

第 5 章 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度法（Ultraviolet and Visible Spectrophotometry，简称 UV-VIS）是基于物质的分子与光子相互作用过程中所产生的吸收光谱而建立的一种光学仪器分析方法。紫外-可见分光光度法方法简单、灵敏度高、准确度高，通常使用的仪器价格也便宜，是目前使用较广泛的定量分析方法之一。

第一节 基本原理

5.1.1 吸收光谱的产生

分子中的电子，总是处于某种运动状态，具有一定的能量，属于一定的能级。当具有一定能量的光子作用于物质的分子时，处于基态的电子吸收了光子的能量，从低能态跃迁至高能态。跃迁前后两个能级的能量差（ ΔE ）与光子波长（ λ ）或频率（ ν ）之间的关系满足普朗克公式，即

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = hc/\lambda \quad (5.1)$$

紫外-可见吸收光谱是由于分子的价电子跃迁所致。每种电子能级的跃迁伴随着若干振动和转动能级的跃迁，使分子光谱呈现宽带吸收。

有机化合物的吸收带主要由 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 及电荷转移跃迁所产生。无机化合物的吸收带主要由电荷转移和配位场跃迁（即 $d \rightarrow d^*$ 和 $f \rightarrow f^*$ 跃迁）产生。激发不同类型的电子跃迁所需光子的能量不同，因而吸收光的波长范围也不同。从图 5.1 可大致了解紫外-可见光谱区不同电子跃迁谱带的吸收波长及相应的吸收强度分布。

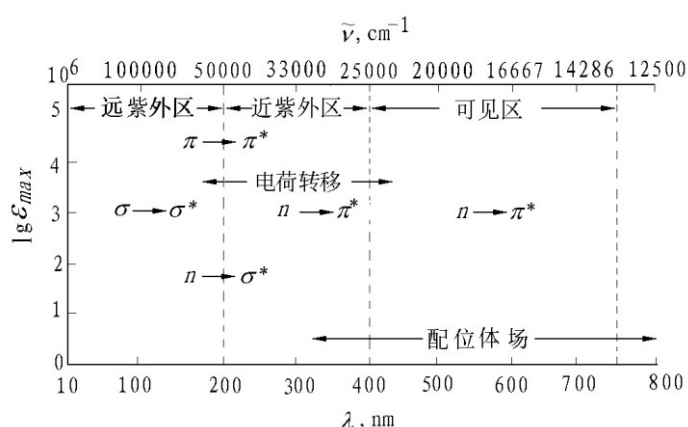


图 5.1 常见紫外-可见吸收谱带的位置与强度分布

5.1.2 吸收光谱与分子结构

紫外-可见吸收光谱与物质的分子结构以及所处的环境密切相关。

饱和烃类分子中只含有 σ 键，只产生 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁，最大吸收波长 λ_{\max} 一般小于 150 nm。此

类化合物的氢原子被 O、N、S 和 X 等含有 n 电子的原子取代后，可产生 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁， λ_{\max} 发生红移。不饱和烃及共轭烯烃含有 σ 键和 π 键，可产生 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 等跃迁。羰基化合物除了含有 σ 键和 π 键外，还有非成键 n 电子，通常呈现出三个吸收带，分别由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所致。分子中若有共轭 π 键存在，将使吸收峰红移且强度增大。不同性质取代基在共轭骨架上的引入，可引起光谱红移或蓝移。当在电磁辐射作用下有机化合物分子中的电子给体和电子受体同时融入共轭体系时，便可能发生分子内的电荷转移跃迁，其吸收峰强但相对宽化。

不少无机化合物也可以发生电荷转移跃迁，很多金属配合物因发生配体与金属中心离子之间的电荷转移跃迁而呈现很深的颜色。金属配合物的电子跃迁还可以发生于因配位场作用而分裂出的能量不同的金属 d 轨道或 f 轨道上，称为配位场跃迁；过渡金属配合物的 $d \rightarrow d^*$ 跃迁吸收与中心离子的主量子数、价态及配位体的性质密切相关。

一些由贵金属构成的纳米颗粒会对频率与其传导电子的整体振动频率相匹配的入射光子产生很强的吸收作用，发生局域表面等离子体共振（Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR）现象。产生的强共振吸收峰的吸收波长取决于材料的微观结构特性（包括组成、形状及尺寸等），人们可借此分析纳米粒子的微观结构。

分子所处的环境，如溶剂、温度等也对吸收光谱有影响。 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收带随溶剂极性增大出现蓝移，而 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收带则随溶剂极性增大发生红移。低温有利于有机化合物吸收光谱精细结构的显现，而温度升高则可使谱带的精细结构消失。

总之，在特定的实验条件下，分子的结构是决定分子紫外-可见吸收光谱的本质所在。不同的物质，具有不同的分子结构，在与光子作用过程中所表现出来的紫外-可见吸收光谱便具有不同的特征，因此有机化合物的紫外-可见吸收光谱常被用作结构分析的依据。

5.1.3 光吸收定律

物质对光的吸收，在一定的实验条件下遵循朗伯-比尔定律，即当一定波长的光通过某物质的溶液时，入射光强度 I_0 与透射光强度 I_t 之比的对数与该物质的浓度及液层厚度成正比。其数学表达式为：

$$A = \lg(I_0/I_t) = \epsilon bC \quad (5.2)$$

式中， A 为吸光度； b 为液层厚度，单位为 cm ； C 为被测物浓度，单位为 mol/L ； ϵ 称摩尔吸光系数。当被测物浓度单位是 g/L 时， ϵ 就以 a 表示，称吸光系数。此时：

$$A = abC \quad (5.3)$$

给定波长和溶剂条件，摩尔吸光系数 ϵ 是吸光分子（或离子）的一个特征常数，可作定性分析的参数。

朗伯-比尔定律是紫外-可见分光光度法定量分析的依据。在确定的实验条件下，吸光度正比

于被测物的浓度。

第二节 紫外-可见分光光度计

紫外-可见分光光度法所使用的仪器称为紫外-可见分光光度计。分光光度计主要由光源、单色器、吸收池、检测系统及信号显示系统五个部分组成（图 5.2）。生化实验中常用的酶标仪实际上就是一台变相的分光光度计：光源发出的光波经过单色器分光后变成一束单色光照射到待测标本上，未被标本吸收的入射单色光透过标本照射到光电检测器上，光电检测器再将光信号转换成相应的电信号以便后续的数据处理，最后由信号显示系统显示结果。

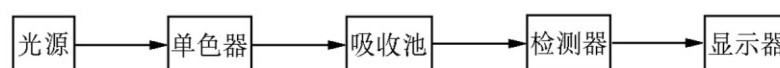


图 5.2 分光光度计基本构造方框图

需要说明的是，吸收光谱体现的是被待测物质吸收的光信号；而消光光谱体现的则是通过样品后入射光减少的部分，包括吸收和散射。由仪器的构造可知，用常规的紫外-可见分光光度计测得的实际上是消光光谱。对于一般的溶液来说，分子的瑞利散射十分微弱，因而消光光谱基本等同于吸收光谱；对于胶体甚至悬浊液而言，丁铎尔散射或米氏散射的影响就不可忽略了，因而测得的并不是真正的吸收光谱。

紫外-可见分光光度计，按其光学系统可分为单波长单光束（如国产 721 型、751 型、752C 型和 Beckman DU-8B 型等）、单波长双光束（如国产 WFZ-25 型、Hitachi UV-240 型和 Shimadzu UV-2700 型等）和双波长（如 UV-300 型等）分光光度计。

下面以 Shimadzu UV-240 型和 Shimadzu UV-2700 型为例，介绍最常见的单波长双光束紫外-可见分光光度计的结构、性能及使用方法。

5.2.1 UV-240 型紫外-可见分光光度计

UV-240 型紫外-可见分光光度计由分光光度计和单片微处理机两大部件组成。这是双光束带有数字显示并配有单片微处理机控制的仪器，具有编制操作程序、数据处理和绘制光谱图等功能。

一、工作原理

仪器的光学原理系统图如图 5.3 所示。

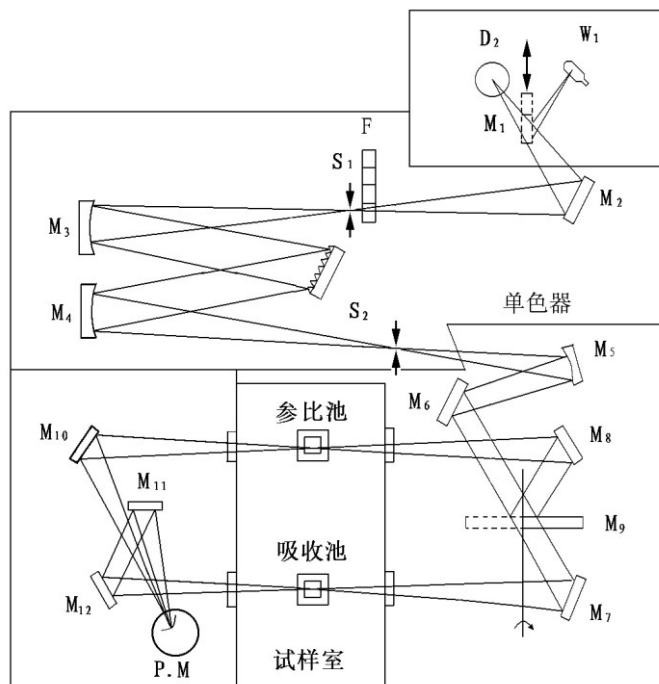


图 5.3 UV-240 型紫外-可见分光光度计光路图

D₂—氘灯；W₁—钨灯 S₁—进口狭缝；S₂—出口狭缝；F—除去杂散光滤光片；M₁~M₁₂—反射镜；P. M.—光电倍增管

二、使用方法

1. 开机：确认试样室中光路上无遮挡物时，打开电源开关，仪器自检，约 10 min 后显示器上显示波长 700.0 nm，即可进行测定。

2. 将两个空吸收池分别置于参比光路和试样光路，按 **ABS0 100%T** 键进行校正。

3. 参数设置：

本机的操作由单片微处理机键盘操作控制。欲输入某参数或选择某工作方式，先按相应的功能键或参数键，显示器上即显示当前状态，承认当前状态，只需按 **ENTER** 键；若欲修改，则输入新的参数后按 **ENTER** 键。下面以重复扫描与单波长定点测量为例说明使用方法。

重复扫描：①将试液和参比溶液置于试样室中；②按照表 4.4 设置参数，仪器自动完成扫描。

单波长定点测量：①按 **MODE** **4** **ENTER** 各键，选择定点测量；②按 **GOTO λ** **数字键** **ENTER** 各键，选择测量波长；③将参比溶液置于试样光路，按“ABS0 100%T”键进行校正；④将试液置于试样光路，按 **START** 键测量，按 **STOP** 键输出吸光度值。

4. 关机：按 **GOTO λ** **700.0** **ENTER** 各键，待显示器上出现 700.0 nm 后，切断电源开关。

三、注意事项

1. 严格遵守操作程序，否则会造成仪器内存混乱，不能正确测量。

2. 热敏纸勿与有机溶剂接触，否则会变质而失效。当热敏纸出现红色粗线后要停止使用。不能在无记录纸状态下打印，以免热敏头受损。

5.2.2 UV-2700 型紫外可见分光光度计

岛津 UV-2700 型是由微机平台控制的单波长双光束紫外-可见分光光度计，光路设置与日立 UV-240 型紫外-可见分光光度计类似；不同的是 UV-2700 的单色器采用超低杂散光的衍射光栅作为色散元件，测定精度有较大提高。

一、开机：打开主机电源（在主机右侧前下方），指示灯亮，同时打开计算机，打印机。

二、双击桌面图标，启动 UVProbe，进入测定窗口。根据点击工具栏图标，选择进行“动力学”测定、“光度测定”或“光谱”扫描。单击界面下端的“连接”键，联机并开始初始化，初始化项目全部通过后，点击“确定”变为可操作状态，进入测定模式。

三、如果进行光谱测定，选择“窗口”>“光谱”，打开光谱模块。

1. 建立数据采集方法：选择“编辑”>“方法”，或者点击方法图标，显示方法对话框。设置扫描波长范围、扫描速度（一般为中速）、采样间隔（一般为 1.0 nm）和扫描方式（一般为单个）。点击仪器参数选项卡，选择信号模式为“吸收值”，选择狭缝宽度，单击“确定”。
2. 保存测定方法：单击文件菜单的“另存为”，显示光谱文件窗口，输入文件名，选择“方法文件”，单击“保存”。
3. 基线校正：将两个空白样品放入样品仓，点击光度计状态栏中的“基线”，在弹出的基线参数对话框中确认开始波长和结束波长，然后点击“确定”进行基线校正。
4. 样品测量：打开分光光度计的样品室盖，将样品放入样品池架上，后关闭样品室盖。点击“开始”测量样品，扫描结束点击“确定”。
5. 点击“峰值检测”图标，显示峰值数据。
6. 点击“数据打印”图标，显示各波长处的吸光度值。
7. 测量结束后显示“新数据集”窗口，输入文件名，并根据需要输入数据储元，然后单击确定。
8. 点击“文件”，根据需要另存文件。
9. 根据需要，选择打印“激活”、“重叠”或“堆叠”的光谱图。

四、如果进行光度测定，选择“窗口”>“光度测定”，进入光度测定模块。

1. 建立数据采集方法，选择“编辑”>“方法”，或者点击“方法”图标，显示“方法”对话框。
2. 设置波长，在波长类型中选择“点”或“范围”，添加测定所需的波长。单击“下一步”。
3. 设置标准曲线，在“类型”选择多点，“定量法”选择“固定波长”，选择“参数”，单击“下一步”。
4. 出现“测定参数（标准）”标签页。不做任何更改，直接点击“下一步”键。
5. 出现“测定参数（样品）”标签页。不做任何更改，直接点击“下一步”键。

6. 出现“文件属性”页，不做任何更改，点击“完成”键。
7. 设置“光度测定方法”，点击“仪器参数”，在“测定方式”中选择“吸收值”，在“狭缝宽”中选择相应的狭缝宽度。点击“关闭”键。
8. 保存数据采集方法。选择“文件”>“另存为”，输入文件名，保存类型选择为“方法文件”，点击“保存”。
9. 点击“标准表”，输入标准样品“ID”，“浓度”后按回车键，重复以上步骤至标准曲线浓度输入完成。
10. 将第一号标准样品放入样品室中，点击“读取 Std”。
11. 依次将余下的样品放入样品室，并完成测量。
12. 点击“样品表”，输入样品“ID”后按回车键，点击“读取 UNK”。
13. 保存结果，点击“文件”>“另存为”，输入文件名。

五、关机：单击“断开”，断开连接；关闭 UVProbe 软件；关闭仪器电源；关闭计算机和打印机。