



**УФ- и ИК-
спектроскопические методы
анализа**

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УФ-ОБЛАСТИ

Ультрафиолетовая (электронная) спектроскопия – раздел спектроскопии, который включает получение, исследование и применение спектров испускания, поглощения и отражения в ультрафиолетовой области.

Явление УФ спектроскопии было открыто в 1852 г Г. Стоксом и У. Миллером.

Фармакопейным метод стал с 1968 г, включен во все современные фармакопеи.

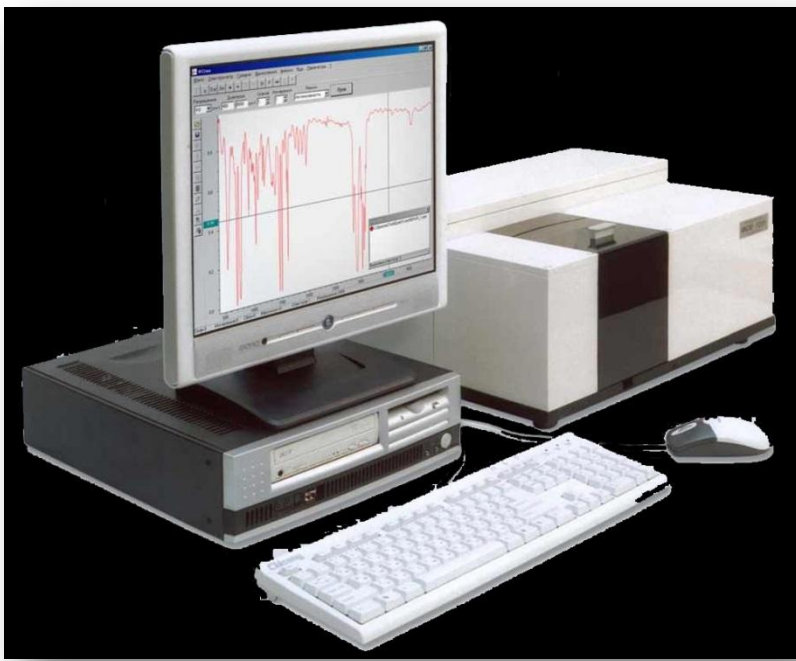
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УФ-ОБЛАСТИ

1 – 400 нм ультрафиолетовая часть спектра

1 – 200 нм дальняя УФ область (область вакуумного УФ излучения) – необходимы вакуумированные устройства

200 – 400 нм ближняя УФ область – рабочая в современных спектрофотометрах.

Источник излучения – водородная лампа (электрическая дуга в атмосфере водорода при низком давлении)



Используемая в настоящее время аппаратура позволяет измерять УФ-СПЕКТРЫ в области от 190 до 380 нм, видимые - от 380 до 780 нм.



ПРИНЦИП ПОЛУЧЕНИЯ УФ-СПЕКТРА

Техника измерения ультрафиолетовых спектров, в основном, такая же, как для спектров в видимой области. Спектральные приборы для ультрафиолетовой спектроскопии отличаются тем, что вместо стеклянных оптических деталей применяют аналогичные кварцевые (реже флюоритовые или сапфировые), которые не поглощают ультрафиолетовое излучение

```
graph LR; И[И] --> М[М]; М --> О[О]; О --> Ф[Ф]; Ф --> РУ[РУ];
```

И

М

О

Ф

РУ

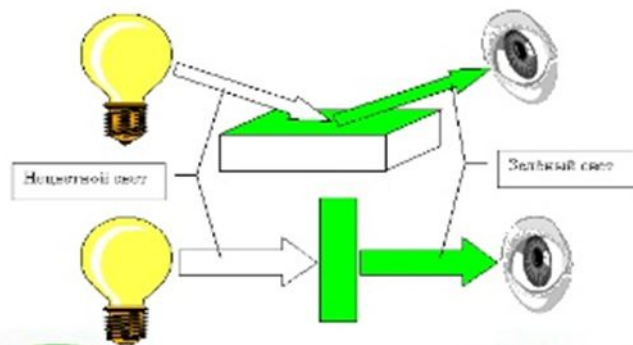
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УФ-ОБЛАСТИ



Природа полос поглощения (молекулярных спектров) в УФ и видимой частях спектра связана с различными электронными переходами в поглощающих молекулах и ионах (электронная спектроскопия). В ИК области она связана с колебательными переходами в молекулах (колебательная спектроскопия).

Спектроскопия УФ- и видимого диапазона

Цвет объекта



Аддитивное смешение цветов



Субтрактивное смешение цветов

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УФ-ОБЛАСТИ

ДОСТОИНСТВА МЕТОДА

- **Возможность получать данные о химическом составе и структуре вещества, так как при ультрафиолетовом облучении вещество не разрушается и не изменяется**
- **Малое количество вещества для исследования — около 0,1 мг.**
- **Высокая чувствительность**
- **Анализ многокомпонентных систем не требует их предварительного разделения**
- **Простота аналитических операций**

В связи с этим ультрафиолетовая спектроскопия является одним из наиболее распространенных физико-химических методов исследования органических и неорганических соединений

ПРИМЕНЕНИЕ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

- Идентификация (установление подлинности)
- Установление доброкачественности
- Количественное определение индивидуальных веществ и компонентов лекарственных форм
- Испытание по тестам «Растворение» и «Однородность дозирования»

Метод применяется на стадиях изучения лекарственных веществ и форм:

- Фармакокинетика
- Биодоступность
- Изучение стабильности
- Установление сроков годности

Испытание на подлинность лекарственных веществ

- ❑ Нахождение в спектре λ_{\max} и λ_{\min} , характеризующих области максимального и минимального поглощения
- ❑ Вычисление отношения значений оптических плотностей исследуемого раствора при разных длинах волн
- ❑ Характеристика интенсивности поглощения по величине удельного показателя $E_{1\text{см}}^{1\%}$
- ❑ Сравнение спектра анализируемого вещества со спектром стандартного образца этого же вещества

Во всех случаях необходимо получение спектра в условиях, приведенных в НД: **растворитель, концентрация, интервал длин волн, толщина кюветы**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Используют **аналитические** полосы поглощения:

- 1) Полоса должна быть свободна от наложения полос поглощения других компонентов анализируемой системы
- 2) Полоса должна обладать достаточно высоким показателем поглощения для индивидуального соединения

При анализе используют максимум или минимум полосы поглощения.

Нельзя проводить измерения на участках крутого спада или подъема кривой.

АНАЛИЗ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ - основан на принципе аддитивности

Способы спектрофотометрического определения в зависимости от характера светопоглощения компонентов:

- 1) Лекарственная форма содержит два вещества, одно из которых имеет максимум светопоглощения, а другое не поглощает УФ-свет в данной области**
- 2) Каждый из двух компонентов смеси имеет свой максимум светопоглощения, в котором второй компонент оптически прозрачен**

3) Лекарственная форма содержит два вещества, в максимуме поглощения одного из них второе тоже поглощает, а в максимуме поглощения второго вещества первое оптически прозрачно.

Метод изолированной абсорбции

Этот метод используют для анализа папаверина и рибофлавина в смеси с другими препаратами, а также ацетилсалициловой кислоты в присутствии салициловой.

- 4) Двухкомпонентная лекарственная смесь содержит лекарственные вещества, полосы поглощения которых налагаются друг на друга

Метод Фирордта (расчетный)

На основе этого метода разработаны способы анализа лекарственных форм, содержащих резорцин и кислоту салициловую, резорцин и новокаин, кислоту салициловую и бензойную, папаверин и теобромин, смесь сульфаниламидов и т.д.

Недостаток метода Фирордта – при трех и более компонентных смесях даже небольшие ошибки в измерениях оптической плотности приводят к существенному снижению точности анализа

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ИК-ОБЛАСТИ

Явление взаимодействия ИК-излучения с веществом было открыто в 1881 г У.Эбни и И.Фестингом.

В настоящее время, инфракрасная спектроскопия – один из основных методов исследования, в том числе и лекарственных соединений, включена во все современные фармакопеи.

Впервые метод стал фармакопейным в 1968 г, где он рекомендовался для контроля трех лекарственных веществ: фторотана, оксациллина и метициллина натриевых солей.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ИК-ОБЛАСТИ

Инфракрасная спектрофотометрия – метод исследования веществ, основанный на поглощении ИК-излучения, в результате чего происходит усиление колебательных и вращательных движений молекул.

ИК-спектры называют колебательными



Под ИК-областью подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,78 до 400 мкм

Длину волны (λ) в ИК-спектрах обычно измеряют в микрометрах (микронах), мкм

ближняя ИК-область: 0,78 - 2,5 мкм (780 - 2500 нм)

средняя ИК-область: 2,5 - 25 мкм (4000 - 400 см⁻¹) -

дальней ИК-область: 25 - 400 мкм

Наиболее часто используется средняя ИК-область.

Инфракрасные (ИК) спектры (колебательные спектры) возникают вследствие поглощения электромагнитной энергии при колебаниях ядер атомов в молекулах или ионах, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания от длины волны (λ) или частоты колебаний (ν)

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ КОЛЕБАНИЙ ПРИ ПОГЛОЩЕНИИ ИК-ИЗЛУЧЕНИЯ:

Валентные колебания (ν) – связаны с изменением длины связи между атомами и не сопровождающиеся отклонением от межъядерной оси. Располагаются в области больших частот 4000 – 1400 см⁻¹
Могут быть **симметричными** и **антисимметричными**.

Деформационные колебания (δ) – связаны с изменением валентного угла, образованного связями у общего атома, в результате чего атомы смещаются с межъядерной оси. Располагаются в области низких частот < 1400 см⁻¹

В зависимости от природы колебания подразделяют на

□ **скелетные** (800-1500 см⁻¹)

□ **колебания групп** (>1500 см⁻¹)

□ **обертонны** – полосы резонансного взаимодействия, составные полосы, возникающие в результате взаимодействия полос поглощения отдельных атомов.

С увеличением числа атомов в молекуле число возможных колебаний растет. В реальной молекуле колебания атомов тесно связаны друг с другом и взаимодействуют между собой.

Интенсивность поглощения в ИК-спектрофотометрии выражают чаще как пропускание (Т) светового потока в процентах:

$$T, \% = I/I_0 * 100, \text{ где}$$

I – интенсивность света, прошедшего через анализируемый образец

I₀ – интенсивность света, падающего на анализируемый образец

При изучении взаимодействия с ИК-излучением веществ различного химического строения (модельные соединения) было установлено, что многие атомные группы, такие как -OH , -NH_2 , -NO , >CO , а также некоторые связи, такие как C-H , C-C , C=C , $\text{C}\equiv\text{C}$ характеризуются в спектре определенными частотами, мало отличающимися в различных соединениях. Такие частоты называются **характеристическими** или **групповыми**.

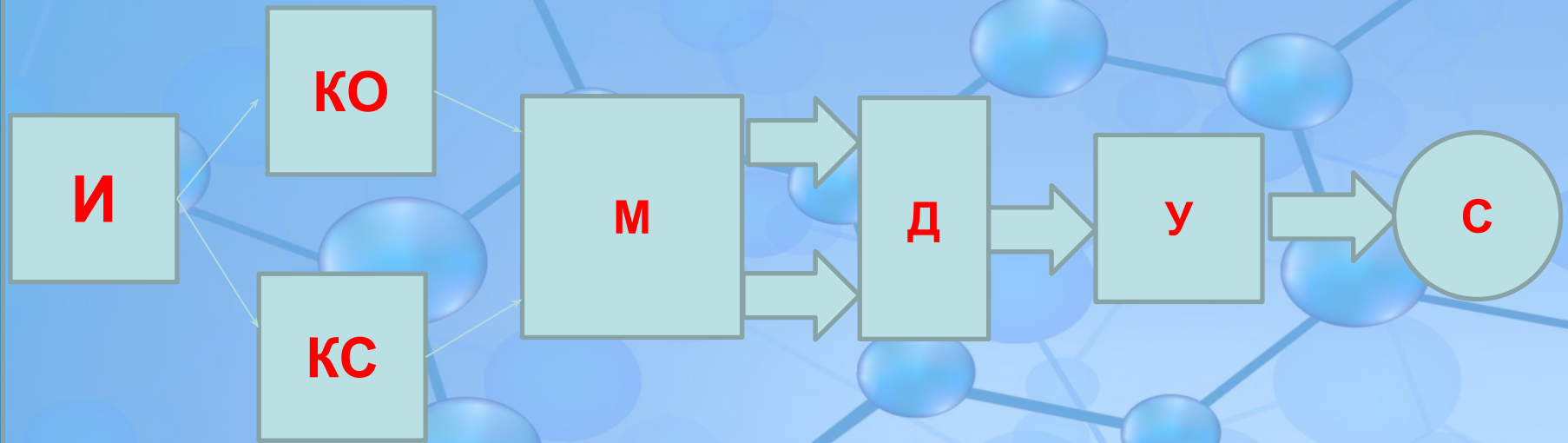
Полосы, расположенные в области $1500\text{-}400\text{ см}^{-1}$ называют **областью отпечатков пальцев**.

Эту область используют для идентификации вещества, потому что в ней каждое вещество имеет только для него характерный набор полос поглощения.

В основе получения ИК-спектра лежит облучение исследуемого образца ИК-излучением с постепенно меняющейся частотой, осуществляемое с помощью прибора ИК-спектрофотометра.



Схема ИК-спектрофотометра



И — источник излучения

КО — кювета с образцом

КС — кювета сравнения

М — монохроматор

Д — детектор

У — усиливающее устройство

С — самописец

ПРИНЦИП РАБОТЫ ИК-СПЕКТРОФОТОМЕТРА

ИК- излучение является тепловым.

Его источники: стержни из карбида кремния или диоксида циркония, раскаляемые проходящим электрическим током.

С помощью системы зеркал световой поток разделяется на два одинаковых луча, один из которых пропускается через кювету с веществом, другой – через кювету сравнения.

Прошедшее через кюветы излучение поступает в монохроматор, состоящий из вращающейся призмы, зеркала и щели, позволяющей выделять излучение со строго определенной частотой и плавно изменять эту частоту.

Призмы изготавливают из монокристаллов солей.
В приборах высокого класса применяют три призмы:

- Из фторида лития ($3800-2000\text{ см}^{-1}$)
- Из хлорида натрия ($2000-700\text{ см}^{-1}$)
- Из бромида калия ($700-400\text{ см}^{-1}$)

Интенсивности двух световых потоков, прошедших через монохроматор, автоматически вычитаются одна из другой.

Электрический импульс, образующийся при попадании результирующего светового потока на детектор типа термопары, усиливается и регистрируется самопишущим потенциометром.

ИК-спектры получают **в любом агрегатном состоянии** вещества: твердом, жидком, газообразном. Для снятия спектра анализируемый образец помещают **в специальную кювету из галогеновой соли щелочного металла.**

Спектр можно снимать в различных температурных режимах и под давлением.

Толщина слоя исследуемого вещества может меняться в широком интервале – **от 0,5 мм до 25 см.**

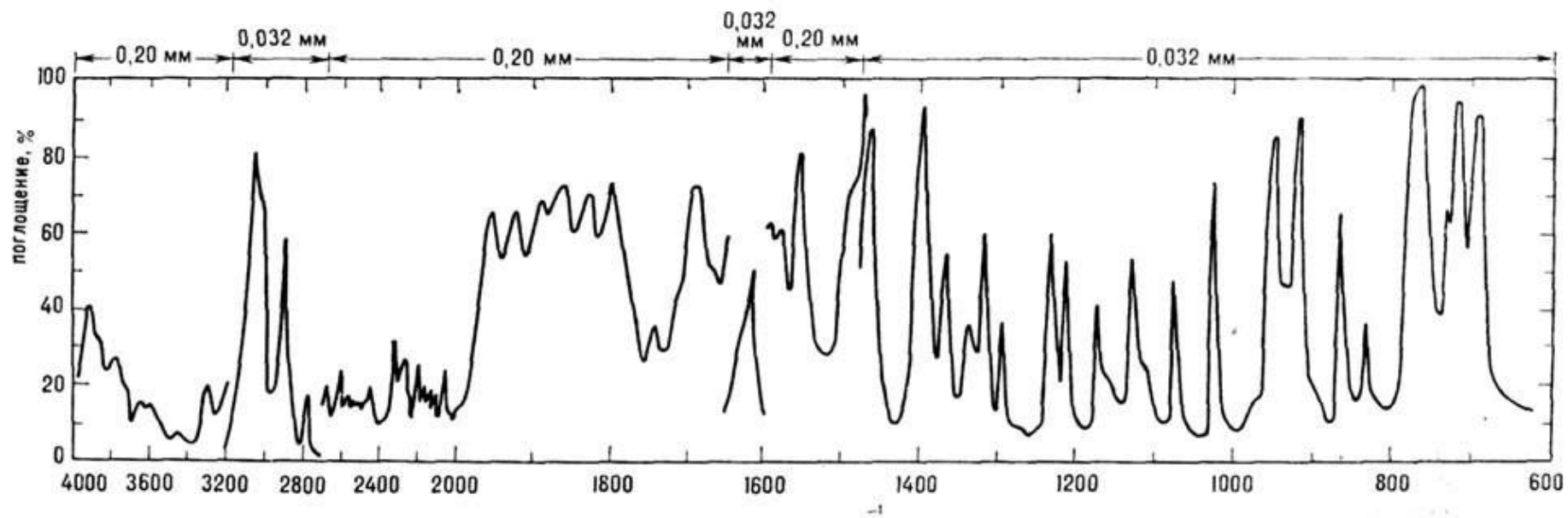
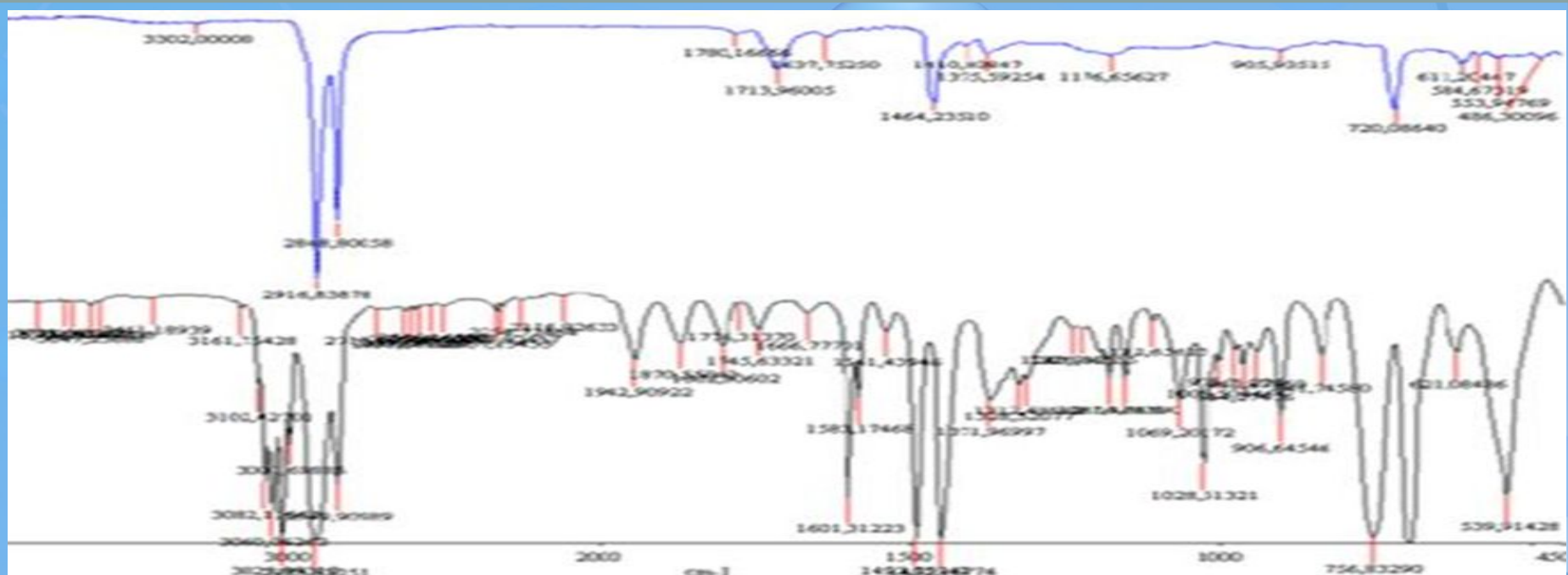
Обычно используют органический растворитель, «прозрачный» в данной области спектра и не взаимодействующий с анализируемым веществом. Чаще всего используют сероуглерод или четыреххлористый углерод. Растворители не должны содержать воду, этиловый спирт, диоксан и др. вещества, действующие на материал кювет.

ИК-спектры представляют собой график зависимости процента пропускания (T , %) от длины волны (λ , мкм) или частоты (ν , см⁻¹) инфракрасного излучения.

Картина ИК-спектра значительно отличается от картины УФ-спектра или спектра в видимой области.

В ИК-спектре **«максимумов»** достаточно много. Их количество определяется поглощением ИК-излучения отдельными функциональными группами или колебаниями под действием этого излучения фрагментов скелета органического вещества.

Положение каждого максимума (полосы) характеризуется **интенсивностью** (сильная, средняя, слабая), **формой** (очень широкая, широкая, узкая) и **определенным положением в спектре** (λ , мкм; ν , см⁻¹)



ПРИМЕНЕНИЕ ИК-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

- При установлении структуры новых БАВ, получаемых путем химического синтеза или выделяемых из природных объектов, изучении строения метаболитов
- При испытании на подлинность лекарственных веществ
- Определении доброкачественности лекарственных соединений
- Количественном анализе
- Контроле технологического процесса в промышленном производстве фармпрепаратов

Во всех случаях необходимо получение спектра

ИК-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ВКЛЮЧАЕТ СТАДИИ:

- Подготовка исследуемого образца
- Регистрация (снятие) спектра с помощью прибора
- Интерпретация (анализ спектра, отнесение полос поглощения к определенным функциональным группам, связям, фрагментам структур)
- Решение аналитической задачи

СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА:

- **Растворы веществ:** наиболее удобны для получения спектров (отсутствуют межмолекулярные взаимодействия). Растворители: сероуглерод, четыреххлористый углерод. Объем раствора для анализа – 0,1 - 1,0 мл при концентрации 0,05-10%.
- **Тонкие полимерные пленки вещества:** для их получения исследуемое вещество и полимер растворяют в легколетучем растворителе, полученный раствор наносят на пластины из NaCl или KCl. Растворитель испаряют в вакууме, на пластинке остается твердая полимерная пленка. Пластинку помещают в кюветное отделение прибора и снимают ИК-спектр.

СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА:

- **Пасты:** готовят тщательным растиранием в агатовой ступке твердого образца с вазелиновым, фторированным или парафиновым маслами и помещают в виде тонкого слоя между солевыми пластинами (окнами кюветы). Само вазелиновое масло поглощает в области 2900 и 1400 см⁻¹.
- **Твердые вещества:** в виде тонкого порошка 0,5 – 1,0 мг тщательно перемешивают с порошком бромида калия приблизительно 100 мг, затем спрессовывают в специальном устройстве под давлением в тонкую, прозрачную пластинку (таблетку, диск).

Применение ИК-спектроскопии в исследовательских целях

В случае исследования новых химических соединений проводят анализ спектра: интерпретацию, расшифровку, объяснения нахождения в спектре определенных полос.

Имеющиеся полосы поглощения относят к определенным функциональным группам, связям, фрагментам структур, используя таблицы характеристических частот, имеющиеся в руководствах по ИК-спектрофотометрии.

На основании подробного анализа спектра делают заключение о строении исследуемого вещества.

ИК-спектрофотометрия используется также для изучения внутри- и межмолекулярных взаимодействий, строения комплексных соединений, установления механизмов протекания реакций.

Для установление подлинности лекарственного вещества по ИК-спектру согласно НД используют следующие способы:

- 1) Сравнение ИК-спектров анализируемого лекарственного вещества и его стандартного образца.** Спектры снимают в одинаковых условиях. Способ в настоящее время получил наибольшее распространение и рекомендован для лекарственных веществ различной структуры.
- 2) Сравнение спектра анализируемого вещества со спектром, приведенным в фармакопейной статье (если СО отсутствует).**
- 3) Снятие не всего спектра, а только наиболее характерных его фрагментов.**

ИК-спектрофотометрия является **обязательным методом контроля веществ – стандартных образцов**, она вводится практически во все ФС на лекарственные субстанции.

Метод используется в фармакопейном анализе для доказательства отличия лекарственных веществ, близкого химического строения.

Метод ИК-спектрофотометрии применяют для **установления чистоты анализируемого лекарственного вещества и определения примесей**.

В количественном анализе ИК-спектрофотометрия применяется редко.

В основе расчетов лежит **закон Бугера-Ламберта-Бера**.

Преимущественно применяется **способ калибровочного графика**. В ИК-спектрофотометрии **не применяются** расчеты с использованием молярного или удельного коэффициентов поглощения из-за некоторых побочных эффектов (рассеяние, сплошного поглощения и др.)

- Для количественного определения в ИК-спектрофотометрии устанавливают **характеристическую частоту**, при которой будут проводить анализ, находят графически коэффициент пропускания T и строят график зависимости от концентрации.

ДОСТОИНСТВА МЕТОДА

- **Высокая информативность метода**
- **Селективность**
- **Универсальность исследования, использование его в анализе веществ различной структуры, органической и неорганической природы**
- **Достаточно высокая чувствительность**
- **Возможность использования для анализа небольшого количества вещества**

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Малая доступность оборудования
- Необходимость квалифицированного персонала, выполняющего работы на приборе и все операции, связанные с подготовкой пробы исследуемого вещества

**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ**

