МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Нефелометрия** |  | **ОФС.1.2.1.1.0016** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод нефелометрии.

**Область применения**

Метод нефелометрии используют в качестве инструментального метода для определения степени мутности различных лекарственных форм (суспензий, эмульсий, экстрактов, растворов и др.). Кроме того, нефелометрия позволяет с высокой точностью посредством реакции преципитации проводить анализ:

- иммуноглобулинов (IgG, включая подклассы; IgM и IgA);

- белков системы комплемента (компоненты С3, С4, фактор В и др.);

- С-реактивного и некоторых других сывороточных белков;

- полисахаридов вакцинальных серотипов, входящих в состав поливалентных полисахаридных вакцин.

**Метод**

Метод основан на измерении интенсивности светового потока, рассеянного под определённым углом (обычно под углом 90 °) частицами, распределёнными в объёме испытуемого образца и находящимися в растворе во взвешенном состоянии. Интенсивность рассеянного света зависит, главным образом, от количества взвешенных частиц, их размеров, а также длины волны падающего на образец электромагнитного излучения.

Для получения воспроизводимых и достоверных результатов при проведении анализа частицы в исследуемых образцах не должны растворяться и оседать с течением времени.

Взвеси исследуемых и стандартных веществ готовят параллельно одним и тем же способом. Необходимые условия проведения испытания должны быть указаны в методиках испытаний.

Для измерения мутности окрашенных растворов используют относительную нефелометрию. Нефелометрические процедуры выполняются аналогично турбидиметрическим процедурам как для прямых измерений, так и для измерений в режиме отношения в соответствии
с ОФС «Турбидиметрия».

Для количественного анализа необходимо построение калибровочного графика, поскольку соотношения между оптическими свойствами суспензии и концентрацией дисперсной фазы являются полуэмпирическими. Количественные значения мутности (опалесценции) используют для контроля и анализа качества и стабильности образцов.

Если смотреть на суспензию под прямым углом к направлению падающего на неё света, появляется опалесценция (эффект Тиндаля). Подобное явление объясняется тем, что при прохождении через взвесь частиц световой поток не только частично поглощается, но и рассеивается ими.

Метод нефелометрии наиболее пригоден для измерений при низких значениях мутности, при которых существует линейная зависимость между значением NTU (Nephelometric Turbidity Units *–* нефелометрические единицы мутности) и сигнала детектора. С повышением мутности не все частицы подвергаются воздействию падающего света, и рассеянный остальными частицами свет блокируется на пути к детектору. Максимальные нефелометрические значения, при которых возможно производить достоверные измерения, лежат в диапазоне 1750–2000 NTU.

На практике удобно использовать метод сравнительной нефелометрии, в котором используется стандарт-система той же природы, что и исследуемая, для которой известны концентрация или размер частиц дисперсной фазы.

В случае применения нефелометрии для качественного и количественного определения белков и полисахаридов в реакции преципитации, как правило, используют автоматический анализатор, возможно с функцией кинетики. Взаимодействие антиген-антитело (реакция преципитации) происходит в жидкой фазе. Образовавшиеся иммунные комплексы образуют нерастворимый осадок, вызывающий помутнение среды. Учёт результатов реакции может проводиться по конечной точке (нефелометрия) или по мере нарастания мутности (опалесценции), обусловленной образованием осадка (кинетическая нефелометрия).

***Оборудование***

Действие нефелометра основано на уравнивании двух световых потоков: одного от рассеивающей искомой взвеси, другого со стандартом. Радиус частиц вычисляют, исходя из уравнения Релея по пропорции:

|  |  |
| --- | --- |
| $$\frac{I\_{ст}}{I\_{x}}=\frac{r\_{ст}^{3}}{r\_{x}^{3}}$$ | $$\frac{I\_{ст}}{I\_{x}}=\frac{C\_{ст}}{C\_{x}}$$ |
| где | *I* | – | интенсивность света; |
|  | *r* | – | радиус; |
|  | *C* | – | концентрация частиц (моль/л). |

Обычно, у приборов, работающих в режиме отношения, источником света излучения служит вольфрамовая лампа накаливания с максимумом интенсивности излучения при длине волны около 550 нм и температурой нити накаливания 2700 К. Также могут использоваться другие подходящие источники света. Альтернативным источником излучения, нивелирующим эффекты, связанные с окраской образцов, может быть инфракрасный светодиод с максимумом излучения при длине волны 860 нм и шириной спектральной линии 60 нм.

В качестве детекторов обычно используют кремниевые фотодиоды или фотоэлектронные умножители. Свет, рассеянный под углом (90±2,5)°, определяют на первичном детекторе.



Рисунок 1 – Схема нефелометрического анализа

А – нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеяние; Б – нефелометр, регистрирующий рассеяние под углом 90°.

Другие детекторы определяют прямой или обратный рассеянный свет или светопропускание. Калибровку приборов проводят с помощью растворов стандартов с известной мутностью. Приборы должны быть способны к автоматическому определению мутности.

Результаты испытаний, выраженные в NTU, регистрируют непосредственно с оборудования и сравнивают с требованиями, указанными в методиках испытаний.

***Эталоны для калибровки приборов.*** В соответствии с требованиями ОФС «Турбидиметрия».

***Технические условия пригодности прибора.*** В соответствии с требованиями ОФС «Турбидиметрия».