

ФБГОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

МЕТОДЫ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

Солодунова Г.Н.
Новиков М.С.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ РЕФРАКЦИИ

Занятие 6
IV семестр

Дисциплина МЕТОДЫ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

ЗАНЯТИЕ № 6

IV семестр

Физические методы
фармакопейного анализа

Физические методы фармакопейного анализа –
рефрактометрия.

Определение показателя рефракции растворов
некоторых ЛВ.

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Рефрактометрия – определение, понятие. Чем отличаются "абсолютный показатель преломления" и "относительный показатель преломления"? Математическое и графическое содержание закона Снеллиуса.
2. Закон Снеллиуса. Расчеты в рефрактометрии. Идеальные и реальные системы. Фактор прироста показателя рефракции.
3. Измерение показателя рефракции (приборы, проведение измерения). Явление полного внутреннего отражения. Предельный угол падения.
4. Рефрактометрия как метод качественной и количественной оценки растворённых веществ (применение).

1. РЕФРАКТОМЕТРИЯ

Рефрактометрия (от лат. refractus - преломленный и греч. metreo - измеряю) - это метод исследования веществ, основанный на определении показателя (коэффициента) преломления (рефракции) и некоторых его функций. Рефрактометрический метод применяется для идентификации химических соединений, количественного и структурного анализа, определения физико-химических параметров веществ.

Рефрактометрия является одним из самых простых физических методов с затратой минимального количества анализируемого вещества и проводится за очень короткое время.

Свет, падающий на границу раздела двух прозрачных сред, частично отражается от поверхности раздела, а частично проходит внутрь второй среды. Различная скорость распространения луча света в средах с различной плотностью вызывает изменение его направления при переходе из одной среды в другую, т.е. **рефракцию**. Таким образом, при прохождении светового луча через поверхность раздела двух сред он отклоняется от первоначального направления, т.е. преломляется. Величина угла отклонения зависит от

концентрации и температуры вещества. Угол падения и преломления связаны соотношением, которое называется **показателем преломления**.

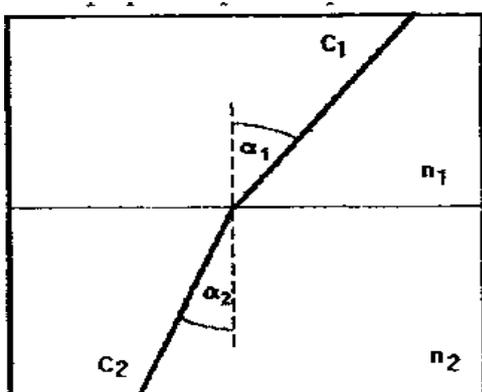
В большинстве случаев применения показателя преломления в качестве стандартной среды используют вакуум. Отношение скорости света в вакууме к скорости света в данной среде называют **абсолютным показателем преломления** этой среды. На практике определяют так называемый **относительный показатель преломления**, т.е. отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Показатель преломления среды по отношению к воздуху на 0,03% меньше абсолютного показателя преломления по отношению к вакууму. Этой величиной можно пренебречь. Преломление луча света описывается **законом Снеллиуса** (рис. 1):

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{C_1}{C_2} = \frac{n_2}{n_1} = n_{1,2}$$

где: α_1 - угол падения;
 α_2 - угол преломления;
 $n_{1,2}$ - относительный показатель преломления (перехода световой волны из среды 1 в среду 2);
 n_1 - абсолютный показатель преломления среды 1;
 n_2 - абсолютный показатель преломления среды 2;
 C_1 - скорость распространения света в среде 1;
 C_2 - скорость распространения света в среде 2.

Рисунок 1

Графическое изображение закона Снеллиуса.



Значение показателя преломления практически не зависит от давления, и, следовательно, этим параметром можно пренебречь. В то же время показатель преломления зависит от температуры. Показатель преломления органических жидкостей уменьшается при увеличении температуры. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

2. ИЗМЕРЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ

Приборы, применяемые при определении показателя преломления, называются рефрактометрами. Определение проводится при температуре $(20 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$ и длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Показатель преломления, определенный при таких условиях, обозначается индексом n_D^{20} . При необходимости измерения показателя преломления с высокой точностью (до четвертого знака после запятой) следует поддерживать температуру среды с точностью до $\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ при помощи термостатирования. Современные приборы откалиброваны таким образом, что отсчеты, полученные по их шкалам, соответствуют показателям преломления для D линии натрия, поэтому при проведении измерений следует соблюдать указания в отношении соответствующего источника света, приведенные и инструкции к приборам.

Обычно измерения показателя преломления проводят на рефрактометрах типа Аббе, в основу которых положено явление полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления (рис.3). Так как $n_1 > n_2$, то $\alpha_1 < \beta$. При увеличении угла α_1 угол β может стать равным 90° , тогда преломленный луч будет скользить по поверхности раздела сред. При дальнейшем увеличении угла α_1 луч отражается от среды 2 (n_2).

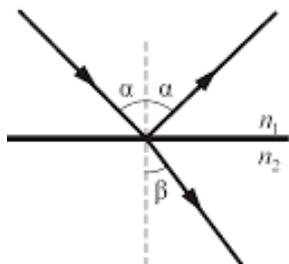


Рис 2

Это явление называется полным внутренним отражением, а угол падения – предельным углом падения.

Принцип действия рефрактометра становится понятен, если проследить ход лучей через его призмный блок. Призмный блок состоит из двух гипотенузных призм (Рис 3), между которыми имеется зазор для тонкого слоя исследуемой жидкости. Луч проходит через осветительную призму, плоскопараллельный слой жидкости, измерительную призму и попадает в окуляр.



Рис 3

Угол α_1 близок к предельному углу падения. Лучи, падающие под большими углами, чем угол α , вследствие полного внутреннего отражения, не попадут в окуляр, и верхняя его часть не будет освещена. Лучи, падающие под меньшими углами, чем угол α_1 , также не попадут в окуляр, так как нижняя призма имеет черненую металлическую оправу,

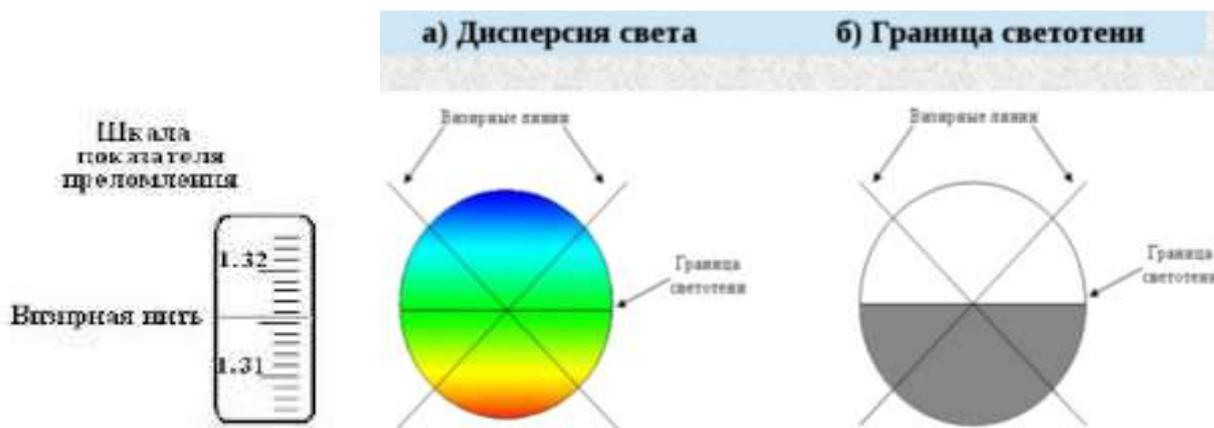
ограничивающую ее поверхность. По этим причинам в окуляре возникает граница светотени, которая может перемещаться в зависимости от показателя преломления исследуемой жидкости. Совместив указатель (перекрестье) в окуляре рефрактометра с границей светотени, измеряют показатель преломления исследуемой жидкости по шкале рефрактометра. Граница светотени указывает на шкале численное значение показателя преломления.

Точность измерения показателя преломления должна быть не ниже $\pm 2 \cdot 10^{-4}$. Могут быть использованы рефрактометры других типов с такой же или большей точностью. Рефрактометры юстируют по эталонным жидкостям, прилагаемым к приборам, или дистиллированной воде, для которой $n_D^{20} = 1,3330$.

Измерение показателя преломления прозрачных жидкостей на ИРФ-22

На поверхность измерительной призмы наносят несколько капель исследуемой жидкости и осторожно закрывают головку; наблюдают в окно 15 (рис 6), чтобы жидкость полностью заполнила зазор между измерительной и осветительной призмами. Осветительное зеркало 13 устанавливают перед окном 15 так, чтобы поле зрения трубы было равномерно освещено, затем зеркало закрепляют винтом 16. Вращая маховичок 10, находят границу раздела света и тени, маховичком 11 устраняют ее окрашенность. Точно совмещая границу раздела с перекрестием сетки, снимают отсчет по шкале показателей преломления.

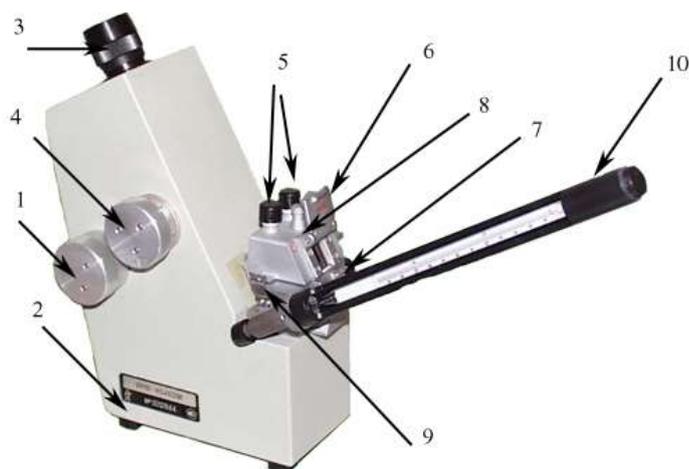
Рис 4



Индексом для отсчета служит неподвижный визирный штрих сетки. Целые, десятые, сотые и тысячные доли значения показателя преломления отсчитываются по шкале, десятитысячные доли оцениваются на глаз. Шкала рефрактометра проградуирована для температуры. Так как показатель преломления в значительной мере зависит от температуры, в приборе предусмотрено термостатирование призмного блока с помощью камер, через которые пропускается вода, идущая от термостата. В учебных целях, если не требуется высокая точность при определении показателя, измерения могут проводиться без термостатирования. По окончании измерений

тщательно вытирают рабочие поверхности блока Аббе мягкой тряпочкой или фильтровальной бумагой. Полированную грань измерительной призмы надо вытирать очень осторожно, чтобы не повредить полировку. Затем призмы промывают спиртом или эфиром, протирают и оставляют блок на некоторое время открытым для просушки. После этого измерительную головку осторожно закрывают, и прибор накрывают футляром.

Рисунок 5 – Внешний вид рефрактометра ИРФ 454 Б2М



1 – маховик для измерения показателя преломления;
 2 – заглушка, закрывающая регулировочный винт;
 3 – окуляр;
 4 – маховик с нониусом для измерения средней дисперсии;
 5 – штуцеры для подключения преломляющей призмы к водяному термостату;
 6 – зеркало для освещения

преломляющей призмы;

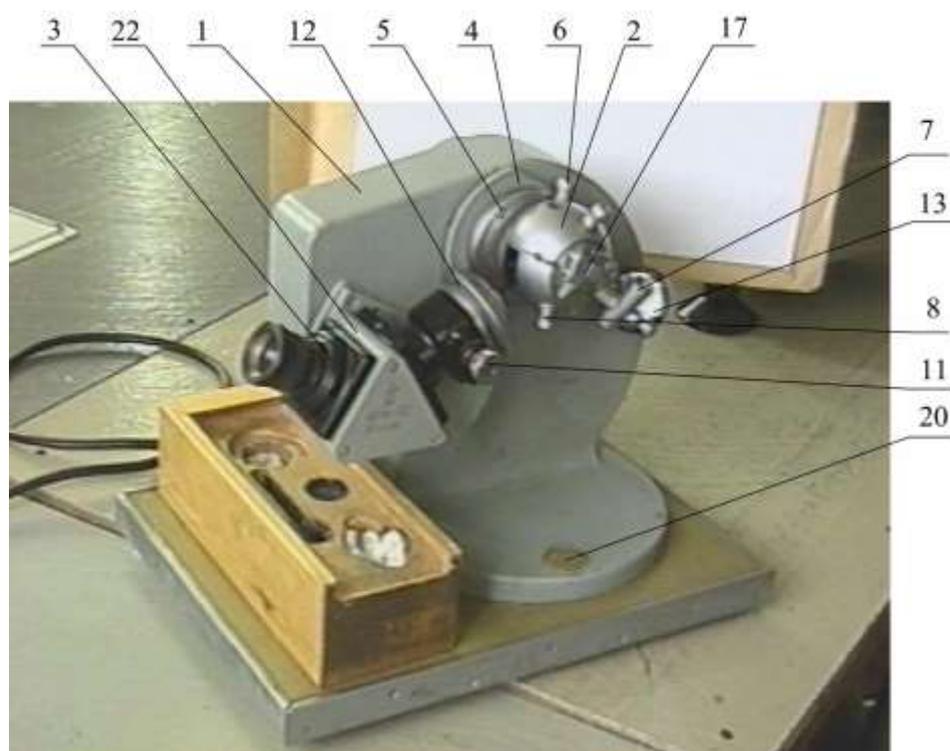
7 – преломляющая призма;

8 – осветительная призма;

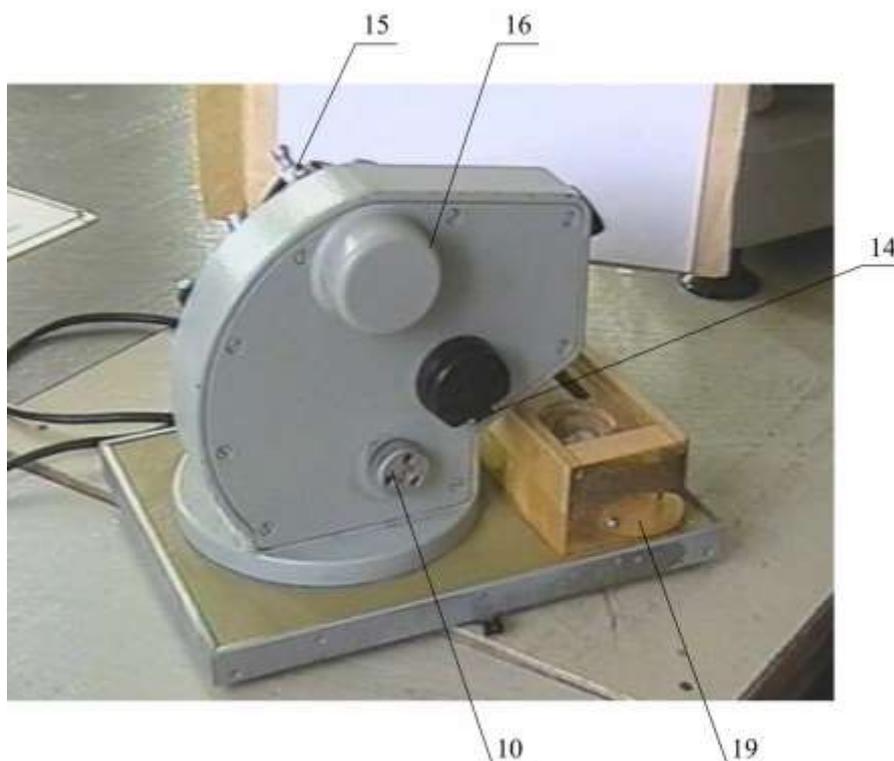
9 – защелка для закрепления осветительной и преломляющей призм;

10 – термометр;

11 – зеркало для освещения шкалы.



**Рисунок 6
 Внешний вид
 рефрактометра
 Аббе типа ИРФ-
 22**



3. РАСЧЕТЫ В РЕФРАКТОМЕТРИИ

Очень важным условием определения ПП является соблюдение температурного режима. Как правило, определение выполняется при 20 градусах по шкале Цельсия. При температуре свыше 20 градусов - величина ПП уменьшается, при температуре ниже 20 градусов – величина ПП увеличивается.

Поправка на температуру рассчитывается по формуле:

$$n_1 = n_{20} + (20 - T_1) \cdot 0,0002$$

В идеальных системах (образующихся без изменения объема и поляризуемости компонентов) зависимость показателя преломления от состава близка к линейной. Показатель преломления раствора складывается из показателя преломления растворителя и показателей преломления растворенных веществ. Если состав выражен в объемных долях, тогда:

$$n = n_1 \varphi_1 + n_2 \varphi_2,$$

где n , n_1 , n_2 - показатели преломления смеси и компонентов,

φ_1 , φ_2 - объемные доли компонентов ($\varphi_1 + \varphi_2 = 1$).

Рефрактометрия применяется для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяется также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления от концентрации. График

предварительно строят по растворам с известной концентрацией. На графике выбирают интервал концентраций, в котором соблюдается линейная зависимость между коэффициентом преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию можно вычислить по формуле:

$$X = \frac{n - n_0}{F}$$

- где X - концентрация раствора;
 n - показатель преломления раствора;
 n₀ - показатель преломления растворителя при той же температуре;
 F - фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1 % (устанавливается экспериментально).

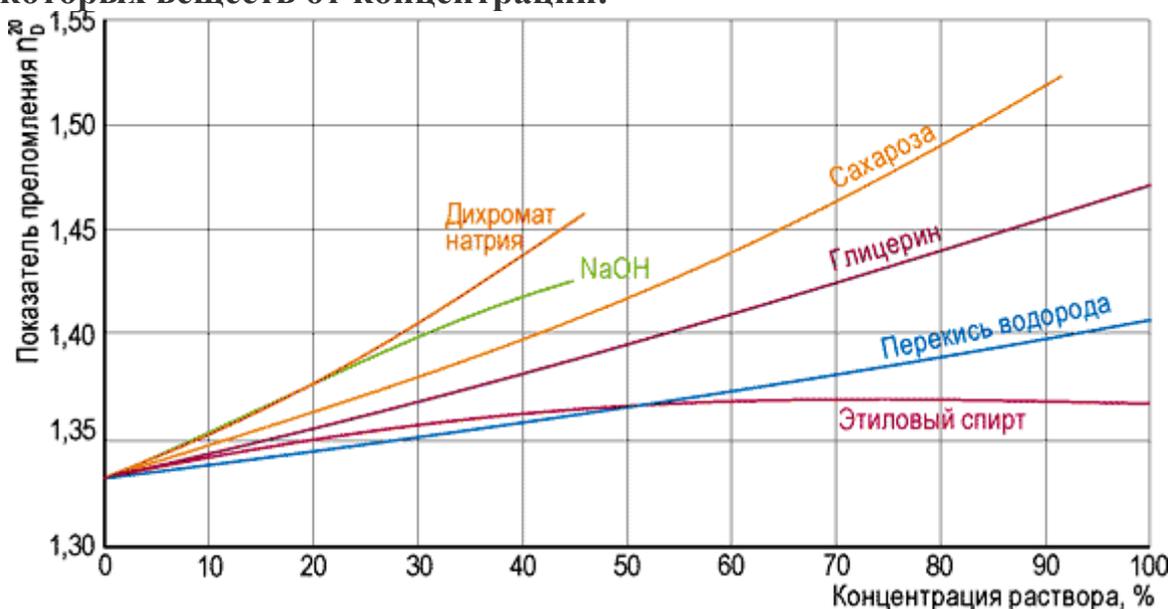
Значения показателей преломления и факторов для различных концентраций растворов лекарственных веществ приведены в рефрактометрических таблицах, которые имеются в руководстве по внутриаптечному контролю.

Рефрактометрический метод используется для количественного определения концентрированных растворов. Концентрированные растворы - это рабочие растворы лекарственных веществ (ЛВ) определённой, более высокой концентрации, чем эти растворы прописываются в аптеках.

При приготовлении концентрированных растворов следует избегать концентраций близких к насыщенным, т.к. при понижении температуры раствора возможна кристаллизация растворённого вещества.

Рисунок 2

Зависимость показателя преломления водных растворов некоторых веществ от концентрации:



Формулы расчёта для исправления концентрации растворов, изготовленных массообъемным способом

➤ Концентрация раствора оказалась выше требуемой.

Объем воды, необходимый для разбавления полученного раствора, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot (C - B)}{B}$$

Где:

- X – количество воды, необходимое для разбавления изготовленного раствора (мл.);
 A – объем изготовленного раствора (мл.); B - требуемая концентрация раствора (%);
 C – фактическая концентрация раствора (%).

➤ Концентрация раствора оказалась ниже требуемой.

Массу ЛВ для укрепления полученного раствора вычисляют по формул

$$X = \frac{A \cdot (B - C)}{100 \cdot \rho_{20} - B}$$

Где:

- X – масса вещества, которую следует добавить к раствору (г);
 A – объем изготовленного раствора (мл.);
 B – требуемая концентрация раствора (%);
 C – фактическая концентрация раствора (%);
 ρ_{20} – плотность раствора при 20°C (г/мл, г/см³)

4. РЕФРАКТОМЕТРЫ ПРИМЕНЯЮТСЯ

1. В МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЯХ для определения белка в моче, сыворотке крови, плотности мочи, анализ мозговой и суставной жидкости, плотности субретинальной и других жидкостей глаза. Использование рефрактометра позволяет значительно сократить затраты времени при массовых обследованиях пациентов.
2. В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ рефрактометр ИРФ-454 Б2М может применяться для исследования водных растворов различных лекарственных препаратов: кальция хлорида (0% и 20%); новокаина (0,5%, 1%, 2%, 10%, 20%, 40%); эфедрина (5%); глюкозы

(5%, 25%, 40%); магния сульфата (25%); натрия хлорида (10%); кордиамина и т.д.

3. В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ:

на сахарных и хлебных заводах, кондитерских фабриках для анализа продуктов и сырья, полуфабрикатов, кулинарных и мучных изделий рефрактометр ИРФ-454 Б2М определяет влажность меда (до 20 %) для определения доли сухих веществ в различных сулах, "промочке", сахараагравом сиропе, сиропе для мармелада, зефира, кремов и пряников, "тиражки" для пряников; для определения массовой доли растворимых сухих веществ по сахарозе (BRIX) в продуктах переработки плодов и овощей, для определения процентного содержания жира в твердых продуктах питания (пряники, вафли или хлебобулочных изделий) концентрации солей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение концентрации исследуемых растворов этилового спирта и глюкозы

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

Научиться строить калибровочные графики и по ним определять концентрацию исследуемых растворов.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Растворы спирта этилового и глюкозы неизвестной концентрации.

Методика определения.

1. Рассчитывают и готовят растворы спирта этилового (20%, 40%, 50%, 60% - объемные концентрации) из 95% (φ) спирта ($\rho = 0,791$) и глюкозы (2%, 4%, 6%, 8%, 10%) в объеме равном 10 мл. Рассчитывают массовую концентрацию приготовленных спиртовых растворов. Все расчеты записывают в таблицу № 1:

Таблица № 1

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
C ₂ H ₅ OH (φ)	10%	20%	40%	50%	60%
V(EtOH)					
V(H ₂ O)					
C ₂ H ₅ OH (ω)					
n ²⁰ _D (C ₂ H ₅ OH) _{сред}					
C ₆ H ₁₂ O ₆	2%	4%	6%	8%	10%

m(глюкозы)					
V(H ₂ O)					
$n_D^{20}(C_6H_{12}O_6)_{\text{сред}}$					

2. Определяют показатель преломления каждого раствора. Определение проводят следующим образом:

- с помощью термостата устанавливают требуемую температуру (20°C),
- источник электрического света направляют на светоприемник, поднимают освещающую призму и наносят с помощью стеклянной палочки 2-3 капли анализируемой жидкости на горизонтальную поверхность измерительной призмы; толщина анализируемой жидкости между призмами должна составлять 0,1 мм (для равномерного распределения жидкости по всей поверхности рекомендуется несколько раз поднять и опустить освещающую призму).
- Опускают освещающую призму,
- систему термостатируют,
- вращают регулятор до тех пор, пока граница полного внутреннего отражения в поле зрения не станет резкой;
- границу, освобожденную от цветового ореола, совмещают с точкой крестообразного пересечения линий и считывают результат измерения со шкалы прибора.
- Показатель преломления определяют по верхней шкале с точностью до четвертого знака после запятой.
- После завершения измерений тщательно очищают поверхность призм мягкой бумажной салфеткой, смоченной в эфире или ацетоне.

Рекомендуется измерение проводить быстро. Если в фармакопее при показателе преломления не указана температура, при которой проводили измерение, то, значит, измерение проводили при 20 °С. Полученные результаты записываются следующим образом: например для хлороформа (CHCl₃) $n_D^{20} = 1,4486$. Результаты заносят в таблицу:

3. Рассчитывают F – фактор прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1 %.
4. Строят калибровочный график зависимости показателя преломления от концентрации.
5. Определяют показатель преломления растворов неизвестной концентрации (задачи), и по калибровочному графику находят их концентрации.
6. Рассчитывают ошибку определения (в сравнении с реальной концентрацией задач).

Таблица № 2:

	X	1 n_D^{20}	2 n_D^{20}	3 n_D^{20}	сред n_D^{20}	C (X)	C _{заданная}	Ошибка
C ₂ H ₅ OH	X ₁							
	X ₂							
C ₆ H ₁₂ O ₆	X ₁							
	X ₂							

Вывод:

Вывод записывают по точности определения концентрации исследуемых растворов.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Студент приготовил раствор кофеин-бензоата натрия массо-объемным способом и провел определение показателя рефракции этого раствора. Рассчитайте концентрацию раствора кофеин-бензоата натрия, если показатель преломления раствора $n_D^{20} = 1,3663$, воды $n_D^{20} = 1,333$. Фактор показателя преломления кофеин-бензоата натрия 0,00112.
2. В межбольничной аптеке был изготовлен раствор калия йодида для проведения физиопроцедур при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей. Рассчитайте концентрацию раствора калия йодида, по фактору показателя преломления (для всех концентраций фактор прироста показателя преломления калия йодида 0,00130), если показатель преломления анализируемого раствора $n_D^{20} = 1,3462$, воды $n_D^{20} = 1,333$.
3. Раствор гексаметилентетраамина (метенамина) назначается при цистите (воспалении мочевого пузыря). Рассчитать фактор прироста показателя преломления раствора гексаметилентетраамина, если раствор с концентрацией 19,2 % имеет показатель преломления $n_D^{20} = 1,3670$, а воды $n_D^{20} = 1,333$.
4. Рассчитать фактор прироста показателя преломления раствора кофеинбензоата натрия, если раствор с концентрацией 33,5% имеет показатель преломления $n_D^{20} = 1,3973$, а воды $n_D^{20} = 1,333$.
5. Рассчитать фактор прироста показателя преломления калия бромиды, если навеска препарата 1,3880 г была растворена в 20 мл воды, и показатель преломления этого раствора $n_D^{20} = 1,3417$, а воды $n_D^{20} = 1,333$. Плотность воды $\rho = 1$ г/мл.
6. Рассчитать фактор прироста показателя преломления кофеин бензоата натрия, если навеска препарата 10,0 г была растворена в 40 мл воды, и показатель преломления этого раствора $n_D^{20} = 1,3812$, а воды $n_D^{20} = 1,333$. Плотность воды $\rho = 1$ г/мл.