



Интегрисане академске студије фармације Инструменталне методе- Б14

П1. Принципи и подела инструменталних метода. Електромагнетно зрачење. Квалитативна и квантитативна анализа. Ламберт-Беров закон.



Проф. др Недељко Манојловић

Инструменталне методе- Б14

- IV семестар 2+2

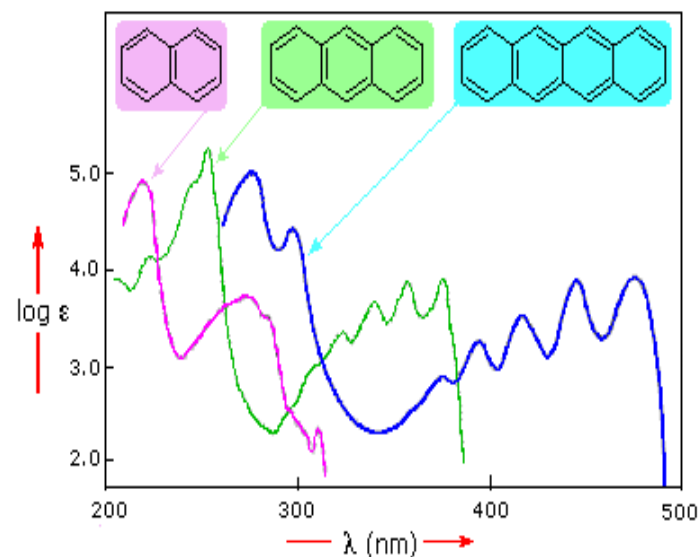
- ПРЕДАВАЊА:

Проф. др Недељко Манојловић
Шеф Катедре за другу годину
фармације

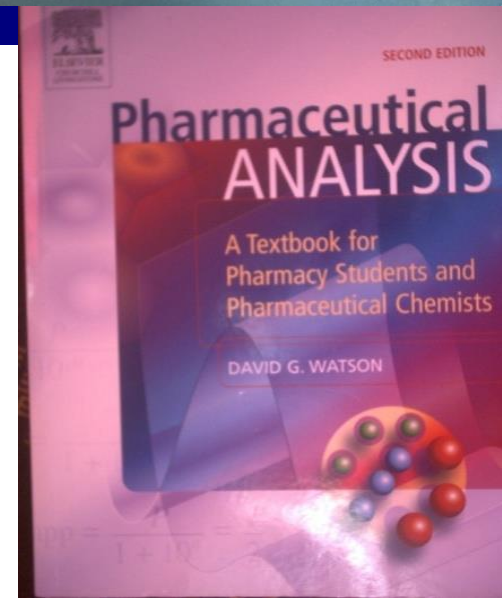
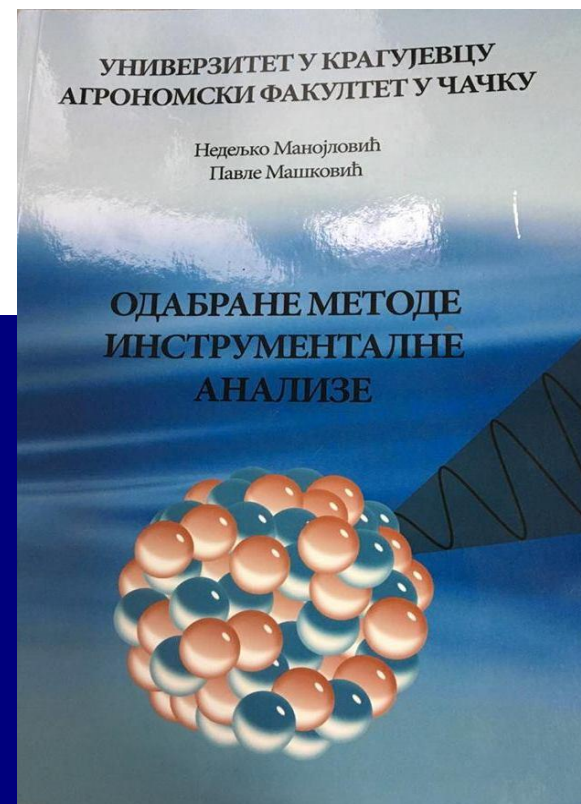
- ВЕЖБЕ: асс. Јовица Томовић

- 5 ЕСПБ

- Обавезан предмет

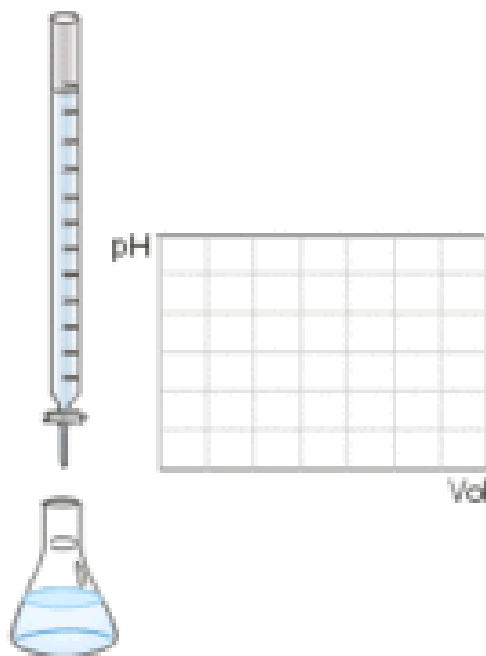


1. Инструменталне спектроскопске и хроматографске методе анализе, Недељко Манојловић, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 2016
2. Одабране методе инструменталне анализе, Недељко Манојловић и Павле Машковић, Агрономски факултет Универзитета у Крагујевцу, 2016
3. Pharmaceutical analysis **David G. Watson** Second edition, Elsevier, UK 2005



МЕТОДЕ КОЈЕ СЕ ПРИМЕЊУЈУ У ФАРМАЦЕУТСКОЈ АНАЛИЗИ

■ ТИТРИМЕТРИЈСКЕ И ХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ АНАЛИЗЕ

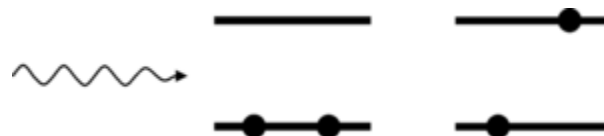
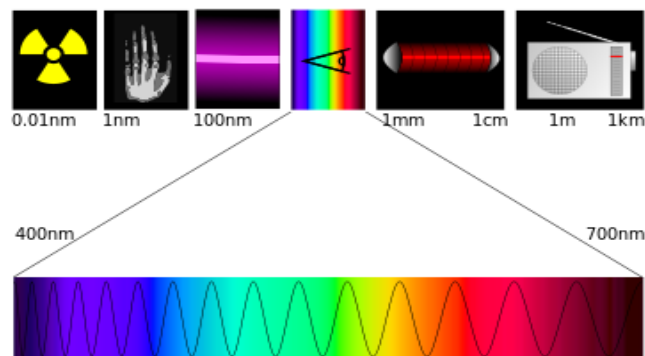


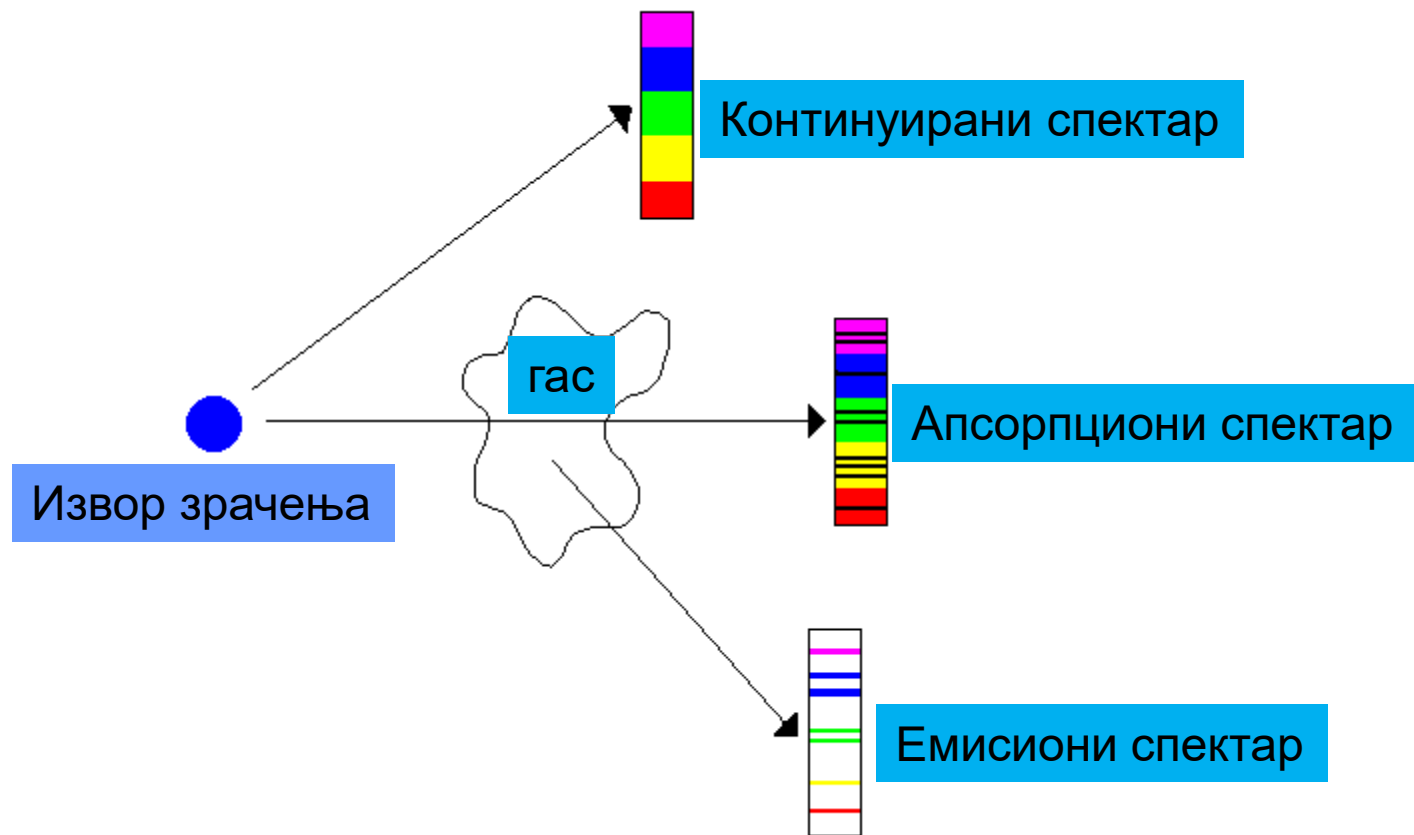
■ СПЕКТРОСКОПСКЕ МЕТОДЕ:

а) квалитавне методе анализа
анализе

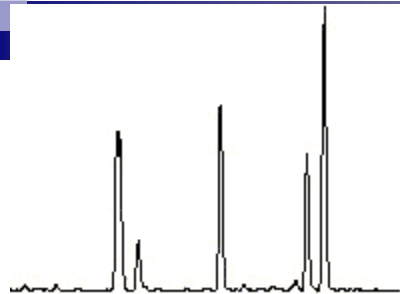
б) квантитативне методе

- UV/VIS спектроскопија – електронски прелази, више квантитативна
- IR спектроскопија – вибрације и ротације молекула, више квалитативна
- NMR спектроскопија – понашање језгра у магнетном пољу, више квалитативна
- масена спектрометрија (фрагментација молекула и настајање фрагмената), квалитативна
- колориметрија





- Атомска апсорпциона спектрофотометрија (ААС), апсорпција светлости од стране атома, одређивање хемијских елемената
- нпр. клиничка анализа крви (Ca, Mg, Li, Na, K, Fe),
- анализа адитива и уљима и мастима (Ba, Ca, Na, Li, Zn, Mg)
- анализа воде и хране
- Пламена фотометрија
- Молекулска емисиона спектроскопија (флуоресцентна и Раманова спектроскопија)
- Флуоресценција и фосфоресценција
- Електроаналитичке методе
- Оптичке методе анализе



- **ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ :**

- TLC (хроматографије на танком слоју), хроматографија на хартији, R_f вредност
- Гасна хроматографија (ГН) за идентификацију компонената смеше и одређивање њихове количине, користи се ГН колона и гас носач, нпр. етарских уља
- HPLC (High performance liquid chromatography) за раздвајање и идентификацију компонената смеше и одређивање њихове количине – користи се течност (растварачи)

- **КОМБИНОВАНЕ МЕТОДЕ:**

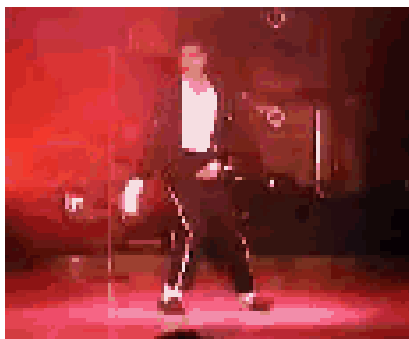
GC-MS,

GC-IR,

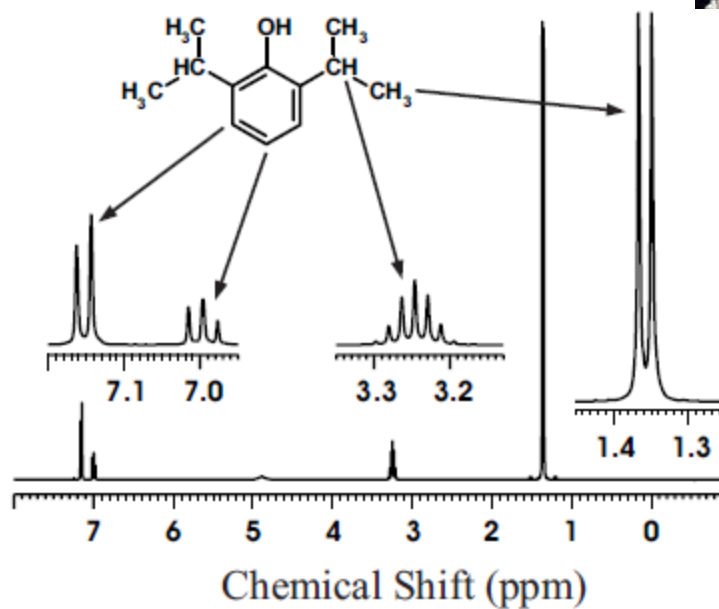
HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-UV-NMR ...

Шта је Пропофол?

2009.

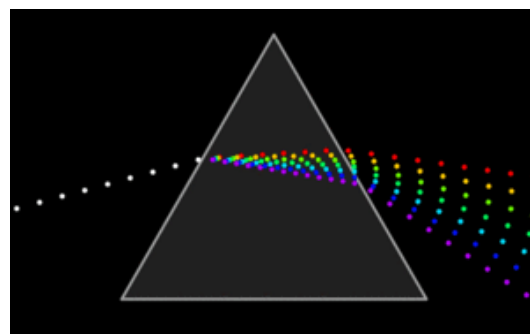


NMR



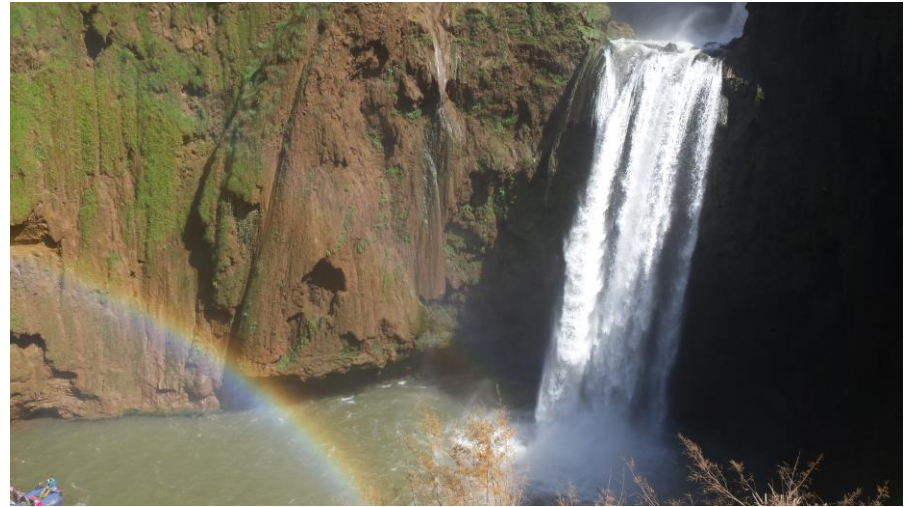
□ Основна својства електромагнетног зрачења

- Електромагнетно зрачење има **двојака својства**: таласна и честична (корпускуларна).



- **Таласна природа** електромагнетног зрачења постаје знатно јаснија када се разматра простирање овог зрачења у простору (преламање, дифракција и интерференција).
- **Честично (корпускуларно)** разматрање се примењује када се посматра интеракција зрачења са атомима и молекулима испитиване супстанце (апсорпција или емисија).

- Електромагнетско зрачење се карактерише:
- брзином простирања,
- таласном дужином,
- фреквенцијом,
- таласним бројем и
- енергијом.



Веза између таласне дужине и фреквенције дата је релацијом:

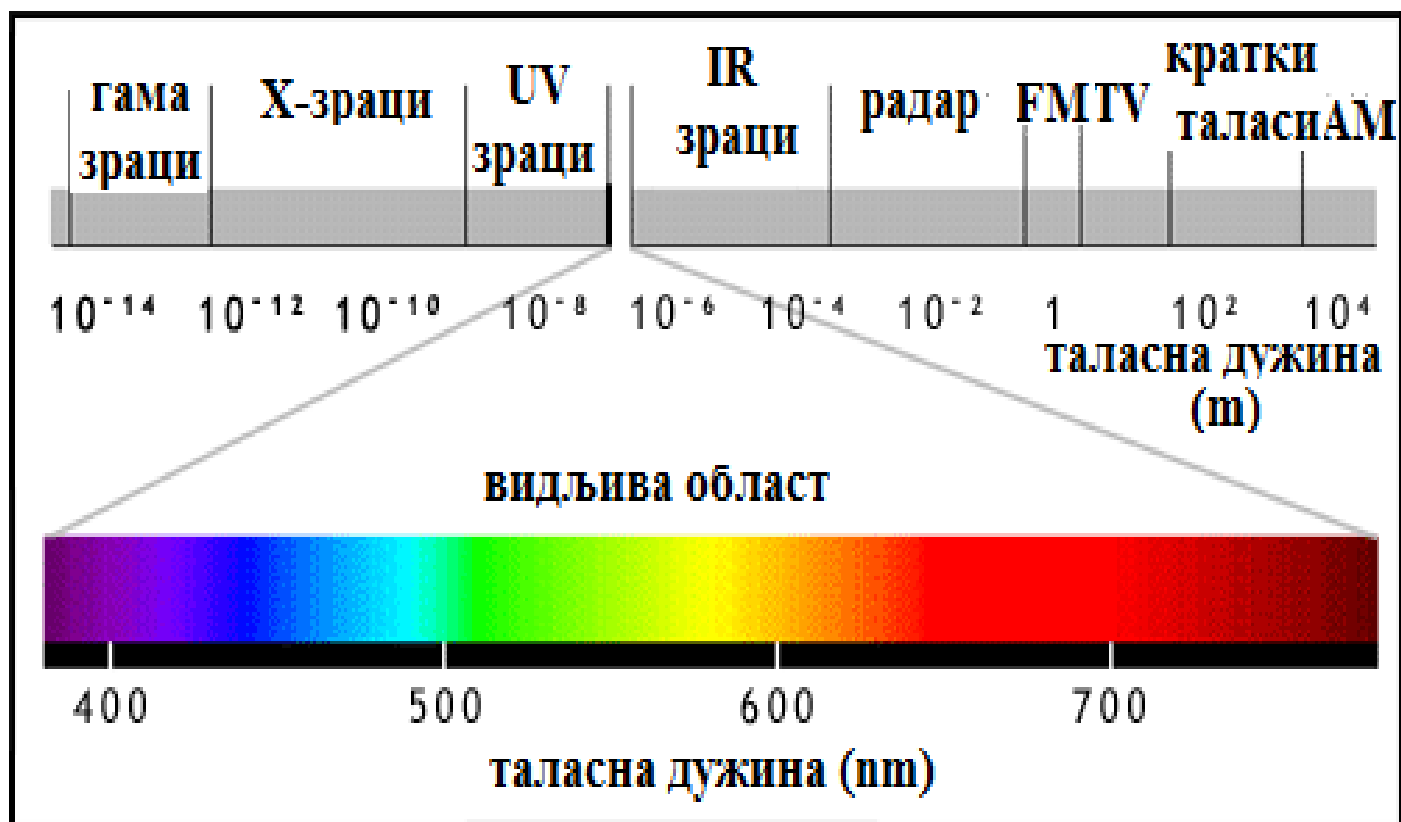
$$\lambda \nu = c$$

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

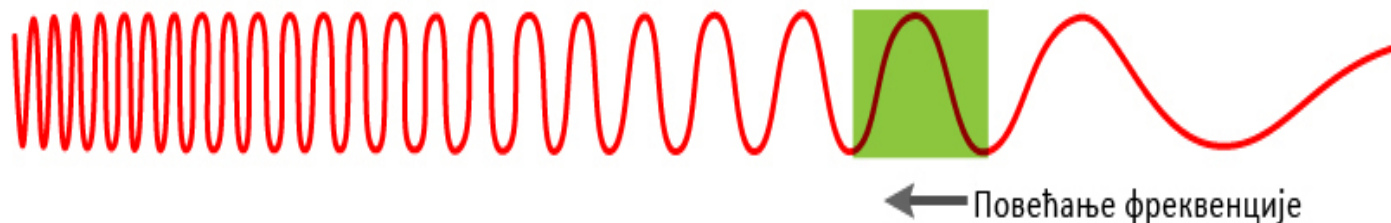
$$c = 2,9979 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$$

Таласни број, представља број таласа на јединици дужине, обично један центиметар.

$$\tilde{\nu}$$



Спектар електромагнетног зрачења



Повећање фреквенције у спектру ЕМЗ

Енергија зрачења

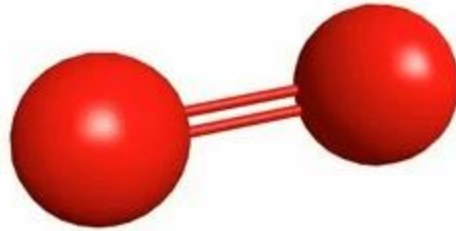
Укупна енергија атома или молекула је збир њихове транслаторне, ротационе, вибрационе и електронске енергије. За сваки од ових типова енергија, постоје одговарајући енергетски нивои.

$$E_y = E_t + E_r + E_v + E_e$$

- **Ротациона енергија** је кинетичка енергија коју поседује молекул за време ротације око своје осе кроз њихово тежиште. Ова енергија је квантирана и даје апсорпциони спектар у микроталасној области електромагнетног зрачења.

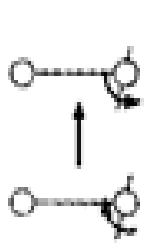
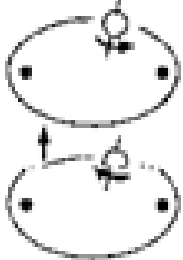

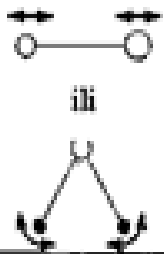



- **Вибрациона енергија** је кинетичка и потенцијална енергија коју поседује молекул за време вибрационог кретања. Атоми и молекули се могу сматрати као тачкасте масе које се међусобно држе хемијским везама које се понашају као опруге. С обзиром да молекул није крут, његова флексибилност резултује у вибрационом кретању.



Вибрациона енергија

- Вибрациона енергија је квантирана и даје спектар у инфрацрвеној области. Релативно растојање између вибрационих енергетских нивоа увећава се са повећањем јачине хемијске везе између атома.
- **Електронска енергија** је енергија коју поседује молекул или атома као потенцијалну и кинетичку енергију својих електрона. Кинетичка енергија је резултат кретања, а потенцијална енергија је последица интеракције електрона са језгром или другим електронима. Електронска енергија је квантирана и даје спектар у видљивом ултраљубичастом делу електромагнетног зрачења.

промена спина	промена оријентације	промена конфигурације	промена расподеле електрона	промена нуклеарне конфигурације
				
10^{-2}	1	100	10^4	10^8
10 m	100 cm	1 cm	100 μ m	1 000 nm
3×10^4	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}
10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^8
NMR	ESR	микроталасна	инфрацрвена	видљива и ултраљубичаста
				x-зраци
				γ -зраци

области спектра електромагнетног зрачења и промене до којих долази код молекула

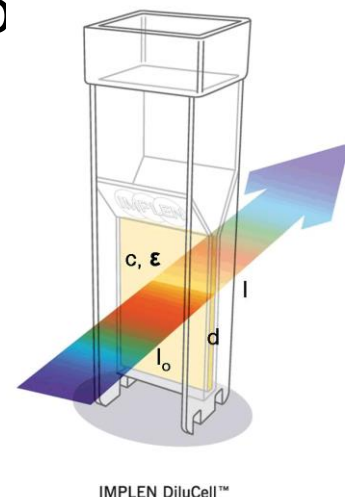
Назив	Гранична λ/m	Побуђивање
Х-зрачење	$10^{-12} - 10^{-8}$	Електрона из К или L орбитале
Далеко ултра- љубичасто	$10^{-8} - 2 \cdot 10^{-7}$	Електрона из средњих орбитала
Блиско ултраљуб.	$2 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-7}$	Валентних електрона
Видљиво	$4 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-7}$	Валентних електрона
Блиско IR	$8 \cdot 10^{-7} - 2.5 \cdot 10^{-6}$	Молекулских вибрација
Средње IR	$2.5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$	Молекулских вибрација
Далеко IR	$5 \cdot 10^{-5} - 10^{-3}$	Молакулских ротација и вибрација ниских енергија
Микроталасно зрачење	$10^{-3} - 1$	Молекулских ротација и електронске парамагнетне резонанције
Радиоталаси	$1 - 10^3$	Нуклеарне магнетне резонанције

- Квантитативна анализа се заснива на **Lambert-Beer-овом закону** по коме је моларна концентрација неког једињења директно пропорционална његовој апсорбацији.

Ова зависност је дата следећим изразом:

$$A = \epsilon cd$$

- где је:
- A = апсорбација
- ϵ = моларни екстинкциони коефицијент (моларна апсорптивност)
- d = дужина путање зрака кроз узорак, односно дебљина ћелије (најчешће 1 cm)
- У фармацеутским прорачунима концентрација се чешће изражава у g или mg него у моловима, па се уместо ϵ користи екстинкциони коефицијент A (1%, 1cm).
- $\epsilon = 10^{-1} A(1\%, 1\text{cm}) \times M$ M = молекулска маса



- Приликом проласка електромагнетског зрачења кроз неку средину долази до смањења интензитета упадног снопа зрачења. Физички процеси који доводе до слабљења интензитета зрачења су; апсорпција, резонанција, флуоресценција (фосфоресценција), рефлексија и расипање светлости.
- Примењујући закон о одржању енергије, можемо написати:

$$I_0 = I_a + I_p + \sum I_r$$

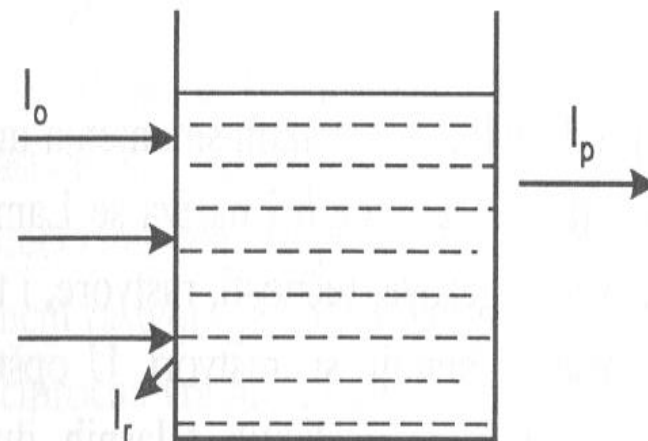
где је:

I_0 - интензитет упадног зрачења

I_a - интензитет апсорбованог зрачења

I_p - интензитет пропуштеног зрачења

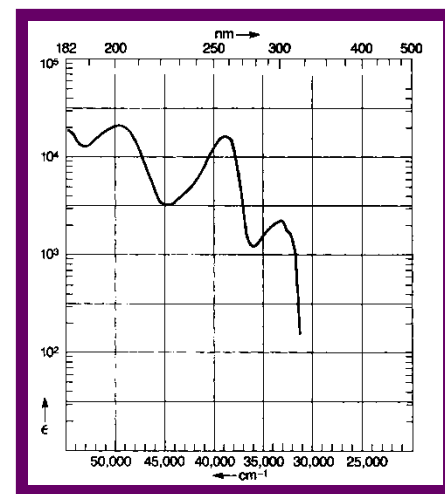
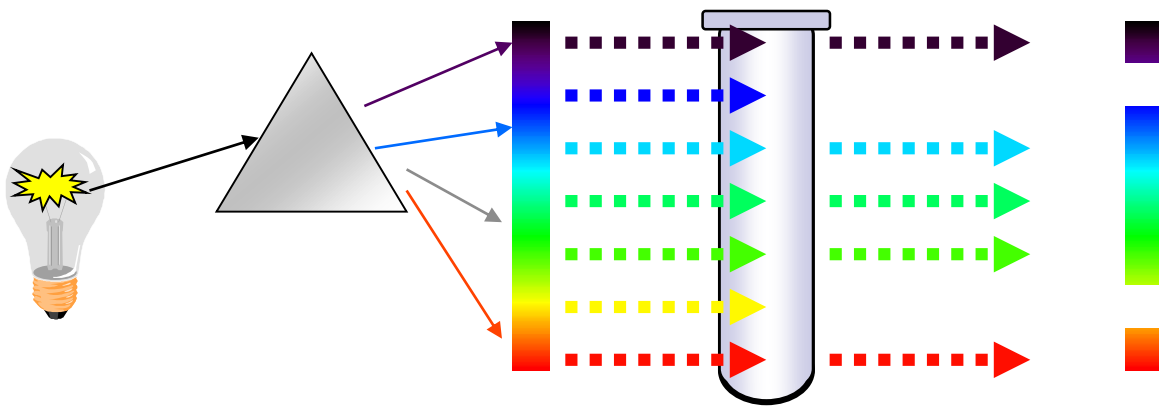
последњи члан означава збир интензитета рефлектованог, расутог, резонантног и флуоросцентног (фосфоресцентног) зрачења.



- **Моларна апсорптивност** је једнака апсорбанци раствора јединичне концентрације и дебљине слоја и може се дефинисати као реципрочна вредност дебљине слоја која почетни интензитет зрачења смањује за пута.

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

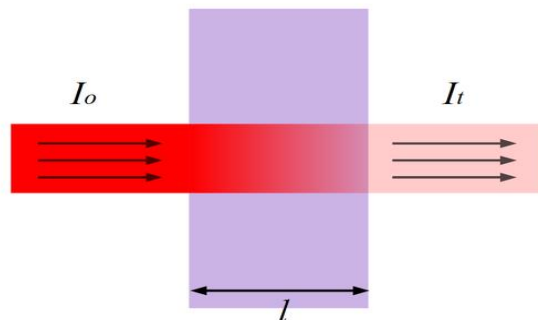
апсорбанца је адитивна величина.



$$\frac{I_p}{I_0} = 10^{-abc}$$

логаритмовањем ове једначине
добиамо:

$$\log \frac{I_0}{I_p} = abc = -\log T$$



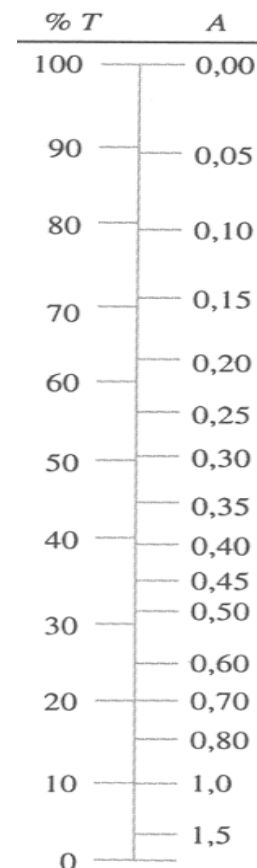
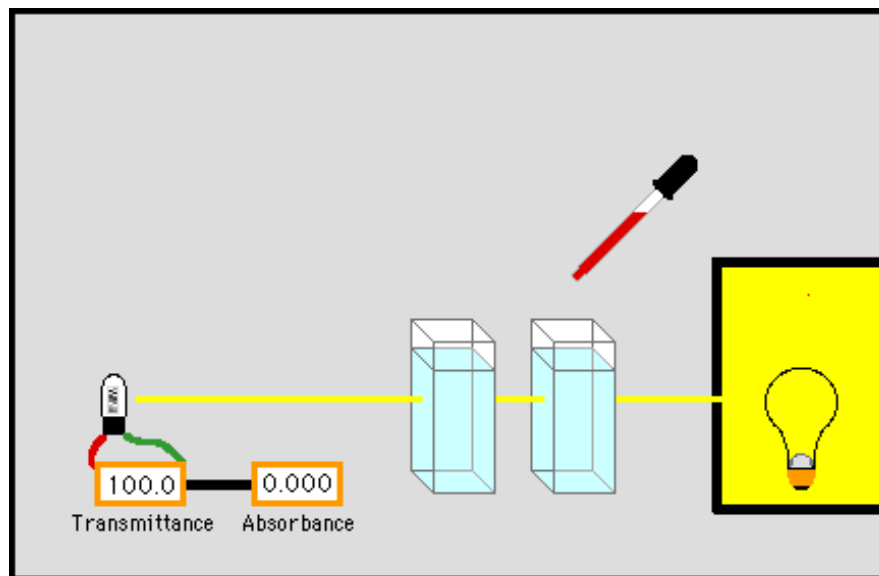
I_0 - интензитет упадног зрачења

I_a - интензитет апсорбованог зрачења

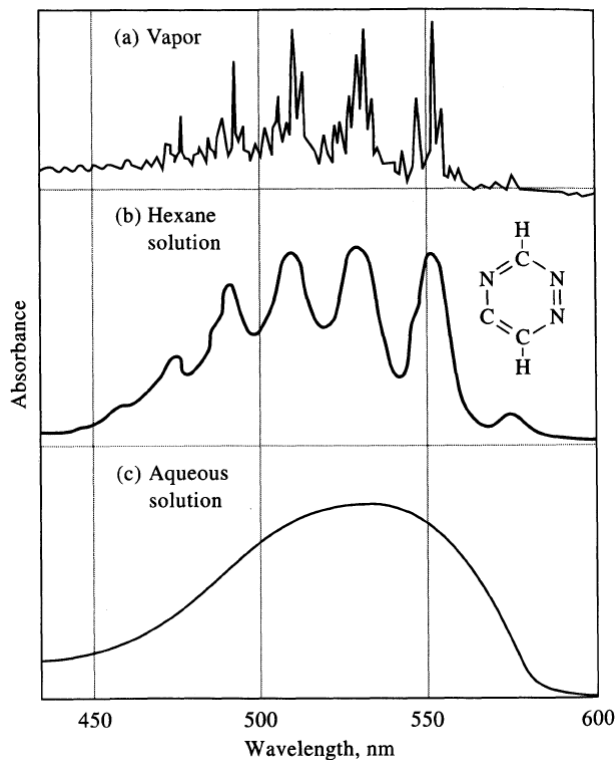
I_p - интензитет пропуштеног зрачења

уместо транспаренције је уведена нова величине,
апсорбанца која је једнака :

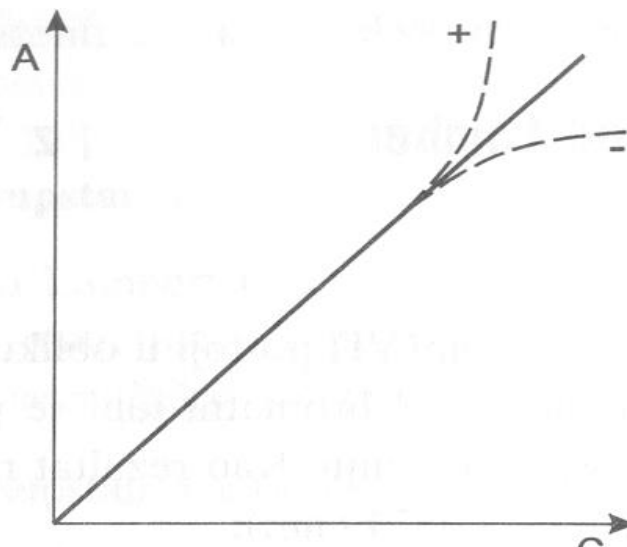
$$A = -\log T$$



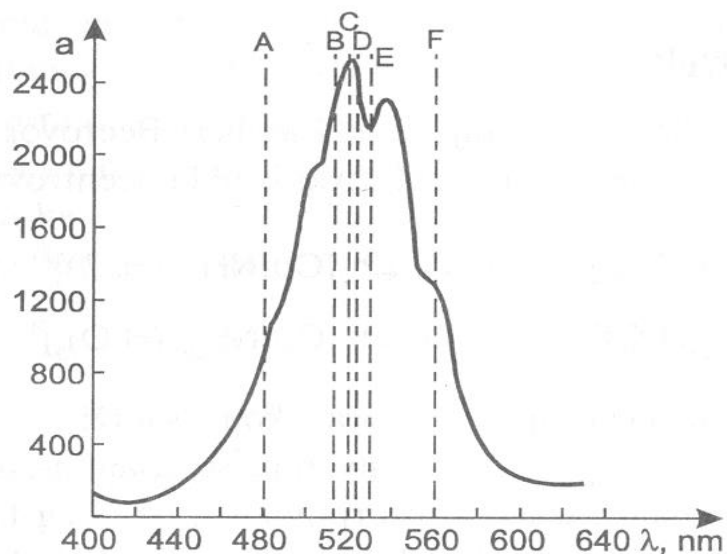
- Графички приказ моларне апсорптивности од таласне дужине зрачења (или фреквенце) за константну дебљину слоја, концентрацију, температуру назива се **апсорпциони спектар супстанце**.



Део видљивог апсорпциоиниг спектра 1,2,4,5-тетразина



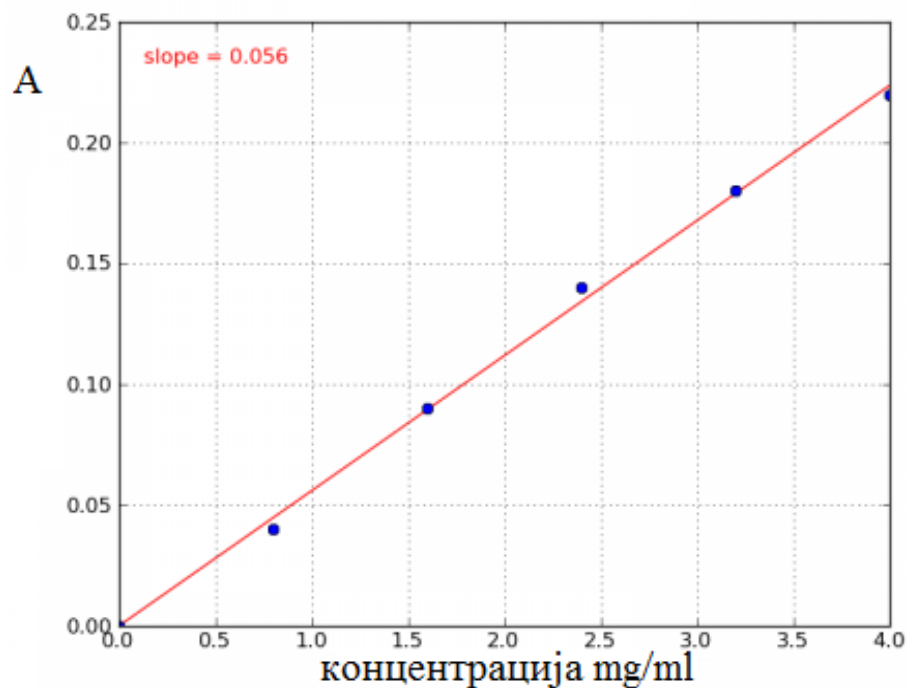
Одступања од Ламберт-Бееровог закона



Апсорпциони спектар

- У спектрофотометријској анализи се користе следеће квантитативне методе:

1) **метода стандардне криве** — направи се серија стандардних раствора познатих концентрација и конструише калибрациона крива (зависност A од c). Затим се измери A раствора непознате концентрације и екстраполацијом очита непозната концентрација.



Калибрациона крива

2) метода помоћу раствора стандардне супстанце за упоређивање - метода стандарда

$$X = (A \cdot a_1 / A_1 \cdot a) \cdot 100$$

X - маса испитиваног узорка (%)

A, A₁ - апсорбанција раствора узорка и стандарда

a, a₁ - измерена маса узорка и стандарда у грамима у 100 ml раствора

3) метода специфичног апсорпционог коефицијента

$$X = A \cdot f / A(1\%, 1\text{cm}) \cdot a$$

X - маса испитиваног узорка (%)

A - апсорбанција раствора узорка

A(1%1cm) - специфични апсорпциони коефицијент

f - укупна запремина (ml) у којој је растворено а грама узорка

a - одмерена маса узорка у грамима