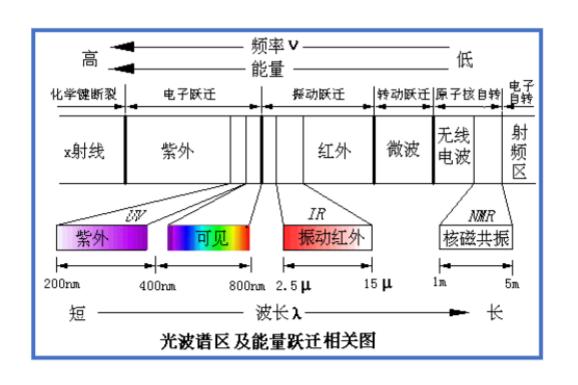
第三章 紫外-可见分子 吸收光谱分析

李哲 博士、副教授

药学院332

lizhe5@mail.sysu.edu.cn

紫外可见吸收光谱的基本原理



 $\Delta Er 0.005 \sim 0.050 eV$

远红外光谱或分子转动光谱

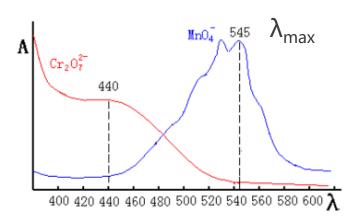
 $\Delta Ev 0.05 \sim 1 eV$

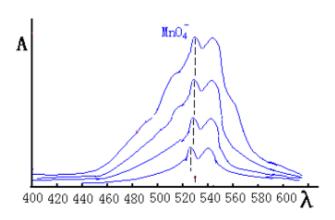
红外光谱或分子振动光谱

ΔEe 1~20eV

紫外可见光谱或分子的电子光谱

吸收光谱与最大吸收波长





- 不同物质吸收光谱、最大吸收波长不同
- 同种物质,浓度不同,吸收值不同

吸收曲线:表明吸光物质溶液对不同波长的光的吸收能力不同的曲线叫吸收曲线,也叫吸收光谱。

- 什么因素导致了不同物质吸收光谱不同?
- 由"浓度不同,吸收值不同"这一事实,可以想到哪些应用?

吸收光谱与最大吸收波长

• 吸收光谱的波长分布是由产生谱带的跃迁能级间的能量差所决定, 反映了分子内部能级分布状况, 是物质定性的依据;

同一种物质对不同波长光的吸光度不同。吸光度最大处对应的波长称为最大吸收波长λ_{max};

吸收光谱与最大吸收波长

• 不同浓度的同一种物质,其吸收曲线形状相似 λ_{max} 不变。而对于不同物质,它们的吸收曲线形状和 λ_{max} 则不同;

• 吸收谱带的强度与该物质分子吸收的光子数成正比,定量分析的依据。

什么是紫外可见吸收光谱法

1. 定义

利用物质分子对紫外与可见光的吸收所产生的吸收光谱对物质的组成、含量和结构进行分析、测定和推断的分析方法。

2. 分类

紫外吸收光谱法和可见吸收光谱法

- (1) 紫外吸收光谱法: 吸收光波长范围200~400 nm, 可用于结构鉴定和定量分析;
- (2) 可见吸收光谱法: 吸收光波长范围400~780 nm, 主要用于有色物质的定量分析。

问题

为什么产生紫外-可见吸收光谱?

定性和定量测量光谱的依据

怎样应用光谱?

3.1 分子轨道理论与有机分子的电子跃迁

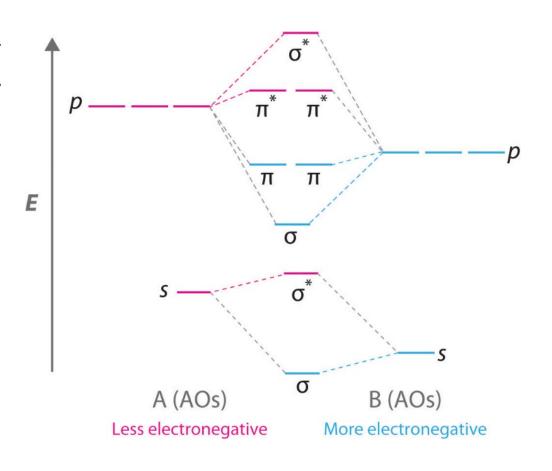
紫外或可见吸收光谱 是由于分子中价电子 的跃迁而产生的

分子轨道理论

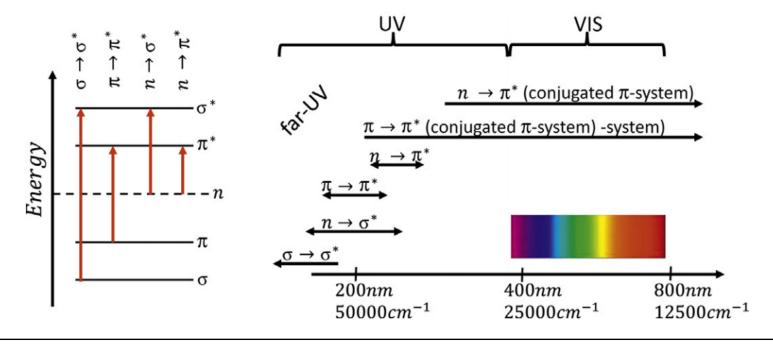
成键轨道:σ、π

非键轨道: n

反键轨道: σ*、π*



电子跃迁类型



有机化合物				
$\sigma{ ightarrow}\sigma^{\star}$	$n{ ightarrow}\sigma^*$	$\pi{ ightarrow}\pi^*$	$n \rightarrow \pi^*$	
饱和烷烃	含 杂原子 饱和烷 烃	不饱和烃类	含有 杂原子 的不 饱和烃类	
甲烷、乙烷	O, S, N, X	烯烃、苯环		
< 150 nm 溶剂	光吸收能力小	光吸收能力强	波长长,光吸收 弱	

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁(饱和烃类)

饱和烃类	λ_{max} (nm)
甲烷	125
乙烷	135
丙烷	135
己烷	210

跃迁所需能量最大,相应的吸收波长最短,在远紫外区 (真空紫外区)

n→σ* 跃迁(含杂原子)

化合物	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	3	化合物	$\lambda_{max}/$ nm	3
H_2O	167	1480	CH ₃ OCH ₃	184	2520
CH ₃ OH	183	150	CH ₃ NH ₂	215	600
CH ₃ Cl	173	200	$(CH_3)_2NH$	220	100
CH ₃ Br	204	200	$(CH_3)_3N$	227	900
CH ₃ I	258	365			

跃迁所需能量较大,相应的吸收波长较短,在200 nm附近

$n \rightarrow \pi^*$ 跃迁(杂原子与其他 π 键共轭)

化合物	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	3	备注
CH ₃ COOH	204	41	在乙醇中
CH ₃ CONH ₂	214	60	在H ₂ O中
$CH_3N = NCH_3$	339	5	在乙醇中
$CH_3 - NO_2$	280	22	在异辛烷中
	186	1000(n→σ*)	
CH ₃ COCH ₃	280	16 $(n \rightarrow \pi^*)$	
饱和醛酮	280 ~ 300		

跃迁所需能量最低,相应的吸收波长在近紫外或可见光区,强度较低

$\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁(不饱和烃类)

化合物	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	3
乙烯	175	14000
乙炔	173	6000

跃迁所需能量低,相应的吸收波长在近紫外区,吸收强度大

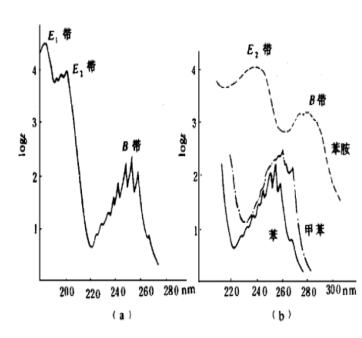
有机化合物的紫外可见吸收光谱

R吸收带	K吸收带	B吸收带	E吸收带
杂原子	共轭非封闭体	闭合环状共轭	芳香化合物
$n \rightarrow \pi^*$	系	π→π*与振动重	$\pi{\longrightarrow}\pi$ *
	$\pi{ o}\pi^*$		
250~400 nm	>200 nm		E ₁ 180nm
			E ₂ 200 nm
<100	>10000		>10000
L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹			7000

芳香烃及其杂环化合物

苯及衍生物

- * E_1 带180~184nm ε=47000 , E_2 带200~204 nm ε=7000 苯环上三个共扼双键的 $\pi \to \pi^*$ 跃迁特征吸收带 ;
- ◆B带230-270nm ε=200
 π → π*与苯环振动引起;
- ❖含取代基时, B带简化, 红移。



相关概念

生色团: 使化合物产生颜色 (含 π电子)

 生色团
 -N=N -N=O- (亚 = C=S- (硫 - C=O- (羰 (偶氮基))

 (偶氮基)
 硝基)
 羰基)
 基)

助色团: 使发色基团吸收带移向长波长区和吸收增强 (含n电子)

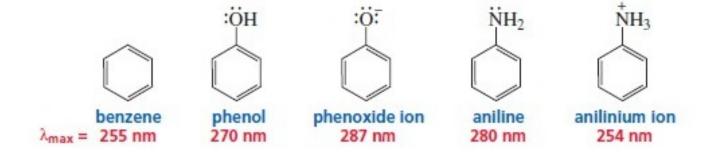
助色团 —NH -OH -F -C1

相关概念

红移和蓝移:

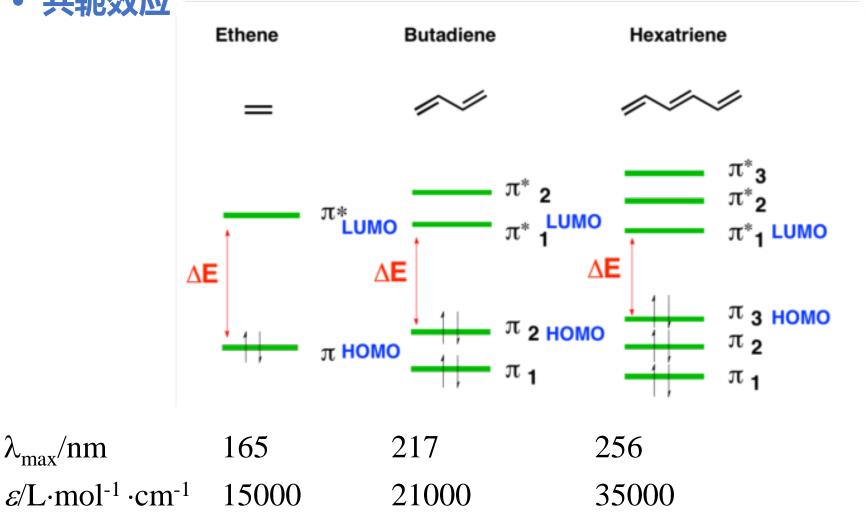
吸收峰位置向长波方向的移动,叫红移





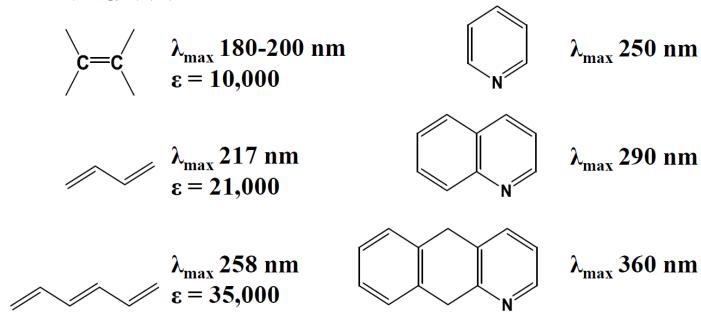
3.4 影响紫外-可见分子吸收光谱的因素

• 共轭效应



3.4 影响紫外-可见分子吸收光谱的因素

• 共轭效应



紫外光谱的研究对象大多是具有共轭双键结构的分子。

3.4 影响紫外-可见分子吸收光谱的因素

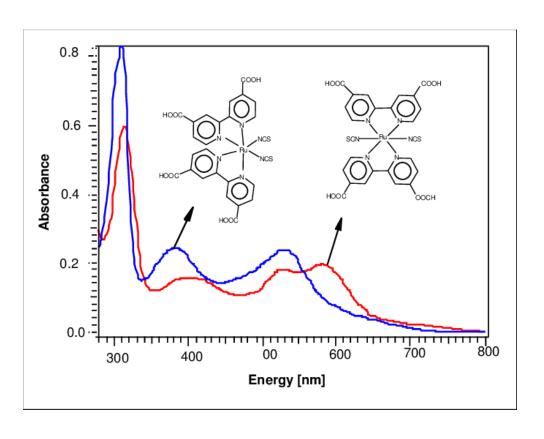
• 共轭效应

共轭分子的吸收峰

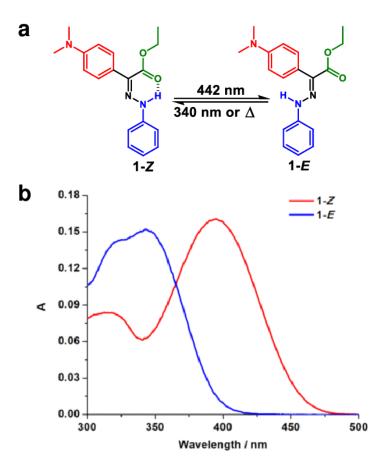
4. A III	11. A 11.	π→π*		n→π*	
生色团	化合物	λmax	εmax	λmax	εmax
C=C—C=C	H ₂ C=CH—CH=CH ₂	217	21000	_	_
C=C-C=O	CH₃—CH= CH—CHO	218	18 000	320	30
C=C—C=O	C ₃ H ₇ —C—C≡CH O	214	4 500	308	20
C=C—C=C—C=C	H ₂ C=CH—CH=CH—CH=CH ₂	258	35 000	_	_
C=C—C=C—C=C	H ₂ C=CH—C=C—CH=CH CH ₃ —СН ОН	257	17 000	-	_
$(C=C-C=C)_2$	二甲基辛四烯	296(淡黄)	52 000	_	_
$(C=C-C=C)_2$ $(C=C-C=C)_3$	二甲基十二碳六烯	360(黄色)	70 000	_	_
(C=C—C=C) ₄	α—羟基—β—胡梦卜素	415 (橙色)	210 000	_	-

影响因素

• 空间位阻



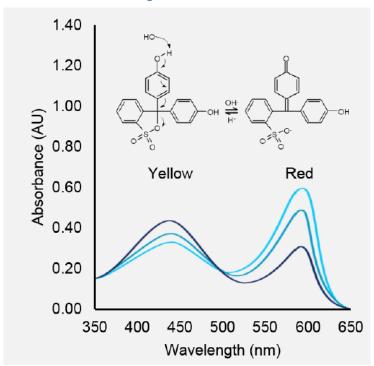
• 异构现象



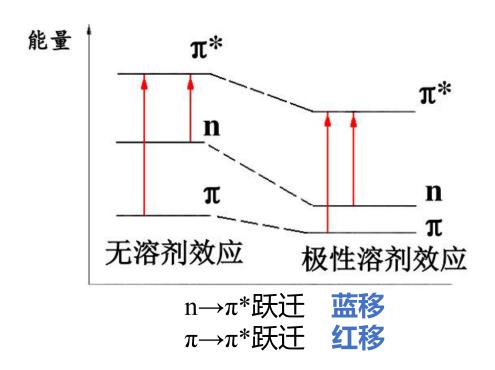
影响共轭效应

影响因素

pH的影响



溶剂的影响



溶剂极性对异丙叉丙酮的 $\pi \to \pi^*$ 和 $n \to \pi^*$ 跃迁谱带的影响

跃迁类型	λ _{max} (正己烷)	λ _{max} (氯仿)	λ _{max} (甲醇)	$\lambda_{\text{max}}(7K)$
$\pi \rightarrow \pi^*$	230	238	237	243
n→π*	329	315	309	305

溶剂对光谱精细结构的影响

溶剂极性增加



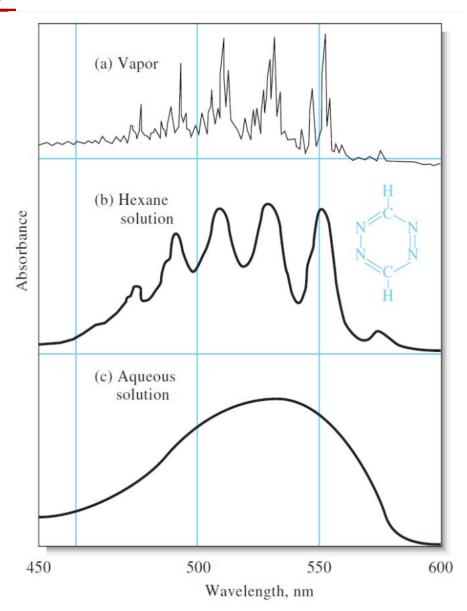
溶剂与溶质之相互作用增强



溶质分子的振动受到限制



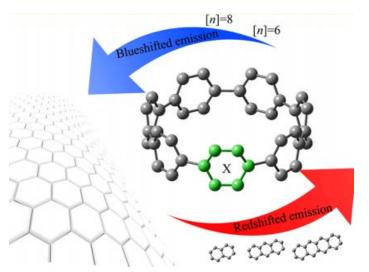
振动引起的精细结构消失

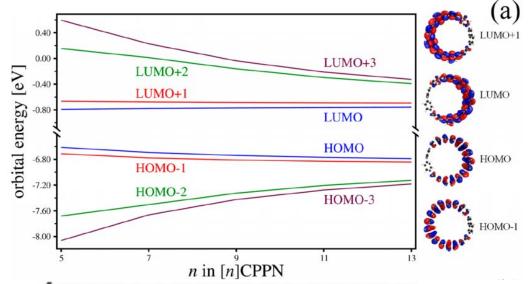


研究前沿案例分析: 手性碳纳米环的紫外吸收特性

红移和蓝移:

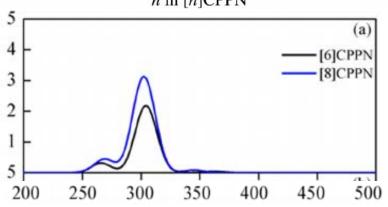
本质: HOMO与LUMO能级差增大, 跃迁需要吸收更多能量(波长更短的光子), 发生蓝移。反之发生红移。





n增加, LUMO与HOMO能极差增大, 紫外吸收蓝移

量子力学计算: CAM-B3LYP/def-SV(P)

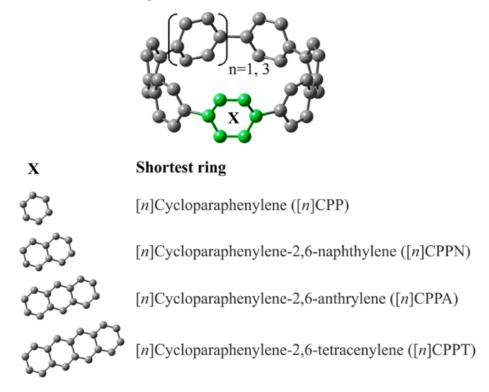


J. Phys. Chem. A 2018, 122, 37, 7284-7292

课外思考

对文章中所提到的其他类似物的紫外吸收性质进行解释

Scheme 1. Shortest Sidewall Segments of Achiral and Chiral Carbon Nanorings



J. Phys. Chem. A 2018, 122, 37, 7284-7292

学习重点

- 有机化合物电子跃迁类型
- 生色团、助色团、蓝移、红移
- 影响紫外-可见分子吸收光谱的因素

问题

为什么产生紫外-可见吸收光谱?

定性和定量测量光谱的依据

怎样应用光谱?

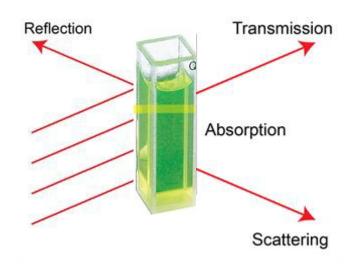
3.5 光吸收定律---朗伯-比尔定律

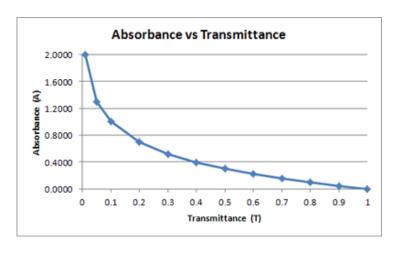
$$I_0 = I_a + I_t + I_r + I_s$$

简化为: $I_0 = I_a + I_t$

透光度: $T = I_t/I_0$ $(0 \le T \le 1)$

吸光度: $A = -lg\frac{l_t}{l_0} = Ig\frac{1}{T}$ $(0 \le A < \infty)$





吸光系数

摩尔吸光系数

 $A = \varepsilon bc$

 $\varepsilon = 0.87 \times 10^{20} Pa$

b:cm 样品厚度

P为电子跃迁几率

c: L•mol⁻¹浓度

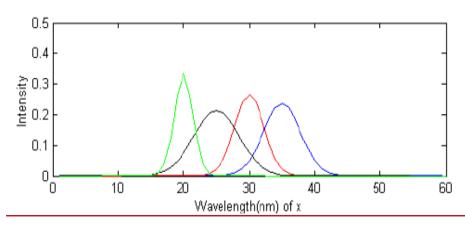
a为分子截面积

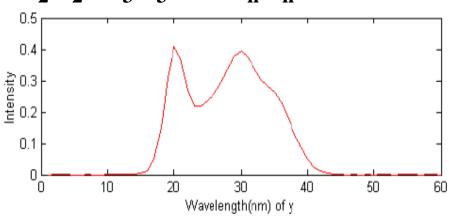
 ε : L • mol⁻¹ • cm⁻¹ 摩尔吸光系数

 ε >10⁴(高) ε <10⁵

• 加和性(单一波长处)

$$A=A_1+A_2+A_3+...+A_n=\varepsilon_1lc_1+\varepsilon_2lc_2+\varepsilon_3lc_3+...\varepsilon_nlc_n$$





桑德尔灵敏度

桑德尔灵敏度

$$S = \frac{M}{\varepsilon}$$

M: 摩尔质量

 $S: \mu g \cdot cm^{-2}$

A=0.001时,单位截面积光程内所能检测的含量。

某一光度分析方法能够达到的最低检测能力时, 采用S 更加方便、直观; 而表示同一物质在不同显色反应时的灵敏度采用 *ε*比较方便。

前提条件

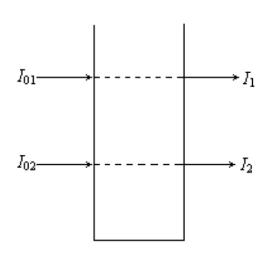
朗伯-比尔定律成立的前提条件:

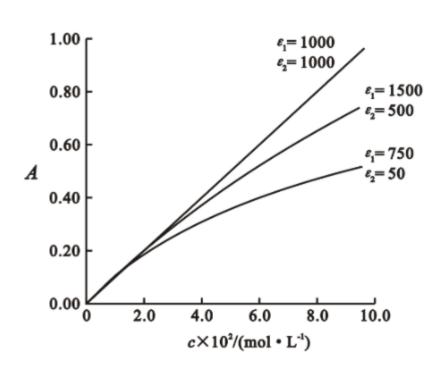
- (1) 入射光为平行单色光且垂直照射(窄波长、垂直)
- (2) 吸光物质为均匀非散射体系(完全溶解)
- (3) 吸光质点之间没有相互作用(稀溶液)
- (4) 光与物质之间的作用只有吸收,无其他光化学现象

3.5 偏离朗-比定律的因素

• 仪器因素

入射光为复合光



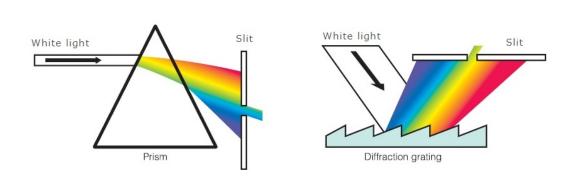


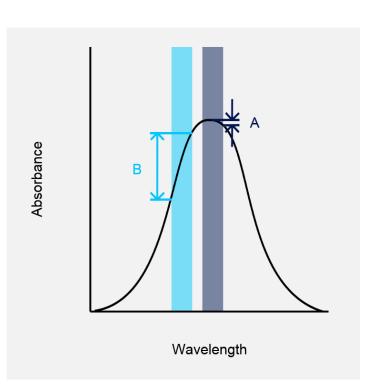
$$\frac{d^{2}A}{dc^{2}} = -\frac{2.30f_{1}f_{2}b^{2}(\varepsilon_{1} - \varepsilon_{2})^{2}10^{-(\varepsilon_{2} + \varepsilon_{1})bc}}{(f_{1}10^{-\varepsilon_{1}bc} + f_{2}10^{-\varepsilon_{2}bc})^{2}}$$

 ε_1 与 ε_2 相差愈大,偏离比尔定律愈严重。

偏离朗一比定律的因素

- 1. 好的单色器
- 2. 波长选择最大吸收处



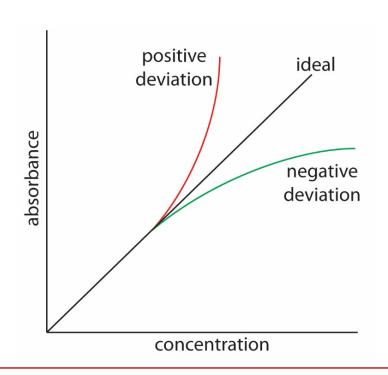


吸收曲线一般比较平滑且较宽,容易达到条件

偏离朗一比定律的因素

- 3. 选择适当的浓度
 - 高浓度改变了质点对光的摩尔吸收系数
 - ✓ 质点间电荷相互作用
 - ✓ 溶液折光指数变化

 $c \le 0.01 \text{mol/L}$



偏离朗一比定律的因素

• 介质不均匀

增加散射



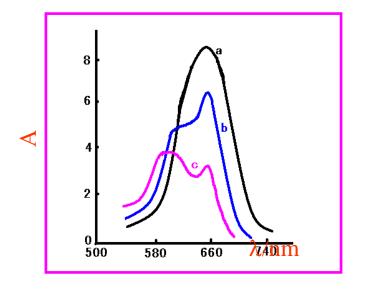
• 溶质和溶剂的性质



偏离朗-比定律的因素

• 溶质变化

- 1.离解
- 2.配位
- 3.缔合和聚焦



未加缓冲剂的重铬酸钾溶液

$$Cr_2O_7^{2-} + H_2O = 2H^+ + 2CrO_4^{2-}$$

(橙色) (黄色)

亚甲蓝阳离子

a. $6.36 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

b. 1.27×10⁻⁴ mol/L

c. $5.97 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

单体 $\lambda_{max} = 660 \text{ nm}$

二聚体 $\lambda_{max} = 610 \text{ nm}$

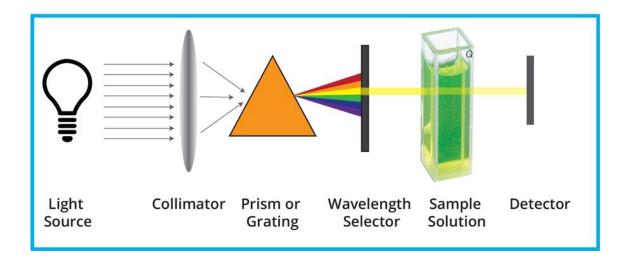
问题

为什么产生紫外-可见吸收光谱?

定性和定量测量光谱的依据

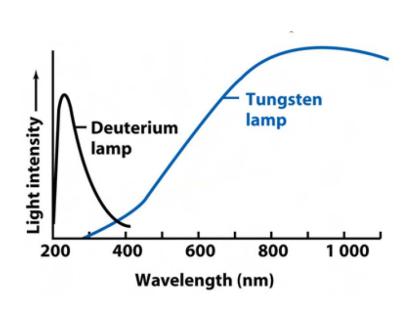
怎样应用光谱?

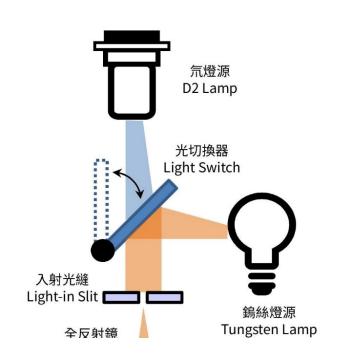
3.6 紫外可见分光光度计



光源

热辐射光源: 钨灯、碘钨灯,可见光源 340~2500 nm 气体放电光源: 氢灯或氘灯,紫外光源 160~375 nm

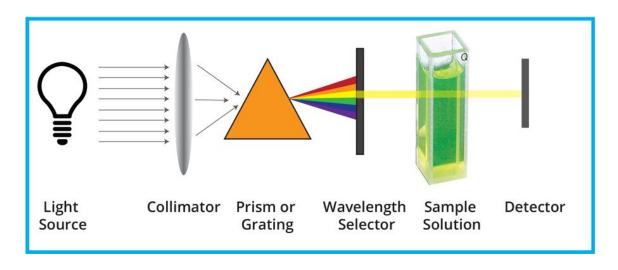




单色器:包括狭缝、准直镜、色散元件

光路系统

单光束系统



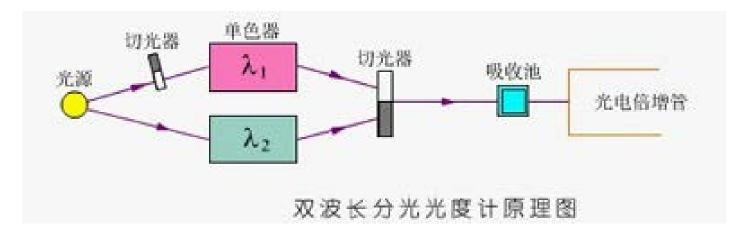
操作繁琐、耗时耗力

光路系统

双光束系统 氘燈源 D2 Lamp 主流仪器系统 光切換器 **Light Switch** 參考比色液槽 光偵測器 全反射鏡 Reference Cuvette Detector Reflector 入射光縫 Light-in Slit 鎢絲燈源 **Tungsten Lamp** 全反射鏡 Reflector 準直鏡 Collimating 樣品比色液槽 光偵測器 射出光縫 Mirror Sample Cuvette Detector Light-out Slit 半反射鏡 濾鏡 Semi-Reflector 光柵 Filter 勢動科技有限公司 ACTTR Technology Grating

光路系统

双波长系统

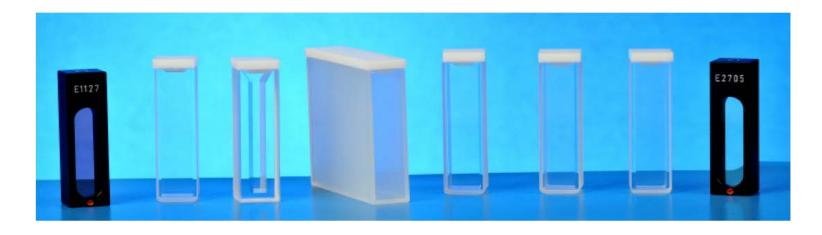


两个单色器; 方便多组分测量分析

$$A_{1} = \varepsilon_{x_{1}}bc_{x} + \varepsilon_{y_{1}}bc_{y}$$

$$A_{2} = \varepsilon_{x_{2}}bc_{x} + \varepsilon_{y_{2}}bc_{y}$$

样品池





3.7 分子吸收光谱的测定

• 试样的制备:完全溶解、极性小、惰性、无吸收

• 仪器的矫正:

吸光度标度校正:采用 K_2CrO_4 标准液校正 (在25°C时,于不同波长处测定含0.0400g/L $K_2Cr_2O_7$ 的0.05 $mol\cdot L^{-1}$ NaOH溶液的吸光度A,调整光度计使其A与标准值对应。)

3.7 分子吸收光谱的测定

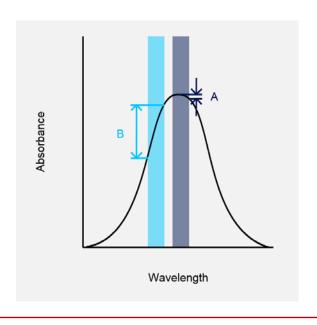
• 测量条件的选择:

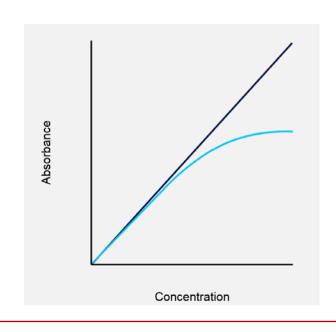
测量波长的选择:最大吸收原则

狭缝宽度:实验确定

窄:分辨率高、其他谱线干扰少;信号弱、噪音增大

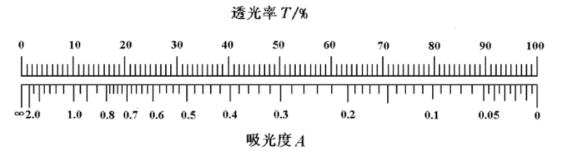
宽: 亮度增加、灵敏度高; 单色性差, 偏离朗伯比尔定律



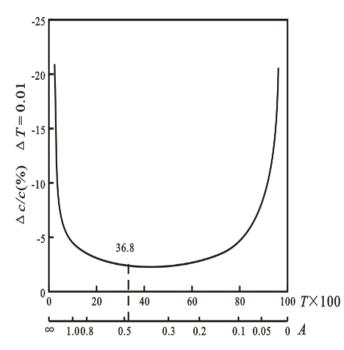


分子吸收光谱的测定

吸光度范围



$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{0.434}{T \lg T} \Delta T$$



A = 0.434, T = 36.8% 时,测量的相对误差最小

A=**0.2~0.8**, T=15~65%,相对误差<4%

参比溶液的选择

• 消除仪器误差(样品池+溶剂)、消除本体颜色

溶剂参比: 试剂和溶剂均无色, **溶剂**为参比

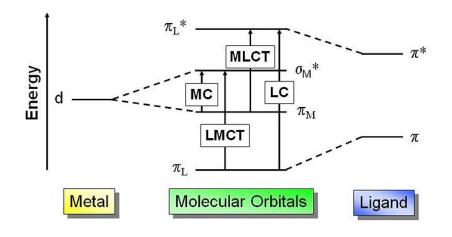
试剂参比: 试剂有颜色,采用**试剂+溶剂**作参比(即不加待测物的空白溶液)

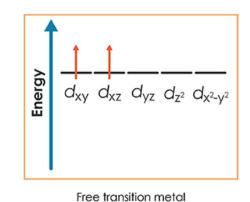
试样参比: 试样有其他有色离子, 但不与显色剂反应时, 可以**试样**作参比(不能加显色剂)

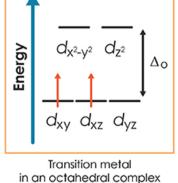
加掩蔽剂: 试样、试剂都有颜色,加掩蔽剂消除试剂的显色反应

紫外-可见光谱法的应用

无机化合物	
电荷转移跃迁	配位场跃迁
金属和配体的氧化还原	d-d、f-f 跃迁
金属配合物	镧系、锕系
摩尔吸光系数大 (>104)	摩尔吸光系数小 (0.1~100)





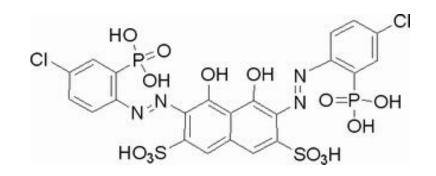


3.8 金属离子的测定

• **显色反应**(试液+显色剂+其他试剂 → 有色溶液) 氧化还原反应、配位反应

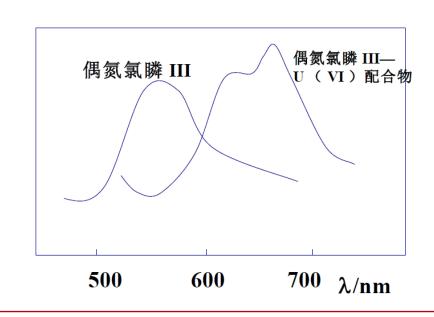
显色剂

偶氮类、三苯甲烷类、双硫腙和氨磺酸类、氧-氧型螯合物、氮-氮型螯合物



偶氮氯膦III

光度法测定铀、锶



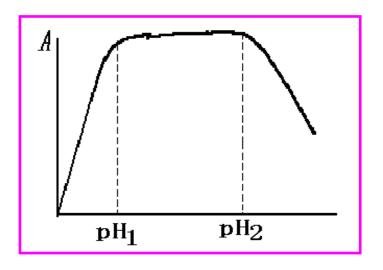
显色反应的选择原则

- ullet选择灵敏度高的反应: 如选择摩尔吸光系数 arepsilon 高的反应
- ◆选择性要好
- ◆显色剂在测定波长处无明显吸收
- 显色剂吸收波长与有色化合物最大吸收波长相差大 ($\Delta\lambda_{max}$ >60 nm)
- ◆显色反应的生成物组成恒定、化学性质稳定

酸度的选择

Fe3+与磺基水杨酸(Sal2-)的反应:

$$pH=1.8 \sim 2.5$$
 $Fe^{3+} + Sal^{2-} = Fe(Sal)^+$ 紫红色 $pH=4 \sim 8$ $Fe^{3+} + 2Sal^{2-} = Fe(Sal)_2^-$ 紫褐色 $pH=8 \sim 11.5$ $Fe^{3+} + 3Sal^{2-} = Fe(Sal)_3^{3+}$ 黄色 $pH>12$ 配合物被破坏,生成 $Fe(OH)_3$ 沉淀

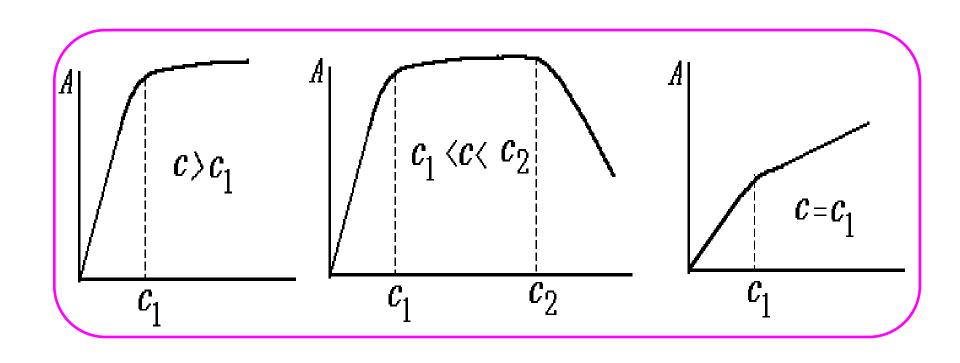


通过实验寻找A较大且较稳定的区域

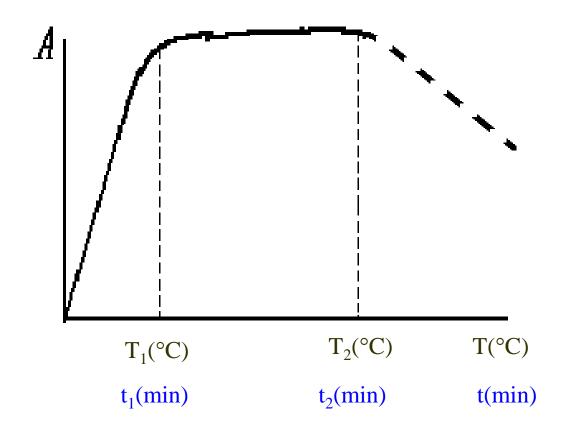
 $pH_1 < pH < pH_2$

显色剂用量

通过实验寻找A较大且较稳定的区域



显色温度及显色时间



通过实验寻找A较大且较稳定的区域

干扰离子的消除方法

对于干扰离子的消除通常采用下述方法。

(1) 加入配位剂掩蔽干扰离子

在Al³+, Zn^2 +两种离子共存的溶液中要单独滴定 Zn^2 +, 可在溶液中加入 NH_4F , F-和Al³+可以生成稳定的Al F_6 ³-配离子, 溶液中Al³+浓度降到很低,因而对EDTA的影响很小, 故可以在pH5~6时用EDTA选择性滴定 Zn^2 +。

(2) 调节溶液酸度

如硅钼蓝在酸度4~6mol/L仍然稳定,但磷砷钼蓝在酸度 1.6mol/L以上时则被破坏。

干扰离子的消除方法

- (3) 根据配合物的稳定性不同实现分离
- (4) 选择合适的测定波长

若显色物质存在多个吸收峰且在λmax处存在干扰时,可选择吸收次强的峰以避开干扰,但测定灵敏度会降低。

(5) 分离

考虑采用预先分离的方法,如沉淀、萃取、离子交换、蒸发和蒸馏以及色谱分离等。

3.9定性分析法

无机元素: 应用较少

原子发射光谱

X射线荧光光谱

ICP-MS

经典的化学分析方法

• 有机化合物: 应用有一定的局限性

简单,特征性不强

大多数简单官能团只有微弱吸收或无吸收

主要适用于不饱和有机物,特别是共轭体系的鉴定

定性分析法

推测化合物骨架、官能团; 判断构型; 检查纯度

• 比较法

鉴定依据: 吸收光谱曲线形状

吸收峰数目

最大吸收波长 λ_{\max}

相应摩尔吸光系数 \mathcal{E}_{\max}

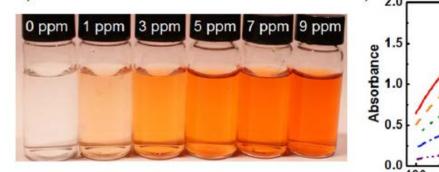
• 经验规则

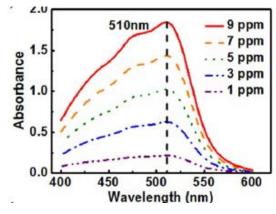
计算最大吸收波长 λ_{\max}

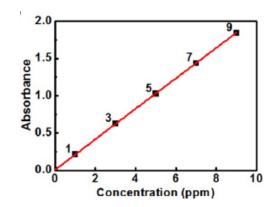
Woodward规则

定量分析法

• 标准曲线法







• 标准对比法

紫外一可见光谱法定量检测牛乳中大肠杆菌总数

- 获取大肠杆菌在各生长时期的紫外 可见光谱
- 构建细菌微生物紫外 可见光谱的解释模型

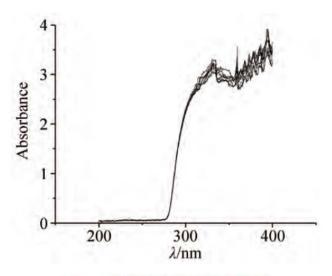


图1 带菌牛乳的原始光谱图

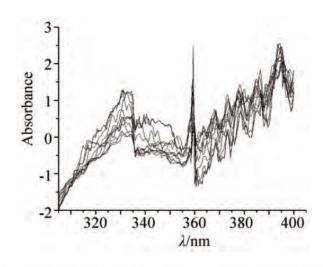


图 2 SNV 处理后的 300~400 nm 带菌牛乳的光谱图 标准正态校正法(SNV) 处理

紫外一可见光谱法定量检测牛乳中大肠杆菌总数

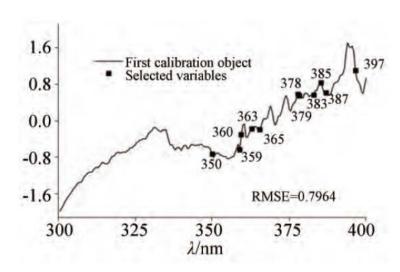


图 3 SNV 处理后光谱的特征波长提取位置图

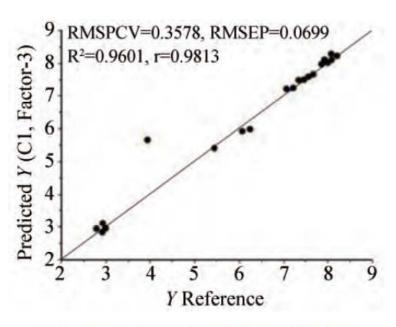


图 5 SNV 处理后光谱的预测散点图

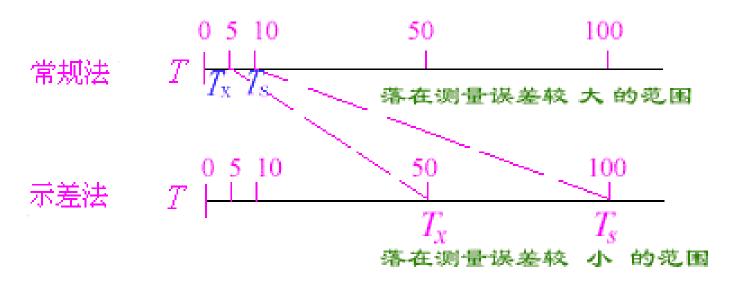
高含量组分的测定

• 示差光度法

参比溶液:调节浓度稍低的标准溶液 c₁的T%为100 (A=0)

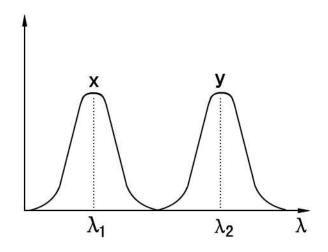
$$\triangle A = A_2 - A_1 = \varepsilon l (c_2 - c_1) = \varepsilon l \triangle c$$

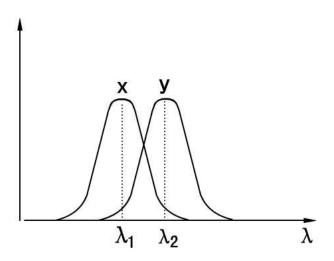
结论:两溶液的吸光度差△A与浓度差△c成正比。



结论: 示差法通过提高测量得准确度提高了方法的准确度。

多组分混合物的分析





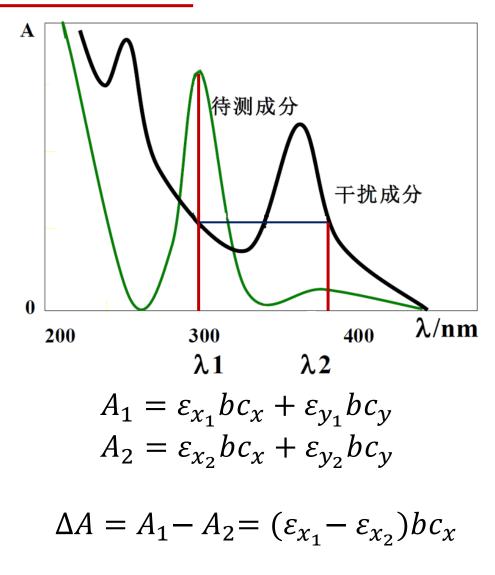
$$A_{1} = \varepsilon_{x_{1}}bc_{x} + \varepsilon_{y_{1}}bc_{y}$$

$$A_{2} = \varepsilon_{x_{2}}bc_{x} + \varepsilon_{y_{2}}bc_{y}$$

多组分混合物的分析

已知在 λ_1 和 λ_2 处_,A 的摩尔吸光系数 $\varepsilon_{A(\lambda 1)}$ = 4800 L·mol⁻¹·cm⁻¹和 $\varepsilon_{A(\lambda 2)}$ = 700 L·mol⁻¹·cm⁻¹ , B的摩尔吸光系数 $\varepsilon_{B(\lambda 1)}$ = 800 L·mol⁻¹·cm⁻¹ 和 $\varepsilon_{B(\lambda 2)}$ = 4200 L·mol⁻¹·cm⁻¹ 。用1cm比色皿对一含A和B的混合样品进行测定,得A λ_1 = 0.580与A λ_2 = 1.10 。求试液中A和B的浓度。

双波长法测定混合物



X为待测组分 Y为干扰组分

学习重点

- 朗伯-比尔定律
- 偏离朗-比定律的因素
- 紫外可见吸收测量条件的选择
- 定量分析方法