**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях** |  | **ОФС.1.2.1.1.0003** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0003.15** |

|  |
| --- |
|  |

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра – это метод молекулярной абсорбционной спектроскопии, основанный на измерениях и изучении спектров поглощения электромагнитного излучения молекулами в оптической области. Измерения обычно проводят в ближней ультрафиолетовой области (диапазон волн приблизительно 180–400 нм) и видимой области (диапазон волн приблизительно 400–800 нм).

**Область применения**

Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях спектра предназначен для количественного и качественного анализа лекарственных средств, вспомогательных веществ, упаковочных и других материалов, используемых в фармацевтической практике, при этом испытуемые образцы могут находиться в жидком, твёрдом или газообразном состоянии. Метод также может быть использован для исследования строения, состава, определения физических и химических свойств различных светопоглощающих соединений.

Спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях спектра применяют для контроля качества веществ и материалов (например, промежуточных продуктов) при фармацевтической разработке, технологическом процессе производства лекарственных средств, исследовании стабильности и на других этапах жизненного цикла лекарственных средств.

При анализе веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях применяют в качестве метода детектирования, используя детекторы в ультрафиолетовой и видимой областях спектра и диодно-матричные детекторы.

**Метод**

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях основана на способности молекул и ионов поглощать свет при определённых длинах волн в ультрафиолетовом и видимом диапазонах спектра. Поглощение световой энергии приводит к переходу валентных электронов на более высокий энергетический уровень (возбуждение). Пребывание валентного электрона в возбуждённом состоянии краткосрочно, возвращение его в основное состояние происходит посредством безизлучательной релаксации избыточной энергии. Разность энергий основного и возбуждённого состояний определяет длину волны полосы поглощения. Поскольку каждый энергетический уровень молекулы или молекулярного иона также связан с колебательными и вращательными подуровнями, это приводит к множеству допустимых переходов электронов, которые, как правило, невозможно разделить, в результате чего образуются полосы поглощения, а не отчетливые линии. Эти полосы являются характеристикой сопряжённых хромофорных систем в структуре соединений.

При использовании метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях испытуемый образец подвергают воздействию света, затем измеряют уменьшение интенсивности (режим пропускания) и/или рассеяние (режим диффузного отражения) выходящего (прошедшего или отражённого), как правило, монохроматического светового потока (электромагнитного излучения) при конкретной длине волны или в определенном диапазоне длин волн.

***Режим пропускания***

В этом режиме определяют пропускание образца, помещённого между источником света и детектором при заданной длине волны ультрафиолетового/видимого диапазона. Пропускание (*T*) представляет собой отношение интенсивности светового потока, прошедшего через образец, к интенсивности падающего на образец светового потока и определяется по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *,* | (1) |
| где | *Т* | – | пропускание;  |
|  | *I* | – | интенсивность прошедшего монохроматического излучения; |
|  | *I*0 | – | интенсивность падающего монохроматического излучения. |

Спектр может быть получен построением зависимости пропускания или оптической плотности от длины волны. Оптическая плотность (*A*) является измеряемой безразмерной величиной, представляющей собой десятичный логарифм величины, обратной пропусканию для монохроматического излучения; она определяется по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *,* | (2) |
| где | *A* | – | оптическая плотность; |
|  | *Т* | – | пропускание;  |
|  | *I* | – | интенсивность прошедшего монохроматического излучения; |
|  | *I*0 | – | интенсивность падающего монохроматического излучения. |

В соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера для прозрачных разбавленных поглощающих растворов, при отсутствии мешающих физико-химических факторов, оптическая плотность пропорциональна длине оптического пути (толщине поглощающего слоя) и концентрации вещества в растворе в соответствии со следующей формулой:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *,* | (3) |
| где | *A* | – | оптическая плотность; |
|  | *ε* | – | молярный коэффициент поглощения, л/моль·см; |
|  | *с* | – | молярная концентрация вещества в растворе, моль/л; |
|  | *l* | – | длина оптического пути (толщина поглощающего слоя), см. |

В фармакопейных статьях используют удельный показатель поглощения вещества (, который связан с оптической плотностью следующей формулой:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | , | (4) |
| где | *A* | – | оптическая плотность; |
|  |  | – | удельный показатель поглощения вещества; |
|  | *сm* | – | массовая концентрация вещества в растворе, г/100 мл; |
|  |  | – | длина оптического пути или толщина слоя кюветы, см. |

представляет собой удельный показатель поглощения раствора вещества с концентрацией 1 г/100 мл (или 1 %, (м/о)), находящегося в кювете или ячейке с длиной оптического пути 1 см и измеряется при определенной длине волны. Величины и *ε* связаны между собой следующим соотношением:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  *,* | (5) |
| где | *М.м* | – | относительная молекулярная масса испытуемого вещества. |

***Режим диффузного отражения***

В этом режиме измеряют отражение (*R*) в соответствии с формулой:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | , | (6) |
| где | *R* | – | отражение; |
|  | *I* | – | интенсивность отражённого и/или рассеянного света испытуемым образцом; |
|  | *I*0 | – | интенсивность отражённого и/или рассеянного света образцом сравнения или эталонной отражающей поверхностью. |

Спектры отражения в ультрафиолетовой/видимой области обычно получают путём расчёта и построения графика зависимости log10 (1/*R*) от длины волны.

**Оборудование**

Спектрофотометры или иные приборы, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 180 до 800 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, а также устройства для детектирования прошедшего излучения. Основными составляющими частями этих приборов, как правило, являются:

- подходящий источник света (излучения), например, дейтериевая лампа для ультрафиолетовой области, вольфрамово-галогенная лампа для видимой области или ксеноновая лампа для всей ультрафиолетовой и видимой области спектра;

- монохроматор, например, дифракционная решётка, призма или светофильтры;

- другие оптические элементы, например, линзы или зеркала, которые обеспечивают прохождение пучка света через основные узлы прибора, а также формируют два луча света, например, в двухлучевых спектрофотометрах, в отличие от однолучевых;

- контейнер для образца, держатель или устройство для отбора проб; например, подходящие обычные кюветы, оптоволоконные зонды и погружённые передающие ячейки (например, из кварца высокой чистоты или сапфира, прозрачного для ультрафиолетового и видимого излучения); выбор зависит от предполагаемого применения, при этом особое внимание уделяют его пригодности для данного типа анализируемого образца;

- детектор излучаемой энергии, который может быть одноканальным (фотоумножитель, фотодиод) или многоканальным (фотодиодный матричный детектор или устройство с зарядовой связью);

- подходящие компьютеризированные системы для получения, обработки и оценки данных.

***Кюветы***

Кюветы или ячейки с определённой длиной оптического пути (толщиной слоя), могут быть изготовлены из разных материалов, например, кварца или стекла. Допустимое отклонение длины оптического пути кварцевой или стеклянной кюветы составляет ±0,5 %, то есть для кюветы с толщиной слоя 1 см допустимое отклонение – не более ±0,005 см. Можно использовать кюветы из полимерных материалов, но в этом случае интервал допустимого отклонения будет больше, поэтому применение таких кювет должно быть тщательно обосновано, основываясь на оценке рисков.

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.

Для проверки чистоты оптических кювет и любых значительных различий в их толщине или параллельности может быть использован следующий метод: кювету заполняют водой и измеряют её наблюдаемую оптическую плотность по сравнению с воздухом при длине волны 240 нм для кварцевых кювет и 650 нм для стеклянных кювет; поворачивают кювету в держателе на 180 ° и снова измеряют наблюдаемую оптическую плотность при той же длине волны.

При использовании сканирующих приборов рекомендуется проводить сканирование в пределах интересующего оптического диапазона.

При использовании двухлучевых спектрофотометров следует принять меры (например, выбрать соответствующие друг другу кюветы), чтобы гарантировать, что любые различия между оптическими плотностями кювет не окажут значительного влияния на результаты анализа, который необходимо выполнить.

*Критерии приемлемости:*

- наблюдаемая оптическая плотность должна быть не более 0,093 для кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см (ультрафиолетовая область) и 0,035 для стеклянных кювет с длиной оптического пути 1 см (видимая область);

- оптическая плотность, измеренная после поворота на 180 °, не должна отличаться более чем на 0,005 от ранее полученного значения.

**Условия проведения испытаний**

***Выбор режима измерения***

Режим измерения выбирают в соответствии с предполагаемым применением и типом образца. Режим измерения пропускания или измерения оптической плотности обычно применяют для жидкостей (растворов, дисперсий), но при использовании соответствующих приспособлений такой режим также может быть использован и для твёрдых образцов (таблетки, капсулы). Измерение жидких образцов проводят, используя ячейки или кюветы с подходящей длиной оптического пути (от 0,01 до 5 см), изготовленных из материала, пропускающего ультрафиолетовое и видимое излучение, или, применяя оптоволоконный зонд подходящей конфигурации, погружённый в жидкость.

Для твёрдых образцов может быть выбран режим диффузного отражения. В зависимости от химического состава и физических свойств испытуемого образца ультрафиолетовое и видимое излучение может поглощаться по мере его прохождения через образец. В режиме диффузного отражения непоглощённое излучение частично отражается и/или рассеивается образцом и измеряется детектором прибора. При испытании образец находится в подходящем устройстве, например, держателе образца, или в прямом контакте с зондом.

При использовании метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях для мониторинга технологического процесса производства испытание вещества может быть проведено через окно производственного резервуара, которое имеет полированную поверхность, например, кварцевую или сапфировую, или в потоке *(in-line)* с использованием зонда. При таком использовании необходимо, чтобы при последовательных измерениях образцов условия измерения были максимально воспроизводимыми.

***Подготовка прибора***

После выбора режима измерения следует, учитывая размер и тип образца, определить условия измерения (размер луча, время измерения, количество измерений) таким образом, чтобы получить удовлетворительное отношение сигнал/шум. Для сканирующих спектрофотометров также выбирают диапазон и скорость сканирования, ширину щели, которые обеспечивают необходимое оптическое разрешение для предполагаемого применения с сохранением требуемого отношения сигнал/шум или линейности аналитического метода. Выполнять коррекцию размера луча, диапазона и скорости сканирования, ширины щели для спектрофотометров с матричными преобразователями нет необходимости, поскольку оптическое разрешение обычно фиксировано, и всегда записывается полный спектр.

Перед измерением оптической плотности необходимо установить или определить положение «ноль» для поглощения (коррекция базовой линии) при данной длине волны или в пределах соответствующего диапазона длин волн.

При проведении испытания движущихся веществ (образцов) при технологическом процессе производства необходимо убедиться, что на показания датчика (сенсора) не влияют возможные загрязнения, налипания вещества и др.

***Коррекция фона***

Выбирают подходящий спектрофотометрический контрольный образец (раствор сравнения), например, воздух, растворитель, твёрдое вещество.

Растворители, используемые для растворения образца анализируемого вещества при спектрофотометрическом определении в ультрафиолетовой и видимой областях, должны быть оптически прозрачными в используемой области длин волн. Для этих областей длин волн пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры, разбавленные растворы сильных кислот и оснований.

Для спектрофотометрических детекторов в ультрафиолетовой и видимой областях, используемых в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, в качестве контрольного раствора (раствора сравнения) может быть использована подвижная фаза.

В некоторых случаях при использовании метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях для мониторинга технологического процесса производства может оказаться, что извлечь зонд для сбора фоновых данных невозможно. В этом случае рассматривают различные варианты, включая использование внутренних опорных сигналов, измерение контрольных образцов с применением второго детектора и т.д. Напрямую можно сравнивать друг с другом только спектры, снятые по отношению к контрольному образцу, обладающему одинаковыми оптическими свойствами.

В случае измерения отражения используют общепринятые контрольные образцы, включая керамические вещества, фторполимеры, например, политетрафторэтилен, и порошки, такие как бария сульфат (BaSO4) и магния оксид (MgO), а также другие подходящие вещества.

***Измерение оптической плотности***

Если в фармакопейной статье не указано иное, измерение оптической плотности испытуемого образца проводят в условиях комнатной температуры при указанной длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см (используя длину оптического пути 1 см), по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. Параллельно с испытуемым образцом измеряют оптическую плотность контрольного образца при использовании двухлучевого спектрофотометра или измерение проводят последовательно в короткий промежуток времени при использовании однолучевого спектрофотометра. Значения оптической плотности контрольного и испытуемого образцов должны находиться в пределах рабочего диапазона оборудования, указанного производителем в инструкции по эксплуатации прибора.

Если в фармакопейной статье не указано иное, то при измерении оптической плотности раствора при заданной длине волны оптическая плотность растворителя, измеренная по отношению к воздуху при той же длине волны, не должна превышать 0,4 и, желательно, чтобы она была менее 0,2.

Если в фармакопейной статье для максимума или минимума поглощения указано требование к значению только одной длины волны, то это означает, что полученное значение максимума или минимума поглощения не должно отличаться от указанного более чем на ±2 нм, если не указано иное в фармакопейной статье.

Следует избегать проведения количественных измерений при значениях оптической плотности более 2,0.

**Обработка и анализ данных**

В случае определения концентрации испытуемого образца путём измерения оптической плотности при одной длине волны, обработка данных заключается в определении регрессионной зависимости фотометрических показаний прибора (оптической плотности) от концентрации стандартных образцов.

В случае регистрации спектров в режимах отражения и пропускания перед систематизацией полученных данных или разработкой модели калибровки может потребоваться их предварительная обработка. Целью может быть, например, уменьшение сдвига базовой линии или внесение поправок на рассеяние, вызванное изменениями размера частиц в твёрдых образцах. Например, спектры производных первого, второго и более высокого порядка, как правило, могут использоваться для улучшения разрешения или чувствительности. Такая предварительная обработка позволяет упростить данные и, таким образом, уменьшить возможность вариаций, которые могут вызвать помехи в применяемых впоследствии математических моделях. Различные методы обработки, например, масштабирование, сглаживание, нормализация и дериватизация, могут быть применены по отдельности или в комбинации.

В методе спектрофотометрии в ультрафиолетовой/видимой области спектры поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или её некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция длины волны – по оси абсцисс.

**Проверка работы оборудования**

Работоспособность, надлежащее функционирование оборудования для метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях проверяют в течение всего периода его эксплуатации. Периодичность проверок, объём режимов измерения и соответствующих критериев приемлемости непосредственно зависят от характеристик используемого оборудования, его предназначения и определяются требованиями, установленными в соответствии с ОФС «Квалификация аналитического оборудования». Например, для оборудования, подверженного воздействию меняющихся условий окружающей среды (температуры, влажности), может потребоваться более частая проверка его функционирования. В табл. 1 приведён минимальный перечень испытаний для различных режимов измерений, выполняемых для проверки работоспособности используемого оборудования. При необходимости могут быть проведены другие подобные испытания. Правильность шкалы длин волн, правильность шкалы оптической плотности и фотометрическую линейность проверяют с использованием либо сертифицированных стандартных образцов, например, твёрдых фильтров или жидких фильтров, находящихся в подходящих герметично укупоренных ёмкостях, либо с использованием специально приготовленных растворов.

***Проверка шкалы длин волн в ультрафиолетовой и видимой области***

Правильность шкалы длин волн в требуемом спектральном диапазоне проверяют с использованием одного или более стандартных образцов. В зависимости от контролируемого спектрального диапазона длин волн для проверки точности калибровки прибора по шкале длин волн в спектральном ряду могут быть использованы:

Таблица 1 – Минимальный перечень испытаний, выполняемых для проверки функционирования оборудования при его эксплуатации

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Назначение****испытания** | **Режим измерения** | **Пра****виль****ность шкалы****длин волн** | **Правиль****ность шкалы оптичес****кой плот****ности** | **Фотометричес****кая линейность** | **Рас****сеян****ный свет** | **Разреше****ние/ширина спектральной щели** |
| Количественное определение или испытание на предельное содержание примесей | На основании измерения оптической плотности при одной или более длинах волн | Х | Х | Х | Х | При наличии требований в фармакопейной статье  |
| Подлинность (идентификация) | На основании длины волны максимума и минимума поглощения | Х | - | - | Х | - |
| На основании измерения поглощения и длины волны максимума поглощения | Х | Х | - | Х | - |
| На основании сравнения спектра со спектром стандартного образца | Х | Х | - | - | - |

- положения спектральных линий эмиссии газоразрядных ламп (дейтериевой, неоновой, ксеноновой) или линий паров ртути кварцево-ртутной дуговой лампы низкого давления:

- положения полос поглощения твёрдых или жидких фильтров (светофильтров).

В качестве жидких фильтров могут быть применены растворы оксидов редкоземельных элементов – гольмия, церия, смеси неодима и празеодима; твёрдые фильтры представляют собой стёкла, полученные сплавлением оксида редкоземельного металла (гольмия, неодима) в матрице базового стекла. Могут быть использованы как готовые сертифицированные стандартные образцы, так и приготовленные растворы (например, реактив для калибровки спектрофотометра представляет собой гольмия перхлората раствор 4 % в растворе хлорной кислоты 14,1 %). В случае использования готовых стандартных образцов, при проверке положения полос сравнивают их со значениями, указанными в соответствующей сопроводительной документации. В табл. 2 приведены примеры значений максимумов поглощения стандартных образцов, рекомендованных для проверки правильности длин волн.

Некоторые приборы могут иметь автоматическую или встроенную функцию для контроля правильности шкалы длины волны.

Таблица 2 – Примеры значений длин волн (максимумов поглощения) стандартных образцов для проверки правильности шкалы длин волн

|  |  |
| --- | --- |
| **Стандартный образец** | **Длина волны, нм\*** |
| Растворы | Церий в серной кислоте | 201,1; 211,4; 222,6; 240,4;.253,7 |
| Дидимий в хлорной кислоте | 511,8; 731,6; 794,2 |
| Гольмий в хлорной кислоте | 241,1; 287,2; 361,3; 451,4; 485,2; 536,6; 640,5 |
| Твёрдые фильтры  | Неодимовое стекло | 513,5 |
| Гольмиевое стекло | 279,3; 360,9; 453,4; 637,5 |
| Лампы | Дейтериевая | 486,0; 656,1 |
| Ртутная (низкое давление) | 184,9; 253,7; 312,5; 365,0; 404,7; 435,8; 546,1; 577,0; 579,1 |
| Неоновая | 717,4 |
| Ксеноновая | 541,9; 688,2; 764,2 |
| Примечание – Определяемое значение зависит от разрешения прибора |

Проверку правильности шкалы длин волн спектрофотометрических детекторов в ультрафиолетовой и видимой областях, используемых в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, также можно осуществлять, измеряя оптическую плотность кофеина раствора 0,05 мг/мл в метаноле, максимум поглощения должен быть при длине волны 272 нм, а минимум поглощения – при длине волны 244 нм.

*Критерии приемлемости*

Рекомендуется проводить проверку правильности шкалы длин волн не менее чем при 2 длинах волн, которые ограничивают предполагаемый спектральный диапазон.

Допустимое отклонение при определении правильности шкалы длин волн для приборов с использованием кювет составляет ±1 нм при длинах волн менее 400 нм (ультрафиолетовая область) и ±3 нм при длинах волн 400 нм и более (видимая область).

Для спектрофотометрических детекторов в ультрафиолетовой и видимой областях, используемых в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, и при использовании спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях в технологическом процессе производства, допустимое отклонение при проверке правильности шкалы длин волн составляет ±2 нм во всём ультрафиолетовом/видимом диапазоне спектра. Однако в некоторых случаях для технологического процесса производства возможен контроль шкалы длин волн с большими допусками; в этом случае необходимая правильность длины волны должна быть определена пользователем в зависимости от требуемого назначения с использованием подхода, основанного на оценке рисков.

Параметры прибора, особенно его оптических составляющих, таких как ширина щели или диаметр оптического волокна, влияют на разрешение и должны быть такими же, как те, которые предназначены для рутинных измерений.

***Проверка шкалы оптической плотности***

Для проверки шкалы оптической плотности при подходящем количестве длин волн в предполагаемом спектральном диапазоне используют соответствующие твёрдые или жидкие фильтры для подтверждения того, что оптическая плотность, измеренная на выбранной длине волны, соответствует сертифицированному значению оптической плотности фильтра или значению оптической плотности, рассчитанному из удельного показателя поглощения.

Для приготовления жидких фильтров могут быть использованы растворы стандартного образца никотиновой кислоты для квалификации оборудования (в этом случае значения сертифицированных удельных показателей поглощения должны быть указаны в сопроводительных документах) или растворы калия дихромата при длинах волн, указанных в табл. 3, в которой для каждой длины волны приведено точное значение удельного показателя поглощения и его допустимые пределы, которые основаны на допустимой погрешности при измерении поглощения ±0,01.

Таблица 3 – Удельные показателя поглощения и его допустимые пределы растворов калия дихромата при различных длинах волн

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Длина волны, нм** | **Удельный показатель****поглощения**  | **Допустимые пределы для**  |
| 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 |

Для приготовления растворов калия дихромат предварительно сушат до постоянной массы при температуре 130 °С. Для проверки шкалы оптических плотностей при длинах волн 235 нм, 257 нм, 313 нм и 350 нм растворяют 57,0–63,0 мг калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл. Для проверки шкалы оптических плотностей при длине волны 430 нм растворяют 57,0–63,0 мг калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. Для контроля правильности различных уровней оптической плотности объёмы можно корректировать для получения растворов калия дихромата, имеющих другую концентрацию.

Раствор никотиновой кислоты можно приготовить следующим образом: 57,0–63,0 мг никотиновой кислоты стандартного образца [для аттестации оборудования](https://extranet.edqm.eu/4DLink1/4DCGI/Web_View/mono/20225) растворяют в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, доводят до объёма 200,0 мл этим же растворителем; затем 2,0 мл полученного раствора доводят до объёма 50,0 мл этим же растворителем для получения конечной концентрации никотиновой кислоты 12 мг/л. Для контроля правильности различных уровней оптической плотности объёмы можно корректировать для получения растворов никотиновой кислоты с другими концентрациями (до концентрации около 40 мг/л). Оптическую плотность измеряют при длинах волн 213 нм и 261 нм.

Проверку правильности шкалы оптической плотности при выбранных длинах волн рекомендуется проводить с использованием одного или нескольких твёрдых или жидких фильтров с различными уровнями оптической плотности; необходимо проверять как минимум 2 значения диапазона, приблизительно соответствующих границам ожидаемых значений оптической плотности.

Для спектрофотометрических детекторов в ультрафиолетовой и видимой областях, используемых в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, и при использовании спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях в технологическом процессе производства, исследование точности определения абсолютного поглощения не требуется при условии того, что строится калибровочная кривая по стандартным растворам различной концентрации.

*Критерии приемлемости*

Допустимые пределы удельного показателя поглощения для используемой длины волны при проверке шкалы оптической плотности с применением раствора калия дихромата, указаны в таблице 3.

В случае использования сертифицированного стандартного образца, разница между измеренной оптической плотностью и оптической плотностью, указанной в сопроводительной документации на сертифицированный стандартный образец, должна составлять ±0,010 или ±1 % (в зависимости от того, какая из этих величин больше) для каждой проанализированной комбинации длины волны и оптической плотности (применительно к значениям оптической плотности не более 2). Отклонения для значений оптической плотности более 2 следует определять на основании оценки рисков.

***Проверка фотометрической линейности***

Проверяют фотометрический отклик (линейность) в предполагаемом спектральном диапазоне. Для ультрафиолетового диапазона могут быть применены фильтры, используемые для проверки правильности оптической плотности, а также растворы никотиновой кислоты и кофеина. Для видимого диапазона можно использовать нейтральные стеклянные фильтры. Также могут быть применены растворы калия дихромата. Перед проведением испытания необходимо убедиться в том, что оптическая плотность используемых фильтров сопоставима с предполагаемым линейным диапазоном.

Для проверки могут быть использованы растворы с возрастающими концентрациями, например:

- растворы никотиновой кислоты стандартного образца для квалификации оборудования в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в концентрации от 5 мг/л до 40 мг/л; оптическую плотность в этом случае измеряют при длинах волн 213 нм и 261 нм;

- растворы предварительно высушенного до постоянной массы при 130° С калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты в концентрации от 20 мг/л до 120 мг/л для измерений при длинах волн 235 нм, 257 нм, 313 нм и 350 нм, и в концентрации от 60 мг/л до 800 мг/л для измерений при длине волны 430 нм.

Проверку фотометрической линейности хроматографических систем можно выполнить, используя растворы кофеина в воде для хроматографии в подходящей концентрации; оптическую плотность измеряют при длине волны 273 нм.

*Критерий приемлемости.* Коэффициент детерминации (*R*²) должен быть не менее 0,999.

***Предельный уровень рассеянного света***

Рассеянный свет может быть обнаружен при подходящей длине волны с использованием соответствующих твёрдых или жидких фильтров или приготовленных растворов. Параметры прибора, используемые для проверки, такие как ширина щели и тип источника света, например, дейтериевая или вольфрамовая лампа, должны быть такими же, как для реальных измерений.

*Критерии приемлемости.* Критерии приемлемости зависят от используемых фильтров или растворов, например:

- оптическая плотность должна быть не менее 3,0 при использовании  натрия йодида раствора 10 г/л при длине волны 220 нм, калия йодида раствора 10 г/л при длине волны 250 нм или натрия нитрита раствора 50 г/л при длинах волн 340 нм и 370 нм;

- оптическая плотность должна быть не менее 2,0 при использовании калия хлорида раствора 12 г/л при длине волны 198 нм.

Эти значения применимы при использовании кюветы с длиной оптического пути 1 см и воды в качестве контрольного раствора (раствора сравнения).

***Проверка разрешающей способности*****(для качественного анализа)**

Если указано в фармакопейной статье, проверяют разрешающую способность оборудования, используя подходящие сертифицированные стандартные образцы или записывают спектр толуола раствора 0,02 % (о/о) в гексане или гептане, применяя гексан или гептан в качестве контрольного раствора (раствора сравнения/растворителя).

*Критерии приемлемости*

Для измерений, выполненных с использованием раствора, приготовленного как описано выше, 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.

***Проверка ширины спектральной щели (для количественного анализа)***

При применении оборудования 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. Таким образом, ширина щели должна быть такой, чтобы дальнейшее её уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

***Проверка пригодности системы***

Перед проведением анализа испытуемого образца может потребоваться проверка пригодности системы для контроля критических параметров, которые могут повлиять на результат испытания. Проверка может включать определение правильности длины волны, правильности оптической плотности, рассеянного света и фотометрической линейности. Испытания функционирования системы, например, те, которые выполняют при автоматической проверке оборудования, могут считаться частью испытаний проверки пригодности системы.

Для спектрофотометрических детекторов в ультрафиолетовой и видимой областях, используемых в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, применимы дополнительные испытания на пригодность системы, если это указано в фармакопейной статье и/или ОФС «Хроматография».

**Идентификация**

Абсорбционную спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях спектра применяют для определения подлинности лекарственных средств путём:

- 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;

- указания отношения значений оптических плотностей испытуемого раствора при двух значениях длин волн в указанной области спектра.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в фармакопейных статьях.

**Количественное определение**

Концентрацию веществ спектрофотометрическим методом определяют на основании закона Бугера-Ламберта-Бера, используя для расчета формулу:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | , | (7) |
| где |  | – |  концентрация вещества в растворе, г/100 мл; |
|  |  | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  |  | – | удельный показатель поглощения вещества; |
|  |  | – | длина оптического пути или толщина слоя кюветы, 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 (7), а экспериментально найденной зависимостью.

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | (8) |
| где | *С* | – | концентрация испытуемого раствора; |
|  | *С*0 | – | концентрация раствора стандартного образца; |
|  | *А* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *А*0 | – | оптическая плотность раствора стандартного образца. |

Концентрации испытуемого раствора 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 надёжным. 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 ±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:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | (9) |
| где |  | – |  |
|  | *А*i | – | оптическая плотность испытуемого раствора при *i*-ой длине волны; |
|  | *Е*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 расчётные формулы указываются в фармакопейных статьях.

**Производная спектрофотометрия**

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.

В производной спектрофотометрии используют преобразование исходных спектров поглощения (нулевого порядка) в спектры производных первого, второго и более высоких порядков.

Спектр производной первого порядка представляет собой график зависимости скорости изменения оптической плотности от длины волны (*dA*/*d*λ). Спектр производной первого порядка начинается и заканчивается на нуле; он также проходит через ноль на той же длине волны, что и *λmax* полосы поглощения. Производные первого порядка применяют, как правило, для минимизации или устранения фонового поглощения при измерениях мутных, опалесцирующих жидкостей, суспензий, а также для анализа микрокомпонентов в сложных составах поглощающих веществ.

Спектр производной второго порядка представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения от длины волны (*d*2*A*/*d*λ2). Вторая производная при любой длине волны связана с концентрацией следующим соотношением:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *,* | (10) |
| где | *А* | – | оптическая плотность при длине волны λ; |
|  |  | – | удельный показатель поглощения при длине волны λ; |
|  |  | – | концентрация вещества в растворе, г/100 мл; |
|  |  | – | длина оптического пути или толщина слоя, см. |

Производные второго и более высокого порядка могут быть использованы для:

- повышения разрешения перекрывающихся пиков для разделения наложенных спектров, что особенно полезно при многокомпонентном спектрофотометрическом анализе;

- количественного определения микроэлементов;

- дополнительных данных о физико-химических свойствах отдельных соединений, которые были получены с использованием, например, таких методов как, спектрофотометрия в инфракрасной области спектра, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектроскопия;

- для определения чистоты лекарственных средств.

Минимальное количество наблюдаемых полос при производной спектрофотометрии равно порядку производной плюс один.

***Приборы***

Используют спектрофотометры, отвечающие общим требованиям и дополнительно оснащенные аналоговым резистентноёмкостным дифференцирующим модулем, цифровым дифференциатором или другими устройствами получения производных спектров, в соответствии с инструкцией производителя по эксплуатации прибора. Некоторые методы получения спектров производной второго порядка приводят к смещению длин волн относительно исходного спектра нулевого порядка, что следует учитывать там, где это необходимо.

***Разрешающая способность***

Если указано в фармакопейной статье, записывают спектр производной второго порядка для толуола раствора 0,2 г/л в метаноле, используя метанол в качестве контрольного раствора (раствора сравнения/растворителя). На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при длинах волн 261 нм и 268 нм. Если иное не указано в фармакопейных статьях, отношение *А*/*B* должно быть не менее 0,2 как указано на рисунке.

***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 по эксплуатации прибора, проводят испытание и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в фармакопейной статье.



Рисунок 1 – Спектр производной второго порядка раствора толуола 0,2 г/л в метаноле