

1 Actualización

2

470. ESPECTROFOTOMETRÍA

3

ULTRAVIOLETA Y VISIBLE MERCOSUR

4 La espectrofotometría ultravioleta y visible
5 consiste en la medida de la absorción de las
6 radiaciones electromagnéticas comprendidas
7 en un intervalo espectral de 200 a 400 nm
8 para la región ultravioleta y de 400 a 800 nm
9 para la región visible.

10 Las bandas del espectro del UV y visible
11 generalmente son anchas y no poseen un alto
12 grado de especificidad para la identificación
13 de sustancias. Sin embargo, existen ensayos
14 adecuados para su cuantificación y otros
15 ensayos adicionales para su identificación.

16 En la ley de Lambert-Beer la absorbancia (A_λ)
17 de una solución a una longitud de onda dada,
18 λ , es definida como el logaritmo en base 10
19 de la inversa de la transmitancia (T_λ):

$$20 \quad A_\lambda = \log_{10} \left(\frac{1}{T_\lambda} \right) \text{ y } T_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_{\lambda 0}}$$

21 Donde:

22 I_λ = intensidad de la radiación transmitida a la
23 longitud de onda λ .

24 $I_{\lambda 0}$ = intensidad de la radiación incidente a la
25 longitud de onda λ .

26 En ausencia de algún otro factor físico o
27 químico, A_λ es proporcional al camino óptico,
28 b , atravesado por la radiación, y a la
29 concentración de la sustancia en solución, c ,
30 de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$31 \quad A_\lambda = \epsilon_\lambda c b$$

32 ϵ_λ = absorptividad molar

33 c = concentración de soluto

34 b = camino óptico

35

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

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

$$43 \quad A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 10a_\lambda = 10 \frac{\epsilon_\lambda}{M}$$

44 **Equipo** - Consta de un sistema óptico
45 capaz de producir luz monocromática en la
46 región de 200 a 800 nm, un dispositivo para
47 seleccionar una banda angosta de longitudes
48 de onda, una celda para contener la muestra y
49 un detector apropiado para determinar la
50 absorbancia. Cuando se emplean aparatos de

51 doble haz de luz, la celda que contiene el blanco
52 se coloca en el haz de referencia.

53 Las celdas empleadas para la solución muestra
54 y el blanco deben tener las mismas
55 características espectrales.

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

61 *Verificación de la escala de longitud de onda* -

62 La escala de longitud de onda puede verificarse
63 midiendo los máximos de absorbancia
64 correspondientes a las líneas de emisión de una
65 lámpara de hidrógeno a 486,10 nm o deuterio a
66 486,00 nm, o las líneas de un arco de vapor de
67 mercurio a 253,70; 302,25; 313,16; 334,15;
68 365,48; 404,66; 435,83; 546,07; 576,96 y
69 579,07 nm y los máximos de absorbancia de una
70 solución estándar de perclorato de holmio a
71 241,15; 287,15; 361,50 y 536,30 nm. Pueden
72 ser utilizados otros materiales de referencia
73 certificados.

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

76 *Control de absorbancias* - Controlar la
77 absorbancia usando filtros de referencia
78 certificados o una solución de dicromato de
79 potasio preparada como se indica a continuación:

80 *Solución de dicromato de potasio* - Secar el
81 dicromato de potasio a 130 °C hasta peso
82 constante. Para el control de absorbancia a 235
83 nm, 257 nm, 313 nm y 350 nm, pesar
84 exactamente entre 57,0 y 63,0 mg, disolver en
85 ácido sulfúrico 0,005 M y diluir a 1000,0 mL
86 con el mismo solvente.

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

93 *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

94 *Límite de luz parásita o espúrea* - La luz
95 parásita o espúrea puede ser detectada a una
96 determinada longitud de onda acorde a los
97 filtros o soluciones: por ejemplo, la
98 absorbancia de una solución de cloruro de
99 potasio al 1,2 %, medida a 200 nm con un
100 camino óptico de 1 cm, empleando agua
101 como blanco, debe ser mayor de 2. Pueden ser
102 utilizados otros materiales de referencia
103 certificados.

104 *Resolución* (para análisis cualitativo) -
105 Registrar el espectro de una solución de
106 tolueno al 0,02 % v/v en hexano. La relación
107 entre el máximo de absorbancia a 269 nm, y
108 el mínimo a 266 nm no debe ser menor de 1,5.
109 Asimismo, deben tenerse las siguientes
110 precauciones:

111 *Ancho de rendija* (para análisis cuantitativo) -
112 Cuando se mide la absorbancia a un máximo
113 de absorción y cuando se emplea un equipo
114 con ancho de rendija variable a la longitud de
115 onda seleccionada, el ancho de rendija debe
116 ser pequeño comparado con la mitad del
117 ancho de la banda de absorción. Sin embargo,
118 debe ser lo más grande posible para obtener
119 un valor alto de *I_o* y debe ser tal que una
120 reducción adicional no resulte en un aumento
121 de la lectura de absorbancia.

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

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

139 **Determinación de la absorbancia** - A menos
140 que se especifique de otro modo en la
141 monografía individual, medir la absorbancia
142 a la longitud de onda especificada empleando
143 celdas de 1 cm de camino óptico y efectuar
144 las medidas con referencia al solvente o

145 solventes empleados para preparar la solución
146 muestra. En caso de que las medidas se deban
147 efectuar con referencia a una mezcla de
148 reactivos, los detalles se describen en las
149 monografías individuales.

150 En ciertas ocasiones, las derivadas de primero y
151 segundo orden o de un orden mayor de los
152 espectros podrían ser de utilidad a fin de mejorar
153 la resolución y/o sensibilidad. De la misma
154 forma que en la espectrofotometría directa, la
155 derivada puede ser correlacionada con la
156 concentración del analito y emplearse para la
157 cuantificación de sustancias.

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

162 Cuando un ensayo indica el empleo de una
163 *Sustancia de referencia*, se deben realizar las
164 medidas espectrofotométricas con la solución
165 preparada a partir de la *Sustancia de referencia*
166 y con la solución correspondiente preparada a
167 partir de la muestra. Efectuar las medidas en
168 sucesión inmediata, empleando las mismas
169 condiciones experimentales y de preferencia la
170 misma celda.

171 **Identificación por medio de Sustancias de**
172 **referencia** - La solución de referencia y la
173 solución muestra deben medirse en celdas de 1
174 cm de camino óptico, en el intervalo espectral
175 comprendido entre 200 y 400 nm, a menos que
176 se especifique de otro modo en la monografía
177 individual. Disolver separadamente una
178 cantidad de sustancia de referencia y de la
179 muestra en el *Solvente* especificado para obtener
180 soluciones de concentración conocida
181 aproximadamente igual a la especificada en la
182 monografía individual. Registrar en sucesión
183 inmediata los espectros de la *Solución de*
184 *referencia* y la *Solución muestra*.

185 Calcular las absorbancias específicas y/o la
186 relación de absorbancias según se especifique
187 en la monografía individual. Los requisitos se
188 cumplen cuando los espectros de absorción
189 ultravioleta de la *Solución muestra* y la *Solución*
190 *referencia* presentan máximos y mínimos a las
191 mismas longitudes de onda, y las absorbancias
192 específicas y/o la relación de absorbancias están
193 dentro de los límites especificados en la
194 monografía.