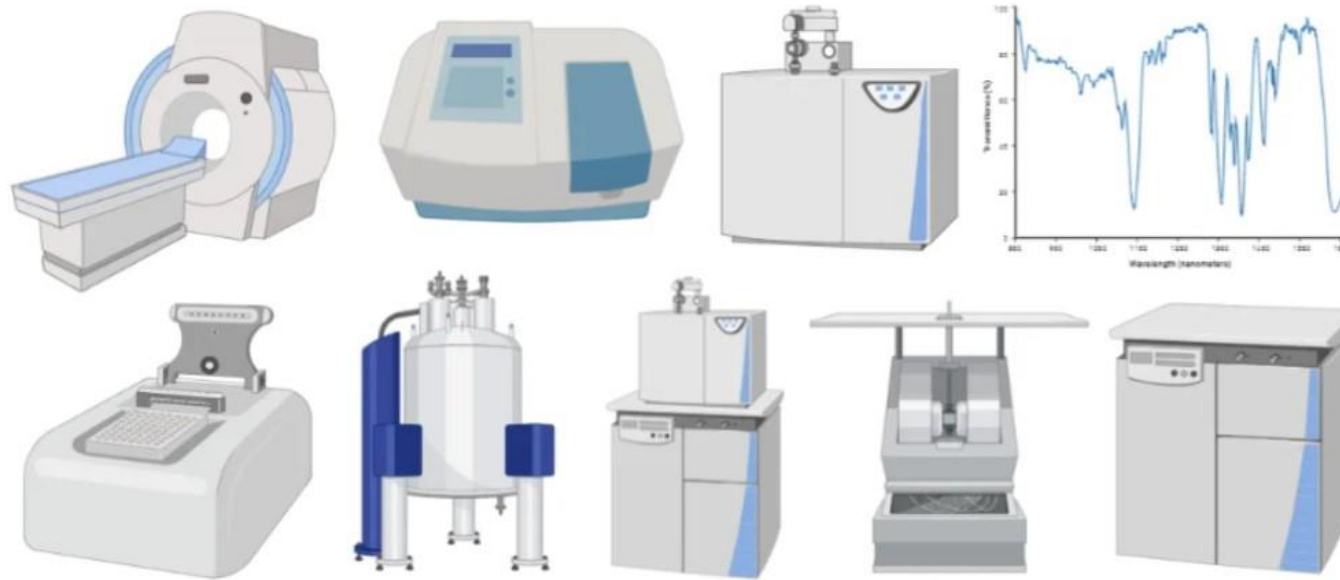


Современные методы фармацевтического анализа

МАГИСТРАТУРА, 2 КУРС, 3/0

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

- ❑ 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



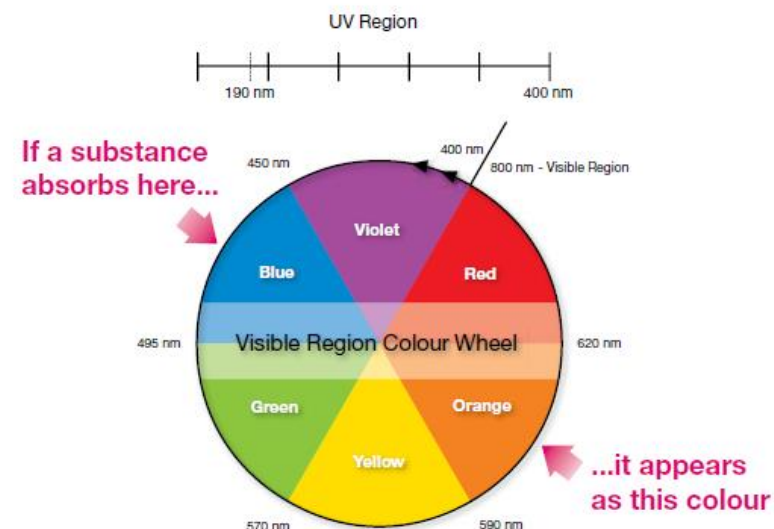
- ❑ Оптический прибор, использующийся для измерения оптической плотности растворов в узком диапазоне спектра.
- ❑ Измерения ведутся в луче не монохроматического, а полихроматического узко-спектрального света, формирующегося специальными светофильтрами.
- ❑ Используют для измерения оптической плотности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

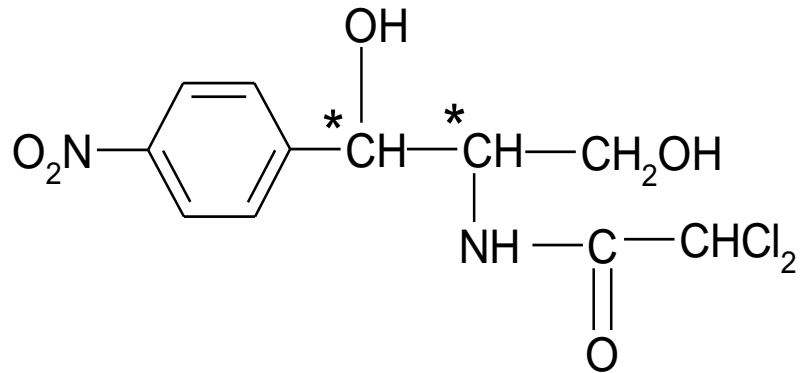
- ❑ погрешность 3-5 %;
- ❑ наименьшая ошибка достигается при оптической плотности 0,434;
- ❑ в интервале оптической плотности 0,30-0,70 ошибка составляет $\pm 3\%$;
- ❑ простота и быстрота проведения;
- ❑ точность;
- ❑ нижние границы определяемых концентраций – от 10^{-3} до 10^{-8} моль/л.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

ОФС. ОФС.1.2.1.1.0003

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,

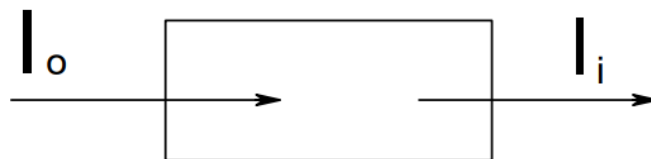
C – концентрация,

ε – молярный коэффициент поглощения.

Оптическая плотность и пропускание

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

$$A = \lg \frac{I_0}{I_i}$$



I_0 – интенсивность падающего светового потока

I_i – интенсивность светового потока, прошедшего через раствор

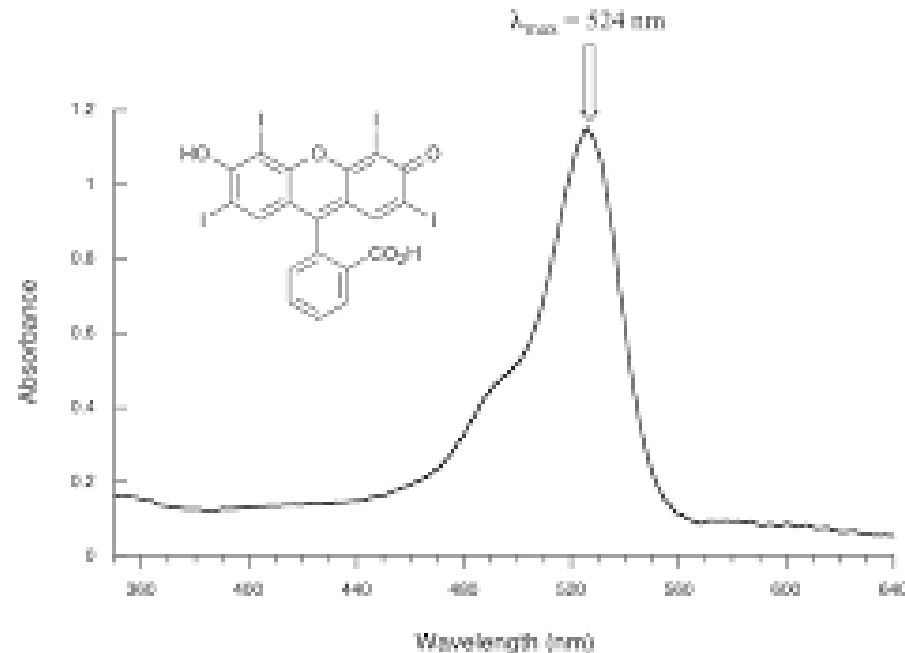
Удельный и молярный показатели поглощения

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

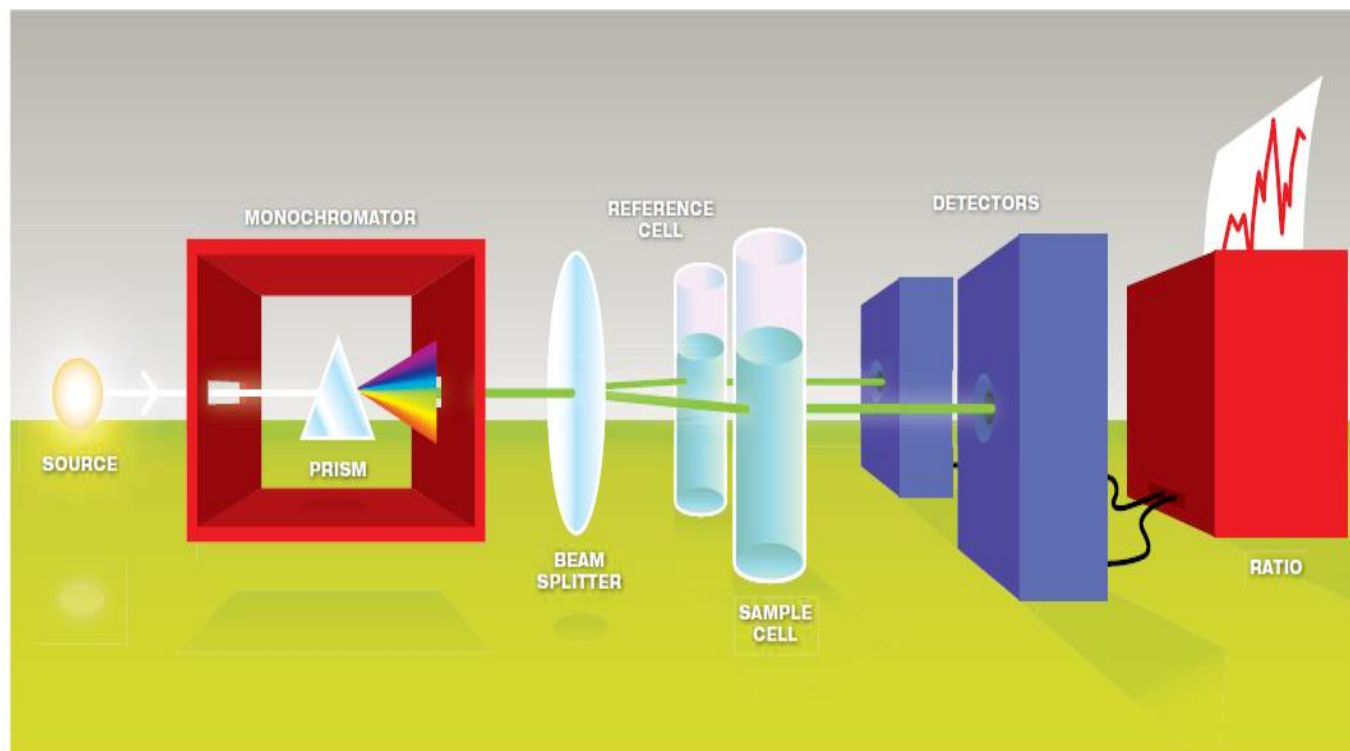
Молярный показатель поглощения ϵ - оптическая
плотность 1 М раствора при толщине
поглощающего слоя 1 см

Спектр поглощения

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



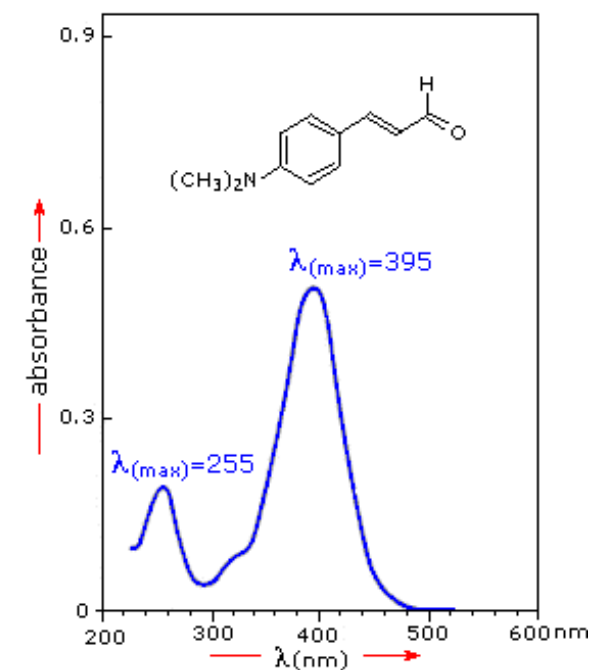
Спектрофотометр



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

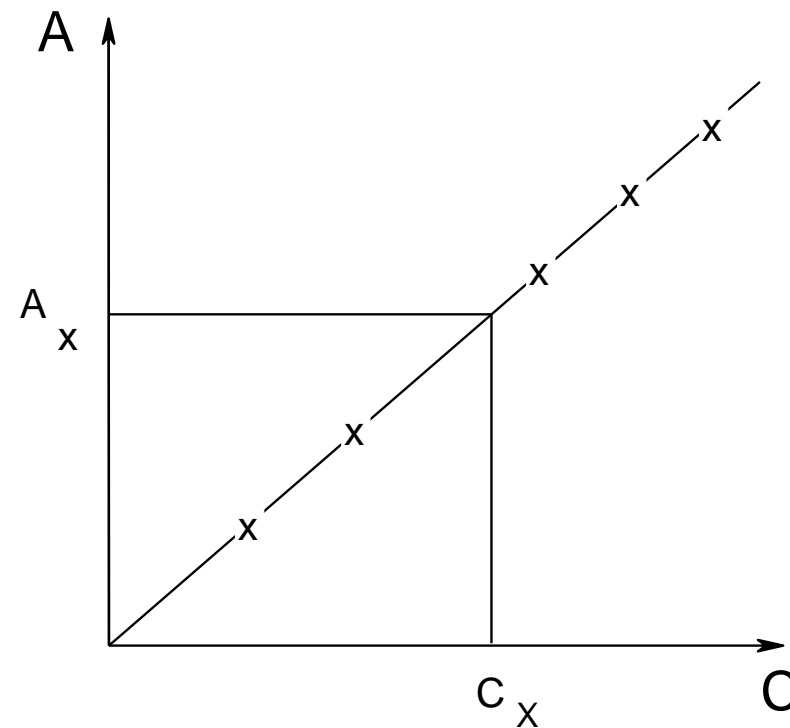
- Сравнение спектров поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца – в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба;
- В нормативной документации указаны положения максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба. Характеристики 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:

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

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

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

Спектрометрия в средней инфракрасной области

ОФС.1.2.1.1.0002

ИК-спектроскопия

- ❑ Основана на поглощении электромагнитного излучения ИК-области веществом.
- ❑ ИК-область – 0,78 – 400 мкм
- ❑ ближняя ИК-область (БИК) – 0,78-2,5 мкм ($14000-4000\text{ см}^{-1}$)
- ❑ средняя ИК-область – 2,5-25 мкм ($4000-400\text{ см}^{-1}$)
- ❑ дальняя ИК-область – 25-400 мкм ($400-10\text{ см}^{-1}$)

ИК-спектроскопия

Частоты колебаний в ИК-области имеют большие числовые значения, поэтому для удобства используют не частоты, а волновые числа, которые измеряются в обратных сантиметрах (см^{-1}).

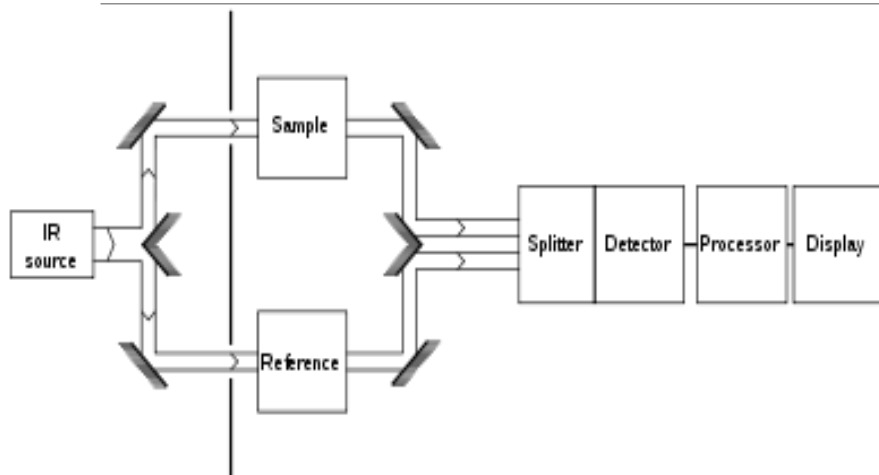
$$\nu^{-} = \frac{\nu}{c}$$

ν – частота в Гц

c – скорость света в вакууме.

$$\nu^{-} = \frac{10^4}{\lambda}$$

ИК-спектрометр



Прибор снабжен оптической системой (призма или дифракционная решетка), выделяющей монохроматическое излучение в измеряемой области. В ИК-спектрофотометрах с Фурье-преобразованием используется полихроматическое излучение и интерферометр, спектр рассчитывается в заданной области частот путем Фурье-преобразования исходных данных.

Взаимодействие вещества с излучением

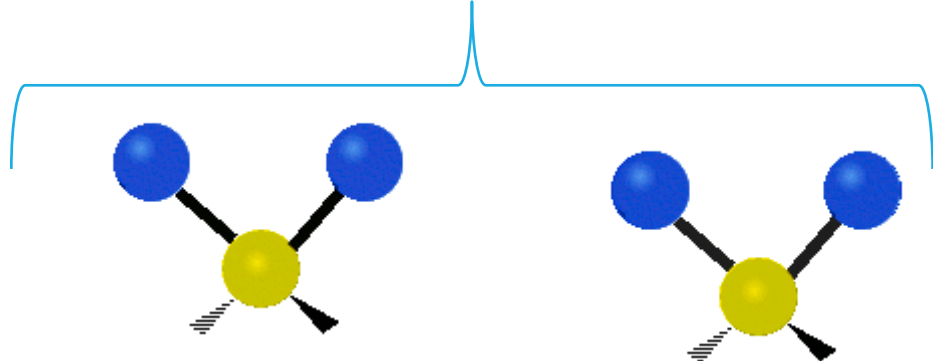
- ❑ Поглощение излучения происходит благодаря переходу с одного колебательного энергетического уровня на другой, более высокий.
- ❑ Одинаковые связи (функциональные группы) в разных соединениях поглощают примерно в одних и тех же волновых числах.
- ❑ Колебательные спектры молекул связаны с переходами между колебательными энергетическими состояниями, т.е. колебаниями атомных ядер относительно равновесных положений.
- ❑ Любая молекула имеет свой, только ей присущий колебательный спектр, состоящий из набора полос разной частоты и интенсивности.
- ❑ Колебательный спектр вещества является его индивидуальной характеристикой («отпечатки пальцев») и может использоваться для его идентификации.

Колебания атомов

Валентные колебания – колебания атомов по линии связи.

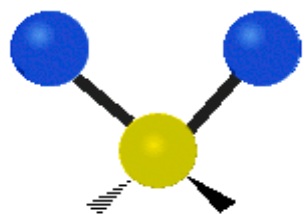
Деформационные колебания – колебания атомов в сторону от линии связи

валентные

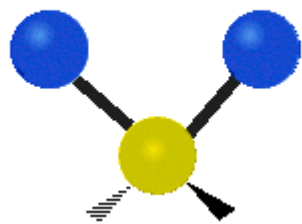


симметричное

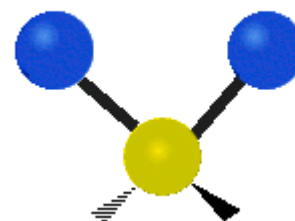
антисимметричное



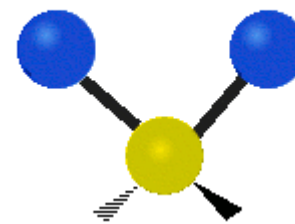
маятниковое



веерное



ножничное



крутильное

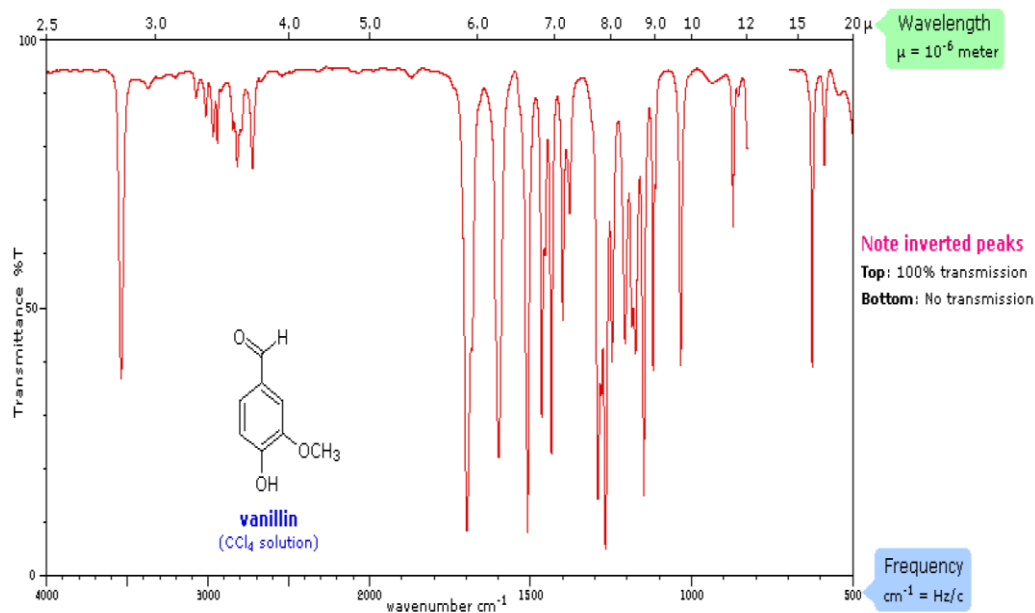
ИК-спектр

Спектральные данные записываются как зависимость коэффициента поглощения от длины волны.

В ИК-спектрах запись проводится в процентах пропускания или поглощения.

Спектр характеризуется следующими величинами:

- 1) длинами волн максимумов поглощения и интенсивностью в этих максимумах;
- 2) длинами волн в минимумах кривой поглощения и интенсивностью в этих точках;
- 3) длинами волн, отвечающих перегибам кривой поглощения, и интенсивностью для этих точек.



Подготовка образцов.

Жидкости – в форме пленки между двумя пластинками, прозрачными для ИК-излучения, или в кювете с малой толщиной слоя (0,01-0,05 мм).

Жидкости или растворы твердых веществ – в кюветах с помещением в канал сравнения кюветы с растворителем.

Материал кювет – NaCl, KBr, CaF₂, LiF и др.

Применяемые растворители должны быть инертны к материалу кювет

Подготовка образцов

Твердые вещества.

Диски из галогенидов щелочных металлов (калия хлорид или калия бромид) – небольшое количества вещества измельчают с солью, перетирают до однородности, прессуют диск при давлении 800 Мпа в вакууме.

Суспензии – небольшое количество вещества растирают с вазелиновым маслом, полученную суспензию сжимают между двумя пластинками, прозрачными для ИК-излучения.

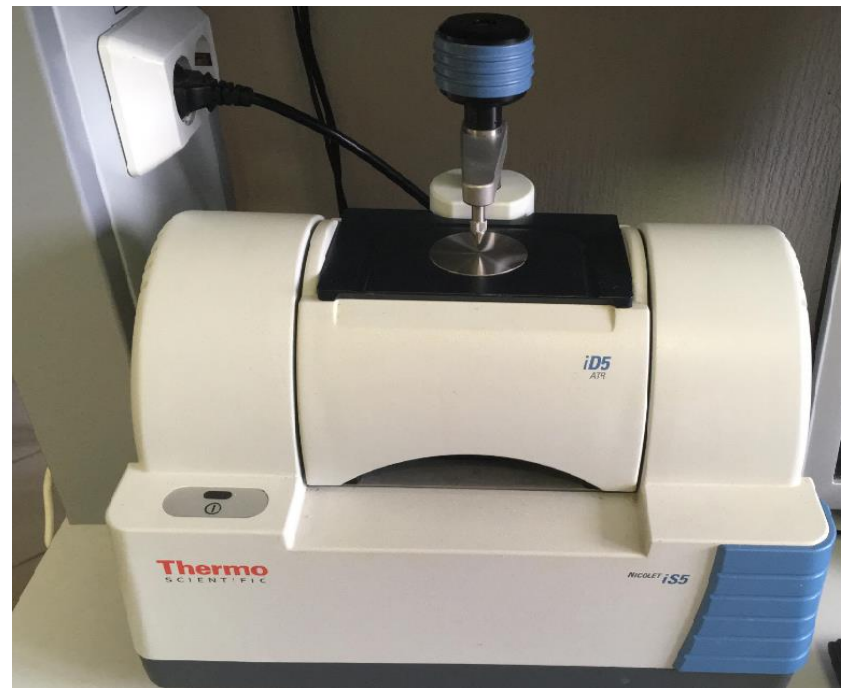
Газы – кювета, прозрачная для ИК-излучения.

Подготовка образцов.

Метод нарушенного полного внутреннего отражения:

Растворы — испаряют на поверхности внутреннего элемента отражения (из кристалла галогенида таллия, германия или другого минерала)

Твердые вещества — помещают на поверхность внутреннего элемента отражения, чтобы достичь как можно более плотного и полного контакта со всей поверхностью кристалла.



Подготовка образцов

Спектрометрия в ИК-области диффузного отражения:

Испытуемое вещество растирают с тщательно измельченным и высушенным калия бромидом или калия хлоридом. Смесь тщательно перетирают и регистрируют спектр.



Идентификация веществ

- Сравнивают ИК-спектры анализируемого и стандартного образцов, полученных в области от 4000 до 400 см⁻¹. Положения полос поглощения спектра анализируемого образца должны соответствовать положениям полос на спектре стандартного образца.
- Сравнивают ИК-спектр анализируемого образца с эталонным спектром, приведенным в нормативной документации. Положение полос поглощения в спектре анализируемого образца должно соответствовать положениям полос в эталонном спектре с допустимым отклонением $\pm 0,5\%$.

Спектрометрия в ближней инфракрасной области

ОФС. 1.2.1.1.0001

БИК-спектроскопия

Метод, основанный на способности веществ поглощать электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 780 до 2500 нм.

Преимущества:

- простота подготовки проб или отсутствие пробоподготовки
- быстрота измерений
- неразрушающий характер анализа
- одновременная оценка нескольких параметров
- проведение дистанционного контроля, в т.ч. В технологических потоках в режиме реального времени

Применение

- содержание воды и органических растворителей;
- гидроксильное и йодное число;
- кристаллическая форма и степень кристалличности;
- полиморфная форма и псевдополиморфная форма;
- дисперсность частиц.

БИК-спектрометр



- источник излучения
- монохроматор или интерферометр
- детектор
- устройство размещения образца или дистанционного оптоволоконного зонда
- Образцы размещают в стеклянных или кварцевых кюветах, флаконах, стеклянных стаканах, держателях капсул или таблеток и др.

Качественный анализ

Основан на схожести спектров одного и того же вещества.

Проведение анализа:

- создание библиотеки спектров
- подбор оптимальной математической модели для обработки спектров и реализации алгоритмов их сравнения
- валидация библиотеки в совокупности с выбранной математической моделью
- сравнение спектра испытуемого образца со спектрами в библиотеке

Количественный анализ

- разработка калибровочной модели – устанавливается зависимость изменения интенсивности поглощения или отражения в спектре образцов от изменения свойств или состава веществ
- предварительная обработка спектров
- анализ данных
- валидация калибровочной модели

Рамановская спектроскопия

ОФС. 1.2.1.1.0009

Раман-спектроскопия

□ Рамановская спектрометрия – вид спектроскопии, в основе которой лежит способность исследуемых систем (молекул) в неупругом (рамановском или комбинационном) рассеянии монохроматического света.

□ Рамановская спектрометрия – экспрессный и неразрушающий аналитический метод идентификации и контроля качества лекарственных средств.

Раман-спектроскопия



- В 1928 году Сэр Раман открыл явление неупругого рассеяния света.
- Излучение, рассеиваемое молекулами, содержит фотоны той же частоты, что и падающее излучение, а также некоторое количество фотонов с измененной или смещенной частотой.
- Спектроскопический процесс измерения этих смещенных фотонов был назван в честь сэра Рамана, само изменение частоты известно как «эффект Рамана» (Рамановский эффект), а излучение со смещенными частотами называют «Рамановским излучением».

Теория комбинационного рассеяния света

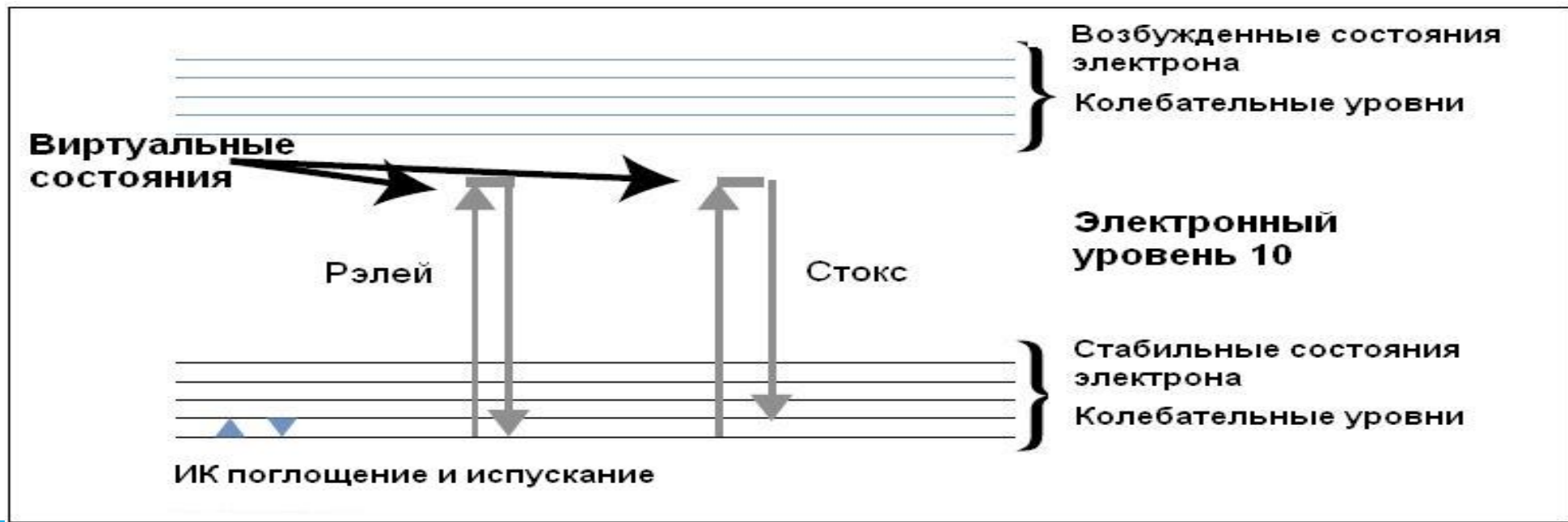
- ❑ Монохроматический свет, падающий на образец, может быть отражен, поглощен или рассеян.
- ❑ Процесс рассеяния света может быть упругим (происходить без обмена энергией между светом и веществом) и неупругим (между светом и веществом может происходить перераспределение энергии).
- ❑ Упругое рассеяние света называется релеевским. Оно является преобладающим (лишь 1 фотон из 10 000 000 рассеивается неупруго. При релеевском рассеянии частота рассеянного света в точности равна частоте света падающего).

Теория комбинационного рассеяния света

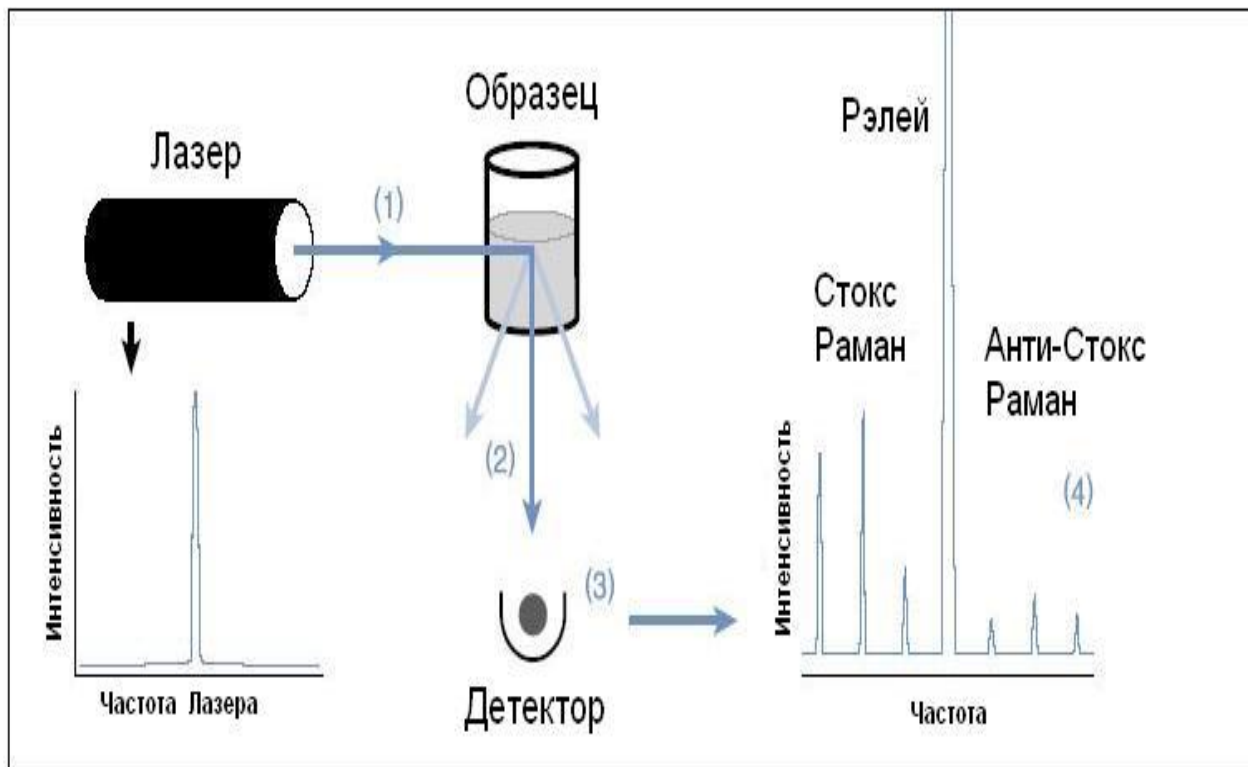
- ❑ Неупругое рассеяние света называется **комбинационным** (КР), или **рамановским**.
- ❑ При комбинационном рассеянии свет и вещество обмениваются энергией.
- ❑ В результате, частота рассеянного света может , как уменьшаться (при этом энергия переходит от света к веществу – это **стоксово рассеяние**), так и увеличиваться (при этом энергия переходит от вещества к свету – это **анти-стоксово рассеяние**).

Теория комбинационного рассеяния света

Рассеяние можно рассматривать как очень быстрый процесс поглощения и испускания фотона. При подобном поглощении фотона молекула не переходит в устойчивое возбужденное электронное состояние, если энергия фотона недостаточна для этого процесса. Она переходит в нестабильное возбужденное состояние, из которого она излучает фотон через очень короткое время.

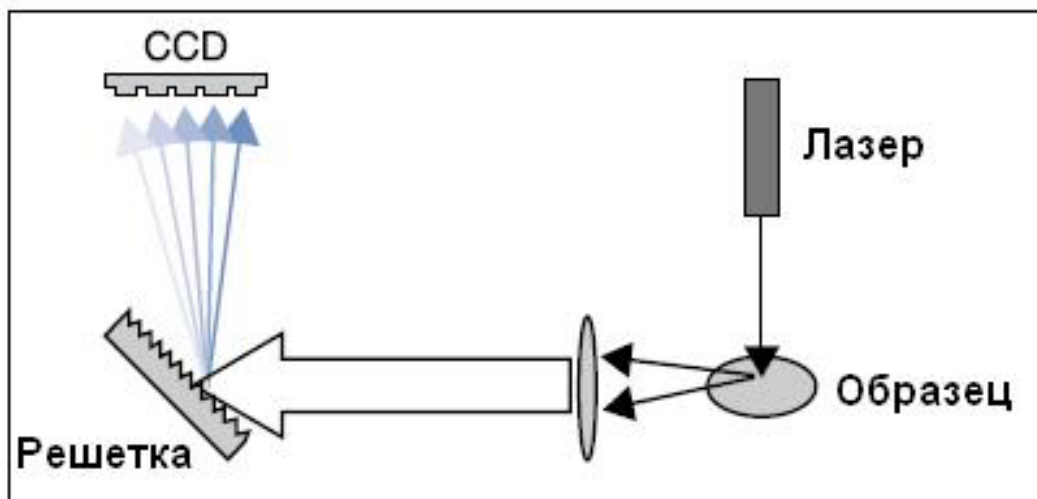


Теория комбинационного рассеяния света



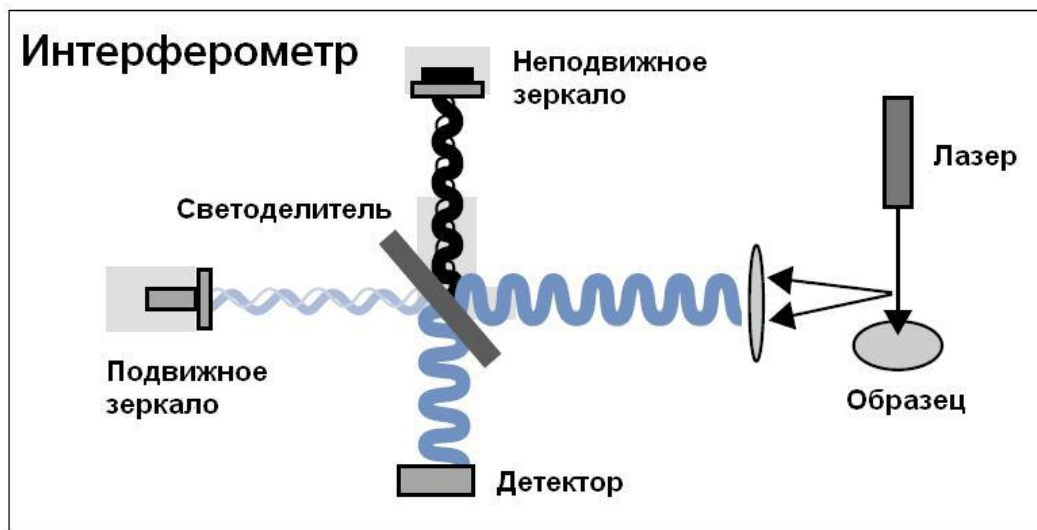
- (1) Лазерный луч возбуждает образец
- (2) Этот луч рассеивается во всех направлениях
- (3) Частично свет попадает на детектор, который регистрирует Раман-спектр
- (4) На спектре представлен свет на начальной частоте лазера (или рэлеевской) и спектральные особенности, характерные для каждого уникального образца.

Дисперсионная Раман спектроскопия



- Для получения Рамановского спектра необходимо разделить собранное рассеянное излучение на отдельные длины волн.
- В дисперсионных Раман спектрометрах это выполняется фокусированием Раман сигнала на решетке, которая пространственно разделяет излучение на различные длины волн. Этот разделенный луч направляется на CCD детектор.
- Дисперсионный Раман обычно использует лазеры в видимой области. Типичные длины волн лазеров 780 нм, 633 нм, 532 нм и 483 нм

Фурье-Раман спектроскопия

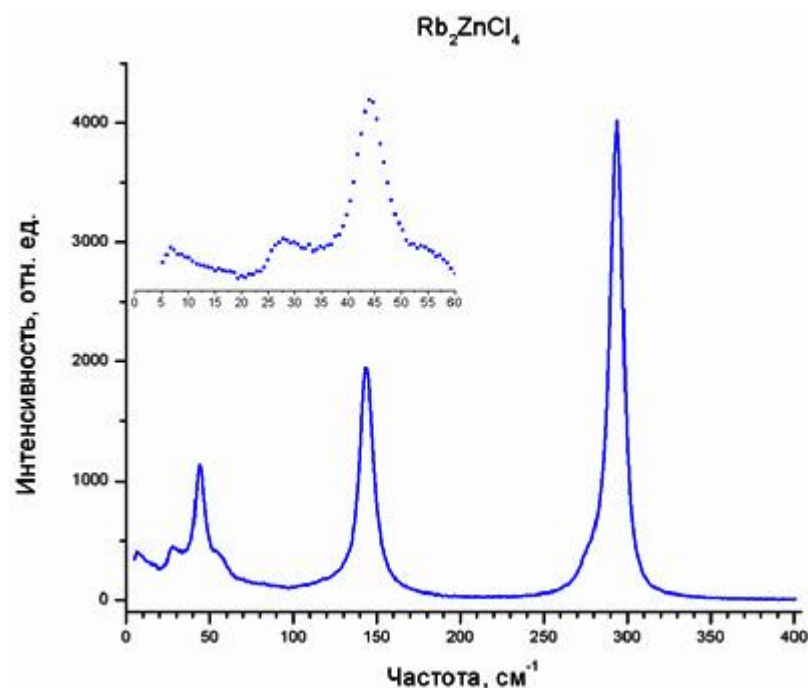


□ Фурье-Раман спектрометры используют возбуждающий лазер 1 мкм, интерферометр и высоко чувствительный детектор в ближнем ИК диапазоне.

□ При использовании возбуждающего лазера с большей длиной волны снижается энергия, поэтому виртуальное состояние ниже и меньше вероятность наложения высоких электронных уровней. Это значительно снижает возникновение мешающей флуоресценции.

□ Фурье-Раман спектроскопия использует интерферометр для получения интерферограммы, которая «кодирует» уникальные частоты Рамановского рассеяния в единственный сигнал.

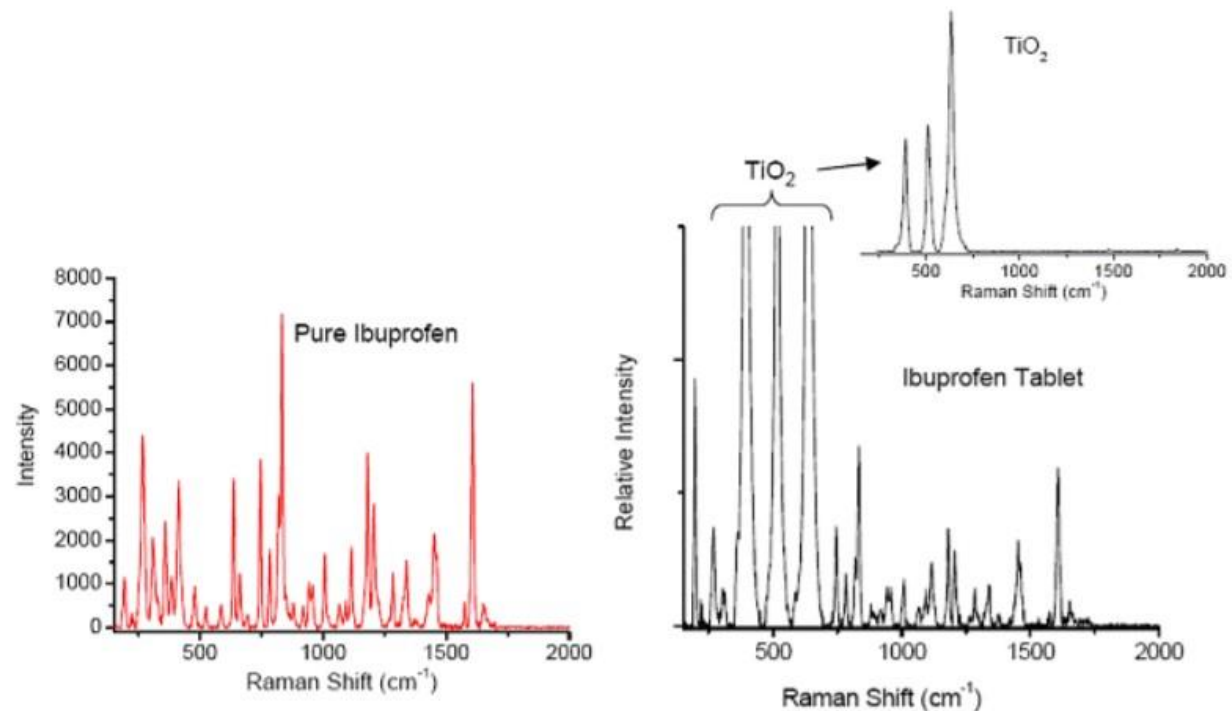
Колебательные спектры



- Колебательные спектры обычно представляют как спектры частот (график зависимости интенсивности при каждой индивидуальной частоте)
- В результате анализа можно идентифицировать молекулярные фрагменты – определять строение вещества или изучать внутримолекулярные взаимодействия, наблюдая положение и интенсивность полос в Рамановском спектре.

Идентификация соединений

Идентификация осуществляется сравнением спектра анализируемого вещества со спектром стандартного образца, зарегистрированных на одном и том же приборе в одних и тех же условиях.



Количественное определение

- При количественном анализе смеси проводится последовательная регистрация спектров в одинаковых условиях и сравнение интенсивности линий образцов, с учетом предварительной идентификации всех компонентов смеси и наличия соответствующих стандартов.
- Количественный анализ основана на прямо пропорциональной зависимости интенсивности линий спектра числу молекул в единице объема:

$$I = i \times k \times N$$

I – интенсивность линий спектра;

i – интенсивность рассеиваемого света на одну молекулу;

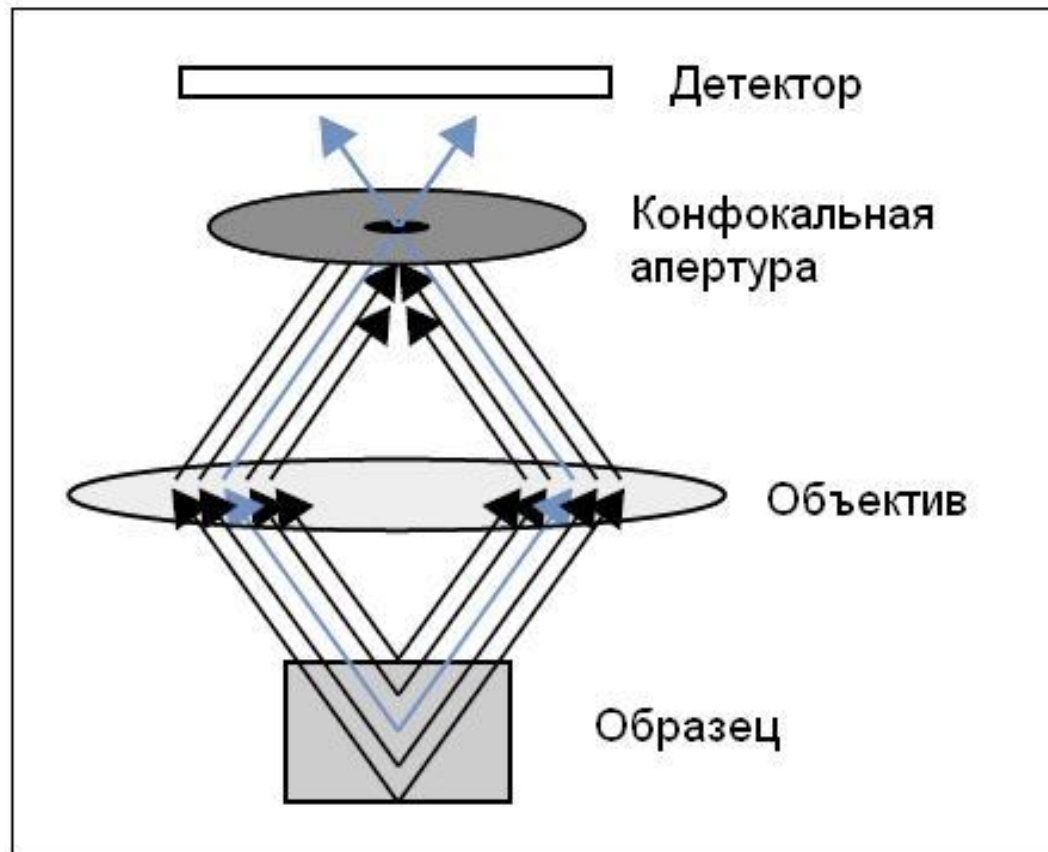
k – коэффициент, зависящий от условий эксперимента, постоянная для данного прибора величина;

N – число молекул

Библиотеки спектров

- ❑ Количественное определение образца проводят также с использованием библиотек спектров сравнения и с учетом всех необходимых поправок и калибровок прибора.
- ❑ Также библиотеки спектров используют при анализе примесей в лекарственных средствах.
- ❑ Набор спектров, полученных на данном спектрометре и образующих спектральную библиотеку, содержит информацию, определяющую границы подобия или количественные пределы.
- ❑ Селективность базы данных устанавливается при валидации.
- ❑ Спектральная библиотека пригодна только для использования данного прибора.

Рамановская микроскопия



❑ Цель микроскопии – анализировать как можно более мелкие образцы и выявлять интересующее вещество в его окружении.

❑ Этот параметр называется пространственным разрешением. В микроскопии более высокое пространственное разрешение достигается использованием малых пропускающих отверстий или «апертур», установленных где-либо в микроскопе.

Преимущества рамановской спектроскопии

- ❑ неразрушающий метод;
- ❑ бесконтактный метод;
- ❑ не требует подготовки пробы;
- ❑ можно анализировать твердые вещества, жидкости, в определенных случаях – газы;
- ❑ быстрый анализ (от секунд до минут);
- ❑ возможность удаленного бесконтактного анализа (для систем с оптическим волокном);

Преимущества рамановской спектроскопии

- применяются недорогие кварцевые и стеклянные кюветы (не требуется солевая оптика, как в ИК-спектрометрии);
- возможность контроля температуры/давления/влажности в ячейках, криостатах;
- возможность сканирования по глубине образца, прозрачного в выбранном диапазоне, с проникновением в глубину от 0,1 до 10 мкм;
- возможность одновременного получения КР-спектров и спектров фотолюминисценции;
- возможность комбинирования с ИК-Фурье системой , сканирующим электронным микроскопом , атомно-силовым микроскопом.