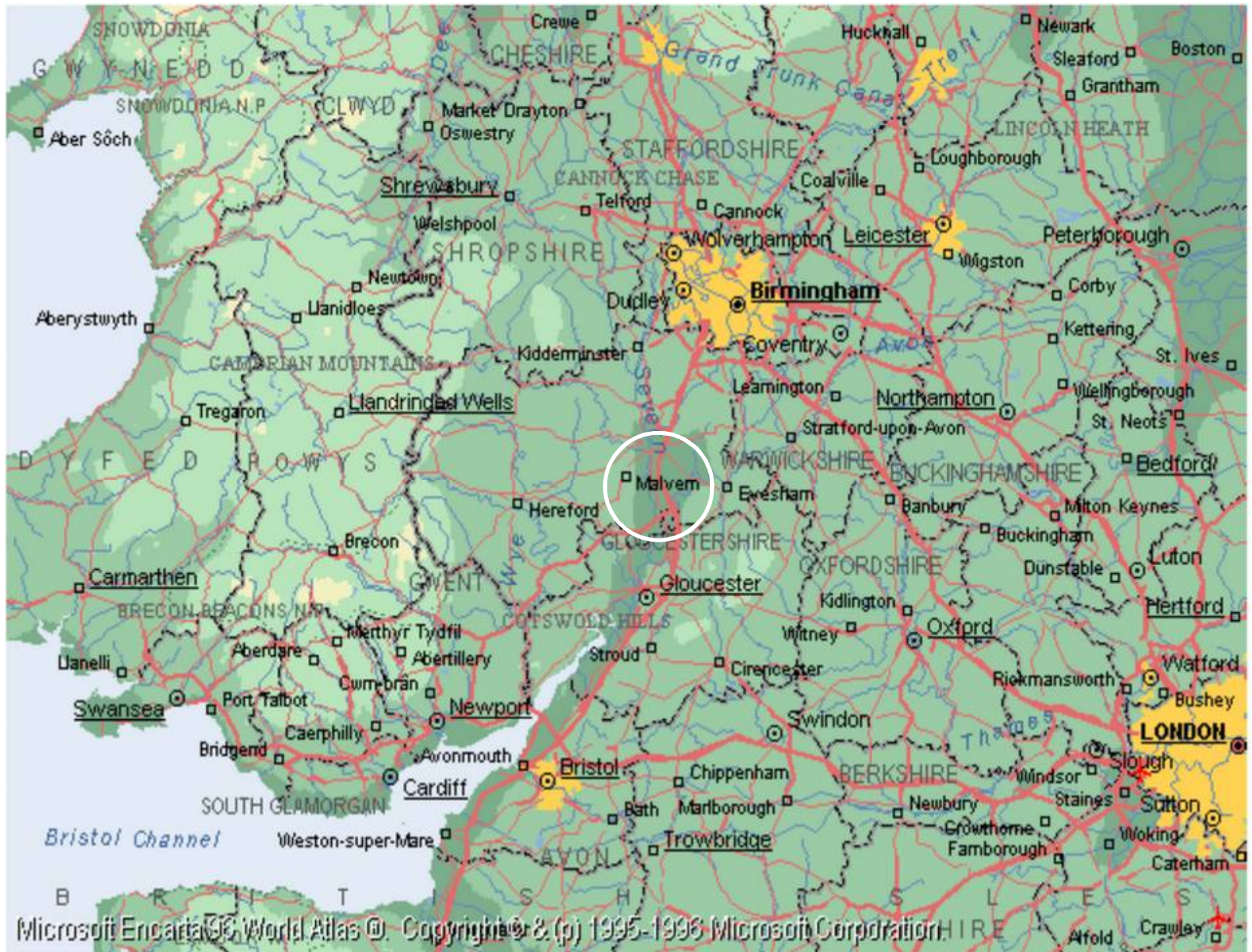


# Malvern

## Zetasizer Nano 系列: 培训课程





# Malvern Instruments Ltd. UK



PANalytical

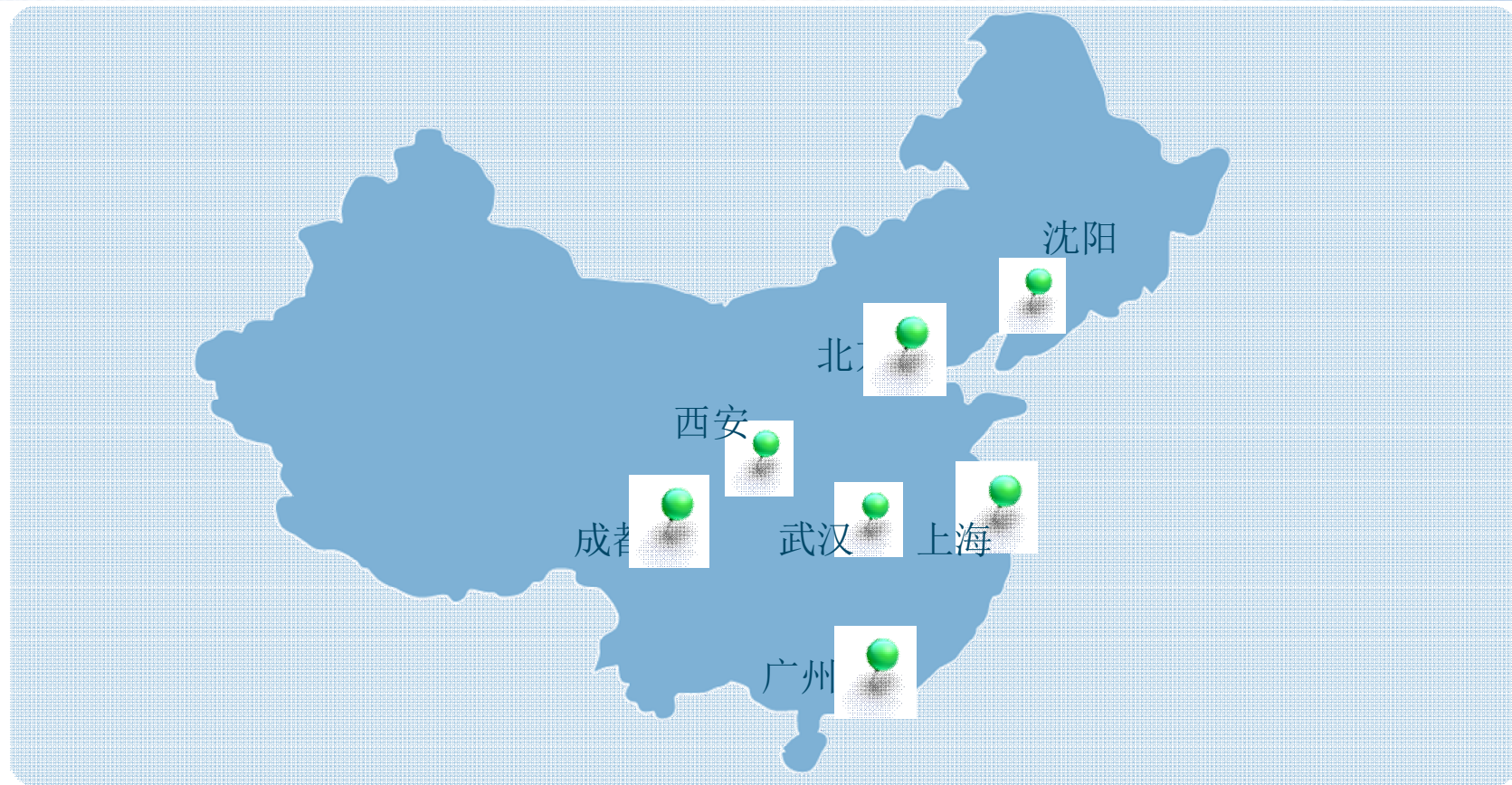
A large version of the Malvern logo, featuring the green mountain icon above the word 'Malvern' in a bold, black, sans-serif font.

# 马尔文仪器公司简介



- 马尔文仪器是一家英国公司，专注于设计和制造精确的测量仪器，应用于
  - 颗粒尺寸及其分布
  - 颗粒的电荷，**Zeta**电位
  - 粒度和粒形表征
  - 分子量
  - 分子构型
  - 分散体系的流体力学性质
  - 流变性能
  - **MicroCal**热稳定分析

# 马尔文中国的主要分支机构



# 马尔文中国的主要分支机构



- 7个办公室
- 上海（销售，维修，应用，市场）
- 北京（销售，维修，应用）
- 广州（销售，维修，应用）
- 成都（销售，维修）
- 西安（销售，维修）
- 武汉（销售，维修）
- 沈阳（维修）

# 马尔文中国的主要分支机构

- 三个应用实验室
- **上海**
  - 粒度和粒形表征
  - 流变性能表征
  - 分子量及分子构型
  - 生命科学实验室
- **北京**
  - 粒度，流变性能和分子量及分子构型表征
- **广州**
  - 粒度表征

# 马尔文中国的主要分支机构



- 上海应用实验室



# 马尔文中国的主要分支机构



## ■ 北京应用实验室



## ■ 广州应用实验室



# 培训内容

- 动态光散射（第一天）
  - 测量原理
  - 由相关曲线得到粒径信息 – 运算法则
  - **Nano** 系列中的优化测量位置
  - 样品要求
  - 样品制备
  - 数据解释
- 静态光散射及分子量的测定（第一天）
- **Zeta** 电位 测量原理（第二天）

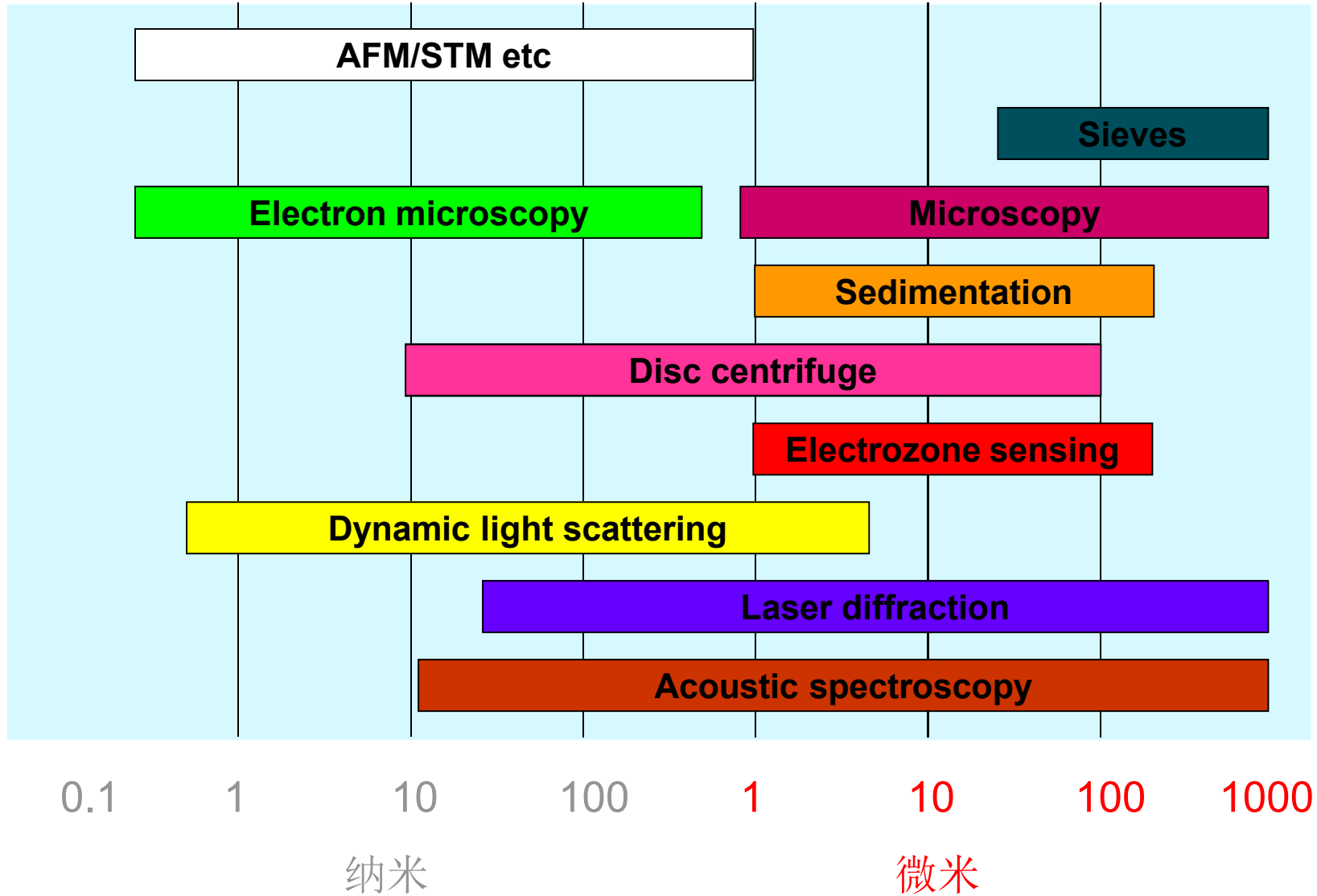
Malvern

# 动态光散射 Dynamic Light Scattering

测试原理

Measurement Principle

# 为什么选择DLS?



## 动态光散射的特点:

- 上亿个粒子的统计学效果，使得对粒径及其分布的测量更加准确
- 对微量存在的大颗粒极其敏感
- 在溶液状态下测量颗粒的尺寸
- 测试速度快，所需样品少
- 需要溶液的粘度和折光指数等光学参数
- 所得到的尺寸分布正比于不同种类颗粒对光强的贡献率

## 测试所需参数较少

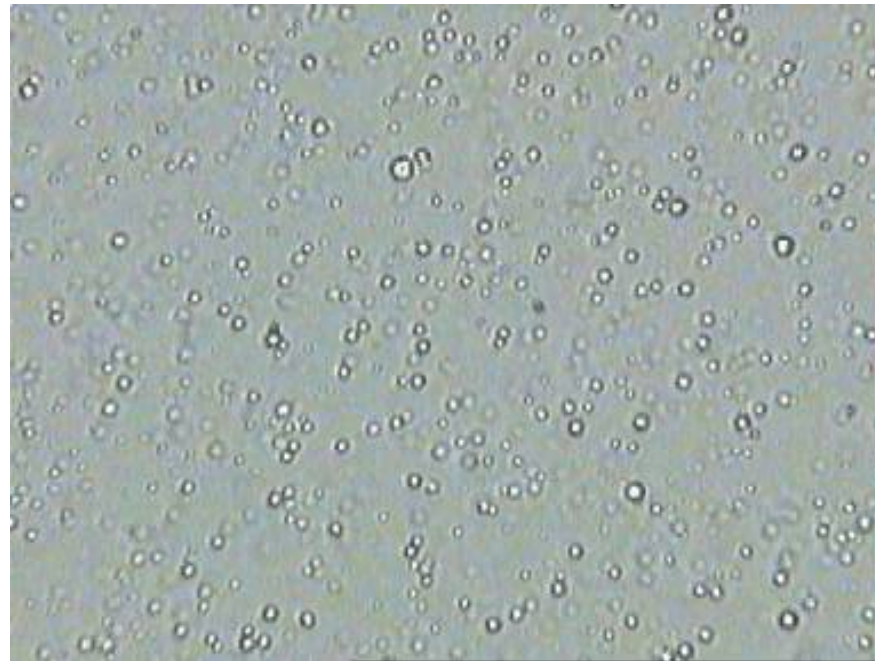
- 对于平均粒径和多分散指数
  - 温度
  - 溶剂的粘度和折光指数（温度依赖性）
  
- 对于粒径的体积和数量分布
  - 米氏理论计算需要：
    - 样品的折光指数
    - 样品的吸收率

## Zetasizer Nano是如何测试粒子的粒径的？

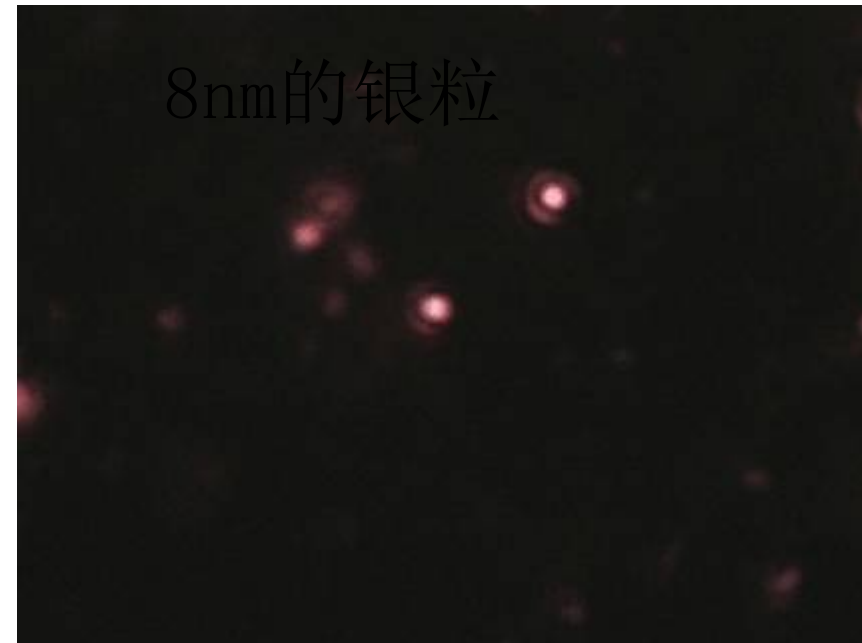
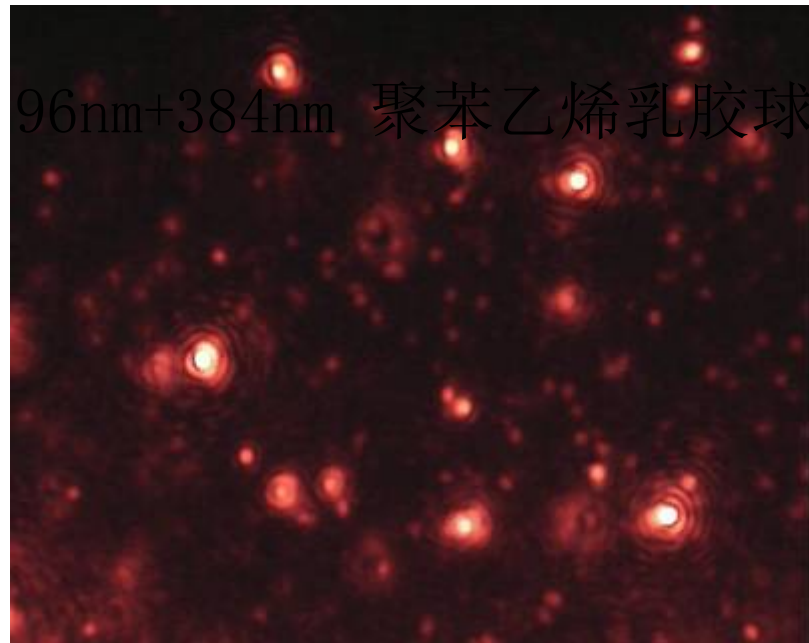
- 动态光散射Dynamic Light Scattering (DLS)，也称光子相关光谱Photon Correlation Spectroscopy (PCS)，准弹性光散射quasi-elastic scattering，测量光强的波动随时间的变化
- 粒子的**布朗运动Brownian motion**导致光强的波动
- 光子相关器correlator将光强的波动转化为**相关方程**
- 相关方程检测光强波动的速度，从而我们得到粒子的**扩散速度信息**和**粒子的粒径d(h)**
- 从相关方程我们还可以得到**尺寸分布**信息

# 动态光散射及布朗运动

- 微小粒子在悬浮溶液中的随意运动
- 布朗运动的速度依赖于
  - 粒子的大小
  - 介质的粘度



布朗运动：由于受到周围溶剂分子的碰撞，颗粒产生随机运动



# 布朗运动

- 因为分子的运动与温度有关，进而与液体的粘度有关，所以必须知道样品的温度
- 温度必须是均匀并且保持稳定，否则由于液体的对流,沉降及其他运动会干扰样品的测量
- 颗粒愈大，其布朗运动越慢，颗粒越小，布朗运动速度越快
- 温度愈高，其布朗运动愈快
- 布朗运动的速度是由扩散系数(D)来表示的

# STOKES-EINSTEIN EQUATION

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d(h)}$$

这里

$d(h)$  为流体力学直径

$k_B$  为波尔兹曼常数

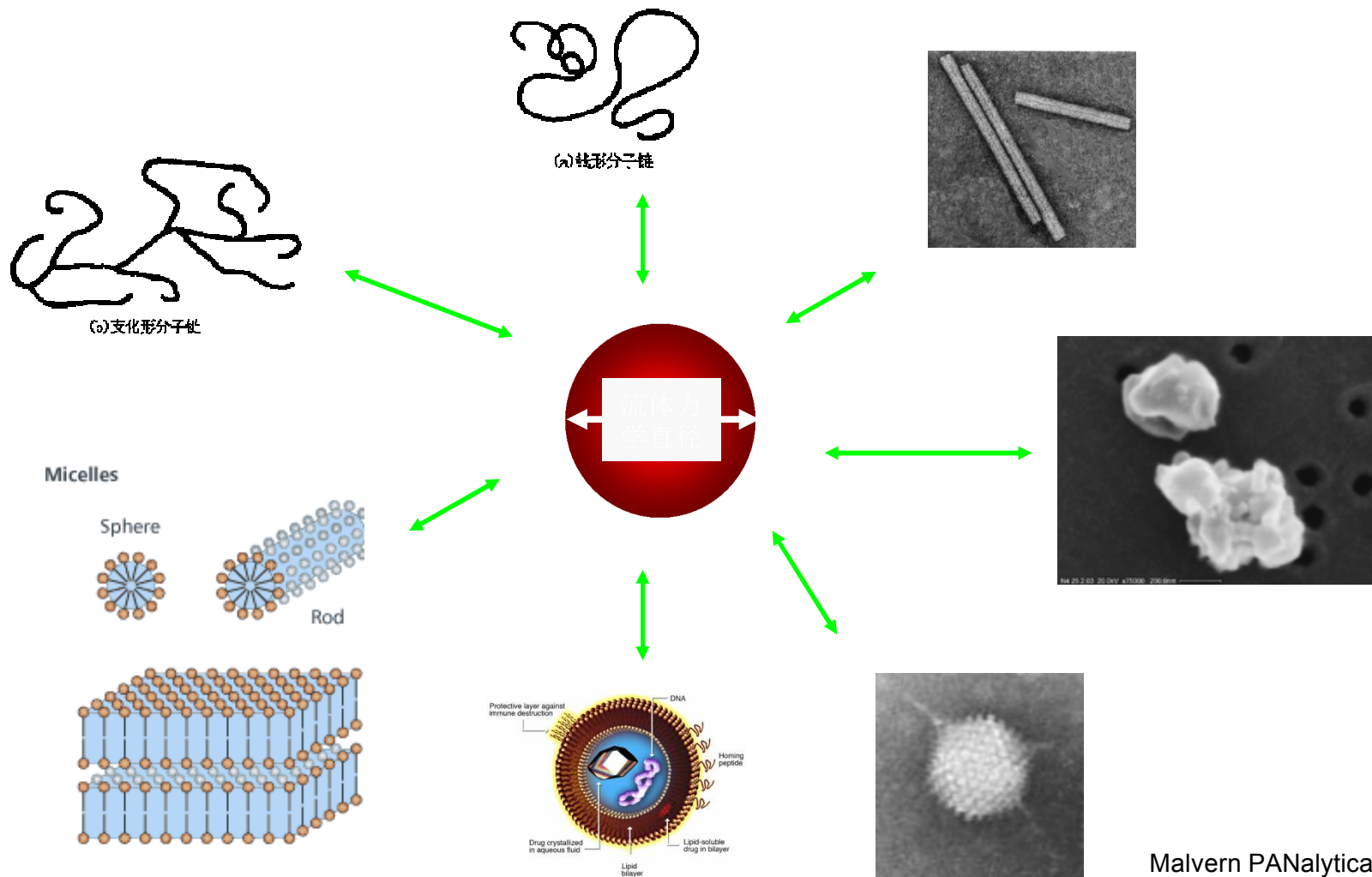
$T$  为绝对温度

$\eta$  为粘度

$D$  为扩散系数

# 动态光散射实际测量的是什么？

- 流体学直径



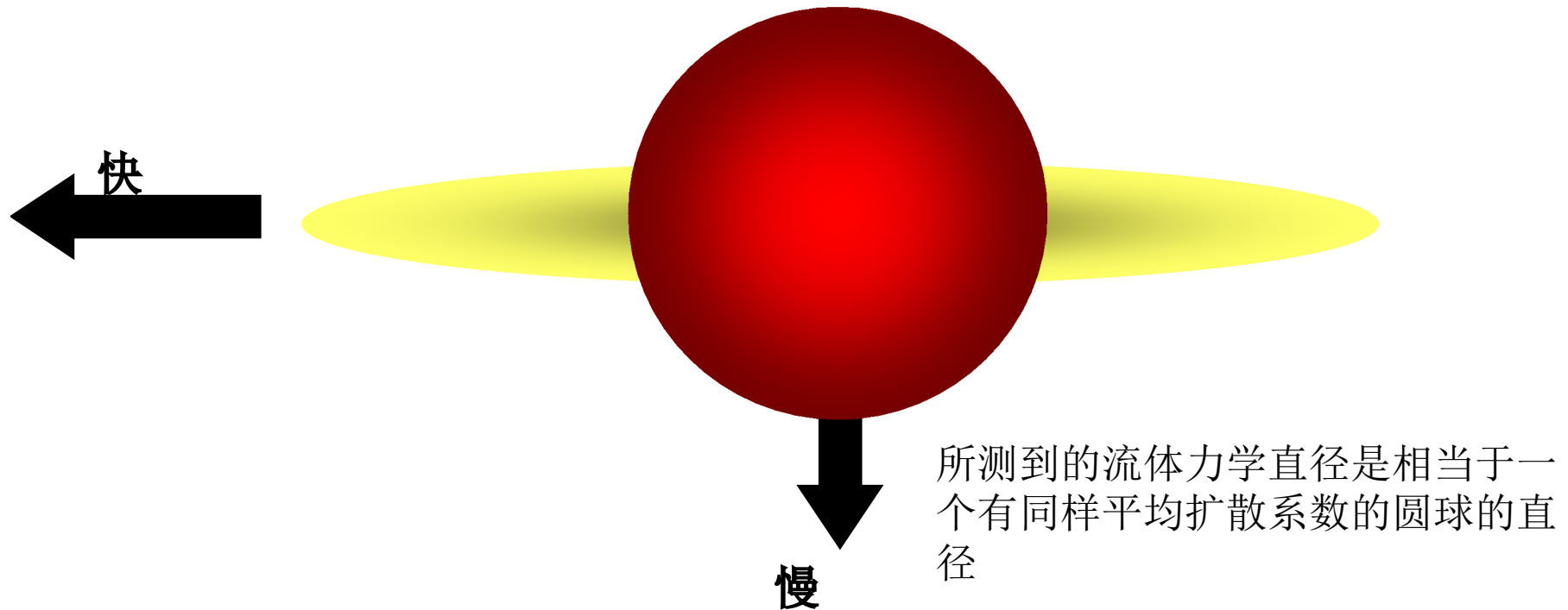
# 流体力学直径



- 用DLS所测到的是与颗粒在液体内运动有关的颗粒大小
- 称为流体力学直径
- 是与在同样条件下有相同扩散系数的圆球等效的直径

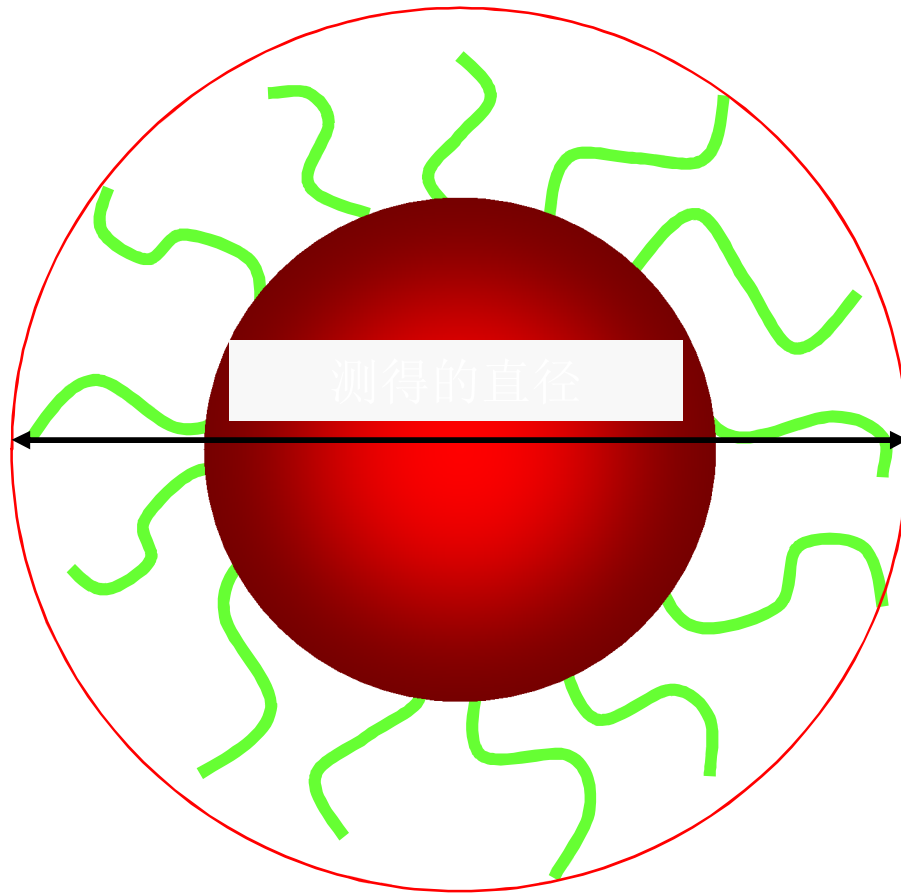
# 非球状颗粒

等效球



## 动态光散射实际测量的是什么？

- 流体力学直径



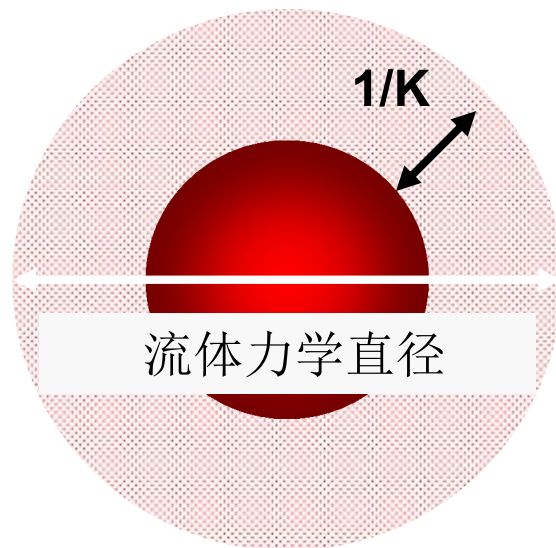
表面上枝接的一层分子将会降低扩散速度

因此，流体力学直径将会受到表面结构的影响

# 离子强度的影响

- $1/K$ , Debye 长度是带电颗粒双电层的厚度, 他取决于介质中的离子浓度

在较低离子强度 (如蒸馏水中)双电层是展开的



在较高离子强度(如高于10mM盐溶液) 双电层是压缩的

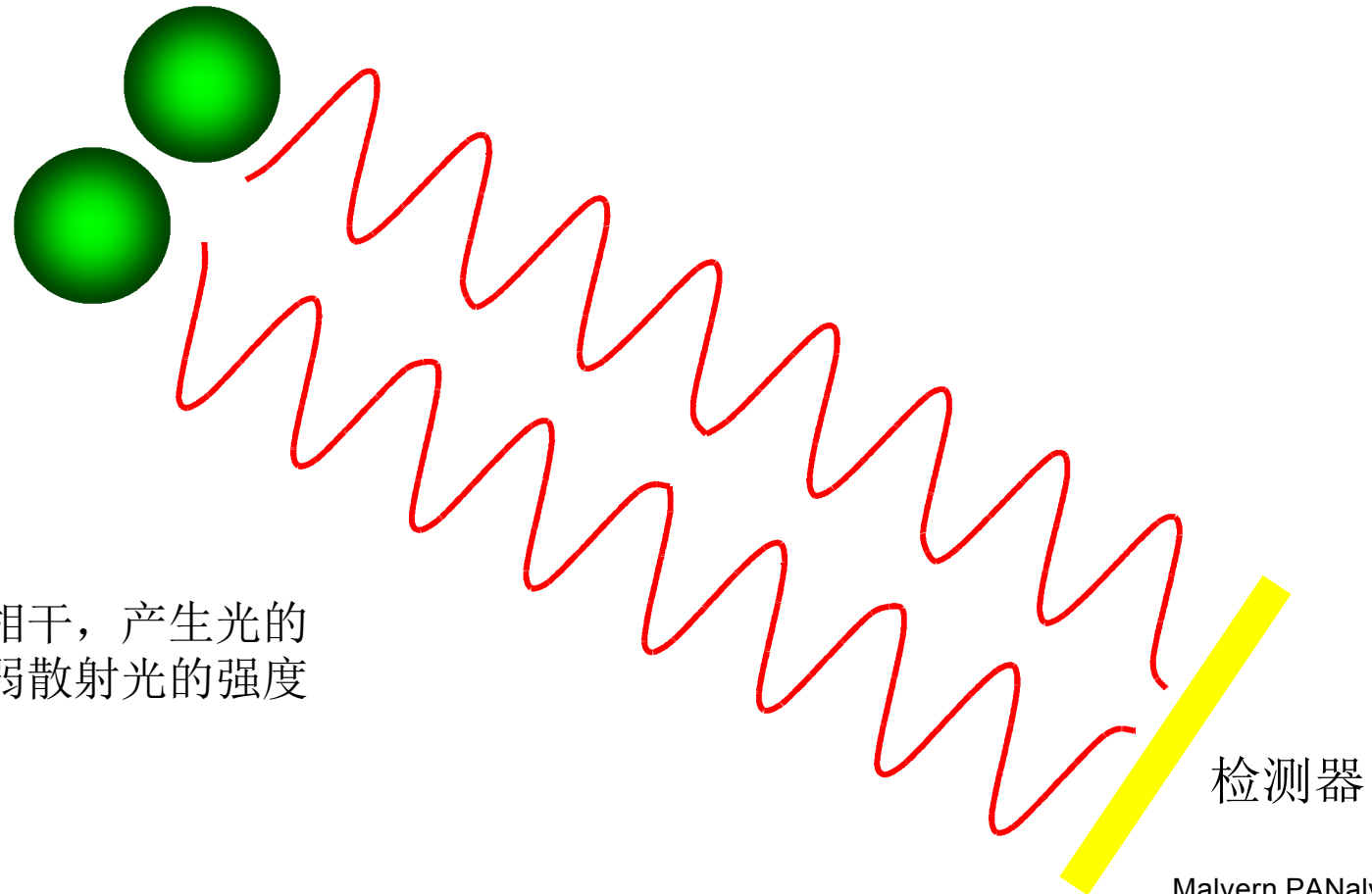


## DLS实验是如何进行的？

- 我们需要测量颗粒的布朗运动速度并根据它得到粒子的大小
- 布朗运动本身是无规则的随机运动，无法直接测量它的速度
- 但布朗运动会造成颗粒散射光强的起伏涨落，根据散射光的起伏涨落可计算扩散速度，从而计算粒度
- 散射光强的起伏涨落是如何产生的呢？

# 布朗运动与散射光

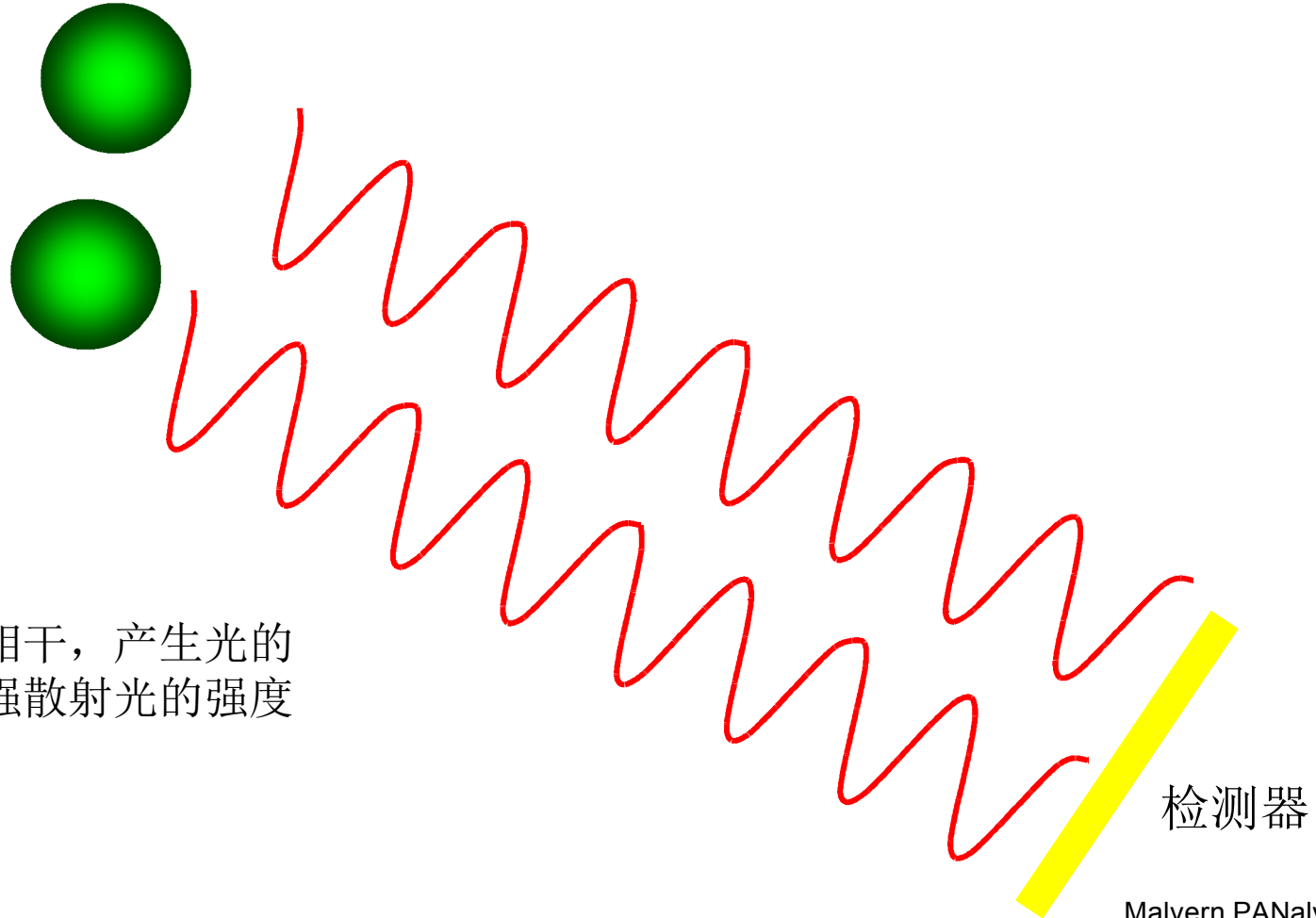
考虑两个静止颗粒



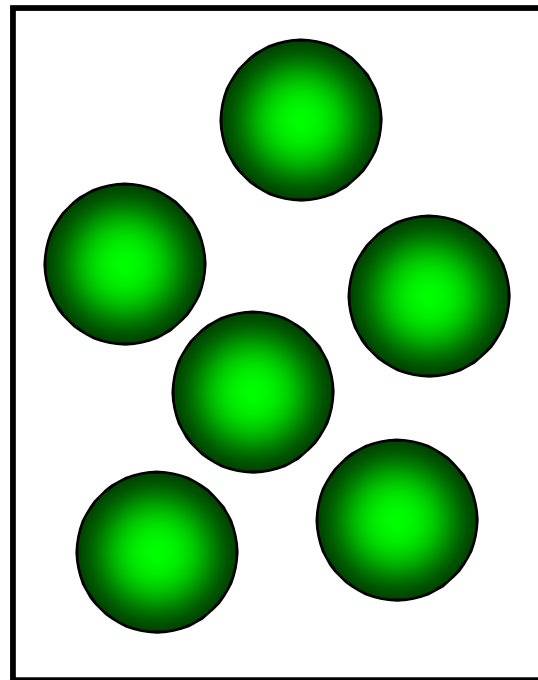
两束光线相干，产生光的相消而减弱散射光的强度

# 布朗运动与散射光

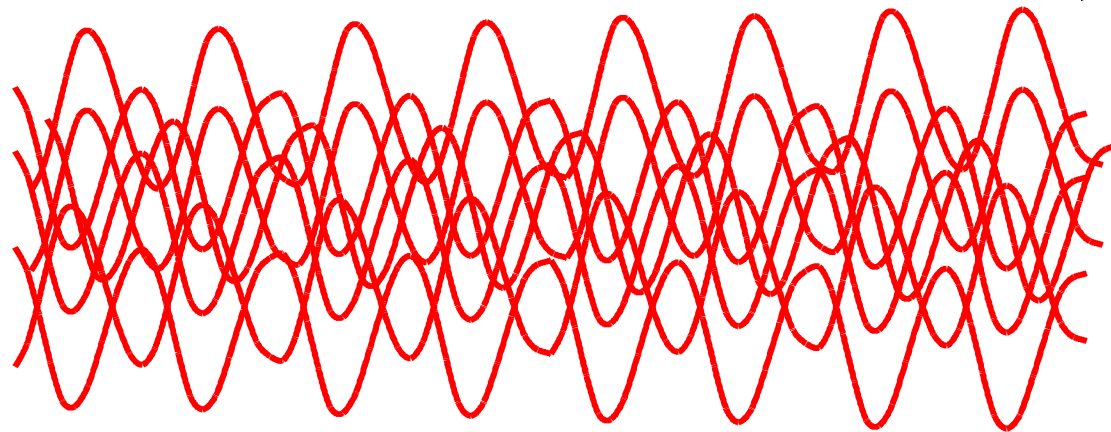
考虑两个静止颗粒



# 布朗运动与散射光



考虑很多颗粒

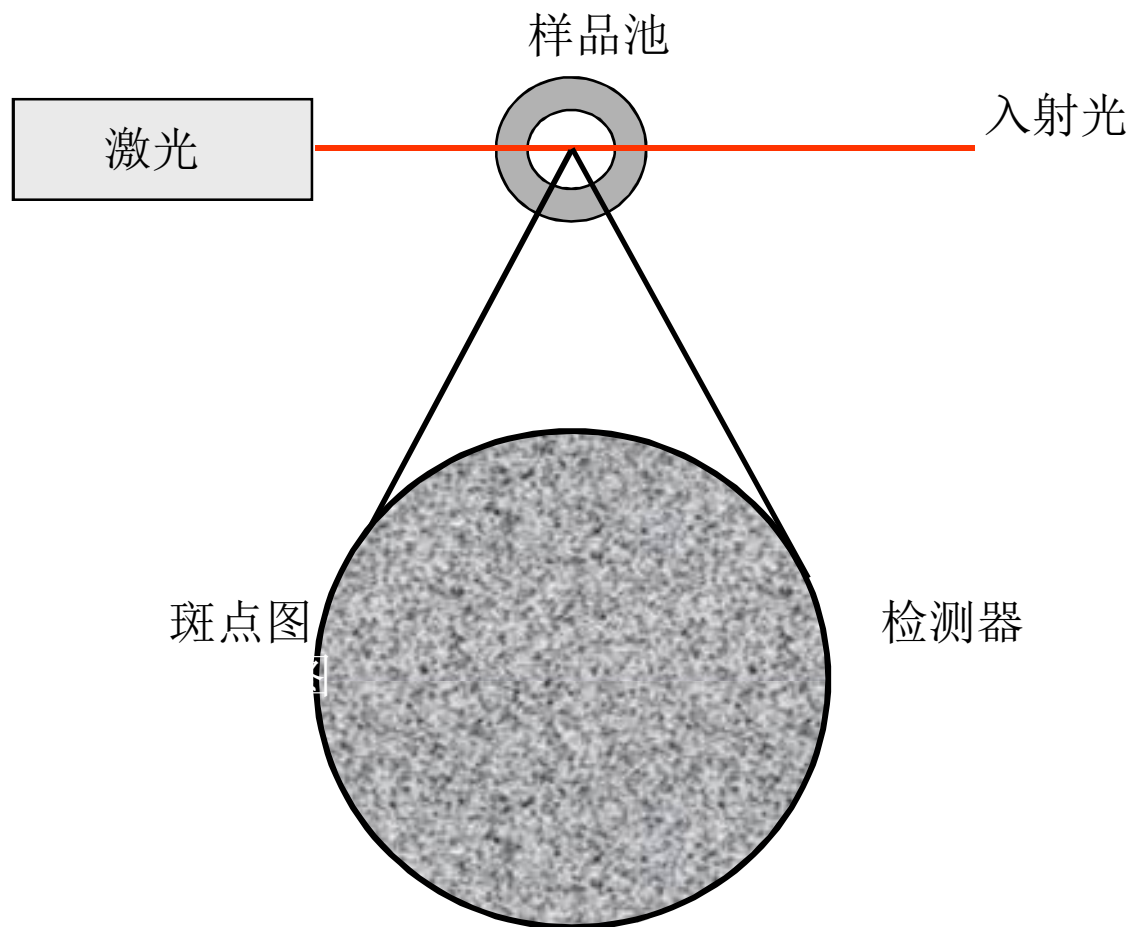


检测器



很多颗粒的散射光相互干扰产生相当复杂的光强度斑点图案

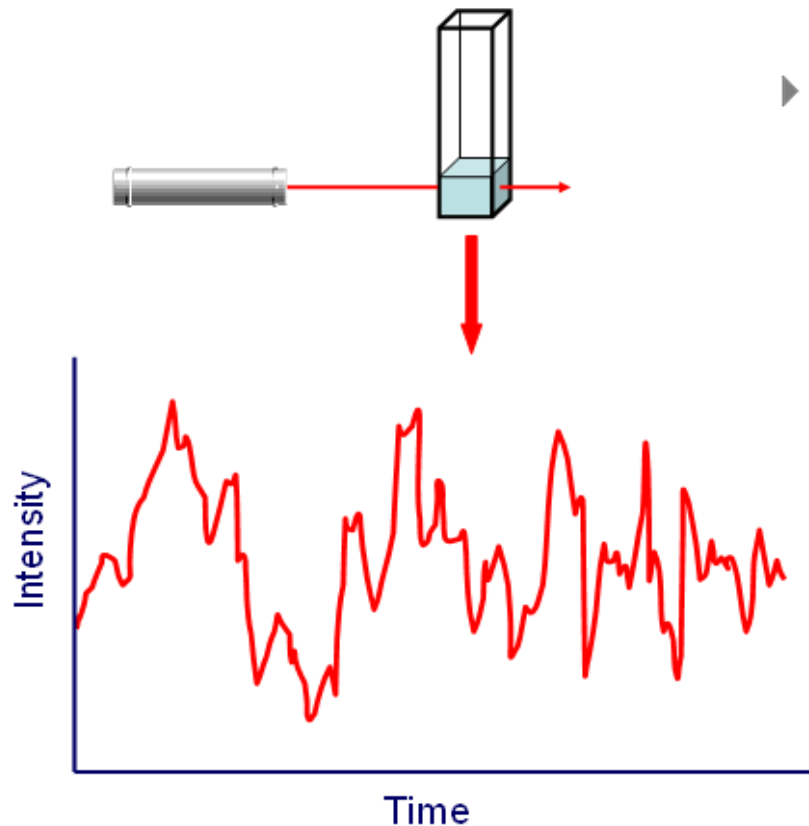
# 散射光斑纹图



## 强度涨落

- 对于具有布朗运动的颗粒体系，可以观察到斑点不停在变的斑点图案
- 这是因为所有颗粒运动造成的综合相位随时在变化
- 光强度涨落的变化速率与颗粒的大小有关

## 动态光散射



- ▶ 动态光散射测量依赖于时间的散射光强波动。由动态光散射可以得到粒子扩散速度的信息, 进而从 Stokes-Einstein 方程得到流体动力学直径 hydrodynamic diameter ( $D_H$ )

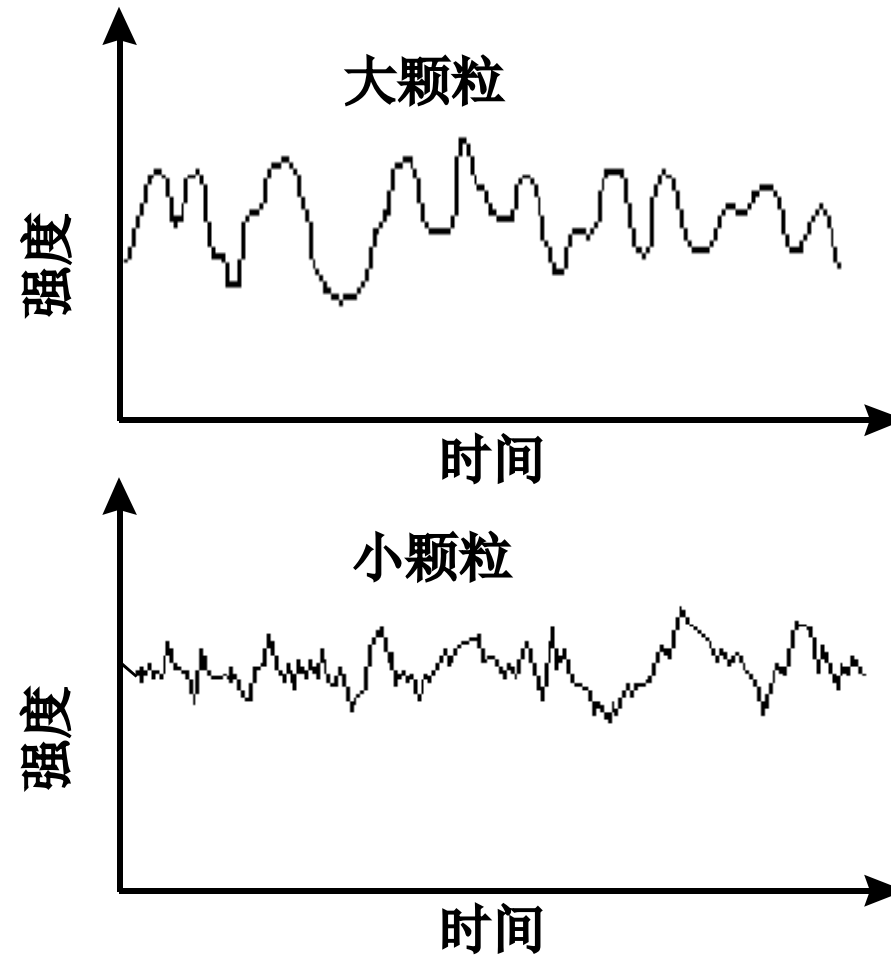
$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H}$$

k: 波尔兹曼常数,

T: 绝对温度,

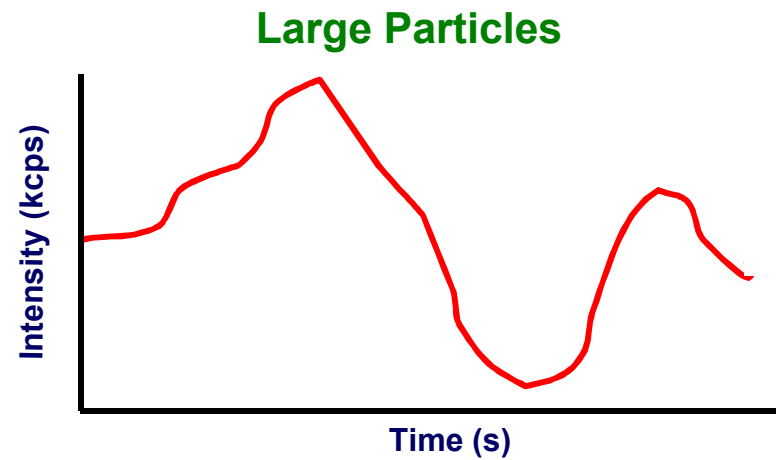
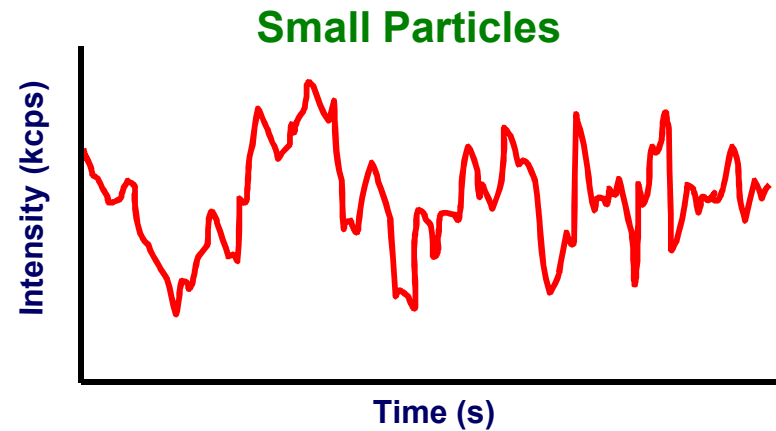
$\eta$ : 粘度

# 强度涨落



# 散射光强的波动

- ▶ 散射光强依赖于粒子的大小
- ▶ 散射光强的信息被传输到光子相关器
- ▶ 相关器连续加和处理从散射信号中得到的很短时间的波动信息进而得到相关曲线

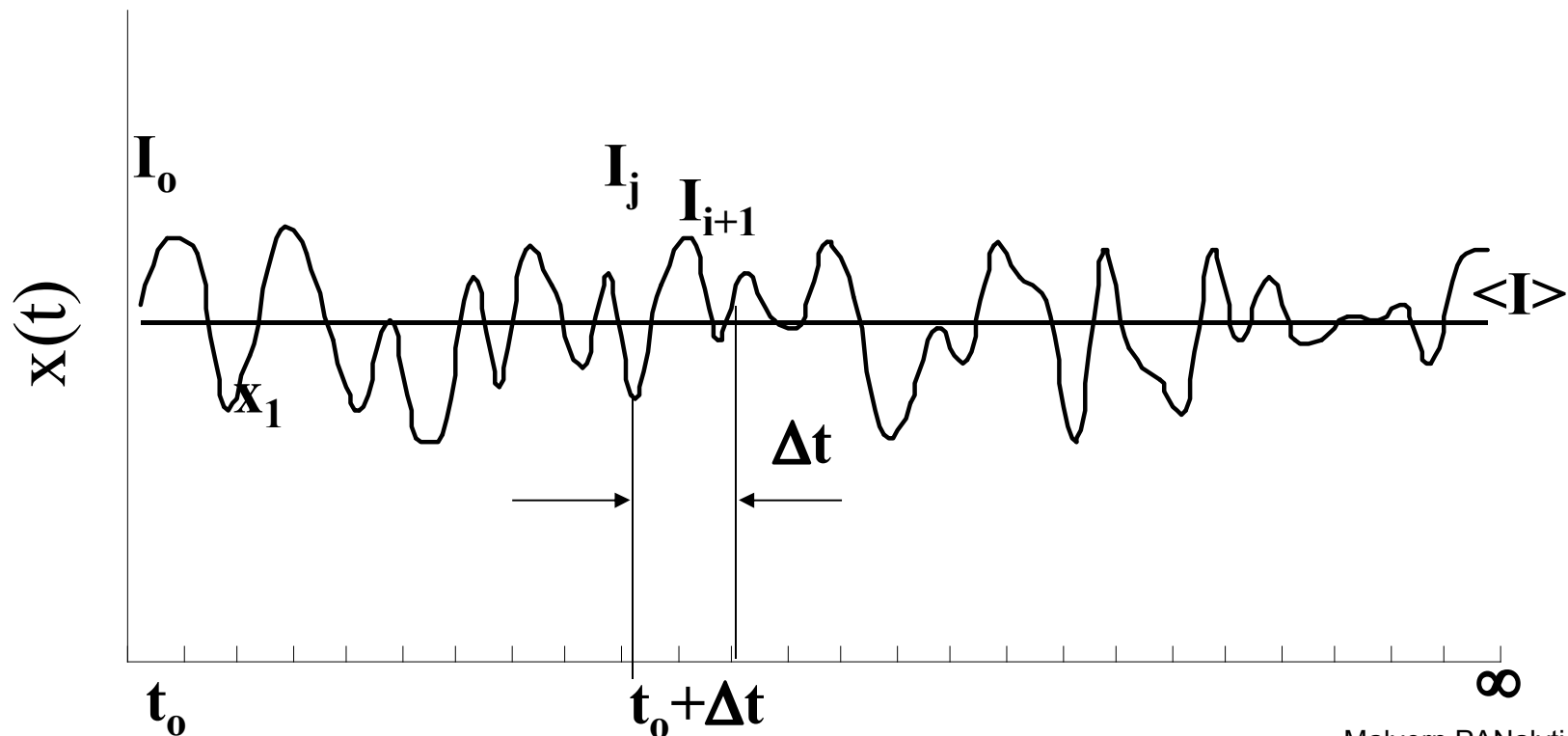


# 自相关函数 (ACF)

- 自相关函数 (ACF)

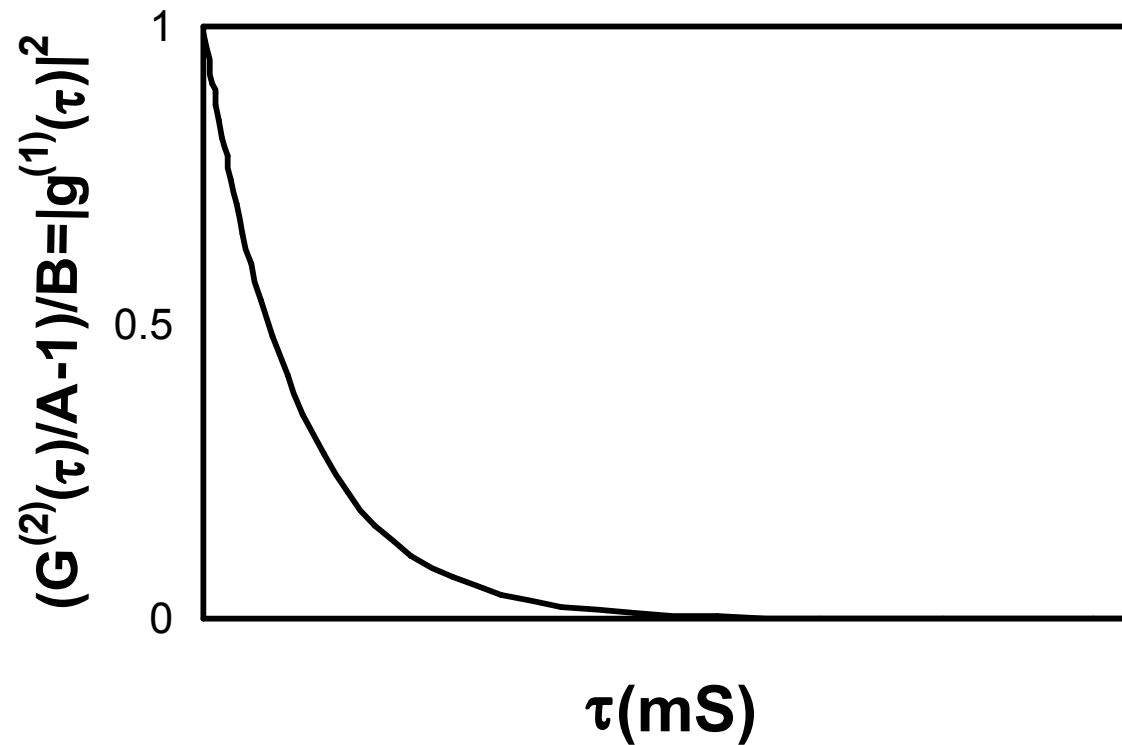
$$G^{(2)}(t) = \langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle$$

$\tau (= \Delta t)$  是在不同的时间 (取样时间)

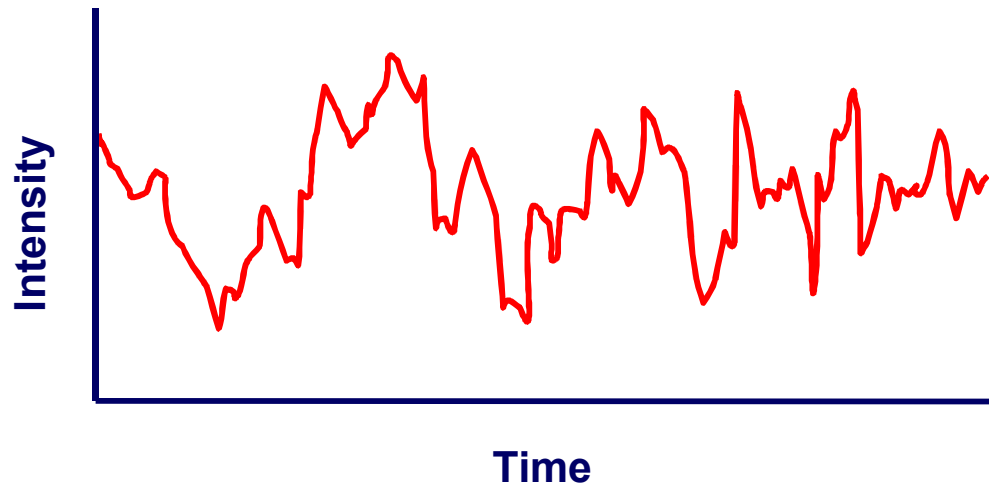


# 相关函数

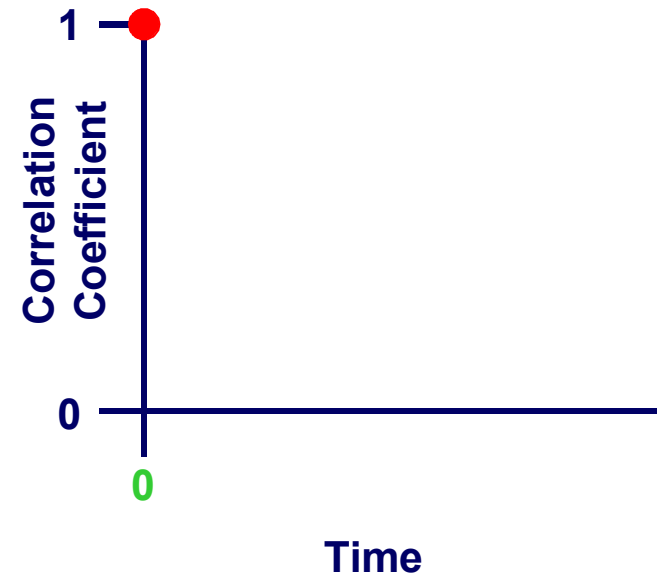
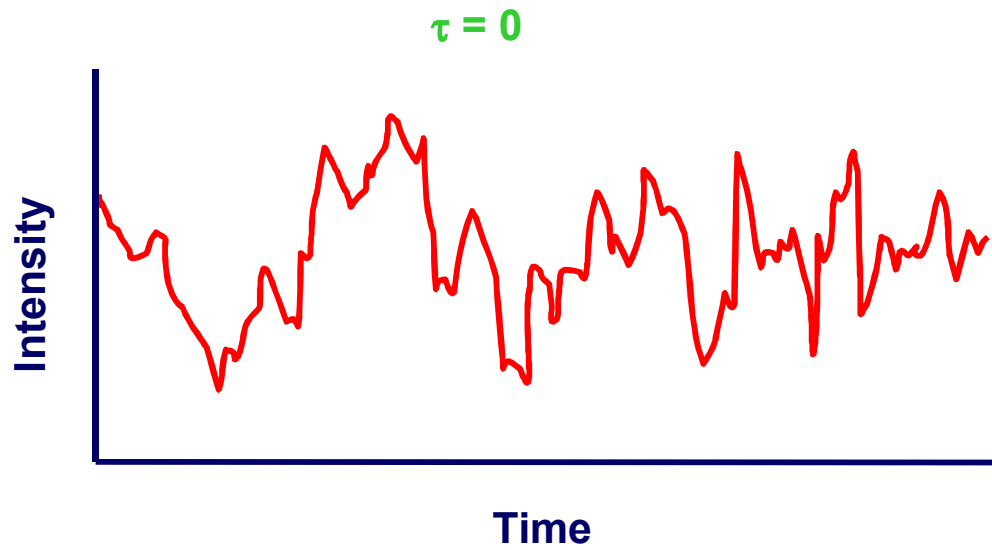
最大的相关从1开始衰减到0，没有任何相关性



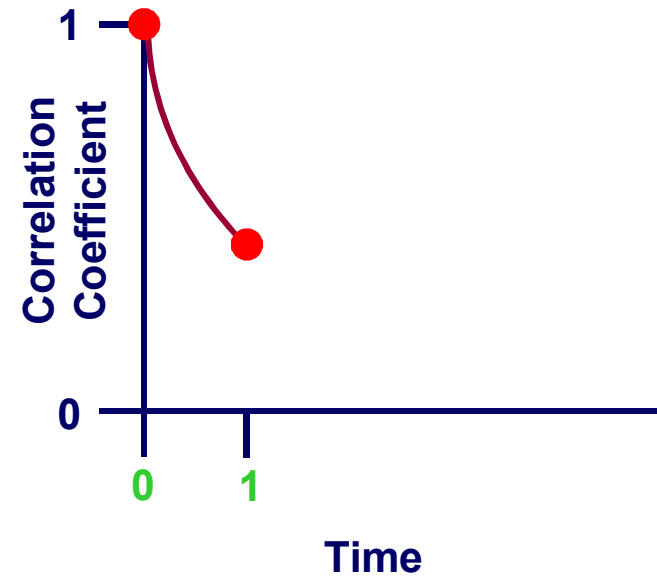
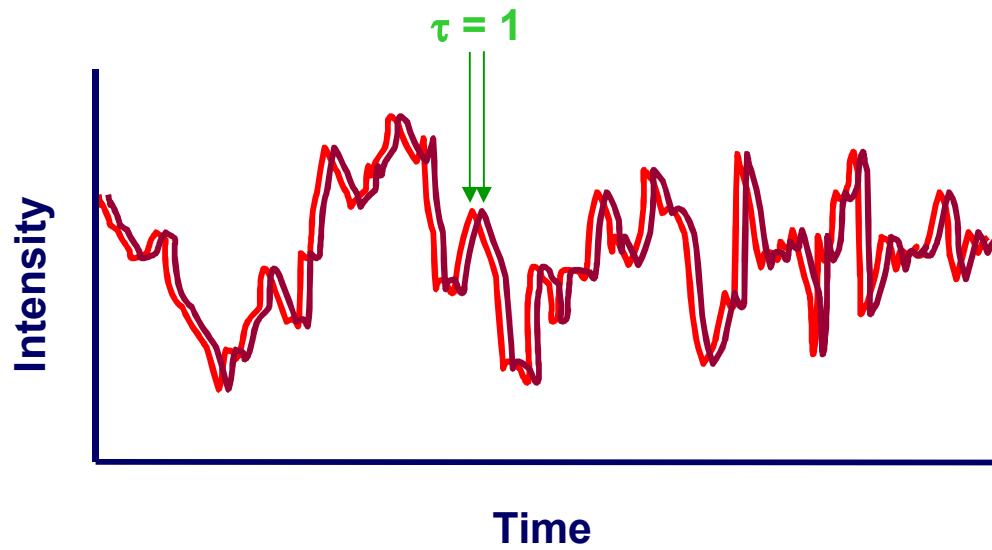
相关性：  
小粒子，光强波动比较快



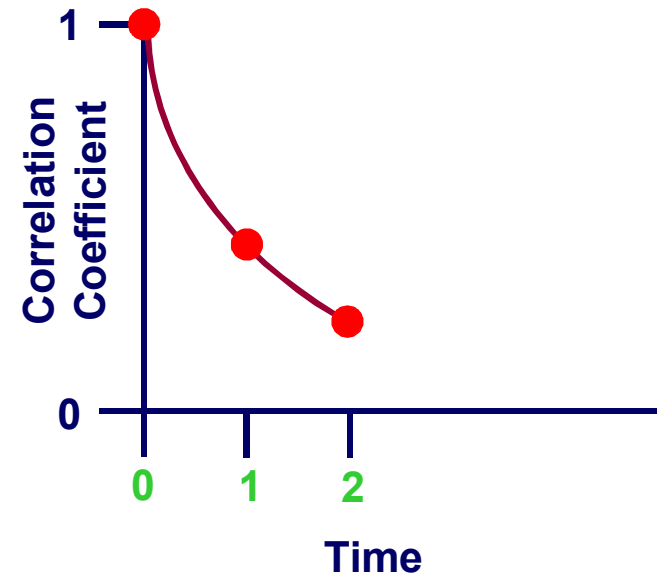
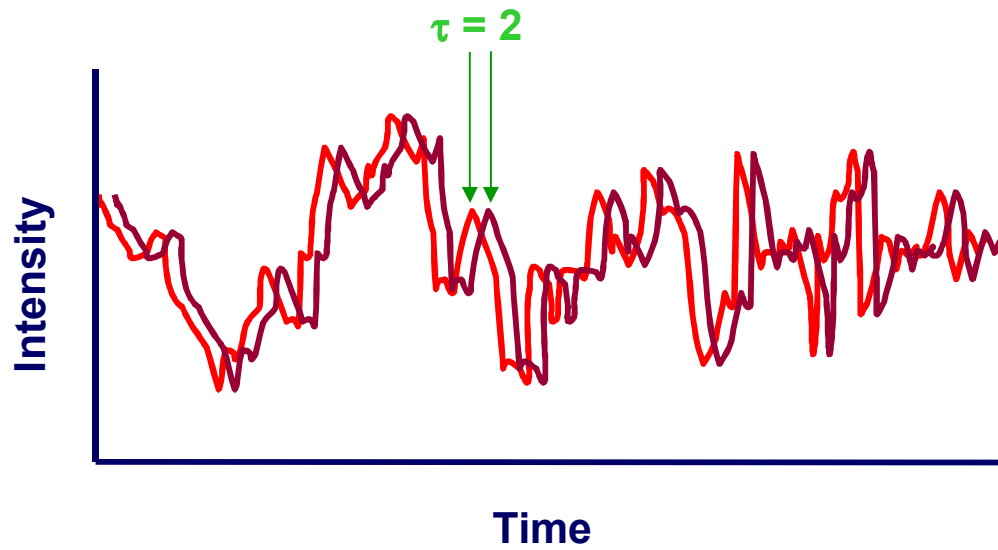
相关性：  
小粒子，光强波动比较快



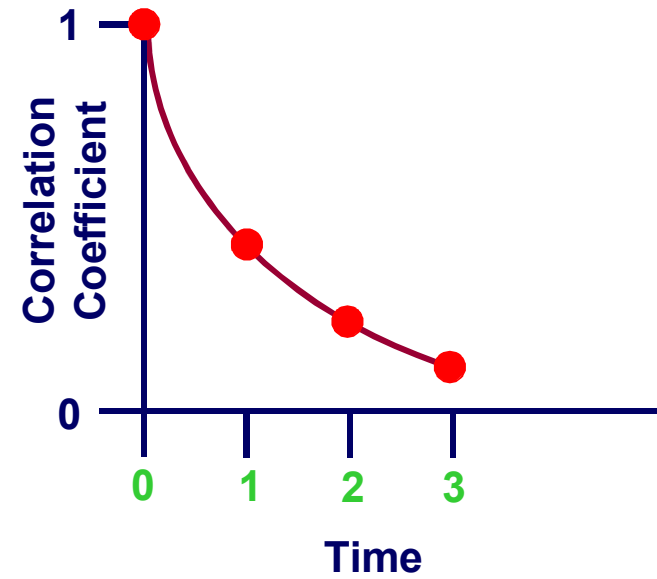
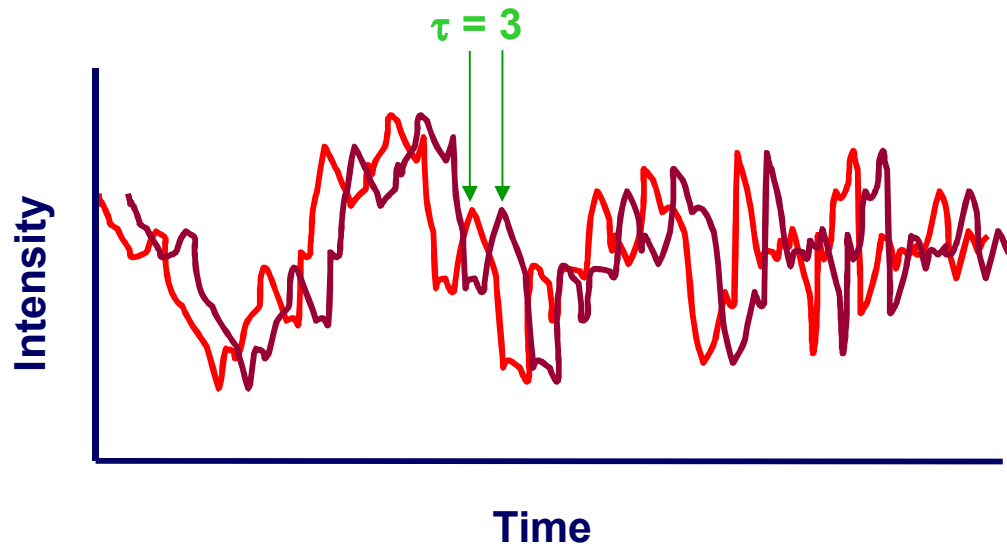
相关性：  
小粒子，光强波动比较快



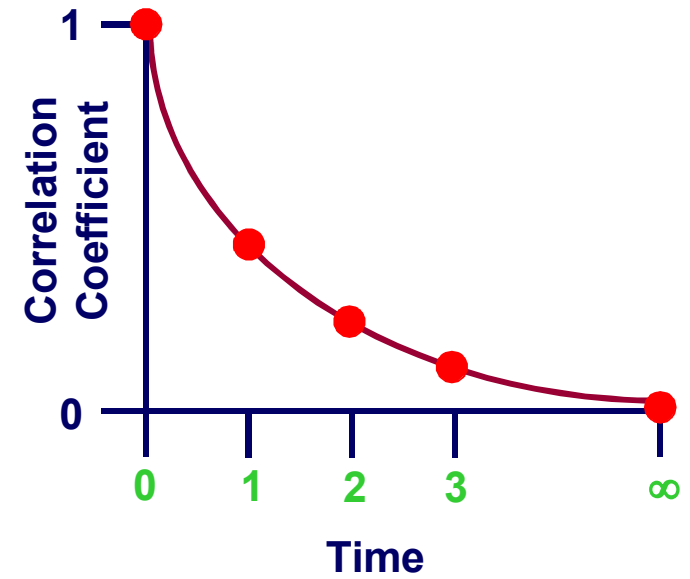
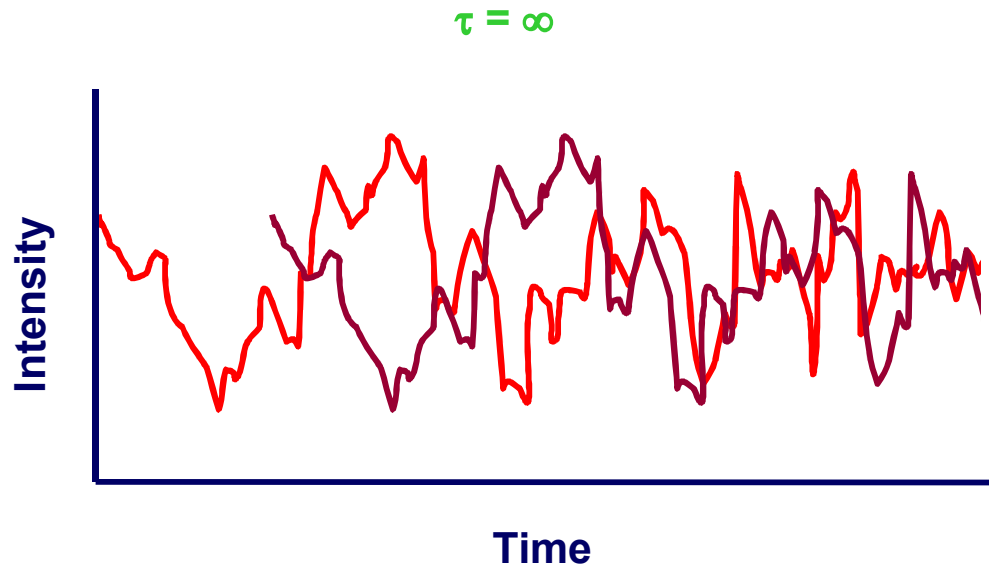
相关性：  
小粒子，光强波动比较快



相关性：  
小粒子，光强波动比较快



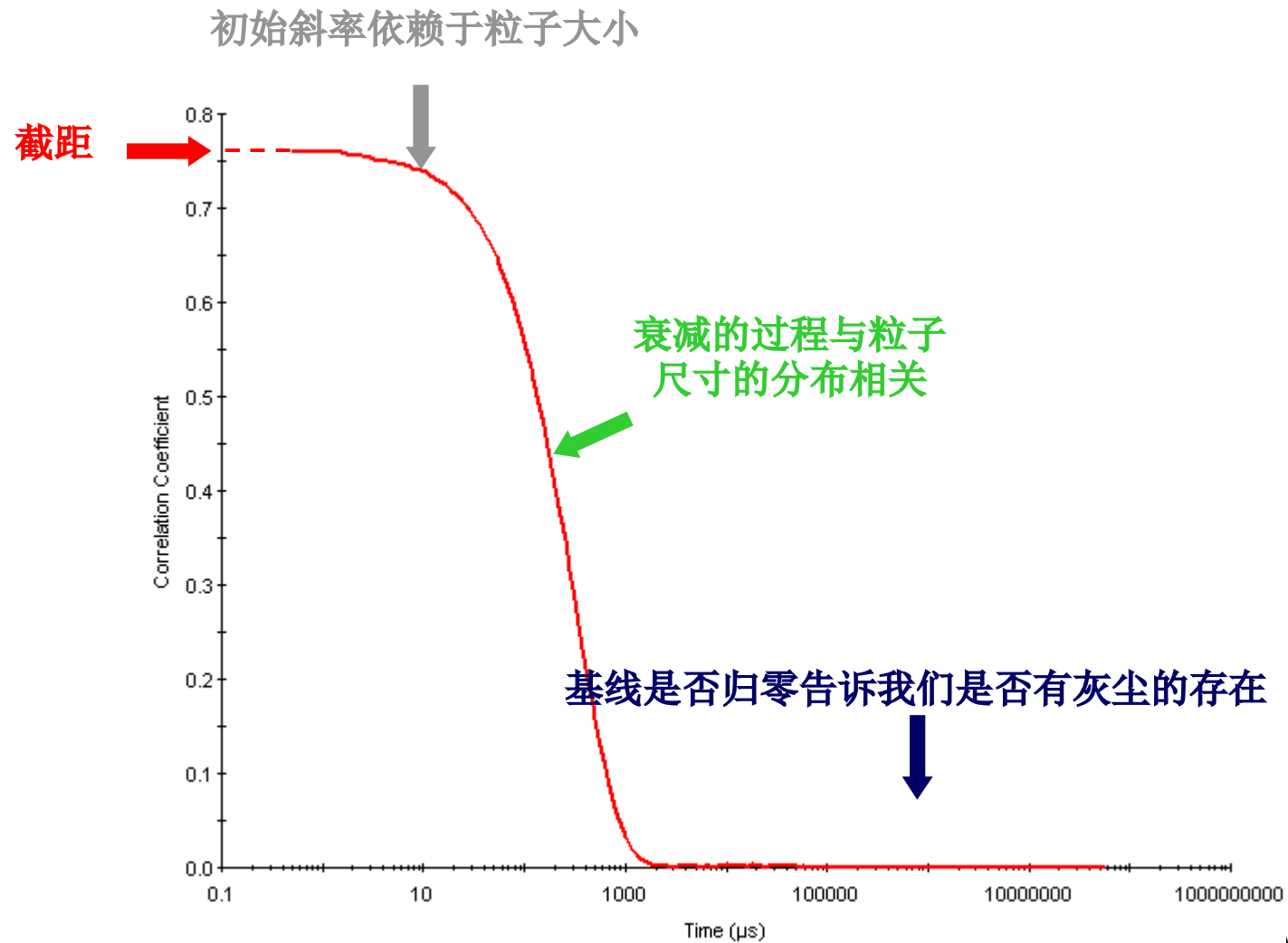
相关性：  
小粒子，光强波动比较快



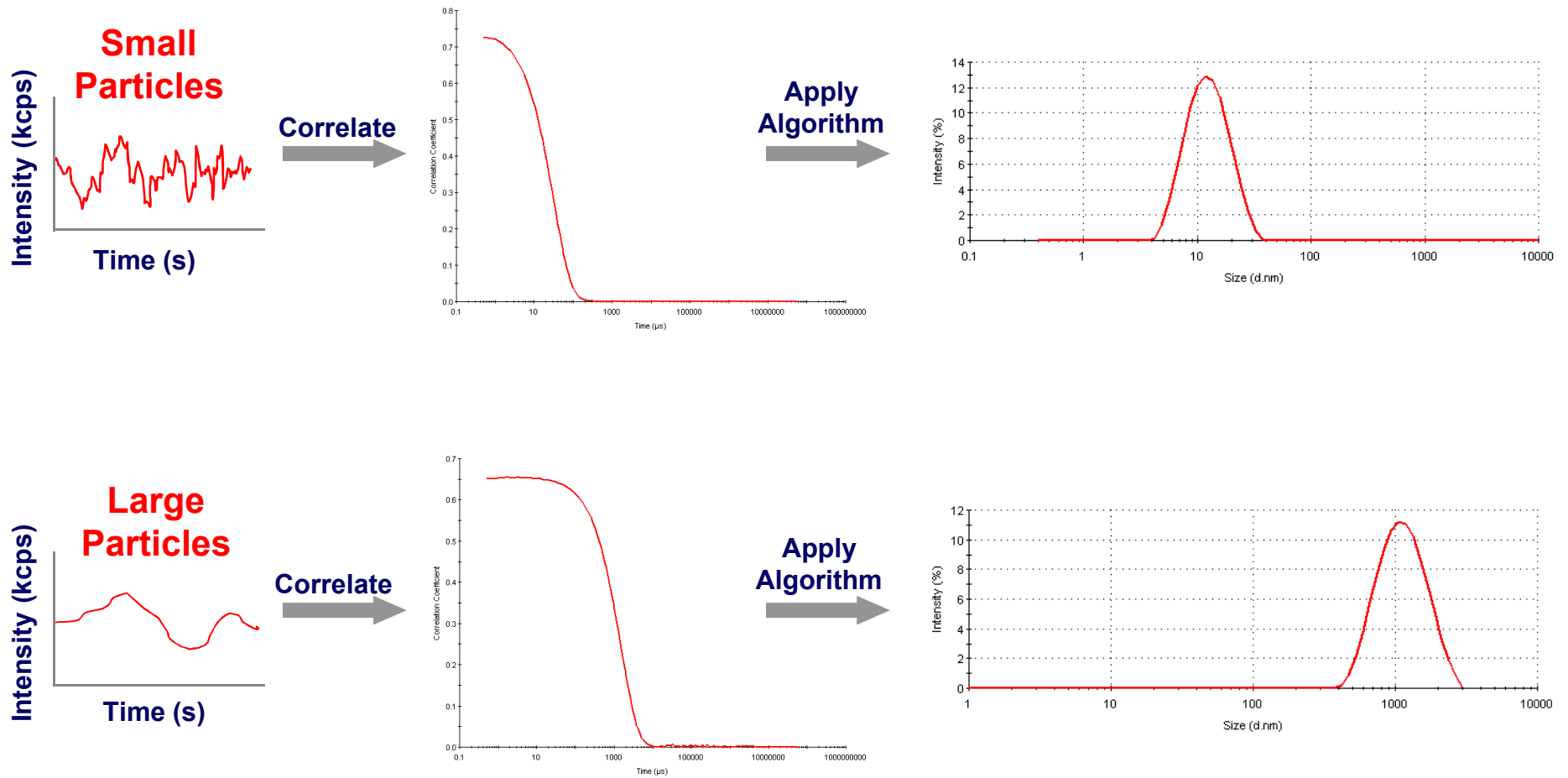
## 相关函数与粒度的关系

- 对于运动缓慢的大颗粒，散射光强信号变化缓慢，存在长时间的相关性
- 对于快速运动的小颗粒，散射光强信号变化较快，很快地相关性就没有了

# 相关方程（曲线）



# 光强波动，相关函数和粒径分布



## 相关方程（曲线）

- 相关方程可以用衰减指数的方程来解析

$$G(\tau) = B + A \sum e^{-2q^2 D \tau}$$

- 这里B是在无限长时间的基数, A 是相关曲线的戒距, q 是矢量因子 ( $4\pi n/\lambda_0$ )  $\sin(\theta/2)$ , n 是折光指数,  $\lambda_0$  是激光的波长,  $\theta$  是测量的角度, D 是扩散系数,  $\tau$  是衰减时间常数

# Malvern

## 动态光散射

由相关曲线得到粒径信息：运算法则

## 累积距法

- ISO13321 (1996)定义了应用于动态光散射技术的累积距法
- 这种方法给出了平均粒子尺寸 (**z-average**)和样品的多分散指数 (**polydispersity index**)
- 这个分析方法只需要分散剂的折光指数和粘度

## z-均直径

- **z-均直径(Z-ave)的定义:**

累积距法得到的颗粒平均粒度对应于不同粒度的颗粒对整体散射光强的贡献

- 这里“平均”的概念特指用于光散射试验中
- 这种算法得到的平均粒度对于大的缔合物或者灰尘非常敏感

# 分布系数

- **多分散指数定义 (PDI):**

由累积距法得到的多分散指数是一个无纲量的值，代表颗粒尺寸的分布宽度

- 在Zetasizer Nano软件中它的范围是 0到1
- 如果PDI大于0.7，这说明样品的尺寸分布非常宽，可能不适合用动态光散射的方法来测量

## 多分散指数

多分散指数	描述
<0.05	单分散体系，如一些乳液的标样。
<0.08	近单分散体系，但动态光散射只能用一个单指数衰减的方法来分析，不能提供更高的分辨率。
0.08 to 0.7	适中分散度的体系。
>0.7	尺寸分布非常宽的体系。

## 多分散指数

- 也可以用多指数模型来分析相关曲线方程，由此可以得到扩散系数的分布，进而得到粒子的尺寸分布
- Nano软件中计算出来的尺寸分布，是通过non-negative least squares (NNLS)分析，演算而来。

# 对于分布的分析

- 对于相同的光散射数据，可以有几种不同的分析结果
- 为了适应不同的样品类型,两种NNLS 分析模型被应用到一起的软件中
  - General Purpose
  - Multiple Narrow Modes
- 这两种算法的差异在于所得到的分布曲线的平滑程度

# 对于分布的分析



- **general purpose** 算法适用于大部分分布状况未知的样品
- **multiple narrow mode** 算法适用于分布状况不连续的样品

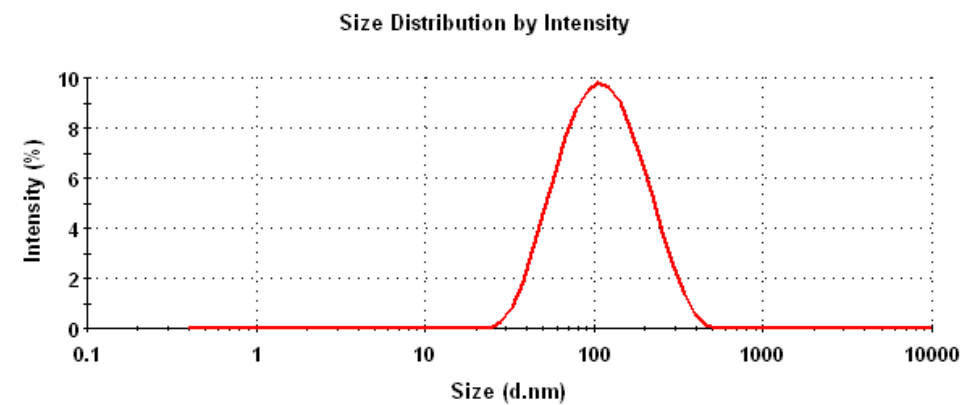
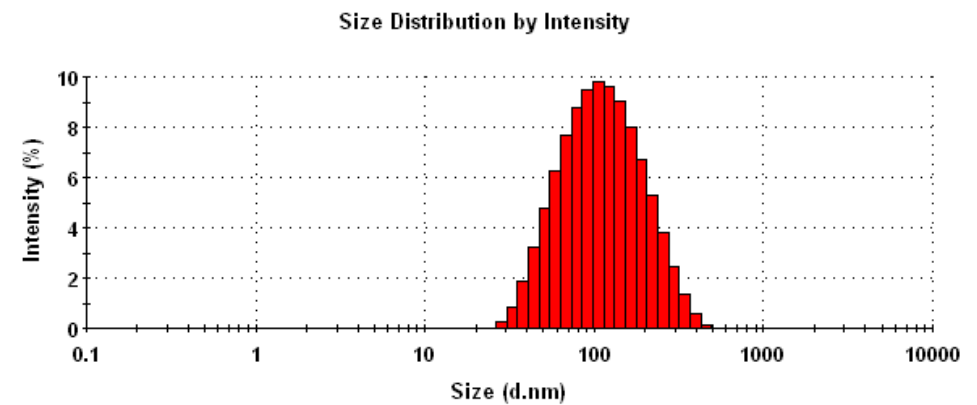
# Zetasizer Nano 软件中的尺寸分布分析



- 由DLS而得的基本的尺寸分布，是一个根据光强的贡献率，并使用(NNLS)分析方法得到的分布
- 尺寸分布被表示为一个散射光相对光强对于对应的粒子尺寸的曲线
- 默认地，在尺寸分布中最多可以出现70个等级

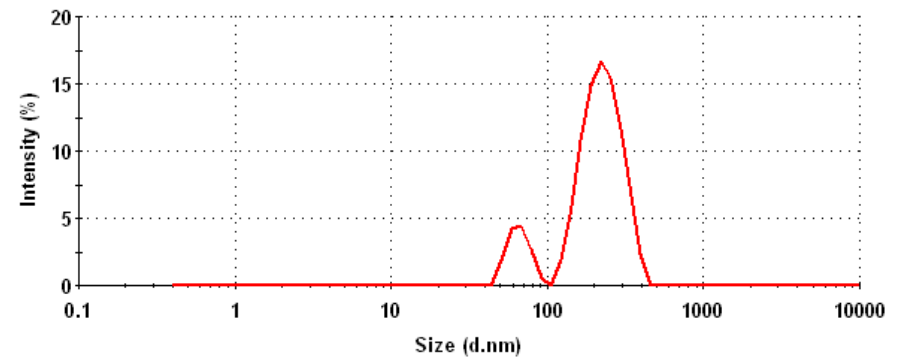
# Zetasizer Nano 软件中的尺寸分布分析

Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0.4000	0.0	13.54	0.0	458.7	5.1
0.4632	0.0	15.69	0.0	531.2	3.1
0.5365	0.0	18.17	0.0	615.1	1.4
0.6213	0.0	21.04	0.0	712.4	0.4
0.7195	0.0	24.36	0.0	825.0	0.0
0.8332	0.0	28.21	0.0	955.4	0.0
0.9649	0.0	32.67	0.0	1106	0.0
1.117	0.0	37.84	0.0	1281	0.0
1.294	0.0	43.82	0.0	1484	0.0
1.499	0.0	50.75	0.0	1718	0.0
1.736	0.0	58.77	0.0	1990	0.0
2.010	0.0	68.06	0.0	2305	0.0
2.328	0.0	78.82	0.1	2669	0.0
2.696	0.0	91.28	1.0	3091	0.0
3.122	0.0	105.7	2.7	3580	0.0
3.615	0.0	122.4	5.1	4145	0.0
4.187	0.0	141.8	7.6	4801	0.0
4.849	0.0	164.2	9.8	5560	0.0
5.615	0.0	190.1	11.4	6439	0.0
6.503	0.0	220.2	12.2	7456	0.0
7.531	0.0	255.0	12.1	8635	0.0
8.721	0.0	295.3	11.2	1.000e4	0.0
10.10	0.0	342.0	9.5		
11.70	0.0	396.1	7.4		



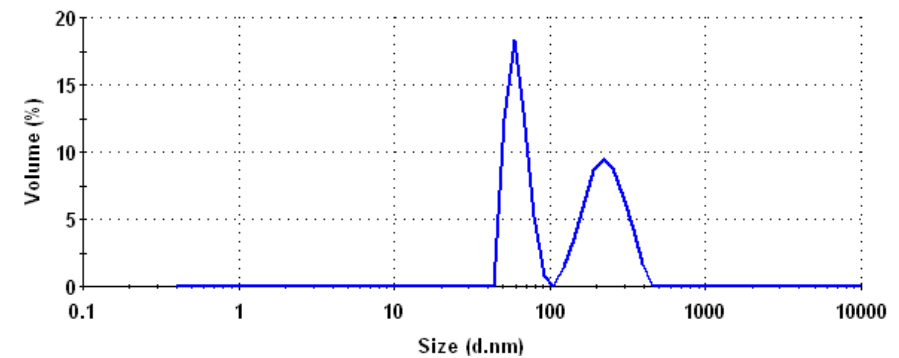
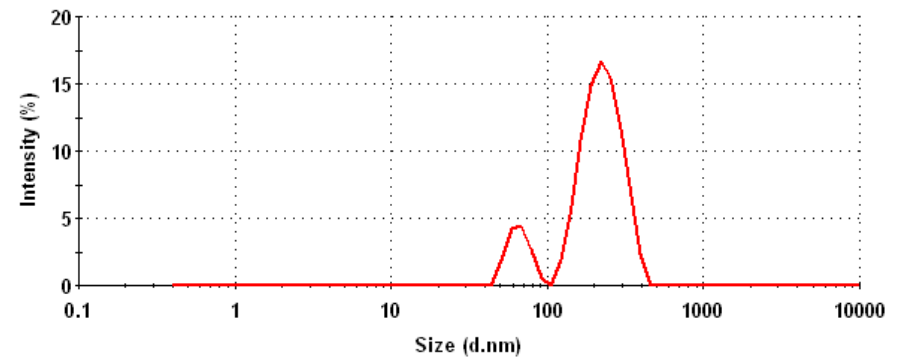
## 光强粒度分布

- 从动态光散射得到最初的结果
- 结果基于粒子的散射光强度
- 对于大的粒子和灰尘十分敏感
- 分析样品的特性仅仅需要介质的粘度和折光指数



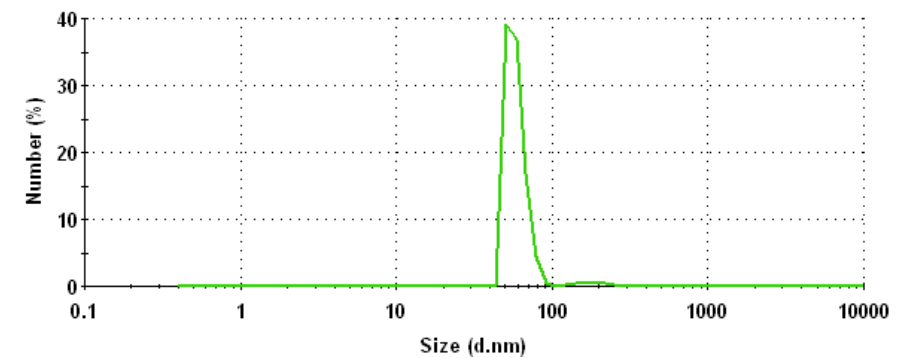
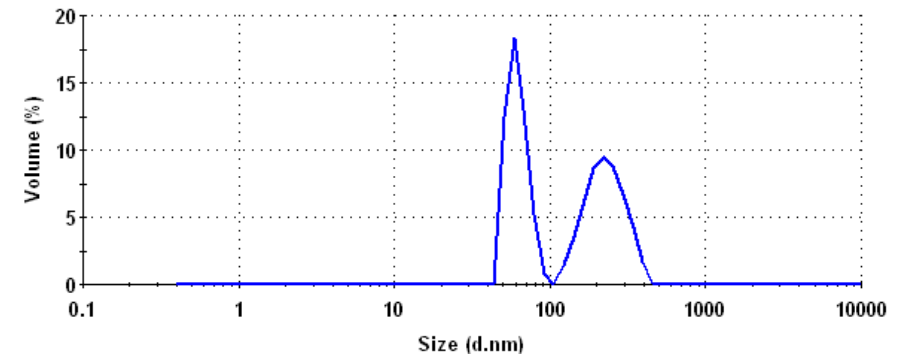
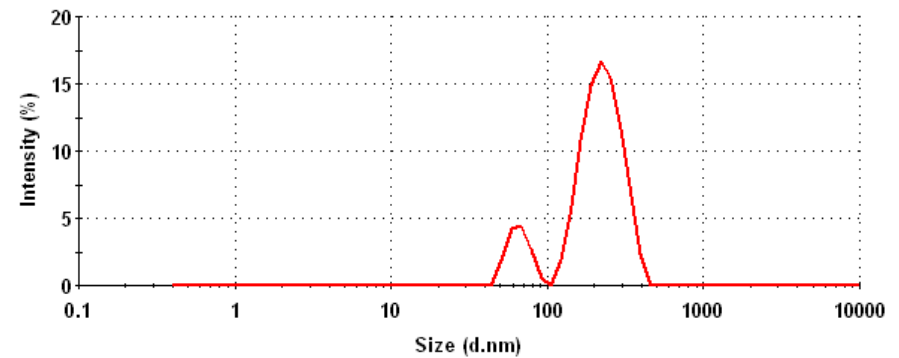
## 体积粒度分布

- 使用光强分布数据应用Mie theory演算而来
- 等同于质量粒度分布
- 换算过程需要粒子的光学性质
  - 粒子的折光指数
  - 粒子对光的吸收率



## 数量粒度分布

- 使用光强分布数据应用Mie theory演算而来
- 换算过程需要粒子的光学性质
  - 粒子的折光指数
  - 粒子对光的吸收率



# 动态光散射 DLS 的粒子尺度分布

- 光强分布，体积分布和数量分布之间的相互转换基于以下前提：
  - 所有的粒子都是球型的
  - 所有的粒子都是均匀的，且密度相同
  - 光学性质已知（折光指数，吸收率）
- 动态光散射 **DLS** 技术往往高估分布峰的宽度，这个影响可以从体积分布和数量分布的相互转换过程中体现
- 体积和数量分布中，峰的平均值和分布宽度只能用来估计成分的相对量。

# 动态光散射 DLS 的粒子尺度分布

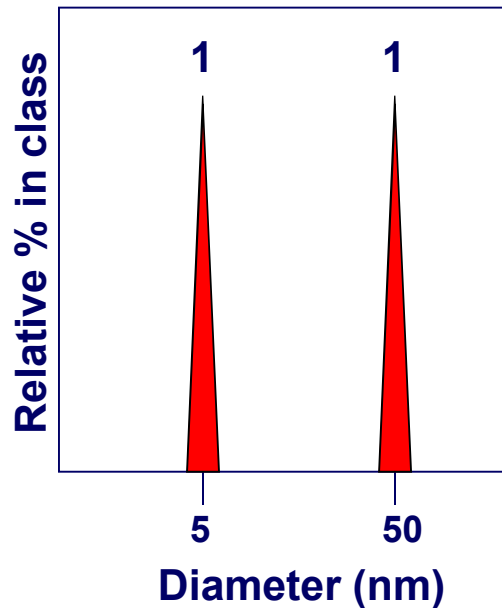
- 如果光强分布是一个相对平滑的峰，那么光强分布和转化得到的体积分布以及数量分布将会比较相似
- 如果光强分布中有一条非常明显的尾巴，或是多于一个分布峰，那么转化得到的体积和数量分布将会非常不同，并且会更真实地展现尾巴和其它峰
- 总的来说  $d_{(\text{intensity})} > d_{(\text{volume})} > d_{(\text{number})}$

# 光强, 体积和数量分布

设想一个由相等数量的 5 nm 和 50nm 球型粒子组成的混合物

数量分布

$$N_1:N_2$$

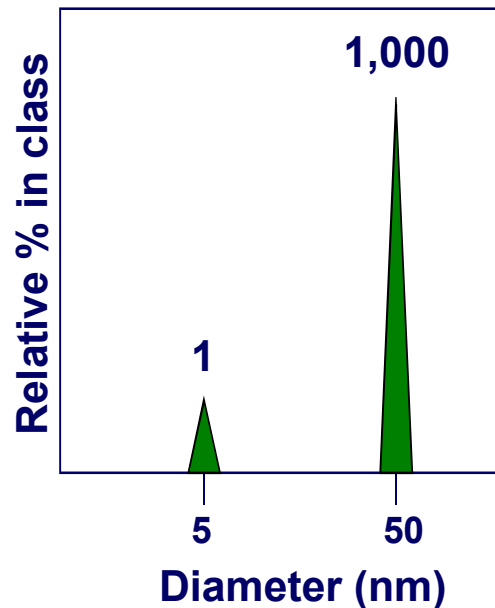


数量平均粒径  $\approx 28\text{nm}$

体积分布

$$N_1 * 3/4\pi r_1^3 : N_2 * 3/4\pi r_2^3$$

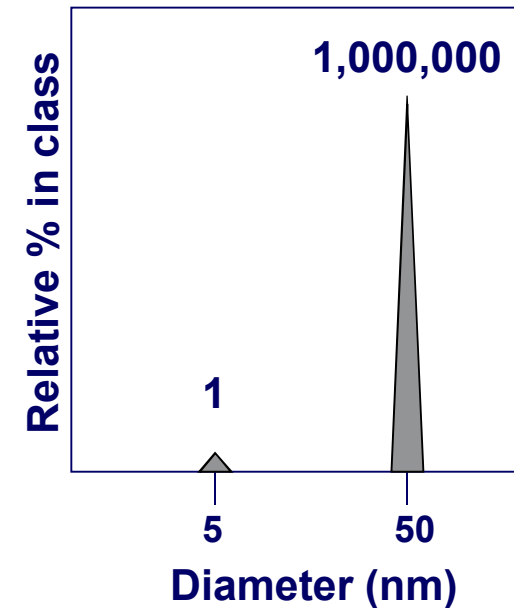
$$N_1 V_1 : N_2 V_2$$



体积平均粒径  $\approx 49\text{nm}$

光强分布  
(Rayleigh Theory)

$$N_1 V_1^2 : N_2 V_2^2$$

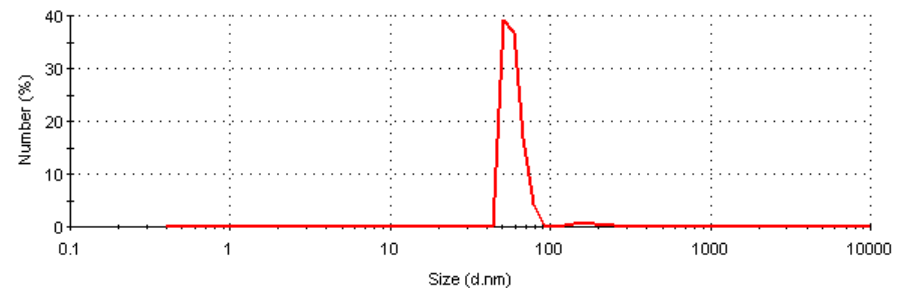
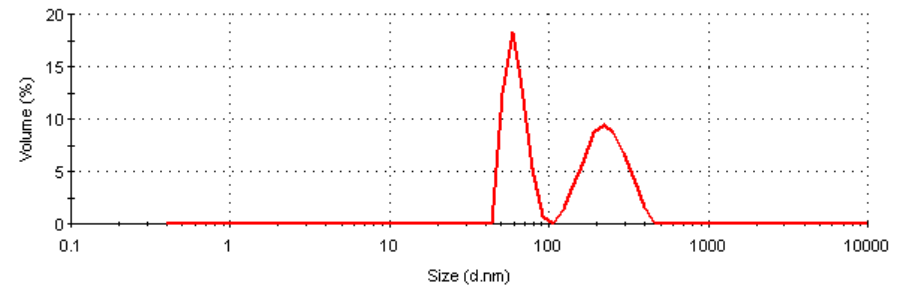
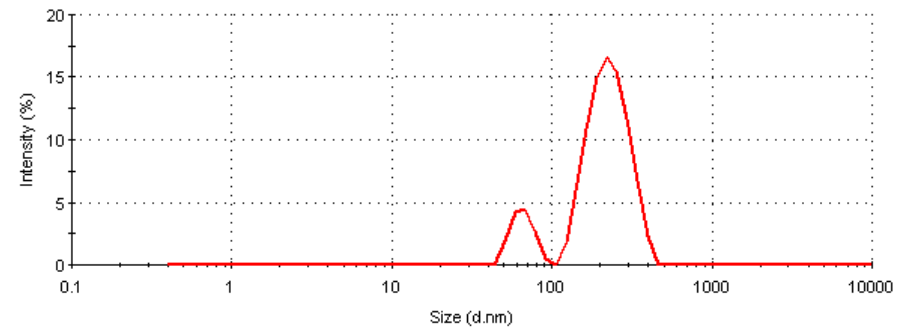


光强平均粒径 = 50nm

# 光强，体积和数量分布: 例子

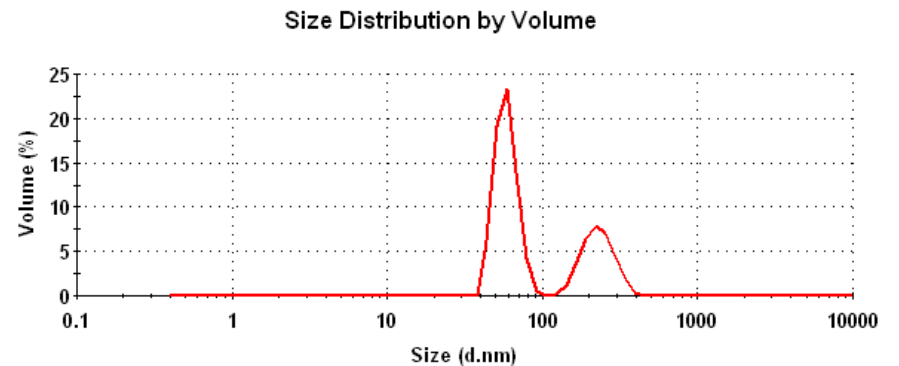
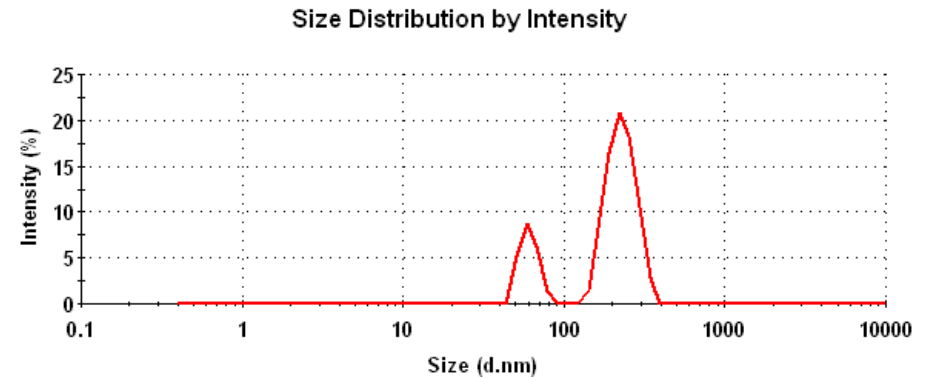
60nm 和 220nm 聚苯乙烯乳液标样1:1 体积混合  
 z-均直径 = 168nm  
 PDI = 0.215

	Peak 1		Peak 2	
	Mean (nm)	%	Mean (nm)	%
<b>Intensity</b>	231	86.3	65.8	13.7
<b>Volume</b>	232	50.3	61.8	49.7
<b>Number</b>	184	2.6	58.2	97.4



# 体积和数量分布:建议

- 建议在报告一个分布峰所对应的尺寸时，使用光强分布曲线的结果
- 在报告各个峰的相对数量时，使用体积或者是数量分布



Peak	D <sub>i</sub> (nm)	% Int	% Wt
1	59	21	67
2	220	79	33

Malvern

动态光散射

Dynamic Light Scattering

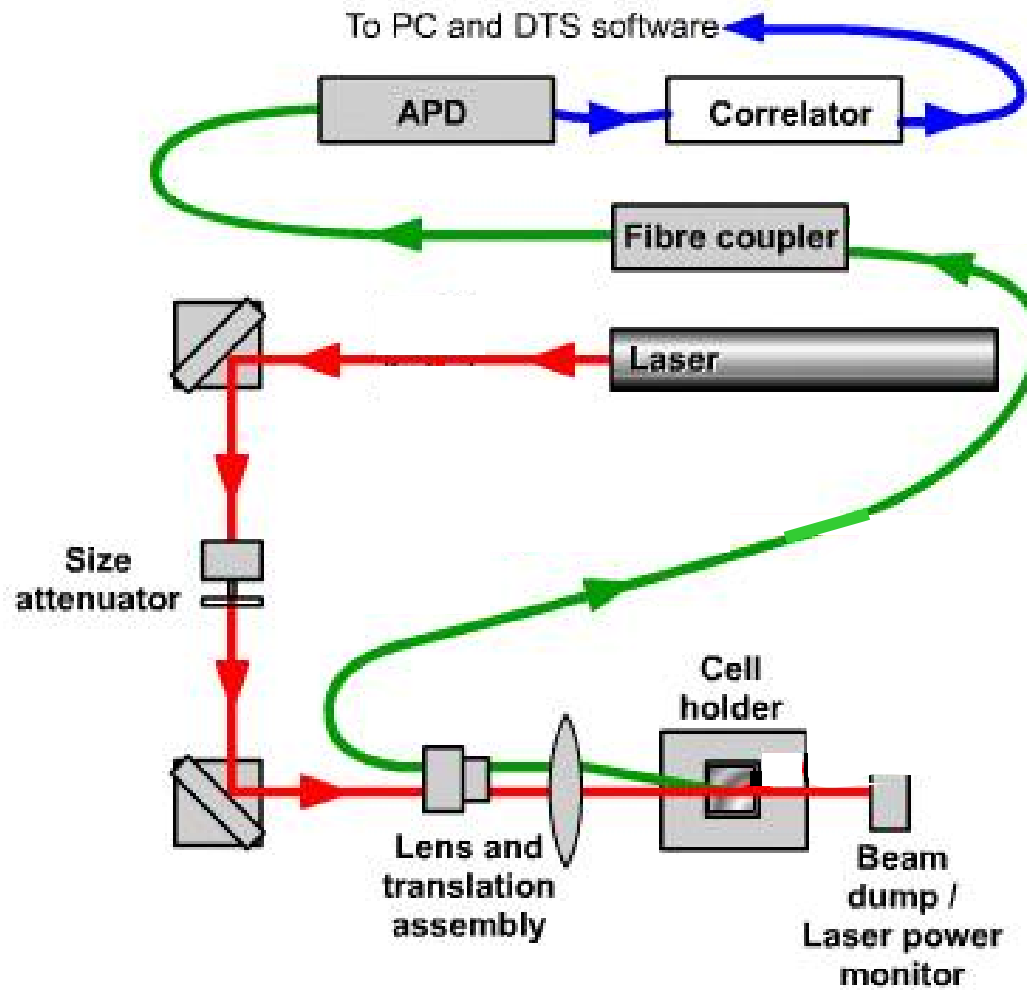
Nano 系列中的优化测量位置

## Zetasizer Nano系列产品

- Nano - Z** Zeta电位
- Nano - S** 用NIBS测量粒度  
分子量
- Nano - ZS** 用NIBS测量粒度  
分子量  
Zeta电位
- Nano - S90** 在90度测量粒度
- Nano - ZS90** 在90度测量粒度  
Zeta电位



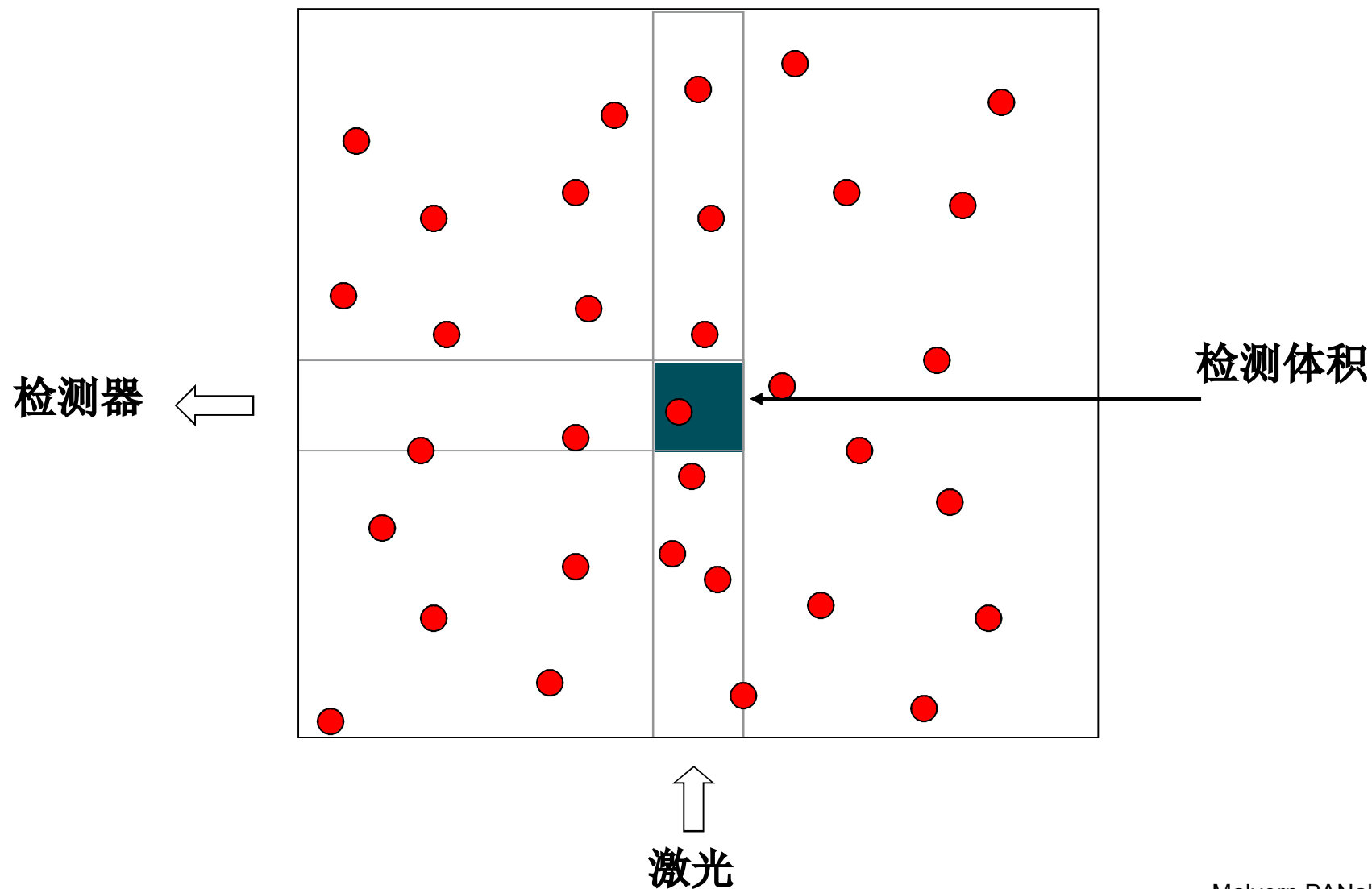
# Zetasizer Nano ZS的颗粒度测量光路图



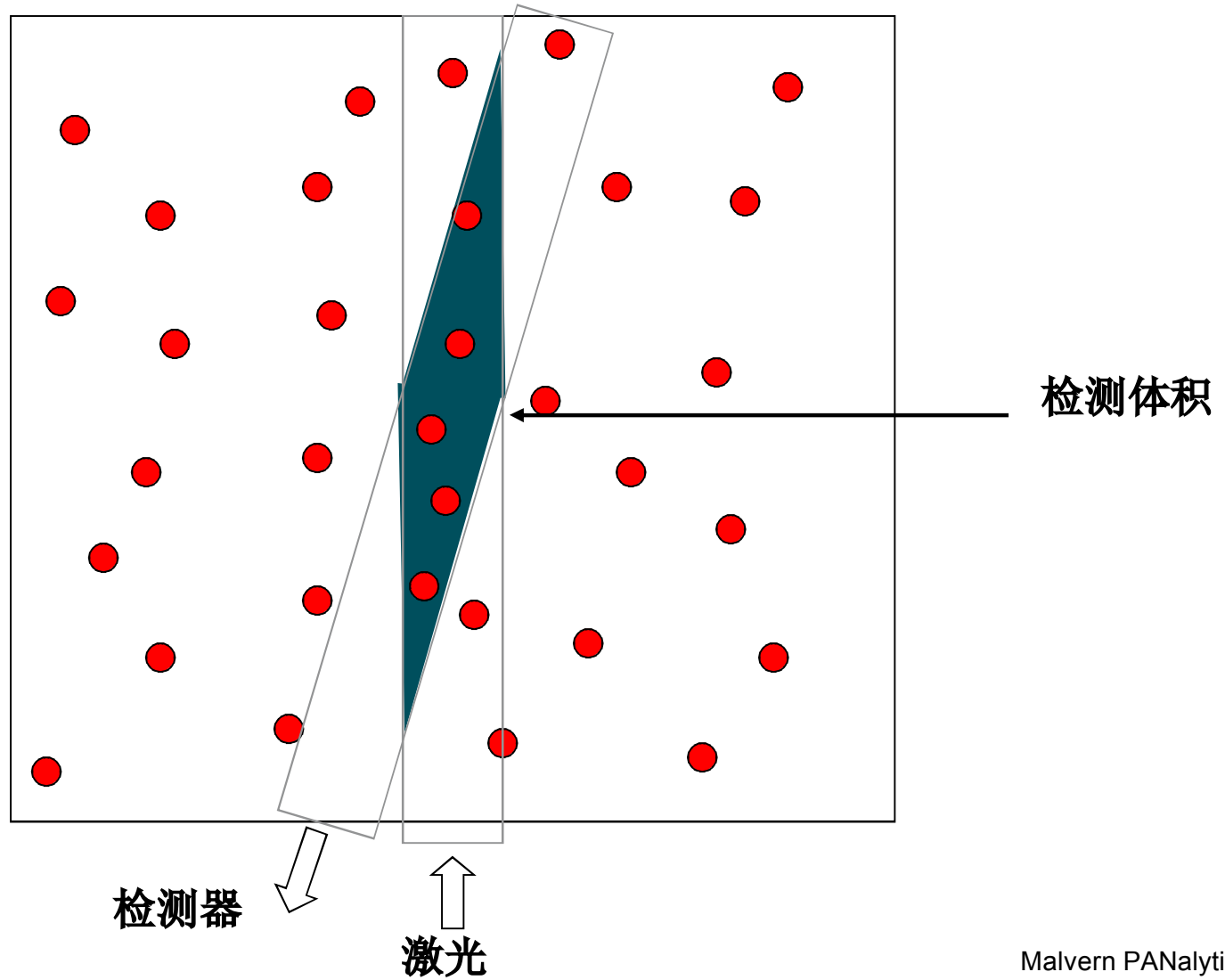
## 非侵入背侧光散射概况 (Non Invasive Back Scatter (NIBS) Overview)

- 在Nano S 和 Nano ZS 系列中，光散射检测角度为 $175^\circ$ ，因此称为背散射
- 光学系统不接触样品，因此称为非侵入性

# 测量体积：Nano S90/Nano ZS90



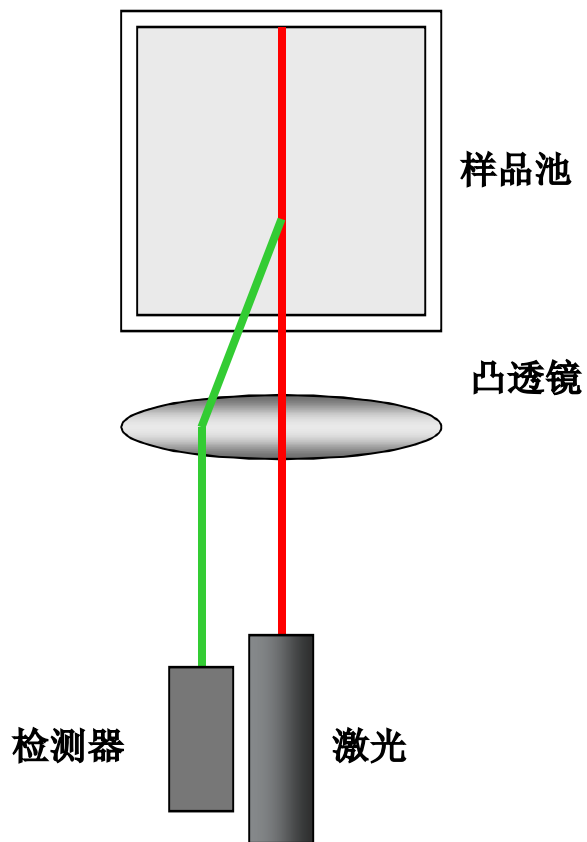
# 测量体积：Nano ZS



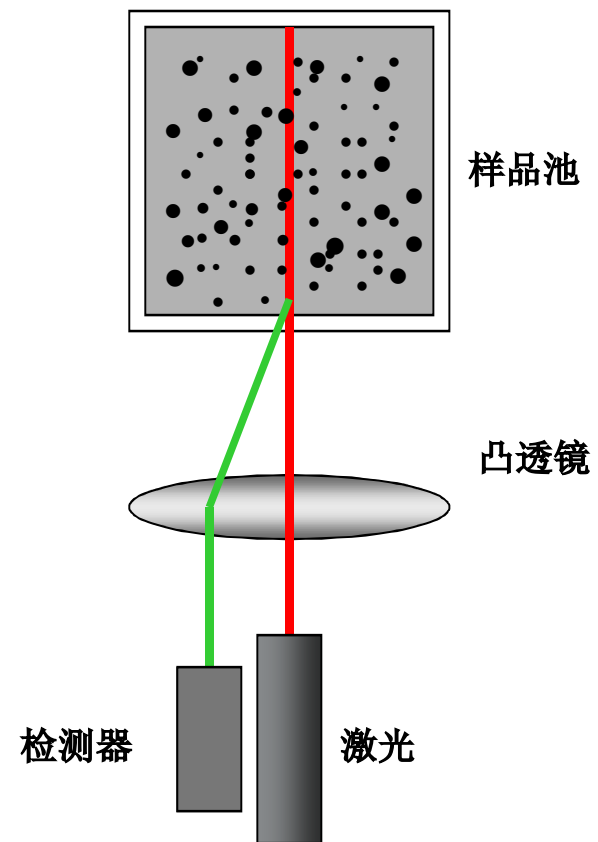
# NIBS: 可调整检测位置



小粒子/  
稀溶液  
较大的散射体积

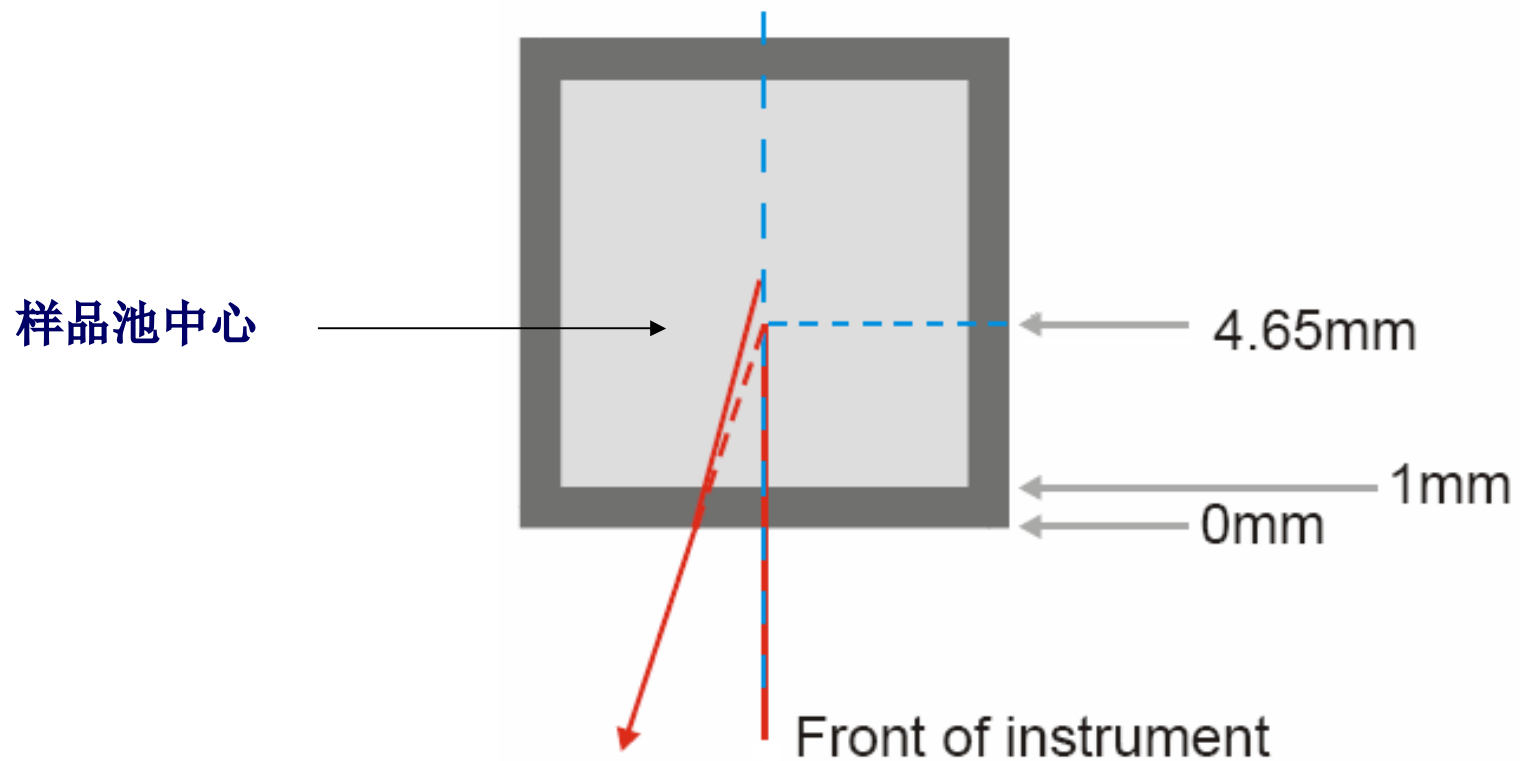


高浓度溶液  
减小散射光体积  
降低多次散射影响



## 检测位置

- 在Nano S 或者 ZS系列中,可由一个可以移动的凸透镜(0 to 6.5mm)来调整样品的检测位置
- 这样仪器可以被应用在一个样品浓度比较宽的范围



## 光路中的自动衰减器 (Attenuator)

- 自动衰减器起到调整光学强度的作用，使得粒子的散射光在一个仪器可以检测的范围之内
- Zetasizer Nano自动衰减器有11个光学衰减片涵盖100% 到0.0003% 的透射率
- 透射率指到达样品的激光的强度占光源激光强度的百分比
- 在测量粒子大小的过程中，自动衰减器会自动调节透射光的强度，直到检测器检测到的光强小于 500kcps

## 光路中的自动衰减器 (Attenuator)

衰减器编号	衰减率 (% 正常)	透射率 (% 正常)
1	99.9997	0.0003
2	99.997	0.003
3	99.99	0.01
4	99.97	0.03
5	99.9	0.1
6	99.7	0.3
7	99	1
8	97	3
9	90	10
10	70	30
11	0	100

# The Cell Positioning Factor (CPF)



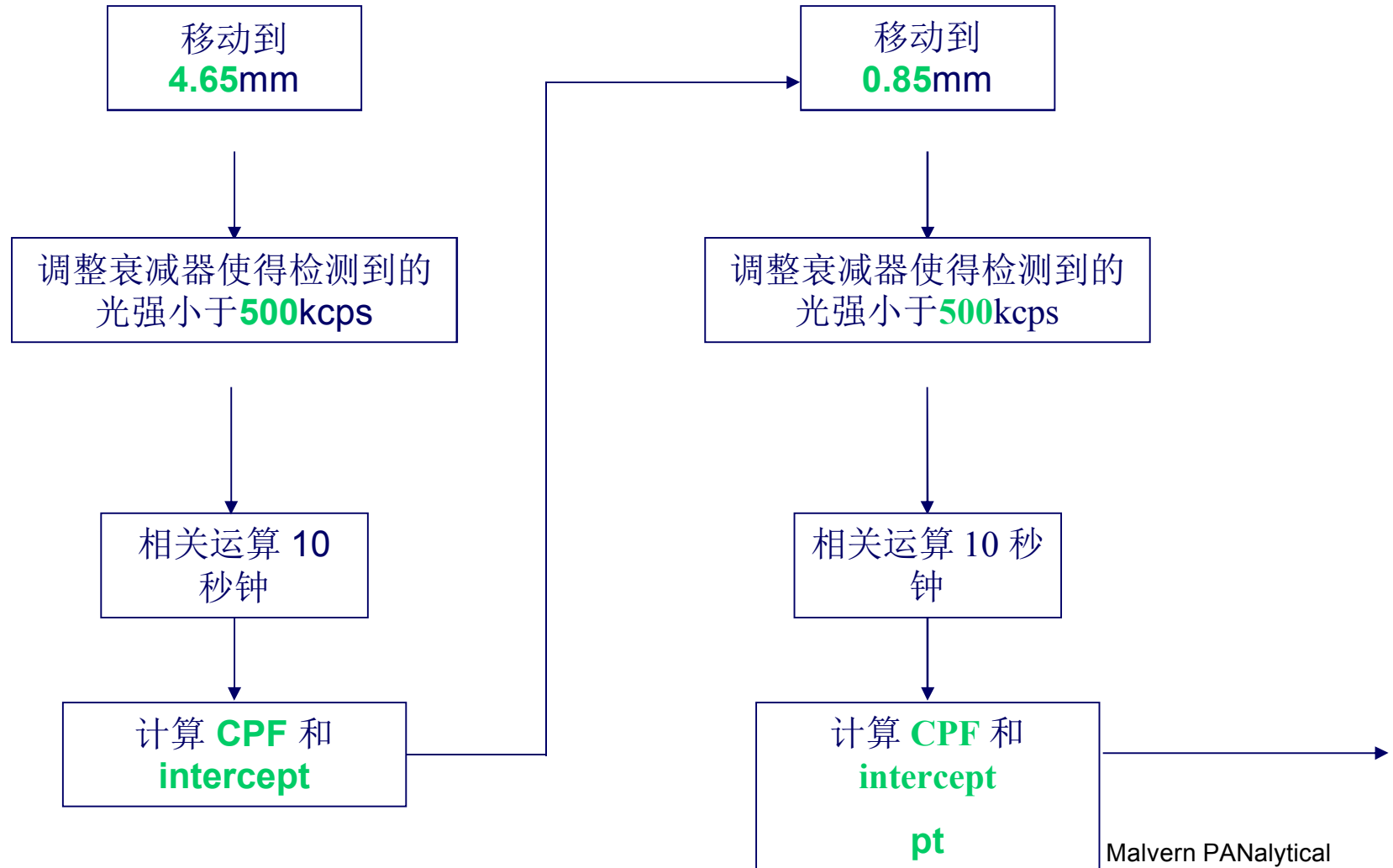
- 最佳测试位置可以由比较截距的数值和样品池的位置因子（ cell positioning factor /CPF ）而得到
- CPF可以结合光子相关函数的截距，平均光强和衰减率得到
- 在大部分应用过程中，得到最大CPF值的测试位置即为最佳测试位置（即最低的多次光散射）

# 测试程序: Nano S / ZS

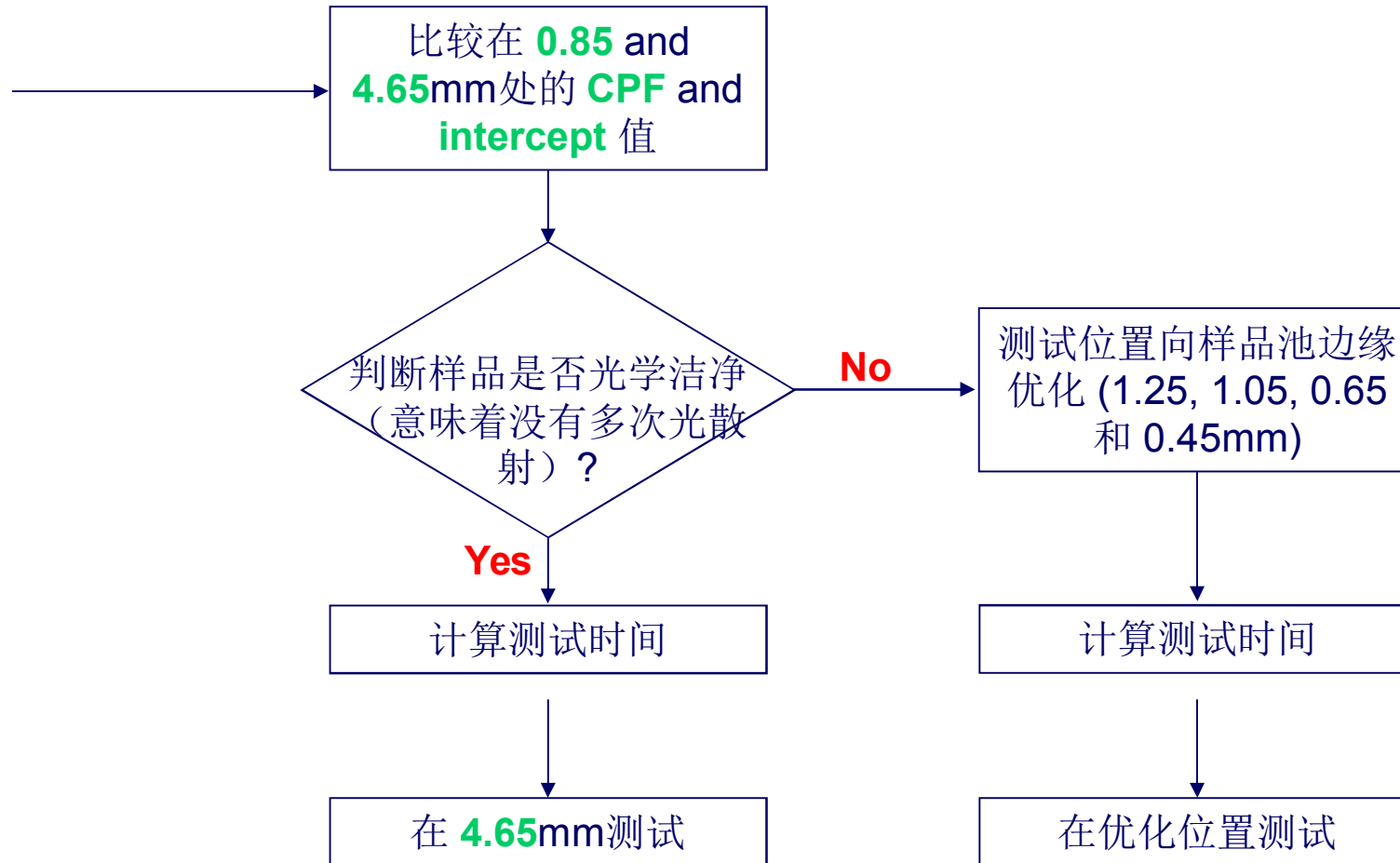


- 当使用一个默认设置开始一个手动测试或者一个标准操作过程 (standard operation process/SOP),测试将会按照如下程序进行

# 测试程序: Nano S / ZS (1)



# 测试程序: Nano S / ZS (2)



# 测试程序： Nano S90 / ZS90



- 对于 S90 或者 ZS90 仪器, 测试位置固定在4.65mm即中心位置
- 因此, 测试程序仅仅包括优化衰减器的位置及测试时间

# 测试时间



- 测试时间由样品的散射光强度决定
- 散射光越弱测试的时间越长
- 每个测试都被分成一系列**10**秒钟的子测试以减少灰尘对测试的影响
- 仪器默认 **50%** 的平均光强最小的子测试为有效测试，被用来进行数据分析

Malvern

# 动态光散射 Dynamic Light Scattering

样品要求

# 样品要求

- 样品应该较好的分散在液体介质中
- 理想条件下，分散剂应具备以下条件：
  - 透明
  - 和溶质粒子有不同的折光指数
  - 应和溶质粒子相匹配 (也就是：不会导致溶胀, 解析或者缔合)
  - 掌握准确的折光指数和粘度，误差小于0.5%
  - 干净且可以被过滤

International Standard ISO 13321 (1996)

# 动态光散射对粒子尺寸的下限



依赖于:

- 粒子相对于溶剂产生的剩余光散射强度
  - 折光指数
  - 样品浓度
- 仪器敏感度
  - 激光强度和波长
  - 检测器敏感度
  - 仪器的光学构造

## DLS的颗粒大小测量上限

- 当颗粒的运动不再是随机的布朗运动时(沉降，絮凝发生时)，DLS就不再是一个合适的技术
- 颗粒大小上限是由沉降的开始来定的
- 所以颗粒大小的上限取决于样品
- 将含大颗粒的样品分散在高粘度的介质中并不会提高测量的上限，因为布朗运动也会与沉降一样的减慢

## DLS的颗粒大小测量上限

- 另外需要考虑的因素是在测量体积中的颗粒数目
- 可能由大颗粒产生的散射光强已经足够进行测量
- 但是散射体积中的颗粒数目可能太少，当有瞬间颗粒数的变化就会产生极大的散射光强涨落
- 这种称为数目涨落的现象会导致相关函数基线的不稳与结果的误差

## DLS的颗粒大小测量上限

- 为了克服数目涨落，样品浓度需要增加
- 但这会导致多重散射效应，需要用背散射检测技术
- 这就是为何拥有背散射的仪器有更高的颗粒测量上限

# 样品浓度

- 从动态光散射得到的样品尺寸应该不依赖于浓度 (ISO 13321)
- 每种样品都有其理想的测试浓度范围
- 如果浓度太低，可能散射光强不足以进行试验
- 这种状况不太可能出现在**Nano S/Nano ZS**系列中，除非在一些极端条件下
- 如果样品浓度太高，实验结果可能会依赖于浓度
- 为了得到正确的尺寸信息，可能会需要在不同的浓度下检测样品尺寸，即浓度滴定

# 样品浓度下限

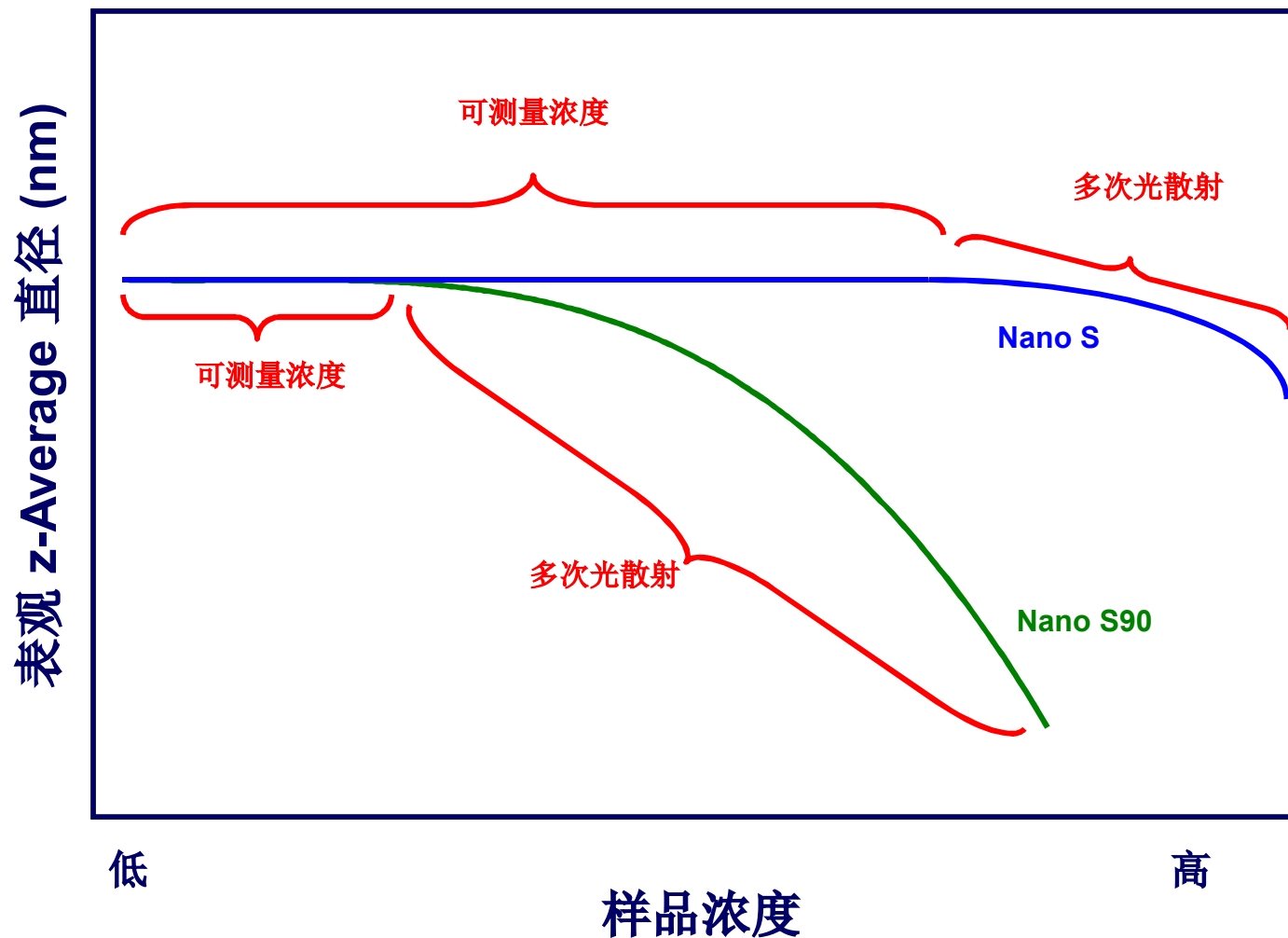
依赖于：

- 粒子相对于溶剂产生的剩余光散射强度
  - 折光指数
  - 样品浓度
- 仪器敏感度
  - 激光强度和波长
  - 检测器敏感度
  - 仪器的光学构造

# 样品浓度上限

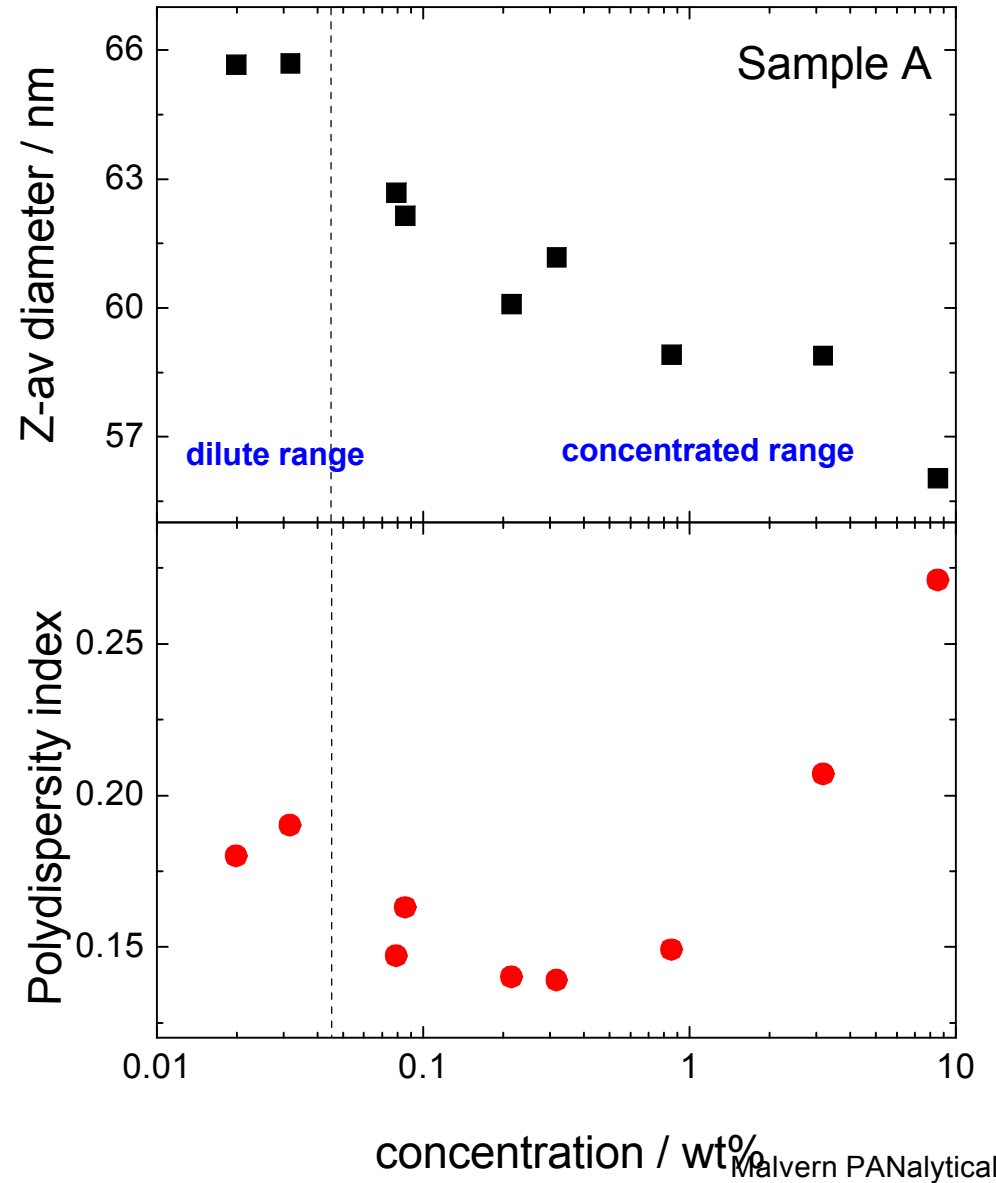
- 对于高浓度样品，由动态光散射测得的表观尺寸可能会受到不同因素的影响
  - 多重光散射 – 检测到的散射光经过多个粒子散射
  - 扩散受限 – 其他粒子的存在使得自由扩散受到限制
  - 聚集效应 – 依赖于浓度的聚集效应
  - 应电力作用 – 带电粒子的双电层相互重叠，因而粒子间有不可忽视的相互作用。这种相互作用将影响平移扩散

# 样品浓度上限



# 样品浓度上限

二氧化硅浆料的粒径以及多分散指数随浓度的变化



## 推荐样品浓度

粒子尺寸	最小推荐浓度		最大推荐浓度	
	Nano S90/ZS90	Nano S/ZS	Nano S90/ZS90	Nano S/ZS
< 10nm	5mg/ml	0.5mg/ml	Only limited by the sample material interaction (gelation, aggregation)	Only limited by the sample material interaction (gelation, aggregation)
10nm to 100nm	1mg/ml	0.1mg/ml	0.1% w/v	5% w/v (assuming a density of 1gcm <sup>-3</sup> )
100nm to 1μm	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.01% w/v	1% w/v (assuming a density of 1gcm <sup>-3</sup> )
> 1μm	1mg/ml	0.1mg/ml	0.1% w/v	1% w/v (assuming a density of 1gcm <sup>-3</sup> )

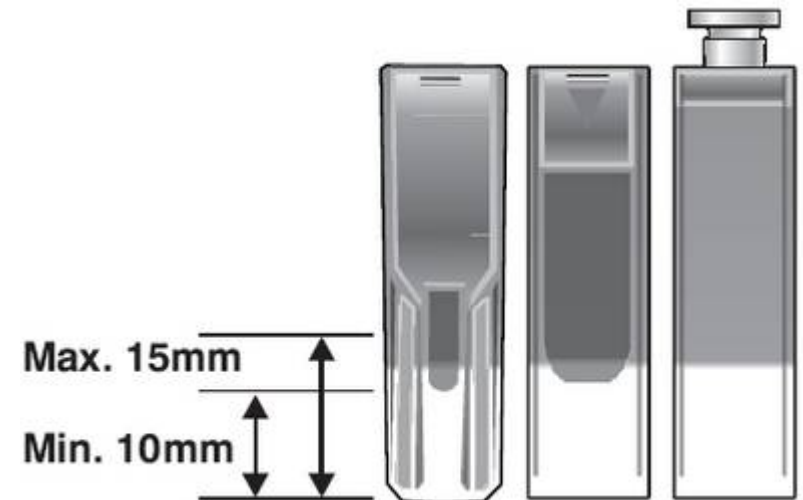
Malvern

# 动态光散射 Dynamic Light Scattering

样品制备和仪器验证

# 注入溶液

- 只用干净的样品池！
- 缓慢注入溶液以避免气泡
  - 使用滴液管，同时倾斜样品池
- 如果使用注射管滤膜过滤样品，请放弃开始的几滴溶液以避免在滤膜下面的灰尘进入样品池
- 用盖子将样品池封住



# 样品制备:稀释

- 如果样品浓度很高，则需要将溶液稀释
- 稀释样品时须注意保证保持样品原来的性质，如吸附在粒子表面的物质和原溶液之间的化学/物理平衡
- 稀释溶液应和原来的样品溶液保持相同的性质
- 如果样品很多，稀释液可以由过滤或者离心原来的样品溶液除去溶质而得到
- 如果样品很少，稀释液应尽量按原溶液性质制备

## 样品制备:过滤

- 灰尘是光散射实验最主要的问题之一，灰尘的存在可能导致测试失败
- 为了避免灰尘的影响，样品溶液在测试之前应该被适当的过滤
- 商业化的注射管过滤膜网眼的尺寸通常从  $1\mu\text{m}$  到  $20\text{nm}$

## 样品制备：超声

- 如果使用得当是非常有用的技术。对矿物样品(如TiO<sub>2</sub>)可很有效的应用超声技术。
- 某些材料(e.g. 炭黑)的粒度与超声的功率与时间紧密相关
- 一般粉体材料的分散都需要用到超声来分散
- 乳液不能用超声

# 仪器验证



- 动态光散射Dynamic light scattering是一种绝对的测试方法，因此仪器本身不需要校准
- 但仪器可以通过验证来确认仪器的状态
- 验证可通过测量标样（聚苯乙烯乳液）来完成

# 验证



- 聚苯乙烯乳液标样 (通常 60nm)
- 标准样品需用10mM NaCl溶液稀释

# Malvern

## 动态光散射

### 数据处理

### Zetasizer Nano 系列

# 数据处理



- 实验得到的原始数据对于之后的计算分布的运算过程非常重要
- 原始数据的质量越好，所得结果的重复性越好
- 为了有助于更好的解释实验数据，马尔文建议观看不同的报告页，并将实验参数加入DTS软件中的默认选项中，显示在报告中

# 数据处理



- 报告
  - 专家建议报告 (Expert Advice Report)
  - 尺寸质量报告 (Size Quality Report)
  - 相关曲线报 (Correlogram Report)
  - 累计距拟和报告 (Cumulants Fit Report)
  - 多指数拟和报告 (Multimodal Fit Report)

- 报告
  - 专家建议报告（Expert Advice Report）
  - 尺寸质量报告（Size Quality Report）
  - 相关曲线报（Correlogram Report）
  - 累积距拟和报告（Cumulants Fit Report）
  - 多指数拟和报告（Multimodal Fit Report）
- 参数
  - 平均光强（Mean Count Rate）
  - 截距（Measured Intercept）
  - 检测位置（Measurement position）
  - 累积距拟和误差（Cumulants fit error）
  - 多指数拟和误差（Multimodal fit error）
  - 衰减率（Attenuator）
  - 原始光强（Derived Count Rate）

## z-均直径重复性

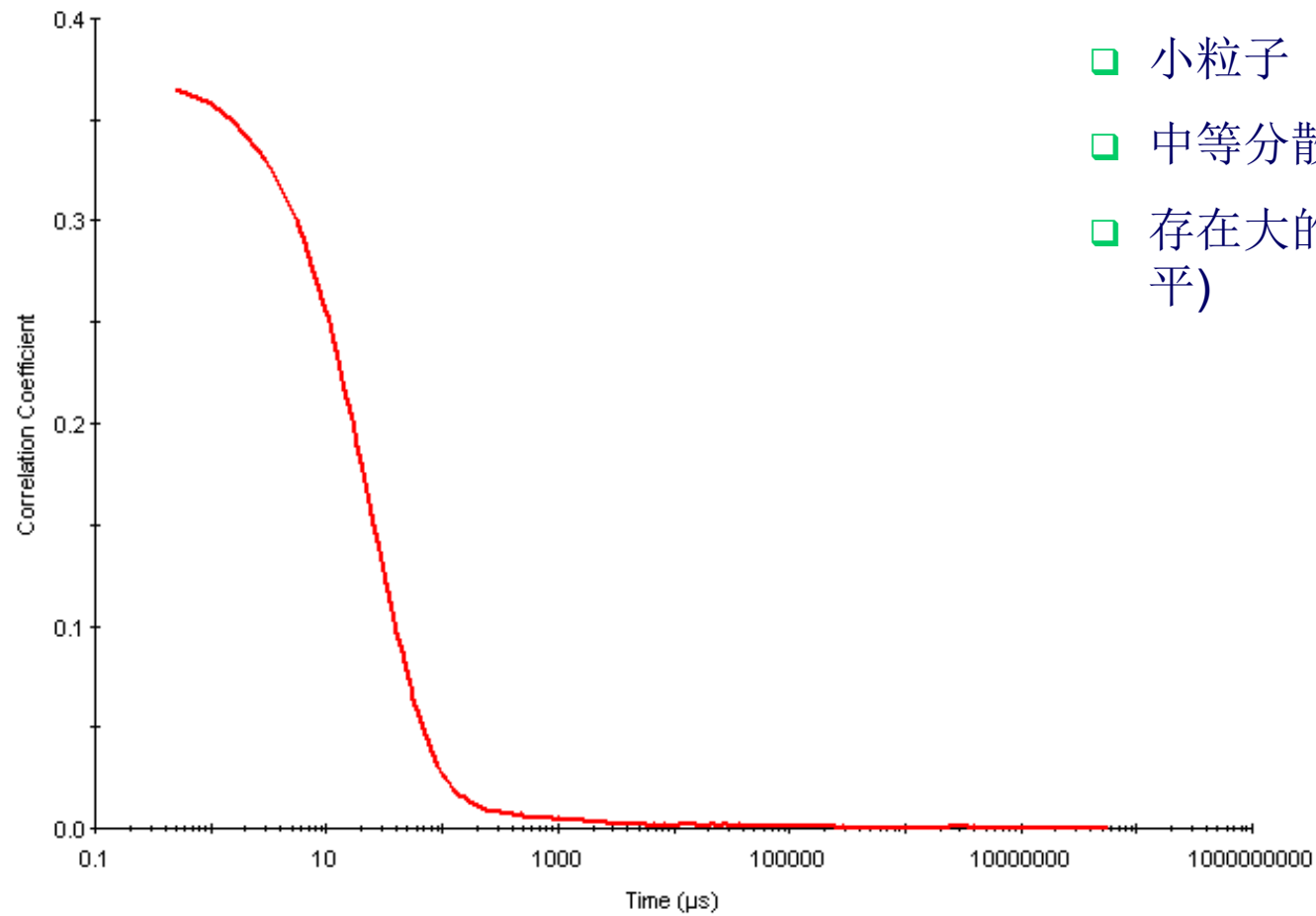


- 多次z-均直径的测试结果误差应在1%-2%之内
- z-均直径**增长**意味着:
  - 粒子聚集
  - 温度不稳定 (粘度随时间变化)
- z-均直径**下降**意味着:
  - 粒子沉淀
  - 粒子溶解
  - 温度不稳定(粘度随时间变化)

## 数据分析: 相关曲线图

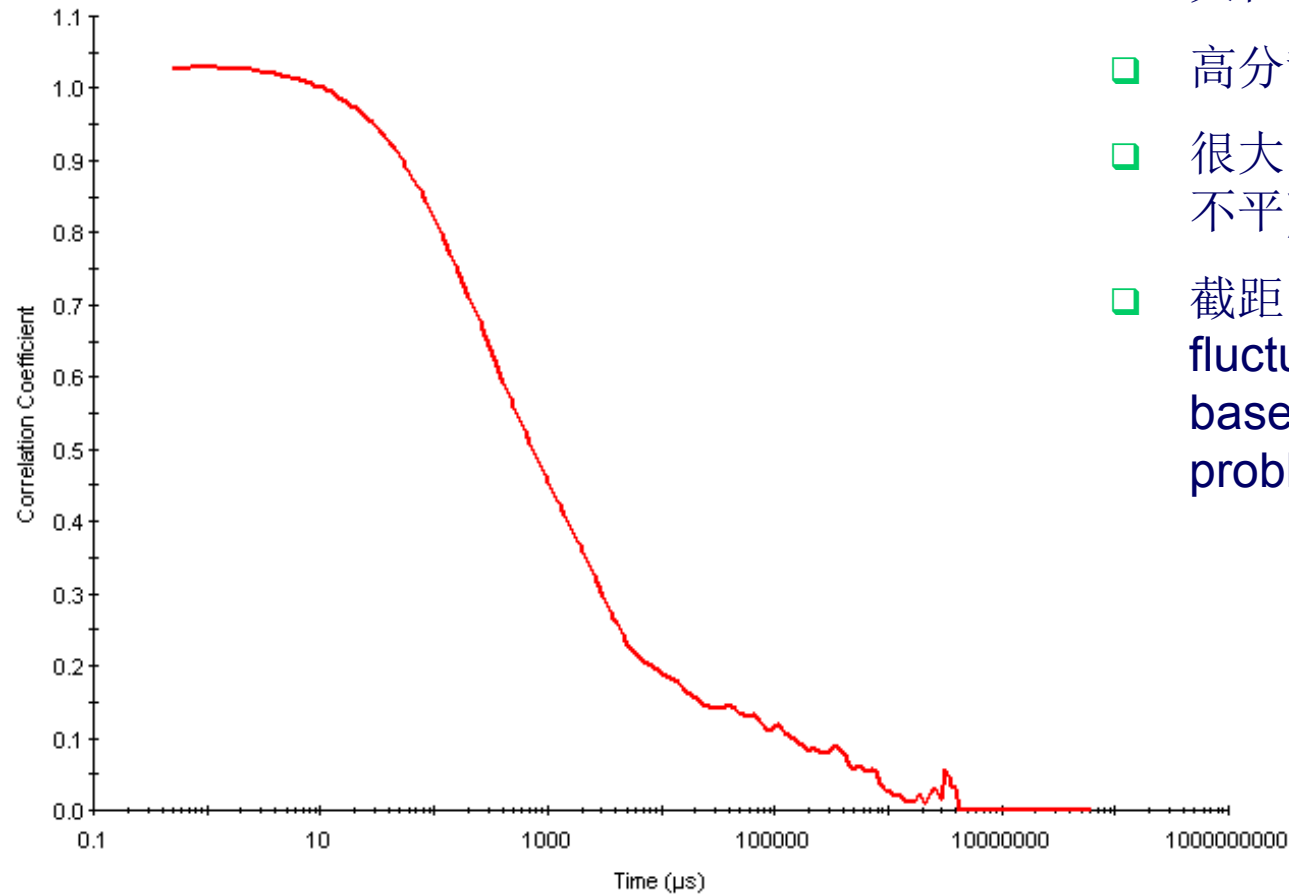
- 相关曲线图显示在特定时间段下每个通道的相干性，其中包含样品的信息
- 曲线的形状能够显示一些可能出现的明显的问题
- 应检查相关曲线中的噪音状况
- 噪音可由不同原因造成-光强太弱，样品不稳定，或者一些外部原因如散射光和其它杂散光源的相互干涉

# 数据分析: 相关曲线图



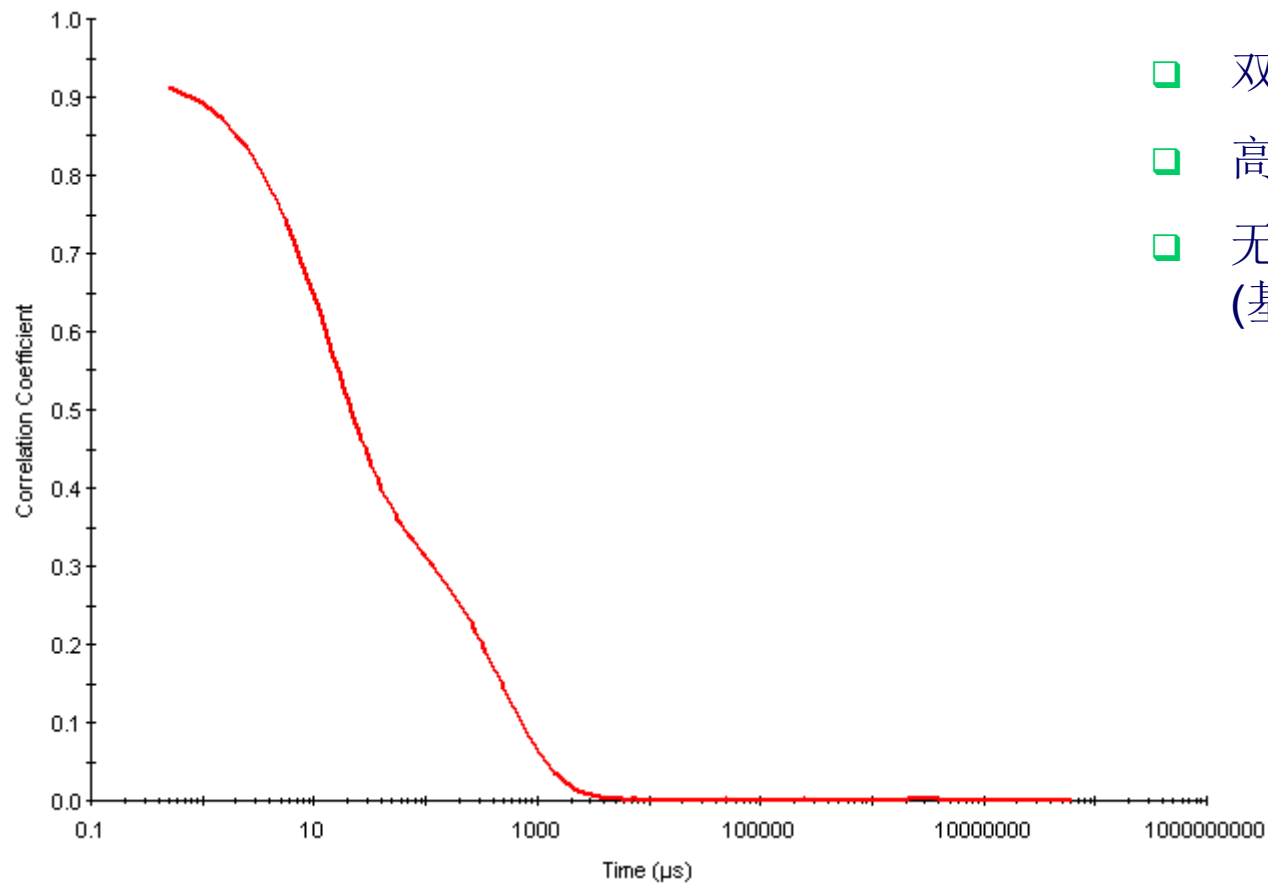
- 小粒子
- 中等分散指数
- 存在大的粒子/缔合 (基线不平)

# 数据分析: 相关曲线图



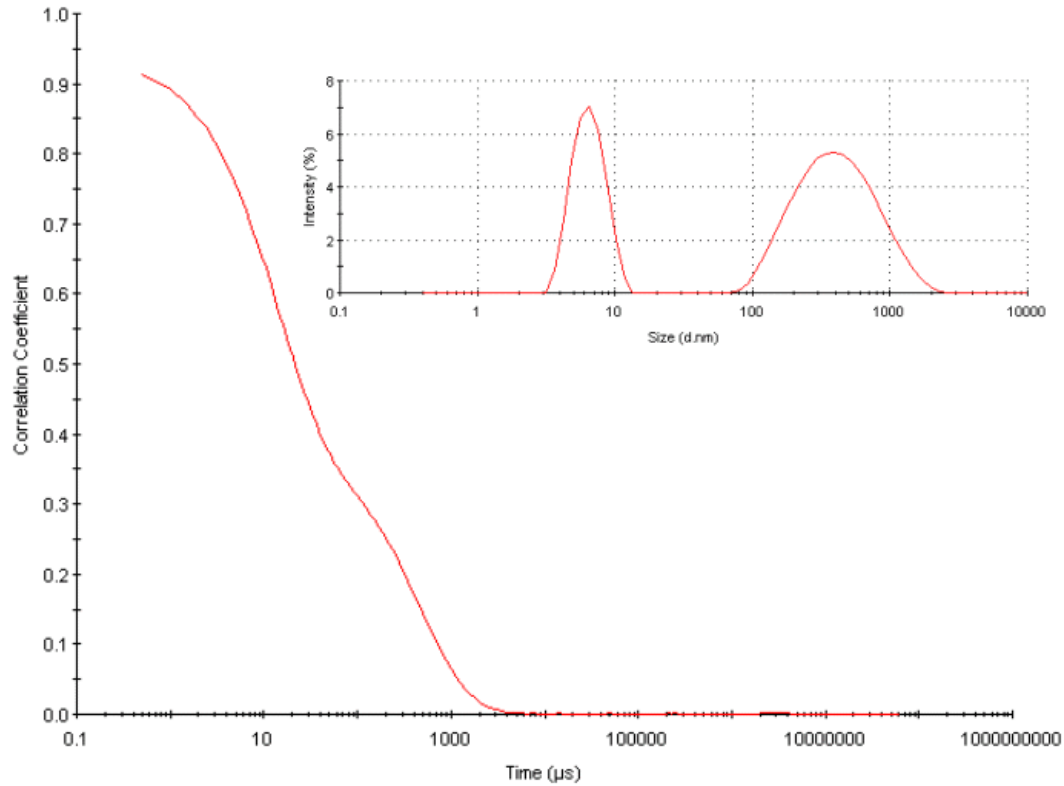
- 大粒子
- 高分散指数
- 很大的粒子/缔合物 (基线不平)
- 截距 > 1.0 (number fluctuations causing baseline definition problems)

# 数据分析: 相关曲线图



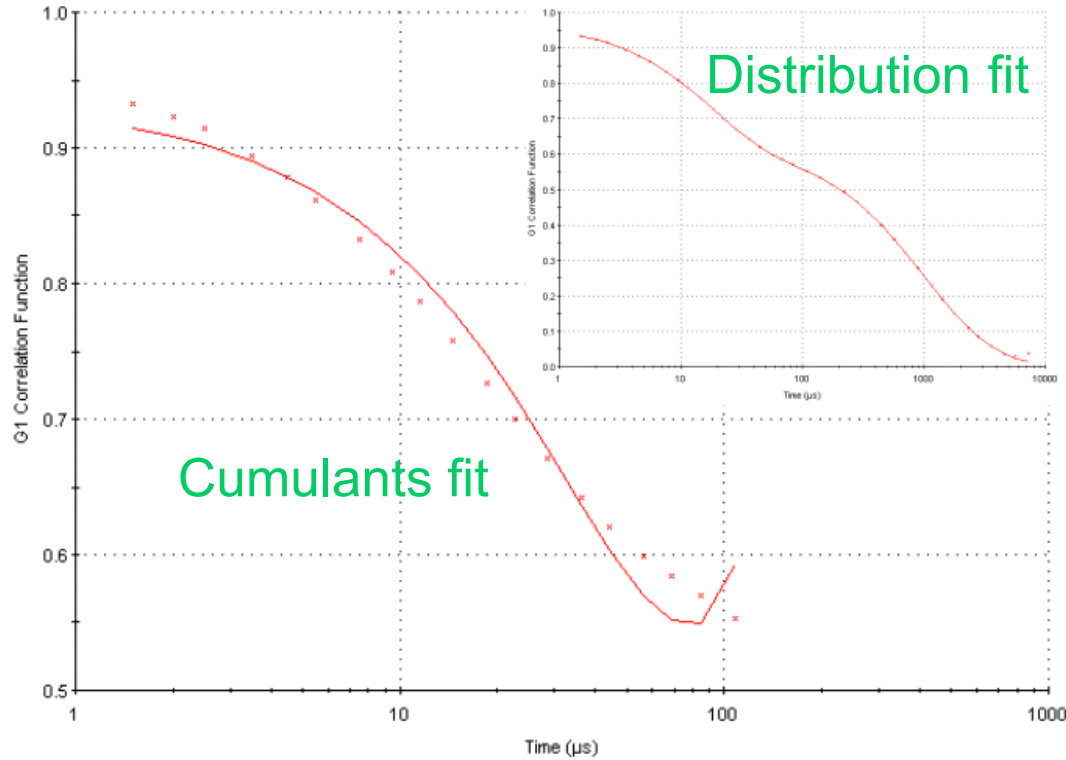
- 双峰分布
- 高分布指数
- 无大粒子/缔合物 (基线平)

# 累积距/分布拟和报告



- 双分布样品的相关曲线和光强分布
- 尺寸质量报告给出的对于累积距法的拟和误差说明测得的z-均直径 (301nm) 并不可靠

# 累积距/分布拟和报告



- 由于双分布累积距拟和的结果很不好，然而分布拟和的结果非常好
- 因此，尽管这个测试的z-均半径不可靠，但是光强尺寸分布是很准确地

# 尺寸质量报告



- 对于任何选择的测试纪录，尺寸质量报告包含**12**步检测步骤
- 如果任意一步检测的结果在一个特定的范围之外，一个警告信息和一个可能原因的建议将会出现
- 如果所有的检测都通过，会出现一条 “**Result Meets Quality Criteria**” 信息

# 尺寸质量报告



检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
1 研究软件	使用适合的低尺寸分析限度检查分布分析中的结果	<b>z-average is smaller than lower size analysis limit</b>	在分布分析过程中应用错误的低尺寸分析限度	在研究软件中编辑低尺寸分析的设置
2 研究软件	使用适合的高尺寸分析限度检查分布分析中的结果	<b>z-average is larger than upper size analysis limit</b>	在分布分析过程中应用错误的高尺寸分析限度	在研究软件中编辑高尺寸分析的设置
3	检测适当的显示尺寸下限	<b>z-average is smaller than lower display limit</b>	使用错误的的显示尺寸下限	编辑显示尺寸下限
4	检测适当的显示尺寸上限	<b>z-average is larger than the upper display limit</b>	使用错误的的显示尺寸上限	编辑显示尺寸上限

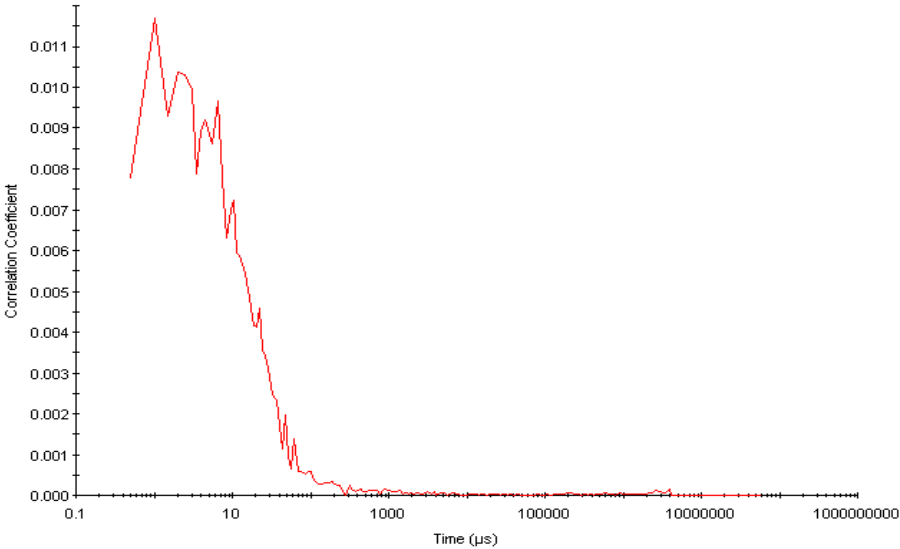
# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
5	检测分散系数数值 (分散系数 > 1 ?)	Polydispersity index is very high	样品分散度很大，可能不适合DLS测试	DLS技术可能不适用于此样品
			样品中有灰尘或是大的缔合物	通过过滤和离心除去灰尘大的缔合物
			错误的测试位置 (只应用于 Nano S/ZS)	优化测试位置

# 尺寸质量报告

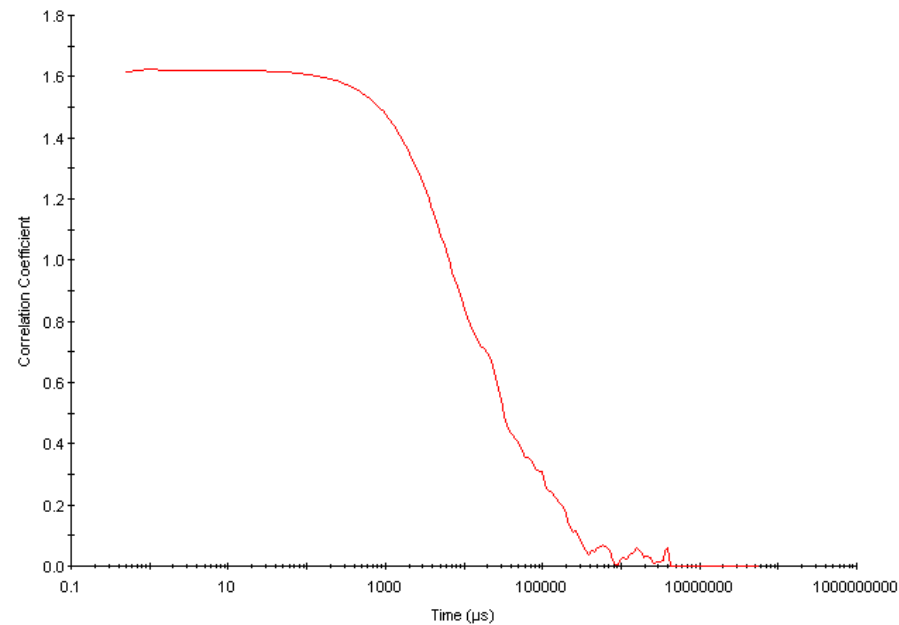
检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
6	检查相关曲线的截距  (截距 <0.1 或 >1.0 ?)	Correlation function intercept out of range	样品浓度太高 (多次散射)	稀释样品
			样品浓度太低	增加样品浓度重新检测
			样品荧光	使用窄波长滤波片
				使用不同波长的激光
			样品吸收光强	使用不同波长的激光
			错误的测试位置 (只应用于 Nano S/ZS)	优化测试位置
样品中有非常大的粒子 (基线不回零), 可能不适用于动态光散射方法	通过过滤和离心除去灰尘大的缔合物			

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	Warning Message	Possible Reasons For Warning Message	Possible Actions
6	检查相关曲线的截距  (截距 <0.1 或 >1.0 ?)			<ul style="list-style-type: none"> <li>❑ 发射荧光的样品的相关曲线</li> <li>❑ 注意到截距值为0.011</li> <li>❑ 在Nano 系列中可使用窄波长的滤波片来提高信号质量</li> <li>❑ 如果以上办法不能显著提高信号质量，那么就要使用不同波长的激光作为光源</li> </ul>

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述
6	检查相关曲线的截距  (截距 <0.1 或 >1.0 ?)



- 由一个有很大，且沉淀的粒子的溶液测得的相关曲线。数量波动引起相干效应。
- 大粒子的存在导致了基线定义问题，并且导致截距值大于1.0

# 尺寸质量报告

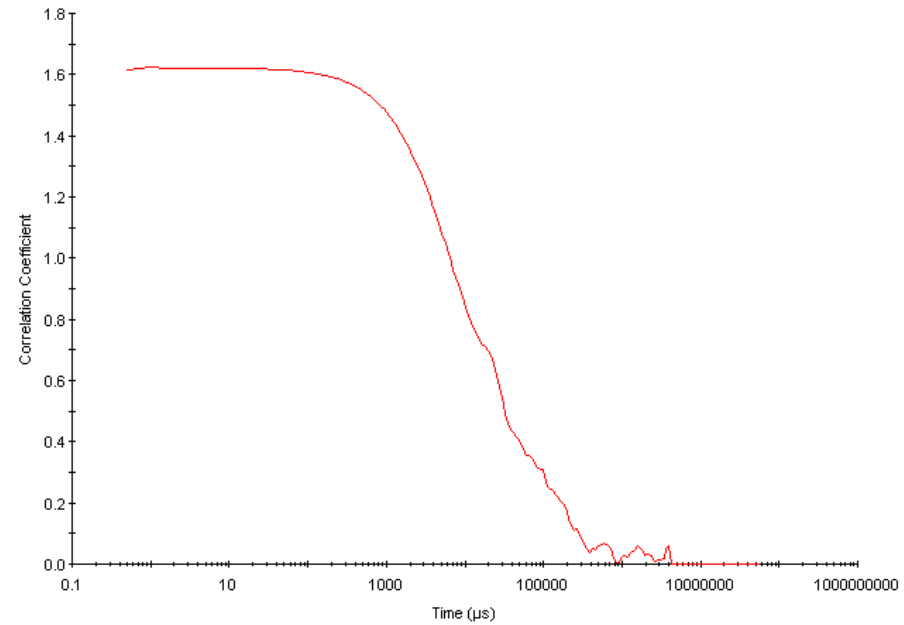
检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
7 研究软件	检查相关曲线前几个点针对与多指数模型的选择  (第一个相关测试点 >3 并且 z-均直径 <5nm ?)	Check first correlation point selection for multimodal analysis	仅应用于研究模式的软件。检测相关曲线前几个点的选择是否适合粒子尺寸的分布范围	编辑在分布分析中第一个点的时间位置，重新分析原始数据

## 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
8	检测在范围内的值 ( $< 90\%$ ?)	The in range figure is low	大粒子或者粒子沉淀	通过过滤和离心除去灰尘大的缔合物
			样品产生荧光	使用窄波长滤波片 使用不同波长的激光
			样品吸收照射光	使用不同波长的激光

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述
8	检测在范围内的值 ( $< 90\%$ ?)



- 由一个有很大，且沉淀的粒子的溶液测得的相关曲线。数量波动引起相干效应
- 样品不适合DLS测试，除非通过过滤离心将大尺寸粒子除去

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
9a	检查平均光强 (平均光强 <20 kcps ?)	Count rate is out of range	衰减器没有设置为自动状态	设置为自动状态
			样品浓度太低	增加浓度, 重新测量、
			样品吸收入射光光强	使用不同波长光源
			样品在测试过程中不稳定	样品不适用于DLS技术
9b	检查平均光强 (平均光强 >1000 kcps ?)	Count rate is out of range	衰减器没有设置为自动状态	设置为自动状态
			样品中有大的粒子/缔合物/灰尘	通过过滤和离心除去灰尘大的缔合物
			样品在测试过程中不稳定	样品不适用于DLS技术

## 尺寸质量报告

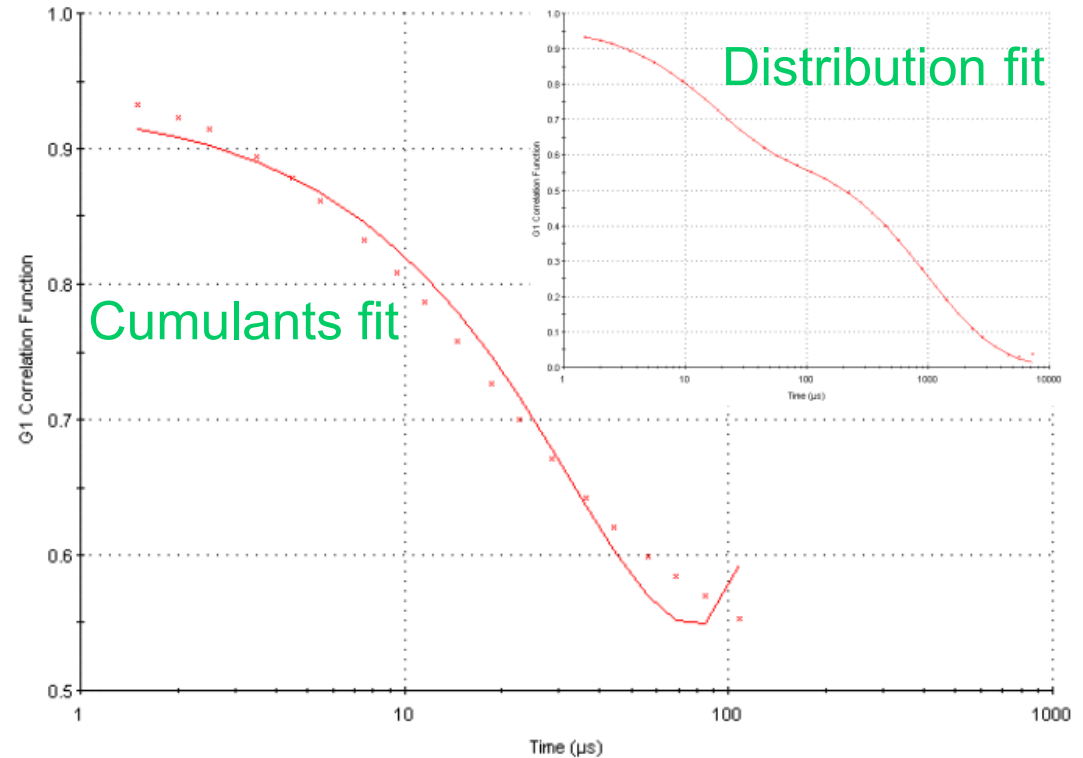
检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
10	检测是否积累了足够的数据  (累积的光子数 < 10000K ?)	Insufficient signal collected	将测试时间没有设为自动	设为自动
			衰减器没有设为自动	设为自动
			数据过滤器没有设为默认值 (50%) – 仅应用于研究软件	r在研究软件中设置过滤指数

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	警告信息	警告信息的可能原因	可以采取的措施
11	检测累积距拟和误差  (误差 >0.005?)	Cumulant fit error high	相关曲线质量不好	样品不适合 DLS 技术
			样品分布太宽	样品更适合分布分析
			在研究软件中的对于累积距拟和方法不恰当的设置	编辑设置
12	检测分布拟和误差  (误差 >0.005?)	Multimodal fit error high	相关曲线质量不好	样品不适合 DLS 技术
			样品分布太宽	样品不适合 DLS 技术
			在研究软件中的对于分布拟和方法不恰当的设置	编辑设置

# 尺寸质量报告

检测步骤	检测描述	警告信息
11	检测累积距拟和误差  (误差 >0.005?)	Cumulant fit error high
12	检测分布拟和误差  (误差 >0.005?)	Multimodal fit error high



- 由于样品的多分散性，累积距拟和结果很差，然而分布拟和的结果很好
- 因此，尽管这个测试的z-均半径不可靠，但是光强尺寸分布是很准确地

# Nano 软件中的数据分析



- Zetasizer Nano 软件提供不同的报告类型，（如尺寸质量，电位质量等等）和参数（如拟和误差）来帮助用户解释数据和结果
- 尺寸质量报告
  - 对于任何一个被选择的测试结果都有**12** 个检测步骤
- 电位质量报告
  - 对于任何一个被选择的测试结果都有**6**个 检测步骤
- 但是，这些都是测试完成后的分析报告

# 内容

- 动态光散射
- 静态光散射及分子量的测定
  - 测量原理
  - 应用实例
- Zeta 电位

# 静态光散射

## Static light scattering (SLS)

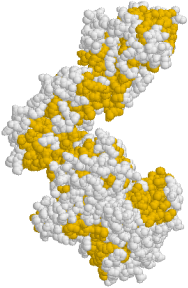
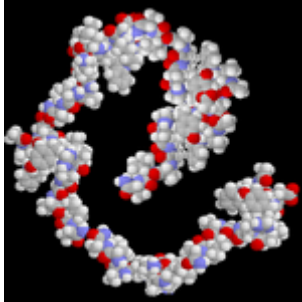
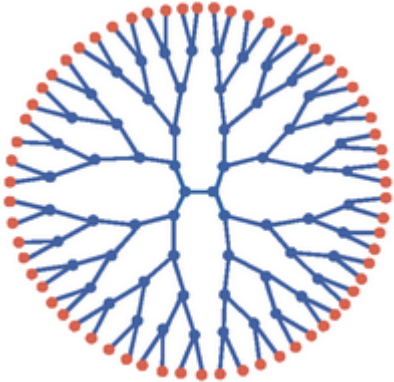
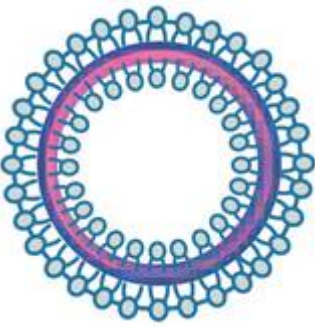
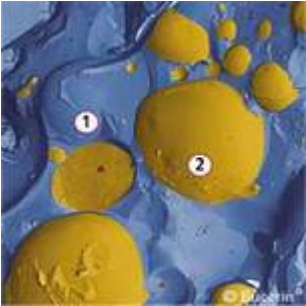
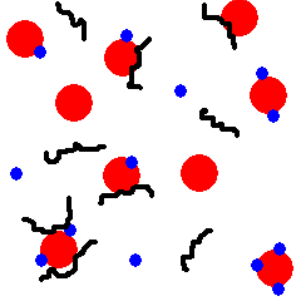


- 在静态光散射中，我们检测溶质粒子的绝对散射光强随浓度的变化
- 在Zetasizer Nano ZS中，我们在一个角度检测光强
- 通过Debye曲线我们可以测量
  - 绝对分子量
  - 第二维利系数

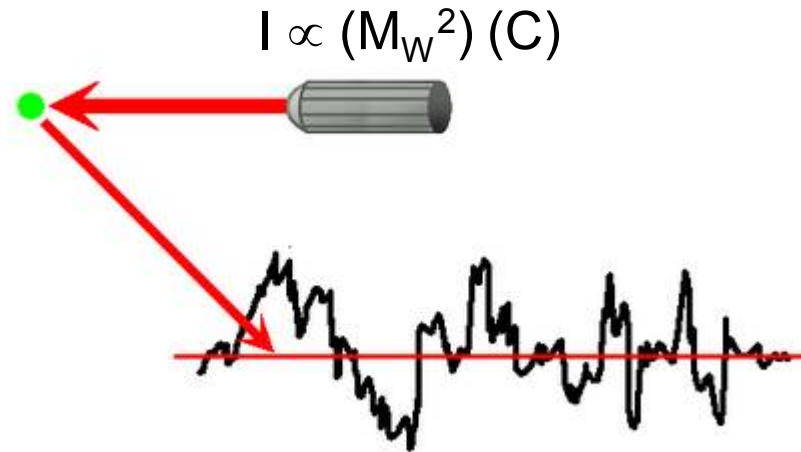
## 第二维利系数 2nd virial coefficient ( $A_2$ )

- 一个热力学性质，形容溶质和溶剂间的相互作用
- 当  $A_2 > 0$ , 溶质分子稳定的存在于溶剂中
- 当  $A_2 = 0$ , 溶质分子和溶剂分子的相互作用等同于溶质分子内部相互作用被称为 **theta** 溶剂条件
- 当  $A_2 < 0$ , 溶质分子不能稳定存在于溶剂中，形成结晶或者聚集

# 什么样的样品适合静态光散射?

<p>YES</p>	<p>Proteins</p> 	<p>Polymers</p>  <p>Dendrimers</p> 
<p>NO</p>	<p>Liposomes</p> 	<p>Emulsions</p>  <p>Mixtures</p> 

# 静态光散射



$$\frac{KC}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2C \right) P(\theta)$$

K: 光学常数

C: 浓度

M: 分子量

$R_\theta$ : 样品的瑞利比

$A_2$ : 2<sup>nd</sup> 维利系数

$P(\theta)$ : 形态因子

# 静态光散射

$$\frac{K C}{R_{\theta}} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2 C \right) P(\theta)$$

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_o^4 N_A} \left( n_o \frac{dn}{dc} \right)^2$$

$\lambda_o$  = 激光波长

$N_A$  = 阿佛家德罗常数

$n_o$  = 溶剂折光指数

$dn/dc$  = 折光指数对浓度的增量

$$P(\theta) = 1 + \frac{16\pi^2 n_o^2 R_g^2}{3\lambda_o^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$R_g$  = 均方旋转半径

$\theta$  = 检测角度

$$R_{\theta} = \frac{I_A n_o^2}{I_T n_T^2} R_T$$

$I_A$  = 绝对光强 ( $I_{\text{样品}} - I_{\text{溶剂}}$ )

$n_o$  = 溶剂

$I_T$  = 标准物光强 (toluene)

$n_T$  = 标准物 (toluene) 折光指数

$R_T$  = 标准物瑞利比 (toluene)

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2C \right) P_{\theta}$$

对于瑞利散射,  $P(\theta) = 1$  因此方程被简化

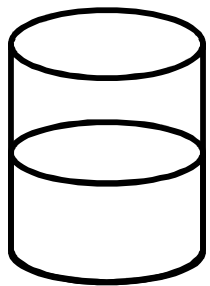
Debye 曲线

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2C \right) \quad (y = mx + c)$$

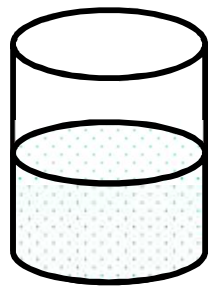
因此从  $KC/R_{\theta}$  对浓度做曲线, 截距值为分子量的倒数  $1/M$ ,  
斜率为第二维利系数  $A_2$

# 样品制备

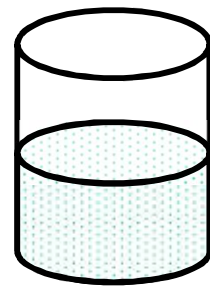
- 在适合的溶剂中，制备一系列已知准确浓度的样品溶液
- 具体浓度依赖于所测量的样品，一般在0.1-10g/L



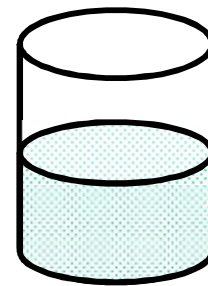
溶剂



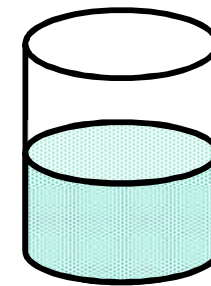
1



2



3

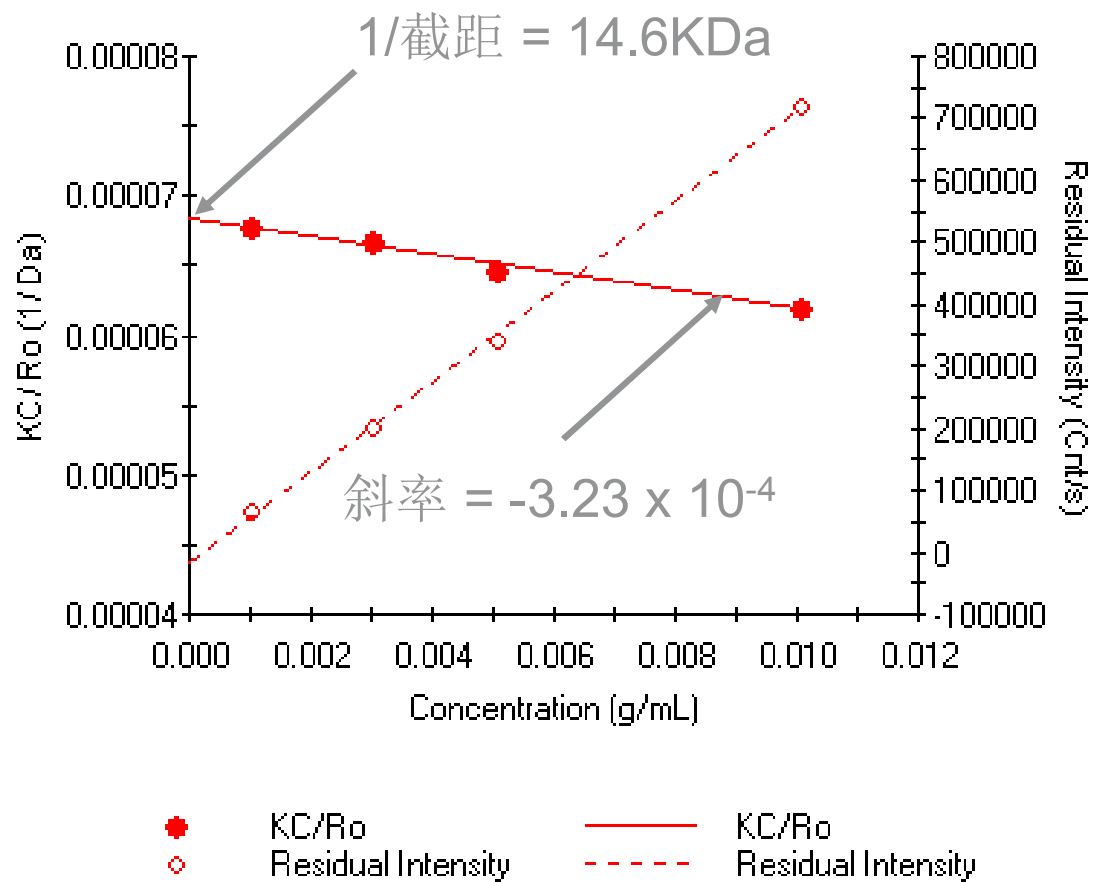


4

# 样品制备

- 所有使用的玻璃容器，吸液管，样品池，溶剂，均应无尘
- 用过滤膜过滤所有的溶剂，分散剂 (e.g. Whatman Anotop 20nm pore size filters)

# 分子量测定应用实例 (Lysozyme in PBS)



# 内容



- 动态光散射
  
- 静态光散射及分子量的测定
  
- **Zeta** 电位
  - **Zeta**电位基本理论
  - 测量原理
  - 样品制备与仪器验证
  - 软件设置
  - 数据解释

Malvern

# Zeta电位 Zeta Potential

Zeta电位基本理论

# 胶体介绍



- › 物质的三态：气、固、液
- › 如果其中一相很细的分散在另一相中，我们称为胶体体系

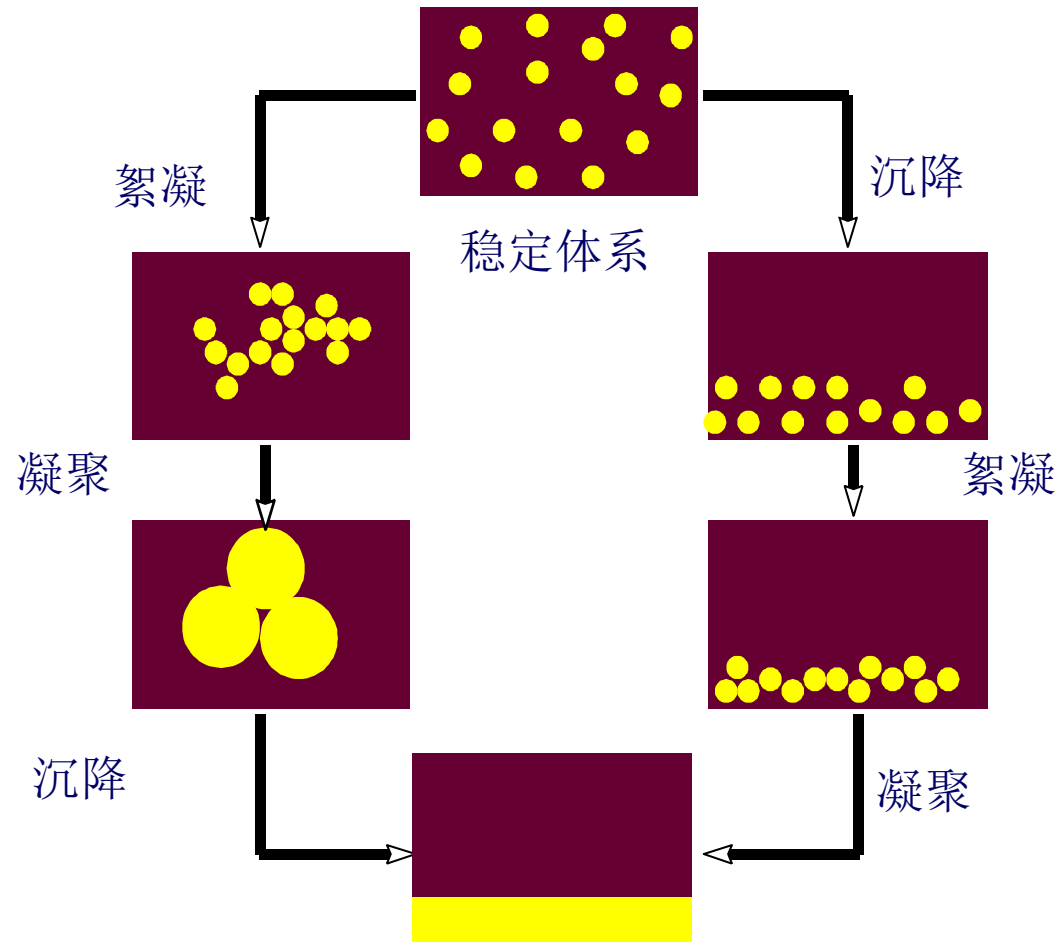
# 胶体体系举例

- › 气溶胶 (aerosols) – 细小液滴或微小固体颗粒分散在气体中(雾、烟)
- › 乳状液(emulsions) – 细小的油滴分散在水相中(牛奶)
- › 反相乳状液(inverse emulsions) – 细小水滴分散在非水相中(原油)
- › 胶体悬浮液(sols or colloidal suspensions) – 微小颗粒分散在液相中(漆, 泥浆)
- › 凝胶(gels) – 大分子分散在液相中
- › 胶束(association colloids) – 表面活性剂分子在水中集成胶束

# 胶体体系

- › 在分散体中的颗粒可能生成聚合体而变成大颗粒沉淀
- › 新形成的集合体称为絮状物（FLOC），其过程称为絮凝（FLOCCULATION） - 其过程是可逆的(DEFLOCCULATION)
- › 如果集合体变成更紧密的聚合体，其过程称为凝聚（COAGULATION） - 其过程是不可逆的

# 造成分散体系不稳定的机理



## 胶体稳定性: DLVO理论

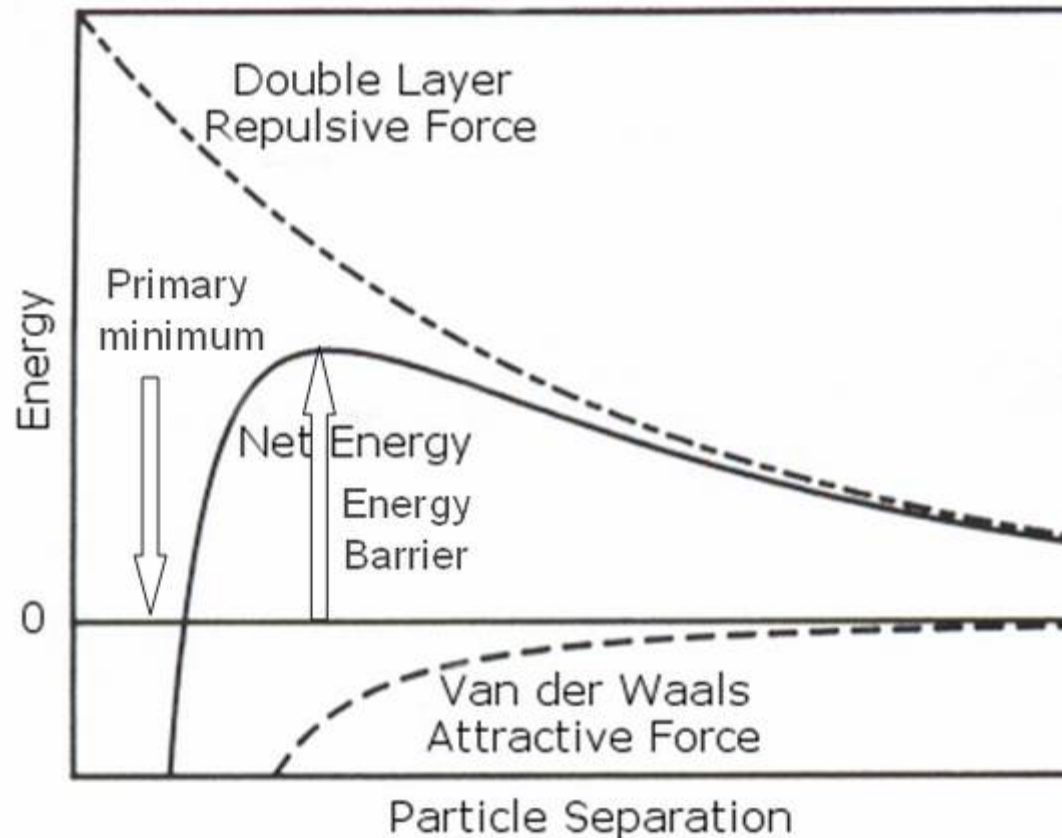
- › 在1940年代Derjaguin, Landau, Verwey与Overbeek 提出了描述胶体稳定的理论
- › 认为胶体体系的稳定性是当颗粒相互接近时它们之间的双电层斥力与范德华作用力的净结果

# 胶体稳定性: DLVO理论

- › 此理论提出当颗粒接近时颗粒之间的能量障碍来自于互斥力
- › 当颗粒有足够的能量克服此障碍时，互吸力将使颗粒进一步接近并不可逆的粘在一起
- › 如果颗粒有足够高的互斥力，它们之间不会生成絮凝 (胶体稳定)
- › 如果没有互斥机理，絮凝与凝结终究会发生 (胶体不稳定)
- › 如欲维持胶体稳定，互斥力必须占主导

## 分散体系的稳定性

- 胶粒分散体系的稳定性取决于粒子间短程吸引力（范德华力）和远程排斥力（静电力）之和
- 胶粒分散体系的可以通过不同机制失去稳定性

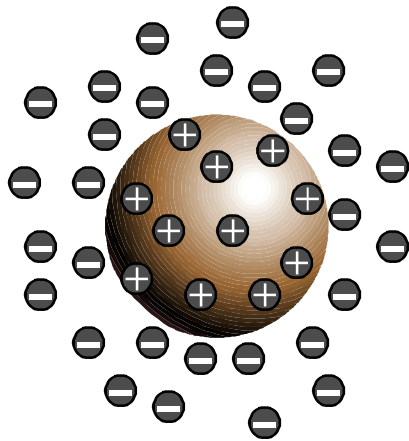


# 维持分散体系的稳定性

- 粒子稳定的存在于溶液中主要基于以下两种机制:

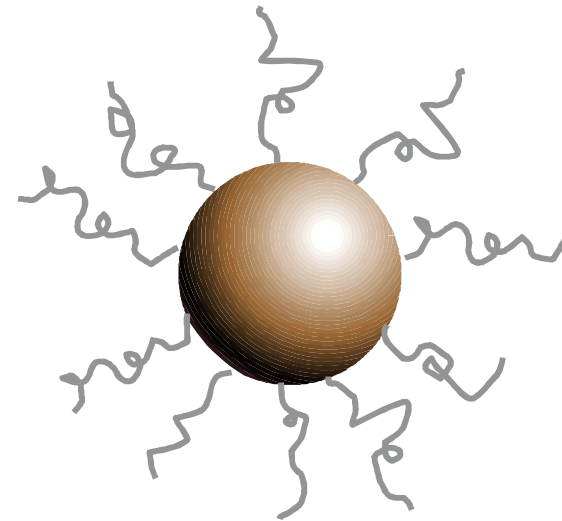
## 静电力排斥 (ELECTROSTATIC)

- ▶ 容易测量控制参数 (Zeta电位)
- ▶ 可逆
- ▶ 只需要改变PH值或者离子浓度



## (位阻效应) STERIC

- ▶ 简单, 但选择不多
- ▶ 不可逆
- ▶ 要加入其他物质



# 水溶液中表面电荷的产生

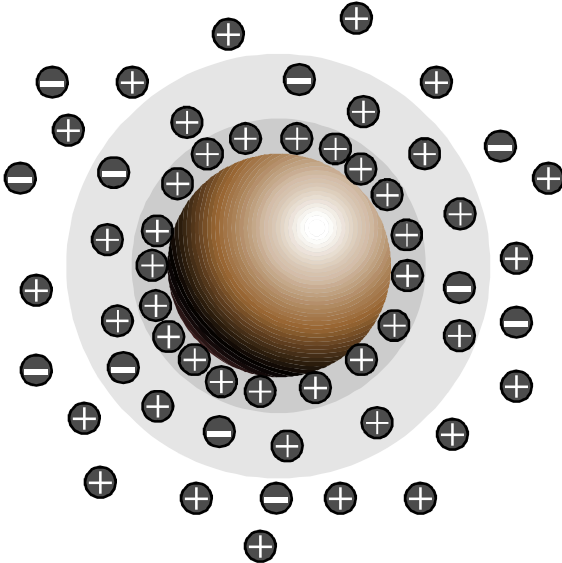


- 大部分水溶液中的胶体系统带一定量的电荷
- 电荷的产生机制有很多取决于粒子的材料和介质的性质
  - 表面基团的离子化
  - 粒子表面有失去离子的趋势
  - 粒子的表面能够吸收离子或者离子性表面活性剂
- 表面电荷导致在粒子周围离子浓度的增加

## 双电层

- 在颗粒表面的电荷变化会影响离子在界面的分布，造成表面周围平衡离子的浓度增加
- 这样，在每一颗粒周围生成一个双电层

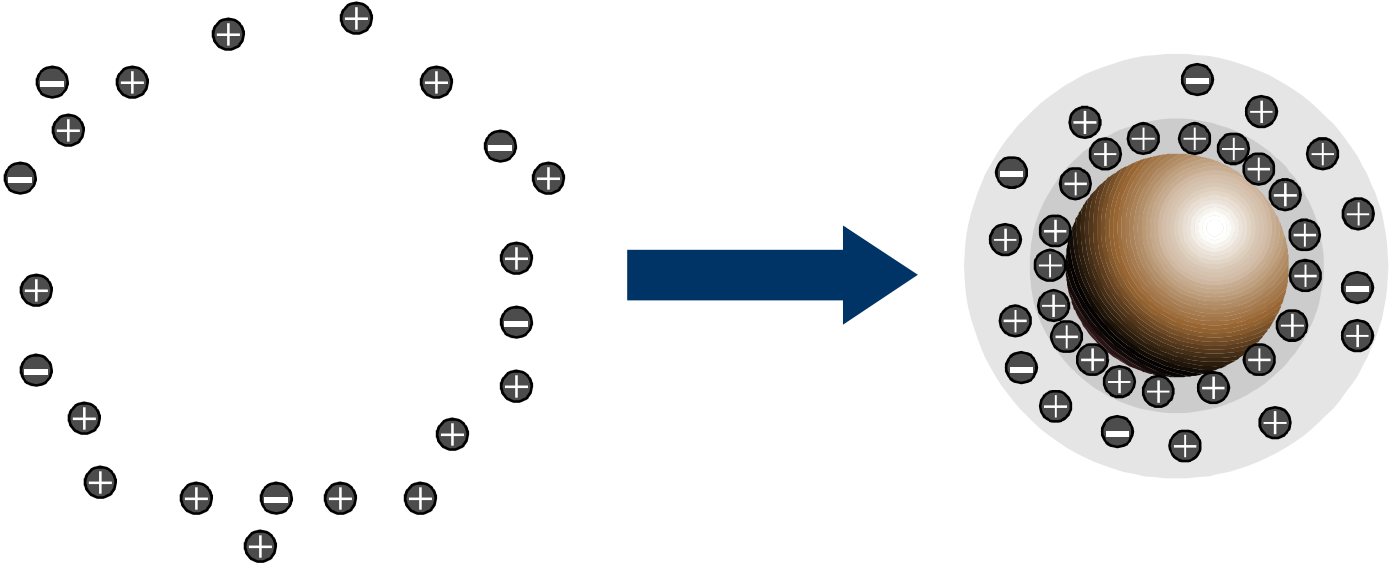
# Zeta电位(Zeta Potential)



# Zeta电位(Zeta Potential)

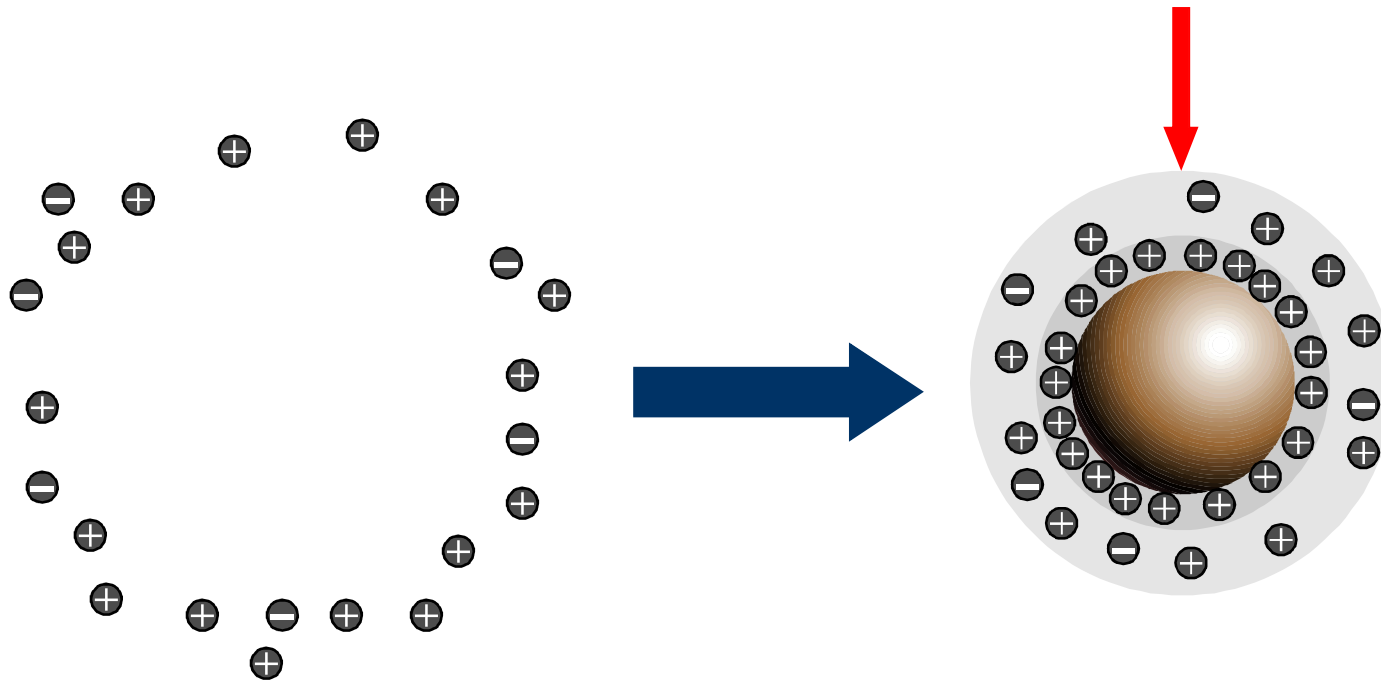


PANalytical

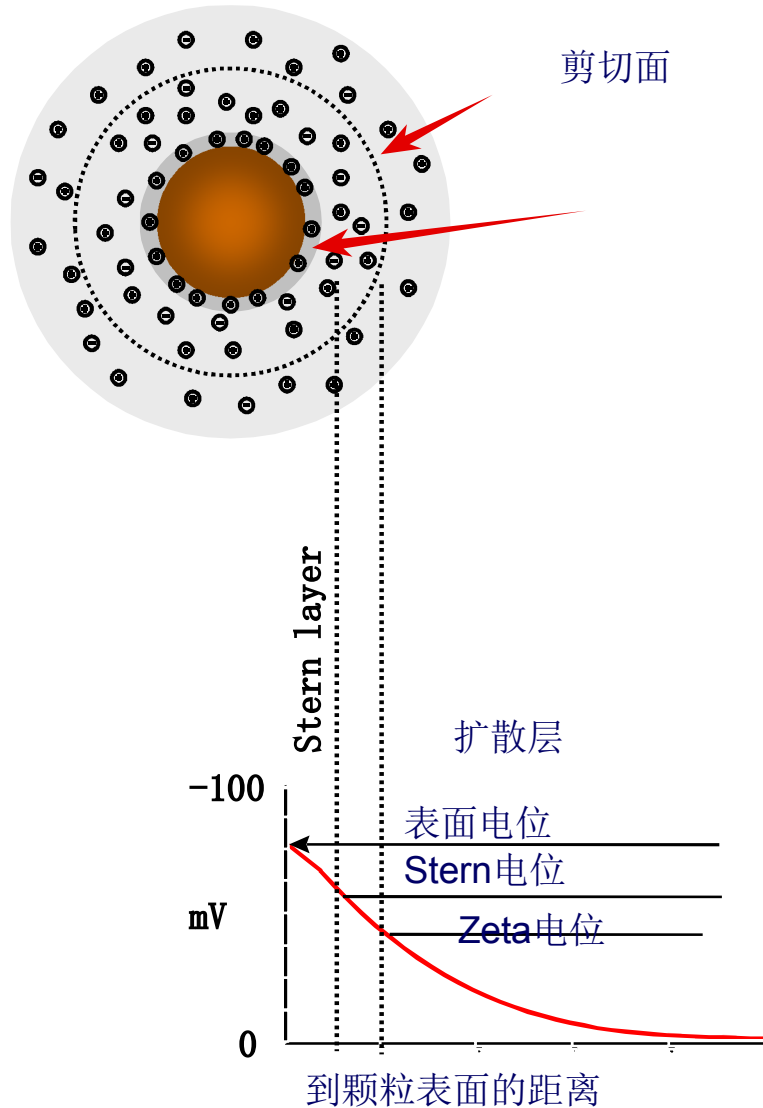


# Zeta电位(Zeta Potential)

Zeta电位是在滑移层的电势  
(剪切的流体动力学平面)



# 什么是Zeta电位?



Zeta电位是与一个颗粒在某一特定介质中所带的总电荷有关

确切地说,是颗粒在剪切面处的电位

与颗粒表面与分散介质有关

微小的pH或离子浓度变化可能会产生很大的zeta电位变化

剪切面的位置变化也会影响Zeta电位

## Zeta电位与分散体系的稳定性

- › **Zeta**电位可用来作为胶体体系稳定性的指示，是粒子间静电力相互作用的标尺，可以被用来预测分散体系的稳定性以及存储时间
- › 如果颗粒带有很多负的或正的电荷,也就是说很高的**Zeta**电位,它们会相互排斥,从而达到整个体系的稳定性
- › 如果颗粒带有很少负的或正的电荷,也就是说它的**Zeta**电位很低,它们会相互吸引,从而达到整个体系的不稳定性

## 分散稳定性与Zeta电位

- › 一般来说, **Zeta**电位愈高,颗粒的分散体系愈稳定
- › 水相中颗粒分散稳定性的分界线一般认为在+30mV或-30mV
- › 如果颗粒所带电荷高于+30mV或低于-30mV, 则该分散体系比较稳定

## 影响Zeta电位的因素

- › 分散体系的Zeta电位可因下列因素而变化：
  - pH 的变化
  - 溶液电导率的变化
  - 某种特殊添加剂的浓度,如表面活性剂,高分子
- › 测量颗粒的zeta电位随上述变量的变化可了解产品的稳定性，反过来也可决定生成絮凝的最佳条件

# Zeta电位与pH

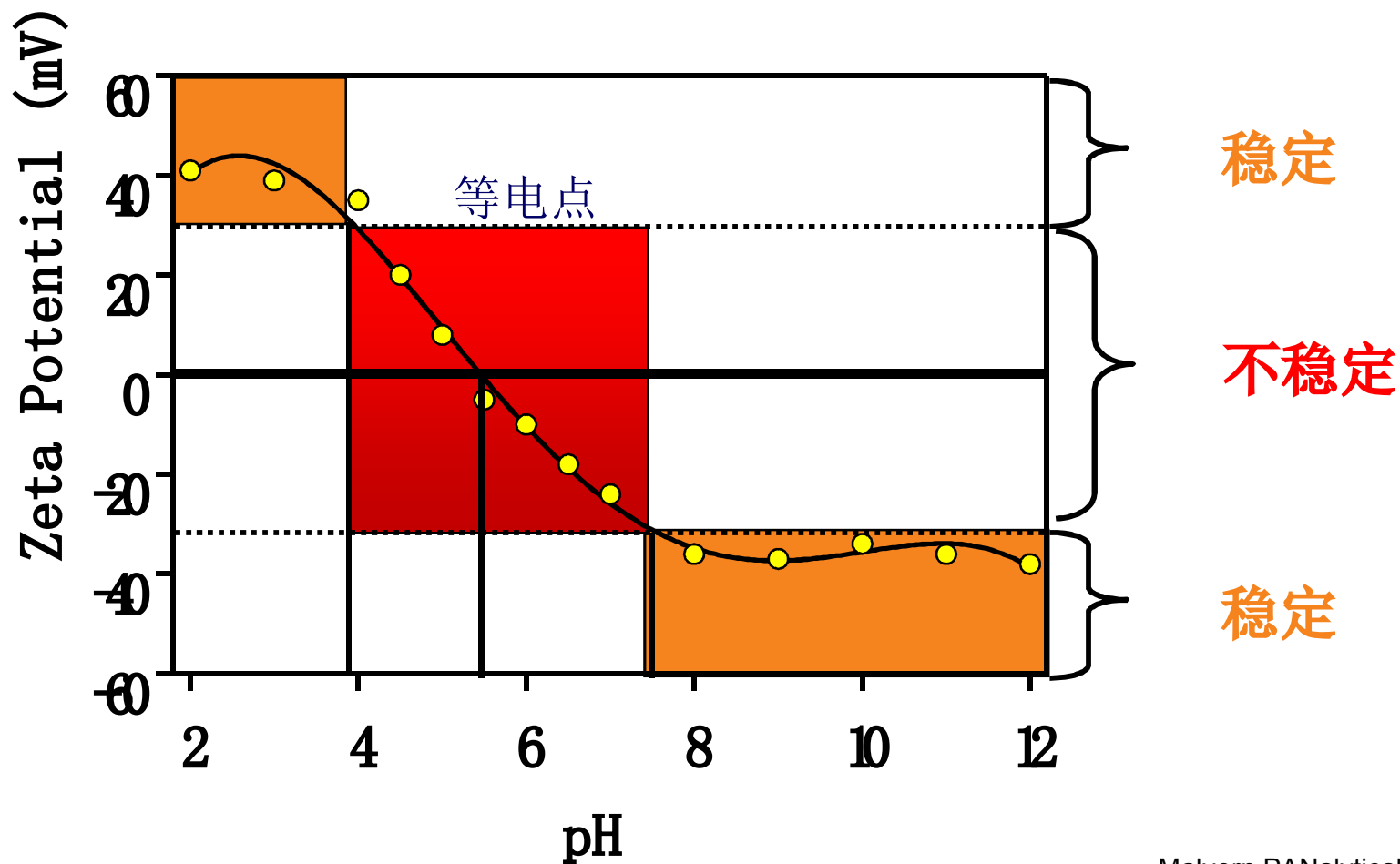
- › 影响zeta电位最重要的因素是pH
- › 假定在悬浮液中有一个带负电的颗粒
- › 假如往这一悬浮液中加入碱性物质，颗粒会得到更多的负电
- › 假如往这一悬浮液中加入酸性物质，在一定程度时，颗粒的电荷将会被中和
- › 进一步加入酸，颗粒将会带更多的正电

# Zeta电位与pH



- › Zeta电位对pH作图在低pH将是正的，在高pH将是负的
- › 这中间一定有一点会通过零zeta电位
- › 这一点称为等电点，是相当重要的一点
- › 通常在这一点胶体是最不稳定的

# 影响Zeta电位的因素:pH



## Zeta电位与电导率

- › 双电层的厚度与溶液中的离子浓度有关，可根据介质的离子强度进行计算
- › 离子强度越高，双电层愈压缩
- › 离子的化合价也会影响双电层的厚度
- › 三价离子( $\text{Al}^{3+}$ )将会比单价离子( $\text{Na}^{+}$ )更多的压缩双电层

# Zeta电位与电导率

- › 无机离子可有两种方法与带电表面相作用
  - 非选择性吸附-对于等电点没有影响
  - 选择性吸附-会改变等电点
- › 即使很低浓度的选择性吸附离子,也会对**Zeta**电位有很大的影响
- › 有时选择性吸附离子甚至会造成颗粒从带负电变成带正电,从带正电变成带负电

## Zeta电位与添加剂浓度

- › 研究样品中的添加剂浓度对产品zeta电位的影响可为研发稳定配方的产品提供有用的信息
- › 样品中已知杂质对zeta电位的影响可作为研制抗絮凝的产品的有力工具

Malvern

# Zeta电位 Zeta Potential

## 测量原理

电泳光散射

Electrophoretic Light Scattering (ELS)

激光多普勒电泳

Laser Doppler Electrophoresis (LDE)

# 电动力学效应

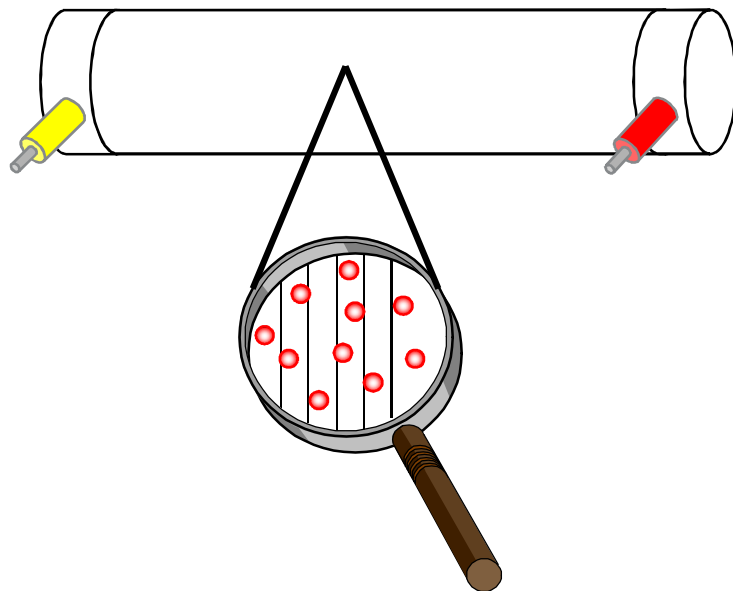
- 粒子表面带有电荷的一个重要的特性是它们会对一个存在的电场做出反应
- 这个效应被笼统地称作电动力学效应
- 依赖于运动的方式，存在有四种不同的效应

## 电动力学效应

- 电泳（**Electrophoresis**）:在施加电场下，带电粒子相对于液体介质的运动
- 电渗（**Electroosmosis**）:在施加电场下，液体介质相对于带有静止电荷的表面的运动
- 流动势能（**Streaming potential**）:当液体在外力下流过一个带有静止电荷的表面所产生的电场
- 沉淀势能（**Sedimentation potential**）:当一个带电电荷在静止液体中移动所产生的电场

# 测量 Zeta 电位

- **电泳**是在施加电场下，带电粒子相对于液体介质的运动



▶ 带电粒子以特定的速度运动，运动的速度取决于：

- ✓ 电场强度
- ✓ 介质的介电常数
- ✓ 介质的粘度
- ✓ Zeta 电位

# 电泳

Zeta电位与电泳迁移率之间由Henry方程计算

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(\kappa a)}{3 \eta}$$

$U_E$  = 电泳迁移率 ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{sec}/\text{V}$ )

$\zeta$  = zeta电位 (mV)

$\varepsilon$  = 介电常数 ( $\varepsilon_0 \varepsilon_r$ ) (F/m)

$\eta$  = 粘度 (Poise)

$f(\kappa a)$  = Henry函数

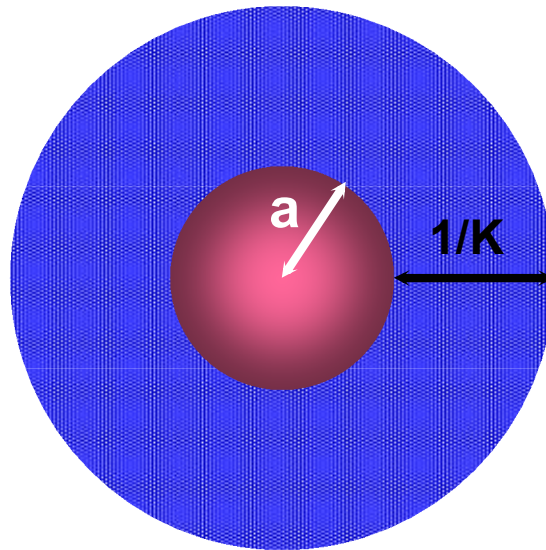
## Henry's 方程 $F(ka)$



- ›  $k$  的单位是长度的倒数,  $1/k =$  双电层厚度(德拜长度)
- ›  $a =$  颗粒半径
- ›  $ka =$  颗粒半径与双电层厚度之比

# Henry's Equation $F(ka)$

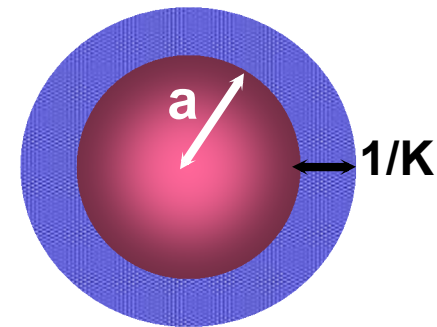
非极性溶剂



Huckel  
近似

$$F(ka) = 1.0$$

极性溶剂

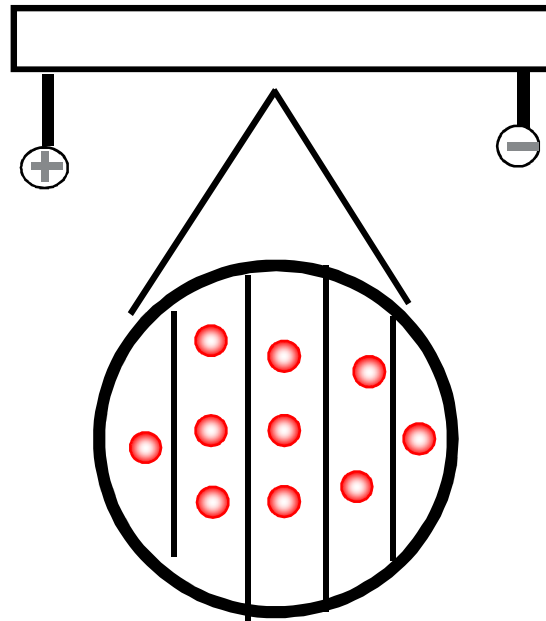


Smoluchowski  
近似

$$F(ka) = 1.5$$

## 测量电泳迁移率

- › 在样品池两端加一电场
- › 早期的电泳测量用显微镜直接观察颗粒的运动



## 测量电泳迁移率

现代方法用激光与信号处理方法

Malvern's Zetasizer 系列用电泳光散射的方法

电泳光散射用激光多普勒效应来测量带电颗粒在电场中的运动

由于颗粒的运动，散射光有频率位移

# 激光多普勒电泳

## Laser Doppler Electrophoresis

- 一束激光经过毛细管样品池中的样品。样品在外加电场的作用下进行电泳运动，因此由运动粒子发出的散射光会有频率的移动
- 频率移动  $\Delta f$  等于:

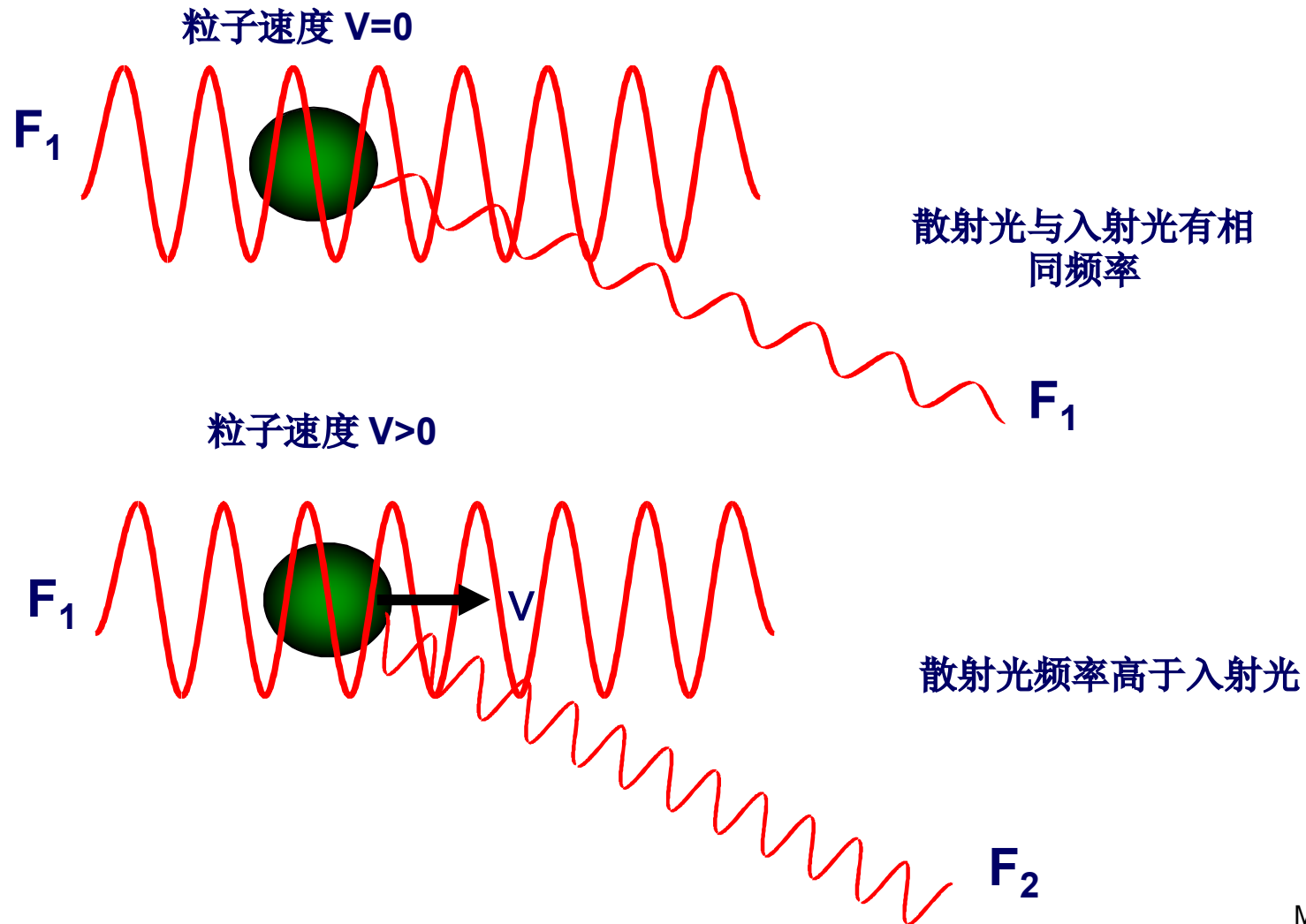
$$\Delta f = 2v \sin(\theta/2)/\lambda$$

$v$  : 粒子的速度

$\lambda$  : 激光的波长

$\theta$  : 散射角度

# 用激光多普勒电泳测量Zeta电位



# 用激光多普勒电泳测量Zeta电位

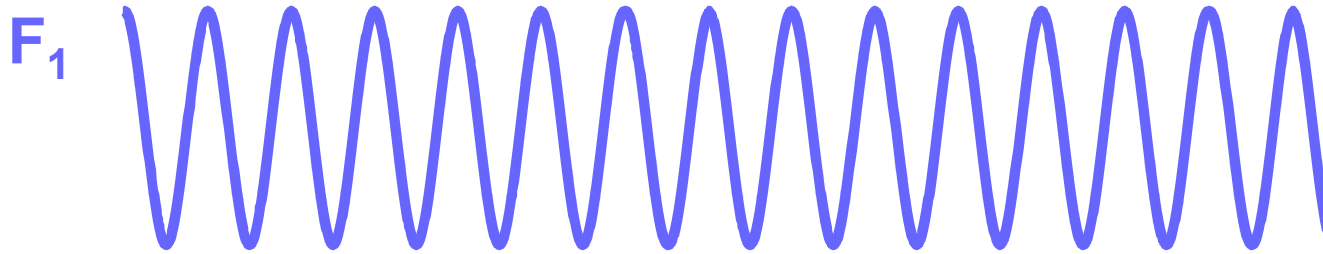
- 因为光源的频率很高 ( $10^{14}\text{Hz}$ ), 而颗粒运动引起的频率移动很小, 因此频率的移动只能通过光学混拍来测得
- 这种技术是检测从一个光源分出的两束光程几乎相同的激光相干性
- 其中一束光必须通过样品体系(这束光被称为**散射光**)
- 另一束光 (称为**参考光**)不通过样品体系
- 散射光和参考光在检测器处相干, 引起光强的波动

# 光强的波动是怎样被引发的？



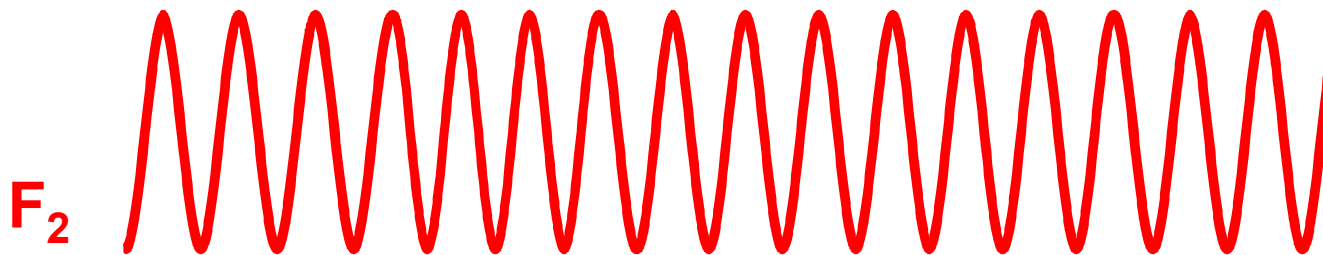
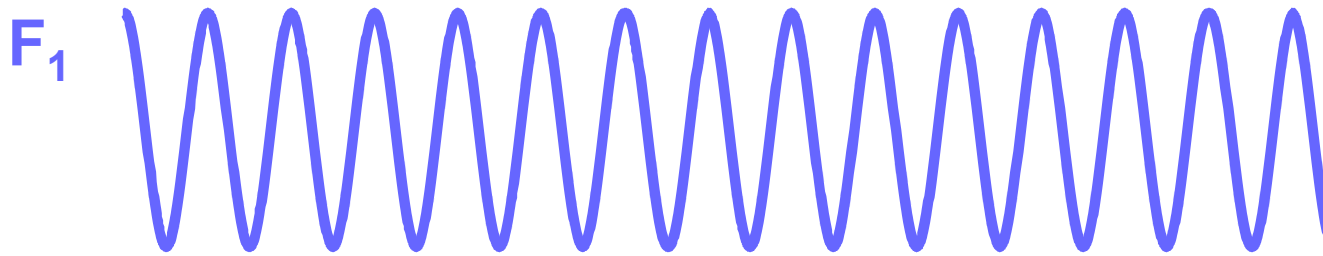
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光  $F_1$



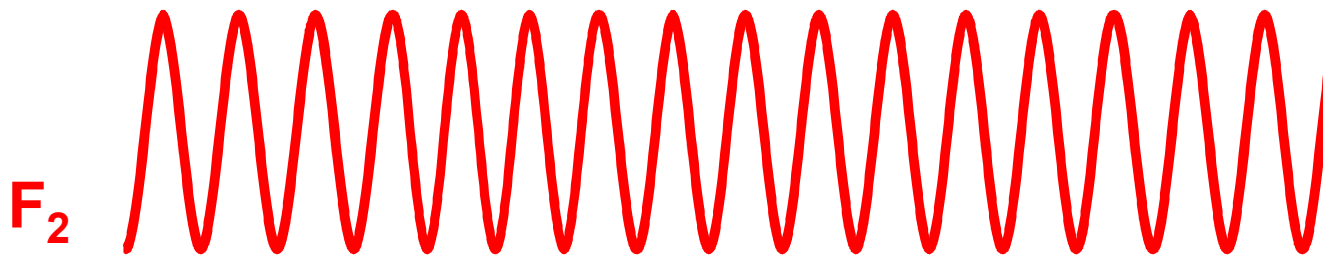
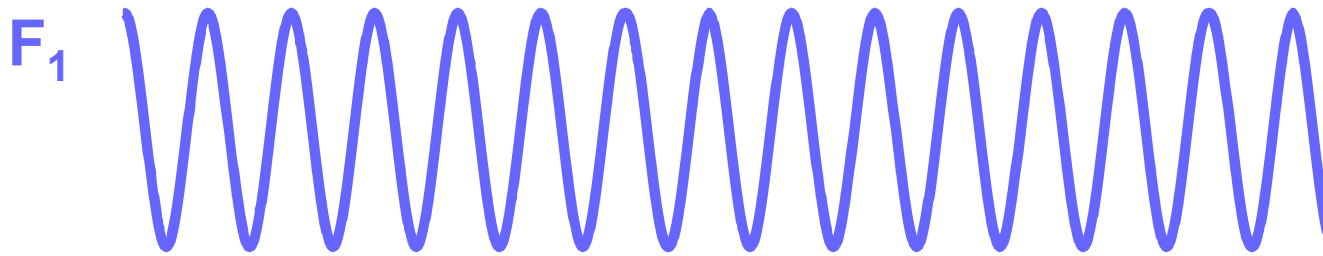
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光 **F<sub>1</sub>** 和 **散射光 F<sub>2</sub>**



# 光强的波动是怎样被引发的？

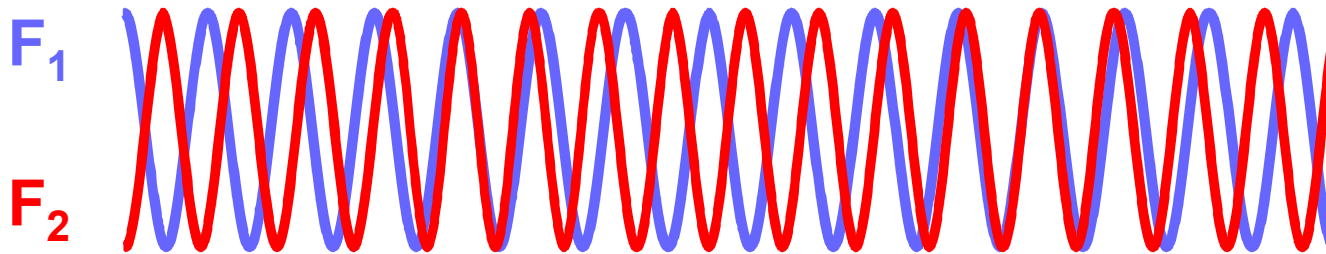
参考光 **F<sub>1</sub>** 和 **散射光 F<sub>2</sub>**



将两束光结合

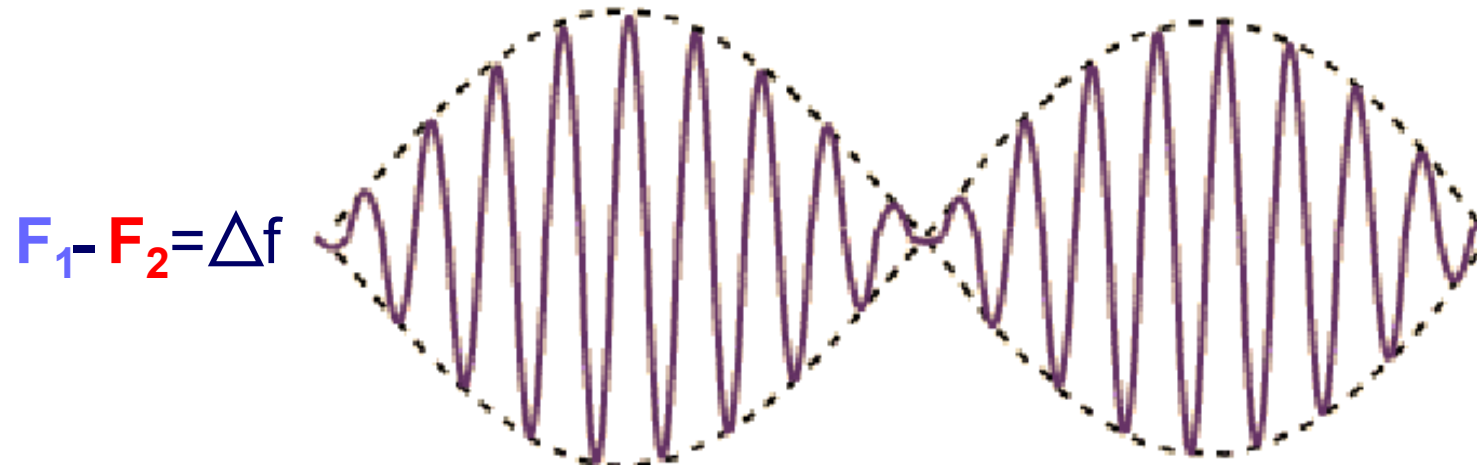
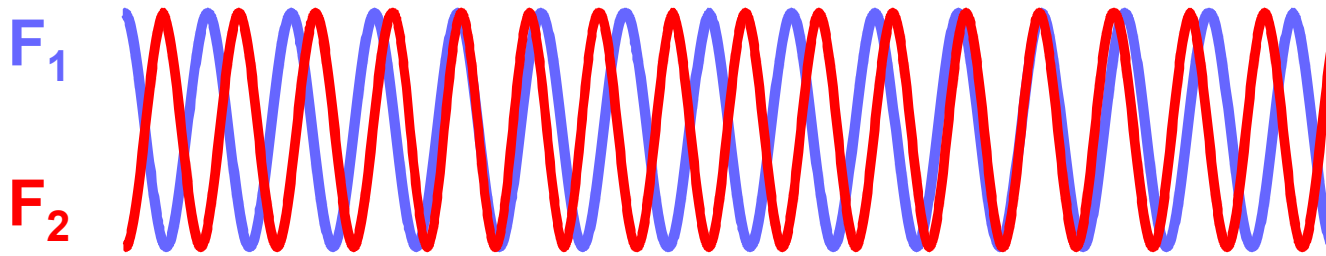
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光  $F_1$  和 散射光  $F_2$



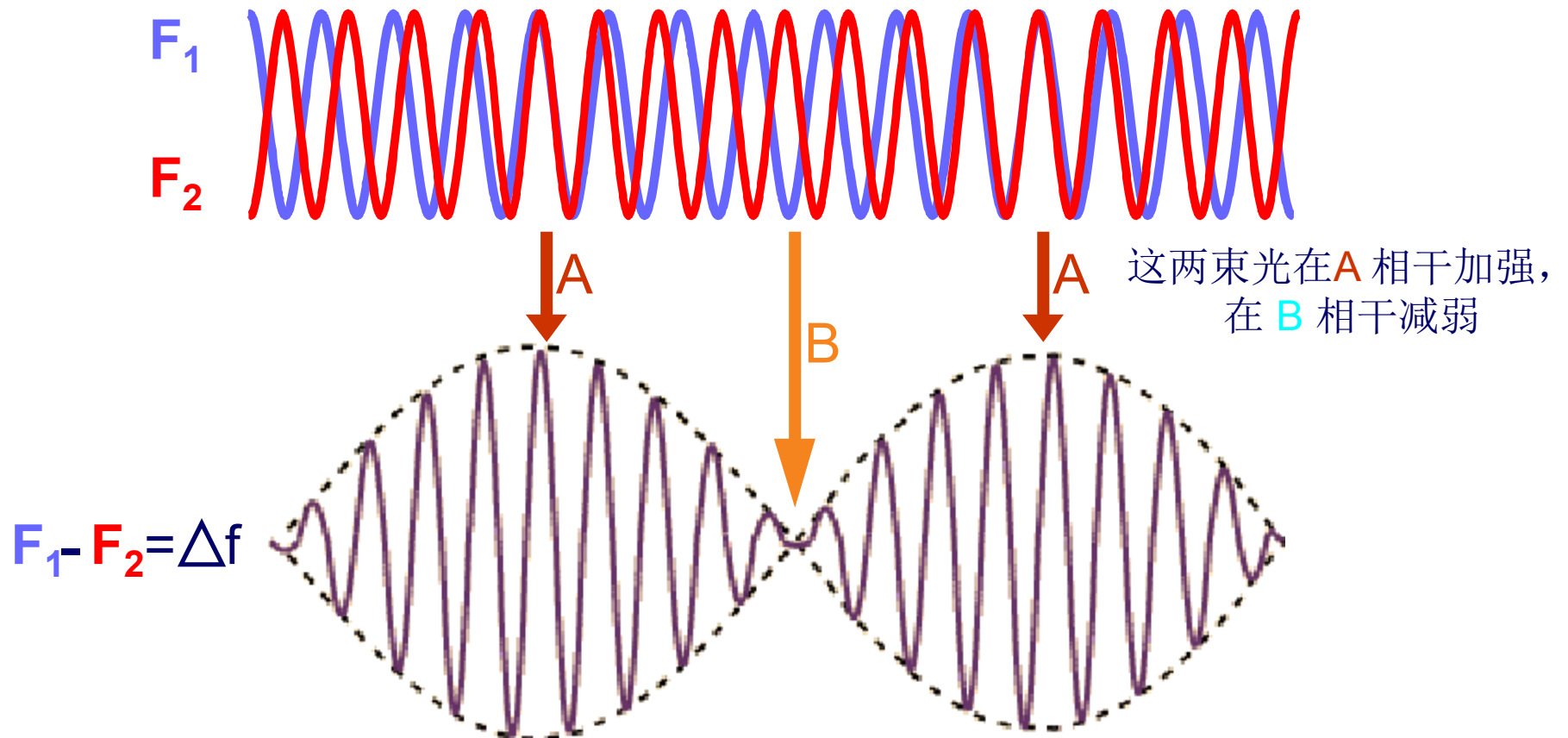
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光  $F_1$  和散射光  $F_2$



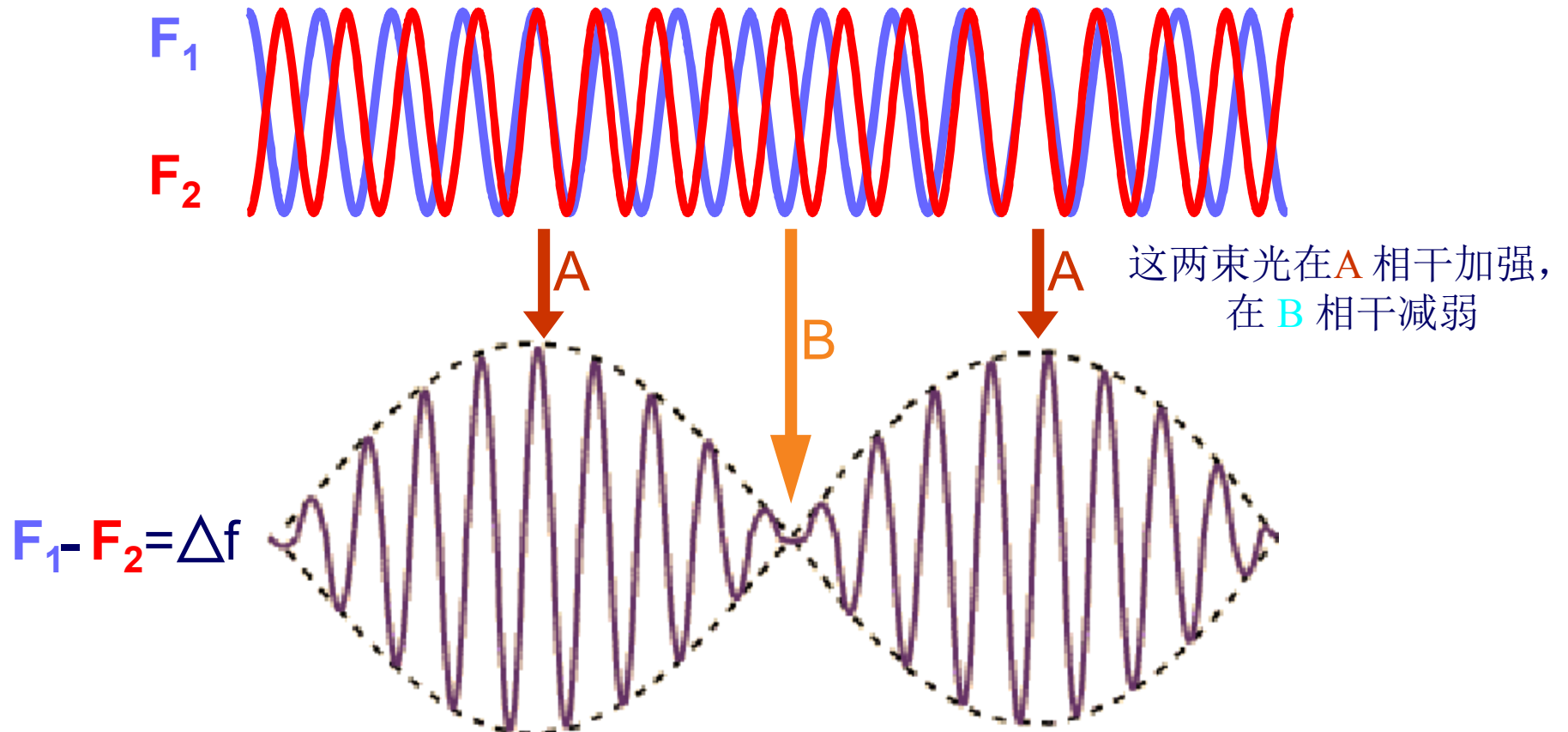
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光  $F_1$  和散射光  $F_2$



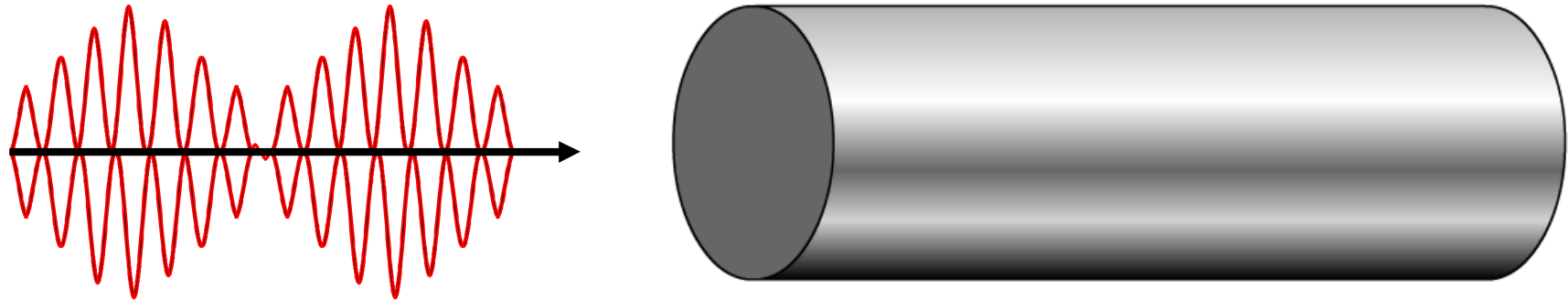
# 光强的波动是怎样被引发的？

参考光  $F_1$  和 散射光  $F_2$



相干的结果产生一个频率小得多的调制光源，这束光的频率等于参考光和散射光频率的差，即 $F_1$ 与 $F_2$ 的频率差

## 拍频被聚焦到检测器处

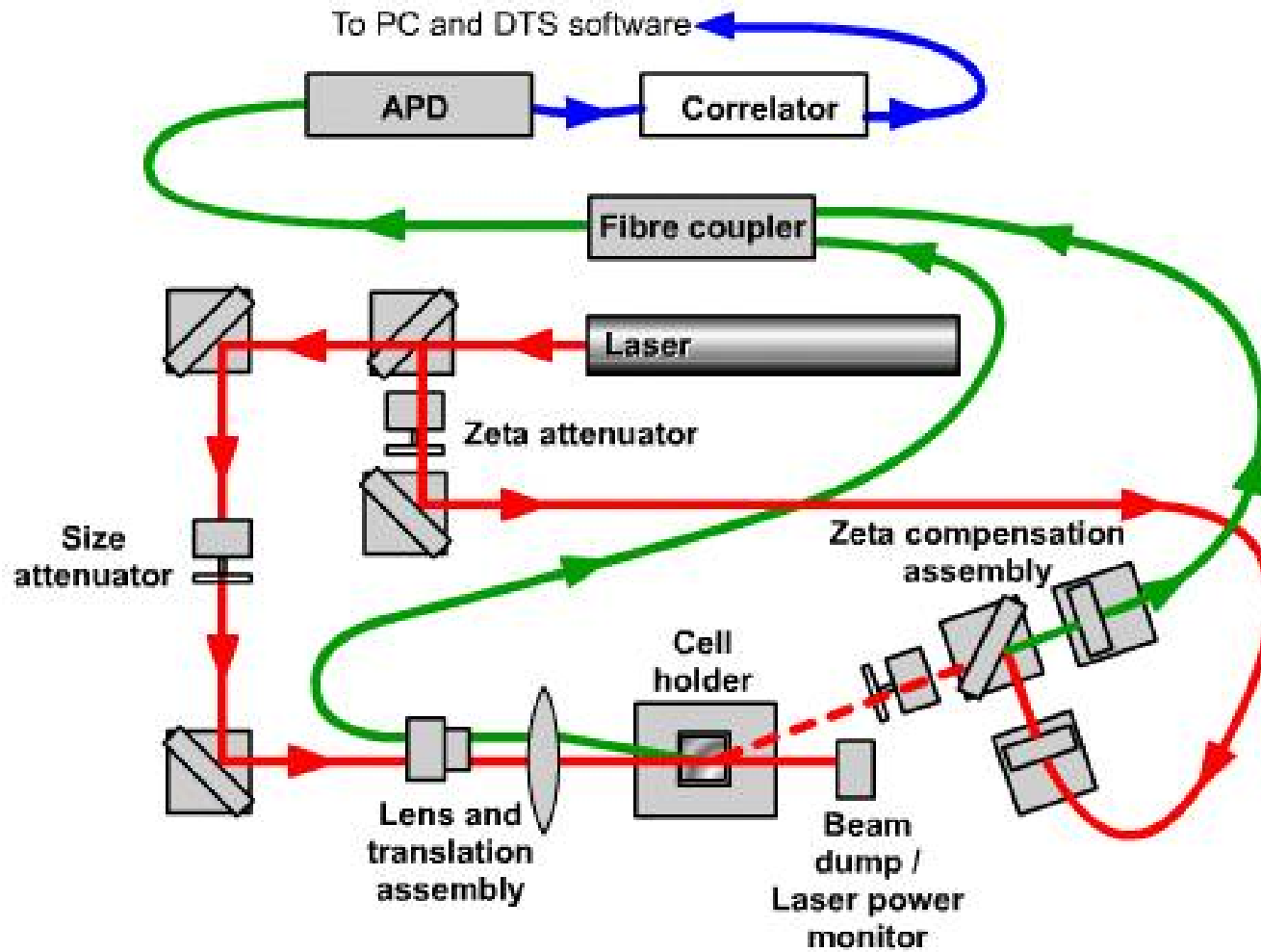


检测器检测的是光强随时间的波动，进而得到拍频

## 检测多普勒平移的方向

- 多普勒位移的符号是由比较拍频频率与参考频率来决定的
- 参考频率由调制在参考光源光路上的一面反光镜生成
- 粒子在施加电场中的移动将会造成区别于调制频率的频率(320 Hz)的移动
- 这样我们得到zeta电位的明确的符号

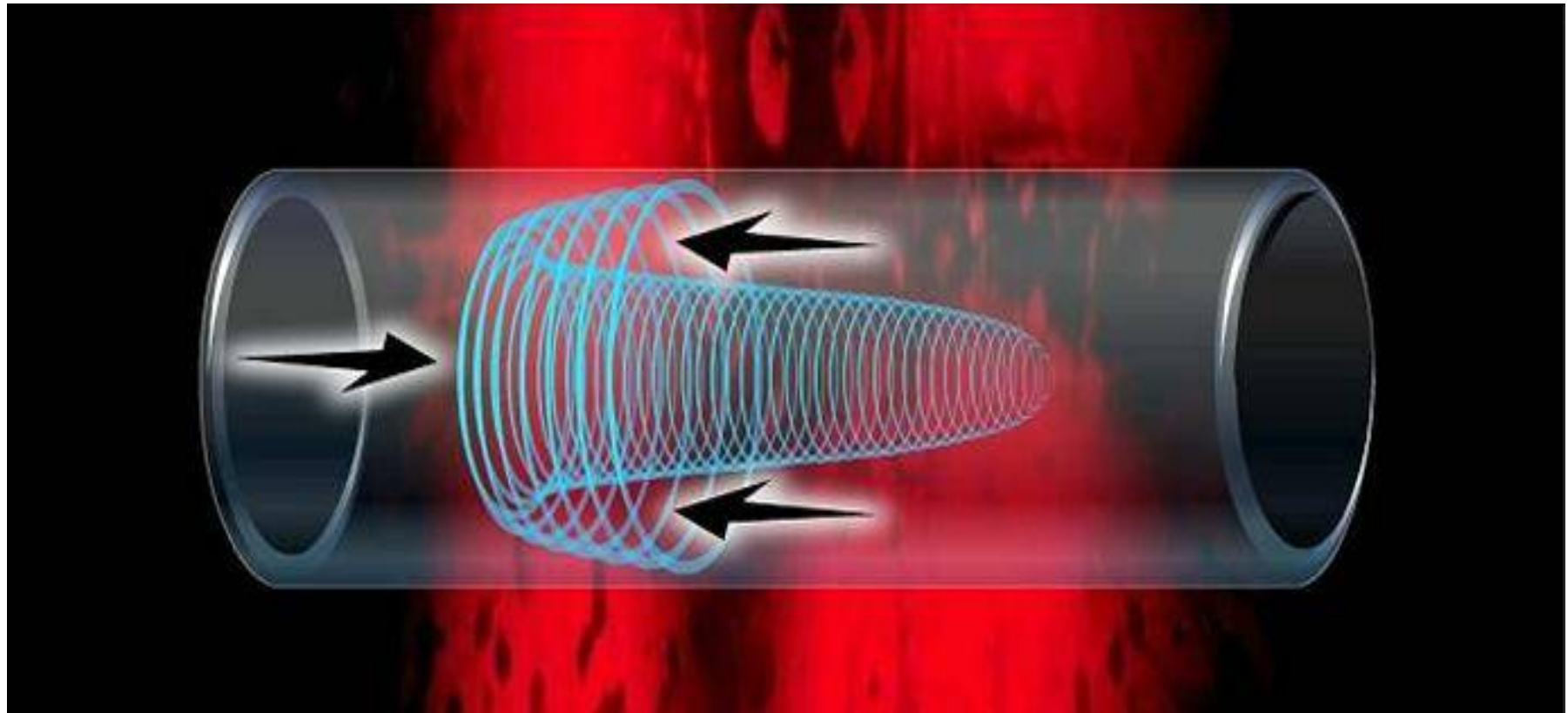
# Zetasizer Nano Z的光学结构



## 电渗

- › 由于毛细管样品池壁带电，当外加电场导致颗粒运动时，池壁附近的液体也会在电场中由于电渗而运动
- › 当用毛细管样品池时由于池壁与水中离子的作用，水会在电场下移动(电渗)而影响颗粒移动速度的测量(因为测到的是两种运动的总和)
- › 但是，由于在一个封闭的池子内，池壁的液体流动会造成池中间的液体向另一方向运动，而在样品池中造成抛物面状的液体流动

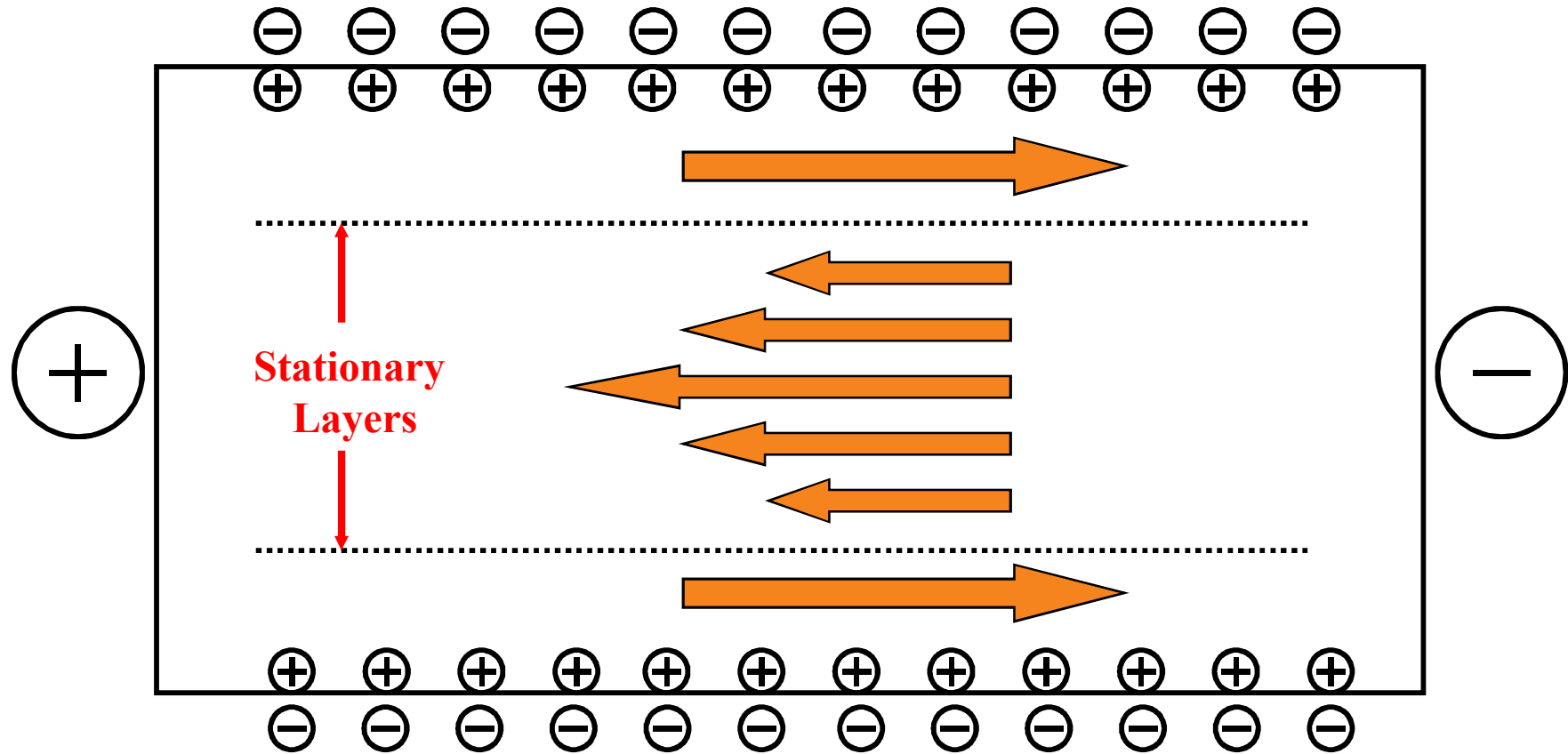
## 电泳迁移率测量中的难题:电渗



## 电渗

- › 在样品池中有两个无限薄的层面(静止层)内无电渗
- › 经典方法将光束定位在静止层内测量，以避免电渗误差
- › 不可能准确定位,及费时而造成各种误差(甚至池壁有微量污染)

# 静止层



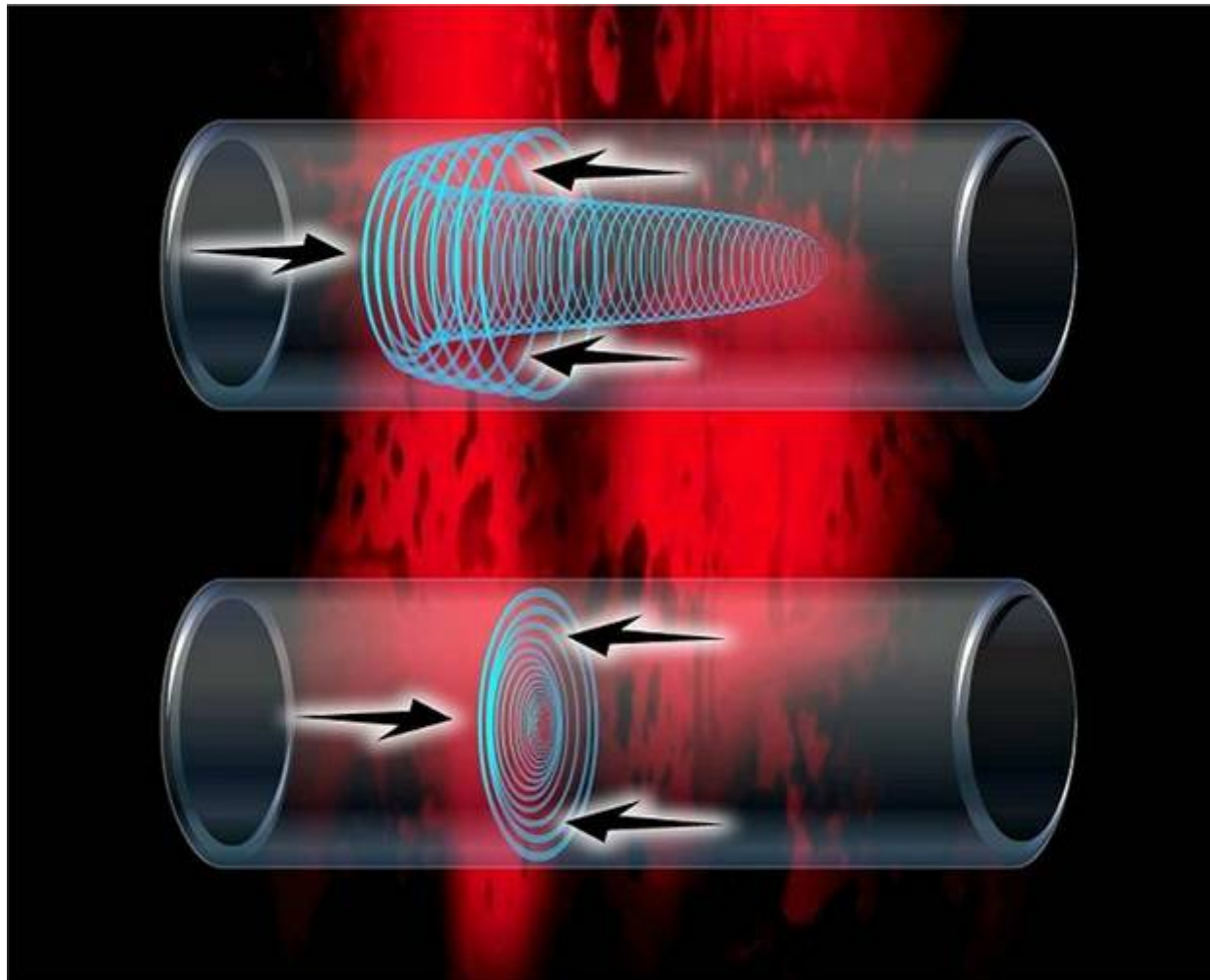
## 避免电渗

- › 假如没有电渗，颗粒的电泳测量将简单的多
- › 在任何位置测到的颗粒电泳都将是颗粒的真正电泳

## 避免电渗：快速电场反转 (FFR)

- › 假如一外加电场有足够高的频率时：
  - 与颗粒的运动相比，液体的运动可以忽略不计
  - 这样，测量就不一定要在静止层进行
- › 但是FFR与传统的SFR相比，有较低的分辨率

## 电场反转频率的效果

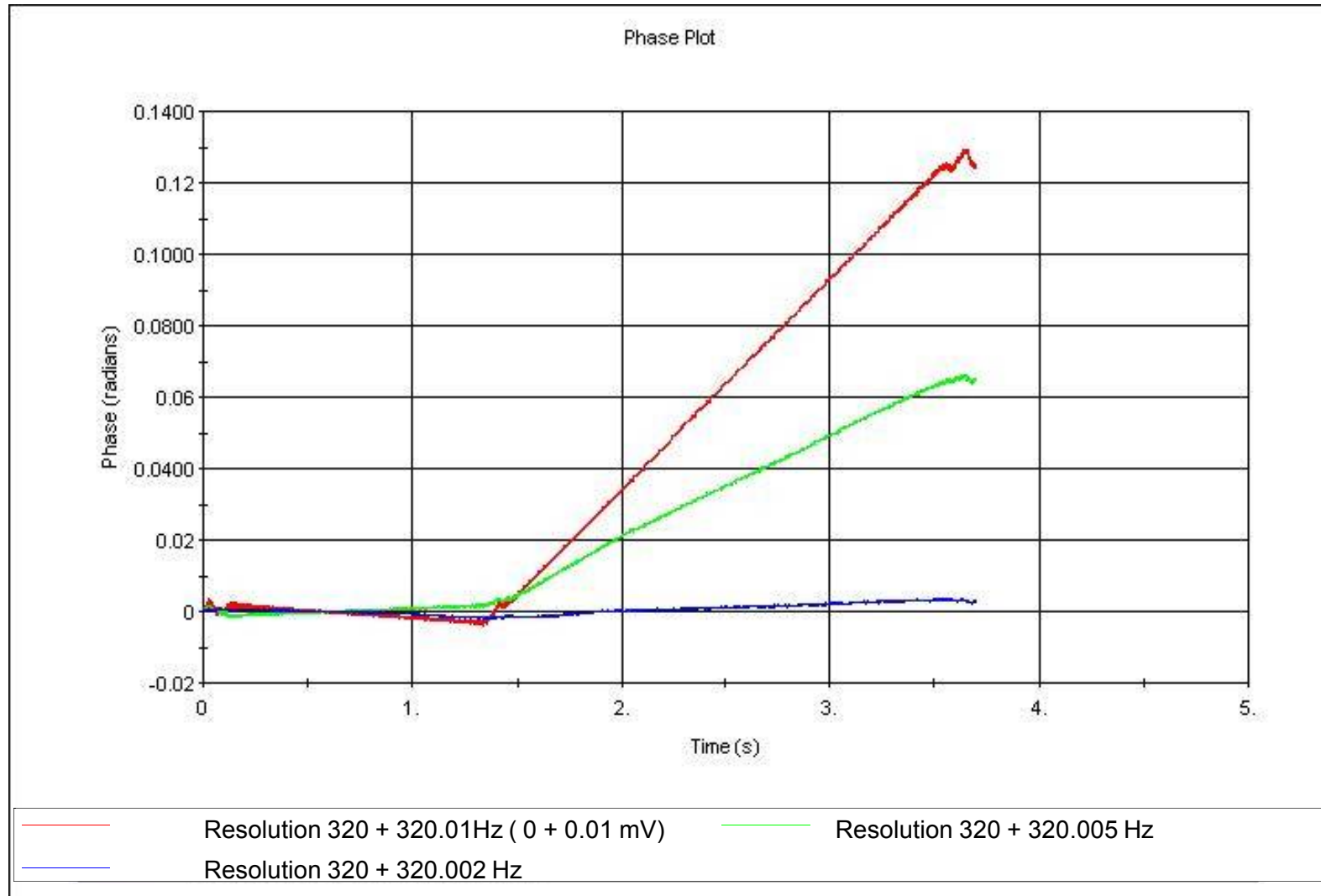


## 混合模式测量(M3)

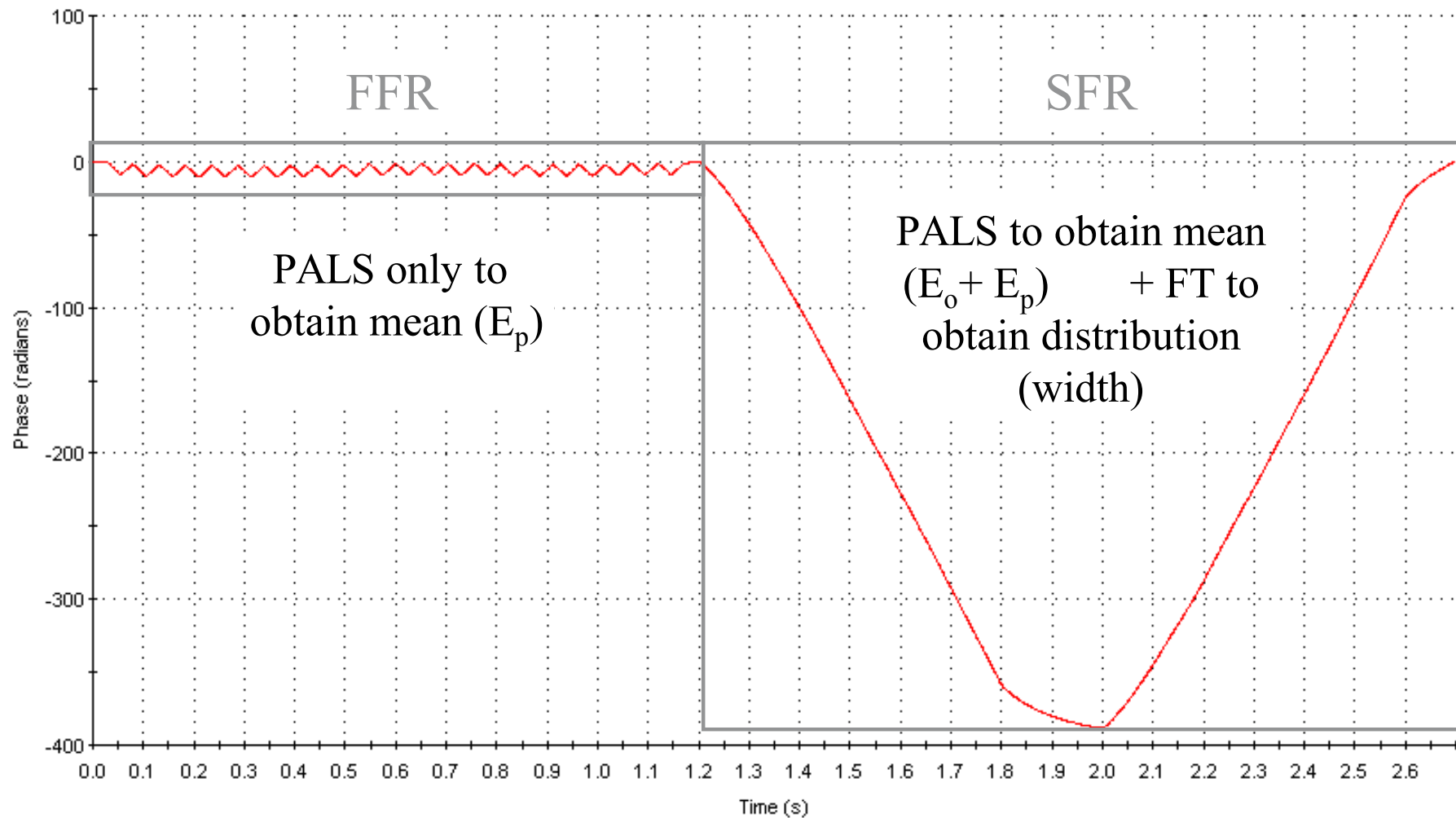
- › 混合模式测量(M3)是一个专利技术，可在毛细管样品池的任何位置测量
- › 用快速电场反转(FFR)与慢速电场反转(SFR)联用
- › FFR 允许测量正确的电泳迁移率而不受电渗的影响
- › SFR 可得到高分辨率的分布图
- › PALS用来决定FFR测量时的电泳迁移率

## Zeta电位测量:M3-PALS

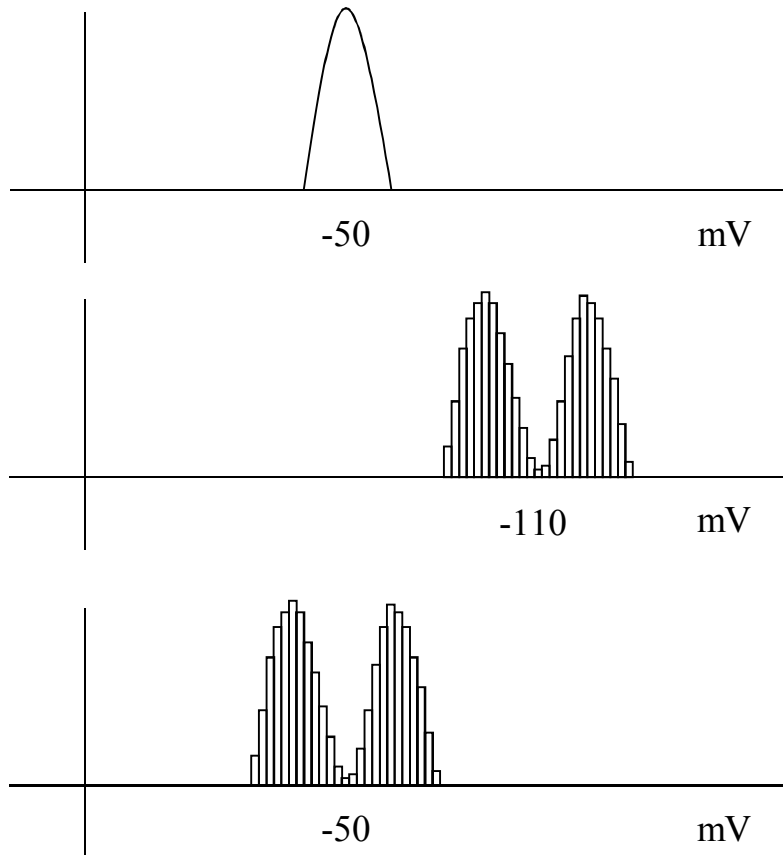
- › 光散射相位分析
- › 可很精确的测定频率位移
- › 颗粒的电泳迁移率是由拍差频率与参考频率之间的相位差来求得的
- › 参考频率是320Hz



# 相位图



## 测量过程:系列的快速电场极性转换(FFR) 与慢速电场极性转换(SFR)



- › 在FFR中用PALS测量平均电泳迁移率或Zeta电位,并多次FFR用于精确的测定斜率的平均值
  - 插入式样品池不需用FFR
- › Zeta电位或迁移率分布由SFR测量的傅立叶变换而得到
- › 整个分布的X-坐标根据平均值标定从而得到正确的分布

Malvern

# Zeta电位 (Zeta Potential)

样品制备和仪器验证

# Zeta电位试验中的样品制备

- Zeta电位测试中对样品的要求不像尺寸测试对样品的要求那样严格，样品可以看上去不很透明
- 可测浓度的上限依赖于粒子尺寸和光学性质
  - 粒子的尺寸越大，需要样品的浓度越稀
  - 粒子和分散剂的折光指数差越大，需要样品浓度越稀

# zeta电位试验中的样品制备

- 当溶液需要稀释的时候，稀释的方式对于最终结果的测量非常重要
- 对于有效的测试，稀释溶液很重要！
- 不考虑分散剂性质（盐度，PH.....）的测试是没有意义的！
- **Zeta**电位对分散体系组成的依赖性和对粒子性质的依赖性同样重要

# zeta电位试验中的样品制备

- 在稀释溶液的过程中应该保持粒子表面的性质
  - 你有稀释溶液吗?
  - 过滤或者离心一些原溶液，取上清液作为稀释溶液
  - 让样品自然沉淀，使用上层溶液测试 (**zeta**电位不依赖于粒子尺寸)
  - 尽量使稀释溶液的性质接近原溶液，应考虑以下因素
    - *pH*
    - *离子强度*
    - *其它成分浓度*

# 样品的浓度要求

- 激光必须能够穿过样品，因为散射光将在向前的角度被检测到（12.8度）
- 因此，对于Zeta电位测试的样品应该具备光学上的清澈
- 最高和最低的样品浓度依赖于以下因素：
  - 粒子尺寸
  - 粒子尺寸分散度
  - 粒子的光学性质

# 最低样品浓度

- 为了进行测试，样品的散射光应该有一定的强度
- 因此，最低样品浓度依赖于相对折光指数 (溶质粒子和分散剂的折光指数差)和粒子的尺寸
- 粒子的尺寸越大，散射光越强，因此浓度下限越低
- 如果散射光强低于 10kcps, 测试过程中 **Expert advice** 将会建议增加溶液浓度

# 最高样品浓度

- 这个问题不太容易回答
- 我们应该考虑到很多因素，如样品尺寸，分散度，光学性质
- **Zeta**电位的测试中，激光必须穿过样品，因为散射光在向前的角度被检测到
- 如果样品的浓度太高，被检测到的粒子散射的激光强度会有很大的衰减
- 为了抵消这些影响，仪器中衰减镜片的位置将被调整到一个比较高的指数，也就是比较高的透射率

## 检查正确的仪器操作



- Zeta电位的仪器本身不用校正
- 但是可以通过检测标样的zeta电位来验证仪器是否工作正常

## Zeta电位标准样品



- 这个乳液被用来验证仪器的操作是否正确
- 其电位值为  $-42 \text{ mV} (\pm 4.2\text{mV})$
- 样品直接测量不需要再制备
- 因此不用考虑制样过程带来的影响

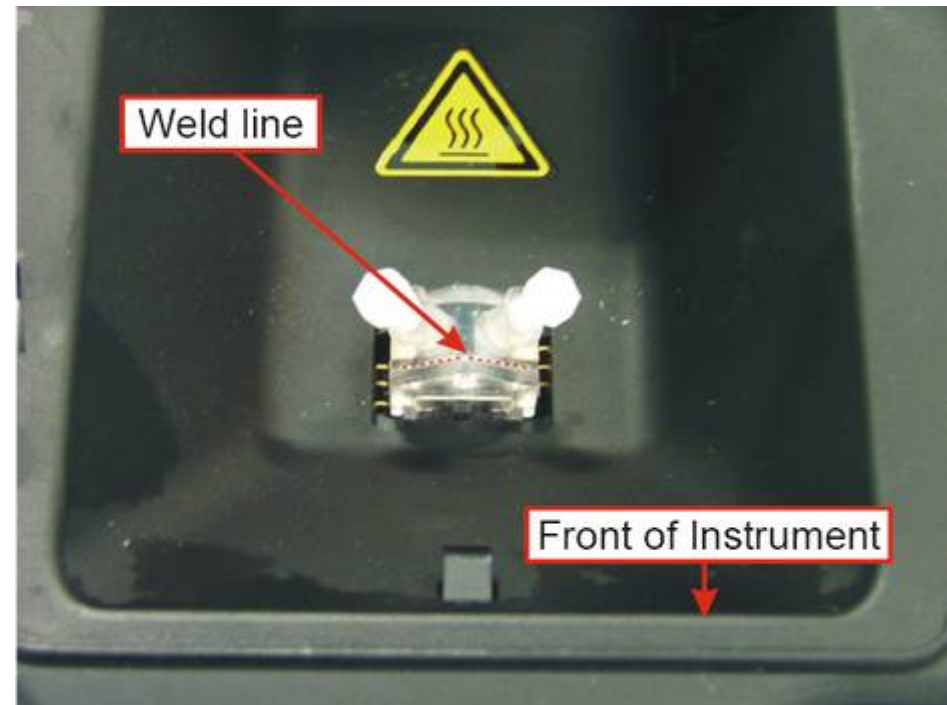
## 推荐测试前清洗过程

- 对于毛细管样品池
  1. 用乙醇或者甲醇清洗样品池
  2. 用去离子水清洗样品池
  3. 用你的样品清洗样品池
  4. 将样品注入样品池
- 请注意，仅仅在第一次使用样品池之前用乙醇清洗样品池，在之后的测试过程中不需要再用乙醇清洗



## 插入样品池

- 白色透明的毛细管样品池不同的插入方向将导致检测器检测到差别很大的散射光强
- 大部分情况下，散射光强的不同不会导致不同的检测结果
- 然而，当被测样品的散射性很差时，试验可能无法进行



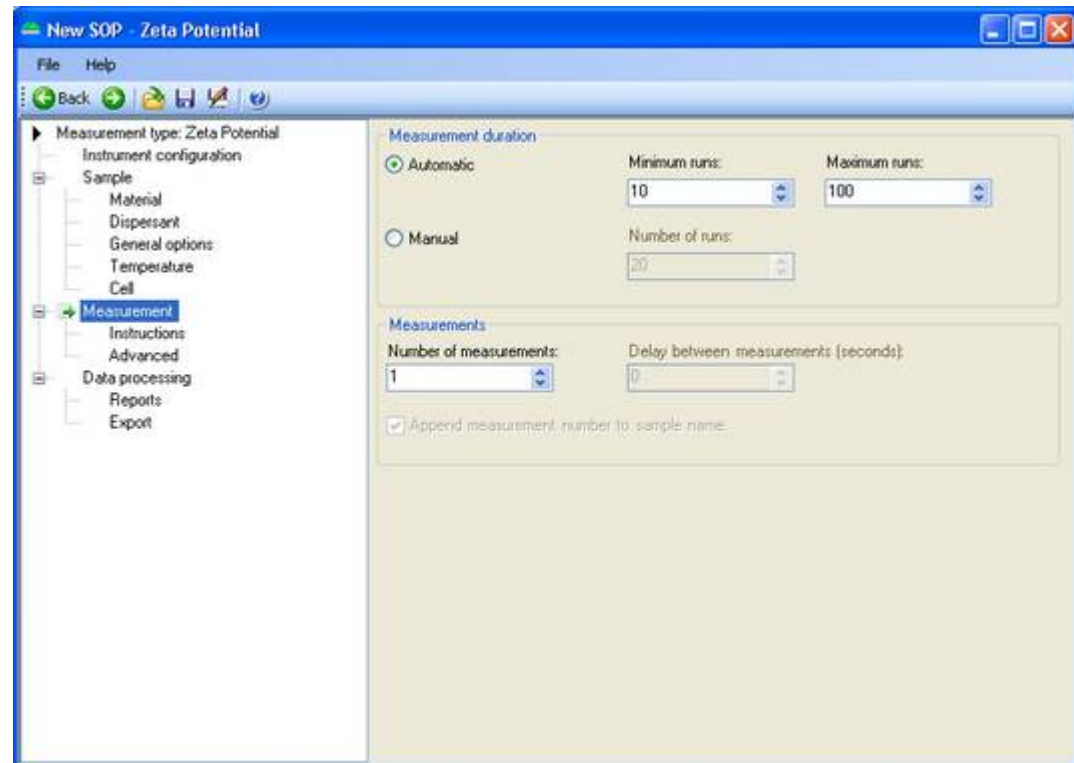
# Malvern

## Zeta电位 / Zeta Potential

### 软件设置

# 建立测试： 测试（measurement）

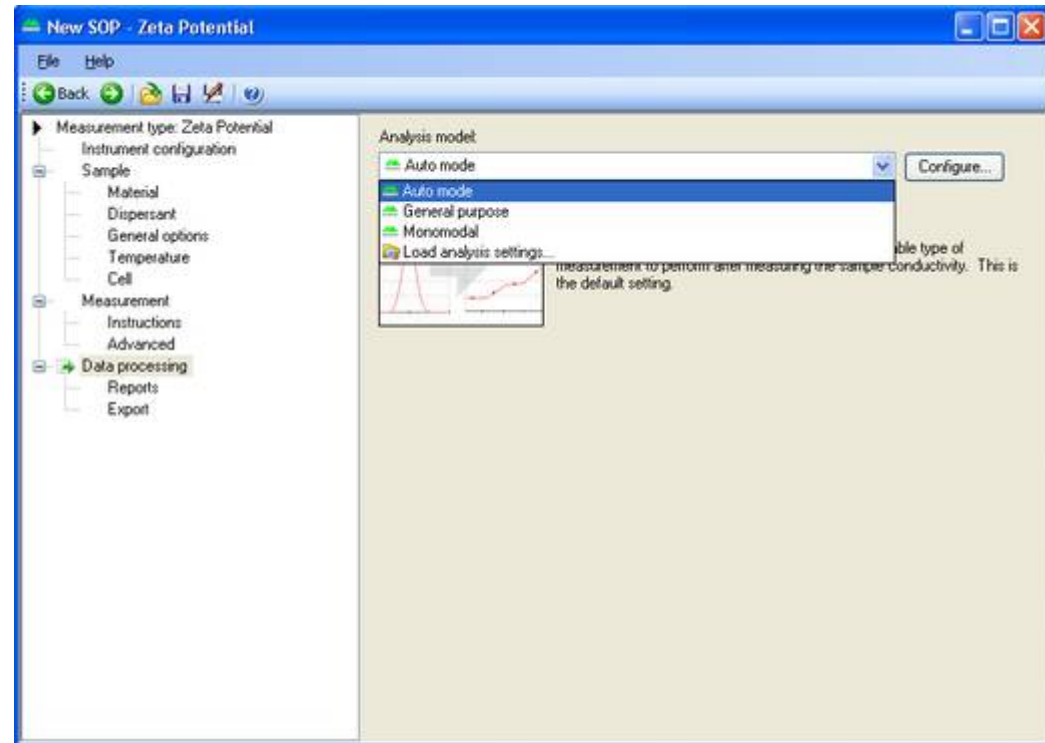
- 自动模式（**automatic**）的时间取决于子测试（**sub runs**）的数量。子测试最少为10次最多可以进行100次。
- 子测试的具体次数将在后面讨论
- 也可以选择手动设置（**manual**）测试时间来规定子测试的数量



# 建立测试： 数据处理（Data Processing）

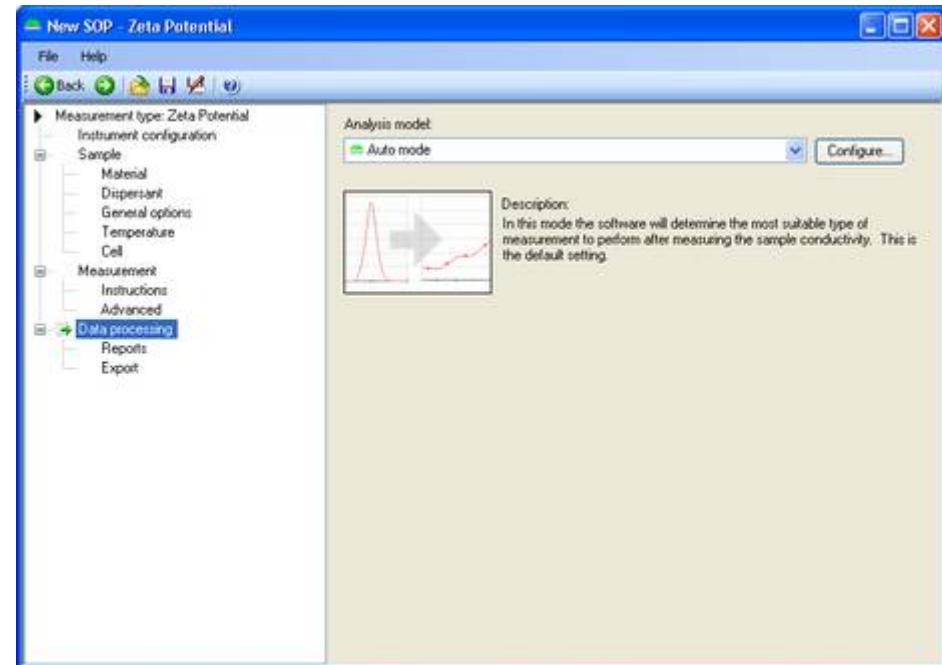


- 软件提供三种分析模式
  - 自动模式-Auto mode
  - 常规模式-General Purpose
  - 单项模式-Monomodal
- 软件中还有一个选择可以载入由Malvern工作人员提供的分析设置



# 自动模式- Auto Mode 1

- 检测散射光水平，使用适当的衰减镜片使得散射光的强度为参考光源强度的1/10
- 如果样品的散射光强度低于10kcps, 将会显示专家建议- Expert advice, 适当增加样品的浓度



## 自动模式- Auto Mode 2

- 测试样品的导电率-conductivity
- 施加在样品上的电压将会视导电率而定，详细信息请参看右表
- 增加导电率将会使得施加的电压下降，从而延长样品池和样品的寿命

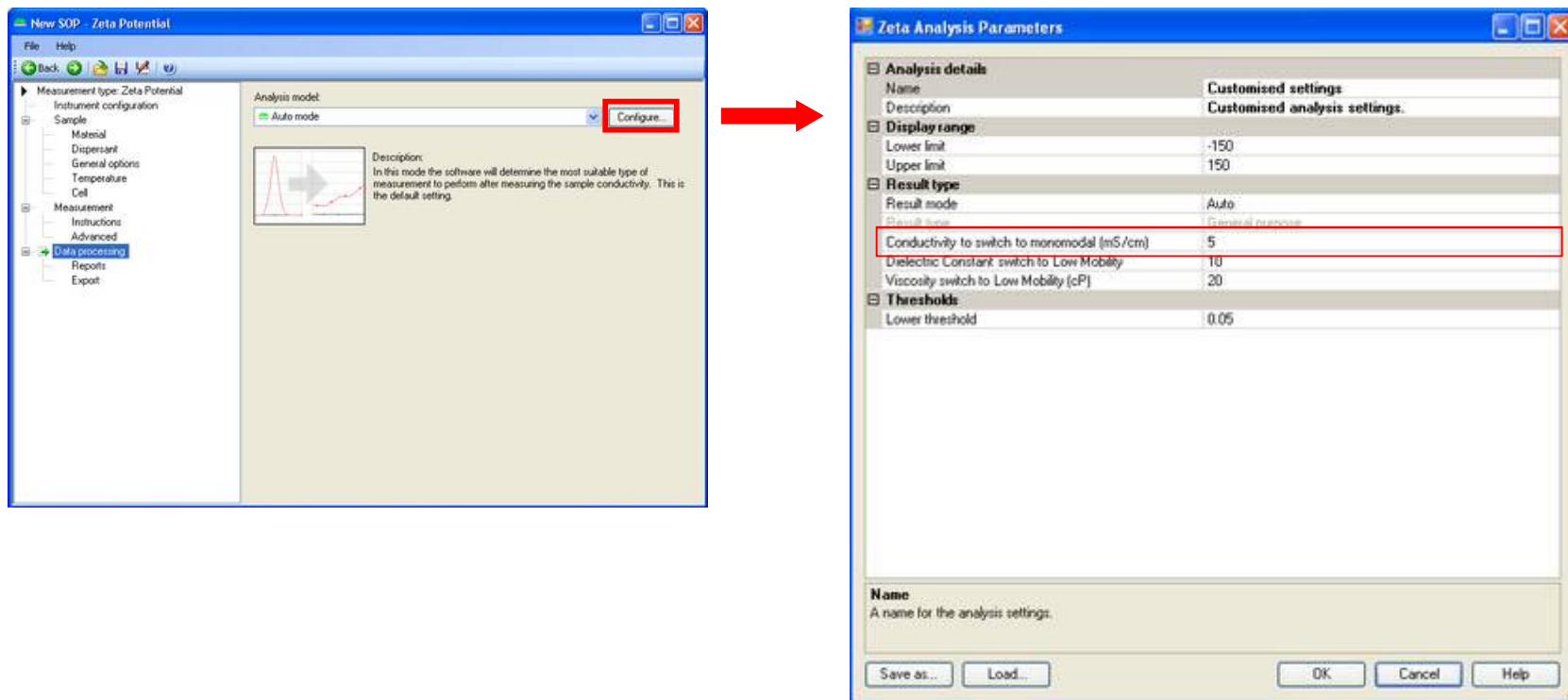
Conductivity (mS/cm)	Voltage Selected (V)
<5	150
5 to 30	50
>30	10

## 自动模式- Auto Mode 3

- 选择分析模式
- **General Purpose** 将会给出 zeta电位的分布, **Monomodal** 只能给出平均 zeta 电位值
- **General Purpose** 模式下会施加长时间的稳定电场, 但这种模式将降低样品池和样品的寿命
- 如果导电率大于 5mS/cm 将默认使用 **Monomodal** 模式

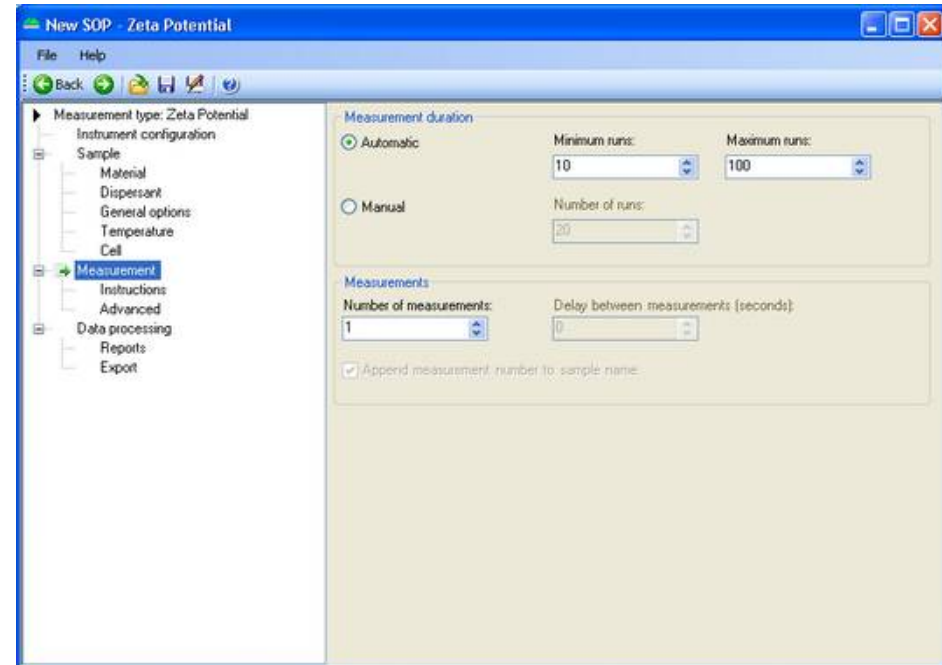
# 自动模式 - Auto Mode 4

- 这个条件可以用 **Configure** 改变，从而手动设置分析模式



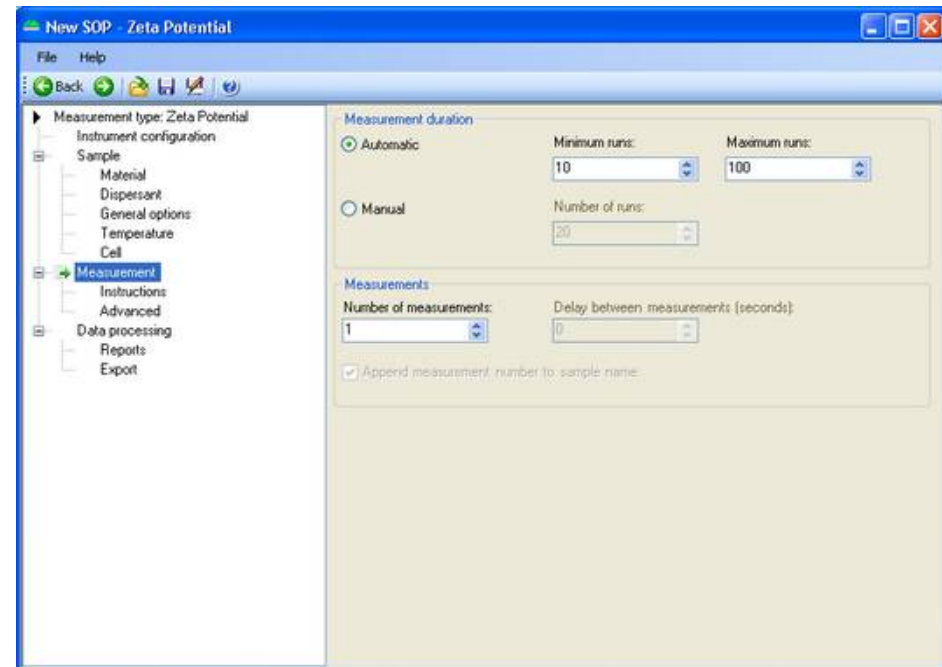
# 自动模式- Auto Mode 5

- 经过10个子测试后，软件将会检测测试质量，测试质量是一个基于信噪比的参数
- 一旦质量因子大于1，软件认为测试结果可以接受并且可靠



## 自动模式- Auto Mode 6

- 进一步软件将会监测zeta电位的平均值，只有当下一次测试的结果与前面结果的误差在 1% 以内，软件将停止测试
- 如果这个条件没有达到，测试将继续进行直到结果间误差小于 1% 或者测试将进行到最大的设置值 (默认为100次子测试)



# Malvern

## Zeta电位 (Zeta Potential)

数据解释

Data Interpretation

# 数据解释



## ■ 报告-REPORTS

- Zeta Quality Report
- Expert Advice Report
- Phase Plot Report
- Voltage/Current Report
- Frequency Report

## ■ 参数-PARAMETERS

- Conductivity
- Attenuator

# Zeta质量报告



- **Zeta**质量报告对任何一个实验结果进行六项测试
- 如果任意一项测试结果在特定的范围之外，将会出现一个警告信息和一个可以导致这个警告信息的可能原因
- 如果所有的测试都通过了将会显示“**Result Meets Quality Criteria**”

## Zeta 质量报告

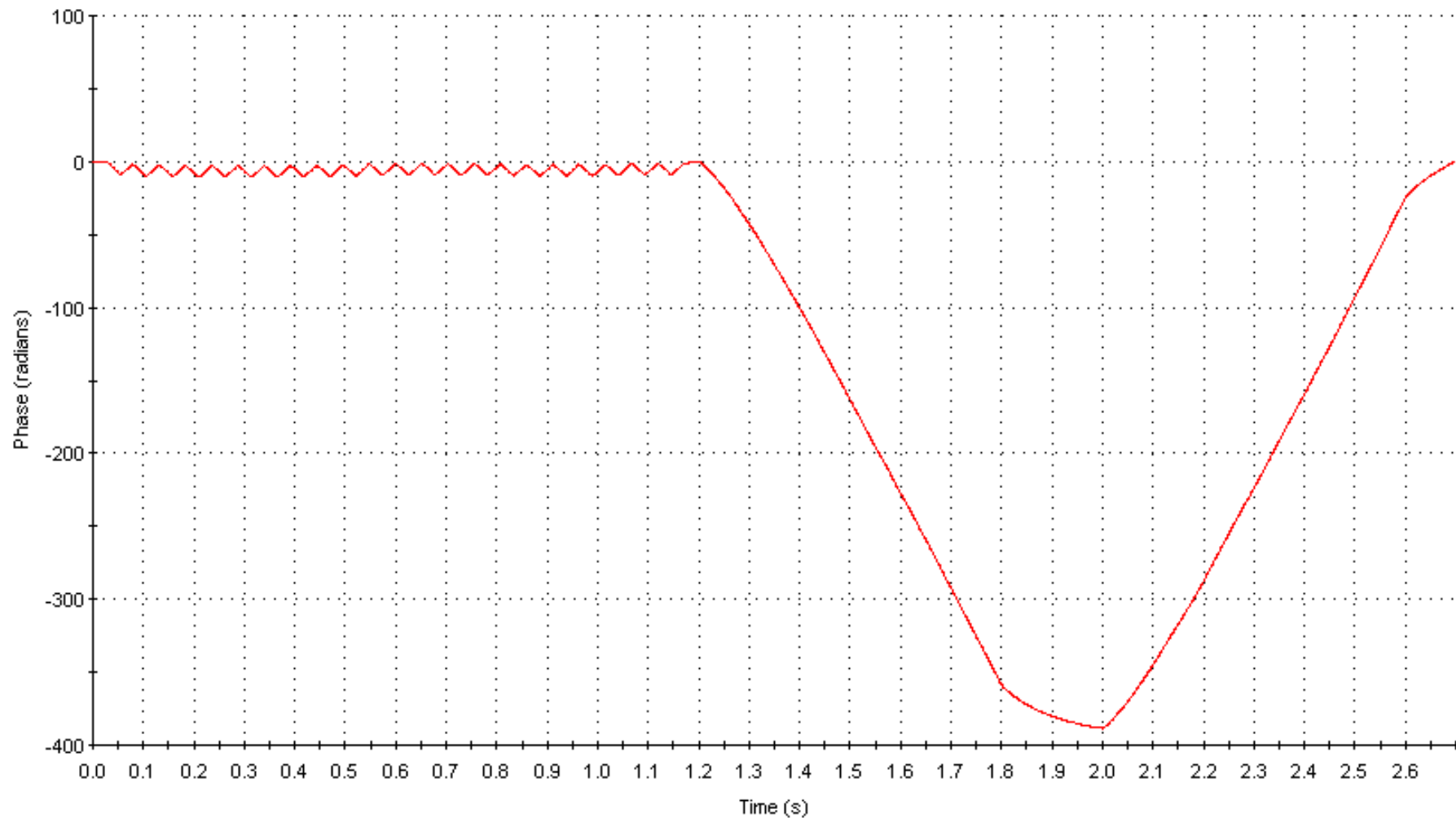
测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
1	检测相曲线的质量  Check the quality of the phase plot data	相数据不好-信噪比太低  Phase data poor – signal to noise ratio low	样品浓度过低	增加子测试数量
				增加样品浓度，重新测试
			样品浓度过高	增加子测试数量
				稀释样品，重新测试
			高导电率导致样品变质/电极退化	用 Monomodal模式测试
				手动降低电压

## 相曲线-phase plot

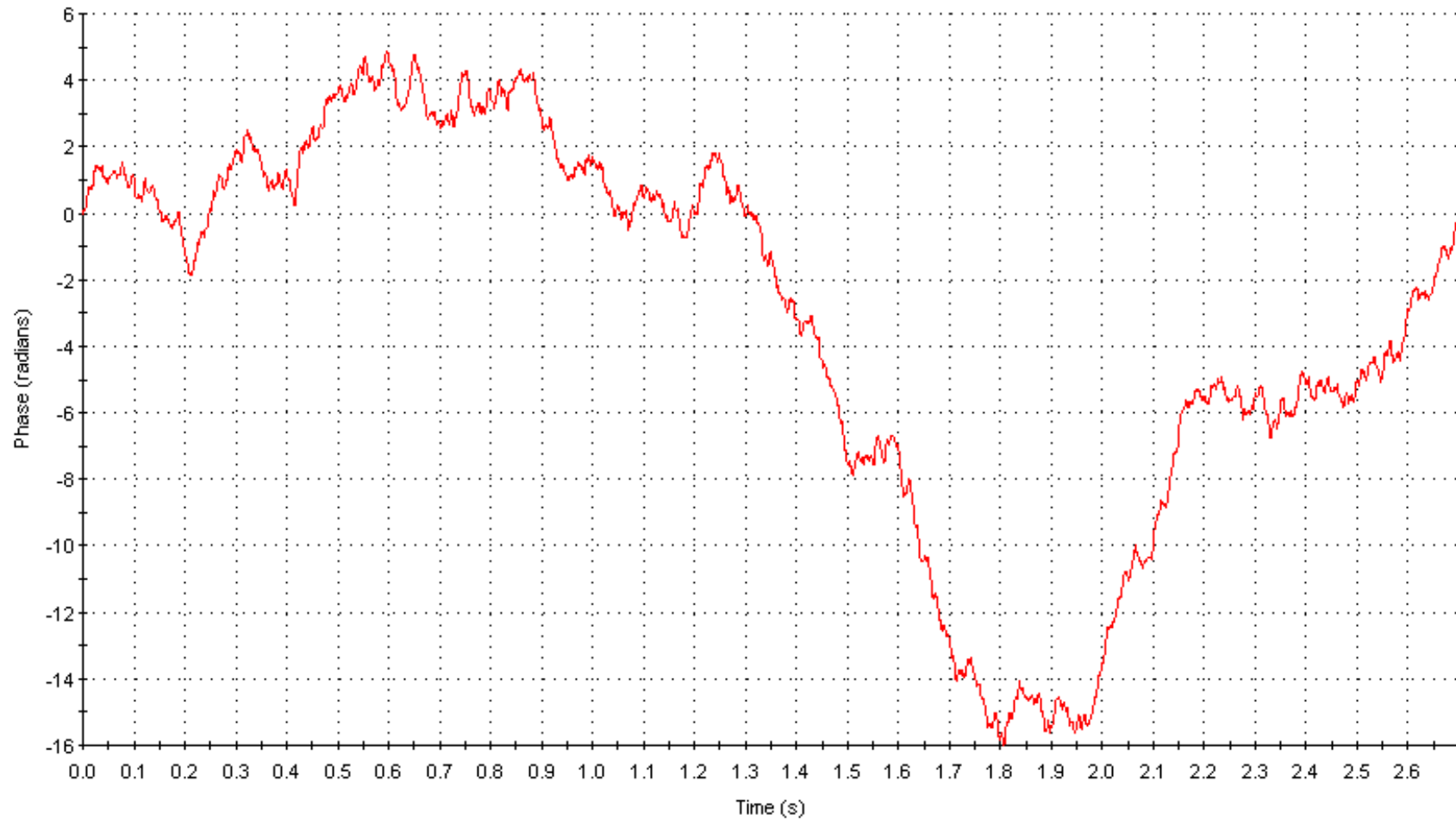


- 相曲线记录了拍频和参考频率之间的随时间变化的相差
- **Zeta**电位的平均值由测试过程中的 **FFR** 部分测定

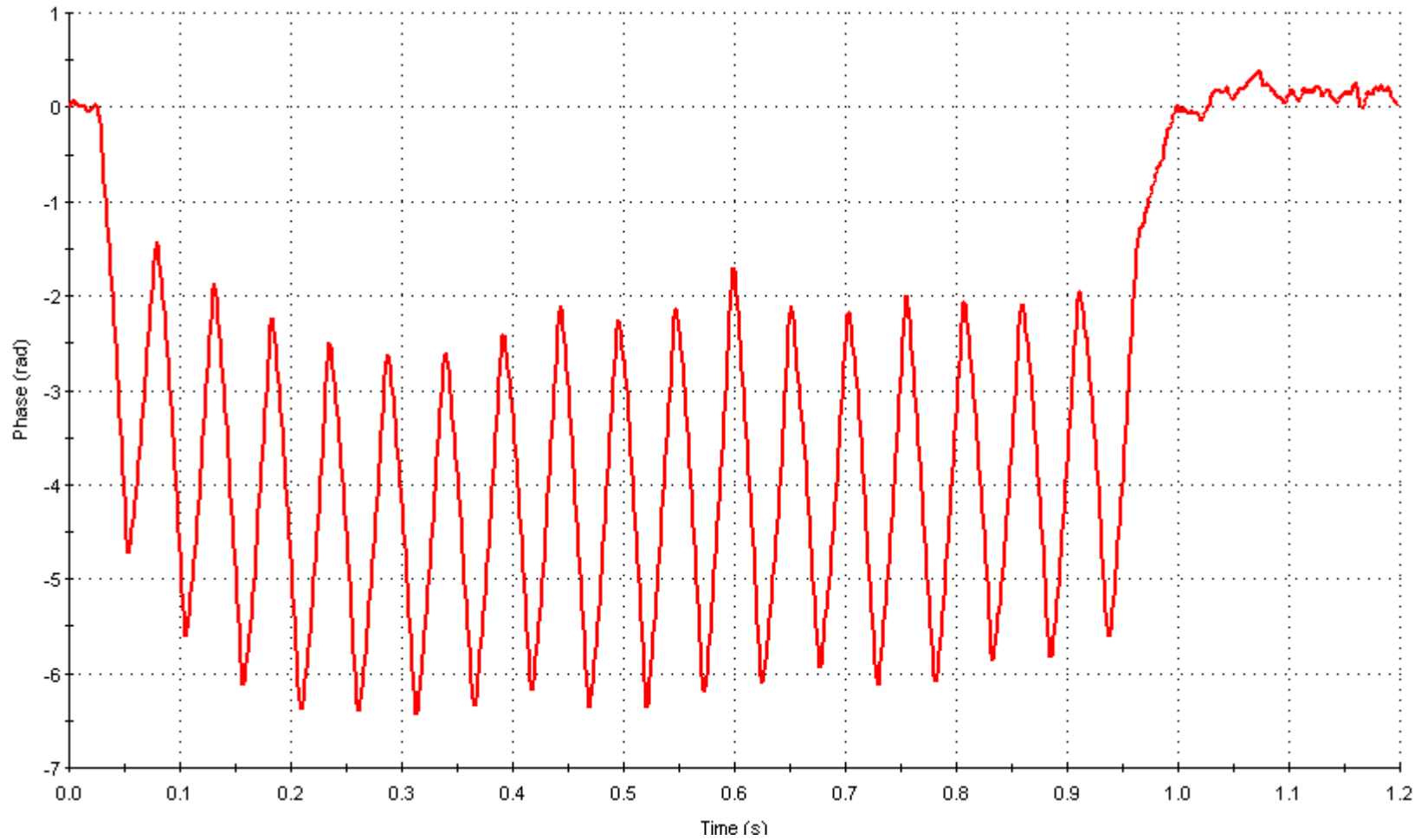
# 相曲线-phase plot : 常规模式-General Purpose: 质量较好



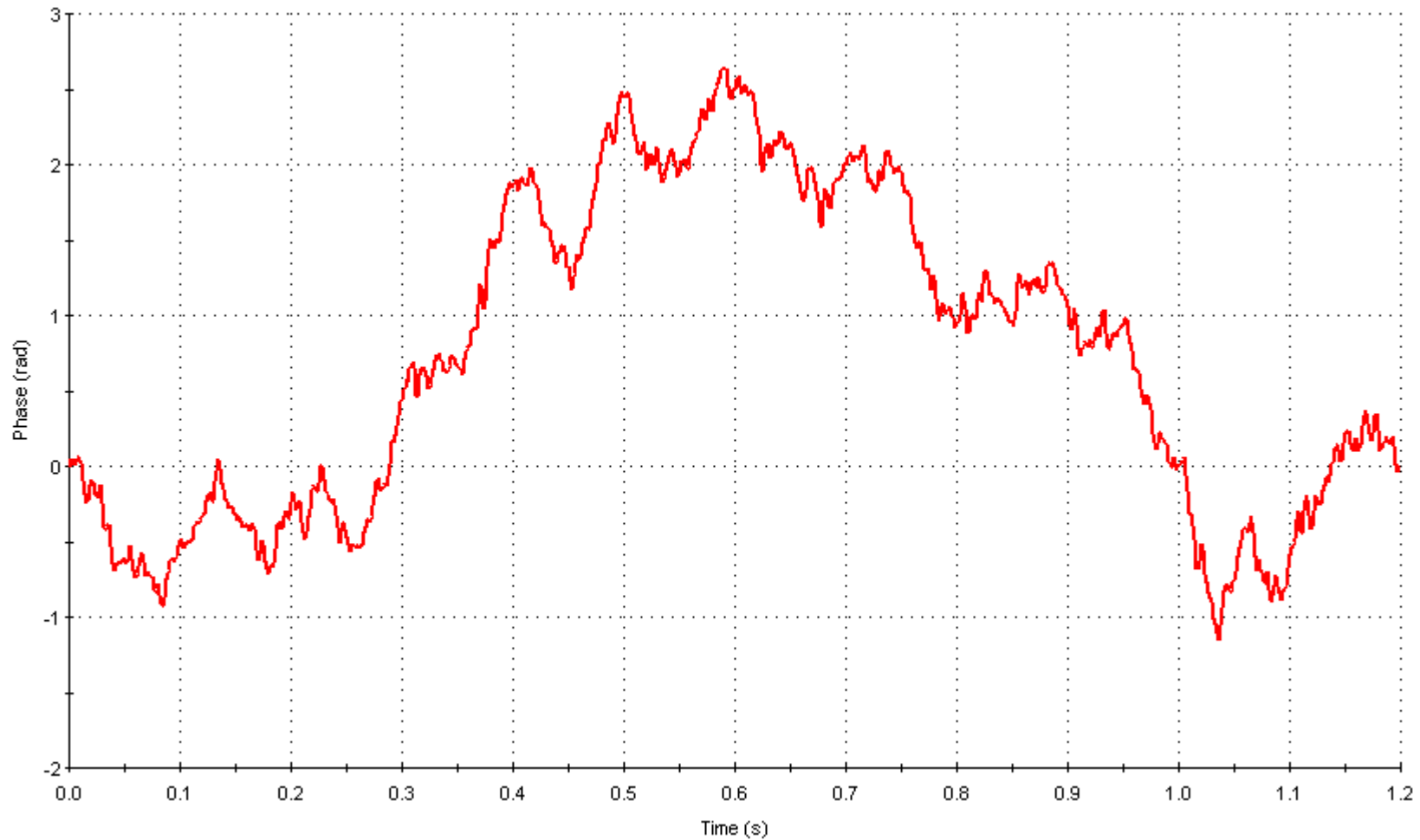
# 相曲线-phase plot : 常规模式-General Purpose: 质量较差



# 相曲线-phase plot : 单项模式-Monomodal: 质量较好



# 相曲线-phase plot : 单项模式-Monomodal: 质量较差



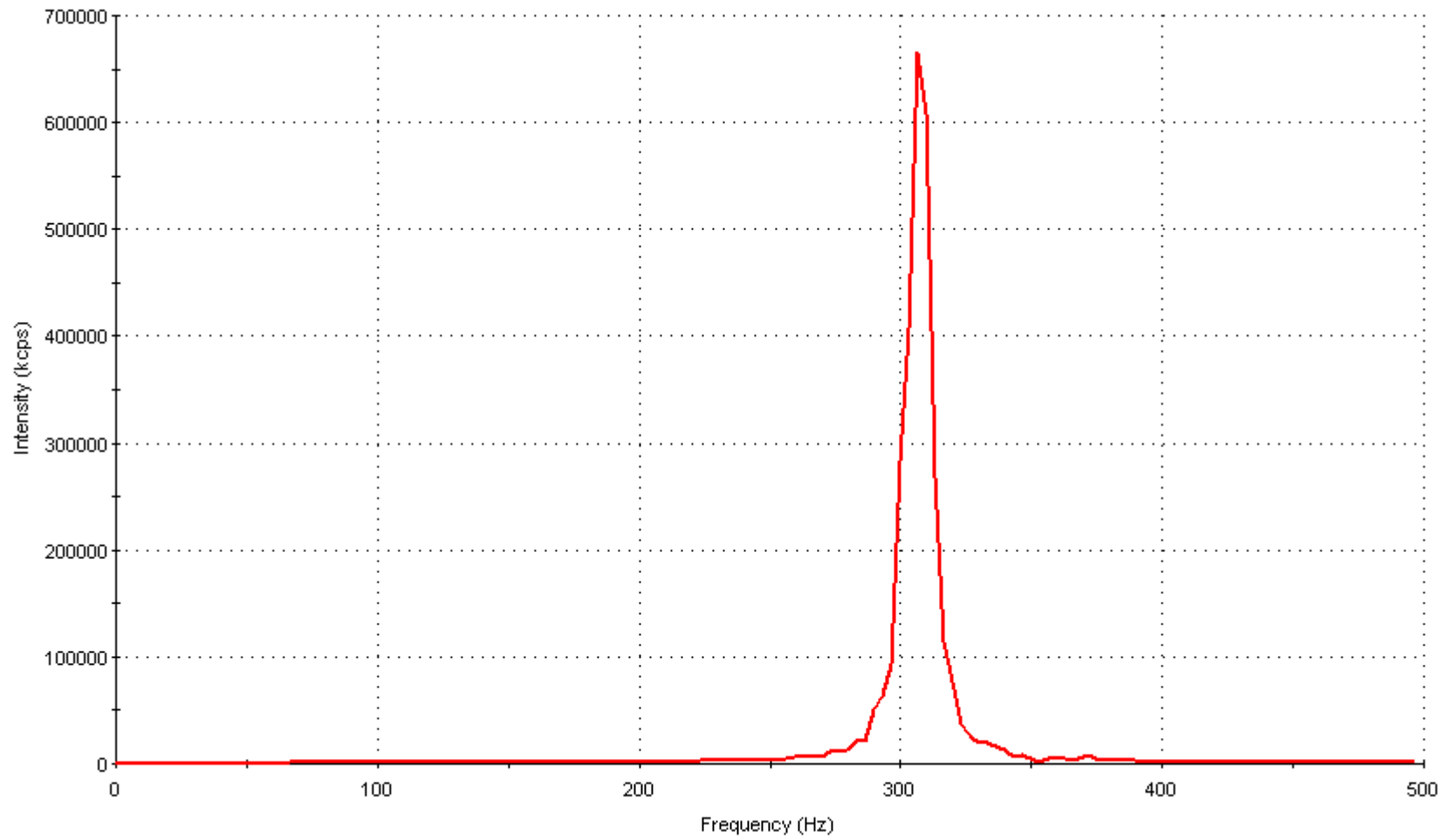
## Zeta 质量报告

测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
2	检测分布曲线的质量  Check the quality of the distribution plot data	Distribution data poor	样品浓度太低	增加子测试数量
				增加样品浓度，重新测试
			样品浓度太高	增加子测试数量
				稀释样品，重新测试
			高导电率导致样品变质/电极退化	用 Monomodal模式测试
				手动降低电压

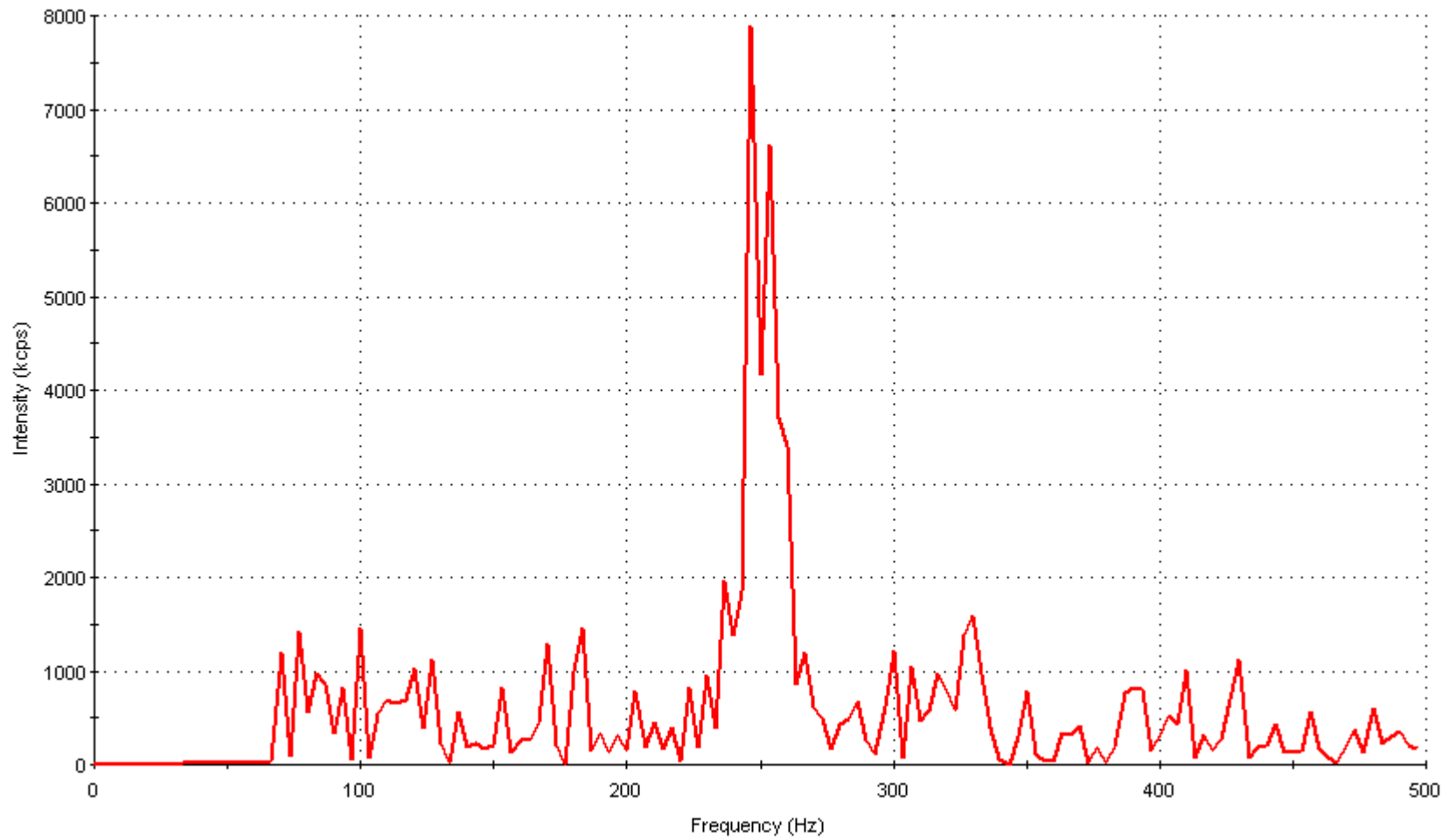
## 频率曲线- frequency plot

- 频率曲线显示了由傅里叶转换而得到的频率分布状况，这是由测试中的 SFR 部分得到的 (General Purpose)
- 频率分布被转变为电泳迁移率分布，进而被转化为zeta电位分布

# 频率曲线: 较好数据



# 频率曲线: 较差数据



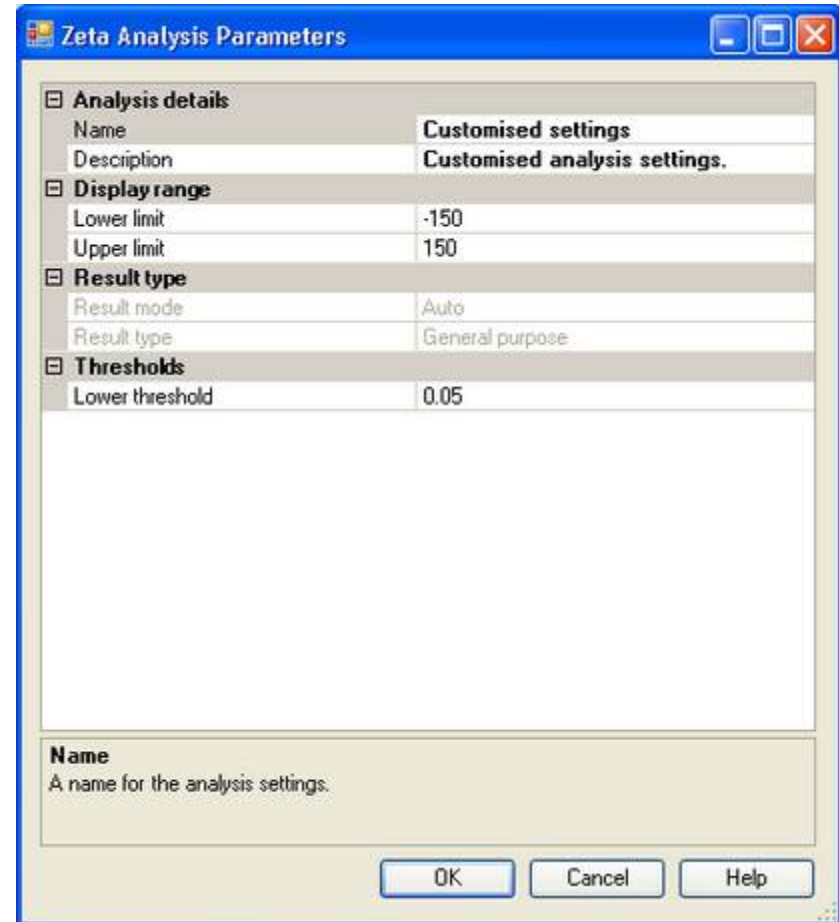
# Zeta 质量报告



测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
3	检测zeta电位分布的范围是否在科分析范围之内 Check the limits of the zeta potential distribution are within the analyzed range	Increase zeta potential analysis range	样品的zeta电位分布很宽	编辑 zeta potential 分析范围重新测试
			较高的导电率导致施加的电压自动降低	编辑 zeta potential 分析范围重新测试
			样品的介电常数太低或粘度太高	编辑 zeta potential 分析范围重新测试

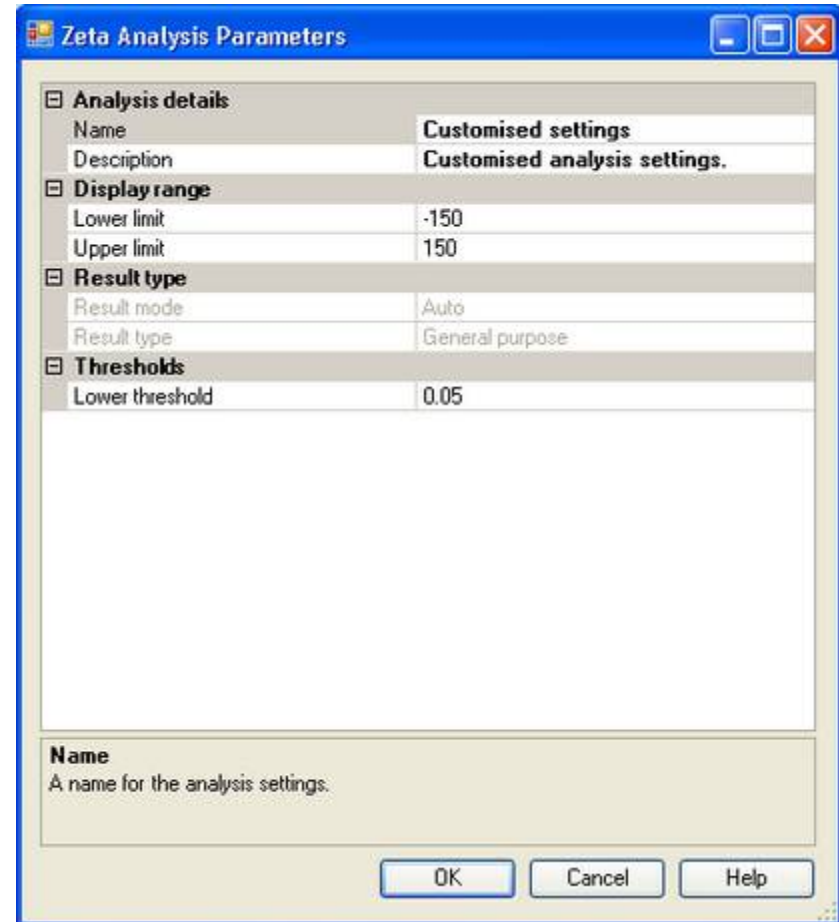
# Zeta 电位分布范围限制

- 默认的Zeta 电位分布范围限制在 +150 到 -150mV
- 如果所测得的zeta电位分布 在这个范围之外，一个警告信息将会出现在 Zeta 质量报告中
- 要校正这个问题，需要在Record View 中选择这个测试记录并进行编辑。

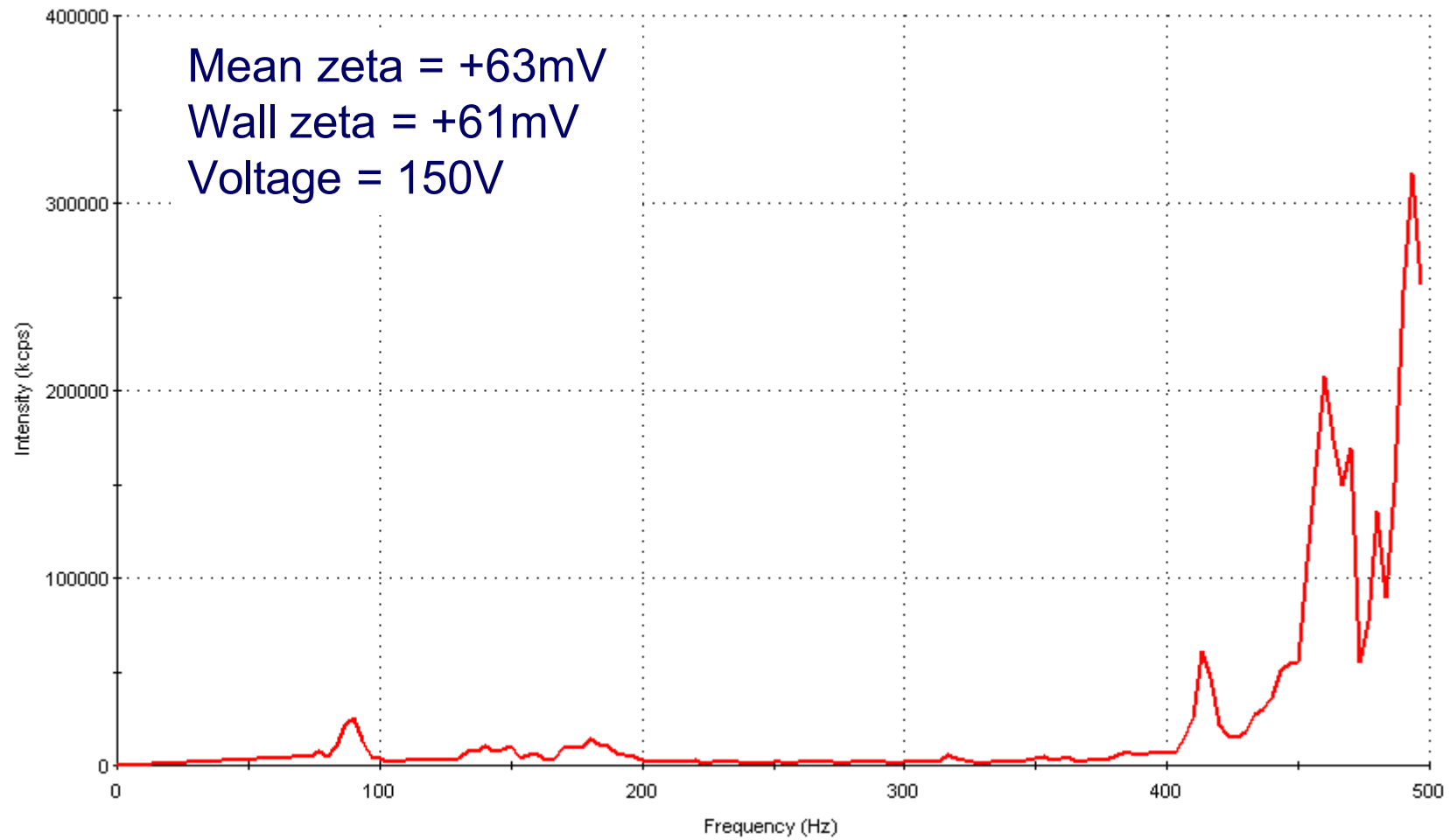


# Zeta 电位分布范围限制

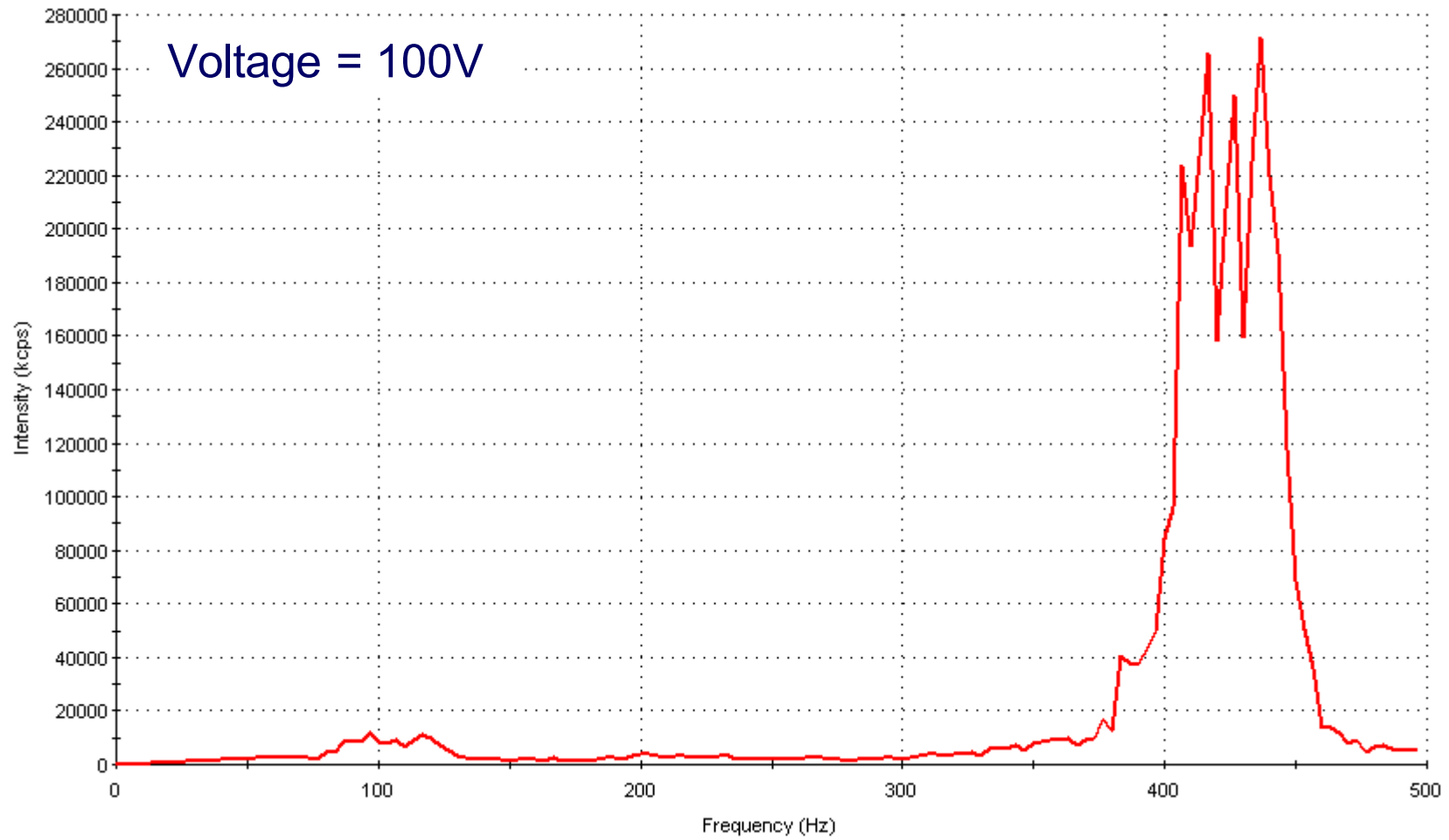
- 有几种原因可能导致这个问题的出现
- 样品的zeta电位分布很宽
- 较高的导电率导致施加的电压自动降低
- 样品的介电常数太低或粘度太高
- 如果平均zeta电位和样品池壁zeta电位分别大于+50mV



# Zeta 电位分布范围限制



# Zeta 电位分布范围限制



# Zeta 质量报告

测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
4	<p>检测是否对导电率大于10mS/cm的样品使用单项模式</p> <p>Checks that the Monomodal analysis has been used for samples with conductivities greater than 10mS/cm</p>	<p>Suggest use of Monomodal analysis as conductivity is &gt;10 mS/cm</p>	<p>样品电导率太高</p>	<p>设置较低减压用 General Purpose 重新测试 (可能会需要新鲜样品)</p> <hr/> <p>使用Monomodal analysis测试样品, 减小样品变质速度</p>

## Zeta 质量报告

测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
5	检查样品池中的闪光源  Check for flare originating from the cell wall	Flare from cell wall – check for bubbles, increase sample concentration	样品浓度太低	增加样品浓度重新测试
			气泡存在于光路中	检查样品中的气泡，清除气泡，重新测试

## Zeta 质量报告

测试项	测试描述	警告信息	可能原因	可采取的措施
6	检查衰减镜片的位置是否为11  Check if the attenuator used was position 11	<b>Sample concentration may be inappropriate (too high or low)</b>	样品浓度太低	增加样品浓度重新测试
			样品浓度太高	稀释样品重新测试