흡광광도법

2012

(Absorptiometric Analysis)

1. 원리 및 적용범위

이 시험방법은 빛이 시료용액을 통과할 때 흡수나 산란 등에 의하여 강도가 변화하는 것을 이용하는 것으로서 시료물질의 용액 또는 여기에 적당한 시약을 넣어 발색(發色)시킨 용액의 흡광도를 측정하여 시료중의 목적성분을 정량 하는 방법으로 파장 200 ~ 900㎚에서 액체의 흡광도를 측정함으로써 각종 화학물질의 분석에 이용한다.

2. 개요

흡광광도법은 일반적으로 광원(光源)에서 나오는 빛을 단색화장치(monochro meter) 또는 필터(filter)를 이용해서 좁은 파장범위의 빛만을 선택하여 액층을 통과시킨 다음 광전관(photoelectric tube)으로 흡광도를 측정하여 목적 성분의 농도를 정량하는 방법이다. 세기 I_0 인 빛이 그림 1과 같이 농도 C, 길이 ℓ되는 용액 층을 통과하면 이 용액에 빛이 흡수되어 입사광의 세기가 감소한다. 통과한 직후의 빛의 세기 I_t와 I_0 사이에는 램버어트 비어(Lambert-Beer)의 법칙에 따라 다음의 관계가 성립한다.

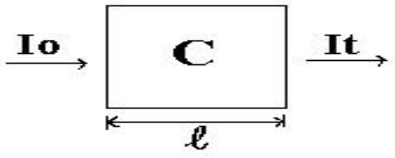


그림 1. 흡광광도 분석방법 원리도

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}$$

I_0 : 입사광의 세기

I_t : 투사광의 세기

C : 농도

ℓ : 빛의 투과거리

ε : 비례상수로서 흡광계수(吸光係數)라 하고, C = 1mol. ℓ = 10㎜ 일때의 ε 값

을 몰흡광계수라 하며 K로 표시한다.

I_t 와 I_0의 관계에서 $\frac{I_t}{I_o} = t$ 를 투과도(透過度), 이 투과도를 백분율로 표시한 것 즉, $t \times 100 = T$를 투과 퍼센트라 하고 투과도의 역수(逆數)의 상용대수 즉, $\log(1/t) = A$를 흡광도(吸光度)라 한다.

램버어트-비어의 법칙은 대조액(對照液)을 통과한 빛의 세기를 I_o, 측정하려고 하는 액층을 통과한 빛의 세시를 I_t로 했을 때도 똑같은 식이 성립하기 때문에 정량에 사용할 수 있다. 대조액층(對照液層)으로는 보통 용매 또는 바탕시험액을 사용하며 이것을 대조액(對照液)이라 한다. 흡광도를 이용한 램버어트-비어의 법칙을 식으로 표시하면 $A=\varepsilon cl$ 이 되므로 농도를 알고 있는 표준액에 대하여 흡광도를 측정하고 흡광계수(ε)를 구해 놓으면 시료액에 대해서도 같은 방법으로 흡광도를 측정함으로써 정량할 수가 있다.

그러나 실제로는 ε를 구하는 대신에 농도가 다른 몇 가지 표준액을 사용하여 시료액과 똑같은 방법으로 조작하여 얻은 검량선으로부터 시료중의 목적성분을 정량하는 것이 보통이다.

3. 장 치

3.1 장치의 개요

일반적으로 사용하는 흡광광도 분석장치는 그림 2와 같이 광원부(光源部), 파장선택부(波長選擇部), 시료부(試料部) 및 측광부(測光部)로 구성되고 광원부에서 측광부까지의 광학계(光學係)에는 측정목적에 따라 여러 가지 형식이 있다.

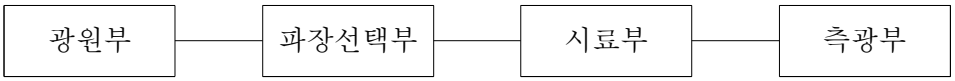


그림 2. 흡광광도 분석장치

3.2 광원부

광원부의 광원에는 텅스텐램프나 중수소방전관(重水素放電管) 등을 사용하며 점등(點燈)을 위한 전원장치나 렌즈와 같은 광학계를 부속시킨다. 가시광선과 근적외선의 광원으로는 주로 텅스텐램프를 사용하고 자외선의 광원으로는 주로 중수소 방전관을 사용한다. 또 전원장치에는 광원의 세기를 안정시키기 위한 장치를 사용할 때도 있다.

3.3 파장선택부

파장의 선택에는 일반적으로 단색화장치(monochromater) 또는 필터(filter)를 사용한다. 단색화장치로는 프리즘, 회절격자 또는 이 두 가지를 조합시킨 것을 사용하며 단색광을 내기 위하여 슬릿(slit)을 부속시킨다. 필터에는 색유리 필터, 젤라틴 필터, 간섭필터 등을 사용한다.

3.4 시료부

시료부에는 일반적으로 시료액을 넣은 흡수셀(cell, 시료셀)과 대조액을 넣은 흡수셀(대조셀)이 있고 이 셀을 보호하기 위한 셀홀더(cell holder)와 이것을 광로(光路)에 올려놓는 시료실(試料室)로 구성된다.

3.5 측광부

측광부의 광전측광에는 광전관(光電管), 광전자증배관(光電子增倍管), 광전도셀 또는 광전지 등을 사용하고 필요에 따라 증폭기(增幅器) 대수변환기(對數變換器)가 있으며 지시계, 기록계 등을 사용한다. 또 광전관, 광전자증배관은 주로 자외선에서 가시광선파장 범위에서, 광전도셀을 근적외선 파장범위에서, 광전지는 주로 가시광선파장 범위에서 사용된다. 지시계는 투과율, 흡광도, 농도 또는 이를 조합한 눈금이 있고 숫자로 표시되는 것도 있다. 기록계는 투과율, 흡광도, 농도 등을 자동 기록한다.

3.6 광전분광광도계

파장선택부에 단색화장치를 사용한 장치로 구조에 따라 단광속형(單光速型)과 복광속형(復光速型)이 있고 복광속형에는 흡수스펙트럼을 자동기록할 수 있는 것도 있다. 또 광전분광광도계에는 미분측광(微分側光), 2파장측광(2波長測光), 시차측광(時差測光)이 가능한 것도 있다.

3.7 광전광도계

파장선택부에 필터를 사용한 장치로 단광속형이 많고 비교적 구조가 간단하여 작업분석용에 적당하다.

3.8 흡수셀

흡수셀은 일반적으로 그림 3과 같이 4각형 또는 시험관형의 것을 사용한다. 그림

3 (2)의 (a)는 액량 1㎖이하 액층(液層)의 길이 10㎜ 이상의 것, (b)는 시료액을 흘러보내면서 그 농도를 측정할 때, (c)는 마개가 있는 것으로 휘발성 시료를 측정할 때, (d)는 액층의 길이가 50㎜이상으로 저농도 시료를 측정할 때 사용하는 특수용도용 흡수셀의 보기이다.

흡수셀의 재질로는 유리, 석영, 플라스틱 등을 사용한다. 유리제는 주로 가시광선 및 근적외선 파장범위, 석영제는 자외선 파장범위, 플라스틱제는 근적외선 파장범위를 측정할 때 사용한다.

3.9 장치의 보정

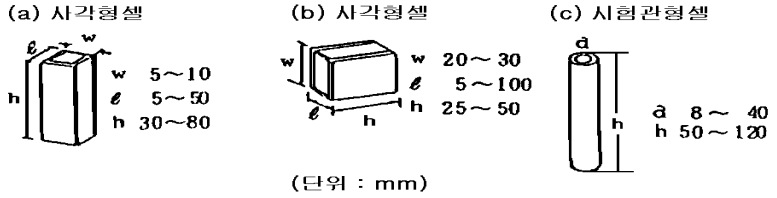
3.9.1 파장눈금의 교정

① 광전분광광도계에서는 안정한 선 스펙트럼(line spectrum)을 갖는 적당한 광원을 사용하고 그 선을 중심으로 전후의 좁은 파장범위에서 스펙트럼의 강도를 측정하여 그림 4 와 같은 그래프용지 위에 그 눈금의 값을 기록하고 양측의 직선부분을 연장하여 그 교차점으로부터 파장 λ_m을 구한다. 이 파장 λ_m와 진파장(眞波長) λ_t와의 차 $\triangle\lambda$가 파장오차를 표시하는 것이므로 단색화장치의 파장조절기구를 조절하여 $\triangle\lambda$가 영(zero)이 되도록 한다.

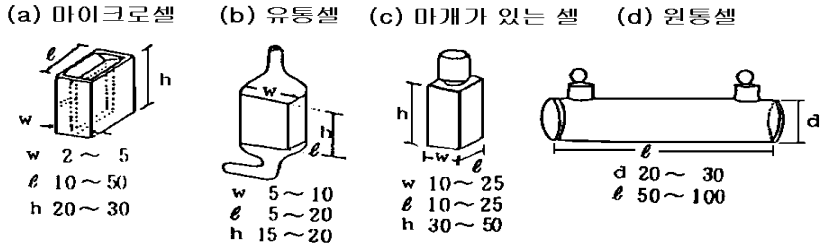
파장눈금의 교정은 일반적으로 < 표 1 >에 따른다.

< 표 1 > 파장눈금의 교정

광원의 종류	사용하는 선 스펙트럼의 파장(nm)	
수소방전관	486.13	656.28
중수소방전관	486.00	656.10
석영저압수은	253.65	365.01
방 전 관	435.88	546.07



(1) 보통형



(2) 특수형

그림 3. 흡수셀의 모양

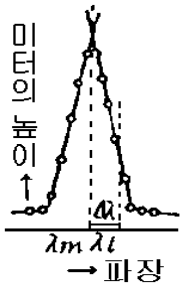


그림 4. 파장눈금 교정을 위한 선 스펙트럼 측정보기

② 자동기록식 광전분광광도계의 파장교정은 홀뮴(holmium) 유리의 흡수스펙트럼을 이용한다. 그림 5는 1㎚ 파장 폭에서 측정한 홀뮴유리의 흡수스펙트럼을 표시한 보기이다. 파장을 교정할 때 주사속도(走査速度)가 너무 크면 흡수 피이크의 파장이 달라지는 수가 있으므로 적당한 속도로 주사해야 한다. 또 홀뮴유리나 간섭필터를 사용하여 파장을 교정할 때도 파장 폭이 너무 크면 파장이 달라지는 수가 있으므로 주의해야 한다.

3.9.2 흡광도 눈금의 보정

110℃에서 3시간 이상 건조한 중크롬산칼륨(1급이상)을 1/20N 수산화칼륨용액에 녹여 중크롬산칼륨용액을 만든다. 그 농도는 시약의 순도를 고려하여 $K_2Cr_2O_7$ 으로서 0.0303g/ℓ가 되도록 한다. 이 용액의 일부를 신속하게 10.0㎜ 흡수셀에 취하고 25℃에서 1㎚이하의 파장 폭에서 흡광도를 측정한다. 이때 각 파장에 있어서의 흡광도 및 투과율은 이상이 없는 한 <표 2>의 값을 나타내야 하며 만일 다른 값을 나타내면 <표 2>에 의하여 흡광도 눈금을 보정한다.

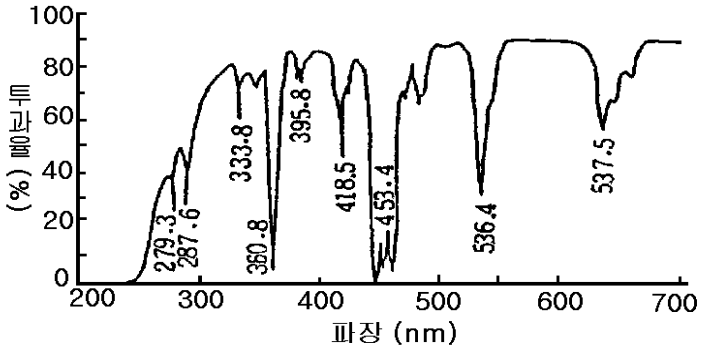


그림 5. 홀뮴유리 흡수스펙트럼과 피이크의 파장

< 표 2 > 중크롬산칼륨용액의 흡광도와 투과율(%) (25℃)

파장(㎚)	흡광도	투과율(%)	파 장(㎚)	흡광도	투과율(%)
220	0.446	35.8	340	0.316	48.3
230	0.171	67.4	350	0.559	27.6
240	0.295	50.7	360	0.830	14.8
250	0.496	31.9	370	0.987	10.3
260	0.633	23.3	380	0.932	11.7
270	0.745	18.0	390	0.695	20.2
280	0.712	19.4	400	0.396	40.2
290	0.428	37.3	420	0.124	75.1
300	0.149	70.9	440	0.054	88.2
310	0.048	89.5	460	0.018	96.0
320	0.063	86.4	480	0.004	99.1
330	0.049	71.0	500	0.000	100

3.9.3 미광(迷光, stray light)의 유무조사

광원이나 광전측광 검출기에는 한정된 사용파장영역에 있어 <표 3>에 표시한 파장영역에서는 미광의 영향이 크기 때문에 그림 6에 표시한 것과 같은 투과특성을 갖는 컷트필터(cut filter)를 사용하며 미광의 유무를 조사하는 것이 좋다.

< 표 3 > 광원 또는 광전측광검출기의 사용파장 한계

파장영역(㎚)	한계파장이 생기는 이유
200 ~ 220	검출기 또는 수은방전관, 중수소방전관의 단파장 사용한계
300 ~ 330	텅스텐램프의 단파장 사용한계
700 ~ 800	광전자 증배관의 장파장 사용한계

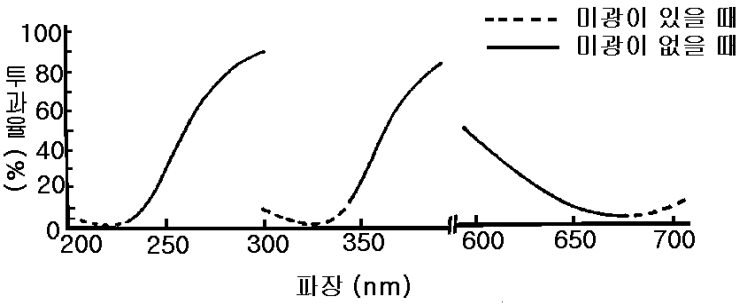


그림 6. 미광조사용 커트필터의 투과율(%)

4. 측 정

4.1 장치의 설치

장치는 되도록 다음과 같은 조건을 구비한 실내에 설치한다.

(1) 전원의 전압 및 주파수의 변동이 적을 것

(2) 직사일광을 받지 않을 것

(3) 습도가 높지 않고 온도변화가 적을 것

(4) 부식성 기체나 먼지가 없을 것

(5) 진동이 없을 것

4.2 흡수셀의 준비

흡수셀은 다음과 같이 준비한다.

(1) 시료액의 흡수파장이 약 370㎚ 이상 일 때는 석영 또는 경질유리 흡수셀을 사용하고 약 370㎚ 이하 일 때는 석영흡수셀을 사용한다.

(2) 따로 흡수셀의 길이(ℓ)를 지정하지 않았을 때는 10㎜셀을 사용한다.

(3) 시료셀에는 시험용액을, 대조셀에는 따로 규정이 없는 한 증류수를 넣는다. 넣고자 하는 용액으로 흡수셀을 씻은 다음 적당량(셀의 약 80%까지)을 넣고 외면이 젖어 있을 때는 깨끗이 닦는다. 필요하면(휘발성 용매를 사용할 때와 같은 경우) 흡수셀에 마개를 하고 흡수셀에 방향성(方向性)이 있을 때는 항상 방향을 일정하게 하여 사용한다.

(4) 흡수셀은 미리 깨끗하게 씻은 것을 사용한다.

흡수셀의 세척방법은 다음과 같이 한다. 탄산나트륨용액(2w/v %)에 소량의 음이온 계면활성제(보기:액상합성세제)를 가한 용액에 흡수셀을 담가 놓고 필요하면

40 ~ 50℃로 약 10분간 가열한다. 흡수셀을 꺼내 물로 씻은 후 질산(1+5)에 소량의 과산화수소를 가한 용액에 약 30분간 담가 놓았다가 꺼내어 물로 잘 씻는다. 깨끗한 흡수지 위에 거꾸로 놓아 물기를 제거하고 실리카겔을 넣은 데시케이터 안에서 건조하여 보존한다. 급히 사용하고자 할 때는 물기를 제거한 후 에틸알코올로 씻고 다시 에틸에테르로 씻은 다음 건조기로 건조해도 무방하다. 또 빈번하게 사용할 때는 물로 잘 씻은 다음 증류수를 넣은 용기에 담가 두어도 무방하다. 질산과 과산화수소의 혼액 대신에 새로 만든 크롬산과 황산혼액에 약 1시간 담근 다음 흡수셀을 꺼내어 물로 충분히 씻어내도 된다. 그러나 이 방법은 크롬의 정량이나 자외선영역의 측정을 목적으로 하는 경우나 접착하여 만든 셀에는 사용하지 않는 것이 좋다. 또 세척후의 셀에는 지문이 묻지 않도록 주의하고 빛이 통과하는 면에는 손이 직접 닿지 않도록 해야한다.

4.3 측정준비

흡광도의 측정준비는 다음과 같이 한다.

(1) 측정파장에 따라 필요한 광원과 광전측광 검출기를 선정한다.

(2) 전원을 넣고 잠시 방치하여 장치를 안정시킨 후 감도와 영점(zero)을 조절한다.

(3) 단색화장치나 필터를 이용하여 지정된 측정파장을 선택한다.

4.4 흡광도의 측정

흡광도의 측정은 원칙적으로 다음과 같은 순서로 한다.

(1) 눈금판의 지시가 안정되어 있는가를 확인한다.

(2) 대조셀을 광로에 넣고 광원으로부터 빛을 차단하고 영점을 맞춘다. 영점을 맞춘다는 것은 투과율 눈금으로 눈금판의 지시가 영이 되도록 맞추는 것이다.

(3) 광원으로부터 빛을 통하여 눈금 100에 맞춘다.

(4) 시료셀을 광로에 넣고 눈금판의 값을 흡광도 또는 투과율로 읽는다. 투과율로 읽을 때는 나중에 흡광도로 환산해 주어야 한다.

(5) 필요하면 대조셀을 광로에 바꿔넣고 영점과 100에 변화가 없는 가를 확인한다.

(6) 위 (2), (3), (4)의 조작 대신에 농도를 알고 있는 표준액 계열을 사용하여 각각의 눈금에 맞추는 방법도 무방하다.

4.5 흡수곡선의 측정(吸收曲線의 測定)

흡수곡선의 측정은 다음과 같이 한다. 필요한 파장범위에 대해서 10㎚ 마다의 흡광도를 측정하여 가로축에 파장을, 세로축에 흡광도를 표시하고 그래프용지에 흡수곡선을 작성한다. 이때 최대흡수값 부근에서는 파장간격을 1~5㎚까지 좁게 하여 흡광도를 측정하는 것이 좋다. 또 흡광도의 변화가 적은 파장에서는 파장간격을 적당히 넓게 하여도 상관없다. 이때 흡광도 대신 투과율을 세로축에 표시해도 좋다. 또한 흡수곡선을 작성하는 데는 자기분광광전광도계(自己分光光電光度計)를 사용하는 것이 편리하다. 그림 7은 흡수곡선의 보기를 표시한 것이다.

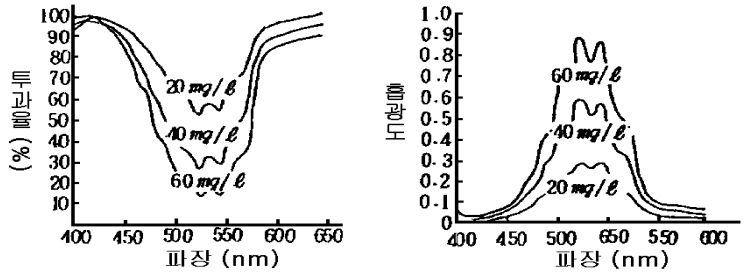


그림 7. 흡수곡선(과망간산칼륨용액의 흡수곡선)

4.6 측정결과의 정리

측정결과에는 다음과 같은 사항을 기록한다.

(1) 사용한 장치의 명칭과 형식

(2) 광전분광광도계를 사용했을 때는 측정파장, 슬릿의 폭 및 밴드폭

(3) 광전광도계를 사용했을 때는 필터의 번호

(4) 흡수셀의 재질, 모양, 셀의 길이 또는 직경

(5) 대조액의 성분

(6) 시험용액 또는 발색된 액의 성분

(7) 시험용액의 액성

(8) 시약첨가에서부터 흡광도 측정까지의 시간

(9) 측정시의 시험용액 온도

(10) 기타 필요사항

5. 정량방법

흡광광도 분석방법으로 정량분석을 하기 위해서는 흡광도와 시료성분의 농도와의 비례관계와 같은 시료에 대한 흡광도의 재현성을 검토하여야 한다. 일반적으로 정량분석에는 검량선법을 이용하며 경우에 따라서는 ε (몰흡광계수)값을 이용한다.

5.1 검량선의 작성

검량선은 표준액의 여러 가지 농도에 대해 적당한 대조액을 사용하여 흡광도를 측정하고 그래프 용지에 표준액의 농도를 가로축, 흡광도를 세로축으로 나타내어 얻는다. 검량선은 거의 직선으로 나타나는 범위 내에서 사용하는 것이 좋다. 시약을 바꾸거나 시험자가 바뀔 때에는 검량선을 다시 작성하는 것이 좋다. 단, 투과율을 측정하여 흡광도로 환산하지 않고 검량선을 작성할 때는 편대수(片對數) 그래프용지를 사용하여 대수축에 투과율을 취하여 검량선을 작성한다.

5.1.1 표준액

분석하려는 성분의 순물질(純物質) 또는 일정농도의 표준액을 단계적으로 취하여 규정된 방법에 따라 표준액을 만든다. 이 때의 표준액 농도는 시험용액중의 분석하려는 성분의 추정농도와 거의 같은 농도범위로 한다.

5.1.2 대조액

일반적으로는 용매를 사용하며 분석하려는 성분이 들어있지 않는 같은 종류의 시료를 사용하여 규정된 방법에 따라 조제한다.

5.2 정량조건의 검토

흡광광도법으로 정량분석을 할 때는 다음과 같은 조건을 검토하여 결정하여야 한다.

5.2.1 발색반응의 검토

(1) 발색한 시험용액에 대한 흡수곡선과 최대흡수파장
(2) 바탕시험액의 흡수곡선과 바탕 시험치
(3) 액성의 변화에 따른 흡광도의 변화
(4) 최적 pH 범위와 완충액의 종류 및 첨가량
(5) 마스킹이 필요할 때는 마스킹제의 종류와 첨가량
(6) 안정제, 산화방지제 등의 종류와 첨가량
(7) 온도변화 및 방치시간에 의한 흡광도의 변화

(8) 시약의 농도, 첨가량, 첨가순서에 의한 영향

(9) 시료액중의 시료성분의 최적농도 범위

(10) 시료액에 대한 빛(光)의 영향

(11) 용매 추출을 할 경우 최적용매의 선정

5.2.2 측정조건의 검토

(1) 측정파장은 원칙적으로 최고의 흡광도가 얻어질 수 있는 최대 흡수파장을 선정한다. 단, 방해성분의 영향, 재현성 및 안정성 등을 고려하여 차선(次善)의 측정파장 또는 필터를 선정하는 수도 있다.

(2) 대조액으로는 용매, 바탕시험액 기타 적당한 용액을 선정한다.

5.3 정량조작

정량조작은 원칙적으로 다음과 같은 순서로 한다.

(1) 시료를 메스플라스크 같은 용기에 달아 넣는다.

(2) 발색시약, 산, 염기, 완충액, 마스킹제, 안정제 등 각각 규정된 순서에 따라 가한다.

(3) 충분한 발색이 되도록 필요하면 가열 또는 방치한다.

(4) 용매를 가하여 일정부피로 희석한다.

(5) 광도계의 측정파장 또는 필터, 슬릿의 폭, 흡수셀 등을 규정한 방법에 따라 조절 또는 준비한다.

(6) 발색액의 일부를 흡수셀에 넣어 4.4의 순서에 따라 흡광도를 측정한다.

(7) 측정한 흡광도를 5.1의 요령에 따라 작성한 검량선과 비교하여 목적하는 성분의 농도를 구한다.

비고 : 시료중의 목적성분 농도가 낮을 때는 발색액에 잘 녹지 않는 시료성분을 다시 잘 녹는 용매로 추출, 흡광도를 측정하여 농도를 구해도 무방하다.