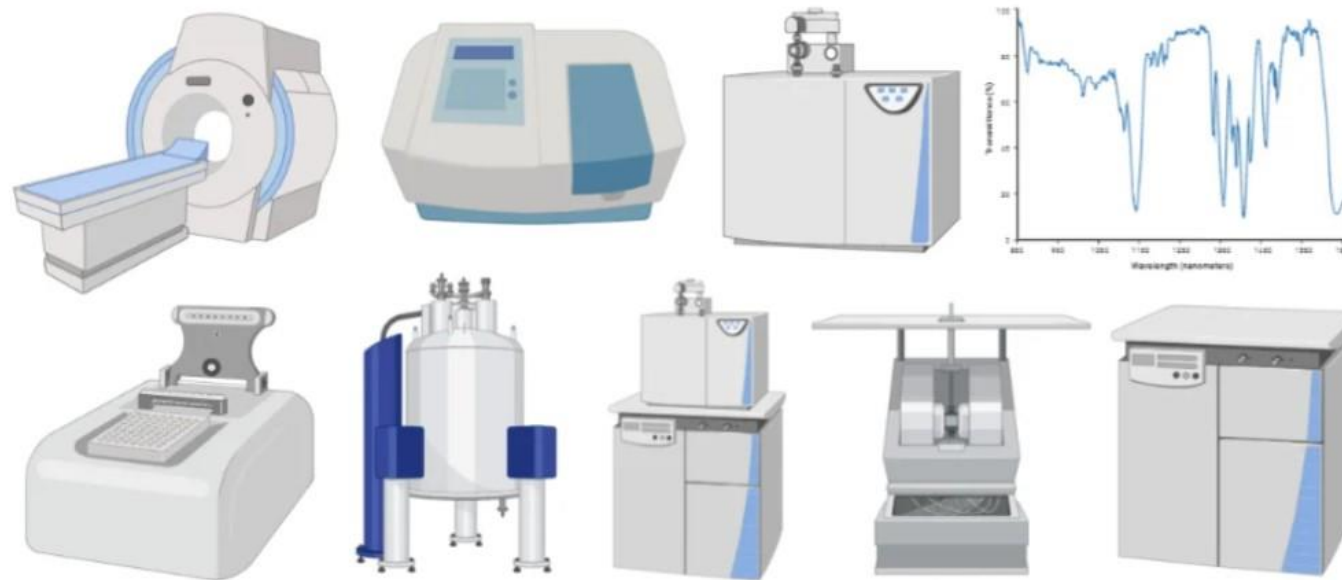


Методы фармакопейного анализа

3 КУРС, 5 СЕМЕСТР, 2021-2022 ГГ.

Спектроскопические методы анализа

Основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом, служат для исследования строения, идентификации и количественного определения



Created with BioRender.com

Спектроскопические методы анализа

- Спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях.
- Спектрометрия в инфракрасной (ИК) области.
- Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС).
- Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС).
- Флуориметрия.
- Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).
- Масс-спектрометрия.
- Рамановская спектрометрия.
- Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия.
- Рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Диапазоны длин волн спектра

Ультрафиолетовая область: 200 – 380 нм

Видимая область: 380 – 750 нм

Ближняя инфракрасная область: 750 – 2500 нм

Фотоколориметрия

ОФС. 1.2.1.1.0012.18

Фотоколориметрия

- ❑ Метод количественного определения действующих веществ, основанный на измерении степени поглощения немонахроматического света испытуемым веществом с помощью фотоэлектроколориметров.
- ❑ Применим только для окрашенных прозрачных растворов.
- ❑ Основан на использовании закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

A – оптическая плотность,

l – толщина поглощающего слоя (ширина кюветы), см,

C – концентрация,

ε – молярный коэффициент поглощения.

Фотоколориметр



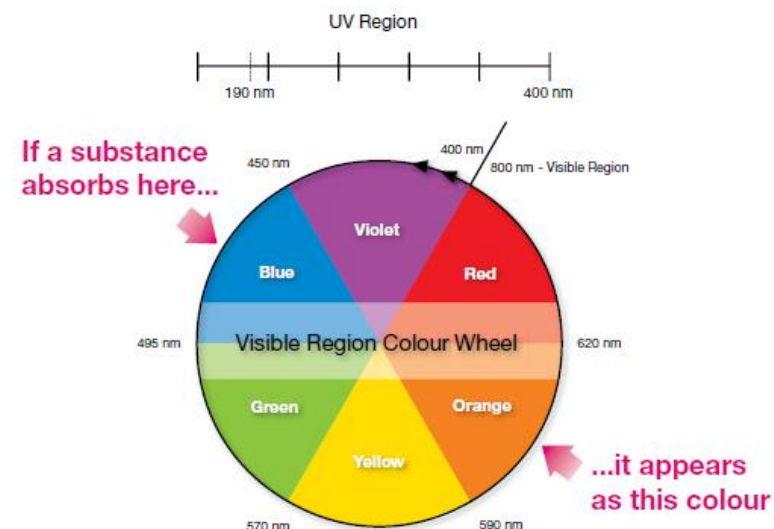
- ❑ Оптический прибор, использующийся для измерения оптической плотности растворов в узком диапазоне спектра.
- ❑ Измерения ведутся в луче не монохроматического, а полихроматического узко-спектрального света, формирующегося специальными светофильтрами.
- ❑ Используют для измерения оптической плотности в диапазоне 315-630 нм.

Светофильтры

Выбирают, чтобы максимум и минимум поглощения определяемого вещества попадал в диапазон между максимумом пропускания и минимумом поглощения светофильтра.

Светофильтры необходимо выбирать по окраске анализируемого раствора

Цвет раствора	Область макс. Поглощения (нм)	Цвет светофильтра
Желто-зеленый	400-450	Фиолетовый
Желтый	450-480	Синий
Оранжевый	480-490	Зелено-синий
Красный	490-500	Сине-зеленый
Пурпурный	500-560	Зеленый
Синий	575-590	Желтый
Зелено-синий	590-625	Оранжевый



Red	620-750 nm
Orange	590-620 nm
Yellow	570-590 nm
Green	496-570 nm
Blue	450-495 nm
Violet	380-450 nm

Особенности метода

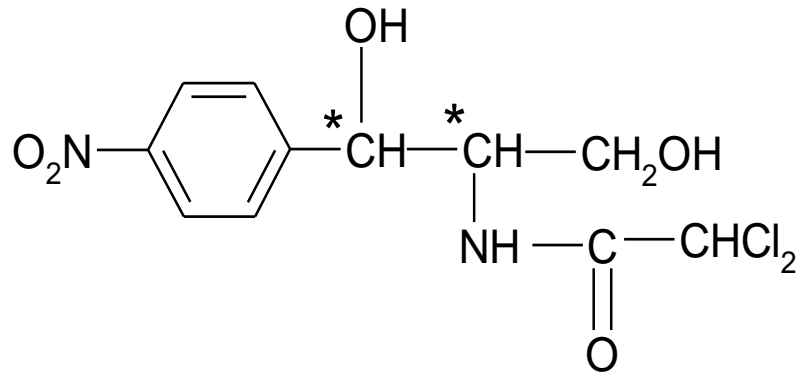
- ❑ погрешность 3-5 %;
- ❑ наименьшая ошибка достигается при оптической плотности 0,434;
- ❑ в интервале оптической плотности 0,30-0,70 ошибка составляет $\pm 3\%$;
- ❑ простота и быстрота проведения;
- ❑ точность;
- ❑ нижние границы определяемых концентраций – от 10^{-3} до 10^{-8} моль/л.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

ОФС. 1.2.1.1.0003.15

Хромофорные группы

Вещества поглощают
электромагнитное излучение за
счет наличия хромофорных
групп



$\text{C}=\text{C}$ (180 нм) – $\pi \rightarrow \pi^*$

$\text{C}=\text{O}$ (280 нм) – $n \rightarrow \pi^*$

$\text{N}=\text{O}$ (660 нм) – $n \rightarrow \pi^*$

$-\text{NO}_2$ (280 нм) – $n \rightarrow \pi^*$

$\text{C}=\text{S}$ (240 нм) – $\pi \rightarrow \pi^*$

Закон Бугера-Ламберта-Бера

Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна толщине поглощающего слоя и концентрации

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

A – оптическая плотность,

l – толщина поглощающего слоя (ширина кюветы), см,

C – концентрация,

ε – молярный коэффициент поглощения.

Оптическая плотность и пропускание

$$T = \frac{I_i}{I_0} \cdot 100 \%$$
$$A = \lg \frac{I_0}{I_i}$$

Если нет других указаний в ФС, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см, при температуре $20 \pm 1^\circ \text{C}$ по сравнению с тем же растворителем или с той же смесью растворителей, в которой растворено вещество

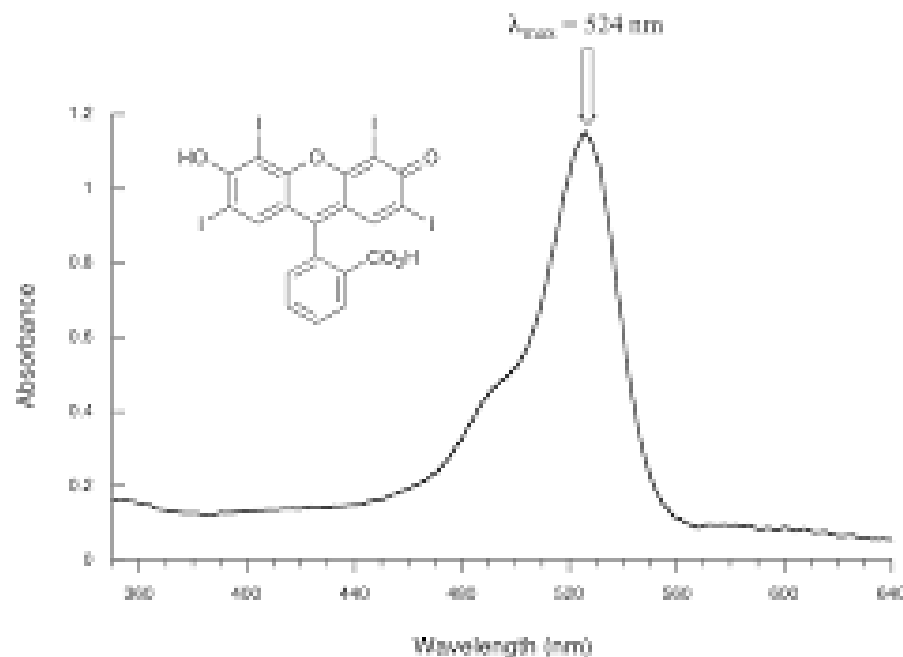
Удельный и молярный показатели поглощения

Удельный показатель поглощения $E^{1\%}$ -
оптическая плотность 1% раствора при толщине поглощающего слоя 1 см

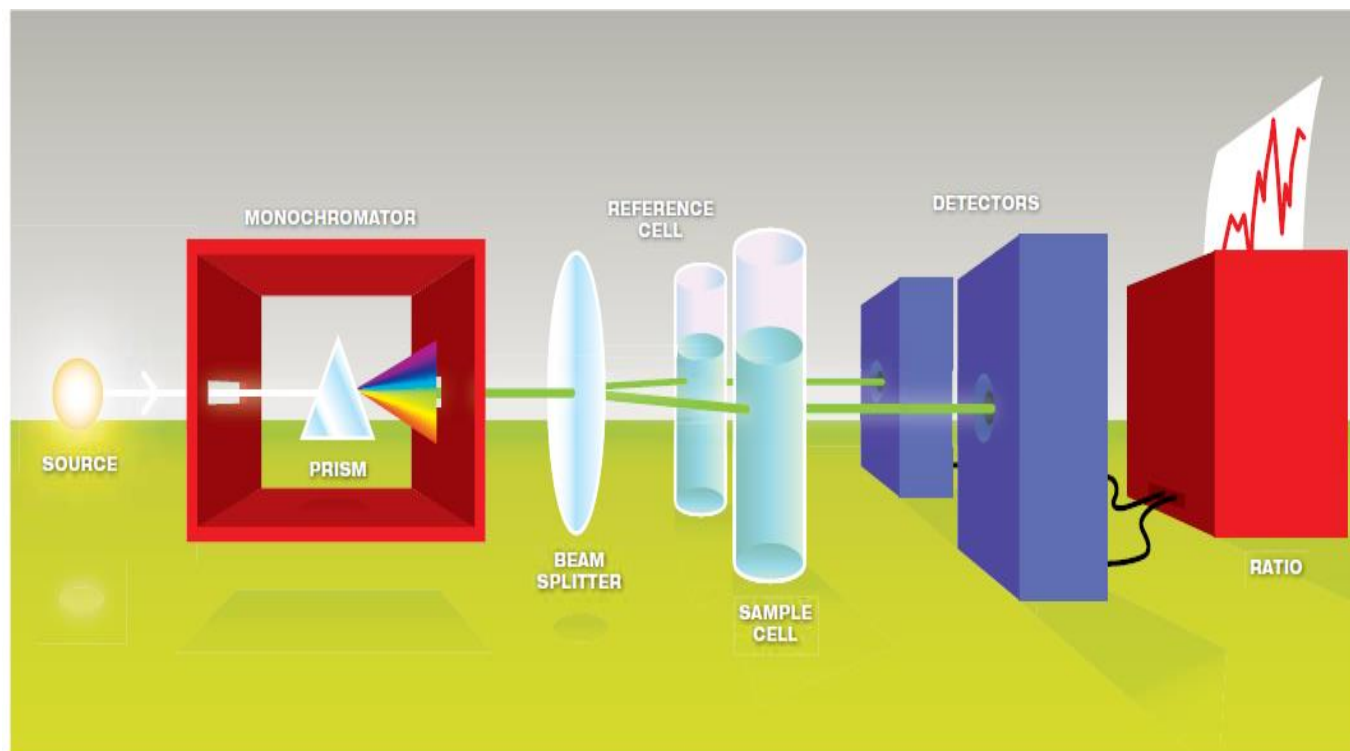
Молярный показатель поглощения ε - оптическая плотность 1 М раствора при толщине поглощающего слоя 1 см

Спектр поглощения

Спектр поглощения – графическая зависимость оптической плотности A (или ϵ , или T) от длины волны светового потока λ



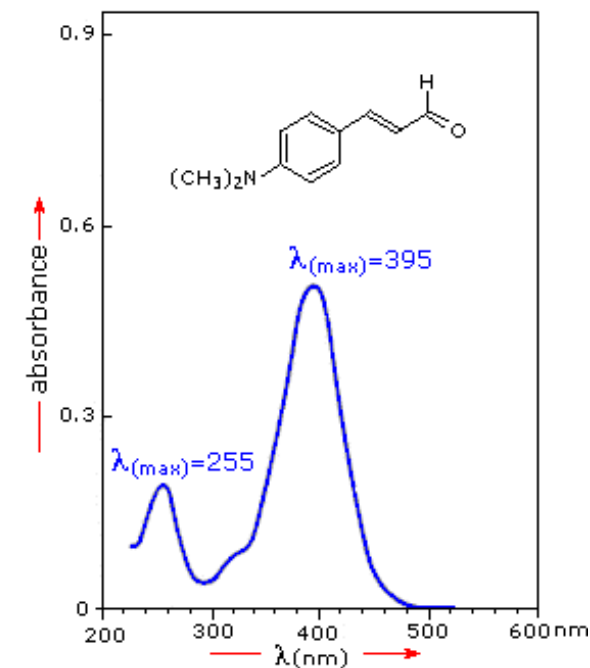
Спектрофотометр



Если нет других указаний в фармакопейной статье, измерение проводят с использованием кювет с толщиной слоя 1 см при температуре 20 ± 1 °С по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество

Идентификация

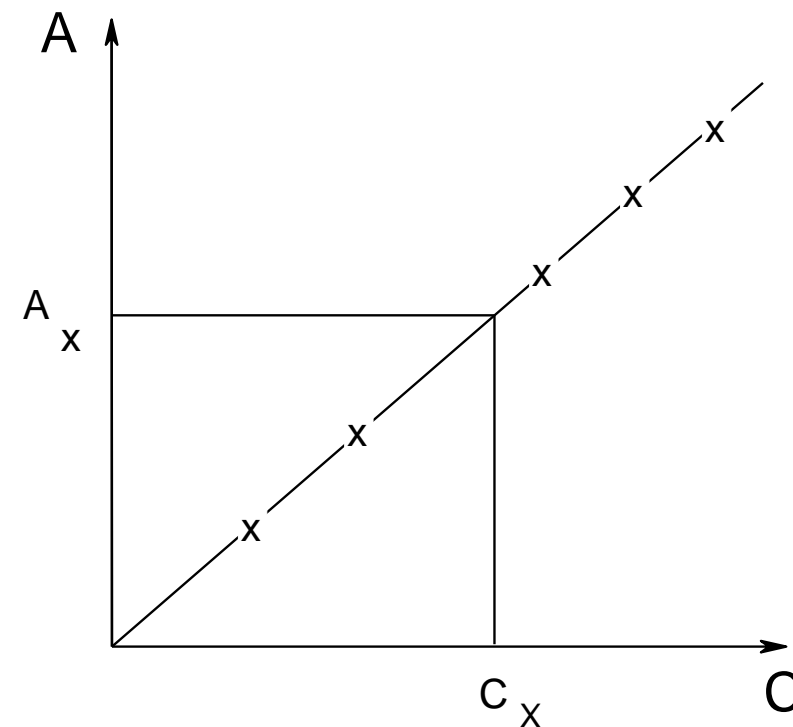
- Сравнение спектров поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца – в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба;
- В нормативной документации указаны положения максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба. Характеристики спектра поглощения испытуемого раствора должны совпадать с указанными (расхождение не должно превышать ± 2 нм).



Количественный анализ

Метод калибровочной кривой (нет в ГФ)

- Готовят серию стандартных растворов с точно известной концентрацией
- Измеряют оптическую плотность растворов при заданных условиях
- Строят график зависимости оптической плотности от концентрации (по полученным данным)
- Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора при заданных условиях
- По калибровочной кривой определяют концентрацию анализируемого раствора



С использованием закона Бугера-Ламберта-Бера

- Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см
- Исходя из основного закона светопоглощения рассчитывают концентрацию анализируемого раствора:

$$C_x = \frac{Ax}{\varepsilon \cdot l}$$

С использованием стандартного образца

- Готовят стандартный раствор с точно известной концентрацией, близкой к концентрации испытуемого раствора.
- Измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца, приготовленного, как указано в ФС
- Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора в тех же условиях

$$\frac{A_{st}}{A_x} = \frac{C_{st}}{C_x}$$

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_{st}}{A_{st}}$$

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ

$$A = \sum E_i * c_i$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора при данной длине волны

E_i - показатели поглощения компонента образца при данной длине волны

c_i - концентрация компонента образца

Производная спектрофотометрия

- Исходные спектры поглощения (нулевого порядка) преобразуются в спектры производных первого, второго и более высоких порядков.
- Спектр первой производной – график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности от длины волны, $dA/d\lambda$) от длины волны.
- Спектр второй производной – график зависимости кривизны спектра поглощения ($d^2A/d^2\lambda$) от длины волны.

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = \frac{d^2 A_{1\text{ см}}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot c \cdot l$$

A – оптическая плотность при длине волны λ

$A_{1\text{ см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения при длине волны λ

C – концентрация вещества в растворе, г/100 мл

l – толщина слоя, см

Задача 1

Рассчитайте содержание фуразолидона в таблетках, если навеску порошка растертых таблеток массой 0,1004 г растворили в мерной колбе вместимостью 25 мл. 0,6 мл полученного раствора довели водой до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл. Оптическая плотность этого раствора при 360 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см составила 0,49. Удельный показатель поглощения стандартного образца фуразолидона в тех же условиях равен 985. Средняя масса 1 таблетки – 0,101.

Решение

$$X, \text{ г} = \frac{A \cdot P}{E \cdot l \cdot 100 \cdot a}$$

$$X, \text{ г} = \frac{0,49 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 0,101}{0,1004 \cdot 0,5 \cdot 100 \cdot 985 \cdot 0,6} = 0,0417 \text{ г}$$

Задача 2

0,0200 г индометацина поместили в мерную колбу на 100 мл и довели водой до метки. 5 мл полученного раствора перенесли в мерную колбу на 50 мл, довели водой до метки. Оптическая плотность полученного раствора при длине волны 318 нм составила 0,414. Рассчитайте содержание индометацина (%), если оптическая плотность раствора стандартного образца с концентрацией 0,00002 г/мл – 0,415.

Решение

$$X, \% = \frac{0,414 \cdot 0,00002 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{0,415 \cdot 5 \cdot 0,0200} = 99,76 \%$$