

## 第三章 光谱分析技术

光谱分析技术 (spectrum analysis technology) 是利用各种化学物质所具有的吸收、发射或散射光谱系的特征, 来确定其性质、结构或含量的一种技术。因为它具有精确度高, 灵敏度高, 操作简便快速等优点, 已成为生物化学研究中广泛使用的技术之一。

根据光谱谱系的特征不同, 可把光谱分析技术分为吸收光谱分析、散射光谱分析和发射光谱分析。应用吸收光谱原理进行分析的主要有分光光度法, 包括可见光分光光度法、紫外光分光光度法、红外分光光度法, 以及原子吸收分光光度法等; 应用发射光谱原理进行分析的主要有荧光光度法和火焰光度法; 应用散射光谱原理进行分析的主要有比浊法。

### 第一节 分光光度法的基本知识



分光光度法 (spectrophotometry) 是利用各种化学物质所特有的吸收光谱来测定其含量或鉴别物质的一种分析方法。

由于不同的化学物质中生色团与助色团的种类、数目及其在分子中所处的位置与环境不同, 导致所测出的吸收光谱不同。因此, 可以根据吸收光谱的形状和特征, 对物质进行鉴别、含量测定等。

#### 一、基本原理

##### (一) 有色溶液与光吸收的关系

###### 1. 光谱的分类

白光通过棱镜后可以分解成各种波长不同的色光, 把不能再分解, 具有一种波长的光叫作单色光。混合光分解成各种单色光的现象叫作光的色散, 由于色散作用而形成的色光按照一定的次序排列便形成光谱。

每一种颜色的光都具其特定的波长范围, 人们视觉可见的光称为可见光, 表现为红色、橙色、黄色、绿色、青色、蓝色、紫色等颜色, 波长范围在 400 ~ 760 nm; 波长 < 400 nm 的光线称为

紫外光；波长大于 760 nm 的光线称为红外光。紫外光和红外光都是视觉不可见的。

## 2. 互补色

如果按一定的强度比例将两种适当颜色的光混合,可以形成白光,则这两种色光就称为互补色光。如图 3-1 所示,直径两端的颜色互为补色,即互有最大的吸收。如黄光与蓝光、绿光与紫光、红光与青光即为互补色光。



图 3-1 各种颜色光的互补关系

## 3. 溶液的颜色与光吸收

有色溶液之所以呈现不同的颜色,是由于该溶液在可见光区有选择地吸收自然光的一部分光能,从而使透过光(或散射光、反射光)的组成发生改变而形成。

当白色光通过溶液时,如果溶液对各种波长的光都不吸收,则溶液是无色透明的。如果溶液对某些波长的光吸收较少而对其他波长的光吸收较多,则溶液呈现这种吸收较少而透过较多的光的颜色。即溶液对不同波长的光具有不同的吸收能力,其呈现的颜色是它主要吸收光的互补色。

例如,当一束白光通过  $\text{CuSO}_4$  溶液时,该溶液选择性地吸收黄色光,而其他颜色的光均为两两互补成白光而通过去,透过光中只剩下蓝色光未被互补,所以  $\text{CuSO}_4$  溶液呈现蓝色。同理,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  溶液吸收了蓝色光,所以溶液呈现黄色。

大多数物质本身具有一定的颜色,也有一些物质本身虽是无色的,但加入适当的试剂后通过发生反应可生成有色的物质。溶液的浓度越大,其颜色越深,对光的吸收也越大。所以,可通过测定溶液在某一波长下的吸光度值来确定溶液的浓度。

## 4. 光吸收的基本原理

当某单色光通过溶液时,其透射光强会减弱(图 3-2)。因为有一部分光在溶液的表面被反射或散射,还有一部分光被组成此溶液的物质所吸收,只有一部分光可透过溶液。即:

$$\text{入射光} = \text{反射光} + \text{散射光} + \text{吸收光} + \text{透射光}$$

如果用蒸馏水(或组成此溶液的溶剂)作为“空白”去校正散射、反射等因素造成的入射光的损失,则:

$$\text{入射光} = \text{吸收光} + \text{透射光}$$

以  $I_0$  表示空白校正后的入射光强度,  $I_t$  表示透射光强度,透射光强度与入射光强度之比称为透光度或透光率,用  $T$  表示。即:

$$T = I_t / I_0$$

溶液的透光度越大,说明其对光的吸收越小。相反,透光度越小,溶液对光的吸收越大。

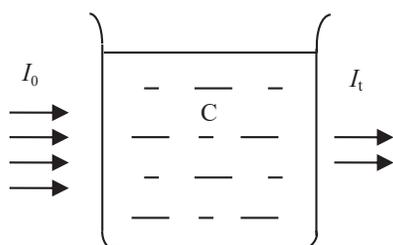


图 3-2 光吸收示意图

## (二) 朗伯 - 比尔定律

### 1. 朗伯定律

布格 (Bouguer) 和朗伯 (Lambert) 先后于 1729 年和 1760 年阐明了光的吸收程度 ( $A$ ) 和吸收层厚度 ( $L$ ) 的关系, 即朗伯 (Lambert) 定律。

一束单色光在通过均匀透明溶液时, 由于溶液吸收了一部分光能, 使得光的强度减弱, 若溶液浓度不变, 则溶液的厚度越大, 光线的强度减弱也越显著, 即光吸收的量与溶液的厚度成比例关系。

Lambert 定律可表示为:

$$\lg I_0 / I_t = KL \quad (K \text{ 为吸光系数}) \quad (1)$$

### 2. 比尔定律

1852 年比尔 (Beer) 又提出了光的吸收程度 ( $A$ ) 和吸收物浓度 ( $L$ ) 之间也具有类似的关系, 即比尔 (Beer) 定律。

一束单色光在通过均匀透明溶液时, 若溶液的厚度不变, 则溶液的浓度越高, 光线强度的减弱也越显著, 即溶液对光的吸收与溶液的浓度成比例关系。

Beer 定律可用下式表示:

$$\lg I_0 / I_t = KC \quad (2)$$

### 3. 朗伯 - 比尔定律

如果同时考虑液层厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 将朗伯 (Lambert) 定律和比尔 (Beer) 定律结合, 则称为朗伯 - 比尔 (Lambert-Beer) 定律。Lambert-Beer 定律它是吸收光谱法的基本定律。

$$\lg I_0 / I_t = KCL \quad (3)$$

此公式为 Lambert-Beer 定律的数学形式。其物理意义是:

当  $I_t=0$  时,  $\lg I_0 / I_t=0$ , 表示溶液完全不吸收光线;

当  $I_t \ll I_0$  时,  $\lg I_0 / I_t$  值大, 表示溶液吸收光线较多;

当  $I_t \rightarrow I_0$  时,  $\lg I_0 / I_t$  值无穷大, 表示光线几乎完全被溶液吸收, 即溶液不透光。

由此可见,  $\lg I_0 / I_t$  表示溶液对光线吸收的程度, 故称为吸光度 (absorbance,  $A$ ) 表示, 即  $A = \lg I_0 / I_t$ 。

于是 (3) 式也可写成:

$$A = KCL \quad (4)$$

### （三）吸光系数

由（4）式可得知， $K = A / (C \cdot L)$ ，它表示有色溶液在单位厚度和单位浓度时的吸光度。 $K$ 是比例常数，又称消光系数或吸光系数。吸光系数是物质的特征性常数，它与入射光的波长和物质性质有关，而与光的强度、溶液浓度及液层厚度无关。在入射光波长、温度和溶液种类一定的条件下，吸光系数它是一个定值，可以通过实验测得。

在吸光度与浓度（或厚度）之间的直线关系中，吸光系数表示物质对某一特定波长光的吸收能力，其值越大，表示吸光能力越强，比色测定的灵敏度也越高。

吸光系数的表示方法有百分浓度吸光系数和摩尔浓度吸光系数两种。

百分浓度吸光系数：即以百分浓度来表示的吸光系数，它等于液层厚度为 1 cm，并且当溶液浓度为 1% 时的吸光度值。

摩尔浓度吸光系数：即以摩尔浓度来表示的吸光系数，它等于液层厚度为 1 cm，并且当溶液浓度为 1 mol/L 时的吸光度值。

## 二、待测溶液浓度的计算

通常，分光光度计测定时直接读出透明溶液的吸光度值，然后按下列方式进一步处理，就可求出待测溶液浓度。

### （一）标准管法

在相同实验条件下同时测定标准液与待测液的吸光度值，然后进行计算。

根据 Lambert-Beer 定律公式得：

$$\text{标准溶液：} A_1 = K_1 \cdot C_1 \cdot L_1$$

$$\text{待测溶液：} A_2 = K_2 \cdot C_2 \cdot L_2$$

两种溶液是同一物质的两种不同的浓度，其液层厚度相等，即  $L_1 = L_2$ ；光源、温度等测定条件也相同，在测定时所用的波长也相同，因此  $K_1 = K_2$ 。将上述两式相比得：

$$A_1/A_2 = C_1/C_2$$

得到：

$$C_2 = A_2 C_1 / A_1$$

公式中  $C_1$  为已知， $A_1$ 、 $A_2$  可由分光光度计测出，则待测溶液的浓度  $C_2$  即可求出。

### （二）标准曲线法

当分析大批待测溶液时，采用标准曲线法比较方便。

首先配制一系列浓度由小到大的同一种标准溶液，分别测出它们的吸光度值。然后以各管的吸光度值为纵坐标，浓度值为横坐标，在方格坐标纸上作图得出标准曲线（图 3-3）。在标准溶液的一定浓度范围内，溶液的浓度与其吸光度之间呈直线关系。

需要注意的是，在制作标准曲线时，至少需要配制 5 种浓度递增的标准溶液，测出的数据至少有 3 个点落在直线上，这样的标准曲线方可用来求待测溶液的浓度。

测定待测溶液时，实验条件应与标准曲线制作时的实验条件相同。读出待测溶液的吸光度后，即可从标准曲线上直接查出该吸光度值所对应的浓度值。

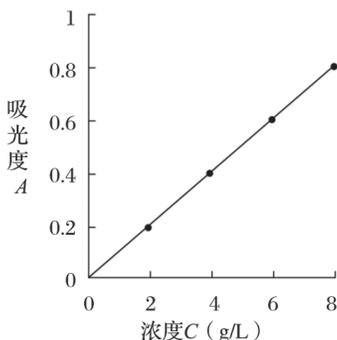


图 3-3 标准曲线

### (三) 标准系数法

此法较上述两法简便。将多次测定标准溶液的吸光度算出平均值后，按下式求出标准系数：

$$\text{标准系数} = \text{标准液浓度} / \text{标准液平均吸光度}$$

将用同样实验条件测出的待测溶液的吸光度代入下式即可求出待测溶液的浓度：

$$\text{待测溶液浓度} = \text{待测溶液吸光度} \times \text{标准系数}$$

### (四) 吸光系数法

吸光系数计算浓度的公式为： $C = A/\epsilon$

当浓度为 1 mol/L 的溶液厚度为 1 cm 时， $\epsilon = A$ 。在同样实验条件下测得的待测溶液的吸光度，可用上式计算出浓度。

此公式常用于紫外吸收法，待测物质不需要显色，操作简便。如对蛋白质溶液含量的测定，利用已知蛋白质在波长 280 nm 的摩尔吸光系数，再读取待测蛋白质的吸光度，即可算出待测蛋白质的浓度。

## 三、偏离朗伯 - 比尔定律的原因

根据朗伯 - 比尔定律，吸光度与浓度之间的关系应该是一条通过原点的直线，但是在实际测定中，往往容易发生偏离直线的现象而引起误差（图 3-4），引起偏离的原因有以下两个方面。

### (一) 由于非单色光引起的偏离

严格地说，朗伯 - 比耳定律只适用于单色光，但实际上目前各种方法

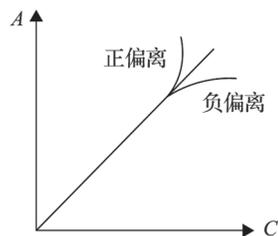


图 3-4 标准曲线的偏离

所得到的人射光都混有其他波长的杂光，因而导致这种偏离。

## （二）由于溶液本身的原因所引起的偏离

### 1. 由于介质的不均匀性引起的偏离

当被测物是乳浊液、胶体溶液或悬浮物质时，入射光通过溶液后，除了一部分被溶液吸收外，还有一部分因散射现象而损失，因而实测吸光度增加，导致偏离。

### 2. 由于溶液中的化学反应所引起的偏离

溶液中的吸光物质常因解离，缔合形成新的化合物或发生结构互变，从而使待测物的浓度发生改变。其结果必然导致偏离朗伯 - 比尔定律。

## 四、分光光度法的影响因素

### （一）测定条件的选择

#### 1. 波长的选择

根据测定组分的吸收光谱，一般选择吸收强度最大吸收峰处的波长 ( $\lambda_{\max}$ ) 作为测量波长。因为在  $\lambda_{\max}$  处吸光度随波长改变变化较小，可获得较好的测量精度，再者由于此处单位浓度所产生的吸光度最大，可得到最大的灵敏度。但在实际工作中并非任何情况下都适用，如果在  $\lambda_{\max}$  处有干扰物质存在，待测物质浓度较高或吸收峰较窄时，采用  $\lambda_{\max}$  作为测定波长就会引起较大测量误差，此时可选择灵敏度较低，无干扰的吸收峰或宽峰作为测定波长。总之，选择波长的原则是“吸收最大，干扰最小”。

如图 3-5 所示，A 物质最大吸收波长在 a 处，但在同样波长下 B 物质也有吸收，对测定有干扰。因此，选择 b 处波长比较合适，此时灵敏度虽有所降低，但消除了 B 物质的干扰，就提高了准确度。

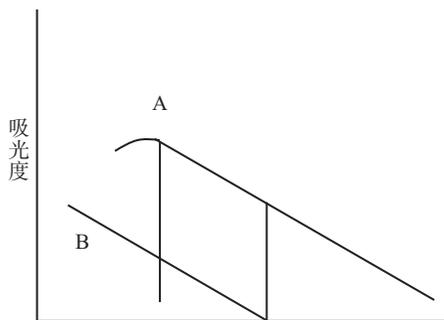


图 3-5 A、B 物质吸收曲线

#### 2. 吸光度的选择（溶液浓度选择）

溶液的吸光度太小或太大都会影响测定的准确度。透光度所引起的浓度相对误差 ( $\Delta c/c$ ) 称光度误差。表 3-1 列举了同透光度下测定的相对光度误差。

表 3-1 不同透光度下测定的相对  $\Delta C/C$  ( $T=1\%$ )

$T\%$	$\Delta c/c$ (%)	$T\%$	$\Delta c/c$ (%)	$T\%$	$\Delta c/c$ (%)
99	101.00	70	4.01	20	3.11
98	50.50	60	3.26	10	4.34
95	20.50	50	2.88	5	6.70
90	10.60	40	2.73	2	12.80
80	5.60	30	2.77	1	43.30

当透光度在 15% ~ 65% (吸光度为 0.8 ~ 0.2) 范围内, 光度误差小于 3.5%; 当透光度增大或减小, 光度误差会急剧增大。因此, 为了减小光度误差, 一般要求待测样品的吸光度在 0.2 ~ 0.8 的范围内。

为了控制吸光度, 根据  $A = KCL$  关系可以看出, 改变比色杯的厚度或调节溶液的浓度, 都可控制溶液的吸光度在适当的范围内。一般采用改变溶液浓度的方法控制吸光度在适当的范围内。

## (二) 显色反应及影响因素

在可见光区进行分光光度法测定时需要选择适当的显色剂与待测组分进行络合反应或氧化还原反应, 生成有色化合物, 然后进行测定。

选择合适的显色剂, 从而使显色反应灵敏度高, 选择性好, 化学性质稳定。显色剂的用量、溶液的温度、pH 和反应时间都会直接影响到生成的有色物质的解离平衡, 这些因素的变化能引起颜色深浅的变化, 从而影响比色测定的准确度, 因此必须控制显色条件。另外, 有些杂质也能与显色剂也能生成有色溶液而干扰测定, 所以在比色测定前必须设法除掉干扰物质。

此外, 在比色分析中, 常需要利用空白溶液调节仪器的透光度为 100%, 此时吸光度为零。空白溶液仅仅不含有被测物质, 而其他溶剂、试剂和处理条件等与被测溶液完全相同。故利用空白溶液可消除显色剂中其他有色物质的干扰, 抵消比色杯和试剂对入射光的影响。

## 第二节 分光光度计的结构与使用



### 一、分光光度计的部件介绍

分光光度计是一种靠光栅或棱镜提供单色光的比色计。不论型式如何, 各种型号的分光光度计基本上都由五部分组成 (如图 3-6 所示): 光源、单色器、吸收池、检测器、显示器。

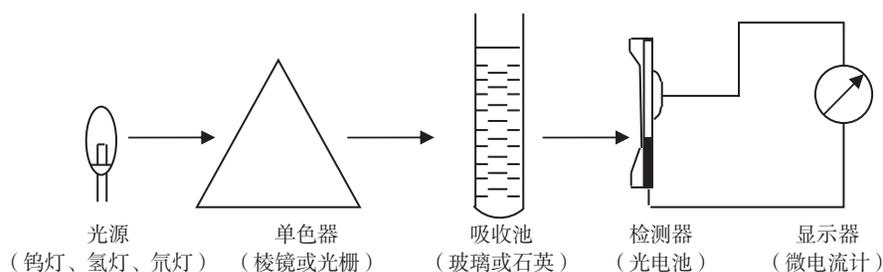


图 3-6 分光光度计的部件组成

### (一) 光源

光源必须具有稳定的、足够强度的连续光谱，光亮均匀，能通过聚光镜而成为平行光。可见光源通常为钨灯光源，其光谱范围为 320 ~ 2 500 nm。紫外光常以低压氢弧灯为光源。为透过紫外光，氢弧灯具石英窗，其光谱范围为 180 ~ 375 nm。通常，用可见光源测定有色物质的方法，称为可见光光度法；用紫外光源测定无色物质的方法，称为紫外分光光度法。

为了保证光源的稳定常配有稳压电源，氢弧灯需经预热，故需配置开关管控制的专用稳压器。

### (二) 单色器

单色器又称分光系统，是一种将混合光波分解为单一波长光的装置。根据色散元件不同，常见的单色器可分为棱镜单色器和光栅单色器两类。

棱镜单色器是由石英或玻璃制成的。用玻璃制成的棱镜，分辨率高、色散力强，只能在可见光区工作。石英棱镜用于紫外分光光度计中，在紫外区有较好分辨力，而且也适用于可见光和近红外光区。棱镜的特点是波长越短，色散程度越好。

光栅是另一类色散元件，它是在一块平面度要求很高、热膨胀系数很小的光学玻璃上，用真空蒸镀法镀上一层厚度为 0.5 ~ 1  $\mu\text{m}$  的铝反射层，然后用金刚石刀在铝层上挤压出许多等间隔等宽平行刻纹，这样就形成了光栅，光源光照射到光栅上，形成光栅的多级衍射光谱。光栅的优点是：波长范围宽（从几纳米到几百微米），分辨力高，色散均匀。缺点：各级光谱重叠而相互干扰。

### (三) 吸收池

吸收池又称比色皿，是盛装测定液的容器，按容量或光程的不同有不同的规格，常用比色皿的光程长度为 1 cm，若用高浓度或低浓度测定时，也可选用大于或小于 1 cm 的比色皿。

比色皿分为玻璃比色皿和石英比色皿两种。前者只适用于可见光的测定，后者主要用于紫外光的测定，也可用于可见光的测定。

每一个比色皿的透光性能常有不同，对要求精密的检测，要配对选择，只选用 2 ~ 4 个透光性能非常相近的比色皿，并对应于空白或标准液的比色皿固定使用。

### (四) 检测器

来自单色器的单色光通过样品和空白溶液时，光强度发生了改变，为了表示光强度的变化值，

需对光强度进行测量并以电信号形式表示，这种光电转化设备称检测器。分光光度计中最常见的检测器是光电管和光电倍增管等。

### （五）显示器

显示器是将检测器获得的电信号经放大后并能把待测结果的数据显示出来的装置。在分光光度计上用得较普通的是直读式和光点反射式显示仪表，大都是各种微安表，其刻度有线性的百分透光度及对数的吸光度两种。

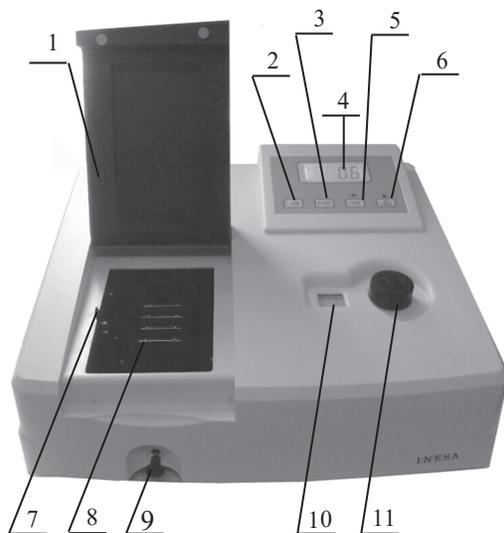
## 二、分光光度计的结构和具体操作

常用的分光光度计有很多种，下面简要介绍常用的 722G 型可见光分光光度计和 UV754N 型紫外分光光度计的结构和使用方法。

### （一）722G 型可见光分光光度计

#### 1. 结构

722G 型可见光分光光度计（外形如图 3-7）采用微处理机控制技术，在可见光谱区域内对物质作定性、定量分析，光谱范围在 325 ~ 1 000 nm。具用先进的全息闪耀光栅 C-T 式单色器，具有波长精度高、单色性好、杂散光低等优点。



722G 型可见光  
分光光度计

图 3-7 722G 型可见光分光光度计外形示意图

1. 比色室盖；2.MODE；3.PRINT；4. 数字显示屏；5.0%T；6.100%T；7. 光门挡片；8. 比色皿架；9. 比色皿架滑竿；10. 波长刻度窗；11. 波长手轮

#### 2. 具体操作

- （1）开机预热：打开电源，开机预热 20 min。
- （2）加样：将比色皿用蒸馏水清洗数遍，倒过来将水稍微控干，再用待测样品润洗后，倒入待

测样品。习惯上将盛装空白溶液的比色皿放入比色皿座架中的第一格内，并对准光路。然后，按顺序依次将待测液的比色皿放入比色槽内。

(3) 设定波长：根据实验要求，旋动波长手轮，把测试所需的波长调节至刻度线处

(4) 调零：本仪器键盘共四个按键，分别为：MODE、PRINT、0%T、100%T。其中，MODE 键切换 A、T、C、F 值。A：吸光度 (absorbance)；T：透射比 (transmittance)；C：浓度 (concentration)；F：斜率 (factor)。

调零时，MODE 键必须切换 T 状态。①调节 T=0%：打开样品室盖（光门自动关闭），按“0% T”键调零，数字显示为“0.00%”。②调节 T=100%：盖上样品室盖，此时空白溶液正对光路，按“100% T”键，数字显示为“100.0%”。

(5) 测定：①按 MODE 键切换至“A”，此时因为空白溶液置于光路中，数字显示为“0.000 A”；②轻轻拉动比色室滑竿，使待测溶液进入光路，此时数字显示值即为该待测溶液的吸光度值。读数，然后记录数值。

(6) 收整：实验完毕，将比色皿取出洗净，将溶液倒回原试管，并将比色皿冲洗干净后放入盒中。为防止光电管疲劳，在本组同学的结果测出来之后，应打开比色室盖子。

## 深入探究

### 分光光度计加样时，比色皿有哪些注意事项？

①分光光度计需要根据波长选择合适的比色皿，350 nm 以下的波长必须使用石英比色皿，350 nm 以上的波长一般使用玻璃比色皿。②比色皿分为透光面和磨砂面，比色皿的透光面必须保持干净，指纹、油腻、内壁上的气泡或沉积物都将影响其透光性能。因此，比色皿清洗后只能以很柔软的纯棉布或镜头纸擦净透光面，并且手持比色皿时也必须是手持磨砂面。③比色皿在盛装液体时，要注意所盛溶液的体积。体积必须超过 1/2，防止光线没有透过溶液；但是也不宜太多，不能超过 4/5，防止溶液溢出，腐蚀仪器。一般溶液达到比色皿的 3/4 即可。

## (二) UV754N 型紫外分光光度计

### 1. 结构

UV754N 型紫外分光光度计（外形如图 3-8）可在紫外光谱和可见光谱区域内对物质作定性、定量分析，光谱范围在 200 ~ 1 000 nm。采用先进的全息闪耀光栅单色器，具有波长精度高，单色性好，杂散光低等优点。

UV754N 型紫外分光光度计的外形结构与 722G 型可见光分光光度计十分相似，两者在外形上最大的区别就是数字显示屏附近的按键设置。