

# 第十一章 光学分析法概论

光学分析法是以物质发射的辐射或辐射与物质相互作用为基础的分析方法。随着光学、电子学、数学和计算机技术的发展,光学分析法在各个领域中的应用越来越广泛。为了能正确了解光学分析的一般原理,本章将对这些方法赖以建立的基础,即电磁辐射的基本性质及其与物质相互作用的特点,结合各种常用的光学分析方法加以介绍。

## 第一节 电磁辐射和电磁波谱

电磁辐射又称为电磁波,是一种以巨大速度通过空间传播的光子流。它有各种类型,从 $\gamma$ 射线直至无线电波都是电磁辐射,光就是人们最熟悉的一种。电磁辐射具有波粒二象性,它在传播过程中出现的反射、折射、衍射、干涉等现象表现为波动性。波动性可用速度( $c$ )、波长( $\lambda$ )、频率( $\nu$ )和波数( $\tilde{\nu}$ )这样一些参数加以描述。波数是波长的倒数,表示单位长度内波的振动次数,单位为 $\text{cm}^{-1}$ 。在真空中,上述参数间的关系为

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (11-1)$$

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (11-2)$$

式中, $c$ 是电磁辐射在真空中的传播速度,为 $2.997925 \times 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在其它透明介质中,由于电磁辐射与介质的作用,传播速度比在真空中稍小一些。但因空气和真空中的传播速度相差不大,故也常用上述二式表示空气中三者关系。电磁辐射的发射或与物质作用时被吸收的现象则只能用微粒性来解释,即必须将其看作是不连续的粒子流,这种粒子称为光子或光量子,每个光子具有能量( $E$ ),其大小与相应的频率和波长有如下关系:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (11-3)$$

式中 $h$ 为普朗克常数(Planck constant),其值为 $6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ 。可见,波长愈短或频率愈高,光子能量愈大;反之亦然。式(11-3)把电磁辐射的粒子性和波动性有机地联系在一起。通过(11-1)(11-2)(11-3)式可进行电磁辐射的波长与频率、波数、能量之间的换算。

电磁辐射的吸收是指辐射通过某些透明物质(固体、液体或气体)时,其中某些频率被选择性吸收而使辐射强度减弱的过程,吸收的实质是电磁辐射的能量被转移到了物质的原

子或分子上,结果,这些粒子由最低能态(基态)跃迁到了较高的能态(激发态)电磁辐射的发射则是吸收了外界能量(包括电能、热能、电磁辐射能、电子或其它基本粒子轰击等)而处于激发态的粒子(离子、原子或分子)在返回到低能级或基态时,以电磁辐射的形式释放出多余的能量。电磁辐射的吸收或发射是物质内能变化的一种客观反映,任一波长的光子能量( $E$ )必须与物质的原子或分子的能级变化  $\Delta E$  相等,才能被吸收或发射,它们之间的关系为:

$$\Delta E = E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (11-4)$$

若已知物质由原子或分子在不同能级间跃迁的能量差,按式 11-4 可计算出相应电磁辐射能的波长。

电磁辐射按波长顺序的排列称为电磁波谱,它包括了波长和能量的无限范围。按波长的不同,它又可分为不同的区域。由于电磁辐射的产生或吸收,是物质内部运动变化的一种客观反映,所以,电磁波谱内的所有波谱区都可用于物质的分析测定。表 11-1 列出了分析中常用的电磁波谱区的名称、波长范围、能量大小及与其相应的物质内部能级跃迁类型、分析应用的波谱类型。

表 11-1 电磁波谱及其在仪器分析中的应用 \*

| 波谱区名称        | 波长范围                                     | 光子能量/eV                                        | 能级跃迁类型    | 应用类型                                   |
|--------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|----------------------------------------|
| $\gamma$ -射线 | $5 \times 10^{-4} \sim 0.014 \text{ nm}$ | $2.5 \times 10^6 \sim 8.7 \times 10^4$         | 核         | $\gamma$ -射线的发射光谱;穆斯堡尔光谱               |
| X-射线         | $0.014 \sim 10 \text{ nm}$               | $8.7 \times 10^4 \sim 1.25 \times 10^2$        | 原子内层电子    | X-射线的吸收、发射光谱及荧光光谱                      |
| 远紫外区         | $10 \sim 200 \text{ nm}$                 | $1.25 \times 10^2 \sim 6.2$                    | 原子及分子外层电子 | 可见与紫外吸收光谱;原子吸收与原子发射光谱;分子与原子荧光光谱;分子磷光光谱 |
| 近紫外区         | $200 \sim 400 \text{ nm}$                | $6.2 \sim 3.1$                                 |           |                                        |
| 可见区          | $400 \sim 760 \text{ nm}$                | $3.1 \sim 1.6$                                 |           |                                        |
| 近红外区         | $0.76 \sim 2.5 \mu\text{m}$              | $1.6 \sim 0.50$                                | 分子振动      | 红外吸收光谱                                 |
| 中红外区         | $2.5 \sim 50 \mu\text{m}$                | $0.50 \sim 0.025$                              |           |                                        |
| 远红外区         | $50 \sim 1000 \mu\text{m}$               | $0.025 \sim 1.25 \times 10^{-3}$               | 分子转动      |                                        |
| 微波区          | $0.1 \sim 100 \text{ cm}$                | $1.25 \times 10^{-3} \sim 1.25 \times 10^{-6}$ | 电子自旋      | 顺磁共振波谱                                 |
| 射频区          | $1 \sim 1000 \text{ m}$                  | $1.25 \times 10^{-6} \sim 1.25 \times 10^{-9}$ | 核自旋       | 核磁共振波谱                                 |

(1) 各光谱区的波长范围划分并不严格,在不同文献资料中会有出入;

(2) 各种波长单位的关系为  $1\text{nm} = 10^{-3}\mu\text{m} = 10^{-6}\text{mm} = 10^{-7}\text{cm} = 10^{-9}\text{m}$ ;

(3)  $1\text{eV} = 1.6020 \times 10^{-19}\text{J}$ 。

## 第二节 光学分析法分类

光学分析法可分为光谱分析法和非光谱分析法两大类。当物质发射辐射或与辐射能作用将其吸收时,总是伴随着物质内部的能级跃迁,记录由能级跃迁所产生的辐射能发射或吸收强度随波长(或相应单位)的变化,所得的谱图称为光谱。利用物质的光谱进行定性、定量和结构分析的方法称为光谱分析法,简称光谱法。非光谱分析法则不是以光的波长为特征信号,而是通过测量辐射线照射物质时产生的辐射在传播方向上或物理性质上的变化进行分析的,如利用其折射、偏振、衍射与散射等现象建立起来的折射法,旋光法、X射线衍射法、散射浊度法、比浊法等光学分析法。各种常用的光学分析法列于表 11-2。本书只讨论光谱法。

表 11-2 常用的光学分析方法

| 原 理   | 分 析 方 法                                                                       |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 辐射的发射 | 1. 发射波谱法(可见、紫外、X-射线法等)<br>2. 荧光光度法与磷光光度法<br>3. 火焰光度法<br>4. 放射化学法              |
| 辐射的吸收 | 1. 比色法<br>2. 分光光度法(可见、紫外、红外、X-射线法等)<br>3. 原子吸收光谱法<br>4. 核磁共振波谱法<br>5. 电子自旋共振法 |
| 辐射的散射 | 1. 拉曼光谱<br>2. 散射浊度法<br>3. 比浊法                                                 |
| 辐射的折射 | 1. 折射法<br>2. 干涉法                                                              |
| 辐射的衍射 | 1. X-射线衍射法<br>2. 电子衍射法                                                        |
| 辐射的旋转 | 1. 偏振法<br>2. 旋光法<br>3. 圆二向色性法                                                 |

由于光谱与物质中原子或分子在特定能级间的跃迁有关，因此根据其特征光谱的波长可对试样进行定性或结构分析，而根据其强度与相应原子或分子的含量有关，又可借以对试样作定量分析。按产生光谱的方式不同，光谱法可分为发射光谱法，吸收光谱法和拉曼光谱法。

## 一、吸收光谱法

由物质对辐射能的选择性吸收而产生的光谱称为吸收光谱。根据吸收光谱进行定性、定量及结构分析的方法，称为吸收光谱法。

吸收光谱也称吸收曲线。光学光谱区(紫外、可见、红外区)的吸收光谱通常是用分光光度计测量得到的，故该区的吸收光谱法一般称为分光光度法。

### (一) 原子吸收光谱法 atomic absorption spectrometry; AAS)

原子吸收光谱法又称原子吸收分光光度法。

原子中的电子总是处于某一种运动状态之中。每一种状态具有一定的能量，属于一定的能级。而原子所有电子所处的能级状态也即代表了原子的某种能级。当原子蒸气吸收紫外-可见区中一定能量光子时，其外层电子就从能级较低的基态跃迁到能级较高的激发态，从而产生所谓的原子吸收光谱。通过测量处于气态的基态原子对辐射能吸收程度来测量样品中待测元素含量的方法，就称为原子吸收光谱法。原子吸收光谱法的测定对象主要为金属元素。

原子外层电子跃迁前后两个能级的能量差  $\Delta E$  与吸收光的波长，频率之间服从普朗克条件(式 11-4)。不同元素因不同的原子结构和外层电子分布，能级结构各不相同，故各有其特征吸收波长，而能级的量子化，则决定了原子吸收光谱为不连续的线状光谱。另外，由于一个原子可具有多种能级状态，吸收不同的能量后可以跃迁到不同的激发态上，因此其特征吸收线会有多条。

### (二) 分子吸收光谱法

分子吸收光谱产生的机理与原子吸收光谱相似，也是在辐射能的作用下，由分子内的能级跃迁所引起。但由于分子内部的运动所涉及的能级变化比较复杂，因此分子吸收光谱比原子吸收光谱要复杂得多。

分子由两个或两个以上的原子所组成，因而除电子的运动外，还有原子间的相对振动和分子绕质量中心的转动。与此相应，分子除有电子能级外，还有振动能级和转动能级。如图 11-1 所示，在同一电子能级时，分子的能量因振动能量不同而分为若干亚能级，即振动能级 ( $V = 0, 1, 2, \dots$ ) 在同一电子能级和振动能级时 它的能量还因转动能量不同而分为若干次能级，即转动能级 ( $J = 0, 1, 2, \dots$ )，三种不同能级都是量子化的。若不计核能和分子的平动能，分子能量  $E_{\text{分子}}$  应为其电子能  $E_e$ 、振动能  $E_v$  和

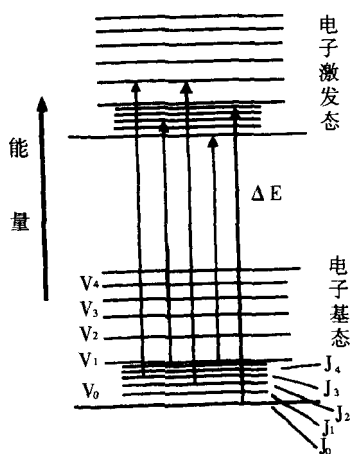


图 11-1 分子能级跃迁示意图

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$$

转动能  $E_r$  之和：

$$E_{\text{分子}} = E_e + E_v + E_r$$

当吸收一定能量的电磁辐射时，分子就由较低的能级跃迁到较高的能级上，吸收辐射的能量与分子的这两个能级差相等。对多数分子而言，其中的电子能级差  $\Delta E_e$ 、振动能级差  $\Delta E_v$ 、转动能级差  $\Delta E_r$  的值及与之相当的电磁波波段为

|                                                       |                                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| $\Delta E_e$ 1 ~ 20eV                                 | 1.25 $\mu\text{m}$ ~ 60nm (主要为紫外、可见区) |
| $\Delta E_v$ 0.05 ~ 1eV (约为 $\Delta E_e$ 的 1%)        | 25 ~ 1.25 $\mu\text{m}$ 近、中红外区)       |
| $\Delta E_r$ 0.0001 ~ 0.05eV (约为 $\Delta E_e$ 的 0.1%) | 12500 ~ 25 $\mu\text{m}$ 主要为远红外区、微波区) |

由分子中的电子能级、振动能级和转动能级跃迁产生的光谱分别称为电子光谱、振动光谱和转动光谱。实际上，只有用远红外光或微波照射分子时才能得到纯粹的转动光谱，而纯粹的振动光谱和电子光谱却无法获得。因为振动跃迁一般都伴随有转动状态的改变，结果使相应于两个振动能级间的跃迁产生的光谱不是一条单个的谱线，而包含着靠得很近的许多谱线，相当于叠加到该振动跃迁上的许多转动跃迁。同样，因为有许多振动和转动能级的改变叠加到电子跃迁上，电子光谱实际上是电子 - 振动 - 转动光谱，表现出很复杂的结构。由于仪器分辨率及测试条件的影响，电子光谱中振动和转动能级跃迁所产生的谱线结构一般分辨不出，观察到的只是这些谱线展宽后合并在一起形成的较宽的吸收带。因此，分子光谱常以谱带为其特征。图 11-2 是四氮杂苯在不同测量条件下的紫外吸收光谱图，其蒸汽光谱呈现出明显的振动和转动能级跃迁所产生的光谱精细结构，在非极性溶剂环己烷中还可观察到振动 - 含转动效应的谱带，而在强极性溶剂水中精细结构完全消失，得到的是很宽的吸收带。

以测量分子转动能级、振动能级和电子能级跃迁所产生的分子吸收光谱为基础的定性、定量和结构分析的方法称为分子吸收光谱法。根据照射辐射的波谱区域不同，分子吸收光谱法可分为紫外分光光度法，可见分光光度法和红外分光光度法。

### 1. 紫外分光光度法 (ultraviolet spectrophotometry; UV)

又称紫外吸收光度法，紫外吸收光谱法。

紫外线波长范围为 10 ~ 400nm，其中 10 ~ 200nm 为远紫外区域，称真空紫外区，200 ~ 400nm 为近紫外区，与之对应有近紫外分光光度法和远紫外分光光度法。远紫外线能被空气中的氧气和水强烈地吸收，利用其进行分光光度分析，需将分光光度计抽真空，因此远紫外分光

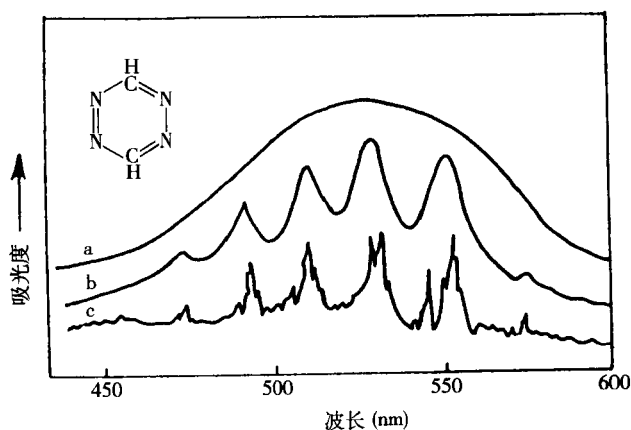


图 11-2 四氮杂苯的吸收光谱

(a) 四氮杂苯蒸汽；(b) 四氮杂苯溶于环己烷中；(c) 四氮杂苯溶于水中

光度法的研究与应用不多。通常所说的紫外分光光度法指的是近紫外区的分光光度法。

近紫外线光子能量约为  $6.2 \sim 3.1\text{eV}$  能引起分子外层电子(价电子)的能级跃迁并伴随振动能级与转动能级的跃迁,故吸收光谱表现为带状光谱。对有机物而言,具有共轭结构的分子,因其价电子能级跃迁所需能量与近紫外线光子能量相当,故为紫外分光光度法的主要研究对象。

## 2. 可见分光光度法 (visible spectrophotometry; VIS)

可见光波长范围为  $400 \sim 760\text{nm}$  光子能量为  $3.1 \sim 1.6\text{eV}$  能引起具有长共轭结构的有机分子或有色无机物的价电子能级跃迁,并伴随分子振动和转动能级跃迁,吸收光谱也为带状。

因紫外分光光度计上一般具有可见波段,因此常把紫外分光光度法和可见分光光度法合称为紫外-可见分光光度法 (UV-VIS)。紫外-可见分光光度法是药物分析应用最广泛的分光光度法之一,主要用于无机和有机物的定量分析及某些有机物的定性与结构分析。

## 3. 红外分光光度法 (infrared spectrophotometry; IR)

又称红外吸收光谱法,简称红外光谱法。



图 11-3 分子的伸缩振动 (a)和弯曲振动 (b)示意图

红外线波长为  $0.75 \sim 1000\mu\text{m}$ ,分近、中、远红外三个波段,各波段的波长范围,光子能量及相应的能级跃迁类型见表 11-1。其中中红外区  $2.5 \sim 50\mu\text{m}$  最为常用,中红外分光光度法 (Mid-IR; MIR) 即通常所指的红外分光光度法。中红外线光子

能量约为  $0.5 \sim 0.025\text{eV}$ ,可引起分子振动能级跃迁并伴随着转动能级跃迁,因此,其吸收光谱属于振-转光谱,为带状光谱。分子振动分为伸缩振动(键长周期性变化)及弯曲振动(键角周期性变化)两类如图 11-3 所示。分子吸收适宜频率的中红外线后,振幅或键角加大。

红外光谱因由基团中原子间振动而引起,故主要用于分析有机分子中所含基团类型及相互之间的关系。对于有机化合物结构分析具有重要作用。在定量方面虽也有应用,但灵敏度不及其它仪器方法,故不常用。

## (三) 磁共振波谱法

磁共振波谱是一类由磁场诱导而产生的吸收光谱。

### 1. 核磁共振波谱法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR)

在强磁场中,磁性原子核的自旋能级会受外磁场诱导而分裂成两个或两个以上的量子化能级。核自旋能级差很小,其大小与  $1 \sim 300\text{m}$  的无线电波能量相当,故当以一定频率的无线电波照射置于强场中的物质时,会引起分子中某种核的自旋能级跃迁,而发生该原子核自旋取向的改变。此即核磁共振(图 11-4)。

NMR法能够提供待测原子核的数目和它们在分子中的位置以及它们与邻近原子或基团的相互关系等信息。根据这些信息

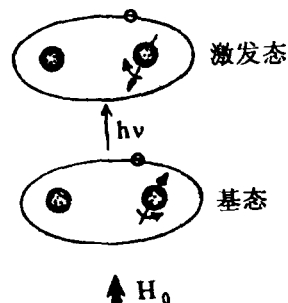


图 11-4 原子核自旋能级跃迁示意图

可描绘出原子或基团在分子中的排列，推出分子化学结构。NMR法是当前研究分子化学结构最有力的方法之一，也可进行定性和定量分析。

## 2. 顺磁共振波谱法

全称为电子顺磁共振波谱法 ( electron paramagnetic resonance spectroscopy; EPR ) 或电子自旋共振波谱法 electron spin resonance spectroscopy; ESR)。

具有未成对电子的物质在磁场中表现为顺磁性，称为顺磁性物质。这类物质在强磁场的作用下，其未成对电子的自旋被诱导发生量子化的能级分裂，这种自旋能级间的能级差比核自旋能级差大得多，当吸收  $1 \sim 10\text{cm}$  的微波后即发生跃迁而改变电子自旋的取向 ( 图 11-5 )。

顺磁共振研究的对象是具有未成对电子的化合物，主要用于自由基，过渡金属离子及其化合物，以及能产生自由基的物质的定性、定量及结构分析。

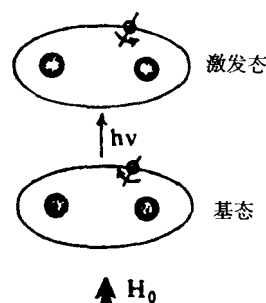


图 11-5 电子自旋能级跃迁示意图

## 二、发射光谱法

物质的原子、离子或分子受激后，由激发态回到基态或较低能态所产生的光谱称为发射光谱。根据发射光谱对物质进行定性、定量分析的方法称为发射光谱法。

### (一) 原子发射光谱法 (atomic emission spectroscopy; AES)

用火焰、电弧、辉光、等离子体等作为激发源，使气态原子或离子的外层电子受激发，由基态跃迁到激发态。处于激发态的电子很不稳定，在极短的时间内 ( 约  $10^{-8} \sim 10^{-7}$  秒 ) 便返回基态或其它较低能级上，在返回过程中能量往往以光的形式释放出来。发射光的波长或频率与跃迁前后能级差服从普朗克条件 ( 式 11-4 )，由于不同元素特有的原子结构、量子化的能级以及能级状态的多样性，因此，每种元素的原子都可产生一系列不同波长的特征光谱线。根据某些特征谱线的出现与否，可以判断有无某元素的存在，进一步测量谱线的强度就可进行定量分析。这就是原子发射光谱法。原子发射光谱法可进行多元素的同时测定。

### (二) 原子荧光光谱法 (atomic fluorescence spectroscopy; AFS)

又称原子荧光分光光度法、原子荧光分析法。

以辐射能作为激发源，使分子或原子的外层电子受激发，当其返回基态或较低能级时，有的便以发出辐射的方式 ( 二次辐射 ) 放出能量。这种以辐射能 ( 一次辐射 ) 为激发方式产生的二次辐射就称为荧光。根据由原子蒸气所发射的荧光光谱而建立的分析方法就叫原子荧光光谱法。原子荧光光谱法主要用于元素的定量分析。

原子荧光光谱与原子发射光谱波长一般均位于紫外-可见光谱区，且都为线状光谱。但两者受激方式不同。

### (三) 分子荧光光谱法 (molecular fluorescence spectroscopy; FS)

由分子产生的荧光称分子荧光。根据分子的荧光光谱而建立的分析方法称为分子荧光光谱法或分子荧光分析法，简称荧光分析法。荧光分析通常以紫外光作光源，其荧光波长

一般位于紫外 - 可见光谱区，为带状光谱。主要用于有机或无机物的定量分析。

#### (四) 分子磷光光谱法 (molecular phosphorescence spectroscopy; PS)

分子的磷光与荧光相似，也是由于分子价电子吸收光能激发后，在返回基态时而发出的辐射，而且两者一般都经过无辐射跃迁过渡到较低激发态，然后再以辐射形式返回基态。但它们的发光机理有根本的区别：荧光是由单重态 - 单重态的跃迁产生的，而磷光则是由三重态 - 单重态跃迁产生的(见第十五章)。根据分子磷光光谱而建立的分析方法称为分子磷光光谱法或分子磷光分析法，简称磷光分析法。它主要用于环境分析，药物研究等方面的有机化合物的定量测定。

#### (五) X 射线荧光分析法 (X-ray fluorometry; XRF)

以 X 射线初级作激发源照射物质，物质即发出次级 X 射线，这种由于 X 射线照射物质而产生的次级 X 射线叫 X 射线荧光。根据物质的 X 射线荧光进行元素定性、定量分析的方法就称为 X 射线荧光分析法。

X 射线荧光的产生是原子中内层电子发生能级跃迁的结果。X 射线波长短，能量大，当它作用于物质时，可从原子的内层打出一个电子，留下具有一个内层空穴的正离子，而较外层的电子立即跃迁到能级较低的内层轨道上，填补空穴。同时，以发射 X 射线的形式释放出量子化的能量。不同元素各有其特征的 X 射线荧光谱线，且谱线波长不随元素的物理及化学状态而变。因此 X 射线荧光分析是一种非破坏性的仪器分析，试样的状态可以是各种各样的，如固体、粉末、液体、浆状等。可进行多元素的同时分析，并具有分析浓度范围广的特点，从痕量到常量浓度均可得到满意的准确度和精密度。

### 三、Raman 光谱法

Raman 光谱是因散射光能而产生的。当用一定频率的激发光照射透明物质(固体、液体或气体)时，还可发生散射现象。在与入射光成直角的方向，可以检测到这种散射。如果散射光与入射光频率相同，这种散射称为瑞利散射；如果频率发生了变化，则称为拉曼(Raman)散射。一般认为瑞利散射的产生是因为分子吸收能量后，被激发至准激发态(其能级间于电子基态与第一电子激发态能级)，当返回基态原来的振动能级时，重新以光的形式放出能量，光子与分子间没有净的能量交换，只是改变了光子运动方向。Raman 散射则是由激发至准激发态的分子返回至比原来稍高或稍低的振动能级而产生的，光子与分子发生了能量交换，由此所得的散射光谱称为 Raman 光谱。Raman 谱线相对于光源谱线的频率位移称为 Raman 位移，朝低频率方向位移的谱线称为 Stokes 线，朝高频率方向位移的谱线则称为反 Stokes 线，Raman 谱线对称地排列于入射光谱线的两侧(见图 11-6)。分析中常用强度较大的 Stokes 线。分析上的 Raman 光谱一般是以 Raman 位移来表示的，即其纵坐标为谱带的相对强度，横坐标为 Raman 位移即波数。根据分子的特征 Raman 光谱来进行定性、定量和结构分析的方法称为 Raman 光谱法(Raman spectroscopy; Raman)。

Raman 位移反映了散射物质分子的振动 - 转动能级的改变，属于振动光谱，因此 Raman 光谱法常与红外光谱互为补充，成为有机结构分析的有力工具，激光光源 Raman 分光光度计的应用，使 Raman 光谱法得到了进一步的发展。

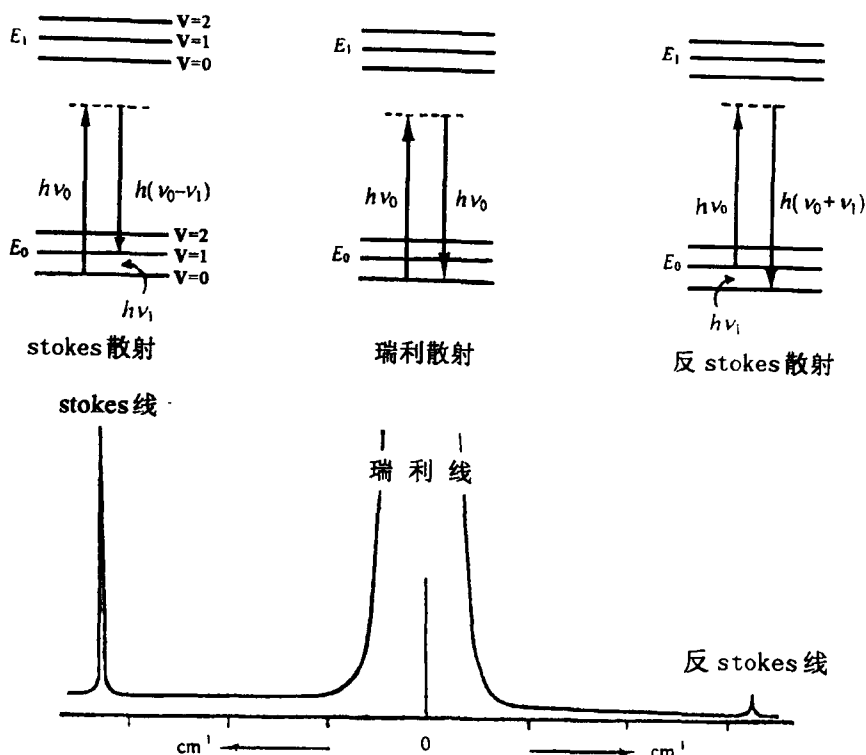


图 11-6 拉曼散射和瑞利散射时发生的能级跃迁与能量交换 (上) 及拉曼位移 (下)

#### 四、质谱法

质谱，是将化合物形成的离子，按其质量与电荷的比值不同进行分离测定得到的质量谱 (相对强度 - 质荷比)。根据质谱来确定分子的原子组成、分子量、分子式和分子结构的方法称为质谱法 (mass spectroscopy; MS)。因为它是未知物结构分析不可缺少的一环，经常与 UV、IR 及 NMR 等光谱法配合运用，关系密切，因此很多分析化学文献亦把质谱法归在光谱法中。

### 第三节 光谱分析法发展概况

半个世纪以来，光谱分析一直是分析化学中最有活力的领域。在各种分析方法中，光谱分析是研究最多和应用最广的分析技术之一。

物理学、电子学及数学等相邻学科的发展对光谱分析的发展起了巨大的推动作用。40 年代中期，电子学中光电倍增管的出现，促进了原子发射光谱、红外吸收光谱、紫外 - 可见吸收光谱及 X 射线荧光光谱等一系列光谱法的发展。50 年代原子物理的发展，使原子吸收及原子荧光光谱兴起。60 年代等离子体、傅立叶变换与激光技术的引入，出现了电感耦合

等离子体原子发射光谱 (ICP - AES)、傅立叶变换红外光谱 (FT - IR)、傅立叶变换核磁共振光谱 (FT - NMR) 及激光光谱 (如激光拉曼光谱、激光诱导荧光光谱、激光光声光谱) 等一系列光谱分析技术。70 年代以来, 计算机技术和化学计量学的发展, 进一步推动了光谱分析方法和仪器的发展。一机多能或多机联用; 吸取其它学科的新成果, 创立新的分析方法; 进一步提高仪器的自动化、智能化、微型化程度并使其满足高灵敏度、高选择性、更精密、更快速的分析需要, 已是光谱分析重要的发展趋势。近年来各种色谱与光谱联用技术如气相色谱 (GC) 与质谱、傅立叶变换红外光谱、核磁共振谱的联用 (GC - MS、GC - FTIR、GC - NMR) 液相色谱 (LC) 与上述光谱的联用 (LC - MS、LC - FTIR、LC - NMR) 及 LC - UV 高效毛细管电泳 - 质谱联用 (HPCE - MS) 以及 GC - FTIR - MS、LC - NMR - MS 等的出现与发展, 使复杂混合物的分离分析比较容易解决, 分析效能大大提高。同时, 三维光谱 - 色谱图 (波长 - 强度 - 时间) 的出现使联用技术更有特色, 在一张三维光谱 - 色谱图上, 可同时获得定性与定量信息。在此期间, 波谱法也有了很迅速的发展。超导, 高频率的核磁共振仪 (如 500 兆赫以上仪器) 的出现, 使核间高级耦合的复杂光谱可以变为一级耦合的简单光谱; 以及二维核磁共振技术 (H-H 相关与 C-C 相关谱等) 使核磁共振谱的解析及分子结构的测定更加容易, 更加迅速。

与其它仪器分析一样, 学科渗透、技术结合、取长补短, 融合 - 分化 - 融合是光谱分析发展的途径。

## 第十二章 可见分光光度法

### 第一节 概述

可见分光光度法 Visible spectrophotometry; VIS 是通过测定物质在可见光区波长范围内光的吸光度对该物质进行定量分析的方法。通常应用以滤光片获得单色光的光电比色计, 测量有色溶液的吸光度, 对组分进行含量测定的方法称为光电比色法; 而经棱镜或光栅等为单色器的分光光度计在可见光区测量溶液吸光度的测定方法称为可见分光光度法。由于两者均基于在可见光区吸光度的测定, 所以统称为可见分光光度法。

可见分光光度法一般适宜于微量组分的测定, 所测物质浓度下限可达  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  mol/L, 相对误差一般为 2~5%, 完全能满足微量组分的准确度要求。如果选用精密分光光度计测量 相对误差可降至 1~2%。采用示差法可测定高含量组分, 而使分光光度法进入常量分析领域。

此法不仅能测定有色物质, 还能通过显色反应测定无色物质。如果采用选择性高的显色剂和反应条件, 或选择分光光度法的特殊技术, 常可不经分离直接测定混合物中某种组分。除某些稀有元素和一些阴离子外, 几乎所有的无机离子和许多的有机物, 均可用此法进行定量分析, 还可用于酸、碱离解常数, 配合物组成和稳定常数的测定等方面的研究。因此, 可见分光光度法在科学研究、工农业生产以及医药卫生事业中都有广泛的应用。

### 第二节 基本原理

#### 一、Lambert - Beer定律

Lambert - Beer 定律是物质对光吸收的基本定律, 是分光光度分析法的依据和基础。Lambert 定律说明了物质对光的吸光度与吸光物质的液层厚度成正比关系。Beer 定律说明了物质对光的吸光度与吸光物质的浓度成正比关系。常将 Lambert 定律与 Beer 定律合并即为 Lambert - Beer 定律, 简称为吸收定律。

定律推导如下:

如图 12-1 所示, 当一束强度为  $I_0$  的平行

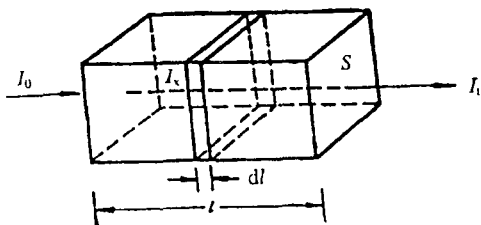


图 12-1

单色光垂直照射到长度为  $L$  的液层时, 由于溶液中吸光质点 (分子或离子) 的吸收, 因此光强度由  $I_0$  减弱到  $I_t$  ( $I_t < I_0$ )。如将液层分成厚度无限小的相等薄层  $dL$ , 设其截面积为  $S$ , 则每一薄层的体积  $dV$  为  $SdL$ 。又设薄层溶液中吸光质点数为  $dn$ , 照射到薄层溶液上的光强度为  $I_x$ , 光通过薄层溶液后强度减弱  $dI$ , 则  $dI$  与  $dn$ 、 $I_x$  成正比, 即

$$-dI = kI_x dn \quad (12-1)$$

负号表示光强度减弱,  $k$  为比例常数。

设吸光物质浓度为  $c$ , 则上述薄层溶液中的光质点数  $dn$  为

$$dn = k'cdV = k'SdL \quad (12-2)$$

$k'$  与所取浓度、面积及长度单位有关。式中  $S$  为光束截面积, 对仪器来说, 它为定值。将式 (12-2) 代入 (12-1) 中, 合并常数项, 得到

$$-dI = k''I_x cdL \quad (12-3)$$

式 (12-3) 积分后, 得到

$$\begin{aligned} \int_{I_0}^{I_t} dI &= - \int_0^L k''I_x cdL \\ \int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I_x} &= - \int_0^L k''cdL \\ \ln \frac{I_t}{I_0} &= -k''Lc \quad \log \frac{I_0}{I_t} = \frac{k''}{2.30} Lc = KLc \end{aligned} \quad (12-4)$$

式 (12-4) 中,  $\log(I_0/I_t)$  称为吸光度  $A$ , 它与溶液透光率  $T$  的关系为

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \log \frac{1}{T} \quad (12-5)$$

由式 (12-4) 及 (12-5) 得到 Lambert-Beer 定律的数学表达式

$$A = KLc \quad (12-6)$$

$K$  值随  $c$  所取单位不同而不同, 如果浓度  $c$  以摩尔浓度 (mol/L) 表示, 则 (12-6) 式可写成

$$A = \epsilon CL \quad (12-7)$$

如果浓度  $c$  以重量浓度 (g/100ml) 表示, 则 (12-6) 式可以写成

$$A = ECL \quad (12-8)$$

(12-7 式中  $\epsilon$ , (12-8 式中  $E$  均称为吸光系数。

## 二、吸光系数

吸光系数是在一定条件下，吸光物质在单位浓度及单位厚度时的吸光度。吸光系数与物质的性质、入射光波长、溶剂、温度等因素有关。物质对光具有选择性吸收，在相应波长下的吸光系数是该物质的物理常数。吸光系数作为特性常数取决于吸光物质的本性，还决定于吸光分子的有效截面积和电子跃迁几率。吸光系数愈大，说明该物质在某特定条件下吸光能力愈强，测定的灵敏度愈高。吸光系数可以作为吸光物质定性分析的依据和定量分析灵敏度的估量。吸光系数因溶液浓度单位不同，有两种表达方式：

### (一) 摩尔吸光系数 (molar absorptivity)

是指在一定入射波长下，溶液浓度为  $1\text{mol/L}$  液层厚度为  $1\text{cm}$  时的吸光度，用  $\epsilon$  表示。(见 12-7 式) 物质的摩尔吸光系数通常在  $10 \sim 10^5$  之间，大于  $10^4$  为强吸收，小于  $10^3$  为弱吸收。 $\epsilon$  值越大，方法的灵敏度越高。

### (二) 百分吸光系数 (specific absorptivity)

是指在一定入射波长下，溶液浓度为  $1\%$  ( $\text{g/ml}$ ) 液层厚度为  $1\text{cm}$  时的吸光度，用  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  表示 (见 12-8 式)。百分吸光系数常用于化合物组成不明，分子量尚不清楚的情况，在药物定量分析中应用广泛。我国现行药典均采用百分吸光系数。

吸光系数两种表示方式之间的关系用下式表示：

$$\epsilon = \frac{M}{10} E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad (12-9)$$

式 (12-9) 中  $M$  为吸光物质的摩尔质量。

在实际工作中，并不能直接取  $1\text{mol/L}$  或  $1\%$  这样高浓度的溶液进行测定  $\epsilon$  或  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ，而是用已知准确浓度低浓度溶液测量其吸光度，然后通过计算得出。例如左旋紫草素 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ ,  $M \approx 288.3$ ) 的乙醇溶液在  $516\text{nm}$  波长处有吸收峰。用纯品精密配成  $100\text{ml}$  含  $2.00\text{mg}$  左旋紫草素的乙醇溶液。以  $1\text{cm}$  厚度的吸收池在  $516\text{nm}$  处测定吸光度为  $0.484$ ，计算左旋紫草素的  $\epsilon$  和  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 。

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{A}{cL} = \frac{0.484}{0.002 \times 1} = 242$$

$$\epsilon = \frac{M}{10} E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{288.3}{10} \times 242 = 6977$$

### (三) 桑德尔灵敏度

分光光度法分析的灵敏度除用吸光系数表示外，还常用桑德尔 (Sandell) 灵敏度 灵敏度指数  $S$  来表示。桑德尔灵敏度本来是指人眼借助颜色反应，在单位截面积液柱内能够检出的物质最低含量以  $\mu\text{g/cm}^2$  表示。将此概念推广到各种光度仪器，则规定仪器的检测极限为  $A=0.001$  时，单位截面积光程内所能检测出来的吸光物质的最低含量，同样以  $\mu\text{g/cm}^2$  表示。 $S$  与  $\epsilon$  的关系可推导如下：

$$A = 0.001 = \epsilon CL$$

$$CL = \frac{0.001}{\epsilon} \quad (12-10)$$

C 为 mol/L 即 mol/1000cm<sup>3</sup>; L 为吸收层厚度 (cm), 故 C × L 为单位截面积光程内的摩尔数, 即 mol/1000cm<sup>2</sup>。如果 CL 乘以吸光物质的摩尔质量 M, 就是单位截面积光程内吸光物质的量, 即为 S, 所以

$$S = \frac{CL}{1000} M \times 10^6 = CLM \times 10^3 (\mu g/cm^2) \quad (12-11)$$

将 (12-10) 式中 CL 值代入 (12-11) 式中, 得到

$$S = \frac{0.001}{\epsilon} M \times 10^3 (\mu g/cm^2)$$

$$S = \frac{M}{\epsilon} (\mu g/cm^2) \quad (12-12)$$

### 第三节 · 显色反应及显色条件的选择

#### 一、显色反应和显色剂

可见分光光度法一般用来测定能吸收可见光的有色溶液。由于许多无机元素和有机化合物吸光系数值比较小, 而且有些不吸收可见光, 通常都是选用适当的试剂与供试品中被测组分定量反应生成对可见光有较大吸收的有色物质再进行测定, 这种反应称为显色反应, 所用的试剂称为显色剂。显色反应可以由无色物质变成有色物质, 也可由一种浅色物质变成另一种颜色较深的有色物质。

#### (一) 显色反应

##### 1. 显色反应的基本要求

(1) 被测物质和所生成的有色物质之间必须有稳定的定量关系, 方能使反应产物对光的吸光度准确反映被测物质的含量。

(2) 反应产物必须有足够的稳定性以保证测量结果有良好的重现性。

(3) 如显色剂本身有色, 则反应产物的颜色与显色剂的颜色必须有明显的差别, 即产物与显色剂的最大吸收波长的差别要在 60nm 以上, 才能分辨产物与显色剂的吸收。

(4) 反应产物的摩尔吸光系数在 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>5</sup> 范围, 对微量组分的测定, 灵敏度较高。

(5) 显色反应必须有较好的选择性。实际工作中可选择干扰组分容易消除的显色反应, 或者选择显色剂和被测组分生成物的吸收峰与显色剂和干扰组分生成物的吸收峰相隔较远的显色反应。对于萃取比色法, 应有足够大的分配比, 以保证萃取完全。

##### 2. 显色反应的类型

显色反应有各种类型, 如配位反应, 氧化还原反应, 缩合反应以及增加生色团的衍生

化反应等。其中用得最广泛的是配位反应。同一种物质常常可有几种显色反应，其原理和灵敏度亦有差别，可根据具体情况和要求进行选择。

(1) 配位反应：许多配离子或配合物有较深的颜色，可用作测定某些金属离子、阴离子或有机化合物。例如，具有未成键电子对的离子或分子如  $\text{CN}^-$ 、 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{NH}_3$  等能和一些金属离子生成有色配离子，可用于比色分析，如用  $\text{SCN}^-$  测定  $\text{Fe}^{3+}$ 、用  $\text{NH}_3$  测  $\text{Cu}^{2+}$  等。

一些含酚羟基、羟基、氨基、巯基等功能团的有机物能和金属离子生成有色配合物，如  $\text{Fe}^{3+}$  与酚类、水杨酸、没食子酸等生成不同颜色的配合物，可在一定的条件下用作比色测定。有些有机物与金属离子生成稳定的内络盐，在一定条件下有一定的选择性，被用作测定金属的有机试剂。如用双硫腙测  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  等离子。酯类与羟胺生成的羟肟酸能与  $\text{Fe}^{3+}$  生成红色的内络盐，可用于测定羧酸、酯、酸、酐、酰胺等化合物。

(2) 氧化还原反应：高价态离子有色的元素，可氧化成高价后比色，如铬、锰可氧化成  $\text{CrO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 、 $\text{MnO}_4^-$  等以后再比色测定。

还原态有色的也可用于比色，如钼酸盐可被还原成蓝色的钼蓝，可用以测定某些具有还原性的物质，如糖类等。

有些因氧化还原而变色的有机物可用以测定具有氧化还原性质的物质。例如，四氮唑盐类易被还原成深色的甲臌类，可用作测定还原性物质；常用的有 2,3,5-三苯四氮唑和蓝四氮唑等，可用以测定醛、酮、糖等还原性物质。如可的松类具有 17- $\alpha$  酮醇结构，具有还原性，能还原四氮唑，可用以测定此类激素物质。

(3) 缩合反应：有机化合物的缩合反应可因共轭体系增长而产生有色缩合物，或使原来的颜色加深。有些化合物已被用作测定某些官能团的常用试剂。例如，2,4-二硝基苯肼与羰基化合物缩合成腙，在酸性溶剂中呈黄橙色，在碱性溶剂中呈酒红色，可用作测定醛、酮等化合物。对二甲氨基苯甲醛试剂在酸性介质中与芳伯胺缩合成黄色产物可用作测定芳伯胺类化合物，此试剂还可与吡咯环、吲哚环等含氮杂环化合物缩合成有色物质。

## (二) 显色剂

### 1. 无机显色剂

无机显色剂在可见分光光度法中应用不多，这主要是因为生成的配合物不稳定，灵敏度和选择性也不高。目前，应用较多的仅有硫氰酸盐，钼酸胺和过氧化氢等。

### 2. 有机显色剂

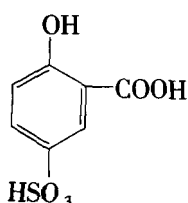
大多数有机显色剂能与金属离子生成稳定的螯合物，除了能测定金属离子外，也可利用金属离子作试剂测定具有配位体性质的有机物。如用铝或锆测定黄酮类化合物，显色反应的选择性和灵敏度都较高。有些有色螯合物易溶于有机溶剂，故可进行萃取比色，进一步提高测定的灵敏度和选择性。

有机显色剂的种类繁多，现简介几种如下：

(1) 磺基水杨酸：属于  $\text{O}=\text{O}$  型螯合显色剂，可与很多高价金属离子生成稳定的螯合物，主要用于测定  $\text{Fe}^{3+}$ 。磺基水杨酸与  $\text{Fe}^{3+}$  在  $\text{pH}1.8 \sim 2.5$  时生成红褐色的  $\text{FeSsal}^+$  在  $\text{pH}4 \sim 8$  时生成褐色的  $\text{Fe}(\text{Ssal})_2^-$ ； $\text{pH}8 \sim 11.5$  时生成黄色的  $\text{Fe}(\text{Ssal})_3^{3-}$ ； $\text{pH} > 12$  时，有色配合物被破坏而生成氢氧化铁沉淀。

$$\text{FeSsal}^+ \quad \lambda_{\max} = 520\text{nm} \quad \epsilon = 1.6 \times 10^3$$

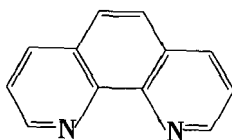
结构式



(2) 1,10-二氮菲 邻二氮菲 邻菲罗啉 属于 NN 型螯合显色剂 是目前测定微量  $\text{Fe}^{2+}$  的较好试剂。用还原剂 盐酸羟胺 先将  $\text{Fe}^{3+}$  还原成  $\text{Fe}^{2+}$  然后在 pH3 ~ 9(一般控制 pH5 ~ 6)的条件下,  $\text{Fe}^{2+}$  与试剂作用生成稳定的桔红色配合物。

$$\lambda_{\max} = 508\text{nm} \quad \epsilon = 1.1 \times 10^4$$

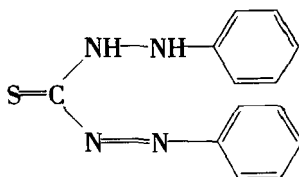
结构式



(3) 二苯硫脲 双硫脲 属于含 S 显色剂, 是目前萃取比色测定  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  等很多重金属离子的重要试剂。采用控制酸度及加入掩蔽剂的方法, 可以消除重金属离子之间的干扰, 提高反应的选择性。反应的灵敏度较高, 如  $\text{Pb}^{2+}$  的二苯硫脲配合物

$$\lambda_{\max} = 520\text{nm} \quad \epsilon = 6.6 \times 10^4$$

结构式

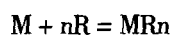


## 二、显色反应条件的选择

在初步选定好显色剂以后, 认真细致地研究显色反应的条件十分重要。对显色反应影响较大的重要因素有显色剂的用量、溶液酸度、反应时间、温度、溶剂等。

### (一) 显色剂的用量

为使显色反应能进行完全, 常需要加入过量的显色剂。生成配合物的显色反应可用下式表示:



$$\beta_n = \frac{[\text{MR}_n]}{[\text{M}][\text{R}]^n} \quad \text{或} \quad \frac{[\text{MR}_n]}{[\text{M}]} \approx \beta_n [\text{R}]^n \quad (12-13)$$

式中 M 代表金属离子, R 代表显色剂,  $\beta_n$  为配合物的累积稳定常数。由 (12-13) 式可

看出,当[ R]固定时,从 M 转变成  $MR_n$  的转化率不发生变化,对稳定性好的(即  $\beta_n$  大)配合物,只要显色剂过量,显色反应即能定量进行。而对不稳定的配合物或可形成逐级配合物时,显色剂用量要过量很多或必须严格控制。例如  $SCN^-$  作显色剂测定钼时,要求生成红色的  $Mo$

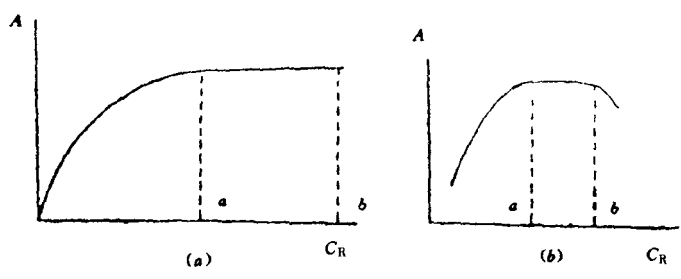


图 12-2 吸光度与显色剂浓度曲线

( $SCN$ )<sub>5</sub> 配合物进行测定。但当  $SCN^-$  浓度过高时,由于会生成浅红色的  $Mo(SCN)_6^-$  配合物而使吸光度降低。又例如用铁的硫氰酸配合物测定  $Fe^{3+}$  时,随  $SCN^-$  浓度增大,逐步形成颜色更深不同配位数的化合物,吸光度增加。 $SCN^-$  浓度低时,主要产物是  $FeSCN^{2+}$ ,当  $SCN^-$  为  $0.1mol/L$  左右时,生成  $Fe(SCN)_2^+$ ,若  $SCN^-$  的浓度大于  $0.2mol/L$  时则生成  $Fe(SCN)_3^-$  等阴离子。因此在这两种离子的测定中必须严格控制显色剂用量,才能得到准确的结果。显色剂的用量可通过实验确定,作吸光度随显色剂浓度变化曲线,选恒定吸光度值时的显色剂用量,见图 12-2。

(二) 溶液的酸度

多数显色剂都是有机弱酸或弱碱,介质的酸度会直接影响显色剂的存在形式,从而影响显色反应的完全程度。溶液酸度的影响表现在许多方面。

由于 pH 值不同,可形成具有不同配位数,不同颜色的配合物。金属离子与弱酸阴离子在酸性溶液中大多生成低配位数的配合物。当 pH 值增大时,游离的阴离子浓度相应增大,可能生成高配位数的化合物。如  $Fe^{3+}$  与磺基水杨酸  $C_7H_4SO_6^{2-}$  在不同 pH 条件下生成配比不同的配合物:

| pH 值范围    | 配合物组成                   | 颜色      |
|-----------|-------------------------|---------|
| 1.8 ~ 2.5 | $Fe(C_7H_4O_6S)^+$      | 红色(1:1) |
| 4 ~ 8     | $Fe(C_7H_4O_6S)_2^-$    | 橙色(1:2) |
| 8 ~ 11.5  | $Fe(C_7H_4O_6S)_3^{3-}$ | 黄色(1:3) |

当  $pH > 12$  时,则生成  $Fe(OH)_3$  沉淀,在用这类反应进行测定时,控制溶液 pH 值至关重要。

pH 值增大会引起某些金属离子水解,而形成各种型体的羟基化合物,甚至可能析出沉淀;或者由于生成金属的氢氧化物而破坏了有色配合物,使溶液的颜色完全褪去。

实际工作中可通过实验来确实显色的适宜酸度。具体做法是固定溶液中待测组分与显色剂的浓度,改变溶液的酸度(pH 值)分别测定溶液的吸光度,然后绘制吸光度 A 与 pH 的关系曲线,从中找出适宜 pH 范围。

(三) 显色时间