



Интегрисане академске студије фармације
Инструменталне методе- Б14

**П12. UV-VIS спектри. Квантитативна UV-VIS
анализа.**

Проф. др Недељко Манојловић

ИНТЕРПРЕТАЦИЈА UV-VIS СПЕКТРА.

АНАЛИЗА СПЕКТРА ФАРМАЦЕУТСКИХ СУПСТАНЦИ СА КИСЕЛО-БАЗНИМ ОСОБИНАМА И ТАУТОМЕРА

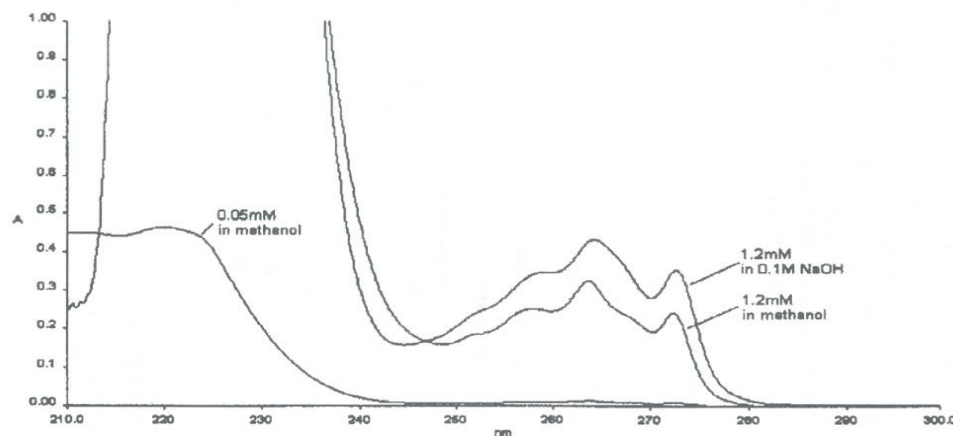
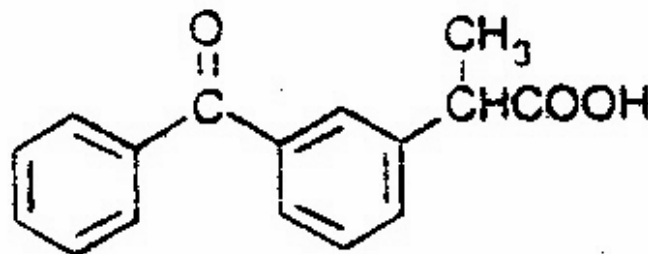
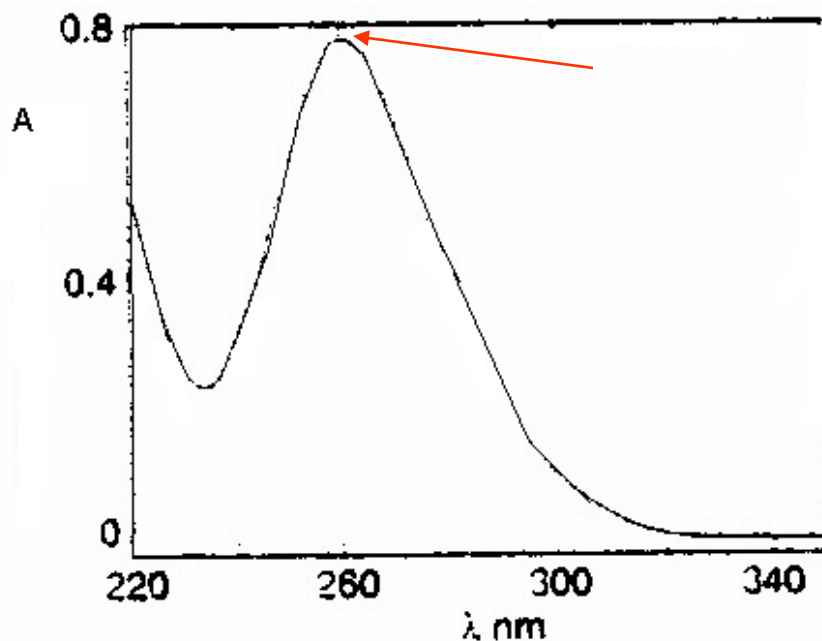



Figure 6. Ultraviolet absorption spectrum of *rac*-ibuprofen in methanol and in 0.1 N NaOH [23].

- апсорпциони максимуми у UV-VIS спектру се карактеришу обликом (фина структура), λ_{\max} и ϵ_{\max}
- идентификација се може вршити компарацијом са спектром стандарда



Кетопрофен



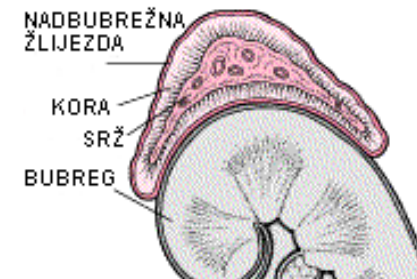
UV спектри неких репрезентативних молекула дрога

■ Стероидни енони кортикостероиди

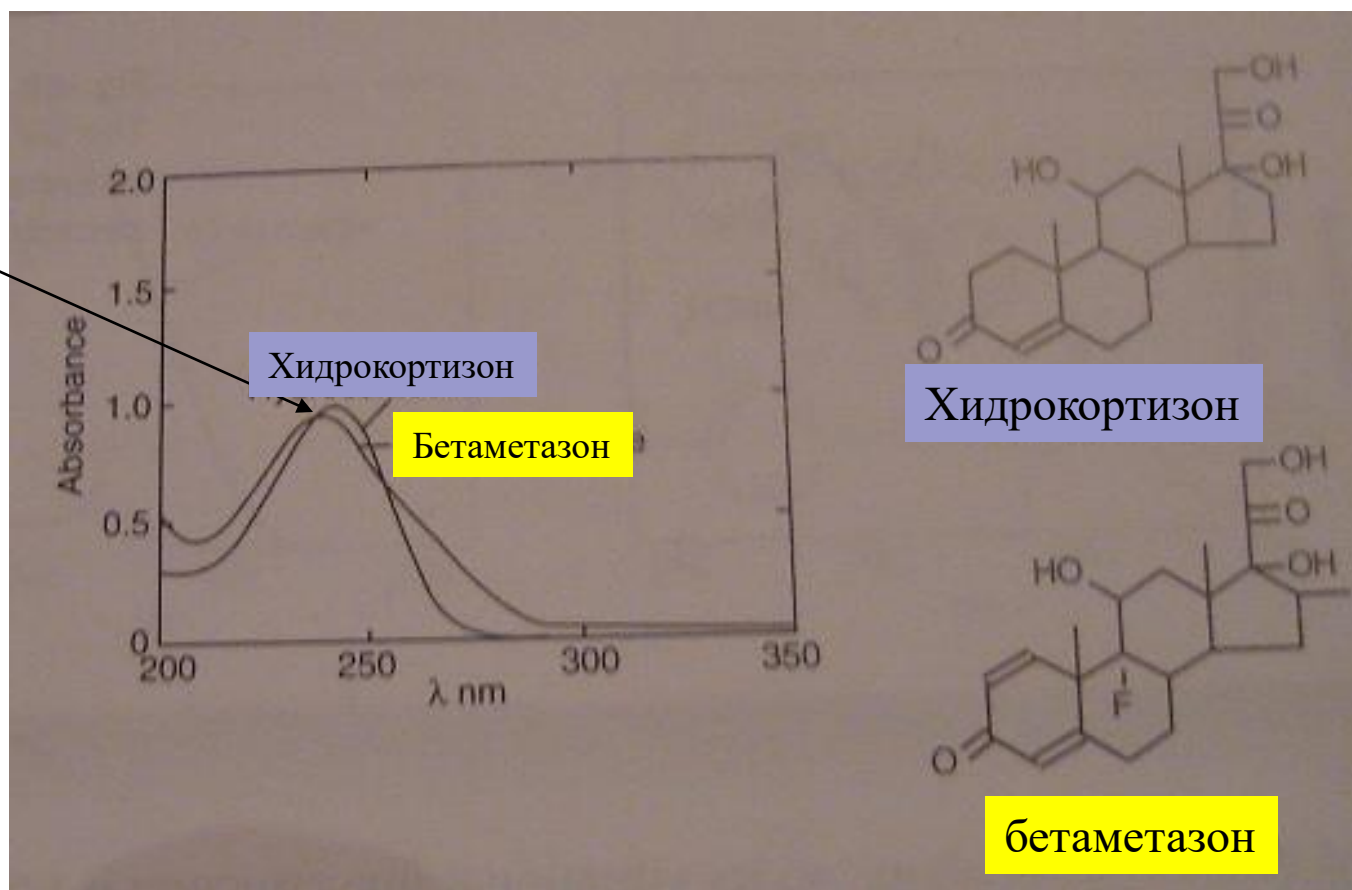
Хидрокортизон и бетаметазон

λ_{\max} око 240 nm

Додатна = веза бетаметазона нема утицаја



λ_{\max}



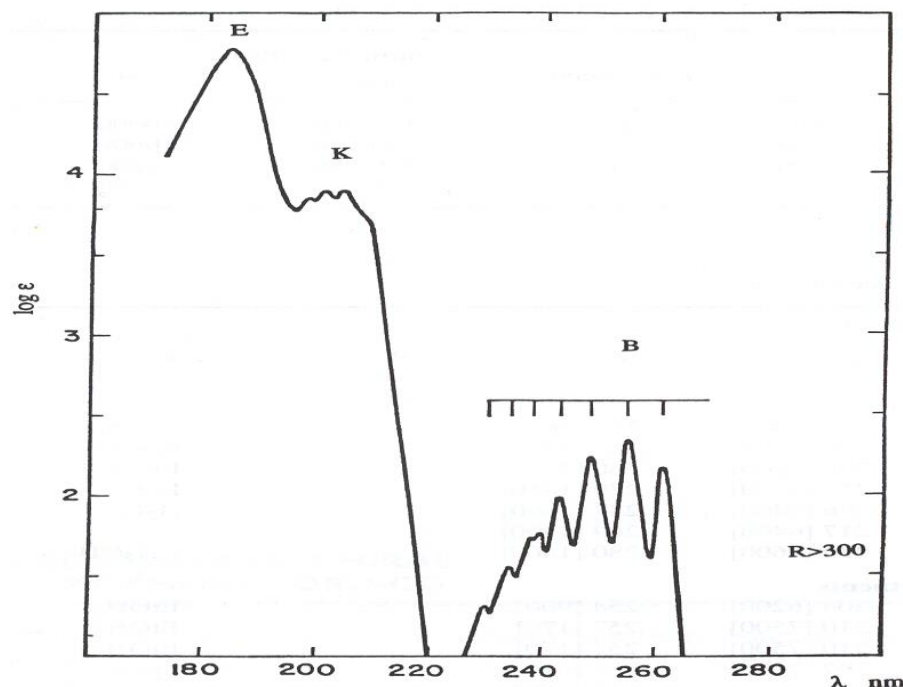
АРОМАТИЧНА ЈЕДИЊЕЊА

UV спектар бензена садржи 3 апс. максимума:
на 184 nm (дозвољени прелаз; E1 или II примарна трака, E),

на 203 nm (забрањени прелаз; E2 или примарна трака, K)
и на 256 nm (забрањени прелаз; B или секундарна трака).

Сви потичу од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза.

УВ спектар бензена
у хексану



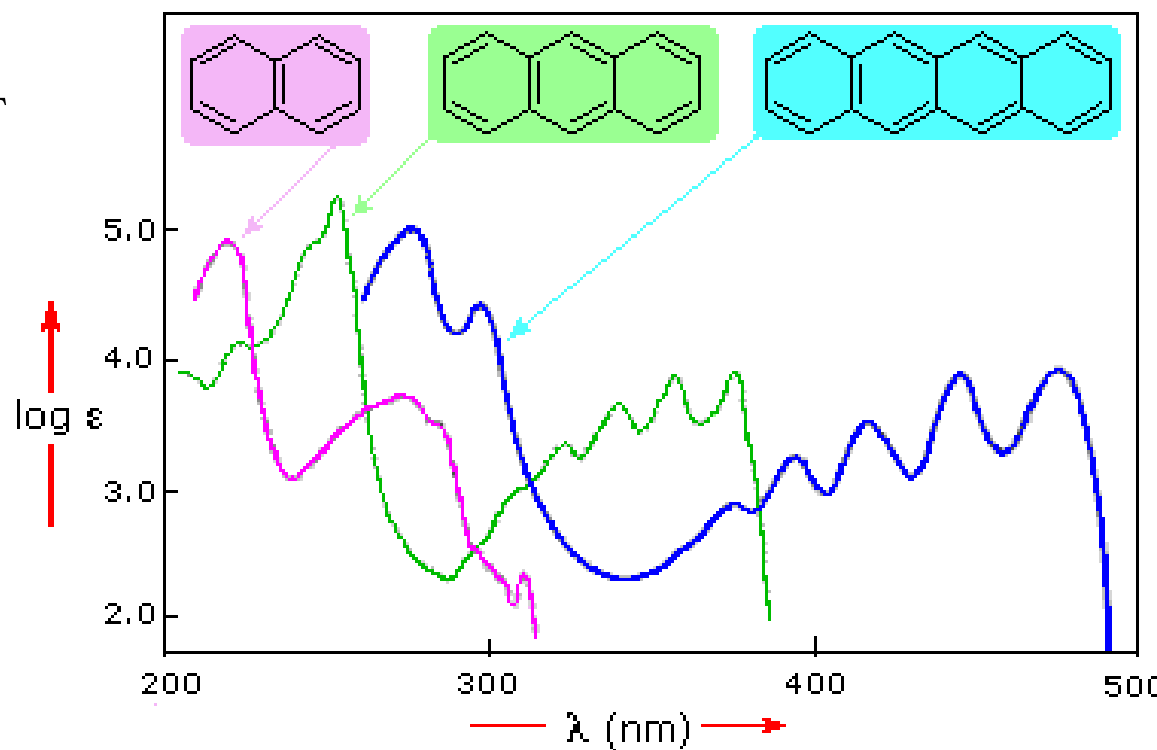
Утицај различитих супституената на померања трака бензена

- утицај ауксохрома: батохромно померање примарне и секундарне траке и повећање интензитета секундарне траке и губитак fine структуре
- утицај хромофоре: батохромно и хиперхромно померање

	примарна трака		секундарна трака	
	λ_{\max}	ϵ_{\max}	λ_{\max}	ϵ_{\max}
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH=CH}_2$	244	12000	282	450
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$	211	6200	270	1450
				(у води)

Полициклична ароматична једињења

Са повећањем броја
прстенова (односно коњугације)
смањује се енергија
електронских прелаза
и долази до батохромног
померања

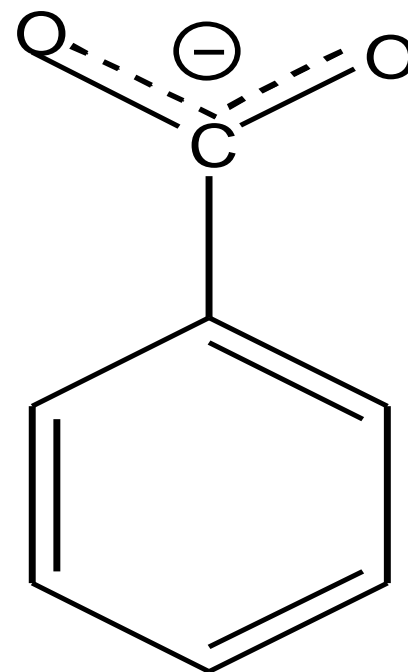


Бензен супституисан хромофором

- Нпр. Ar-CH=CH_2 (-R ефекат)
- Долази до батохромног и хиперхромног померања које је веће код дуже коњугације
- Код дугих коњугација примарна трака се више помера од секундарне па се оне могу преклапати

Ar-COOH

- Додатком базе прелази у карбоксилатни анјон који због појачане резонанције унутар COO^- групе слабије интерагује са π -електронима Ar језгра и долази до хипсохромног ефекта.

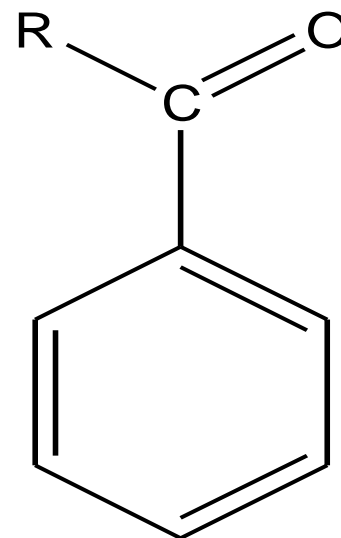


Бензоил деривати

R = алкил или остатак прстена
H, OH, O-алкил

Емпиријска правила за израчунавање
 λ_{\max} код бензоил деривата

На основну вредност
додају се утицаји супституената
у o, m и p-положајима



Хетероаромати

$\pi \rightarrow \pi^*$

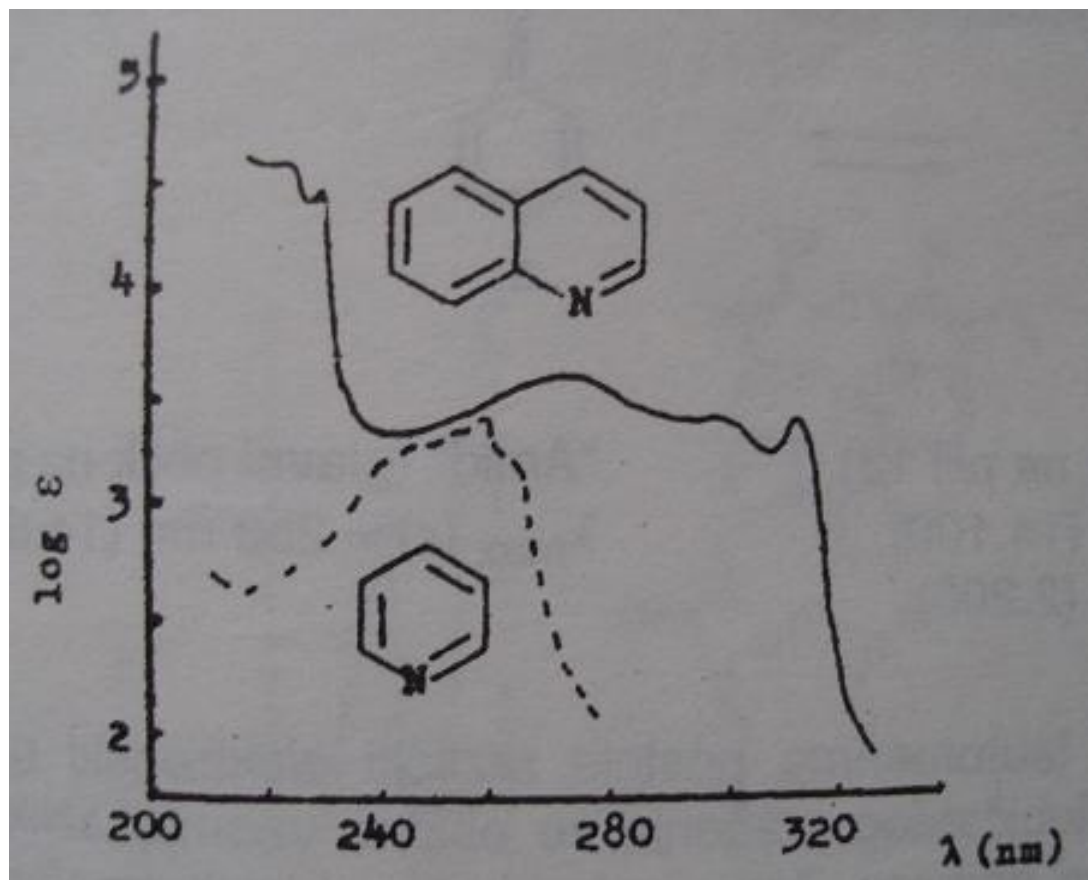
190-240 nm (ϵ 5000-15000) интензивна трака

240-300 nm слаба трака
са фином структуром

$n \rightarrow \pi^*$

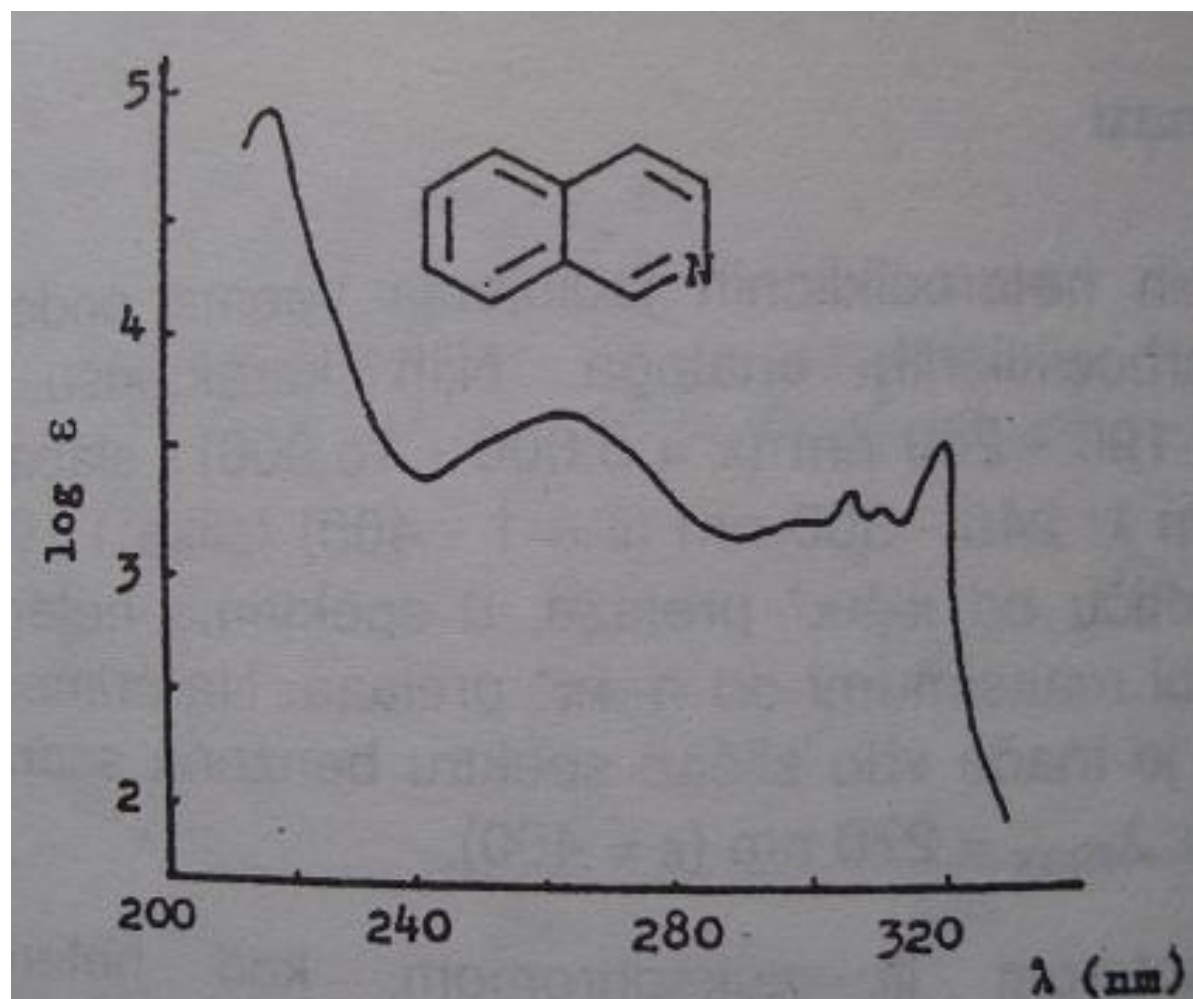
Код пиридина на 270 nm

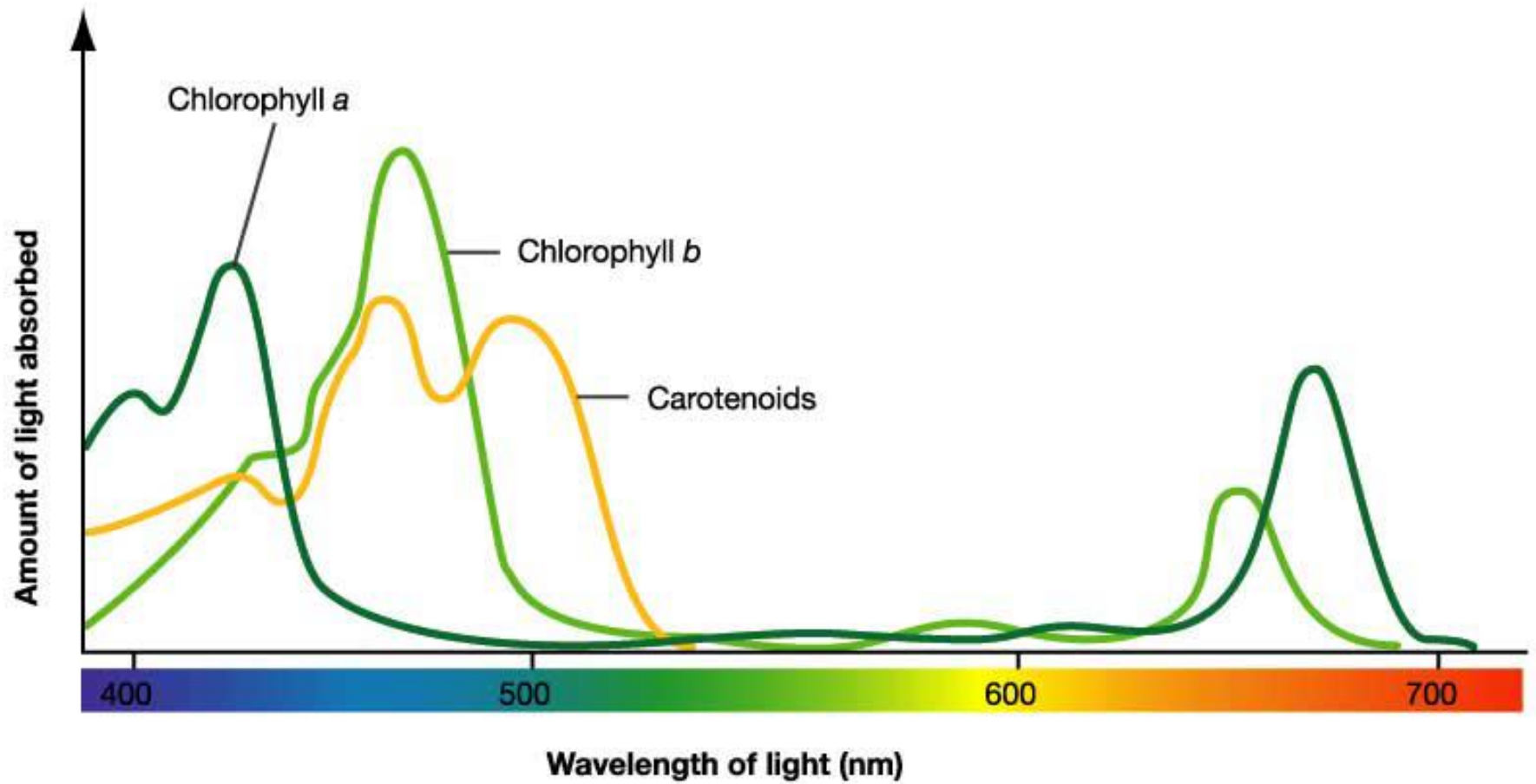
UV спектри пиридина и
хинолина



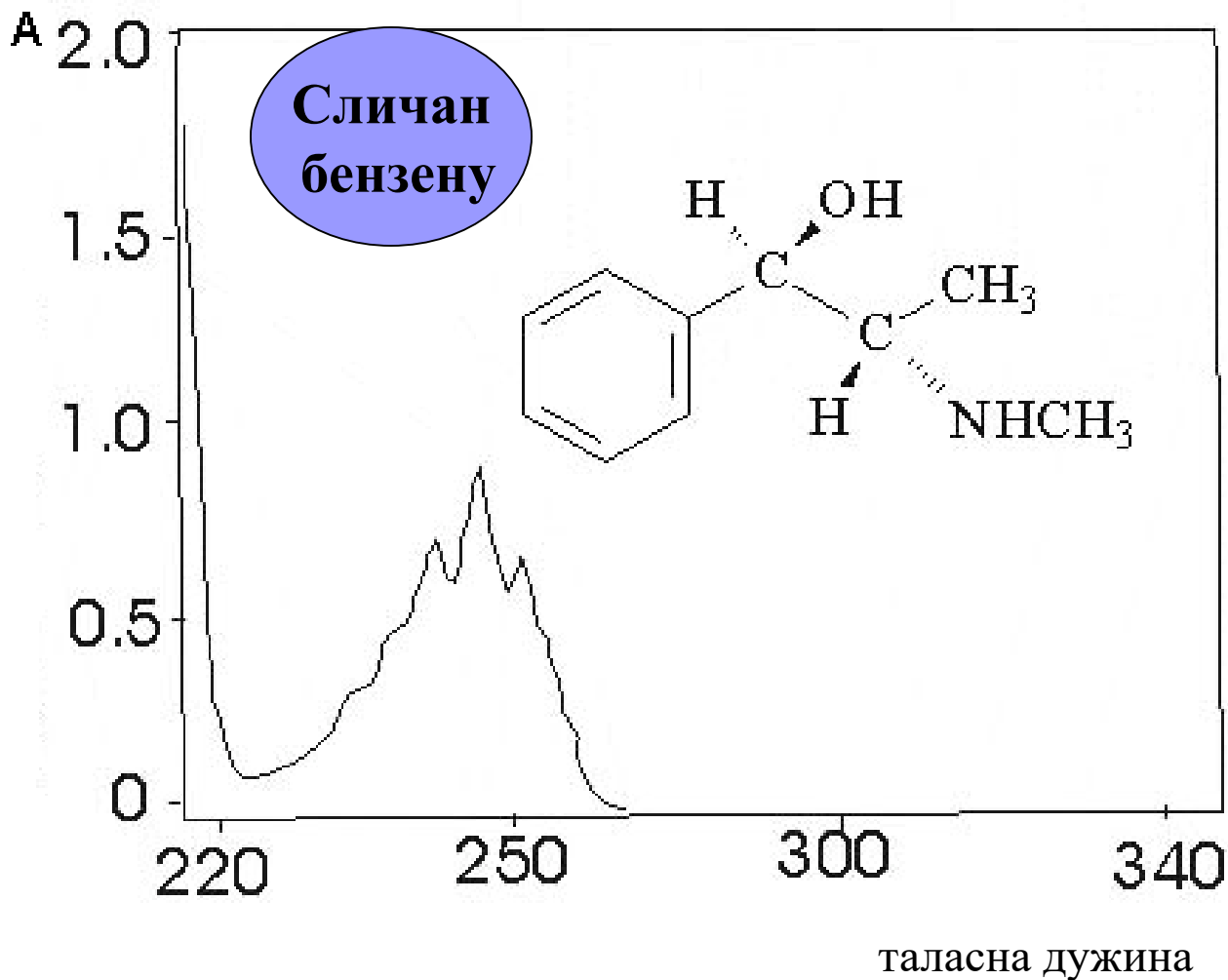
супституција хромофором
и ауксохромом доводи
до батохромног и
хиперхромног
померања код
хетероцикличних
једињења

UV спектар
ИЗОХИНОЛИНА





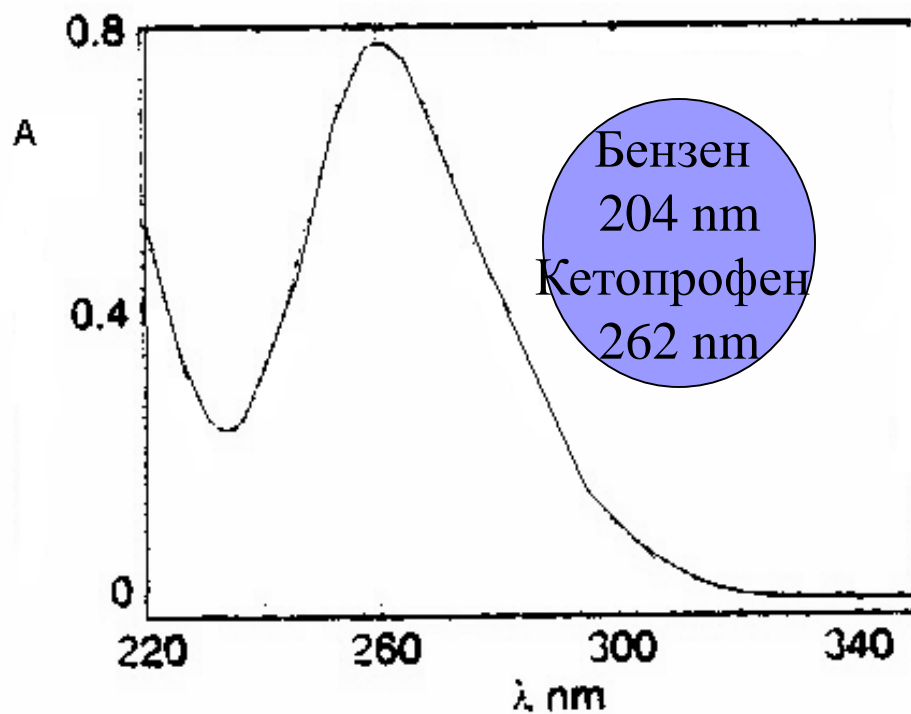
ефедрин



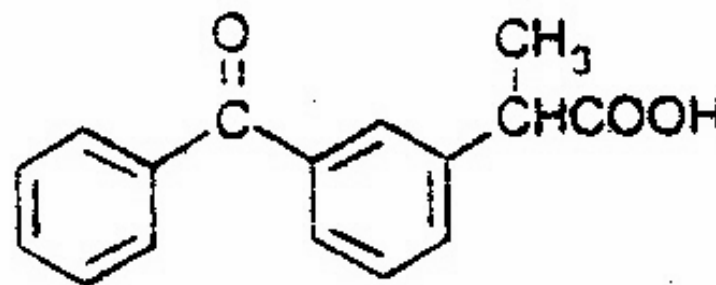
Сличне
хромофоре
ефедрину имају
ибупрофен,
амфетамин

UV спектар ефедрина - једноставан бензеноидни систем око 240 nm

кетопрофен



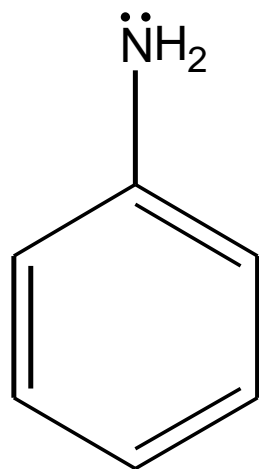
Продужена
бензенска
хромофора



Кетопрофен

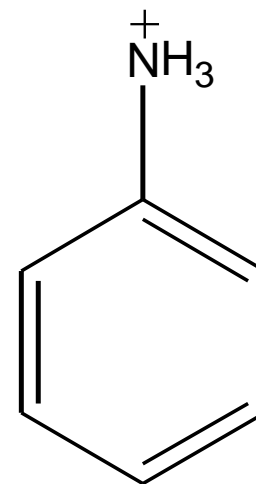
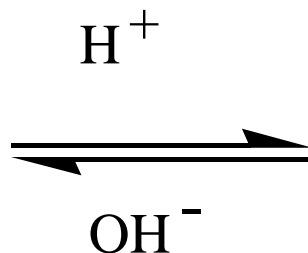
Анализа спектра фармацевтских супстанци са кисело-базним особинама и таутомера

- снимањем спектра ацидо-базних коњугованих парова једне супстанце **при различитим рН вредностима** долази до померања апсорп. максимума
- протонизација анилина доводи до **хипсохромног утицаја** због блокирања слободног електронског пара који продужава коњугацију



анилин

λ_{\max}
 ϵ
230 i 280 nm
(8600)



анилинијум катјон

203 i 254 nm
(7500)

сличне вредности као бензен

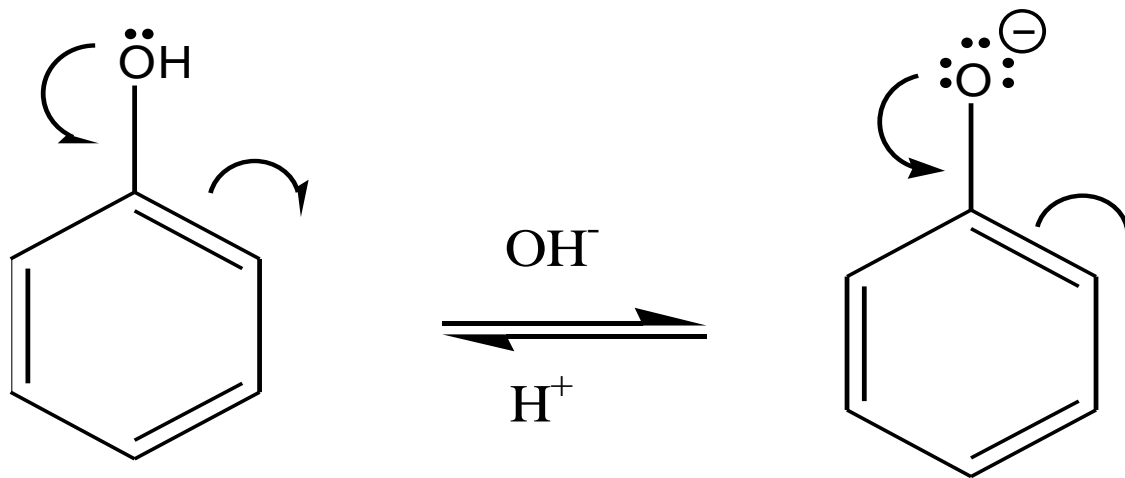
- Применом одговарајућих **пуфера** може се издиференцирати један таутомерни облик; молекулски или одговарајући коњуговани код ацидо – базних коњугованих парова
- промена рН код оваквих функционалних група (NH_2 , $\text{OH}\dots$) користи се за њихово **доказивање**.



МИНИ ТЕСТ

**ОБЈАСНИТИ ПОМЕРАЊА АПСОРПЦИОНИХ
МАКСИМУМА КОД ФЕНОЛА ПОД
ДЕЈСТВОМ АЛКАЛИЈА**

ОДГОВОР

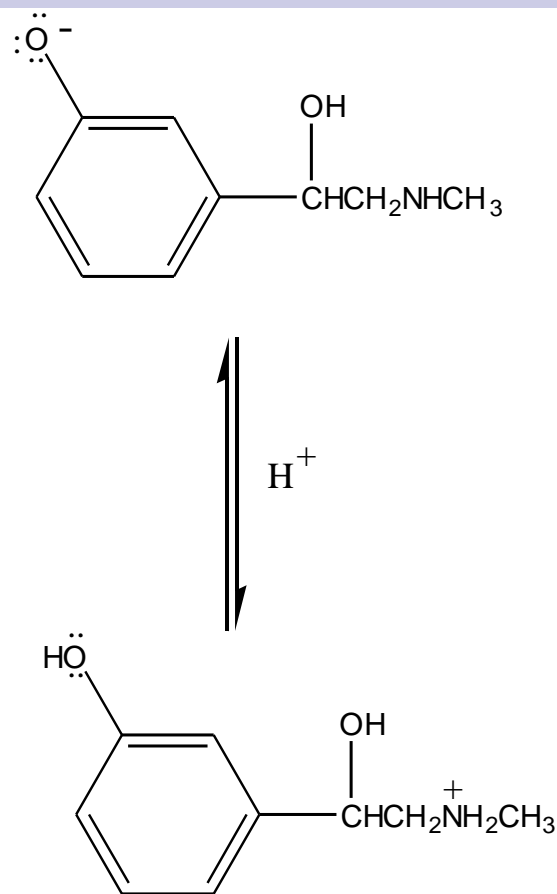
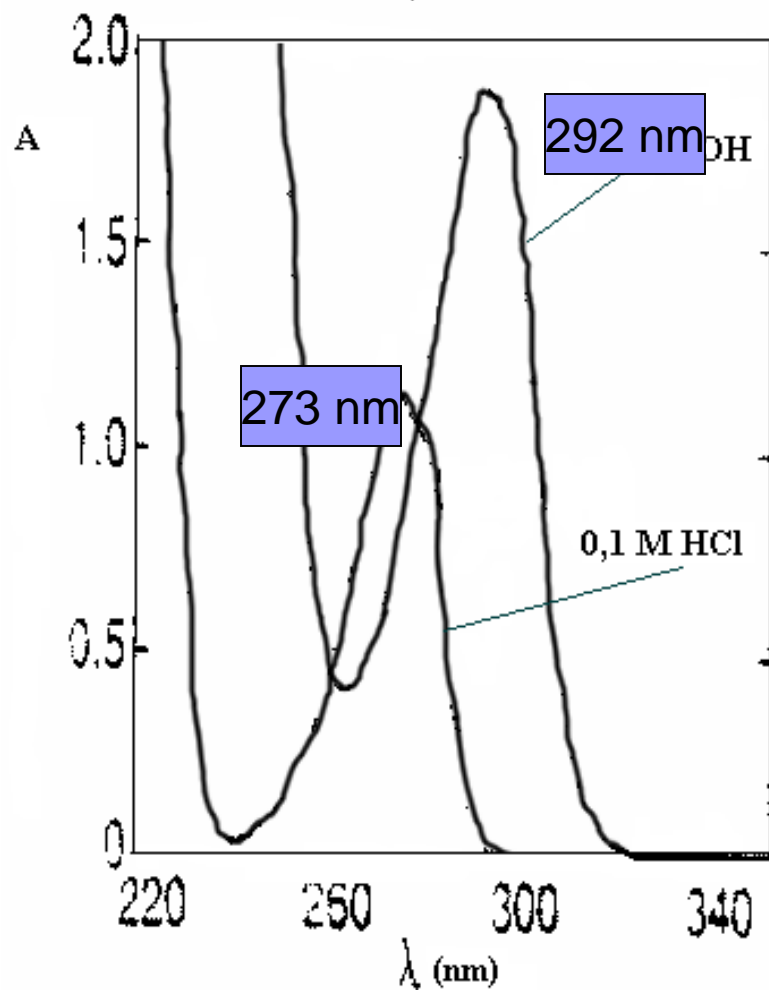


$$\lambda_{\text{max}} = 211 \text{ i } 270 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{max}} = 235 \text{ i } 287 \text{ nm}$$

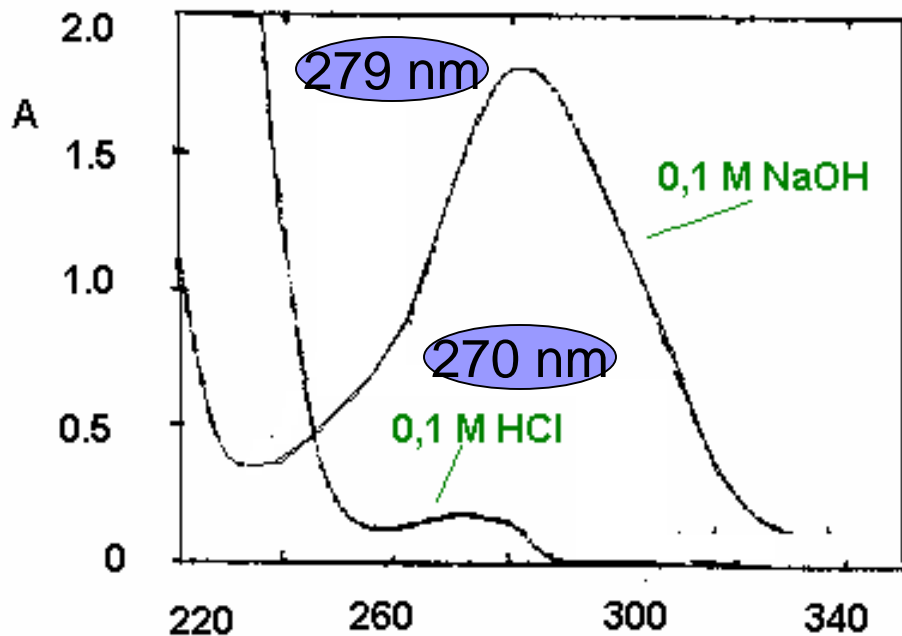
Батохромно и хиперхромно
померање примарне и
секундарне траке

УВ спектар **фенилефрина** снимљен у базним и киселим условима.

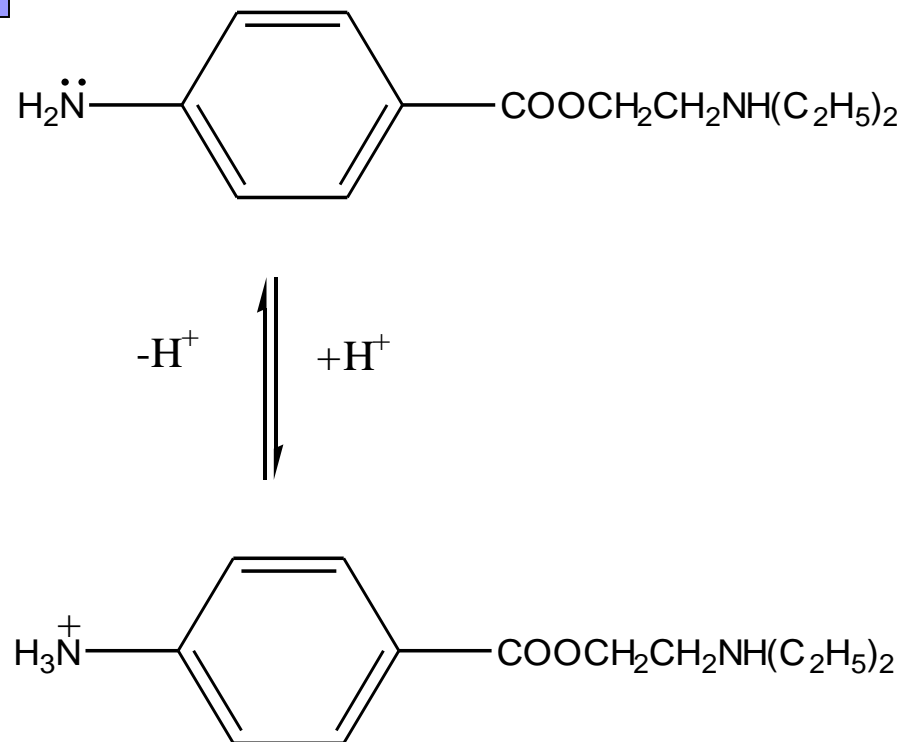


УВ спектар **прокаина** снимљен у киселој и базној средини

C=O продужава хромофору



таласна дужина



УВ-ВИС спектри

β-каротен

Кофеин

Ацетилсалицилна киселина
(аспирин)

Ацетон

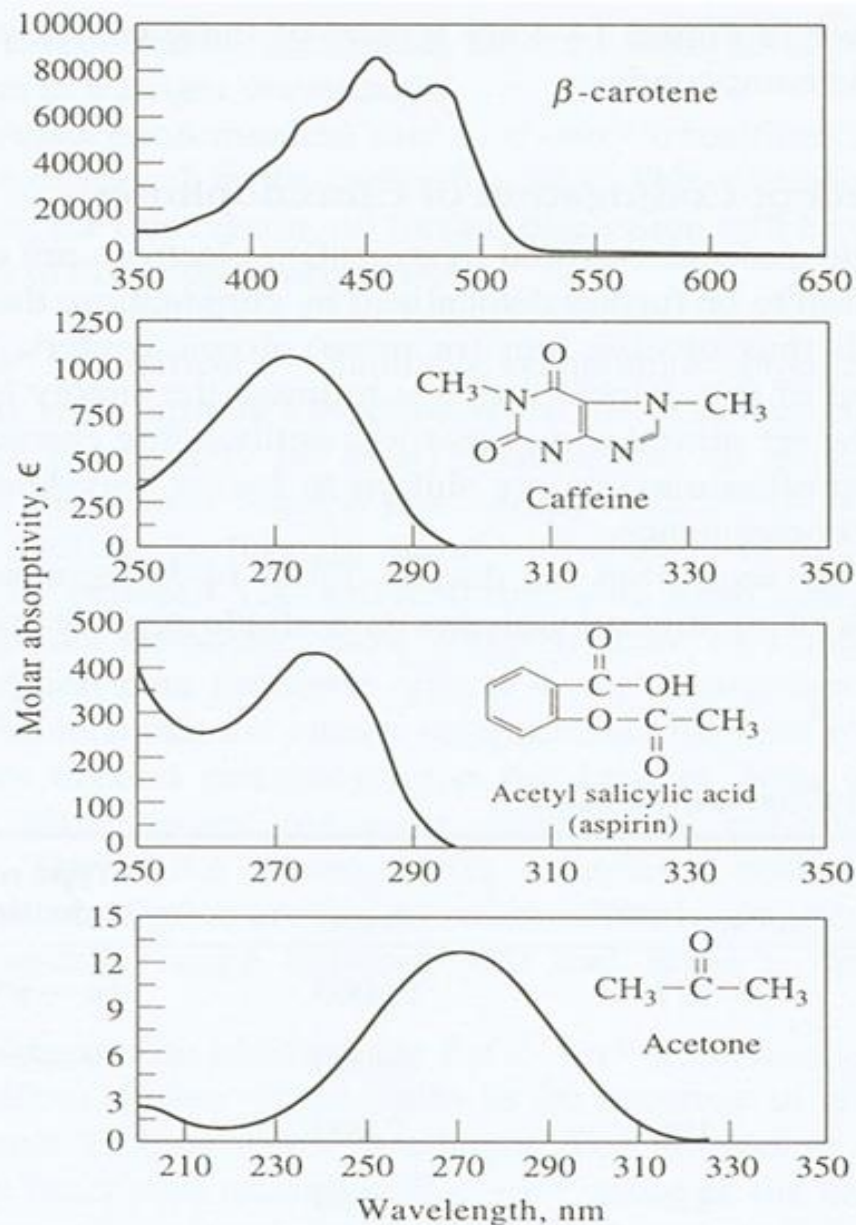
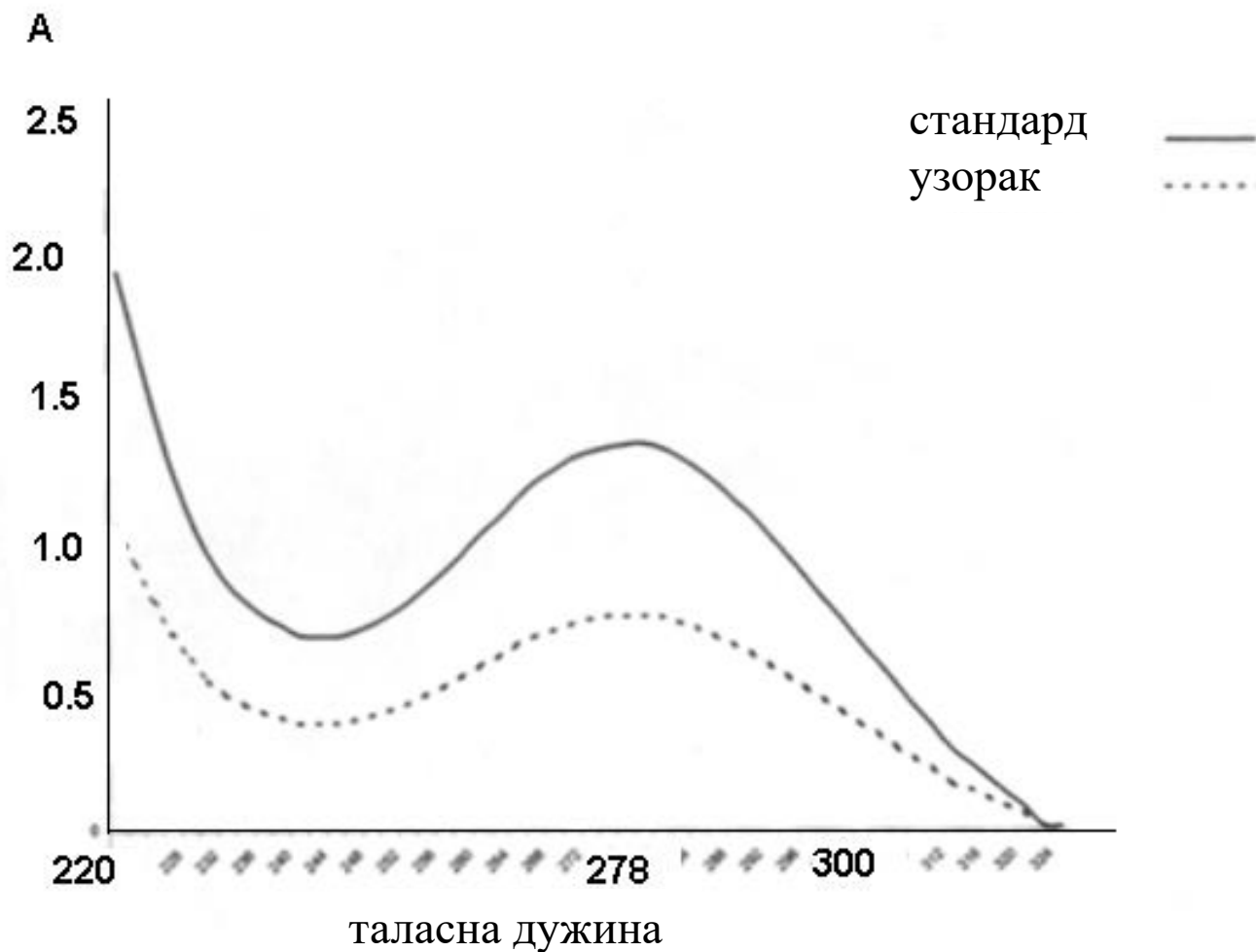


Figure 14-4 Ultraviolet spectra for typical organic compounds.


МЕТОДА КОМПАРАЦИЈЕ СА СТАНДАРДОМ

Компарација UV спектра хлорамфеникола са стандардом



Квантитативна анализа и статистичка обрада података

- **РАСТВОРАЧИ:** морају бити тзв. спектроскопске чистоте. Најчешће се користе 95 % етанол, циклохексан, хексан, изооктан, вода.
- **поларни растварачи** могу узроковати померања апс. максимума код нпр. енона, код којих изазивају батохромно померање $\pi \rightarrow \pi^*$ траке и хипсохромни ефекат $n \rightarrow \pi^*$ траке, те се мора извршити корекција за растварач.
- Поларни растварачи имају веома мали утицај на диене и полиене који се при прерачунавању може занемарити.


$$A = \log I_0/I_t = \varepsilon c d$$

I_0 = интензитет упадног зрачења

I_t = интензитет зрачења по проласку кроз узорак

A = апсорбанција

c = концентрација (mol/dm^3)

ε = моларни екстинциони коефицијент

d = дужина путање зрака кроз узорак (cm)

У фармацеутским прорачунима концентрација се радије изражава у g или mg него у молovima, па се уместо ε користи **екстинциони коефицијент** A (1%, 1cm).

$$\varepsilon = 10^{-1} A(1\%, 1\text{cm}) \times M \quad M = \text{молекулска маса}$$

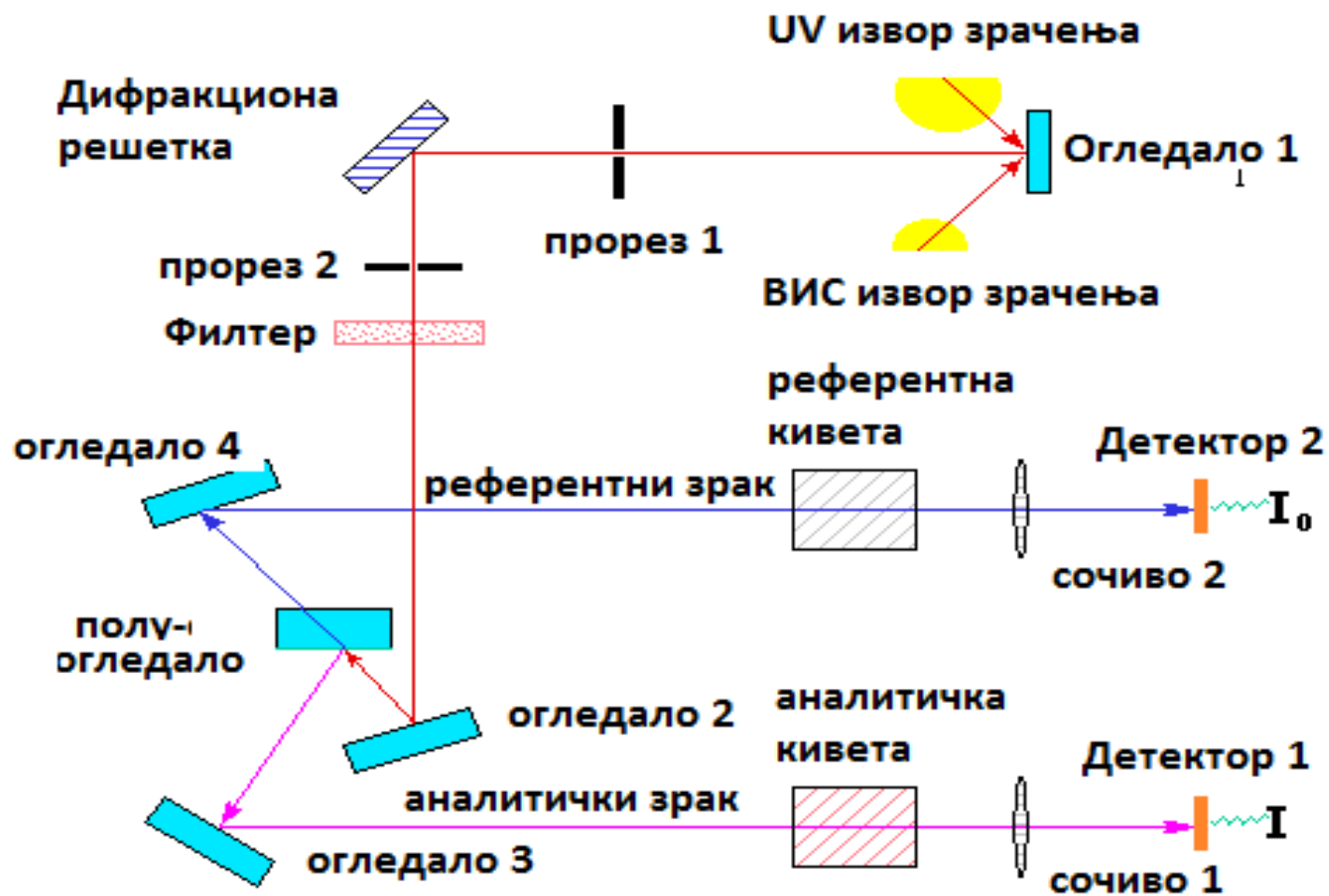
Делови UV-VIS спектрофотометра

Светлосни извор

1. кварцна халогена или тунгстенова лампа за VIS област 350-900 nm
2. деутеријумска лампа за UV област 190-350 nm

Монохроматор — разлаже сноп зрачења на различите фреквенције

- Дифракциона решетка
- Огледала
- Прорези за пропуштање зрака одређених фреквенција
- Детектори
- Аналитичка и референтна кивета од кварца (блиска UV и VIS) и стакла (само VIS)



Упрощена схема двозрачног UV-VIS спектрофотометра

Истовремена анализа двокомпонентног фармацеутског препарата

Л.В. закон је адитиван - ако су λ_{\max} две компоненте довољно удаљени да нема преклапања, или је потпуна апсорпција само једне компоненте, на одговарајућој λ_{\max} , док друга супстанца уопште не апсорбује на тој таласној дужини.

испитивање појединачних апсорпционих спектра супстанци као и када су заједно у раствору

$$A = abc$$

$$ab = f$$

$$A = fc$$

f = апсорпциона константа - нагиб криве

за раствор који садржи n
апсорбујућих компоненти
чије су апсорпције
адитивне важи израз

$$A = \sum_{j=1}^{j=n} f_{ij} c_j$$

$$A_1 = f_{11}c_1 + f_{12}c_2 + \dots + f_{1n}c_n$$

$$A_2 = f_{21}c_1 + f_{22}c_2 + \dots + f_{2n}c_n$$

j - компоненте

i - таласна дужина

A_1 апсорбанција када је $i = \lambda_1$

A_2 апсорбанција када је $i = \lambda_2$

UV – VIS спектрофотометријска анализа неких фармацеутских супстанци

Одређивање оксибензоевих киселина у UV спектралној области:

- Ацетилсалицилна кис. - хлороформ, $\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$
- Салицилна киселина. - хлороформ $\lambda_{\max} = 308 \text{ nm}$
вода, рН 5-8, $\lambda_{\max} = 269 \text{ nm}$
рН 1-6, $\lambda_{\max} = 298 \text{ nm}$

Употреба: у одређивању у препаратима Аспирина
(салицилна кис. је деградациони производ
ацетилсалицилне кис.)

Прво се одреди салицилна кис. у хлороформском раствору на 308 nm, а онда раствор разблажи и одреди ацетилсалицилна кис. на 278 nm

Индиректна спектрофотометрија - VIS

-Салицилна киселина и њене соли у облику комплекса са Fe(III) јоном при рН 4-6 , λ_{max} 525 nm (љубичаста боја).

-Ацетилсалицилна киселина се на овај начин може одредити тек после хидролитичког цепања са 10 % КОН
Реакцију дају и друге окси киселине

Одређивање деривата р-аминофенола и пиразолона

ФЕНАЦЕТИН

UV спектрофотометријски на λ_{\max} 250 nm – у смеши са
аспирином и кофеином

VIS спектрофотометријски

-растворен у метанолу и води са нитратном кис. даје
наранџасто – црвено обојење (λ_{\max} 465 nm)

-после хидролитичког цепања настаје р -амино фенол који
реагује са хромном киселином у присуству амонијум
цитрата дајући црвено обојење (λ_{\max} 543 nm)

АНТИПИРИН

VIS спектрофотометријски

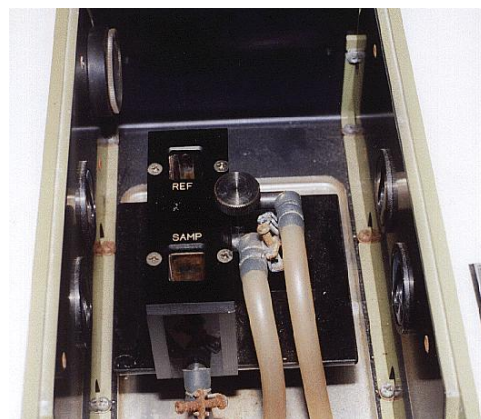
- у кис. средини са нитратима даје обојење са максимумом апсорпције, λ_{\max} 350 nm.
- са р-диметиламинобензалдехидом даје ружичасто обојење (λ_{\max} 513nm)

АМИНОПИРИН

-UV спектар - у етанолу има λ_{\max} 270 nm

колориметријски са р-нитроанилином и Fe(III)-хлоридом.

-VIS спектрофотометријски у кис. или неут. средини са Fe(III) - солима даје љубичасто једињење (λ_{\max} 570 nm).



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

Кивете за
снимање



Вежба: снимање и анализа UV-VIS спектра антрахинона у метанолу и базним условима

