

ЛЕКЦИЯ № 3

«Оптические методы анализа ЛВ»

Общая характеристика и классификация

Оптические методы анализа основаны на измерении оптических свойств вещества (испускание, поглощение, рассеяние, отражение, преломление, поляризация света), проявляющихся при взаимодействии электромагнитного излучения с веществом.

Классификация оптических методов анализа

Оптические методы анализа классифицируют различным образом, а именно.

- а) По изучаемым объектам: атомный и молекулярный спектральный анализ.**
- б) По характеру взаимодействия электромагнитного излучения с веществом.**

Различают следующие методы.

Атомно-абсорбционный анализ. В основе метода лежит измерение поглощения монохроматического излучения атомами определяемого вещества в газовой фазе после атомизации вещества.

Эмиссионный спектральный анализ. В основе метода лежит измерение интенсивности света, излучаемого веществом (чаще всего — атомами или ионами) при его энергетическом возбуждении, например, в плазме электрического разряда.

Пламенная фотометрия. Основана на использовании газового пламени в качестве источника энергетического возбуждения излучения.

Молекулярный абсорбционный анализ. В основе метода лежит измерение светопоглощения молекулами или ионами изучаемого вещества. Является наиболее распространённым методом.

Люминесцентный анализ. В основе метода лежит измерение интенсивности излучения люминесценции, т.е. испускания излучения веществом под воздействием различных видов возбуждения.

Спектральный анализ с использованием эффекта комбинационного рассеяния света (раман-эффекта). Основан на измерении интенсивности излучения при явлении комбинационного рассеяния света.

Нефелометрический анализ. Основан на измерении рассеивания света частицами света дисперсной системы (среды).

Турбидиметрический анализ. Основан на измерении ослабления интенсивности излучения при его прохождении через дисперсную среду.

Рефрактометрический анализ. Основан на измерении показателей светопреломления веществ.

Интерферометрический анализ. Основан на изучении явления интерференции света.

Поляриметрический анализ. Основан на измерении величины оптического вращения — угла вращения плоскости поляризации света оптически активными веществами.

В современном физико-химическом анализе используются и некоторые другие оптические методы: *спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) и многократно нарушенного внутреннего отражения (МНПВО); фотоэлектронная спектроскопия; рентгеноэлектронная спектроскопия; гамма-резонансная спектроскопия (эффект Мессбауэра); электронный парамагнитный резонанс; ядерный магнитный резонанс и т.д.*

в) По области используемого электромагнитного спектра.

Различают следующие методы.

Спектроскопия (спектрофотометрия) в УВИ области спектра, т.е. в

ближней ультрафиолетовой (УФ) области — в интервале длин волн $\sim 200-400$ нм и в видимой области — в интервале длин волн $\sim 400-760$ нм.

Инфракрасная спектроскопия, изучающая участок электромагнитного спектра в интервале $0,76-1000$ мкм ($1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$).

Реже используются: ***рентгеновская спектроскопия*** (изучает рентгеновские спектры); ***микроволновая спектроскопия***, изучающая электромагнитное излучение с длинами волн от 10^{-1} до 10 см.

г) По природе энергетических переходов.

Различают следующие спектры.

Электронные спектры (в основном в УВИ области) —

возникают при изменении энергии электронных состояний частиц (атомов, ионов, радикалов, молекул, кристаллов).

Колебательные спектры. Охватывают ИК-область и спектры

комбинационного рассеяния света. Колебательные спектры

возникают при изменении энергии колебательных состояний частиц

(двух- и многоатомных ионов, радикалов, молекул, а также жидких

и твердых фаз).

Вращательные спектры. Охватывают дальнюю ИК- и

микроволновую область электромагнитного излучения. Возникают

при изменении энергии вращательных состояний молекул, двух- и

многоатомных ионов, радикалов.

Рефрактометрия

Рефрактометрия - старейший оптический метод анализа, основанный на измерении относительных показателей преломления (n).

Преломление света на границе двух сред - это изменение направления и скорости распространения светового луча.

Если луч проходит из среды (1) с меньшей преломляющей способностью в среду (2) с большей преломляющей способностью, то угол падения α будет больше угла преломления β . (рис.1).

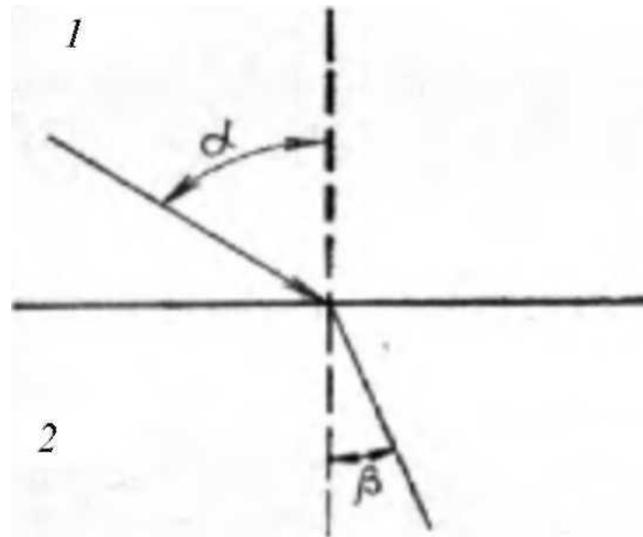


Рис.1. Преломление света на границе двух оптических сред

Согласно закону преломления,

$$n_2 = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

где n_2 - *относительный показатель преломления* среды (2) по отношению к среде (1).

Кроме того, показатель преломления можно выразить через скорости света в средах (1) и (2):

$$n_2 = \frac{v_1}{v_2}.$$

Для большинства жидкостей показатель преломления равен $1,3 \pm 1,7$.

Аналитические возможности метода

С помощью метода рефрактометрии можно проводить:

Качественный анализ (идентификацию индивидуальных веществ), поскольку показатель преломления - характерная для данного вещества константа. Например, рефрактометрически контролируют подлинность жидких лекарственных форм (эфирные масла, витамины, сахарные сиропы и т. п.).

Количественный анализ, который основан на зависимости показателя преломления от концентрации вещества. Рефрактометрически можно анализировать 1-, 2- и 3-компонентные системы (лекарственные препараты, спирты, сахара и др.). Однако чаще всего проводят анализ 2-компонентных растворов. Например, можно проводить количественный анализ солей в водных растворах (NaCl , NaBr , NaI , KBr , KI , CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и т.д.). Для анализа 3-компонентных смесей необходимо дополнительно определить другие величины - плотность или вязкость.

Метрологические характеристики метода

✓ **Низкая точность**, но чем больше разница в показателях преломления компонентов смеси, тем выше точность.

✓ **Низкая чувствительность**, поэтому метод используется при анализе в области высоких концентраций ($> 1 \%$).

✓ **Низкая селективность**, поскольку n - «неспецифическая» величина (для разных веществ значения n могут быть близки), поэтому метод используется только для анализа индивидуальных веществ или простейших смесей (2-3 компонента).

✓ **Простота выполнения и оборудования.**

✓ **Экспрессность.**

✓ **Минимальное количество пробы.**

Факторы, влияющие на аналитический сигнал

1. Физико-химические свойства вещества (природа вещества):

- ♦ ρ - плотность: чем больше ρ , тем больше n ;
- ♦ ϵ - диэлектрическая постоянная: $\epsilon = n^2$;
- ♦ α - поляризуемость.

2. Внешние условия:

- ♦ λ - длина волны: чем больше λ , тем меньше n . Зависимость n от λ называется дисперсией;
- ♦ t° - температура: чем больше t° , тем меньше n ;
- ♦ p - давление (для газов).

3. Концентрация (для растворов):

при прочих постоянных условиях показатель преломления линейно зависит от концентрации:

$$n_p = n_0 + F\omega,$$

где n_p - показатель преломления раствора;
 n_0 - показатель преломления растворителя;
F - аналитический рефрактометрический фактор;
 ω - массовая доля вещества в растворе.

4. Тип растворителя (для растворов).

Все рефрактометрические измерения проводят при **постоянных внешних условиях**: $\lambda = \text{const}$, $t^\circ = \text{const}$. Например, в справочной литературе приводятся значения n_D^{20} , где надстрочный индекс 20 показывает, что измерения проведены при 20°C, а подстрочный индекс D обозначает длину волны, при которой проведены измерения (жёлтой D-линии спектра натрия соответствует $\lambda = 589,3$ нм).

Удельная и молярная рефракция

Установлено, что не сам показатель преломления, а некоторая функция от него *прямо пропорциональна* плотности:

$$f(n) = r \cdot \rho,$$

где $f(n)$ - некоторая функция показателя преломления;
 r - коэффициент пропорциональности, называемый *удельной рефракцией*;
 ρ - плотность.

Согласно *формуле Лоренц - Лорентца*, эта функция имеет вид:

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2},$$

тогда

$$r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho}.$$

При умножении удельной рефракции на молярную массу получаем *молярную рефракцию*:

$$R = r \cdot M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{\rho} .$$

Удельная и молярная рефракции **не зависят** от внешних условий - температуры, давления, агрегатного состояния вещества.

Рефракция подчиняется *правилу аддитивности*:

1. Правило аддитивности молярной рефракции для индивидуального вещества: рефракция молекулы равна сумме атомных рефракций или сумме рефракций связей

$$R_{\text{молекулы}} = \sum R_{\text{атомов}} ;$$

$$R_{\text{молекулы}} = \sum R_{\text{связей}} .$$

С помощью этого правила проводится **идентификация** органических соединений.

2. Правило аддитивности молярной и удельной рефракции для растворов и смесей веществ: рефракция смеси равна сумме рефракций отдельных компонентов с учётом их концентрации:

$$R_{\text{смеси}} = R_1 \cdot x_1 + R_2 \cdot x_2;$$

$$r_{\text{смеси}} = r_1 \cdot \omega_1 + r_2 \cdot \omega_2,$$

где x - молярная доля компонента в смеси;

ω - массовая доля компонента в смеси.

С помощью этого правила проводится *количественный анализ* бинарных смесей.

Приёмы нахождения неизвестной концентрации

В рефрактометрии используют следующие приёмы нахождения концентрации по величине аналитического сигнала:

Метод градуировочного графика. Можно использовать даже в случае нелинейной зависимости (рис.2).

По специальным рефрактометрическим таблицам $n - \omega$, которые составлены для многих веществ.

Метод стандартов - по значению аналитического рефрактометрического фактора F .

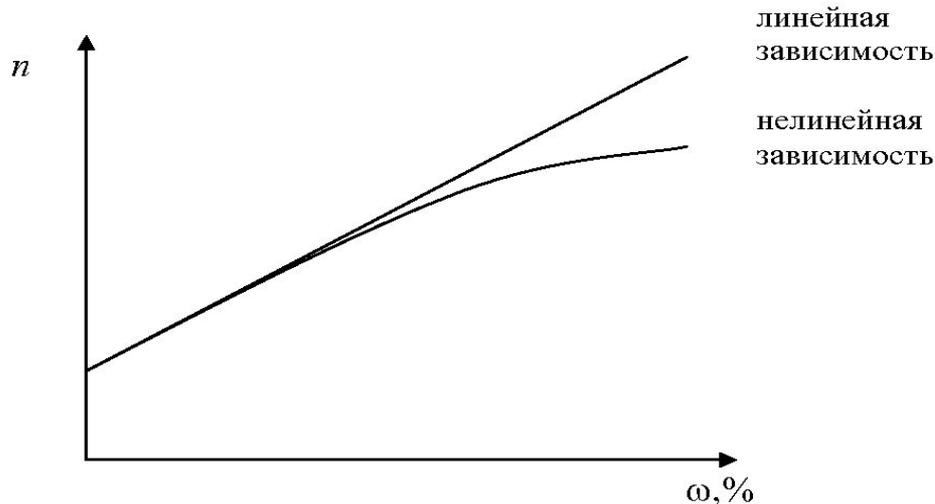


Рис. 2. Зависимость показателя преломления раствора от массовой доли определяемого компонента.

Приборы для рефрактометрических измерений

Для рефрактометрических измерений используют рефрактометры разных типов, но чаще всего - *рефрактометры Аббе*.

Основные узлы рефрактометра Аббе:

- ✓ *призменный блок:* состоит из двух призм (измерительной и осветительной), между которыми помещают тонкий слой вещества;
- ✓ *компенсатор дисперсии:* позволяет устранить дисперсию, за счёт которой белый свет, проходя через измерительную призму, разлагается, и граница света и темноты получается нечёткой, размытой, окрашенной во все цвета радуги;
- ✓ *зрительная труба.*

Принцип действия рефрактометра основан на измерении *предельного угла преломления* (см. рис. 3). Пусть луч проходит из среды (1) с меньшей преломляющей способностью в среду (2) с большей преломляющей способностью, т.е. $n_2 > n_1$. При увеличении угла падения α будет увеличиваться и угол преломления β , но всегда $\alpha > \beta$. Когда падающий луч скользит по границе раздела, тогда угол преломления становится предельным углом:

$$\text{при } \alpha_{\text{скол}} = 90^\circ \Rightarrow \beta_{\text{пред}} < 90^\circ.$$

Поскольку

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

а при $\alpha_{\text{скол}} = 90^\circ \Rightarrow \sin \alpha_{\text{скол}} = 1$, то получаем:

$$n = \frac{1}{\sin \beta}.$$

Таким образом, измерение показателя преломления n сводится к измерению предельного угла β .

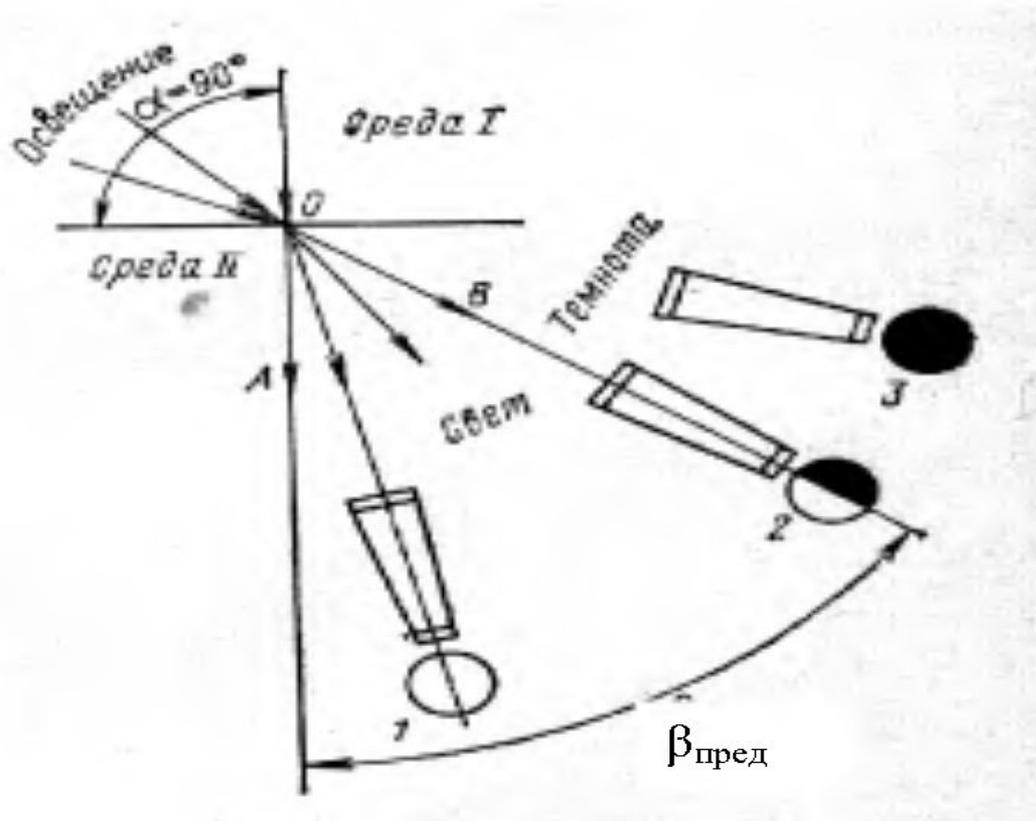


Рис.3. Принцип измерения показателя преломления





<http://reagent-alfa.uaprom.net/>



Поляриметрия

1. Для изучения структуры и свойств различных веществ: с его помощью проводят исследования кристаллических веществ в минералогии и кристаллохимии, изучают кинетику процессов, протекающих с участием оптически активных веществ, изучают некоторые параметры космических объектов.
2. Метод поляриметрического анализа применяют в аналитических целях при количественных определениях различных веществ.
3. Поляриметрия нашла широкое применение для решения теоретических и практических вопросов органической химии, в сахарной промышленности, в виноделии.
4. В медицине поляриметрический анализ применяется для определения концентрации глюкозы в моче и в крови.
5. Поляриметрия занимает особое место в производстве продуктов питания (производство масел, жиров), напитков, молочных и кондитерских изделий, в сельском хозяйстве, в фармацевтическом производстве при выпуске инъекционных лекарственных форм.
6. В фармации измерение величины угла вращения проводят либо для оценки чистоты оптически активного вещества, либо для определения его концентрации в растворе.

Явление оптической активности известно с начала XIX века. Именно с открытия оптической активности (Ж. Био, 1815) начала развиваться стереохимия. В ее изучение главный вклад внесли французские ученые Д. Араго, Ж.Био, Л.Пастер, Э.Коттон, О.Френель. Л. Пастер впервые высказал мысль, что **оптическая активность вещества – следствие асимметрии, т.е. хиральности молекул.**

Оптическое вращение – это способность вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

Соединения, способные вращать плоскость поляризованного луча в противоположные стороны называются **оптически активными**. Последнее свойство веществ является следствием хиральности молекул. Так, все хиральные молекулы оптически активны.

Величина отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженная в угловых градусах – угол вращения α . Он зависит от:

- от природы оптически активного вещества,
- длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе)
- длины волны света.

Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества.

Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света в оптически активной среде, т.е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора.

Влияние температуры в большинстве случаев незначительно.

Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращения $[\alpha]$.

Удельное вращение $[\alpha]$ определяют расчётным путём как угол поворота плоскости поляризации монохроматического света на пути длиной в 1 дм в среде, содержащей оптически активное вещество, при условном приведении концентрации этого вещества к значению, равному 1 г/мл. выражается удельное вращение в ($^{\circ} \times \text{мл} \times \text{дм}^{-1} \times \text{г}^{-1}$).

Все оптически активные вещества встречаются в виде пар оптических антиподов – изомеров (энантиомеров), физические и химические свойства которых в обычных условиях одинаковы, за исключением одного – знака вращения плоскости поляризации.

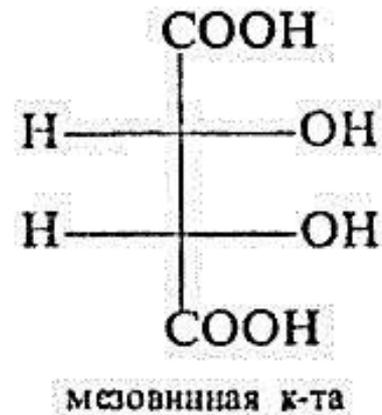
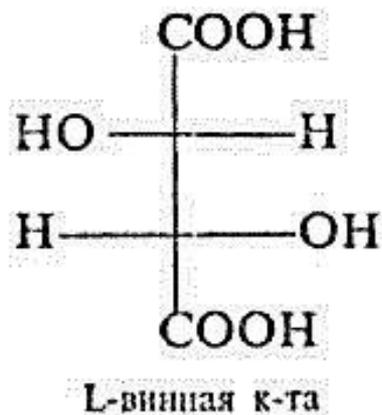
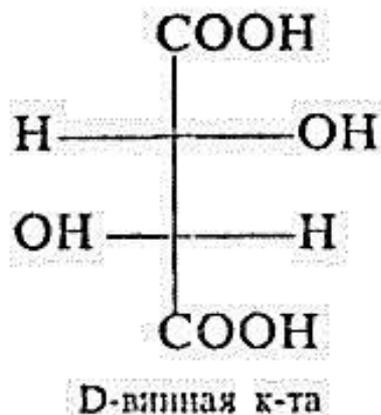
Если один из оптических антиподов имеет, например, удельное вращение $[\alpha] = +11^\circ$, то другой – удельное вращение $[\alpha] = -11^\circ$.

В названиях таких молекул обозначается знак вращения поляризации, например: (+)-аланин, (–)-2-бутанол, (+)-глицериновый альдегид.

Способностью вращать плоскость поляризованного луча света обладают все энантиомеры.

Однако растворы – **рацематы**, состоящие из эквимольных количеств энантиомеров, вследствие компенсации знака вращения, не обладают оптической активностью.

В результате «внутренней компенсации» знака вращения, оптически неактивны также и мезоформы диастериоизомеров – пространственных изомеров с несколькими хиральными центрами; например, винная кислота.



Приводя величину удельного вращения, необходимо указывать растворитель и выбранную для измерения концентрацию раствора.

Величину удельного вращения рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе (1):

$$[\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{l \times c}$$

где α - измеренный угол вращения в градусах; l - толщина слоя в дециметрах; c - концентрация раствора, выраженная в граммах вещества на 100 мл раствора.

Для жидких веществ (2):

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l \times \rho}$$

где α - измеренный угол вращения в градусах; l - толщина слоя в дециметрах; ρ - плотность жидкого вещества в граммах на 1 мл.

Удельное вращение определяют либо в пересчете на сухое вещество, либо из высушенной навески, о чем в частных статьях должно быть соответствующее указание.

Для оценки чистоты вещества по уравнению (1) или (2) рассчитывают величину его удельного вращения $[\alpha]$. Концентрацию оптически активного вещества в растворе находят по формуле (3):

$$c = \frac{\alpha \times 100}{[\alpha] \times l}$$

Поскольку величина $[\alpha]$ постоянна только в определенном интервале концентраций, возможность использования формулы (3) ограничивается этим интервалом.

По ГФ XII: измерение угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью $\pm 0,02$ град, при температуре $(20 \pm 0,5)$ °С. Измерения оптического вращения могут проводиться и при других значениях температуры, но в таких случаях в частной фармакопейной статье должен быть указан способ учета температуры.

Основными частями поляриметра являются источник поляризованных лучей (поляризатор) и прибор для их исследования (анализатор), представляющие собой спец. призмы или пластинки, изготовленные из различных минералов. Чаще всего используются призмы Николя, изготовленные из исландского шпата.

Технические характеристики СМ-3:

- диапазон показаний угла вращения плоскости поляризации - $0 - 360^\circ$;
- основная погрешность поляриметра в диапазоне измерений $-35^\circ - 0^\circ - +35^\circ$, - не более 0.04° ;
- чувствительность поляриметра - 0.04° ;
- объем кювет - не более 5; 8; 10; 20 мл;
- источник света лампа натриевая ДНАС-18;



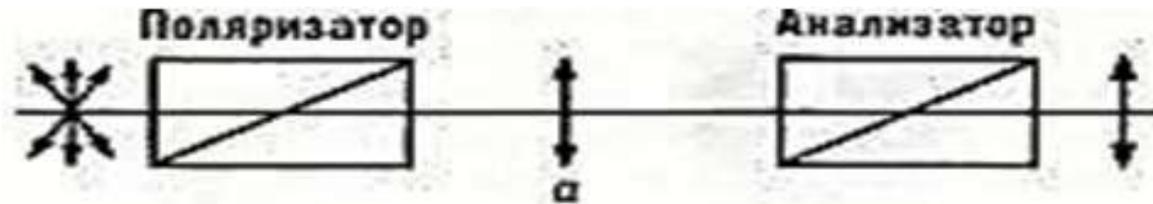
Общий принцип устройства и работы поляриметров

Луч от источника света направляется через желтый светофильтр в призму-поляризатор. Проходя через призму Николя, луч света поляризуется, колебания его совершаются только в одной плоскости. Плоскополяризованный свет пропускают через кювету с раствором оптически активного вещества. При этом отклонение плоскости поляризации света определяют с помощью второй, вращающейся, призмы Николя (анализатора), которая жестко связана с градуированной шкалой. Наблюдаемое через окуляр значительное поле, разделенное на две или три части различной яркости, следует сделать равномерно освещенным, поворачивая анализатор. Величину поворота считывают со шкалы. Для проверки нулевой точки прибора проводят аналогичные измерения без исследуемого раствора. Направление плоскости поляризации, как правило, устанавливают направлением поворота анализатора.

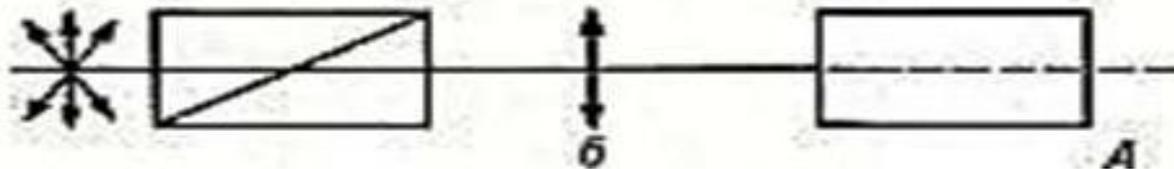
Конструкция отечественных поляриметров такова, что если для получения однородного, освещенного поля зрения приходится повернуть анализатор вправо, т. е. по часовой стрелке, то исследуемое вещество было правовращающим, что обозначается знаком + (плюс) или d . При повороте анализатора против часовой стрелки получаем левое вращение, обозначаемое знаком - (минус) или l .

В других приборах точное направление вращения определяют при помощи повторного измерения, которое проводят либо с половинной толщиной слоя жидкости либо с половинной концентрацией. Если при этом получают угол вращения $\alpha/2$ или $\alpha/2+900$, то можно считать, что вещество является правовращающим. Если новый угол вращения равен $90 - \alpha/2$ или $180 - \alpha/2$, то вещество обладает левым вращением. Удельное вращение не очень сильно зависит от температуры, однако для точных измерений термостатирование кюветы необходимо. При данных по оптическому вращению необходимо указывать применяемый растворитель и концентрацию вещества в растворе, например $[\alpha] = 27,3^\circ$ в воде ($C=0,15$ г/мл).

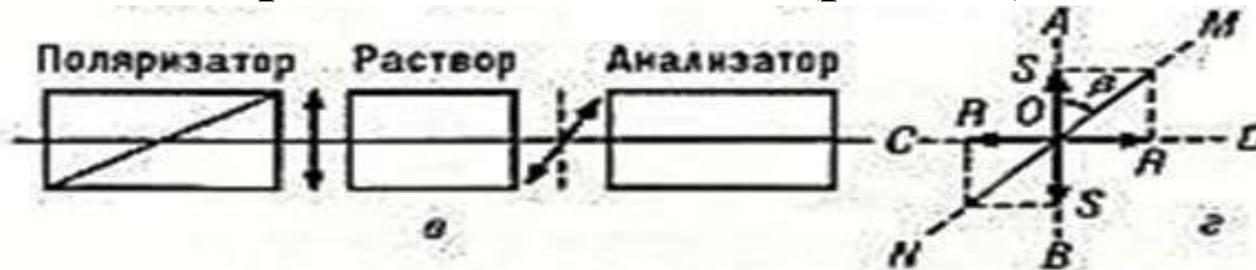
Если поляризатор и анализатор установлены так, что их плоскости поляризации взаимно параллельны, то луч света проходит через них (рис 1 а).



Если плоскости поляризации взаимно перпендикулярны, то лучи света не проходят через анализатор, свет за ним не обнаруживается; он установлен «на темноту» (рис. 1 б).



Если между поляризатором и анализатором, поставленным «на темноту», поместить раствор оптически активного вещества (рис. 1 в), то за анализатором появится свет, т. к. луч света, вышедший из раствора, колеблется уже не в плоскости, перпендикулярной плоскости анализатора, а в плоскости М (рис. 1 г).



Составляющая O колеблется в плоскости пропускания лучей анализатора; за ним виден свет. Для того чтобы установить снова анализатор «на темноту», необходимо повернуть его так, чтобы плоскость его стала перпендикулярной плоскости M , т.е. на угол. **Угол в определенных пределах прямо пропорционален концентрации вещества в растворе и толщине раствора!!!!!!**

✓ Оптическое вращение растворов должно быть измерено в течение 30 мин с момента их приготовления.

✓ Предназначенные для измерения угла вращения растворы или жидкие вещества должны быть прозрачными.

✓ При измерении, прежде всего, следует установить нулевую точку прибора или определить величину поправки с трубкой, заполненной чистым растворителем (при работе с растворами) или с пустой трубкой (при работе с жидкими веществами).

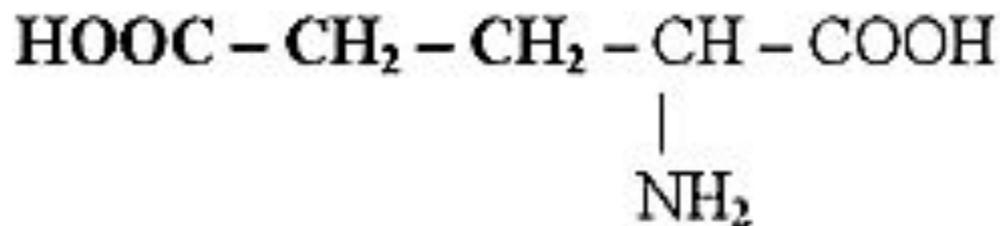
✓ После установки прибора на нулевую точку или определения величины поправки проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз.

✓ Для получения величины угла вращения показания прибора, полученные при измерениях, алгебраически суммируют с ранее найденной величиной поправки.

Примеры использования поляриметрии в частных статьях различных фармакопей.

ГФ XII

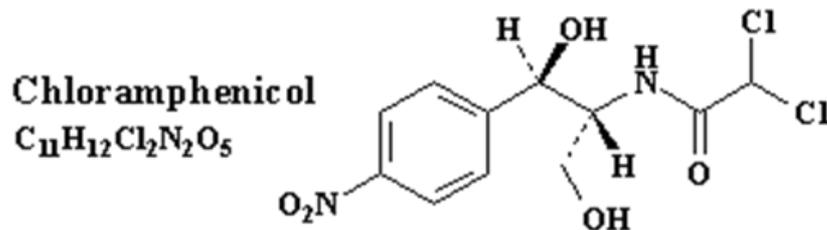
ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА (ФС 42-0229-07)



Удельное вращение. От +30,5 до +32,5 ° в пересчете на сухое вещество (10 % раствор субстанции в 1 М растворе хлористоводородной кислоты).

ГФ XII

ЛЕВОМИЦЕТИН
(ФС 42-0250-07)



Удельное вращение. От +18 до +21 ° в пересчете на сухое вещество (5 % раствор субстанции в спирте 96 %).

EUR. PH.

CHLORAMPHENICOL
(Chloramphenicolum)

TESTS. Specific optical rotation (2.2.7). Dissolve 1.50 g in ethanol R and dilute to 25.0 ml with the same solvent. The specific optical rotation is + 18.5 to + 20.5.

Поляриметрический способ определения концентрации оптически активных веществ имеет преимущество перед другими способами:

- ✓ Занимает очень мало времени, не требует реактивов, анализируемый раствор после поляриметрического исследования может быть применен для любой цели.
- ✓ Поляриметрия является более специфическим методом исследования оптически активных веществ по сравнению с рефрактометрией, так как она основана на измерении величины, значение которой определяется присутствием только оптически активного вещества.
- ✓ Большая практическая ценность данного метода заключается в его высокой точности, простоте осуществления.
- ✓ Высокая точность важна не только для получения требуемой точности результатов измерений - она даёт возможность анализа при малых количествах образцов. Например, в современных приборах в 0,1 мл раствора можно идентифицировать $2,5 \times 10^{-9}$ г глюкозы.



Atago POLAX-2L
поляриметр полуавтоматический



Автоматический поляриметр
Atago AP-300

Помимо указанных оптических методов для идентификации индивидуальных лекарственных веществ в фармацевтическом и токсикологическом анализе не теряет своего значения химическая микроскопия. Перспективно применение электронной микроскопии, особенно в фитохимическом анализе. В отличие от оптической микроскопии объект подвергается воздействию пучка электронов высоких энергий. Изображение, образованное рассеянными электронами, наблюдают на флуоресцирующем экране.

Одним из перспективных экспрессных физических методов является рентгенографический анализ. Он позволяет идентифицировать лекарственные вещества в кристаллической форме и различать при этом их полиморфное состояние. Для анализа кристаллических лекарственных веществ могут быть также применены различные виды микроскопии и такие методы, как фотоакустическая спектроскопия, компьютерная томография, измерения радиоактивности и др.

Эффективным неdestructивным методом является отражательная инфракрасная спектроскопия, которая используется для определения примесей различных продуктов разложения и воды, а также в анализе многокомпонентных смесей.