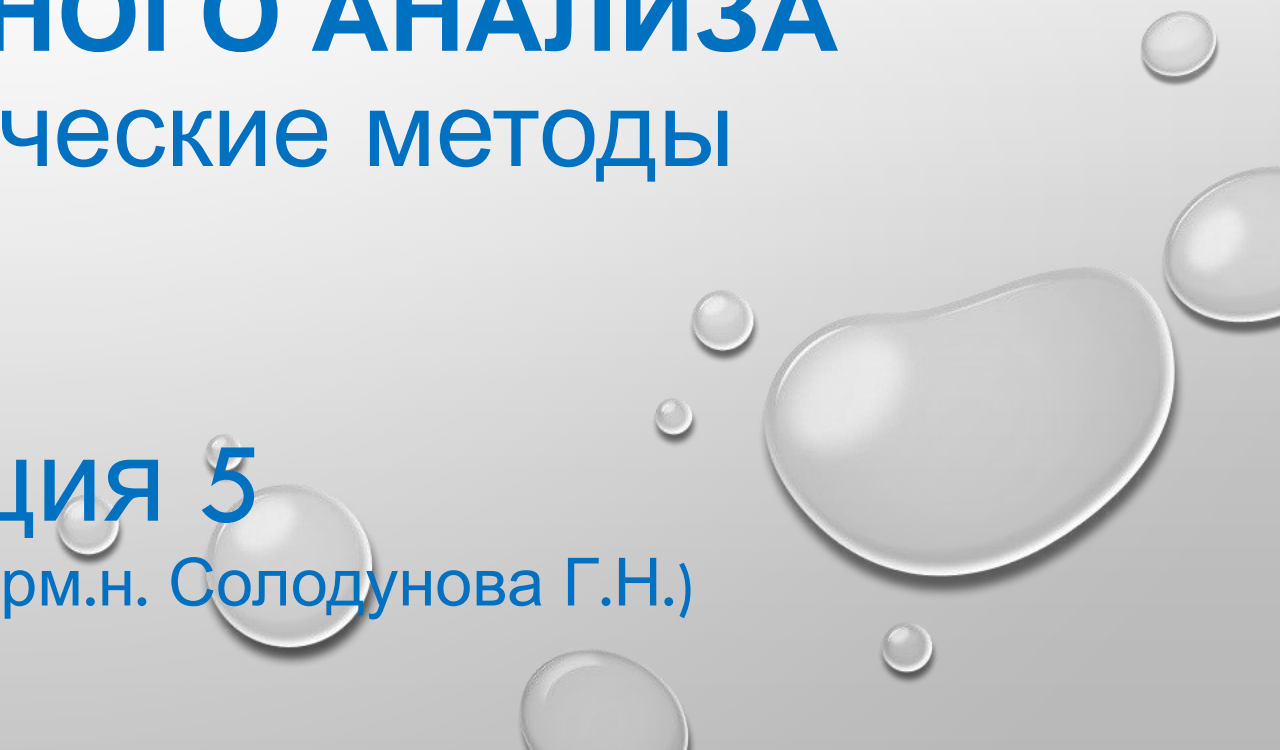


Дисциплина
«Методы фармакопейного анализа»

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА**
Спектроскопические методы

лекция 5

(лектор: доцент, к.фарм.н. Солодунова Г.Н.)



СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Спектроскопия – это раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения, включающий в себя методы количественного и качественного анализа, основанные на взаимодействии света с живой и неживой материей.

Спектрофотометрический метод анализа – основан на поглощении монохроматического излучения, т.е. Излучения с одной длиной волны в видимой и УФ (ультро-фиолетовой) областях спектра.

Методы спектроскопии можно условно поделить на две группы:

- Методы оптической атомной спектроскопии, основанные на *изменении энергии валентных электронов свободных атомов.*
- Методы, основанные на *возбуждении электронов внутренних оболочек* под воздействием излучения более высокой энергии, которые находятся в рентгеновской области спектра.

СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Основой качественного спектрального анализа является свойство каждого химического элемента излучать характерный линейчатый спектр.

Задачей качественного спектрального анализа сводится к отыскиванию линий определяемого элемента в спектре пробы. Доказательством того, что линия принадлежит данному элементу, являются длина волны и интенсивность линии.

При уменьшении содержания элемента в пробе интенсивность линий этого элемента в спектре будет уменьшаться, некоторые линии исчезнут и число линий уменьшится. При очень малой концентрации останется всего несколько линий, по которым обычно проводится качественный анализ. Длины волн и характеристику интенсивности можно найти в специализированных таблицах и справочниках. Для расшифровки спектра и определения длины волны анализируемой линии пользуются спектрами сравнения.

КЛАССИФИКАЦИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Все спектроскопические методы основаны на взаимодействии атомов, молекул или ионов, входящих в состав анализируемого вещества, с электромагнитным излучением. Это взаимодействие проявляется в поглощении или испускании фотонов (квантов). В зависимости от характера взаимодействия пробы с электромагнитным излучением выделяют две группы методов - *эмиссионные и абсорбционные*. В зависимости от того, какие частицы формируют аналитический сигнал, различают методы *атомной спектроскопии* и методы *молекулярной спектроскопии*:

Электромагнитное излучение может проявляться в разных формах:

- Видимый свет,
- Ультрафиолетовое излучение,
- Инфракрасное (тепловое) излучение,
- Радиоволны,
- Рентгеновские лучи,
- Гамма-лучи.

ОБЛАСТИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО СПЕКТРА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

В химическом анализе применяют не все виды излучений. Широко используют «оптический диапазон», границы которого - от 200 нм до 40 000 нм. В этот диапазон входят три области:

Ультрафиолетовая область (уф) – 200-400 нм.

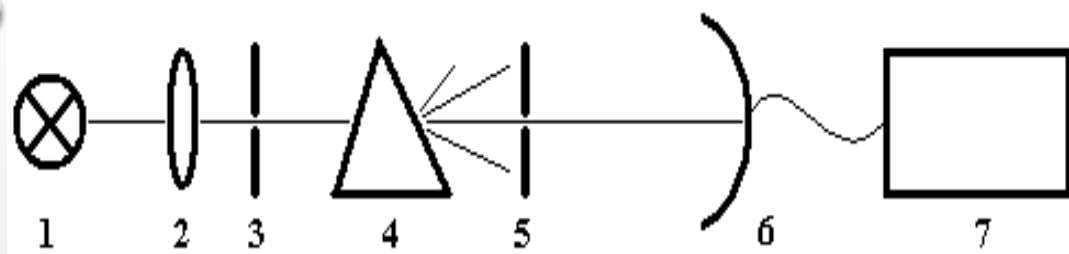
Видимая область – 400-800 нм;

Инфракрасная область (ИК) - от 800 до 40 000 нм.

Спектры излучения и поглощения

Как правило, анализируемая проба излучает и поглощает полихроматический свет, включающий кванты разной энергии и разной длины волны. Однако для аналитика предпочтительнее измерять испускание или поглощение света, в котором все кванты примерно одинаковы по энергии, соответствуют одной длине волны. Чтобы выделить ее из полихроматического излучения, нужно особое устройство – *монохроматор*. На рис.1. Показана схема спектрального прибора с призмным монохроматором

СХЕМА СПЕКТРОМЕТРА С ПРИЗМЕННЫМ МОНОХРОМАТОРОМ



1 – источник света,
2 – фокусирующая оптика,
3 – входная щель,
4 – призма,

5 – выходная щель, 6 – приемник (фотоэлемент), 7 – регистрирующее устройство (микроамперметр и т.п.).

Спектр излучения пробы показывает, на каких длинах волн она преимущественно излучает свет при возбуждении (например, при сильном нагревании). Спектр излучения регистрируют в координатах: интенсивность (I) излучения - длина волны (λ).

Спектр поглощения пробы показывает, на каких длинах волн она преимущественно поглощает излучение внешнего источника. Такие спектры обычно регистрируют в координатах $A - \lambda$, где A - количественная характеристика поглощения света на данной длине волны, называемая *оптической плотностью*.

Спектры поглощения и излучения одного и того же вещества в некоторой области длин волн очень похожи.

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРОВ РАЗНОГО ТИПА И ИХ АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Атомные спектры поглощения и излучения, наблюдаемые во всем оптическом диапазоне, определяются переходами электронов, относящихся к наружным слоям («валентные электроны»). Атомные спектры по своей природе являются *электронными*, а по внешнему виду - *линейчатыми*..

Молекулярные спектры излучения или поглощения обычно не являются линейчатыми. Вид молекулярных спектров в разных диапазонах длин волн различен, поскольку различно происхождение соответствующих спектров. Спектры поглощения молекул в видимой или уф-области являются *широкополосными*.

АТОМНО-ЭМИССИОННЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Еще в древности было замечено, что цвет пламени меняется при введении в него некоторых веществ. Например, по окраске пламени различали соду (Na_2CO_3) и поташ (K_2CO_3). В XIX веке был установлен линейчатый характер спектров пламени. Спектры начали фотографировать, определять длины волн отдельных линий. Некоторые исследователи указывали, что, по наличию определенных спектральных линий можно судить о присутствии в пробе тех или иных элементов.

АТОМНО-ЭМИССИОННЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Принцип метода довольно прост. Во всех вариантах атомно-эмиссионного спектрального анализа (АЭС) пробу вносят в источник возбуждения, где тем или иным способом создается высокая температура (тысячи градусов). Образуется плазма (совокупность возбужденных атомов, ионов и электронов). В ней последовательно проходят следующие процессы:

- Испарение пробы;
- Атомизация первоначальных продуктов испарения (молекул или ионов);
- Возбуждение образовавшихся атомов;
- Испускание света возбужденными атомами.

Для качественного анализа полученный спектр сопоставляют с эталонными спектрами разных элементов. *По одному спектру* пробы можно быстро и надежно обнаружить многие, а то и *все присутствующие в ней элементы*. Для количественного анализа надо измерить интенсивность излучения пробы на некоторых заранее выбранных длинах волн.

АТОМНО-ЭМИССИОННЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Источники возбуждения

В качестве источников возбуждения применяют пламя, электрическую дугу, искру, а также высокочастотную индуктивно-связанную плазму (ИСП, ICP).

Способы регистрации спектра

Фотографическая регистрация это «классический» способ, он позволяет получать и измерять даже очень слабые сигналы микропримесей. Одновременно регистрируются линии всех компонентов пробы. Сфотографированные спектры можно долго хранить и в любое время провести повторные измерения.

Фотоэлектрическая регистрация основана на применении фотоэффекта. Фототок приблизительно пропорционален интенсивности излучения, вызывающего фотоэффект. Фотоэлектрическая регистрация спектров более экспрессна, чем фотографическая. Исключается трудоемкая обработка фотопластинок и последующие измерения почернений.

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Качественный анализ

Существуют спектральные атласы, где приведены эталонные спектры испускания большого числа элементов с указанием длин волн и относительных интенсивностей линий. По мере уменьшения концентрации компонента интенсивность излучения уменьшается и уже не регистрируется прибором. Последними исчезают так называемые *последние линии* (как правило, наиболее интенсивные). Для каждого элемента эти линии хорошо известны.

Количественный анализ

Интенсивность излучения в атомно-эмиссионном спектральном анализе (АЭС) определяется концентрацией возбужденных атомов. Это прямо пропорциональная зависимость интенсивности излучения на данной длине волны от концентрации элемента в пробе:

$$I = a \cdot C$$

C - Концентрация

I - интенсивность излучения

a - коэффициент, зависящий от свойств источника излучения и пробы

МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ)

Еще в начале XIX века концентрацию окрашенных растворов научились оценивать, сравнивая на глаз интенсивность их окраски с заранее приготовленной шкалой эталонных растворов (*колориметрия*). Затем были изобретены приборы для количественного измерения поглощения света растворами.

В зависимости от того, в какой области спектра измеряют аналитический сигнал, методы молекулярно-абсорбционной спектроскопии разделяют на две группы:

- фотометрический анализ в УФ – и видимой области (Спектрофотометрия);
- ИК-спектроскопия.

Соответствующие методы сильно различаются по своим возможностям, но основаны они на одних и тех же теоретических закономерностях.

В качестве аналитического сигнала в молекулярно-абсорбционной спектроскопии используют *оптическую плотность* (A). Это десятичный логарифм отношения интенсивности монохроматического света, прошедшего через раствор сравнения, к интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор

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

МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ)

Оптическая плотность – безразмерная величина. Она не зависит от $i_{нач}$, а определяется природой и концентрацией частиц, поглощающих свет на данной длине волны, а также толщиной поглощающего слоя в кювете. Связь этих величин описывает основной закон светопоглощения, который принято называть *законом Бугера – Ламберта - Бера*:

В соответствии с законом *Бугера – Ламберта - Бера*, оптическая плотность раствора, измеренная на некоторой длине волны, прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества, поглощающего свет на этой длине волны, и толщине слоя раствора.

$$A = \varepsilon l c$$

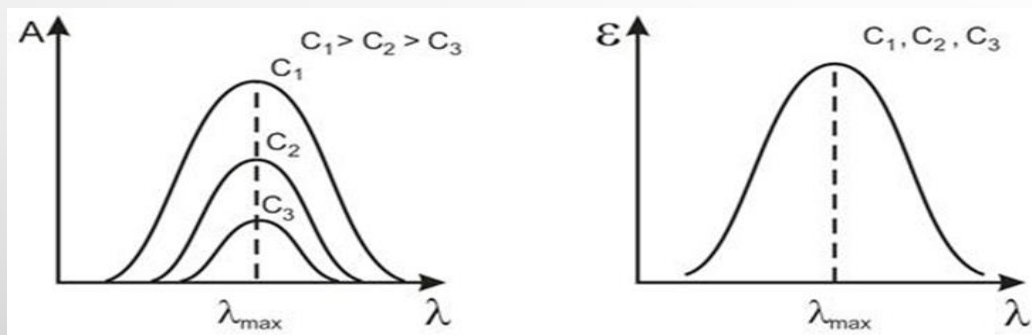
C - концентрация поглощающих частиц, [моль/л]?

L - толщина слоя [см],

e - молярный коэффициент поглощения (коэффициент пропорциональности), его величина зависит от природы x и длины волны, на которой измеряют оптическую плотность.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Спектр поглощения отдельного раствора строят в координатах $A - \lambda$. При изменении концентрации раствора спектральная кривая будет сдвигаться по вертикали, но число максимумов на этой кривой и их положение в шкале длин волн не изменятся.



Длину волны, при которой наблюдается максимальное поглощение, обозначают как λ_{max} , а молярный коэффициент на этой длине волны – как ϵ_{max} . Зависимость ϵ от λ (или $\lg \epsilon$ от λ) характеризует все растворы данного состава.

Она не меняется при изменении концентрации растворенного вещества или толщины поглощающего слоя. Именно такие «обобщенные» спектры поглощения индивидуальных веществ приводят в спектральных атласах (рис.4, справа). Чем больше ϵ_{max} , тем меньшие концентрации X можно определять по данной методике.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

В определенных условиях часть поглощенной веществом энергии может выделяться в виде вторичного излучения. Это явление называют люминесценцией. Кванты вторичного излучения, испускаемого люминесцирующими атомами, молекулами или ионами, имеют меньшую энергию, чем кванты, которые те же частицы поглощали при своем возбуждении. Виды люминесценции классифицируют по способу возбуждения. Наиболее известны:

Катодолюминесценция (свечение под действием потока электронов, например, свечение экрана кинескопа или жидкокристаллического экрана, свечение ламп дневного света).

Хемилюминесценция (свечение за счет химической реакции, например, у светлячков).

Фотолюминесценция. В этом случае проба светится за счет облучения невидимым УФ-светом от внешнего источника. Именно этот вид люминесценции обычно применяют в химическом анализе.

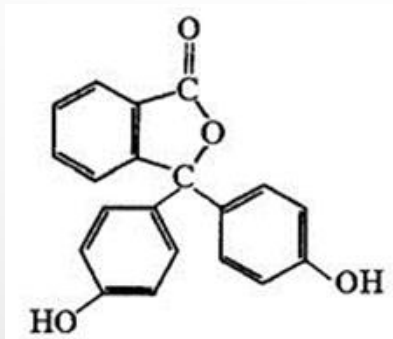
Виды люминесценции классифицируют и по времени жизни возбужденного состояния. В анализе преимущественно используют:

Флуоресценцию – в этом случае возбужденное состояние молекулы неустойчиво, и вторичное излучение пробы в УФ- или видимой области спектра прекращается сразу после удаления источника возбуждения;

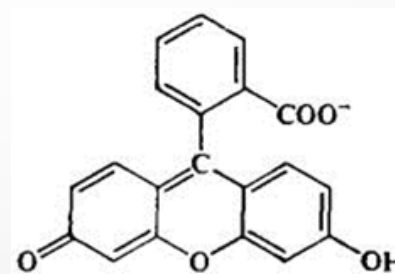
Фосфоресценцию (иногда используют) – в этом случае свечение вещества продолжается в течение нескольких секунд, минут или даже часов после прекращения возбуждения.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Люминесцировать могут далеко не все молекулы, поглощающие свет. Большая часть органических веществ, способных люминесцировать, – это ароматические соединения, имеющие жесткую структуру молекулы.



Фенолфталеин



флуоресцеин

Так, фенолфталеин и флуоресцеин имеют сходное строение молекул. Но у фенолфталеина все три бензольных кольца могут свободно колебаться друг относительно друга, и это соединение не люминесцирует. У флуоресцеина же возможность внутримолекулярных колебаний гораздо меньше (кислородный мостик жестко фиксирует два бензольных кольца), и это соединение интенсивно светится в видимой области при облучении его раствора УФ-светом. В качестве источников возбуждения чаще всего используют мощные УФ-лампы (ртутные, ксеноновые и др.), а также лазеры.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Качественный люминесцентный анализ

По появлению люминесценции при УФ-облучении пробы, а также по характерному цвету люминесценции можно визуально опознавать некоторые элементы, например, уран, находящийся в растворе в виде ионов. Известен целый ряд качественных реакций, приводящих к образованию люминесцирующих соединений. Так, например, можно открывать (а затем и определять) субмикрограммовые количества ионов кадмия по реакции с кальце-ином, ионы бериллия и циркония – по реакции с морином, ионы цинка – с салициловой кислотой, ионы алюминия - с 8-оксихинолином.

По характерному цвету люминесценции выявляют и присутствие некоторых органических соединений. Например, полиароматические углеводороды (ПАУ) дают синее свечение, а смолы и асфальтены – сине-зеленое. В этих случаях люминесценцию наблюдают визуально, облучая анализируемый образец ультрафиолетовым светом ртутной лампы.



**Возникшие вопросы по материалам лекции
просьба направлять на почту**

gn_solodunova@mail.ru

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!