



# Интегрисане академске студије фармације

## Инструменталне методе - Б14

### **П 3.**

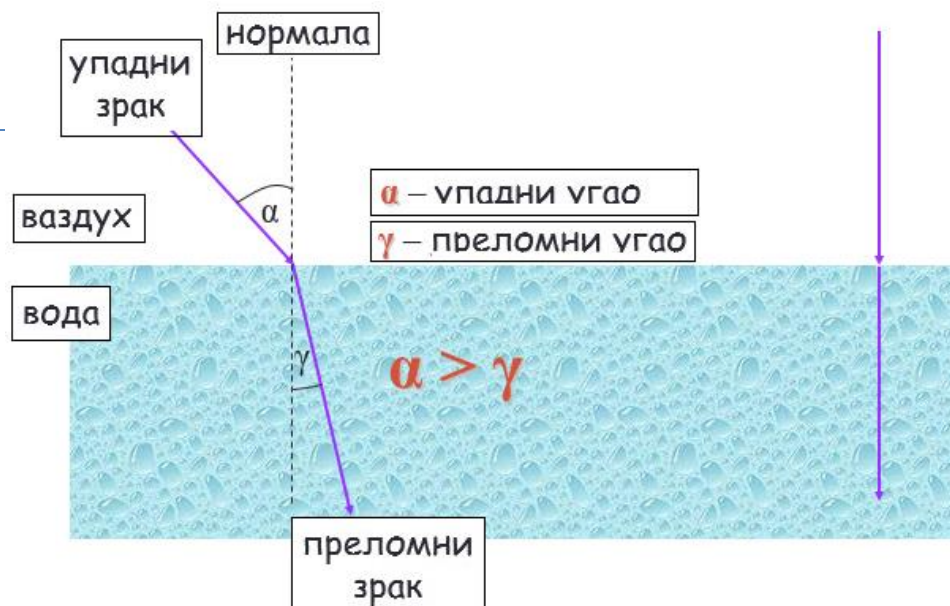
### **Основе рефрактометрије, полариметрије и колориметрије**

**Проф. др Недељко Манојловић**



**Рефрактометрија** се заснива на законима преламања и одбијања светлости на граници између две средине које имају различите густине, односно кроз које светлост пролази различитим брзинама.

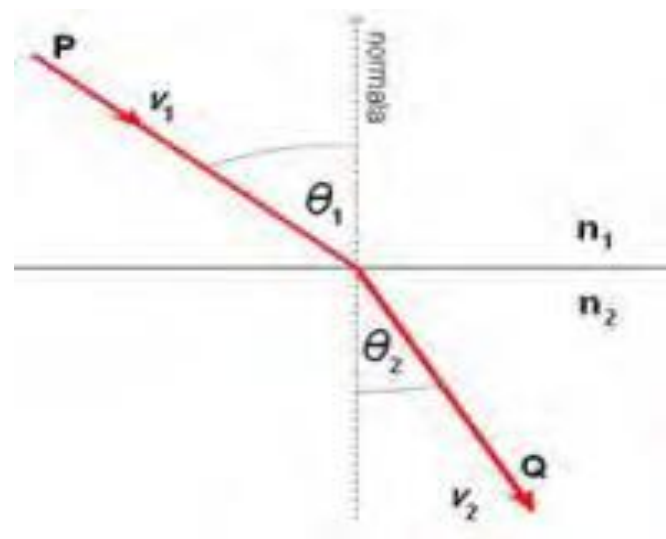
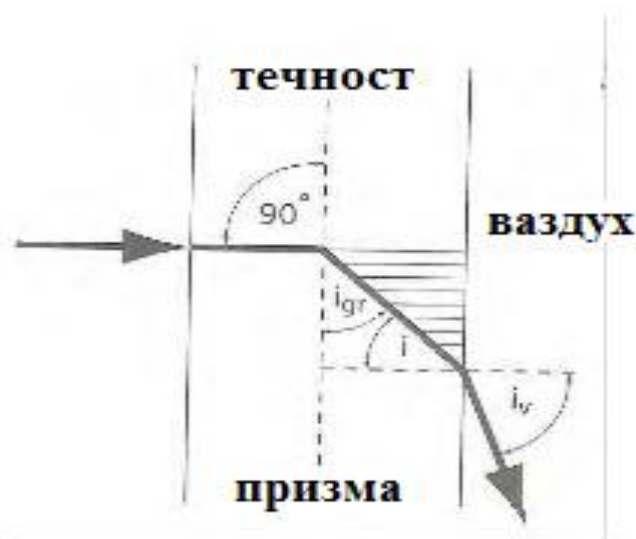
- Приликом преласка из једне у другу средину на граничној површини која раздваја те две средине долази до промене правца простирања светлосних зрака. Та појава се назива **преламање светлости**.





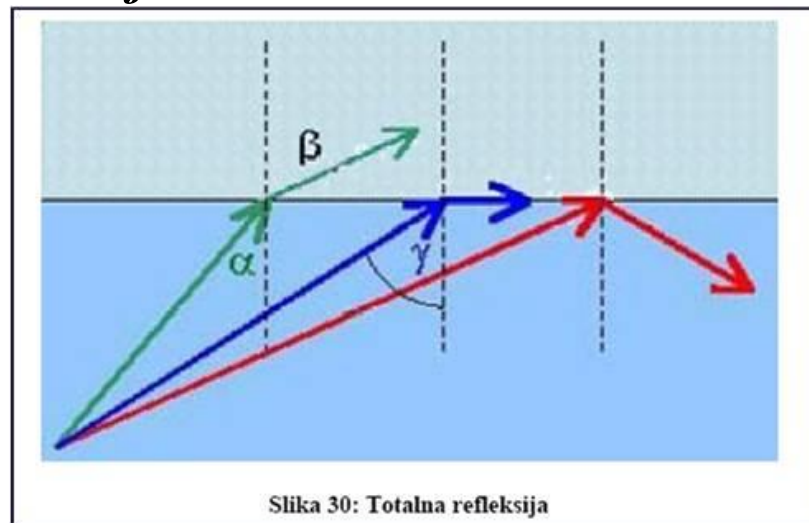
- **Индекс преламања** представља физичку особину супстанце која се може одредити при аналитичким одређивањима и представља број који показује колико пута је брзина светлости у некој средини мања од брзине светлости у вакууму.
- **Индекс преламања супстанце строго зависи** од температуре и таласне дужине употребљене светлости и то тако да опада са порастом ових параметара, па се мора обратити пажња на температурне разлике и таласне дужине (систем се термостатира). Како индекс преламања зависи и од температуре, потребно је у току времена одржавати константну температуру.
- **Температура** се очитава на термометру, који се поставља на одређеном месту у окулару призме. Мерења се обично врше на стандардној температури од **20 °C** (68 °F), која се сматра собном температуром.
- За **таласну дужину** обично се користи натријумова линија дужине 589,3 nm.

- Одређивање индекса преламања неке течности заснива се на мерењу граничног угла  $i_{gr}$  при преласку светлости из испитиване течности у стаклену призму познатог индекса преламања  $N$ .



Преламање светлости при  
преласку из једне средине у  
другу

- **Гранични угао** *igr* је највећи угао под којим се може преломити зрак кад прелази из једне средине у другу. Да би се то постигло, светлост мора да пада на додирну површину две средине скоро паралелно, односно под углом од  $90^\circ$  у односу на нормалу. Зраци који падају под углом већим од граничног не би могли прећи у течност, већ би се одбијали од површине призме и поново у њу враћали. Ова појава се назива **тотална рефлексија**.



ваздух

вода

Slika 30: Totalna refleksija



## АПСОЛУТНИ ИНДЕКС ПРЕЛАМАЊА

Индекс преламања неке средине представља однос брзине светлости у вакууму и у тој средини. Означава се малим словом  $n$ .

$$n = \frac{c_0}{c}$$

$c_0$  – брзина светлости у вакууму

$c$  – брзина светлости у некој средини

## РЕЛАТИВНИ ИНДЕКС ПРЕЛАМАЊА

$$n_r = \frac{c_1}{c_2}$$

$c_1$  – брзина светлости у првој средини

$c_2$  – брзина светлости у другој средини

$$c_1 = \frac{c_0}{n_1} \quad c_2 = \frac{c_0}{n_2}$$

$$n_r = \frac{n_2}{n_1} = n_{21}$$

$n_1$  и  $n_2$  – апсолутни индекси преламања за прву односно другу средину

## ТОТАЛНА РЕФЛЕКСИЈА

Када светлосни зрак прелази из оптички гушће у ређу средину, преломни угао је већи од упадног угла - зрак скреће од нормале.





**Апсолутни индекс преламања**

$$n = \frac{c_0}{c}$$

$c_0$  - брзина светлости у вакууму

$c$  - брзина светлости у датој средини





Користе се три типа рефрактометара: ручни, стони и рефрактометар са призмом која се урања у течност (имерзион рефрактометар). **Рефрактометрима** се одређује гранични угао.

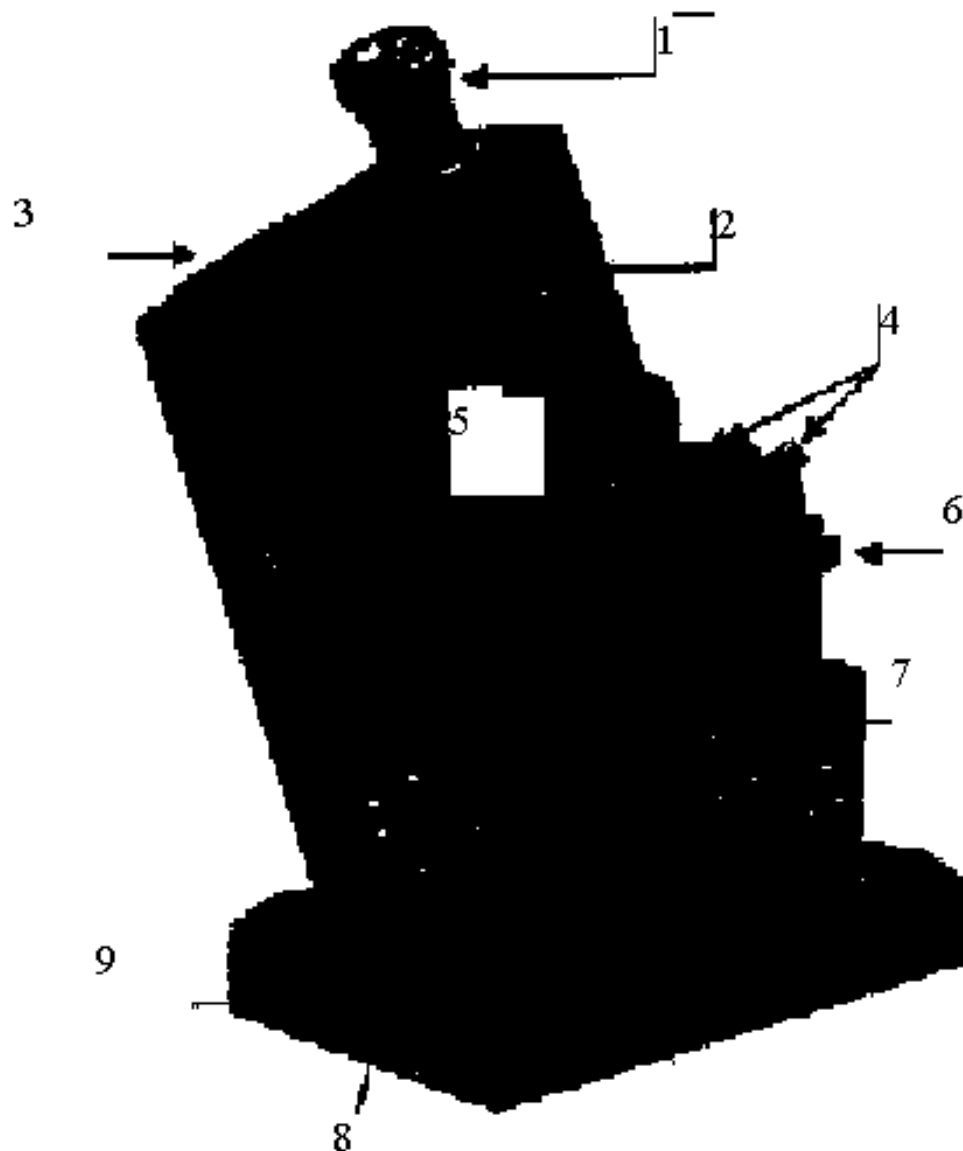


Ручни рефрактометар



Абеов рефрактометар

Термометар је означен у подеоцима од 0,5 °C или мање.



1 Окулар

2 поклопац за калибрацију

3 Дисплеј

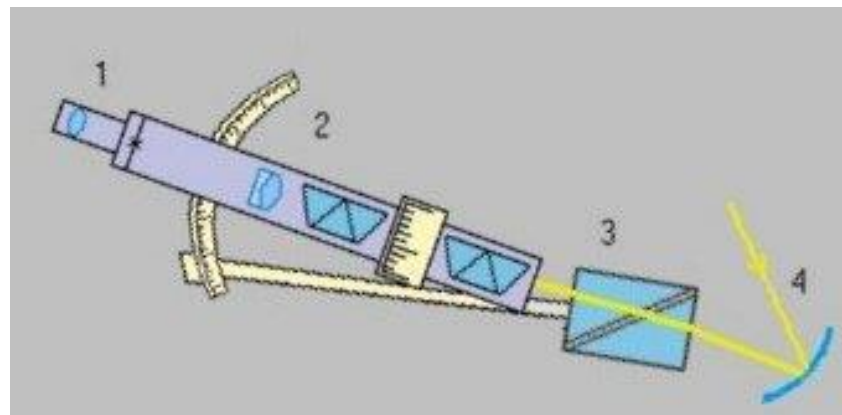
4 Места за прикључивање  
термостата

5 Дугме за компезацију

6 Прикључак за термостат

7 Дугме за померање скале

8 Избор напајања 230/115 VAC



1. окулар
2. скала
3. двострука призма са течношћу
4. огледало

**Аббеов рефрактометар** служи за одређивање индекса преламања малих количина течности), **рефрактометар с призмом за урањање** користи се за одређивање индекса преламања већих количина течности), док се **Пулфрихов рефрактометар** користи за одређивање индекса преламања течности и чврстих супстанци.













**Фатаморгана у  
пустињи**

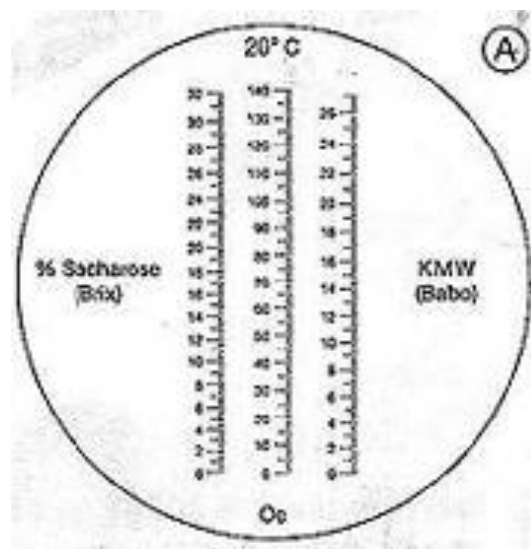
**Фатаморгана** је оптичка појава у атмосфери настала инверзијом температуре у којој се на далеком хоризонту јавља инвертован лик удаљеног објекта.

Рефлексија слике неба са топлотом ваздуха изнад песка.



Топлији ваздух – густина мања

Због повишене температуре асфалта, индекс преламања ваздуха при површини знатно је нижи него околног ваздуха због чега долази до тоталне рефлексије што ствара илузију да је на асфалту барица.



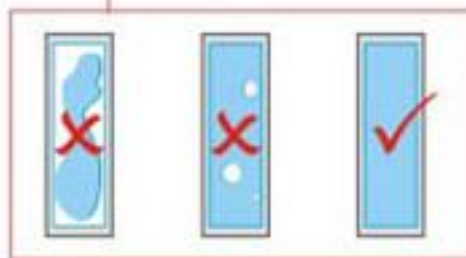
Скале рефрактометра



Мерење на рефрактометру

- По закону рефракције је:

$$n = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \text{const.}$$



Поступак мерења на ручном рефрактометру

# ПОЛАРИМЕТРИЈА

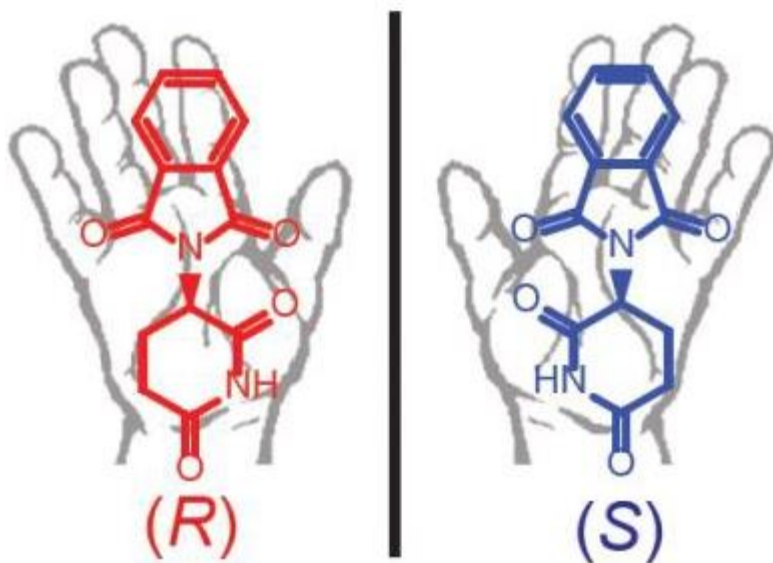
**Оптичка ротација** је способност неких супстанци да обрћу раван поларизације поларизоване светлости.

• Према фармакопеји **специфична оптичка ротација** растворене супстанце је угао ротације  $\alpha$  изражен у степенима, за који раствор који садржи 1 g/ml дате супстанце, обрне раван поларизованог светлосног зрака D-линије натријумовог спектра, измереног на 20 °C, при његовом проласку кроз слој дебљине од 1 dm.

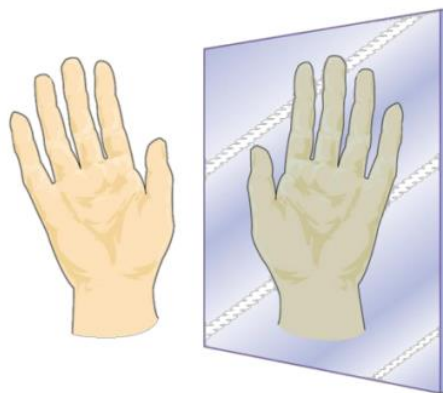
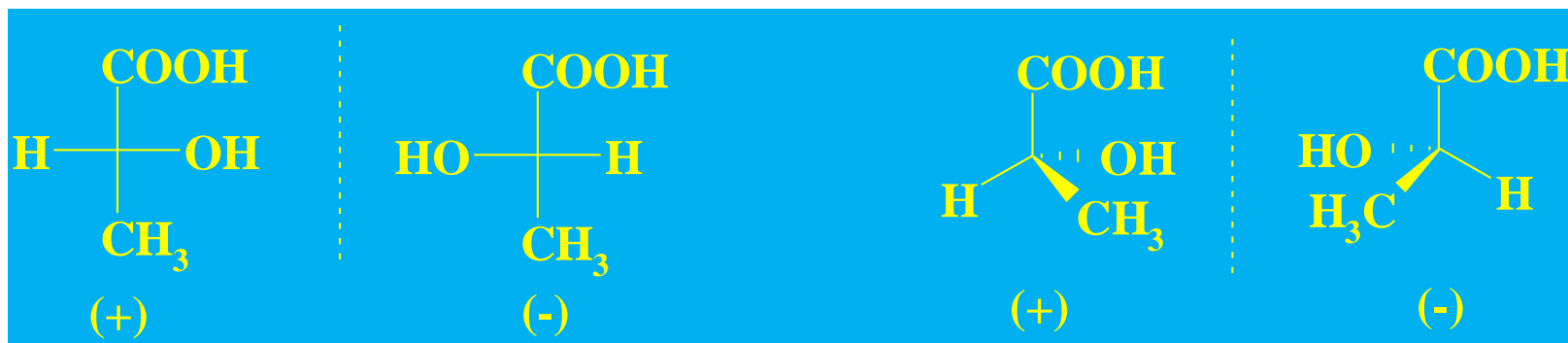
• Изражава се у јединицама ( $^{\circ}$ ) ml dm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Метода одређивања назива се **полариметрија**.

- Примена – у анализи провере квалитета оптички активних фармацеутских супстанци мерењем угла скретања равни поларизоване светлости.

енантиомери



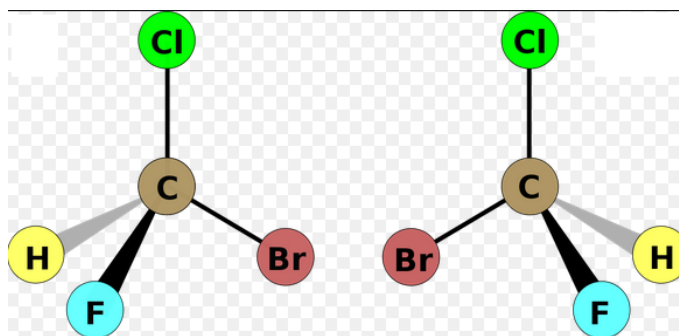
- имају исте физичке и хемијске особине, а разликују се по смеру скретања равни поларизоване светлости - (-) или S и (+) или R
- хемијски су идентични у оптички неактивној средини (према оптички неактивним реагенсима)
- могуће их је разликовати у оптички активној средини



- **Енантиомери**- односе се као предмет и његов лик у огледалу



- Енантиомери имају различите биолошке активности.



- При нестереоспецифичној синтези хиралних фармацеутских супстанци добија се еквимоларна смеша енантиомера - **рацемат или рацемска смеша**. Терапија рацематом није оправдана.
- Раздвајање енатиомера је специфично, веома тешко због брзе рацемизације и доста скупа метода (99% чистоћа хиралног дериватизационог реагенса).
- Постоје три начина за раздвајање рацемске смеше енантиомера:

# РАЗДВАЈАЊЕ РАЦЕМСКЕ СМЕШЕ ЕНАНТИОМЕРА

- механичко раздвајање - раствор рацемске смеше остави се да кристалише. Кристали (+) енантиомера се разликују од кристала (-) енантиомера тако да их је могуће одвојити. Пример. Пастер-ово одвајање натријум - амонијум ( $\pm$ ) тартарата
- биолошка метода - метаболише само један енантиомер, а други заостане када се нпр. узму као храна живим организмима
- метода помоћу дијастереоизомерних једињења - рацемска смеша реагује са неким оптички чистим хиралним реагенсом који садржи само један енантиомер при чему настају дијастереоизомери

- **дијастереоизомери** су различитих физичких особина и могу се раздвојити фракционом дестилацијом или кристализацијом, полазни енантиомер се затим регенерише неком погодном реакцијом
- пример: рацемска смеша киселине може се базом превести у со - дијастереоизомер који се одвоји нпр. кристализацијом и тражени еантиомер истисне јачом киселином из соли

Специфична оптичка ротација се израчунава из следећих израза:

За течности 
$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l\rho_{20}}$$

За чврсте 
$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100\alpha}{lc}$$

$\alpha$  = угао ротације у степенима на  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$

$l$  = дужина цеви полариметра у dm

$\rho_{20}$  = густина на  $20^\circ\text{C}$  у  $\text{g/cm}^3$



полариметар

Израчунава се садржај у g/l или садржај  $c'$  у % m/m  
растворене супстанце према следећим изразима

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha]_D^{20}}$$

C = концентрација супстанце у g/l

$$c' = \frac{100\alpha}{l[\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}}$$

$C'$  = садржај супстанце у % m/m





Дигитални лабораторијски полариметар

- Задатак

Оптичка ротација је одређена коришћењем D-линије натријума на  $25^{\circ}\text{C}$  (дужина цеви полариметра 1 cm) и износила је за фенилефрин HCl концентрације 2,6 % w/v у 0,1 M HCl,  $\alpha = -0,98^{\circ}$

Израчунати  $[\alpha]$  за ову дрогу и изразити је у конвенционалној форми



# КОЛОРИМЕТРИЈА

- Колориметријским методама врши се одређивање концентрација обојених раствора, тј. раствора који апсорбују у видљивом, или блиском УВ делу електромагнетног спектра.
- Боја коју има раствор неке супстанце комплементарна је боји коју та супстанца апсорбује.
- На пример, бакар(II) јон је бледо плаве боје, што значи да апсорбује у жутом делу спектра.



# КОЛОРИМЕТРИЈА

Да би нека супстанца могла да се одреди колориметријски, тј на основу интензитета њене боје у раствору, потребни су следећи услови:

- Интензитет боје мора бити стабилан у дужем временском интервалу јер слабљење интензитета боје може настати као последица оксидације ваздухом, фотохемијског разлагања, промене рН раствора итд.
- Боја мора бити интензивна

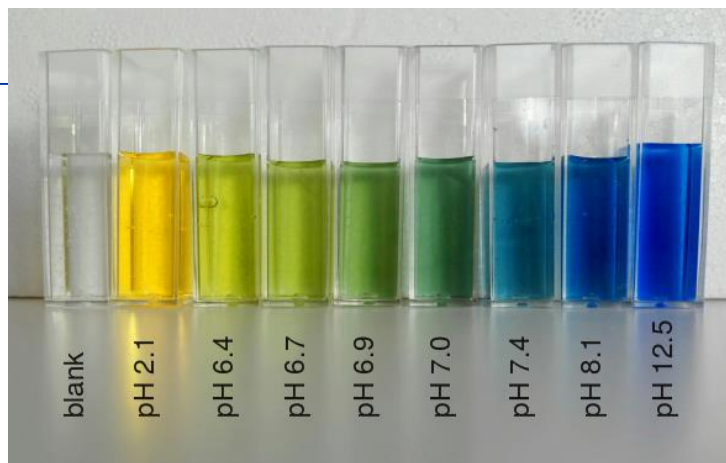


- Апсорпција зрачења мора да се поковава Lambert-Вееровом закону.

$$A = \epsilon c d$$

где је  $A$  апсорбанција,  
 $c$  концентрација (mol/l),  
 $d$  – дужина путање зрака кроз узорак (cm),  
и  $\epsilon$ -моларна апсорптивност

- Мале промене рН, температуре и других фактора не смеју битно да утичу на интензитет боје.



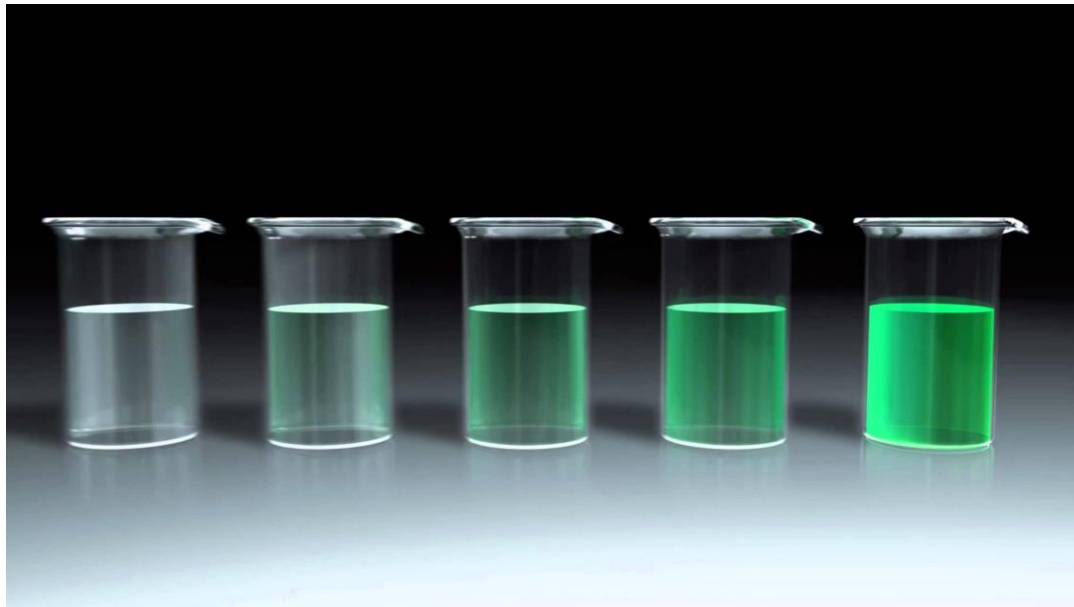
Користи се само за квантитативну анализу, при чему морају да буду испуњени следеће *услови*:

- интензитет боје мора бити стабилан у дужем временском интервалу
- боја мора бити интензивна
- апсорпција зрачења мора да се покорави Ламберт-Бееровом закону

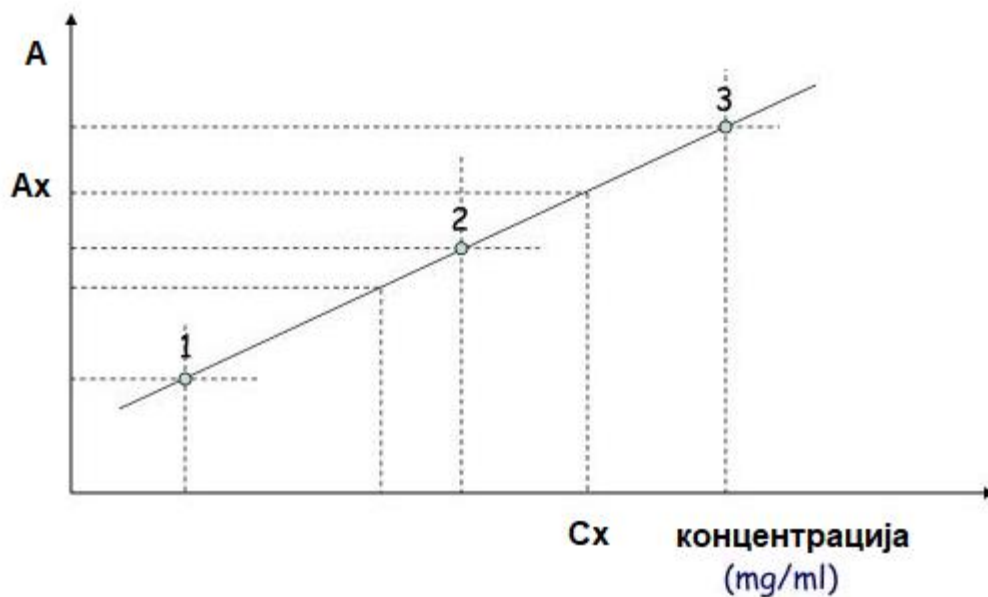




- Боја коју има раствор неке супстанце комплементарна је боји коју та супстанца апсорбује.

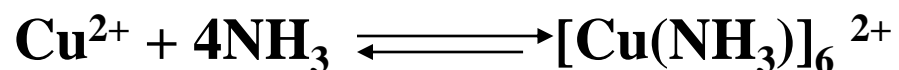


- Уколико је раствор безбојан или је интензитет неке боје недовољан, додатком погодног реагенса може превести у интензивније обојено једињење.
- Мери се апсорбанција раствора стандарда познатих концентрација, при чему се конструише калибрациона крива из које се на основу измерене вредности апсорбанције, екстраполацијом очита непозната концентрација.





- заснива се на оптичким својствима раствора бојених супстанци.
- Многе хемијске супстанце дају обојене растворе. Тако, на пример, раствор  $\text{KMnO}_4$  обојен је љубичасто, раствор  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  наранџасте боје итд.
- Уколико је интензитет боје недовољан тада се она може превести додатком погодног реагенса у интензивније обојено једињење, на пример аква-бакар(II) јон у раствору је бледо плаве боје, па се зато бакар(II) јон колориметријски одређује на основу интензивно плаве боје комплексног јона који настаје реакцијом са амонијаком:



У колориметрији се увек ради са полихроматским зрачењем што искључује могућност квалитативне анализе.

Интензитет боје мора бити стабилан у дужем временском интервалу, а боја мора бити интензивна.

Колориметрија и фотометрија се заснивају на истом принципу, а то је апсорпција светлости одређене таласне дужине у раствору обојене супстанце, што квантитативно описује Беров закон.

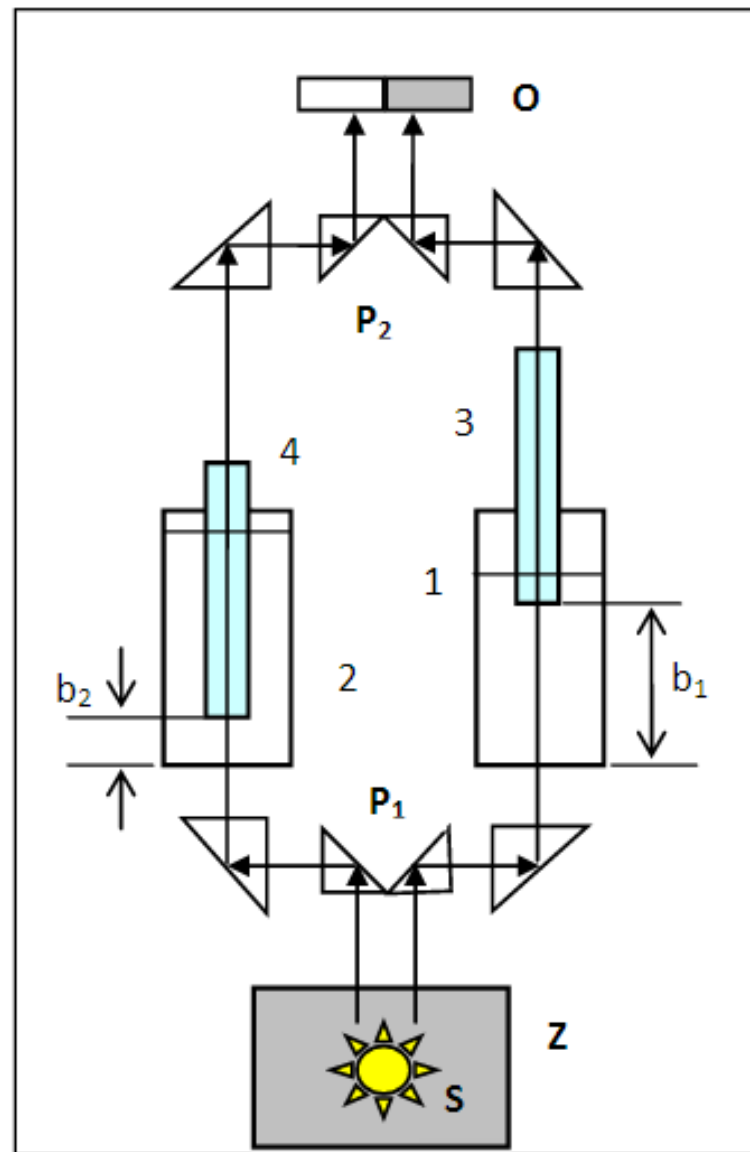
Према техници рада колориметријске методе делимо на:

- Методу стандардне серије
- Методу изједначавања(балансовања)
- Методу колориметријске титрације



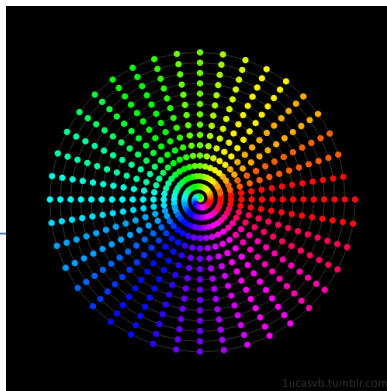
Мерење непознате концентрације **Дибосковим колориметром** се изводи тако што се у **кивету 1** налије раствор обојене супстанце познате концентрације  $c_1$ , а у **кивету 2**, раствор исте супстанце, непознате концентрације  $c_x$ . Укључи се извор светлости  $S$  и светлосни зраци усмере, како је приказано на слици. Подижући или спуштајући стаклене цилиндре 3 и 4 у киветама, мења се дебљина раствора до постизања једнаке апсорбације светлости у оба раствора.

**Као извор светлости користи се бела светлост.**



# МЕТОДА СТАНДАРДНЕ СЕРИЈЕ

- Код ове методе интензитет боја раствора непознате концентрације упоређује се са интензитетом боје стандардних раствора, тј. раствора познатих концентрација испитиване супстанце.
- Концентрација непознатог раствора једнака је концентрацији оног стандардног раствора који има исти интензитет боје као и непознати раствор.



колориметри



# МЕТОДА БАЛАНСОВАЊА

- Код ове методе упоређује се интензитет боје непознатог раствора и стандардног раствора у таквим апаратима и судовима код којих могу да се мењају дебљине слоја раствора.

## *КОЛОРИМЕТРИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ алкалоида*

- Колориметријско одређивање се примењује код оних дрога чији алкалоиди са одговарајућим реагенсима дају стабилне обојене комплексе.
- Тако се алкалоиди ражене главнице одређују колориметријски, на основу Ван - Уркове реакције (деривати лизергне киселине се са парадиметиламинобензалдехидом боје плаво).



- Колориметријско одређивање алкалоида у *Secale cornutum* (Ph. Jug. II) **ергот алкалоиди**
- **Принцип:** алкалоиди се екстрахују етром у базној средини, а затим помоћу винске киселине преводе у алкалоид-соли, са којима се изводи бојена реакција са п-диметиламинобензалдехидом. Добијена плава боја се упоређује са бојом стандардног раствора трипан-плавила и купри-сулфата.

