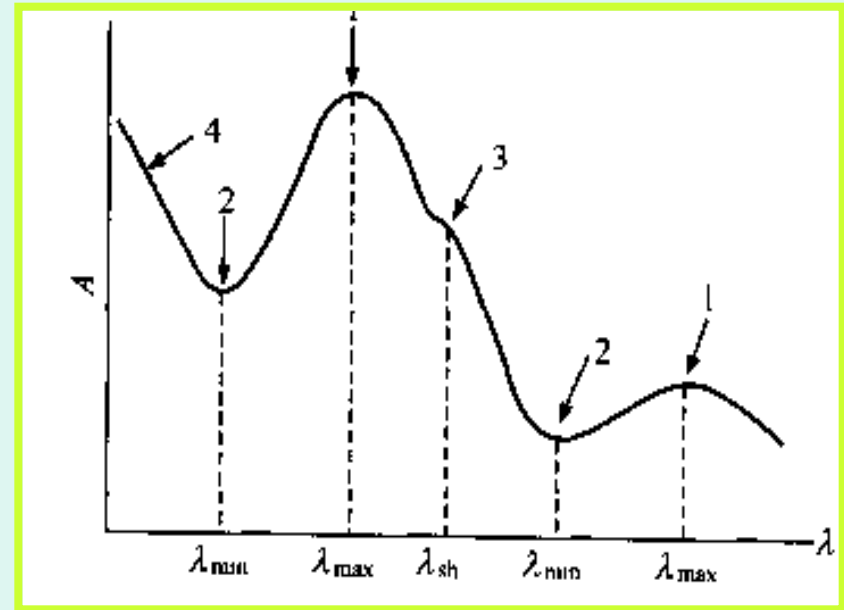


第三节 紫外可见分光光度分析方法

一、定性分析

- 吸收光谱特征数据
- 吸收度或吸收系数的比值



1. 对比吸收光谱特征数据

■ λ_{\max}

峰、谷、肩峰等可综合考虑

■ ε 或 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$

不同吸收基团（相同吸收基团）的不同化合物，可有相同的 λ_{\max} ，但吸收系数有明显差异

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \varepsilon \times 10/M \quad \varepsilon = M/10 E_{1\text{cm}}^{1\%}$$

例如 3位酮体4位烯键的甾体类化合物在
240nm处都有吸收峰

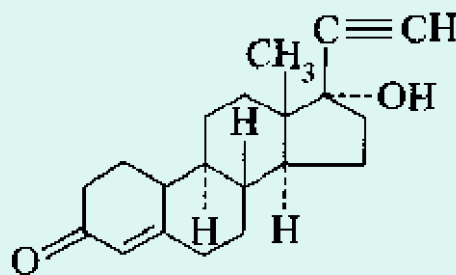
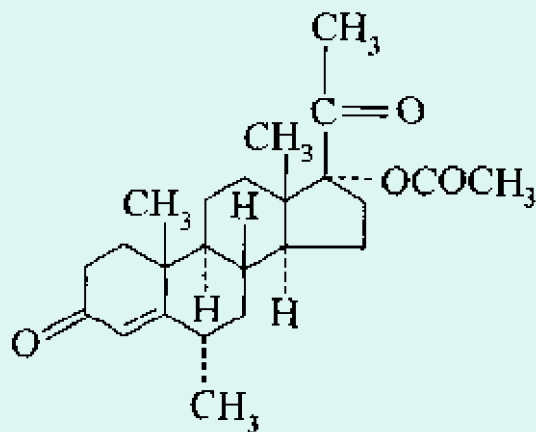
安宫黄体酮

$$E_{1cm}^{1\%} = 408$$

炔诺酮

$$= 571$$

有明显差别



2. 对比吸收度或吸收系数的比值

$$\begin{array}{l} \lambda_1 \text{ 处} \quad A_1 = E_1 cl \\ \lambda_2 \text{ 处} \quad A_2 = E_2 cl \end{array} \quad \frac{A_1}{A_2} = \frac{E_1}{E_2}$$

例如：VB₁₂的鉴别，2010版中国药典规定：

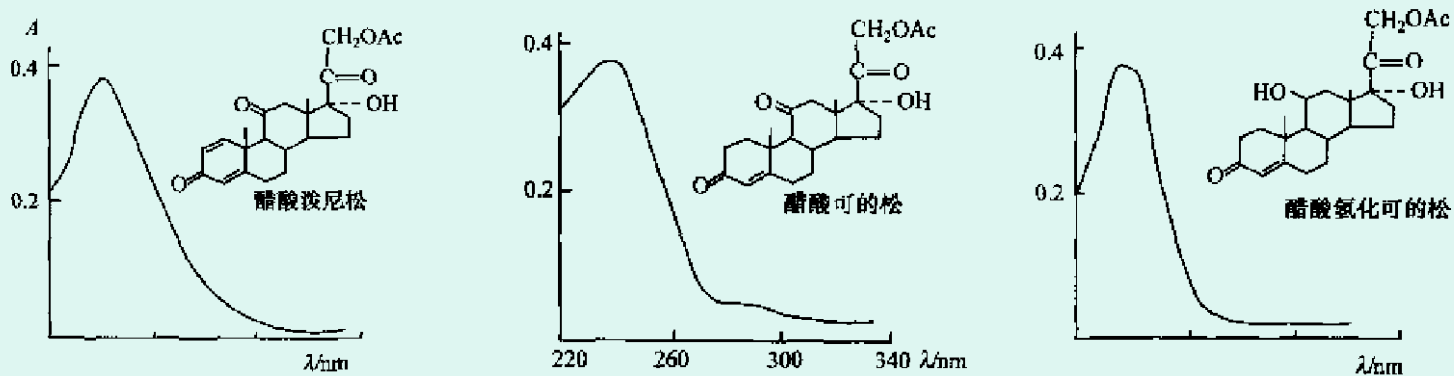
$$\frac{A_{361}}{A_{278}} = 1.70 \sim 1.88 \quad \frac{A_{361}}{A_{550}} = 3.15 \sim 3.45$$

3. 对比吸收光谱的一致性

例如：醋酸泼尼松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松有几乎完全相同的光谱数据

| | | |
|------------------|------------------------|--------------------------------------|
| λ_{\max} | $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ | ϵ |
| 240nm | 390 | 1.57×10^4 |

但从它们的吸收光谱上可看出其中的差别

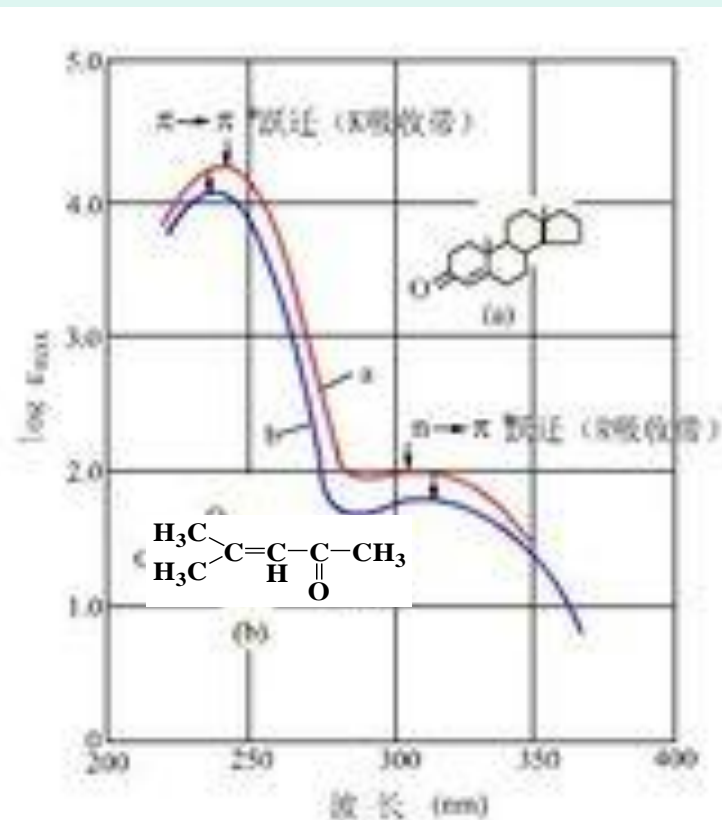


用紫外吸收光谱进行定性时需注意：

■ 当两种纯化合物的吸收光谱有明显差别时，可以肯定是两个**不同**的化合物，

■ 而两吸收光谱

相同时，不能肯定是同一化合物。



结构相差大，但图谱相似

二、纯度检查

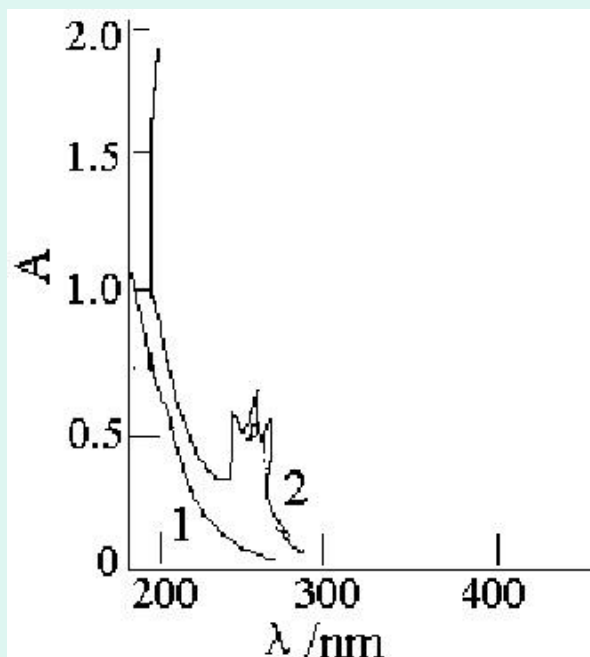
1. 杂质检查

若：化合物 无吸收

杂质

有较强吸收

可被查出



乙醇中含苯量

低至10ppm也可查出

1. 杂质检查

若：化合物
杂质

有较强吸收
无或吸收较弱

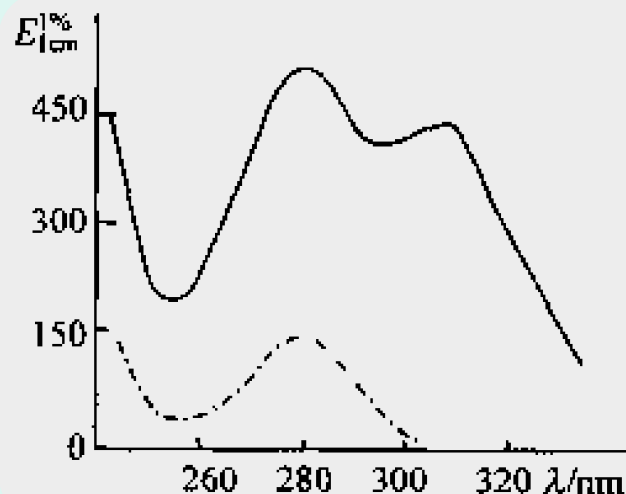
$E_{\text{化合物}} \downarrow$

若：化合物
杂质

有吸收
有更强吸收

$E_{\text{化合物}} \uparrow$

杂质有吸收时，导致化合物的吸收光谱变形。



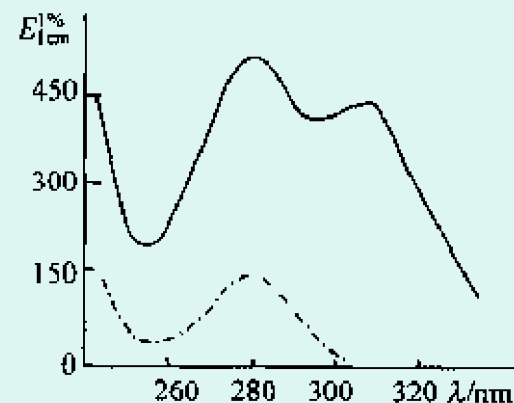
2. 杂质限量检查

- 药物中杂质，常需制定一个允许其存在的限量。

例如：

肾上腺酮 → 肾上腺素

在310nm处 肾上腺酮有较强吸收
肾上腺素吸收很小



为控制肾上腺素中肾上腺酮的量，产品用紫外吸收光度法测定时，要求 $A < 0.05$

根据 $A = Ecl$ 当 $A = 0.05$ 时

$$c = \frac{A}{El} = \frac{0.05}{435 \times 1} = 0.00012 \text{ g} / 100 \text{ ml}$$

产品溶液：2mg/ml = 0.2g/100ml

杂质含量：

$$\frac{c_{\text{杂质}}}{c_{\text{产品}}} \times 100\% = \frac{0.00012}{0.2} \times 100\% = 0.06\%$$

有时用 $A_{\text{峰}}/A_{\text{谷}}$ 来控制杂质限量

例如：碘磷定

$\lambda_{\text{max}}=294\text{nm}$ 杂质无吸收

$\lambda_{\text{min}}=262\text{nm}$ 杂质有吸收

碘磷定纯品 $\frac{A_{294}}{A_{262}} = 3.39$

若有杂质 $A_{262} \uparrow \frac{A_{294}}{A_{262}} \downarrow$

三、单组分的定量方法

λ 选择的原则

- 选吸收峰 λ_{\max} 处
- 避免干扰
- 不选末端吸收处

提高灵敏度

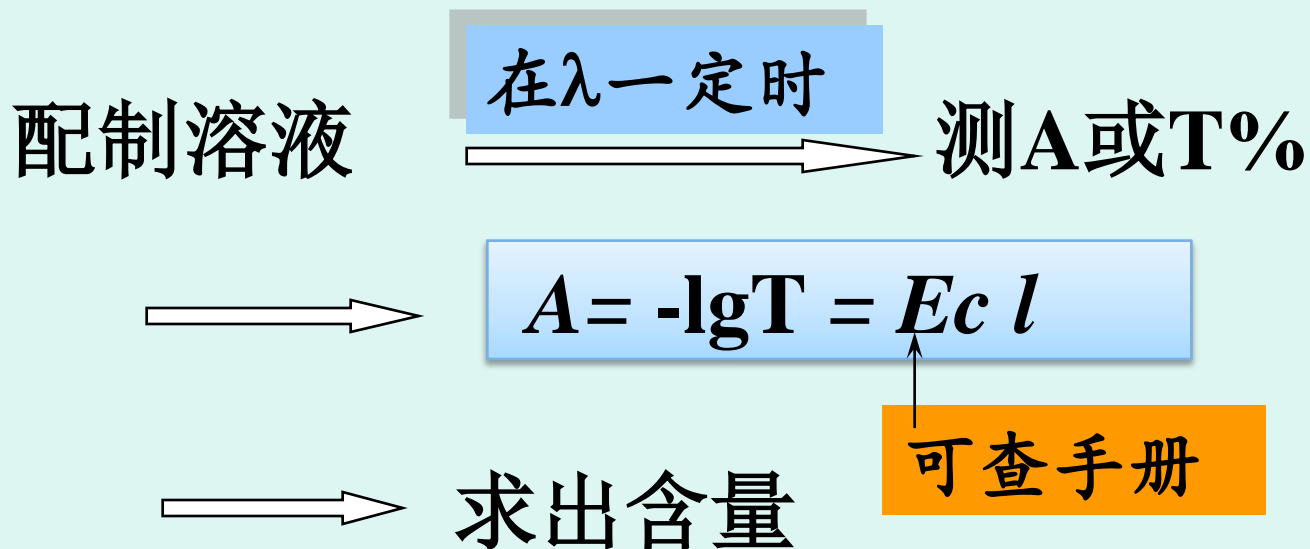
许多溶剂在短波长处有吸收

部分溶剂的截止波长

| 溶剂 | 极限波长 (nm) |
|----|------------|
| 乙醚 | 210 |
| 乙醇 | 215 |
| 氯仿 | 245 |
| 水 | 200 |

组分的测定波长必须大于溶剂的截止波长

(一) 吸光系数法



例：VB₁₂样品水溶液，1cm吸收池中， $\lambda = 361\text{nm}$ 处测得A为0.414，已知E=207，计算溶液浓度。

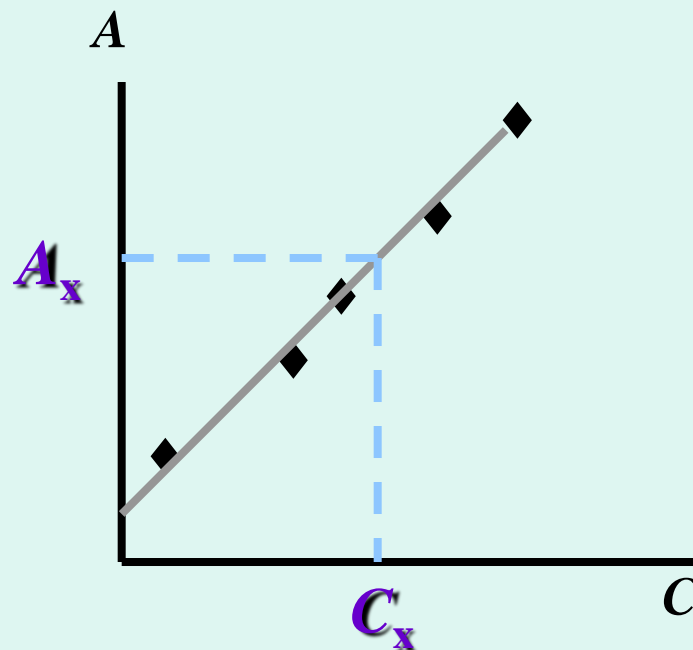
解：

$$c = A/El = 0.414/207 = 0.00200 \quad (\text{g}/100\text{ml})$$

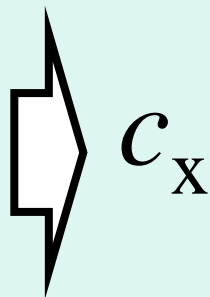
(二) 校正曲线法

对同一台仪器，在
相同条件下：

$$A = Kc$$



- 工作曲线
- 回归方程



C_x

(三) 对照法

标准溶液
样品溶液



相同条件下配制



相同条件下
选定波长处测定

$$A_s = E c_s l$$

$$A_x = E c_x l$$

$$\frac{A_s}{A_x} = \frac{E c_s l}{E c_x l}$$

$$\frac{A_s}{A_x} = \frac{c_s}{c_x}$$

$$c_x = c_s \cdot \frac{A_x}{A_s}$$

离解常数的测定，浓度为c



酸性时: $A_{\text{HA}} = \varepsilon_{\text{HA}} c$

碱性时: $A_{\text{A}^-} = \varepsilon_{\text{A}^-} c$



两者之间时，
A加合性

$$A = A_{\text{HA}} + A_{\text{A}^-} = \varepsilon_{\text{HA}} c \delta_{\text{HA}} + \varepsilon_{\text{A}^-} c \delta_{\text{A}}$$

$$A = \varepsilon_{\text{HA}} \frac{c[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} + \varepsilon_{\text{A}^-} \frac{cK_a}{K_a + [\text{H}^+]}$$

$$K_a = \left(\frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{\text{A}^-}} \right) \cdot [\text{H}^+]$$

$$K_a = \left(\frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{A^-}} \right) \cdot [\text{H}^+] \Rightarrow \text{p}K_a = \text{pH} - \lg \left(\frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{A^-}} \right)$$

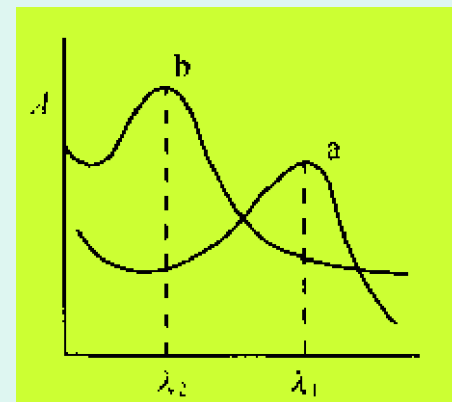
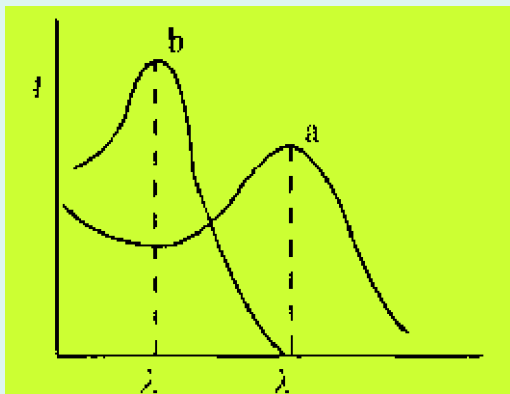
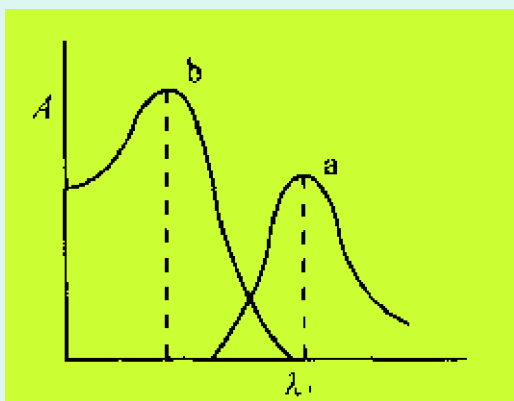
例:

$$\text{p}K_a = 4 - \lg \left(\frac{0.002 - 0.430}{0.430 - 1.024} \right) = 4.14$$

$$K_a = \left(\frac{0.002 - 0.430}{0.430 - 1.024} \right) \cdot [10^{-4}]$$

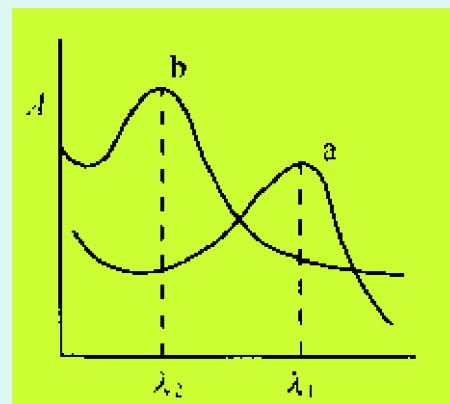
四、多组分的定量方法-计算分光光度法

- 解联立方程组
- 双波长法
- 导数光谱法



解联立方程组

利用吸光度的加和性



$$\lambda_1: A_1^{a+b} = A_1^a + A_1^b = E_1^a c_a l + E_1^b c_b l$$

$$\lambda_2: A_2^{a+b} = A_2^a + A_2^b = E_2^a c_a l + E_2^b c_b l$$

(一) 双波长法

波长选择

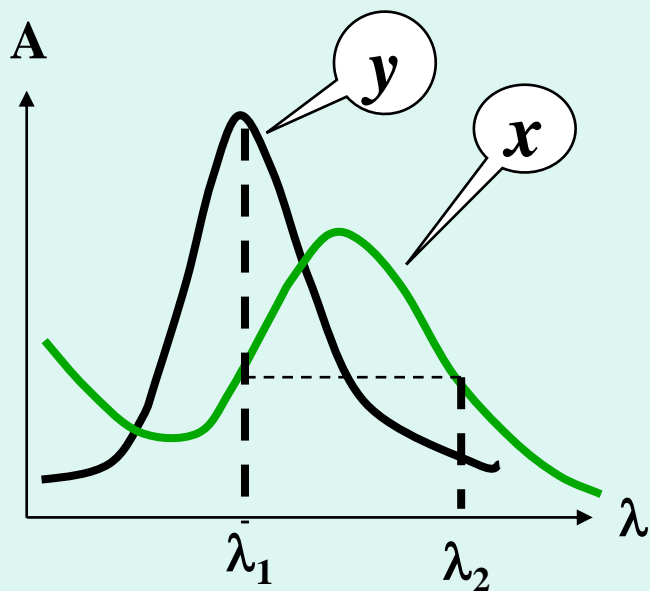
λ_1 、 λ_2

干扰组分

- 两个波长处具有相同的 A

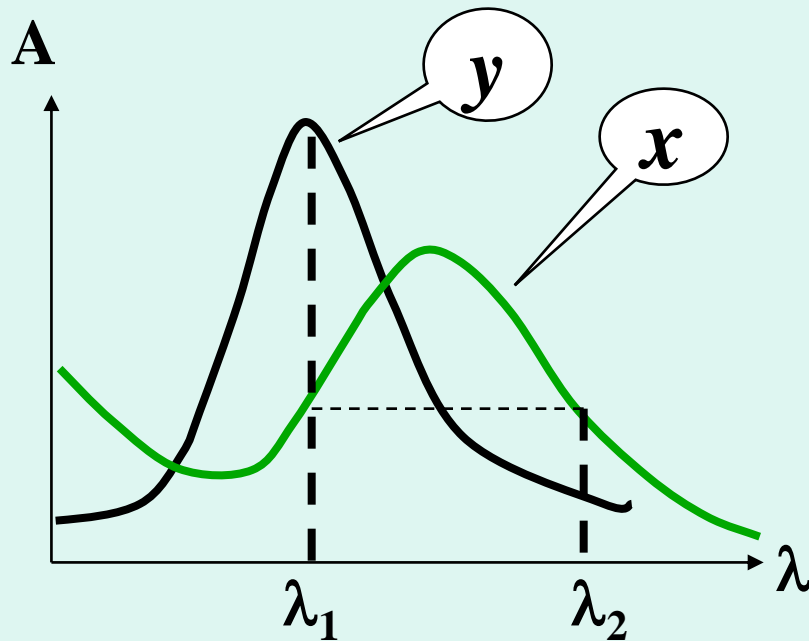
待测组分

- 两波长处的 ΔA 足够大



选择 λ_1 、 λ_2 使:

$$\mathbf{A}_2^x = \mathbf{A}_1^x$$



$$\lambda_1 \text{处} \quad \mathbf{A}_1 = \mathbf{A}_1^x + \mathbf{A}_1^y$$

$$\lambda_2 \text{处} \quad \mathbf{A}_2 = \mathbf{A}_2^x + \mathbf{A}_2^y$$

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{A} &= \mathbf{A}_2 - \mathbf{A}_1 = (\cancel{\mathbf{A}_2^x} + \mathbf{A}_2^y) - (\cancel{\mathbf{A}_1^x} + \mathbf{A}_1^y) \\ &= \mathbf{A}_2^y - \mathbf{A}_1^y = (\mathbf{E}_2^y - \mathbf{E}_1^y) C_y l \end{aligned}$$

(二) 导数光谱法

- 如果将一个吸收光谱写成一个波长的函数：

$$A = cf_{(\lambda)}$$

它的导函数的图像就是导数光谱。

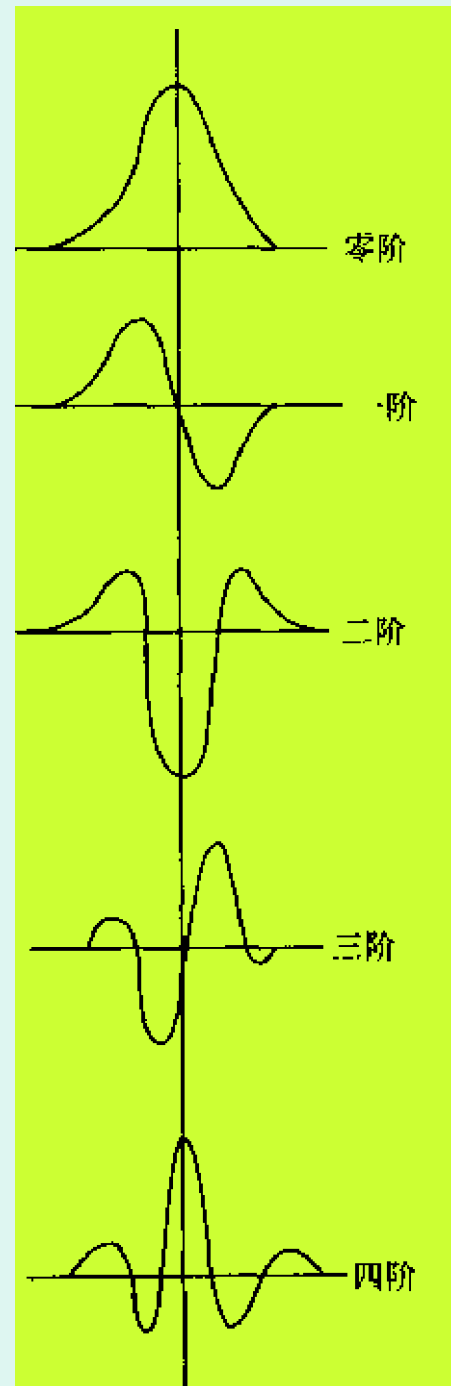
$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\varepsilon}{d\lambda} cl$$

1. 导数光谱的波型和特点

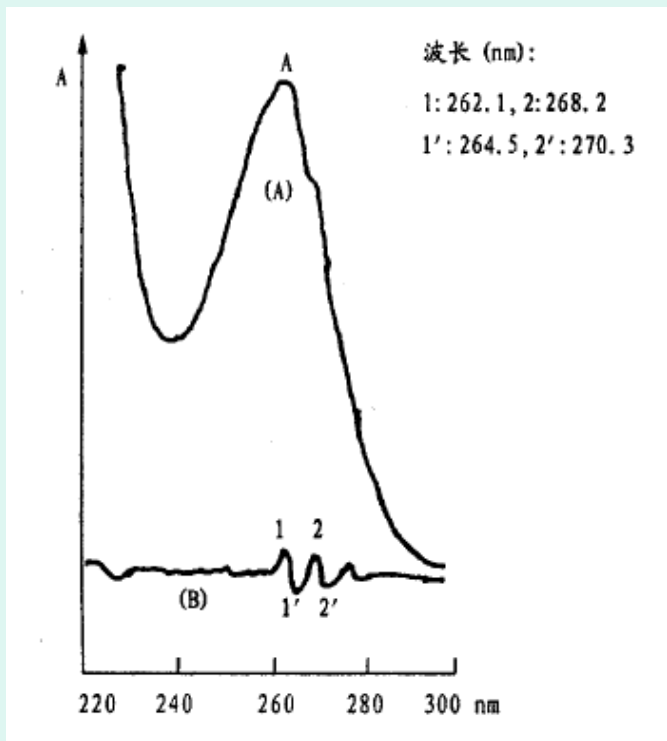
峰位：在奇数阶光谱中为0，
在偶数阶光谱中为极值。

拐点：在偶数阶光谱中为0，
在奇数阶光谱中为极值。

导数阶数 \uparrow ，峰数 \uparrow ，峰
形更锐，分辨能力 \uparrow 。

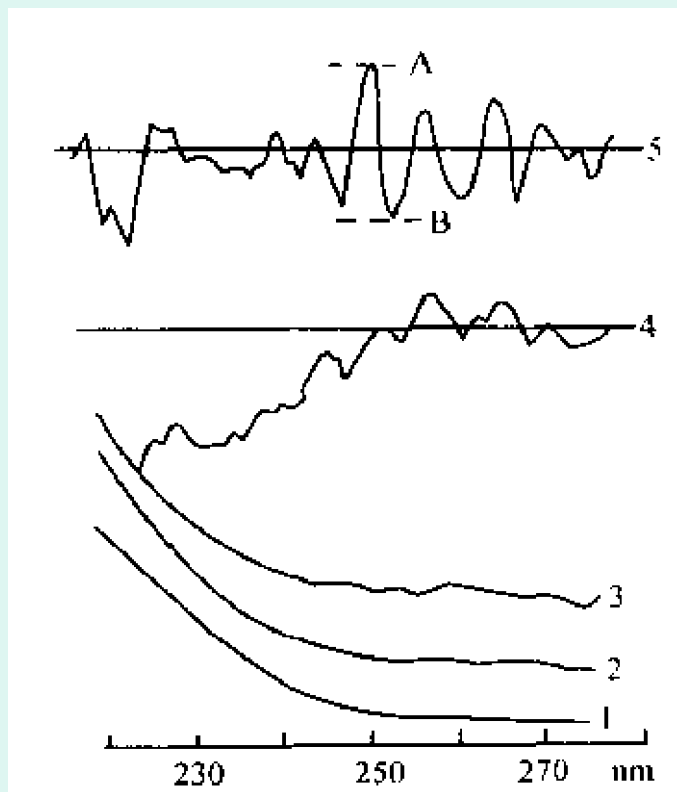


随导数阶数增加，分辨率提高



(A) 0阶导数光谱

(B) 4阶导数光谱



1-空白醇 2-醇中含苯0.0001%

3-醇中含苯0.001%

4-含苯0.0001%二阶

5-含苯0.0001%四阶

2. 导数光谱对干扰吸收的消除

若能把干扰吸收表达为一个幂函数：

$$A_{\text{干}} = a_0 + a_1\lambda + a_2\lambda^2 + a_3\lambda^3 + \dots + a_n\lambda^n$$

求一阶导数后

$$A'_{\lambda} = a_1 + 2a_2\lambda + 3a_3\lambda^2 + \dots + na_n\lambda^{n-1}$$

求n阶导数后

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = n!a_n$$

3. 导数光谱的定量原理

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\varepsilon}{d\lambda} cl$$

当 λ 一定时 ε 固定 $\frac{d\varepsilon}{d\lambda}$ 是一定值

在任意一波长处，导数光谱上的数值
应与浓度成正比。

4. 定量数据的测量

基线法

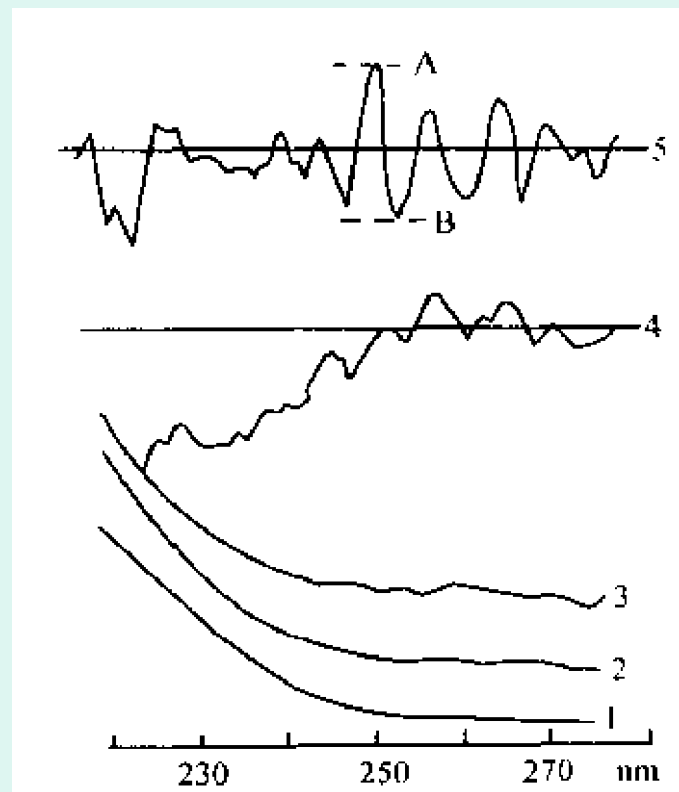
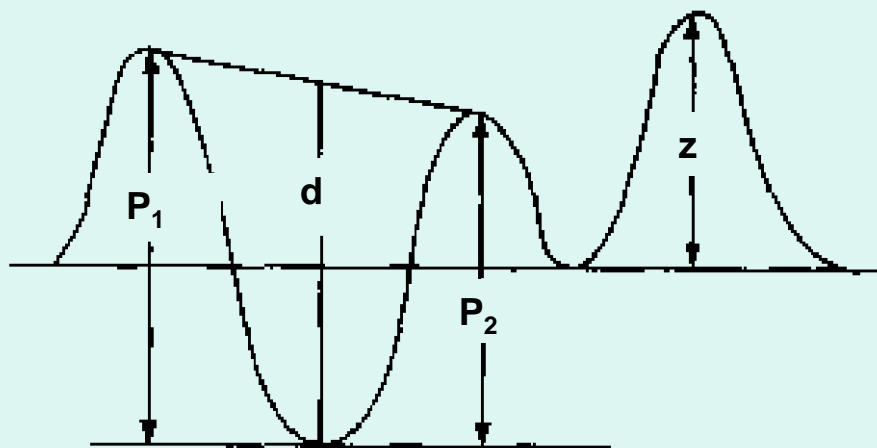
$$d \propto C$$

峰谷法

$$p \propto C$$

峰零法

$$z \propto C$$



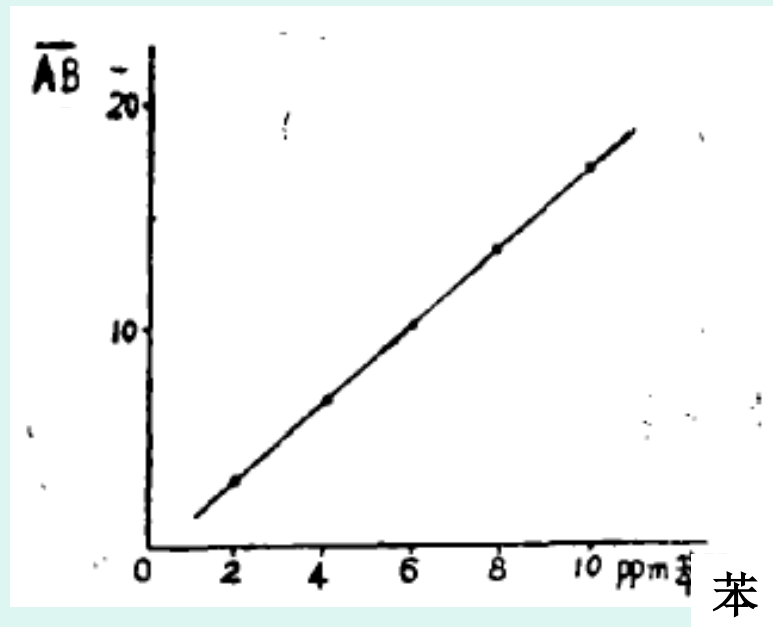
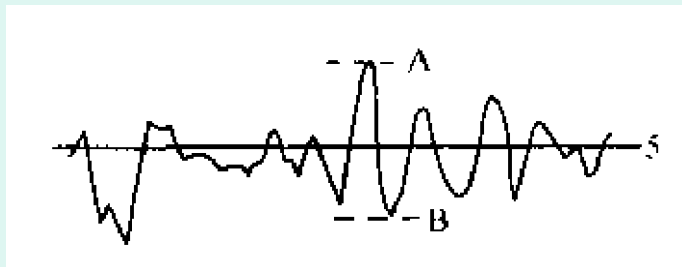
1-空白醇 2-醇中含苯0.0001%

3-醇中含苯0.001%

4-含苯0.0001%二阶

5-含苯0.0001%四阶

定量分析



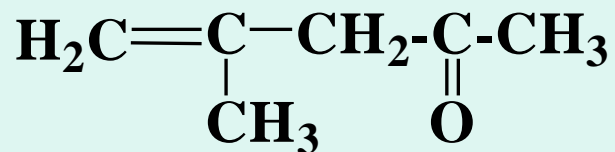
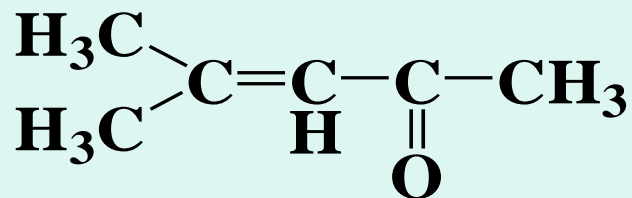
$$\overline{AB} \propto c_{\text{苯}}$$

五、 结构分析

(一) 有机化合物的紫外吸收光谱

- 是基团的特征。单独用紫外光谱不能完全确定物质的分子结构。
- 可以推定分子的骨架、判断生色团之间的共轭关系和估计共轭体系中取代基的种类、位置和数
- 与**IR**、**MS**和**NMR**等配合能发挥较大作用

举例



I. λ_{max} 235nm, ϵ 12000

II. >220nm 无吸收

1.饱和碳氢化合物

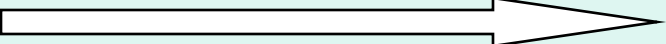
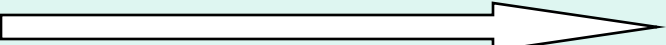
只有 σ 电子 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁

ΔE 大 吸收峰位于短波区（真空紫外区）

在200~400nm没有吸收 可用做溶剂

2. 含孤立助色团和生色团的饱和化合物

■ 助色团 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁

| | —Cl | —Br | —I |
|-------------------------------------|--|-------|----------|
| | 173nm | 208nm | 256nm |
| $\Delta E_{n \rightarrow \sigma^*}$ |  | | |
| 吸收峰 |  | | |
| | | | 变小 长移 |

■ 孤立生色团

| | | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| $n \rightarrow \sigma^*$ | $\pi \rightarrow \pi^*$ | $n \rightarrow \pi^*$ |
| ~190nm | 150~180nm | 275~295nm |

3.共轭烯烃

共轭后， $\Delta E \pi \rightarrow \pi^*$ 变小，吸收峰长移

随共轭体系增加，长移增加， ϵ 增大，
化合物由无色逐渐变为有色。

乙烯

~ 170nm

10,000

丁二烯

~ 210nm

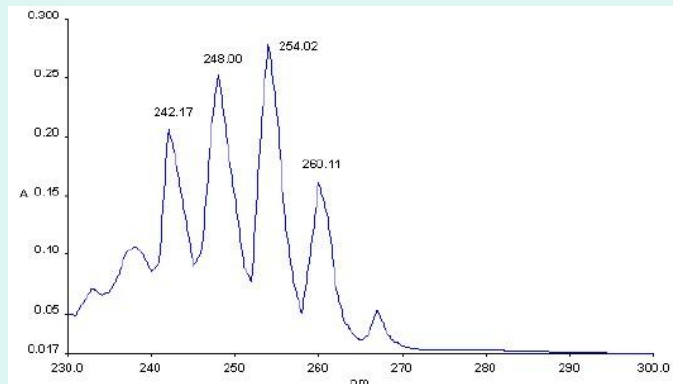
>20,000

4. α, β 不饱和醛、酮、酸和酯

| 一般规律 | $\pi \rightarrow \pi^*$ | $n \rightarrow \pi^*$ | ϵ |
|--|-------------------------|-----------------------|-------------|
| 孤立乙烯 | ~200nm | | $\sim 10^4$ |
| 孤立羰基 | | ~280nm | <100 |
| $\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ -H | 200~260nm | 310~350nm | $\sim 10^4$ |
| $\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ -OR | 长移 | 短移 | |

5. 芳香族化合物

(1) 苯和取代苯



E₁带 ~180nm

E₂带 ~200nm

} 强吸收

B带

(芳香族化合物的特征吸收)

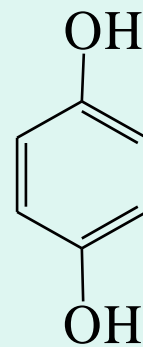
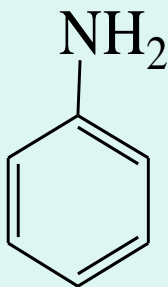
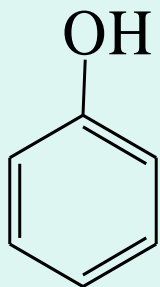
在极性溶剂中吸收较弱
精细结构消失

在非极性溶剂中精细结构
较清楚

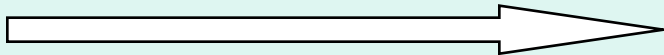
取代苯

E₁ E₂ B带长移, ϵ 增加

取代基不同, 红移效应不同。



λ_{\max}



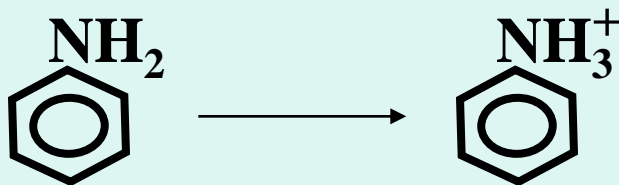
助色团取代

$n-\pi^*$ 共轭:

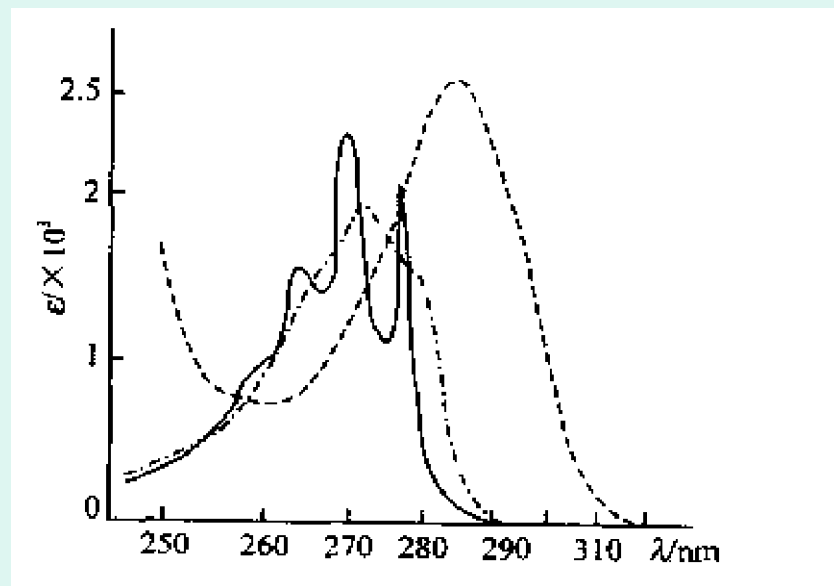
E_2 、 B 带长移 ϵ 增加 精细结构消失



$n-\pi^*$ 共轭加强



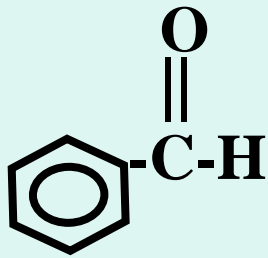
$n-\pi^*$ 共轭消失



不同溶剂对苯酚吸收光谱的影响

生色团取代

- 在200~250nm处出现K带
- B带长移

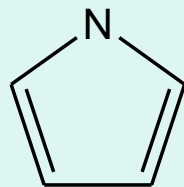


有K、B、R带

(2) 芳杂环化合物

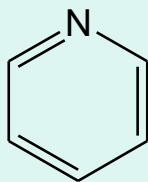
■ 饱和五元、六元杂环 $\lambda < 200\text{nm}$

■ 五元不饱和



λ_{max} 210nm
 ϵ 1.5×10^4

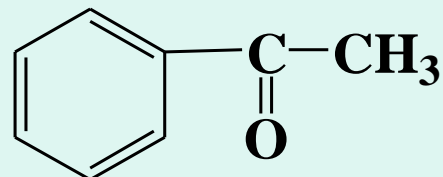
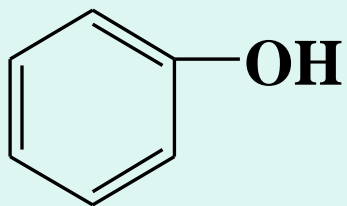
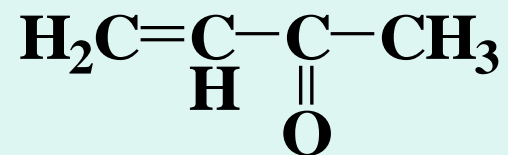
■ 六元不饱和



λ_{max} 240-260nm
270

ϵ 2×10^3
 4.5×10^2

以下有哪些跃迁和吸收带



(二) 有机化合物结构的研究

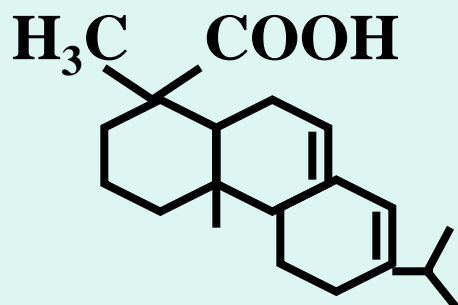
1. 推断官能团

| 吸收峰位置(λ) | 吸收强弱 | 官能团推断 |
|--------------------|------|----------|
| 210 ~ 250nm | 强 | 共轭双键 |
| 260 ~ 300nm | 强 | 3~5个共轭单位 |
| 250 ~ 300nm | 弱 | 羰基存在 |
| 250 ~ 300nm | 中强 | 苯环特征 |

220~800nm无吸收 ($\epsilon < 1$)：脂肪族饱和碳氢化合物、胺、腈、醇、醚、羧酸、氯(氟)代烃等。

2. 异构体的推定

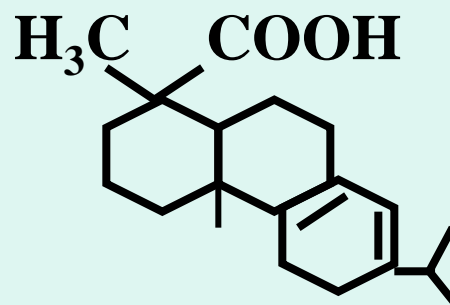
(1) 结构异构



$$\lambda_{\max} = 238\text{nm}$$

$$\varepsilon 15,100$$

松香酸
无立体障碍

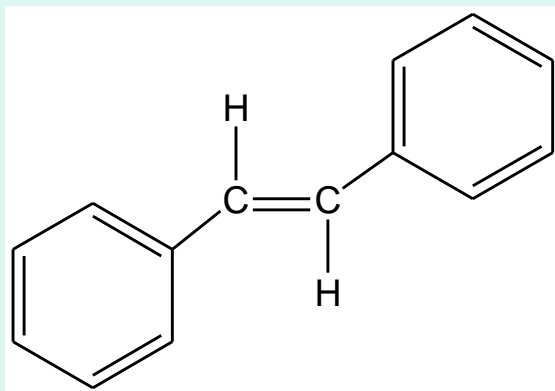


$$\lambda_{\max} = 273\text{nm}$$

$$\varepsilon 7,100$$

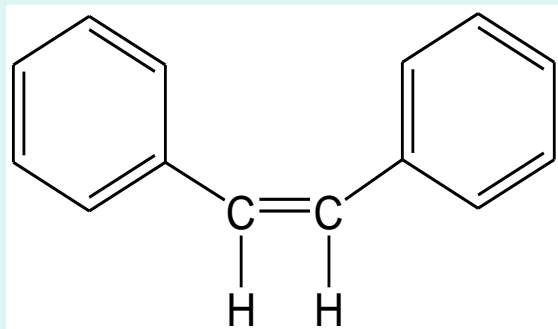
左旋松香酸

异构体的推定 (2) 顺反异构



λ_{\max} 295.5nm

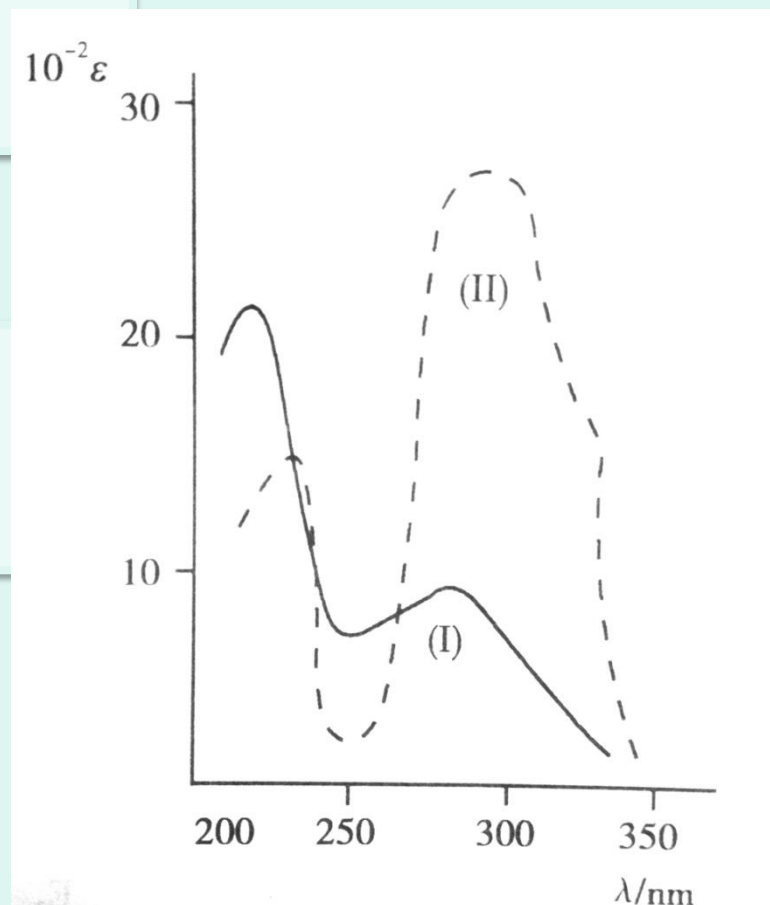
ϵ 29,000



λ_{\max} 280nm

ϵ 10,500

位阻效应



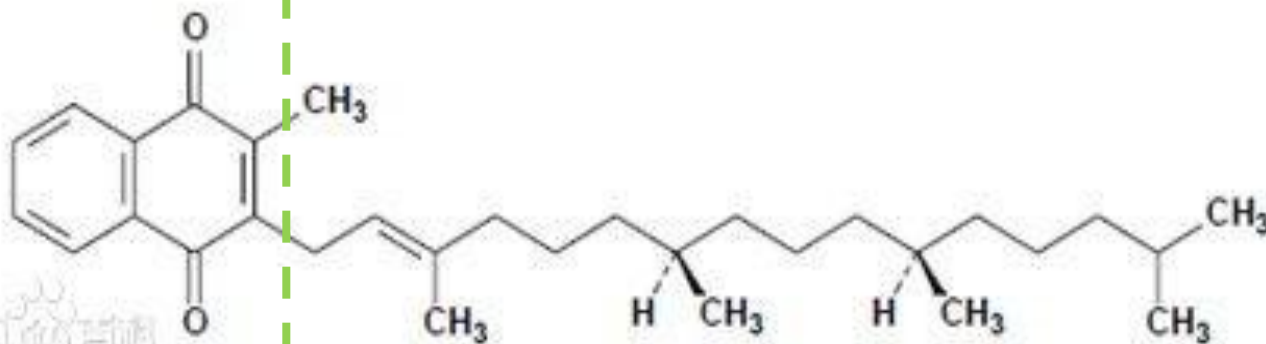
3. 化合物骨架的推定

VK₁

$$\lambda_{\max} = 250\text{nm} \quad \lg \epsilon \ 4.6$$

$$\lambda_{\max} = 330\text{nm} \quad \lg \epsilon \ 3.8$$

1,4-萘醌
文献值

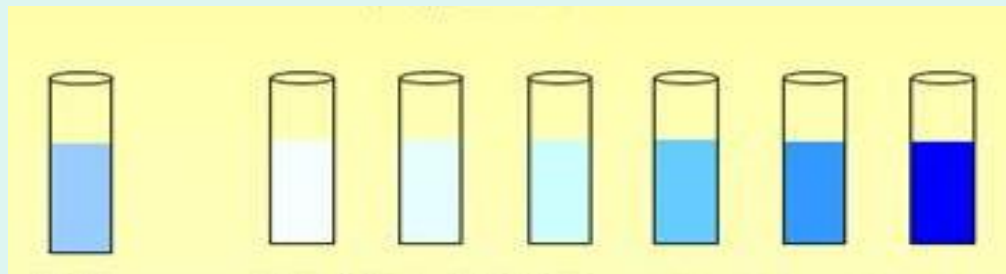


$$\lambda_{\max} = 249\text{nm} \quad \lg \epsilon \ 4.28$$

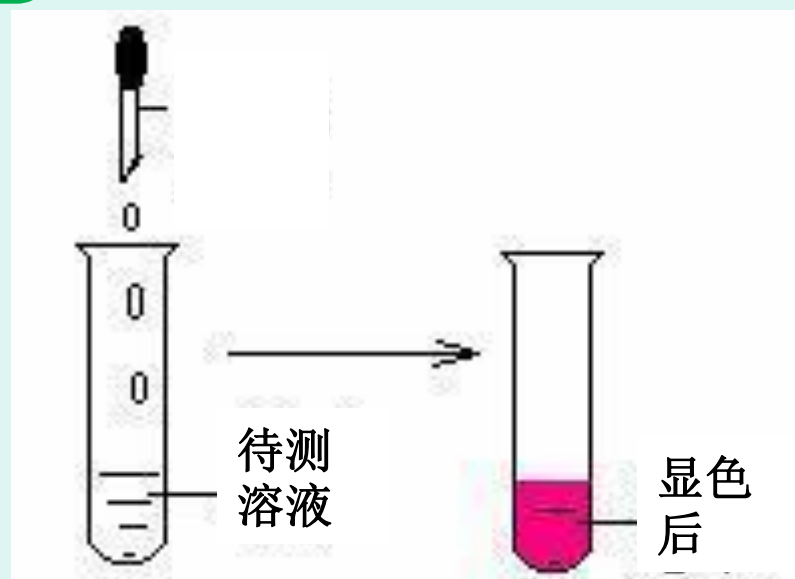
$$\lambda_{\max} = 260\text{nm} \quad \lg \epsilon \ 4.26$$

$$\lambda_{\max} = 325\text{nm} \quad \lg \epsilon \ 3.28$$

六、比色法



- 配位
- 缩合
- 氧-还



(一) 显色反应及其条件

1. 显色反应的要求:

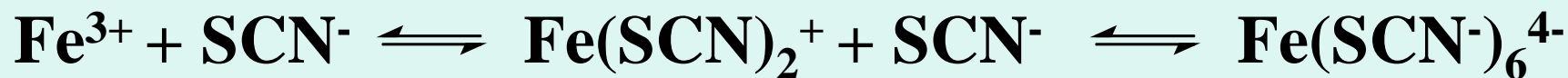
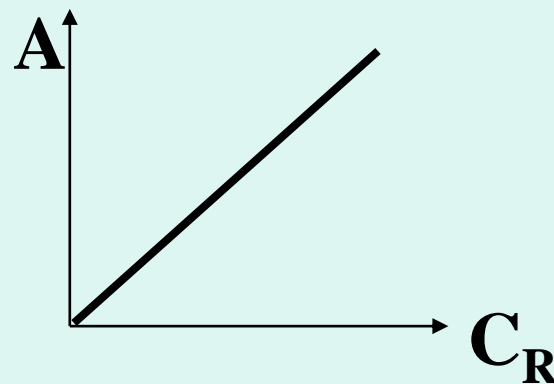
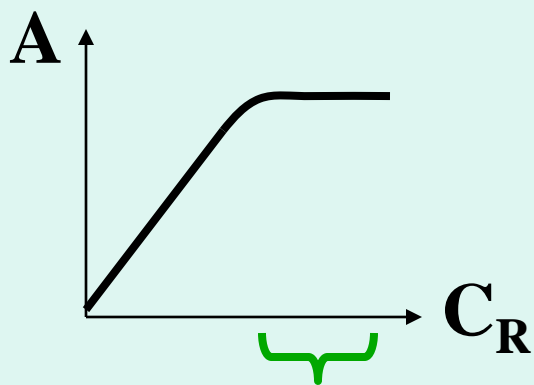
- 有确定的计量关系
- 产物有足够的稳定性
- 试剂**R**与产物**MR**的颜色差别足够大
- 产物**MR**的 ϵ 足够大 ($10^3 \sim 10^5$)
- 反应有较好的选择性, 以避免干扰



2. 反应的条件



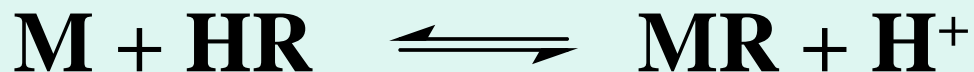
■ 显色试剂与溶剂



■ 酸碱度

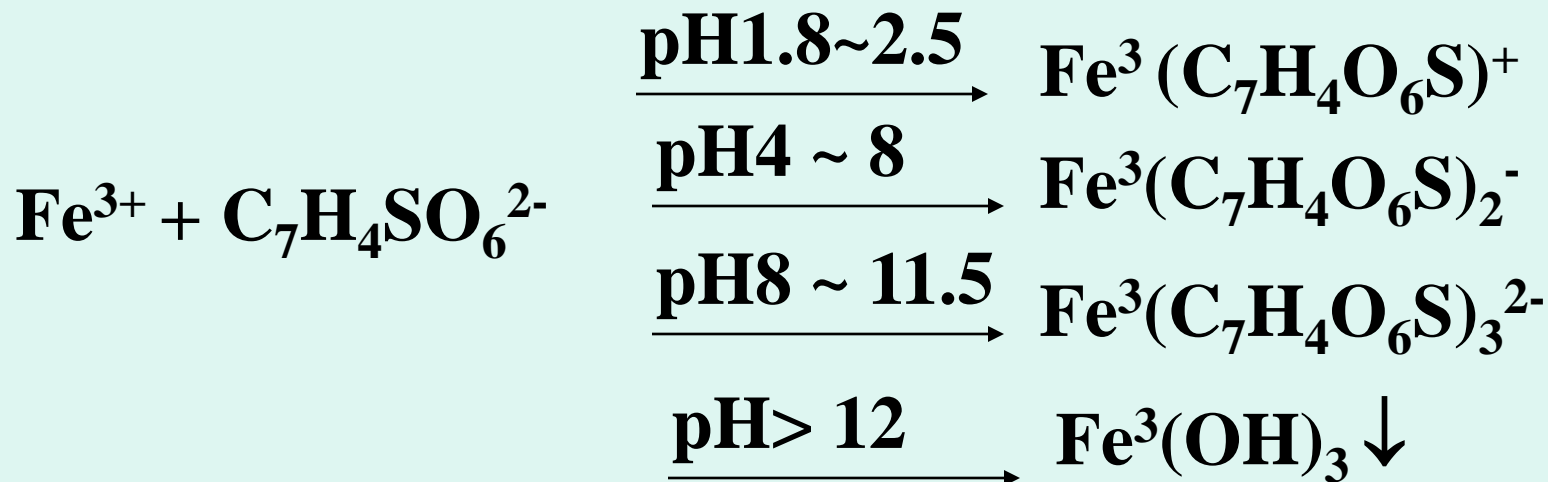


显色剂不少是有机弱酸



$H^+ \uparrow$ 不利于显色反应

$H^+ \downarrow$ 引起金属离子水解



■ 时间

决定于反应速度，需通过实验确定

■ 温度及其它

应视具体情况决定反应温度。

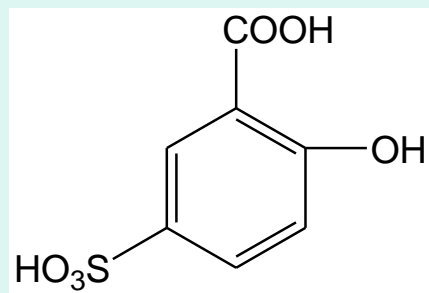
见光易变质的产物，放置过程中应避光。

易受空气干扰的，应密闭放置。

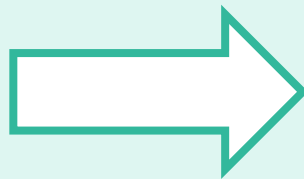


3. 反应条件的控制

- 通过实验确定反应条件
- 控制已确定的合适的反应条件



弱酸性



碱性

紫红色配合物

黄色配合物

445nm

(二) 测定方法

- 仪器 可见-紫外分光光度计
光电比色计
- 方法 标准曲线法等

