**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Определение дзета-потенциала методом электрофоретического рассеяния света** |  | **ОФС.1.1.1.0005** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Дзета-потенциал представляет собой параметр, используемый для характеристики физической стабильности дисперсных систем с жидкой дисперсионной средой ‒ суспензий, эмульсий, коллоидных растворов и др.

Дзета-потенциал или электрокинетический потенциал, обозначаемый греческой буквой ζ (отсюда и название), ‒ это разность между электрическими потенциалами на поверхности скольжения и в основном объёме жидкости. Под поверхностью (плоскостью) скольжения подразумевают абстрактную, воображаемую поверхность вблизи границы раздела между дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой, где становится заметным движение (скольжение) жидкости относительно поверхности этой границы.

Дзета-потенциал определяют косвенно на основании экспериментально полученных данных какого-либо электрокинетического явления ‒ электрофоретического, электроосмотического, электроакустического и др. В случае использования явлений электрофореза измеряют значение электрофоретической подвижности, например, оптическими методами, такими как микроскопия (микроэлектрофорез) или рассеяние света (электрофоретическое рассеяние света).

В настоящей общей фармакопейной статье приведено определение дзета-потенциала посредством измерения электрофоретической подвижности дисперсных, в том числе коллоидных систем, методом электрофоретического рассеяния света.

**Область применения**

Определение дзета-потенциала методом электрофоретического рассеяния света может быть применено для исследования и характеристик физической стабильности дисперсных систем (например, суспензий и эмульсий), используемых в фармацевтической практике. Физическая нестабильность суспензий может привести лекарственные препараты к флокуляции, осаждению, нестабильность эмульсий ‒ к разрушению, разделению фаз, кроме того флокуляция также может повлиять на внешний вид, эффективность, биодоступность лекарственных препаратов. Метод широко используется для характеристики коллоидных систем, где важно контролировать их стабильность, например, изучение возможности флокуляции субмикронных материалов, взвешенных в жидкости. Также определение дзета-потенциала может проводится на этапе фармацевтической разработки составов лекарственных препаратов в виде дисперсных систем для оценки путей деградации и характеристики выбранных композиционных вариантов.

**Принцип метода**

В жидкой дисперсионной среде частицы дисперсной фазы участвуют в броуновском хаотическом движении, а приложение электрического поля вызывает их направленное перемещение. На поверхности частиц дисперсной фазы (на границе раздела «частица-жидкость») возникает двойной электрический слой. На поверхности частицы закрепляется слой ионов определенного знака, равномерно распределённый по поверхности и создающий на ней поверхностный заряд (потенциалопределяющие ионы). К этому слою из жидкой дисперсионной среды притягиваются ионы противоположного знака (противоионы). Слой противоионов состоит из плотного адсорбционного слоя, прочно связанного с частицей и движущегося вместе с ней, и диффузного слоя, который связан менее прочно и при движении частицы отрывается от неё. Граница между адсорбционным и диффузионным слоями называется поверхностью скольжения. Электрический потенциал, возникающий на поверхности скольжения за счёт взаимодействия частицы и дисперсной среды, называется электрокинетическим или дзета-потенциалом. Дзета-потенциал – основной показатель стабильности коллоидных систем в жидких средах. Чем больше дзета-потенциал, тем устойчивее коллоидная система. Значение дзета-потенциала, равное 30 мВ, характерное значение для условного разделения низко-заряженных поверхностей и высоко-заряженных поверхностей.

В основу измерения дзета-потенциала частиц дисперсной фазы в жидких дисперсионных системах методом электрофоретического рассеяния положено явление электрофореза, то есть направленного движения заряженных частиц, взвешенных в жидкости, под действием электрического поля. Репрезентативный образец, диспергированный в подходящей дисперсионной среде, помещают в измерительную ячейку, в которой имеется пара электродов. Эти электроды могут быть расположены либо на концах цилиндрического или прямоугольного капилляра, либо быть выполненными в виде специальной вставки, в которой они находятся на фиксированном расстоянии друг от друга, и погружаются в стандартную кювету или другой сосуд (рис. 1).

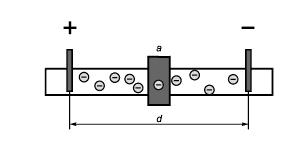


Рисунок 1 ‒ Схема электрофоретической ячейки

*a ‒* область измерения*; d ‒* расстояние между электродами.

На электроды подают известное постоянное напряжение. Между электродами образуется потенциал известной силы, и в результате электрофореза частицы мигрируют к электроду с противоположным зарядом. В случае заряженных стенок капилляров наряду с электрофорезом имеет место электроосмос, то есть течение дисперсионной среды вдоль стенок капилляра. Направление и скорость частиц зависят от знака и значения их заряда. Общее движение частиц в ячейке является суммой скоростей обоих процессов. При этом, время необходимое частицам для достижения равновесной скорости электрофоретического движения после приложения электрического поля, значительно меньше времени, необходимого жидкости для установления равновесного электроосмотического потока. Измеряют скорость движения частиц в системе отсчёта, связанной с ячейкой, а также и направление этого движения частиц. Так как напряжение, приложенное к электродам, и расстояние между ними известны, можно определить электрофоретическую подвижность, по которой затем можно вычислить дзета-потенциал.

Электрофоретическая подвижность (µ) ‒ электрофоретическая скорость, приходящаяся на единицу напряженности электрического поля. Если частицы движутся в направлении более низкого потенциала (к отрицательному электроду) величина электрофоретической подвижности положительная, если в противоположном направлении ‒ отрицательная. Единицы измерения электрофоретической подвижности ‒ м2/В·с.

Для измерения электрофоретической подвижности частиц дисперсионной фазы используют метод электрофоретического рассеяния света ‒ косвенный метод, основанный на измерении допплеровского сдвига, например, с помощью фотоэлектрического детектора (наблюдаемого изменения частоты волны, когда измерительное устройство и источник волны находятся в относительном движении) в рассеянном свете. Частицы, диспергированные в жидкости и находящиеся в электрическом поле, освещаются монохроматическим когерентным световым лучом, как правило, генерируемым лазером. Заряженные частицы движутся либо к катоду, либо к аноду, в зависимости от знака своего заряда. Вследствие этого движения частота и фаза излучения, рассеянного частицами, изменяется в соответствии с эффектом Доплера. По распределению сдвига частоты определяют распределение электрофоретической подвижности. Затем, принимая во внимание вязкость и диэлектрическую проницаемость основной жидкости, электрофоретическая подвижность используется для расчёта дзета-потенциала. Дзета-потенциал выводят из электрофоретической подвижности с использованием функции Генри, для которой может использоваться приближение Смолуховского или Хюккеля, в соответствии с относительной толщиной двойного электрического слоя по сравнению с гидродинамическим радиусом частицы.

**Оборудование**

Измерение дзета-потенциала методом электрофоретического рассеяния света целесообразно проводить при малых углах рассеяния (от 12° до 30°), чтобы минимизировать спектральное уширение лазерных линий вследствие эффекта Доплера.

Для определения дзета-потенциала могут быть применены оптические устройства с использованием опорного излучения, реже ‒ устройства с использованием кросс-корреляции излучения. Определение электрофоретической подвижности частиц осуществляют, используя данные анализа интенсивности или спектра сдвига частоты, поэтому такой метод называют частотным методом анализа (ELS). Метод ELS является основным экспериментальным методом для определения дзета-потенциала дисперсных, в том числе коллоидных систем, имеющих частицы дисперсной фазы от 3,8 нм до 100 мкм.

На рис. 2 представлена схема прибора для определения дзета-потенциала с использованием опорного излучения.

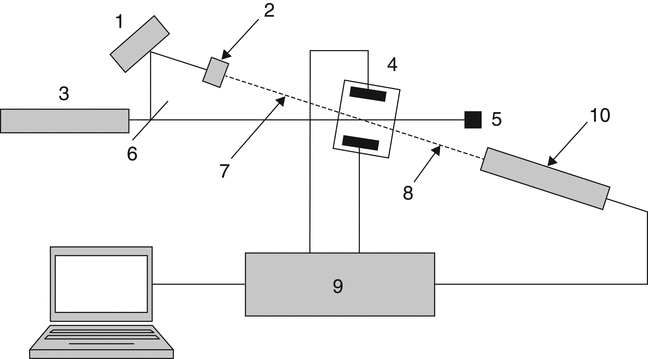


Рисунок 2 ‒ Схема прибора для определения дзета-потенциала с использованием опорного излучения

1 ‒ оптический модулятор; 2 ‒ аттенюатор (ослабитель); 3 ‒ источник излучения (лазер);

4 ‒ ячейка для образца с электродами; 5 ‒ оптический поглотитель;

6 ‒ разделитель луча; 7 ‒ опорное излучение; 8 ‒ рассеянный свет; 9 ‒ процессор;

10 ‒ фотоэлектрический детектор.

Испытуемый образец помещают в ячейку с электродами (4), которая должна быть не только термостатирумой, но и терморегулируемой, так как вязкость, проницаемость, показатель преломления образца зависят от температуры. Между электродами ячейки, расстояние между которыми точно известно, прикладывается напряжение. Излучение лазерного источника (3) известной длины волны при помощи разделителя (6) разделяют на два луча ‒ падающий и опорный. Падающий луч направляют в ячейку с образцом для возбуждения рассеяния. Опорный луч (7) после разделителя проходит через оптический модулятор (1) и аттенюатор (2), в результате частота излучения опорного луча смещается на несколько герц относительно частоты исходного лазерного излучения (3), что позволяет определять знак доплеровского сдвига и измерять его значения, малые по абсолютной величине. Рассеянное излучение (8) и опорный луч совмещают, используя стандартную или волоконную оптику, и регистрируют фотоэлектрическим детектором (10). Сигнал фотоэлектрического детектора передается на модуль обработки сигнала, которым может быть цифровой коррелятор или анализатор спектра. Управление процессом осуществляют, используя компьютерную систему и соответствующее программное обеспечение для обработки полученных данных для вычисления дзета-потенциала.

Прибор для определения дзета-потенциала с использованием кросс-корреляции излучения отличается от приборов с использованием опорного излучения тем, что в них лазерный луч (3) разделяется на два луча равной интенсивности, частоты которых изменяются. Лучи пересекаются и входят в образец через одну и ту же стенку ячейки. Фотоэлектрический детектор в приборе расположен за противоположной стенкой ячейки, между двумя лучами. Рассеивание от каждой частицы является результатом воздействия излучения под разными углами. Доплеровский сдвиг вследствие рассеяния света зависит только от угла пересечения лучей.

Обычно доплеровские сдвиги, возникающие во время электрофореза, довольно малы (от нескольких герц до нескольких сотен герц) и не могут быть измерены напрямую. Для решения этой проблемы используют интерферометры, которые объединяют свет, сдвинутый по частоте образцом, с опорным лучом. В результате интерференции луча рассеянного света и опорного луча возникает биение. Частота биений – это разность частот между двумя нижележащими лучами, которая представляет собой доплеровский сдвиг, вызванный частицами.

Однако простой интерферометр не может определить знак доплеровского сдвига и, следовательно, не может определить знак дзета-потенциала. Измеренная частота биений всегда положительна, независимо от того, положительный или отрицательный доплеровский сдвиг. Поэтому в современных приборах для измерения дзета-потенциала используют частотный модулятор опорного луча. Этот модулятор вызывает контролируемый доплеровский сдвиг на частоте опорного луча. Это означает, что измеренный доплеровский сдвиг представляет собой сумму доплеровского сдвига, индуцированного модулятором, плюс доплеровский сдвиг, вызванный движением частиц. Таким образом, использование частотного модулятора позволяет определять знак (положительное или отрицательное напряжение) дзета-потенциала.

В тех случаях, когда доплеровский сдвиг очень мал (менее 1 Гц) и метод частотного анализа не имеет достаточного разрешения для определения изменения, можно использовать метод фазового анализа на основе рассеяния света (PALS), называемый также, как амплитудно-взвешенный метод обработки частотной функции. Малые значения доплеровского сдвига имеют место при измерениях дисперсных систем в неполярных растворителях или в водных растворителях с высокой электропроводностью, когда во избежание нагрева образца и возможной его деградации необходимо прикладывать к ячейке слабое электрическое поле.

На рис. 3 представлена схема прибора для определения дзета-потенциала на базе PALS.

Метод PALS основан на измерении разности фаз между опорным и предметным лучами, возникающей за счёт электрофоретического движения частиц, что даёт возможность определять очень малые значения скорости частиц и электрофоретической подвижности, например, частотные сдвиги от 0,002 Гц. Метод PALS позволяет вычислить только среднее значение электрофоретической подвижности и дзета-потенциала, но не предоставляет никакой информации о его распределении. Для получения информации о распределении значений показателя объединяют метод PALS и спектральный анализ с быстрой и медленной сменой напряжения.

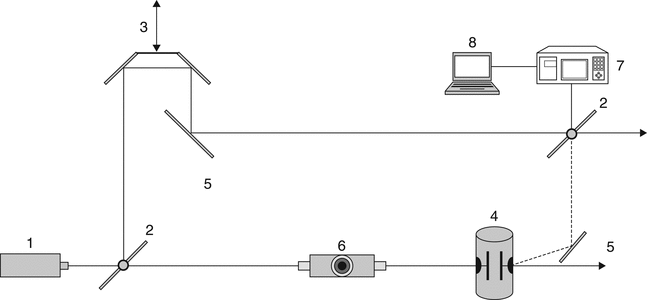


Рисунок 3 ‒ Схема прибора для определения дзета-потенциала на основе PALS

1 ‒ лазер; 2 ‒ разделитель; 3 ‒ пара зеркал; 4 ‒ ячейка образца с электродами;

5 ‒ зеркало; 6 ‒ аттенюатор переменный; 7 ‒ детектор рассеяния; 8 ‒ компьютер.

Оборудование для определения дзета-потенциала должно быть размещено в помещении, в котором отсутствуют электрические помехи, механические вибрации, температурные колебания, защищённом от прямых солнечных лучей и потоков воздуха. Прибор должен быть установлен на твёрдой поверхности, исключающей воздействие вибраций, оптическая система прибора должна быть устойчивой во избежание необходимости частой ее калибровки.

**Проведение измерений**

*Меры предосторожности*. Излучение в приборах, оборудованных лазером, может вызвать повреждение глаз. Поэтому категорически запрещается смотреть на прямое лазерное излучение и его отражение.

Перед проведением измерений необходимо проверить настройки прибора, например, время готовности к работе, требуемый диапазон измерений и положение линзы, угол анализа, температурное равновесие и др.

Во время проведения измерений следует избегать образования пузырьков воздуха, испарения жидкости или появления других неоднородностей в испытуемой дисперсной системе.

*Измерительная ячейка.*Измерительная ячейка в приборах для определения дзета-потенциала выполняет следующие функции:

- удерживает заданный объём испытуемого образца в области воздействия светового излучения;

- обеспечивает приложение к испытуемому образцу заданного напряжения;

- обеспечивает подачу падающего и сбор рассеянного излучения.

Тип ячейки выбирают в зависимости от прибора, она также должна быть совместима с испытуемой дисперсной системой. Перед и после измерений ячейка и электрод должны быть тщательно промыты во избежание искажения результатов измерений. Важен постоянный контроль температуры в ячейке, так как вязкость дисперсной системы зависит от температуры и оказывает существенное влияние на результаты измерений.Предпочтительно, чтобы вязкость дисперсной системы была ниже 10 мПа∙с, то есть чтобы система не отклонялась от ньютоновской жидкости.

Потенциал, приложенный к электродам ячейки, может быть выражен постоянным напряжением, применяемым в течение определённого промежутка времени, до изменения полярности. В случае высокой проводимости дисперсной системы, изменение полярности достигается в течение короткого промежутка времени, при этом возможен усиленный нагрев содержимого ячейки. Поэтому проводимость ячейки должна поддерживаться на уровне, как можно более низком, рекомендуется, чтобы проводимость находилась в пределах 1–5 мСм/см (миллисименс на сантиметр).

*Пробоподготовка.* Испытуемый образец должен представлять собой частицы дисперсной фазы, диспергированные в жидкой дисперсионной среде. Образец не должен содержать крупных частиц или осадка, седиментация которых может произойти непосредственно во время измерения, в результате чего измерение будет невозможным, так как частицы не попадут в луч лазера.

Важно избегать изменения электрофоретической подвижности образца в процессе его подготовки. Используемая для отбора проб и пробоподготовки посуда и инвентарь (пипетки, лопатки, шприцы, мензурки и т.п.) могут иметь поверхности, притягивающие определённые ионы из образца или добавляющие в образец загрязнения, оставшиеся после более ранних процессов очистки. Предпочтительнее использовать одноразовую посуду и инвентарь из полимерных материалов, которые химически совместимы с образцом.

Электрофоретическая подвижность образца, а следовательно и дзета-потенциал, зависит от химических характеристик дисперсионной среды. Важными характеристиками для дисперсионной среды являются значения показателя рН и ионная концентрация, особенно в случае разбавления концентрированных дисперсных систем, поэтому необходимо контролировать значение pH, тип и концентрацию ионов испытуемой дисперсной системы.

*Определение диапазона концентраций дисперсной фазы в образце дисперсной системы.* Для проведения надёжных измерений необходимо, чтобы концентрация дисперсной фазы была приемлемой для установления постоянного дзета-потенциала, то есть установления приемлемого соотношения сигнал-шум детектора. Для достижения этой цели концентрация дисперсной фазы должна превышать определённый уровень, но при этом она не должна приводить к множественному рассеянию и взаимодействию частиц дисперсной фазы, то есть должна быть ниже определённого максимального уровня. На диапазон концентраций влияют ширина лазерного луча, длина пути между электродами, оптические свойства используемых веществ, чувствительность детектора. Для установления подходящего диапазона концентраций для любого конкретного испытуемого образца выполняют измерения при различных концентрациях дисперсной фазы.

*Стабильность испытуемых образцов.* При определении дзета-потенциала учитывают следующие аспекты стабильности испытуемых образцов.

В зависимости от характера испытуемой дисперсной системы электроды в ячейке для образца и сама дисперсная система могут измениться после измерения дзета-потенциала. Поэтому, при повторном использовании того же объёма образца или ячейки для измерения дзета-потенциала данные следует тщательно проверять, чтобы гарантировать приемлемость измерений. Для некоторых дисперсных систем может потребоваться испытание аликвоты вновь приготовленной дисперсной системы для каждого повторного измерения.

Определение дзета-потенциала концентрированной дисперсной системы может потребовать разведение её перед измерением, чтобы снизить концентрацию частиц и избежать артефактов измерения из-за множественного рассеяния или взаимодействия между частицами. В этом случае применяют так называемую равновесную процедуру разбавления, при которой в качестве разбавителя используют ту же дисперсионную среду, что в испытуемом образце, в испытуемом образце в этом случае меняется только один параметр ‒ концентрация частиц. Если разведённая дисперсная система была подготовлена задолго до измерения, то её стабильность должна быть оценена путём измерения дзета-потенциала в течение ожидаемого времени измерения, чтобы гарантировать отсутствие зависимости измеренного дзета-потенциала от времени. Также может быть целесообразно испытание серийных разведений для ограничения ожидаемого целевого коэффициента разведения.

*Повторные измерения.* Количество повторных измерений (с отдельной подготовкой образцов), которые необходимо выполнить, зависит от требуемой прецизионности измерений. Это количество следует устанавливать в зависимости от свойств испытуемой дисперсной системы. Как правило, выполняют три последовательных измерения.

**Анализ данных**

Обработка данных производится с помощью спектрального анализа, автокорреляционной функции и фазового анализа рассеяния света.

*Определение электрофоретической подвижности*. Отношение между доплеровским сдвигом частоты рассеянного света (Δω) в приложенном электрическом поле (E) и электрофоретической подвижностью частиц (µ) зависит от оптического устройства прибора. Для оптических устройств с использованием опорного излучения электрофоретическую подвижность вычисляют по формуле (1), для приборов, основанных на методе кросс-корреляции излучения *‒* по формуле (2).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | (1) |
|  |  | (2) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | Δω | *‒* | доплеровский сдвиг частоты; |
|  | λ | *‒* | длина волны лазерного излучения в вакууме; |
|  | n | *‒* | показатель преломления среды (или основной жидкости); |
|  | E | *‒* | напряженность электрического поля; |
|  | θ | *‒* | угол между падающим на ячейку и рассеянным светом; |
|  | ξ | *‒* | угол между рассеянным светом и направлением электрического поля; |
|  | θ' | *‒* | угол между двумя лучами. |

### *Определение дзета-потенциала.* Для непроводящих сфер дзета-потенциал (ζ) обычно вычисляют с использованием расширенного уравнения Генри, описывающего зависимость между дзета-потенциалом и электрофоретической подвижностью (формула 3):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | μ = f (κα), | (3) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | ε | *‒* | средняя диэлектрическая проницаемость среды (или основной жидкости); |
|  | η0 | *‒* | средняя вязкость среды (или основной жидкости); |
|  | κ | *‒* | обратная величина толщины двойного слоя Дебая; |
|  | α | *‒* | радиус сферы; |
|  | ƒ(κα) | *‒* | монотонная функция, изменяющаяся от ƒ(κα) = 1, как κα → 0, до ƒ(κα) = 3/2, как κα → ∞ |

Большинство дисперсных сред являются полидисперсными, имеющими различные значения *(κα),* поэтому получение полного распределения дзета-потенциала является сложной задачей.

Если *κα >> 1*, что типично для крупных частиц в водных суспензиях (гидродинамический радиус велик по сравнению с толщиной электрического двойного слоя), *ƒ(κα)* принимает значение 3/2 в формуле (3). Это приводит к уравнению Смолуховского (уравнение 4):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | (4) |

*При κα << 1*, что типично для мелких частиц в органических жидкостях (гидродинамический радиус мал по сравнению с толщиной электрического двойного слоя), *ƒ(κα)* принимает значение 1 в формуле (3). Это приводит к уравнению Хюккеля (уравнение 5):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | (5) |

Таким образом, в зависимости от природы частиц и дисперсионной среды дзета-потенциал *(ζ)* вычисляют по электрофоретической подвижности *(µ)* с использованием либо уравнения Смолуховского (уравнение 4), либо уравнения Хюккеля (уравнение 5).

**Интерпретация результатов**

Дзета-потенциал, выраженный в единицах милливольт (мВ), в основном используют для характеристики физической стабильности дисперсных систем. В целом, увеличение значения дзета-потенциала ведёт к повышению стабильности суспензии, а его уменьшение – к снижению стабильности. Несмотря на то, что об изменении относительной устойчивости дисперсной системы можно судить по изменению величины дзета-потенциала, прямой связи между дзета-потенциалом и абсолютной стабильностью нет. Кроме того, для того чтобы сделать общие выводы относительно стабильности различных дисперсных систем, может потребоваться многократное определение различных образцов или их партий.

Данные, полученные при определении дзета-потенциала, сочетают с другими методами количественной или качественной характеристики для мониторинга и характеристики стабильности дисперсных систем, такими как мониторинг внешнего вида или мутности с течением времени.

Дзета-потенциал также зависит от состава дисперсной системы. Как правило, не существует чёткого значения дзета-потенциала, которое можно было бы использовать в качестве порога стабильности.

Дзета-потенциал является характеристикой всей дисперсной системы, а не только частиц дисперсной фазы, поэтому его определение зависит не только от частиц дисперсной фазы, но и от жидкой дисперсионной среды с различными ионами или химическими веществами, присутствующими в равновесии. Если не соблюдать осторожность, выполнение многократных разведений дисперсионной среды при определении может изменить эту среду и изменить значение дзета-потенциала. Важно также отметить, что поскольку измерение опирается на миграцию частиц в электрическом поле, выполнение повторных измерений (не менее 3–5 в зависимости от образца) на одной и той же аликвоте может вызвать сдвиг дзета-потенциала. Изменение дзета-потенциала дисперсной системы может также изменять наблюдаемый гидродинамический диаметр частиц за счёт динамического рассеяния света.