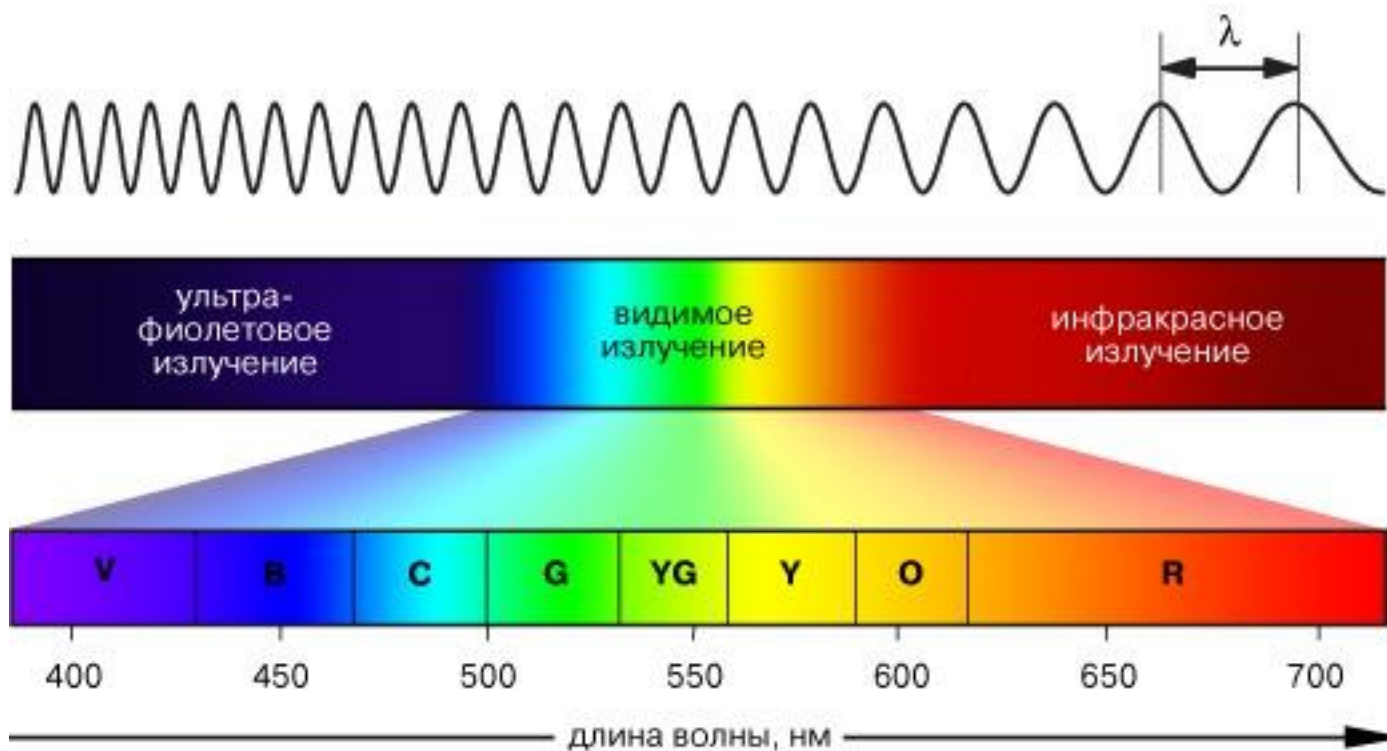


ЛЕКЦИЯ № 6

*«Методы анализа, основанные на
поглощении электромагнитного
излучения»*

Абсорбционные методы основаны на свойствах веществ поглощать свет в различных областях спектра.

К методам абсорбционного анализа относятся: *колориметрия, фотоэлектрокolorиметрия, спектрофотометрия*. Все эти методы - фармакопейные.



Колориметрия

Этот самый простой, и самый старый метод основан на визуальном сравнении окраски жидкостей.

При проведении колориметрических измерений используют несложные приборы: стеклянные колориметрические пробирки, стеклянные цилиндры с кранами, колориметры, фотометры.

Наибольшее распространение получили три метода колориметрии: *метод стандартных серий (метод шкалы), метод уравнивания окрасок и метод разбавления*, который иногда относят к методу уравнивания окрасок.

Метод стандартных серий

Пусть имеется анализируемый окрашенный раствор определяемого вещества, в котором требуется найти концентрацию этого вещества. В одинаковых стеклянных *колориметрических* пробирках готовят серию из 10-12 стандартных растворов с различной известной, постепенно возрастающей концентрацией того же определяемого вещества так, чтобы интенсивность окраски анализируемого раствора была промежуточной между интенсивностью окраски стандартных растворов с наименьшим и наибольшим содержанием определяемого вещества, в которых его концентрация различалась бы не более чем в 20-30 раз. Если окраска анализируемого раствора по ее интенсивности совпадает с окраской одного из стандартных растворов или близка к ней, то делают заключение о равенстве или близости концентраций определяемого вещества в анализируемом и в данном стандартном растворе.

Метод прост по своему выполнению, не нуждается в сложной аппаратуре, однако требует определенного навыка и обладает невысокой точностью (ошибка определений составляет около 5-10%), поэтому может использоваться лишь для приблизительной оценки концентрации определяемого вещества в анализируемом растворе.

В фармакопейном анализе вариант этого метода *широко и систематически применяется* при определении окраски жидкостей для оценки *цветности* жидких лекарственных форм и растворов, содержащих окрашенные фармацевтические препараты, при контроле их качества.

Тест на цветность является обязательным для окрашенных жидкостей, содержащих лекарственные препараты.

Метод уравнивания окрасок

Первый способ. Интенсивность окраски анализируемого раствора определяемого окрашенного вещества визуально уравнивают с интенсивностью окраски раствора сравнения, содержащего все те же компоненты, что и анализируемый раствор, за исключением определяемого вещества. К раствору сравнения постепенно добавляют известные количества определяемого вещества до тех пор, пока интенсивность окраски раствора сравнения станет равной интенсивности окраски анализируемого раствора, что обычно оценивают визуально. При достижении равенства интенсивности окраски обоих растворов считают, что концентрация определяемого окрашенного вещества в этих растворах одинакова. Зная количество определяемого вещества, введенного в раствор сравнения, находят концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе.

Второй способ. Для визуального уравнивания интенсивности окраски двух жидкостей изменяют толщину поглощающего слоя сравниваемых анализируемого и стандартного растворов до совпадения интенсивности окраски обоих растворов. При этом уже требуется, выполнимость основного закона светопоглощения.

Если l_x и l - соответственно измеренная толщина окрашенного слоя анализируемого раствора с неизвестной концентрацией c_x определяемого вещества и стандартного раствора с известной концентрацией c того же определяемого вещества, ϵ - молярный коэффициент погашения определяемого вещества, то при равенстве интенсивности окраски обеих жидкостей их оптическую плотность A можно считать одинаковой:

$$A = \epsilon c l = \epsilon c_x l_x,$$

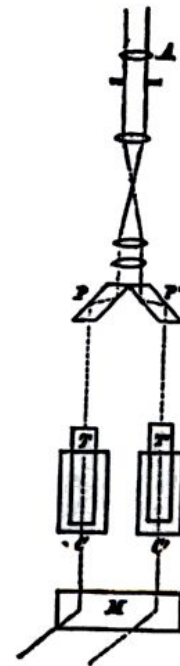
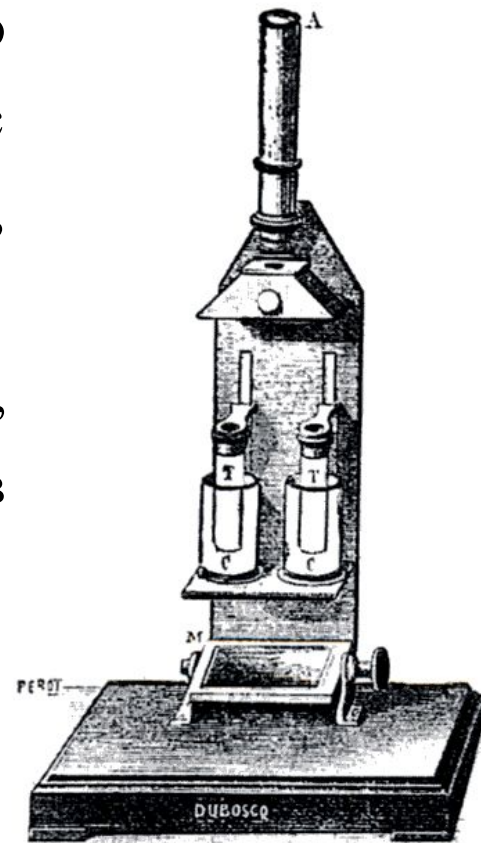
откуда

$$c_x = c l / l_x.$$

Изменение толщины окрашенного слоя можно проводить, например, с использованием колориметра Дюбоска, снабженного двумя одинаковыми прозрачными стеклянными цилиндрами, погруженными на разную высоту в одинаковые сосуды с анализируемым и стандартным растворами.

Два одинаковых световых потока от источника света проходят через растворы и стеклянные цилиндры.

Интенсивность обоих световых потоков сравнивается визуально с помощью окулярного устройства и уравнивается путем перемещения стеклянных цилиндров в сосудах с жидкостями, при котором меняется толщина поглощающего слоя.



Третий способ. Выравнивание интенсивности светопоглощения двух жидкостей можно проводить визуально с помощью фотометров, в которых уравнивание окраски осуществляется не за счет изменения толщины поглощающего слоя или концентрации сравниваемых растворов, а путем перекрывания части одного из световых потоков.

Измерения проводят в двух одинаковых кюветах, в одну из которых помещают анализируемый раствор с определяемым веществом, а в другую - раствор сравнения, содержащий растворитель и те же компоненты, что и анализируемый раствор (и в тех же количествах), за исключением определяемого вещества. Интенсивность светового потока, проходящего через обе кюветы, выравнивают, ослабляя световой поток, проходящий через раствор сравнения, путем введения диафрагмы, перекрывающей часть светового потока. Предварительно проводят градуировку отсчетного устройства фотометра по эталонным растворам с известной концентрацией определяемого вещества.

Метод уравнивания окраски обладает невысокой точностью; погрешность в определении концентрации растворов составляет около $\pm (5-10)\%$.

Метод разбавления

Метод сводится к выравниванию интенсивности окраски анализируемого и стандартного растворов путем разбавления растворителем того или другого раствора.

При этом методе не требуется выполнение основного закона светопоглощения.

Точность метода невелика; как и в предыдущих случаях, ошибка определений составляет около $\pm(5-10)\%$.

Фотокolorиметрия

Метод основан на измерении интенсивности некогерентного светового потока, прошедшего через анализируемый раствор, с помощью фотоэлементов в фотокolorиметрах и в фотоэлектрокolorиметрах. Световой поток от источника излучения (обычно - лампы накаливания) проходит через светофильтр, пропускающий излучение лишь в определенном интервале длин волн, через кювету с анализируемым раствором и попадает на фотоэлемент, преобразующий световую энергию в фототок, регистрируемый соответствующим прибором. Чем больше светопоглощение анализируемого раствора (т.е. чем выше его оптическая плотность), тем меньше энергия светового потока, попадающего на фотоэлемент.

Фотоэлектроколориметры снабжаются несколькими светофильтрами, имеющими максимум светопропускания при различных длинах волн.

Разработаны различные конструкции фотоэлектроколориметров, предназначенных для работы в ближней УФ и в видимой (преимущественно) области спектра. Светофильтры (чаще всего это стекла различного состава и окраски) пропускают излучение шириной в несколько десятков нм - примерно от 20 до 50 нм.

Наиболее распространенными являются фотоэлектроколориметры с одним или с двумя фотоэлементами. Фотоэлектроколориметры с одним фотоэлементом предусматривают измерение энергии однолучевого светового потока. Приборы с двумя фотоэлементами измеряют энергию двух световых потоков (двухлучевая схема), один из которых проходит через анализируемый раствор, а другой - через раствор сравнения («нулевой» раствор).

Концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе находят либо с использованием основного закона светопоглощения, предварительно установив концентрационный интервал его выполнимости при заданных светофильтре и толщине поглощающего слоя, либо методом градуировочного графика. В последнем случае строгая выполнимость основного закона светопоглощения необязательна.

Относительная ошибка фотоколориметрического определения концентрации обычно не превышает $\pm 3\%$.

Метод обладает сравнительно высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью, селективностью, прост по выполнению измерений оптической плотности или пропускания, использует относительно несложную аппаратуру. Однако немонахроматичность регистрируемого светового потока несколько понижает точность и воспроизводимость аналитических измерений.

Фотоколориметрический метод включен в НТД для количественного определения ряда нитропроизводных (нитроглицерин, фурадонин, фуразолидон), а также препаратов витаминов (рибофлавин, фолиевая кислота, рутин) и сердечных гликозидов (целанид), диэтилстильбэстрола, левомецетина, ментола, новокаина, пилокарпина гидрохлорида, стрептомицина, этакридина лактата. Разработаны многочисленные методики фотоколориметрического определения препаратов в лекарственных формах. Известны различные модификации фотоколориметрии и способы расчета концентрации в фотоколориметрическом анализе.

Спектрофотометрия

Этот метод, применяемый чаще других и наиболее совершенный среди методов абсорбционного молекулярного анализа, основан на использовании специальных спектральных приборов - спектрофотометров, позволяющих регистрировать световые потоки в широком интервале изменения длин волн от ~ 185 нм до ~ 1100 нм, т.е. в УФ, видимой и ближней ИК области спектра, и обеспечивающих высокую степень монохроматичности света ($\sim 0,2-5$ нм), проходящего через анализируемую среду.

В большинстве спектрофотометров, применяемых в аналитической практике, монохроматизация светового потока осуществляется за счёт использования диспергирующих (разлагающих свет в спектр) элементов - призм или дифракционных решеток.

Разработаны различные конструкции спектрофотометров, работающих как по однолучевой (одноканальной), так и по двухлучевой (двухканальной) схеме.

На рис. 1. показана принципиальная блок-схема, включающая основные узлы, обеспечивающие работу спектрофотометра.

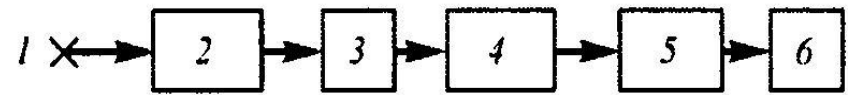


Рисунок 1. Принципиальная блок-схема спектрофотометра:

1 — источник излучения; 2 — монохроматор; 3 — кюветное отделение; 4 — приемник излучения (фотоэлементы); 5 — усилитель; 6 — регистратор (отсчетное или записывающее устройство)

Свет от источника излучения 1 попадает в монохроматор 2, в котором он разлагается в спектр. Монохроматизованный световой поток проходит после этого через кюветное отделение 3, в котором устанавливаются кюветы с анализируемым раствором и раствором сравнения («нулевым» раствором). Пройдя через кюветы с растворами, световой поток попадает на фотоэлементы приемника излучения 4, в котором энергия светового потока преобразуется в фототок, усиливаемый в блоке усилителя 5, после чего усиленный электрический сигнал регистрируется в блоке регистратора 6 либо в виде спектральной кривой, либо по показанию отсчитывающего устройства.

В качестве источника излучения в спектрофотометрах используют лампы накаливания при работе в видимой области спектра, в которой они обеспечивают непрерывный световой поток (а не линейчатый, даваемый ртутной лампой), и водородные либо дейтериевые лампы - при работе в УФ диапазоне спектра ($\sim 200-350$ нм).

Для разложения светового луча в спектр в монохроматоре чаще всего используют, как уже говорилось выше, призмы или дифракционные решетки. При работе в видимой и в ближней ИК области используют стеклянные призмы, а также стеклянные конденсоры (линзы) и кюветы. При работе в УФ диапазоне $\sim 200-400$ нм применяют кварцевую оптику (призмы, конденсоры, кюветы), так как стекло поглощает УФ лучи.

При использовании спектрофотометров, работающих по однолучевой схеме, в световой поток в кюветном отделении попеременно вносят кювету с раствором сравнения (нулевым раствором) и кювету с анализируемым раствором. В кюветное отделение спектрофотометров, работающих по двухлучевой схеме, устанавливают одновременно обе кюветы: кювету с нулевым раствором - в канал сравнения, кювету с анализируемым раствором - в измерительный канал.

Обе кюветы - с нулевым и с анализируемым растворами - должны быть совершенно одинаковыми, с равной толщиной поглощающего слоя. При толщине поглощающего слоя $l = 1$ см допустимое отклонение не должно превышать $\Delta l = \pm 0,005$ см при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Обе кюветы, заполненные чистым растворителем, должны иметь одинаковую оптическую плотность *при одной и той же* длине волны.

Градуировку спектрофотометров по длинам волн (или волновым числам) контролируют по положению максимумов в спектре поглощения стандартов - раствора перхлората гольмия, ртутной, дейтериевой разрядной и водородной разрядной лампы (табл. 1).

Погрешность измерения длин волн на обычных спектрофотометрах составляет ± 2 нм в области 200-800 нм.

Градуировку спектрофотометров по оптической плотности (или по пропусканию) контролируют по стандарту — серноокислому раствору дихромата калия $K_2Cr_2O_7$. В табл. 2. приведены значения удельного коэффициента погашения E для стандартного раствора дихромата калия.

Для приготовления стандартного раствора дихромата калия растворяют 57,0-63,0 мг $K_2Cr_2O_7$, предварительно высушенного при $130^{\circ}C$ до постоянной массы, в 0,005 моль/л серной кислоте в мерной колбе на 1000,0 мл и доводят раствор до метки той же кислотой.

В качестве стандартов при контроле измерения оптической плотности используют также 0,3 моль/л водный раствор нитрата калия и 0,0001 моль/л раствор хромата калия K_2CrO_4 в 0,05 моль/л растворе гидроксида калия КОН, значения молярных коэффициентов, которых приведены в табл. 3.

Разработаны различные приемы спектрофотометрии - прямая (непосредственная), дифференциальная, производная спектрофотометрия, спектрофотометрическое титрование.

Концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе при спектрофотометрических измерениях находят, как и в фотоэлектроколориметрии, с использованием либо основного закона светопоглощения, либо градуировочных графиков.

Спектрофотометрические методы обладают, по сравнению с фотоэлектроколориметрическими, большей точностью и чувствительностью, позволяют проводить анализ многокомпонентных систем без разделения компонентов, определять вещества, не поглощающие в видимой области спектра (но имеющие полосы поглощения в УФ диапазоне). Относительные ошибки спектрофотометрических определений не превышают $\pm 2\%$.

Количественный фотометрический анализ

Для получения оптимальных результатов при фотометрических измерениях предварительно проводят фотометрическую реакцию (если это необходимо), подбирают *аналитическую длину волны*, концентрацию измеряемого раствора, толщину поглощающего слоя, раствор сравнения (нулевой раствор).

Выбор аналитической длины волны. Аналитическая длина волны - это длина волны, при которой проводят фотометрические измерения. Для выбора аналитической длины волны вначале получают спектр поглощения раствора определяемого вещества в возможно более широком спектральном диапазоне и измеряют длину волны, соответствующую ***максимуму самой интенсивной полосы*** поглощения. При этой длине волны и проводят последующие измерения. Проводить фотометрические измерения на спаде полосы поглощения не рекомендуется.

Выбор концентрации измеряемого раствора и толщины поглощающего слоя. Ранее указывалось, что фотометрические измерения целесообразно проводить в интервале изменения оптической плотности A от 0,2 до 0,6, так как при этом систематическая ошибка фотометрических измерений наименьшая. Минимальная систематическая ошибка получается при $A = 0,434$. Исходя из этого, концентрацию раствора c и толщину поглощающего слоя l подбирают так, чтобы значение $A = \varepsilon cl$ лежало в интервале от 0,2 до 0,6, где ε - молярный коэффициент погашения определяемого вещества в данном растворе. Если принять $A = 0,434$ и $l = 1$ см, то тогда концентрация c должна быть примерно равна

$$c = 0,434/\varepsilon.$$

Использование раствора сравнения. Раствор сравнения (нулевой раствор) должен представлять собой либо чистый растворитель, если измеряемый раствор состоит только из растворителя и растворенного определяемого вещества, либо растворитель, содержащий все те же компоненты и в тех же количествах, что и измеряемый раствор, за исключением определяемого вещества.

Все последующие измерения проводят по отношению к раствору сравнения.

Фотометрические измерения лучше проводить сразу же после приготовления растворов (если методика не предусматривает соблюдение других условий) и достаточно быстро, так как при продолжительном нахождении в кюветном отделении кюветы с растворами нагреваются; при этом возможно появление мелких пузырьков воздуха на стенках кюветы, что искажает результаты фотометрических измерений и повышает их ошибку.

Нахождение концентрации определяемого вещества.

Метод градуировочного графика (метод калибровочных кривых).

По результатам измерения оптической плотности A пяти-шести эталонных растворов с различной точно известной концентрацией c при аналитической длине волны строят градуировочный график в координатах A - c (рис. 2).

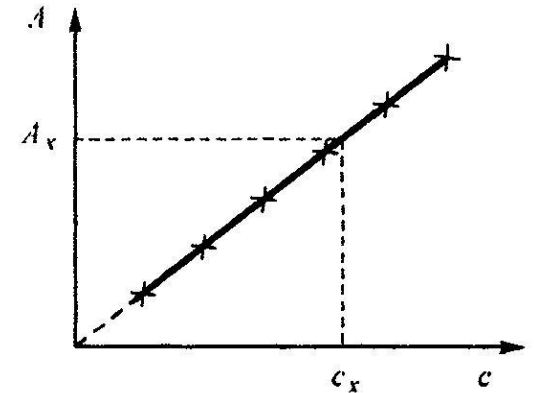


Рис. 2. Градуировочный график, построенный на основании фотометрических измерений

Измеряют оптическую плотность A_x анализируемого раствора в тех же условиях, в которых измеряли оптическую плотность эталонных растворов (кювета, аналитическая длина волны, раствор сравнения). По найденному значению A_x находят концентрацию c_x определяемого вещества на градуировочном графике (рис. 2).

Метод одного стандарта

Данный метод применим тогда, когда выполняется закон светопоглощения. Сущность метода состоит в следующем. Готовят стандарт (стандартный раствор) - раствор с точно известной концентрацией определяемого вещества $c(ст)$ - и измеряют его оптическую плотность $A(ст)$ при аналитической длине волны по отношению к раствору сравнения. Затем в той же кювете и в тех же условиях измеряют оптическую плотность $A(x)$ анализируемого раствора с неизвестной концентрацией $c(x)$ определяемого вещества. При условии выполнимости основного закона светопоглощения имеем:

$$\begin{aligned} A(ст) &= \varepsilon c(ст)l, \\ A(x) &= \varepsilon c(x)l, \end{aligned}$$

откуда

$$c(x) = \frac{A(x)}{A(ст)} c(ст).$$

Определение концентрации по молярному или удельному коэффициенту погашения

Метод применим при условии выполнимости основного закона светопоглощения. Численное значение молярного ϵ или удельного E коэффициента погашения должно быть известно. Если оно неизвестно, то определяют среднее значение ϵ или E экспериментально, проводя фотометрические измерения оптической плотности эталонных растворов с точно известной концентрацией определяемого вещества при аналитической длине волны.

Измеряют оптическую плотность $A(x)$ анализируемого раствора с искомой концентрацией $c(x)$ определяемого вещества при аналитической длине волны в кювете с толщиной поглощающего слоя l . По измеренному значению $A(x)$ рассчитывают концентрацию $c(x)$, исходя из основного закона светопоглощения:

$$A(x) = \varepsilon c(x)l, \quad c(x) = A(x)/\varepsilon l$$

или

$$A(x) = EW(x)l, \quad W(x) = A(x)/El,$$

где концентрация $c(x)$ выражена в единицах моль/л, а концентрация $W(x)$ - в г/100 мл раствора.

Метод добавок стандарта

Метод применим, если выполняется основной закон светопоглощения.

Готовят два раствора: первый - анализируемый раствор с искомой концентрацией $c(x)$ определяемого вещества и второй - анализируемый раствор, к которому прибавили точно известное количество (добавка стандарта) определяемого вещества, так что его концентрация во втором растворе равна $c(x) + c$, где c - точно известное увеличение концентрации за счет прибавления добавки стандарта.

Измеряют последовательно оптическую плотность A_1 и A_2 соответственно первого и второго растворов в одной и той же кювете при аналитической длине волны. С учетом выполнимости основного закона светопоглощения можно написать

$$A_1 = \varepsilon c(x)l,$$

$$A_2 = \varepsilon [c(x) + c]l,$$

откуда

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{c(x)}{c(x) + c}; \quad A_1 c(x) + A_1 c = A_2 c(x),$$

$$c(x)(A_2 - A_1) = A_1 c,$$

$$c(x) = \frac{A_1}{A_2 - A_1} c.$$

Определение концентрации нескольких веществ при их совместном присутствии

В основе метода лежит закон аддитивности оптической плотности при соблюдении основного закона светопоглощения.

Пусть в анализируемом растворе одновременно присутствуют два вещества - компонент 1 и компонент 2, не вступающие в химическое взаимодействие друг с другом.

Компонент 1 имеет в спектре поглощения *полосу с максимумом при длине волны λ_1* , а компонент 2 - *полосу с максимумом при длине волны λ_2* .

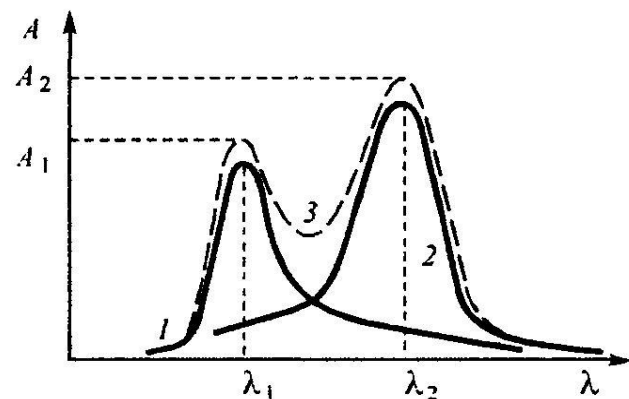


Рис. 3. Спектр поглощения двух веществ при их совместном присутствии:
1 — полоса поглощения компонента 1; 2 — полоса поглощения компонента 2; 3 — суммарный спектр поглощения раствора

Обе полосы частично налагаются друг на друга, так что суммарное светопоглощение раствора при обеих длинах волн складывается из светопоглощения обоих компонентов (рис. 3).

Пусть оптическая плотность раствора, измеренная при длинах волн λ_1 и λ_2 в кювете с толщиной поглощающего слоя l , равна A_1 и A_2 соответственно (рис. 3).

Согласно закону аддитивности оптической плотности можно написать

$$A_1 = \varepsilon(1)_{\lambda_1} c_1 l + \varepsilon(2)_{\lambda_1} c_2 l,$$

$$A_2 = \varepsilon(1)_{\lambda_2} c_1 l + \varepsilon(2)_{\lambda_2} c_2 l,$$

где $\varepsilon(1)_{\lambda_1}$ и $\varepsilon(2)_{\lambda_1}$ – соответственно молярные коэффициенты погашения компонентов 1 и 2 при длине волны λ_1 ; $\varepsilon(1)_{\lambda_2}$ и $\varepsilon(2)_{\lambda_2}$ – соответственно молярные коэффициенты погашения компонентов 1 и 2 при длине волны λ_2 ; c_1 и c_2 – концентрация соответственно компонента 1 и 2 в анализируемом растворе.

Аналогично можно провести измерения и расчеты и в тех случаях, когда в анализируемом растворе одновременно присутствуют более двух определяемых веществ.

Рассматриваемым методом можно определять медь, кобальт и никель при их совместном присутствии в виде комплексонатов фотометрированием раствора при трех длинах волн (436; 367 и 328 нм); амидопирин и кофеин - при 272 и 255 нм; дикаин и новокаин - при 311 и 290 нм и т.д.