**III məşğələ.**

**Spektrofotometriya və onun əsasları.**

***Ultrabənövşəyi və görünən sahələrdə spektrofotometriya***

Tədqiq olunan maddələr tərəfindən monoxromatik elektromaqnit şüalarının (UB- və IQ-sahələrdə) udulmasına əsaslanan spektrofotomerik üsullardan və monoxromatik olmayan şüaların udulmasına əsaslanan kolorimetrik analiz üsullardan istifadə olunur.

Spektrin ultrabənövşəyi və görünən sahəsində spektrofotometriya müəyyən quruluş xüsusiyyətlərinə malik maddələr üçün tətbiq edilə bilər.

Üzvi maddələrin elektron spektrləri molekuldakı bölünən rabitə və bölüşdürülməmiş elektron cütlərindən asılıdır. Udma baş verən dalğa uzunluğu molekulda elektron vasitəsilə birləşmiş atom qruplarının xassəsidir. Bu qrup xromofor adlanır. Xromoforu olan birləşmələrə aromatik birləşmələr, bir sıra metallarla üzvi birləşmələrin əmələ gətirdikləri kompleks birləşmələr və s. aiddir.

Elektromaqnit şüalarının udulmasının ölçülməsinə əsaslanan üsullar maddələrin quruluşunu, eyniliyini və miqdarını təyin etmək üçün tətbiq olunur. Şüanın maddə tərəfindən udulmasının ölçülməsinə əsaslanan bu üsulda iki qanundan istifadə edilir:

1. Buger-Lambert qanunu – bu qanun işıq şüasının mühitdən keçərkən intensivliyinin azalması ilə həmin mühitdə olan maddə qatının qalınlığını əlaqələndirir.

Bu qanunauyğunluq təcrübi cəhətdən 1729-cu ildə Pyer Buger, nəzəri cəhətdən isə 1760-cı ildə İohann Henrix Lambert tərəfindən əsaslandırılmışdır.

Məhluldan keçən işıq şüasının intensivliyinin azalması işıqburaxma əmsalı (T) ilə xarakterizə olunur:

burada: I- məhlula düşən şüanın intensivliyi;

Iº - məhluldan keçən şüanın intensivliyidir. T – nin əks loqarifmi optik sıxlıq adlanır və D ilə işarə olunur:

1. Ber qanunu – udulma ilə udan maddənin məhlulda konsentrasiyası arasındakı aslılığı göstərir.

1852-ci ildə A.Ber tərəfindən işıq şüası keçən məhlul qatının qalınlığının işıq şüası intensivliyinin azalma səbəblərindən biri olduğu aşkar edildi və qanun ümumi şəkildə Buger – Lambert – Ber qanunu adlandırıldı.

Məhluldan keçən işıq şüasının intensivliyinin dəyişməsi Buger – Lambert – Ber qanununa tabe olur:

I=Iº · 10 – Ɛlc

-lgT=D=Ɛlc

burada: Ɛ – molyar udma əmsalı; l – məhlulun qatının qalınlığı; c – məhlulun qatılığıdır.

l=1 sm və c = 1 mol/l olduqda, D=Ɛ olur. Deməli, molyar udma əmsalı (Ɛ) qatının qalınlığı 1 sm olan 1 molyar məhlulun optik sıxlığına bərabərdir.

Buger–Lambert-Ber qanununa uyğunsuzluq hallarında əvvəlcə standart məhlulun köməyilə optiki sıxlığın qatılıqdan aslılığı müəyyən olunur, sonra isə kalibrə əyrisi qurulur. Kalibrə əyrisinin köməyilə hesablamalar aparılır.

Qatılığı məlum olan standart məhlullarda təyinat aparmaqla müvafiq optik sıxlıq (D) müəyyən edilir. Sonra bu göstəricilər əsasında yoxlanılan məhlul üçün D və müvafiq olaraq miqdar hesablanır.

Şüa udulmanın intensivliyinin dalğa uzunluğundan (nm) asılı olduğunu göstərən əyri maddənin udma spektri adlanır və hər bir maddə üçün səciyyəvi göstəricidir.

Maddənin udma spektrinin köməyi ilə onların keyfiyyətini, məhlullarda və ya qarışıqlarda miqdarını təyin etmək mümkündür.

Elektromaqnit spektri dalğa uzunluqlarına müvafiq olaraq müəyyən sahələrə ayrılmasına görə infraqırmızı, görünən və ultrabənövşəyi sahələrdə spektrofotometriya vardır. Ultrabənövşəyi və görünən sahələrdə molekulların elektron spektrləri, infraqırmızı sahədə isə rəqs edən spektrlər özünü göstərir.

Hal-hazırda spektrofotometrlərin köməyi ilə 190-dan 380 nm-ə qədər olan UB-sahədə (UB-spektrləri), 380-780 nm olan sahələrdə görünən spektrləri, 700 nm-dən (0,7 mkm) 3000 nm-ə (30 mkm)2 qədər olan sahədə isə infraqırmızı spektrləri ölçmək mümkündür. Həlledici kimi qatışıqlardan təmizlənmiş su, turşu və qələvi məhlulları, etanol, xloroform və digər üzvi həlledicilər istifadə olunur.

Spektrofotometriya ilə məhlulların konsentrasiyasını təyin etmək üçün Buger-Lambert-Ber qanunu aşağıda göstərilən formada istifadə edilir:

Ultrabənövşəyi və görünən sahədə optik sıxlığın (D) ölçülməsi spektrofotometrlərin köməyilə aparılır.

Udma göstəricisi (Ɛ) optik sıxlığın D öçülməsi əsasında məlum konsentrasiyalı məhlullar üçün aşağıdakı düstur üzrə hesablanır:

Qatılıq (c) litrdə mol-la və 100 ml məhlulda qramlarla göstərilə bilər. Bununla əlaqədar olaraq düstura (2) əsasən molyar udma göstəricisi hesablanır. Molyar udma göstəricisi (Ɛ) qatının qalınlığı (l) 1 sm olan 1 molyar məhlulun optik sıxlığıdır; xüsusi udma göstəricisi () qatının qalınlığı 1sm və 100 ml-də 1 qr maddə olan məhlulun optik sıxlığıdır. Məhlulun optik sıxlığını ölçməklə aşağıdakı düstur üzrə xüsusi udma göstəricisi hesablanır:

Xüsusi udma gösəricisindən molyar udma göstəricisinə keçid aşağıdakı düsturla yerinə yetirilir:



burada:

M – molekul kütləsidir.

Dərman maddələrinin eyniliyinin təyini xüsusi udma göstəricisinə, müxtəlif həlledicilərdə olan spektral əyrilərin xarakterinə, şüaudmanın maksimum və minimum qiymətlərinə və yaxud müxtəlif dalğa uzunluqlarında onların nisbətinə əsasən müəyyən oluna bilər.

Spektrofotometriya ilə miqdarı təyinatların aparılması zamanı analitik udma sahələrinin (zonalarının) seçilməsi mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Analiz olunacaq maddənin udma sahələri digər komponentlərin udma sahələri ilə üst-üstə düşməməli və kifayət qədər yüksək xüsusi udma göstəricisinə malik olmalıdır.

Miqdarı təyinatlarda istifadə olunan udma zolaqları aşağıdakı şərtlərə uyğun gəlməlidir:

1. Verilmiş zolaqlar mümkün dərəcədə analiz olunan sistemdəki digər komponentlərin udma zolaqları təsirindən azad olmalıdır;
2. Fərdi birləşmə üçün seçilmiş zolaq daha yüksək udma gösəricisinə malik olmalıdır. Belə zolaqlar, adətən, analitik zolaqlar adlanır.

Yoxlanan maddələrin məlum konsentrasiyalı məhlulları üçün χ kəmiyyətini və ya χ*b*-ni əvvəlcədən bir sıra ölçmələr aparmaqla təyin edirlər.

C və D arasında xətti asılılıq olmadıqda C-ni təyin etmək üçün hər bir yoxlanan maddə üçün kalibrləmə əyrisi qurulur. Optik sıxlığın təyini spektrofotometrlərlə aparılır. Spektrofotometriya ilə analizdə ardıcıl olaraq aşağıdakı əməliyyatlar aparılır.

1. Reaktivlərin hazırlanması: onların köməyilə yoxlanan preparatı rəngli birləşməyə çevirirlər. Reaktivlərin hazırlanma qaydası metodikalarda yazılmış və ya dövlət farmakopeyasında göstərilmişdir.

2. Standart məhlulların hazırlanması: standart məhlulları hazırlamaq üçün standart nümunələrin və ya dövlət farmakopeyasının tələblərinə cavab verən preparatların dəqiq kütlələri götürülür.

3. Kalibrə əyrisinin qurulması: koordinatlarda təyin olunan maddənin konsentrasiyası (absis oxunda) və optik sıxlığı (ordinat oxunda) qeyd olunur.

Bir sıra kolbalara müxtəlif həcmlərdə standart məhlul və reaktivlər yerləşdirilir. Yoxlanan maddənin miqdarına görə bir-birindən fərqlənən rəngli məhlullar seriyası hazırlayırlar. Bu məhlulların optik sıxlığı, göstərilən dalğa uzunluğunda və müəyyən qat qalınlığına malik küvetdə müqayisəli məhlullara nisbətən ölçülür.

4. Analizin yerinə yetirilməsi və maddənin konsentrasiyasının hesablanması.

Analizin yerinə yetirilməsi hər bir metodikada ətraflı verilmişdir. Yoxlanan maddənin preparatdakı miqdarı kalibrə əyrisinin, standart nümunənin, xüsusi udma göstəricisinin köməyilə hesablanır.

Hər bir halda alınmış nəticələri dövlət farmakopeyasında və digər normativ-texniki sənədlərdə olan göstəricilərlə müqayisə edirlər.

Verilmiş obyektin təyininə başladıqda, onun müvafiq həllediciyə nisbətən udma spektrini öyrənmək lazımdır. Bu məqsədlə preparatın məhlulunun müxtəlif işıq filtrlərində optik sıxlığı ölçülür. Sonra işığın udulmasının əsas qanunundan asılılığını müəyyənləşdirməklə kalibrə əyrisi qurulur.

Kimyəvi birləşmələrin quruluşunun öyrənilməsində və onların identifikasiya olunmasında UB – spektroskopiyadan da istifadə olunur. Bu sahədə mühüm məlumatları isə maddənin spektri çəkildikdən sonra onun udma zolaqlarının sayı, udma maksimumu, dalğa uzunluğu, spektrin intensivliyi və s. verir. Üzvi birləşmələrin identifikasiyası və kimyəvi quruluşunun öyrənilməsində 200 – 800 nm dalğa uzunluğu sahəsindən istifadə olunur.

Dalğa uzunluğu elektron keçidin enerjisini göstərir. Udma zolaqlarının sayı sistemdəki keçid tiplərinin sayını göstərir.

Ardıcıl ikiqat rabitələrə malik birləşmələrdə UB – spektroskopiya *sis* – və *trans* – izomerlərin fərqləndirilməsi üçün istifadə oluna bilər.

**Diferensial spektrofotometriya üsulu**

Bu üsul, tədqiq edilən məhlulun şüaudmasının, tərkibində tədqiq edilən maddənin və yaxud onun əvəzedicisinin standart nümunəsinin müəyyən miqdarı olan müqayisə məhluluna nisbətən ölçülməsinə əsaslanır. Bu üsulun istifadəsi nəticəsində təyinatın nisbi xətası ±0,5-1%-ə qədər azalır. Diferensial spektrofotometriyanın digər variantı olan **müqayisəli UB-spektrofotometriyada** optik sıxlıq bir-birindən kiçik intervalla fərqlənən 2 müxtəlif dalğa uzunluğunda müəyyən olunur. Bu üsulla kimyəvi quruluşca bir-birinə oxşar olan maddələrin eyniliyini təyin etmək olur.

Diferensial spektrofotometriyanın digər bir variantı tədqiq edilən nümunənin tərkibində olan bir maddənin digər, tautomer formaya çevrilməsinə əsaslanır. Belə ki, tautomer forma ilkin maddədən şüaudma intensivliyinə görə fərqlənir. Bundan sonra bir tautomer formanın məhlulunun digər tautomer formaya nisbətən şüaudma göstəricisi müəyyən olunur, başqa sözlə, tədqiq edilən maddənin məhlulu standart kimi istifadə olunur.