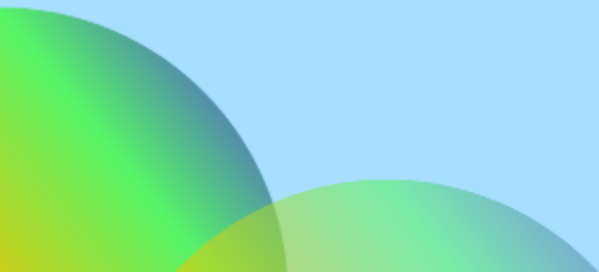


紫外可见分光光度计



第一部分 紫外-可见吸收光谱法的原理

第二部分 紫外-可见分光光度计构造与类型

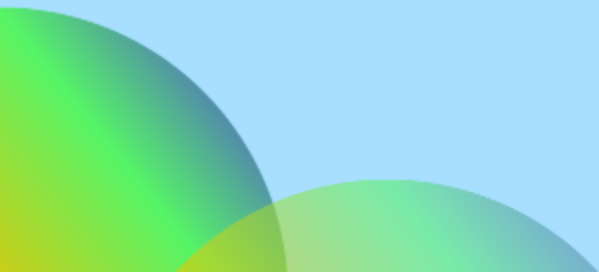
第三部分 紫外-可见分光光度计的应用

第四部分 紫外-可见吸收光谱分析的条件和影响因素

第五部分 仪器的使用操作、维护

第一部分

紫外-可见吸收光谱法的原理



一、基本原理:光的选择性吸收

分子中的某些基团吸收了紫外可见辐射光后，发生了电子能级跃迁，而产生了相应的吸收光谱。属分子吸收光谱。

紫外-可见吸收光谱分析是研究物质在紫外-可见光波下的分子吸收光谱的分析方法。

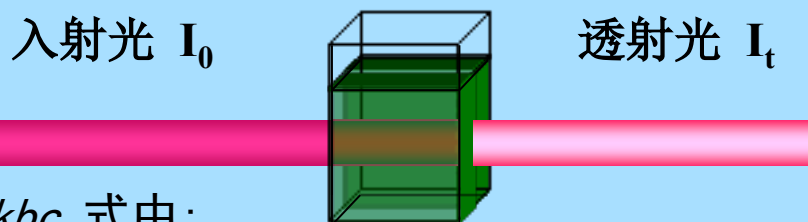
紫外-可见区可细分为：

- (1) 10-200nm；远紫外光区
- (2) 200-400nm；近紫外光区
- (3) 400-800nm；可见光区

二、光的吸收定律：

○ 1. 朗伯——比尔定律： $A = kbc$ 。

表明：一定温度下，一定波长的单色光通过均匀的、非散射的溶液时，溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比。



$A = kbc$ 式中：

A ：吸光度；描述溶液对光的吸收程度；

k ：摩尔吸光系数，单位 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ；

b ：液层厚度(光程长度)，通常以cm为单位；

c ：溶液的摩尔浓度，单位 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；

○ 2. 摩尔吸光系数: ($A = kbc$)

- (1) k 与入射波长、溶液的性质以及温度有关。
- (2) 吸收物质在特定波长和溶剂条件下的特征常数；
- (3) 不随浓度 c 和光程长度 b 的改变而改变。在温度和波长等条件一定时， k 仅与吸收物质本身的性质有关；
- (4) 是物质吸光能力的量度，可作为定性鉴定的参数；

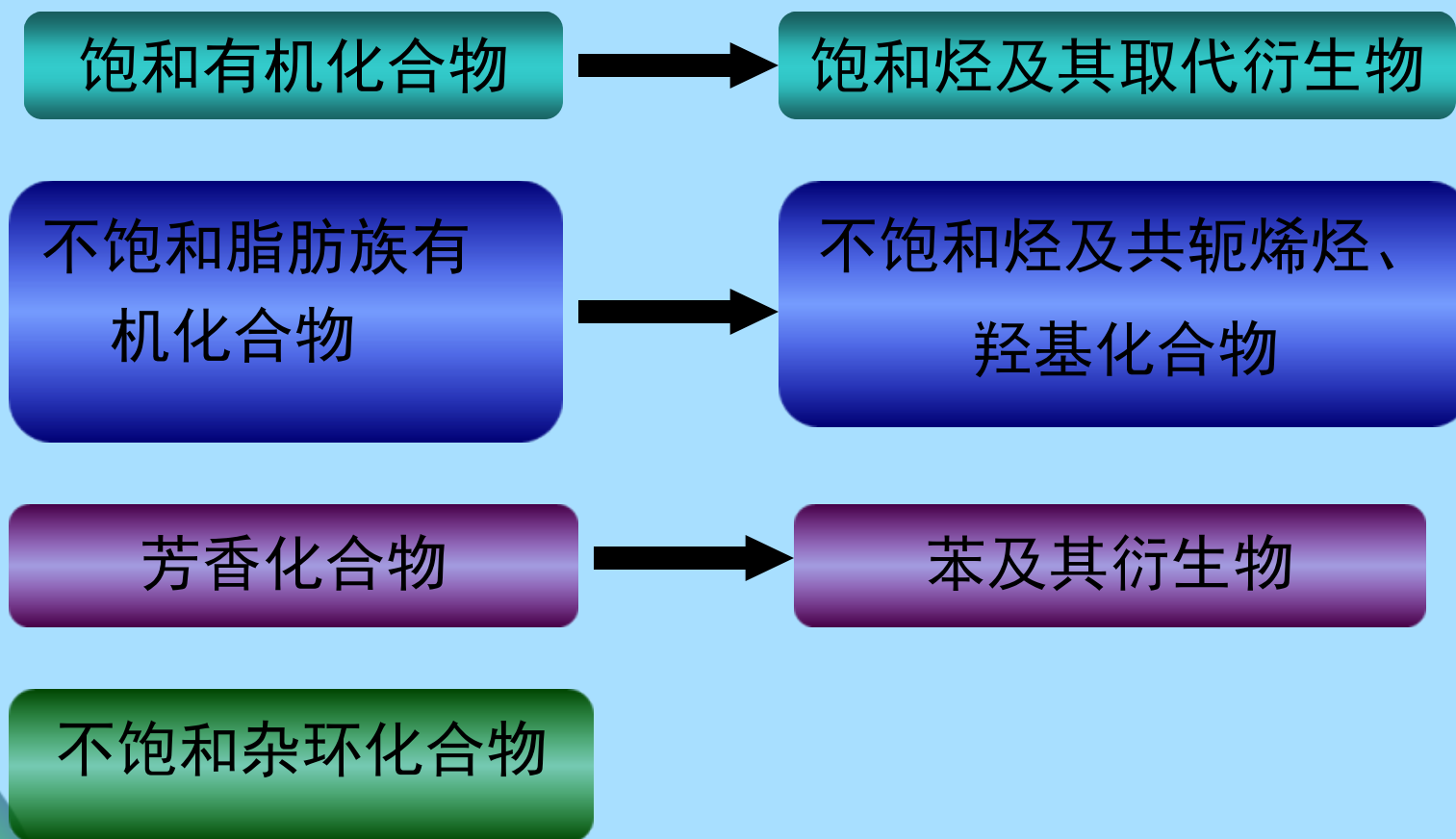
(5) 同一物质在不同波长下的 k 值是不同的。在最大吸收波长 λ_{\max} 处的摩尔吸光系数，常以 k_{\max} 表示。 k_{\max} 表明了该吸收物质最大限度的吸光能力，也反映了光度法测定该物质可能达到的最大灵敏度。

(6) k_{\max} 越大表明该物质的吸光能力越强，用光度法测定该物质的灵敏度越高。

(7) k 在数值上等于浓度为 1mol/L 、液层厚度为 1cm 时该溶液在某一波长下的吸光度。

三、紫外吸收光谱与分子结构的关系

有机化合物的紫外吸收光谱常被用作结构分析的依据：

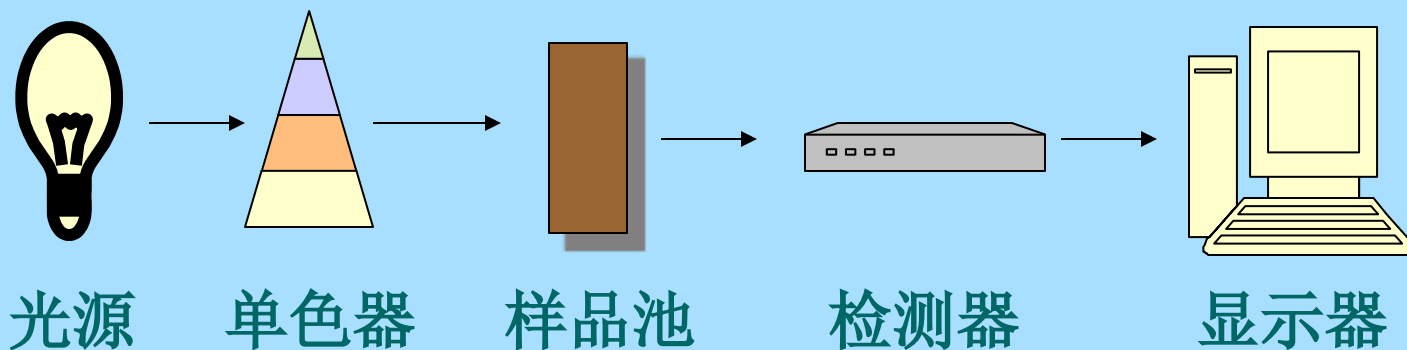


第二部分

紫外—可见分光光度计

一、紫外-可见分光光度计的基本构造

基本构造主要由光源、单色器、吸收池、检测器和显示器五大部分组成。



1. 光源

在整个紫外光区或可见光区可以发射连续光谱，具有足够的辐射强度、较好的稳定性、较长的使用寿命。

可见光区常用的光源是钨灯或碘钨灯，波长范围是350-1000 nm。

在紫外区常为氢灯或氘灯，发射的连续波长范围是180-360 nm。



图2.1.1 HAMAMATSU公司的一些氙灯外形



图2.1.2 HAMAMATSU公司的氙灯近视图

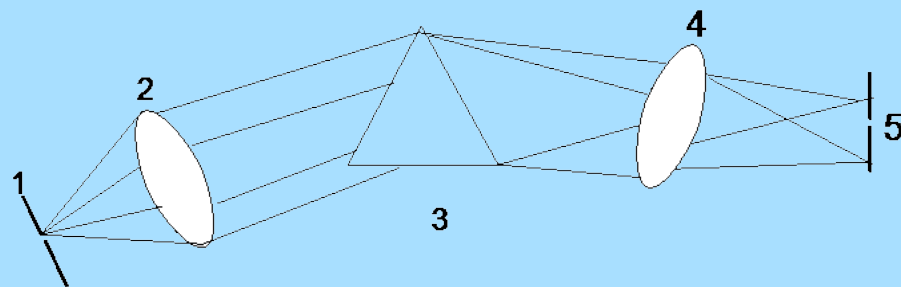
2. 单色器

单色器是将光源辐射的复合光分成单色光的光学装置。它是分光光度计的“心脏”部分。单色器一般由狭缝、色散元件及透镜系统组成。关键是色散元件，最常见的色散元件是棱镜和光栅。

狭缝：将单色器的散射光切割成单色光。直接关系到仪器的分辨率。狭缝越小，光的单色性越好。分为入射狭缝和出射狭缝。

棱镜：玻璃350~3200 nm，石英185~4000 nm。

光栅：波长范围宽，色散均匀，分辨性能好，使用方便。

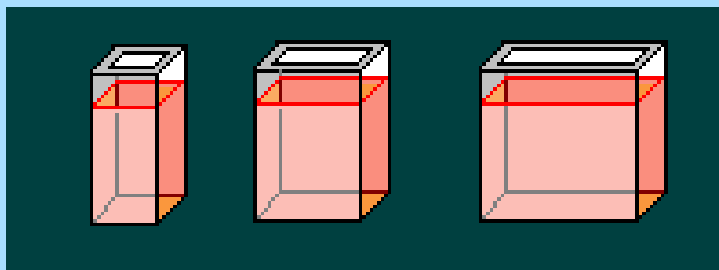


1. 入射狭缝 2. 准直透镜 3. 棱镜 4. 聚焦透镜 5. 出射狭缝

3. 吸收池

用于盛装试液的装置。吸收材料必须能够透过所测光谱范围的光。一般可见光区使用玻璃吸收池，紫外光区使用石英吸收池。规格有、 、 、 等。

在高精度的分析测定中（紫外区尤其重要）吸收池要挑选配对，因为吸收池材料的本身吸光特性以及吸收池的光程长度的精度等对分析结果都有影响。



4. 检测器

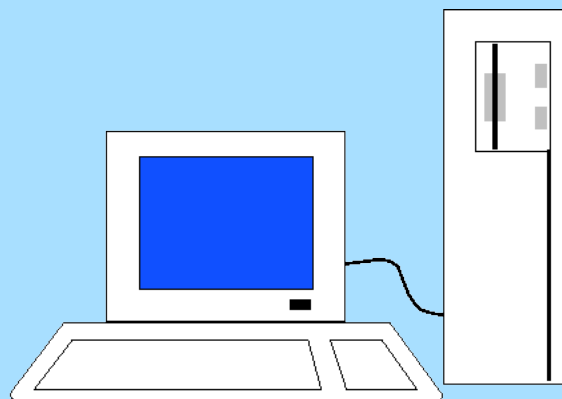
利用光电效应将透过吸收池的光信号变成可测的电信号，常用的有光电管、光电倍增管、光电二极管、光电摄像管等。

要求灵敏度高、响应时间短、噪声水平低、稳定性好的优点。

5. 显示器

将监测器输出的信号放大并显示出来的装置。

常用的液晶数字指示窗口和计算控制显示。



二、紫外-可见分光光度计的分类及特点

(一) 按仪器使用波长分类：

- ①真空紫外分光光度计 (0.1–200 nm) ；
- ②可见分光光度计 (350–700 nm) ；
- ③紫外-可见分光光度计 (190–1100 nm) ；
- ④紫外-可见-红外分光光度计 (190–2500 nm) ；

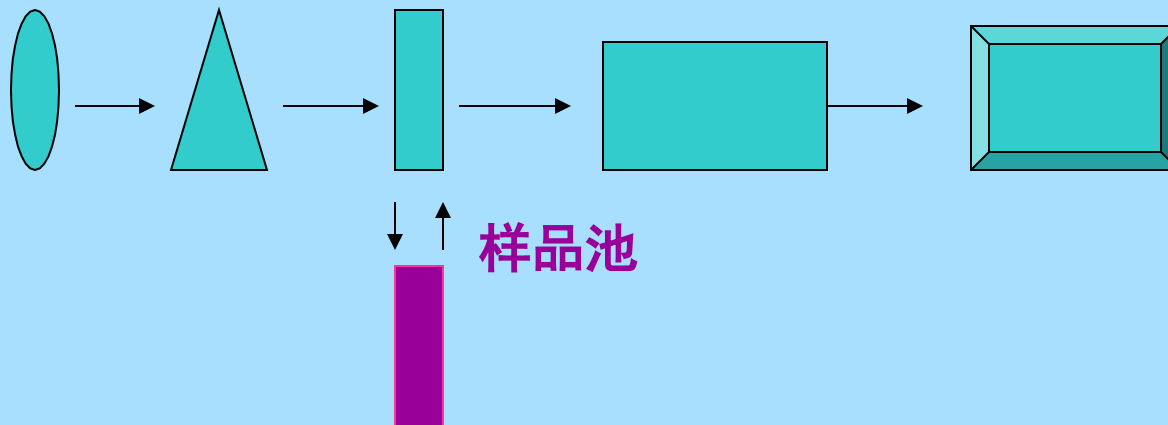
(二) 按仪器使用的光学系统分类：

- ①单光束分光光度计；
- ②双光束分光光度计
- ③双波长分光光度计
- ④动力学分光光度计

(1) 单光束分光光度计

经单色器分光后的一束平行光，轮流通过参比溶液和样品溶液，以进行吸光度的测定。

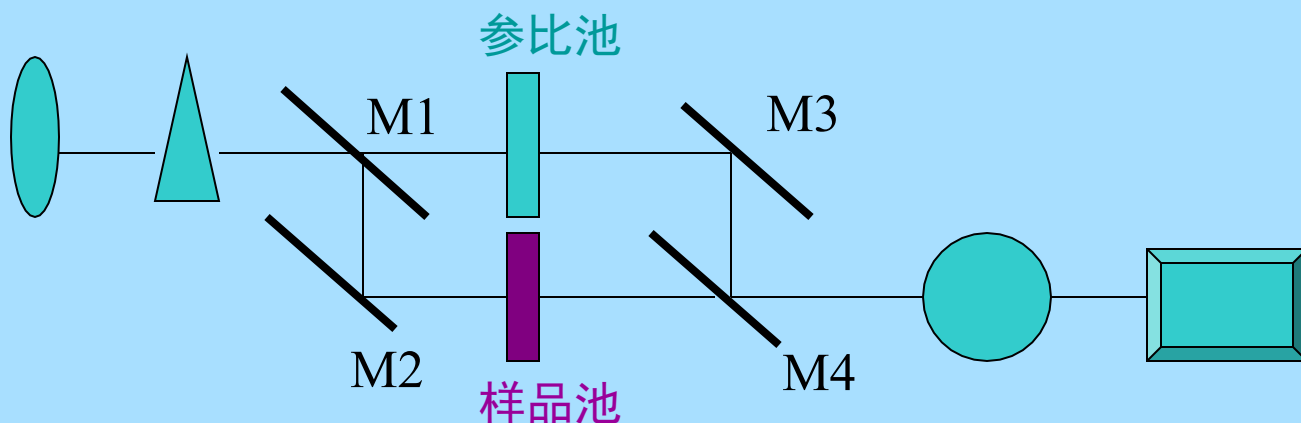
简单，价廉，适于在给定波长处测量吸光度或透光度，一般不能作全波段光谱扫描。要求光源和检测器具有很高的稳定性。



(2) 双光束分光光度计

经单色器分光后经反射镜分解为强度相等的两束光，一束通过参比池，一束通过样品池。光度计能自动比较两束光的强度，此比值即为试样的透射比，经对数变换将它转换成吸光度并作为波长的函数记录下来。

自动记录，快速全波段扫描。可消除光源不稳定、检测器灵敏度变化等因素的影响，特别适合于结构分析。仪器复杂，价格较高。

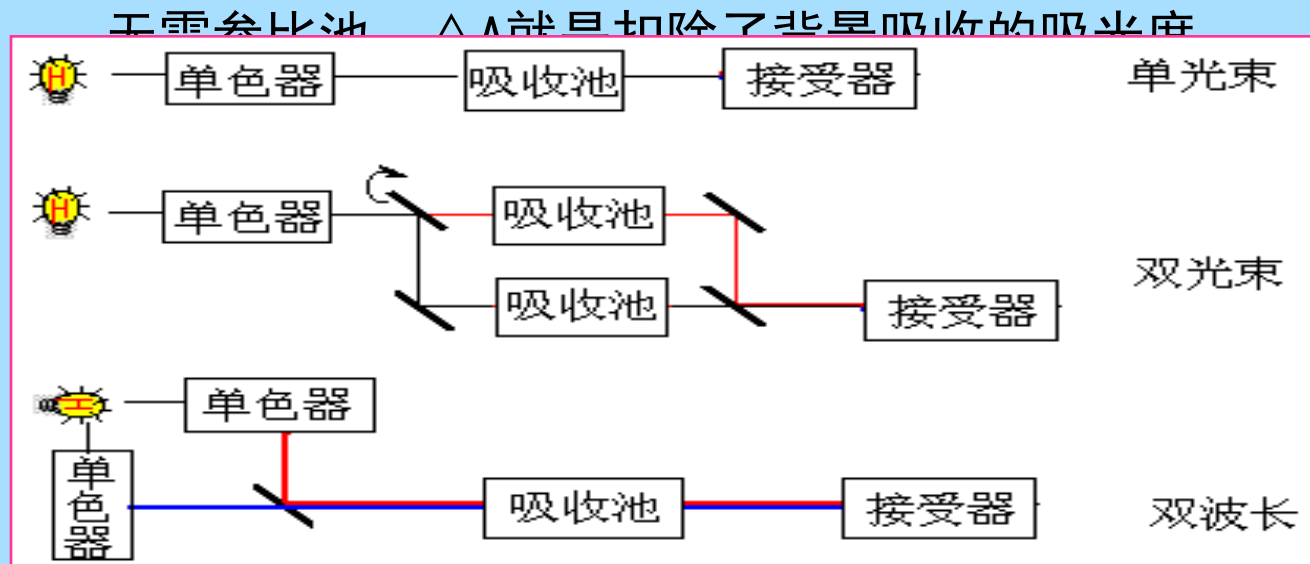


岛津UV-2450



(3) 双波长分光光度计

由同一光源发出的光被分成两束，分别经过两个单色器，得到两束不同波长 (λ_1 和 λ_2) 的单色光；通过折波器以一定的频率交替通过同一样品池，然后由检测器交替接收信号，最后由显示器显示出两个波长处的吸光度差值 ΔA 。



对于多组分混合物、混浊试样（如生物组织液）分析，以及存在背景干扰或共存组分吸收干扰的情况下，利用双波长分光光度法，往往能提高方法的灵敏度和选择性。利用双波长分光光度计，能获得导数光谱。

双波长
BECKMAN-DU_640



(4) 动力学分光光度计

解决在光化学反应、辐射化学反应和酶催化反应中，能量转化、酶的降解、生物合成等的反应变化。

特点：时间辨别、快速扫描、测定生物化学瞬间产物的吸收光谱和随时间变化值。

(三) 紫外-可见分光光度计主要技术指标

1. 波长范围：表示仪器能测定的波长范围。波长范围越大，仪器越好，这与仪器使用的灯有关。
2. 波长精度：表示仪器单色器波长误差程度。波长误差越小，仪器精度越高，这与仪器使用的单色器有关。
3. 杂散光：表示单色光的纯度，这与制作单色器的材料和加工工艺有关。

4. 光度的测量精度：表示仪器每次测定显示读数的精确度，即仪器能准确读小数点后几位。位数越多，仪器精度越高，这与仪器使用的检测系统有关。
5. 光度测量的重现性：每次A读数的重现性，这与仪器使用的检测器的质量有关。
6. 分辨率：表示仪器分辨吸收光谱微细结构的能力，即指仪器对于紧密相邻的峰可分辨的最小波长间距，这是衡量仪器性能的一个综合指标。

第三部分

紫外-可见吸收光谱法的应用

○ 一、定性分析

通常根据吸收光谱的形状、吸收峰的数目以及最大吸收波长的位置和相应的摩尔吸收系数进行定性鉴定。

一般采用比较光谱法：即在相同的测定条件下，比较待测物与已知标准物的吸收光谱曲线，如果它们的吸收光谱曲线完全等同，则可认为是同一物质。

在进行定性鉴定时，需要注意：

1. **测试溶剂**：应当对标准物和待测物有良好的溶解度，本身在测定的波长内无光的吸收，有良好的稳定性。
2. **测试的条件**：标准物和待测物测试条件要完全相同，如溶剂、PH、离子强度、温度及所用仪器等。
3. **更改测试条件**：为了防止测试数据的假象，要对现有某些条件进行适当的变换，改变其中的某些测定条件，然后看标准物和待测物的吸收光谱是否仍然完全相同。

○ 二、结构分析

判断所含官能团、有机化合物的同分异构体。

(例如：某一化合物在250-300nm有强吸收带，则表示存在苯环的特征吸收；若在210-350nm有强吸收带，则可能含有两个双键的共轭单位。)

○ 三、纯度鉴定

根据在吸收光谱最大吸收峰的位置和峰形状、数量判断该物质的纯度。

○ 四、定量分析

根据朗伯—比尔定律，物质在一定波长处的吸光度与它的浓度呈线性关系。所以通过测定溶液对一定波长入射光的吸光度，便可求得溶液的浓度和含量。紫外可见分光光度法不仅用于测定微量成分，而且用于常量组分和多组分混合物的测定。

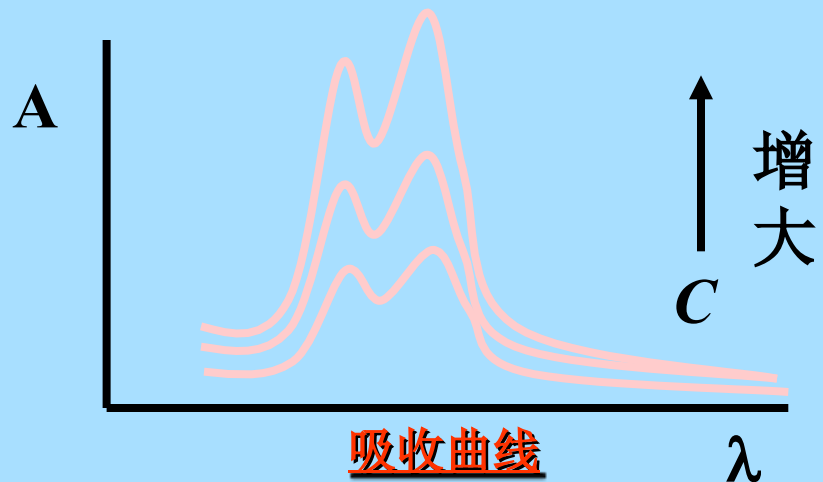
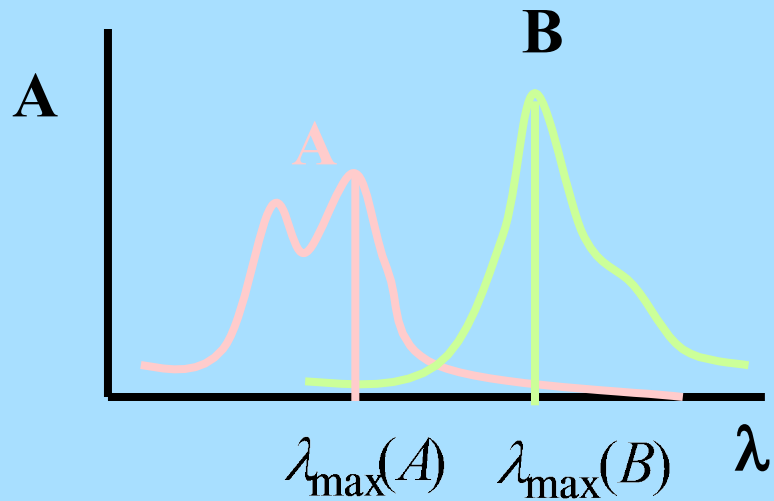
定性分析与定量分析的基础

定性分析基础

物质对光的选择吸收物质的电子结构不同，所能吸收光的波长也不同，这就构成了物质对光的选择吸收基础。

定量分析基础

在一定的实验条件下，物质对光的吸收与物质的浓度成正比。



- ★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} 。
- ★同一物质的浓度不同时，光吸收曲线形状相同，最大吸收波长不变，只是相应的吸收度大小不同。
- ★物质不同，其分子结构不同，则吸收光谱曲线不同，最大吸收波长也不同。

所以可以根据吸收光谱曲线对物质进行定性鉴定和定量分析。

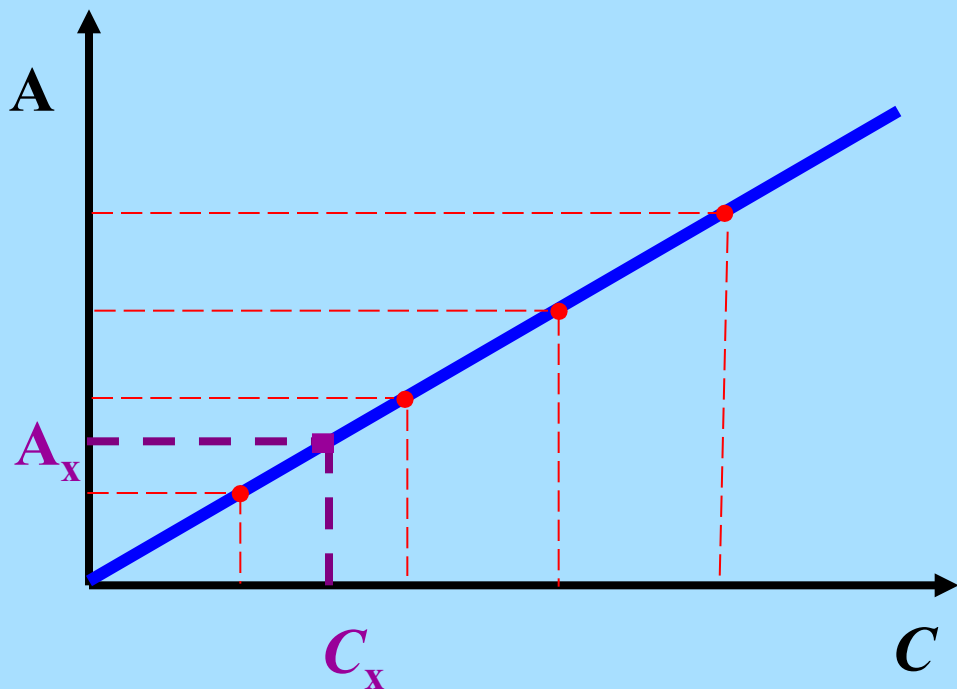
物质对光的吸收特征，可以用吸收曲线来描述。以入射光的波长 λ 为横坐标，溶液的吸光度A为纵坐标作图，得到的曲线即为该物质的紫外-可见吸收曲线或吸收光谱。

吸收曲线表明了物质对不同波长的入射光的吸收能力。

(一) 单波长分光光度法

- (1) 比较法：在相同的条件下配制样品溶液和标准溶液（与待测组分的浓度近似），在相同的实验条件和最大波长处分别测得吸光度 A_x 和 A_s ，然后进行比较，求得样品溶液中待测组分的浓度， $C_x = C_s \times (A_x/A_s)$ 。
- (2) 标准曲线法：首先配制一系列已知浓度的标准溶液，在最大吸收波长处分别测得标准溶液的吸光度，然后，做A-c的校正曲线（理想的曲线应为经过原点的直线）。在完全相同的条件下测出试液的吸光度，并从曲线上求得相应的试液的浓度。

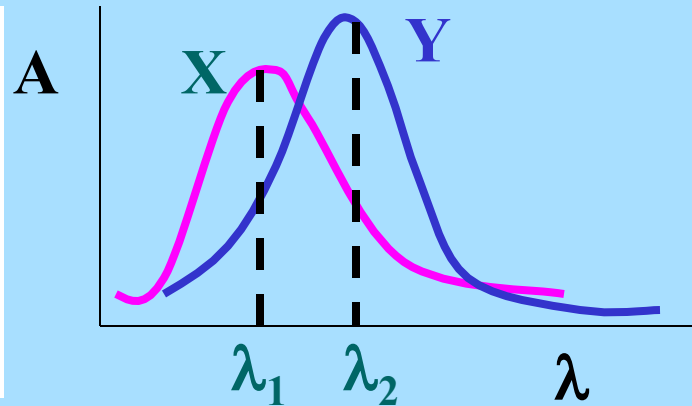
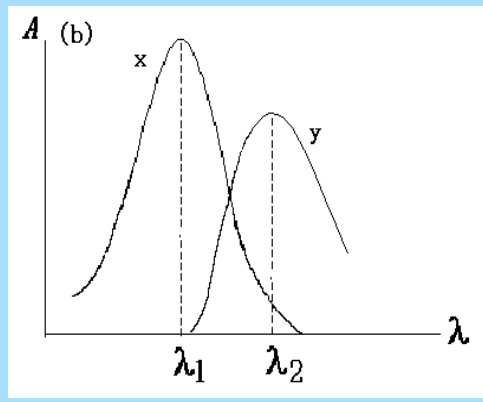
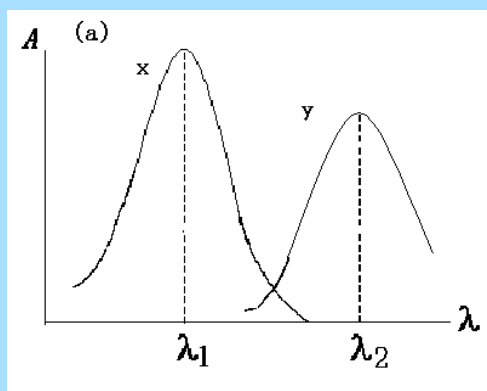
标准曲线/工作曲线制作



根据光的吸收定律：
吸光度与吸光物质的
含量成正比，这是光
度法进行定量的基础，
标准曲线就是根据这
一原理制作的。

2. 多组分物质的定量分析

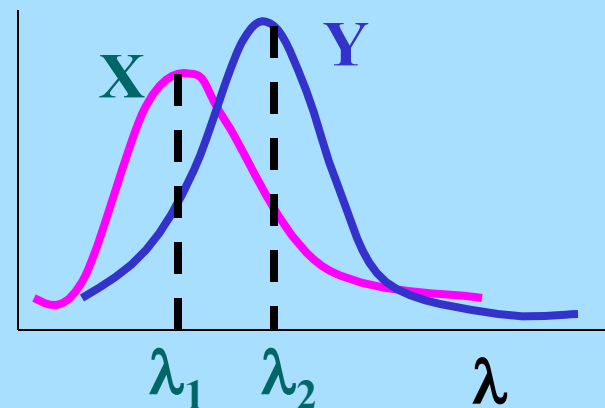
根据吸光度加和性原理，对于两种或两种以上吸光组分的混合物的定量分析，可不需要分离而直接测得。



根据加合性原则，解联立方程法

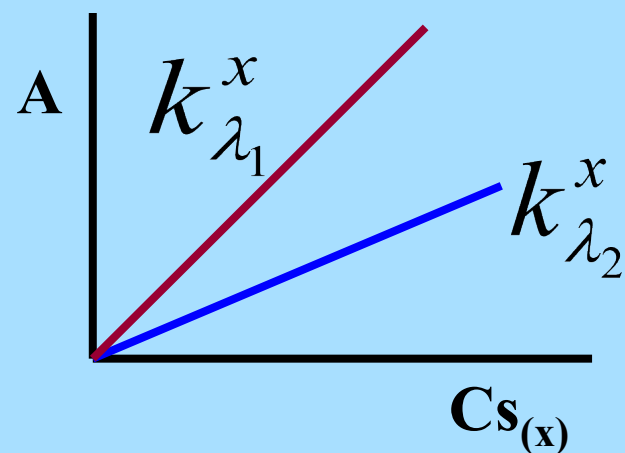
$$A_{\lambda_1} = A_{\lambda_1}^x + A_{\lambda_1}^y = k_{\lambda_1}^x bc_x + k_{\lambda_1}^y bc_y \quad \mathbf{A}$$

$$A_{\lambda_2} = A_{\lambda_2}^x + A_{\lambda_2}^y = k_{\lambda_2}^x bc_x + k_{\lambda_2}^y bc_y$$



k 为物质的特征参数，可通过配制标准溶液测得。

解联立方程，可求得 C_x , C_y



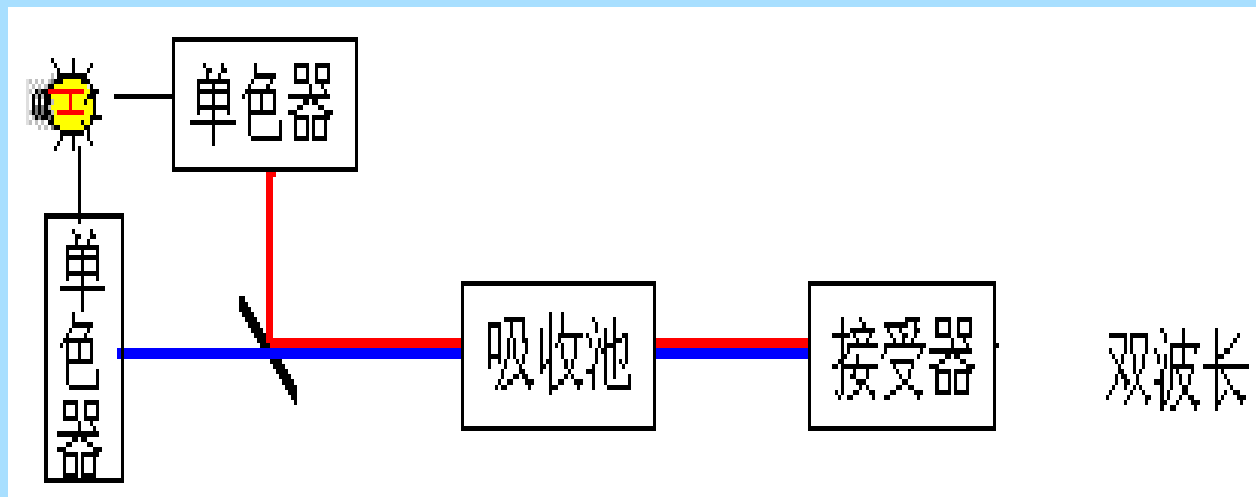
(二) 双波长分光光度法

不需空白溶液作参比；但需要两个单色器获得两束单色光(λ_1 和 λ_2)；以参比波长 λ_1 处的吸光度 A_{λ_1} 作为参比，来消除干扰。

对于多组分混合物、浑浊试样分析及存在背景干扰或共存组分吸收干扰的情况，利用双波长分光光度法灵敏度、选择性、测量精密度等方面都比单波长法有所提高。

$$\begin{aligned}\Delta A &= A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} \\ &= (k_{\lambda_2} - k_{\lambda_1}) b c\end{aligned}$$

两波长处测得的吸光度差值 ΔA 与待测组分浓度成正比。 k_{λ_1} 和 k_{λ_2} 分别表示待测组分在 λ_1 和 λ_2 处的摩尔吸光系数。



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/748030036135007001>