



Интегрисане академске студије фармације

Обрада резултата мерења- И16

**П4. Инструменталне методе
(теоријске основе, подела).
Спектроскопске методе
(теоријске основе, подела).
Израчунавања у спектрофотометрији.**

Проф. др Недељко Манојловић

Спектроскопија

Спектроскопија проучава интеракцију електромагнетног зрачења, односно дела електромагнетног зрачења са атомима и молекулима.

Спектар електромагнетног зрачења представља укупни опсег фреквенција или таласних дужина електромагнетног зрачења. Као резултат апсорпције и емисије од стране атома или молекула настају спектри.

Спектроскопске методе

- **Хемијска и фармацеутска анализа** обухватају хемијске и титриметријске методе анализе супстанци, као и инструменталне методе од којих су најзначајније спектроскопске методе:
- ултраљубичаста-видљива (UV/VIS) спектроскопија,
- инфрацрвена (IR) спектроскопија,
- нуклеарно-магнетно-резонантна (NMR) спектроскопија
- масена спектрометрија (MS),
- атомска апсорпциона спектрофотометрија (AAS) и
- молекулска емисиона спектроскопија (флуоресцентна и Раманова спектроскопија).

Хроматографске методе

- Веома значајно место у хемијској анализи заузимају сепарационе методе, пре свега **хроматографске методе**, од којих се најчешће примењују:
- хроматографија на папиру,
- хроматографија на танком слоју (TLC),
- хроматографија у колони,
- као и инструменталне хроматографске методе:
- гасна хроматографија (GH) и
- течна хроматографија високих перформанси (HPLC).

Комбиноване хроматографско-спектроскопске методе

- Посебно место у хемијској анализи заузимају **комбиноване хроматографско-спектроскопске методе**, настале комбинацијом хроматографских и спектроскопских техника као што су:
- гасна хроматографија-масена спектрометрија (GH-MS),
- гасна хроматографија-инфрацрвена спектроскопија (GH-IR),
- течна хроматографија високих перформанси – UV спектроскопија (HPLC- UV)
- течна хроматографија високих перформанси-масена спектрометрија (HPLC-MS) и друге.

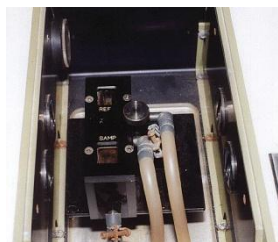
УЛТРАЉУБИЧАСТА/ВИДЉИВА (UV/VIS) СПЕКТРОСКОПИЈА

- **Ултраљубичаста/видљива (UV/VIS)**

спектроскопија обухвата проучавање промена у молекулу до којих долази након пропуштања и апсорпције дела електромагнетног зрачења у области између 200 и 800 nm (UV и VIS област). Ултраљубичасти део спектра може се поделити на три области:

- UV-C област ($\lambda = 100\text{-}280\text{ nm}$),
- UV-B област ($\lambda = 280\text{-}315\text{ nm}$) и
- UV-A област ($\lambda = 315\text{-}400\text{ nm}$).

UV-VIS спектрофотометар



UV-VIS спектрофотометар (горе). Место за референтну и аналитичку кивету (доле лево) и кивете (доле десно)

Обрада резултата мерења

Квантитативна анализа и обрада података

- Квантитативна UV/VIS анализа налази већу примену у фармацији од квалитативне анализе, с обзиром да су веома развијене друге инструменталне методе које прецизније могу дефинисати структуру хемијских супстанци, као што су нуклеарно-магнетна резонантна (NMR) спектроскопија и масена спектрометрија.
- Квантитативна анализа се заснива на *Lambert-Beer-овом закону* по коме је моларна концентрација неког једињења директно пропорциона његовој апсорбацији.
- Ова зависност је дата следећим изразом:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

где је:

A = апсорбанција

ε = моларни екстинкциони коефицијент (моларна апсорптивност)

d = дужина путање зрака кроз узорак, односно дебљина ћелије (најчешће 1 cm)

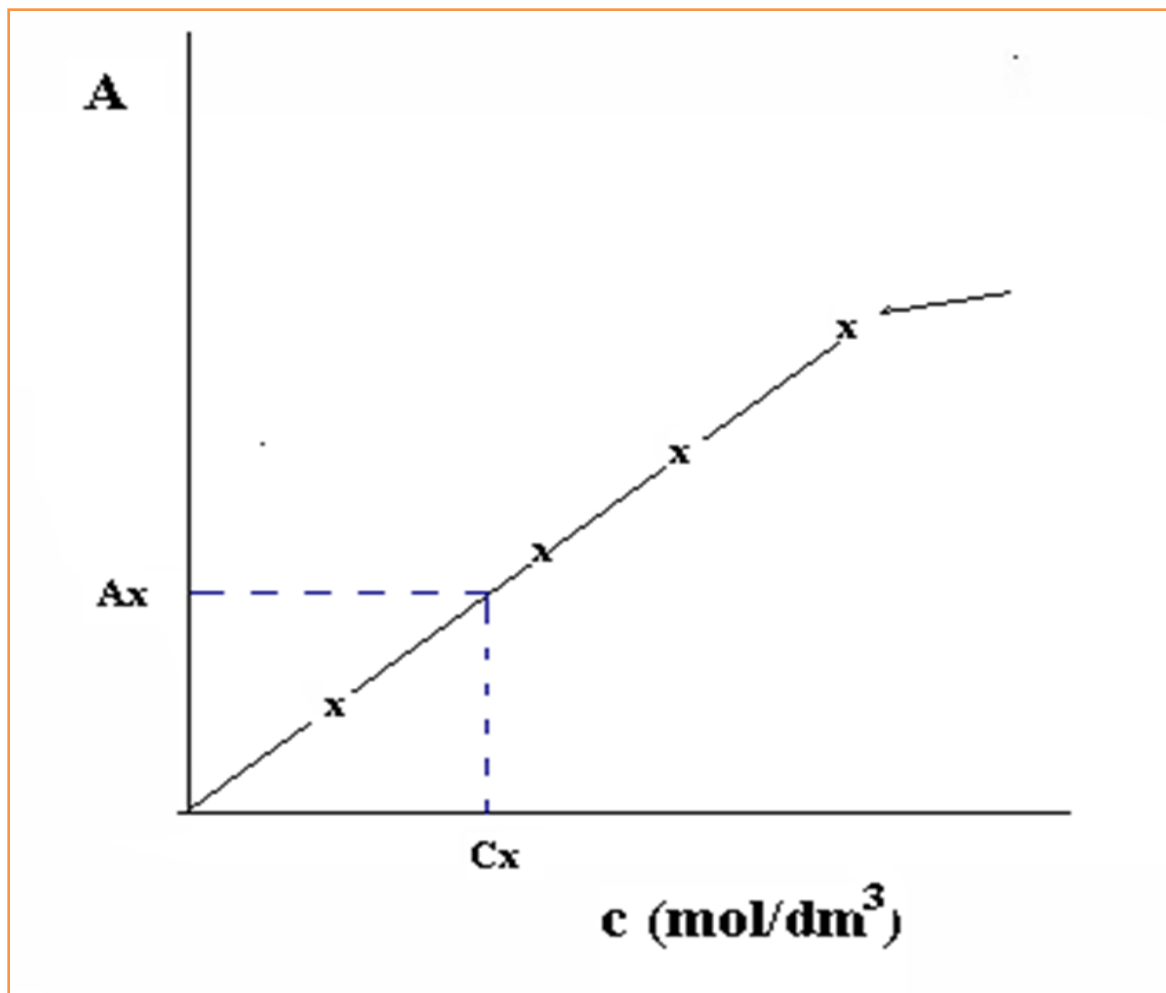
- У фармацеутским прорачунима концентрација се чешће изражава у g или mg него у молонима, па се уместо ϵ користи екстинкциони коефицијент A (1%, 1cm).

$$\epsilon = 10^{-1} A(1\%, 1\text{cm}) \times M$$

M = молекулска маса

Метода калибрационе криве

- Постоји више метода за спектрофотометријско одређивање концентрације фармацеутских супстанци. Једна од најчешће коришћених је метода калибрационе криве, која се конструише помоћу апсорбација претходно припремљене серије стандардних раствора познатих концентрација.



Калибрациона крива

Обрада резултата мерења

Квантитативне методе

У спектрофотометријској анализи и фармакопеји 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.

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, A_1 - апсорбација раствора узорка и стандарда

a, a_1 - 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

$A(1\% 1\text{cm})$ - специфични апсорпциони коефицијент

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

a - одмерена маса узорка у грамима

- **Одређивање оксибензоевих киселина у UV спектралној области:**
- Ацетилсалицилна киселина у хлороформу апсорбује на $\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$. Салицилна киселина у хлороформу апсорбује на $\lambda_{\max} = 308 \text{ nm}$, док је на рН 5-8, апсорпциони максимум $\lambda_{\max} = 269 \text{ nm}$, а на рН 1-6, ова вредност износи $\lambda_{\max} = 298 \text{ nm}$.
- Ово се користи у одређивању у препаратима Аспирина (салицилна киселина је деградациони производ ацетилсалицилне киселине).
- Прво се одреди салицилна киселина у хлороформском раствору на 308 nm , а онда раствор разблажи и одреди ацетилсалицилна киселина на 278 nm .

Одређивање ибупрофена

Реагенси:

Раствор натријум-хидроксида, концентрације 0,1 mol/l.

У одмерном суду од 100 ml растворити 0,4 g натријум-хидроксида и допунити водом до ознаке.

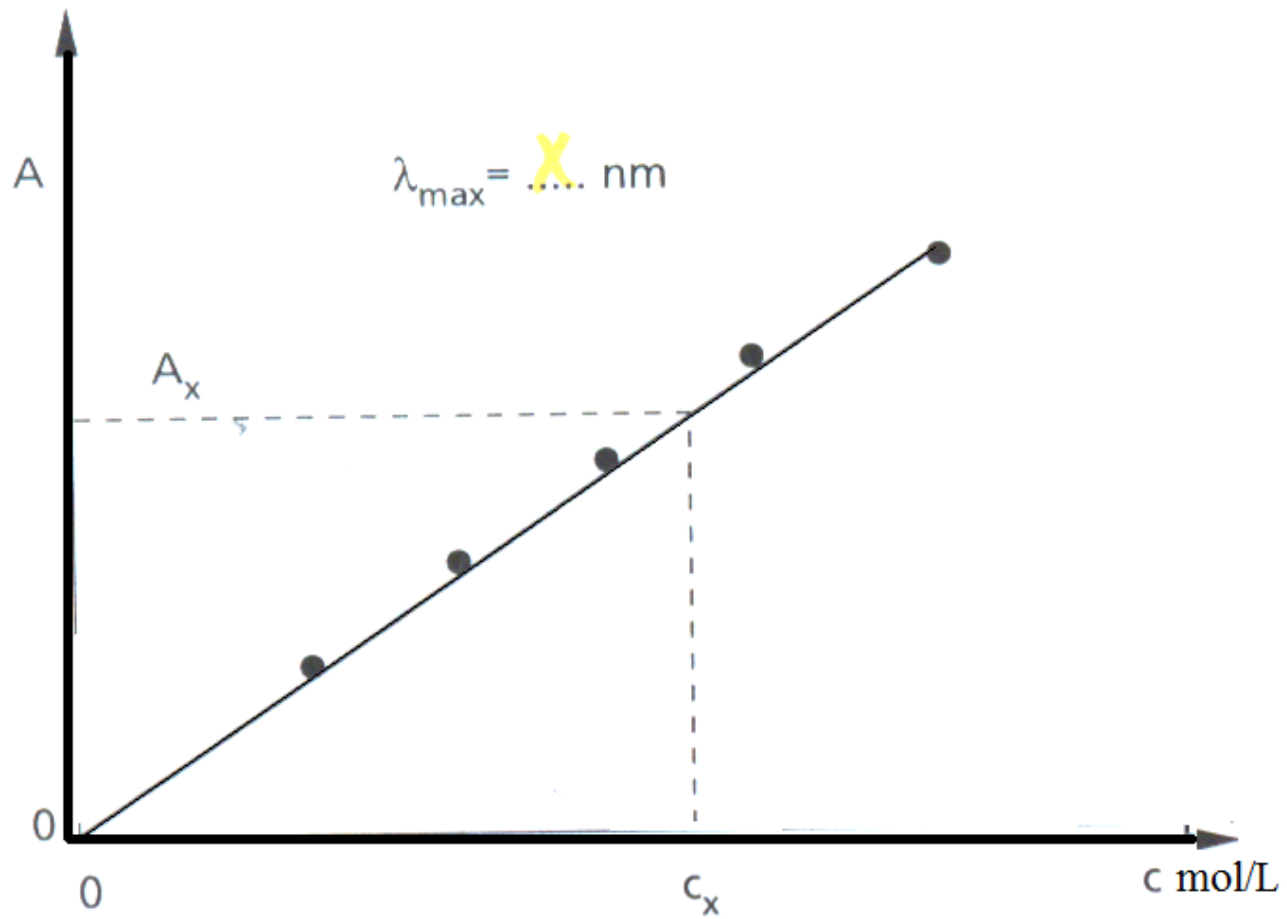
Калибрациона крива:

Одмерити тачно 25,0 mg ибупрофена и пренети у одмерни суд од 50 ml, растворити у натријум-хидроксиду концентрације 0,1 mol/l, мућкати све док се супстанција не раствори, а затим допунити до ознаке (раствор **а**). Концентрација раствора је 0,5 mg/ml. Од раствора **а** отпипетирати по 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 ml, пренети у одмерне судове од 10 ml и допунити до ознаке раствором натријум-хидроксида.

Концентрације овако добијених раствора су од 0,1 до 0,5 mg/ml.

- Измерити апсорбације припремљених раствора на $\lambda = 264 \text{ nm}$ уз воду као слепу пробу. Из добијених вредности апсорбација конструисати график функције $A = f(c)$.
- Мерење апсорбације врши се на таласној дужини на којој анализирани раствор највише апсорбује (или некој другој оптималној таласној дужини), чиме се постиже највећа осетљивост методе, која је дата коефицијентом $\Delta A / \Delta c$.
- За низ раствора познатих концентрација измере се апсорбације на таласној дужини λ_{max} и конструише дијаграм $A = f(c)$.
- Из измерене апсорбације A_x за раствор непознате концентрације, са калибрационе криве се графичким путем одреди c_x , што се може видети из следећег графика:

Калибрациона крива



Обрада резултата мерења

- Најчешће се линеарна зависност концентрације у односу на апсорбанцију испитују у опсегу од $A=0,1$ до $A=1,0$.
- Такође, се испитује вредност моларне апсорптивности за сваки пар апсорбанција-концентрација која треба да буде константна вредност.
- Ова испитивања имају још већи значај када нека супстанца има два или више максимума апсорпције.
- За квантитативну анализу неке супстанце узима се таласна дужина оног максимума код кога се добијају најмања одступања вредности моларне апсорптивности за растворе различите концентрације.

- Поред наведених испитивања потребно је испитати и распон концентрација које дају линеарну зависност у односу на апсорбанцију.
- Овај распон треба да обухвати најмање једну декаду, на пример од 10^{-5} - 10^{-4} mol/l.
- Калибрациона крива се конструише тако што се вредности концентрација наносе на апцису, а вредности одговарајућих апсорбанција на ординату.

- Друга фаза обухвата примену *Beer-ovog* закона у испитивању и израчунавању непознате концентрације раствора супстанце.
- Мерење апсорбације могуће је само у случају када се непозната концентрација налази у распону концентрација које дају линеарну зависност у односу на одговарајуће апсорбације.
- Непозната концентрација супстанце може се израчунати директним читањем са калибрационе криве или израчунавањем применом једначине:

$$c = \frac{A}{a \cdot b}$$

- Задатак. Конструисати калибрациону криву зависности концентрације и апсорбанције

Концентрација X ($\mu\text{g/ml}$)	Апсорбанција Y
20	0.069
60	0.237
100	0.394
140	0.545
180	0.704