

紫外可见分光光度计的应用

尹 涓

(北京市化工研究院 北京市 100022)

摘 要 本文介绍了紫外可见分光光度法的特征、原理及应用,并列举多项实例说紫外可见分光光度法在各个领域中的应用。

关键词 有机分析 吸收光谱 紫外可见分光光度法

1. 概述

人们在实践中早已总结出不同颜色的物质具有不同的物理和化学性质。根据物质的这些特性可对它进行有效的分析和判别。由于颜色本就惹人注意,根据物质的颜色深浅程度来对物质的含量进行估计,可追溯到古代及中世纪。1852年,比尔(Beer)参考了布给尔(Bouguer)1729年和朗伯(Lambert)在1760年所发表的文章,提出了分光光度的基本定律,即液层厚度相等时,颜色的强度与呈色溶液的浓度成比例,从而奠定了分光光度法的理论基础,这就是著名的比尔朗伯定律。1854年,杜包斯克(Duboscq)和奈斯勒(Nessler)等人将此理论应用于定量分析化学领域,并且设计了第一台比色计。到1918年,美国国家标准局制成了第一台紫外可见分光光度计。此后,紫外可见分光光度计经不断改进,又出现自动记录、自动打印、数字显示、微机控制等各种类型的仪器,使光度法的灵敏度和准确度也不断提高,其应用范围也不断扩大。

紫外可见分光光度法从问世以来,在应用方面有了很大的发展,尤其是在相关学科发展的基础上,促使分光光度计仪器的不断创新,功能更加齐全,使得光度法的应用更拓宽了范围。目前,分光光度法已为工农业各个部门和科学研究的各个领域所广泛采用,成为人们从事生产和科研的有力测试手段。我国在分析化学领域有着坚实的基础,在分

光光度分析方法和仪器的制造方面国际上都已达到一定的水平^{[1][2]}

2. 原理

物质的吸收光谱本质上就是物质中的分子和原子吸收了入射光中的某些特定波长的光能量,相应地发生了分子振动能级跃迁和电子能级跃迁的结果。由于各种物质具有各自不同的分子、原子和不同的分子空间结构,其吸收光能量的情况也就不会相同,因此,每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱曲线,可根据吸收光谱上的某些特征波长处的吸光度的高低判别或测定该物质的含量,这就是分光光度定性和定量分析的基础。分光光度分析就是根据物质的吸收光谱研究物质的成分、结构和物质间相互作用的有效手段。

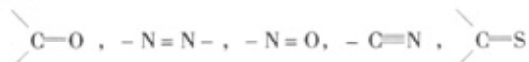
紫外可见分光光度法的定量分析基础是朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律。即物质在一定浓度的吸光度与它的吸收介质的厚度成正比,其数学表示式如下:

$$A = \epsilon bc$$

式中:A—吸光度(又称光密度、消光值), ϵ —摩尔吸光系数(其物理意义为:当吸光物质浓度为1摩尔/升,吸收池厚为1厘米,以一定波长原光通过时,所引起的吸光值A),b—吸收介质的厚度(厘米),c—吸光物质的浓度(摩尔/升)。

物质的颜色和它的电子结构有密切的关系,当辐射(光子)引起电子跃迁使分子(或离子)从基态上升到激发态时,分子(或离子)就

会在可见区或紫外呈现吸光,颜色的发生或变化是和分子的正常电子结构的变形联系的。当分子中含有一个或更多的生色基因(即具有不饱和键的原子基团),辐射就会引起分子中电子能量的改变。常见的生色团有:



如果两个生色团之间隔一个碳原子,则形成共轭基团,会使吸收带移向较长的波长处(即红移),且吸收带的强度显著增加。当分子中含有助色基团(有未共用电子对的基团)时,也会产生红移效应。常见的助色基团有: $-\text{OH}$ $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$

3. 特点

分光光度法对于分析人员来说,可以说是最有用的工具之一。几乎每一个分析实验室都离不开紫外可见分光光度计。分光光度法的主要特点为:

(1) 应用广泛

由于各种各样的无机物和有机物在紫外可见区都有吸收,因此均可借此法加以测定。到目前为止,几乎化学元素周期表上的所有元素(除少数放射性元素和惰性元素之外)均可采用此法。在国际上发表的有关分析的论文总数中,光度法约占 28%,我国约占所发表论文总数的 33%。

(2) 灵敏度高

由于新的显色剂的大量合成,并在应用研究方面取得了可喜的进展,使得对元素测定的灵敏度有所推进,特别是有关多元络合物和各种表面活性剂的应用研究,使许多元素的摩尔吸光系数由原来的几万提高到数十万。

(3) 选择性好

目前已有些元素只要利用控制适当的显色条件就可直接进行光度法测定,如钴、铀、镍、铜、银、铁等元素的测定,已有比较满意的方法了。

(4) 准确度高

对于一般的分光光度法,其浓度测量的相对误差在 1~3% 范围内,如采用示差分光光度法进行测量,则误差可减少到 0.1%。

(5) 适用浓度范围广

可从常量(1%~50%)(尤其使用示差法)到痕量(10^{-8} ~ 10^{-6} %) (经预富集后)。

(6) 分析成本低、操作简便、快速

由于分光光度法具有以上优点,因此目前仍广泛地应用于化工、冶金、地质、医学、食品、制药等部门及环境监测系统。单在水质分析中的应用就很广,目前能有直接法和间接法测定的金属和非金属元素就有 70 多种。

4 应用

4.1 检定物质

根据吸收光谱图上的一些特征吸收,特别是最大吸收波长 λ_{max} 和摩尔吸收系数 ϵ , 是检定物质的常用物理参数。这在药物分析上就有着很广泛的应用。在国内外的药典中,已将众多的药物紫外吸收光谱的最大吸收波长和吸收系数载入其中,为药物分析提供了很好的手段。

4.2 与标准物及标准图谱对照

将分析样品和标准样品以相同浓度配制在同一溶剂中,在同一条件下分别测定紫外可见吸收光谱。若两者是同一物质,则两者的光谱图应完全一致。如果没有标样,也可以和现成的标准图谱对照进行比较。这种方法要求仪器准确,精密度高,且测定条件要相同。

4.3 比较最大吸收波长吸收系数的一致性

由于紫外吸收光谱只含有 2~3 个较宽的吸收带,而紫外光谱主要是分子内的发色团在紫外区产生的吸收,与分子和其它部分关系不大。具有相同发色团的不同分子结构,在较大分子中不影响发色团的紫外吸收光谱,不同的分子结构有可能有相同的紫外吸收光谱,但它们的吸收系数是有差别的。如果分析样品和标准样品的吸收波长相同,吸收系数也相同,则可认为分析样品与标准

样品为同一物质。

例1 己二烯-1,5($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{CH}_2 = \text{CH}_2$)的最大吸收波长 λ_{max} 为178nm(摩尔吸收系数为26000),而己烯-1($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)的最大吸收波长为 λ_{max} 为177nm(摩尔吸收系数 ϵ 为11800)。此两个物质有相同的发色团, λ_{max} 值基本相同,但 ϵ 值不同,二烯的 ϵ 值比单烯的大。这说明有相同的但彼此不共轭的发色团,其吸收波长接近于单个发色团的值,但 ϵ 值则随相同发色团数目的增加而增加。如果有几个发色团彼此共轭,则吸收长向红移动。象丁二烯-1,3($\text{CH}_2 = \text{CHCH} = \text{CH}_2$)与己二烯-1,5($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH} = \text{CH}_2$)相比,同样有两个双键,但丁二烯-1,3中为共轭体系,它的最大吸收长 λ_{max} 为210nm,而摩尔吸收系数 ϵ 值则与己二烯-1,5基本一样。

4.4 纯度检验

例2 紫外吸收光谱能测定化合物中含有微量的具有紫外吸收的杂质。如果化合物的紫外可见光区没有明显的吸收峰,而它的杂质在紫外区内有较强的吸收峰,就可以检测出化合物中的杂质。

例3 检测乙醇样品含有的苯的杂质。苯的最大吸收波长在256nm,而乙醇在此波长处没有吸收。在紫外吸收光谱上就能很明显地看出来。

如果化合物在紫外可见有吸收,可用吸收系数检测其纯度。

例4 菲的氯仿溶液在296 nm处有强吸收, ϵ 为12600, $\log \epsilon$ 为4.10,用某方法精制的菲在紫外上测出的 $\log \epsilon$ 值比标准的菲要低10%,这说明实际含量只有90%,其余的就很有可能是杂质了。

例5 还可以用差示法来检测样品的纯度。取相同浓度的纯品在同一溶剂中测定作空白对照,样品与纯品之间的差示光谱就是样品中含有杂质的光谱。

4.5 推测化合物的分子结构

(1) 推测化合物的共轭体系和部分骨架

如果一个化合物在紫外区是透明的,没有吸收峰(吸收系数 $\epsilon < 10$),则说明不存在共轭体系(指不存在多个相间双键)。它可能是脂肪族碳氢化合物、胺、腈、醇等不含双键或环状结构的化合物。

如果在210-250nm有强吸收,则可能有两个双键共轭系统(如共轭二烯或 α, β -不饱和酮)。

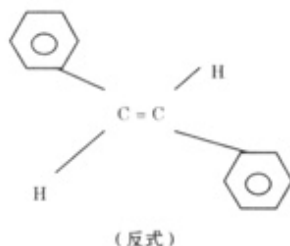
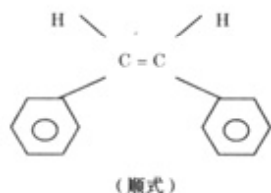
如果在250-300nm有强吸收,则可能具有3-5个不饱和共轭系统。

如果在260-300nm有中强吸收(吸收系数 $\epsilon = 200 - 1000$),则可能有苯环。

如果在250-300nm有弱吸收,则可能存在羰基基团

(2) 区分化合物的构型和构象

例6 化合物二苯乙烯有顺式和反式两种构型:

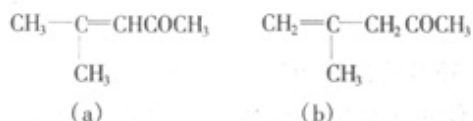


它们的最大吸收波长和吸收强度都不同,由于反式构型没有空间障碍,偶极矩大,而顺式构型有空间障碍,因此反式的吸收波长和强度都比顺式的来得大。为此就很容易区分顺式和反式构型了。

(3) 互变异构体的鉴别。

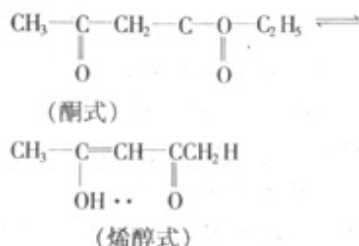
在有机化学中,会有异构体的互变现象,通过紫外光谱也可鉴别。

例7 异丙基酮有两种分异构体:



在紫外吸收光谱上,由于(a)的分子结构中碳碳双键和羰基处于共轭体系,故在235nm处有强吸收($\epsilon = 12000$),而(b)的分子结构中的碳碳双键和羰基不存在共轭体系,故在220nm以上没有强吸收。

例8 乙酰乙酸乙酯有酮式和烯醇式两种变异构体:



烯醇式结构中羰基和主链的双键共轭,其 λ_{max} 为245nm(ϵ 为18000),而酮式结构中没有共轭体系,故在210nm以上没有强吸收带。在极性溶剂(例如水)中,酮式结构与溶剂分子因形成氢键而被稳定,故在极性溶剂中以酮式结构为主(约占85%),而在非极性溶剂(例如正乙烷)中,烯醇式因生成分子内氢而被稳定,故在非极性溶剂中以烯醇式结构为主,在正乙烷溶剂中烯醇式结构约占96%。这种互变异构的转换情况在紫外光谱就很容易看出来。

4.6 氢键强度的测定

实验证明,不同的极性溶剂产生氢键的强度也不同,这可以利用紫外光谱来判断化合物在不同溶剂中氢键强度,以确定选择哪一种溶剂。

例9 在例6中提到的异丙基丙酮在溶剂环己烷(非极性溶剂)、乙醇、甲醇和水中的 λ_{max} 分别为335、320、312和300nm。假定这种 λ_{max} 完全由溶剂的氢键所引起,则可以利用下式计算每种溶剂中的氢键强度。对每种情况,紫外辐射每摩尔能量为

$$E = Nh\nu = Nhc/\lambda$$

式中: N —阿佛加德罗常数, $N = 6.023 \times 10^{23}$;

h —普朗克常数, $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$;

c —光速 $c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$

对于环己烷, $\lambda_{\text{max}} = 335 \text{ nm} = 335 \times 10^{-7} \text{ cm}$;

因此,紫外辐射能量 $N = (6.023 \times 10^{23} \times 6.62 \times 10^{-34}) / (335 \times 10^{-7}) = 3.57 \times 10^5 \text{ J/mol}$
同样可求得乙醇、甲醇和水中的紫外辐射能量分别为 3.74×10^5 、 3.83×10^5 、 $3.98 \times 10^5 \text{ J/mol}$ 。将这些辐射能扣除在非极性溶剂中的辐射能后,便得到在这些极性溶剂中的氢键强度:

在乙醇中氢键强度为

$$3.74 \times 10^5 - 3.57 \times 10^5 = 1.7 \times 10^4 \text{ J/mol}$$

在甲醇中

$$3.83 \times 10^5 - 3.57 \times 10^5 = 2.6 \times 10^4 \text{ J/mol}$$

在水中

$$3.98 \times 10^5 - 3.57 \times 10^5 = 4.1 \times 10^4 \text{ J/mol}$$

4.7 络合物组成及稳定常数的测定

金属离子常与有机物形成络合物,多数络合物在紫外可见区是有吸收的,我们可以利用分光光度法来研究其组成。当金属离子 M 和配位体 L (在这儿往往是显色剂)形成络合物 ML 时,络合物反应如下:



当达到络合平衡时,其络合物稳定常数为:

$$K = C_{MR_n} / (C_M C_R^n)$$

若 M 与 R 不干扰 MR_n 的吸收,且其分析浓度分别为 C_M 、 C_R ,那么固定金属离子 M 的浓度,改变显色剂 R 的浓度,就可以得到一系列 C_M/C_R 值不同的溶液。在适宜的波长条件下测量各溶液的吸光度,然后以吸光度 A 对 C_M/C_R 作图。当加入的试剂 R 还没有使 M 定量转化为 MR_n 时,该曲线处于直线阶段,当加入的试剂 R 已使 M 定量转化为 MR_n 。并稍有了过量时,曲线便出现转折,加入的 R 继续过量,曲线又是水平直线。那么转折点所对应的摩尔比数即是络合物的组成比。若络合物比较稳定,则转折点明显。若络合物不稳定,则转折点不明显,此时可用外

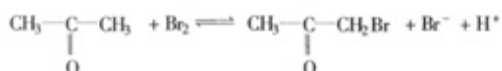
推法求得两条直线的交点,交点对应的 C_M/C_R 值即为络合物 MR_n 中的 n 值。

如果在两种不同的金属离子和配位体总浓度(总摩尔数)的条件下,在同一坐标上分别作吸光度对两种不同总摩尔数的溶液组成曲线,在曲线上找出吸光度相同的两点,则在此两点上对应的络合物浓度应相同,为此便可计算出络合物稳定常数 K 。

4.8 反应动力学研究

借助于分光光度法可以得出一些化学反应速度常数,并从两个或两个以上温度条件下得到的速度数据,得出反应活化能。在丙酮的溴化反应的动力学研究中就是一个成功的例子。

例 10 在有机化学中,丙酮的溴化反应是一个复杂反应,其反应式为:



该反应由氢离子催化,则反应速度为:

$$K = k[\text{CH}_3\text{COCH}_3]^p[\text{Br}_2]^q[\text{H}^+]^r$$

式中: k —反应速度常数

物质的浓度(摩尔/升)

指数 p 、 q 、 r 分别表示丙酮、溴、氢离子的反应级数

在其它试剂没有明显吸收的波长下,用分光光度法在 400nm 处直接观察 Br_2 浓度的减小,就很容易跟踪反应进程。对于固定的吸收池的厚度,吸光度 A 就与 Br_2 的浓度呈正比,令比例系数为 B ,则存在下式:

$$A = BC$$

通过一系列的实验,便可得出反应速度 k 及反应级数来,实验证明对 Br_2 是零级,即 q 等于零。若测出两个或两个以上温度的速度常数(k_1 、 k_2),则可根据阿伦尼乌斯公式计算出反应活化能来。

$$\log k_2/k_1 = E_0(T_2/T_1)/2.30 RT_1 T_2$$

式中: k_1 、 k_2 分别为温度 T_1 、 T_2 下的反应速度常数

R 为气体常数,8.314 焦耳/开尔文·摩尔

E_0 为活化能

4.9 在有机分析中的应用

有机分析是一门研究有机化合物的分离、鉴别及组成结构测定的科学,它是在有机化学和分析化学的基础上发展起来的综合性学科。在国民经济的许多领域都用有机分析。^[3]

波长在 190—800nm 的电磁光谱对于判断有机分子中是否存在共轭体系、芳环结构及 $\text{C}=\text{C}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{N}=\text{N}$ 之类的发色团是一个很好的手段。具有 π 键电子及共轭双键的化合物在紫外区有强烈的吸收,其摩尔吸光系数可达 $10^4 - 10^5$ (而红外吸收光谱的摩尔吸光系数一般均小于 10^3),因而检测灵敏度很高。对于一些特列类型的结构,可通过简单的数学运算确定最大吸收。如果发色团之间不以共轭键相连的话,其紫外吸收具有可加性,即总的吸收等于各单独发色团的吸收之和。用此性质曾成功地推导出利血平及氯霉素的部分结构。一个复杂分子的结构,往往可以由比较化合物的紫外光谱性质而推断其含有何种发色团,有时还能提供一些立体结构及分子量的一些信息,为未知物的剖析提供有用的线索。以下通过一些实例说明分光光度法在有机分析中的应用。

例 11 氯霉素分子中的硝基首先是由它的紫外光谱而确定的,在紫外光谱中 298nm 和 278nm 处出现芳香硝基的特征吸收。

五圆环酮和羧酸酯的红外特征吸收都在 1740cm^{-1} 附近,难以区别。但在紫外光谱中只有前者在 210nm 以上有吸收,从而得以区别。

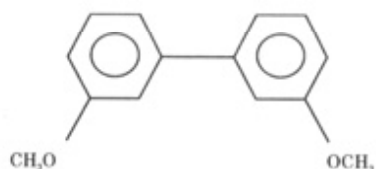
例 12 利用紫外分光光度法进行定量分析时,可将待测试样的纯品配制成一系列标准溶液,事先绘制标准曲线,由待测未知样品吸光度对照标准曲线,就可得到其含量。当未知物样品为几种组分,且这组分的 λ_{max} 互不重叠,则可用联立方程解之。如复方阿司匹林(A. P. C)含有三种组分:阿司匹林

(A)、非那西丁(P)、咖啡因(C),阿司匹林和咖啡因的最大吸收在 277nm 和 275nm,较为接近,必须事先分离,而咖啡因和非那西丁的最大吸收相距较远,可用联立方程解之。将待分析的药片粉碎并溶于氯仿中,用 4% 的碳酸钠水溶液萃取两次,用蒸馏水洗涤一次,合并水层。则阿司匹林进入水层,非那西丁和咖啡因留在氯仿中。再用氯仿洗涤水层三次,进一步提取水层中残留的非那西丁和咖啡因。合并氯仿层,并过滤到 250mL 容量瓶中,用氯仿稀释至刻度。最后移取 1mL 此液到 100mL 容量瓶中,用氯仿稀释至刻度。取此液在 250nm 和 275nm 处测定吸光度。分别测得为 0.795 和 0.280。水层用稀酸酸化(pH 为 2),用氯仿萃取后,将萃取液转入 100mL 容量瓶,以氯仿稀释至刻度,在 277nm 处测其吸光度为 0.78。通过配制的已知浓度的样品可求出 100mg/L 的阿司匹林在 277nm 处的吸光度为 0.72,可知待测样品中的阿司匹林的含量为 $100 \times 0.78 / 0.72 = 108\text{mg/L}$,也就是 10.8mg/100mL,即药片含阿司匹林 10.8g。对标准的非那西丁溶液,测得其比吸光系数为 $k_{250} = 0.0767 \text{ L/mg} \cdot \text{cm}$, $k_{275} = 0.0200 \text{ L/mg} \cdot \text{cm}$ 对标准的咖啡因溶液,测得其比吸光系数为 $k_{250} = 0.0177 \text{ L/mg} \cdot \text{cm}$, $k_{275} = 0.0518 \text{ L/mg} \cdot \text{cm}$ 由此可列出联立方程,解得咖啡因浓度为 1.55mg/L,即 0.155mg/100mL 非那西丁浓度为 10.1mg/L,即 1.01mg/mL,由于未知溶液稀释了 250 倍,所以药片中含非那西丁的量为 $1.01 \times 250 = 252\text{mg}$,含咖啡因的量为 $0.155 \times 250 = 38.8\text{mg}$ 。

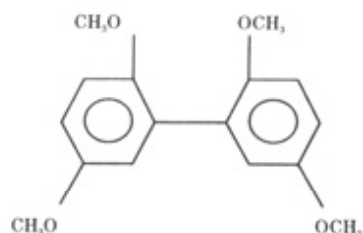
同样,甲苯酚中的甲基和羟基因位置不同有邻、间、对三种异构体,它们有各自不同的吸收谱带,可分别在波长 277、273、268nm 处测定光度,解联立方程即可算出混的中各自组分的含量。

例 13 通过对两个有机化合物(以环己烷为溶剂)的紫外光谱比较,发现(II)的紫外光谱中 260nm 处的吸收峰与(I)的相比大为减弱,从而表明空间位阻效应的存在。这是

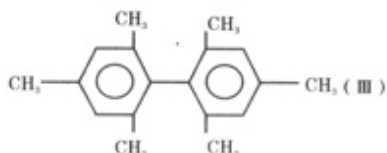
由于有机化合物(II)中分子中心单键的邻位上有了两个体积较大的取代基(甲氧基),使两个苯环以中心键为轴,发生扭曲而不能处于同一个平面内,此时共轭关系受到很大影响,故使反应苯环下 π 键为特征的 260nm 处的吸收就大大减弱了。



(I)

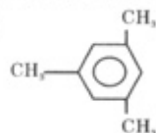


(II)



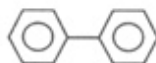
(III)

例 14 在有机化合物(III)中,由于两个苯环上相互处于邻位的四个甲基的位阻效应,使得两个苯环不能处于同一个平面内,其间的共轭关系被破坏。反映在其紫外光谱上,此化合物的紫外光谱很近似地等于两个孤立的间三甲苯



光谱之和,

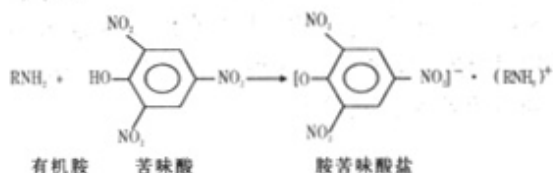
而与二联苯



的吸收光谱无关。

例 15 制备衍生物也是扩大紫外光谱应用范围的一个途径。我们可以利用紫外光谱测定有机物胺类化合物(RNH_2)的分子量。

RNH_2 本身在紫外区是没有吸收的,但可以利用化学反应制备衍生物,引入一个新的共轭系统。



反应产生的胺苦味酸盐(1 + 1 加成产物)在紫外有吸收。当波长为 380nm 时,大多数的胺苦味酸盐在 95% 乙醇中的摩尔吸光度系数大致相同,均在 1.344×10^4 ,因此我们就可以从苦味酸盐的乙醇溶液在 380nm 处的吸收,由公式计算出胺苦味酸盐的分子量,进而再折成未知胺的分子量。

例如,用此方法测定古柯碱的分子量,将古柯碱苦味酸盐 2.159mg 溶于 100ml 95% 乙醇溶液中,在 1 厘米厚吸收池中测得其吸光度为 0.550,又知苦味酸的分子量为 229,这样就可以计算出古柯碱的分子量为

$M = 13440 \times 2.159 \times 10 / (1000 \times 0.550) - 229 = 299$ 按古柯碱分子式($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$)计算的话,其分子量应为 303,与此法计算出的分

子量的偏差仅为 -0.8%。

用此方法测定各类化合物的衍生物及分子量的有关数据如表 1 所示。

表 1 分光光度法测各类化合物分子量的数据

化合物	衍生物	λ_{max} (nm)	E_{max}
胺	苦味酸盐	380	13440
饱和醇	β -2,4 二硝基苯丙酸酯	242	14440
醛和酮	2,4 二硝基苯腙	360	22000
糖	脎	397	20360

乙醇分子中不存在共轭系统,它在波长 200 - 800nm 范围内是没有吸收的,当乙醇与异氰酸苯酯($\text{Ar}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$)反应后,在波长 280nm 处就会出现较强的吸收。

例 16 有时很强的吸收会引起干扰作用,象有些稠环化合物对某些波长的吸收就很强,也可以采用化学 π 反应去除之。如有机化合物具有三个大 π 键,在波长 252nm 处有很强的吸收,其摩尔吸光系数可达 2×10^5 会对一些在此也有吸收的化合物产生干扰,我们可以让它与丁烯二酸酐发生狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)加成反应:



这样一来,原来三个大 π 键共轭系统就被破坏了,原先很强的吸收就被大大减弱了。

结语 所述紫外可见分光光度法具有仪器价格低廉适用性广泛,尤其是采用微机控制以来,该技术得到了突飞猛进的发展。近年来我国仪器制造厂可以生产出与国外同等水平的紫外分光光度计,成为分析者的最佳选择。

参 考 文 献

- [1] 编委会 水和废水监测分析方法指南(上册) 中国环境科学出版社 1990
- [2] 朱良漪 分析仪器手册 北京工业出版社 1997
- [3] 陈耀祖 有机分要 高等教育出版社北京 1981