

ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La espectrofotometría en el ultravioleta y visible consiste en la medida de la absorción de las radiaciones electromagnéticas comprendidas en un intervalo espectral de 200 a 400 nm para la región ultravioleta y de 400 a 800 nm para la región visible.

Las bandas del espectro del UV y visible generalmente son anchas y no poseen un alto grado de especificidad para la identificación de sustancias. Sin embargo, existen ensayos adecuados para la cuantificación de muchas sustancias, así como ensayos adicionales para la identificación de sustancias.

En la ley de **Lambert-Beer** la absorbancia (A_λ) de una solución a una longitud de onda dada, λ , es definida como el logaritmo en base 10 del inverso de la transmitancia (T_λ):

$$A_\lambda = \log_{10} \left(\frac{1}{T_\lambda} \right) \text{ y } T_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_{\lambda 0}}$$

I_λ = intensidad de la radiación transmitida a la longitud de onda λ

$I_{\lambda 0}$ = intensidad de la radiación incidente a la longitud de onda λ

En la ausencia de algun otro factor fisico o químico, A_λ es proporcional al camino óptico, b , por el cual la radiación atraviesa, y la concentración de la sustancia en solución, c , de acuerdo a lo siguiente:

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda c b$$

ϵ_λ = absortividad molar

c = concentración de soluto

b = camino óptico

Si la concentración, c , es expresada en g/L, la constante ϵ_λ se denomina absortividad (a_λ).

La expresión $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ representa la absorbancia específica de una sustancia disuelta, referida a la absorbancia de una solución de 10 g/L en una celda de 1 cm de longitud a una longitud de onda definida:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 10a_\lambda = 10 \frac{\epsilon_\lambda}{M}$$

Equipo - Consta de un sistema óptico capaz de producir luz monocromática en la región de 200 a 800 nm, un dispositivo para seleccionar una banda angosta de longitudes de onda, una celda para contener la muestra y un detector apropiado para determinar la absorbancia. Cuando se emplean aparatos de doble haz, la celda que contiene el blanco se coloca en el haz de referencia. Las celdas empleadas para la solución muestra y el blanco deben tener las mismas características espectrales.

Calificación del equipo - Los equipos empleados para registrar los espectros ultravioleta y visible indicados en esta Farmacopea deben cumplir con los siguientes ensayos:

Verificación de la escala de longitud de onda - La escala de longitud de onda puede verificarse midiendo los máximos de absorbancia correspondientes a las líneas de emisión de una lámpara de hidrógeno a 486,10 nm o deuterio a 486,00 nm, o las líneas de un arco de vapor de mercurio a 253,70; 302,25; 313,16; 334,15; 365,48; 404,66; 435,83; 546,07; 576,96 y 579,07 nm y los máximos de absorbancia de una solución estándar de perclorato de holmio a 241,15; 287,15;

361,50 y 536,30 nm, descritos en la Tabla a continuación. Podrían utilizarse otros materiales de referencia certificados.

La tolerancia permitida es de ± 1 nm para el ultravioleta y ± 3 nm para el visible.

Control de absorbancias - Controlar la absorbancia usando filtros de referencia certificados o una solución de dicromato de potasio preparada según se indica a continuación:

Solución de dicromato de potasio – Secar el dicromato de potasio hasta peso constante a 130°C. Para el control de absorbancia a 235 nm, 257 nm, 313 nm y 350 nm, disolver entre 57,0-63,0 mg en ácido sulfúrico 0,005 M y diluir a 1000,0 mL con el mismo solvente. Para el control de la absorbancia a 430,0 nm disolver entre 57,0-63,0 mg de dicromato de potasio en ácido sulfúrico 0,005 M y diluir a 100,0 mL con el mismo solvente.

Registrar el espectro de la *Solución de dicromato de potasio* y determinar las absorbancias a las longitudes de onda especificadas en la *Tabla*. Los valores de $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ deben estar dentro de las tolerancias especificadas.

Tabla

Longitud de onda (nm)	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	Tolerancia máxima
235	124,5	122,9 a 126,2
257	144,0	142,4 a 145,7
313	48,6	47,0 a 50,3
350	106,6	104,9 a 108,2
430	15,9	15,7 a 16,1

Límite de luz parásita o espúrea – La luz parásita o espúrea puede ser detectada a una determinada longitud de onda acorde a los filtros o soluciones: por ej. la absorbancia de una solución de cloruro de potasio al 1,2 %, medida a 200 nm con un paso óptico de 1 cm, empleando agua como blanco, debe ser mayor de 2. Podrían utilizarse otros materiales de referencia certificados.

Resolución (para análisis cualitativo, cuando lo especifique la monografía individual)- Registrar el espectro de una solución de tolueno al 0,02 % v/v en hexano. La relación entre el máximo de absorbancia a 269 nm, y el mínimo a 266 nm no debe ser menor de 1,5.

Asimismo, deberán tenerse las siguientes precauciones:

Ancho de rendija (para análisis cuantitativo) - Cuando se mide la absorbancia a un máximo de absorción y cuando se emplea un aparato con ancho de rendija variable a la longitud de onda seleccionada, el ancho de rendija debe ser pequeño comparado con la mitad del ancho de la banda de absorción. Sin embargo, debe ser lo más grande posible para obtener un valor alto de I_0 y debe ser tal que una reducción adicional no resulte en un aumento de la lectura de absorbancia.

Celdas - Las absorbancias de las celdas de lectura, cuando se llenan con el mismo solvente, deben ser iguales. Si este no es el caso, debe aplicarse una corrección apropiada. La tolerancia en el paso óptico de las celdas empleadas es $\pm 0,005$ cm. Las celdas deben limpiarse y manipularse con cuidado.

Solventes - Cuando se mide la absorbancia de una solución a una longitud de onda determinada, la absorbancia de la celda de referencia y su contenido no debe ser mayor de 0,4 y es conveniente que sea menor de 0,2 cuando se mide en referencia al aire a la misma longitud de onda. El solvente en la celda de referencia debe ser del mismo lote que el empleado para preparar la solución muestra.

Determinación de la absorbancia - A menos que se especifique de otro modo en la monografía individual, medir la absorbancia a la longitud de onda especificada empleando celdas de 1 cm de paso óptico y efectuar las medidas con referencia al solvente o solventes empleados para preparar la solución muestra. En caso de que las medidas se deban efectuar con referencia a una mezcla de reactivos, los detalles se describen en las monografías individuales.

Cuando en una monografía se especifica la longitud de onda a la cual se presenta un máximo de absorción, implica que dicho máximo presenta una tolerancia de ± 2 nm.

Cuando un ensayo indica el empleo de una *Sustancia de referencia*, se deben realizar las medidas espectrofotométricas con la solución preparada a partir de la *Sustancia de referencia* y luego con la solución correspondiente preparada a partir de la muestra. Efectuar las medidas en sucesión inmediata, empleando las mismas condiciones experimentales y de preferencia la misma celda.

Identificación por medio de Sustancias de referencia – La solución de referencia y la solución muestra deben medirse en celdas de 1 cm de paso óptico, en el intervalo espectral comprendido entre 200 y 400 nm, a menos que se especifique de otro modo en la monografía individual. Disolver separadamente una cantidad de sustancia de referencia y de la muestra en el *Solvente* especificado para obtener soluciones de concentración conocida aproximadamente igual a la especificada en la monografía individual. Registrar en sucesión inmediata los espectros de la *Solución de referencia* y la *Solución muestra*.

Calcular las absorbancias específicas y/o la relación de absorbancias según se especifique en la monografía individual. Los requisitos se cumplen si los espectros de absorción ultravioleta de la *Solución muestra* y la *Solución referencia* presentan máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda, y las absorbancias específicas y/o la relación de absorbancias están dentro de los límites especificados en la monografía.