**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Атомно-эмиссионная спектрометрия** |  | **ОФС.1.2.1.1.0004** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0004.15** |

|  |
| --- |
|  |

Атомная эмиссия – это процесс испускания (эмиссии) электромагнитного излучения термически возбуждёнными атомами или одноатомными ионами.

Атомно-эмиссионная спектрометрия представляет собой инструментальный метод определения концентрации химических элементов в испытуемом образце путём измерения интенсивности одной из эмиссионных линий атомного пара элемента. Определение проводят при длине волны, соответствующей выбранной эмиссионной линии.

**Область применения**

Метод атомно-эмиссионной спектрометрии может быть использован для идентификации и количественного определения элементов. Качественный анализ проводят по положению линий в спектре. Для количественного анализа достоверной мерой концентрации определяемого элемента является интенсивность линии.

Метод атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой указан в ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой».

**Метод**

В методе атомно-эмиссионной спектрометрии испытуемый образец подвергают воздействию достаточно высоких температур, чтобы вызвать не только диссоциацию молекул на атомы, но также вызвать значительное количество соударений, приводящих к возбуждению и ионизации атомов испытуемого образца. Эти процессы являются равновесными и зависимыми от температуры. При термическом возбуждении атома или иона валентные электроны переходят с основного уровня на уровни с более высокой энергией. Обратный переход, т.е. возвращение валентного электрона на основной энергетический уровень, происходит с передачей тепловой или излучающей энергии и испусканием (эмиссией) электромагнитного излучения определённой длины волны (*λ*) в соответствии с соотношением:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | *ΔE = hc/λ,* | (1) |
| где | *ΔE* | – | разница в энергиях двух энергетических уровней, Дж; | | |
|  | *h* | – | постоянная Планка (6,626·10-34Дж·с); | | |
|  | *с* | – | скорость света (299 792 458 м/с); | | |
|  | *λ* | – | длина волны, нм. | | |

Зависимость интенсивности испускаемого электромагнитного излучения от длины волны называется *эмиссионным спектром*. Число линий в эмиссионном спектре элемента определяется числом валентных электронов и числом разрешённых межуровневых переходов. Эмиссионный спектр элемента содержит несколько больше линий, чем соответствующий абсорбционный спектр. Спектры атомов с малым числом валентных электронов (щелочные, щёлочноземельные металлы) имеют мало линий. Атомы со сложно построенными внешними оболочками (особенно атомы элементов побочных подгрупп периодической системы) дают спектры с большим числом линий. Линии, соответствующие переходам на основной энергетический уровень, называют резонансными. В эмиссионном спектре резонансные линии наблюдаются в видимой и ультрафиолетовой областях. Интенсивность *(I)* линии эмиссионного спектра элемента прямо пропорциональна числу возбуждённых атомов или однозарядных ионов (*N*\*). Возбуждённые и невозбуждённые атомы и однозарядные ионы находятся между собой в термодинамическом равновесии, положение которого описывается законом распределения Больцмана:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | *N*\*/*N*0 = (*g*\*/*g*0) *e*–*E/kT ,* | (2) |
| где | *N0* | – | число невозбуждённых атомов или однозарядных ионов; | | |
|  | *g\** и *g0* | – | статистический вес возбуждённого и невозбуждённого состояния; | | |
|  | *E* | – | энергия возбуждения, Дж; | | |
|  | *k* | – | постоянная Больцмана, (1,381·10-23Дж/К); | | |
|  | *T* | – | абсолютная температура, К. | | |

При постоянной температуре интенсивность спектральной линии элемента прямо пропорциональна числу невозбуждённых атомов элемента, которое при заданных условиях атомизации пропорционально концентрации определяемого элемента в растворе образца (*С*). Поэтому между интенсивностью спектральной линии элемента в эмиссионном спектре и концентрацией определяемого элемента существует прямо пропорциональная зависимость:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | *I*=*k∙C*, | (3) |
| где | *I* | – | интенсивность спектральной линии элемента; | | |
|  | *k* | – | коэффициент пропорциональности; | | |
|  | *С* | – | концентрация определяемого элемента в растворе, %. | | |

Коэффициент пропорциональности (*k)* является эмпирической величиной, зависящей от источника атомизации и возбуждения (атомизатора).

**Оборудование**

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

- система для ввода образца;

- система для распыления образца;

- атомизатор;

- монохроматор;

- детектор, преобразующий энергию излучения в электрическую;

- блок сбора данных.

Атомизатор прибора должен обеспечить достаточную энергию для возбуждения и распыления атомов и ионов испытуемого образца. Основным типом источника атомизации в атомно-эмиссионной спектрометрии является пламя, реже используют дуговые и искровые атомизаторы. Определяющей характеристикой любого атомизатора является его температура, от которой зависит совокупность равновесий процессов, протекающих в атомизаторе, и, как следствие, интенсивность спектральных линий и метрологические характеристики методики. Типы атомизаторов, используемых для атомно-эмиссионной спектрометрии, температурные и метрологические характеристики атомизаторов, приведены в табл. 1.

Таблица 1 − Температурные и метрологические характеристики различных типов атомизаторов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Атомизатор | Температура, °С | Агрегатное  состояние образца | Минимальная концентрация  Сmin, (% масс.) | Относительное стандартное отклонение(*Sr*) |
| Пламя | 1500−3000 | Раствор | 10-7–10-2 | 0,01–0,05 |
| Электрическая  дуга | 3000−7000 | Твёрдое | 10-4–10-2 | 0,1–0,2 |
| Электрическая  искра | 10 000−12 000 | Твёрдое | 10-3–10-1 | 0,05–0,10 |

*Пламя* – самый низкотемпературный атомизатор, используемый в атомно-эмиссионной спектрометрии. Эмиссионные спектры, полученные с использованием пламенного атомизатора, имеют преимущества, будучи более простыми, по сравнению со спектрами, полученными с использованием генераторов атомного пара других типов, однако главное ограничение заключается в том, что пламя недостаточно мощное для возбуждения атомов многих элементов. Достигаемые в пламени температуры оптимальны для определения наиболее легко атомизируемых и возбудимых элементов – щелочных и щёлочноземельных металлов. Для них чувствительность метода пламенной атомно-эмиссионной спектрометрии составляет 10–7 % масс. Для большинства других элементов нижние пределы определения на несколько порядков выше. Важным достоинством пламени, как источника возбуждения, является высокая стабильность и связанная с ней хорошая воспроизводимость результатов измерений (среднее стандартное отклонение *Sr*0,01–0,05).

Для образования пламени атомизатора используют газовую смесь, состоящую из горючего газа (водород, ацетилен, пропан, бутан) и газа-окислителя (кислород, воздух). Выбор компонентов той или иной газовой смеси определяется требуемой температурой пламени, которая зависит от энергии возбуждения определяемого элемента. В табл. 2 приведены некоторые данные об используемых видах пламени.

Таблица 2 − Характеристика пламени наиболее часто используемых газовых смесей

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Горючий газ | Окислитель | Температура, °C | Ско-рость горения, см/с | Характер  пламени | Возбуждаемые элементы |
| метан | воздух | 1800 | 55 | ламинарный | щелочные металлы |
| ацетилен | воздух | 2200 | 266 | ламинарный | щелочные и щёлочноземель-ные металлы |
| водород | кислород | 2800 | 3680 | турбулентный | щелочные, щёлочноземель-ные, тяжёлые металлы |
| ацетилен | кислород | 3100 | 2480 | турбулентный | Ag, Cu, Mn и др. |
| ацетилен | закись азота | 3200 | 120 | ламинарный | тяжёлые металлы |

Многие металлы в пламени имеют тенденцию образовывать тугоплавкие, устойчивые к диссоциации оксиды. Для повышения степени образования свободных атомов создают восстановительную атмосферу пламени путём повышения скорости потока горючего газа. Такое пламя называют обогащённым. Главное ограничение применения пламенного атомизатора – недостаточная способность вызывать эмиссию у многих элементов, необходимую для их определения.

*Электрическая дуга.*В качестве источников возбуждения атомов испытуемого вещества в атомно-эмиссионной спектрометрии используют дуговые разряды постоянного и переменного тока. Между парой электродов, как правило, угольных, пропускают электрический разряд. При этом в углубление одного из электродов помещают испытуемый образец в твёрдом состоянии. Температура дугового разряда составляет 3000–7000 °C. Таких значений температуры достаточно для атомизации и возбуждения большинства элементов, кроме наиболее трудновозбудимых неметаллов – галогенов. Поэтому для большого числа элементов пределы обнаружения в дуговом разряде ниже, чем в пламени. Дуговые атомизаторы, в отличие от пламенных, не обладают высокой стабильностью работы, воспроизводимость результатов невелика (*Sr* 0,1–0,2), поэтому их используют, как правило, для качественного анализа.

*Электрическая искра****.*** Искровой атомизатор устроен так же, как и дуговой и предназначен в первую очередь для качественного анализа твёрдых образцов.

Эксплуатацию прибора осуществляют в строгом соответствии с инструкцией завода-производителя. Необходимо проверять надлежащее функционирование атомно-эмиссионного спектрометра. Для проверки выполняют соответствующие испытания, включающие, как правило, проверку эффективности и стабильности распылителя; измерение разрешения оптической системы путём измерения ширины пика на уровне половины его высоты; расчёт пределов обнаружения элементов в выбранном диапазоне длин волн и др.

**Интерференция**

Появлению интерференции могут способствовать следующие причины. На установление равновесия между процессами испарения и диссоциации молекул на атомы испытуемого образца в ходе атомной эмиссии могут оказывать влияние конкурирующие химические реакции, например, реакции образования труднолетучих и малодиссоциирующих соединений – фосфатов, силикатов, боратов, образование оксидов и карбидов металлов и т.д. под действием анионов. Мешающее влияние анионов становится особенно заметным при понижении температуры. Присутствие легко ионизируемых катионов смещает равновесие процессов возбуждения и ионизации в сторону образования возбуждённых атомов, при этом помехи от присутствия катионов возрастают с повышением температуры. Изменение интенсивности определяемого элемента под влиянием других присутствующих в пробе элементов называют эффектом матрицы, который устраняют добавлением в испытуемый образец химических модификаторов или ионизационных буферов.

Спектральную интерференцию при измерениях методом атомной эмиссии уменьшают или исключают путём выбора для измерения подходящей линии спектра либо подбора ширины щели. Физическую интерференцию корректируют разведением раствора испытуемого образца, подбором матрицы или использованием метода стандартных добавок. Химическую интерференцию уменьшают использованием химических модификаторов или ионизационных буферов.

**Эффект памяти**

Влияние эффекта памяти, вызванного осаждением испытуемого образца в приборе, может быть снижено тщательным промыванием прибора между испытаниями; разведением, если это возможно, измеряемых растворов, и таким образом снижающим содержания в них солей, а также как можно быстрым впрыскиванием растворов.

**Условия проведения испытания**

*Подготовка прибора.* Атомно-эмиссионный спектрометр выводят на рабочий режим в соответствии с инструкцией завода-производителя и устанавливают рабочие параметры эксплуатации прибора, указанные в методике испытания (скорость подачи образца в атомизатор, длину волны, температуру пламени, время интегрирования – время для измерения интенсивности эмиссии на каждой длине волны; число повторов измерения эмиссии и т. д.). В атомизатор вводят контрольный раствор и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение или на значение контрольного раствора. Вводят калибровочный раствор определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают прибор так, чтобы получить регистрируемый сигнал в оптимальном диапазоне измерений. Контрольный, испытуемый и калибровочные растворы вводят вприбор в одинаковом количестве повторов. После каждого измерения прибор промывают.

*Пробоподготовка* зависит от типа атомизатора. В случае пламенной атомно-эмиссионной спектрометрии приготовление пробы для испытания заключается в растворении испытуемого образца и обеспечении концентрации испытуемого раствора, соответствующей рабочему диапазону прибора. Предпочтительным растворителем для приготовления испытуемых и калибровочных растворов является вода либо растворы кислот. Используемые кислоты должны быть качеством не ниже квалификации «ос.ч.». Используемая вода должна быть деионизованной на ионообменных смолах, полученная непосредственно перед использованием, соответствующая требованиям, предъявляемым к воде очищенной. Некоторые системы ввода проб допускают применение высоких концентраций кислот или использование органических растворителей, если при этом подтверждено отсутствие влияния такого растворителя на стабильность пламени. При применении органических растворителей следует учитывать необходимость введения кислорода для предупреждения образования органических слоёв. Для устранения эффектов матрицы готовят контрольный раствор и добавляют, в случае необходимости, в испытуемый раствор химический модификатор или ионизационный буфер. При проведении количественных измерений готовят калибровочные растворы, представляющие собой стандартные растворы определяемого элемента известной концентрации. Если в методике испытания не указано иное, все реагенты, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют к калибровочным растворам определяемого элемента и контрольному раствору в одних и тех же концентрациях. Испытуемый, контрольный и калибровочные растворы готовят, как указано в методике испытания.

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

При вводе испытуемого образца в прибор в твёрдом виде, все условия испытания должны быть указаны в методике испытания.

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.

Измерение содержания определяемого элемента проводят путём сравнения эмиссии испытуемого раствора с эмиссией калибровочных растворов известной концентрации с использованием метода калибровочной кривой (метод 1) или метода 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 методе 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 и контрольный раствор. Калибровочные растворы готовят таким образом, чтобы ожидаемое значение концентрации определяемого элемента в испытуемом растворе находилось внутри диапазона концентраций растворов сравнения.

Испытуемый раствор готовят в соответствии с указаниями в методике испытания.

Для количественных определений оптимальные значения концентрации калибровочных растворов должны быть в диапазоне 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 концентрации калибровочных растворов должны находиться в диапазоне от предела количественного определения, установленного в ходе валидационных испытаний, до 1,2 предельного значения концентрации определяемого элемента. Любые реактивы, используемые для приготовления испытуемого раствора, прибавляют в контрольный и калибровочные растворы в таких же количествах, как и в испытуемый раствор. Все растворы вводят в прибор в одинаковом количестве повторов для получения устойчивых показаний.

*Расчёт.* Строят калибровочную кривую зависимости средних значений эмиссии калибровочных растворов от концентрации, по которой определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе. Калибровочную кривую рассчитывают методом регрессии наименьших квадратов по всем измеренным данным калибровочного испытания. По графику определяют концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

***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, значения эмиссии которого, если это возможно, находятся в линейной области калибровочной кривой. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки, получая серию калибровочных растворов со стандартными добавками. Все растворы вводят в прибор одинаковое количество раз для получения устойчивых результатов.

*Расчёт.* Методом наименьших квадратов рассчитывают параметры линейного уравнения зависимости среднего значения результата измерения эмиссии от концентрации раствора и вычисляют концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе. Расчёт концентрации может быть произведён графическим методом. Для этого строят график зависимости среднего результата измерения эмиссии от добавленного количества определяемого элемента. Экстраполируют линию, соединяющую эти точки на графике, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние от начала координат до полученной точки пересечения даёт 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 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 весовые 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.* Предпочтительно оценивать правильность с использованием сертифицированных стандартных образцов. Если это невозможно, то правильность проверяют через открываемость. В случае методик количественного определения открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для других определений, например 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 10σ, ниже измеряемого значения.