) 克分子吸收系数 ϵ 与吸收系数 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 的关系如下：

$$\epsilon = E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times \frac{\text{物质分子量}}{10}$$

$$\text{或 } E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{10 \times \epsilon}{\text{物质分子量}}$$

例如：核黄素分子量为 376.4，用 0.02 N 醋酸溶液配成浓度每 ml 含 0.01 mg

(0.001%) 的溶液时，在 445 nm 的波长，测得其吸收度为 0.324，其吸收系数 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 为

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} \lambda_{445\text{ nm}} = \frac{0.324}{0.001 \times 1} = 324$$

克分子吸收系数

$$\epsilon_{\lambda_{445\text{ nm}}} = 324 \times \frac{376.4 (\text{核黄素分子量})}{10} = 12200$$

有时用 $\log \epsilon$ 表示，核黄素的 $\log \epsilon$ 为 4.086。

又如醋酸可的松，分子式 $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6$ ，分子量为 402，从有机电子光谱资料 (Organic Electronic Spectral Data) 第 12 卷查出在甲醇溶液中 $\lambda_{\text{max}} 238\text{ nm}$ $\log \epsilon$ 为 4.23，从对数表查出 ϵ 为 16980。

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} \lambda_{238\text{ nm}} = \frac{16980}{240} \times 10 = 422.4$$

2. 物质的特征吸收曲线及最大吸收峰

从朗伯—比尔定律中看出，若测定溶液的浓度，厚度和溶剂固定时，物质的吸收系数随单色光的波长而改变，这是因为物质分子对各个波长的光吸收强度不同，在某一个或某几个波长吸收最强，而其它波长吸收较弱，这是分子的物理特征，在分光光度分析中，将单色光分别地，依次序地通过一定浓度的某一种溶液，测定溶液对每一个波长的吸收度（或透光率），然后以波长为横坐标，以吸收度（或透光率）为纵坐标，绘制出吸收度—波长曲线（或吸收系数—波长曲线），称为物质的吸收光谱曲线，如图 4，图 5，纵坐标的表示方式尚有以分子吸收系数，吸收系数， $\log \epsilon$ 等，横坐标有时也用波数 ($\bar{\nu}$) 或频率 (ν) 表示。

物质性质不同，其吸收光谱曲线是不同，大致可分下列二类。

(1) 一般吸收光谱曲线：波长改变时，吸收光谱的吸收强度改变很微小，对各种波长光的吸收差不多，形成平坦的曲线，称为一般吸收曲线（如图 2—3 中 (B) 线）。

(2) 选择吸收光谱曲线或特征吸收光谱曲线：波长改变时，吸收光谱的吸收强度有显著的变化，在某波长时，吸收很强烈，在某些波长，吸收很弱，形成具有起伏的高峰和低谷的曲线，称为选择吸收光谱曲线或特征吸收光谱曲线，如图 4 中的 A 线

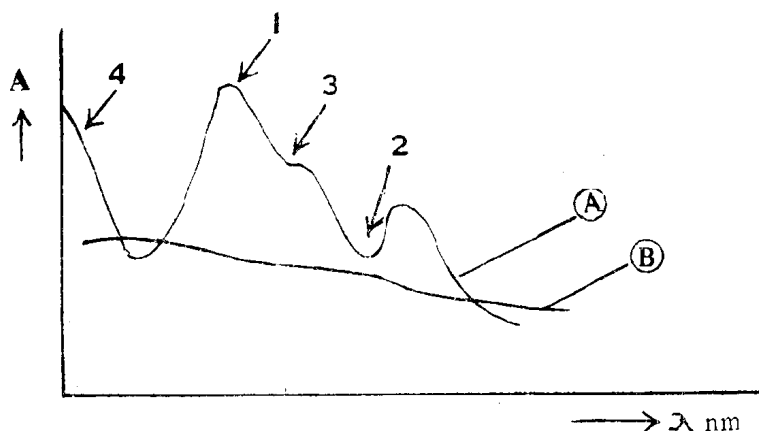


图 4 物质的特征吸收曲线示意图

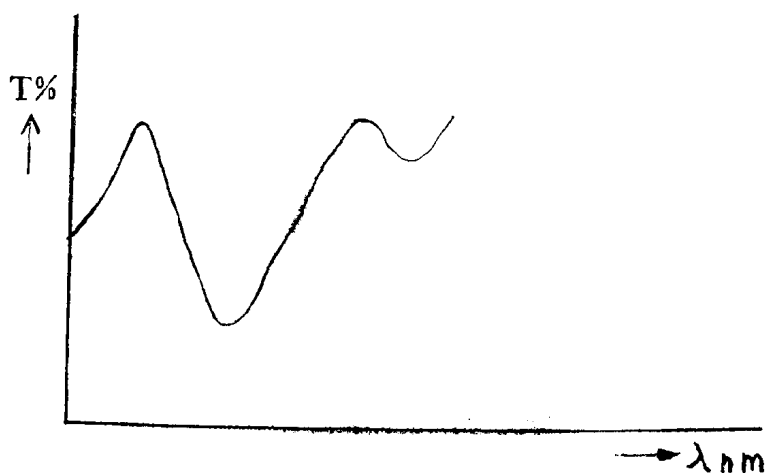


图 5 以 T% 绘制的物质吸收光谱曲线示意图

从图上可以看出吸收光谱曲线的特征，曲线的峰称吸收峰，它所对应的波长称最大吸收波长 ($\lambda_{\max}$)，曲线的谷所对应的波长称最小吸收波长 ($\lambda_{\min}$)；在峰旁边一个小的曲折称为肩峰 (λ_{sh} , shoulder peak)，也叫曲折点 (λ_{inf})；在吸收曲线的波长最短一端，吸收相当大但不成峰形的部分，称为末端吸收 (end absorption) (λ_{end})。

在吸收曲线中可能出现几个最大吸收波长和几个最小吸收波长，浓度改变时，在一定溶剂中，每一种物质都有自己的特征吸收曲线，其最大吸收和最小吸收波长及在此波长时 ϵ 值或 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 值的大小为一常数，因此吸收光谱曲线的形状和 $\lambda_{\max}$, $\lambda_{\min}$, ϵ 或 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 为分光光度法中物质的定量基础。

当物质有两个或三个最大吸收峰时, 则有两个或三个克分子吸收系数 ϵ (或吸收系数 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$), 也可以将 ϵ_1 与 ϵ_2 , 或 ϵ_2 与 ϵ_3 等相比求出比值 ϵ_1/ϵ_2 或 ϵ_3/ϵ_2 作为鉴定物质的标准。

例如维生素 B_{12} 溶于水, 有三个最大的吸收峰, 其吸收系数 $\lambda_{\max} 278\text{nm}$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 119$), $\lambda_{\max} 361\text{nm}$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 207$), $\lambda_{\max} 550\text{nm}$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 63$), 其吸收光谱曲线如图6所示, 中国药典鉴别规定, 吸收度 $361\text{nm} \div$ 吸收度 278nm 应为1.70—1.88, 吸收度 $361\text{nm} \div$ 吸收度 550nm 应为3.15~3.45。

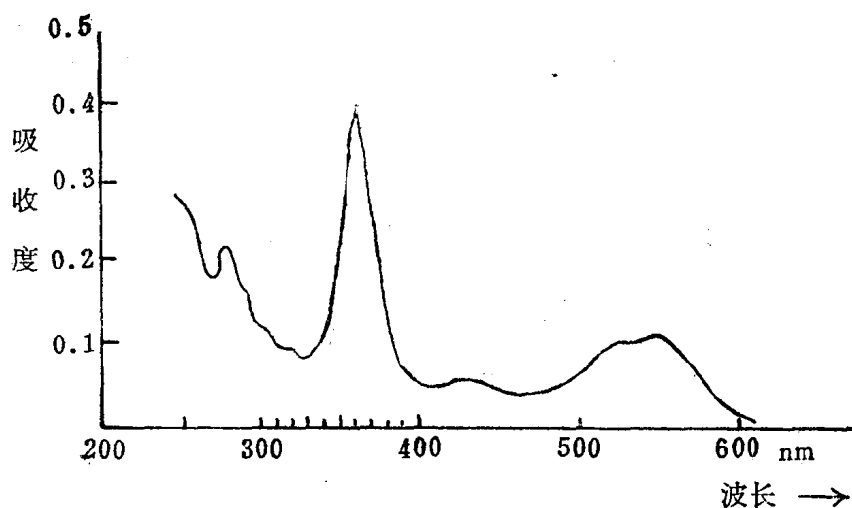


图6 维生素 B_{12} 水溶液(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)吸收光谱

如果在最大吸收波长处遵守朗伯—比尔定律, 我们可以选择这一波长作定量分析, 在最大吸收波长时, 物质的吸收度最大, 在此波长测定时, 灵敏度最高, 极微量的物质(0.1 μg 以下)亦能区别出来, 为方便起见, 常将一系列纯碎的物质, 预先测定它的 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$, 用 ϵ_s 或 $\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_s$ 表示, 然后测定供试品的 ϵ_x 或 $\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_x$, 求出二者之比, 就可知道供试品的百分含量。

$$\text{供试品的百分含量} = \frac{\epsilon_x}{\epsilon_s} \times 100\% = \frac{\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_x}{\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_s} \times 100\%$$

因此纯品在 $\lambda_{\max}$ 时的 ϵ 或 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 是物质的定量基础。已知物质的纯品在一定条件下的吸收系数 $\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_s$ 后, 可用同样条件将样品配成溶液, 测定其吸收度, 即可由上述公式计算出样品中该物质的含量, 或用下列公式计算:

$$\text{供试品的百分含量} = \frac{A \times 0.01 \times \text{稀释倍数}}{\left[E_{1\text{ cm}}^{1\%}\right]_s \times \text{供试品称重(g)}} \times 100\%$$

也可用不同浓度的对照品溶液测出相应的吸收度，绘成坐标曲线，在测定供试品溶液的吸收度后，即可由此标准曲线读出供试品溶液的浓度，求出供试品的百分含量。

例如中国药典（1977年版）维生素B₁₂的含量测定方法是取本品，精密称定，加水制成每1 ml中约含25μg的溶液，照分光光度法，在361±1 nm的波长处测定吸收度，

按C₆₃H₈₈O₁₄N₁₄PCO的吸收系数(E_{1cm}^{1%})为207计算，即得。

在可见光区，除某些物质对光有吸收外，很多本身没有吸收，但可在一定条件下加入显色试剂或经过处理使其显色后再测定，由于显色影响呈色深浅的因素较多，且进行比色分析时常使用单色光纯度较差的简单的可见光分光光度计和比色计，用这类仪器测得的吸收度常比单色光纯度高的仪器偏低，故测定时应用标准品或对照同时操作，比较其读数，用紫外线分光光度计测定时，灵敏度和精密度较高，误差约为1—2%，用显色进行比色分析时，误差约为2—4%。

紫外分光光度计的一般构造

一、仪器的工作原理

紫外分光光度计工作原理与光电比色计的工作原理基本相同，都是根据相对测量的原理设计的。要测定某溶液的吸收，首先要选择某一溶剂（或空气）作为空白溶液，并认为它的透光率为100%，这样才能测出这一样品溶液的相对吸收，实际上样品溶液的透光率就是和空白溶液比较出来的，也就是由出光狭缝射出的单色光分别通过空白溶液和被测溶液这两个能量的比值，就是在一定波长对于被测溶液的透光率或吸收度，仪器的工作原理方框图如图7所示：

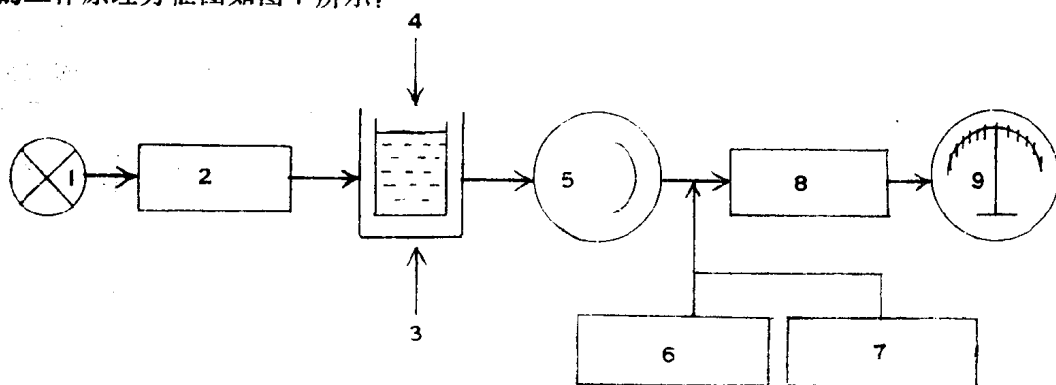


图7 仪器的工作原理方框图

1. 光源 2. 单色器 3. 空白 4. 样品 5. 光电管 6. 补偿电位器
7. 读数电位器 8. 指零放大器 9. 电表

仪器的结构原理也是根据上述的工作原理设计的。从光源发射出来的连续光谱经单色器色散，成为一定波长的单色光，从出光狭缝射出的单色光通过空白溶液，再照到光电管或检测器上，可以通过改变狭缝宽度使光线进入强弱和调节灵敏度旋钮改变电表灵

敏度使电表指示在100%透光率上，或利用补偿电压把读数电位器标度尺上的读数调节至100%透光率处，然后将样品溶液移入光路，使同一强度单色光再通过样品溶液，照射到光电管或接受器上，如果样品溶液有吸收，则光能量就会减少，指示部分就指出相对透光率或吸数度的大小，或转动读数电位器来改变补偿电压，使电表指针重新指零，读数电位器上的指示值就是样品溶液的透光率或吸收度。根据透光率和吸收度，即可计算溶液的浓度，进行定性和定量。

双光束自动记录紫外分光光度计结构繁杂，能够自动记录吸收光谱图谱，其工作基本原理是一样的，也是与空白比较测定的。

二、分光光度计的主要部件

分光光度计一台共计三件，一件是主机，一件是稳压电源，供应主机内放大器和钨丝灯光源的稳定电能；一件是氢弧灯稳流器，专门供应氢灯光源的稳定电能。

主机的光学系统，都是由光源，单色光器，狭缝、吸收池，检测器及指示器等主要部件组成。图8是751型分光光度计光学系统。

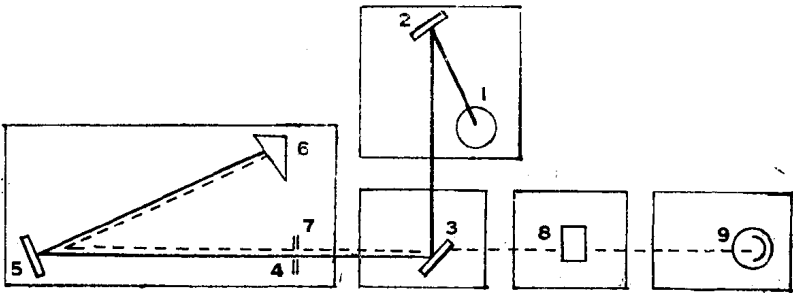


图8 751型分光光度计光学系统

1. 光源 2. 聚光镜 3. 反光镜 4. 入光狭缝 5. 准直镜 6. 石英棱镜
7. 出光狭缝 8. 吸收池 9. 光电管

1. 光源

光源有两种，钨灯及氢弧灯，分别装于盒内，另有一表面涂铝的反射聚光镜，将光聚集成平行光，灯座及聚光镜后有螺丝可以调节灯泡位置及聚光镜的光角，聚光镜连有一手柄，可分别转换聚光镜的位置来选择钨灯及氢灯。

(1) 钨丝灯：可见光的连续光谱可由钨灯或碘钨灯供给。常用的为钨灯，也就是一般灯泡发射出来的，适用于波长320—2500nm。由于玻璃质量不同，其光谱范围亦有差别，要求灯泡的灯丝是直的螺旋圈，这样将灯丝对准仪器中光学装置的轴线时，能够在出光狭缝的平面上投射直线影象，光亮均匀。仪器上使用的灯泡位置一般是预先校准焦点的，也就是出厂时就安置在特制的灯座上，使用时灯丝的位置恰好对准入光狭缝，为减少杂散光，一般在400nm以上的波长使用，320~400nm时应加滤光片。一般是

6V、32W，电源是用晶体管稳压电源供给。

(2) **氢灯或重氢(氘)灯**：重氢灯能发射150~400nm波长的连续光谱，适用于波长190~400nm，电源由电子管稳压器供给。氢灯是石英玻璃制成，内充有氢气及装有阴极及阳极，阴极是网状的，当接上电源后，灯丝发热，由灯丝发射出来的热电子受阳极吸引而产生电弧（阳极电压为60~90V，阳极电流为300mA），管内的氢气分子受电子冲激而被激励生成离子，成为氢光谱，通过石英玻璃放出来，氢光谱在紫外线是连续光谱，作紫外线光源，在可见光区是明线光谱，其中379.79nm，486.1nm，656.3nm可作为仪器校正波长之用。

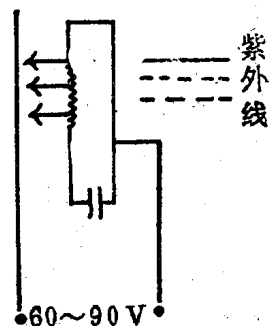


图9 氢弧灯的结构

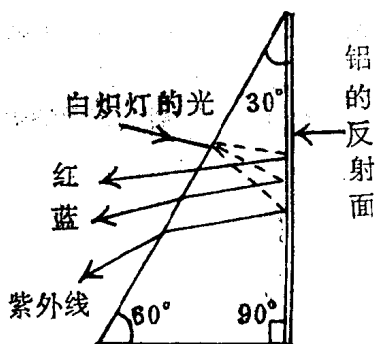


图10 Littrow石英棱镜的色散

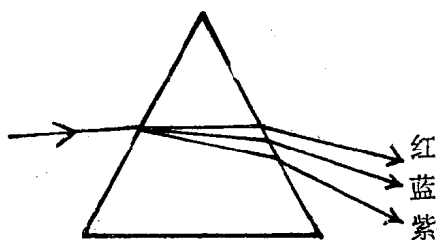


图11 三角玻璃棱镜的色散

2. 单色器

(1) **色散元件**：单色器是复光按波长长短顺序分散成为单色光的装置，其分散过程称光的色散，色散以后的单色光经反射，聚光，通过狭缝到达溶液。常用的单色器是棱镜和光栅。

①**棱镜**：棱镜由玻璃或石英材料组成，当光从空气射入棱镜时，其传播速度即改变，波长短的光在玻璃中传播速度比波长长的光慢，这样就可以将混合光中所包含的各个波长从长波到短波依次分散成为一个由红到紫的连续光谱。这样得到的光谱，短波间的距离较大，长波间的距离较密，即光波间的距离与各条波长不呈线性，玻璃棱镜色散能力大，分辨本领强，但由于玻璃吸收紫外线，只能用在350—3200nm波长范围，所以用玻璃棱镜只能装置可见分光光度计，紫外区的光源必须用石英棱镜色散，其光谱范围在185—400nm。棱镜的形状不一，在30°的直角棱镜，也有60°的正三角形棱镜，前者其反射面镀铝，使光线能第二次通过棱镜，以加强色散程度。如图10，图11。

②**光栅**：光栅是另一种常用的色散元件，它由玻璃材料制作，在玻璃表面上每毫米内刻有一定数量等宽等间距的平行条痕，其数量根据所需波长而定，测紫外吸收光谱用的光栅，每1mm刻有1200条。有透光光栅及反射光栅二种。当复光通过条痕狭缝或从条痕反射后，产生衍射与干涉作用，出现各级明暗条纹而形成光栅的各级的衍射光谱。由于紫光与红光波长不同，衍射后各波长的位置亦不同，于是得到由紫到红各谱线间距