

普通高等院校规划教材

食品仪器分析实验指导

主编 高义霞 周向军

参编 (按姓氏汉语拼音排序)

焦成瑾 王倩宁

西南交通大学出版社
·成都·

内容简介

本书是在总结我校仪器分析理论和实验教学的基础上，以国家标准为主线，参考近年来国内外仪器分析理论和实验技术的最新进展，并结合部分老师的科研成果编写而成。

全书分为基本理论、仪器分析实验及仪器操作规程三部分。基本理论包括光谱分析、电分析化学、色谱分析、质谱分析、热分析、流动注射分析和微流控技术。实验部分包括 13 个基础实验、16 个综合实验和 15 个设计实验题目。仪器操作规程部分包括 11 种常见大型仪器的操作方法。

本书可作为高等学校食品质量与安全、生物科学、药学及农学等相关专业的仪器分析实验教材或教学参考书，亦可供相关研究人员参考。

图书在版编目 (C I P) 数据

食品仪器分析实验指导 / 高义霞, 周向军主编. —
成都: 西南交通大学出版社, 2016.4
普通高等院校规划教材
ISBN 978-7-5643-4669-0

I. ①食... II. ①高... ②周... III. ①食品分析—仪器分析—实验—高等学校—教材 IV. ①TS207.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 089726 号

普通高等院校规划教材

食品仪器分析实验指导

主编 高义霞 周向军

责任编辑 牛君

封面设计 何东琳设计工作室

出版发行 西南交通大学出版社
(四川省成都市二环路北一段 111 号
西南交通大学创新大厦 21 楼)

发行部电话 028-87600564 028-87600533

邮政编码 610031

印刷 四川森林印务有限责任公司

成品尺寸 185 mm×260 mm

印张 17.5

字数 429 千

版次 2016 年 4 月第 1 版

印次 2016 年 4 月第 1 次

书号 ISBN 978-7-5643-4669-0

定价 39.80 元

课件咨询电话: 028-87600533

图书如有印装质量问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话：028-87600562

前 言

近年来，随各种新的仪器、分析方法和分析技术的不断出现，以光谱分析、电分析化学、色谱分析及其他分析方法为核心的现代仪器分析，已成为解决化学化工、生命科学、医学、药学、材料、环境及刑侦等领域众多问题的重要手段。在高校相关专业开设仪器分析理论及实验课程，对于学生加深理解仪器分析原理，培养分析和解决问题的能力，形成科学思维和创新精神等都具有不可替代的作用。

仪器分析理论及实验课在生物、食品、药学、地理及农林科学等非化学专业已被陆续列为必修专业基础课之一。我校自 2013 年开始在食品质量与安全专业开设仪器分析理论和实验课程，为配合该课程的理论和实验教学，根据我校仪器设备的客观条件编写而成本教材。为了使该教材适应食品质量与安全等专业的需要，便于学生学习，本书简要介绍了各种仪器分析方法的基本理论、实验及仪器操作规程。本书分为三部分，第一部分为基本理论，简要介绍了仪器的基本原理，仪器构造及定性、定量测定等；实验集中编写在第二部分，包括基础实验、综合实验和设计实验题目；第三部分为仪器操作规程，考虑到学时、实验室条件的限制及学生使用的方便，本书对一些仪器的操作方法进行了简要介绍。编写本书旨在使学生通过对仪器分析理论和实验的学习和实践，加深其对仪器分析中各方法的原理、仪器构造及适用范围等的理解，帮助学生提高分析和解决食品或生物相关专业具体问题的能力，培养其严谨的科学态度。

本书编写分工如下：第一部分由周向军编写，第二部分基础实验中实验 12 和综合实验中实验 25 由焦成瑾编写，第二部分综合实验中实验 14、15、16 由王倩宁编写，其他部分由高义霞编写。全书由高义霞统稿。

参加本书编写的作者都是我校从事仪器分析理论和实验教学的一线教师和教辅人员。本书由天水师范学院生物工程与技术学院焦成瑾教授审阅，焦成瑾教授对该教材内容的修改和补充等提供了许多宝贵的建议和意见，在此深表感谢。

本书的编写得到天水师范学院“青蓝工程人才”项目（编号：TS201406）资助。

由于编者学识水平和实践有限，书中难免存在错漏之处，敬请各位专家和读者批评指正。

编 者

2015 年 10 月于天水

目 录

第一部分 基本理论

1 绪论	错误!未定义书签。
1.1 仪器分析的发展历史和趋势	错误!未定义书签。
1.2 仪器分析方法的分类	错误!未定义书签。
1.3 仪器分析方法的评价指标	错误!未定义书签。
1.4 试样的采集与处理	错误!未定义书签。
1.5 仪器分析实验教学目的、要求	错误!未定义书签。
1.6 仪器分析实验数据处理	错误!未定义书签。
2 光谱分析	1
2.1 光谱学导论	1
2.2 紫外-可见分光光度法	3
2.3 红外吸收光谱法	20
2.4 拉曼光谱法	34
2.5 分子发光分析法	38
2.6 原子发射光谱法	48
2.7 原子吸收光谱法	56

2.8	核磁共振光谱法	67
3	电分析化学	错误!未定义书签。
3.1	电分析化学导论	错误!未定义书签。
3.2	电位分析法	错误!未定义书签。
3.3	电导分析法	错误!未定义书签。
3.4	电解和库仑分析法	错误!未定义书签。
4	色谱分析	错误!未定义书签。
4.1	色谱法导论	错误!未定义书签。
4.2	气相色谱法	错误!未定义书签。
4.3	高效液相色谱法	错误!未定义书签。
4.4	毛细管电泳	错误!未定义书签。
4.5	超临界流体色谱法	错误!未定义书签。
5	质谱分析	错误!未定义书签。
5.1	基本原理	错误!未定义书签。
5.2	质谱表示方法	错误!未定义书签。
5.3	质谱仪	错误!未定义书签。
5.4	离子的类型及影响其形成的因素	错误!未定义书签。
5.5	质谱裂解规律	错误!未定义书签。
5.6	定性分析	错误!未定义书签。

5.7 定量分析	错误!未定义书签。
6 热分析	错误!未定义书签。
6.1 热重分析法	错误!未定义书签。
6.2 差热分析法	错误!未定义书签。
6.3 差示扫描量热法	错误!未定义书签。
7 流动注射分析和微流控技术	错误!未定义书签。
7.1 流动注射分析	错误!未定义书签。
7.2 微流控技术	错误!未定义书签。

第二部分 仪器分析实验

8 基础实验	错误!未定义书签。
实验 1 比色法测定油脂的过氧化值 (参考 GB/T 5009.37—2003) ..	错误!未定义书签。
实验 2 紫外分光光度法测定饮料中的咖啡因含量 (参考 GB/T 5009.139—2003) 错	误!
未定义书签。	
实验 3 有机化合物的红外光谱测定与谱图分析	错误!未定义书签。
实验 4 多维葡萄糖粉中维生素 B ₂ 含量的测定 (荧光法)	错误!未定义书签。
实验 5 石墨炉法原子吸收法测定食品中的铜元素含量 (参考 GB/T 5009.13—2003) 错	误!
未定义书签。	
实验 6 直接电位法测定水溶液的 pH	错误!未定义书签。

- 实验 7 乙酸的电位滴定分析及其解离常数的测定…………… 错误!未定义书签。
- 实验 8 库仑滴定法测定食品中的砷含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 9 外标法测定奶茶中胆固醇的含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 10 气相色谱法测定白酒中的杂质醇含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 11 液相色谱法测定奶茶、可乐中咖啡因含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 12 外标法测定鲜肉类食品中肌苷酸含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 13 酚氨咖敏药片中各组分的核磁共振法定量测定…………… 错误!未定义书签。
- 9 综合实验…………… 错误!未定义书签。
- 实验 14 邻二氮菲法测定大豆中铁的含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 15 分光光度法同时测定果蔬中维生素 C 和维生素 E 的含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 16 荧光分光光度法测定猕猴桃中总抗坏血酸含量 (参考 GB/T 5009.86—2003) 错误!
未定义书签。
- 实验 17 原子荧光光谱法测定水产品中硒元素含量…………… 错误!未定义书签。
- 实验 18 火焰原子吸收分光光度法测定食品中钙含量 (参考 GB/T 5009.92—2003) 错误!
未定义书签。
- 实验 19 鱼类中有害物质铅和镉含量的测定 (参考 GB/T 5009.75—2003 和
GB/T 5009.15—2003)…………… 错误!未定义书签。
- 实验 20 离子选择性电极法测定饮用水中的氟含量 (参考 GB/T 7484—1987) 错误!未定
义书签。

- 实验 21 食品中有机磷农药残留量的测定 (参考 GB/T 5009.20—2003) 错误!未定义书签。
- 实验 22 气相色谱-质谱联用法测定维生素 E 胶囊中维生素 E 的含量 错误!未定义书签。
- 实验 23 气相色谱-质谱联用法测定苹果的香气成分 错误!未定义书签。
- 实验 24 高效液相色谱法测定畜、禽肉中的土霉素、四环素和金霉素含量
(参考 GB/T 5009.116—2003) 错误!未定义书签。
- 实验 25 高效液相色谱法测定山豆素 β -N-草酰-L- α , β -二氨基丙酸 错误!未定义书签。
- 实验 26 氨基酸自动分析仪法测定食品中氨基酸的含量
(参考 GB/T 5009.124—2003) 错误!未定义书签。
- 实验 27 基于羰基价的检测鉴别地沟油 (参考 GB/T 5009.37—2003) 错误!未定义书签。
- 实验 28 植物油中苯并芘的检测 (参考 GB/T 5009.27—2003) 错误!未定义书签。
- 实验 29 原料乳及乳制品中三聚氰胺的检测 (参考 GB/T 22388—2008) 错误!未定义书签。
- 10 自主设计实验 错误!未定义书签。

第三部分 仪器操作规程

- 11 岛津 UV-1800 型紫外-可见分光光度计操作规程 错误!未定义书签。
- 12 岛津 UV-2450 型紫外-可见分光光度计操作规程 错误!未定义书签。

13	RF5301 荧光分光光度计操作规程	错误!未定义书签。
14	Nicolet iS5 型傅里叶变换红外光谱仪操作规程	错误!未定义书签。
15	U3000 高效液相色谱仪操作规程	错误!未定义书签。
16	Thermo Fisher Trace 1300 气相色谱仪操作规程	错误!未定义书签。
17	日立 L-8900 全自动氨基酸分析仪操作规程	错误!未定义书签。
18	ICE3500 原子吸收光谱仪标准操作规程	错误!未定义书签。
19	ICS-1100 型离子色谱仪操作规程	错误!未定义书签。
20	Agilent1100 高效液相色谱仪操作规程	错误!未定义书签。
21	Agilent 7890 A/ 5975C 气相色谱-质谱联用仪操作规程	错误!未定义书签。
	参考文献	错误!未定义书签。
	附 录	错误!未定义书签。

2 光谱分析

2.1 光谱学导论

光谱分析法是指不同形式的辐射与物质作用后，物质发生量子化的能级跃迁后产生发射、吸收或散射，并对其波长和强度进行分析的方法。光是一种电磁波，其在空间的高速传播不需要任何物质作为介质，具有一定的频率、强度和速度。光具有波粒二象性，其能量辐射是量子化的，而非连续的。不同波长的光，具有的能量不同，电磁波能量与波长成反比，与频率成正比。根据波长范围将电磁辐射分为无线电波区、微波区、红外区、可见光区、紫外区及 X 射线区等。

光的波长、频率及光速间的关系为

$$\lambda \nu = c \quad (2.1)$$

式中 λ —— 波长，nm；

ν —— 频率；

c —— 光速，真空中光速为 $2.9979 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

光子的能量与波长的关系为

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (2.2)$$

式中 E —— 光子的能量；

ν —— 频率；

h —— 普朗克常数， $h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ 。

表 2.1 给出不同类型电磁波谱的一系列特性。

表 2.1 不同电磁波的特性

电磁波	波长范围 (λ)	频率范围 (ν) /Hz	E/eV	跃迁类型	分析方法
γ 射线	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	$3 \times 10^{20} \sim 3 \times 10^{18}$	$>2.5 \times 10^5$	原子核	穆斯堡尔 (Mossbauer) 谱法
X 射线	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	$3 \times 10^{18} \sim 3 \times 10^{16}$	$2.5 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^2$	内层电子	X 射线光谱法
紫外	$10 \sim 400 \text{ nm}$	$3 \times 10^{16} \sim 7.5 \times 10^{14}$	$1.2 \times 10^2 \sim 3.1$	中、外层电子	紫外光谱法

可见	400 ~ 800 nm	$7.5 \times 10^{14} \sim 3.8 \times 10^{14}$	3.1 ~ 1.6	外层电子	可见光谱法
红外	0.8 ~ 100 μm	$3.8 \times 10^{14} \sim 3 \times 10^{12}$	$1.6 \sim 1.2 \times 10^{-3}$	分子振动	红外光谱法
微波	0.01 ~ 100 cm	$3 \times 10^{12} \sim 3 \times 10^8$	$1.2 \times 10^{-3} \sim 4.1 \times 10^{-6}$	分子转动	微波光谱法
无线电波	1 ~ 10^4 m	$3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^4$	$< 4.1 \times 10^{-6}$	磁诱导核自旋	核磁共振光谱法

引自：古练权编，《有机化学》。

分子由原子构成，原子中含有电子，分子、原子和电子始终处于不断运动之中，每一种运动具有一定的能量，即处于某一能级，且都是量子化的。在一定条件下，分子处于一定运动状态，其运动形式包括：整个分子绕其重心的旋转所形成的转动能级；原子或原子团在其平衡位置的相对振动所产生的振动能级；电子绕原子核相对运动的电子能级。所以分子的总能量是上述运动的能量之和，其中电子能级最大，常为 1 ~ 20 eV，位于紫外-可见光区；振动能级为 0.05 ~ 1 eV，位于近红外和中红外光区；小于 0.05 eV 的转动能级，位于远红外和微波区。

一般情况下，分子处于基态，当其吸收外界能量辐射后，发生能级跃迁至激发态。分子结构不同，其能级跃迁所吸收的能量不同；不同能量辐射于同一物质时，其发生的能级跃迁也不同。也就是说，分子只能选择性吸收等于其基态与激发态间能量差的外来辐射，这是一切吸收光谱的分析基础。

太阳光是各种可见光的混合光。人眼能感觉到的光称为可见光，波长为 400 ~ 760 nm。物质的颜色由物质与光的相互作用决定，其中某种波长的光被吸收后，其互补光则透过溶液，刺激人的眼睛，从而使人感觉到颜色。如果物质为无色溶液，则能透过所有颜色的光；如果物质为有色溶液时，则透过光的互补色。如果物质为黑色溶液，吸收所有颜色的光，白色时则反射所有颜色的光（表 2.2）。

表 2.2 被吸收光波长与观察者看到的颜色间的对应关系

吸收光的波长及颜色		物质颜色（互补色）
波长 / nm	吸收光	
400 ~ 450	紫	黄绿
450 ~ 480	蓝	黄
480 ~ 490	蓝绿	橙黄
490 ~ 510	绿蓝	红
510 ~ 530	绿	深红
530 ~ 570	黄绿	紫
570 ~ 590	黄	蓝
590 ~ 600	橙黄	蓝绿
600 ~ 680	红	绿蓝
680 ~ 760	深红	绿

引自：汪小兰编，《有机化学》（第四版）。

2.2 紫外-可见分光光度法

2.2.1 基本原理

紫外-可见分光光度法 (ultraviolet and visible spectrophotometry , UV-Vis) 是基于分子的外层价电子跃迁或分子轨道上的电子跃迁产生的吸收光谱, 对物质进行定性、定量分析的一种电子光谱分析法 (从试样状态看, 属于分子光谱)。它既可以利用物质本身对波长 200 ~ 800 nm 光的吸收特性, 也可利用某些化学反应改变物质对光的吸收特性。紫外吸收光谱范围 200 ~ 400 nm (10 ~ 200 nm 为远紫外区或真空紫外区, 200 ~ 400 nm 为近紫外区或石英紫外区), 可见光吸收光谱范围 400 ~ 800 nm。由于空气中的 O₂、N₂、CO₂ 及 H₂O 等对真空紫外区电磁辐射有吸收, 因此, 真空紫外区测定需具备真空条件, 但由于仪器设备难以达到要求, 一般所说的紫外-可见光谱的波长范围为 200 ~ 800 nm。

紫外-可见分光光度法具有以下优点: 仪器设备简单、操作容易、分析耗时短、灵敏度高及应用范围广等; 但也存在仅适合微量分析、仪器相对昂贵等缺点。目前已广泛应用于有机和无机化合物的定性、定量分析, 特别是有机化合物的共轭基团鉴定、平衡常数的测定、互变异构的判断及氢键强度的测定等领域。

2.2.2 基本术语

1. 吸收光谱

也称为吸收曲线, 以波长 λ (nm) 为横坐标, 吸光度 (absorbance , A) 或透射比 (transmittance , T) 为纵坐标绘制的曲线为吸收光谱曲线 (absorption spectrum)。

2. 最大吸收波长

最大吸光度对应的波长为最大吸收波长 (absorption wavelength , λ_{\max})。

3. 谷

不同峰之间的最低波长处称为谷 (valley), 相应的波长称为最小吸收波长 (λ_{\min})。

4. 肩 峰

峰周围出现的小的曲折称为肩峰 (shoulder peak)。

5. 末端吸收

短波长处有强吸收但无峰形的部分称为末端吸收 (end absorption)。

6. 生色团

能使分子产生紫外或可见吸收的基团，主要是一些含有不饱和键的基团，如 $C=C$ 、 $C\equiv C$ 、 $C=O$ 等，称为生色团 (chromophore)。如果各生色团不共轭，则各生色团的吸收峰位置和强度相互影响不大；如果各生色团共轭，则发生红移且吸收强度显著增强。一般涉及 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁和 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁，从广义上讲，凡是含有 π 键的基团均可认为是生色基团。

7. 助色团

自身在紫外和可见光区不产生吸收峰，但与生色团相连时，使吸收峰发生红移且吸收强度增大的基团，称为助色团 (auxochrome)。一般含有未共用电子对的中性杂原子，如 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-X$ 、 $-OR$ 等，常产生 $p-\pi$ 共轭。

8. 增色效应和减色效应

吸收峰的 ϵ_{max} 增加，称为增色效应 (hyperchromic effect)，反之；称为减色效应 (hypochromic effect)。

9. 红移和蓝移

因溶剂或取代基的影响，吸收峰向长波长方向移动称为红移 (red shift)；反之，称为蓝移 (blue shift)。红移一般是由极性改变、生色团或共轭度增大等造成的。

10. 吸收带

紫外-可见分光光谱的吸收带可分为强带和弱带： $\epsilon_{max}>10^4 L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$ 的吸收带称为强带， $\epsilon_{max}<10^3 L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$ 的称为弱带。另外，紫外-可见光谱吸收带也可根据跃迁类型的不同分为：① R 带 (德文 Radikal，意思为基团)：含杂原子生色团的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁对应的吸收带，一般吸收峰在 270 nm 以上，如 $C=O$ 等。该类跃迁所需能量较小，产生弱的吸收峰， $\epsilon_{max}<10^2 L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$ 。② K 带 (德文 Konjugation，意思为共轭)：具有共轭体系的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁产生的吸收带，此类跃迁产生强吸收峰， $\epsilon_{max}>10^4 L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$ ，一般吸收峰位于 220 ~ 280 nm。③ B 带 (德文 Benzenoid，意思为苯的)：芳香族化合物的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁产生的精细结构吸收带，这是由在基态电子跃迁上的振动跃迁和苯环的振动重叠所造成的， ϵ_{max} 一般较小，可用于鉴别芳香族化合物。但随溶剂极性增加，精细结构不明显甚至会消失。④ E 带 (ethylenic band，意思为乙烯型)：芳香族化合物的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁产生的吸收带，分为 E_1 和 E_2 带， ϵ_{max} 一般较大，如苯的 E_1 、 E_2 和 B 带的 λ_{max} 分别为 184 nm、204 nm 和 255 nm。 E_2 带和 B 带是苯的特征谱带，可作为鉴别苯环的依据。

2.2.3 有机化合物的紫外-可见吸收光谱

有机化合物的特征吸收光谱取决于分子结构及分子轨道上电子的性质。该特征吸收的最大吸收波长 (λ_{\max}) 取决于激发态与基态间的能量差。当有机分子吸收一定的能量辐射后, 价电子 (σ 电子、 π 电子、未成键孤对电子 n) 跃迁至激发态 (反键轨道), 包括 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $\sigma \rightarrow \pi^*$ 、 $\pi \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 以及 $n \rightarrow \pi^*$ 6 种形式 (σ 、 π 分别为 σ 和 π 成键轨道电子, σ^* 、 π^* 分别为 σ 和 π 反键轨道电子, n 为未成键轨道电子)。根据分子轨道理论, $\sigma^* > \pi^* > n > \pi > \sigma$, 分子中 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量最小, 吸收峰出现在长波长方向; $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量大, 吸收峰出现在短波长方向。根据轨道匹配性原则, 有意义的电子跃迁有 4 种类型 (图 2.1), 但与紫外-可见吸收光谱有关的跃迁形式只有 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 3 种 ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所需能量仍较大, 位于真空紫外区, 常规仪器难以达到要求)。有机分子的紫外-可见光谱研究中最常用的是 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。由于电子能级跃迁需要的能量高于红外光谱对应的振动和转动能级能量, 因此, 电子能级跃迁伴随有振动和转动能级跃迁, 或者说, 紫外光谱中含有振动和转动能级跃迁的吸收谱线, 因此, 紫外-可见光谱带通常较宽。

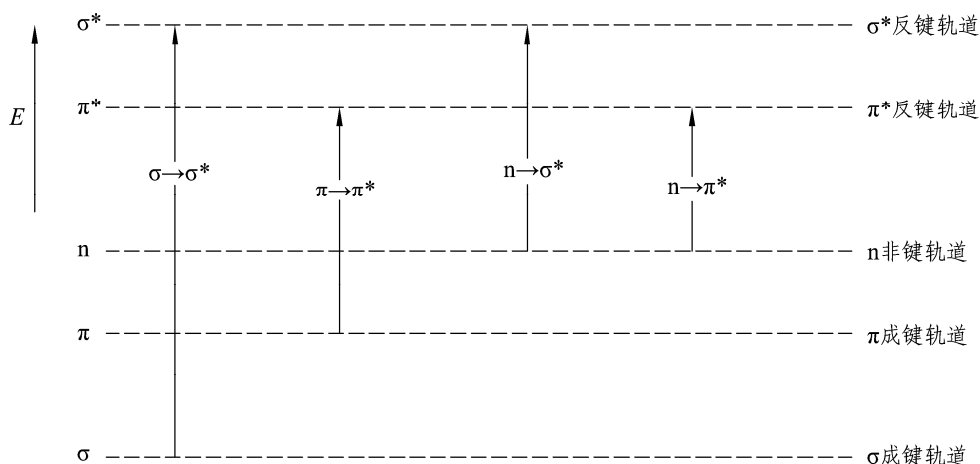


图 2.1 分子的电子能级跃迁

引自：李艳梅主编，《有机化学》。

1. $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁

饱和有机化合物只有 C—C 和 C—H 键, 只能发生 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁, 一般吸收小于 200 nm 波长的光, 但当 H 原子被 S、N、O、P 和卤素 (X) 等杂原子取代时, 可发生 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁, 这种跃迁所产生的吸收峰在 150~200 nm, 位于真空紫外区, 常规紫外-可见分光光度计难以检测。如乙醚的吸收峰在 184 nm, CH_3Cl 吸收峰在 173 nm, CH_3NH_2 吸收峰在 215 nm 等。

2. $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁

不饱和有机化合物含有 C=C、C≡C、C≡N 及 C=O 等不饱和键, 可发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁,

最大摩尔吸光系数 (maximum molar absorptivity, ϵ_{\max} , 即 λ_{\max} 处的摩尔吸光系数) 较大, 这是因为该类型属于跃迁“允许”, 跃迁概率大, 因而光吸收强度大。孤立的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所需能量很接近, 吸收峰在 200 nm 附近。但分子中若有共轭体系, 则 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量和分子共轭度有关, 随共轭度不断加大, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收带向长波长方向移动 (红移), 吸收强度也随之增大。如丁二烯的最大吸收峰在 217 nm 处, 苯的最大吸收峰在 256 nm 处。

3. $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁

某些有机化合物含有 $C=O$ 、 $-N=N-$ 、 $-CHO$ 、 $-COOH$ 等, 既含有不饱和键, 又含有杂原子, 这类化合物中的杂原子还可发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 其吸收峰在 200 ~ 400 nm。另外, 含 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-X$ 、 $-S$ 等基团与不饱和键相连时也可发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 但吸收强度较弱, 这是因为 n 电子与 π 电子在空间上属于不同区域, 虽然 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量较低, 但该类跃迁的概率低, 属于跃迁“禁阻”, 因而光吸收强度弱。非共轭双键不影响 λ_{\max} , 但往往增强吸收带强度。

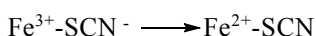
2.2.4 无机化合物的紫外-可见吸收光谱

一些无机化合物也可以产生紫外-可见吸收光谱, 其光谱类型包括电荷转移吸收光谱和配位体场吸收光谱。

2.2.4.1 电荷转移吸收光谱

某些同时具有电子供体和电子受体的无机化合物, 当受到外来辐射时, 电子从供体的外层轨道跃迁到受体轨道时产生的光谱, 称为电荷转移光谱 (charge-transfer spectrum), 也称为 $p \rightarrow d$ 跃迁, 其最大吸收波长位置取决于电子供体和电子受体相应轨道间的能量差。从本质上讲, 电荷转移跃迁属于分子内氧化还原反应, 因此, 必须提供电子供体和电子受体。一般而言, 金属离子是电子受体, 配体是电子供体, 金属离子越容易被氧化, 或配体越容易被还原, 则发生电荷转移跃迁所需的能量越小, 吸收光谱发生红移。电荷转移跃迁属于“允许”跃迁, 因此, 其摩尔吸光系数一般较大, 大于 $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 适合微量金属离子的鉴定和定量。电荷转移跃迁呈现的光谱 λ_{\max} 及吸收强度与电荷转移的难易程度有关。

在紫外光照射下, 许多无机配合物能发生此类电子转移, 产生电荷转移光谱, 如



由于 $\text{Fe}^{3+}\text{-SCN}^-$ 吸收某波长的光, SCN^- 将电子转移给 Fe^{3+} , 从而形成 $\text{Fe}^{2+}\text{-SCN}^-$, 为血红色配合物, 在 490 nm 处有最大光吸收; 或者定域在 Fe^{3+} 轨道上的电荷转移至配位体 SCN^- 的轨道上, 产生紫外吸收光谱。

少数有机化合物, 如烷基苯基酮类化合物, 苯环作为电子给体, 氧为电子受体, 在一定

的光辐射下也发生电荷转移。电荷转移吸收光谱的吸收强度大， $\epsilon_{\max} > 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ，利用此特点可定量分析该类化合物。

2.2.4.2 配位体场吸收光谱

配位体场吸收光谱 (ligand field absorption spectrum) 指过渡金属离子与配体 (主要是有机化合物类) 间形成的配合物，当有紫外或可见光能量辐射时，产生相应的吸收光谱。元素周期表中第四周期、第五周期的过渡元素分别含有简并轨道 (degeneration orbit): 3d、4d 轨道，镧系和铜系元素分别含有 4f、5f 简并轨道。但当配位体与金属离子配位时，轨道简并解除，5 个 d 轨道和 7 个 f 轨道发生能级分裂，形成几组能量不等的 d 轨道和 f 轨道。如果轨道未充满，当吸收光能后，电子从低能态的 d 轨道或 f 轨道分别跃迁至高能态的 d 轨道或 f 轨道，从而产生吸收光谱，此类跃迁相应称为 d→d 跃迁或 f→f 跃迁。由于 d→d 跃迁或 f→f 跃迁均需要配体的配位场诱导或微扰产生，因此上述两类跃迁又称为配位场跃迁。电荷转移跃迁的 $\epsilon_{\max} > 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ，配位场跃迁的 $\epsilon_{\max} < 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ，相比较而言，前者属于金属离子微扰，后者属于配体微扰，产生弱的光吸收，对定量分析意义不大，主要用于配合物的结构研究。如 $\text{Cu}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 合离子为浅蓝色，吸收峰为 794 nm，而 $\text{Cu}^{2+} \cdot \text{NH}_3$ 合离子为深蓝色，吸收峰为 663 nm，原因是 H_2O 的配位场小于 NH_3 。

2.2.5 紫外-可见分光光度计构造

紫外-可见分光光度计的工作原理是利用分光装置获得一束平行的、波长范围极窄的单色光，通过一定厚度的试样溶液，一部分光被吸收，未被吸收的光则照射在光电元件上，从而产生光电流，通过仪器读出相应的吸光度或透光率。紫外-可见分光光度计主要由光源、单色器、吸收池、检测器和信号指示系统五个部分组成。图 2.2 为紫外-可见分光光度计的构造。

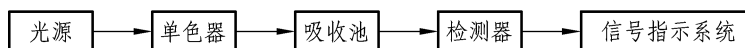


图 2.2 紫外-可见分光光度计结构

2.2.5.1 光源

紫外-可见分光光度计所利用的辐射光源须发射连续、强度足够大且稳定，其作用在于提供激发能，使待测分子产生光吸收。常用的辐射光源有钨灯和氘灯。钨灯中常充惰性气体以提高寿命，使用时需利用稳压器或电子电压调制器来保持钨灯电源电压 (6~12 V) 稳定。在钨灯中加入适量卤素或卤化物制成卤钨灯，其发光效率和寿命均高于钨灯。近年来，许多分光光度计已采用此种光源代替钨灯。钨灯和卤钨灯提供可见区的连续辐射光源，可使用的

波长范围为 340~2 500 nm，最适合的工作范围为 360~800 nm。氘灯提供紫外区连续辐射光源，可使用的波长范围为 160~360 nm。

2.2.5.2 单色器

单色器是指能从光源发出的具有连续光谱的混合光中分解出单色光的光学装置。单色器是分光光度计的核心部件，其由棱镜和光栅等色散元件、聚焦透镜和狭缝等构成，其中色散元件是单色器中最为关键的部分。

棱镜是通过光折射原理先将复合光色散成单色光，再将目的波长的光通过极窄的狭缝后照射到吸收池的试样中。棱镜分出的光波长不等距。棱镜由玻璃或石英制成，其中玻璃棱镜用于可见光，石英棱镜用于紫外或可见光区。光栅是根据光的衍射和干涉原理色散而成的单色光，然后同样将目的波长的光通过极窄的狭缝后照射到吸收池的试样中。由于光栅是由大量等宽、等间距的平行狭缝（有 600、1 200 和 2 400 条/mm 几种）构成的，其分出的光具有分辨率高、可用波长范围宽、光谱均排（色散率几乎与波长无关）且成本较低等优势，目前多数分光光度计采用光栅作为色散元件。

2.2.5.3 吸收池

样品吸收池也称为比色皿，是用来盛放待测溶液或参比溶液的容器。一般由无色透明、耐腐蚀、化学性质稳定、厚度均匀的石英或玻璃材料制成。常见的比色皿规格有 0.5 cm、1 cm、2 cm 和 5 cm 等。紫外区测定用石英比色皿，可见区测定用石英或玻璃比色皿。

比色皿使用时的注意事项：测定时盛样量为其容积的 $2/3 \sim 3/4$ ；使用时务必注意比色皿必须保持透明，不被磨损，不可加热或烘干，不能长时间盛放腐蚀性物质；盛装参比溶液和试样溶液的比色皿必须匹配；比色皿的光面必须与入射光垂直；手不能接触比色皿的光面；实验结束后用水、稀盐酸或乙醇，甚至铬酸洗液（需慎用，因铬酸氧化性太强）及时冲洗比色皿（但不可用碱液洗涤），之后用柔软绒布、绸布或擦镜纸擦干表面。但切忌超过 15 min 浸泡在浓酸溶液中，以防开胶引起比色皿破碎。另外，对于挥发性试样，使用时注意加盖。

2.2.5.4 检测器

检测器的作用是通过光电效应将透过吸收池试样后的光信号转变为可识别的电信号。检测器分为光电池、光电管和光电倍增管。目前较常用的是光电倍增管，它具有灵敏度高、噪音低、响应时间短、稳定性好等优点。光电管是一个真空或充有少量惰性气体的二极管，依据其对光敏感的波长范围不同分为红敏和紫敏两种，前者阴极涂有银和氧化铯，适用范围为 630~1 000 nm；后者涂有铯和铯，适用范围为 200~630 nm。光电倍增管是在光电管的基础上增加了若干附加电极，因而使光电流得以放大。经测定，一个光子此时可产生 $10^6 \sim 10^7$ 个

电子，灵敏度是光电管的 200 倍，适用范围为 160~700 nm。目前的分光光度计中，光电管几乎已完全被光电倍增管所代替。

近年来发展的光电二极管阵列检测器，与光电倍增管相比，其检测的动态范围更宽，响应时间更短，可靠性更高且使用寿命更长，已开始用于多通道自动扫描分光光度计中。

2.2.5.5 信号指示系统

信号指示系统的作用是将放大的信号以吸光度或透光率的形式显示并予以记录。常用的信号指示装置有直读检流计、电位调节指零装置以及数字显示或自动记录装置等。新型的紫外-可见分光光度计大多配有计算机，一方面可对分光光度计进行操作控制，另一方面可进行数据处理。

2.2.6 紫外-可见分光光度计的类型

按光学系统不同，紫外-可见分光光度计可分为单波长和双波长分光光度计，而单波长分光光度计又分为单光束和双光束型。

2.2.6.1 单波长单光束分光光度计

单波长单光束分光光度计是最简单的分光光度计。它是由一束经过单色器色散的光，通过来回拉动变换位置，使参比溶液和样品溶液依次进入光路系统，以测定光的吸收。该分光光度计的优点是结构简单，价格低廉，主要适于特定波长处的定量分析；缺点是光源强度不稳定，误差较大，另外，操作时每换一次波长都需要用参比溶液重新调零，操作麻烦，不适用于全波长的定性分析。如常见的 721、722 型分光光度计。

2.2.6.2 单波长双光束分光光度计

双光束分光光度计对参比信号和试样信号的测量几乎是同时进行的，将光源不稳定或检测系统灵敏度差等不良影响降至最低，具有较高的精密度和准确度。可以不断地变更入射光波长，自动测量不同波长下试样溶液的吸光度，实现吸收光谱的自动快速扫描。但双光束分光光度计结构较复杂，价格较贵。如国产 710 型、730 型、740 型，日立 UV-340 及岛津 UV-2501PC 等。

2.2.6.3 双波长分光光度计

双波长分光光度计与单波长分光光度计的主要差别在于其采用了双单色器（图 2.3）。从

光源发出的光分成两束，分别经过两个单色器，得到两束强度相同、波长分别为 λ_1 和 λ_2 的单色光。以切光器（旋转镜）调制使 λ_1 、 λ_2 两单色光交替地照射到同一吸收池上，其透过光被检测器接收，经信号处理系统可直接获得对 λ_1 和 λ_2 两单色光的吸光度差值。如国产 WFZ800-5 型及岛津 UV-1800 等。

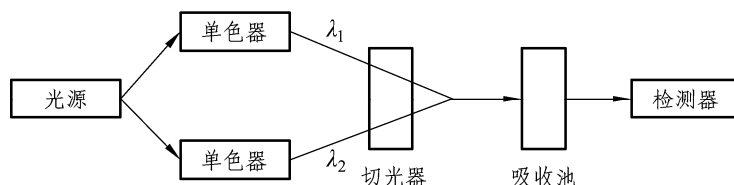


图 2.3 双波长紫外-可见分光光度计结构

采用双波长分光光度计进行分析时，不需要参比溶液，可以通过波长的选择方便地校正背景吸收造成的干扰，消除吸收光谱重叠干扰，因而适用于混浊液和多组分混合物定量分析。

2.2.6.4 分光光度计的校正

镧玻璃用于校正可见光区的波长标尺，钡玻璃则用于紫外和可见光区的波长标尺校正。常用 K_2CrO_4 标准溶液校正吸光度标度，25 °C 时不同波长对应的吸光度值见表 2.3。

表 2.3 铬酸钾溶液的吸光度

波长 λ /nm	吸光度 A	波长 λ /nm	吸光度 A	波长 λ /nm	吸光度 A	波长 λ /nm	吸光度 A
220	0.4 559	300	0.1 518	380	0.9 281	460	0.0 173
230	0.1 675	310	0.0 458	390	0.6 841	470	0.0 083
240	0.2 933	320	0.0 620	400	0.3 872	480	0.0 035
250	0.4 962	330	0.1 457	410	0.1 972	490	0.0 009
260	0.6 345	340	0.3 143	420	0.1 261	500	0.0 000
270	0.7 447	350	0.5 528	430	0.0 841		
280	0.7 235	360	0.8 297	440	0.0 535		
290	0.4 295	370	0.9 914	450	0.0 325		

引自：叶宪曾编，《仪器分析教程》（第 2 版）。

2.2.7 紫外-可见光谱的影响因素

紫外-可见光谱的影响因素主要有共轭效应、取代基效应、溶剂效应、立体化学效应、pH 效应、温度和氢键效应等。

2.2.7.1 共轭效应及超共轭效应

通过共轭效应形成一个大 π 键，该大 π 键的电子离域程度较为明显，最终引起各能级间能量差减小，跃迁所需能量相应减少，发生红移。共轭体系越大，红移越明显，甚至出现在可见光区，同时，吸收强度增大。因为只有当分子中存在共轭体系时， $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量才能处于波长大于 210 nm 的近紫外区，故紫外-可见光谱主要用于鉴定分子中是否有共轭体系。另外，还有各种助色基团的助色效应。

超共轭效应是指烷基上的 C—H 键的 σ 电子与共轭体系中的 π 电子的交盖程度不大，因此仅能发生很小程度的共轭，结果引起 λ_{\max} 红移，吸收强度增大，称为 σ - π 超共轭效应。

2.2.7.2 溶剂效应

溶剂化使得溶质的自由转动受到限制，一般情况下会导致其转动光谱难以展现出来或彻底消失。若溶剂的极性增强，其与溶质间的相互作用力也随之增强，引起溶质的振动能级也逐渐受到限制，最终导致由振动引起的有关精细结构的信息减少，甚至消失。但当化合物溶解在非极性溶剂中时，可展现出转动-振动等精细结构信息。另外，溶剂的极性增强，由于溶剂与溶质相互作用，激发态 π^* 比基态 π 能量降低很多 ($\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁时激发态极性大于基态，激发态因溶剂化的缘故，其稳定性比基态高)，因而激发态与基态间能量差降低，引起 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的吸收谱带红移。但在 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁中，由于基态比激发态极性大，且基态 n 电子与极性溶剂间形成氢键而更加稳定，基态的能量降低，因而导致激发态与基态间能量差增大，因此， $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的吸收带发生蓝移。溶剂极性不同所引起的吸收带红移或蓝移的现象称为溶剂效应 (solvent effect)。另外，静电引力也可在溶质与溶剂的相互作用中发挥作用，从而影响吸收峰的位置和强度。

由于溶剂对电子光谱的影响较大，因此，在各种吸收光谱或数据上必须注明所用溶剂。实验中对溶剂的选择应遵循：尽量选择非极性溶剂或低极性溶剂，以防止 K 带红移、R 带蓝移及由此造成的 K、R 带的相互接近，同时要特别注意极性溶剂对芳环 B 带精细结构的影响；要求溶剂的溶解性好且由此形成的溶液具有良好的光化学、化学稳定性；溶剂不能在试样吸收光谱区有明显的吸收，挥发性小且安全无毒等。

在紫外区测定时常用的有机溶剂有正己烷、庚烷、苯等，极性溶剂有甲醇、乙醇和水等。溶剂的初始吸收位置称为吸收截止点或最低波长极限。常见溶剂的最低吸收波长见表 2.4。

表 2.4 溶剂使用中的最低波长极限

溶 剂	最低波长极限/nm	溶 剂	最低波长极限/nm
乙 醚	220	二氯甲烷	233

环己烷	210	氯仿	245
正丁醇	210	乙酸正丁酯	260
水	210	乙酸乙酯	260
异丙醇	210	甲酸甲酯	260
乙二醇	210	四氯化碳	265

续表

溶剂	最低波长/μm	溶剂	最低波长/μm
甲醇	210	甲苯	285
0.6%硫酸	210	吡啶	305
乙醇	215	丙酮	330
甘油	220	二硫化碳	380
1,2-二氯乙烯	230	苯	280

引自：朱明华编，《仪器分析》(第四版)。

2.2.7.3 立体化学效应

立体化学的影响主要包括空间位阻、构象、跨环效应等。空间位阻 (steric hindrance) 不利于具有共轭作用的发色团的共平面，因而削弱了共轭效应，发生蓝移且吸收强度降低。跨环效应 (cross-ring effect) 是指 β , γ -不饱和酮，尽管 $C=O$ 与 $C=C$ 发色团间不共轭，但由于空间位置的靠近和排列， $C=O$ 氧原子上的孤对电子与 $C=C$ 平面上下方的 π 电子仍能产生相互影响，从而使相当于 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的 R 带波长向长波长方向移动，吸收强度增强。另外， $C=O$ 上的 π 电子与杂原子的 n 电子的有效交盖也会产生跨环效应。如 α -和 β -紫罗酮异构体、1,2-二苯乙烯的顺反异构体等。

2.2.7.4 pH 效应

不同 pH 对处于不同酸碱环境的化合物的解离不同，因此，其紫外光谱的形状、 λ_{max} 及吸收强度也不同，需要具体问题具体分析。如苯酚在酸性溶液中有两个吸收峰： $\lambda_{max} = 210 \text{ nm}$ 、 270 nm ，碱性环境也有两个吸收峰： $\lambda_{max} = 235 \text{ nm}$ 、 287 nm 。原因在于酸碱条件下其解离状态不同：苯酚在酸性条件下以酚羟基的中性形式存在；而在碱性条件下以苯氧负离子形式存在，故氧负离子电子离域现象更为明显。苯胺的 pH 效应与苯酚受到酸碱效应的影响相似。

2.2.7.5 温 度

在室温条件下，温度对紫外-可见吸收光谱的影响不大。低温条件下，分子热运动降低，能量交换减少，产生红移，吸收峰变尖且吸收强度略有增强。温度较高时，分子碰撞几率增大，谱带变宽，精细结构开始消失。

2.2.8 紫外-可见光谱的定性和定量分析

2.2.8.1 紫外-可见吸收光谱的定性分析

紫外-可见吸收光谱法对无机元素的定性分析较少，大都用于有机化合物初步的定性鉴定和结构分析，如吸收光谱的形状，吸收峰的数目、位置和强度及相应的摩尔吸收系数。这主要是因为紫外-可见光谱过于简单，提供的信息太少，特征性较差。紫外-可见吸收光谱适用于不饱和化合物，特别是具有共轭体系的化合物的鉴定。另外，由于紫外-可见光谱的吸收峰少，精细结构缺乏，仅能反映含生色团、助色团等共轭体系结构，难以提供整个分子结构信息，因此，在实际应用中，应充分结合红外光谱、核磁共振光谱以及质谱等信息，才能进行最终定性鉴定。紫外-可见吸收光谱的定性分析有两种方法，对照法：采用与标准纯样品的光谱进行比较；最大吸收波长计算法：利用 Woodward-Fieser 和 Scott 经验规则计算不饱和和有机化合物的最大吸收波长，并与实验值相比较。

1. 顺反异构体的判断

由于顺式异构体空间位阻相对较大，共轭度较差，所以顺式异构体 λ_{\max} 和 ϵ_{\max} 小于反式异构体。如反式肉桂酸 ($\lambda_{\max} = 295 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 27\,000$) 和顺式肉桂酸 ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 13\,500$)；反式番茄红素 ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 185\,000$) 和顺式番茄红素 ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 90\,000$)。

2. 互变异构体的判断

一般而言，化合物的共轭度越大，其 λ_{\max} 和 ϵ_{\max} 也越大。如乙酰乙酸乙酯的酮式 ($\lambda_{\max} = 204 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 110$) 和烯醇式 ($\lambda_{\max} = 243 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 18\,000$)。另外，前者酰基氧、酯基氧与水分子间形成氢键，发生了 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁；后者羟基氧与酯基氧形成分子内氢键，发生了 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。

3. 构象的判断

α -卤代环己酮中 C—X 键有直立和平伏两种构象。由于前者羰基氧 π 电子与 C—X 的 σ 电子重叠程度大，因此，前者的 λ_{\max} 比后者大。

4. 氢键强度的判断

通过测定同一化合物在不同极性溶剂中 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收带, 可估算该化合物在极性溶剂中的氢键强度。如在水和己烷中丙酮 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收峰分别在 294.5 nm 和 279 nm, 能量分别为 452.99 和 429.40 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 因此, 丙酮在水中的氢键强度为 23.59 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

2.2.8.2 紫外-可见光谱的定量分析原理

朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律是紫外-可见吸收光谱定量分析的依据。当一束平行单色光垂直通过某一非散射、稀 (浓度低于 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的均匀液体介质时, 一部分光被吸收, 一部分透过溶液, 还有一部分被反射。透射光的强度 I 与入射光的强度 I_0 之比称为透射率 (Transmittance, T), 吸光度 (absorbance, A , 也称为光密度, 用 OD 表示) 与入射光强度 I_0 、透射光 I 之比的对数成正比, 也与溶液厚度 (b) 和浓度 (c) 的乘积成正比, 即

$$A = \lg I/I_0 = \lg 1/T = \epsilon bc \quad (2.3)$$

式中 T ——透射率, %;

ϵ ——摩尔吸收系数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;

b ——液层厚度, cm;

c ——浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在一定波长和溶剂条件下, 摩尔吸收系数是该化合物的特征性常数, 数值上等于 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物在液层厚度 b 为 1 cm 时的吸光度。 ϵ 与物质的性质、入射光波长、溶剂种类及溶液温度等因素有关, 与物质浓度和试样溶液厚度无关。摩尔吸收系数可反映该化合物在该条件下的光吸收能力, 常用于检测定性分析和定量分析方法的灵敏度。摩尔吸收系数越大, 表明该物质吸光能力越强, 该方法越灵敏。 $\epsilon_{\max} > 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 为超高灵敏, $\epsilon_{\max} > 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 为高灵敏, $\epsilon_{\max} < 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 为不灵敏。

另外, 吸光度 A 具有加和性, 即当溶液含有多种组分时, 如果它们间相互不发生化学反应, 则体系在该波长处的总吸光度等于各组分吸光度之和。

当待测化合物的组分不明确时, 由于摩尔质量未知, 物质的量无法计算, 此时不能使用摩尔吸光系数, 而经常采用比吸光系数 (specific absorption)。比吸光系数指质量分数为 1%、液层厚度 b 为 1 cm 时的吸光度, 用 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 表示。

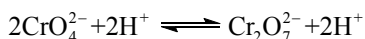
朗伯-比尔定律不仅适用于溶液, 也适用于均匀的气体和固体, 它是各类光吸收的基本定律, 也是各类分光光度法进行定量分析的依据。

当标准溶液的浓度较高时, 标准曲线发生弯曲, 该现象称为朗伯-比尔定律的偏离。其主要原因: 一是物理因素, 即仪器可能在非理想状况下工作, 如各种原因引起的非单色光、非平行光、光散射及光反射等杂散光现象明显等问题, 常可通过提高单色器质量或选择最大吸收波长 λ_{\max} 处测定来消除或减弱其影响; 二是各种化学因素, 如由溶液浓度过大引起的吸光

物质的相互作用，溶液中存在的解离、缔合或聚合，互变异构，配位等化学反应也可使吸光物质浓度发生变化，最终影响光吸收值。如显色剂 KSCN 与 Fe^{3+} 反应形成 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ ：



在 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 的稀溶液时，上述平衡右移，当配位反应中其他反应试剂的加入或定容等导致整个反应体系体积增大时，由于解离度 (ionization degree, α) 与浓度成反比关系，此时 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 的解离度进一步增大，其浓度发生非线性减小，也可导致朗伯-比尔定律的偏离。再如，铬酸盐或重铬酸盐在溶液中的平衡：



由于 CrO_4^{2-} 和 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 的结构不同，颜色不同，吸收光谱也不同，最终导致偏离朗伯-比尔定律。

2.2.8.3 定量分析方法

在紫外-可见分光光度测定中，常用的定量分析方法主要有单组分定量法、多组分定量法、双波长法、示差法和导数分光光度法。

1. 单组分定量法

(1) 标准曲线法

配制一系列不同浓度的标准溶液，在相同操作条件下测定各标准溶液的吸光度。以标准溶液浓度为自变量，相应的吸光度值为响应值，利用最小二乘法处理数据，绘制标准曲线。在相同条件下，测试未知液的吸光度值，可根据标准曲线确定未知液标准物质含量。该方法是一种快速、简单的常规定量方法，要求未知样品与标准溶液组成简单且一致；对于组成复杂、对分析结果要求高的样品难以准确测定。

(2) 标准加入法

当试样组成复杂，除待测物质外有难以确定的其他共存组分时，可选择标准加入法。将不同量已知浓度的标准溶液加入几份等量待测样品中，在选定相同测定条件下，测定加入后各待测样品的吸光度值，以不加标准溶液的待测样品为第一份试样，绘制吸光度 A 对待测样品中加入标准物质浓度 c 的关系曲线。若待测样品不含标准物质，曲线过原点；若曲线不过原点，说明待测样品中含有标准物质，可外延曲线与横坐标相交，交点到原点的距离即为待测样品中标准物质的浓度。

2. 多组分定量法

如前所述，由于吸光度具有加和性，因此，可以测定多组分试样。多组分定量法也称为解方程法。以两组分为例，测定各组分在波长 λ_1 和 λ_2 处的吸光度 A_1 和 A_2 ，则

$$\begin{aligned} A_1 &= \varepsilon_x^{\lambda_1} b c_x + \varepsilon_y^{\lambda_1} b c_y \\ A_2 &= \varepsilon_x^{\lambda_2} b c_x + \varepsilon_y^{\lambda_2} b c_y \end{aligned} \quad (2.4)$$

式中 A_1, A_2 —— λ_1 和 λ_2 处测定的吸光度值；

b ——试样厚度；

c_x, c_y ——两组分的浓度；

$\varepsilon_x^{\lambda_1}, \varepsilon_y^{\lambda_1}, \varepsilon_x^{\lambda_2}, \varepsilon_y^{\lambda_2}$ ——两组分在 λ_1 和 λ_2 处的摩尔吸光系数。

吸光度之差 ΔA 与待测组分浓度 c 呈线性关系。

3. 双波长法

当混合物的吸收曲线发生重叠时，利用双波长法进行定量分析。该法不需要参比溶液，通过两个单色器获得两束单色光，以其中一个组分为干扰组分，测定另一个组分。首先制作两个组分各自的吸收曲线，然后画一条平行于横坐标的直线，与干扰组分的曲线 (a) 交于两点，且与待测组分的曲线 (b) 也相交，以交于干扰组分的一点所对应的波长为参比波长 λ_1 ，另一点对应的波长为测量波长 λ_2 ，然后对混合组分进行测定。该法在分析浑浊或背景影响较大的试样时，其灵敏性及选择性等均比单波长法强。

$$\begin{aligned} A_1 &= A_{1a} + A_{1b} + A_{1s} \\ A_2 &= A_{2a} + A_{2b} + A_{2s} \\ A_{1s} &= A_{2s} + A_{1a} = A_{2a} \\ \Delta A &= A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = \Delta \varepsilon b c = (\varepsilon_{2b} - \varepsilon_{1b}) b c_b \end{aligned} \quad (2.5)$$

式中 A_{1a}, A_{1b} —— λ_1 处组分 a 和 b 的吸光度值；

A_{2a}, A_{2b} —— λ_2 处组分 a 和 b 的吸光度值；

A_{1s}, A_{2s} —— λ_1 和 λ_2 处的背景吸收，默认其值相等；

b ——试样厚度；

c ——试样浓度；

ε ——摩尔吸光系数。

ΔA 与待测组分浓度 c 呈线性关系，可求得 c_b ，同理也可求得 c_a 。

λ_1 与 λ_2 的选择必须注意以下几点：一是干扰组分在这两波长处的吸光度要相等；二是待测组分在这两个波长处必须具有最大差值。在实际操作中，一般是通过作图法确定 λ_1 与 λ_2 。

4. 示差法

如朗伯-比尔定律所述，分光光度法一般只适用于微量组分的测定。当组分含量较高时，光吸收值 A 较大，将产生较大的读数误差，此时需采用示差法，即以浓度略低于待测组分浓度 (c_x) 的标准溶液 (c_s) 为参比溶液，调 $T\% = 100\%$ 或 $A = 0$ ，所测得的试样吸光度此时实际为 ΔA ，则

$$\begin{aligned}
 A_x &= \varepsilon b c_x \\
 A_s &= \varepsilon b c_s \\
 \Delta A &= A_x - A_s = \varepsilon b \Delta c
 \end{aligned}
 \tag{2.6}$$

式中 A_x, A_s ——待测组分及空白的吸光度值；

b ——试样溶液厚度；

c_x ——待测组分浓度；

c_s ——空白浓度；

ε ——摩尔吸光系数。

示差法测得的吸光度 ΔA 与 Δc 呈线性关系，故 $c_x = c_s + \Delta c$ 。

5. 导数分光光度法

导数分光光度法特别适用于多组分的光谱重叠、浑浊试样、胶体散射和背景吸收干扰严重、精细结构难以获取等特殊情况下的测定。它是通过将吸光度值信号转化为波长的导数信号，从而提高分辨率的一种数据处理分析方法。根据 $I = I_0 e^{-\varepsilon bc}$ ，对波长求一阶导数，即

$$\frac{dI}{d\lambda} = \frac{dI_0}{d\lambda} e^{-\varepsilon bc} - \frac{d\varepsilon}{d\lambda} I_0 b c e^{-\varepsilon bc}
 \tag{2.7}$$

控制仪器，使入射光强度 I_0 始终保持恒定，即 $\frac{dI_0}{d\lambda} = 0$ ，则

$$\frac{dI}{d\lambda} = -\frac{d\varepsilon}{d\lambda} I b c
 \tag{2.8}$$

式中 I ——透光度强度；

I_0 ——入射光强度；

b ——试样溶液厚度；

c ——试样浓度；

ε ——摩尔吸光系数；

λ ——波长。

以摩尔吸光系数对波长的变化率 $d\varepsilon/d\lambda$ 表示， $d\varepsilon/d\lambda$ 越大，灵敏度越高，故常选择吸收曲线拐点处以提高灵敏度。一阶导数信号与试样浓度呈线性关系，以此类推，可求得二阶、三阶、四阶导数对应的光谱信号与浓度仍成正比的关系。吸收峰的数目为导数阶数 +1，阶数越大，峰形越尖，分辨率越高。

2.2.9 紫外-可见分光光度法测定条件的选择

有些化合物在紫外-可见区有吸收峰，可直接利用分光光度法定量测定；有些化合物在紫外-可见区无吸收，则可利用特异性显色剂与其反应后再测定。为了使测定结果的准确度及灵

敏度更高，必须确定适宜的测量条件，主要包括温度、溶剂极性、pH、波长、吸光度范围、狭缝宽度、显色剂、反应条件及参比溶液的选择等。

2.2.9.1 测定波长

测定波长一般选择最大吸收波长 λ_{\max} 以提高准确度和灵敏度，此时非单色光引起的误差较小。但若最大吸收波长处有共存组分干扰，应根据“干扰最小、吸收最大”的原则，选择灵敏度稍低而不受干扰的次强峰作为测量波长。

2.2.9.2 吸光度范围

浓度的相对误差 $\Delta c/c$ 与透光度误差 ΔT 及透光度 T 有关。控制 $\Delta T = 1\%$ ，制作 $\Delta c/c$ 与 T 的关系曲线，研究表明，当 T 在20%~65%之间时， $\Delta c/c$ 最小，此时为最佳读数范围。

$$A = \lg I^{1/T} = \varepsilon bc \quad (2.9)$$

对式(2.9)进行微分，得

$$d \lg T = 0.4343 \frac{dT}{T} = \frac{-\varepsilon}{dc} \quad \text{或} \quad d \lg T = 0.4343 \frac{\Delta T}{T} = \frac{-\varepsilon}{\Delta c} \quad (2.10)$$

将式(2.10)带入朗伯-比尔定律，得

$$\frac{\Delta c}{c} = 0.434 \frac{\Delta T}{T \lg T} \quad (2.11)$$

要使式(2.11)的误差 $\Delta c/c$ 最小，对其求导并取极小值，即

$$\lg T = -0.434 = A \quad (2.12)$$

所以，当吸光度 $A = 0.434$ 或 $T = 36.8\%$ 时，吸光度测量误差最小。在有关分光光度技术的具体实验操作中，一般可通过调节待测溶液的浓度，将 A 控制在0.2~0.8之内。

2.2.9.3 狭缝宽度

狭缝宽度不仅影响测量的灵敏度，还影响吸光度范围。狭缝太宽，将引入杂色散光，使光的单色性差，造成测量灵敏度降低；狭缝太窄，出射光信号弱，对光吸收弱的组分测定带来困难。因此，吸光度不减小时的最大狭缝宽度为最佳测量狭缝宽度，一般狭缝宽度大约是试样吸收峰半宽度的1/10。

2.2.9.4 显色剂反应条件

在可见分光光度测定中，常加入显色剂增大测量体系的吸光度值。选用显色剂的要求是反应生成物具有很大的摩尔吸光系数，以提高灵敏度，选择性好，形成的有色化合物的组成恒定，

稳定性好，显色条件易于控制；有色化合物与显色剂之间的颜色差别大（至少在 60 nm 以上），显色反应条件易于控制等。显色反应条件，包括显色剂的用量、反应时间、反应温度、溶液的酸碱性、参比溶液等决定测定的准确度、灵敏度及实验的重现性，可在具体实验中进行优化。

常见的显色反应包括配位反应和氧化还原反应。

2.2.9.5 参比溶液的选择

若试样共存组分较少，且对测定波长不产生光吸收，可采用试样溶液作为参比溶液，以消除溶剂等因素的影响。若显色剂或溶液中其他组分在测定波长处有光吸收，则可通过不加入试样，而用相同体积的试样溶液（试样无色时可用蒸馏水或缓冲液）代替试样，其他条件不变，来制作参比溶液。该法可消除试剂组分的光吸收造成的影响。

如果测定体系中存在共存离子的干扰，需予以消除。常见的干扰现象有：共存离子与试剂形成有色配合物，或虽然不形成有色物质但消耗了大量的显色剂；干扰离子本身有颜色；与目的离子结合生成一种解离度更小的化合物等。以上所述现象可通过以下办法有针对性地尝试予以解决：调节体系酸碱度，以提高反应的选择性；尝试加入屏蔽剂，与干扰组分反应，且该反应产物不影响目的组分的测定；更换参比溶液；重新选择测定波长；除去干扰离子或尝试双波长等方法。

2.2.10 紫外-可见光谱的应用

紫外-可见光谱除可用于某些微量组分的定性和定量分析外，还可用于反应动力学研究，如速率常数和活化能的测定、 pK_a 测定、DNA 的溶解温度（ T_m ）的测定、配合物的组成和稳定常数的测定、弱酸的解离常数的测定及蛋白质等生物大分子的空间构象的判断等。

2.2.10.1 反应动力学研究

若反应体系中仅反应物或产物在某一波长处有特征性光吸收，则可利用紫外-可见光谱法测定该反应的反应速率。如 L-苹果酸脱氢酶催化苹果酸脱氢生成草酰乙酸，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（ NAD^+ ）是苹果酸脱氢酶的辅酶，其在反应中得到从苹果酸中脱下的 H^+ 和一对电子生成还原型 $NADH$ ，而将另一个 H^+ 释放在介质中。 $NADH$ 在 340 nm 具有特征性光吸收， NAD^+ 在 340 nm 处无吸收，因此，可通过 340 nm 吸光度的变化来定义酶促反应速度的快慢。该反应在生化、环境监测领域应用较为广泛。

2.2.10.2 pK_a 的测定

酸碱化学中，若酸或碱中仅一个存在特征性紫外-可见光吸收，则可利用紫外-可见光谱法并结合 Henderson-Hasselbalch 方程测定 pK_a 。以苯酚为例，苯氧负离子的特征性吸收在 287 nm，以 pH 为横坐标，测定波长 287 nm 处的光吸收值，绘制曲线。光吸收值增加一半时所对应的 pH 即为该化合物的 pK_a 。

2.2.10.3 DNA 的溶解温度的测定

DNA 双螺旋两条链有一半为单链时对应的温度为 DNA 的溶解温度 (T_m)。由于随着温度的增高， A_{260} 增加，产生增色效应 (hyperchromic effect)，因此，通过制作光吸收值-温度曲线，其对应的中点即为 DNA 溶解温度。该法可用于估算 DNA 分子中鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 碱基的比例。

2.2.10.4 纯度的鉴定

蛋白质和核酸的纯度鉴定，可用 A_{280}/A_{260} 或 A_{230}/A_{260} 表示。 A_{280} 和 A_{260} 分别代表蛋白质和核酸的紫外吸收值。

2.3 红外吸收光谱法

红外吸收光谱 (infrared absorption spectrometry, IR) 是利用物质分子对红外光产生吸收及产生的红外吸收光谱来鉴别分子组成、结构或定量的方法。由于红外光能量不足以使试样发生电子能级跃迁，只能发生分子的振动和转动能级跃迁，因此，红外光谱也称为分子振动转动光谱。振动能级跃迁必然引起转动能级跃迁，因而红外谱图也是一种带状光谱。

红外光谱法是分子结构鉴定和化学组成分析的常用手段之一，较为常用的是根据吸收谱带的峰位置、峰强度及峰形来鉴别分子结构以进行定性分析，但只适用于在振动中伴有偶极矩变化 ($\Delta\mu$) 的化合物。红外光谱法具有以下优点：特征性强，不受试样物理状态限制，分析速度快且成本低，试样用量少且无损，应用范围广 (除单原子分子及同核分子外，几乎所有有机物都有红外吸收)，获得的分子结构信息更为精细，已有许多标准谱图可供查询等；但也有解谱困难、谱带重叠严重等缺点。目前，红外光谱法已广泛用于化学分析、生物医药、食品及环境监测等领域。

2.3.1 基本原理

2.3.1.1 红外光区的划分

红外光 (infrared ray) 是波长在可见光和微波光 ($0.8 \sim 1\,000\ \mu\text{m}$) 之间的一种电磁波, 该区域被称为红外光谱区或红外区。根据应用的需要, 将红外光区划分为近红外区 ($0.8 \sim 2.5\ \mu\text{m}$, $15\,000 \sim 4\,000\ \text{cm}^{-1}$)、中红外区 ($2.5 \sim 50\ \mu\text{m}$, $4\,000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$) 和远红外区 ($50 \sim 1\,000\ \mu\text{m}$, $400 \sim 10\ \text{cm}^{-1}$), 其中中红外区是研究分子振动能级跃迁的主要区域。

1. 近红外光区

近红外光区的吸收主要是低能电子跃迁或 X—H 键伸缩振动的倍频(由基态跃迁至第二、三等激发态吸收的频率)和组合频振动吸收产生。与基频相比较, 倍频和组合频的峰强度减弱约两个数量级, 摩尔吸光系数较小, 主要用于某些物质的定量分析, 如 O—H 键伸缩振动可用于测定甘油、肼和有机膜等试样中的水, 也可定量测定醇和有机酸等; C=O 伸缩振动可用于测定酯、酮和羧酸, 其准确度、精确度与紫外-可见吸收光谱接近。近红外光区还可利用漫反射进行未处理固体和液体试样的测定。目前, 近红外光主要用于蛋白质、水分、淀粉、油脂及纤维素等的测定。

2. 远红外光区

远红外光区的吸收主要是金属有机化合物和金属配合物、一些无机化合物或无机离子及其晶体中重原子的伸缩振动和弯曲振动、气体分子的纯转动跃迁或振动跃迁等。由于远红外光区能量弱, 一般不在此区域进行分析。

3. 中红外光区

绝大多数有机化合物、无机化合物或它们的结合物的基频吸收基本处于该区域。一方面由于基频是红外光谱中吸收强度最大时所对应的振动, 另一方面, 现在红外光谱仪的光栅色散系统已被替换为干涉分光系统, 因此中红外光不仅适合进行化合物的定性、结构分析, 还可以较好地进行定量分析。随傅里叶变换技术的出现, 该区域的光也开始应用于表面的显微分析。

由于绝大多数有机化合物和无机离子中化学键的基频吸收都在中红外区, 因此, 通常所说的红外光谱指中红外光谱。

2.3.1.2 分子振动原理

产生红外光谱必须满足两个条件: 第一, 红外辐射光子的能量与分子振动能级跃迁所需能量相同; 第二, 辐射与物质间有相互耦合作用, 即瞬时偶极距有变化(偶极矩无变化的振动出现在拉曼光谱中)。这是因为只有分子振动时偶极矩作周期性变化, 才能产生交变偶极场, 并与其频率相匹配的红外辐射交变电磁场发生耦合作用, 分子吸收能量跃迁至激发态,

此时振动频率不变，振幅增大，具有这样性质的分子称为具有红外活性 (infrared active)。必须明确的是，只需分子振动时发生偶极矩变化即表明分子具有红外活性，而与分子是否具有永久偶极矩无关，因此，单质和对称性好的分子的对称伸缩振动无偶极矩变化，不产生红外活性，但 CO_2 除了对称伸缩振动外，其余三种均具有红外活性。

以化学键相连的两个原子类似于弹簧连接的两个球，具有柔性，其在不停地以各种形式振动，振动频率取决于原子质量和化学键的强度。当分子受到频率变化的红外光照射时，如果分子中某个基团的振动频率与其相等，则会产生共振，此时光的能量通过偶极矩的变化传给分子，该基团吸收一定频率的红外光后，分子振动和转动能级由基态向激发态跃迁，使相应区域的透射光强度减弱。

不同原子组成的双原子分子的振动近似于简谐振动 (simple harmonic vibration)，即将双原子间的化学键视为质量不计的弹簧，两个原子视为各自在其平衡位置附近进行伸缩振动的小球。根据胡克 (Hooke) 定律，谐振子的振动频率为

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.13)$$

式中 ν ——化学键的振动频率；

k ——化学键力常数，为将两原子由平衡位置拉伸单位长度 (约为 0.1 nm) 后的恢复力，与键能和键长有关， $\text{N}\cdot\text{cm}^{-1}$ ；

μ ——质量为 m_1 和 m_2 的双原子的折合质量 (reduced mass)， $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ ，g。

波数可表示为

$$\sigma = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.14)$$

式中 σ ——波数 (也可用 $\tilde{\nu}$ 表示)，其值为 $1/\lambda$ ，表示每厘米光中波的数目， cm^{-1} ；

c ——光速， $c = 3 \times 10^{10} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

从式 (2.14) 可以看出，振动跃迁的波数或频率主要取决于化学键力常数 k 和原子折合质量 μ ，即取决于分子的结构特征；但实际上分子的振动能量变化是量子化的，分子中原子间、基团间的化学键会相互影响，除了上述化学键力常数和折合质量外，还受到化学结构和化学环境的影响。

以波数 $\tilde{\nu}$ 或波长 λ 为横坐标、以透光率 $T\%$ 或吸光度 A 为纵坐标作图，所得到的曲线为红外吸收光谱。红外光谱图包括谱带数目、谱带位置、谱带形状 (包括尖锐程度和对称性等) 和谱带强度等。红外光谱的谱带位置、谱带强度代表了某种分子的结构特点，可鉴别基团的存在与否；谱带强度与某些基团的含量有关，可用于定量或纯度分析。

2.3.1.3 多原子分子振动

多原子分子由于原子数目增多，空间结构多样化，其振动光谱的复杂程度远超双原子分子。但可将其振动分解为许多简单的基本振动的线性组合，即简正振动的线性组合。在红外光谱中简正振动的振动形式基本可分为伸缩振动和弯曲振动。简正振动是指分子的质心保持不变，整体不转动，每个原子均在其平衡位置做简谐振动，其振动频率和相位均相等，即每个原子都在同一瞬间通过其平衡位置，且同时达到其最大位移。

1. 伸缩振动

伸缩振动 (stretching vibration, ν) 是指原子沿键轴方向的伸长和缩短引起的振动，振动时只有键长的变化而无键角的变化。根据振动方向，伸缩振动又可以分为对称伸缩振动 (ν_s) 和反对称伸缩振动 (ν_{as})。双原子分子仅有伸缩振动。

2. 弯曲振动

弯曲振动又称变形振动或变角振动 (bending vibration, δ)，它指基团化学键的键长不变而键角发生周期性的变化。弯曲振动分为面内弯曲振动 (β) 和面外弯曲振动 (γ)。面内弯曲振动又分为剪式 (δ) 和平面摇摆振动 (ρ)，指的是在几个原子组成的平面内的振动。面外弯曲振动可分为面外摇摆 (ω) 和扭曲振动 (卷曲振动, τ)，指的是在几个原子组成的平面外的振动。如 CO_2 对称伸缩振动无红外活性，非对称伸缩振动在 2349 cm^{-1} 有红外活性。

一般而言，伸缩振动频率高于弯曲振动，不对称伸缩振动频率高于对称伸缩振动，面内弯曲振动频率高于面外弯曲振动频率。

以水分子的振动为例，其为非线型分子，振动自由度为 3 个振动形式，分别为不对称伸缩振动、对称伸缩振动和变形振动 (图 2.4)。

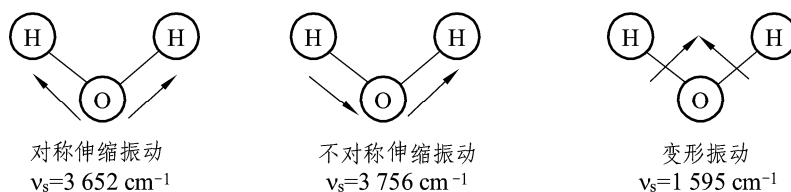


图 2.4 水分子的振动形式

3. 简正振动的自由度和峰数

振动的数目为振动自由度。如果分子中的原子数目为 N ，由于每个原子具有 x 、 y 、 z 三维空间，所以分子的总自由度为 $3N$ ，即 $3N$ 种运动状态。分子总自由度可表示为 $3N =$ 平动自由度 + 转动自由度 + 振动自由度。 $3N$ 种运动状态中有 3 个整个分子的质心沿 x 、 y 、 z 轴方向的平移运动和 3 个整个分子的质心绕 x 、 y 、 z 轴的转动运动，这 6 种运动均不是分子振动，因此，非线性分子的振动自由度为 $3N - 6$ ；而对于线性分子，假如贯穿所有原子的轴在 x 轴上，则整个分子只能绕 y 、 z 轴转动，也就是说只有 2 个转动自由度，因而其振动自由度为 $3N - 5$ 。

理想状况下，每个振动自由度代表一次独立的振动，相应产生一个红外峰，即峰数等于自由度，但由于在振动过程中存在诸如无瞬时偶极矩(非红外活性)、频率相同振动的重叠(红外光谱简并)、强峰掩盖弱峰、振动吸收能量太小及红外峰处于非中红外区等原因，引起峰的数目常少于振动自由度数目。如水为非线性分子，振动自由度为 3，应产生三个吸收峰；CO₂ 为线性分子，振动自由度为 4，但只出现两个红外峰(2 349 cm⁻¹ 和 667 cm⁻¹)，原因在于 CO₂ 的对称伸缩振动是非红外活性的，面内弯曲振动(667cm⁻¹)和面外弯曲振动(667cm⁻¹) 发生红外光谱简并。

4. 简正振动的非谐性

分子的振动只是近似于简谐振动，因此，它不可避免地遵循非谐振动的规律，允许分子振动从基态跃迁至任何激发态。如前所述，振动能级从基态跃迁至第一激发态的吸收峰为基频峰，由基态跃迁至其他非第一激发态的吸收峰为倍频峰，如跃迁至第二激发态和第三激发态等所产生的吸收峰分别称为二倍频峰、三倍频峰等，总称为倍频峰。除此之外，还有一些弱峰，是由两个或多个基频峰频率的和或差产生的，相应地称为合峰和差频峰。倍频峰、合峰及差频峰总称为泛频峰，为弱峰，一般在谱图上难以辨认。另外，除特征峰外，其他相互依存、相互佐证的吸收峰，称为相关峰。

2.3.2 基团频率和特征吸收峰

红外光谱可以反映物质的分子结构，而不同分子中的相同基团，其振动频率相近，即相同基团的吸收谱带基本一致，将此基团吸收谱带称为特征吸收峰，通常是由基态跃迁至第一振动激发态时产生的，其所对应的频率称为基团频率(group frequency)，也称为基频，如—CH₃的基团频率为 2 800~3 000 cm⁻¹等。基团频率能代表基团的存在，且往往具有较大的吸收强度。如—OH、—CH₃、—CH₂—等都有各自的特征吸收峰，分子中的其他基团对其吸收位移影响较小。因此，掌握基团频率规律可确定相应基团，进而可鉴定物质的分子结构。

2.3.3 谱带的划分

在红外光谱中，用来鉴定分子官能团的区域主要是波数 4 000~1 300 cm⁻¹，这一区域也称为官能团区或基团频率区或特征区。该区吸收峰主要是由基团的伸缩振动所产生的，峰带少，易辨认，是化学键和基团的特征性振动频率区，常被优先用于官能团鉴定。

在 1 300~400 cm⁻¹ 范围内，当分子结构发生细微改变时，其指纹区将有细微差异，与结构的相关性很紧密，因而能对应地显示出分子特征，就像人的指纹，称为指纹区。该区对

于辨认结构类似的化合物具有重要意义。但指纹区的吸收峰比较密集，不易辨认。该区振动形式除了单键的伸缩振动外，还有 C—H 的弯曲振动。无机化合物的振动频率基本处于这一红外区域。

2.3.3.1 官能团区

1. 4 000 ~ 2 500 cm^{-1} 的 X—H 键伸缩振动区

X 主要是 C、N、O、S 原子。O—H 键的伸缩振动出现在 3 650 ~ 3 200 cm^{-1} ，可作为判断有无醇、酚和有机酸等的重要依据。当 —OH 缔合形成氢键时，O—H 键的伸缩振动峰一般移向低波数处且峰形变宽、峰强增大。有机酸中的 —OH 常形成双缔合体，因而这种现象更加明显。胺和酰胺中 N—H 键的伸缩振动也出现在 3 500 ~ 3 300 cm^{-1} 。要特别注意区分是 N—H 键还是 O—H 键的伸缩振动：—NH₂ 为双峰、=NH 为单峰、≡N 无吸收峰。

对于饱和烷烃而言，C—H 键的伸缩振动在 2 800 ~ 3 000 cm^{-1} ，取代基的影响微乎其微。—CH₃ 的伸缩振动在 2 960 cm^{-1} (ν_{as}) 和 2 870 cm^{-1} (ν_{s})，—CH₂ 的伸缩振动在 2 930 cm^{-1} (ν_{as}) 和 2 850 cm^{-1} (ν_{s})，—CH 的伸缩振动在 2 890 cm^{-1} 且强度较弱。

对于不饱和烷烃而言，C—H 键的伸缩振动在 3 000 cm^{-1} 以上。苯环中 C—H 的伸缩振动在 3 030 cm^{-1} ，谱带较尖；=CH 在 3 010 ~ 3 040 cm^{-1} 处，=CH₂ 在 3 085 cm^{-1} 处，三键中的 C—H 键的伸缩振动在 3 300 cm^{-1} 处。另外，醛中的羰基碳与氢原子的 C—H 键的伸缩振动为双重峰，在 2 740、2 855 cm^{-1} 处。

2. 2 500 ~ 1 900 cm^{-1} 的三键和累积双键区

主要包括 C≡C、C≡N 等伸缩振动，—C=C=C、O=C=O 等不对称伸缩振动。端炔 C≡CH 的三键在 2 100 ~ 2 140 cm^{-1} 处，其余炔烃 R—C≡CR 在 2 190 ~ 2 260 cm^{-1} 处。非共轭条件时 C≡N 的伸缩振动在 2 240 ~ 2 260 cm^{-1} 处，共轭条件下其伸缩振动在 2 220 ~ 2 230 cm^{-1} 处。O=C=O 的双键振动在 2 300 cm^{-1} 处。

3. 1 900 ~ 1 500 cm^{-1} 的双键区

C=O 的伸缩振动在 1 900 ~ 1 650 cm^{-1} 处，且峰强度较大，常用来鉴别醛、酮、有机酸和酯等；C=C 的伸缩振动在 1 680 ~ 1 620 cm^{-1} 处，芳香环的 C=C 的伸缩振动在 1 600 cm^{-1} 和 1 500 cm^{-1} 附近，常有几个峰，可用于判断芳香环的存在。

需要注意的是 N—H 键的弯曲振动也大致在 1 600 cm^{-1} 附近。

2.3.3.2 指纹区

1. 1 500 ~ 900 cm^{-1} 区

该区域除诸如 C—O、C—N、C—S 等单键的伸缩振动和 C=C 等双键的伸缩振动外，还有弯曲振动对应的谱带。如甲基中的 C—H 的对称弯曲振动在 $1\ 375\text{ cm}^{-1}$ ，烯烃双键 C—H 弯曲振动在 $1\ 000\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 区。

2. $900\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 区

该区域主要用于判断某些化合物的顺反构型。另外，苯环中 C—H 的弯曲振动在 $910\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 区，具体信息还需要研究是单取代还是双取代的邻、间、对等。

2.3.3.3 常见有机化合物的红外谱带

1. 烷烃类化合物

烷烃类化合物主要有 C—H 键的伸缩振动和面内弯曲振动，前者在 $3\ 000\sim 2\ 850\text{ cm}^{-1}$ 处出现强的多重峰，常需具体分析，如 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}$ 或上述基团的各种含杂原子的衍生物等，其吸收峰均相应出现一定的变化。C—H 键的面内弯曲振动在 $1\ 490\sim 1\ 350\text{ cm}^{-1}$ 处，同样，仍需具体考虑含不同氢原子数目时 C—H 键的振动频率，要特别注意 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 或 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 类振动耦合对其振动频率的影响。

2. 烯烃类化合物

烯烃类化合物主要有 C=C、 $=\text{CH}$ 的伸缩振动和面外弯曲振动吸收峰。 $=\text{CH}$ 的伸缩振动和面外弯曲振动吸收峰分别出现在 $3\ 100\sim 3\ 010\text{ cm}^{-1}$ 和 $990\sim 690\text{ cm}^{-1}$ 处，前者较弱，后者强度较大且常用来判断双键的取代、顺反异构等情况。C=C 的伸缩振动在 $1\ 680\sim 1\ 620\text{ cm}^{-1}$ 处，强度较小。

3. 炔烃类化合物

炔烃类化合物主要有 $\equiv\text{CH}$ 和 $\text{C}\equiv\text{C}$ 的伸缩振动吸收峰。前者在 $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 且峰强而尖；后者在 $2\ 260\sim 2\ 100\text{ cm}^{-1}$ 处，但后者含氢数目不同时，振动频率会发生变化，一次取代时， $\text{C}\equiv\text{C}$ 的伸缩振动吸收峰在 $2\ 150\sim 2\ 100\text{ cm}^{-1}$ 处，两次取代时，在 $2\ 270\sim 2\ 150\text{ cm}^{-1}$ 处。

4. 芳香烃类化合物

芳香烃类化合物主要有 $=\text{CH}$ 、C=C、泛频区、 $-\text{CH}$ 的剪式弯曲振动及 $=\text{CH}$ 的面外弯曲振动。 $=\text{CH}$ 的伸缩振动在 $3\ 030\text{ cm}^{-1}$ ；C=C 出现多个峰，但通常以弱的 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 和强的 $1\ 500\text{ cm}^{-1}$ 峰出现，当有共轭基团相连时， $1\ 580\text{ cm}^{-1}$ 处出现新峰。芳香烃类化合物的 C=C 需要充分考虑取代基、取代的位置和数目及分子的对称性等许多因素对吸收峰位置和强弱的影响。C—H 键面外弯曲振动的倍频和组合频在 $2\ 000\sim 1\ 660\text{ cm}^{-1}$ 处，常用于表征芳香环的取代类型； $-\text{CH}$ 的剪式弯曲振动在 $1\ 230\sim 960\text{ cm}^{-1}$ 处； $=\text{CH}$ 的面外弯曲振动在 $900\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 处有强吸收峰，有助于判断取代基的数目和类型。

5. 醇、酚和醚类化合物

醇和酚类化合物的吸收峰主要是一OH和C—O的伸缩振动。游离的醇和酚—OH的振动频率在 $3\ 650\sim 3\ 600\text{ cm}^{-1}$ 处；固体或液态时，由于分子间氢键的缘故，该吸收带变宽且移向低频处。对伯醇、仲醇、叔醇和酚而言，其C—O的伸缩振动分别在 $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 150\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 230\text{ cm}^{-1}$ 处。对醚而言，C—O—C的非对称伸缩振动在 $1\ 260\sim 1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 处，但在结构鉴定中意义不大，这是因为醇、酚、酯和羧酸等的C—O均会对醚键的吸收提供帮助。

6. 羰基类化合物

C=O类化合物的电负性差距大，偶极矩变化大，吸收峰强，特征性较为明显。一般而言，醛、酮、羧酸、酯、酰胺等的C=O的伸缩振动频率分别在 $1\ 725\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 715\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 710\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 735\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 690\text{ cm}^{-1}$ ，相应的酰肼和酸酐的C=O振动频率更大。

对醛类而言，主要是C=O和C—H的伸缩振动，有共轭作用存在时，向低频方向移动，出现在小于 $1\ 725\text{ cm}^{-1}$ 处。C—H的伸缩振动一般在 $2\ 820\sim 2\ 720\text{ cm}^{-1}$ 处有两个强度接近的吸收峰。

对酮类而言，主要是C=O的伸缩振动，同样，有共轭作用存在时，向低频方向移动，如果为环酮，则随环张力的增大向高频方向移动。

对羧酸类而言，主要是C=O和C—O的伸缩振动及—OH的伸缩振动和面外弯曲振动。游离的—OH的伸缩振动一般在 $3\ 550\text{ cm}^{-1}$ 处，峰形较尖；缔合的—OH的伸缩振动一般在 $3\ 300\sim 2\ 500\text{ cm}^{-1}$ ，峰形宽而强；—OH的面外弯曲振动约在 920 cm^{-1} ，面内弯曲振动在 $1\ 440\sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 。C=O的伸缩振动在 $1\ 725\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ ，峰宽而强，C—O的伸缩振动在 $1\ 330\sim 1\ 210\text{ cm}^{-1}$ 。羧酸盐负离子在 $1\ 600$ 和 $1\ 400\text{ cm}^{-1}$ 处分别具有不对称伸缩振动和对称伸缩振动，吸收峰较强，羧酸原有的C=O和—OH的伸缩振动及—OH的面外弯曲振动随之消失。其他羧酸衍生物，如酸酐，有两个C=O吸收峰，约 $1\ 820$ 和 $1\ 750\text{ cm}^{-1}$ 处， $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 处有C—O的伸缩振动峰。

对酯类化合物而言，主要是C=O和C—O的振动。当C=O未共轭时，吸收峰在 $1\ 740\sim 1\ 725\text{ cm}^{-1}$ 处，同样，共轭作用及环内酯中存在的环张力可分别使其向低频和低频方向移动。C—O的对称伸缩振动和非对称伸缩振动峰出现在 $1\ 300\sim 1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 处。

对酰胺而言，主要有N—H的伸缩振动和剪式面内弯曲振动，C=O、C—N的伸缩振动。N—H的伸缩振动在 $3\ 500\sim 3\ 100\text{ cm}^{-1}$ 处，具体如下：游离的伯酰胺吸收峰在 $3\ 500$ 和 $3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 处出现双峰，游离的仲酰胺吸收峰在 $3\ 500\sim 3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 处出现单峰，缔合时，两者均相应移向低频方向。N—H的伸缩振动峰比—OH弱且尖。C=O的伸缩振动具体如下：游离的伯酰胺和仲酰胺吸收峰分别在 $1\ 690\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 680\text{ cm}^{-1}$ 处，缔合时，两者均相应移向低频方向，叔酰胺的C=O的伸缩振动基本在 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 处。N—H的剪式面内弯曲振动具体如下：伯酰胺和仲酰胺分别在 $1\ 640\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 570\sim 1\ 510\text{ cm}^{-1}$ 处，可用于区别伯酰胺和仲酰胺；对伯酰胺和仲酰胺而言，C—N的伸缩振动分别在 $1\ 400\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 。

7. 含氮类化合物

含氮类化合物分为胺类化合物、硝基类化合物和氰类化合物。

对胺类化合物而言,主要有N—H的伸缩振动和剪式面内弯曲振动及C—N的伸缩振动。N—H的伸缩振动在 $3\ 500\sim 3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 处,具体如下:伯胺在 $3\ 400\sim 3\ 250\text{ cm}^{-1}$ 处出现双峰,仲胺在 $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 出现单峰,叔胺则无N—H的伸缩振动。伯胺或仲胺各自缔合后均移向低频方向。N—H的剪式面内弯曲振动:对于伯胺而言,出现在 $1\ 640\sim 1\ 560\text{ cm}^{-1}$ 处,面外弯曲振动在 $900\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 处;而仲胺的剪式面内弯曲振动在 $1\ 580\sim 1\ 490\text{ cm}^{-1}$ 处,几乎观察不到面外弯曲振动。C—N的伸缩振动:对脂肪胺而言,在 $1\ 250\sim 1\ 020\text{ cm}^{-1}$ 处,为弱峰;对芳香胺而言,在 $1\ 350\sim 1\ 270\text{ cm}^{-1}$ 处,为强峰。

对硝基类化合物,主要有N=O和C—N的伸缩振动,前者出现在 $1\ 650\sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 390\sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 处,后者出现在 $920\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 处。

对氰类化合物,主要有C≡N的伸缩振动,在 $2\ 300\sim 2\ 200\text{ cm}^{-1}$ 处,中强峰,峰形尖。

2.3.4 影响吸收峰位置的因素

如前所述,红外光谱吸收峰的位置由振动能级差决定,基团频率由成键原子的质量和键力常数决定。但分子中各基团不是孤立的,其邻近化学基团或化学环境的改变均会不同程度地影响基团频率的大小,因而使吸收峰的位置发生变化。主要分为电子效应、空间效应、氢键、振动耦合和Fermi共振等。

2.3.4.1 电子效应

1. 诱导效应(I效应)

就整个分子而言,是呈电中性的,但对于各原子,其得失价电子难易不同,因而分子表现出不同的电负性。取代基团的电负性不同,可通过静电诱导引起电子分布发生改变,从而影响键力常数 k 的大小,最终使吸收峰的位置发生改变。如烷基酮,当其烷基被Cl原子取代时,基团频率增大,这是因为Cl原子的强电负性使氧原子上的电子云转移至C=O键间,增加了C=O键力常数,基团频率增加,向高波数方向移动。如将Cl原子替换为F原子,由于F原子电负性强于Cl原子,诱导效应更为明显,将使C=O键的基团频率更加显著地移向高频方向。

2. 共轭效应(C效应)

共轭效应导致电子云密度有平均化的趋势,使原来双键键长略有变长,键力常数 k 减小,因此,基团频率向低波数方向移动。如烷基酮的C=O,当其烷基被苯环取代时,由于C=O

键的 π 电子向苯环的离域现象随苯环取代比例的增加而更加明显,双键具有部分单键的性质,即键长增加,键强度降低,最终使 $C=O$ 的基团频率相应向低波数方向移动。

在许多情况下,诱导效应和共轭效应是同时存在的,只需要考虑哪种效应占优势。如当O、N、X等杂原子与双键或三键相连时,吸电子诱导效应和给电子共轭效应同时存在。一般而言,当杂原子是吸电子诱导效应占优的卤原子或氧原子时,不饱和键的红外吸收频率移向高波数方向;当杂原子是给电子共轭效应占优的氮原子或硫原子时,不饱和键的红外吸收频率移向低波数方向。

3. 中介效应

O、S及N原子的孤对电子与多重键相连时,产生 $p-\pi$ 共轭,类似于共轭效应对基团频率的影响,同时也存在诱导效应,此时,振动频率取决于两者的净效应。

2.3.4.2 空间效应

空间位阻是指由于基团的相互靠近等引起电子云密度发生变化,最终使振动频率发生变化,主要包括场效应、空间位阻和环张力作用等。

场效应(field effect)是空间上靠得比较近的基团间沿着空间结构,而不是化学键的静电作用力。

对共轭效应而言,空间位阻常导致共轭效应的共平面性减弱,从而引起红外峰移向高波数方向。另外,空间位阻也可以通过影响键长、键角,致使分子产生“电子张力”来减弱共轭效应。如环己酮、环戊酮和环丁酮的基团频率依次增大,就是由于键角改变所引起环张力产生的。分子量接近的环状化合物吸收频率通常高于链状化合物,也是由环张力造成的。

2.3.4.3 氢键

氢键的形成使电子云密度被平均化,体系能量下降,削弱了 $O-H$ 、 NH_2 键的强度,使伸缩振动频率降低。形成的氢键越强,频率下降越明显,同时,谱带强度增大且变宽。但对弯曲振动,氢键的形成使其轻微移向高波数方向,形成的氢键越强,谱带越窄。如羧酸由于 $-COOH$ 与 $-OH$ 间易形成氢键, $-COOH$ 中的 $C=O$ 基团频率降低,因此,液态和固态羧酸(此时羧酸基本为二聚体)的 $C=O$ 振动频率低于游离或气态羧酸(气态时二聚体比例很小,可忽略)。

另外,分子内氢键和分子间氢键对红外谱图的频率、强度和形状的影响不同,前者所导致的变化程度小于后者,即分子内氢键对基团频率的影响不随分子浓度的改变而改变,但分子间氢键则受到分子浓度的影响较大,该方法常用于判断氢键是分子间还是分子内氢键。如 CCl_4 作为溶剂进行乙醇醇羟基的红外光谱测定,乙醇浓度低于 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,只检测到游

离羟基吸收峰；但增大乙醇浓度时发现，该羟基峰减弱，出现了新的强度增强的吸收峰，这是因为随乙醇浓度的逐渐增大，乙醇不再以单分子存在，而是以相互缔合形式出现。一般而言，无论分子内氢键还是分子间氢键，均使吸收峰移向低波数方向。

2.3.4.4 键 级

键级是化学键的级数，即成键原子间化学键的个数。键级影响键能，因而也会影响峰的振动频率。相同原子组成的化学键，其键级越大，振动频率越高，如 $C\equiv C$ 、 $C=C$ 和 $C-C$ 的伸缩振动频率依次降低。

2.3.4.5 不同杂化原子

不同杂化状态的 $C-C$ 、 $C-H$ 键的振动频率不同，主要取决于碳原子的杂化态。一般而言， $sp>sp^2>sp^3$ ，这是因为 s 成分越多的键，表明其离原子核越近，相应的电负性就越大，键长越短，故键强度越高。当 $C-H$ 键中碳为 sp^2 杂化时，可进一步借助 $C=C$ 伸缩振动频率判断该体系是烯烃还是芳香烃。

2.3.4.6 质 量

化学键所连的两个原子的质量不同，会对振动频率的大小产生影响。如 $C-H$ 、 $O-H$ 、 $N-H$ 等由于氢原子的影响导致折合质量较小，红外振动频率出现在高波数处。同一周期元素的原子质量随原子序数的增大虽然差异不大，但由于电负性显著增大，引起键的极性增强，键长有缩短的趋势，振动频率增大。同族元素由于其质量差异较明显，因此，随原子序数的增大，键的伸缩振动频率明显变小。

2.3.4.7 振动耦合

两个振动频率相同或相近的基团相邻并连接于同一原子时，该原子两侧的两个键的振动将会通过公用原子产生相互影响，导致两个键的伸缩振动频率发生两极分化，相应的特征性吸收峰发生分裂，即一个向高频方向移动，另一个向低频方向移动，称为振动耦合(vibrational coupling)。振动耦合常出现在一些二羰基化合物中，如羧酸酐类化合物的两个 $C=O$ 相互耦合产生两个强的吸收峰； $-CH(CH_3)_2$ 或 $-C(CH_3)_3$ 的 $C-H$ 剪式面内弯曲振动 1380 cm^{-1} 处分裂出现双峰。

2.3.4.8 Fermi 共振

当较弱的倍频峰或泛频峰与强的基频峰接近时，由于相互作用的影响，弱的倍频峰或泛

频峰的红外峰强度增加并发生峰裂分，称为费米共振 (Fermi resonance)。

另外，测定条件如浓度、温度、制备方法、试样状态、粒度、溶剂极性、重结晶条件等也会对基团频率造成影响。此处主要介绍试样状态及溶剂对基团频率的影响。气态测定时提供的是游离分子的红外吸收信息，固态或液态时由于分子间缔合及氢键的影响，使吸收峰向低频方向移动，如前述的羧酸受到氢键的影响情况；极性溶剂的伸缩振动频率一般随溶剂极性增加而移向低波数方向，如 —COOH 在气态、非极性溶剂、乙醚、乙醇溶剂中时，基团频率依次为 1780 、 1760 、 1735 和 1720 cm^{-1} ，这对红外光谱分析是不利的，因此，红外光谱测定通常在非极性溶剂中测定，特别是在进行比对时，务必确保在相同条件下进行。

2.3.5 影响谱带强度的因素

物质对红外光的吸收同样符合朗伯-比尔定律，谱带强度分为强 ($T\% < 60\%$, s)、中 ($T\% 80 \sim 60\%$, m)、弱 ($T\% > 80\%$, w)、可变 (v) 等。也可用摩尔吸光系数 ϵ 表示， $\epsilon > 100\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，为很强吸收 (vs)； $\epsilon = 20 \sim 100\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，为强吸收 (s)； $\epsilon = 10 \sim 20\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，为中强吸收 (m)； $\epsilon = 1 \sim 10\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，为弱吸收 (w)； $\epsilon < 1\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，为很弱吸收 (vw)。

吸收峰的强度取决于振动过程中偶极矩的变化及能级跃迁的可能性，因此，凡是能影响偶极矩变化或能级跃迁几率的因素，均可影响谱带强度。能级跃迁几率是指基态发生振动能级跃迁处于激发态且达到平衡后，激发态分子占总的分子的比例。跃迁几率越大，谱带强度越强。而跃迁几率又与偶极矩变化 ($\Delta\mu$) 有关，偶极矩变化越大，谱带强度越大。

2.3.5.1 分子振动的对称性

基频振动过程中偶极矩变化与峰强度成正比，但偶极矩变化与分子对称性及键的极性有关。键两端原子的电负性相差越小，对称性越好，振动过程中分子的偶极矩变化越小，相应峰强度越弱。如 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动， $\text{C}=\text{O}$ 的两个原子间极性差异大，伸缩振动时偶极矩变化大，跃迁几率大，对称性比 $\text{C}=\text{C}$ 差，所以 $\text{C}=\text{C}$ 的吸收强度较小。

另外，由于不对称伸缩振动的对称性高于对称伸缩振动，前者吸收强度大于后者。伸缩振动的峰强度大于变形振动的峰强度。

2.3.5.2 基团或键的极性

一般而言，极性较强的分子或基团，如 —NH_2 、 —OH 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 C—X 、 R—OR 和 —NO_2 等谱带，偶极矩变化较大，吸收强度较大，均是强峰；而极性较弱的 $\text{C}=\text{C}$ 、 C—C 、 S—S 和 $\text{N}=\text{N}$ 等吸收强度较小。

2.3.5.3 分子振动能级跃迁几率

跃迁几率增加，则峰强度增强，如基频跃迁几率高于倍频，因而基频峰强度高于倍频。跃迁几率减小，则峰强度减弱，如基态跃迁产生的泛频峰。试样浓度越大，跃迁几率越大，峰越强。

2.3.5.4 电子效应

若电子效应降低基团的极性，则峰强度降低；反之，峰强度增大。如 $C=O$ 为强极性基团，当其与吸电子基团相连时， $C=O$ 极性下降，峰强度下降。共轭效应相当于增大了 π 电子的离域程度，不饱和键的极性增大（此时，键更容易形变，更容易激发，相当于增加了能级跃迁的几率），伸缩振动强度显著增强。

另外，氢键也可提高键的极性，伸缩振动的峰强度会有一定程度的增加。相似的化学结构和条件下，键的数目也可以影响峰强度。

2.3.6 红外光谱仪

2.3.6.1 试样要求及准备

试样要求：纯度达到 98% 以上；试样不含水；试样的浓度或厚度适中，使 T 在 10% ~ 80% 范围内。

对固体试样，常采用 KBr 压片法（ $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 区无红外活性）：将干燥的 200 mg KBr 加入玛瑙研钵，充分研磨后，加入其 5% 左右的干燥试样（1 ~ 2 mg），混合研磨至粒度小于 $2 \mu\text{m}$ ，以使光散射降至最低，利用压片机压至透明薄片，以 KBr 片为参比，测定试样的红外光谱。除压片法外，还有石蜡糊法、薄膜法。

对气体试样，可采用气体池进行测定。试样导入前先对玻璃气槽进行抽真空，玻璃气槽两端附有能透过红外光的碱金属卤化物 NaCl 或 KBr 窗片。常用样品池长 5 cm 或 10 cm，容积为 50 ~ 150 mL。气体池也需要干燥，以防止水蒸气在中红外区的强吸收。试样测完后，用干燥氮气冲洗。

对液体试样，沸点较低的采用封闭可拆式液体池法，沸点较高的采用液膜法。所用溶剂应确保在测定红外波段内无强吸收，一般配置成 1% ~ 10% 的溶液，在官能团区用 CCl_4 做溶剂，在指纹区用 CS_2 做溶剂。液体池的清洗是在红外灯下向池内灌注能溶解试样的溶剂浸泡，最后用氮气吹干溶剂。

2.3.6.2 红外光谱仪

目前有两种红外光谱仪：色散型和干涉型。

色散型红外分光光度计由光源、吸收池、单色器、检测器和记录系统组成，一般采用双光束，与紫外-可见分光光度计的构成较为接近。光源为一种能发射高强度连续红外波长的高温黑体惰性固体，电加热可发射高强度的红外辐射。常见的红外光源有能斯特 (Nernst) 灯和碳棒两种，前者发光强度高、寿命长且稳定性好；缺点是价格昂贵，机械强度差，操作不方便。后者在工作时需要用水冷却与电极相接触部分。单色器由色散器、入射和出射狭缝及反射镜组成。色散元件有棱镜和光栅两种，棱镜易吸水，必须干燥。样品池不能用具有红外吸收的玻璃或石英制作，只用能透过红外光的 NaCl、KBr 等材料制成。试样厚度要适中，不含水，试样组分尽可能预先已进行分离等。由于红外光谱辐射的光子能量较弱，不足以引起光电子发射，因此，红外光谱不可选用光电管或光电倍增管。常用的红外检测器有热检测器和光检测器两种。

傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR spectrometer) 由光源、迈克尔逊 (Michelson) 干涉仪、检测器、计算机及记录仪组成，无色散元件，但增加了干涉仪和计算机。其工作原理是光源发出的红外光经干涉仪变为两束光，再以不同光程差重新组合，发生干涉现象，形成干涉图。当光程差为 $\lambda/2$ 的偶数倍时，检测器上的相干光相互叠加，产生明线，相干光强度有极大值；相反，光程差为 $\lambda/2$ 的奇数倍，则相干光抵消，产生暗线，相干光强度有极小值，得到干涉强度对光程差的函数图谱。如将红外吸收试样置于干涉仪中，其吸收相应特征波数的能量，得到试样干涉图，通过计算机采集信息后经傅里叶变换，获得强度随频率或波数发生相应变化的曲线。傅里叶变换红外光谱仪的特点是信噪比高达 60:1、杂散光少、重现性好、灵敏度和分辨率高、扫描速度快、光谱范围宽 ($4\ 500 \sim 6\ \text{cm}^{-1}$) 等，可以对样品进行定性和定量分析，广泛应用于医药化工、地矿、石油、煤炭、环保、海关、宝石鉴定、刑侦鉴定等领域。图 2.5 为傅里叶变换红外光谱仪结构示意图。

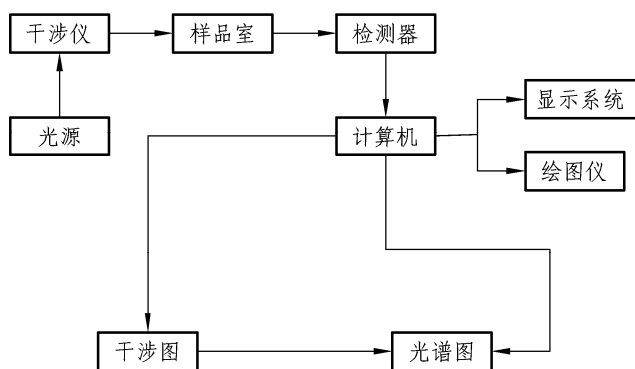


图 2.5 傅里叶变换红外光谱仪结构

2.3.7 红外光谱的定性、定量分析

2.3.7.1 定性分析

可利用红外光谱对物质进行鉴定，若为纯物质，可将试样图谱与标准图谱比较，若吸收带形状、位置及强度基本一致，说明试样和标准物为同一物质。但并非解析所有吸收峰，一般只要求解析 10%~20%即可。标准图谱可利用计算机进行检索，也可利用文献中图谱，但需注意试样的物态、测定条件及测定仪器与标准物质的一致性。若试样为未知物或新化合物，则先考察该试样的熔沸点、折光率和旋光率等，计算不饱和度，对照特征吸收峰的波数，推测可能存在的官能团；再通过指纹区验证，找出可能存在的官能团的相关峰，以佐证官能团的存在；最后结合其他仪器，如核磁共振、质谱等分析技术确定化合物。

另外，由于红外光辐射的能量远比紫外-可见光低，测定时常采用程序增减狭缝宽度的办法，使狭缝自动增加，补偿能量损耗，保持到达检测器的辐射能量的恒定；但这使狭缝宽度对红外吸收带的峰值及宽度的影响不能忽略，摩尔吸光系数也随红外光谱仪的不同而变化较大，因此，摩尔吸收系数在红外定性鉴别中意义不大。

2.3.7.2 定量分析

物质对红外光的吸收也符合朗伯-比尔定律，因此可通过吸收谱带测量物质含量。此法不仅适合固体分析，也适合气体、液体分析；但灵敏度较低，不适合痕量组分定量，其定量功能弱于紫外-可见光谱法。

总之，红外光谱主要用于鉴别化合物基团的种类，苯环或烯烃等的取代类型，但仅依赖红外光谱，有时难以解析谱图，难以最终确定化合物的精细结构，此时往往需要借助诸如气相色谱-红外光谱联用 (GC/FTIR)、液相色谱-红外光谱联用 (LC/FTIR)、光声-红外光谱 (PAS/FTIR) 和显微-红外光谱 (MIC/FTIR) 等才可达到要求。

2.4 拉曼光谱法

拉曼 (Raman) 光谱是基于频率为 ν_0 光与分子间发生非弹性碰撞的一种散射光谱，本质上仍属于分子光谱。当一束单色光照射物质时，物质中的分子与光子发生相互作用，产生吸收、折射、衍射、反射及散射等弹性碰撞和非弹性碰撞过程。弹性碰撞过程中不存在能量交换，散射光与激发光波长相同，只是改变了光子的传播方向，最终形成瑞利散射 (Rayleigh scattering)。而非弹性碰撞则发生能量交换，散射光相应存在比激发光波长长和短的成分，分

别称为斯托克斯 (Stokes) 线和反斯托克斯线。斯托克斯线是指在拉曼散射中, 样品分子吸收频率为 ν_0 的光子, 得到的散射光能量减少, 在垂直方向上测量到的散射光中, 可以检测到的频率为 $(\nu_0 - \Delta E/h)$ 的线; 而反斯托克斯线则指光子从样品激发态分子获得能量, 样品分子从激发态回到基态, 在大于入射光频率 $(\nu_0 + \Delta E/h)$ 处接收到的线。

拉曼光谱分析具有试样不需要预处理, 试样不被破坏, 操作简便省时, 灵敏度高等优点; 但也存在振动峰重叠, 拉曼散射强度易受光学系统参数影响, 荧光现象对傅里叶变换拉曼光谱存在干扰及傅里叶变换拉曼光谱分析的非线性等不足。

2.4.1 基本原理

用单色光照射气体、液体或透明晶体试样时, 绝大部分光继续按原来方向发生透射作用而透过, 一小部分光则按不同角度发生散射, 形成散射光。在垂直方向上除了可观察到与原入射光频率相同的发生弹性碰撞的瑞利散射 (强度与入射光波长的四次方成反比) 外, 还可观察到一系列对称分布、较弱的、相对于入射光频率发生改变的非弹性碰撞散射线, 由大约 0.1% 的入射光引起, 这种光散射称为拉曼散射。

拉曼光谱谱线具有以下特点: 拉曼散射谱线的波数随入射光波数的改变而改变; 由于斯托克斯线与反斯托克斯线分别相应于得到或失去一个量子的能量, 所以其完全对称分布于瑞利散射线两侧; 由于处于振动基态的粒子数大于处于振动激发态的粒子数, 一般而言, Stokes 线强度大于反 Stokes 线。

拉曼光谱的纵坐标以散射强度表示, 横坐标以拉曼位移表示, 通常采用相对于瑞利线的位移表示, 单位为波数 (cm^{-1})。规定瑞利线的位置为零点, 位移为正数表示斯托克斯线, 位移为负值表示反斯托克斯线。

拉曼谱线的数目、位移大小、谱线长度直接与试样分子的振动和转动有关, 因此, 拉曼光谱也可用于获得分子振动和转动信息, 最终为物质鉴定、结构研究提供补充信息。一般而言, 一些红外信号很弱的化学键, 如 C—C、N=N、S—S 等, 拉曼散射信号很强; 一些红外信号强的化学键, 其拉曼散射信号却很弱, 因此, 红外光谱可与拉曼光谱相互补充, 以进行结构分析。与红外光谱相比较, 拉曼光谱的覆盖范围为 $40 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$, 可用于有机物和无机物分析; 水的拉曼散射很微弱, 因而可以用水作为溶剂; 试样可盛放于玻璃容器中; 固体试样可直接测定; 激光束聚焦仅有 $0.2 \sim 2 \text{ mm}$, 辅助拉曼显微镜物镜可进一步聚焦至 0.02 mm , 因而不仅试样用量少, 而且可分析更小面积的试样; 拉曼光谱的谱峰尖锐, 比红外更适合定量; 拉曼光谱的活性振动必须伴有极化率的变化 (极化是分子在外电场下, 电子云变形的难易程度)。

2.4.2 拉曼光谱仪

拉曼散射光的强度仅是瑞利散射强度的 $1/10^6$ ，入射光强度的 $1/10^9$ ，因此，必须提高光照强度以得到较高的灵敏度。拉曼光谱仪主要分为色散型激光拉曼光谱仪、傅里叶变换拉曼光谱仪和共焦激光拉曼光谱仪。

色散型激光拉曼光谱仪主要由激发光源、样品室、单色器、检测器组成。激发光源要求单色性好，照射试样时产生的散射光强度大，常用激光；样品室的作用是使激光聚焦至试样上产生散射，并将散射光聚焦至单色器入射狭缝上；单色器的作用是分离频率接近拉曼散射的瑞利散射和其他散射光，以消除其对拉曼光谱的干扰；检测器的作用是将光信号转换为电信号，以克服拉曼散射弱信号的缺点，从而提高灵敏度。激光拉曼光谱仪结构如图 2.6 所示。

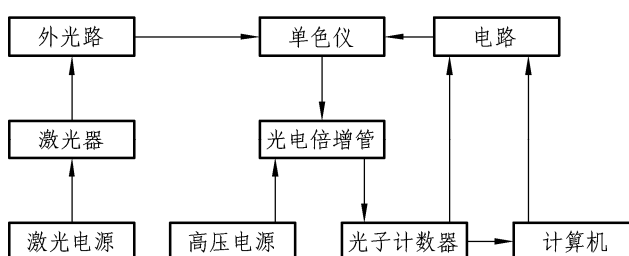


图 2.6 激光拉曼光谱仪结构

傅里叶变换拉曼光谱仪是以近红外激光为激发光源，通过引入傅里叶变换技术而发展起来的光谱仪器，其与激光拉曼光谱仪的不同之处在于引入了迈克尔逊干涉仪和特殊的滤光器。

2.4.3 两种主要的拉曼光谱分析技术

2.4.3.1 表面增强拉曼光谱法(surface enhanced Raman scattering ,SERS)

当某些分子吸附在银电极、氧化银或氯化银溶胶等活性基质的粗糙表面上时，前者由于局域表面等离子激元被激发引起电磁增强，后者由于粗糙表面上的原子簇及其吸附的分子构成拉曼增强的活性位点引起增强效应，从而给出表面分子结构信息，其灵敏度提高 $10^4 \sim 10^7$ 倍。该法广泛用于表面配合物、生物界面性质、生物分子的构型构象、痕量有机物及分子吸附动力学研究等方面。

影响表面增强拉曼光谱的因素有：吸附金属及金属化合物的种类、激发光源频率、金属及金属化合物的表面粗糙程度、被吸附分子与金属表面的距离等。

2.4.3.2 共振拉曼光谱法

当激发光频率与待测分子电子吸收频率接近时产生共振拉曼效应，从而使拉曼谱带强度增强 $10^4 \sim 10^6$ 倍，可以检测到泛频和组合频的振动，其强度有时大于基频强度。通过改变激发频率，可使其仅与试样中某一物质发生共振，因而对某一物质的研究具有选择性。

共振拉曼光谱的应用主要体现在环境污染物监测、液态煤组分测定、人工合成金刚石检测以及蛋白质二级结构的测定和鉴定。存在需要连续可调的激光器以满足不同试样在不同区域的吸收，试样本身或杂质引起的荧光干扰等不足。

2.4.4 拉曼光谱的定性和定量分析

2.4.4.1 拉曼光谱的定性分析

拉曼光谱定性分析主要用于化合物种类、特殊结构的鉴别，与红外互为补充。化学键或化学基团的鉴别主要是根据拉曼光谱的位移大小、强度以及拉曼峰形等。若辅以偏振技术，拉曼光谱还可进行分子异构体的判断。具体是利用拉曼光谱标准谱图的自动检索功能对未知化合物进行比对，如果拉曼光谱的位移、形状以及强度均吻合，则证明为同一种物质。一些常见基团的拉曼特征频率见表 2.5。

表 2.5 常见基团的拉曼特征频率

基团	振动形式	特征频率/ cm^{-1}
O—H	$\nu(\text{O—H})$	2 000 ~ 3 650
N—H	$\nu(\text{N—H})$	2 200 ~ 3 500
$\equiv\text{C—H}$	$\nu(\equiv\text{C—H})$	3 300
$=\text{C—H}$	$\nu(=\text{C—H})$	2 000 ~ 3 100
—CH	$\nu(\text{—C—H})$	2 800 ~ 3 000
—S—H	$\nu(\text{—S—H})$	2 550 ~ 2 600
$\text{C}\equiv\text{N}$	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$	2 220 ~ 2 255
$\text{C}\equiv\text{C}$	$\nu(\text{C}\equiv\text{C})$	2 100 ~ 2 250
$\text{C}=\text{O}$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1 680 ~ 1 820
$\text{C}=\text{C}$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1 500 ~ 1 000
$\text{C}=\text{N}$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	1 610 ~ 1 680
$\text{N}=\text{N}$	$\nu(\text{N}=\text{N})$	1 550 ~ 1 580 ; 1 410 ~ 1 440

续表

基团	振动形式	特征频率/ cm^{-1}
----	------	------------------------

NO ₂	v(NO ₂)	1 530 ~ 1 500 · 1 240 ~ 1 280
C—SO ₂ —C	v(SO ₂)	1 210 ~ 1 250 · 1 120 ~ 1 160
C—SO—C	v(SO)	1 020 ~ 1 070
C=S	v(C=S)	1 000 ~ 1 250
$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—} \\ \text{—CH}_2\text{—} \end{array}$	δ(CH)	1 400 ~ 1 470
—CH ₃	δ(CH)	1 380
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array}$ (A _E)	v(O—C)	1 450 ~ 1 470
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array}$ (B _E)	v(O—C)	600 ~ 1 300
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$ (A _E)	v(C—S)	1 080 ~ 1 100
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$ (B _E)	v(C—S)	630 ~ 700
O—O	v(O—O)	845 ~ 900
Si—O—Si	v(Si—O—Si)	1 000 ~ 1 110 · 450 ~ 550
C—Cl	v(C—Cl)	550 ~ 800
C—Br	v(C—Br)	500 ~ 700
C—I	v(C—I)	480 ~ 660

引自：杜一平，《现代仪器分析方法》。

2.4.4.2 拉曼光谱的定量分析

利用拉曼光谱谱线强度与试样分子浓度成正比的关系进行定量分析，公式可表示如下：

$$\varphi_R = 4\pi \cdot \varphi_L \cdot A \cdot N \cdot L \cdot K \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad (2.15)$$

式中 φ_R ——拉曼散射的光通量；
 φ_L ——入射到试样上的激光通量；
 A ——拉曼散射系数；
 N ——试样子浓度；
 L ——试样体积；
 K ——影响系数；
 θ ——拉曼光束张角。

2.5 分子发光分析法

分子发光分为荧光(fluorescence)、磷光(phosphorescence)、生物发光(bioluminescence)、

化学发光 (chemiluminescence) 及散射光 (light scattering) 等。某些物质的分子吸收一定的能量后跃迁至较高的激发态, 当其返回基态时伴随着光辐射, 这种现象称为分子发光。根据分子受到激发时吸收能源或辐射光的不同, 分子发光可分为: 以光能辐射而激发发光的现象称为光致发光, 分为荧光和磷光; 以电能激发而发光的为电致发光; 分子吸收化学能而激发发光, 称为化学发光; 生物体酶催化释放能量激发的化学发光, 称为生物发光。

分子发光分析法具有灵敏度高、选择性较好、方法简单、样品用量少等优点, 广泛用于传感、生物、环境监测等领域。

2.5.1 分子荧光和磷光

2.5.1.1 基本原理

每个分子均具有分立能级, 即电子能级, 每个电子能级包含一系列的振动能层和转动能层。分子的总能量由电子能级能量、振动能级能量和转动能级能量组成, 其能级复杂程度高于原子能级。具有不饱和基团的基态分子, 其最低振动能层分子吸收辐射能量后跃迁至激发态, 激发态不稳定, 在极短时间内释放光子, 衰变至基态, 称为“发光”。无论是光致激发还是去激发, 分子中价电子均处于不同自旋状态, 通常用电子自旋的多重性表示。

电子自旋状态的多重度 (multiplicity) 用 $M = 2S + 1$ 表示, S 为电子总自旋量子数 (取值 $1/2 - 1/2$ 或 $1/2 + 1/2$)。大多数分子含有偶数电子, 根据泡利 (Pauli) 不相容原理, 基态分子同一轨道上的两个电子自旋方向相反, 为单重态。若分子所有轨道中的电子均是自旋相反, 则 S 为 0, $M = 1$, 为单重态 (singlet state), 无顺磁性, 用“S”表示, S_0 、 S_1 、 S_2 分别代表基态、第一、第二激发单重态。当分子吸收能量后, 分子中的电子发生跃迁, 其自旋方向未发生改变, 则分子处于激发单重态; 如果分子吸收能量后, 在跃迁过程中自旋方向发生改变, 此时 $S = 1$, $M = 3$, 分子处于激发三重态 (triplet state), 有顺磁性, 用“T”表示, T_1 、 T_2 、 T_3 分别代表第一、第二、第三激发三重态。

根据洪特 (Hund) 规则, 平行自旋比反平行自旋 (配对) 稳定, 因此, 三重态能级低于相应的单重态。单重态是所有电子自旋都配对的分子的电子状态, 三重态是激发态分子中两个价电子自旋平行的电子状态。基态的特点是电子自旋配对, 电子多重度为 $2S + 1 = 1$, 为单重态, 以 S_0 表示; 激发单重态的特点是分子吸收能量后, 电子自旋仍配对, 为单重态, 称为激发单重态; 激发三重态的特点是分子吸收能量后, 电子自旋不再配对, 为三重态, 称为激发三重态。

当分子受照射时, 基态分子吸收光能发生电子能级跃迁, 由基态跃迁至更高的单重态, 电子自旋方向没有发生改变 (相反), 净自旋为零, 这种跃迁符合光谱选律, 允许跃迁, 如 $S_0 \rightarrow S_1$ 。如果分子中电子跃迁过程伴随自旋方向改变 (平行), 由基态单重态跃迁至激

发三重态时，净自旋不为零，这种跃迁不符合光谱选律，为禁阻跃迁，如 $S_0 \rightarrow T_1$ 。常见的有机分子的电子跃迁方式主要有 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ ，因此， S_1 为 $n \rightarrow \pi^*$ 第一激发单重态， S_2 为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 第二激发单重态，相应地， T_1 为 $n \rightarrow \pi^*$ 第一激发三重态， T_2 为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 第二激发三重态。

2.5.1.2 去激过程

处于激发态的分子通过振动弛豫、内转换、外转换、系间跨越等非辐射跃迁方式，或荧光及磷光发射等辐射跃迁形式返回基态，完成去激过程。激发态分子返至基态时，如果不伴随发光现象，则为非辐射去激或非辐射跃迁。

1. 振动弛豫

同一电子能级中，激发态分子将多余的能量以热交换形式传递给周围分子，其自身从高振动能级跃迁至较低的相邻振动能级，称为振动弛豫 (vibrational relaxation, VR)。速度较快，一般在 $10^{-14} \sim 10^{-12}$ s 完成。

2. 内转换

当两个电子能级非常接近，其振动能级间有可能产生重叠时，相同多重态间的转换称为内转换 (internal conversion, IC) 或内转移，如 $S_2 \rightarrow S_1$ 及 $T_2 \rightarrow T_1$ 。内转换过程的速率取决于两个能级间的能量差，一般在 $10^{-13} \sim 10^{-11}$ s 完成。

3. 外转换

激发态分子与溶剂或其他溶质分子间发生相互作用，随之能量被转换，引起荧光或磷光强度减弱或消失的现象称为外转换 (external conversion, EC)。外转换使荧光和磷光减弱或猝灭，也称外转换为“猝灭” (quenching)。能与发光分子相互作用而导致荧光强度下降的物质称为猝灭剂。如 O_2 是较为常见的荧光猝灭剂，因此，实验中须首先除去溶液中的氧；其他的荧光猝灭剂如具有重原子效应的溴化物、碘化物、胺类等，其中，胺类是大多数未取代芳烃的有效猝灭剂，卤素对奎宁有猝灭作用。这说明荧光猝灭剂与荧光分子间的作用具有选择性。

荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭，静态猝灭是猝灭剂与荧光物质的基态间相互作用导致的猝灭。动态猝灭是猝灭剂与荧光物质的激发态间相互作用导致的猝灭，其并不改变荧光分子的吸收光谱，如 1-萘胺的荧光在碱性溶液中发生猝灭现象，但吸收光谱无变化。

荧光的自猝灭原因可能是荧光辐射的自吸收，荧光分子的激发态与基态形成二聚体，基态荧光分子的缔合等。

猝灭还有电荷转移猝灭、转入三重态猝灭及光化学反应猝灭等。