

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

А.А. Блинникова

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ И
ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЯ
В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск-2004

УДК 615.073: 535.243: 535.65

Блинникова А.А. Спектрофотометрия и фотоэлектроколориметрия в анализе лекарственных средств: Учебное пособие / Под ред. проф. Е.А. Краснова. – Томск: Изд-во ТПУ, 2004. – 92 с.

В учебном пособии рассмотрены физические основы и аппаратное оформление широко применяемых в фармации оптических методов анализа – спектрофотометрии и фотоэлектроколориметрии. Значительное внимание уделяется анализу двух - и многокомпонентных лекарственных средств. Приведены примеры применения спектроскопии в УФ - и видимой областях для установления подлинности, испытания на чистоту и количественного определения лекарственных средств. Дано описание дифференциальной фотометрии и фотометрического титрования.

Пособие рассчитано на студентов очного и заочного отделений фармацевтических факультетов высших учебных заведений, а также для курсантов военно - медицинского института и слушателей ФУСа.

Табл. 8. Ил. 15. Библиогр.: 13 назв.

Рекомендовано к изданию методическим советом фармацевтического факультета СГМУ от 25.12.2001 (протокол № 4).

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Общие теоретические положения. Электронный спектр поглощения и его характеристики	5
Основной закон светопоглощения	12
Причины отклонения от закона светопоглощения	16
Применение спектроскопии в УФ- и видимой областях в фармацевтическом анализе	18
1. Испытание на подлинность лекарственных веществ	18
2. Испытание на чистоту	19
3. Определение количественного содержания лекарственных веществ	21
Анализ двух- и многокомпонентных лекарственных средств	26
Особенности анализа лекарственных веществ в видимой области спектра	29
Этапы фотометрического определения лекарственных средств при разработке методики анализа	31
Дифференциальная фотометрия	32
Фотометрическое титрование	33
Аппаратура фотометрии	35
Фотоэлектроколориметрия	38
Метрологическая характеристика спектрофотометрического метода анализа	43
Вопросы для самоподготовки	47
Лабораторные работы	48
Приложения	56
Список литературы	92

ВВЕДЕНИЕ

Расширение арсенала лекарственных средств (ЛС) сопровождается развитием новых методов их анализа. Это связано с тем, что выход и качество конечных продуктов химико-фармацевтического производства зависит не только от строгого проведения процесса согласно технологическому регламенту, от качества исходного сырья, но и от применения надежных методов постадийного контроля. Поэтому вопросам совершенствования контроля качества ЛС в последнее десятилетие уделяется значительное внимание.

Как известно, аналитический контроль проводится на всех этапах производства, начиная от входного контроля качества сырья и заканчивая анализом готовой продукции. Этот контроль должен осуществляться в полном соответствии с действующей нормативной документацией (национальная фармакопея, ФСП). Нормативный документ содержит совокупность официальных методов исследования субстанций и их лекарственных форм, на основании результатов анализа которых решается вопрос о возможности их применения в медицинской практике. При этом устанавливается доброкачественность ЛС, складывающаяся как из определения подлинности, так и обнаружения примесей и количественного содержания действующего вещества. Основными требованиями фармакопейного анализа ЛС являются высокая чувствительность, специфичность, точность и экспрессность. Этим требованиям удовлетворяют физические и физико-химические методы анализа, основанные на измерениях некоторых констант, присущих каждому веществу.

В основном физико-химические методы разделяют на три группы:

- 1) оптические методы, базирующиеся на закономерностях взаимодействия вещества с электромагнитным излучением;
- 2) электрохимические методы анализа, в основе которых лежат электрохимические свойства вещества;
- 3) хроматографические методы разделения и количественного определения смеси веществ, основанные на различии распределения компонентов между подвижной и неподвижной фазой.

К числу оптических методов относятся следующие: рефрактометрия, поляриметрия, интерферометрия, фотоколориметрия, фототурбидиметрия, флуориметрия, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия.

Высокая специфичность, возможность широкого выбора полос поглощения, сравнительная простота и точность измерений, достигаемые современной аппаратурой, обеспечивают фотометрическому анализу широкое использование в анализе различных лекарственных средств.

Спектрофотометрический метод широко используется для идентификации, установления количественного содержания и определения чистоты веществ. Указанный метод с успехом применяется также для количественного анализа многокомпонентных смесей. Достоинствами метода являются относительная простота эксперимента, специфичность и

использование сравнительно небольшого количества вещества (2-5 мг). Метод относится к среднечувствительным (в большинстве случаев измеряют концентрации 10^{-1} - 10^1 мкг/мл).

ОБЩИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ. ЭЛЕКТРОННЫЙ СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ

Одним из общих свойств молекул является способность к избирательному поглощению электромагнитного излучения, что и положено в основу исследования строения и идентификации веществ.

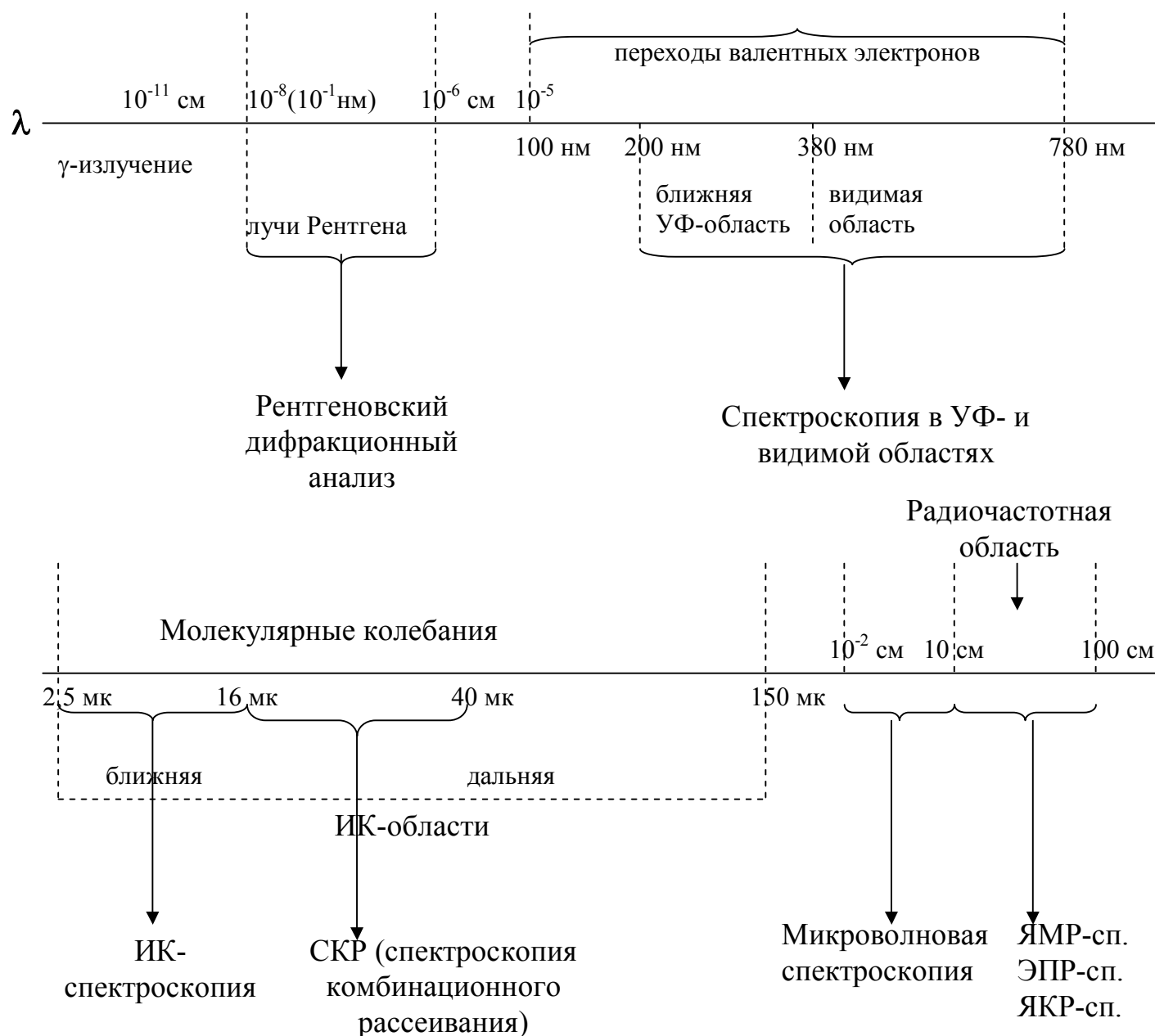


Рис. 1. Области электромагнитного спектра и используемые методы исследования

Испускание и поглощение электромагнитного излучения происходит квантами, энергия которых описывается уравнением:

$$\Delta E = h \cdot \frac{C}{\lambda} \quad (1),$$

где h – постоянная Планка ($6,5 \cdot 10^{-27}$ эрг/с);

C – скорость света в вакууме ($3 \cdot 10^{10}$ см/с);

λ – длина волны излучения, выражается в долях метра: см, мкм (10^{-6} м), нм (10^{-9} м) и ангстремах ($\text{Å} = 10^{-10}$ м).

Основные области электромагнитного спектра, расположенные в порядке уменьшения энергии (увеличения λ) представлены на рис. 1.

Наибольший интерес для анализа лекарственных средств представляет ультрафиолетовая (200-400 нм), видимая (400-800 нм), инфракрасная (2-15 мк) и радиочастотная (10-100 см) области спектра.

Механизмы взаимодействия электромагнитного излучения с веществом в перечисленных областях спектра существенно отличаются друг от друга, но в любом случае происходит поглощение молекулой определенного количества энергии.

Из рис. 1 видно, что с уменьшением λ увеличивается энергия электромагнитного излучения, что определяет характер взаимодействия электромагнитных волн с исследуемым веществом.

Использование указанного в таблице интервала спектра в аналитических целях обусловлено тем, что излучение в данной области обладает энергией, соизмеримой с энергией связей химических соединений.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра для целей анализа веществ основана на поглощении электромагнитного излучения с длиной волны от 200 до 800 нм.

При облучении исследуемого вещества электромагнитным излучением с постепенно меняющейся длиной волны (энергией) можно проследить изменение интенсивности его поглощения. Графическое изображение этой зависимости называется **электромагнитным спектром** (рис. 2). Область интенсивного поглощения в нем называется **полосой поглощения**. Длина волны, при которой наблюдается максимум поглощения, обозначается λ_{max} , ее также называют **аналитической длиной волны**.

На рис. 2 представлены УФ-спектры различных лекарственных веществ. УФ-спектр вещества может иметь несколько максимумов поглощения (например, анаприлин, дибазол, димедрол), каждый из которых соответствует различным типам электронных переходов.

Поглощение световой энергии органическими соединениями в УФ- и видимой областях спектра связано с переходом σ -, π - и n -электронов из основного состояния в состояние с более высокой энергией. Электронные переходы классифицируют в зависимости от типа связи, обуславливаемой характером связывающих орбиталей: σ – простая связь, π – двойная или

тройная связь, а также несвязывающими (n) орбиталями. На несвязывающих орбиталях располагаются свободные электронные пары гетероатомов – O, S, N, Hal.

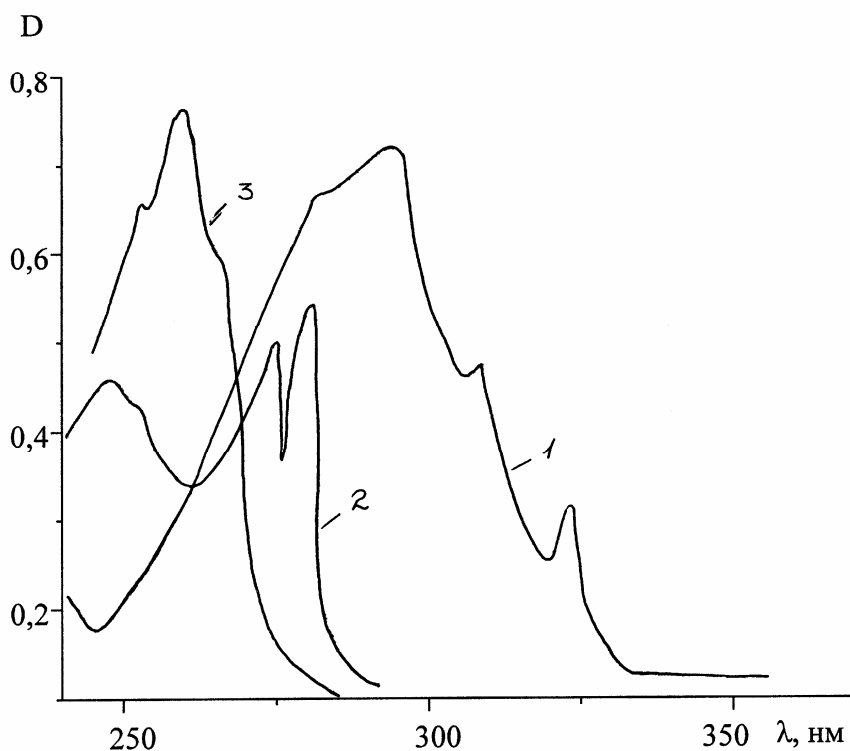


Рис. 2. УФ-спектры:

- 1 – анаприлин, с $2,0 \cdot 10^{-3}$ %, метанол;
- 2 – дибазол, с $1,0 \cdot 10^{-3}$ %, этанол
с добавлением 0,1 моль/л NaOH;
- 3 – димедрол, с $5,0 \cdot 10^{-2}$ %, этанол.

Расположение электронов, на связывающих и несвязывающих орбиталях, соответствует основному состоянию молекулы.

Нахождение электронов на разрыхляющих орбиталях соответствует возбужденному состоянию, которое возникает при поглощении молекулой вещества определенного количества энергии. При возбуждении возможен переход электронов с одних орбиталей на другие, что можно выразить схемой (рис. 3).

Имеются следующие типы электронных переходов, происходящих в

УФ- и видимых областях спектра:

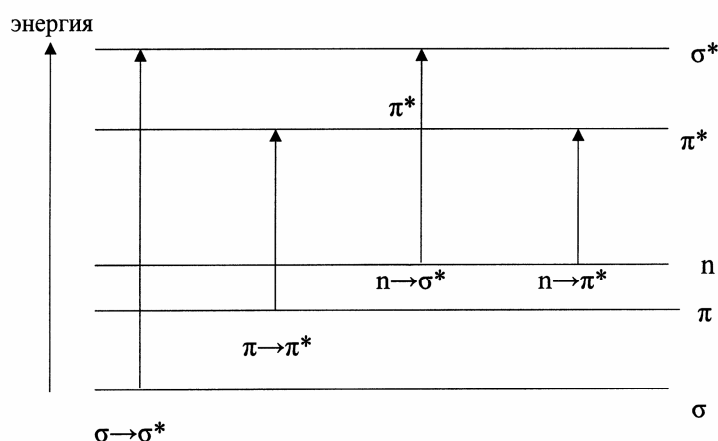


Рис. 3. Схема энергетических электронных уровней и электронных переходов

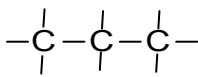
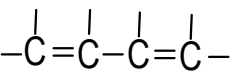
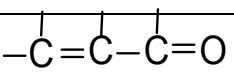

Переходы $\delta - \delta^*$ наблюдаются у насыщенных соединений с δ -связью ($-\overset{|}{\underset{|}{C}}-\overset{|}{\underset{|}{C}}-$; $-\overset{|}{\underset{|}{C}}-\overset{|}{\underset{|}{O}}-$; $-\overset{|}{\underset{|}{C}}-H$) и требуют значительных затрат энергии. Максимумы поглощения таких соединений расположены в дальней (вакуумной) УФ-области спектра (100-150 нм) и не имеют аналитического значения в виду сложности снятия спектров, так как в этой области поглощают составные компоненты воздуха, поэтому необходимо получать спектры в вакууме и вследствие этого использовать вакуумные камеры.

Переходы электронов типа $\pi-\pi^*$ в ординарной π -связи имеют малое аналитическое значение (область спектра 180-200 нм). При появлении сопряженных π -связей максимум сдвигается в ближнюю УФ- или видимую область спектра.

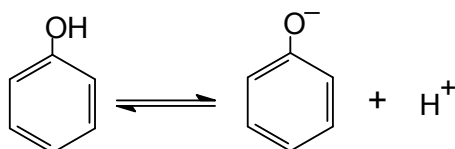
Переходы электронов типа $\pi-\sigma^*$ и $n-\pi^*$ требуют затраты меньшей энергии. Указанные переходы появляются в органических соединениях с гетератомами – Cl, N, S, O, галоидами и т.д., обладающими свободными парами электронов, расположенными на несвязывающих n -орбиталях.

Таким образом, существенными элементами, обуславливающими наличие электронных факторов органических молекул, являются **кратная связь и неподеленная пара электронов**. Группировки, содержащие в своем составе сопряженные двойные связи и неподеленные пары электронов, называют **ХРОМОФОРАМИ**.

Некоторые полосы поглощения основных функциональных групп

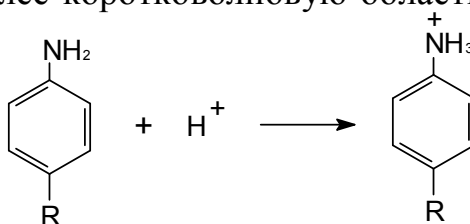
Тип связи 	Тип перехода	λ_{\max} , нм	Тип связи	Тип перехода	λ_{\max} , нм
	σ - σ^*	125-190	-NO ₂	π - π^*	200-250
>C=C<	π - π^*	160-200	-C ₆ H ₅ 	n - π^*	270-330
>C=O	n - π^*	270-300		π - π^*	200-250
-NH ₂	n - π^*	170-190			230-280
>C=N-	n - π^*	210-230		π - π^*	214-250
	π - π^*	230-250		π - π^*	220-260
		190-210		n - π^*	300-320

На положение и интенсивность полос поглощения (табл. 1) большое влияние оказывают электронно-донорные (-NH₂; -OH; -SH) и электронно-акцепторные (-CN; -N=O; -COH) заместители, содержащиеся в молекуле органического соединения. Как правило, введение таких заместителей приводит к смещению полос поглощения веществ в длинноволновую область спектра, называемому **батохромным сдвигом** (рис. 4). На положение полос поглощения значительное влияние оказывают также процессы ионизации и комплексообразования. При ионизации по кислотному типу имеет место дополнительный батохромный сдвиг на 25-29 нм (до 289 нм).



Ионизация по основному типу (протонизация), наоборот, часто приводит к сдвигу в более коротковолновую область спектра – **гипсохромный эффект**.

Например:



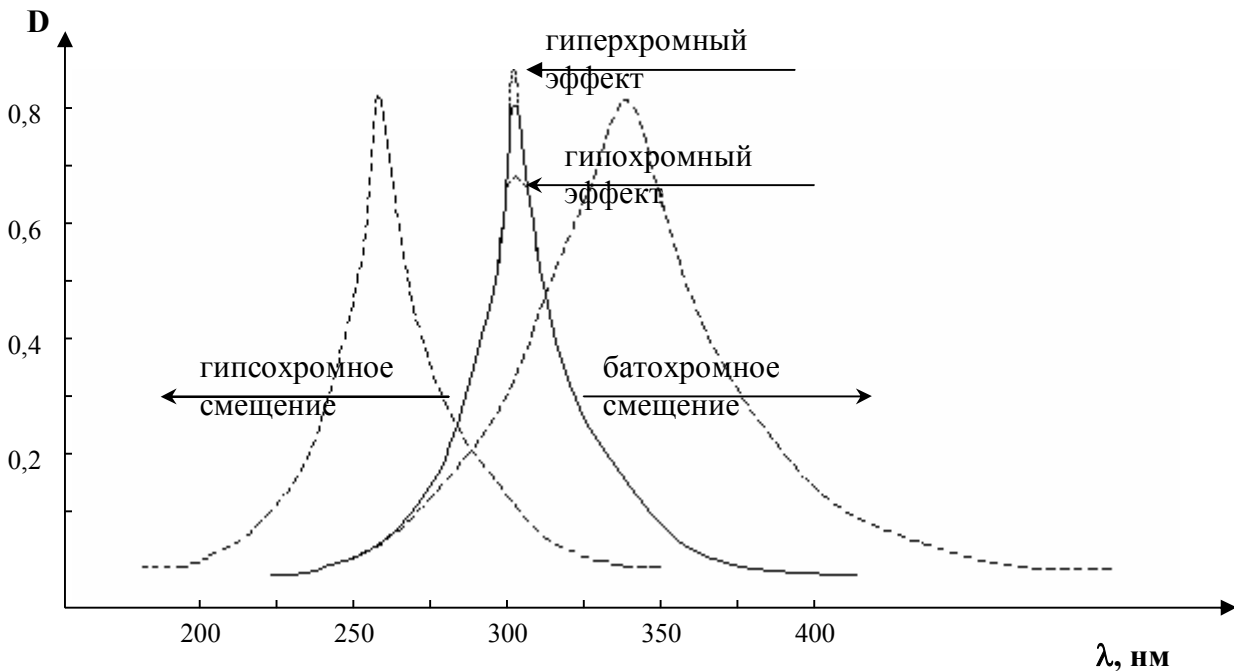


Рис. 4. Эффекты изменения интенсивности и смещения максимума поглощения

Помимо батохромного и гипсохромного сдвигов, влияние ауксохромных групп может проявляться в виде гиперхромного (увеличение интенсивности) и гипохромного (уменьшение интенсивности) эффектов.

Вид спектральной кривой зависит от ряда факторов:

- строения молекул вещества;
- растворителя;
- наличия в молекуле исследуемого вещества тех или иных заместителей;
- поведения вещества в растворе (способность образовывать внутри- и межмолекулярные водородные связи);
- наличия или отсутствия динамической изомерии и т.д.

Природа полос поглощения в УФ- (200-360 нм) и видимой (360-800 нм) областях спектра одинакова и связана главным образом с числом и расположением электронов в поглощающих молекулах и ионах. Вещества, поглощающие только в УФ-области, для человеческого глаза бесцветны.

Поглощение вещества при облучении его монохроматическим УФ-светом изображают графически – чаще в виде кривой зависимости оптической плотности (D) от длины волны падающего света (λ , нм), называемой УФ-спектром (см. рис. 2, приложение 1).

Образец анализируемого вещества при спектрофотометрических определениях обычно растворяют в соответствующем растворителе. Для этой цели пригодны многие растворители: вода, спирты, низшие углеводороды, хлороформ, разведенные растворы едкого натра, аммиака,

хлористоводородной или серной кислоты. Следует использовать растворители, не содержащие примесей, поглощающих в данной спектральной области.

Для получения УФ спектров, как правило, используют растворители, не обладающие собственным поглощением в записываемой области, т.е. получают спектры при длинах волн выше нижних пределов пропускания используемых растворителей (табл. 2)

Т а б л и ц а 2

Нижние пределы пропускания некоторых растворителей

Растворитель	Нижний предел пропускания, нм	Растворитель	Нижний предел пропускания, нм
Вода	200	Этилацетат	251
Метиловый спирт	210	Бензол	280
Этиловый спирт	210	Уксусная кислота	250
Изопропиловый спирт	210	Диметилформамид	270
Хлороформ	250	н-Гексан	210
Четыреххлористый углерод	260	Ацетон	326

ОСНОВНОЙ ЗАКОН СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ

При прохождении света через раствор изменение его интенсивности может быть вызвано светопоглощением определяемого вещества, растворителя, рассеянием, отражением и т.д. (рис. 5).

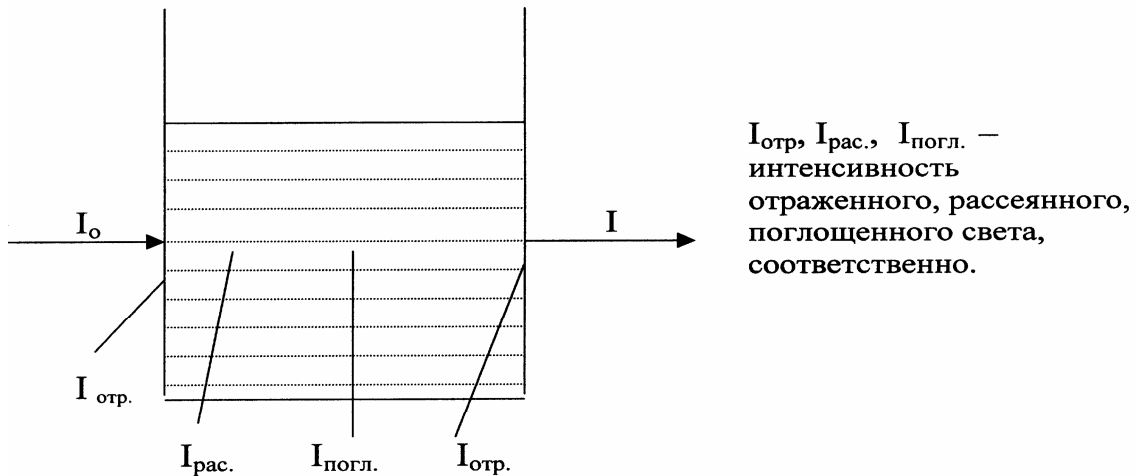


Рис. 5. Прохождение светового потока через раствор

Чтобы исключить влияние светорассеяния, анализируемый раствор должен быть прозрачным, то есть не должно быть взвешенных частиц. Прочие эффекты компенсируют, используя раствор сравнения и одинаковые кюветы.

Зависимость интенсивности монохроматического светового потока, прошедшего через анализируемый раствор, определяется объединенным законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-kCl}, \quad (1)$$

где I или I_0 — интенсивность прошедшего и падающего света соответственно;
 k — коэффициент светопоглощения, пропорциональности;
 C — концентрация растворенного вещества;
 l — толщина поглощающего слоя.

Зависимость поглощения света от толщины слоя анализируемого раствора была открыта в 1729 г. французским физиком-оптиком и мореходом Бугером, занимавшимся изучением поглощения света атмосферой и цветными стеклами. Спустя более 30 лет Ламберт придал ей современную математическую трактовку. Бер проверил справедливость этого закона для растворов различных концентраций веществ.

Объединенный закон светопоглощения справедлив не только для спектрофотометрии, но и для других абсорбционных спектроскопических методов (атомно-абсорбционных, инфракрасных, рентгеновских).

Величина k является специфической физической константой для каждого вещества; она зависит от природы растворенного вещества, растворителя, температуры, длины волны света и не зависит от концентрации

растворенного вещества, толщины поглощающего слоя. В зависимости от способа выражения концентрации вещества коэффициент поглощения в формуле (1) может иметь два значения: **молярного показателя поглощения** (ε) и **удельного показателя поглощения** ($E_{1\text{см}}^{1\%}$).

Молярный показатель поглощения представляет собой оптическую плотность $\left(\varepsilon = \frac{D}{C \cdot l} \right)$ раствора с концентрацией вещества 1 моль/л и толщиной поглощающего слоя 1 см.

Удельный показатель поглощения – оптическая плотность $\left(E_{\text{см}}^{\%} = \frac{D}{C \cdot l} \right)$ 1 % раствора при толщине поглощающего слоя 1 см.

Принято называть их единым термином – коэффициенты экстинкции ε и $E_{\text{см}}^{\%}$.

Связь между величинами молярного и удельного показателей поглощения определяется соотношениями: $E_{\text{см}}^{\%} = \frac{10}{M.м.} \cdot \varepsilon$ или

$$\varepsilon = E_{\text{см}}^{\%} \cdot \frac{M.м.}{10} \quad (2), \text{ где } M.м. - \text{молекулярная масса.}$$

В практике фармацевтического анализа наибольшее применение находит удельный показатель поглощения.

Чувствительность метода для конкретного вещества определяется величиной $E_{\text{см}}^{\%}$: чем больше числовое значение $E_{\text{см}}^{\%}$, тем выше чувствительность.

Величины удельных показателей поглощения вычисляют по опытным данным серии растворов различных концентраций (в %)

конкретного вещества $\left(E_{\text{см}}^{\%} = \frac{D}{C \cdot l} \right)$.

Значения удельных показателей поглощения для некоторых лекарственных веществ представлены в табл. 3; они обычно приводятся в справочных руководствах по спектроскопии, указываются при характеристике спектров, в фармакопеях и в фармакопейных статьях, периодической литературе.

Интенсивность прошедшего потока излучения (уравнение 1) в логарифмической форме имеет вид: $\lg \frac{I_o}{I} = E_{\text{см}}^{\%} C \cdot l$ (3).

Величину $\lg \frac{I_o}{I}$ называют **оптической плотностью** и обозначают буквой **D**.

$$D = E_{\text{см}}^{\%} C \cdot l \quad (4)$$

Отношение интенсивности монохроматического потока излучения, прошедшего через исследуемый объект, к интенсивности падающего потока называется **прозрачностью** или **пропусканием** и обозначается буквой **T**:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

Оптическая плотность **D** и пропускание (прозрачность) **T** связаны уравнением:

$$D = -\lg T \quad (6).$$

Т а б л и ц а 3

Максимумы поглощения и величины удельных коэффициентов в УФ-спектрах некоторых лекарственных веществ

Вещество	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$E_{\text{см}}^{\%}$	Растворитель	Вещество	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$E_{\text{см}}^{\%}$	Растворитель
1	2	3	4	5	6	7	8
Адреналин	280	150	0,01 моль/л HCl	Метилсалицилат	238	570	Этиловый спирт
Аминазин	254 305	880 110	0,1 моль/л H ₂ SO ₄	Никотинамид	262	238	Этиловый спирт
п-Амино-бензойная кислота	228 289	340 1256	Этиловый спирт	Парацетамол	256,5	770	0,1 моль/л NaOH 0,1 моль/л H ₂ SO ₄ Метиловый спирт
					242	700	
					249	900	
Анаприлин	217 293	1350 220	0,1 моль/л H ₂ SO ₄	Новокаин	290	680	Вода
Анестезин	221	553	Этиловый спирт	Рибофлавин	222	942	Вода
	294	1349					
	227	788	267		873		
	272	101	0,1 моль/л HCl		371,5	277	
	278	99	445		324		

1	2	3	4	5	6	7	8
Бутадион	240	534	Этиловый	Сульфадимидин	269	840	0,001 моль/л

	264	660	спирт 0,1 моль/л NaOH	метоксин			NaOH
Викасол	298	133	Вода	Теофиллин	270	530	0,1 моль/л HCl
Гидро- кортизон	240	420– 450	Абсолют- ный этиловый спирт	Фолиевая кислота	256 283 365	545– 565 530– 545 190– 200	0,1 моль/л NaOH
Диазепам	241 284 359	1402 700 170	0,1 моль/л H ₂ SO ₄	Фурацилин	365	850– 875	Этиловый спирт
Кодеина фосфат	284	52,3	Вода	Эргокальци- ферол	265	460– 504	Абсолют- ный этиловый спирт
Кордиамин	255 260 263,5	840 860 273	0,1 моль/л NaOH 0,1 моль/л H ₂ SO ₄	Этакридин	269,5	1874	0,1 моль/л H ₂ SO ₄
				Эуфиллин	274 270	570 485	0,1 моль/л NaOH 0,1 моль/л H ₂ SO ₄

Обычно T выражают в процентах, тогда $D = 2 - \lg T$.

Величины оптической плотности и пропускания зависят от длины волны и концентрации вещества в растворе.

ЗАКОН АДДИТИВНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ ПЛОТНОСТЕЙ

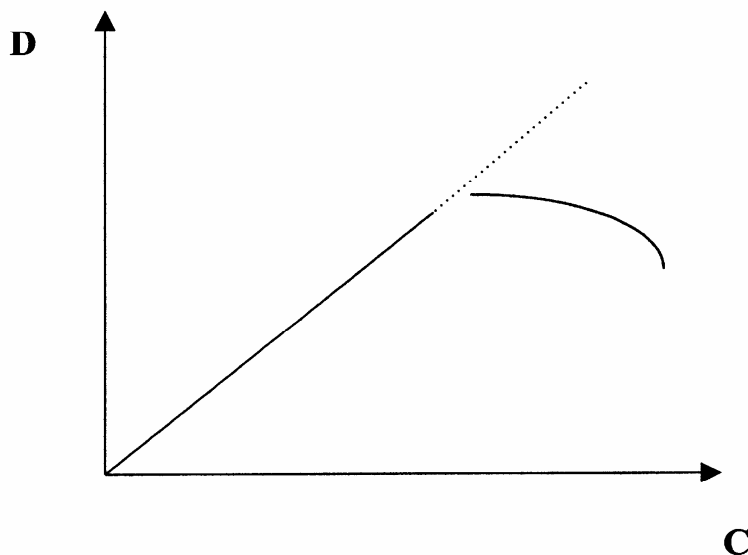
Если в растворе присутствует несколько поглощающих веществ, то оптическая плотность раствора равна сумме вкладов каждого из компонентов:

$$D = \varepsilon_1 C_1 l_1 + \varepsilon_2 C_2 l_2 + \dots \quad (7)$$

Согласно уравнению (4), при подчинении растворов закону светопоглощения наблюдается прямолинейная зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе при постоянном значении толщины поглощающего слоя.

ПРИЧИНЫ ОТКЛОНЕНИЙ ОТ ЗАКОНА ПОГЛОЩЕНИЯ

На практике могут наблюдаться отклонения от линейного характера, особенно в области высоких концентраций или значений оптических плотностей, обусловленные несколькими причинами: немонахроматичностью источника света (наличием постороннего излучения), химическими процессами (диссоциация, ассоциация, комплексообразование).



1. Немонахроматичность источника

При выводе основного закона светопоглощения сделано предположение о строгой монахроматичности источника света. В действительности, в спектре испускания любого источника всегда присутствуют фотоны различных длин волн. Для различных приборов спектральная ширина полосы пропускания может быть различной. Поэтому в спектрофотометрии построение градуировочного графика и измерение оптической плотности анализируемого образца выполняют на одном и том же приборе.

2. Посторонние излучения

Такие же отклонения от основного закона светопоглощения вызывает и влияние рассеянного света.

Рассеянный свет – это постороннее излучение, которое возникает в оптической системе прибора вследствие отражения и рассеяния света от поверхностей линз, зеркал и других оптических деталей. Рассеянное излучение включает все длины волн источника излучения и накладывается на излучение из монохроматора.

Следовательно, на раствор попадает излучение, выходящее из монохроматора, равное:

$$I_0 + I_{\text{рас.}}$$

где I_0 – излучение, вышедшее из монохроматора;
 $I_{\text{рас.}}$ – рассеянное излучение.

На раствор попадает тем больше рассеянного света, чем шире щель монохроматора. Раскрывать щель монохроматора приходится, если I_0 мало или оптическая плотность раствора сравнения велика. Щель увеличивают так же при уменьшении чувствительности детектора. Особенно сильно рассеянное излучение сказывается в УФ-области, где чувствительность детектора в несколько раз меньше, чем в длинноволновой. Рассеянный свет может вызвать смещение максимума поглощения или даже появления ложных максимумов.

Для уменьшения рассеянного излучения в монохроматорах перед попаданием излучения на кювету в областях, где влияние его особенно велико, на пути светового потока ставят специальные светофильтры.

3. Химические процессы

При разбавлении растворов электролитов изменяется степень диссоциации их на ионы, что вызывает отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера. На светопоглощение также оказывают влияние явления гидролиза, комплексообразования, таутомерные превращения, сольватация и т.д.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ В УФ- И В ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

1. Испытание на подлинность лекарственных веществ

1.1. Для идентификации неизвестного вещества спектр исследуемого вещества обычно сравнивается с полученным при тех же условиях спектром стандартного вещества (ГСО или РСО) (рис. 6).

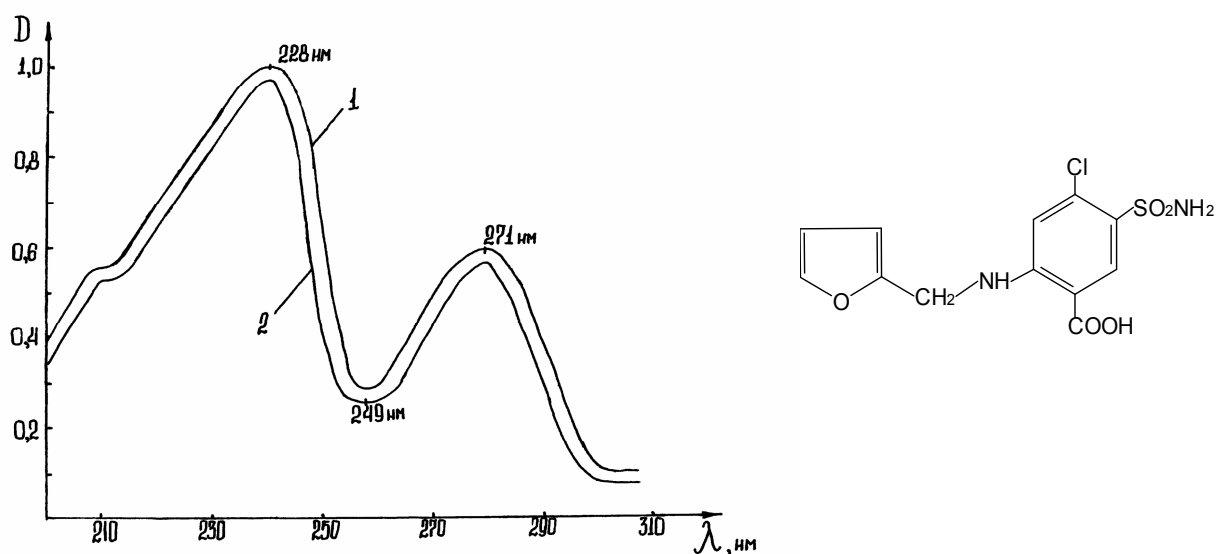


Рис. 6. УФ-спектр фуросемида:

- 1 – РСО, с $0,9 \cdot 10^{-4} \%$ (0,01 моль/л NaOH)
 2 – таблетки фуросемида 0,04 г, с $0,8 \cdot 10^{-4} \%$
 (0,01 моль/л NaOH)

1.2. При отсутствии стандартных образцов можно пользоваться описанием их спектров, предложенным в соответствующем НД (нормативном документе).

Например, подлинность нитроксолина, согласно ФС 42-1854-94, определяется следующим образом: «Ультрафиолетовый спектр 0,0005 % раствора препарата в смеси спирт 95% – буферный раствор с pH 9,18 (98 : 2) в области от 220 до 550 нм имеет максимумы поглощения при 249 ± 2 нм; 341 ± 3 нм и два плеча от 228 до 238 нм и от 258 до 268 нм». В таком случае проверяют идентичность параметров полученного спектра поглощения анализируемого вещества описанному в НД (длины волн максимального и минимального поглощения, плеча, неидентифицированного плеча).

В обоих случаях необходимо строго соблюдать условия, приведенные в НД: растворитель, концентрация растворенного вещества, размер кюветы, интервал длин волн.

1.3. Определяют отношение оптических плотностей при различных длинах волн.

Это уменьшает влияние переменных характеристик прибора на испытание и исключает необходимость использования стандартных образцов (табл. 4).

Например, при определении подлинности инозина по НД 42-8962-98 измеряют оптическую плотность его $0,6 \cdot 10^{-3}$ % раствора в фосфатном буфере при 250, 260, 280 и 290 нм. Должны быть следующие значения

отношений: $\frac{D_{250}}{D_{260}} = 1,63 \div 1,83$; $\frac{D_{280}}{D_{260}} = 0,18 \div 0,30$; $\frac{D_{290}}{D_{260}}$ – не более 0,06.

1.4. Рассчитывают $E_{см}^{%}$ или оптическую плотность при λ_{max} (табл. 4).

Например, при идентификации парацетамола (НД 42-4590-95, Китай) удельный показатель поглощения при 240 нм (максимум) должен быть около 880 (растворитель – 0,1 моль/л кислота хлористоводородная).

2. Испытание на чистоту

При наличии примесей могут изменяться максимумы поглощения, их интенсивность, появляться дополнительные максимумы.

2.1. С целью обнаружения примесей используют те же характеристики, что и при испытаниях на подлинность, т.е. величины отношений оптических плотностей при различных максимумах и значение удельных показателей поглощения (табл. 3, 4).

2.2. При хранении некоторые препараты могут частично окисляться с появлением окраски, интенсивность которой контролируется величиной оптической плотности приготовленного раствора при определенной длине волны. Например, при определении цветности 16 % водного раствора метамизола (анальгина) измеряют его оптическую плотность при 400 нм, которая не должна быть более 0,10 (НД 42-4593-95, Китай). При определении цветности 10 % водного раствора ампициллина натриевой соли измеряют его оптическую плотность при длине волны 430 ± 1 нм; она не должна превышать 0,15 (ФС 42-3535-98).

Т а б л и ц а 4

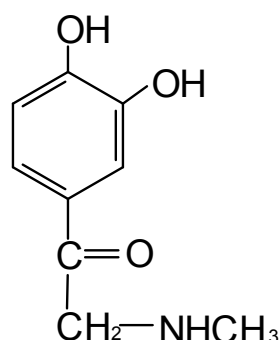
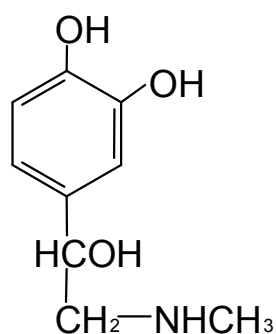
Характеристики УФ-спектров, используемые при идентификации некоторых лекарственных веществ в фармакопейном анализе

Лекарственное вещество	Концентрация и растворитель	Показатель, используемый для идентификации
------------------------	-----------------------------	--

Адреналин	0,005 % в 0,01 моль/л HCl	λ_{\max} 278 нм; $E_{cm}^{\%}$ 78-82
Левомецетин	0,002 % в H ₂ O	λ_{\max} 278 нм; $E_{cm}^{\%}$ 290-305
Токоферол	0,01% в абсолютном спирте	λ_{\max} 285 нм; $E_{cm}^{\%}$ 42-47
Тетрациклин	0,001 % в 0,2 моль/л NaOH	λ_{\max} 380 нм; D 290-305
Феноксиметил-пенициллин	0,02% в 0,4 % растворе NaHCO ₃	$\frac{D_{268}}{D_{274}} = 1,21 - 1,24$
Натрия пара-аминосалицилат	0,001 % водный раствор	$\frac{D_{265}}{D_{299}} = 1,50 - 1,56$
Цианокобаламин	0,002% водный раствор	λ_{\max} 278, 361 и 548 нм $\frac{D_{361}}{D_{278}} = 1,70 - 1,88$ $\frac{D_{361}}{D_{548}} = 3,0 - 3,4$
Прогестерон	0,001 % в 95 % спирте	λ_{\max} 241 нм; $E_{cm}^{\%}$ 518-545
Рибоксин-стандарт	0,001 % водный раствор	λ_{\max} 241 нм; $E_{cm}^{\%}$ 445-465

2.3. Специфические примеси, присутствующие в лекарственных веществах, как правило, имеют близкое химическое строение с исследуемым веществом, однако поглощают УФ-свет при разных длинах волн.

Например, λ_{\max} растворов адреналина (I) находится при 278 нм, а его специфическая токсичная примесь – адреналон (II) имеет максимум поглощения при длине волны 310 нм.



λ_{\max} 278 нм λ_{\max} 310 нм

I II

Согласно ФС, оптическая плотность 0,05 % раствора адреналина при 310 нм не должна превышать 0,1 (т.е. в адреналине допускается незначительное строго нормируемое содержание адреналона).

3. Определение количественного содержания лекарственных веществ

При количественном определении в УФ-области спектра точную массу или объем анализируемого образца (субстанция, таблетки, инъекционные растворы и т.д.) растворяют в подходящем растворителе, при необходимости готовят соответствующее разведение и измеряют оптическую плотность приготовленного раствора при длине волны, указанной в НД, на приборе спектрофотометре. Концентрацию (или массовую долю в процентах) анализируемого вещества определяют одним из нижеприведенных способов.

3.1. По градуировочному графику

Готовят серию растворов (5-10) стандартного образца (ГСО или РСО) исследуемого вещества с постепенно возрастающей концентрацией. Измеряют оптическую плотность каждого из приготовленных растворов при λ_{\max} и строят график зависимости $D = f(C)$ (рис. 7).

Затем измеряют оптическую плотность исследуемого раствора – D_x и графически определяют искомую концентрацию – C_x .

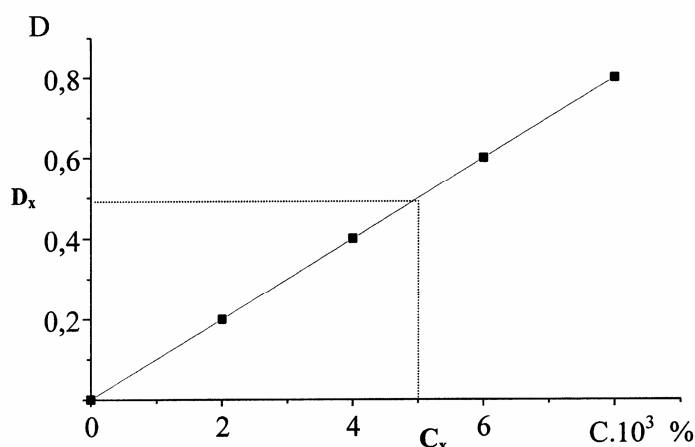


Рис. 7. Градуировочный график

Учитывая, что величина оптической плотности меняется в зависимости от используемой аппаратуры, калибровочный график строят для каждого конкретного прибора, на котором работает аналитик, и его периодически следует проверять. Содержание лекарственного вещества в процентах (X) определяют по формуле:

$$X = \frac{C_x \cdot P(V) \cdot 100}{m} \quad (8),$$

где m – масса (объем) лекарственного вещества или лекарственной формы, взятых для анализа, г (мл);

C_x – количество вещества, найденное по калибровочному графику, г/мл или %;

P – масса лекарственной формы, г; или V – объем лекарственной формы, мл.

Данный способ используется редко для определения содержания лекарственных веществ. Однако калибровочный график позволяет определить диапазон концентраций анализируемого вещества, при котором соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации (подчинение основному закону светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера) и является необходимым при разработке методик определения количественного содержания лекарственных веществ. Данные калибровочных графиков также используются для определения значений удельных показателей поглощения анализируемых веществ.

При этом для каждой концентрации рассчитывают значение $E_{cm}^{\%}$, пользуясь формулой

$$E_{cm}^{\%} = \frac{D}{C \cdot l},$$

и на основании полученных данных определяется среднее значение удельного показателя поглощения по формуле:

$$\bar{E}_{1cm}^{1\%} = \frac{\sum_{i=1}^n E_i}{n}$$

где n – число фотометрируемых растворов.

3.2. Сравнение поглощения раствора испытуемого вещества с поглощением стандартного раствора

Готовят раствор стандартного образца анализируемого вещества с концентрацией, близкой к концентрации анализируемого вещества. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера для одного и того же вещества отношения оптических плотностей к соответствующей концентрации равны между собой.

$$\frac{D_x}{D_{СТ}} = \frac{C_x}{C_{СТ}}, \text{ отсюда } C_x = \frac{C_{СТ} \cdot D_x}{D_{СТ}}$$

Указанный способ часто используется в практике фармацевтического анализа.

Основным ограничением его является наличие стандартного образца.

Стандартные образцы – это дополнительно очищенные вещества, которые используются как эталонные при проведении анализа физическими, физико-химическими и биологическими методами. Стандартные образцы подразделяются на государственные стандартные образцы (ГСО), рабочие стандартные образцы (РСО) и стандартные образцы веществ-свидетелей (СОВС). ГСО выпускаются в соответствии со специальными требованиями. На них, как и на лекарственные вещества, имеются отдельные фармакопейные статьи. При расчете количественного содержания стандартный образец принимают за 100 %.

В качестве РСО используют образцы серийных лекарственных веществ, соответствующих требованиям фармакопейных статей на эти вещества.

Стандартные образцы веществ-свидетелей используют для определения примесей или компонентного состава лекарственных средств. В качестве СОВС могут быть использованы ГСО, РСО, а также вещества, специально изготовленные и аттестованные в порядке, предусмотренном частной фармакопейной статьей. Расчет количественного содержания индивидуального вещества в процентах (X) в субстанциях проводят по формуле:

$$X = \frac{D \cdot C \cdot 100 \cdot 100}{D_{ГСО} \cdot a \cdot 5} \cdot 100\%, \quad (9)$$

где D и $D_{ГСО}$ – оптическая плотность растворов исследуемого и государственного стандартного образца соответственно;

C – концентрация раствора стандартного образца, г/мл;

a – точная масса лекарственного вещества, г;

5, 100, 100 – разведения, согласно НД, мл.

Более практичен вариант записи формулы (9), где указан способ приготовления раствора стандартного образца:

$$X = \frac{D \cdot v \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10}{D_{ГСО} \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100} \cdot 100\% = \frac{D \cdot v \cdot 2}{D_{ГСО} \cdot a} \cdot 100\% , (10)$$

где 5, 10, 100, 100, 100, 100 – разведения, согласно НД, мл;
 v – точная масса ГСО, г.

При анализе лекарственных форм формула (10) принимает следующий вид:

а) в таблетках, драже, суппозиториях

$$X(\%) = \frac{D \cdot v \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10 \cdot M}{D_{PCO} \cdot a_1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{D \cdot v \cdot 2 \cdot M}{D_{PCO} \cdot a_1} , (11)$$

где D_{PCO} – оптическая плотность раствора рабочего стандартного образца;

a_1 – точная масса лекарственной формы, г.

б) в жидких лекарственных формах

$$X(\%) = \frac{D \cdot v \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10 \cdot V}{D_{ГСО} \cdot V_1 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100} , (12)$$

где V_1 – объем анализируемого раствора, взятый для анализа, мл;

V – объем лекарственной формы по прописи, мл;

2, 10, 100, 100, 100, 100 – разведения, согласно НД, мл.

Предлагаемый способ реализуется лишь при наличии ГСО или РСО.

В противном случае определение проводят по п. 3.3.

3.3. Определение концентрации по величинам удельного или молярного коэффициентов поглощения

Расчет концентрации лекарственных веществ в субстанциях, твердых и жидких лекарственных формах проводят по формулам, аналогичным (10), (11), (12).

При этом в них $\frac{D_{PCO(ГСО)}}{C_{PCO(ГСО)}} = \frac{D_{PCO(ГСО)} \cdot 100 \cdot 100}{v \cdot 10}$ заменены на величины

$E_{см}^{\%}$ или ϵ . При количественном анализе, как правило, используется величина

$E_{см}^{\%}$.

В субстанциях

$$X\% = \frac{D \cdot 100 \cdot 100}{E_{CM}^{\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 100} \cdot 100\% , (13)$$

где 100 (в знаменателе) – пересчет концентрации растворов (г/мл в %).

В таблетках, суппозиториях, драже

$$X_G = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot M}{E_{CM}^{\%} \cdot a_1 \cdot 5 \cdot 100} (14)$$

В жидких лекарственных формах

$$X_G = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{E_{CM}^{\%} \cdot V_1 \cdot 2 \cdot 100} (15)$$

В фармацевтическом анализе достаточно часто используют значение удельного показателя поглощения определяемого вещества, например, при количественном анализе субстанций рутина, рибофлавина, феноксиметилпенициллина, троксевазина, настойки пустырника, ингаляционного аэрозоля «Астмопент» и др.

3.4. Определение количества действующего вещества, перешедшее в раствор через время, указанное в НД при растворении таблеток (тест «Растворение»)

См. Приложение 2 (таблетки анаприлина 0,01 г и 0,04 г, ФС 42-1549-98).

3.5. При испытаниях на однородность дозирования определяют содержание действующего вещества в каждой отдельной дозе см. Приложение 2 (таблетки анаприлина 0,01 г и 0,04 г, ФС 42-1549-98).

В соответствии с современными требованиями для таблеток, стерильных сухих лекарственных средств для инъекций и лекарственных веществ в капсулах с содержанием вещества 0,05 г и менее обязательным является испытание на однородность дозирования. Для такой оценки требуется применение высокочувствительного метода. Одним из таких методов является УФ–спектрофотометрия.

При количественном определении целесообразно использовать такие полосы поглощения, которые отвечают следующим условиям:

- **данная полоса поглощения должна быть по возможности свободна от наложения полос других компонентов анализируемой системы;**
- **выбранная полоса должна обладать достаточно высоким показателем поглощения для индивидуального соединения.**

При анализе используют максимум, реже – минимум полосы поглощения. Не следует производить измерения на участках крутого спада или подъема кривой.

АНАЛИЗ ДВУХ- И МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Спектрофотометрический метод широко применяется в анализе многокомпонентных систем, так как в ряде случаев позволяет провести количественное определение компонентов без их предварительного разделения.

Здесь возможно несколько вариантов без предварительного разделения компонентов в зависимости от характера светопоглощения каждого их них.

1. Анализ соединений с неперекрывающимися полосами поглощения, когда одно вещество имеет максимум светопоглощения, а другое не поглощает УФ-свет в данной области.

Например анализ лекарственной формы, состоящей из дибазола и папаверина гидрохлорида, в которой качественное определение второго компонента может быть определено по собственному поглощению в длинноволновой области при длине волны 324 нм.

Это наиболее оптимальный вариант, позволяющий без разделения определить концентрацию обоих компонентов, содержащихся в лекарственной форме. В этом случае каждый из компонентов анализируют в соответствующем максимуме светопоглощения.

2. Анализ лекарственной смеси, каждый из двух компонентов которой имеет свой максимум светопоглощения, в которой второй компонент оптически прозрачен. Такие смеси анализируют методом изолированной абсорбции. Лекарственное вещество, в максимуме светопоглощения которого другой компонент не поглощает, определяют в однокомпонентной лекарственной форме.

3. Анализ соединений с частично перекрывающимися полосами поглощения.

Расчёт содержания второго компонента (X_2), в максимуме светопоглощения которого поглощает также первое вещество, проводят по формуле:

$$X_2 = \frac{\left[\left(D_2 - \frac{D_1 \cdot E_3}{D_1} \right) \cdot W \cdot b \right]}{E_2 \cdot a \cdot 100},$$

- где D_1 – оптическая плотность раствора в максимуме поглощения первого компонента;
- D_2 – оптическая плотность раствора в максимуме поглощения второго компонента (сумма светопоглощений растворов обоих компонентов);
- E_1 и E_2 – удельный показатель поглощения первого и соответственно второго компонента в их максимумах поглощения;
- E_3 – удельный показатель поглощения первого компонента в максимуме поглощения второго компонента;
- a – навеска (или объём) лекарственной формы, взятой для анализа, г (мл);
- b – общая масса (или объём) прописанной лекарственной формы, г (мл);
- W – разведение.

4. Анализ соединений с полным наложением полос поглощения.

Это наиболее сложный вариант анализа, разрешаемый расчётным методом Фирордта с использованием числа длин волн, превышающего число компонентов. Метод приемлем, если при двух длинах волн наблюдается значительное различие в интенсивности поглощения обоих компонентов при каждой выбранной для анализа длине волны. Затем для определения каждого компонента устанавливают оптическую плотность анализируемого раствора смеси при обеих длинах волн. Точность определения зависит от того, насколько велико различие между светопоглощением компонентов смеси: она будет наибольшей, когда одна длина волны является максимумом для второго компонента, а при второй длине волны наблюдается обратное явление.

При выполнении анализа методом Фирордта концентрацию (C_1 и C_2) в двухкомпонентной смеси рассчитывают по формуле:

$$C_1 = \alpha_1 D_1 - \beta_1 D_2; C_2 = \alpha_2 D_2 - \beta_2 D_1.$$

Предварительно вычисляют значения коэффициентов $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$:

$$\alpha_1 = \frac{E''_2}{\begin{pmatrix} E'_1 \cdot E''_2 - E'_2 \cdot E''_1 \end{pmatrix}}; \beta_1 = \frac{E''_2}{\begin{pmatrix} E'_1 \cdot E''_2 - E'_2 \cdot E''_1 \end{pmatrix}};$$

$$\alpha_2 = \frac{E'_1}{\begin{pmatrix} E'_1 \cdot E''_2 - E'_2 \cdot E''_1 \end{pmatrix}}; \beta_2 = \frac{E'_1}{\begin{pmatrix} E'_1 \cdot E''_2 - E'_2 \cdot E''_1 \end{pmatrix}},$$

где E'_1 , E'_2 – удельные показатели поглощения первого и второго компонентов при длине волны λ_1 ;

E''_1 , E''_2 – удельный показатель поглощения первого и второго компонентов при λ_2 ;

D_1 и D_2 – оптические плотности смесей при длинах волн λ_1 и λ_2 соответственно.

На основе использования метода Фирордта разработаны способы анализа многих лекарственных форм, например, содержащих кислоты салициловую и бензойную, резорцин и новокаин, смесь папаверина с анестезином и новокаином, смеси сульфаниламидов и др.

Недостаток метода Фирордта заключается в том, что при анализе трёх- и более компонентных систем даже небольшие ошибки в измерениях $E_{см}^{\%}$ и D приводят к значительному снижению точности анализа.

ОСОБЕННОСТИ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

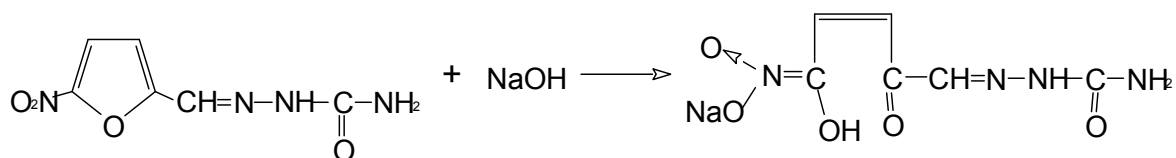
В видимой области спектра электромагнитное излучение (360-780 нм) обычно поглощают окрашенные вещества: либо за счёт собственной окраски (например, рибофлавин), либо за счёт окрашенных продуктов реакции определяемых веществ с реагентами (функциональный анализ). Основная сложность при реализации методики заключается в том, что многие реакции протекают достаточно медленно (при комнатной температуре иногда часами). Увеличение температуры приводит не только к ускорению основной реакции, но и побочных. Состав продуктов порой до конца неизвестен.

Требования к реакциям, применяемым в фотометрии

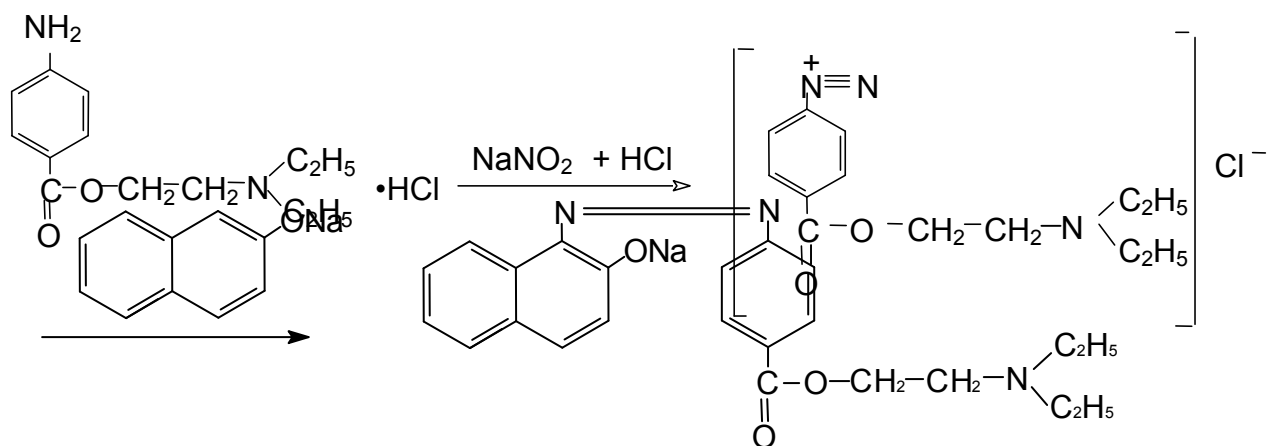
1. Полученное окрашенное соединение должно быть устойчивым и иметь постоянный состав.
2. Реакция должна протекать быстро.
3. Реакция должна быть стехиометрической.
4. Реакция должна быть избирательной и чувствительной.
5. Используемые реагенты должны быть доступны, экологически безвредны и рентабельны.
6. Продукт реакции должен иметь возможно большую величину удельного коэффициента поглощения ($E_{cm}^{\%}$).

Для получения окрашенных соединений используют ряд реакций.

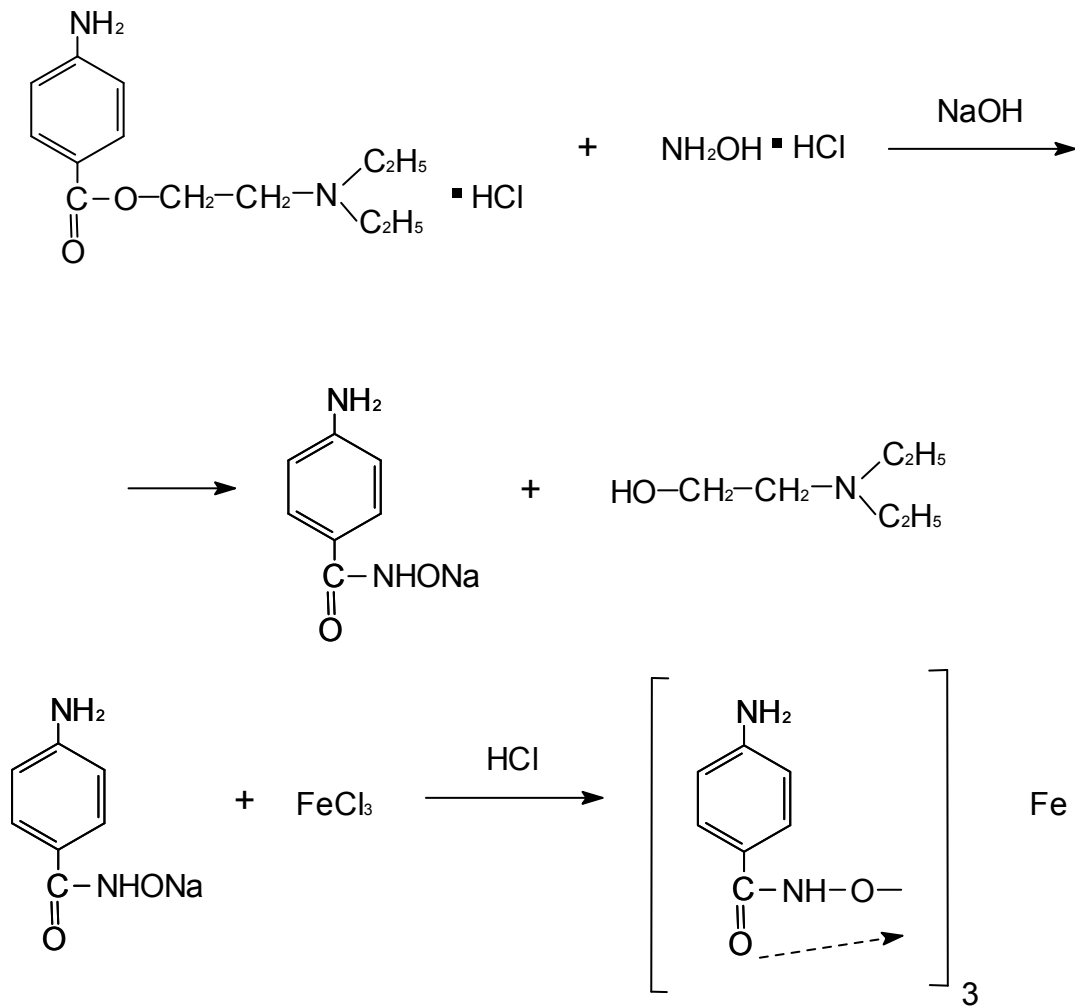
- 1) Получение АЦИ-солей с натрия гидроксидом на препараты, содержащие нитрогруппу (фурацилин, фуразолидон, левомецетин, нитроксолин и др.):



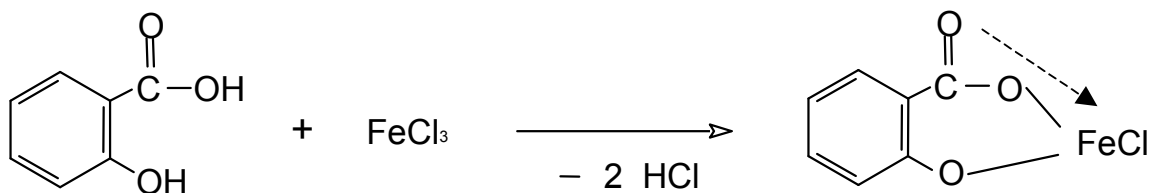
- 2) Диазотирование с последующим азосочетанием на лекарственные вещества, содержащие первичную ароматическую аминогруппу (анестезин, новокаин, сульфаниламиды и др.):



- 3) Получение гидроксаматов меди и железа для препаратов, содержащих сложноэфирную (новокаин), лактонную (пилокарпин), лактамную (бензилпенициллина калиевая и натриевая соли) группы:



- 4) Комплексообразование с железа (III) хлоридом, железомонийными квасцами (кислота салициловая):



Если полученное окрашенное соединение не растворимо в воде, его извлекают органическим растворителем, не смешивающимся с водой (хлороформ, бензол и др.), и определяют оптическую плотность окрашенной

жидкости при определённой длине волны (метод экстракционной спектрофотометрии).

ЭТАПЫ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК АНАЛИЗА

1. Приготовление раствора анализируемого препарата.

С этой целью в случае отсутствия государственных стандартных образцов (ГСО) берут препараты, соответствующие требованиям ГФ, ФС, т.е. РСО. Для измерения готовят растворы с концентрациями в пределах 10^{-2} - 10^{-3} % методом последовательного разведения. Полученные растворы должны быть прозрачными.

2. Установление зависимости оптической плотности растворов от длины волны (получение электронного спектра).

Электронные спектры необходимы для целей идентификации, испытания на чистоту (по величине отношений оптических плотностей при различных максимумах поглощения и по положению максимумов полос поглощения на оси длин волн) и количественного определения.

3. Определение области концентраций веществ, в которой наблюдается подчинение основному закону светопоглощения (Бугера-Ламберта-Бера) – составление калибровочного графика.

Данный метод можно использовать для области концентраций растворов, где имеет место линейная зависимость.

В случае исследования окрашенных растворов в видимой области спектра важным моментом является время, в течение которого для одной и той же концентрации сохраняется постоянное значение оптической плотности, поэтому в методике его необходимо указать (когда, после проведения цветной реакции, раствор фотометрируют).

Оптимальными значениями оптических плотностей является диапазон 0,3-0,7, в пределах которого имеют место минимальные отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера. Указанными величинами оптической плотности следует руководствоваться при количественных определениях.

Калибровочный график можно использовать также для определения удельного показателя поглощения и установления неизвестной концентрации вещества.

4. Определение неизвестной концентрации вещества следующими методами:

а) по градуировочному графику,

б) по формуле (используя значение $E_{см}^{\%}$),

в) путём сравнения со стандартным раствором.

При разработке методики фотоэлектроколориметрического определения веществ вместо снятия электронного спектра подбирают подходящий светофильтр (учитывают окраску раствора и значения оптических плотностей при различных светофильтрах).

Спектрофотометрический и фотоэлектроколориметрический методы возможно применять для анализа субстанций препаратов только при наличии Государственных стандартных образцов (ГСО). Анализ лекарственных форм можно проводить, используя в качестве стандартных образцов вещества, соответствующие требованиям ГФ, ФС (РСО).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ФОТОМЕТРИЯ

При определении поглощения интенсивно окрашенных растворов с пропусканием $< 10\%$ ($D > 1,0$), соответствующих высокому содержанию определяемого вещества в растворе, погрешность определения концентрации будет недопустимо велика. Её можно уменьшить, используя метод дифференциальной фотометрии. В отличие от обычной фотометрии, поглощение исследуемого и стандартного растворов измеряют относительно раствора сравнения, содержащего точно известное количество определяемого вещества, переведённого в аналитическую форму. При этом концентрация поглощающего вещества в растворе сравнения близка к его концентрации в фотометрируемом растворе.

В дифференциальной фотометрии используют различные приёмы работы, чаще всего метод «определения больших концентраций». В этом методе оптический нуль фотометрического прибора по шкале поглощений ($D = 0$; $T = 100\%$) устанавливают по раствору сравнения, содержащему аналитическую форму определяемого вещества. Обычно таким раствором сравнения является один из растворов стандартного ряда. Тогда, выполняя измерение светопоглощения фотометрируемого раствора относительно этого стандартного раствора, может быть достигнуто расширение фотометрической шкалы и, следовательно, уменьшение погрешности измерения пропускания или поглощения.

Так как соотношение поглощений растворов сравнения и фотометрируемого в дифференциальной фотометрии может быть и больше, и меньше единицы, при работе удобно использовать метод двусторонней дифференциальной фотометрии: если $D > D_{ср}$, используют прямой порядок измерения, если $D < D_{ср}$ – обратный порядок измерения, то есть суммируют поглощение раствора сравнения относительно фотометрируемого и поглощение записывают со знаком минус. При этом градуировочный график

не проходит через начало координат, но пересекает ось концентраций в точке, соответствующей концентрации определяемого вещества в растворе сравнения. Результат определения может быть найден также и по формуле: $C_x = DF + C_0$.

Аналитический фактор F рассчитывают по формуле:

$$F = \frac{C_{i+1} - C_i}{D_{i+1} - D_i}$$

где D_{i+1} , D_i – поглощение каких-либо двух стандартных растворов с концентрациями определяемого вещества C_{i+1} , C_i .

ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

Фотометрическое титрование основано на регистрации изменения поглощения (или пропускания) анализируемого раствора по мере прибавления титранта. По результатам этих измерений в координатах $D = f(V_B)$, где V_B – объём добавленного титранта, строят кривую титрования и по излому на ней или по скачку находят конечную точку титрования (рис. 8).

Зная расход титранта, соответствующий этому моменту, находят содержание определяемого вещества в титруемом растворе по обычным формулам титриметрического анализа. Реакции, используемые в титриметрии, должны быть стехиометричными, быстрыми, иметь достаточно большую константу равновесия и удобный способ индикации конечной точки. Преимуществом метода является возможность использования реакций, не заканчивающихся в точке эквивалентности (рис. 8, кривые 2, 4).

В фотометрическом титровании могут быть использованы все химические реакции, применяемые в титриметрии – кислотно-основное взаимодействие, реакции окисления-восстановления, осаждения, комплексообразования.

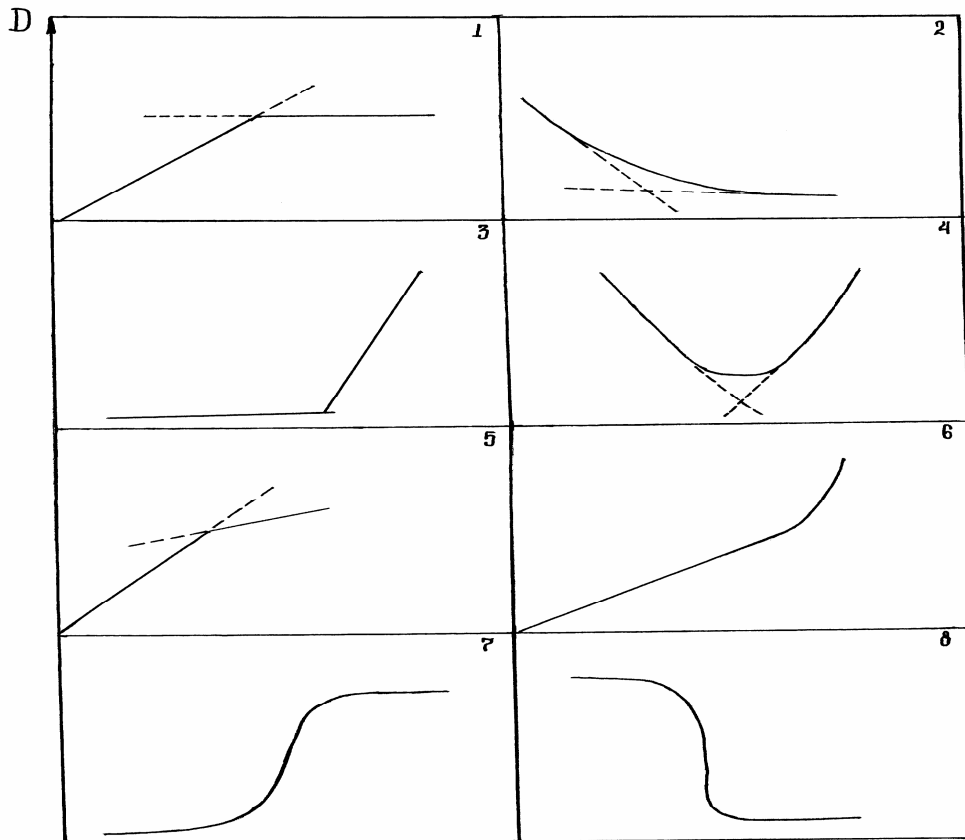


Рис. 8. Типы кривых фотометрического титрования

ПРЕИМУЩЕСТВА ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

1. Достаточно высокая чувствительность.
2. Хорошая воспроизводимость.
3. Возможность анализа смеси веществ.
4. Возможность автоматической регистрации конца титрования.
5. Возможность получения результатов с выводом их на дисплей компьютера.

ДОСТОИНСТВА ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

- Простота и быстрота аналитических реакций.
- Использование небольшого количества анализируемого вещества (несколько мг).
- Высокая чувствительность (предел обнаружения 10^{-7} г).
- Универсальность метода (возможность анализа лекарственных веществ разнообразной химической структуры по различным показателям согласно НД).

- Возможность сочетания его с другими методами (с хроматографией, экстракцией и т.д.)
- Невысокая погрешность аналитических измерений ($\pm 1-2\%$).

АППАРАТУРА В ФОТОМЕТРИИ

Измерение поглощения в УФ- и видимой областях производят на фотоэлектрических спектрофотометрах разного типа: СФ-46, СФ-56 (Россия), Specord UV-VIS, Specord M-40 (Германия), Perkin Elmer 402, 412 (США) и др.

При всём многообразии схем и конструктивных особенностей приборов абсорбционной спектроскопии в каждом из них имеется несколько основных узлов (рис. 9).



Рис. 9. Блок-схема приборов для поглощения излучения

- 1 – источник излучения;
- 2 – монохроматор;
- 3 – кюветы с исследуемым раствором и растворителем;
- 4 – приёмник излучения;
- 5 – измерительные и регистрирующие устройства.

К этим узлам следует добавить оптическую систему, состоящую из линз, призм и зеркал, для создания параллельного пучка света, также систему для уравнивания световых потоков (диафрагмы, оптические клинья и т.д.).

Источник излучения. В качестве источника УФ-излучения применяется обычно газоразрядная «водородная лампа» (электрическая дуга в атмосфере водорода при низком давлении), которая даёт практически непрерывный спектр излучения в области 190-360 нм. При работе в видимой области источником излучения служит лампа накаливания с вольфрамовой спиралью, дающая свет с длинами волн 340-1100 нм.

Монохроматор – это устройство, разлагающее излучение на составляющие его волны разной длины. Все монохроматоры состоят из диспергирующего устройства и связанной с ним системы линз, зеркал, входных и выходных щелей. Диспергирующими элементами служат призмы и дифракционные решётки.

В призмном монохроматоре излучение проходит через входную щель, сводится линзой в параллельный пучок и затем попадает под углом на поверхность призмы. На обеих гранях призмы происходит преломление. Разложенное излучение фокусируется на слегка изогнутой поверхности, на

которой расположена выходная щель. Поворотом призмы можно направить в эту щель излучение с требуемой длиной волны.

В видимой части спектра в качестве материала для призм используют стекло, в ультрафиолетовой – кварц.

Дифракционные решётки изготавливают нанесением параллельных штрихов на стекло или другой прозрачный материал (до 6000 штрихов на 1 см). При освещении дифракционной решётки потоком излучения, прошедшим через входную щель, каждый штрих становится источником излучения. В результате интерференции многочисленных потоков излучение разлагается в спектр.

Кюветное отделение – устройство, где находятся кварцевые кюветы с раствором сравнения и исследуемого образца.

Приёмник излучения (фотоэлемент) регистрирует интенсивность световых потоков в широком диапазоне длин волн. Он чувствителен к излучению небольшой интенсивности, быстро реагирует на излучение, давая электрический сигнал, который легко можно умножить. Для приёма сигнала в УФ- и видимой областях обычно применяют фотоэлементы с внешним фотоэффектом: сурьмяно-цезиевый (190-700 нм) и кислородно-цезиевый (600-1100 нм). При измерении излучения с низкой интенсивностью используют **фотоумножители**.

Измерительное и регистрирующее устройства включают шкалу прибора, микропроцессорную систему, диаграммную ленту, экран монитора, принтер.

Для спектрофотометрических измерений в УФ- и видимой областях применяются два типа приборов – **нерегистрирующие и регистрирующие спектрофотометры**.

При работе на нерегистрирующих спектрофотометрах результаты наблюдают на шкале прибора визуально. В таком случае электронные спектры строят графически по полученным данным (λ , D). Регистрирующие спектрофотометры автоматически изображают электронный спектр на ленте-самописце, экране монитора, принтере.

Спектрофотометры бывают **одно- и двухлучевые**.

При работе на однолучевом спектрофотометре в монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводится контрольный (раствор сравнения) и исследуемый образцы (например, СФ-46) (рис. 10).

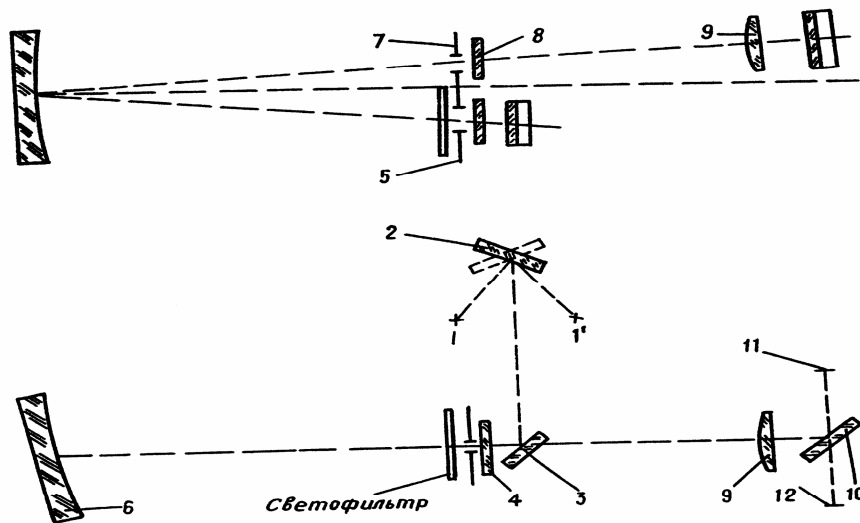


Рис. 10. Оптическая схема СФ-46

1 – источник света; 2 – конденсор; 3 – плоское поворотное зеркало; 4 – линза; 5 – входная щель монохроматора; 6 – дифракционная решетка; 7 – выходная щель; 8, 9 – линзы; 10 – поворотное зеркало; 11 или 12 – светочувствительный слой фотоэлемента.

В современных регистрирующих приборах световой поток делится на два одинаковых пучка, один из которых проходит через исследуемый раствор, а другой через раствор сравнения. При этом уравнивание интенсивности световых потоков, прошедших через кюветы, и непрерывное изменение длин волн производится автоматически. В обоих типах приборов интенсивность прошедшего через кювету света измеряется с помощью фотоэлемента. Ток усиливается и регистрируется потенциометром, сравнивается интенсивность двух световых потоков: прошедшего через исследуемый раствор и пропущенного через раствор сравнения.

Спектрофотометр СФ-56

Однолучевой автоматизированный спектрофотометр предназначен для измерения спектральных коэффициентов пропускания жидких и твердых прозрачных веществ. Управление спектрофотометром и обработка результатов измерения осуществляется при помощи микро-ЭВМ. Информация выводится на дисплей и печатающее устройство.

Основные режимы работы спектрофотометра: автоматическое однократное и многократное выполнение измерений для одного или нескольких образцов на заданных оператором длинах волн с заданным временным интервалом между циклами измерений; обзорное сканирование и

вывод заданных участков спектра на видеомонитор для проведения качественного анализа; проведение кинетических измерений; математическая обработка результатов измерений, в том числе вычисление оптической плотности и концентрации, а также расчет цветовых характеристик исследуемых объектов

ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЯ

Более доступным является фотоэлектроколориметрический метод количественного определения. Основные законы и методы определения являются общими как для фотоэлектроколориметрии, так и спектрофотометрии в видимой области спектра.

Существенным моментом в фотоэлектроколориметрии является подбор светофильтра. Нужный светофильтр подбирают экспериментально. Для этого готовят две пробы исследуемого раствора различной концентрации и измеряют их оптические плотности со всеми имеющимися светофильтрами. Затем для каждого светофильтра находят разность оптической плотности ΔD , соответствующую взятой разности концентрации ΔC окрашенного раствора. Тот светофильтр, при котором значение D или ΔD получается максимальное, является наиболее подходящим для фотометрирования данного окрашенного раствора.

Иногда при подборе светофильтра используют менее точный, но более быстрый приём – выбирают светофильтр по цвету исследуемого раствора (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

ЦВЕТА РАСТВОРОВ И СООТВЕТСТВУЮЩИХ ИМ СВЕТОФИЛЬТРОВ

Цвет раствора	Область максимального поглощения лучей раствором, нм	Цвет светофильтра
Жёлто-зелёный	400-450	Фиолетовый
Жёлтый	450-480	Синий
Оранжевый	480-490	Зелёно-синий
Красный	490-500	Сине-зелёный
Пурпурный	500-560	Зелёный
Фиолетовый	560-575	Жёлто-зелёный
Синий	575-590	Жёлтый
Зелёно-синий	590-625	Оранжевый
Сине-зелёный	625-700	Красный

В фотоэлектроколориметрии применяют приборы – фотоэлектроколориметры различных марок (ФЭК-56М; КФК-2; КФК-3). В качестве источника излучения в них используется лампа накаливания или галогенная, позволяющие вести определение в области спектра от 315 до 990 нм. Излучение от источника света попадает на светофильтры (ФЭК-56М; КФК-2) или на дифракционную решётку (КФК-3). Светофильтры пропускают световой поток определённого диапазона длин волн (немонохроматический свет). Светофильтры бывают нескольких типов: абсорбционные, интерференционные и др.

Абсорбционные светофильтры представляют собой цветные стёкла или стеклянные пластинки, между которыми помещён краситель, суспендированный в желатине. Абсорбционные светофильтры пропускают излучение ограниченного интервала длин волн и поглощают излучение всех остальных, они характеризуются довольно широкой полосой пропускания (30 нм и более). В табл. 6 дана характеристика светофильтров фотоэлектроколориметра КФК-2.

Т а б л и ц а 6

СВЕТОФИЛЬТРЫ КОЛОРИМЕТРА КФК-2 (КФК-2МП)

Маркировка на диске	Маркировка светофильтра	Длина волны, соответствующая максимуму пропускания, нм	Ширина полосы пропускания, нм
1	315	315 ± 5	35 ± 15
2	364	364 ± 5	25 ± 10
3	400	400 ± 5	45 ± 10
4	440	440 ± 10	40 ± 15
5	490	490 ± 10	35 ± 10
6	540	540 ± 10	25 ± 10
7	590	590 ± 10	25 ± 10
8	670	670 ± 5	20 ± 5
9	750	750 ± 5	20 ± 5
10	870	870 ± 5	25 ± 5
11	980	980 ± 5	25 ± 5

Характеристики **интерференционных светофильтров** значительно лучше. Светофильтр состоит из двух тончайших полупрозрачных слоёв серебра, между которыми находится слой диэлектрика.

Дифракционные решётки позволяют получать свет определённой длины волны (монохроматический свет). Световой поток определённого диапазона длин волн проходит через кювету с раствором исследуемого

вещества и регистрируется фотоэлементом. Интенсивность светового потока, прошедшего через исследуемый раствор, сравнивается с интенсивностью светового потока, прошедшего через кювету с раствором сравнения. На рис. 11, 13 представлены оптические схемы приборов КФК-2 и КФК-3.

Теплозащитный светофильтр (6) введён в световой пучок при работе видимой области спектра (400-590 нм). Для ослабления светового потока при работе в спектральном диапазоне 400-540 нм установлены нейтральные светофильтры (7). Для выделения узких участков спектра из сплошного спектра лампы в колориметре предусмотрены цветные светофильтры (8).

Фотоприёмники работают в разных областях спектра:
 фотоэлемент Ф-26 (15) в области спектра 315-540 нм;
 фотодиод ФД-24К (12) в области спектра 590-980 нм.

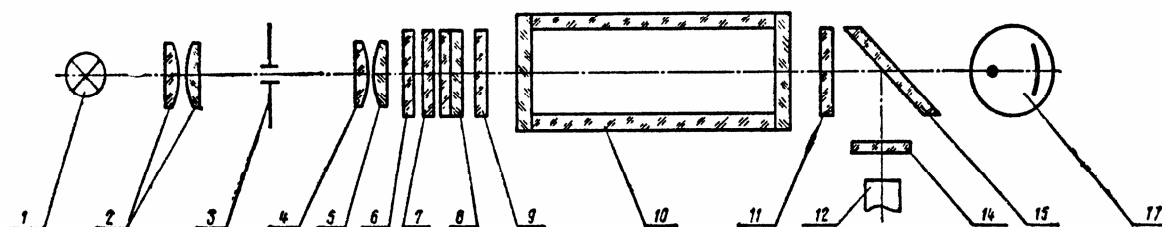


Рис. 11. Принципиальная оптическая схема колориметра фотоэлектрического концентрационного КФК-2 и КФК-2 МП.

- 1 – лампа накаливания;
- 2 – конденсор;
- 3 – диафрагма;
- 4, 5 – объектив;
- 6 – теплозащитный светофильтр;
- 7 – нейтральный светофильтр;
- 8 – цветные светофильтры;
- 9, 11 – защитные стекла;
- 10 – кювета;
- 12 – фотодиод (фотоприемник) ФД-24 К;
- 13 – светофильтр из цветного стекла;
- 14 – пластинка (делит световой поток);
- 15 – фотоэлемент Ф-26.

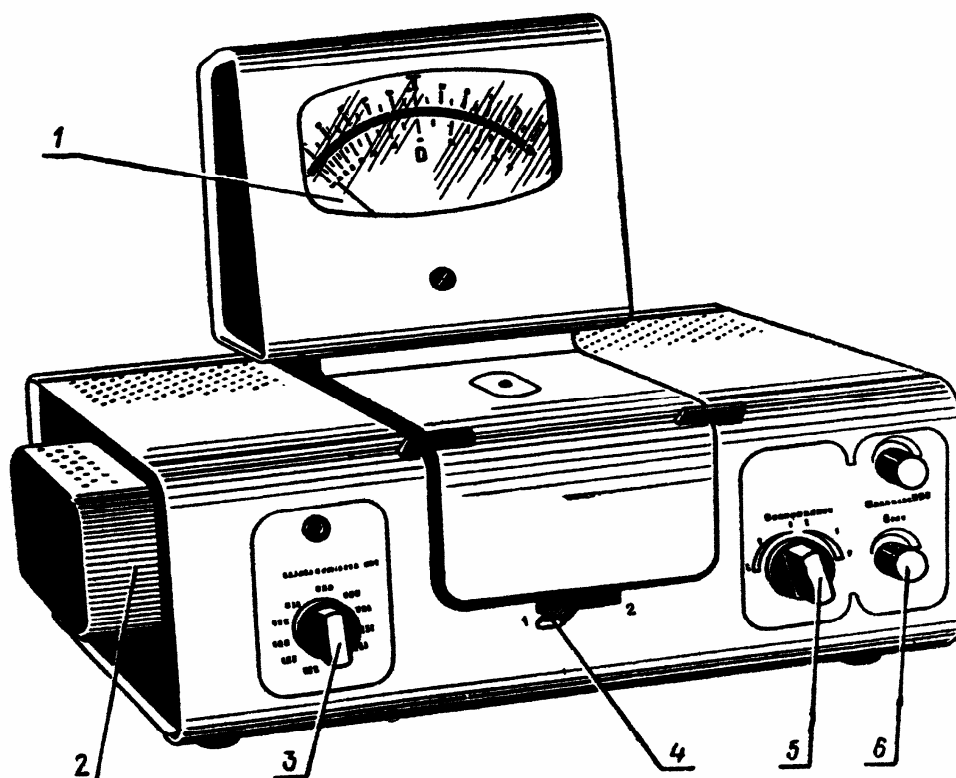


Рис. 12. Общий вид фотоколориметра КФК-2

Светофильтр (13) служит для уравнивания фототоков, снимаемых с фотоприёмника ФД-24К при работе с различными цветными светофильтрами.

Пластинка (14) делит световой поток на две части: примерно 10 % светового потока направляется на фотоприёмник ФД-24К и примерно 90 % на фотоэлемент Ф-26. Световой поток, пройдя через исследуемый раствор, воздействует одновременно на фотоприёмники ФД-24К и Ф-26.

Колориметры фотоэлектрические концентрационные КФК-2 и КФК-2МП (у которых имеется вычислительный блок с микропроцессорной системой) предназначены для измерения в отдельных участках диапазона длин волн 315-980 нм, выделяемых светофильтрами, коэффициентов пропускания и оптической плотности растворов анализируемых веществ. Весь спектральный диапазон (315-980 нм) разбит на 11 спектральных интервалов, выделяемых с помощью светофильтров.

Принцип действия колориметра основан на поочерёдном измерении светового потока F_0 , прошедшего через растворитель или контрольный раствор, по отношению к которому производится измерение и потока F , прошедшего через исследуемый раствор.

Световые потоки F_0 и F преобразуются в электрические сигналы, и определяется отношение этих потоков, то есть коэффициент пропускания исследуемого раствора T ($T = \frac{F}{F_0} \cdot 100\%$), или оптическую плотность D ($D = 2 - \lg T$) определяют по измерительной шкале прибора или цифровому табло (КФК-2МП).

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА

Требования, предъявляемые к спектрофотометрическому анализу лекарственных средств: высокая чувствительность, достаточная точность (надежность).

Чувствительность выражается нижней границей определения соединений. Это то наименьшее количество вещества (мг или мкг), содержащееся в исследуемом растворе, которое можно обнаружить при определённых условиях.

Квантово-механическими расчетами показано, что для молекул в растворах максимальная величина удельного показателя поглощения ($E_{cm}^{\%}$) составляет порядка 10^3 (на практике обычно 100-1000). Минимальное значение оптической плотности, которое можно измерить с необходимой точностью ($S_r < 0,33$), составляет порядка 0,01, а величина толщины слоя (ℓ), используемая в аналитической практике, равна 1 см.

Отсюда минимальные значения концентраций веществ, определяемых спектрофотометрическим методом, составляют 10^{-1} мкг/мл (в большинстве случаев измеряют концентрации 10^{-1} - 10^1 мкг/мл).

В то же время другие методы, как, например, флуориметрия, позволяют определять концентрации на несколько порядков меньше (1 нг/мл). Поэтому спектрофотометрический метод относится к среднечувствительным.

Точность. Результат анализа по тем или иным причинам имеет ошибку (погрешность) определения, которая возникает при каждом измерении объёма, оптической плотности, при взвешивании и т. д.

Вследствие этого вместо истинного получают приближённое значение определяемой величины. Необходимо уметь оценивать степень и характер этого приближения, т.е. *точность*, которая характеризует одновременно два вида ошибок: **воспроизводимость** и **правильность**.

Под погрешностью определения (A) понимают разность между истинной (D) и измеряемой (D_1) величинами.

$$A = D - D_1$$

Найденная ошибка (A) называется **абсолютной**. Отношение абсолютной ошибки к истинному значению измеряемой величины называют относительной ошибкой ($A_{отн.}$), которую обычно выражают в процентах.

$$A_{отн} = \frac{A \cdot 100}{D}$$

Возникающая при количественном анализе ошибка обуславливается не только неточностью конечного измерения. Результат анализа зависит как от точности конечного измерения, так и от результатов всех предшествующих операций (взвешивания, отмеривания объёмов и т. д.). Общая ошибка является суммой независимых малых ошибок, порождаемых различными причинами.

Ошибки по происхождению подразделяют на **систематические, случайные и промахи.**

Систематические ошибки обусловлены факторами, действующими постоянно при повторении одних и тех же измерений. Систематические ошибки могут появляться при работе на не поверенных весах, с некалиброванными колбами, пипетками, при использовании растворов определяемых веществ и реактивов, хранящихся в незакрытых сосудах, а также по неопытности и невнимательности аналитика.

К числу систематических погрешностей относятся погрешности, которые могут появляться за счет неисправных фотоэлементов, усилительной схемы спектрофотометра, присутствия рассеянного излучения, неправильной калибровки шкалы длин волн и оптической плотности (пропускания), большого значения спектральной ширины щели. Большая ширина щели может быть одной из главных причин систематических искажений спектрофотометрических измерений.

Систематические ошибки уменьшают правильность анализа. Чем меньше отклонение отдельного результата определения или его среднего значения от истинного содержания вещества в пробе, тем больше точность анализа.

Правильность анализа оценивается при помощи стандартных образцов или эталонов.

Стандартный образец (СО) – это образец с установленными в процессе метрологической аттестации значениями одной или более физических величин, характеризующих свойства или состав данного вещества или материала. СО играют роль меры свойства или состава конкретного вещества и вносятся в Государственный реестр СО.

Случайные ошибки отличаются друг от друга в отдельных измерениях, и эти различия имеют случайную, неизвестную величину. Она различна даже для измерений, выполненных одинаковым образом.

Случайные ошибки обусловлены рядом причин, которые нельзя учесть при измерениях. Они проявляются в отклонении результатов то в одну, то в другую сторону от средней величины нескольких измерений. Случайные ошибки могут появиться при взятии на анализ неоднородной средней пробы навески гигроскопических веществ, при изменении температуры во время опыта, при потере вещества в ходе анализа, при попадании в растворы

примесей из реактивов, посуды и т. д.. Случайные ошибки понижают **воспроизводимость** анализа. Воспроизводимость анализа характеризуется отклонением полученного результата от среднего значения определяемых величин и определяется методами математической статистики.

Случайные погрешности, обуславливающие воспроизводимость результатов фотометрических определений, вызваны следующими причинами: погрешностями при приготовлении анализируемых растворов; полнотой перевода определяемого компонента в фотометрируемое соединение; влиянием посторонних компонентов; погрешностями контрольного опыта; кюветной погрешностью, которая связана с различиями в толщине кювет и состоянием их рабочих граней, а также воспроизводимостью их положения в кюветодержателе; погрешностями установки нужной длины волны и настройки регистрирующей системы на 0 и 100 % пропускания; нестабильностью работы источника освещения и приемно-усилительной системы.

Надёжность спектрофотометрических измерений обеспечивается периодической калибровкой прибора. Калибровке подлежат шкалы длин волн и оптической плотности (пропускания).

Учитывая, что фото- и спектрофотометрические исследования лекарственных средств проводят в основном в растворах, точность результатов анализа зависит от свойств растворителей, которые должны отвечать ряду требований:

- 1) Обладать достаточной растворяющей способностью по отношению к лекарственным средствам.
- 2) Не должны поглощать свет в той же области спектра, что и растворённое вещество.
- 3) Обладать устойчивостью к излучению используемой длины волн.
- 4) Не должны флуоресцировать.
- 5) Должны обладать оптическим постоянством.
- 6) Не должны вступать в реакции с анализируемым веществом и материалом кювет.

При характеристике **точности** метода следует учитывать **правильность** его, зависящую от систематических ошибок, и **воспроизводимость**, зависящую от случайных ошибок.

Промахи – это грубые погрешности, допущенные из-за небрежности или заведомой некомпетентности аналитика. Для обнаружения и устранения промахов рекомендуется проводить контрольные измерения. Все результаты измерений, которые являются промахами (например, отклоняются от среднего арифметического больше, чем на 3σ), не принимаются в расчет при дальнейшей статистической обработке результатов анализа, т.е. при анализах промахи должны полностью исключаться. Существуют и другие критерии промахов.

Не все значения оптической плотности (D) и пропускания (T) можно измерить с одинаковой точностью. Существует оптимальный диапазон измерения светопоглощения. Его выбирают с таким расчетом, чтобы во всём

рабочем интервале D и T относительная погрешность измерения D не превышала его удвоенной минимальной относительной погрешности:

$$S_D/D \leq 2 (S_D/D_{\min}),$$

где S_D – стандартное отклонение результатов измерений D .

$$D_{\min} = \frac{1}{\ln 10} = 0,4343$$

При работе на приборах с менее монохроматичным излучением, чем на спектрофотометрах (например на фотоэлектроколориметрах), диапазон сужается до 0,1-0,7. При измерении очень низких или очень высоких значений D (T) погрешность резко возрастает.

Этот недостаток можно устранить с помощью дифференциальных методов спектрофотометрии.

Селективность. Важнейшими факторами, ограничивающими селективность в спектрофотометрии, являются спектральная ширина полос поглощения в растворах (достигающая десятков нанометров) и связанная с этим вероятность спектральных помех – перекрывание спектров компонентов, появление аддитивных систематических погрешностей.

Спектрофотометрические методы являются в большинстве случаев спектрально неселективными, поэтому селективность обеспечивают, главным образом, на стадии пробоподготовки – выбором реагента, селективно взаимодействующего с определяемым веществом с образованием окрашенного продукта, а также условий определения (варьирования рН, маскирование), разделением компонентов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Какие интервалы длин волн используются в спектрофотометрии в УФ-, видимой, ИК-областях ?
2. Энергетические характеристики электромагнитного излучения.

3. Механизм возникновения спектров поглощения в УФ-, видимой областях спектра.
4. Основные законы поглощения электромагнитного излучения. Закон Бугера-Ламберта-Бера, закон аддитивности поглощения.
5. Физический смысл понятий: оптическая плотность раствора, пропускание или прозрачность раствора, удельный коэффициент поглощения ($E_{см}^{\%}$), молярный коэффициент поглощения (ϵ).
6. Причины отклонения бесцветных и окрашенных растворов от закона Бугера-Ламберта-Бера.
7. Получение окрашенных соединений и использование их в количественном фотометрическом анализе.
8. Принципиальная схема спектрофотометра СФ-46.
9. Принципиальная схема фотоэлектроколориметров КФК-2, КФК-3.
10. Охарактеризуйте источники излучения, используемые в современных спектрофотометрах, фотоэлектроколориметрах. Что представляют собой монохроматоры в указанных приборах ?
11. Какие приёмники используют при регистрации УФ-, видимого излучения ?
12. Каким образом готовят образцы твердых веществ для снятия спектров в УФ-, видимой областях ?
13. Методики работы на фотоэлектроколориметрах КФК-2, КФК-3, спектрофотометре СФ-46.
14. Какую информацию получают при интерпретации спектров в УФ-, видимой областях спектра:
 - а) известного вещества;
 - б) неизвестного вещества ?
15. Методы количественного спектрофотометрического и фотометрического анализов субстанций, различных лекарственных форм:
 - а) метод сравнения (использование ГСО или РСО);
 - б) метод градуировочного графика;
 - в) определение концентраций по величине $E_{см}^{\%}$.
16. Перечислить преимущества и недостатки спектрофотометрии в УФ- и видимой областях спектра.