

Спектроскопические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

- спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
- спектрометрия в инфракрасной (ИК) области;
- атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС);
- атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС);
- флуориметрия;
- спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР);
- масс-спектрометрия;
- рамановская спектрометрия;
- рентгеновская флуоресцентная спектрометрия;
- рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Ряд длин волн, для которых проводятся измерения методами абсорбционной спектрофотометрии, охватывает спектральную область от коротких длин волн в УФ-области до ИК-области. Для удобства отнесений этот спектральный ряд делится на следующие диапазоны длин волн: УФ (от 190 до 380 нм), видимый (от 380 до 780 нм), ИК (от 0,78 до 400 мкм).

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

Уменьшение интенсивности монохроматического излучения, проходящего через гомогенную поглощающую среду, количественно описывается законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$\log_{10} \left(1/T \right) = A = \epsilon \cdot c \cdot b, \quad (1)$$

где T - пропускание, отношение интенсивности светового потока, прошедшего через вещество, к интенсивности падающего на вещество светового потока: $T = I/I_0$;

I - интенсивность прошедшего монохроматического излучения;

I_0 - интенсивность падающего монохроматического излучения;

ϵ - молярный показатель поглощения;

c - молярная концентрация вещества в растворе;

b - длина оптического пути или толщина слоя, см.

Величина $\log_{10} (1/T)$ носит название оптической плотности, обозначается буквой A и является измеряемой величиной. В отсутствие других физико-химических факторов измеренная оптическая плотность (A) пропорциональна концентрации вещества в растворе (c) и толщине слоя

(b). Величина $A_{1\text{см}}^{1\%}$ представляет собой удельный показатель поглощения, т.е. оптическую плотность раствора вещества с концентрацией 10 г/л (1 г/100 мл) в кювете с толщиной слоя 1 см.

Величины $A_{1\text{см}}^{1\%}$ и ϵ связаны соотношением:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{10 \cdot \epsilon}{M.M.} \quad . (2)$$

где $M.M.$ - молекулярная масса исследуемого вещества.

Измерение оптической плотности. Если нет других указаний в фармакопейной статье, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см и при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. При измерении оптической плотности раствора при данной длине волны оптическая плотность кюветы с растворителем, измеренная против воздуха при той же длине волны, не должна превышать 0,9 и, желательно, чтобы она была не менее 0,2.

Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или ее некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция длины волны - по оси абсцисс.

Если в фармакопейной статье для максимума поглощения указывается только одна длина волны, то это означает, что полученное значение максимума не должно отличаться от указанного более чем на ± 2 нм.

Приборы. Спектрофотометры, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 190 до 800 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, и устройства для измерения оптической плотности.

Основными частями этих приборов являются: источник излучения, диспергирующий прибор (призма или решетка), щель для выделения полосы длин волн, кюветы для образцов, детектор излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы.

Проверка шкалы длин волн в УФ и видимой области. Точность калибровки прибора по шкале длин волн в спектральном ряду проверяют по приведенным в [табл. 1](#) спектральным линиям

водородной ($H\beta$) или дейтериевой ($D\beta$) разрядной лампы, линиям паров ртути (Hg) кварцево-ртутной дуговой лампы, а также по максимумам поглощения раствора гольмия перхлората (Ho) (готовый реактив для калибровки спектрофотометра представляет собой 4% раствор гольмия оксида в 14,1% растворе хлорной кислоты). Допустимое отклонение составляет ± 1 нм для УФ и ± 3 нм для видимой области.

Таблица 1 - Максимумы поглощения для проверки шкалы длин волн

241,15 нм (Ho)	404,66 нм (Hg)
253,70 нм (Hg)	435,83 нм (Hg)
287,15 нм (Ho)	486,00 нм (D β)
302,25 нм (Hg)	486,10 нм (H β)
313,16 нм (Hg)	536,30 нм (Ho)
334,15 нм (Hg)	546,07 нм (Hg)
361,50 нм (Ho)	576,96 нм (Hg)
365,48 нм (Hg)	579,07 нм (Hg)

Шкала длин волн может быть калибрована также при помощи подходящих стеклянных фильтров, которые имеют фиксированные полосы поглощения в видимой и УФ областях, а также стандартных стекол, содержащих дидим (смесь празеодима и неодима), и стекло, содержащих тольмий.

Проверка шкалы оптической плотности. Для проверки шкалы оптической плотности используют стандартные неорганические стеклянные фильтры или раствор калия дихромата при длинах волн, указанных в [табл. 2](#), где для каждой длины волны приведено точное значение

удельного показателя поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ и допустимые пределы.

Раствор калия дихромата для проверки шкалы оптической плотности при 235, 257, 313 и 350 нм готовят следующим образом: от 57,0 до 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130°C, растворяют в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000 мл. Для проверки оптической плотности при 430 нм растворяют 57,0 - 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Таблица 2 - Удельный показатель поглощения стандартов при различных длинах волн

Длина волны, нм	Удельный показатель поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$	Допустимые пределы для $A_{1\text{см}}^{1\%}$
235	124,5	от 122,9 до 126,2
257	144,5	от 142,8 до 146,2

313	48,6	от 47,0 до 50,3
350	107,3	от 105,6 до 109,0
430	15,9	от 15,7 до 16,1

Предельный уровень рассеянного света. Рассеянный свет может быть обнаружен при данной длине волны с использованием соответствующих фильтров или растворов. Например, оптическая плотность раствора 12 г/л калия хлорида в кювете с толщиной слоя 1 см резко увеличивается между 220 и 200 нм и должна быть больше 2 при 198 нм при использовании воды в качестве раствора сравнения.

Разрешающая способность (для качественного анализа). Если есть указание в фармакопейной статье, определяют разрешающую способность спектрофотометра следующим образом. Записывают спектр 0,02% (о/о) раствора толуола в гексане. Минимально допустимое значение отношения оптической плотности в максимуме поглощения при 269 нм к оптической плотности в минимуме поглощения при 266 нм указывают в фармакопейной статье.

Ширина спектральной щели (для количественного анализа). В случае использования спектрофотометра с изменяемой шириной спектральной щели при выбранной длине волны возможны погрешности, связанные с шириной этой щели. Для их исключения ширина щели должна быть малой по сравнению с полушириной полосы поглощения (шириной на половине оптической плотности) и в то же время должна быть максимально велика для получения высокого значения интенсивности падающего монохроматического излучения (I_0) . Таким образом, ширина щели должна быть такой, чтобы дальнейшее ее уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

Кюветы. Допустимые отклонения в толщине слоя используемых кювет должны быть не более $\pm 0,005$ см. Кюветы, предназначенные для испытуемого раствора и раствора сравнения, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

Требования к растворителям. Для определений, производимых в УФ и видимой областях, образец анализируемого вещества растворяют в соответствующем растворителе, который должен быть оптически прозрачным в используемой области длин волн. Для этих областей длин волн пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры и разбавленные растворы сильных кислот и щелочей.

Идентификация

Абсорбционную спектрофотометрию в УФ и видимой областях спектра применяют для определения подлинности лекарственных средств путем:

- сравнения спектров поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца; в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба;

- указания положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба спектра поглощения испытуемого раствора; расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн в максимумах и минимумах поглощения не должно обычно превышать ± 2 нм.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в фармакопейных статьях.

Количественное определение

Определение концентрации веществ спектрофотометрическим методом основано на использовании закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot b}, \quad (3)$$

где C - концентрация вещества, г/100 мл;

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения вещества;

b - длина оптического пути или толщина слоя, см.

В ряде случаев даже при использовании монохроматического излучения могут наблюдаться отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера, обусловленные процессами диссоциации, ассоциации и комплексообразования. Поэтому предварительно следует проверить линейность зависимости оптической плотности раствора от концентрации в аналитической области. При наличии отклонений от линейной зависимости следует пользоваться не [формулой \(3\)](#), а экспериментально найденной зависимостью.

Обычно определение концентрации спектрофотометрическим методом проводят с использованием стандартного образца. Расчет концентрации основан на использовании уравнения:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{A}{A_0}, \quad (4)$$

где C и C_0 - концентрации испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно;

A и A_0 - оптические плотности испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно.

Концентрации испытуемого и раствора стандартного образца должны быть близки.

Вначале измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, затем проводят измерение оптической плотности испытуемого раствора. Второе измерение проводят сразу после первого с использованием той же кюветы, в тех же экспериментальных условиях.

Метод с использованием раствора стандартного образца является более точным и надежным. Возможность применения значения удельного показателя поглощения в каждом конкретном случае следует обосновывать. Обычно метод с использованием значения удельного показателя поглощения применим при допусках содержания анализируемого вещества не менее $\pm 10\%$ от номинального содержания.

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ (анализ смесей) применяют для одновременного количественного определения нескольких компонентов лекарственных средств, каждое из которых подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера.

Количественное определение в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе основывается обычно на использовании уравнения:

$$A_i = \sum_{j=1}^m E_{ij} \cdot c_j, \quad i = 1, \dots, n, \quad (5)$$

где A_i - оптическая плотность испытуемого раствора при i -ой длине волны;

E_{ij} - показатели поглощения (зависящие от способа выражения концентрации) j -го компонента образца при i -ой аналитической длине волны;

c_j - концентрация j -го компонента образца.

Соответствующие методики проведения анализа и расчетные формулы указываются в фармакопейных статьях.

Производная спектрофотометрия

В производной спектрофотометрии исходные спектры поглощения (нулевого порядка) преобразуются в спектры производных первого, второго и более высокого порядков.

Спектр первой производной представляет собой график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности от длины волны, $dA/d\lambda$) от длины волны.

Спектр второй производной представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения $(d^2A/d\lambda^2)$ от длины волны. Вторая производная при любой длине волны связана с концентрацией следующим соотношением:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\text{см}}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot c \cdot l, \quad (6)$$

где A - оптическая плотность при длине волны λ ;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$

- удельный показатель поглощения при длине волны λ ;

c - концентрация вещества в растворе, г/100 мл;

l - толщина слоя, см.

Производная спектрофотометрия может быть использована как для целей идентификации веществ, так и для их количественного определения в многокомпонентных смесях, а также в тех случаях, когда имеется фоновое поглощение, вызванное присутствием веществ, содержание которых не регламентируется.

Приборы. Используют спектрофотометры, отвечающие указанным выше требованиям и оснащенные аналоговым резистивно-емкостным дифференцирующим модулем или цифровым дифференциатором, или другими средствами получения производных спектров, в соответствии с инструкцией к прибору. Некоторые методы получения спектров второй производной приводят к смещению длин волн относительно исходного спектра, что следует учитывать там, где это необходимо.

Разрешающая способность. Если указано в фармакопейных статьях, записывают спектр второй производной для раствора 0,2 г/л толуола в метаноле, используя метанол в качестве раствора сравнения. На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при 261 и 268 нм, в соответствии с рисунком. Если нет других указаний в фармакопейных статьях, отношение A/B должно быть не менее 0,2.

Методика. Процедура анализа аналогична применяемой в обычной спектрофотометрии, но вместо оптических плотностей используют производные. Готовят раствор испытуемого образца, настраивают прибор в соответствии с инструкцией производителя и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в фармакопейной статье.

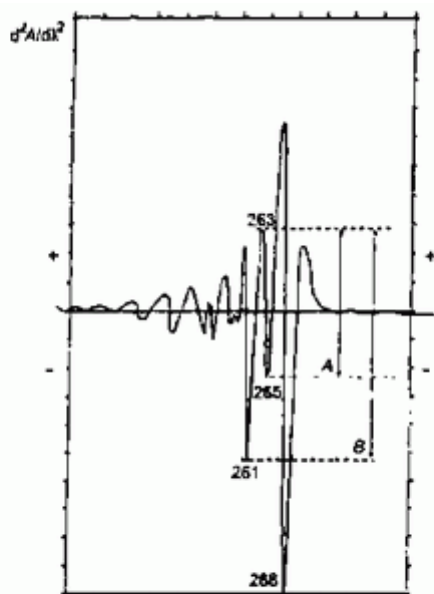


Рисунок – Спектр второй производной раствора толуола (0,2 г/л) в метаноле