

2.2. ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

01/2018:20201

2.2.1. ПРОЗРАЧНОСТЬ И СТЕПЕНЬ ОПАЛЕСЦЕНЦИИ ЖИДКОСТЕЙ

ВИЗУАЛЬНЫЙ МЕТОД

Для определения прозрачности и степени мутности жидкостей используют одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного и нейтрального стекла с плоским дном, которые имеют внутренний диаметр от 15 мм до 25 мм; слой испытуемой жидкости высотой 40 мм. Жидкость сравнивают со свежеприготовленной суспензией сравнения (высота слоя 40 мм) при рассеянном дневном освещении через 5 мин после приготовления суспензии сравнения, просматривая объекты вдоль вертикальной оси пробирок на черном фоне. Рассеянный свет должен быть таким, чтобы суспензия сравнения I легко отличалась от воды *P*, а суспензия сравнения II легко отличалась от суспензии сравнения I.

Прозрачными считаются жидкости, которые по прозрачности не отличаются от воды *P*, или растворителя, который используют при приготовлении раствора в описанных выше условиях, или которые не превышают по интенсивности мутность суспензии сравнения I.

Раствор гидразина сульфата. 1,0 г *гидразина сульфата P* растворяют в воде *P* и доводят водой *P* до объема 100,0 мл. Раствор выдерживают в течение 4—6 ч.

Раствор гексаметилентетрамина. 2,5 г *гексаметилентетрамина P* растворяют в 25,0 мл воды *P* в колбе с притертой пробкой вместимостью 100 мл.

Первичная опалесцирующая суспензия (суспензия формазина). 25,0 мл раствора гидразина сульфата прибавляют к приготовленному раствору гексаметилентетрамина, перемешивают и выдерживают в течение 24 ч. Суспензия стабильна в течение 2 месяцев при хранении в стеклянной посуде, которая не имеет дефектов поверхности. Частицы суспензии могут прилипнуть к стеклу, поэтому перед применением суспензию тщательно взбалтывают.

Стандарт опалесценции. 15,0 мл первичной опалесцирующей суспензии доводят водой *P* до объема 1000,0 мл. Срок годности стандарта опалесценции составляет не более 24 ч.

Суспензии сравнения. Приготовление суспензий сравнения проводят в соответствии с таблицей 2.2.1.-1. Стандарт опалесценции и воду *P* смешивают и встряхивают непосредственно перед применением.

Приготовление суспензий сравнения

	I	II	III	IV
Стандарт опалесценции, мл	5,0	10,0	30,0	50,0
Вода Р, мл	95,0	90,0	70,0	50,0

Стандарт мутности. Суспензия формазина, приготовленная смешиванием равных объемов раствора гидразина сульфата и раствора гексаметилентетрамина, является первичной суспензией сравнения с 4000 *NTU* (*Nephelometric Turbidity Units* — нефелометрические единицы мутности). Суспензии сравнения I, II, III и IV имеют значения 3 *NTU*, 6 *NTU*, 18 *NTU* и 30 *NTU* соответственно. Стабилизированные суспензии формазина, пригодные для приготовления стабильных разведенных стандартов мутности, являются коммерчески доступными и могут быть использованы в случае, если выдерживают сравнение со стандартами, приготовленными как указано выше.

Формазин обладает характеристиками, делающими его превосходным стандартом мутности. Он может быть воспроизводимо приготовлен из реактивов. Физические характеристики делают его стандартом для калибровки светорассеяния. Полимер формазин состоит из цепей различной длины, которые принимают случайные конфигурации, что приводит к получению частиц с широким спектром форм и размеров, аналитически соответствующих частицам с различными размерами и формами, находящимся в испытуемых образцах. Благодаря трассируемости и воспроизводимости светорассеивающих свойств формазина инструментальные калибровочные алгоритмы и критерии выполнения по большей части основаны на этом стандарте.

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

ВВЕДЕНИЕ

Степень мутности раствора может быть определена с помощью инструментального измерения поглощения или рассеяния света за счет субмикроскопических неоднородностей оптической плотности опалесцирующих растворов и суспензий. На практике используются 2 метода: нефелометрия и турбидиметрия. Для измерения мутности окрашенных испытуемых образцов используют методы относительной турбидиметрии и нефелометрии, основанные на соотношении выбранных сигналов.

Эффект рассеяния света суспензированными частицами может быть измерен с помощью либо проходящего света (турбидиметрия), либо рассеянного света (нефелометрия). Относительная турбидиметрия сочетает принципы и нефелометрии, и турбидиметрии. Турбидиметрия и нефелометрия могут использоваться в случае со слегка опалесцирующими суспензиями. Условия приготовления суспензии сравнения должны быть четко оговорены. Для количественных определений существенным является построение калибровочного графика, так как зависимость между оптическими свойствами суспензий и концентрации диспергированной фазы является в лучшем случае полуэмпирической.

Определение опалесценции окрашенных жидкостей проводят методом относительной турбидиметрии или нефелометрии, основанной на соотношении выбранных сигналов, так как окрашивание оказывает негативное воздействие, ослабляя как падающий, так и рассеянный свет, и уменьшает значение мутности. Эффект настолько велик, что даже в случае умеренно окрашенных образцов обычные нефелометры не могут быть использованы.

Инструментальная оценка прозрачности и опалесценции является более селективным методом, который не зависит от остроты зрения аналитика. Числовые результаты более наглядны для мониторинга качества и контроля процесса, особенно в проверке стабильности при хранении. Например, предварительные числовые данные по стабильности могут быть использованы для определения возможности того, что данная партия лекарственного препарата или фармацевтической субстанции превысит предельное значение для срока годности до окончания срока хранения.

НЕФЕЛОМЕТРИЯ

При просматривании суспензии под определенным углом к направлению падающего света система кажется мутной вследствие отражения света от частичек суспензии (эффект Тиндаля). Определенная часть светового луча, попадающего в мутную жидкость, проходит через нее, другая часть поглощается, а оставшаяся часть рассеивается суспендированными частицами. Если измерение проводят под углом 90° к падающему лучу света, рассеянный суспендированными частицами свет может быть использован для определения их концентрации, обусловленной количеством и размерами частиц, влияющих на константу остаточного рассеяния. Суспензия сравнения должна иметь постоянную степень мутности, а испытуемый образец и суспензии сравнения должны быть приготовлены в идентичных условиях. Эффект Тиндаля зависит и от числа частиц, и от их размеров. Нефелометрические данные более достоверны при низкой мутности суспензий, когда наблюдается линейная зависимость между значением нефелометрической единицы мутности (*NTU*) и относительным сигналом детектора. При возрастании степени мутности падающий свет попадает не на все частицы, а рассеянное излучение других частиц поглощается на пути к детектору. Максимальное нефелометрическое значение, при котором может быть проведено достоверное измерение, находится в диапазоне 1750—2000 *NTU*. Для подтверждения линейности необходимо построение калибровочного графика как минимум по четырем концентрациям.

ТУРБИДИМЕТРИЯ

Мутность — это оптическое свойство, возникающее при взаимодействии между светом и суспендированными в жидкости частицами. Это определение оптического свойства, обуславливающего то, что падающий свет в большей степени рассеивается или поглощается, чем проходит через испытуемый образец по прямой. Количество твердых частиц в суспензии может быть определено с помощью измерения интенсивности прошедшего света. Линейная зависимость между мутностью и концентрацией наблюдается в случае однородности и гомогенности размера частиц в суспензии. Это справедливо только для очень разведенных суспензий, содержащих маленькие частицы. Для подтверждения линейности необходимо построение калибровочного графика как минимум по четырем концентрациям.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ТУРБИДИМЕТРИЯ

В относительной турбидиметрии находят отношение интенсивности прошедшего света к интенсивности рассеянного света под углом 90° . Проведение такого испытания компенсирует влияние окрашивания испытуемого образца. Этого эффекта можно добиться также за счет использования инфракрасного светоиспускающего диода при длине волны 860 нм. Фотодиодные детекторы прибора получают и измеряют интенсивность рассеянного света под углом 90° , а также интенсивность рассеяния в прямом направлении (отраженный свет) перед

испытуемым образцом и интенсивность света, прошедшего через испытуемый образец. Измеренные результаты в единицах *NTU* (отношение) рассчитываются делением интенсивности рассеянного света под углом 90° на сумму интенсивности рассеяния в прямом направлении и интенсивности прошедшего света. В относительной турбидиметрии влияние постороннего света становится незначительным. Нефелометры используют для измерения степени мутности бесцветных жидкостей.

Определение степени мутности суспензий сравнения I—IV с помощью относительной турбидиметрии показало, что зависимость между концентрациями и измеренными значениями *NTU* является линейной (см. таблицу 2.2.1.-2). Суспензии сравнения I—IV могут быть использованы для калибровки прибора.

Таблица 2.2.1.-2

Значения опалесценции для различных суспензий формазина.

Суспензия формазина	Значение опалесценции (<i>NTU</i>)
Суспензия сравнения I	3
Суспензия сравнения II	6
Суспензия сравнения III	18
Суспензия сравнения IV	30
Стандарт опалесценции	60
Первичная опалесцирующая суспензия	4000

ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПАЛЕСЦЕНЦИИ

Требования, приведенные в частных фармакопейных статьях, указаны в терминах для визуального определения степени мутности в сравнении с конкретной суспензией сравнения. Может быть использован также и инструментальный метод определения степени мутности при условии, что прибор соответствует требованиям, указанным ниже, и если проведена калибровка с использованием суспензий сравнения I—IV и *воды Р* или используемого растворителя.

Прибор. В качестве источников света в приборах для относительной турбидиметрии или нефелометрах, использующих соотношение выбранных сигналов, используют вольфрамовую лампу со спектральной чувствительностью около 550 нм и с цветовой температурой 2700 К, или инфракрасный светоиспускающий диод, имеющий максимум испускания при 860 нм со спектральной полосой пропускания 60 нм. Могут использоваться и другие подходящие источники света. В качестве детекторов, записывающих изменения в рассеянии или пропускании света испытуемым образцом, обычно используют кремниевые фотодиоды и фотоумножители. Рассеянный свет под углом (90±2,5)° регистрируется первичным детектором. Остальные детекторы регистрируют интенсивность рассеяния в прямом и в обратном направлениях. Используемые приборы калибруют с использованием стандартов с известной степенью мутности; кроме этого, приборы должны быть способны к автоматическому определению степени мутности. Результаты испытания, выраженные в *NTU*, считываются непосредственно с дисплея прибора и сравниваются со спецификацией, приведенной в частной фармакопейной статье.

Прибор считают пригодным, если он соответствует следующим техническим условиям.

– *Единицы измерения: NTU.* *NTU* основана на мутности первичного стандартного образца формазина. Также могут использоваться *FTU* (*Formazin Turbidity Units* — единицы мутности по формазину) или *FNU* (*FormazinNephelometryUnits* — формазинные нефелометрические единицы),

которые эквивалентны *NTU* при низких значениях (до 40 *NTU*). Эти единицы используются во всех трех инструментальных методах (нефелометрия, турбидиметрия и относительная турбидиметрия).

– *Диапазон измерений*: от 0,01 *NTU* до 1100 *NTU*.

– *Разрешение*: 0,01 *NTU* в диапазоне (0—10) *NTU*; 0,1 *NTU* в диапазоне (10—100) *NTU*; 1 *NTU* в диапазоне более 100 *NTU*. Прибор калибруют и контролируют с использованием суспензий сравнения формазина.

– *Точность*: в диапазоне (0—10) *NTU*: $\pm(2\% \text{ от показания прибора} + 0,01) \text{ NTU}$; в диапазоне (10—1000) *NTU*: $\pm 5\%$.

– *Повторяемость*: в диапазоне 1—10 *NTU*: $\pm 0,01 \text{ NTU}$; в диапазоне (10—1000) *NTU*: $\pm 2\%$ от измеренного значения.

– *Калибровка*: используют 4 суспензии сравнения формазина в интересующем диапазоне. Могут быть использованы стандартные образцы, описанные выше, или подходящие стандартные образцы, откалиброванные по первичным суспензиям сравнения.

– *Посторонний свет*: посторонний свет является существенным источником ошибок при низких значениях турбидиметрических измерений; посторонний свет попадает на оптическую систему детектора, но приходит не от испытуемого образца; менее 0,15 *NTU* в диапазоне (0—10) *NTU*, менее 0,5 *NTU* в диапазоне (10—1000) *NTU*.

Приборы, отвечающие требованиям, указанным выше, и поверенные с использованием суспензий сравнения, описанных в разделе «Визуальный метод», могут быть использованы для подтверждения соответствия требованиям частной фармакопейной статьи вместо визуального определения.

Могут быть использованы приборы с характеристиками (диапазоном измерения, разрешением, точностью, повторяемостью), отличными от указанных выше, при условии, что они полностью валидированы и подходят для предполагаемого использования. Для отдельных испытуемых фармацевтических субстанций/лекарственных препаратов для подтверждения возможности использования также должна быть валидирована методика испытания. Прибор и методология не должны противоречить свойствам испытуемого образца.