**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Обнаружение и измерение радиоактивности** |  | **ОФС.1.11.0003** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Радиоактивность – свойство некоторых нуклидов подвергаться радиоактивному распаду. Радионуклиды можно идентифицировать по их эмиссионному спектру. Каждый тип излучения требует специального оборудования для получения соответствующего спектра излучения.

**Область применения**

В частных фармакопейных статьях на радиофармацевтические лекарственные средства обнаружение и измерение радиоактивности проводят с различными целями: подтверждение характеристик, идентификация/установление подлинности по радионуклиду, определение радиоактивности вещества/ активности или объёмной активности (количественное определение), определение радионуклидной и радиохимической чистоты и др.

**Основы метода**

В соответствии с радионуклидным составом радиоактивные источники могут испускать различные типы излучений с определёнными значениями энергий и относительных интенсивностей, такие как: альфа-частицы, бета-частицы (отрицательно заряженные, обычно называемые электронами или положительно заряженные, обычно называемые позитронами), гамма- и рентгеновское излучение. Подобные излучения могут быть обнаружены без дальнейшего определения их характеристик в ионизационной камере в результате проявления ионизирующих свойств. Детальный спектральный анализ с использованием спектрометра применяют для идентификации радионуклидов, присутствующих в образце. Методы, используемые для обнаружения и измерения радиоактивности, зависят от природы и энергии испускаемого излучения. Измерение радиоактивности осуществляется путём подсчёта числа обнаруженных явлений распада (эмиссий) и может быть осуществлено автономно (например, с использованием ионизационной камеры или спектрометра) или в комбинации с другими методами, например методом разделения (радиохроматография) для расчёта относительных вкладов различных радиоактивных химических форм, присутствующих в смеси.

**Детекторы ионизирующих излучений**

Детекторами ионизирующих излучений называют устройства, предназначенные для обнаружения излучений и частиц, определения состава излучения и измерения его энергетического спектра. Для обнаружения и измерения радиоактивности используют: газоразрядные, твёрдотельные (полимерные флуоресцентные и кристаллические сцинтилляторы) и сцинтилляционные детекторы.

***Газоразрядные детекторы (ионизационная камера).*** В основе работы газоразрядных детекторов, которые также называют ионизационными, лежит измерение силы ионного тока, пропорционального количеству образовавшихся ионов, возникающих при ионизации газа под действием на него излучения от радиоактивного источника. Для этого к электродам, находящимся в ионизационной камере заполненной газом, прикладывают постоянное электрическое поле. После чего измеряют результирующий ионный ток, возникающий между электродами при ионизации газа под действием излучения от радиоактивного источника, и соотносят его с радиоактивностью в ионизационной камере. Прикладываемое напряжение, энергия, интенсивность излучения, природа и давление газа оказывают влияние на ионизационный ток. Ионизационная камера измеряет только результирующий ток, возникающий в итоге ионизации внутри камеры, и не может различать излучения различных радионуклидов. Прибор в большинстве случаев может измерять радиоактивность от нескольких десятков кБк до сотен ГБк.

*Прибор.* Ионизационная камера (включая калибраторы дозы) состоит из плотно закрытой камеры с колодцем и встроенным компьютерным оборудованием для преобразования сигнала детектора в единицы радиоактивности. Ионизационная камера должна быть экранирована для минимизации фоновых сигналов до приемлемого уровня.

*Калибровка.* Ионизационную камеру калибруют с учётом формы, размеров, материала первичной упаковки, объёма и состава раствора, положения внутри камеры измеряемого радионуклида. Значения пределов неопределенности при калибровке можно найти в государственных (национальных) или международных нормативных документах.

Калибровка осуществляется не менее одного раза в год, используя радионуклидные источники, соответствующие государственным (национальным) или международным стандартам, в первичной упаковке (флакон, шприц), подходящей по геометрии. Устанавливают и применяют дополнительные поправочные коэффициенты для учёта различия в конфигурациях образцов измеряемых радионуклидов. Выполняют контроль линейности сигнала прибора в пределах всего диапазона значений энергии и активности, для измерения которых применяется данное оборудование.

Для подтверждения калиброванного состояния ионизационной камеры для каждой установки параметра и перед каждым применением (как минимум один раз в день применения) проводят проверку стабильности ионизационной камеры с использованием стандартных радионуклидных источников с длительным периодом полураспада.

Для получения наиболее правильных результатов измерения активности образца и калибровочного источника должны быть проведены в абсолютно идентичной геометрии. При необходимости доводят объём радиофармацевтического лекарственного средства, радиоактивность которого необходимо измерить, до объёма калибровочного источника.

В день применения ионизационной камеры для подтверждения калибровки должна выполняться проверка на соответствие источнику сравнения, например, цезию-137. Для точного измерения радиоактивности отдельного радионуклида в измерение должны быть внесены поправки на вклады в ионизационный ток примесей радионуклидов, присутствующих в лекарственном препарате. Измеряемые уровни активности зависят от насыщения, диапазона усилителя и конструкции камеры.

Установки прибора (фактор калибровки) могут быть отрегулированы для создания прямой зависимости между ионизацией в результате излучения конкретного радионуклида и значением радиоактивности, полученным для каждой геометрии измерения.

Для точного измерения радиоактивности отдельного радионуклида в измерение должны быть внесены поправки на вклады в ионизационный ток примесей радионуклидов, присутствующих в лекарственном препарате. Измеряемые уровни активности зависят от насыщения, диапазона усилителя и конструкции камеры.

*Метод*. Образец размещают внутри колодца ионизационной камеры в заданном положении, используя держатель. После помещения образца в ионизационную камеру и достижения стабильного сигнала регистрируют значение активности.

***Твёрдотельные детекторы***

*Полимерные и кристаллические сцинтилляционные детекторы.* В связи с их высокой чувствительностью применяют при счёте низких уровней радиоактивности.

*Полупроводниковый детектор.* Используется для гамма- и рентгеновской спектрометрии, а так же при необходимости более точного измерения в случае измерения радиоактивности смесей радионуклидов или если предполагаемые примесные радионуклиды имеют близкие значения энергии излучения. Представляет собой ионизационную камеру, чувствительный объём которой является твёрдым телом – полупроводниковым кристаллом. Наиболее распространены детекторы из кристаллов кремния и германия. Малый размер по сравнению с газовыми камерами и сцинтилляторами является основным преимуществом данного вида детекторов.

***Сцинтилляционный детектор.*** Сцинтилляционный метод регистрации излучений основан на регистрации вспышек света, возникающих при попадании на вещество (сцинтиллятор) ионизирующих излучений. Может применяться для измерения радиоактивности в динамическом режиме, например, в случае, когда элюат из жидкостного хроматографа направляется над детектором или через него. Основные свойства сцинтилляторов определяются механизмом возбуждения и высвечивания. В качестве сцинтилляторов используются различные вещества: органические (кристаллы, пластики или жидкости), газы и неорганические кристаллы (CsI, ZnS, NaI и стекла). При взаимодействии со сцинтиллятором ионизирующие излучения вызывают его видимую люминесценцию. С помощью фотоэлектронного умножителя световые сигналы пропорционально преобразуются в электрические и обрабатываются с помощью электроизмерительной техники.

*Прибор.* Сцинтилляционные детекторы состоят из сцинтиллятора и чувствительного фотоэлектрического устройства (фотоэлектронного умножителя). В детекторах небольших размеров сцинтилляторы наносятся непосредственно на катод фотоэлектронного умножителя. В ряде случаев между сцинтиллятором и фотокатодом помещают световод. Система может иметь регулируемое энергетическое окно для выбора, при необходимости, требуемого для счёта диапазона в спектре энергий. Измерительные приборы имеют различные параметры разрешения по энергии и эффективности обнаружения, зависящие от типа детектора, его объёмных и геометрических характеристик. Чем меньше эффективность, тем больше необходимое время счёта.

*Калибровка.* Калибровка детектора должна осуществляться измерением его эффективности с использованием радионуклидного источника, соответствующего государственным (национальным) или международным стандартам. При калибровке, исходя из эффективности, используют такие источники, как цезий-137, кобальт-60, барий-133 и другие, в соответствии с необходимым диапазоном значений энергии.

*Метод.* Необходимо удостовериться, что радиоактивность образца находится в диапазоне линейности оборудования. Измерение начинают после того, как все защитные экраны находятся на месте или крышка колодца возвращена в исходное положение и время счёта выбрано таким образом, чтобы получить число импульсов, достаточное для проведения необходимой статистической обработки. Измеряемые образцы должны быть помещены перед детектором или внутрь колодца детектора. Камеры измерения могут быть закрыты устройством для экранирования детектора, а введение образцов по отдельности может осуществляться с использованием крышки или других систем, позволяющих размещать образцы в определённом положении для обеспечения правильной геометрии измерения.

***Жидкостной сцинтилляционный детектор.*** Жидкостные сцинтилляционные детекторы позволяют регистрировать все виды радиоактивного излучения.

*Калибровка.* Для учёта потери эффективности счёта в связи с поглощением жидкостной сцинтилляционный счётчик может использовать внешний источник, обычно барий-133 или европий-152, который подносится близко к флакону с образцом для высвобождения электронов Комптона. Форму результирующего спектра анализируют автоматически для вычисления параметра, характеризующего поглощение. Затем этот параметр может иметь отношение к источникам измерения эффективности счёта с известной активностью при определённом содержании поглотителя. Полученная кривая поглощения позволяет определить активность неизвестного образца при известных значениях скорости счёта и параметра поглощения.

*Метод.* Образец растворяется или суспендируется в жидкой сцинтилляционной смеси в прозрачных или полупрозрачных (стеклянных или полимерных) ёмкостях и далее ведётся подсчёт электрических импульсов, образованных с помощью фотоумножителя из излучаемого света. Жидкую сцинтилляционную смесь выбирают таким образом, чтобы минимизировать ошибки счёта вследствие поглощения, хемилюминесценции, фосфоресценции и т.д.

**Спектрометрия**

Радионуклиды могут быть идентифицированы по их спектру излучений. Получение спектра каждого типа излучений (например, альфа-частицы, бета-частицы и электроны, гамма- и рентгеновское излучения) требует определенного оборудования.

***Гамма-спектрометрия.*** В гамма-спектрометрии с использованием сцинтилляционного детектора поглощение гамма- и рентгеновского излучения приводит к образованию света, который преобразуется с помощью фотоумножителя в электрический импульс.

В гамма-спектрометрии с использованием полупроводникового детектора поглощение гамма- и рентгеновского излучения приводит к незамедлительному образованию электрического импульса.

В обоих случаях амплитуда импульса пропорциональна энергии поглощенного излучения. Наиболее распространёнными детекторами для гамма- и рентгеновской спектрометрии являются сцинтилляционные счётчики на основе активированного таллием натрия йодида (NaI(Tl)) и полупроводниковые детекторы на основе высокочистого германия (HPGe).

Спектр гамма-излучения может быть образован при получении и анализе достаточного числа импульсов.

*Прибор.*Гамма-спектрометр обычно содержит экранированную измерительную камеру, в которую помещают образец, детектор, электрическую цепь и многоканальный анализатор.

Экранирование камеры должно уменьшать фоновый сигнал до уровня, позволяющего осуществлять регистрацию правильного спектра гамма-излучения. Измерительная камера имеет подвижную крышку или выдвижной ящик, позволяющие разместить образец. Может применяться держатель образца для обеспечения воспроизводимости геометрии между измерениями.

Продолжительность измерения зависит от радиоактивности конкретного радионуклида, и для достижения необходимой статистики счёта может потребоваться длительный период получения результата. Должны быть тщательно рассмотрены потери на мёртвое время для данного типа детектора.

Чувствительность детектора на основе NaI(Tl) выше, чем у германиевого детектора аналогичного размера. Обычно пики на спектре значений энергии идентифицируют с неопределенностью в зависимости от значений ширины пика на половине его высоты. Разрешение по энергии сцинтилляционного твёрдотельного детектора намного хуже, чем для полупроводникового детектора и, следовательно, пики, полученные при использовании полупроводникового детектора, намного уже, чем в случае применения сцинтилляционного детектора. Различные характеристики детекторов на основе NaI(Tl) и HPGe могут ограничивать их применение в некоторых спектрометрических анализах. Для идентификации радионуклида (ов) в РФЛП и определения радионуклидной чистоты оценка риска процесса производства радионуклида должна включать в себя оценку возможного присутствия других радионуклидов со значениями энергии фотонов в диапазоне (±10 %), характерными также и для радионуклида(ов), присутствующего(их) в радиофармацевтическом лекарственном средстве.

В случае присутствия радионуклидных примесей, которые испускают гамма- или рентгеновское излучения с энергией в диапазоне значений, также характерном и для фотонов, испускаемых радионуклидом лекарственного препарата, для идентификации пика достаточной является измеренная энергия пика, находящаяся в пределах максимального интервала значений ±2 кэВ или ±2 % (тот пик, который больше) по отношению к номинальной энергии пика. В случае если не предполагается присутствие таких примесей, для идентификации пика приемлемым является максимальный интервал ±10 кэВ или ±6 % (тот пик, который больше) по отношению к номинальной энергии пика.

*Пробоподготовка.* Необходимо обеспечить, чтобы скорость счёта образца находилась в пределах диапазона линейности оборудования. Для жидких образцов этого можно достичь с помощью соответствующего разбавления; для твёрдых образцов – изменением расстояния между источником и детектором или применением растворителя.

Необходимо обеспечить, чтобы контейнер, применяемый для количественных измерений, был идентичен по форме, размерам, объёму и материалу контейнеру с калибровочным стандартом.

Необходимо обеспечить идентичность радионуклидного состава образца (по энергиям) в контейнере и его положения в измерительной камере контейнеру с калибровочным стандартом для количественного определения.

При измерении образец должен преимущественно находиться в первичной упаковке и занимать определённое положение по отношению к детектору. В этом случае геометрия образец/детектор определяется положением образца относительно детектора и характеристиками контейнера и образца, например, формой, объёмом и плотностью.

*Калибровка.*Калибруют спектрометр по эффективности и энергии.Калибровка по энергии осуществляется с использованием пиков известных источников, соответствующих государственным (национальным) или международным стандартам, например, кобальта-57, цезия-137, кобальта-60 и других, имеющих необходимый диапазон энергий. Параллельно может быть проведена калибровка по эффективности с целью получения не только спектра значений энергии, но в дальнейшем также и значений активности образца и радионуклидных примесей. Калибровка по эффективности может выполняться с применением стандартного радионуклидного источника с соответствующим диапазоном спектра энергий. Для получения кривой эффективности измерение сигнала детектора как функции энергии, должно проводиться в определённой геометрии образец/детектор. В связи с этим возможно проводить измерение с помощью стандартного эталонного источника. Стандартные эталонные источники могут быть неподходящими для радионуклидов с коротким периодом полураспада, например, некоторых излучателей позитронов.

*Метод.*Испытуемый лекарственный препарат в первичной упаковке вносят в камеру измерительного оборудования и снимают спектр. Образец размещают близко к детектору или внутри детектора с колодцем. Все результаты в пределах диапазона заданных значений энергии собирают и выводят на дисплей измерителя скорости в виде числа импульсов в секунду или накапливают в течение заданного периода времени. В случае достаточного различия значений энергии фотонов, испускаемых радионуклидом(ами), может использоваться детектор на основе натрия йодида при установлении его высокой чувствительности. Однако при необходимости установления различия излучений со сходными значениями энергии следует применять детектор на основе HPGe или другой полупроводниковый детектор.

*Идентификация / установление подлинности по радионуклиду.* Калибруют спектрометр по энергии. Установление соответствия энергии пиков, обнаруженных для образца, значениям энергии, указанным в частной фармакопейной статье, подтверждает подлинность радионуклида в испытании.

*Радионуклидная чистота.* Определяют предел количественного определения (ПКО) и разрешение измерительного оборудования. Полученные значения должны соответствовать предельным содержаниям определяемых радионуклидов. Снимают спектр радиофармацевтического лекарственного средства.

Идентифицируют радионуклиды, присутствующие в испытуемом радиофармацевтическом лекарственном средстве, и определяют их радиоактивность (ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»). В связи с тем, что содержание радионуклидных примесей, выраженное в процентах от общей активности, может возрастать или уменьшаться со временем, измеренная активность каждой примеси должна пересчитываться на активность на начало и конец срока годности лекарственного препарата. Активности всех радионуклидных примесей необходимо суммировать (принимая во внимание предел количественного определения) для получения общей активности радиофармацевтического лекарственного средства.

***Бета-спектрометрия.*** Бета-спектрометр аналогичен гамма-спектрометру, но в нём часто используется жидкостной сцинтиллятор для преобразования энергии бета-частиц в свет, который можно обнаружить и затем проанализировать.

*Калибровка.* Общепринятым методом калибровки по энергии является применение непоглощающего образца сравнения для определения максимального значения энергии бета-частиц, испускаемых определяемым радионуклидом.

*Метод.* Бета-спектрометрия заключается преимущественно в растворении или суспендировании образца в жидкой сцинтилляционной смеси в прозрачных или полупрозрачных (стеклянных или полимерных) ёмкостях и последующем счёте электрических импульсов, образованных с помощью фотоумножителя из излучаемого света. Амплитуда импульса зависит от энергии поглощённого излучения. Спектр бета-частиц может быть получен при образовании достаточного числа импульсов. Жидкую сцинтилляционную смесь выбирают таким образом, чтобы минимизировать ошибки счёта вследствие поглощения, хемилюминесценции, фосфоресценции и т.д. Счёт совпадений при использовании двух или более фотоумножителей также используют для минимизации числа импульсов, к которым приводят фоновое излучение, электронные эффекты и т.д. Для выявления различия между эмиссиями альфа- и бета- частиц обычно дифференцируют импульсы по форме.*Идентификация радионуклида.* Установление соответствия на спектре энергии средних и/или максимальных значений энергии, полученных для образца, значениям энергии, указанным в частной фармакопейной статье, подтверждает подлинность радионуклида в испытании.

***Альфа-спектрометрия.*** Для идентификации и количественного определения альфа-излучателей чаще всего применяют спектрометрию с использованием жидкостного сцинтилляционного детектора. Так жедля идентификации и определения радионуклидной чистоты альфа-излучателей может применяться спектрометрия с использованием полупроводникового детектора на кремниевых диодах. При использовании такого детектора поглощение альфа-частиц приводит к незамедлительному образованию электрического импульса. Движение электронно-дырочных пар, образованных при воздействии излучения, индуцирует электрический заряд, который усиливают и измеряют.

*Пробоподготовка.*Подготовка образца является исключительно важной. После химического отделения определяемого радионуклида образец наносится как электролитическое покрытие на диск из нержавеющей стали в виде очень тонкого слоя вещества для минимизации собственной абсорбции. Результативность всей процедуры может определяться экспериментально с добавлением известного количества индикатора, который должен учитывать эффективность разделения, эффективность нанесения электролитического покрытия и эффективность счёта.

Для обоих типов детекторов амплитуда импульса зависит от энергии поглощенного излучения. Спектр альфа-частиц может быть получен при образовании достаточного количества импульсов.

*Калибровка.* Альфа-спектрометр должен быть откалиброван по энергии и эффективности. Калибровка осуществляется с использованием пиков известных источников, имеющих необходимый диапазон значений энергии, таких как америций-241 и плутоний-242. Не все альфа-частицы, испускаемые источником, будут образовывать импульс в системе. Вероятность того, что испускаемые альфа-частицы будут взаимодействовать с материалом детектора и образовывать импульс, характеризует эффективность детектора, зависящую от геометрии.

*Идентификация/установление подлинности по радионуклиду.* Установление соответствия энергии пиков, обнаруженных для образца, значениям энергии, указанным в частной фармакопейной статье, подтверждает подлинность радионуклида в испытании.

**Обнаружение и измерение радиоактивности в сочетании с физико-химическими методами разделения.**

Радиофармацевтическое лекарственное средство может содержать радионуклид в различных химических формах, отличных от необходимой. Поэтому следует разделить различные вещества, содержащие радионуклид, и определить их относительную радиоактивность. Для этого приборы для обнаружения и измерения радиоактивности используют в сочетании с физико-химическими методами разделения. В принципе может быть использован любой метод разделения.

Частные фармакопейные статьи на радиофармацевтические лекарственные средства могут включать совместное применение метода измерения радиоактивности и методов хроматографии на бумаге (ОФС «Хроматография на бумаге»), тонкослойной хроматографии (ОФС «Тонкослойная хроматография»), газовой хроматографии (ОФС «Газовая хроматография»), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»), эксклюзионной хроматографии (ОФС «Эксклюзионная хроматография») или электрофореза (ОФС «Электрофорез») и др. Во всех случаях активность каждого анализируемого образца измеряют после разделения, проведённого указанным методом. Измерение активности может выполняться с применением детекторов, смонтированных последовательно с другими детекторами в аналитических измерительных приборах, например, жидкостных хроматографах с осуществлением поточного («in-line») обнаружения радиоактивности испытуемых образцов, или выполняться автономно («off-line»), то есть после завершения аналитического разделения путём измерения активности фракций элюата, полученных после разделения с помощью жидкостной хроматографии или в виде распределения по активности на полосках (пластинах) в бумажной или тонкослойной хроматографии.

***Непрерывное («in-line») обнаружение и измерение радиоактивности в сочетании с жидкостной хроматографией.*** Высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») может применяться для отделения основного радиоактивного вещества радиофармацевтического лекарственного средства от радиохимических примесей или продуктов деградации.

*Прибор.* Непрерывное («in-line») обнаружение обычно проводят с помощью проточного сцинтилляционного детектора, соединённого с измерителем скорости и регистрирующим устройством. Часть трубки, через которую движется элюат, содержащий радиоактивные компоненты, помещается перед детектором или внутри него. Эффективность счёта можно повысить, используя более длинную часть трубки (например, осуществляя многократные повороты перед детектором или внутри него); однако это будет уменьшать способность системы к разделению двух близко расположенных элюируемых пиков радиоактивности. Одновременное использование детектора радиоактивного излучения и других детекторов (ультрафиолетового, рефрактометрического, кондуктометрического и т.д.), соединённых последовательно, может применяться для идентификации вещества, например, по времени удерживания известного стандарта, для определения количества вещества с использованием подходящего стандартного образца и для измерения радиоактивности данного вещества. При последовательном соединении разных детекторов необходимо откорректировать экспериментально полученные значения времени удерживания с учётом задержки во времени между детекторами. Сцинтилляционный материал детектора выбирают, исходя из типа обнаруживаемого излучения, например, полимерный сцинтиллятор – для бета-частиц или сцинтилляционные кристаллы – для гамма- и рентгеновского излучений. Для обнаружения в потоке радионуклидов, испускающих бета-частицы, может также использоваться добавление жидкой сцинтилляционной смеси перед достижением элюатом детектора.

Предварительную калибровку прибора и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

*Метод.* Образец разбавляют при необходимости и затем вносят в колонку в указанном объёме и при указанных условиях. В данном случае важно подтвердить предел обнаружения (ПО), предел количественного определения (ПКО), а также линейность детектора в пределах всего диапазона измеряемых значений активности. Сигнал детекторов регистрируют как функцию времени.

Идентификация пиков по радиометрическому сигналу (радиохроматограмма) осуществляют на основании времени удерживания анализируемых образцов. Для этой цели может быть использован профиль, полученный с помощью других детекторов.

Количественное определение различных компонентов профилей хроматограммы и радиохроматограммы проводят, исходя из площадей пиков. Площади пиков обычно получают непосредственным интегрированием сигнала детектора с использованием коммерчески доступного программного обеспечения.

***Автономное («off-line») обнаружение и измерение радиоактивности.*** Высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). При условии воспроизводимой последовательности времён удерживания различных радиохимических веществ применяется альтернативный метод количественного определения радиоактивности, заключающийся в сборе элюата в жидкостной хроматографии в виде выходящих во времени порций (фракций) для автономного (off-line) определения радиоактивности. Радиоактивность фракций, соответствующих пикам, может быть выражена в виде относительной части в процентах от общей радиоактивности всех фракций с учётом предела количественного определения.

*Прибор.*Обычно содержит детектор радиоактивности, например, позиционно-чувствительный пропорциональный счётчик или коллимированный сцинтилляционный детектор, размещённый на фиксированном расстоянии от платформы, на которой располагается сканируемая хроматографическая пластина (полоска).Радиоактивность образца, наносимого на хроматографическую полоску, должна быть такой, чтобы значение скорости счёта находилось в диапазоне линейности измерительного оборудования, поэтому при необходимости образец может быть разбавлен. Сканируемая область размещается в соответствующем положении таким образом, чтобы необходимая полоса находилась на одной линии с траекторией сканирования детектора. Необходимо откорректировать время сканирования для обеспечения достаточного времени счёта в течение единичного анализа.

Детектор или платформа могут перемещаться в плоскости вдоль оси x или оси y таким образом, чтобы вся поверхность полностью была просканирована в течение одного анализа.

Детектор соединяется с соответствующим счётным устройством, чтобы можно было провести количественное измерение детектируемой радиоактивности и соотнести пространственно скорость счёта со сканируемой поверхностью.

Протокол с результатами измерения радиоактивности по отношению к пройденному детектором расстоянию выводится автоматически, а профиль содержит пики с площадью, пропорциональной числу импульсов на единицу расстояния.

Предварительную калибровку и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

*Метод.* Образец вносят в колонку в указанном объёме и при указанных условиях. Фракции собирают на конечной стадии хроматографирования.

Измеряют объём между детектором, используемым для идентификации времени удерживания пиков, и местом сбора фракций, а фактор удерживания рассчитывают на основании скорости потока элюата и используют для оценки времени элюирования для каждого пика в месте сбора. Фракции собирают с учётом фиксированного интервала времени или в момент выхода, определённый исходя из времени удерживания таким образом, чтобы любой из рассматриваемых пиков относился к одной или более фракциям.

Радиоактивность каждой фракции измеряют с использованием калиброванного средства измерения, например, калибратора доз или сцинтилляционного детектора, с учётом предела количественного определения и линейности.

Профиль элюирования получают в результате графической обработки данных таблицы, в которой количество импульсов, соответствующее одной фракции, вносится напротив времени элюирования или объёма. Для определения радиохимической чистоты значения активности фракций, относящихся к одному и тому же пику, суммируют и рассчитывают относительное процентное содержание.

Тонкослойная хроматография (ОФС «Тонкослойная хроматография»). и хроматография на бумаге (ОФС «Хроматография на бумаге»). При условии проведения валидации методик тонкослойной хроматографии или бумажной хроматографии для разделения компонентов радиоактивного препарата число и относительная интенсивность разделённых пятен могут обнаруживаться и измеряться с использованием детектора радиоактивности.

Расположение пятен (пиков) дает возможность провести химическую идентификацию при сравнении с растворами этих же химических веществ (нерадиоактивных), используя соответствующий метод детектирования.

***Счётчик радиоактивности*.** В случае если необходимо идентифицировать не более трёх полностью разделённых радиохимических компонентов, пластина (полоска) может быть разрезана на равные участки, каждый из которых имеет размер, не превышающий половину длины пластины (полоски) в соответствии с различием факторов разделения (Rf) двух наиболее близко расположенных пятен. Каждый отдельный участок нумеруют от начального края и подвергают счёту по отдельности. С другой стороны, для хорошо характеризуемых систем полоска может быть разрезана на две или более неравные части, размеры которых перед счётом, при необходимости, могут быть откорректированы. Для измерений могут быть использованы ионизационная камера или сцинтилляционный счётчик при условии их применения в пределах диапазона линейности измерительного оборудования и свыше его ПКО. Предварительную калибровку и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

***Авторадиография****.* Авторадиография также может быть использована для получения изображения распределения радиоактивности на хроматографической полоске. В этом случае необходимо показать, что сигнал системы, применяемой для получения изображения, например, люминофорной системы формирования изображения или фотоплёнки, является линейным по отношению к радиоактивности, представленной на хроматограмме. В ином случае систему необходимо калибровать повторно или параллельно подвергнуть действию серии радиоактивных источников сравнения, полученной разбавлением калибровочного стандартного раствора в диапазоне предполагаемых значений радиоактивности компонентов, которые могут присутствовать на подложке.

*Калибровка.* Подтверждение пределов обнаружения и количественного определения, а также линейности детектора во всем диапазоне измеряемых значений активности и для всех положений на подложке хроматографической системы имеет важное значение. С этой целью применяют образцы со значениями активности от 0,1 % до 100 % от предполагаемого диапазона. Образцы готовят разбавлением и применяют их равные объёмы, высушивая при необходимости. После получения профиля радиоактивности с использованием стандартного измерительного оборудования, площади пиков интегрируют для сравнения с рассчитанным количеством радиоактивности каждого пятна. Контролируют, чтобы чувствительность детектора на всей поверхности измерений была одинакова, так как она может отличаться в зависимости от положения детектора.

На разрешение пиков влияют размер пятна, общая радиоактивность радионуклида и технические возможности детектора. Это может быть проверено при нанесении пятен объёмом 5 мкл, разделённых расстоянием, возрастающим от 4 мм до 20 мм, и с шагом 2 мм. Приблизительное разрешение системы обнаружения может определяться, исходя из профиля радиоактивности, как расстояние между двумя пятнами, где базовая линия является чётко выделенной. Предварительную калибровку и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

*Метод.* Помещают необходимое количество образца на стартовую линию хроматографической полоски, высушивая, при необходимости, во избежание расплывания пятна. Хроматографирование осуществляют согласно указанному методу. Допускается использование носителя, если указано в частной фармакопейной статье.

В бумажной и тонкослойной хроматографии предпочтительно не разбавлять испытуемый лекарственный препарат, но важно избегать нанесения вещества с таким количеством радиоактивности, которое в процессе её измерения обусловливает потери при счёте в связи с совпадениями (потери на мёртвое время).

После разделения полоску высушивают и определяют расположение радиоактивных участков путём измерения радиоактивности на протяжении всей хроматограммы, используя соответствующий коллимированный счётчик, с помощью авторадиографии или разрезанием полосок на части и измерением радиоактивности каждой части.

Суммарная радиоактивность может быть определена путём интегрирования с использованием автоматизированного измерительного прибора или счётчика с цифровой индикацией.

Из отношения площадей пиков получают отношение значений радиоактивности в процентах для соответствующих радиоактивных веществ.

Если полоски разрезаются на части, из отношения измеренных значений радиоактивности определяют отношение значений радиоактивности в процентах для соответствующих радиоактивных веществ.

**Факторы, влияющие на точность измерений**

***Геометрия образца*** в процессе измерения радиоактивности и время измерения оказывают сильное влияние на результат. В общем случае геометрия измерения должна соответствовать геометрии при калибровке, а время измерения должно быть достаточно длительным для получения статистически достоверных данных.

***Потери на мёртвое время.*** В связи с ограниченным временем разрешения (мёртвое время) детектора и соединённого с ним электронного оборудования может быть необходимым внесение поправок на потери при совпадениях. Время разрешения счётчика представляет собой минимальный временной интервал, необходимый счётчику для разрешения двух отдельно регистрируемых импульсов. Эпизодические явления излучения в более короткие интервалы времени могут не обнаруживаться или обнаруживаться как отдельное явление с суммарной энергией. Эти потери иногда называются «потерями на мёртвое время». Для подсчитывающей системы с фиксированным мёртвым временем истинную скорость счёта, c-1, рассчитывают по следующей формуле:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | |  | (1) |
| где | *N1* | – | наблюдаемая скорость счёта в секунду; | | |
|  | *τ* | – | мёртвое время в секундах. | | |

Некоторые приборы вносят данную поправку автоматически. Внесение поправок на потери, вызванные совпадениями, должно быть сделано перед поправками на фоновое излучение.

***Поправки на распад, происходящий в процессе измерения.*** Если период времени для отдельного измерения (tm) не настолько мал, что им можно пренебречь по сравнению с периодом полураспада радионуклида *T1/2*, необходимо учитывать распад, происходящий в процессе измерения. Например, 5 % суммарных потерь при счёте вследствие распада в течение периода измерения составляет 15 % от периода полураспада радионуклида.

Показание прибора (скорость счёта, ионизационный ток и т.д.), откорректированное с учётом фоновых сигналов и при необходимости потерь, вызванных электронными эффектами, на начало отдельного измерения рассчитывают по следующей формуле:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | |  | (2) |
| где | *R* | – | показание прибора перед внесением поправки на распад, но после поправки на фоновый сигнал и т.д.; | | |
|  | *e* | – | основание натурального логарифма; | | |
|  | *λ* | – | константа распада радионуклида (ln 2/T1/2); | | |
|  | *tm* | – | продолжительность измерения. | | |

**Статистика измерения радиоактивности**

Различия в результатах определений радиоактивности происходят, главным образом, из хаотичной природы ядерных превращений. С помощью счёта при любом ограниченном периоде времени можно только оценить истинную скорость ядерных превращений. Для компенсации различий в числе превращений за период времени должно регистрироваться достаточное количество импульсов. В случае измерения радиоактивности стандартное отклонение зарегистрированных импульсов равно корню квадратному из числа этих импульсов. Таким образом, для получения относительного стандартного отклонения, не превышающего 1 %, необходимо не менее 10 000 импульсов.

**Линейность**

Линейность измерительного прибора представляет собой диапазон значений радиоактивности конкретного радионуклида, в пределах которого его эффективность остается постоянной.

Линейный диапазон значений совокупного измерения радиоактивности может быть определён при повторном счёте для радиоактивного образца в условиях фиксированной геометрии, так как радионуклид образца распадается, начиная с уровня значений активности, превышающего линейный диапазон. После внесения поправок на фоновый сигнал строят график зависимости натурального логарифма значений скорости счёта от времени, прошедшего после первого измерения (Рис. 1).



**Прошедшее время, (ч)**

Рисунок 1 – График зависимости измеренной и экстраполированной скорости счёта (натуральный логарифм числа импульсов в секунду (ln cps)) при использовании источника, содержащего технеций-99м, от времени, начиная с уровня значений радиоактивности, превышающих линейный диапазон измерительного оборудования.

Линейный регрессионный анализ центральной линейной части совокупности данных приводит к наклону кривой, который равен постоянной распада λ , имеющей характерное значение для каждого радионуклида:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | *λt+c* | (3) |
| где | *c* | – | натуральный логарифм скорости счёта при t = 0 измерительного прибора, имеющего идеальную линейность. | | |

Итоговое уравнение регрессии используют для расчёта теоретической скорости счёта при каждом значении времени, при котором были зарегистрированы текущие показания прибора. Линейный диапазон измерительного оборудования является превышенным в случае, если отклонение измеренной скорости счёта от теоретической неприемлемо высокое.

С другой стороны, может быть произведён ряд разбавлений раствора радиоактивного вещества с известной радиоактивностью. Затем отмеряют равные объёмы каждого разбавленного раствора и подвергают счёту с использованием стандартизованных геометрии и комплектации счетчика. Отношение скорости счёта для каждого образца (после поправки на фоновые сигналы и распад) к рассчитанной радиоактивности соответствующего образца в Бк представляет собой эффективность счёта. Диапазон, в пределах которого это отношение имеет постоянное значение, является диапазоном измерительного оборудования, подходящим для данного радионуклида.

**Предел обнаружения и предел количественного определения для оборудования и методик**

Предел обнаружения и предел количественного определения для оборудования и методик, используемых при измерении радиоактивности, должны устанавливаться перед их повседневным использованием.

*Предел обнаружения.* Предел обнаружения (ПО) отдельной методики представляет собой наименьшее содержание радиоактивности в образце, которое может быть обнаружено, но не обязательно определено количественно в виде точного значения. На практике для этого необходимо определить фоновый сигнал и его стандартное отклонение. ПО обычно принимается равным трехкратному стандартному отклонению фонового сигнала.

*Предел количественного определения.* Предел количественного определения (ПКО) отдельной методики представляет собой наименьшее содержание радиоактивности в образце, которое может быть определено количественно с соответствующей прецизионностью и правильностью. ПКО применяется, в частности, для определения примесей и/или продуктов деградации. На практике ПКО обычно принимается равным 10-кратному стандартному отклонению фонового сигнала.