



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра аналитической, физической и коллоидной химии

Сеченовский Университет

Москва, Россия

Методы фармакопейного анализа

**Физико-химические (инструментальные)
методы исследования**

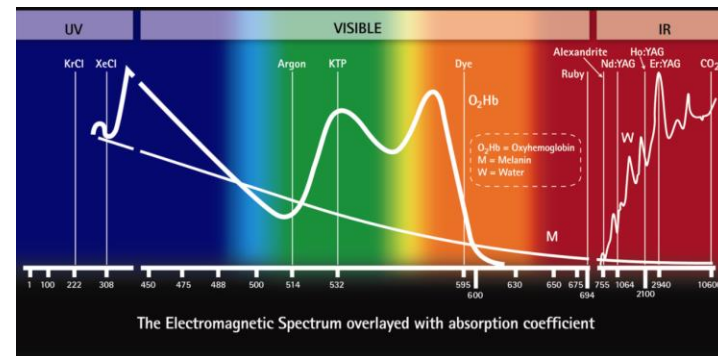
Оптические методы исследования

Физико-химические (инструментальные) методы исследования

Оптические методы исследования

План лекции

1. Введение. Общая характеристика физико-химических методов исследования.
2. Классификация физико – химических методов исследования.
3. Достоинства и недостатки инструментальных методов анализа.
4. Оптические методы анализа.
 - 4.1. Классификации оптических методов анализа.
 - 4.2. Молекулярный спектральный анализ.
 - 4.3. Количественный фотометрический анализ.
 - 4.3.1. Основной закон светопоглощения



1.Общая характеристика физико-химических методов исследования

Физико-химические (инструментальные) методы исследования основаны на использовании зависимости между измеряемыми физическими свойствами веществ и их качественным и количественным составом.

2. Классификация физико-химических методов исследования

Основана на учете измеряемых величин

1. **Оптические методы** – измерение оптических свойств веществ
2. **Хроматографические методы** – использование способности различных веществ к избирательной сорбции
3. **Электрохимические методы** – измерение электрохимических свойств системы
4. **Радиометрические методы** – измерение радиоактивных свойств системы
5. **Термические методы** – измерение тепловых эффектов соответствующих процессов
6. **Масс-спектрометрические методы** – изучение ионизированных фрагментов веществ

Ультразвуковые, магнитохимические, пикнометрические и др.

3. Достоинства и недостатки физико-химических методов исследования

Достоинства:

- низкий предел обнаружения $1 \cdot 10^{-9}$ мкг, C_{lim} до 10^{-12} г/мл
- высокая чувствительность
- высокая селективность
- малое время анализа
- возможность автоматизации

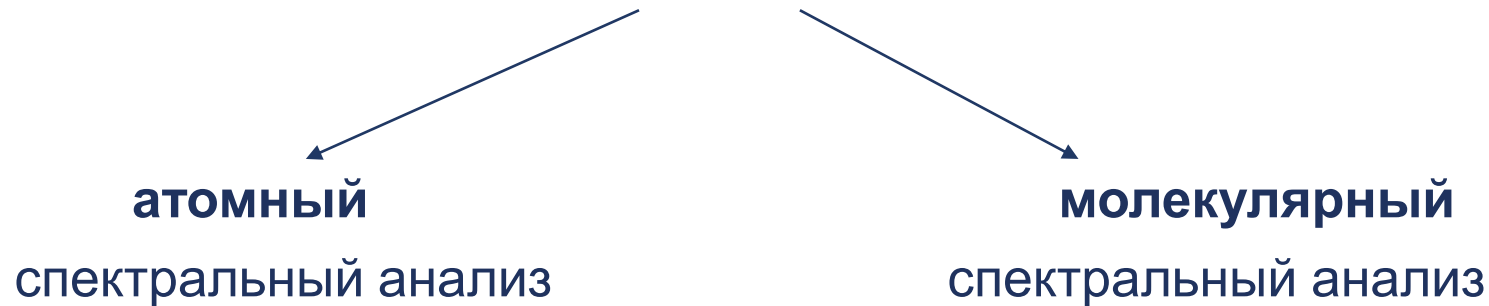
Недостатки

- более низкая воспроизводимость
- погрешность около 5%
- сложность аппаратуры

4. Оптические методы анализа.

4.1. Классификации оптических методов анализа

4.1.1. Классификация по изучаемым объектам



4.1.2. По характеру взаимодействия электромагнитного излучения с веществом

Адсорбционные методы - измерение **поглощения** монохроматического излучения атомами и молекулами вещества



атомно-адсорбционный
спектральный анализ



молекулярно-адсорбционный
спектральный анализ

4.1.2. По характеру взаимодействия электромагнитного излучения с веществом

Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния) - метод молекулярной спектроскопии, основанный на изучении **рассеянного света**.

Эмиссионные методы - измерение интенсивности **излучения света** атомами и молекулами вещества



**Атомно эмиссионная
спектроскопия**

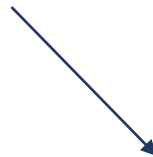
**Люминесцентный
анализ**

Методы, связанные со взаимодействием светового излучения с суспензиями



турбидиметрия

измерении интенсивности света, которое поглощается неокрашенной суспензией



нефелометрия

измерении интенсивности света, которое отражается или рассеивается окрашенной или неокрашенной суспензией

- **рефрактометрия** - измерение показателя преломления
- **поляриметрия** - измерения угла вращения плоскости поляризации
- **интерферометрия** - изучение явления интерференции
- **ЯМР-спектроскопия** — спектроскопический метод исследования химических объектов, использующий явление ядерного магнитного резонанса.
- **рентгеновская спектроскопия** - совокупность методов, позволяющих получать рентгеновские спектры, а также теоретич. интерпретация этих спектров, дающая возможность диагностики излучающих объектов.
- **гамма-резонансная спектроскопия (ГРС)**- основанна на эффекте Мессбауэра

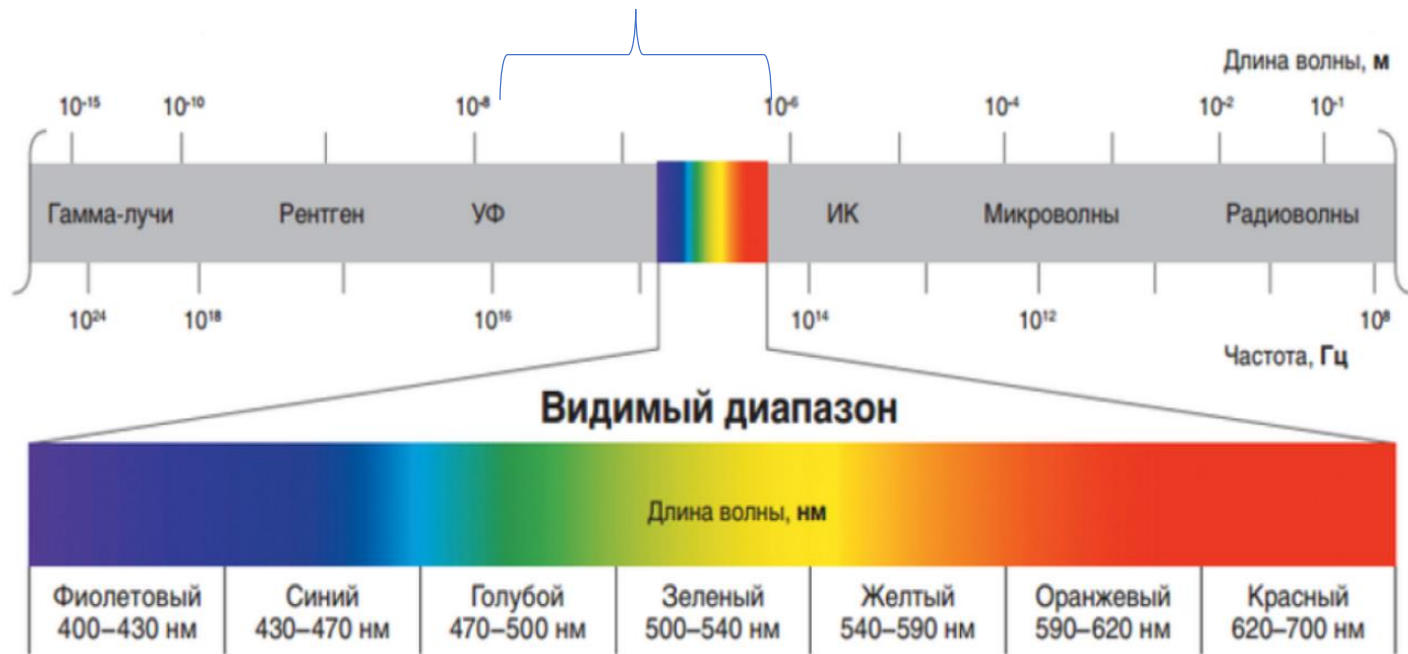
4.1.3. По области используемого электромагнитного спектра

$$\text{УФ} + \text{В} = \text{УВИ}$$

УФ и видимый диапазоны спектра



$$\text{УФ} + \text{В} = \text{УВИ}$$



4.1.4. По природе энергетических переходов

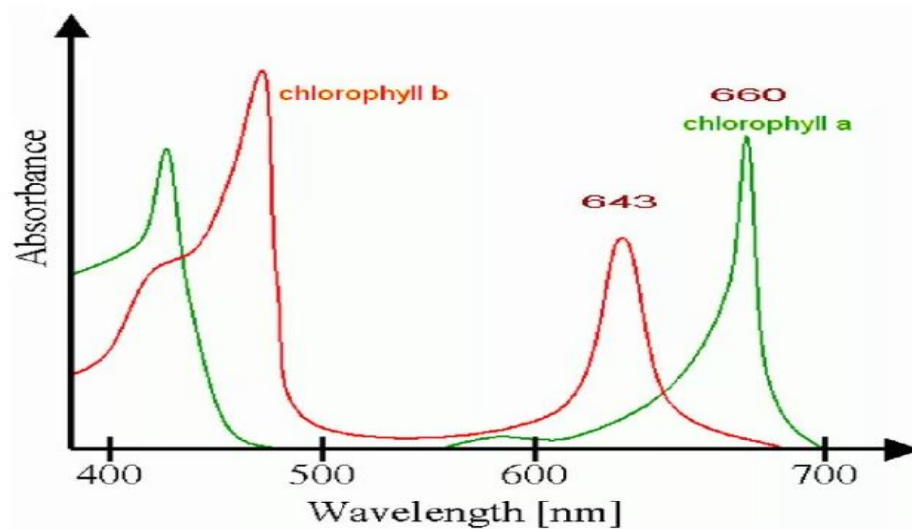
- **Электронные спектры (УВИ область)** – возникают при изменении энергии электронных состояний частиц (атомов, ионов, молекул, радикалов)
- **Колебательные спектры (ИК-область и комбинационное рассеяние света)** - возникают при изменении колебательных состояний частиц
- **Вращательные спектры (дальняя ИК и микроволновая область)** – возникают при изменении энергии вращательных состояний молекул, 2 –х и многоатомных ионов, радикалов.

4.2. Молекулярный спектральный анализ

4. 2. 1. Теоретические основы

- Молекулярный спектральный анализ основан на **избирательном поглощении** или **адсорбции** электромагнитного излучения молекулами вещества в нерассеивающей однородной среде.
- Избирательный характер поглощения связан с природой (структурой) вещества, что отражается **в спектрах поглощения** и является основой **качественного анализа**

- **Спектр поглощения – основа качественного анализа**



- При взаимодействии электромагнитного излучения с веществом происходит поглощение молекулой определенного количества энергии.

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

где E – энергия кванта, эрг

h – постоянная Планка, $6,6 \cdot 10^{-27}$ эрг·с

ν – частота, излучения, с^{-1}

c – скорость света, $3 \cdot 10^{10}$ см·с $^{-1}$

λ – длина волны, см

- При поглощении света частицы вещества – атомы, ионы, молекулы увеличивают свою энергию, переходя в возбужденное более высокоэнергетическое положение
- Для каждой частицы существует индивидуальный набор энергетических состояний, полная энергия которых складывается из:
энергии движения электронов + энергии колебания ядер атомов + энергия вращения
- При переходе в возбужденное состояние возникает новая комбинация электронно - колебательно – вращательных состояний с более высоким уровнем энергии

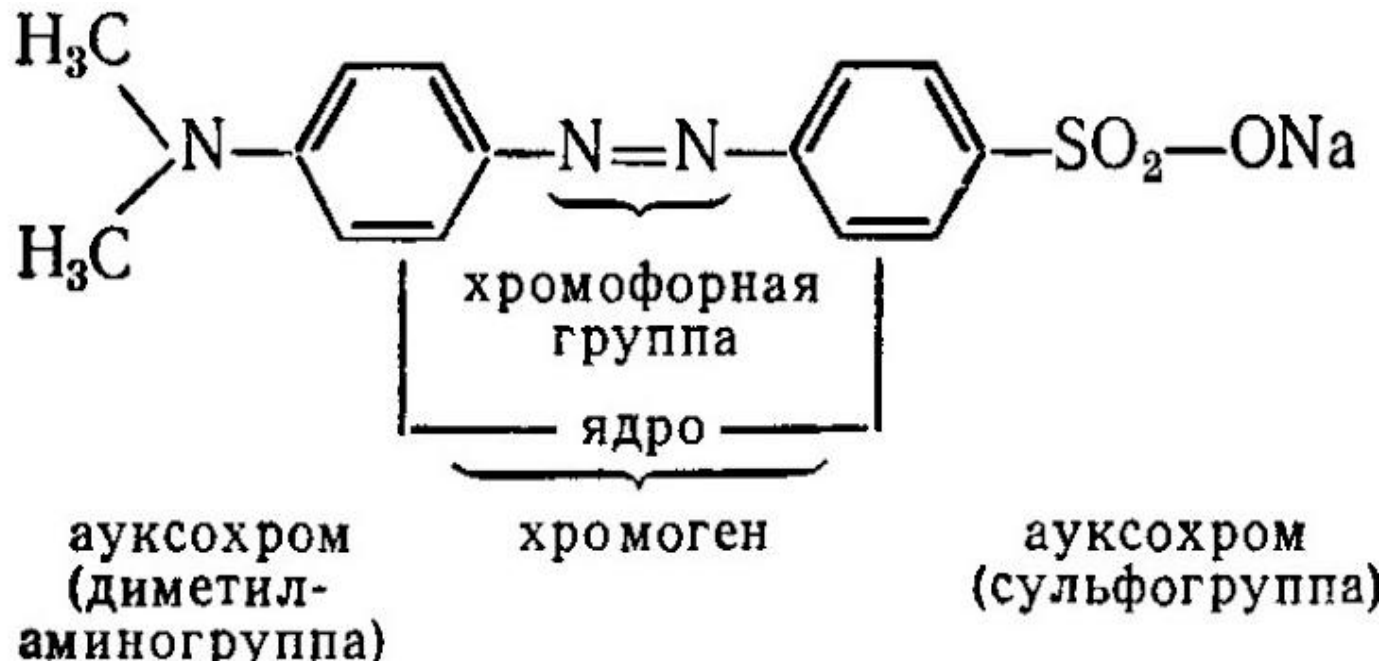
Хромофор – структурная группа в органическом соединении, которая обуславливает избирательное поглощение света в электронном спектре.

Для них характерны переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$

$C=C$, $C \equiv C$, $C=O$, $N=N$, $N=O$, NO_2 , ароматические системы и т.д.

Ауксохром – атомная группировка, не содержащая кратных связей, которая не имеет максимума поглощения в ближнем ультрафиолете, но, включение которой в систему хромофора приводит к увеличению длины волны $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода и увеличению интенсивности поглощения.

Типичные ауксохромы - OH, NH₂, SH, т.е. группы, содержащие гетероатом со свободной электронной парой.

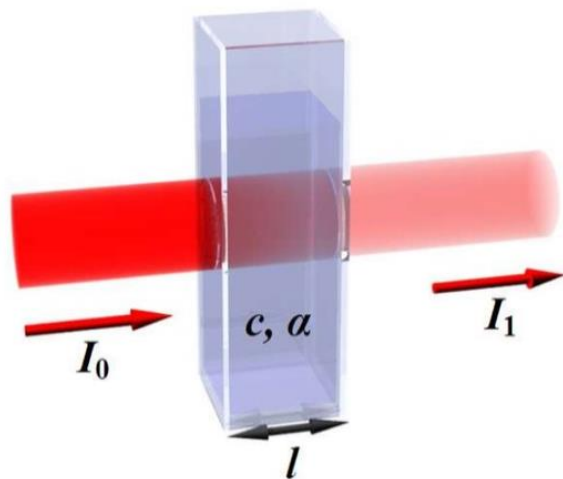


- Окрашенные соединения поглощают в основном в видимой области спектра, при этом видимый цвет раствора является дополнительным к цвету поглощаемого излучения

λ , нм	Спектральный цвет <i>поглощенный</i>	Дополнительный цвет <i>видимый</i>
400-435	Фиолетовый	Зеленовато-жёлтый
435-480	Синий	Жёлтый
480-490	Зеленовато-синий	Оранжевый
490-500	Синевато-зелёный	Красный
500-560	Зелёный	Пурпурный
560-580	Желтовато-зелёный	Фиолетовый
580-595	Жёлтый	Синий
595-605	Оранжевый	Зеленовато-синий
605-730	Красный	Синевато-зелёный
730-760	Пурпурный	Зелёный

- Каждая полоса в электронном спектре характеризуется не только положением, но и интенсивностью

Интенсивность светопоглощения характеризуется **оптической плотностью A**



$$A = \lg I_0 / I$$

от 0 до ∞

$$T = I / I_0$$

пропускание

или

от 0 до 1

от 1 до 100%

$$A = - \lg T$$

если T в долях

$$A = 2 - \lg T$$

если T в процентах

4.3. Количественный фотометрический анализ

4. 3. 1. Основной закон светопоглощения



Экспериментально открыт П.Бугером 1729

Теоретически выведен И.Г. Ламбертом 1760

Для растворов исследован А Бером 1852

1698- 1758

Французский физик и астроном, основатель фотометрии. Известен трудами по теории корабля, геодезии, гидрографии и другим отраслям знания.

1728- 1777

Немецкий физик, философ, математик и астроном; был академиком в Мюнхене и Берлине



Первый закон, сформулирован Бугером в 1729 г. - выражает зависимость между интенсивностью прошедшего излучения и толщиной слоя поглощающего вещества

$$\Delta I / I = k_1 \cdot \ell$$

где ΔI – поглощенная часть светового потока I ;

ℓ – толщина поглощающего слоя;

k_1 – коэффициент пропорциональности

Второй закон, сформулирован Бером в 1862 г.-выражает связь между интенсивностью прошедшего излучения и концентрацией поглощающего вещества в растворе:

$$\Delta I / I = k_2 \cdot C$$

где

C – концентрация вещества в растворе;

k_2 – коэффициент пропорциональности

Объединенный закон Бугера - Ламберта - Бера

$$I = I_0 \cdot e^{-kC \ell}$$

где

C – концентрация вещества в растворе;

k – коэффициент поглощения света

Объединенный закон Бугера - Ламберта - Бера

логарифмическая форма

$$A = \varepsilon C \ell$$

где, C – концентрация вещества в растворе; моль/л

ε – молярный коэффициент погашения, л·моль⁻¹·см⁻¹

ℓ – толщина поглощающего слоя; см

Основной закон справедлив только для поглощения монохроматического потока с $\lambda = \text{const}$

ε – молярный коэффициент погашения численно равен оптической плотности раствора при $C = 1 \text{ моль/л}$ и $\ell = 1 \text{ см}$

Если концентрация выражена в г на 100 мл т.е. $W \text{ г/100мл}$

то

$$A = EW\ell$$

где E – удельный коэффициент погашения - численно равен оптической плотности раствора при $W = 1 \text{ г/100мл}$ и $\ell = 1 \text{ см}$

$$\varepsilon = E \cdot M / 10$$

ε и E

зависят от

- природы вещества,
- природы растворителя
- длины волны λ
- температуры

не зависят от

- концентрации
- толщины поглощающего слоя

4. 3. 2. Техника проведения фотометрического анализа

- Фотометрический анализ основан на сравнении поглощения света стандартным и испытуемым раствором при помощи **фотометров** – приборов, в которых приемником света служит **фотоэлемент**
- В зависимости от степени монохроматизации излучения в рабочей области спектра различают **фотоэлектроколориметрию** и **спектрофотометрию**

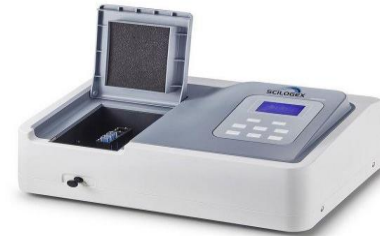
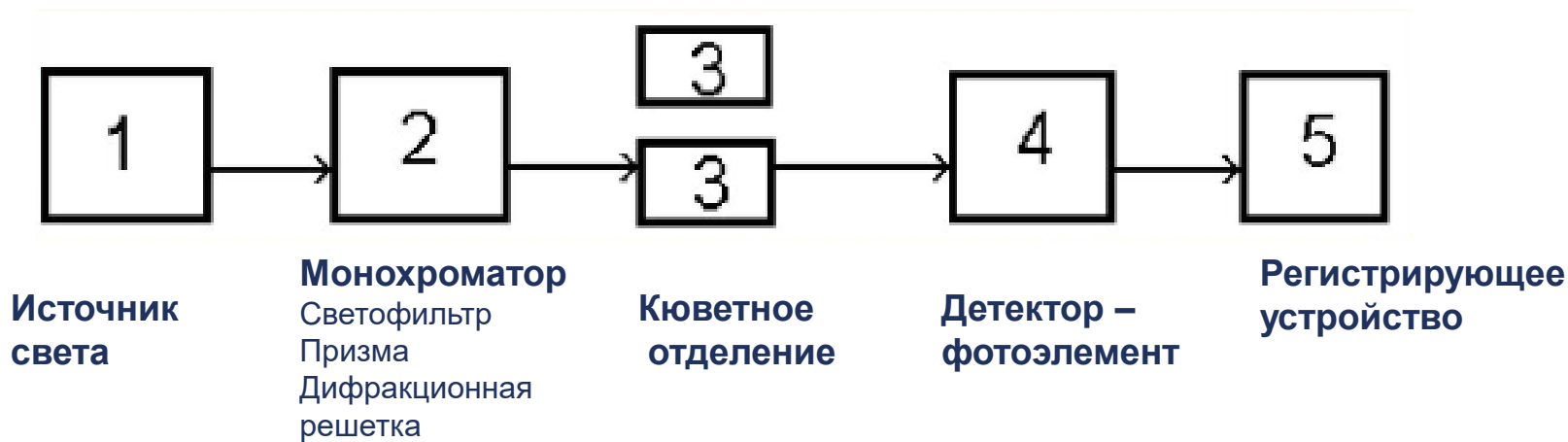


Схема фотометра



Условия проведения фотометрического анализа

1. Выбор фотометрической реакции
2. Выбор аналитической (рабочей) длины волны $\lambda_{\max}$
3. Выбор концентрации и толщины поглощающего слоя

Оптимальное значение A от 0,2 до 0,6,

min систематическая ошибка при $A = 0,434$ и $l = 1$ см,

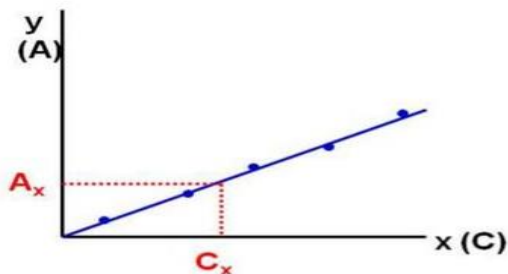
$C = 0,434/\epsilon$ - при этой концентрации отклонения от закона Бугера-Ламберта –Бера минимальны

4. Выбор раствора сравнения - все кроме определяемого вещества

Определение концентрации определяемого вещества

1. Метод градуировочного графика

- Готовят серию стандартных растворов анализируемого вещества, охватывающую область возможных концентраций, измеряют их оптическую плотность.
- Строят график зависимости оптической плотности от концентрации. В случае выполнения основного закона светопоглощения для данного интервала концентраций график представляет собой прямую линию.
- Измерив оптическую плотность анализируемого раствора, его концентрацию определяют по графику.
- Метод градуировочного графика отличается высокой точностью.



$$y = a \cdot x$$

y – оптическая плотность (А)

x – концентрация (С)

Определение концентрации определяемого вещества

2. Метод одного стандарта

$$\frac{A_{\text{ст}}}{C_{\text{ст}}} = \frac{A_{\text{x}}}{C_{\text{x}}}$$

$$C_{\text{x}} = \frac{A_{\text{x}} C_{\text{ст}}}{A_{\text{ст}}}$$

3. Расчетный метод при помощи среднего молярного коэффициента погашения

Определение концентрации определяемого вещества

4. Метод добавок стандарта

- **Метод добавок.** Применяют для анализа растворов сложного состава, так как он позволяет автоматически учесть влияние «третьих» компонентов. Сначала определяют оптическую плотность A_x анализируемого раствора, содержащего определяемый компонент неизвестной концентрации c_x , а затем в анализируемый раствор добавляют известное количество определяемого компонента ($c_{ст}$) и вновь определяют оптическую плотность $A_{x+ст}$. Концентрацию анализируемого раствора находят по формуле:

$$c_x = c_{ст} \frac{A_x}{A_{x+ст} - A_x}$$