

# Chapter9 吸光光度法

§ 9-1 吸光光度法基本原理

§ 9-2 光度计及其基本部件

§ 9-3 显色反应及显色条件的选择

§ 9-4 吸光度测量条件的选择

§ 9-5 吸光光度法的应用

§ 9-6 紫外吸收光谱法简介

§ 9-7 分子发光分析法简介

建立在物质对光的选择性吸收基础上的分析方法称为吸光光度法。



### 光学光谱区

| 紫外光                         | 可见光       | 红外光  |
|-----------------------------|-----------|--|
| 10~200nm(远)<br>200~400nm(近) | 400~750nm | 0.75~2.5 μm(近)<br>2.5~50 μm(中)<br>50~1000μm(远) |



吸光光度法

借助比色计——比色法

借助分光光度计——分光光度法

方法的特点:

(1) **灵敏高** — 定量下限 $10^{-5} \sim 10^{-6}$  mol/L或 $10^{-4} \sim 10^{-5} \%$ 。

| 被测组分 | 含量 (%)        | $\mu\text{g/g}$  |
|------|---------------|------------------|
| 常量   | 1 ~ 100       | $10^4 \sim 10^6$ |
| 微量   | 0.01 ~ 1      | 100 ~ 1000       |
| 痕量   | 0.0001 ~ 0.01 | 1 ~ 100          |
| 超痕量  | <0.0001       | <1               |

(2) **准确度满足微量分析要求**— 相对误差 2% ~ 5%。

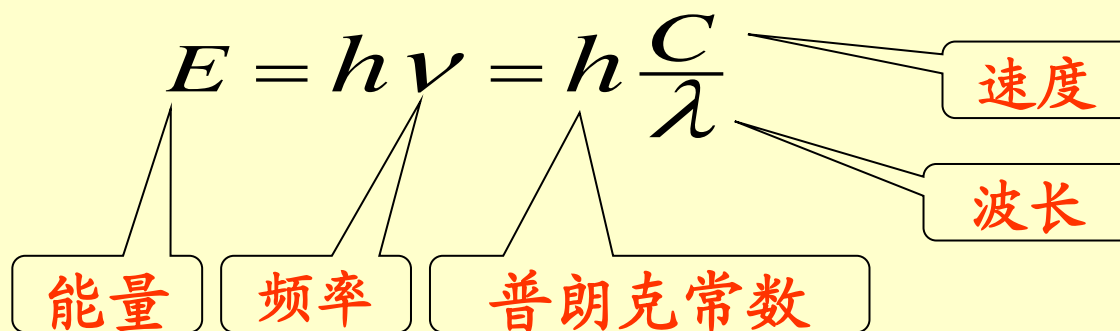
(3) **操作简便**。

(4) **选择性好, 应用广泛**。

# § 9-1 吸光光度法基本原理

## 一、光的基本性质

——光波具有波粒二象性，光子的能量与光波的频率或波长相关。

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$


The diagram illustrates the equation  $E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$  with callouts for each variable:

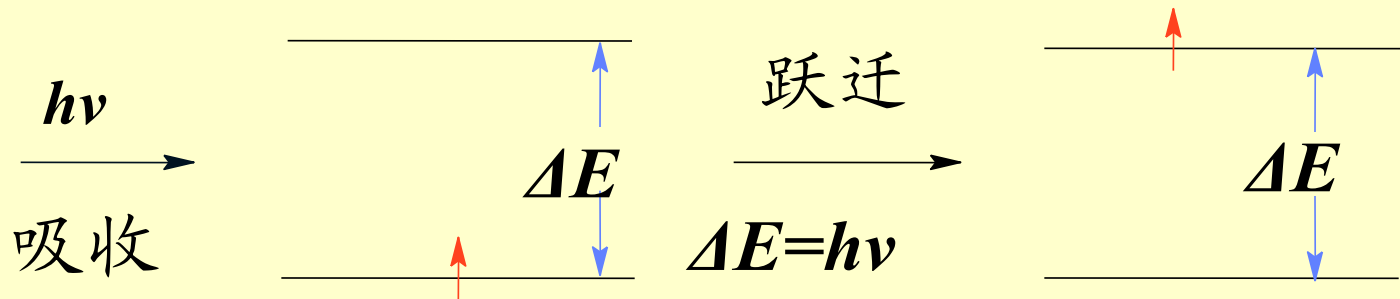
- $E$ : 能量 (Energy)
- $\nu$ : 频率 (Frequency)
- $h$ : 普朗克常数 (Planck constant)
- $c$ : 速度 (Speed of light)
- $\lambda$ : 波长 (Wavelength)

光子的能量与频率成正比，与波长成反比。

## 二、物质对光的选择性吸收

### 1. 产生选择性吸收的本质

构成物质的分子都处在一定的能级上运动。当物质分子吸收了一定频率的可见光后，它的外层电子就会发生跃迁，从而使分子的能量升高。



分子轨道的能级差决定了吸收光的频率。由于不同分子的能级差是不同的，因此，不同物质对不同频率光的吸收是具有选择性的。

## 2. 吸收光与溶液的颜色

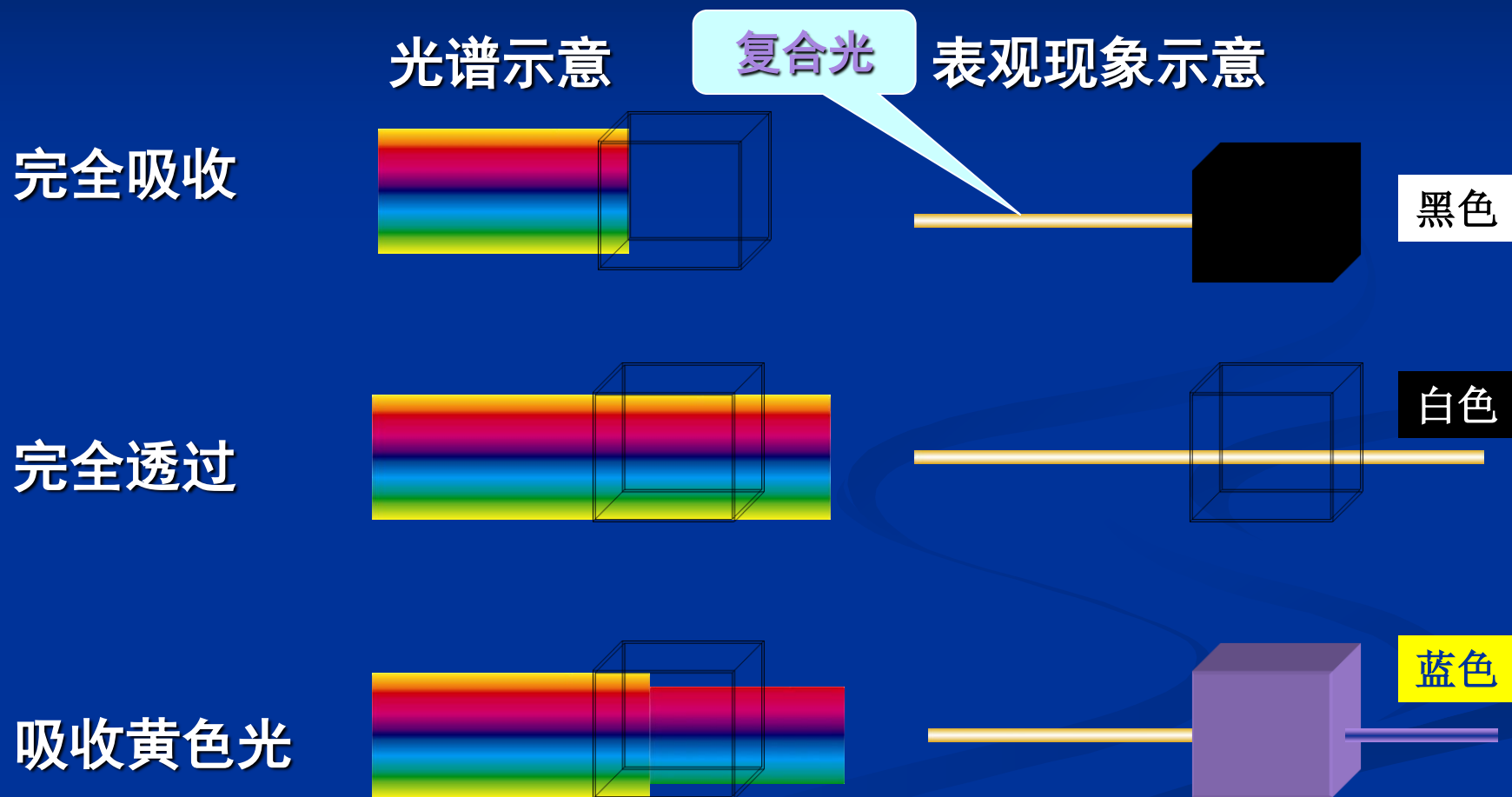
溶液的颜色与吸收光的颜色成互补关系。

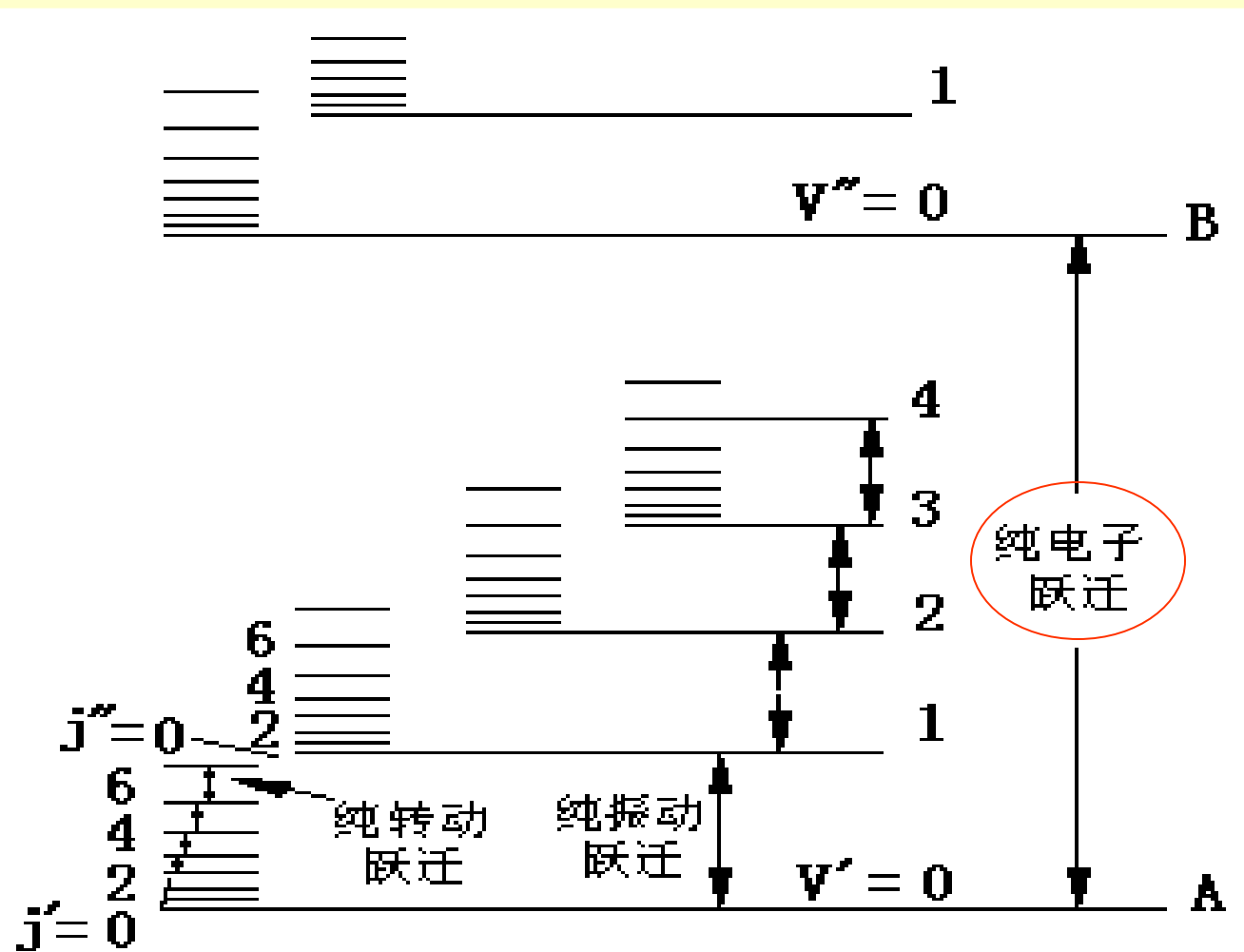
| 溶液的颜色 | 吸收光 |         |
|-------|-----|---------|
|       | 颜色  | 波长/nm   |
| 黄绿    | 紫   | 400~450 |
| 黄     | 蓝   | 450~480 |
| 橙     | 绿蓝  | 480~490 |
| 红     | 蓝绿  | 490~500 |
| 紫红    | 绿   | 500~560 |
| 紫     | 黄绿  | 560~580 |
| 蓝     | 黄   | 580~600 |
| 绿蓝    | 橙   | 600~650 |
| 蓝绿    | 红   | 650~750 |



光的互补色示意图

# 物质的颜色与光的关系



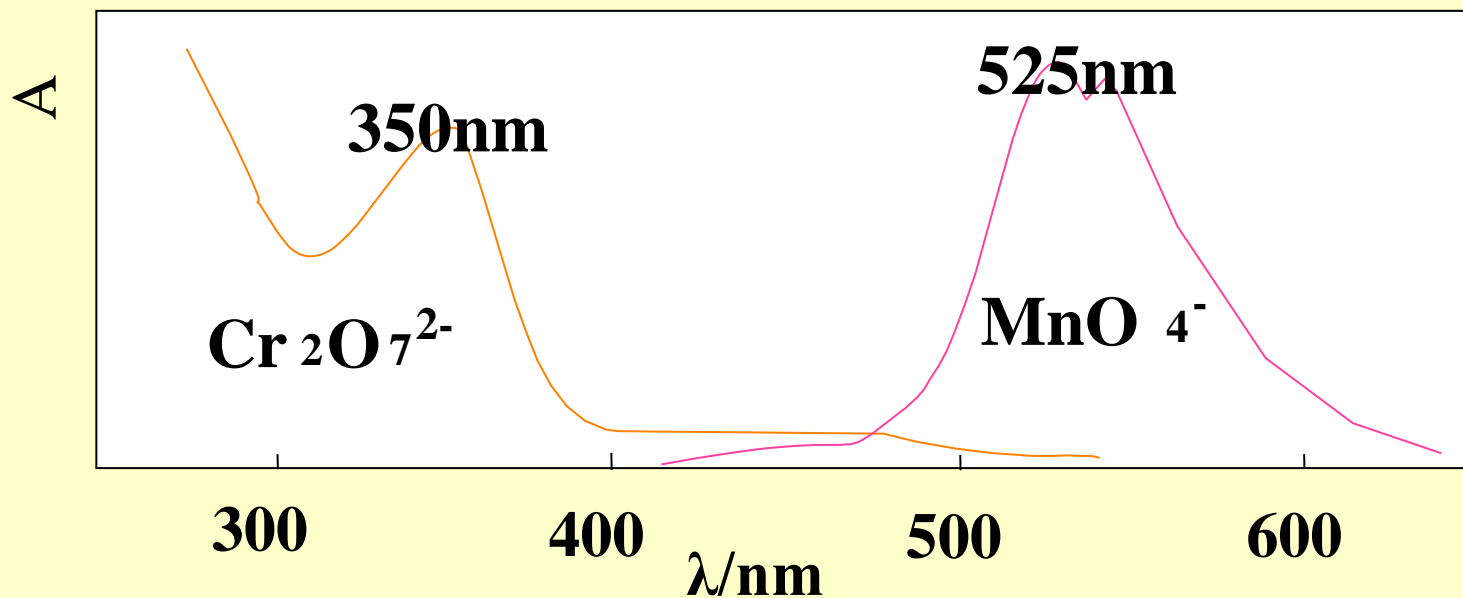


双原子分子的三种能级跃迁示意图



### 3.吸收曲线（吸收光谱）

为了描述溶液对不同波长可见光的选择性吸收作用。通常固定溶液浓度和液层的厚度，测量溶液对不同波长光的吸光度，以波长 ( $\lambda$ ) 为横坐标，吸光度 ( $A$ ) 为纵坐标所得到的曲线，称为吸收曲线。



高锰酸钾和重铬酸钾的吸收曲线

### 三、光吸收定律——朗伯-比尔定律

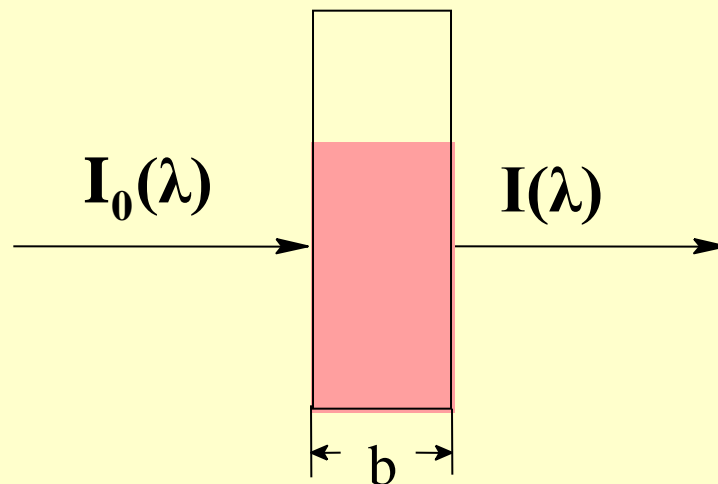
#### 1.表示光吸收程度的两个物理量

(1) 透光度 (透光率)  $T$

$$T = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}$$

$I(\lambda)$  — 某波长透过光的强度;

$I_0(\lambda)$  — 某波长入射光的强度。



$T$  取值为 0.0 % ~ 100.0 %

全部吸收  $T = 0.0 \%$

全部透射  $T = 100.0 \%$

(2) 吸光度  $A$

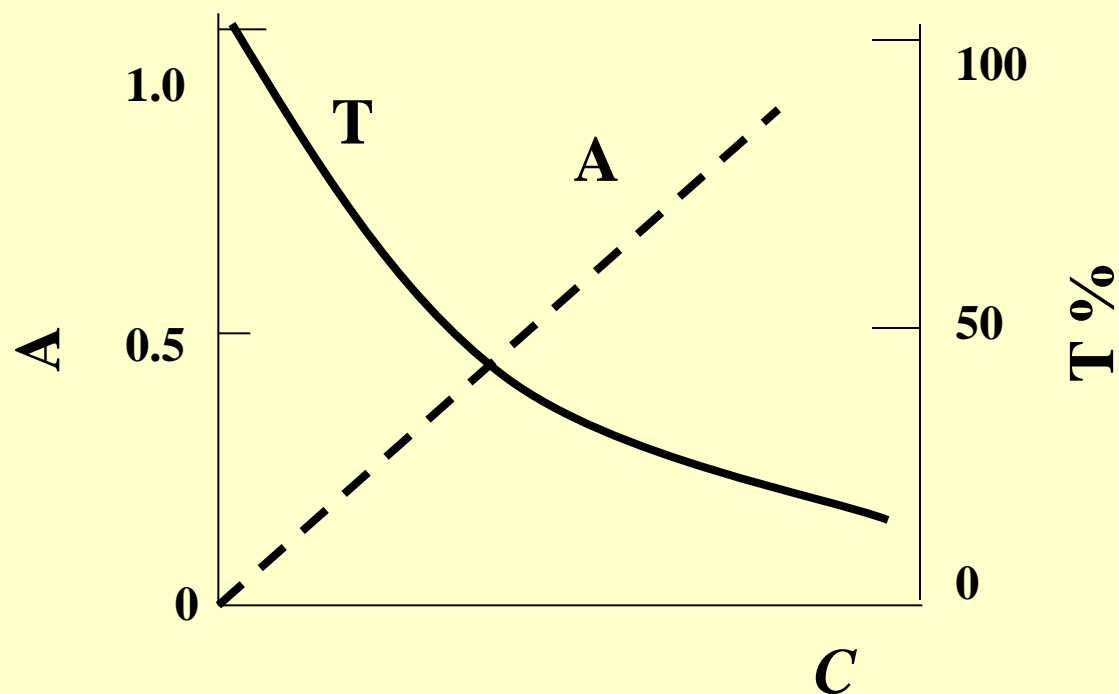
$$A = -\lg T = \lg \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}$$

# 吸光度与透光率

$$-\lg T = Kcb = A \quad T = 10^{-A} = 10^{-Kbc}$$

T: 透光率

A: 吸光度



$$T = 0.0 \%$$

$$A = \infty$$

$$T = 100.0 \%$$

$$A = 0.0$$

$$T = 36.8 \%$$

$$A = 0.434$$

# 吸光系数 Absorptivity

$$A = Kcb$$

$b$  : 吸光液层的厚度, 光程,  $cm$     $c$  : 吸光物质的浓度,  $g/L, mol/L$

$K$ : 比例常数

物质的性质

入射光波长

温度

取值与浓度的单位相关

$c: mol/L$

$K \Rightarrow \epsilon$

$$A = \epsilon cb$$

$c: g/L$

$K \Rightarrow a$

$$A = acb$$

$c: g/100 mL$

$K \Rightarrow E_{1cm}^{1\%}$

比吸光系数

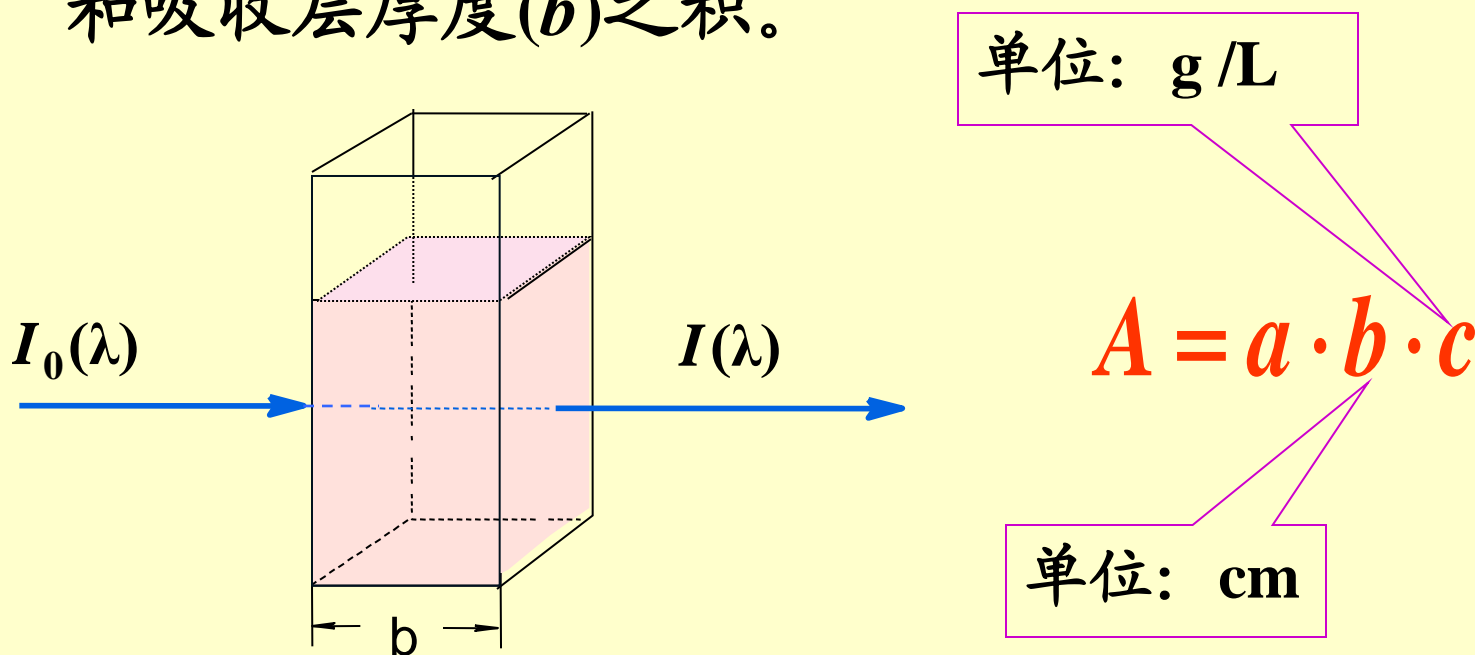
$$A = E_{1cm}^{1\%} cb$$

相互关系

$$E_{1cm}^{1\%} = 10a = 10 \frac{\epsilon}{M}$$

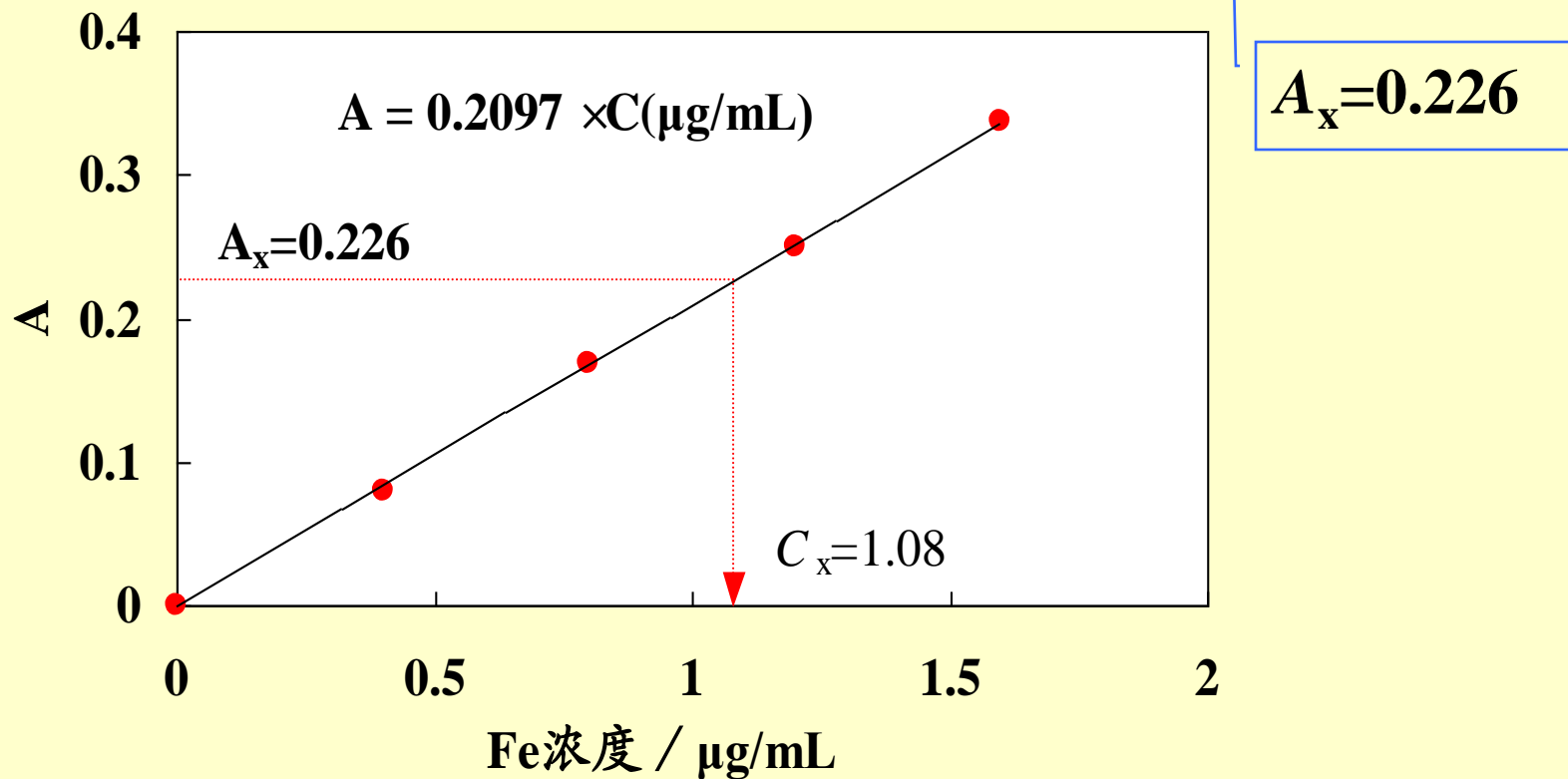
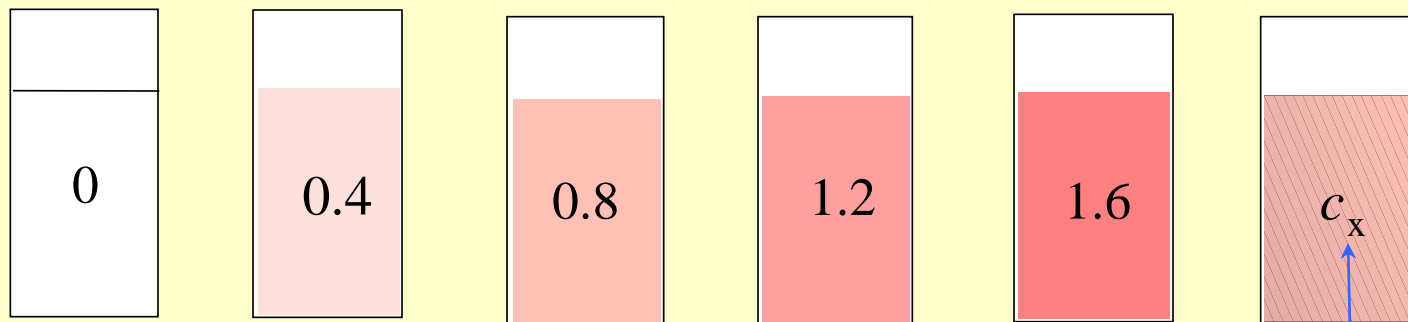
## 2. 朗伯-比尔定律

单色平行光通过单一均匀的非散射溶液时，该溶液的吸光度( $A$ )正比于溶液中吸光物质的浓度( $c$ )和吸收层厚度( $b$ )之积。



$a$ —吸光系数，当浓度单位为g/L，液层厚度单位为cm时， $a$ 的单位为 $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。

### 3.定量分析的方法——标准曲线法



邻二氮菲法测铁标准曲线

当溶液以物质的量浓度为单位时，朗伯比尔定律表示为：

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

$\varepsilon$ —摩尔吸光系数，其单位为  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。

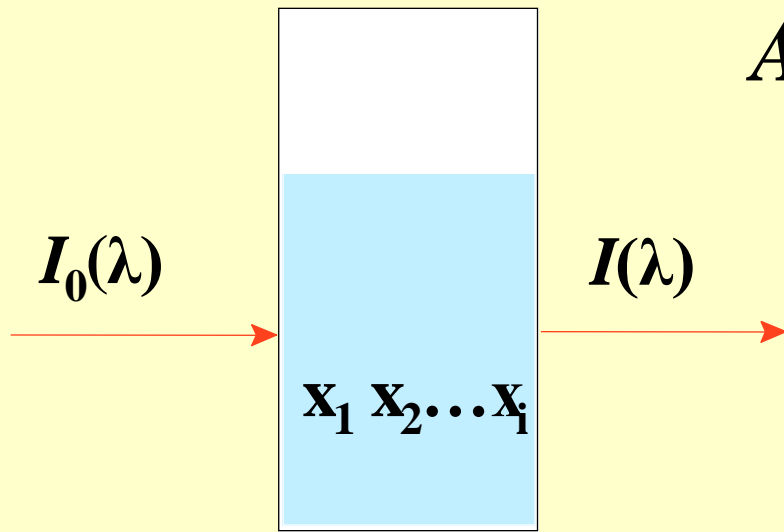
①  $\varepsilon$  表示  $1\text{mol/L}$  待测物质溶液，在  $1\text{cm}$  比色皿中，对某特定波长的光所产生的吸光度。

②  $\varepsilon$  与吸收光波长、溶液温度和介质条件有关，与液层厚度和溶液浓度无关。

③ 最大吸收波长处的  $\varepsilon$  最大，分析灵敏度 ( $\frac{dA}{dc}$ ) 也最高。

## 4.吸光度的加和性原理

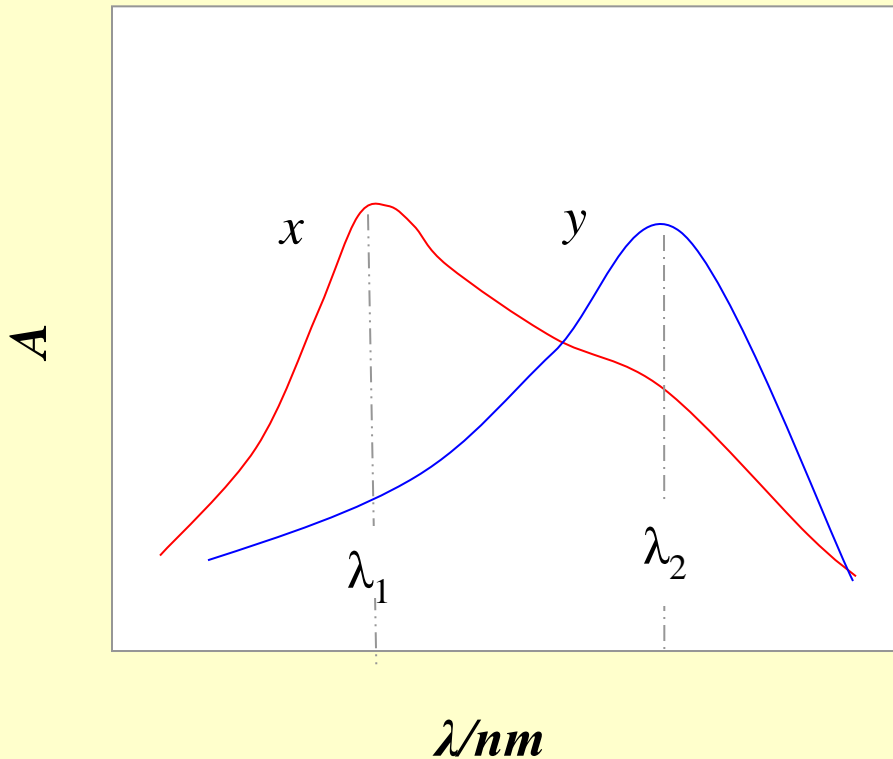
单色光通过符合朗伯比尔定律的多组分溶液时，测得的总吸光度 $A_{\text{总}}$ ，等于各组分独立存在时的各溶液吸光度 $A_i$ 之和。



$$\begin{aligned} A_{\text{总}} &= \lg \frac{I_0}{I} \\ &= A_1 + A_2 + \dots + A_i \\ &= (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_i c_i) b \\ &= b \sum_{n=1}^i \epsilon_i c_i \end{aligned}$$



根据加和性原理，当多个待测组分存在于同一溶液中，且它们的吸收曲线部分重叠时，用分光光度法仍可对它们进行测定。

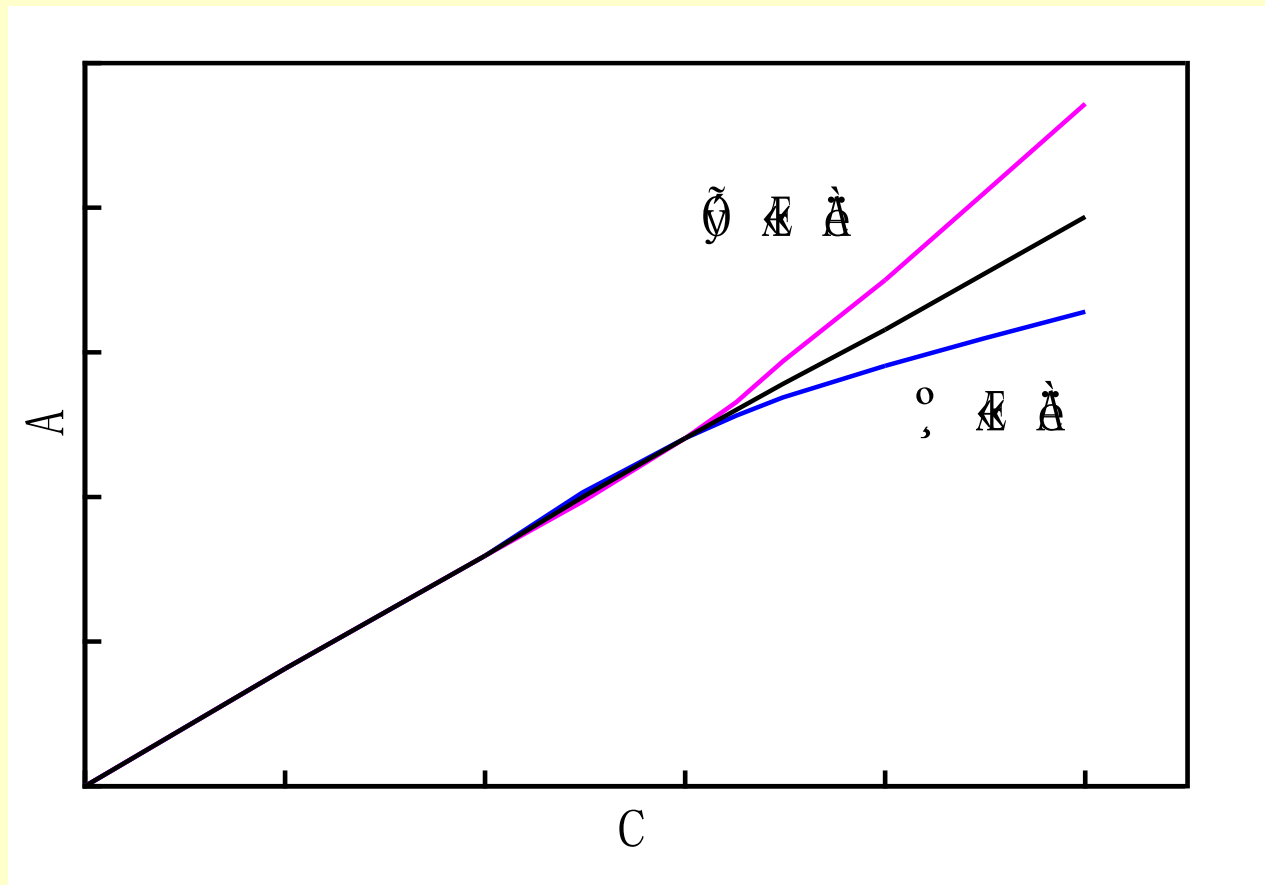


$$\begin{cases} A_1 = \varepsilon_{x1}bc_x + \varepsilon_{y1}bc_y \\ A_2 = \varepsilon_{x2}bc_x + \varepsilon_{y2}bc_y \end{cases}$$

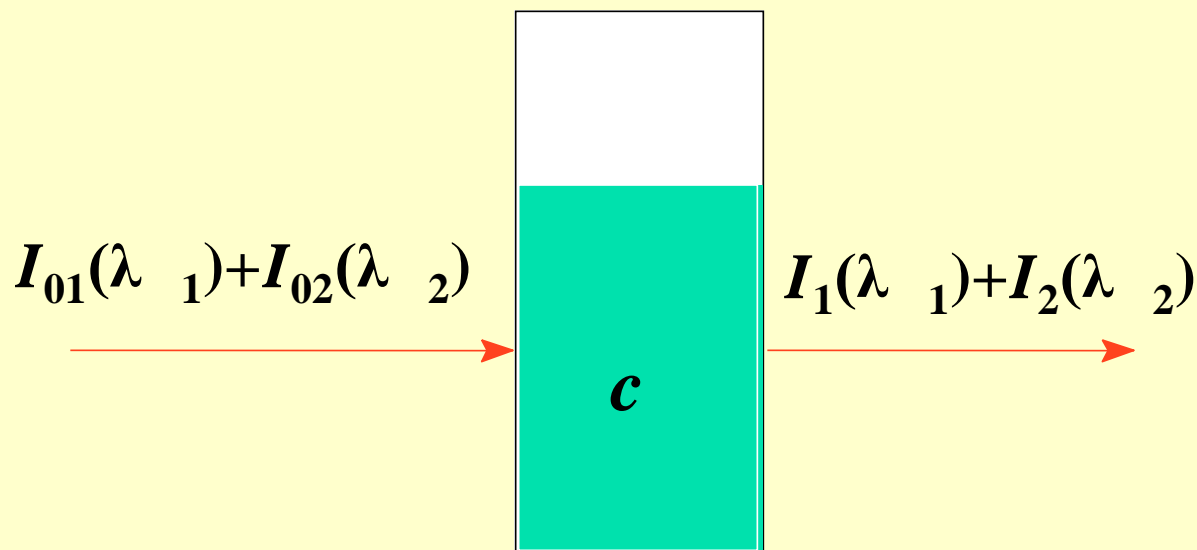
预先测出 $\lambda_1$ 处的 $\varepsilon_{x1}$ 、 $\varepsilon_{y1}$ 和 $\lambda_2$ 处的 $\varepsilon_{x2}$ 、 $\varepsilon_{y2}$ ，再测出 $A_1$ 和 $A_2$ ，解联立方程。

## 四、偏离朗伯比尔定律

标准曲线不成直线的现象称为偏离朗伯比耳定律。



# 1. 非单色光引起的偏离



根据朗伯比耳定律

$$A_1 = \lg \frac{I_{01}}{I_1} = \varepsilon_1 bc, \quad A_2 = \lg \frac{I_{02}}{I_2} = \varepsilon_2 bc$$

$$A_1 + A_2 = \lg \frac{I_{01} I_{02}}{I_1 I_2} = (\varepsilon_1 + \varepsilon_2) bc$$

但是，由于仪器的分光能力是有限的，不可能将波长非常接近的两束光分开，这时两束光就被同时检测到。所以测得的溶液吸光度是：

$$A = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2}$$

而不是：

$$A \neq A_1 + A_2 = \lg \frac{I_{01}I_{02}}{I_1I_2} = (\varepsilon_1 + \varepsilon_2)bc$$

所以， $A$ 与 $c$ 在这种情况下不成直线关系。

$$A = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2}$$

$$I_1 = I_{01} \cdot 10^{-A_1}$$

$$I_2 = I_{02} \cdot 10^{-A_2}$$

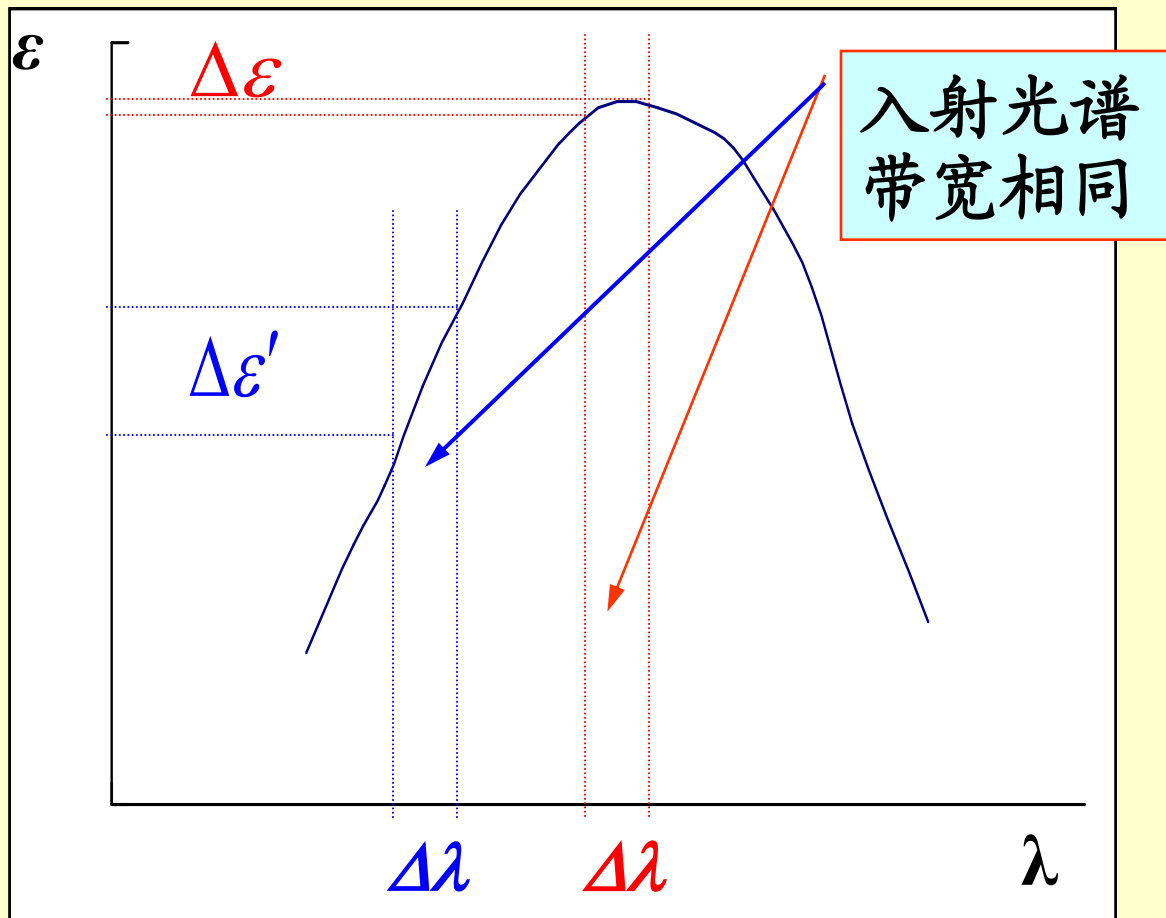
$$= \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{I_{01} \cdot 10^{-\varepsilon_1 bc} + I_{02} \cdot 10^{-\varepsilon_2 bc}}$$

当  $\lambda_1 = \lambda_2$  时， $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = \varepsilon$  符合比耳定律。

$$A = \lg \frac{I_{01} + I_{02}}{(I_{01} + I_{02}) \cdot 10^{-\varepsilon bc}} = \varepsilon bc$$

当  $\lambda_1 \neq \lambda_2$  时， $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_2$

$A$  与  $c$  不成线性关系，偏离比耳定律。 $\varepsilon_1$  与  $\varepsilon_2$  相差越大，偏离越严重。

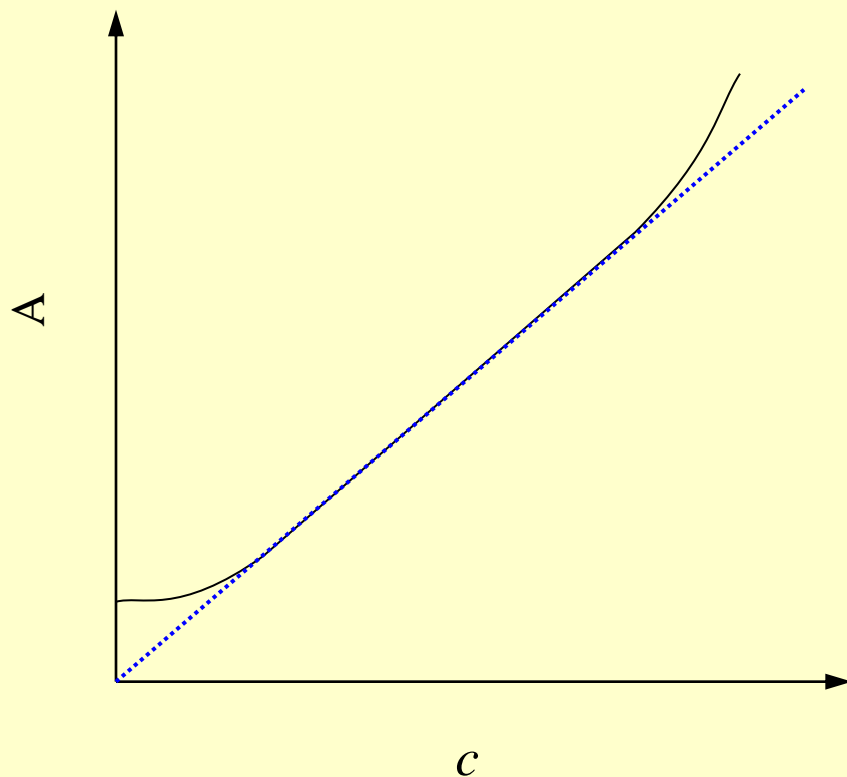


选择在最大吸收波长处进行测量，因为 $\Delta\varepsilon$ 最小，所以偏离朗伯比耳定律最小。

## 2. 介质不均匀引起的偏离

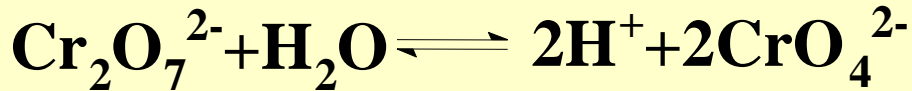
胶体溶液、乳浊液、悬浮液都不是均匀溶液，对光有散射作用，它们的表观吸光度会比实际吸光度要大。使标准曲线向吸光度轴弯曲。

在光度法中应避免溶液产生胶体或混浊。



### 3. 被测物发生化学反应引起的偏离

被测物的离解、配合、缔合改变了标准溶液中吸光物质的存在形式，而标准曲线仍按原分析物绘制，从而使标准曲线弯曲。如：测 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ，标准曲线在稀溶液端向下弯曲。

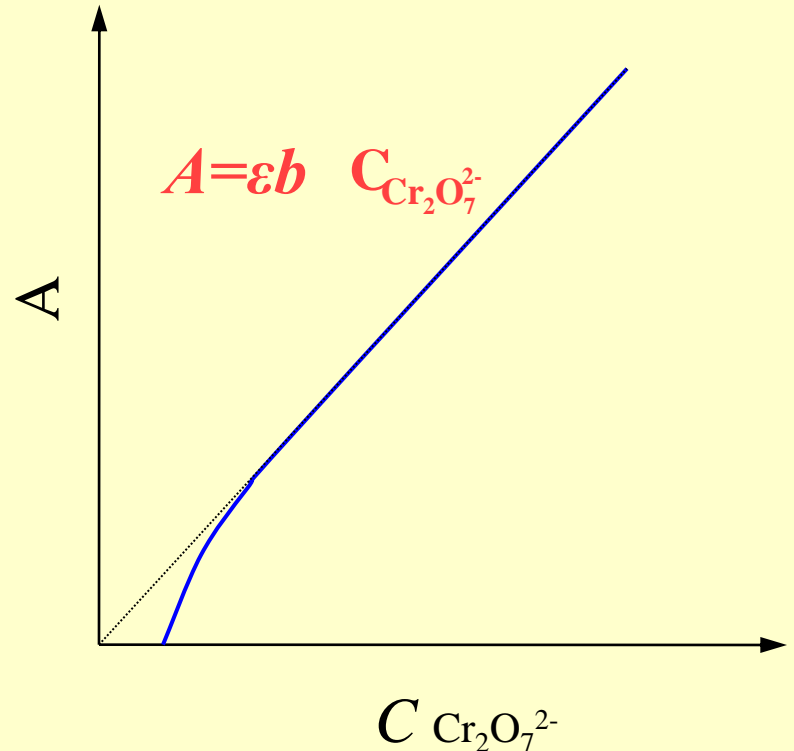


当溶液浓度较高时

$$[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}] \approx C_{\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}}$$

当溶液浓度很稀时

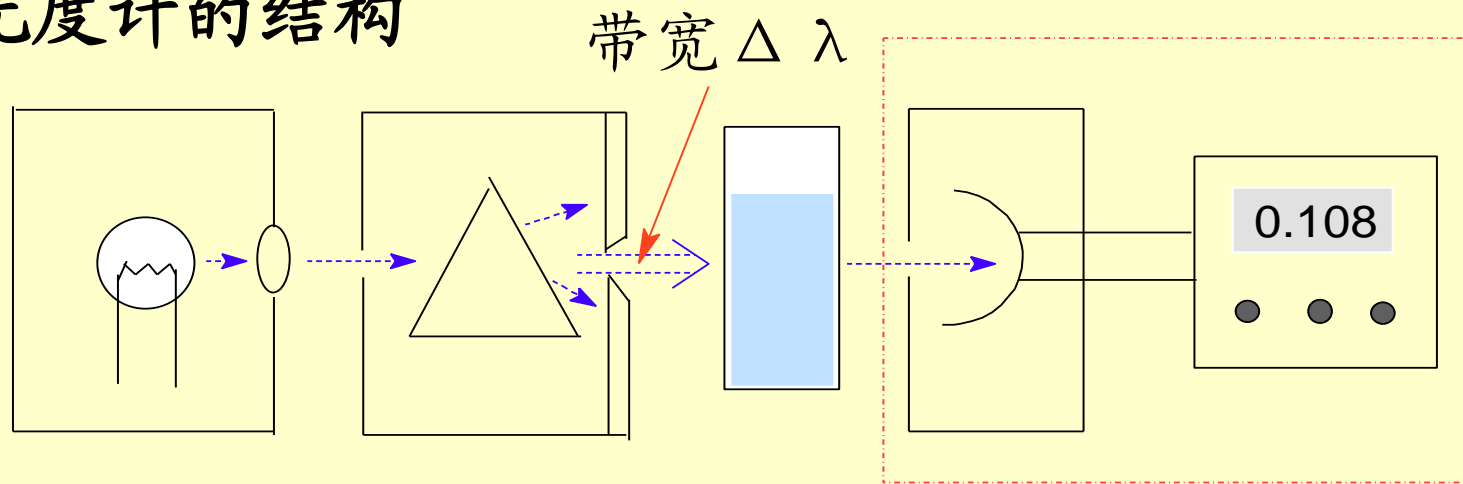
$$[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}] < C_{\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}}$$





# § 9-2 光度计的基本部件

## 1. 光度计的结构



光源

单色器

吸收池

检测系统

### (一)光源

作用：提供测量所需波长范围的入射光。

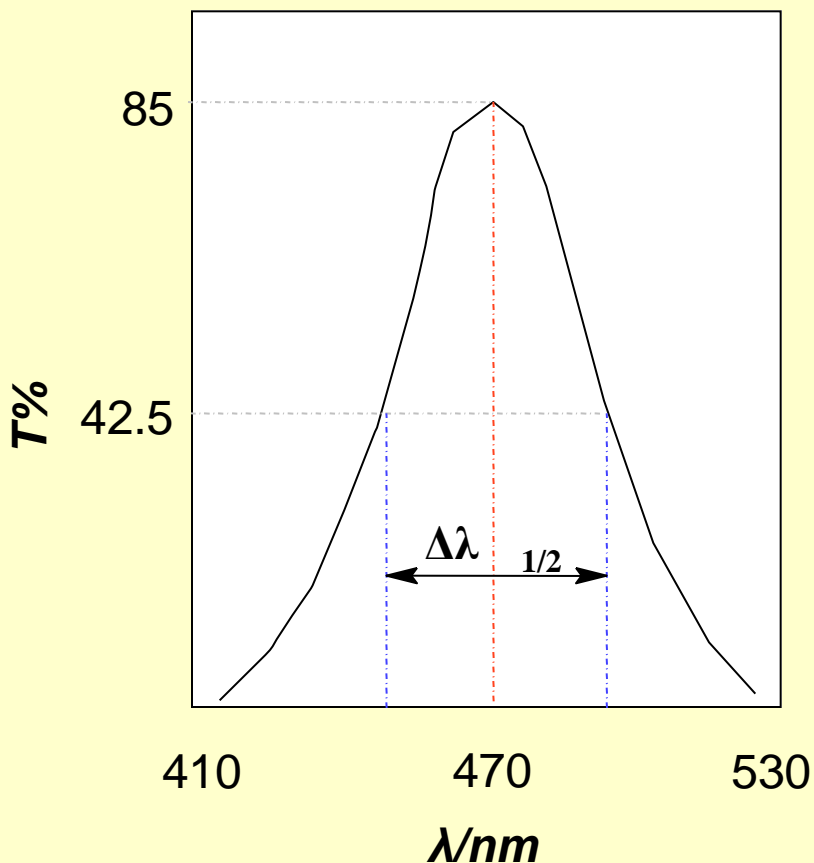
要求：辐射的能量有足够的强度和稳定性，使用寿命较长。

钨灯 320 ~ 2500nm，氘灯 185 ~ 400nm。

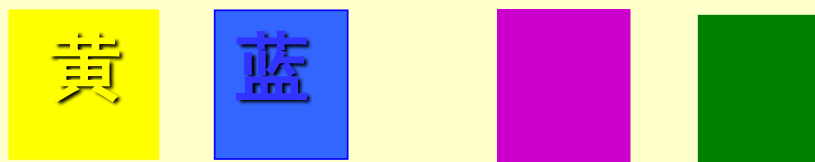
## (二)单色器

作用：将光源发射的复合光分解为“单色光”，并可截取其中任一部分的“单色光”。

①滤光片 一组不同颜色的玻璃片。滤光性能用最大透过波长和谱带半宽度描述。



溶液颜色与滤光片颜色互为补色

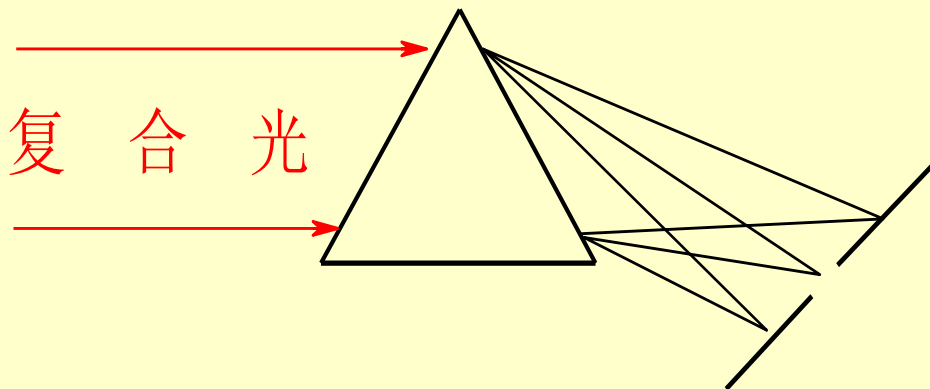


互为补色

互为补色

滤光片透光曲线

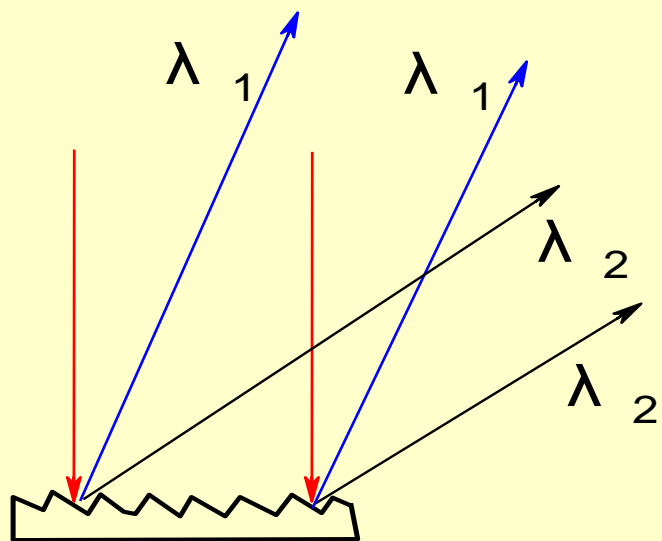
② 棱镜 利用不同波长的光通过两种不同介质时的折射率不同，将复合光分开。



$$n = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}$$

$n$  - 折射率,  $\lambda$  - 光波长,  
 $A, B, C$  - 与棱镜材料有关的常数。

③ 光栅 利用光的干涉作用将复合光分开。



$$\sin \alpha \pm \sin \beta = \frac{k\lambda}{d}$$

$\alpha$  - 入射角,  $\beta$  - 衍射角,  
 $k$  - 光谱级数,  $d$  - 光栅常数。

### (三)吸收池（比色皿）

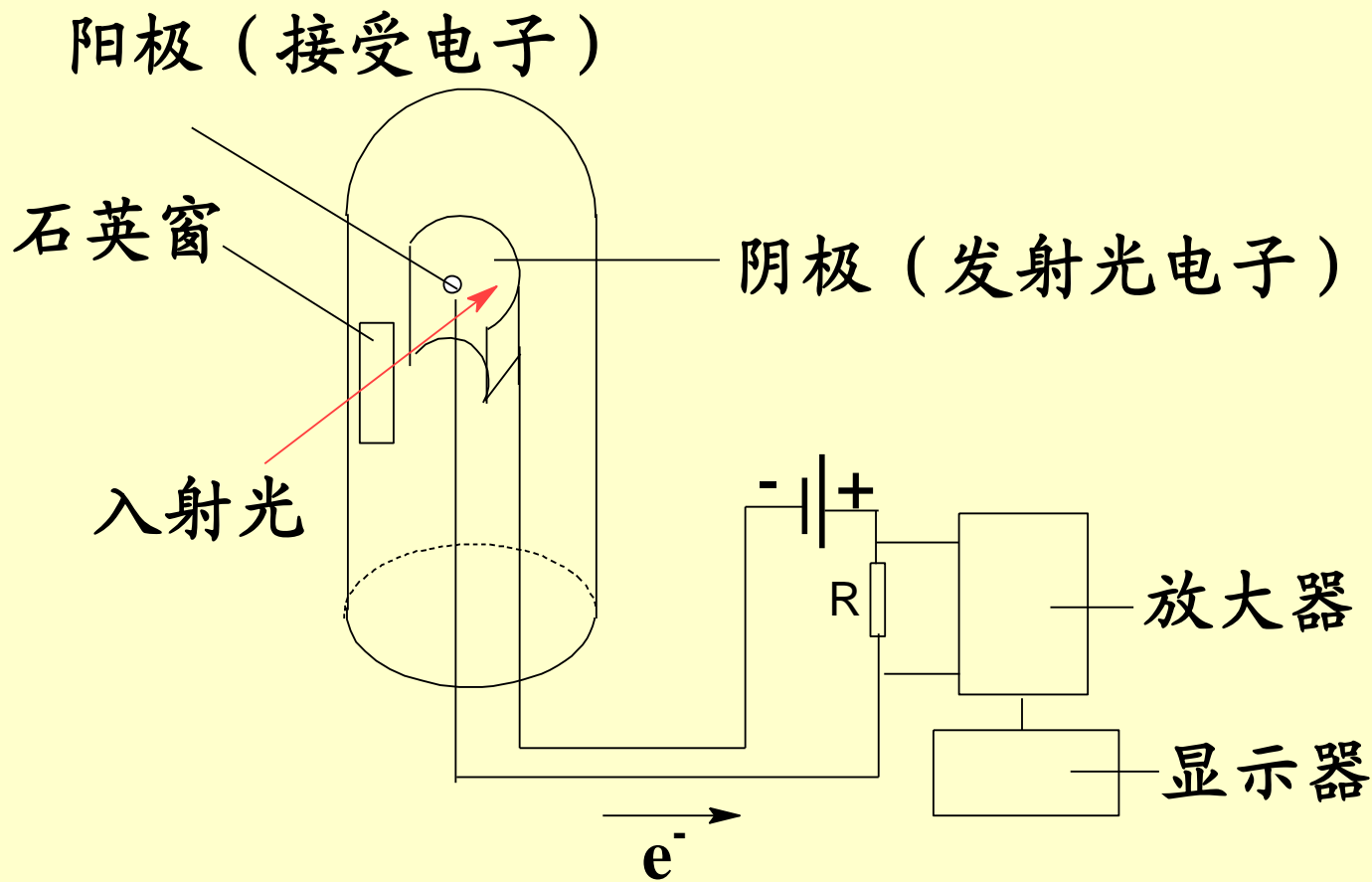
作用：用于盛被测试液。

要求：能透过所需光谱范围的光；同规格吸收池的透光度相差不得大于0.5%。

规格：0.5、1、2、3cm厚度，长方形或圆柱形，光学玻璃或石英材料。

# (四)检测系统

## 光电管



## § 9-3 显色反应及显色条件的选择

显色反应——将待测物转变成有色化合物的化学反应。

显色剂——能将待测物转变成有色化合物的化学试剂。

### 一、显色反应的选择原则

① 反应灵敏度高，形成的有色化合物 $\epsilon$ 大。

② 反应的选择性好。

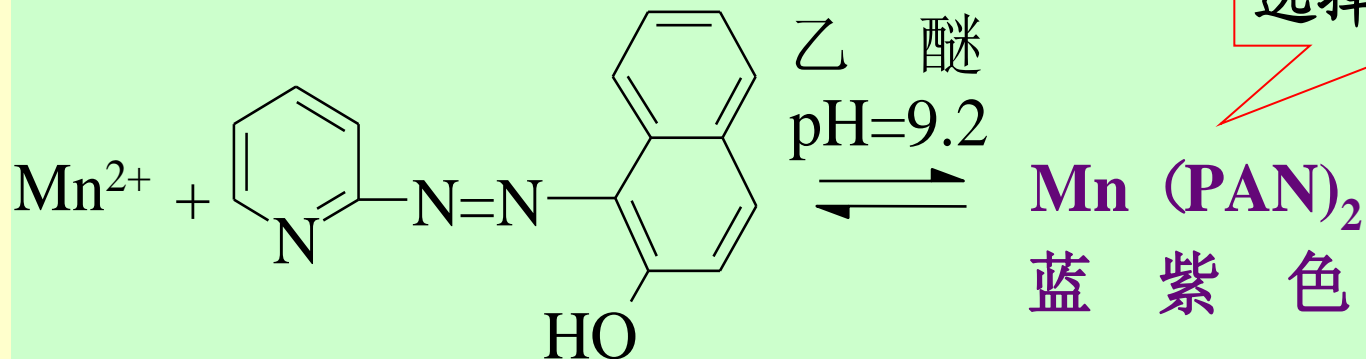
③ 显色剂在测量波长处无明显吸收，即

$$\left| \lambda_{\max}^{\text{化合物}} - \lambda_{\max}^{\text{显色剂}} \right| \geq 60nm$$

④ 有色化合物稳定，并且组成恒定。

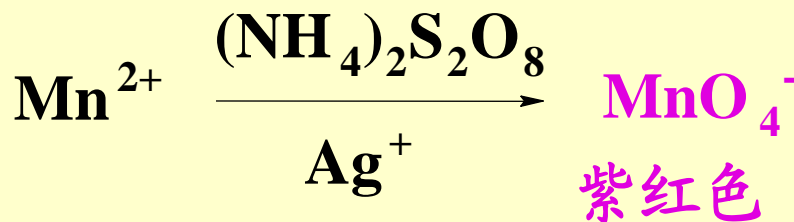
## 例如：锰的测定

灵敏度高，但  
选择性差。



$$\lambda_{\text{max}} = 585\text{nm}, \varepsilon = 5.85 \times 10^4 \text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$$

$\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 等离子干扰测定。



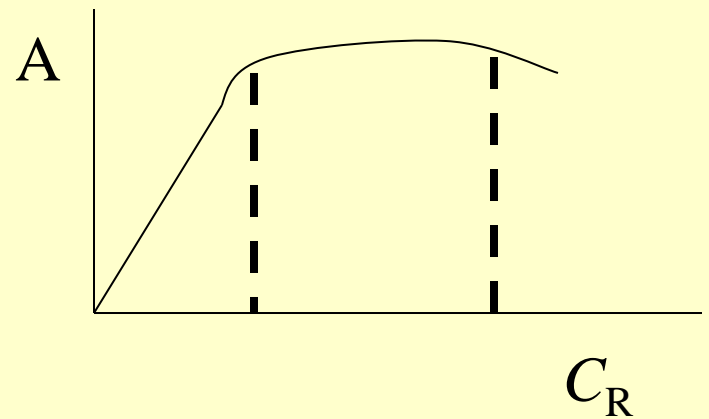
灵敏度较低，  
但选择性好。

$$\lambda_{\text{max}} = 525\text{nm}, \varepsilon = 5.9 \times 10^3 \text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$$

除高浓度 $\text{Co}^{2+}$ 外，其他共存金属离子无干扰。

## (1) 显色剂用量

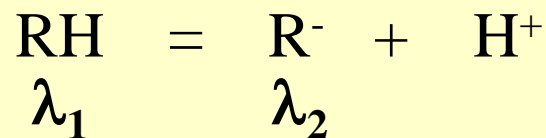
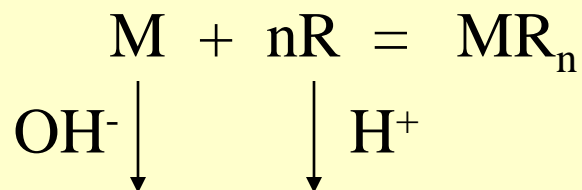
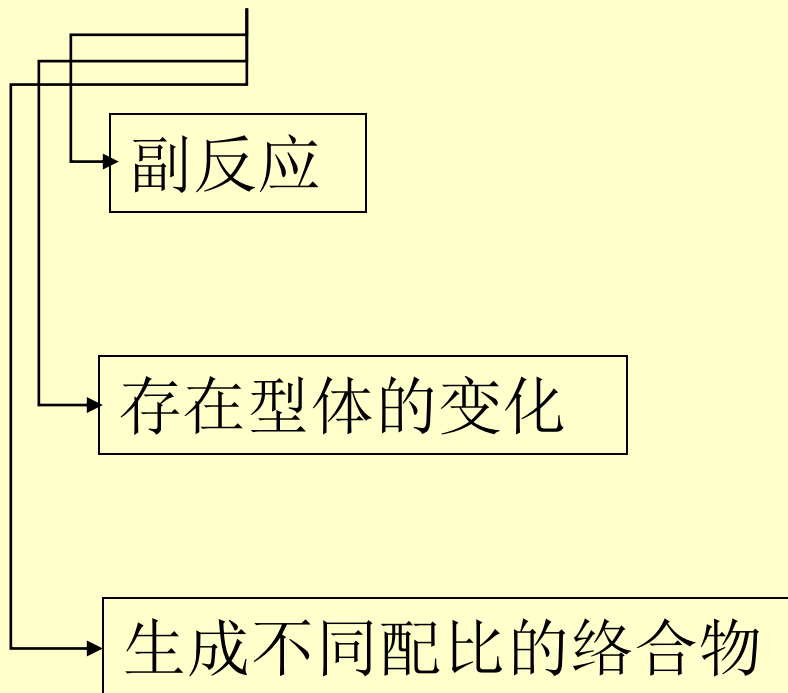
方法：在一系列浓度相同的溶液中，加入不同量的显色剂，在相同条件下，分别测定其吸光度，作 $A \sim C_R$ 曲线，取其中适宜的 $C_R$ 范围。





## (2) 溶液的酸度

酸度的影响

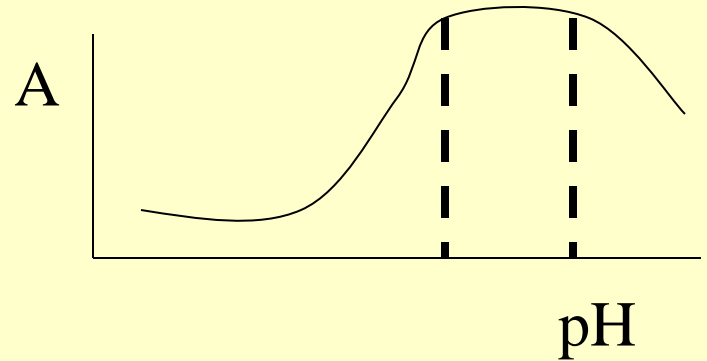


例：磺基水杨酸 -  $\text{Fe}^{3+}$

|             |                |     |
|-------------|----------------|-----|
| pH = 2 ~ 3  | $\text{FeR}$   | 紫红色 |
| pH = 4 ~ 7  | $\text{FeR}_2$ | 橙色  |
| pH = 8 ~ 10 | $\text{FeR}_3$ | 黄色  |

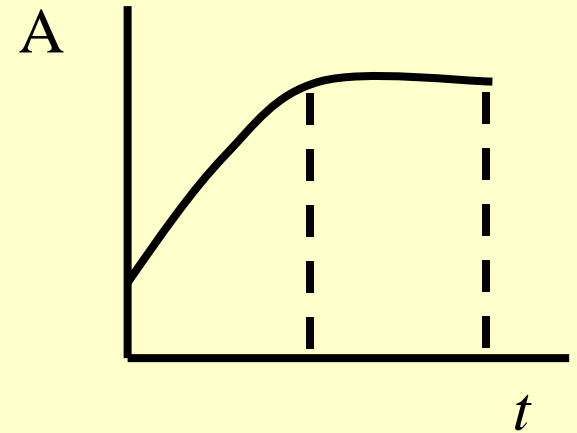
## (2) 溶液的酸度

方法：取若干份浓度相同的被测溶液在不同pH的缓冲溶液中进行显色，分别测其吸光度，作A ~ pH 曲线，曲线上的平直部分所对应的pH区间，即为合适的酸度范围。



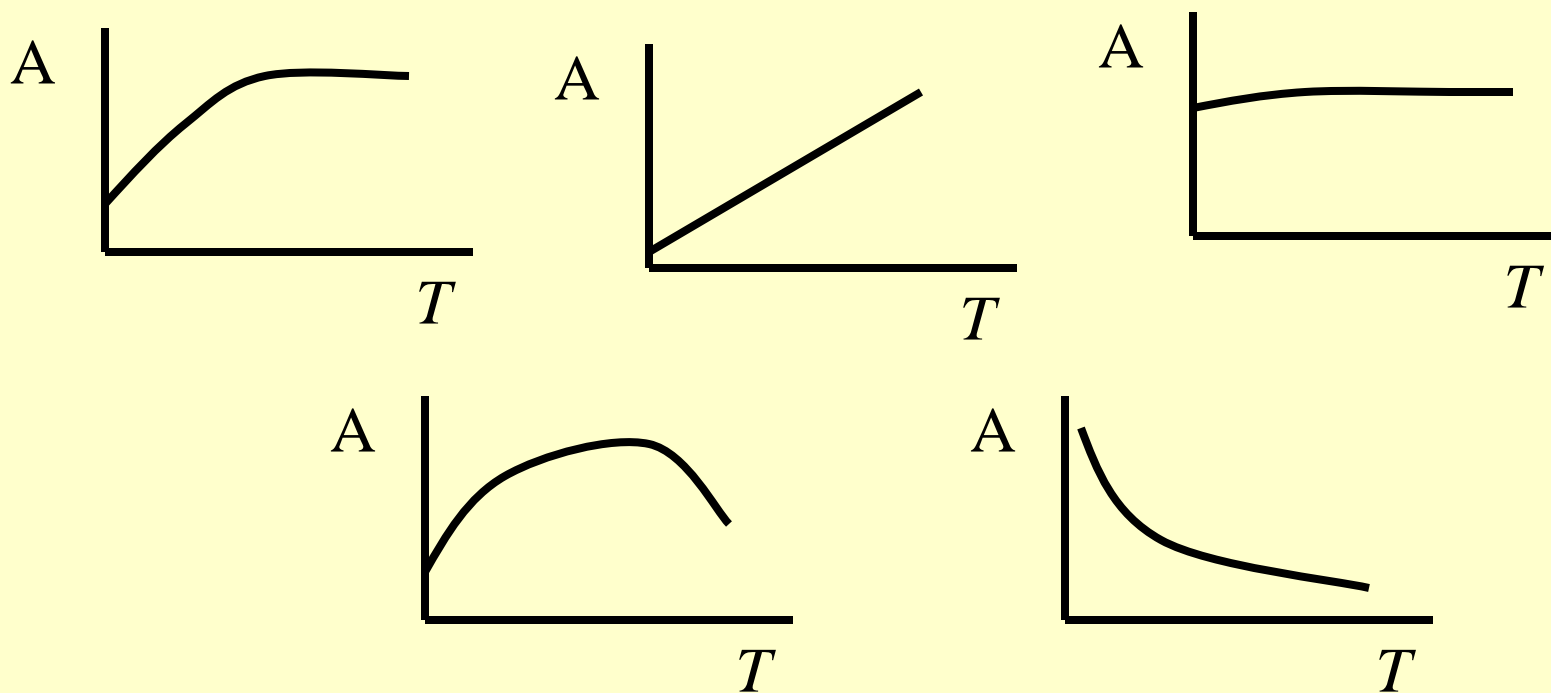
### (3) 显色时间

方法：从在溶液中加入显色剂开始计时，每隔一段时间测定依次吸光度，作 $A \sim t$ 曲线，曲线上平直所对应的时间，即为测定吸光度的最佳显色时间。



#### (4) 显色温度

实际工作中，作  $A \sim T$  曲线，寻找适宜反应温度。



## (5) 溶剂

有机溶剂可以降低有色化合物的解离度，从而提高测定的灵敏度。

## (6) 共存干扰离子的影响

影响

共存离子本身有颜色，会干扰比色测定

共存离子会与显色剂发生反应

## 共存离子的消除办法:

- 控制溶液的酸度
- 添加掩蔽剂
- 通过氧化还原反应, 改变干扰离子的价态
- 利用参比溶液消除显色剂和干扰离子的影响
- 选择合适的测定波长和适当的分离方法

# § 9-4 吸光度测量条件的选择

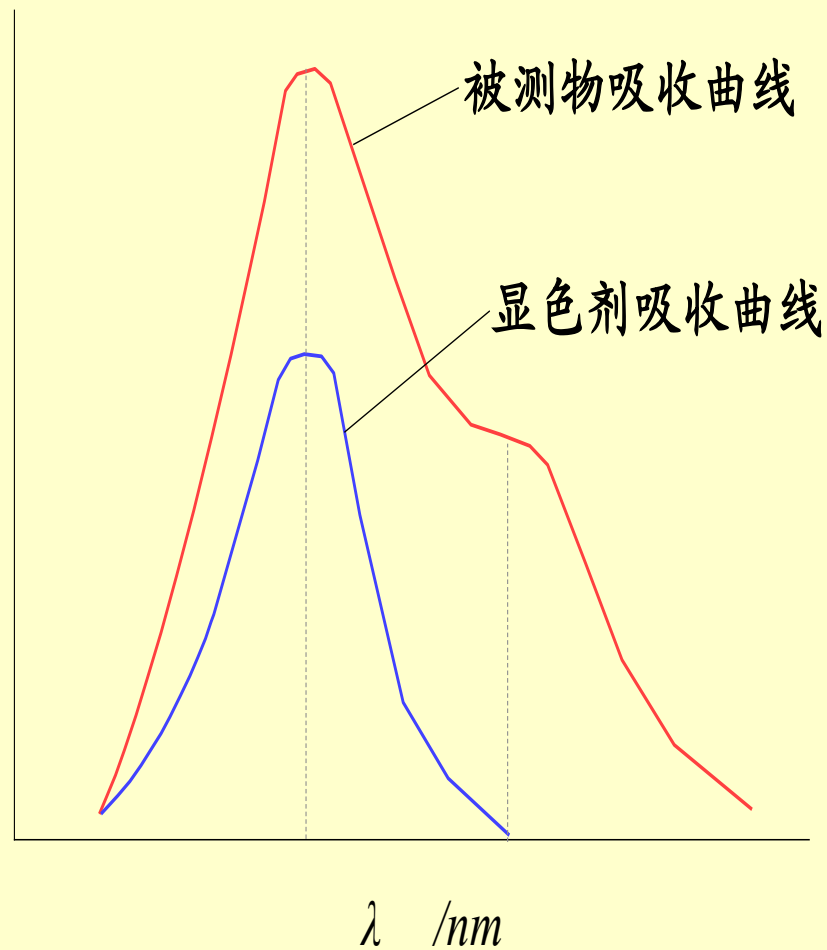
## 一、入射光波长的选择原则

1. 测量波长处应有较高的灵敏度，故一般选择在最大吸收波长测量。

2. 测量波长处偏离朗伯比尔定律应较小。

3. 测量波长处共存组分的光谱干扰应较小，即反衬度满足：

$$\left| \lambda_{\max}^{\text{被测物}} - \lambda_{\max}^{\text{共存物}} \right| \geq 60nm$$



## 二、参比溶液的选择

**参比溶液**— 调节光度计  $T=100\%$ ,  $A=0$  的溶液。

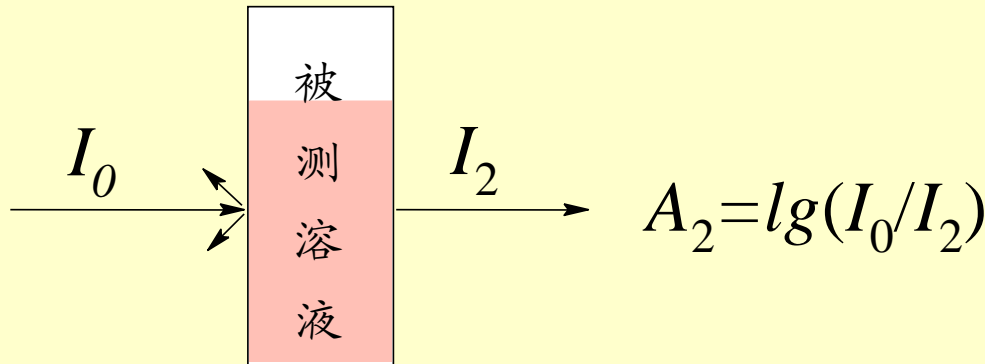
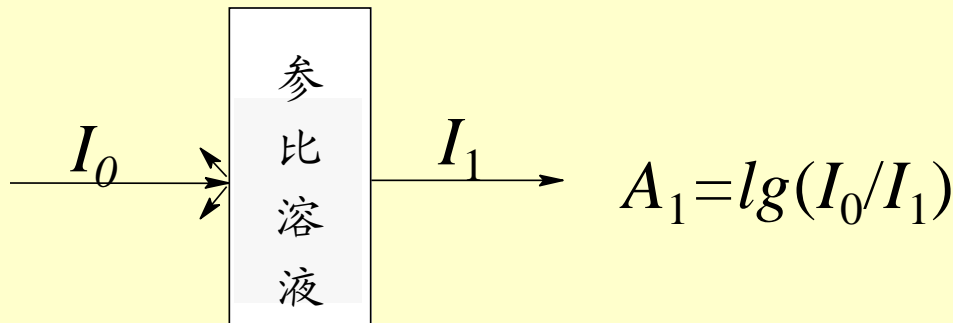
**参比溶液的作用**— 扣除比色皿对光的反射以及试液中其他成分对入射光的吸收。

用参比溶液调节  $A_1=0$  的实质是设定仪器, 使参比液的:

$$I_0 = I_1$$

$$A_2 = \lg \frac{I_0}{I_2} = \lg \frac{I_1}{I_2}$$

$I_1$ — 扣除了比色皿的反射和共存成分的吸收等影响以后入射光强度。





## 选择参比溶液的原则:

使测量到的吸光度真正反映待测物的吸光度。

| 试样溶液 | 显色剂 | 其他试剂 | 参比溶液                   |
|------|-----|------|------------------------|
| -    | -   | -    | 纯溶剂                    |
| -    | +   | -    | 空白溶液                   |
| -    | -   | +    | (不含被测试样<br>的溶液)        |
| -    | +   | +    |                        |
| +    | -   | -    | 试样溶液<br>(不加显色剂)        |
| +    | +   | -    | 掩蔽被测组分后, 加<br>显色剂的试样溶液 |

- 代表无色, + 代表有色。

### 三、吸光度读数范围的选择

对于一台光度计来讲，透光度读数的绝对误差 $\Delta T$ 是恒定的，一般 $\Delta T=0.2\sim 2\%$ 。

假定一台光度计的 $\Delta T=0.5\%$ ，则在不同 $T$ 或 $A$ 时测量得到的浓度相对误差为：

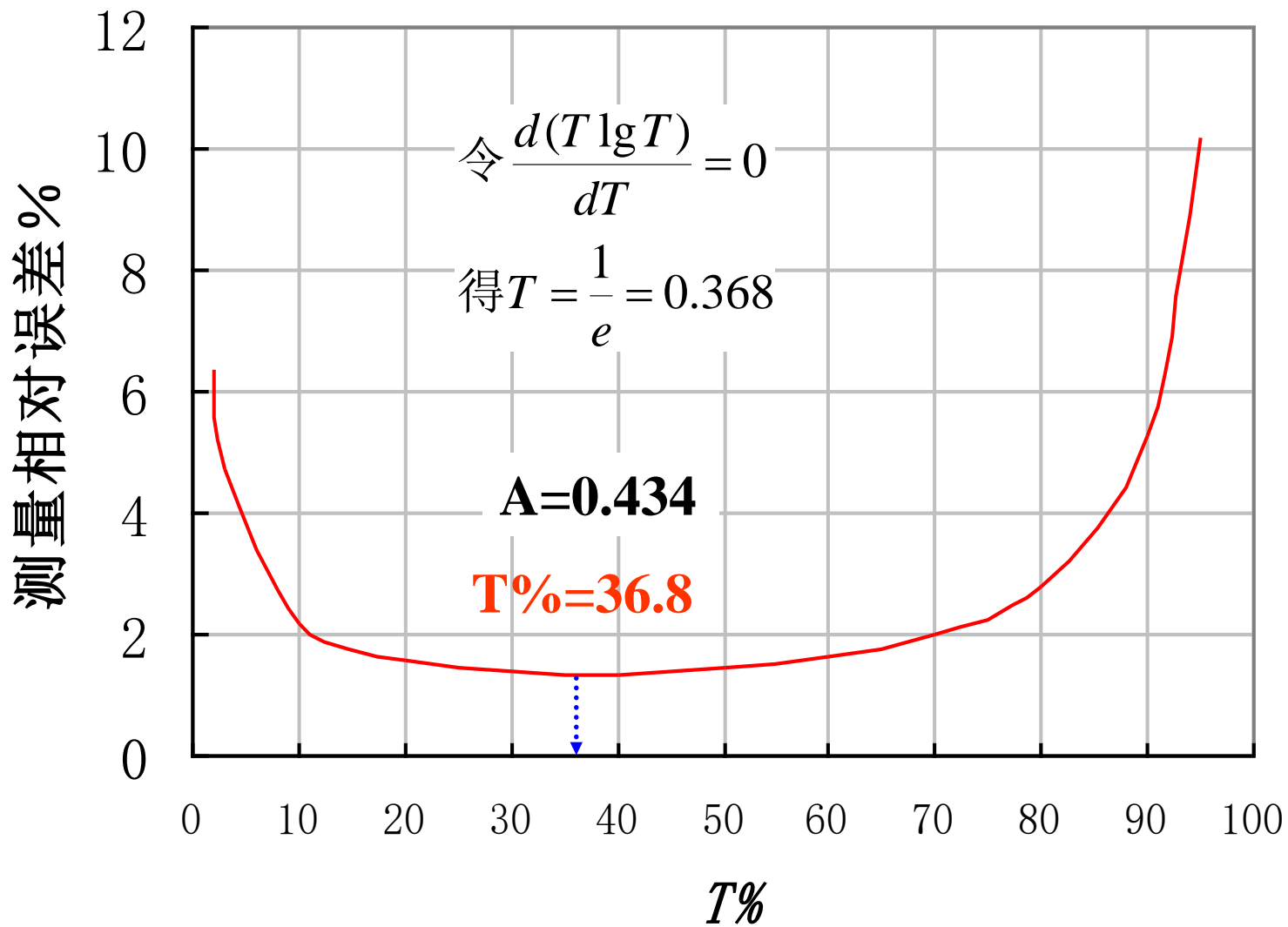
$$\begin{aligned}\frac{\Delta c}{c} &= \frac{0.434 \times \Delta T}{T \lg T} \\ &= \frac{0.434 \times 0.005}{T \lg T} \times 100\%\end{aligned}$$

**结论：**不同透光度或吸光度下的分析误差是不同的。为了使分析误差在2.0%以下，应控制读数 $T=10\sim 70\%$  ( $A=1.0\sim 0.15$ ) 之间。

当 $T=36.8\%$  ( $A=0.434$ )时,分析误差最小,约为1.4%。

## 不同吸光度（透光度）读数下的测量相对误差

| $T \%$ | $A$   | $100 \times \Delta C/C$ |
|--------|-------|-------------------------|
| 95     | 0.022 | 10.2                    |
| 90     | 0.046 | 5.3                     |
| 80     | 0.097 | 2.8                     |
| 70     | 0.155 | 2.0                     |
| 60     | 0.222 | 1.63                    |
| 50     | 0.301 | 1.44                    |
| 40     | 0.399 | 1.36                    |
| 30     | 0.523 | 1.38                    |
| 20     | 0.699 | 1.55                    |
| 10     | 1.000 | 2.17                    |
| 3      | 1.523 | 4.75                    |
| 2      | 1.699 | 6.38                    |



不同透光度时的测量误差



## § 9-5 吸光光度法的应用

### 一、高浓度组分的测定—示差法

常规法 以空白溶剂为参比

$$A_x = \lg \frac{I_0}{I_x} = \epsilon b c_x$$

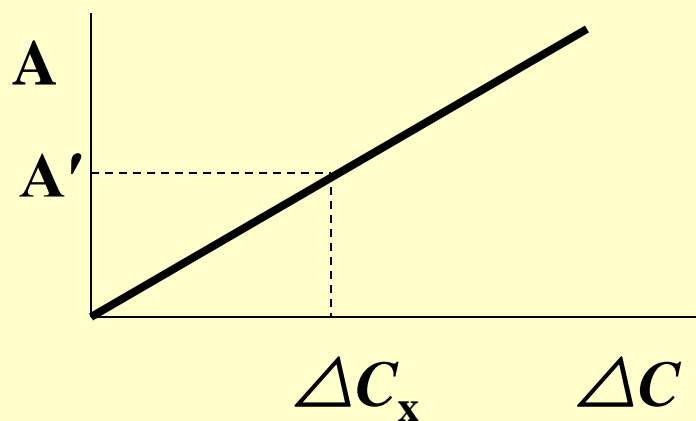
示差法 以浓度为  $C_s$  的标准溶液为参比

$$A'_x = \lg \frac{I_s}{I_x} \times \frac{I_0}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_x} - \lg \frac{I_0}{I_s}$$

$$= A_x - A_s = \epsilon b (c_x - c_s)$$

$$= \epsilon b \Delta c_x$$

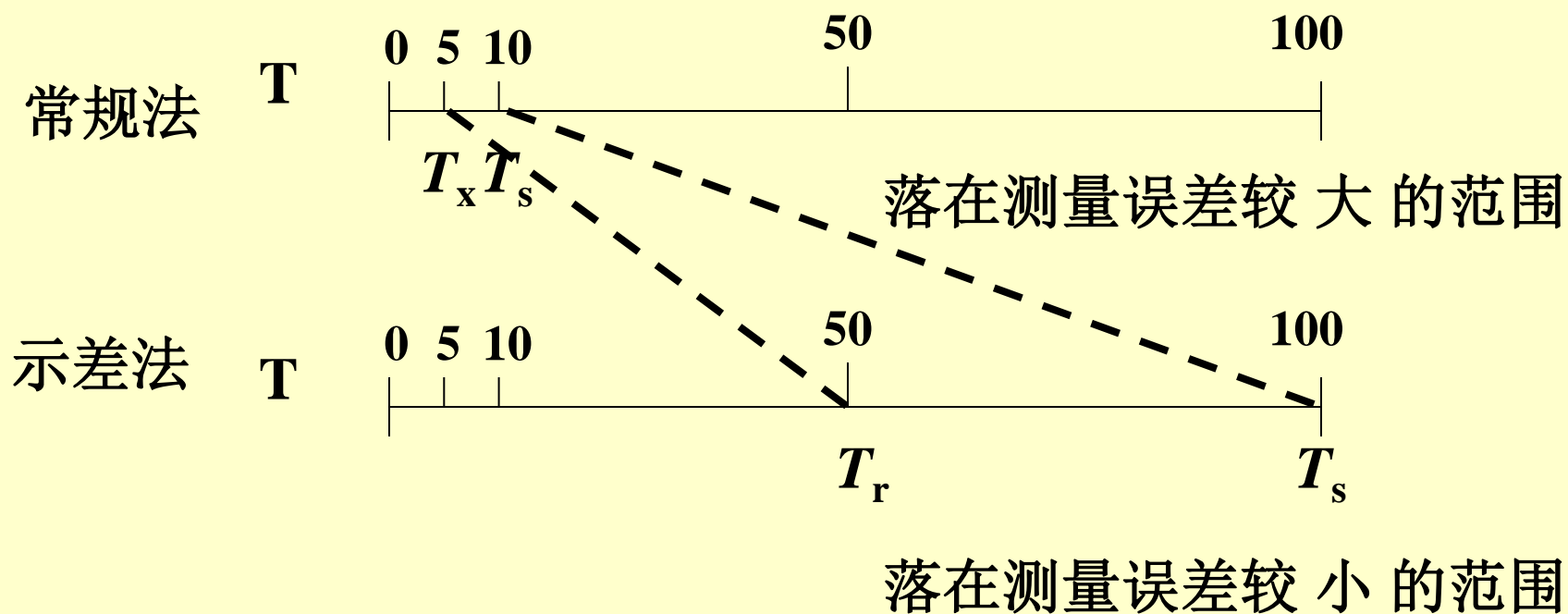
$$c_x = \Delta c_x + c_s$$



$(C_x > C_s)$

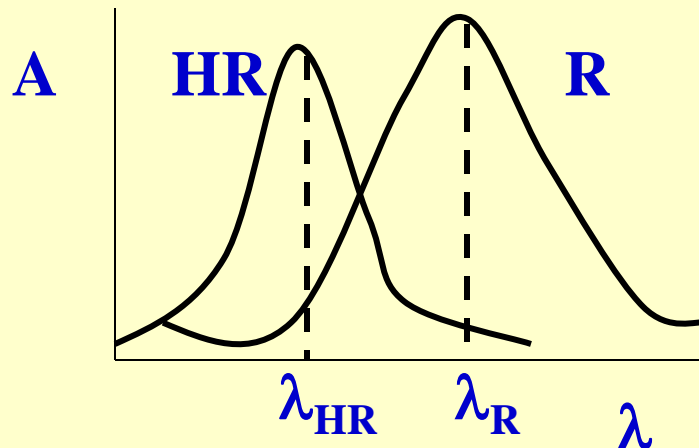
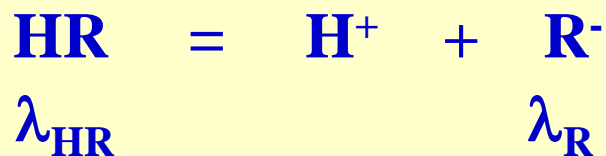
适宜高浓度的测定

## 示差法提高准确度的实质



结论：示差法通过提高测量的准确度提高了方法的准确度

## 二、弱酸弱碱离解常数的测定



用光度法可以测定其离解常数

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{R}^-]}{[\text{HR}]} \quad \lg \frac{[\text{HR}]}{[\text{R}^-]} = -\text{pH} + \text{p}K_a$$

用吸光值表征  $\lg \frac{[\text{HR}]}{[\text{R}^-]}$  或  $\frac{[\text{HR}]}{[\text{R}^-]}$ ，相对于pH作图，可求得 $\text{p}K_a$

在上述实验的基础上作数据处理

对特定 pH  $A_i = \varepsilon_{HR}[HR] + \varepsilon_R[R^-]$   $b = 1 \text{ cm}$

$\text{pH} < \text{p}K_a - 1$   $C = [HR]$   $A_{HR} = \varepsilon_{HR}C$   $\varepsilon_{HR} = \frac{A_{HR}}{C}$

$\text{pH} > \text{p}K_a + 1$   $C = [R^-]$   $A_R = \varepsilon_R C$   $\varepsilon_R = \frac{A_R}{C}$

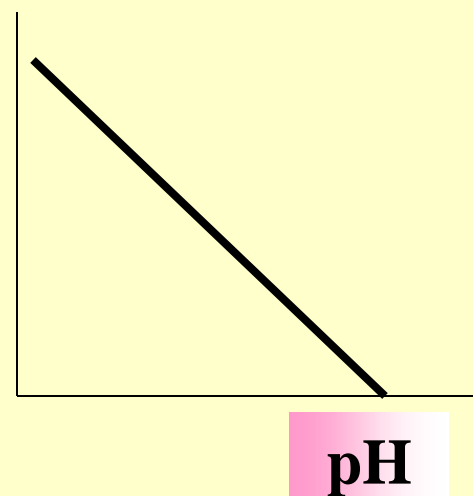
代入, 得  $A_i = \frac{A_{HR}}{C}[HR] + \frac{A_R}{C}[R^-]$

整理, 得  $\frac{[HR]}{[R^-]} = \frac{A_i - A_R}{A_{HR} - A_i}$

$$\lg \frac{A_i - A_R}{A_{HR} - A_i}$$

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \lg \frac{A_i - A_R}{A_{HR} - A_i}$$

作图, 直线截距为  $\text{p}K_a$

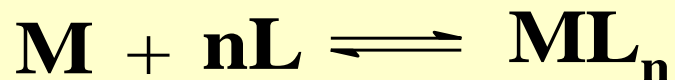




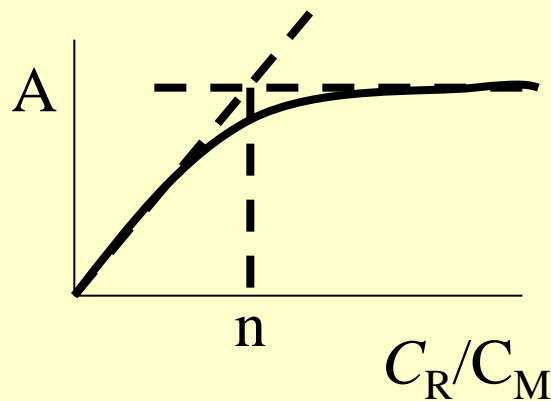
### 三、络合物组成及稳定常数的测定

络合比法测定络合物组成的原理如下：

设M与络合剂L的反应为



固定金属离子的 $C_M$ ，改变络合剂的 $C_L$ ，测定下列溶液的吸光度，以浓度比为横坐标，以吸光度为纵坐标作图，求出络合比 $n$ 。



# 条件稳定常数的测定

由于络合物离解引起

$$A' < A$$

离解度

$$a = \frac{A - A'}{A}$$



总浓度

$C$

平衡浓度

$C(1-a)$

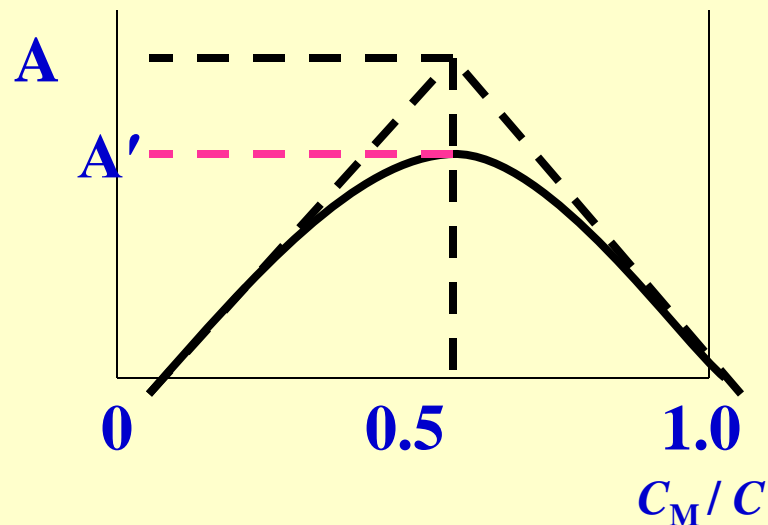
$Ca$

$Ca$

$$K' = \frac{C(1-a)}{C^2 a^2} = \frac{(1-a)}{Ca^2}$$

将  $a = \frac{A - A'}{A}$

代入上式便可求出络合物的条件稳定常数



## 四、双波长分光光度法

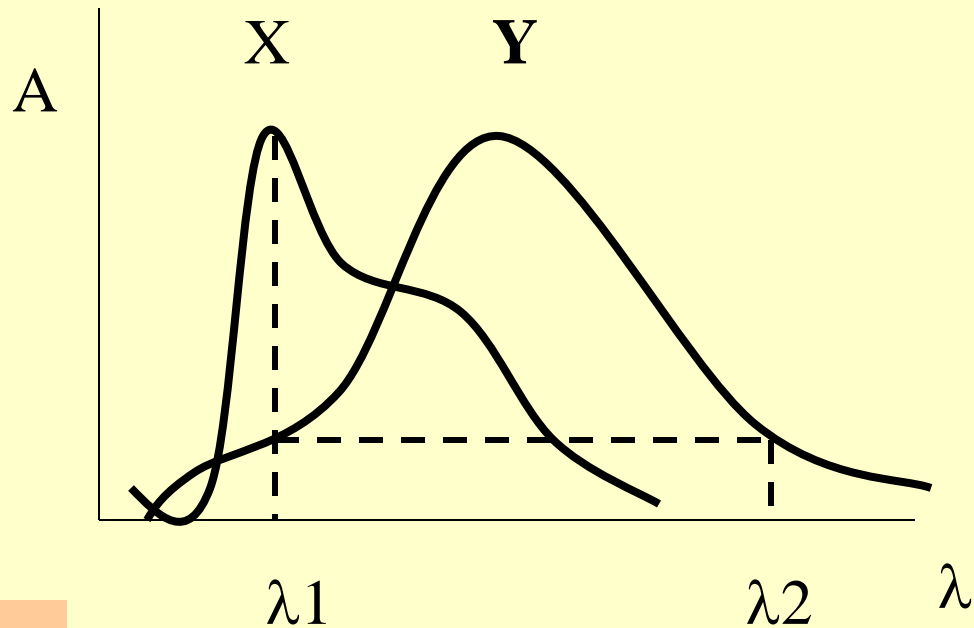
$$\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$$

$$= (A_{\lambda_1}^x + A_{\lambda_1}^y) - (A_{\lambda_2}^x + A_{\lambda_2}^y)$$

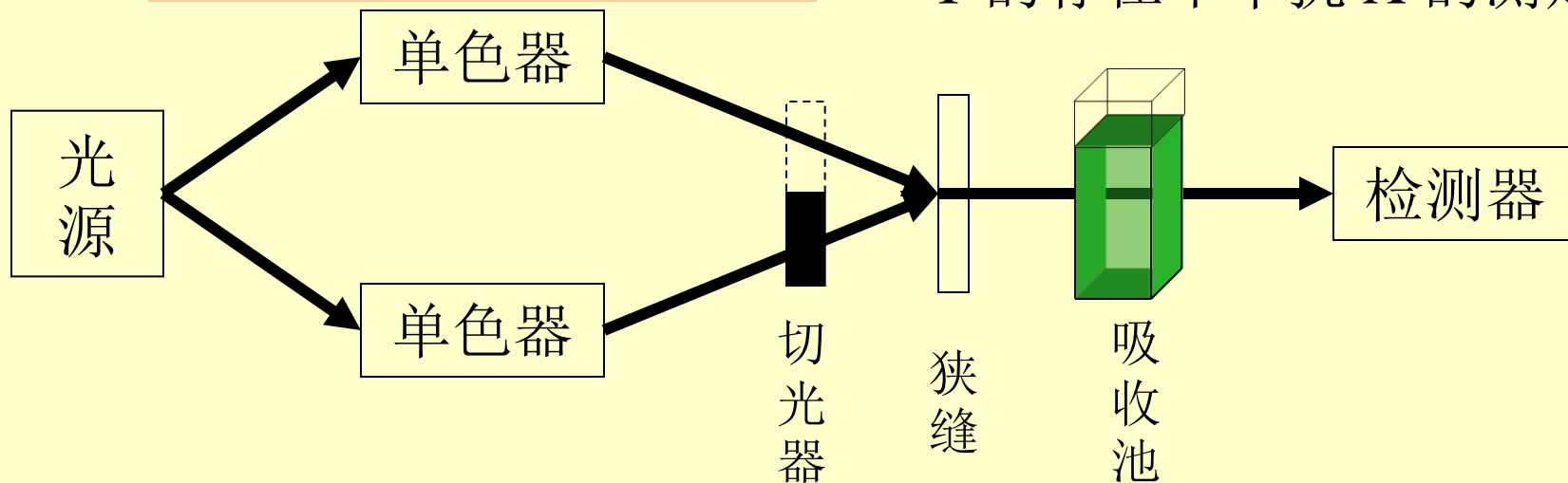
$$\therefore A_{\lambda_1}^y = A_{\lambda_2}^y$$

$$\therefore \Delta A = A_{\lambda_1}^x - A_{\lambda_2}^x$$

$$\Delta A = (\epsilon_{\lambda_1}^x - \epsilon_{\lambda_2}^x) b C_x$$



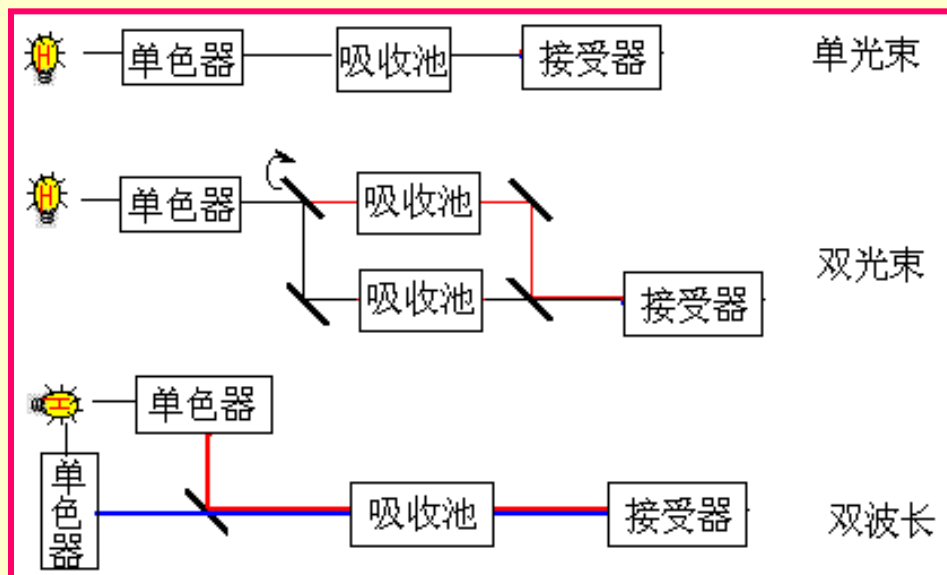
Y 的存在不干扰 X 的测定



# 双波长分光光度计

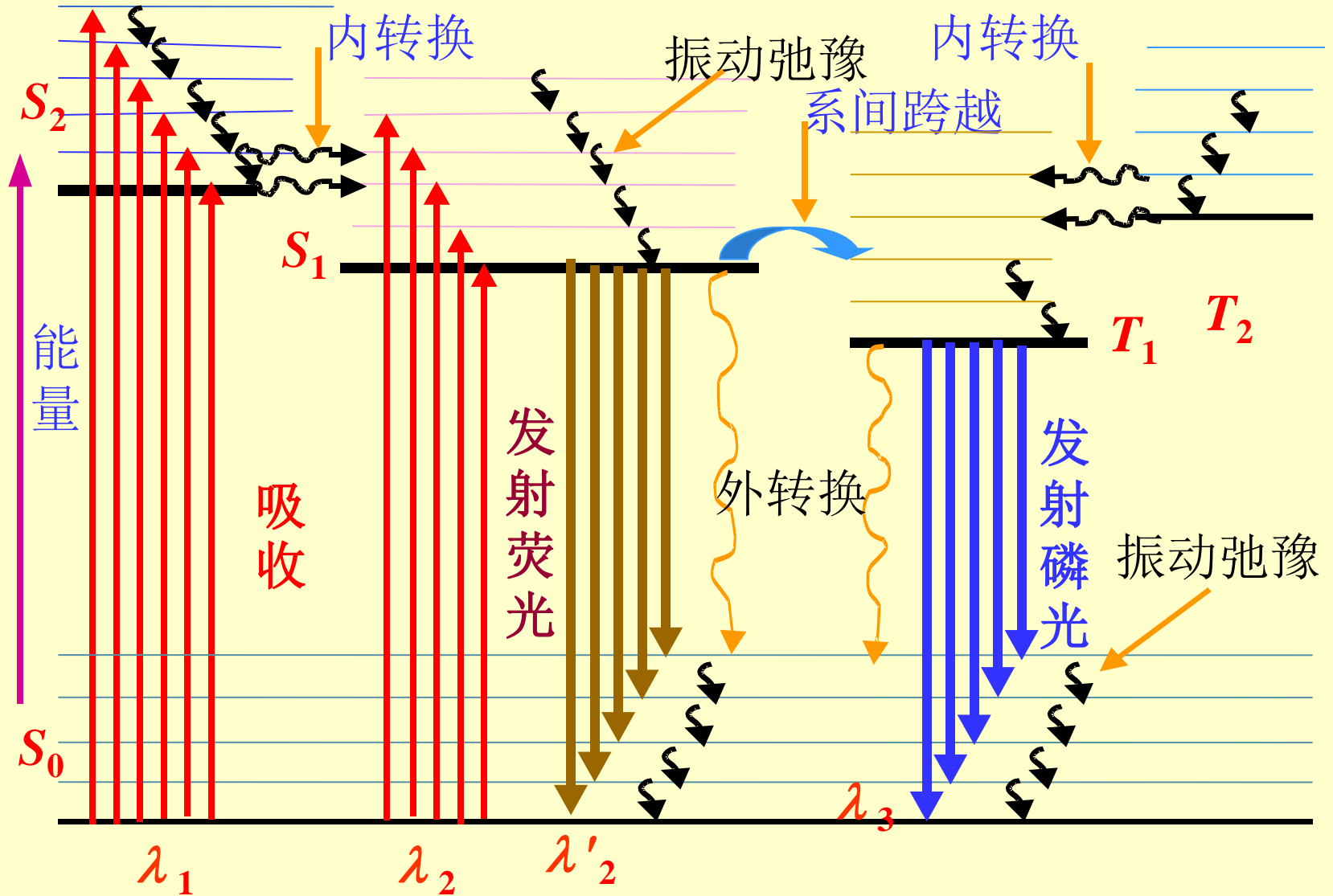
将不同波长的两束单色光( $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ )快速交替通过同一吸收池而后到达检测器,产生交流信号。无需参比池。两波长同时扫描即可获得**导数光谱**。

$$\frac{dA}{d\lambda} - \lambda \text{曲线}$$



双波长分光光度计的  
输出信号是:  
试样在 $\lambda_1$ 和 $\lambda_2$ 处的  
吸收之差。

# 9-7 分子荧光分析法简介



# 激发光谱与发射光谱的关系

## (a). Stokes位移

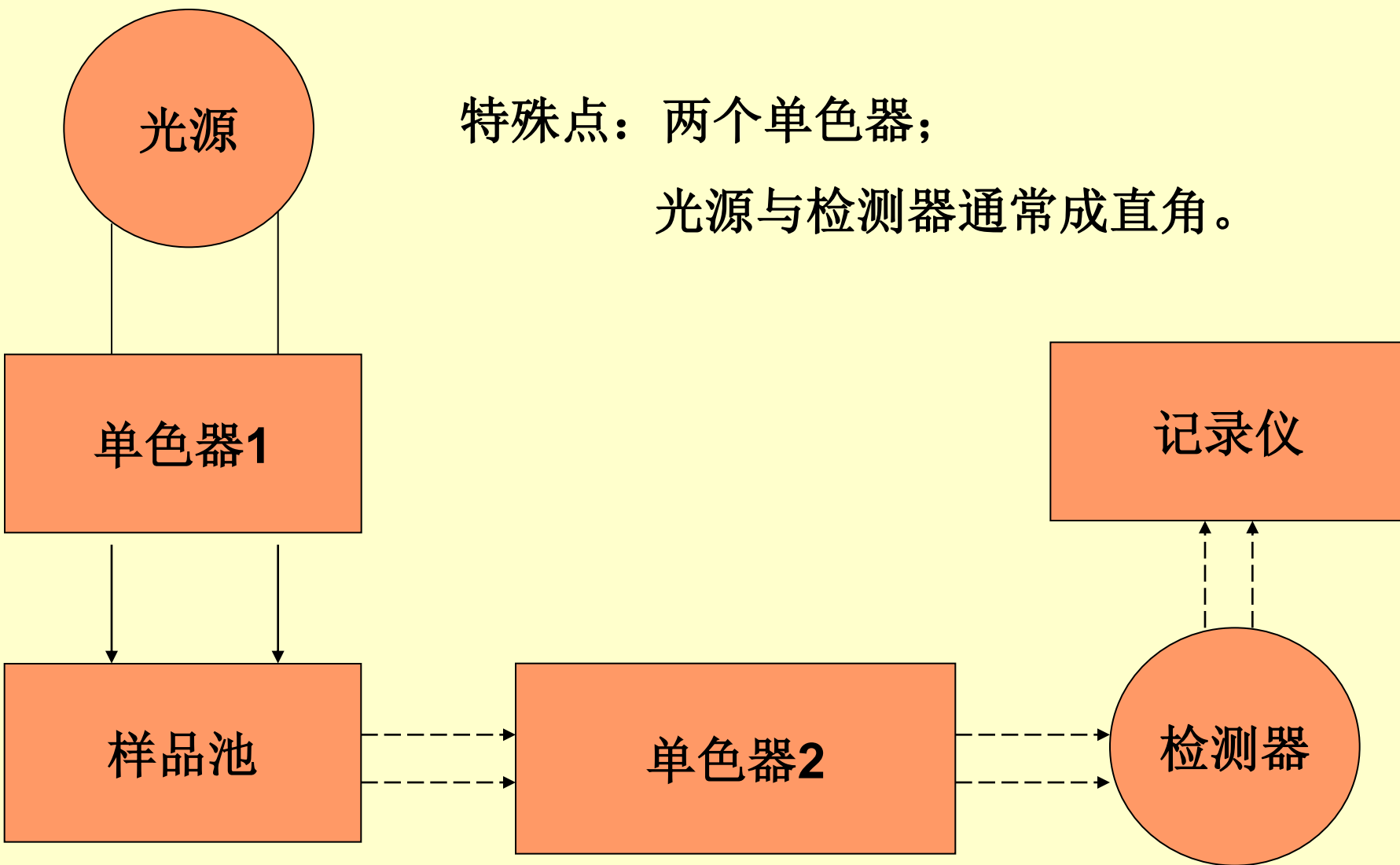
激发光谱与发射光谱之间的波长差值。发射光谱的波长比激发光谱的长，振动弛豫消耗了能量。

## (b). 发射光谱的形状与激发波长无关

电子跃迁到不同激发态能级，吸收不同波长的能量，产生不同吸收带，但均回到第一激发单重态的最低振动能级再跃迁回到基态，产生波长一定的荧光。

## (c). 镜像规则

通常荧光发射光谱与它的激发光谱成镜像对称关系。



特殊点：两个单色器；  
光源与检测器通常成直角。

荧光光谱仪的示意图

# 影响荧光强度的因素

## 1. 荧光强度和溶液浓度的关系

发射的荧光光强 $I_F$ 应正比于该系统吸收的激发光的光强，即

$$I_F = K'(I_0 - I)$$

$I_0$ :入射光强度，  $I$ :透射光强度。 $K'$ 常数取决于荧光效率

根据比尔定律:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon bc}$$



$$\begin{aligned} I_F &= K' I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc}) \\ &= K' I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon bc}) \end{aligned}$$

按照级数展开式：

$$e^x = 1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots + \frac{x^n}{n!}$$

$$I_F = K' I_0 \left[ 2.303 \epsilon b c - \frac{(2.303 \epsilon b c)^2}{2!} + \frac{(2.303 \epsilon b c)^3}{3!} - \dots \right]$$

若  $\epsilon b c < 0.05$ ，则可近似地写成

$$I_F = 2.303 K' I_0 \epsilon b c$$

当  $I_0$  一定时， $I_F = K c$

可见，在低浓度时，荧光强度与物质的浓度成线性关系。  
这也是分子荧光光谱法的定量基础。

当高浓度时，由于自熄灭和自吸收等原因，使荧光强度与分子浓度不呈线性关系。