

利用温控紫外-可见光谱法对乌佐效应进行相图分析

使用 Agilent Cary 3500 UV-Vis 和多池采样模块的多区控温功能进行同步程序升温实验

作者

Marc-André Gagnon 和
Claire Cislak
安捷伦科技有限公司

前言

相图是化学中的一个基本概念。它显示了物质的物理状态如何随着两个变量（例如温度和压力或温度和浓度）的变化而变化。相图通过绘制曲线来构建，这些曲线显示了物质的不同相态平衡共存的条件。相图上的线表示相边界，例如固相和液相之间的边界或液相和气相之间的边界。这些边界表示发生相变的条件。因此，改变特定相图中的相应变量，将某个值从边界的一侧移动到另一侧，即表示相变所需的条件。这个过程可能非常耗时，因为必须进行多次实验才能建立一个全面的相图。

溶解度图被认为是相图的相关图，它揭示了一种或多种物质如何与另一种物质结合。溶解度图报告了溶解度（溶质根据浓度和温度与溶剂形成溶液）和混溶性（物质混合形成均匀溶液，而不产生沉淀）。这些图表基于所研究化学物质之间的有利或不利相互作用。

溶解度图和相图揭示了化学物质之间以及化学物质与环境之间的物理相互作用。因此，这些研究对于理解化学原理至关重要。

由于紫外-可见光谱法已被证明适用于表征浑浊样品^[1]，因此本研究使用该方法研究乌佐效应。乌佐效应是指水和酒精饮料（例如希腊乌佐酒或法国茴香酒）中的萜烯之间发生的一种乳化作用。例如，某知名品牌的茴香酒含有一种强疏水性萜烯——茴香脑（图 1），它是酒中茴香味的来源。纯茴香酒的乙醇浓度为 45% (v/v)。在该乙醇浓度下，茴香脑分子完全溶于水/酒精混合物中。

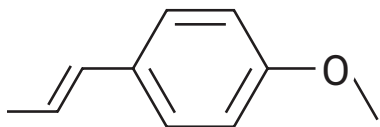


图 1. 茴香脑的化学结构，茴香脑是一种存在于某些茴香酒中的强疏水性萜烯

茴香酒通常会加水 and 冰块饮用，这样可以通过稀释降低酒精含量，并降低混合物的温度。这会使茴香脑分子沉淀到水溶液中，使酒从澄清的琥珀色变成浑浊的黄色（图 2）。这种现象的形成机制尚不完全清楚，但近乎瞬时的变化让化学家和非化学家都为之着迷^[2]。



图 2. 制作一种典型的茴香酒饮料，以显示乌佐效应。将纯茴香酒（左一）、水（左二）和冰块（右二）混合在一起，可以得到浑浊的淡黄色饮料（右一）

在本研究中，通过测量茴香酒混合物中茴香脑悬浮液的光散射程度来评估不同水/乙醇混合物中的相变。如之前所述，Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计凭借其独特的光学设计，在表征浑浊样品方面具有独特优势^[1]。

Cary 3500 紫外-可见分光光度计

Cary 3500 紫外-可见分光光度计是一款完全可更换式模块化系统，使用脉冲氙 (Xe) 灯作为光源，并配备异面 Littrow 双单色器。单色器的光谱带宽 (SBW) 可在 0.1–4.0 nm 范围内调整。采用光纤技术将光源信号同时直接传输至所有比色皿。

当安捷伦双池采样模块与通用的 Cary 3500 紫外-可见分光光度计主机配合使用时，分析人员可使用两个比色皿位置，而使用安捷伦多池采样模块时则可使用 8 个比色皿。

双池控温和多池控温采样模块均采用风冷帕尔帖温度控制系统，可达到并保持在 -5 °C 至 110 °C 之间的设定温度。该系统还能以 0.1–40 °C/min 的速率升温。

多池采样模块的独特多区控温功能允许在不同的区域中同时进行四个温控实验（四对样品和参比）。这种多区控温功能大大提高了构建多点相图的效率。

本研究使用配备多池控温采样模块的 Cary 3500 同时对四种不同的酒精/水混合物进行升温研究。对于每组实验，在不断搅拌的情况下，采样模块中八个比色皿（四个样品比色皿和四个参比池）的温度从 55 °C 再降至-2.5 °C。结果表明，可以使用 Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计系统更高效地构建乌佐效应的八点溶解度相图。

实验部分

样品前处理

在装有星形搅拌子并配备盖子的标准 10 mm 开口式石英比色皿中直接配制 8 份茴香酒样品稀释液。样品浓度为 45.0%（纯茴香酒）、44.0%、42.5%、40.0%、37.5%、35.0%、32.5% 和 30.0% (v/v) 酒精。为了保持一致，每个比色皿中都装有总体积为 2.00 mL 的溶液。

在光学性能匹配的石英比色皿中用去离子 (DI) 水配制相应的乙醇稀释液，得到参比池，这些参比池同样配备搅拌子和盖子。使用光学性能匹配的石英比色皿对，无需在开始测量前进行归零或基线校准。所有样品比色皿均配备温度探头，探头高度固定，使尖端完全浸没在溶液中（图 4）。

仪器

使用 Agilent Cary UV Workstation 软件控制配备多池控温采样模块的 Cary 3500 紫外-可见分光光度计。

多池控温模块的每个样品池单元都配有自己的检测器，每个比色皿还可配备搅拌子和独立的温度探头。因此，在本研究中，所有四个样品池均配备温度探头，以便根据样品比色皿的实际温度读数来监测、测量和控制每个区域（包括样品和参比）的温度。

关键混合物/成分的波长扫描

在不同酒精浓度下进行温控实验之前，使用表 1 中给出的设置采集了纯茴香酒、用乙醇将酒精浓度控制在 45% (v/v) 的茴香酒稀释溶液和酒精浓度为 30% (v/v) 的茴香酒稀释溶液的紫外-可见光谱。参比池中为用去离子水稀释的相应乙醇溶液。

表 1. 使用 Agilent 3500 紫外-可见分光光度计在 25 °C 下采集纯茴香酒样品和稀释的茴香酒样品的紫外-可见光谱时所用的参数

参数	设置
波长范围	200–1100 nm
数据间隔	1.00 nm
信号平均时间	0.02 s
光谱带宽	4.0 nm
搅拌速度	800 rpm
温度	25.0 °C

溶解温度研究

表 2 总结了用于测量每种茴香酒混合物溶解温度的升温参数。所有实验的起始温度均为 25.0 °C。研究发现，有些混合物在室温下已经无法完全溶解。因此，升温程序的第 1 阶段将比色皿的温度升至 55 °C，确保悬浮液中任何剩余的颗粒都完全溶解。然后，第 2 阶段在吸光度模式下采集从 55 °C 到-5 °C 的实际数据。对于所有测量，使用安装在每个区域样品池中的温度探头作为温度控制器的反馈回路。有关这些参数选择的更多详细信息将在下一节讨论。

表 2. 升温程序中各个阶段的 Agilent 3500 紫外-可见分光光度计参数

	第 1 阶段 (加热)	第 2 阶段 (冷却)
波长	750.0 nm	750.0 nm
信号平均时间	1.0 s	1.0 s
光谱带宽	4.0 nm	4.0 nm
搅拌速度	400 rpm	400 rpm
起始温度	25.0 °C	55.0 °C
结束温度	55.0 °C	-5.0 °C
保持时间	10.0 min	0 min
数据间隔	1.0 °C	1.0 °C
速率	5.0 °C/min	1.0 °C/min

Cary 3500 多池控温采样模块配备一条吹扫管线，以防止在露点温度以下进行实验时，比色皿外壁出现冷凝现象。由于研究乌佐溶解度相图需要在 0 °C（水的凝固点）以下采集吸光度，因此使用氮气 (N₂) 作为吹扫气体，流速为 10 L/min。

结果与讨论

确定波长范围

酒精浓度为 45% (v/v) 的纯茴香酒呈现出特有的琥珀色，这是由本研究使用的特定茴香酒配方中的发色团引起的。因此，为了确定相变测量的合适波长范围，我们进行了一些初始对照扫描。

纯茴香酒（图 3 中的蓝色曲线）在低于 500 nm 的波长下具有强吸收，达到了配备多池控温模块的 Cary 3500 的光度测定范围上限，即约 4.5 个吸光度单位。

为了实现茴香酒相关发色团的可视化，配制了茴香酒稀释溶液，同时保持乙醇浓度恒定，以防止茴香脑沉淀。图 3 中的黄色曲线在 244 和 297 nm 处有两个明显的峰，并拖尾至 460 nm，这很可能是因为存在另一个未分离的峰。在纯茴香酒谱图（蓝色曲线）中，峰拖尾延伸至 600 nm。从这些测量结果中可以得出结论，在 600 nm 以上的波长范围内没有可检测的发色团。图 3 中酒精含量较低的混合物 (30%) 的绿色曲线代表室温下的浑浊茴香酒溶液。

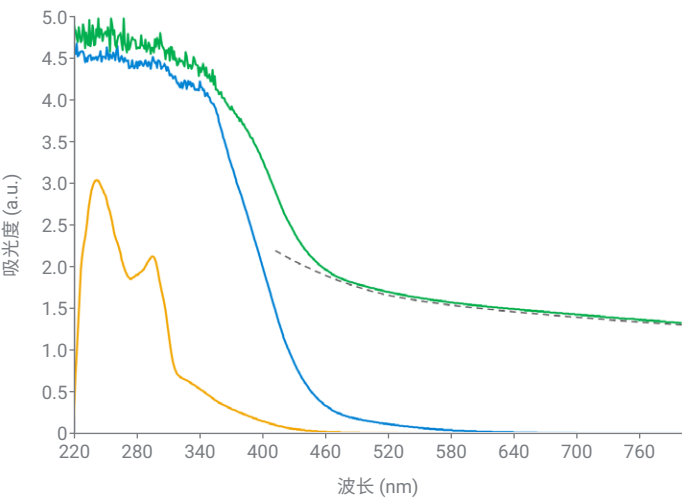


图 3. 未稀释的茴香酒（蓝色）、乙醇含量 45% (v/v) 的 10 倍稀释的茴香酒（黄色）以及酒精含量 30% (v/v) 的浑浊茴香酒溶液（绿色）的紫外-可见光谱。灰色虚线突出显示了光散射对绿色曲线的贡献

如图 3 中的灰色虚线所示，除了 200–600 nm 范围内的发色团特征外，在 > 600 nm 的范围内也观察到了额外的光谱特征。这种缓慢衰减的信号（使整个光谱范围内的信号偏移）与悬浮液中未溶解颗粒引起的光散射有关。

选择 750.0 nm 的波长来确定相变温度。750.0 nm 处的表观吸光度信号仅受光散射影响，与发色团无关。

优化温度条件和冷却速度

本研究中低含量酒精混合物的相变温度接近环境温度。图 4 显示了低含量酒精样品的典型溶解度曲线。在 25.0 °C 的起始温度下，由于悬浮液中未溶解的茴香脑引起的光散射，750 nm 处的表观吸光度较高。将样品首先加热至 55.0 °C（表 2 中的第 1 阶段）会使表观吸光度降至约 0，因为任何沉淀的茴香脑重新溶解到了茴香酒溶液的乙醇成分中。在这一阶段，加热速度并不重要，因为加热的目的是溶解任何可能导致光散射的颗粒。在较高温度下将样品保持 10 分钟，使任何缓慢的溶解过程得以完成。

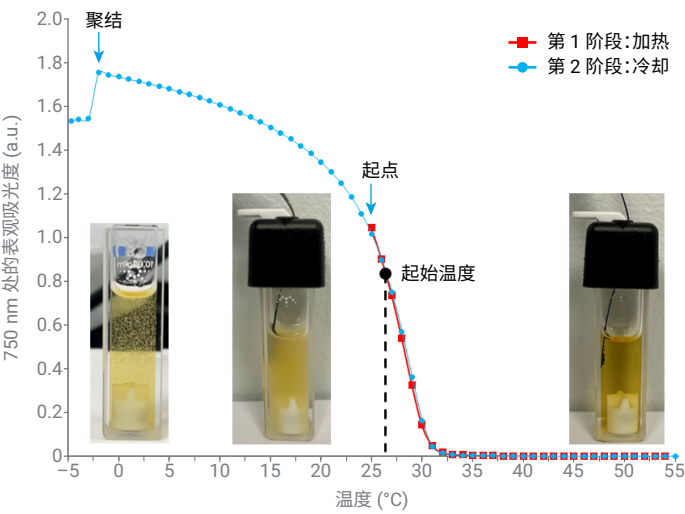


图 4. 酒精含量为 30% (v/v) 的茴香酒样品相变的典型曲线。在第 1 阶段（■），将样品在不断搅拌下加热至 55 °C，获得如右侧比色皿所示的澄清溶液。在第 2 阶段（●），样品缓慢冷却至 -5 °C，获得中间比色皿所示的浑浊溶液。如左侧的比色皿所示，在水的冰点附近又发生了一次相变

在冷却阶段（表 2 中的第 2 阶段），每个区域的温度以 $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率缓慢降至 $-5.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以更快的冷却速度 ($> 2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 进行的初步测试表明，尽管对溶液进行了有效的搅拌，但茴香脑相变仍未达到平衡。在较快的冷却速度下，相变动力学过程过于缓慢，导致冷却/加热曲线出现滞后（结果未显示）。

当冷却速度为 $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或更慢时，获得了可重现的结果。当满足一定的温度条件时，表观吸光度会急剧上升，然后达到稳定状态。这个临界点被称为起始温度。随着茴香脑沉淀增多，光散射量也会增加，即使是稍微稀释的茴香酒样品的水溶液部分也会出现一些茴香脑沉淀。

对于某些溶液，在低于 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时会观察到吸光度突然明显下降，如图 4 所示。尽管对溶液持续进行充分搅拌，但通过目视观察比色皿可以证实，一些溶液在低于 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时开始不稳定并发生相分离。之前的研究曾观察到过这种现象，对此的解释是聚结（茴香脑液滴结合成更大的液滴）、絮凝（茴香脑液滴聚集而不融合）、沉降（由于密度差异而分离）和奥斯特瓦尔德熟化（茴香脑液滴体积增大）^[2]。上述每个过程都会导致吸光度显著下降，因为均匀的茴香脑沉淀云状物体系会瓦解。研究发现，这种低温相变不可逆，即在重新加热溶液时可以观察到滞后现象。根据这些观察结果，溶解度相图中省略了低于 $-2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度，因为它们不会影响初始沉淀的发生。

酒精含量对沉淀温度的影响

使用新鲜配制的不同酒精含量（纯茴香酒至酒精含量 30.0% v/v）的溶液重复实验。不同样品的冷却曲线见图 5。结果表明，即使在酒中加入极少量的水，也会导致茴香脑沉淀的起始温度发生变化。随着溶液中乙醇含量的降低，沉淀温度明显呈升高趋势。

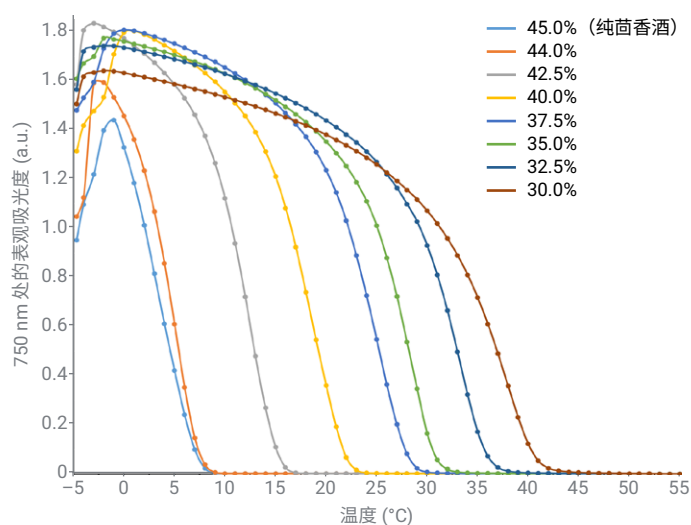


图 5. 酒精浓度为 45.0%、44.0%、42.5%、40.0%、37.5%、35.0%、32.5% 和 30.0% (v/v) 的茴香酒溶液的 UV-Vis 冷却曲线（第 2 阶段）

将实验限制在 30% (v/v) 的酒精含量，因为酒精浓度较低的样品需要降低温度至接近乙醇/水的沸点，才能初步溶解混合物。

测定相温度

采用一阶导数法准确测定图 5 所示每条曲线的相温度。使用平均温度绘制茴香脑溶解度相图，如图 6 所示。误差线为三次重复测量的标准偏差。

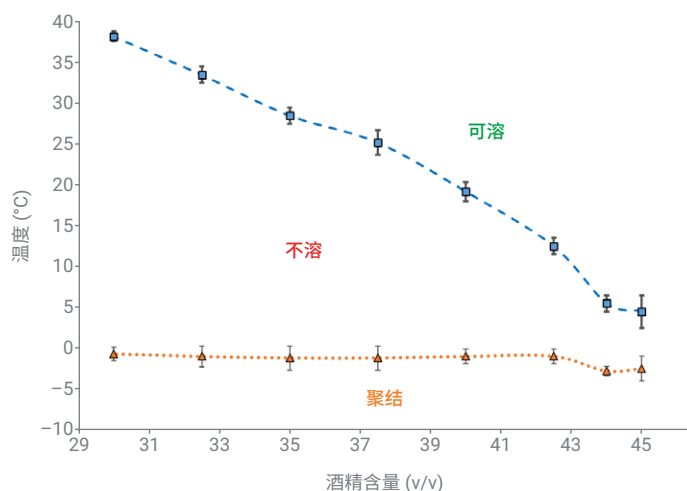


图 6. 茴香酒中茴香脑的溶解度相图。每个数据点都是平均温度值，误差线为三次重复测定的标准偏差

在研究水的冰点附近发生的相分离时，紫外-可见光谱可能不是最直观或最适用的工具。不过，使用一阶导数法也可以估算出发生相分离的温度。这种额外的相变似乎与溶液中的酒精含量无关，如图 6 中的橙色虚线所示。由于相变温度非常接近 0°C，因此可以推测它与乳液中的纯水区域有关。

结论

使用配备安捷伦多池控温采样模块的 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计构建茴香酒中茴香脑的八点相图。

帕尔帖温控多池模块的多区控温功能有助于同时开展四组升温实验，每组实验包含两个比色皿，一个装有样品，一个为参比。利用这一功能，Cary 3500 紫外-可见分光光度计通过两次 73 分钟的运行即可绘制出茴香酒的完整溶解度相图，比使用其他技术构建相图快得多。

为了防止测量过程中出现沉淀，多池模块中的八个比色皿均配备独立搅拌器。持续搅拌还可确保所有比色皿的温度均匀性，对于升温实验至关重要。风冷帕尔帖系统与氮气吹扫功能相结合，确保温度设定值明显高于环境温度或低于水的冰点时，能够准确地达到该温度且不会出现冷凝现象。

这项研究证明了易于使用的 Cary 3500 紫外-可见分光光度计系统在构建复杂样品的相图以及深入了解乌佐效应方面的适用性和效率。

参考文献

1. United States Pharmacopeia (2024). General Chapter, {855} Nephelometry and Turbidimetry. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M9373_03_01
2. Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed trans-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, 21, 16, 7083–7089

更多信息

- Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计
- Cary 3500 双池紫外-可见分光光度计
- Cary UV Workstation 软件
- 紫外-可见光谱法与分光光度计常见问题解答

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE-000868

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 9 月 12 日，中国出版
5994-7767ZHCN