第九章

紫外-可见分光光度法

目录

第一节 光谱分析概述

第二节 紫外-可见分光光度法的基本原理

第三节 紫外-可见分光光度计

第四节 分析条件的选择

第五节 定性定量分析方法

第六节 紫外-可见吸收光谱在有机化合物结构分析中的应用简介

学习目标

掌握 1.紫外-可见分光光度法的基本原理

2.定性定量分析方法

熟悉 1.光谱分析概述

2.紫外-可见分光光度光度计

了解 紫外-可见吸收光谱在有机化合物结构分析中的应 用简介

第一节

光谱分析概述

1.电磁辐射与电磁波谱

（1）电磁辐射：光是一种电磁辐射（又称电磁波），它具有波动性与粒子性。光的波动性主要体现为光的反射、折射、干涉、衍射以及偏振等现象，常用波长λ、波数σ和频率ν来表征。波长、波数和频率的关系为：

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \qquad \sigma = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

式中，c为光在真空中的传播速度，$c = 2.997925 \times 10^8 \mathrm{m/s}$。

1.电磁辐射与电磁波谱

光的粒子性主要体现在热辐射、光的吸收和发射、光电效应以及光的化学作用等方面。 光的粒子性用每个光子具有的能量E作为表征。光子的能量与波长成反比，与频率成正比，波长愈长，光子能量愈小；波长愈短，光子能量愈大。它们的关系如下：

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

式中，h是普朗克(Planck)常数，$h = 6.6262\times10^{-34}$J s；E为光子能量，单位常用电子伏特（eV）或焦耳（J）（$1\text{eV} = 1.6022\times10^{-19}$J）。

1.电磁辐射与电磁波谱

（2）电磁波谱

电磁波谱分区表

电磁辐射区段	波长范围	能级跃迁的类型
γ射线	10^{-3} ~ 0.1nm	原子核能级
X射线	0.1 ~ 10nm	内层电子能级
远紫外辐射	10 ~ 200nm	内层电子能级
紫外辐射	200 ~ 400nm	价电子或成键电子能级
可见光区	400 ~ 760nm	价电子或成键电子能级
近红外辐射	0.76 ~ 2.5μm	涉及氢原子的振动能级
中红外辐射	2.5 ~ 50μm	原子或分子的振动能级
远红外辐射	50 ~ 500μm	分子的转动能级
微波区	0.3mm ~ 1m	电子自旋及核自旋能级
无线电波区	1 ~ 1000m	磁场诱导核自旋能级能级

2.光学分析法的分类

根据待测物质（原子或分子）发射或吸收的电磁辐射，以及待测物质与电磁辐射的相互作用而建立起来的定性、定量和结构分析方法，统称为**光学分析法**。

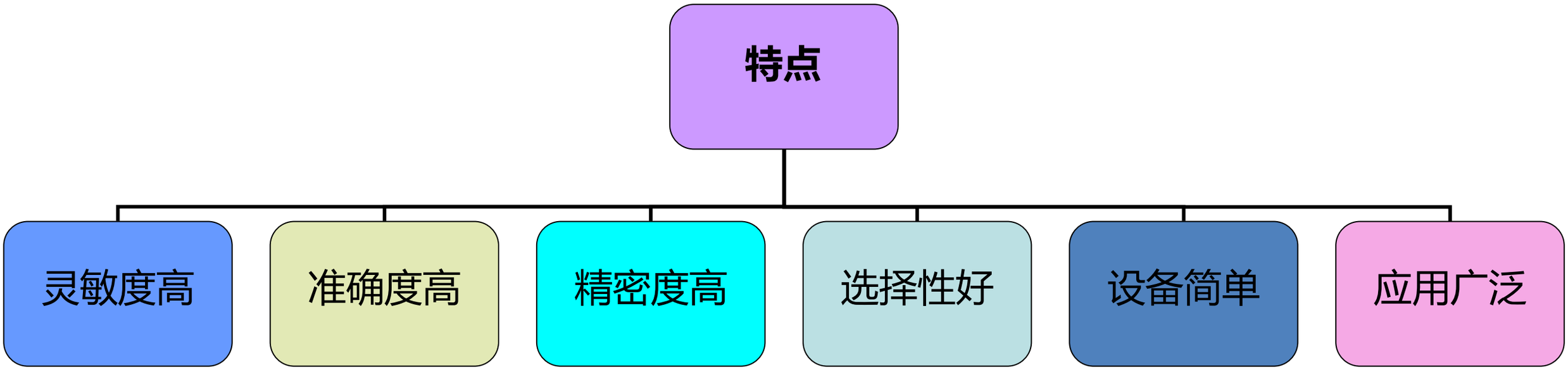
光学分析法

- 非光谱法：不以光的波长为特征讯号，仅通过测量电磁辐射的某些基本性质（反射、折射、干涉、衍射和偏振）的变化的分析方法。
- 光谱法：根据能级跃迁所产生的电磁辐射强度随波长变化所得到的图谱称为光谱。利用光谱进行定性、定量和结构分析的方法。

2.光谱法的分类

- 光谱法
  - 发射光谱法
    - 原子发射光谱法
    - 原子荧光光谱法
    - 荧光光谱法
    - 化学发光法
  - 吸收光谱法
    - 原子吸收光谱法
    - 紫外-可见分光光谱法
    - 红外光谱法
    - X射线吸收光谱法
    - 核磁共振波谱法

3.紫外-可见吸收光谱法的特点



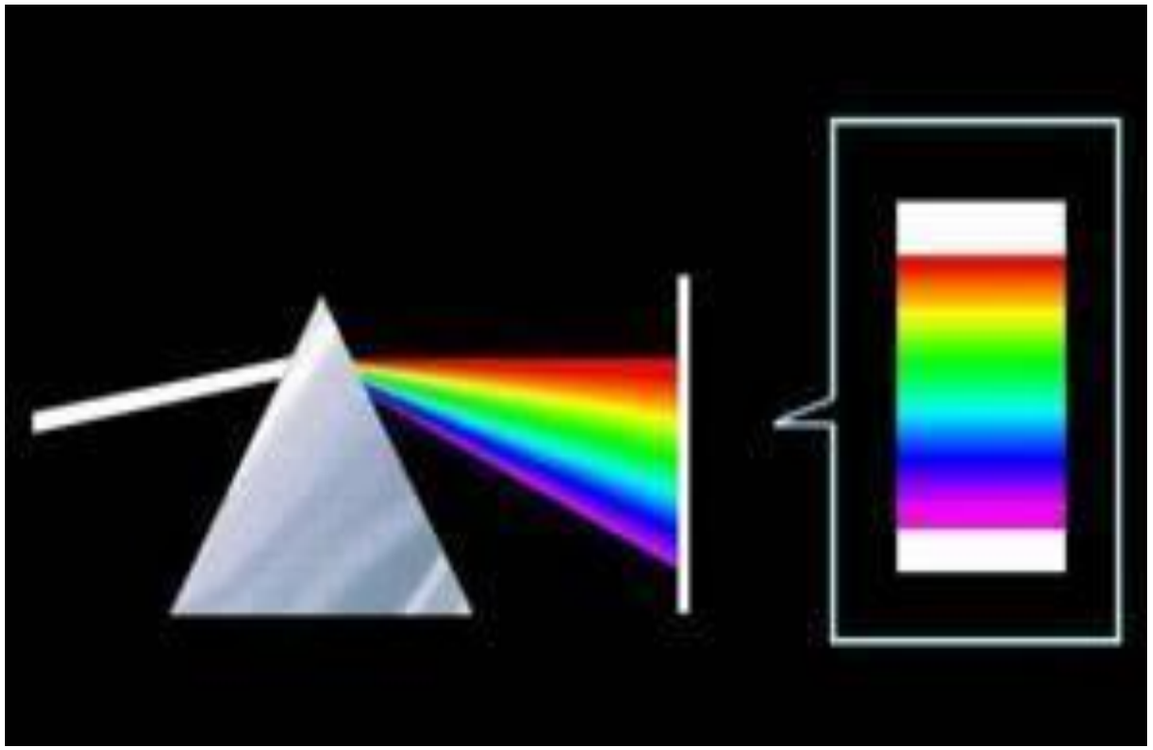
4.物质对光的选择性吸收

物质的结构不同，与电磁辐射发生相互作用所需要的能量也不同，只有当电磁辐射的能量与物质结构发生改变所需要的能量相等时，电磁辐射与物质之间才能发生相互作用而被吸收。也就是说，物质对光具有选择性吸收。

光的颜色	波长范围(nm)	光的颜色	波长范围(nm)
红色	760～650	青色	500 ～ 480
橙色	650 ～ 610	蓝色	480 ～ 450
黄色	610 ～ 560	紫色	450 ～ 400
绿色	560 ～ 500	近紫外	400 ～ 200

4.物质对光的选择性吸收

单一波长的光称为单色光；由不同波长的光混合而成的光称为复合光。如果让一束复合光通过棱镜或光栅，就能散射出多种颜色的光，这种现象称为光的色散。如果两种适当颜色的单色光按一定强度比例混合，可以得到白光，则这两种单色光互称补色光。



4.物质对光的选择性吸收

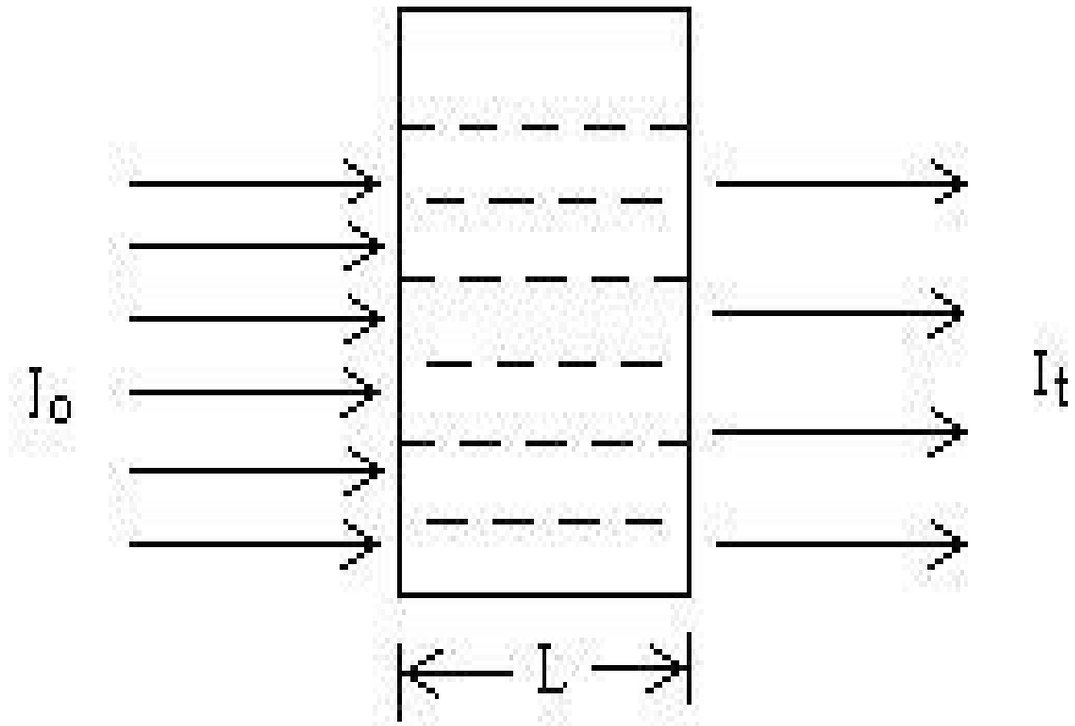
溶液呈现不同的颜色，是由于溶液中的溶质（分子或离子）选择性地吸收了白光中某种颜色的光而引起的。当一束白光通过某溶液时，如果该溶液对任何颜色的光都不吸收，则溶液无色透明；如果该溶液对任何颜色的光的吸收程度相同，则溶液灰暗透明；如果溶液吸收了其中某一颜色的光，则溶液呈现透过光的颜色，即呈现溶液所吸收色光的补色光的颜色。例如高锰酸钾溶液能够吸收白光中的青绿色光而呈现紫红色。

第二节

紫外-可见分光光度法的基本原理

1.透光率与吸收度

- $I_0 = I_a + I_t + I_r$
- $I_0 = I_a + I_t$

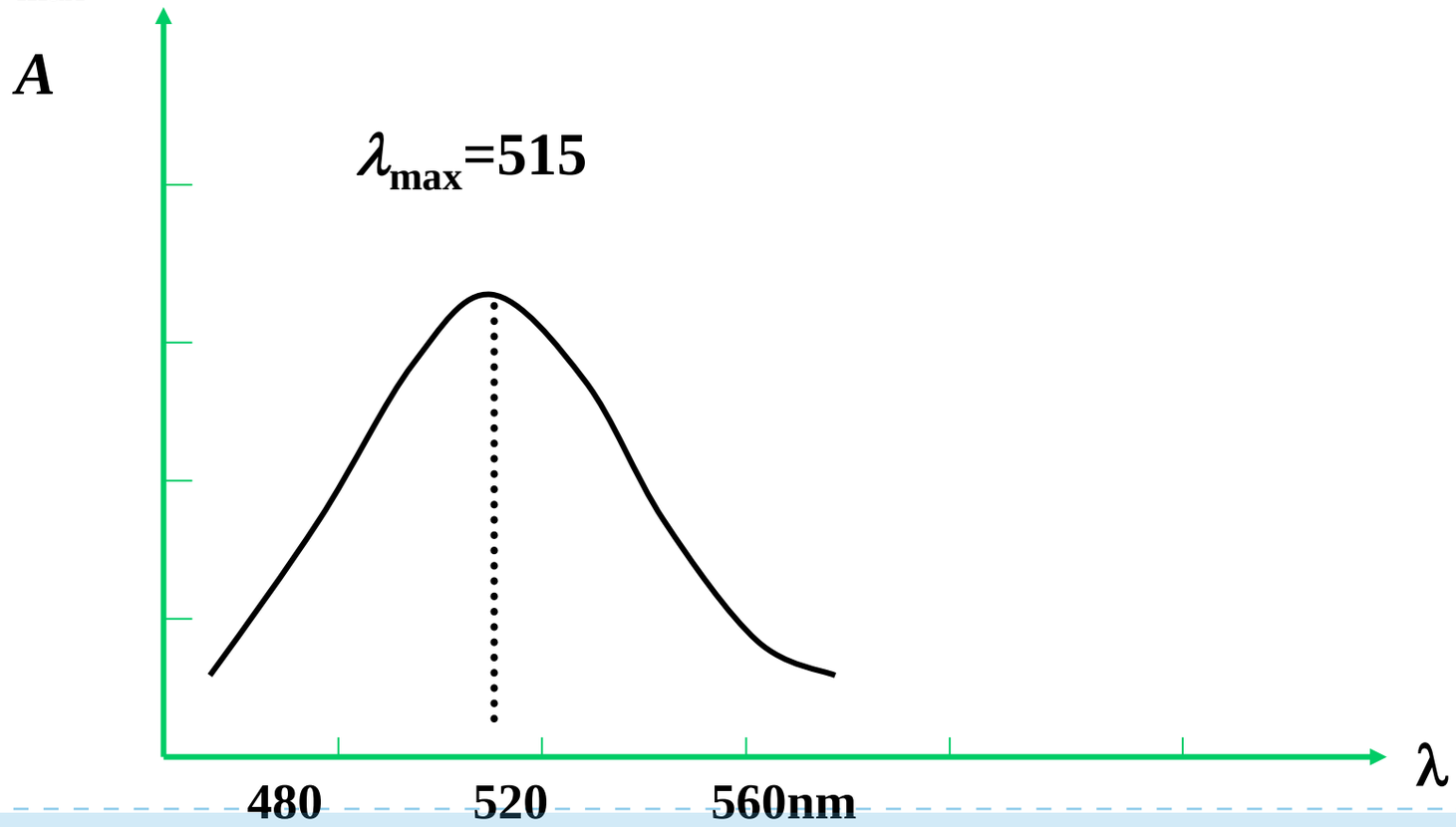


- 透射光强度I_t与入射光强度I_0的比值称为透光率或透光度T。
- 透光率的负对数为吸光度A。

$$A = -\lg T$$

2.吸收光谱曲线

- 概念：以波长λ为横坐标、吸光度A为纵坐标所描绘的曲线称为吸收光谱曲线，简称吸收光谱。
- 特点：在相同条件下，同一物质的不同浓度的溶液，其吸收光谱曲线相似，且λ_{max}相同。这是定性分析的基础。



3.光的吸收定律

- 当一束平行的单色光通过均匀、无散射的含有吸光性物质的溶液时，在入射光的波长、强度及溶液的温度等条件不变的情况下，该溶液的吸光度A与溶液的浓度c及液层厚度L的乘积成正比，即 $A = K\,L\,c$，称为光的吸收定律（朗伯-比尔定律）。
- 光的吸收定律是定量分析的理论依据。

3.光的吸收定律

- 朗伯-比尔定律不仅适用于可见光，而且也适用于紫外光和红外光；不仅适用于均匀、无散射的溶液，而且也适用于均匀、无散射的固体和气体。
- 实验证明，溶液对光的吸光度具有加和性。如果溶液中同时存在两种或两种以上的吸光性物质，则测得的该溶液的吸光度等于溶液中各吸光性物质吸光度的总和，即：

$$A_{(a+b+c)} = A_a + A_b + A_c$$

4.吸光系数

（1）摩尔吸光系数：在入射光波长一定时，溶液浓度为1mol/L，液层厚度为1cm时所测得的吸光度称为摩尔吸光系数，常用ε表示，其量纲为L/（mol·cm）。

（2）比吸光系数：在入射光波长一定时，溶液浓度为1g/L，液层厚度为1cm时的吸光度称为吸收系数，常用α表示，其量纲为L/(g·cm)。

（3）百分吸光系数：在入射光波长一定时，溶液浓度为1%（g/100ml）、液层厚度为1cm时所测得的吸光度称为百分吸光系数，常用$E_{1cm}^{1\%}$表示，其量纲为100ml/（g·cm）

根据上述定义，摩尔吸光系数和吸收系数、百分吸光系数之间的换算关系是：

$$\varepsilon = E_{1cm}^{1\%} \times \frac{M}{10} \qquad \varepsilon = \alpha \cdot M \qquad E_{1cm}^{1\%} = 10\alpha$$

4.吸光系数

例　用氯霉素（相对分子质量为323.15**）纯品配制**100ml**含**2.00mg**的溶液，以**1.00cm**厚的吸收池在**278cm**波长处测得其透光率为**24.3%，**试计算氯霉素在**278cm**波长处的摩尔吸光系数和百分吸光系数。**

解：已知$M = 323.15\text{g/mol}$，$\rho = 2.00\times10^{-3}\%$，$T = 24.3\%$。

求氯霉素在278cm**波长处的摩尔吸光系数**ε**和比吸光系数。**

$$\because\ A = -\lg T = E_{1\text{cm}}^{1\%}\rho L$$

$$\therefore E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{-\lg T}{\rho L} = \frac{-\lg 0.243}{2.00\times10^{-3}} = \frac{0.641}{2.00\times10^{-3}} = 307 \quad [100\text{ml/（g cm）}]$$

$$\varepsilon = E_{1\text{cm}}^{1\%}\frac{M}{10} = 307\times\frac{323.15}{10} = 9920 \quad \text{L/(mol cm)}$$

5.偏离光的吸收定律的主要因素

- 化学因素：(1)吸光性物质溶液的浓度

  (2)吸光性物质的化学变化

  (3)溶剂的影响

- 光学因素：(1)非单色光

  (2)杂散光

  (3)非平行光

  (4)反射现象

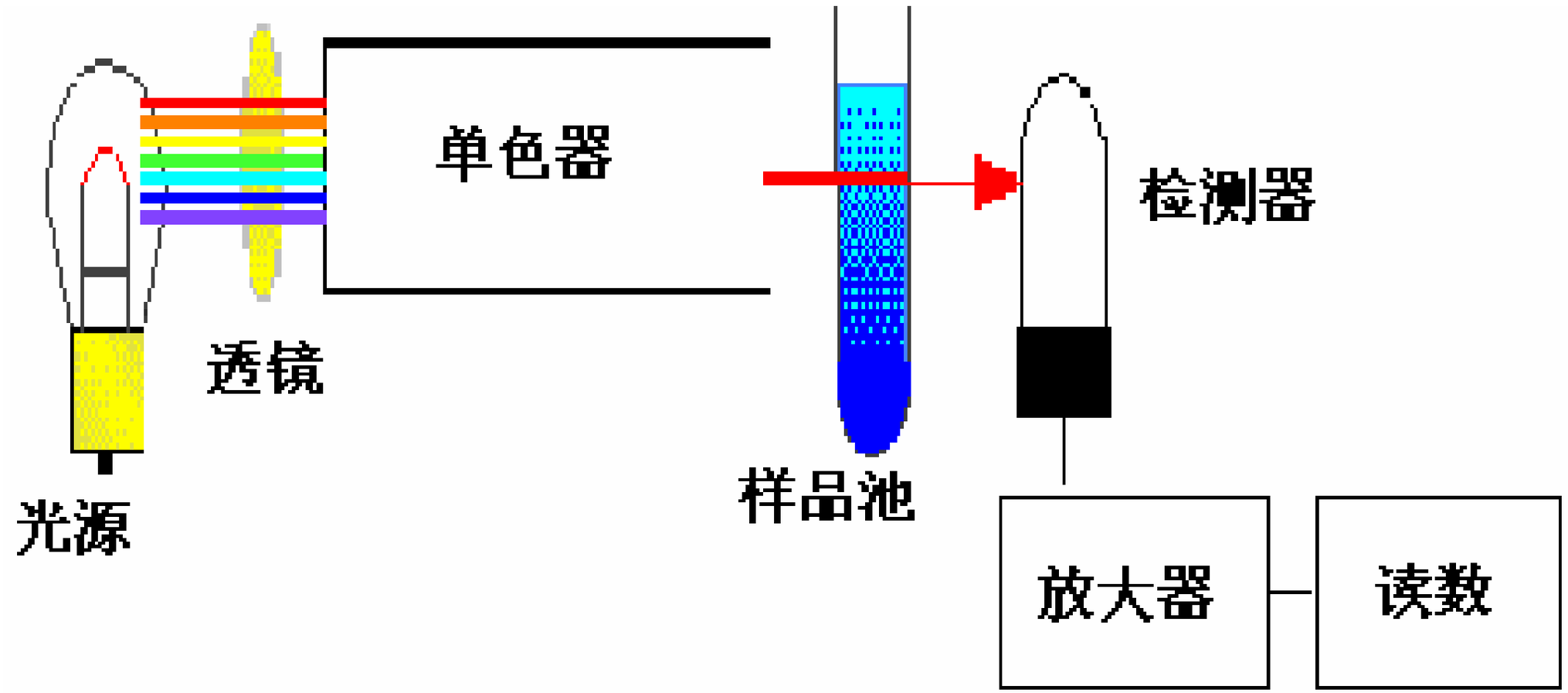
  (5)散射现象

第三节

紫外-可见分光光度计

1.紫外-可见分光光度计的主要部件

光源—单色器—吸收池—检测器—讯号处理与显示器



2.紫外-可见分光光度计的光学性能

(1) 测光方式

(2) 波长范围

(3) 狭缝或光谱带宽

(4) 杂散光

(5) 波长准确度

(6) 吸光度范围

(7) 波长重复性

(8) 测光准确度

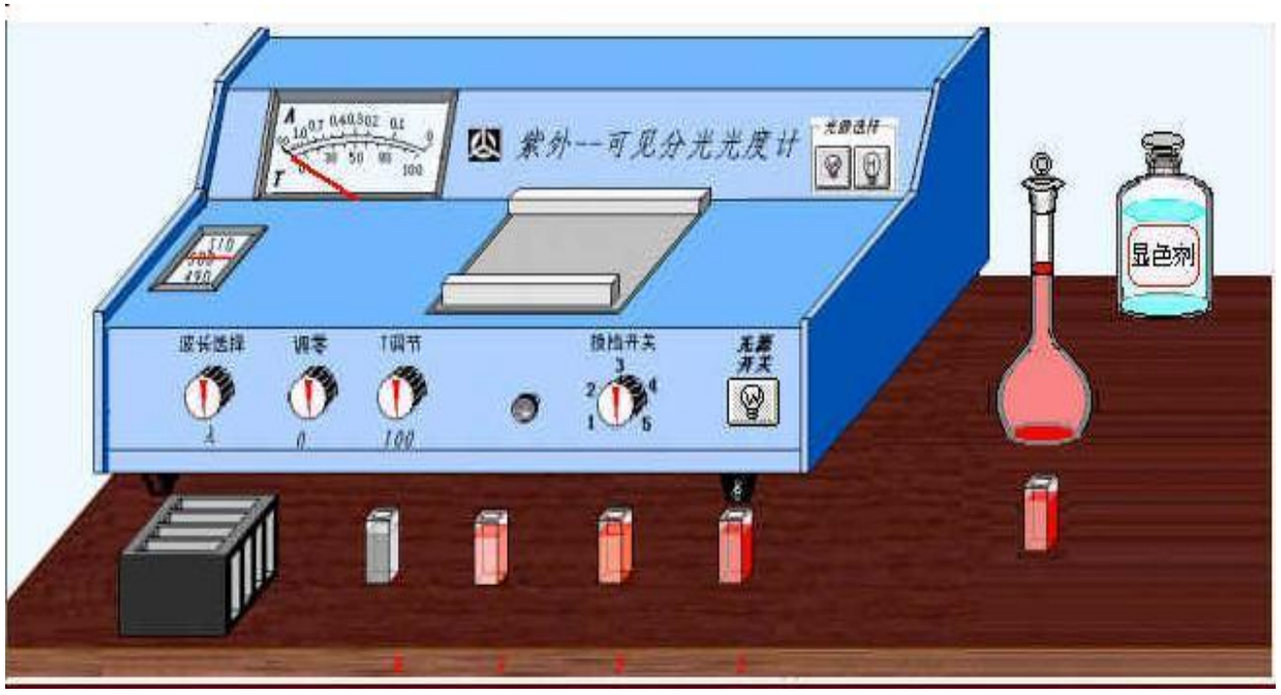
(9) 光度重复性

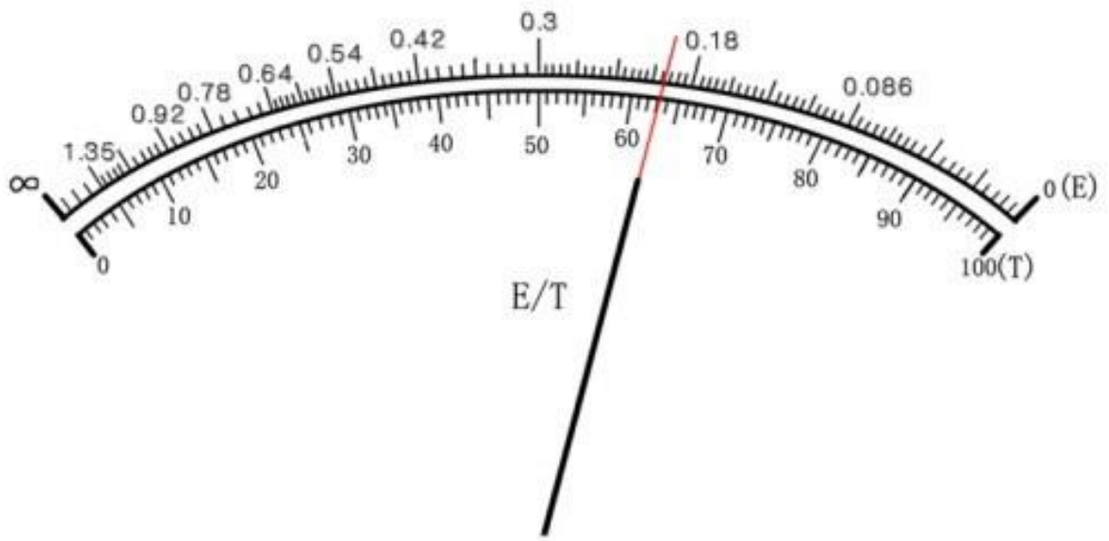
(10) 分辨率

3.紫外-可见分光光度计的类型

(1) 可见分光光度计

721型分光光度计





表盘上透光率的读数为：T%=63+1X1/5=63.2

T=63.2%

A=-logT=0.199

3.紫外-可见分光光度计的类型

(1) 可见分光光度计

722型分光光度计

3.紫外-可见分光光度计的类型

(2) 紫外-可见分光光度计

单光束分光光度计

双光束分光光度计

双波长分光光度计

第四节

分析条件的选择

1.仪器测量条件的选择

（1）应选择最大吸收波长作为入射光。

（2）应控制吸光度读数范围：吸光度在0.2~0.7；

透光率在20%~65%。

2.显色反应条件的选择

在光度分析法中将被测组份转变为有色化合物的反应称为显色反应。

$$X + R \rightleftharpoons XR$$

被测物　显色剂　显色反应

(1) 显色剂和显色反应的要求

①被测物质与所生成的有色物质之间必须有确定的定量关系。

②反应产物必须有足够的稳定性。

③显色剂在测定波长处无明显吸收。

④反应产物的摩尔吸收系数足够大(10^4)，以保证灵敏度。

⑤显色反应须有较好的选择性，才能减免干扰因素。

2.显色反应条件的选择

(2) 显色反应的条件

①显色剂的用量：显色剂的用量是通过实验从*A*-*V*曲线来确定。

②酸度：显色反应最适宜的pH范围(酸度) 是通过实验由*A*-pH关系曲线来确定的。

③显色时间：显色时间是通过实验从*A* - *t*曲线来确定的。

④温度：显色反应适宜的温度仍可通过实验方法从*A*-*T*曲线确定适宜温度。

3.参比溶液的选择

(1) 溶剂参比溶液

(2) 试样参比溶液

(3) 试剂参比溶液

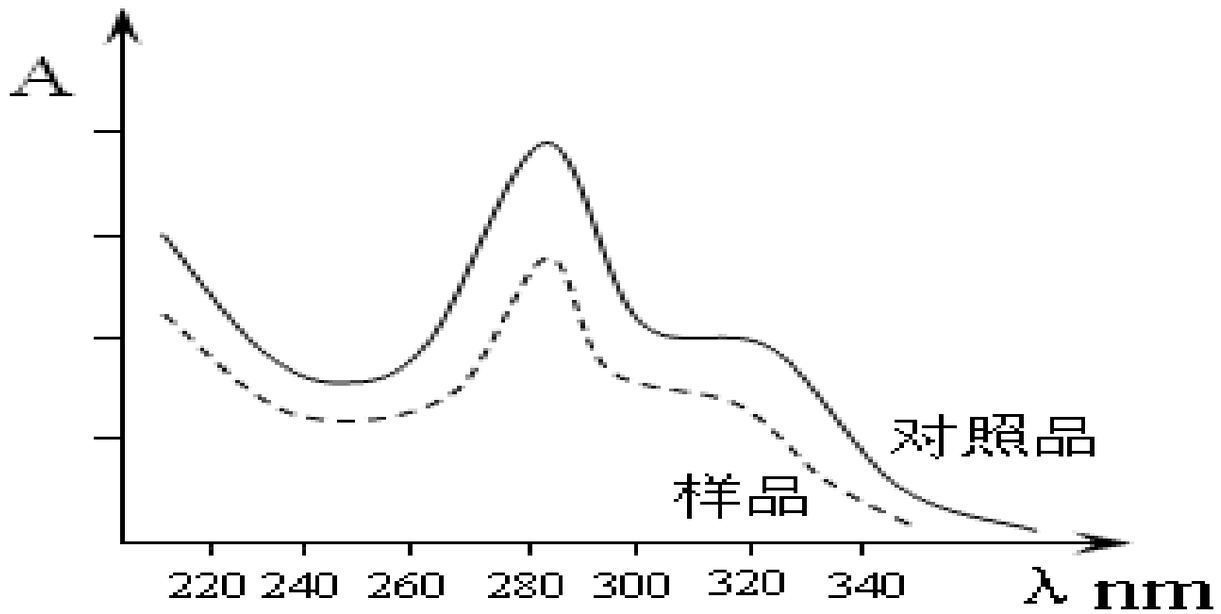
(4) 平行操作参比溶液

第五节

定性定量分析方法

1.定性分析方法

（1）比较光谱的一致性：在相同的条件下，分别测定未知物和标准品的吸收光谱曲线，对比两者是否一致。如果这两个吸收光谱曲线的形状和光谱特征完全一致，诸如吸收曲线的形状、肩峰、吸收峰的数目、峰位和强度（吸光系数）等，则可以初步认为两者是同一化合物。值得强调的是，只有在用其他光谱方法进一步证实后，才能得出较为肯定的定性结论。



丹参注射液的紫外光谱

1.定性分析方法

（2）对比吸收光谱的特征数据：在不同化合物的吸收光谱中，最大吸收波长λ_{max}可以相同，但因摩尔质量不同，它们的吸光系数有明显差异，因此在比较的同时，再比较ε_{max} 或$E^{1\%}_{max}$ 则可加以区分。

例如甲基麻黄碱和去甲基麻黄碱的λ_{max}均为251、257和264nm，但可从两者的摩尔吸光系数加以区别。

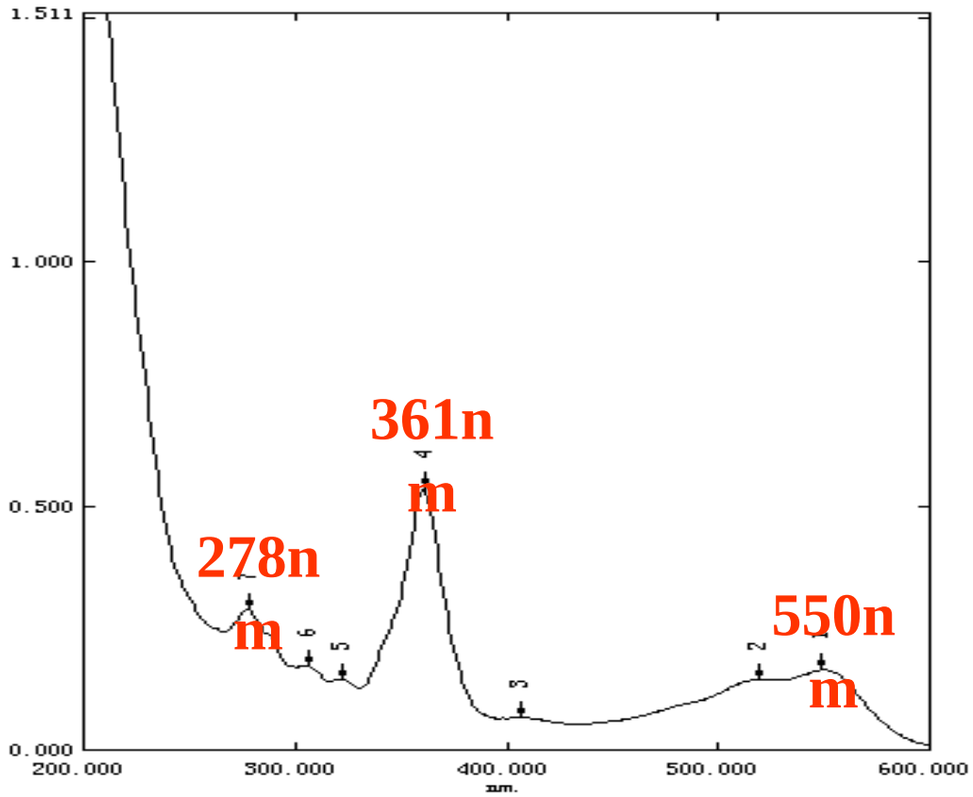
甲基麻黄碱　　251nm（lgε 2.20）、257nm（lgε 2.27）和264nm（lgε 2.19）

去甲基麻黄碱　　251nm（lgε 2.11）、257nm（lgε 2.11）和264nm（lgε 2.20）

1.定性分析方法

（3）对比吸光度(或吸光系数)的比值：不同的最大吸收波长处的吸光度（与标准品在相同条件下测定）的比值是用于鉴别化合物的特性。

如维生素B_{12}的吸收光谱有3个吸收峰，分别为**278、361和550nm。**《中国药典》(2015版)规定，作为鉴别的依据，**361与278nm的吸光度比值应为1.70～1.88，361与550nm的吸光度比值应为3.15～3.45。**



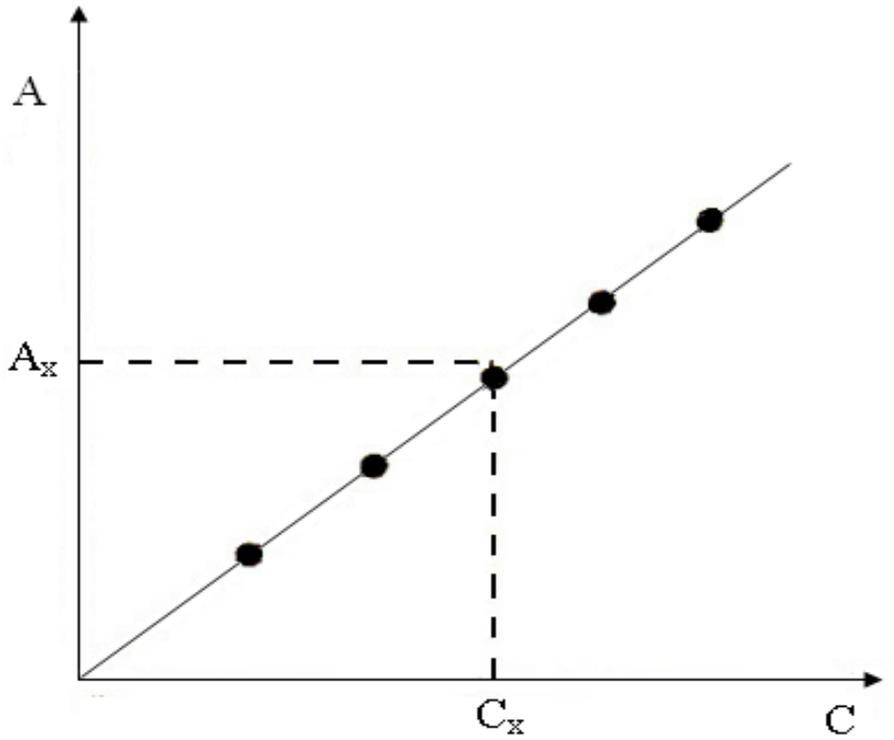
2.杂质检查

紫外-可见分光光度法在药品杂质检查方面也有较为广泛的应用。进行纯度检查时，将待检药品光谱与药品标准光谱相对照，如果杂质在药品无吸收的光区有吸收，或待检药品的吸收峰在药品标准光谱杂质的吸收峰处有变化，则杂质很容易被检查出来（杂质检查）。利用杂质的特征吸收，可以很灵敏地检测出微量杂质(10^{-5}g)的存在或控制主成分的纯度（杂质限量检查）。

3.定量分析方法

（1）单组分溶液的定量方法

①标准曲线法：配制一系列不同浓度的标准溶液，选择合适的参比溶液，在相同条件下，以待测组分的最大吸收波长λ_{max}作为入射光，分别测定各标准溶液对应的吸光度。以浓度c为横坐标、吸光度A为纵坐标描绘曲线，称为标准曲线，也叫工作曲线。按照相同的实验条件和操作程序，用待测溶液配制未知试样溶液并测定其吸光度$A_{样}$，在标准曲线上找到与之对应的未知试样溶液的浓度$c_{样}$。



3.定量分析方法

②标准对比法：在相同的条件下，配制浓度为c_s的标准溶液和浓度为c_x的试样溶液，在最大吸收波长处，分别测定两者的吸光度值为A_s和A_x，依据朗伯-比尔定律得：

$$A_S = \varepsilon c_S L \qquad A_X = \varepsilon c_X L$$

标准溶液与试样溶液中的吸光性物质是同一化合物，在相同的条件下，液层厚度L和摩尔吸光系数的数值相等，由上式得：

$$\frac{A_S}{A_X} = \frac{c_S}{c_X} \qquad c_X = \frac{A_X c_S}{A_S}$$

3.定量分析方法

当测定待测试样中某组分的含量时，可同时配制相同浓度的待测试样溶液$\rho_{样}$和标准品溶液$\rho_{标}$，即$\rho_{样}=\rho_{标}$，在最大吸收波长处分别测定两者的吸光度$A_{样}$和$A_{标}$，设$\rho_{纯}$为待测试样溶液中某组分的浓度，则：

$$\rho_{纯}=\frac{A_{样}}{A_{标}}\times\rho_{标}$$

标准溶液与试样溶液中的吸光性物质是同一化合物，在相同的条件下，液层厚度L和摩尔吸光系数的数值相等，由上式得：

$$\omega=\frac{\rho_{纯}}{\rho_{样}}=\frac{\rho_{标}\dfrac{A_{样}}{A_{标}}}{\rho_{样}}=\frac{A_{样}}{A_{标}}$$

3.定量分析方法

例 分别取$KMnO_4$试样与标准品$KMnO_4$各0.1000g，分别用1000ml量瓶定容。各取10.0ml稀释至50.00ml，在λ_{max}=525nm时，测得$A_{样}=0.220$、$A_{标}=0.260$，求试样中纯$KMnO_4$的含量。

解：已知$\rho_{样}=\rho_{标}=0.1000\times\frac{10.00}{50.00}=0.02000\ g/L$

$A_{样}=0.220$，$A_{标}=0.260$

求：$\omega=?$

$$\omega=\frac{\rho_{纯}}{\rho_{样}}=\frac{\rho_{标}\dfrac{A_{样}}{A_{标}}}{\rho_{样}}=\frac{A_{样}}{A_{标}}=\frac{A_X}{A_S}=\frac{0.220}{0.260}=0.8462$$

3.定量分析方法

③吸光系数法：利用朗伯-比尔定律的数学表达式$A = KcL$进行计算的定量分析方法。在手册中查出待测物质在最大吸收波长处的吸光系数或，并在相同条件下测量试样溶液的吸光度A，则其浓度为：

$$c = \frac{A}{\varepsilon L} \qquad \text{或} \qquad \rho = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%} L}$$

有时也可以将待测试样溶液的吸光度换算成试样组分的吸光系数，计算与标准品的吸光系数的比值，求出试样中待测组分的质量分数。

$$\omega = \frac{\varepsilon_{样}}{\varepsilon_{标}} \qquad \text{或} \qquad \omega = \frac{E_{1\text{cm}样}^{1\%}}{E_{1\text{cm}标}^{1\%}}$$

3.定量分析方法

例 维生素B_{12}水溶液在λ_{max}=361nm处的百分吸光系数$E_{1cm}^{1\%}=207$。取维生素B_{12}试样30.0mg，加纯化水溶解，用1L量瓶定容。将溶液盛于1cm的吸收池，测得361nm波长处的吸光度A=0.600，试求试样中维生素B_{12}的质量分数。

解：已知标准品的$E_{1cm}^{1\%}=207$，试样的$\rho=\dfrac{30.0\times10^{-3}}{1000}\times100\%=0.00300\%$，$A$=0.600

求：ω=？

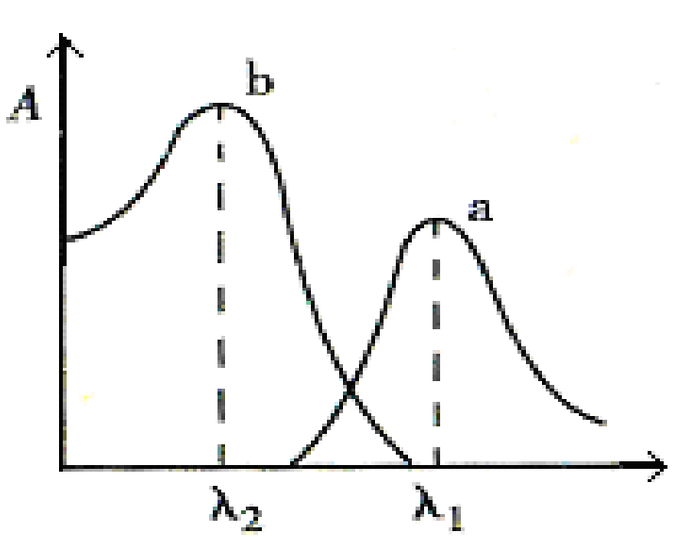
根据光的吸收定律，换算得试样的百分吸光系数为：

$$E_{1cm}^{1\%}=\frac{A}{\rho L}=\frac{0.600}{0.00300\times1.00}=200 \qquad \omega=\frac{E_{1cm样}^{1\%}}{E_{1cm标}^{1\%}}=\frac{200}{207}=0.966$$

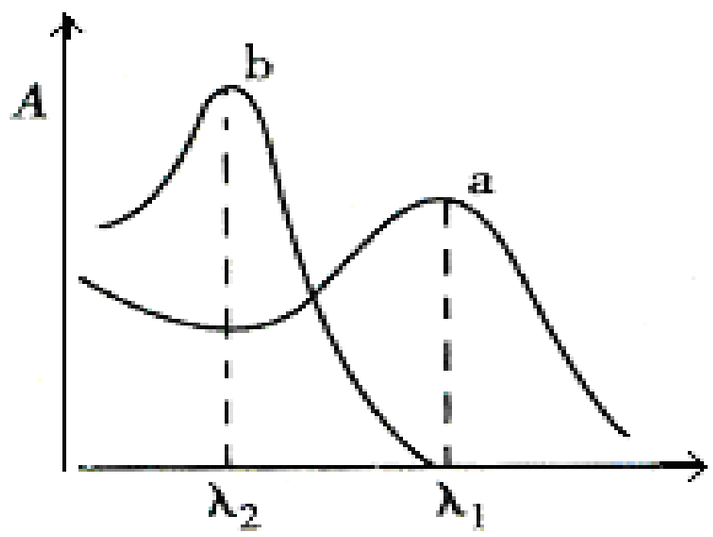
3.定量分析方法

（2）二元单组分溶液的定量方法

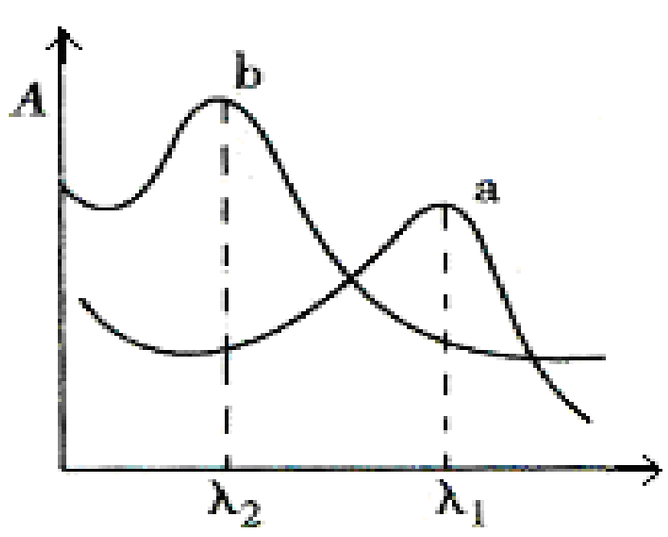
①解联立方程组法：当试样溶液中的各待测组分相互干扰不太严重时，可根据吸光度具有加和性的特点，在同一试样溶液中同时测定两个或两个以上的待测组分。假设要测定试样中有两个待测组分a和b，如果分别绘制a、b两个纯物质的吸收光谱，则有3种情况。



（Ⅰ）



（Ⅱ）



（Ⅲ）

3.定量分析方法

（I）表明，两个待测组分在各自的最大吸收波长处，另一组分没有吸收，可以用测定单组分溶液的方法，分别在λ_1和λ_2波长处测定组分a、b的吸收度, 由光的吸收定律求得c_a、c_b。测定时两组分互不干扰。

（II）表明，在组分a的最大吸收波长λ_1处，组分b对组分a的测定无干扰，而在组分b的最大吸收波长λ_2处，组分a对组分b的测定有干扰。这时，先在λ_1波长处单独测量组分a，然后在λ_2波长处测量组分a、b的总吸光度，根据吸光度的加和性，从而可以求出c_b。

（III）表明，两个待测组分彼此相互干扰，此时，在波长λ_1和λ_2处分别测定试样溶液的总吸光度A_1^{a+b} 及A_2^{a+b}，同时测定a、b纯物质的吸光系数ε_1^a、ε_1^b和ε_2^a、ε_2^b，根据吸光度的加和性，则由联立方程组求得c_a、c_b。

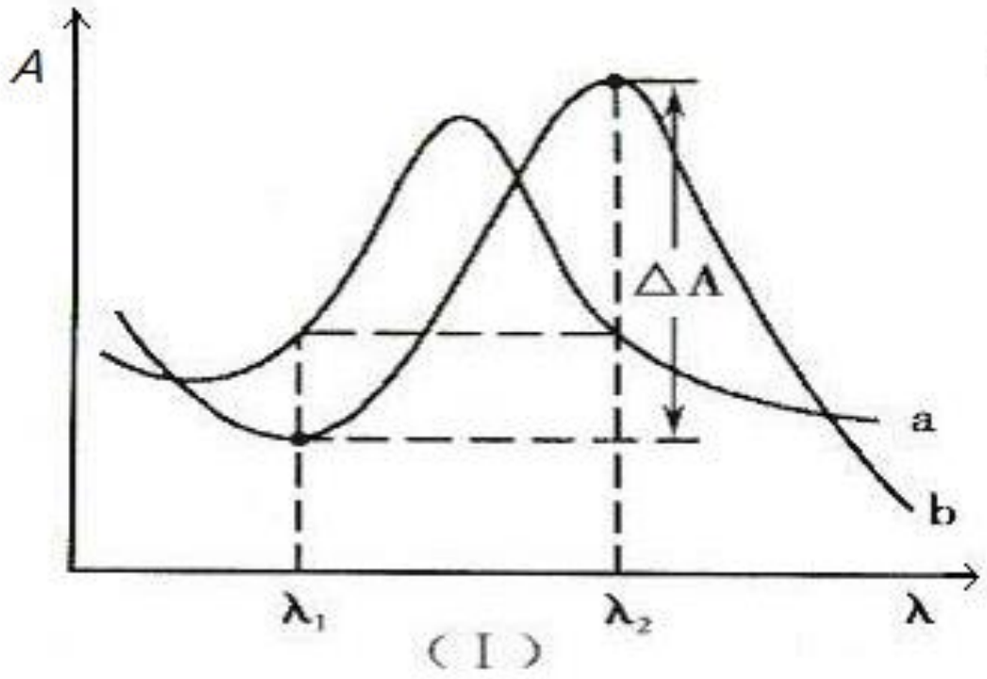
3.定量分析方法

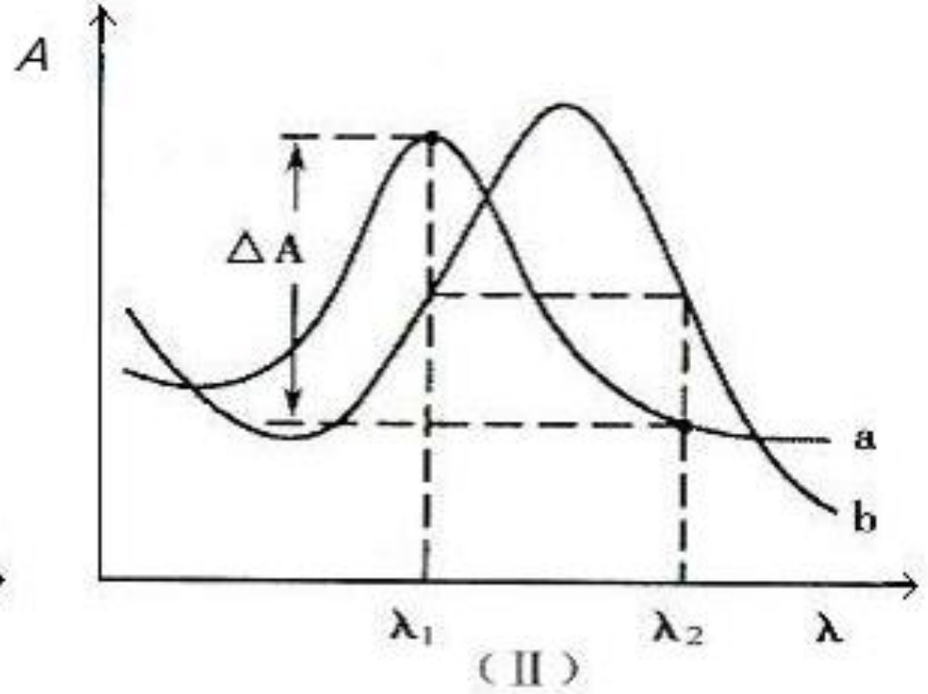
②等吸收波长消去法（双波长分光光度法）：当试样中两个待测组分的相互干扰比较严重时，用解联立方程组的方法进行定量分析会产生较大的误差，这时可以用等吸收波长消去法进行测定。

在试样中含有两个待测组分a和b时，若要测定组分b，组分a有干扰，应设法消除组分a的吸收干扰。首先选择待测组分b的最大吸收波长λ_2作为测量波长，然后用作图的方法选择参比波长λ_1，使组分a在这两个波长处的吸光度相等。

3.定量分析方法

②等吸收波长消去法（双波长分光光度法）：试样溶液在λ_2和λ_1两个波长处的吸光度差，只与待测组分b（a）的浓度成正比，而与干扰组分的浓度无关。





3.定量分析方法

③差示分光光度法：当待测组分含量过高时，吸光度超出了准确测量的读数范围，可以采用差示分光光度法。具体方法是用一个比试样溶液浓度稍低的标准溶液作为参比溶液，将分光光度计调零（透光率为100%），测得的吸光度就是被测试样溶液试液与参比溶液的吸光度差值（相对吸光度）。

根据光的吸收定律得：$\triangle A = A_x - A_s = EL(c_x - c_s)$

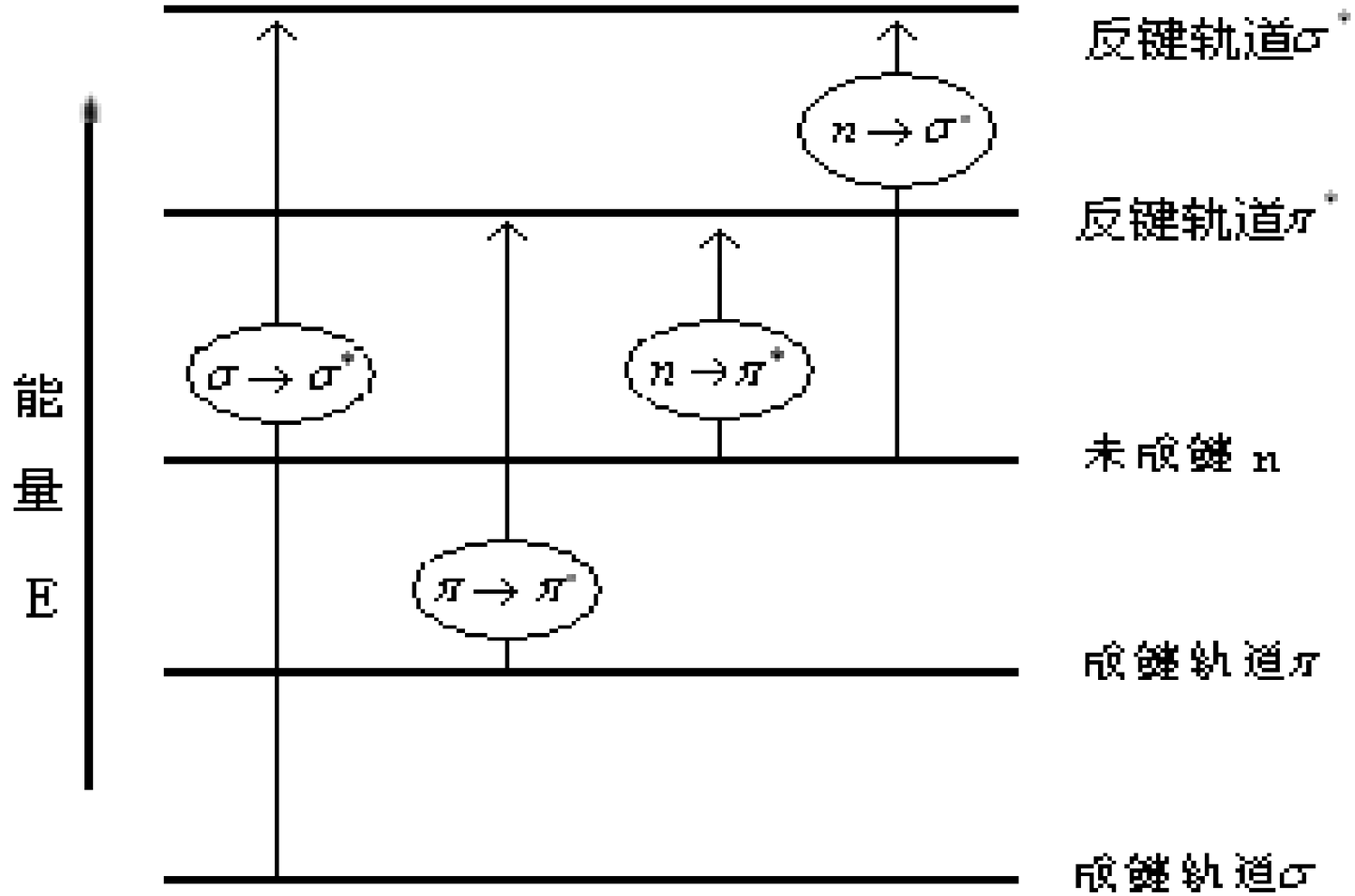
即待测溶液与参比溶液的吸光度差值与两个溶液的浓度之差成正比。

第六节

紫外-可见吸收光谱在有机化合物结构分析中的应用简介

1.有机化合物的紫外-可见吸收光谱

有机化合物的紫外-可见吸收光谱主要是由分子中价电子的能级跃迁而产生的。 电子的能级跃迁有4个基本类型。

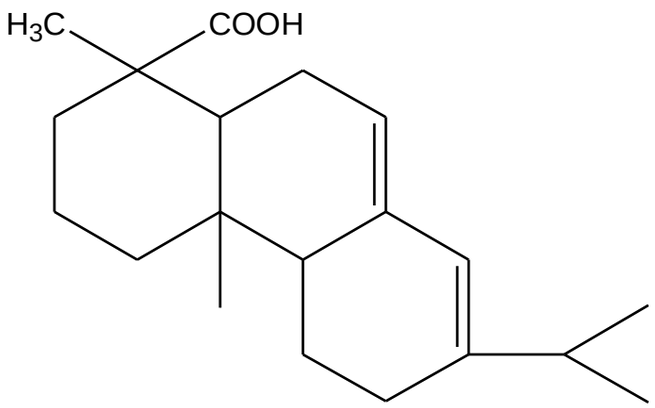


2.根据紫外-可见吸收光谱推断官能团

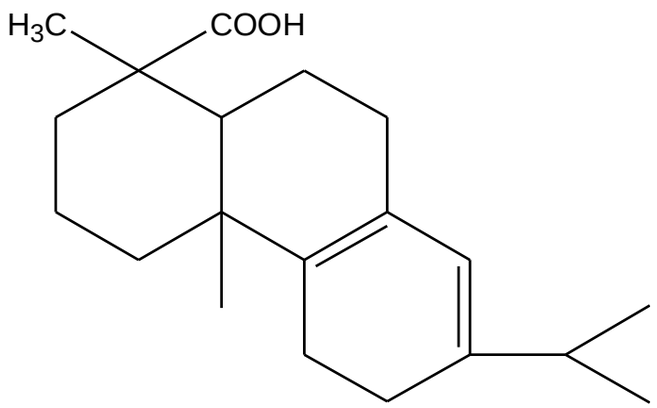
待测化合物如果在220～800nm波长范围内无吸收[ε < 1L/(mol·cm)]，它可能是脂肪族饱和碳氢化合物、胺、氰醇、羧酸、氯代烃和氟代烃等，不含直链或环状共轭体系，没有醛、酮等基团；如果在210～250nm波长范围内有强吸收带，它可能含有2个共轭单位；如果在260～300nm波长范围内有强吸收带，它可能含有3～5个共轭单位；如果在250～300nm波长范围内有弱吸收带，它可能有羰基存在；如果在250～300nm波长范围内有中等强度吸收带，并且含有振动结构，表明有苯环存在；如果化合物有颜色，则分子中含有的共轭基团一般在5个以上。

2.根据紫外-可见吸收光谱推断官能团

（1）结构异构体的推断：许多结构异构体之间可利用其双键的位置不同，应用紫外吸收光谱推断异构体的结构。如松香酸（I）和左旋松香酸（II）的λ_{max}分别为238和273nm，相应的ε_{max}值分别为15 100和7100L/（mol·cm）。这是因为I型没有立体障碍，而II型有一定的立体障碍，因此I型的ε_{max}比II型的ε_{max}大得多。



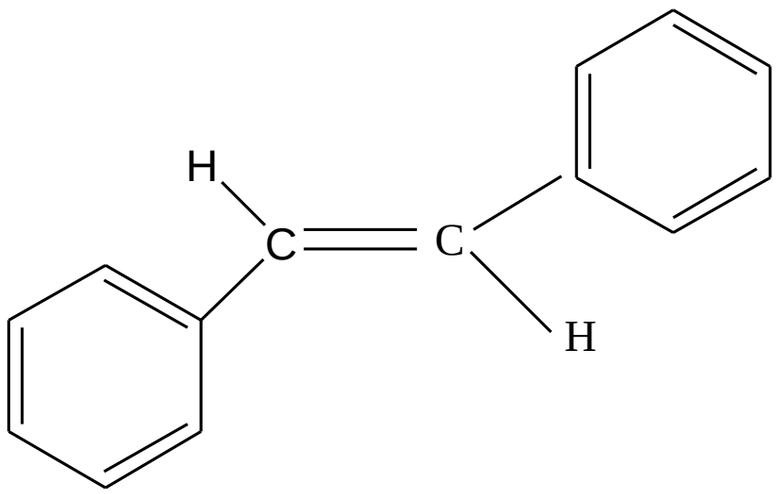
（Ⅰ）



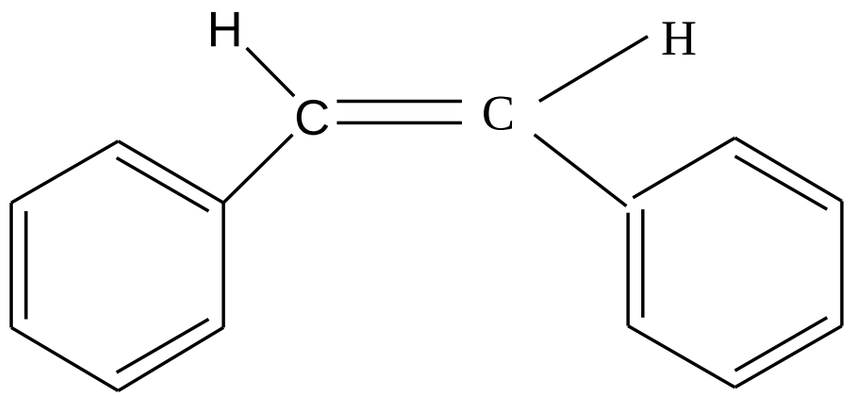
（Ⅱ）

2.根据紫外-可见吸收光谱推断官能团

（2）顺反异构体的推断：反式异构体因为空间位阻小、共轭程度高，所以其最大吸收波长λ_{max}和摩尔吸收系数ε_{max}都大于顺式异构体。如1,2-二苯乙烯的反式异构体的光谱特征为λ_{max} = 295.5nm，ε_{max} = 29 000L/（mol cm）；1,2-二苯乙烯的顺式异构体的光谱特征为λ_{max} = 280nm，ε_{max} = 10 500L/（mol cm）。



反式1,2-二苯乙烯



顺式1,2-二苯乙烯

2.根据紫外-可见吸收光谱推断官能团

（3）互变异构体的推断：分子中存在共轭体系时，其λ_{max}、ε_{max}一般要大于非共轭体系异构体的光谱特征。例如乙酰乙酸乙酯有酮式和烯醇式两个互变异构体，酮式结构没有共轭双键，其光谱特征为：λ_{max}=204nm，ε_{max}=16L/(mol cm)，属于弱吸收，说明该吸收是由$n\rightarrow\pi^*$跃迁引起的；烯醇式异构体有共轭双键，其光谱特征为λ_{max}=245nm，ε_{max}=1.8×10^{4}L/(mol cm)，说明在分子中有共轭双键，甚至形成了分子内氢键。

小结

紫外-可见分光光度法

光谱分析法概述 → 光的本质是电磁波；物质对光的吸收具有选择性
紫外-可见分光光度法是吸收光谱分析法的一种
紫外—可见分光光法具有灵敏度高等特点

基本原理 → 吸收定律即溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度成正比

仪器主要部件
- 光源
- 单色器： 棱镜或光栅
- 吸收池： 玻璃或石英吸收池
- 检测器： 光电池、 光电管、 光电倍增管及二极管阵列检测器
- 信号显示系统

主要应用 → 定性鉴别、杂质检查和含量测定

药品

第九章　紫外-可见分光光度法

THANKS

谢谢观看