**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Атомно-абсорбционная спектрометрия** |  | **ОФС.1.2.1.1.0005** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0005.18** |

|  |
| --- |
|  |

Атомная абсорбция – это процесс, при котором атом в основном (невозбуждённом) состоянии поглощает электромагнитное излучение с определённой энергией (длиной волны) и переходит в возбуждённое состояние.

Атомно-абсорбционная спектрометрия представляет собой инструментальный метод количественного элементного анализа, который применяют для определения концентрации химических элементов в испытуемом образце путём измерения величины поглощения (абсорбции) электромагнитного излучения атомным паром элемента, генерируемым из испытуемого образца.

**Область применения**

Метод атомно-абсорбционной спектрометрии предназначен в основном для количественного определения элементов, включая испытания по определению содержания примесей элементов. Метод также может быть использован для идентификации элементов, как правило, в тех случаях, когда атомно-абсорбционная спектрометрия регламентирована для количественного определения испытуемого вещества. Чувствительность метода атомно-абсорбционной спектрометрии определяется свойствами аналитической линии, составом испытуемого образца, классом используемого оборудования и может достигать 0,001 мкг/мл.

**Метод**

В процессе атомной абсорбции атомы в основном (невозбуждённом) состоянии поглощают энергию с резонансной частотой, и вследствие такого резонансного поглощения электромагнитное излучение ослабляется. Поглощённая энергия фактически прямо пропорциональна количеству присутствующих атомов.

Испытание проводят при длине волны одной из линий поглощения (резонансных линий) определяемого элемента. Количество поглощённого излучения, согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, пропорционально концентрации элемента:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *I=I0e-асl,*  |  |
| где | *I*0 | – | интенсивность падающего излучения; |
|  | *I* | – | интенсивность излучения, прошедшего через вещество; |
|  | *а* | – | показатель поглощения света, рассчитанный на единицу концентрации поглощающего компонента и на единицу толщины слоя; |
|  | *с* | – | концентрация поглощающего компонента;  |
|  | *l* | – | толщина поглощающего слоя. |

Резонансное излучение от лампы проходит через слой атомного пара, получаемого с помощью атомизатора. Излучение попадает на входную щель монохроматора, установленного таким образом, что из спектра выделяется только резонансная линия определяемого элемента, интенсивность которой измеряется фотоэлектрическим способом. Измеряют уменьшение интенсивности резонансной линии вследствие поглощения её атомами определяемого элемента, принимая интенсивность неослабленной линии за 100 %. Величина поглощения резонансного излучения пропорциональна числу атомов, находящихся в поглощающем слое.

**Оборудование**

Основными составляющими частями атомно-абсорбционного спектрометра или иного прибора для определения являются:

- источник излучения;

- система для ввода образца;

- система для распыления образца;

- атомизатор образца;

- монохроматор или полихроматор;

- детектор;

- блок сбора данных.

Большинство приборов также оснащают системой коррекции фона. Для каждого определяемого элемента должен быть выбран специфический источник, излучающий спектральную линию, которая должна быть абсорбирована. В качестве источника излучения используют лампы с полым катодом и безэлектродные газоразрядные лампы (главным образом для определения таких элементов, как мышьяк, селен, теллур, фосфор, ртуть, рубидий, цезий). Излучение таких ламп имеет спектр определяемого элемента, состоящий из очень узких линий с полушириной около 0,002 нм. Требуемая спектральная линия также может быть выделена с помощью монохроматора высокого разрешения из сплошного спектра, излучаемого короткодуговой ксеноновой лампой непрерывного спектра излучения.

В зависимости от типа атомизаторов атомно-абсорбционная спектрометрия может быть пламенной и беспламенной.

*Пламенная атомизация.* Пламенный атомизатор состоит из системы распыления с пневматическим приспособлением для получения аэрозоля, регулятора газа и горелки. Испытуемый образец вводится в пламя через распылительную систему в виде аэрозоля. Для распыления образцов используют подкислённую воду, как предпочтительный растворитель для приготовления испытуемых растворов и растворов сравнения. Также могут быть использованы и органические растворители, если приняты меры, гарантирующие, что растворитель не повлияет на стабильность пламени.

Для создания пламени с нужной температурой (от 2000 до 3000 °С) используют газовые смеси, состоящие из горючих газов (пропан, водород, ацетилен) и окислителей (воздух, закись азота). Конфигурацию горелки адаптируют к используемым газам, скорость подачи газа регулируется.

Так как для реализации метода нужны невозбуждённые атомы, а атомы в возбуждённом состоянии способны испускать излучение на характерных резонансных линиях, следует избегать чрезмерного образования возбуждённых атомов, что может привести к существенным искажениям закона Бугера-Ламберта-Бера. При повышении температуры пламени, например, при добавлении к горючим газам окислителей, количество возбуждённых атомов увеличивается. Изменяя соотношение горючего газа и окислителя можно создать необходимую температуру пламени для атомизации испытуемого образца. В таблице приведена температура газовых смесей, наиболее часто используемых для создания пламени.

Таблица 1 – Температура наиболее часто используемых газовых смесей

|  |  |
| --- | --- |
| **Состав газовой смеси** | **Температура, °С** |
| Метан + воздух | 1840 |
| Ацетилен + воздух | 2250 |
| Ацетилен + кислород | 3050 |
| Водород + кислород | 2680 |
| Ацетилен + закись азота | 2955 |

К беспламенной атомно-абсорбционной спектрометрии относят методы электротермической атомизации (графитовой печи), метод холодного пара и гидридный метод. Вместе с тем, гидридный метод анализа может осуществляться как в беспламенном, так и в пламенном варианте.

*Электротермическая атомизация.* Электротермический атомизатор состоит из нагреваемой графитовой трубки (печи) и источника электроэнергии. Образцы как жидкие, так и твёрдые вводят непосредственно в графитовую трубку, которая нагревается поэтапно, по заданной программе: на первом этапе удаляется растворитель, на втором – удаляются основные компоненты матрицы путём пиролиза, затем атомизируется остаток образца. Две первые стадии обычно проводят в токе инертного газа (аргона или азота), чтобы избежать какого-либо окисления. Поток инертного газа останавливают во время атомизации. Анализируемый элемент в образце полностью атомизируется, и его атомы остаются в трубке, расположенной на пути излучения, в течение длительного периода времени, что существенно улучшает чувствительность и пределы определения элементов. Печь очищают путём нагревания до температуры более высокой, чем температура атомизации. Продувание графитовой печи инертным газом во время пиролиза приводит к более качественному процессу атомизации.

*Метод холодного пара и гидридный метод.* Атомный пар также может быть получен вне спектрометра, например, методом «холодного пара» для определения ртути или гидридным методом для определения некоторых гидридообразующих элементов, таких как олово, мышьяк, селен, сурьма и висмут. В случае определения ртути методом «холодного пара», атомы генерируют химическим восстановлением с использованием олова хлорида или натрия борогидрида, после чего атомный пар вносится потоком инертного газа в холодную кварцевую кювету (абсорбционную ячейку), расположенную на пути излучения, испускаемого лампой прибора. В случае гидридного метода реакцией с натрия борогидридом и хлористоводородной кислотой получают гидрид определяемого элемента, который либо смешивают с газом, питающим горелку, либо вносят инертным газом в нагретую кварцевую или графитовую ячейку, где он диссоциирует на атомы.

**Коррекция фона**

Значение измеренного поглощения электромагнитного излучения атома элемента при пламенной или при электротермической атомизации увеличивает рассеяние и фоновое излучение, которые, как правило, характерны для этих типов атомизации. В отличие от атомов, которые поглощают в очень узких диапазонах длин волн, порядка 0,005–0,02 нм, поглощение фоном охватывает широкий диапазон длин волн.

Для коррекции фонового излучения возможно использование нескольких схем. В принципе, поглощение фоном можно скорректировать, используя контрольный раствор, имеющий точно такой же состав, что и испытуемый образец, но без элемента, который необходимо определить; вместе с тем, такая схема часто является неосуществимой. Для устранения продуктов разложения матрицы, вызывающих фоновое поглощение при электротермической атомизации необходимо обратить внимание на оптимальный подбор температуры.

Коррекцию фона можно выполнить, используя два разных источника энергии: лампы с полым катодом, измеряющей общее поглощение (элемент+фон), и дейтериевой лампы с непрерывным излучением, у которой измерено фоновое поглощение. Фон корректируют путём вычитания сигнала дейтериевой лампы из сигнала лампы с полым катодом. Этот способ ограничен спектральным диапазоном дейтериевой лампы: от 190 до 400 нм.

Фон также может быть измерен путём регистрации значений поглощения при двух длинах волн: резонансной и длине волны, рядом с резонансной, но при которой поглощение образцом не наблюдается; результат определяют вычитанием значений на «непоглощающей» линии из значений резонансной линии.

Коррекция фона с помощью эффекта Зеемана предполагает использование эффекта Зеемана, заключающегося в расщеплении линии поглощения элемента на две или более оптически поляризованных составляющих в присутствии интенсивного магнитного поля. Как правило, эти составляющие поглощают только одно направление поляризованного света, и, следовательно, сочетание магнитного поля и поляризатора может быть использовано для измерения и коррекции фона. Использование коррекции фона с помощью эффекта Зеемана устраняет мешающие линии и мешающие факторы при молекулярном поглощении при электротермической атомизации. Данный способ особенно полезен в случае, если фон имеет тонкую структуру, а также позволяет значительно скорректировать фон в диапазоне от 185 до 900 нм.

**Интерференция**

Наиболее распространёнными типами интерференций (помех, мешающих воздействий) при измерениях атомной абсорбции являются химическая, физическая, ионизационная и спектральная интерференции.

Химическую интерференцию компенсируют использованием модификаторов матрицы, высвобождающих агентов или использованием высоких температур, создаваемых пламенем азота закиси и ацетилена.

Использование специальных ионизационных буферов, например, лантановых или цезиевых, компенсирует ионизационные помехи. В электротермической атомизации применяют химические модификаторы, обычно представляющие собой растворы неорганических солей (например, магния нитрат, никеля нитрат, аммония нитрат и др.) для предотвращения реакций определяемого элемента с поверхностью графита. Физическое мешающее воздействие, обусловленное высоким содержанием соли или вязкостью, можно устранить разведением образца с помощью метода стандартных добавок или подбором матриц.

Спектральная интерференция возникает из-за перекрывания резонансных линий, и её можно избежать, используя другую резонансную линию. Использование коррекции фона с помощью эффекта Зеемана также компенсирует спектральную интерференцию и помехи от молекулярного поглощения, особенно при электротермической атомизации. Спектральную интерференцию может вызвать использование многоэлементных ламп с полым катодом. Cпецифическое или неспецифическое поглощение измеряют в спектральном диапазоне, определяемом выбранной шириной щели монохроматора (0,2–2 нм).

**Условия проведения испытания**

Для конкретного определяемого элемента испытуемого образца подбирают подходящую длину волны и ширины щели и рассматривают следующие моменты:

- коррекция неспецифического фонового поглощения;

- необходимость использования химических модификаторов или ионизационных буферов, добавляемых к образцу, а также к контрольному раствору и калибровочным растворам;

- необходимость разведения образца, например, для минимизации физической интерференции;

- подробные сведения о температурной программе, предварительном нагреве, высушивании, пиролизе, атомизации, последующей атомизации со временем линейного нарастания и временем удерживания;

- расход инертного газа;

- матричные модификаторы для электротермической атомизации (печь);

- химические восстанавливающие реагенты для определения ртути или других гидридообразующих элементов, а также температуры кюветы холодного пара или температуры нагреваемой кюветы;

- технические требования по конструкции печи (камера, платформа Львова и др.).

*Подготовка прибора*. Атомно-абсорбционный спектрометр выводят на рабочий режим в соответствии с инструкцией по эксплуатации завода-производителя и устанавливают необходимую длину волны. В генератор атомного пара вводят контрольный раствор и настраивают регистрирующее устройство на максимальное пропускание. Значение для контрольного раствора можно определить, используя растворитель для установки прибора на нулевое значение. Вводят калибровочный раствор определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают чувствительность прибора для получения максимального регистрируемого сигнала. Во избежание загрязнения и эффекта памяти прибор тщательно промывают водой или подкислённой водой после завершения испытания.

*Пробоподготовка* испытуемого образца может заключаться в его растворении или минерализации, включая сухое озоление, влажной минерализации, микроволновом разложении или сочетании указанных операций для того, чтобы очистить матрицу образца и/или удалить углеродсодержащие вещества. Если процесс происходит в открытой системе, то из-за летучести некоторых металлов температура прокаливания не должна превышать 600° С, если другое не указано в методике испытания. При вводе испытуемого образца в прибор в твёрдом виде, все условия испытания должны быть указаны в методике испытания.

Во всех возможных случаях и на любых этапах проведения испытания, включая пробоподготовку, рекомендуется использование лабораторной посуды из полимерных материалов.

При пробоподготовке образца для испытания методом атомно-абсорбционной спектрометрии, необходимо учитывать природу используемого растворителя и концентрацию твёрдых частиц. Идеальным считается растворитель с минимальными помехами в процессах поглощения или эмиссии, при использовании которого в пламени образуются нейтральные атомы. Если имеются значительные различия между поверхностным натяжением или вязкостью испытуемого и стандартного/калибровочного растворов, то такие растворы будут иметь различную скорость всасывания и атомизации, что может обусловить существенное различие в генерированных сигналах. Предпочтительным растворителем для приготовления испытуемых и стандартных/калибровочных растворов является вода либо растворы кислот. Используемая вода должна быть деионизированной на ионообменных смолах, полученная непосредственно перед применением, отвечающая требованиям, предъявляемым к воде очищенной. Концентрация кислоты в растворах также влияет на процессы абсорбции. Растворители, используемые для приготовления испытуемого и стандартного/калибровочных растворов в методе атомно-абсорбционной спектрометрии, должны быть одними и теми же или максимально похожими и должны образовывать растворы, которые легко всасываются через трубку форсунки аспиратора прибора.

Присутствие в растворе частиц нерастворённого твёрдого вещества может вызвать помехи при выполнении анализа, поэтому общее содержание нерастворимых твёрдых частиц в растворах должно быть менее 2 %.

Предпочтительно, чтобы концентрации растворов находились в линейной части калибровочной кривой. Если это невозможно, то могут быть использованы криволинейные калибровочные графики с применением подходящего программного обеспечения.

Определение проводят путём сравнения величины поглощения испытуемого и калибровочных растворов с известными концентрациями определяемого элемента методом калибровочной кривой (метод 1) или методом стандартных добавок (метод 2).

В некоторых случаях, наряду с методами калибровочной кривой и стандартных добавок для определения концентрации элемента в испытуемых образцах, могут быть использованы метод сравнения и метод ограничивающих растворов. При использовании метода сравнения, для определения используют один стандартный раствор (раствор сравнения), концентрация которого должна находиться в линейной области и не превышать предельно допустимое содержание элемента в испытуемом растворе (для испытания на содержание примесей). При методе ограничивающих растворов для определения используют два стандартных раствора, концентрация одного из которых приблизительно на 20 % выше, а другого приблизительно на 20 % ниже ожидаемого содержания элемента в испытуемом растворе. Использование подобных методов допускается при документальном подтверждении линейности в требуемом диапазоне концентраций в рамках проведения валидационных испытаний.

***Метод 1.*** Готовят не менее трёх калибровочных растворов определяемого элемента, контрольный раствор и измеряют их поглощение. Калибровочные растворы готовят таким образом, чтобы ожидаемое значение концентрации определяемого элемента в испытуемом растворе находилось внутри диапазона концентраций калибровочных растворов.

Испытуемый раствор готовят в соответствии с указаниями в методике испытания.

Для количественных определений оптимальные значения концентраций калибровочных растворов должны быть в пределах от 0,7 до 1,3 ожидаемого значения концентрации определяемого элемента или в диапазоне, указанном в методике испытания. Для испытания по определению содержания примесей оптимальные значения концентраций калибровочных растворов должны находиться в диапазоне от предела количественного определения, установленного в ходе валидационных испытаний, до 1,2 предельного содержания определяемого элемента. Любые реактивы, используемые при приготовлении испытуемого раствора, должны быть прибавлены в контрольный раствор и каждый калибровочный раствор в таких же количествах, как и в испытуемый раствор. Все растворы вводят в прибор одинаковое количество раз, чтобы получить устойчивые результаты.

Должно быть проведено не менее 3 измерений, если иное не указано в методике испытания.

*Расчёты*. Строят калибровочную кривую зависимости средних значений поглощения (абсорбции) калибровочных растворов от концентрации определяемого элемента и по кривой определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе. Для обработки данных испытания обычно применяют линейные функции. В отдельных случаях, при невозможности получения линейной зависимости, могут быть использованы квадратичные функции. Использование квадратичной функции должно быть обосновано. Если в методике испытания не указано другое, коэффициент корреляции калибровочной кривой должен быть не менее 0,99.

***Метод 2.*** Испытуемый раствор готовят в соответствии с указаниями в методике испытания. Равные объёмы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинакового объёма. Для получения ряда разведений во все мерные колбы, кроме одной, прибавляют пропорционально увеличивающиеся объёмы стандартного раствора с известной концентрацией определяемого элемента, сопоставимой с ожидаемой концентрацией определяемого элемента, получая серию растворов, содержащих устойчиво возрастающие концентрации определяемого элемента. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки, получая серию калибровочных растворов со стандартными добавками. При этом значение абсорбции растворов со стандартными добавками должно находиться в линейной области калибровочной кривой. Все растворы вводят в прибор одинаковое количество раз, чтобы получить устойчивые результаты. Должно быть проведено не менее 3 измерений, если иное не указано в методике испытания.

*Расчёты*. Методом наименьших квадратов рассчитывают линейное уравнение калибровочной кривой и из него получают концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Расчёт концентрации может быть произведён графическим методом. Для этого строят график зависимости среднего значения результата измерения от добавленного количества определяемого элемента (от содержания элементов в калибровочном растворе со стандартной добавкой). Экстраполируют линию, соединяющую эти точки на графике, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние от начала координат до полученной точки пересечения дает концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

**Валидация**

Проверяют удовлетворительное выполнение методик, описанных в фармакопейных статьях, через определённые временные интервалы.

*Линейность.* Готовят и анализируют не менее четырёх калибровочных растворов, концентрация элементов в которых находится в пределах диапазона калибровки, и контрольный раствор. Проводят не менее пяти измерений. Используя все полученные данные, рассчитывают калибровочную кривую методом наименьших квадратов. Строят кривую регрессии, отмечая средние значения, измеренные значения и доверительный интервал калибровочного графика.

Метод является пригодным при условии соблюдения следующих требований:

- коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99;

- на калибровочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом.

Рассчитывают среднее значение и относительное стандартное отклонение для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня. В случае если отношение рассчитанного стандартного отклонения наименьшего и наибольшего калибровочного уровня менее 0,5 или более 2,0, то более точная оценка калибровочного графика может быть получена с использованием взвешенной линейной регрессии. Линейную и квадратичную весовую функции применяют к полученным данным для нахождения наиболее подходящей для использования весовой функции. Если средние значения при сравнении с калибровочным графиком проявляют отклонение от линейности, используют двухмерную линейную регрессию.

*Правильность.* Правильность оценивают с использованием подходящих стандартных образцов. Если это невозможно, то правильность выражают через открываемость. В случае методик количественного определения основных компонентов открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для определения следовых количеств элемента открываемость должна быть от 80 % до 120 % от теоретического значения. Открываемость может быть определена с использованием подходящего раствора сравнения (матричного раствора), содержащего известное количество определяемого элемента (средняя концентрация калибровочной кривой).

*Повторяемость.* Для количественного определения – не более 3 %; при определении примесей – не более 5 %.

*Предел количественного определения.* Удостоверяются, что предел количественного определения, например, определённый с использованием приближения 10°σ, ниже измеряемого значения.