

Zetasizer Nano 系列粒度电位仪 快速操作手册

马尔文仪器公司（中国）



2013-11-04

目 录

1. Zetasizer Nano 系列仪器原理.....	3
1.1 动态光散射原理.....	3
1.2 静态光散射原理.....	8
1.3 电泳光散射原理.....	12
1.3.1 激光多普勒测速法.....	15
1.3.2 M3 - PALS 技术.....	16
1.3.3 表面电位测试技术.....	19
1.3.4 动态光散射微流变原理.....	20
2. Zetasizer Nano 系列样品检测详细操作.....	21
2.1 利用动态光散射检测颗粒粒径.....	21
2.1.1 样品要求.....	21
2.1.2 样品制备.....	21
2.1.3 测试步骤 - 软件操作.....	22
2.1.4 测试质量判断.....	24
2.1.5 动态光散射结果解释和使用.....	26
2.2 利用电泳光散射检测 zeta 电位.....	27
2.2.1 样品要求.....	27
2.2.2 样品制备.....	27
2.2.3 测试步骤.....	27
2.2.4 测试质量判断.....	30
2.2.5 结果解释.....	32
2.3 利用静态光散射检测分子量和第二维利系数.....	34
2.3.1 样品要求.....	34
2.3.2 样品制备.....	34
2.3.3 测试步骤.....	34
2.3.4 测试质量判断.....	38
2.3.5 结果解释.....	39
2.4 表面电位检测.....	40
2.4.1 样品要求.....	40
2.4.2 样品制备.....	40
2.4.3 测试步骤.....	42
2.4.4 测试质量判断.....	45
2.4.5 结果解释.....	45
2.5 温度趋势测定.....	47
2.5.1 样品要求.....	47
2.5.2 样品制备.....	47
2.5.3 测试步骤.....	47
2.5.4 测试质量判断.....	48

2.5.5 结果解释.....	48
2.6 动态光散射微流变操作步骤.....	51
2.6.1 样品要求.....	51
2.6.2 样品制备.....	51
2.6.3 测试步骤.....	51
2.6.4 测试质量判断.....	53
2.6.5 结果解释.....	54
2.7 自动滴定操作.....	57
2.7.1 测试目的.....	57
2.7.2 样品制备.....	57
2.7.3 测试步骤.....	57
2.7.4 测试质量判断.....	64
2.7.5 结果解释.....	64
2.8 蛋白质的粒径和电位测定和以及数据解释.....	65

1. Zetasizer Nano 系列仪器原理

Zetasizer Nano 系列仪器能够提供液体介质中粒子或大分子的三种特性。这三种基本参数是：粒径、Zeta 电位和分子量。Zetasizer 系统中采用了多种独特技术，使我们能够在一个比较宽的浓度范围内测量这三种参数。拥有能够进行趋势和自动滴定测量的功能，并且能够测量蛋白质的熔点。Zetasizer 系列仪器的主要特点是：测试前自动进行光路调准，可设置的测量位置，精确的温度控制，这些操作使得测量具有极高的重复性和精确度。此外，仪器还能测量其它重要参数，如 pH 和浓度。标准操作程序（SOPs）和弯曲式毛细管样品池的应用，极大降低了用户的操作仪器强度。

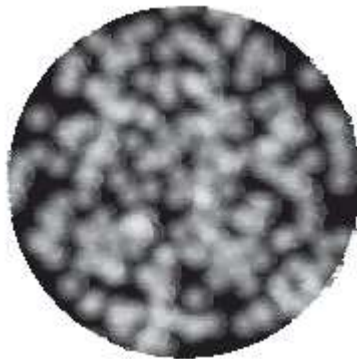
1.1 动态光散射原理

Zetasizer Nano 系列使用称为动态光散射（DLS）的过程进行粒径测量。

动态光散射（也称为 PCS — 光子相关光谱）测量布朗运动，并将此运动与粒径相关。这是通过用激光照射粒子，分析散射光的光强波动实现的。

散射光波动如果小粒子被光源如激光照射，粒子将在各个方向散射。

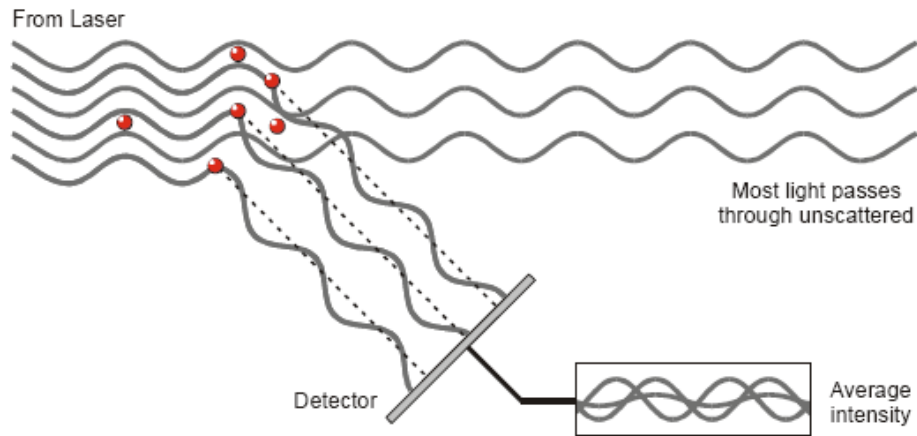
如果将屏幕靠近粒子，屏幕即被散射光照亮。现在考虑以千万个粒子代替单个粒子。屏幕将出现如下所示的散射光斑。



散射光斑由明亮和黑暗的区域组成，在黑暗区域不能监测到光。

什么引起这些明亮区域和黑暗区域？

下图显示粒子散射光的传播的波动。光的明亮区域是：粒子散射光以同一相位到达屏幕，相互叠加相干形成亮斑。黑暗区域是：不同相位达到屏幕互相消减。



The scattered light falling on the detector.

在上例中，我们说粒子是不运动的。在这种情况下，散射光斑也将是静止的 — 即散射光斑位置和散射光斑大小都是不变的。

实际上，悬浮于液体中的粒子从来不是静止的。由于布朗运动，粒子不停地运动。布朗运动是由于与环绕粒子的分子随机碰撞引起的粒子运动。对DLS来说，布朗运动的一个重要特点是：小粒子运动快速，大颗粒运动缓慢。在Stokes - Einstein方程中，定义了粒径与其布朗运动所致速度之间的关系。

由于粒子在不停地运动，散射光斑也将出现移动。由于粒子四处运动，散射光的建设性和破坏性相位叠加，将引起光亮区域和黑暗区域呈光强方式增加和减少 — 或以另一种方式表达，光强似乎是波动的。

Zetasizer Nano测量了光强波动的速度，然后用于计算粒径。

诠释散射光波动数据

我们知道，Zetasizer测量散射光的光强波动，并用于计算样品中粒径 — 但它如何进行工作的呢？

在仪器中有一个部件叫数字相关器。在一段时间，一个相关器基本上测量了两个信号之间的相似程度。

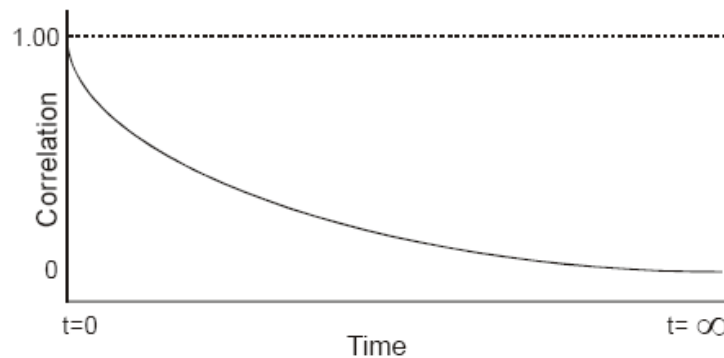
如果我们将某一时间点（比如说时间 = t ）将散射光斑特定部分的光强信号，与极短时间的后（ $t + \delta t$ ）的光强信号相比较，我们将发现，两个信号是非常相似的 — 或是强烈相关的。然后，如果我们比较时间稍提前一点（ $t + 2 \delta t$ ）的原始信号，这两个信号之间仍然存在相对良好的比较，但它也许不如 $t + \delta t$ 时良好。因此，这种相关性是随时间减少的。

现在考虑在“ t ”时的光强信号与随后更多时间的光强信号 — 两个信号将互相没有关系，因为

粒子是在任意方向运动的（由于布朗运动）。在这种情况下，可以说这两个信号没有任何相关。使用DLS，我们可处理非常短的时间标度。在典型的散射光斑模式中，使相关关系降至0的时间长度，处于1—10毫秒级。“稍后短时”（ δt ）将在纳秒或微秒级。

如果我们将“t”时的信号强度与它本身比较，那么我们得到完美的相关关系，因为信号是同一个。完美的相关关系为1，没有任何相关关系为0。

如果我们继续测量在（ $t+3\delta t$ ），（ $t+4\delta t$ ），（ $t+5\delta t$ ），（ $t+6\delta t$ ）时的相关关系，相关关系将最终减至0。相关关系对照时间的典型相关关系函数如下所示。



iii 6092

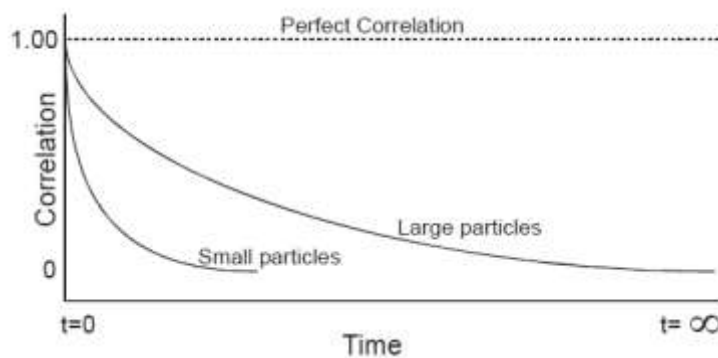
使用相关函数得到粒径信息

相关关系函数如何与粒径相关？我们早先提到，正在做布朗运动的粒子速度，与粒径（粒子大小）相关（Stokes - Einstein方程）。大颗粒运动缓慢，小粒子运动快速。这对散射光斑有什么效应？

如果测量大颗粒，那么由于它们运动缓慢，散射光斑的强度也将缓慢波动。

类似地，如果测量小粒子，那么由于它们运动快速，散射光斑的密度也将快速波动。

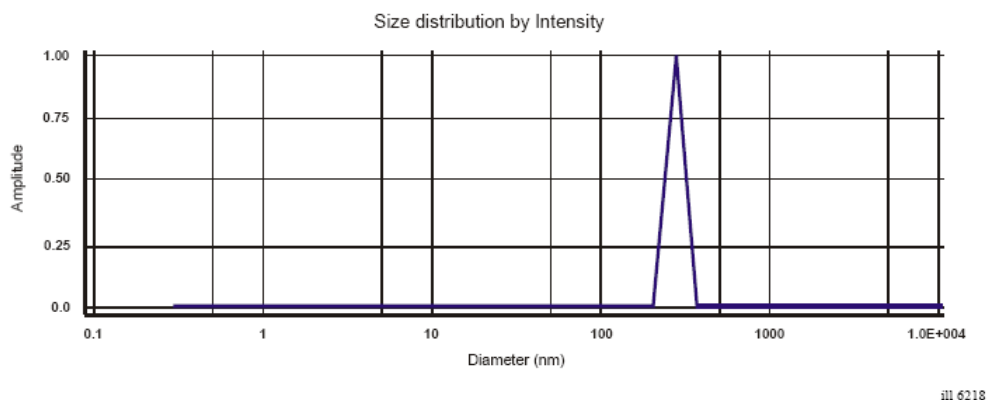
下图显示了大颗粒和小粒子的相关关系函数。可以看到，相关关系函数衰减的速度与粒径相关，小粒子的衰减速度大大快于大颗粒的。



在测量相关函数后，可以使用这个信息计算粒径分布。Zetasizer软件使用算法，提取针对一系列粒径类别的衰减速度，以得到粒径分布。

典型粒径分布图如下所示。 X轴显示粒径类别分布，而Y轴显示散射光的相对强度。

因此，这称为光强度分布。



虽然由DLS生成的基础粒径分布是光强度分布，但使用米氏理论，可将其转化为体积分布 (volume distribution) 。

也可进一步将这种体积分布转化为数量分布 (Number distribution) 。

但是，数量分布的运用有限，因为相关方程采集数据中的小错误将导致数量分布的巨大误差。

Intensity (光强)、Volume (体积) 和Number (数量) 分布

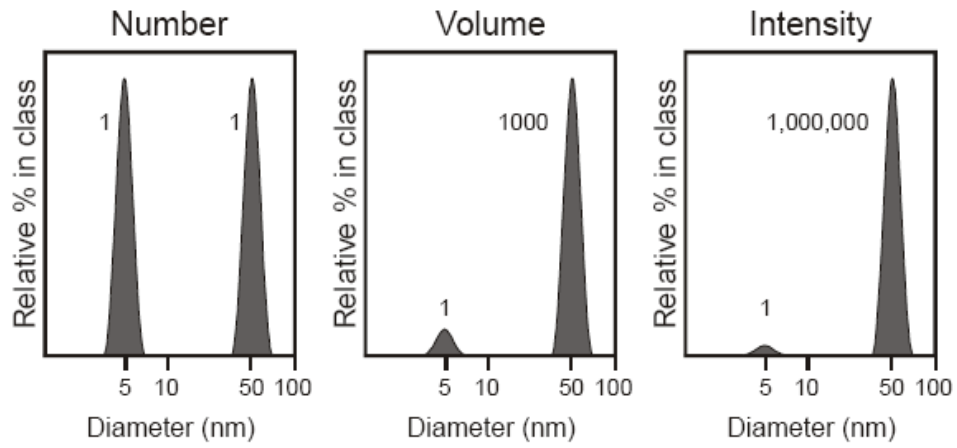
光强、体积和数量分布之间有什么差别？

说明光强、体积和数量分布之间差异的简单方式，是考虑只含两种粒径 (5nm和10nm)、但每种粒子数量相等的样品。

下面第一个图显示了数量分布结果。可以预期有两个同样粒径 (1:1) 的峰，因为有相等数量的粒子。

第二个图显示体积分布的结果。50nm粒子的峰区比5nm (1:1000比值) 的峰区大1000倍。这是因为，50nm粒子的体积比5nm粒子的体积 (球体的体积等于 $4/3\pi (r)^3$) 大1000倍。

第三个图显示光强度分布的结果。50nm粒子的峰区比5nm (1:1000比值) 的峰区大1,000,000倍 (比值1:1000000)。 这是因为大颗粒比小粒子散射更多的光 (粒子散射光强与其直径的6次方成正比) — (得自瑞利近似)。



ill 6094

需要再说明的是，从 DLS 测量得到的基本分布是光强分布 — 所有其它分布均由此生成。

1.2 静态光散射原理

Zetasizer Nano系列使用称为静态光散射（SLS）的过程进行分子量测量。

静态光散射（SLS）是非侵入技术，用于取得溶液中的分子特征。

以动态光散射的类似方式 — 第14章中的粒径理论 — 以光源如激光照射样品中的粒子，而粒子在所有方向散射光。但是，静态光散射测试散射光的时间 — 平均光强，而不测量依赖于散射光强度随时间的波动。

对一系列样品浓度，累计测试其一段时间如10—30秒的散射光光强然后求的平均光强。这个平均光强与固有的信号波动无关，因此称为“静态光散射”。

由此，我们可以测定分子量（MWt）和第二维利系数（A₂）。

第二维利系数（A₂）是一种属性，说明了粒子与溶剂或适当分散剂介质之间的相互作用力。

- 对A₂>0的样品，粒子更“喜欢”溶剂而非它本身，趋于停留在稳定溶液中。
- 当A₂<0时，粒子更“喜欢”它本身而非溶剂，因此可能会聚集。
- 当A₂=0时，粒子 — 溶剂相互作用力等于分子 — 分子相互作用力 — 于是溶剂可描述为 θ 溶剂。

静态光散射 — 理论

通过测量不同浓度的样品，并应用**瑞利方程**，可以测量分子量。瑞利方程说明了溶液中粒子的散射光密度。

瑞利方程是：

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

- $R(\theta)$ ：瑞利比 — 样品散射光与入射光的比值。
- M ：样品分子量
- A_2 ：第二维利系数
- C ：浓度
- $P(\theta)$ ：样品散射强度的角度依赖性，请参考瑞利散射一节。

- K : 如下定义的光学常数。

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

N_A : Avogadro常数

λ_o : 激光波长

n_o : 溶剂折射率

dn/dc : 折射率微分增量。这是折射率随浓度变化的函数。对多数样品/溶剂组合, 在文献中可以查到; 而对新组合, 运用微分折射计可以测量 dn/dc 。

分子量测量的标准方法是, 首先测量被分析物相对于已知瑞利比的标准物的光散射强度。

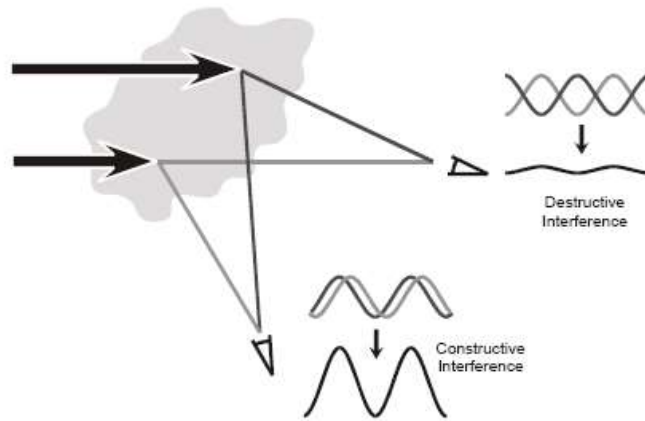
用于静态光散射的**普通标准物**是**甲苯**, 简单理由是, 已知一定范围波长和温度下, 甲苯的瑞利比较高, 适合于精确测量; 而且可能更重要的是, 甲苯相对较容易得到。在许多参考书中可以查到甲苯的瑞利比, 但作为参考, 下面给出用于从甲苯标准物计算样品的瑞比的表达式。

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

- I_A : 被分析物的剩余散光强 (如样品散光强 - 溶剂散光强)。
- I_T : 甲苯散光强。
- n_o : 溶剂折射率
- n_T : 甲苯折射率
- R_T : 甲苯的瑞利比

瑞利散射

在瑞利方程式中, P_θ 一项包含了样品散光强的角度依赖性。角度依赖性源于同一粒子上不同位置散射光的相干加强和相干减弱, 如下所示。这种现在称为**米氏散射**, 当粒子足够大而产生多重光子散射时即发生。



iii 6746

但当溶液中粒子比入射光波长小很多时，多重光子散射则可以避免。在这些情况下， P_{θ} 将降至1，散射光强丧失了的角度依赖性。这种类型的散射称为瑞利散射。

瑞利散射方程为：

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

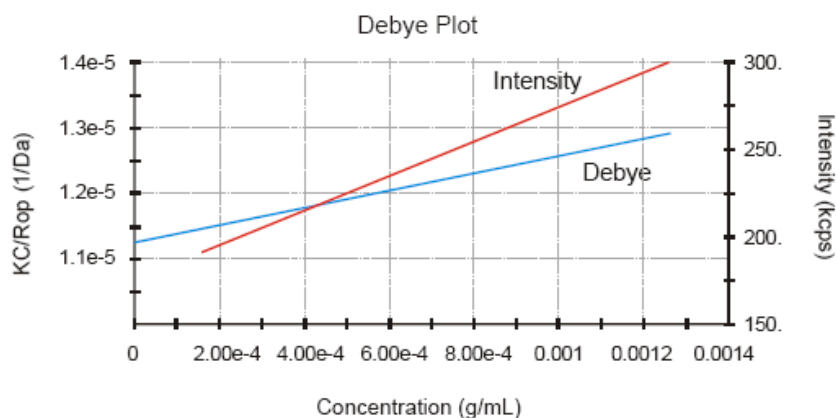
因此，我们可以规定，如果粒子较小，可假定为瑞利散射而采用瑞利近似。

使用Zetasizer Nano系列，适用的分子量测量范围为：对线性聚合物，数百g/mol — 500,000 g/mol；对接近球形的聚合物和蛋白质，超过20,000,000 g/mol。

Debye 曲线 粒子产生的散射光强度，正比于重均分子量的平方以及粒子浓度。

Zetasizer Nano S和ZS在一个角度测量不同浓度样品的**散射光强度 (K/CR)**；将其与标准物（如甲苯）产生的散射进行比较。

其曲线即称为Debye曲线，允许测定**绝对分子量**和**第二维利系数**。



iii 7675

从X轴的截距测定分子量 (Mwt)，即 $K/CR_{\theta} = 1/MWt$ ，以Daltons为单位表示。

从Debye曲线的斜率测量第二维利系数 (A_2)。

每个曲线和分子量的测量，都是通过进行几个单独测量；从所用的溶剂 (0浓度测量)，至各种浓度的样品制备。下图显示如何从Debye曲线得到分子量和第二维利系数。

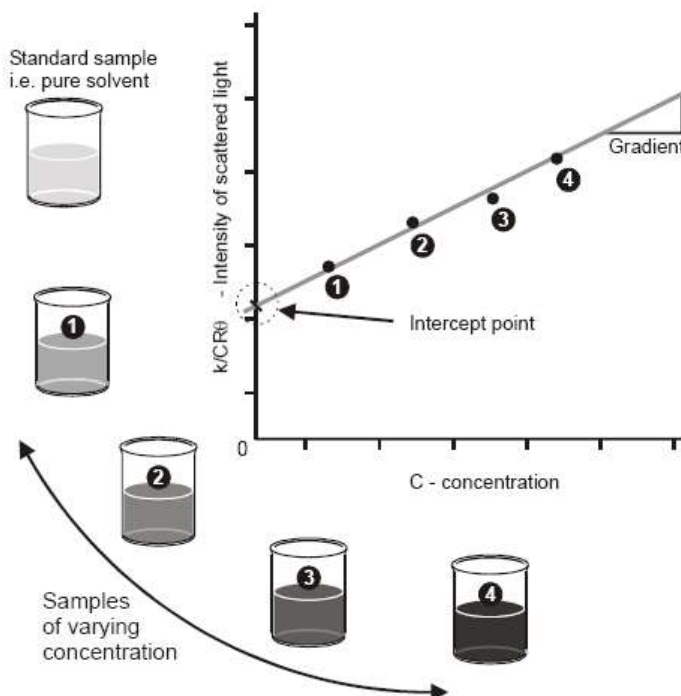


图 6745

由于仅用一个测量角度， $k/CR\theta$ 对照 C 的图应该给出一条直线，其在零浓度时截距为 $1/M$ ，斜率是 A_2 。

1.3 电泳光散射原理

Zetasizer Nano系列通过测量电泳迁移率并运用Henry方程计算Zeta电位。通过使用激光多普勒测速法(LDV)对样品进行电泳迁移率实验，得到带电粒子电泳迁移率。

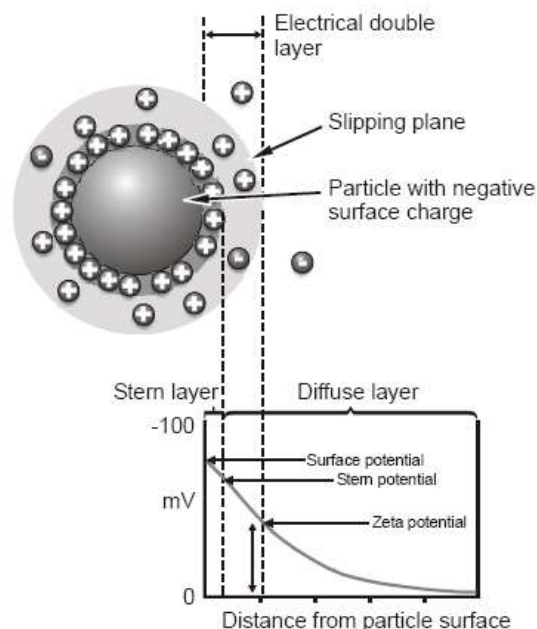
在随后的几节说明这些技术。

Zeta电位和双电层

粒子表面存在的净电荷，影响粒子界面周围区域的离子分布，导致接近表面抗衡离子（与粒子电荷相反的离子）浓度增加。于是，每个粒子周围均存在双电层。

围绕粒子的液体层存在两部分：一是内层区，称为Stern层，其中离子与粒子紧紧地结合在一起；另一个是外层分散区，其中离子不那么紧密的与粒子相吸附。在分散层内，有一个抽象边界，在边界内的离子和粒子形成稳定实体。当粒子运动时（如由于重力），在此边界内的离子随着粒子运动，但此边界外的离子不随着粒子运动。这个边界称为流体力学剪切层或滑动面(slipping plane)。

在这个边界上存在的电位即称为Zeta电位。



iii 6937

Zeta电位的大小表示胶体系统的稳定性趋势。胶体系统是：当物质三相（气体、液体和固体）之一，良好地分散在另一相而形成的体系。对这种技术，我们对两种状态感兴趣：固体分散在液体中和液体分散在液体中即乳剂。

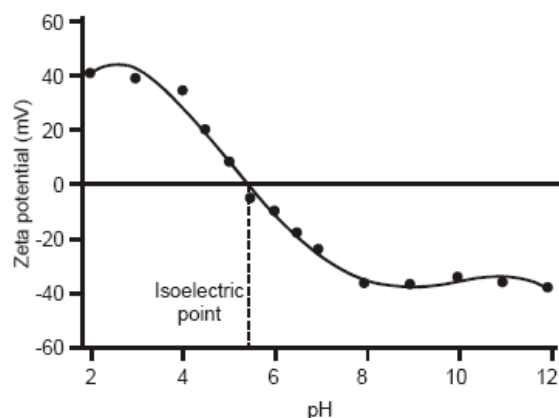
如果悬浮液中所有粒子具有较大的正的或负的Zeta电位，那么他们将倾向于互相排斥，没有絮凝

的倾向。但是如果粒子的Zeta电位值较低，则没有力量阻止粒子接近并絮凝。稳定与不稳定悬浮液的通常分界线是： $+30\text{mV}$ 或 -30mV 。Zeta电位大于 $+30\text{mV}$ 正电或小于 -30mV 负电的粒子，通常认为是稳定的。

影响Zeta电位的最重要因素是pH。没有引用pH值的Zeta电位值，本身实际上是没有意义的数字。想象悬浮液中的一个粒子，具有负Zeta电位。如果在这个悬浮液中加入更强碱，那么粒子将倾向于得到更多负电荷。如果在这个悬浮液中加入酸，将达到某一点，负电荷被中和。进一步加入酸，则导致在表面产生正电荷。因此，Zeta电位对照pH的曲线，在低pH时是正电的，而在高pH时较低正电或是负电的。

曲线通过零Zeta电位的点，叫做等电点（isoelectric point），在实际应用过程中是非常重要的。

正常情况下它就是胶体系统最不稳定的点。Zeta电位对照pH的典型图示如下。



III 6749

电动学效应

在粒子表面存在电荷的重要结果，是它们在所施加的电场影响下呈现一定效应。这些效应被集体定义为电动效应。依赖于哪种运动的方式被诱导，有四种明显的效应。他们是：

■ 电泳：

在所施加的电场影响下，带电粒子相对于其悬浮液体的运动。

■ 电渗：

在所施加的电场影响下，液体相对于静止的带电表面的运动。

■ 泳动电位：

当液体被迫流过静止的带电表面时所产生的电场。

■ 沉降电位：

当带电粒子相对于静止液体运动时产生的电场。

电泳

当电场施加于电解质时，悬浮在电解质中的带电粒子被吸引向相反电荷的电极。作用于粒子的粘性力倾向于对抗这种运动。当这两种对抗力达到平衡时，粒子以恒定的速度运动。

粒子的速度依赖于下述因素：

- 电场或电压梯度的强度。
- 介质的介电常数。
- 介质的粘度。
- Zeta电位。

电场中粒子的速度通常指的是电泳迁移率。

已知这个速度时，通过应用Henry方程，我们可以得到粒子的Zeta电位。

亨利（Henry）方程是：

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

- z : Zeta电位.
- U_E : 电泳迁移率
- ε : 介电常数
- η : 粘度
- $f(Ka)$: Henry函数

有两个值通常用于 $f(Ka)$ 测定的近似，即1.5或1.0。

通常在水性介质和中等电解质浓度下进行Zeta电位的电泳测定法。在这种情况下 $f(Ka)$ 是1.5，即Smoluchowski近似。因此，对适合Smoluchowski模型的系统，即大于0.2微米的粒子分散在含大于 10^{-3} 摩尔盐的电解质溶液中，可由此中算法直接从迁移率计算Zeta电位。

Smoluchowski近似用于弯曲式毛细管样品池和通用插入式样品池的水相样品。

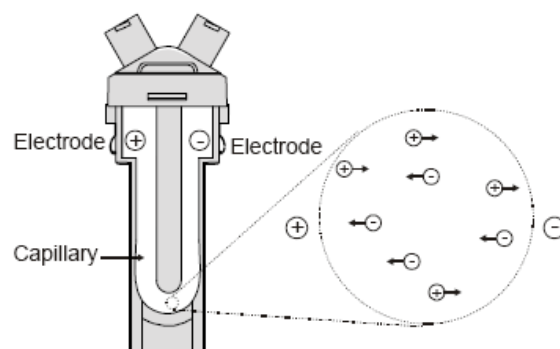
对较低介电常数介质中的小粒子， $f(Ka)$ 为1.0，允许同样的简单计算。这通常指Huckel近似。

非水相测量通常使用Huckel近似。

测量电泳迁移率

我们直接测定的是电泳迁移率，并转化为Zeta电位，Zeta电位是从理论考虑推导出来的。那么如何测量电泳迁移率呢？

电泳体系的主要组成是带电极的样品池，在其两端为电极并且都施加了电势。粒子朝着相反电荷的电极运动，测量其速度并以单位场强表示，即其迁移率。



iii 6750

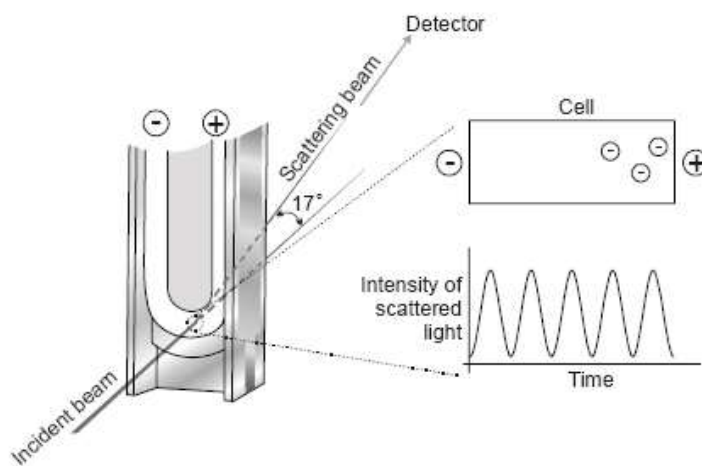
在马尔文Zetasizer Nano系列仪器中，用于测量这种速度的技术是**激光多普勒测速法**。

1.3.1 激光多普勒测速法

激光多普勒测速法（Laser Doppler Velocimetry）在工程应用中是非常成熟的技术，用于从喷气式发动机中涡轮叶的超声流动到树液从植物茎干中升起的速度等很多方面的研究。

在这两种例子中，实际上以我们测量不断运动的流体中微小粒子的速度。因此LDV也适合于测量在电泳实验中运动的带电粒子速度。

接收光学器件被设置用来传递样品池中粒子的散射光。



iii 6777

在17°角度的散射光与参考光结合，产生光强的波动信息，其中波动速度与粒子的速度成正比。一个数字信号处理器用于提取散射光中的特征频率。

光学调制器

系统的精巧部分包括用一个震荡反光镜调制其中一束激光。这得到**Zeta电位信号**的正负性。

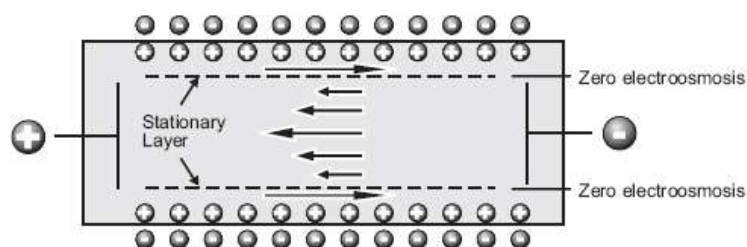
调制器另一个好处是，能使迁移率较低或为零的粒子得到与高迁移率粒子一样精确的信号。

这种技术保证在数秒内得到精确结果，可以观察到数百万个粒子。

电渗效应

毛细样品池壁携带表面电荷，为了观察到电泳运动所施加的电场，将会导致靠近池壁附近的液体进行电渗流动。胶体粒子将要经受这种附加在电泳运动上的流动。但是在封闭系统中，沿管壁流动必须被相反方向的，毛细样品池中央的流动补偿。

在样品池中存在一个点，此时电渗流动为零 — 两种流体流动抵消。如果在这一点进行测量，所测量的粒子速度将是**真实的电泳速度**。这一点称为**稳定层**，是两种激光束交叉的地方；因此，所测量的Zeta电位排除了电渗所造成的误差。



iii 7672

避免电渗

上面所述的稳定层技术已运用多年。

由于电渗效应，只能在样品池的特定点进行测量。如果可能完全排除电渗，则可能在样品池中任一点进行测量、并取得真实迁移率。

现在使用Zetasizer Nano系列仪器，将激光多普勒测速法和相位分析光散射（PALS）结合，即马尔文**M3 - PALS**专利技术，使这变为可能。

实施M3 - PALS，也能够分析极低迁移率的样品，并计算其迁移率分布。

1.3.2 M3 - PALS 技术

马尔文已开发了**M3—PALS**专利技术，在样品池内任一点进行测量，得到电泳迁移率。这是马尔文改良的激光多普勒测速法 — M3测量技术，与PALS（**相位分析光散射**）的结合的专利技术。

M3 技术

如上面所讨论的，传统电泳测量是在稳定层进行测量，而稳定层是接近样品池壁的精确定位。虽然使用Zetasizer Nano是在样品池中心进行测量的，但使用M3测量，可在样品池任何一点进行测量。

M3包括**慢速电场变换（SFR）**和**快速电场变换（FFR）**测量，因此命名为“混合模式测量”。

样品池中测量位置

M3法在样品池中心进行测量，而不是在稳定层进行。原则上，M3测量可在样品池任何位置进行，但有许多理由选择在样品池中心进行。

- 测量区远离样品池壁，因此降低了附近表面所产生的反射闪光的机会。
- 样品设置不是至关重要的。
- 可以计算样品池壁的电荷。

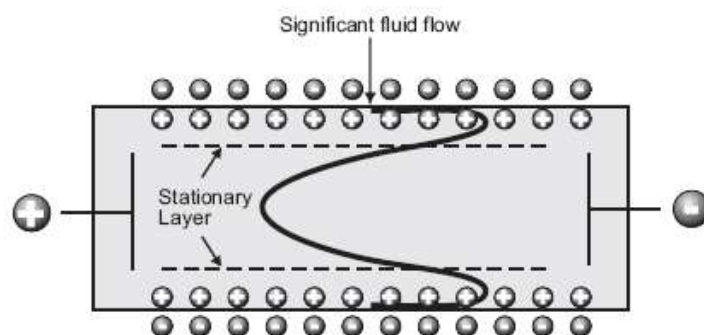
施加电场反转

所有使用LDV（激光多普勒测速法）测量迁移率的系统，在测量过程中周期性地变换应用电场。这通常就是下面提到的慢速电场变换。

但是，M3包括针对每个Zeta电位测量的两种测量：一是，所施加的电场的慢速变换 — 即SFR测量；二是所施加的电场的快速变换 — 即FFR测量。

慢速电场变换（SFR）

这种变换运用于降低电极的氧化，氧化在导电溶液中是不可避免的。电场通常每1秒变反转一次，允许流体稳定流动。



iii 7673

快速电场变换（FFR）

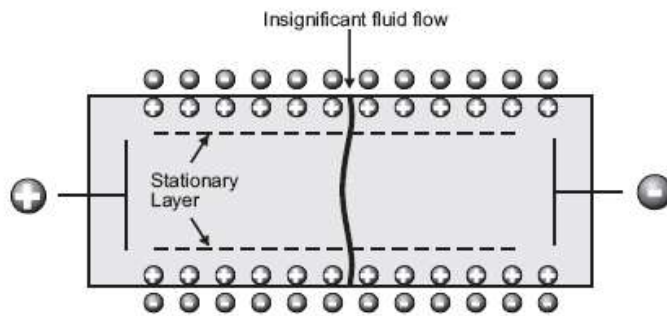
如果电场更快速地变换，则可能在粒子达到最终速度时，由于电参导致的流体流动并不显著。

(下面这个图中的剩余流动是放大的)。

这表明，在这段时期内所测量的迁移率，仅由粒子的电泳所引起，而不受电渗所影响。

这种技术计算的平均Zeta电位是非常准确的，因为样品池的测量位置不是至关重要的。

但是，由于粒子速度是在短的时间内测得的，如此降低了分布信息的价值。这是M3所述的内容，PALS技术用于测定这部分测试中的粒子迁移率。



iii 7674

M3测量顺序

以下述方式进行M3测量：

- 在样品池中进行**快速电场变换**测量。这测得到精确的平均值。
- 进行**慢速电场变换**测量。这得到更好的分辨率，但迁移率值由于电渗效应有所漂移。
- 从FFR和SFR测量计算平均Zeta电位减去了电渗流动的影响。此值用于纠正慢速电场变换的误差。
- 电渗值用于计算样品池壁的Zeta电位。

M3的优点

使用M3，简化了全部Zeta电位测量。对操作者来说，不再需要为测量选择系统参数，因为适当的设置成为计算在M3顺序的一部分。随着测量变量数减少，测量可重复性和准确性均得到改善。

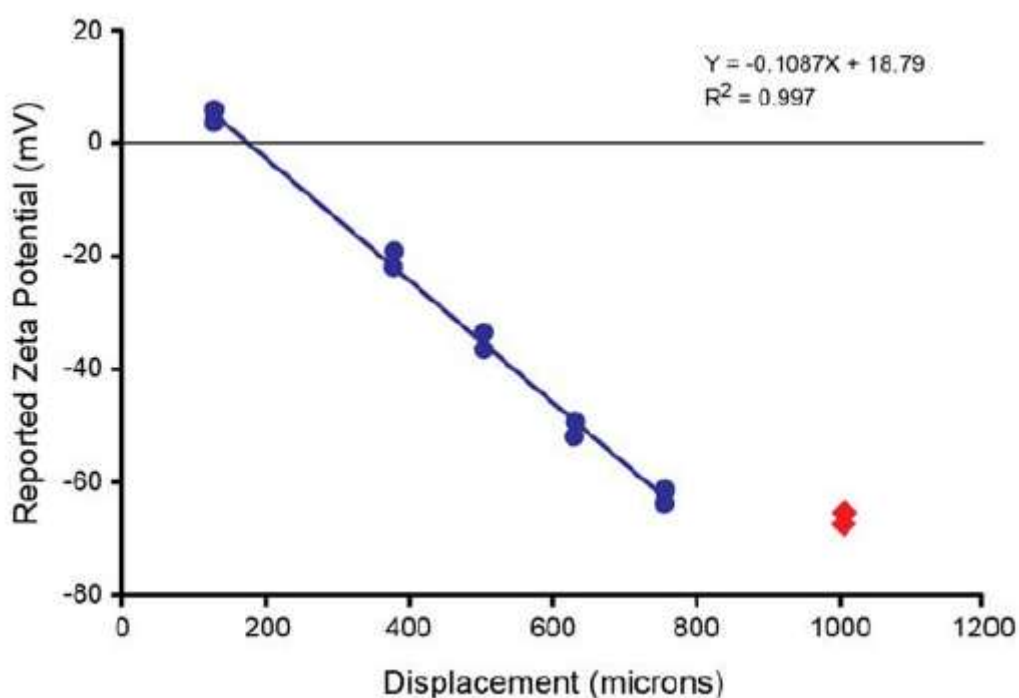
另外，测量位置不再是一个问题，因为不需要关心稳定层的位置。

如今M3与PALS测量已经结合应用。

1.3.3 表面电位测试技术

测试表面电位需要把待测表面固定在两个电极之间，整个样品和电极浸没在适合含有示踪粒子的水性溶液中。

检测距离表面不同距离下示踪粒子的表观电泳速度。样品表面的电渗运动和电泳方向相反，越接近于表面，电渗作用的影响越强烈，反之越微弱。下图展示了检测到的表观Zeta电位与到平面之间距离的关系。



表面zeta电位是通过外推电位到0距离位置，然后通过以下公式计算：

$$\text{表面zeta电位} = - \text{截距} + \text{示踪颗粒的zeta电位}$$

示踪颗粒的zeta电位是通过远离平面的位置（即没有电渗影响）检测得到的。上图中蓝点为每一个测试位置的表观zeta电位，红点是远离平面位置检测到的颗粒的zeta电位。

1.3.4 动态光散射微流变原理

动态光散射微流变功能需要DTS7.0以上版本软件，以及ZEN2500 zetasizer Nano ZSP或者ZEN3600 Zetasizer Nano ZS。

动态光散射微流变DLS Microrheology技术是动态光散射和流变技术的交叉应用。其样品对应的是低粘度弱相互作用力的体系如高分子/蛋白质稀溶液。

其优点是：

- 检测极低粘度弱相互作用力结构样品在高频下的流变特性
- 只需要极低的样品量，这点对于蛋白样品尤为重要
- 提供流变参数 – G' ， G'' ， η^* 。数据可以和机械流变仪重合
- 测试速度时间短，可以同时提供所有频率下流变数据
- 应用于蛋白质溶液的粘度检测，可以检测蛋白质聚集开始

DLS 微流变 – 基本原理

动态光散射微流变使用示踪粒子检测应力和形变之间的关系。同时需要动态光散射技术DLS和电泳光散射技术ELS来确保测试有效性。

确保示踪粒子具有正确的表面化学特性

通过Zeta potential检测保证示踪粒子和样品之间没有化学相互作用力。首先检测样品溶液环境下没有加入样品时示踪颗粒的zeta 电位，然后检测首先检测样品溶液环境下加入样品时示踪颗粒的zeta 电位。如果两次检测的电位值具有可比性，即电位变化非常小，那么说明样品和示踪粒子没有相互作用。

确保适合的浓度和示踪粒子的良好分散

粒径检测功能确保散射光强度和分布符合检测条件。进行一个粒径检测，确保示踪粒子的散射光强贡献占到绝大部分，并且示踪粒子的分布是窄分布，这将说明示踪颗粒得到了良好的分散。

检测示踪粒子的相关方程

进行微流变测试，从均方平均位移曲线（Mean Square Displacement MSD）中提取微流变数据。

2. Zetasizer Nano 系列样品检测详细操作

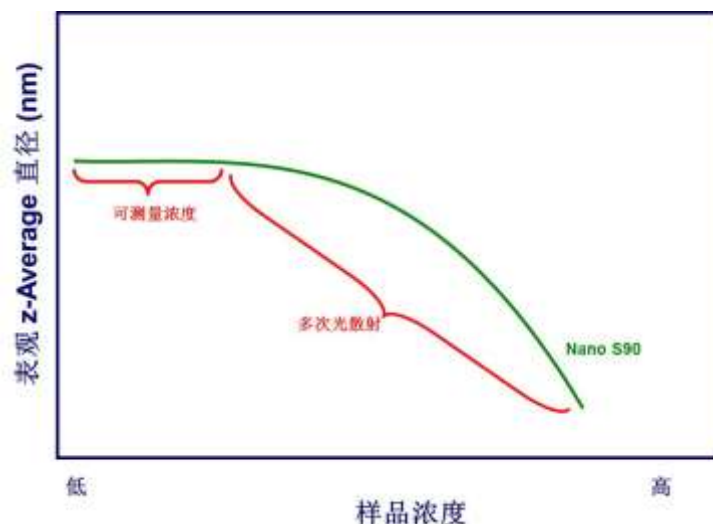
2.1 利用动态光散射检测颗粒粒径

2.1.1 样品要求

动态光散射技术 DLS 通过检测颗粒/胶体/高分子/蛋白质的布朗运动速度，进而得到颗粒的流体力学直径。DLS 技术检测需要样品稳定、均匀。样品稳定意味着颗粒进行布朗运动而不是沉淀或者上浮运动。均匀意味着在检测时间内，样品在空间分布各个位置含量相同。

样品浓度要求：

如果是稳定颗粒，即颗粒的大小及其分布不随浓度所改变，则需要在稀释条件下检测样品粒径，以得到颗粒的自扩散系数计算颗粒的流体力学直径。不同种类的样品可能稀释到的程度有所不同，但是在达到稀释浓度后粒径应该不随浓度改变，如下图。



如果是动态平衡体系，如某些没有经过均制加压处理的乳液、微乳液、表面活性剂胶束，改变样品浓度将改变体系的外部平衡条件导致粒径及其分布改变。这时应该在原液状态下进行检测。

样品洁净程度：

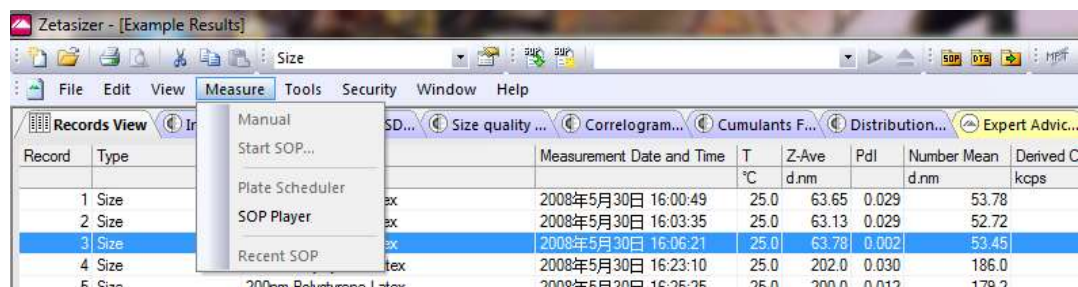
由于颗粒的散射光强正比于颗粒粒径的 6 次方，DLS 技术对于体系中微量存在的灰尘、杂质（通常是微米级别的颗粒）极为敏感。这些物质的存在将对结果造成极大影响。通常来讲对于粒径小于 50nm，表面看上去极为澄清透明的体系，我们建议使用适当孔径的过滤膜过滤，然后再进行测试。

2.1.2 样品制备

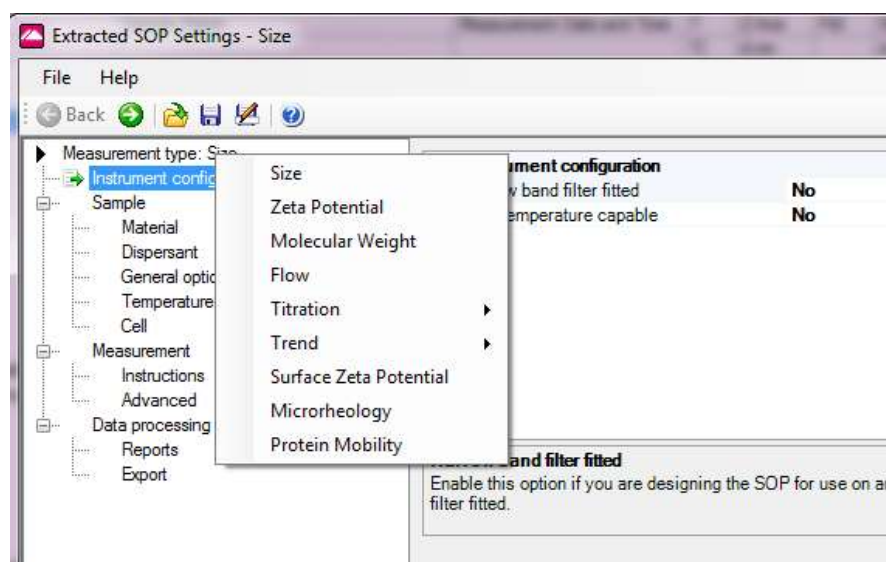
将过滤后的样品直接滴入样品池，尽量避免从侧壁流入，样品高度可以参考样品槽翻盖上 1:1 样品池投影的高度建议。


2.1.3 测试步骤 - 软件操作


新建一个文件，然后单击“measure”选择“Manual”




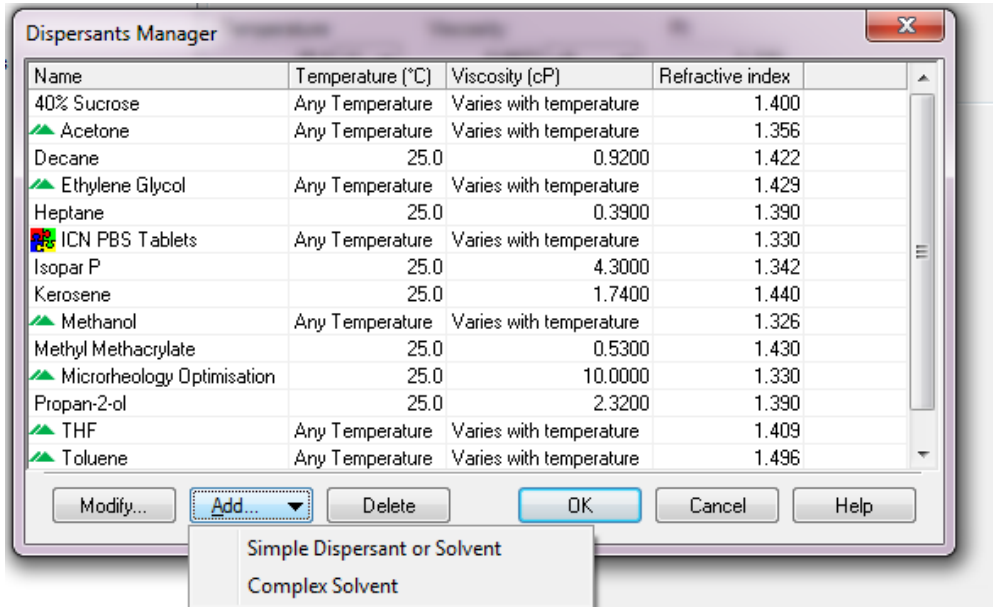
单击“Measurement type”选择“size”



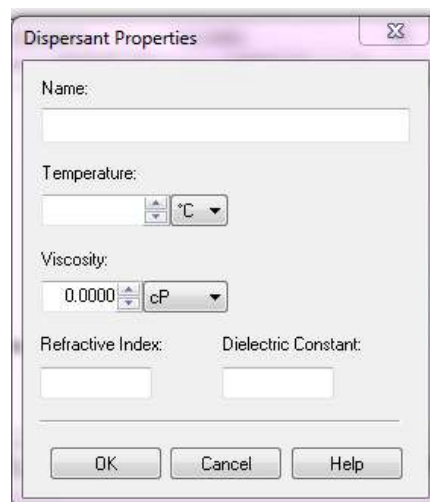
点击 ，在“sample”选项中输入样品名称和备注

点击 ，在“Material”选项中输入/选择颗粒的折光指数 RI 和吸收率 Absorption 的信息。
注：Material 的 RI 和 absorption 参数只对尺寸接近于微米级别颗粒的体积分布和数量分布具有影响，如果您的颗粒不在此范围内，请将此参数保留为默认值。

点击 ，在“Dispersant”选项中输入/选择溶剂的折光指数 RI 和粘度 Viscosity 的信息。
注：溶剂的 RI 和 Viscosity 参数随温度改变，所以应该输入对应温度的正确参数。如果在 Dispersant 的列表中没有对应的溶剂，请点击“Add.....”





在“Simple Dispersant or Solvent”中输入对应 Dispersant 的信息，并起名保存。如果检测粒径，并不需要“Dielectric Constant”参数，请暂时输入一个 0–80 之间的数值。



如果您的溶剂相为水相，Malvern 的 DTS 软件中具有复杂溶剂计算器，请点击“Complex Constant”，在对话框中选择正确的添加物，如 Potassium Chloride 氯化钾，输入浓度，如 0.01 M，点击添加“Add”。可以从对话框中选取多个添加物，输入浓度进行添加。最后请给您的复杂溶剂命名，并保存。



点击 ，在“General options”选项中输入颗粒的 Mark-Houwink 参数 A 值 和 K 值。这两个参数用于通过动态光散射得到的扩散系数来计算高分子/蛋白质的分子量。其默认值为蛋白质的参数，如果您不知道您的样品的 A 值 和 K 值，或者并不关心计算得到的分子量参数，可以将这一项留为默认。

点击 ，在“Temperature”温度选项中输入检测的温度和平衡时间。注：如果您的测试温度和室温相差较大，需要输入较长时间用于样品平衡。通常如果您的样品从室温条件放入仪器在 25 度条件下测试，需要恒温至少 120 秒。

点击 ，在“cell”样品池选项中选择对应的样品池种类。


点击 ，在“measurement”测试选项中选择：


“Measurement angle”测试角度，通常检测粒径请保留为默认角度。


“Measurement duration”测试时间，通常检测粒径请选择默认“Automatic”。

“Number of measurements”重复测试次数，至少输入三次或者三次以上。

“Delay between measurements”每次测试之间间隔时间。如果您的样品对于 6532.8nm 激光没有吸收，请输入 0。

点击 ，“introductions”和“Advanced”选项中保留位默认选择。

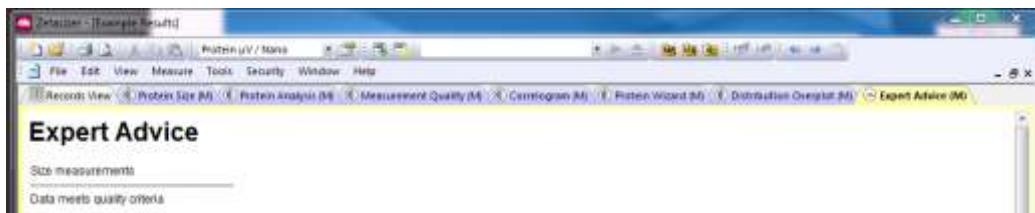
点击 ，“Data processing”中选择分析模型“Analysis model”，若果检测化学合成样品，请保留位默认选择“General purpose”。如果您的样品为蛋白质，请选择“protein analysis”。

点击 ，“Report”和“Export”请保留位默认选择。

点击“OK”开始检测。检测结束后，仪器自动停止测试。

2.1.4 测试质量判断

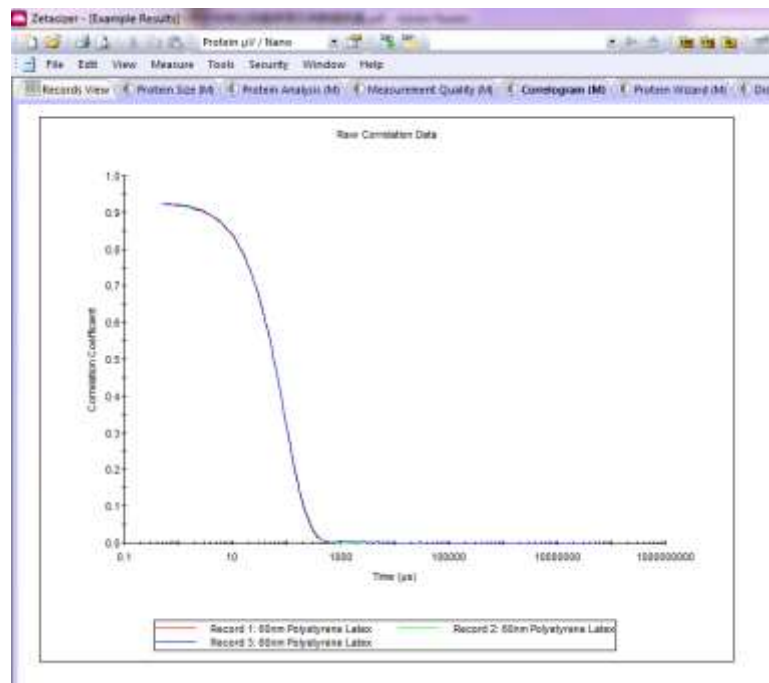
得到检测结果后请不要首先检查粒径结果，而是应该首先判断测试的质量。尽管仪器提供“Expert Advice”专家诊断系统（如下图），但是我们还是有必要有能力独自判断测试质量。



好的测试信号，即相关曲线具有如下特性：

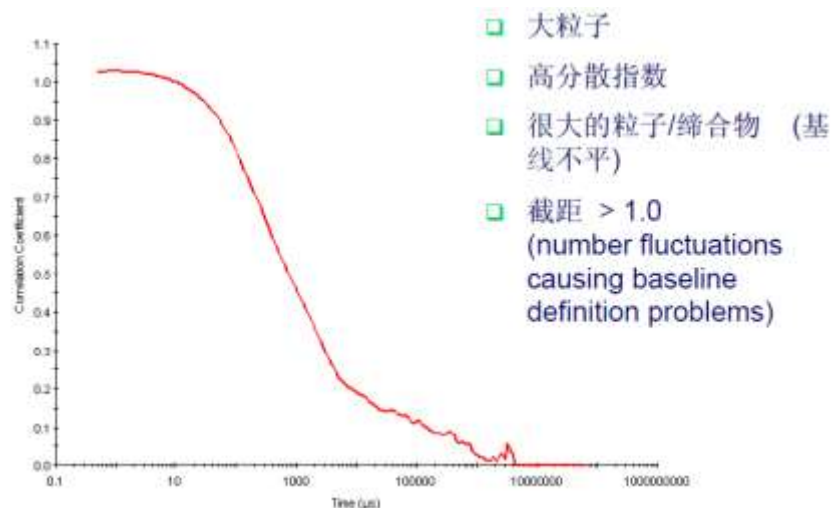
- 平滑，一次衰减
- 平台高度低于，但是接近于 1.0
- 三次检测的重复性好

下面是对于 60nm 标准样品的三次测试的相关曲线，可以通过“Correlogram”报告页察看

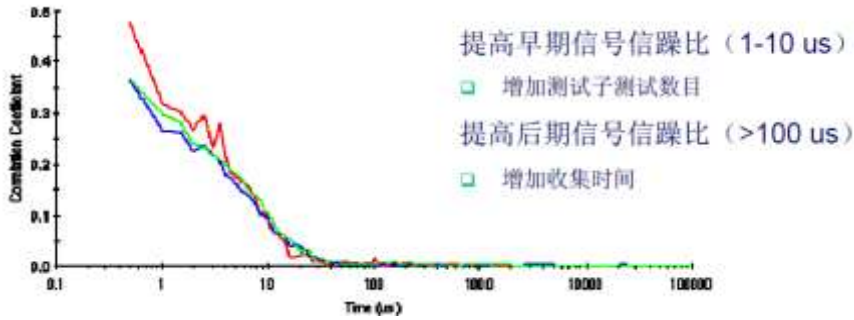


通常来讲不好的测试质量通常分为两种情况：

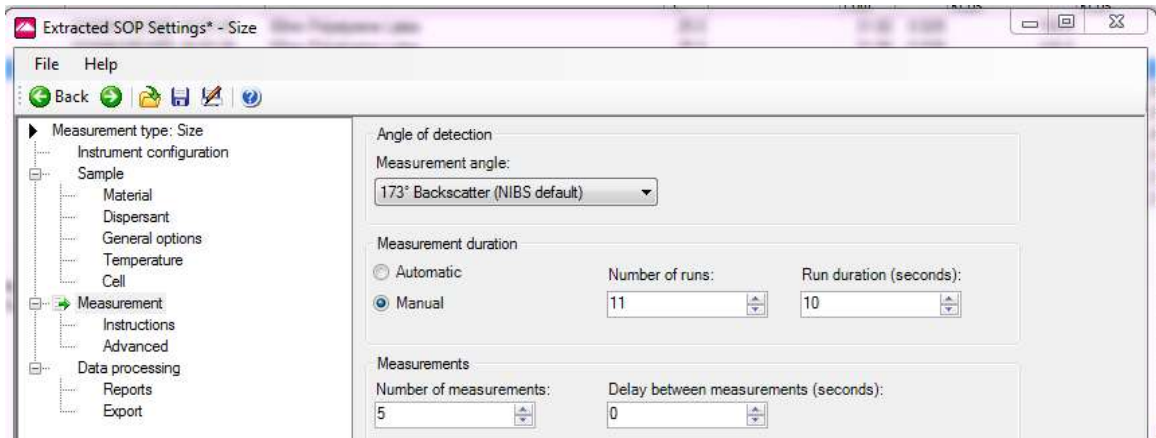
1. 样品本身散射弱，系统中存在大颗粒杂质如灰尘。此时，仪器的相关曲线不平滑，具有多次衰减特征，拖尾，而且平台高于 1.0，多次检测重复性差的特点。对于这样的样品，操作者应该首先使用适当孔径的过滤膜过滤之后再进行检测。



2. 样品本身散射较弱，但是体系比较干净，没有大颗粒杂质。此时，相关曲线不平滑，衰减时间很快，平台高度远小于 1.0，但是多次检测相关曲线的重复性较好。如下图



对于这样的测试，我们因该延长测试时间，将“measurement”中的测试时间从自动改为手动“Manual”，将“Run duration”改为20秒或者更长。



2.1.5 动态光散射结果解释和使用

对于用户来讲，动态光散射得到的信息使用最多的是平均粒径（Z-ave），分布系数 PDI，光强分布，有选择性的使用体积分布和数量分布。

平均粒径和 PDI 提供定量结果，需要使用其三次/三次以上测试结果平均值并标注标准偏差：

Record	Type	Measurement Date and Time	Sample Name	T	Aggregation Index	Z-Ave d.nm	Pdi	Mean Count Rate kcps
1	Size	2008年5月30日 16:00:49	50nm Polystyrene Latex	25.0		63.55	0.029	180
2	Size	2008年5月30日 16:03:35	50nm Polystyrene Latex	25.0		63.13	0.029	148
3	Size	2008年5月30日 16:06:21	50nm Polystyrene Latex	25.0		63.76	0.002	148
4	Size	2008年5月30日 16:23:10	200nm Polystyrene Latex	25.0		202.0	0.030	319
5	Size	2008年5月30日 16:25:25	200nm Polystyrene Latex	25.0		200.0	0.012	317
6	Size	2008年5月30日 16:27:40	200nm Polystyrene Latex	25.0		199.5	0.010	318
Mean 1-3						63.52	0.020	149
Std Dev						0.0	0.3439	0.016
RSD %						0	0.541	77.9

粒径光强分布，体积分布和数量分布提供定性的分布信息。

2.2 利用电泳光散射检测 zeta 电位

2.2.1 样品要求

Zeta 电位测试利用电泳光散射，检测样品中悬浮的颗粒在特定的溶液环境中（pH，盐度，添加物）的电位高低。其测试目的是为了检测颗粒表面的带电性能，包括电性和电位高低，以预测整个悬浮体系的稳定性。

检测要求颗粒具有一定的散射能力，即颗粒物不能太小（不能小于 2-3 个 nm），同时颗粒物不能具有太强烈的沉淀运动，即颗粒物不能太大（超过 100um）。样品可混浊，但是需要有一定的透光性。

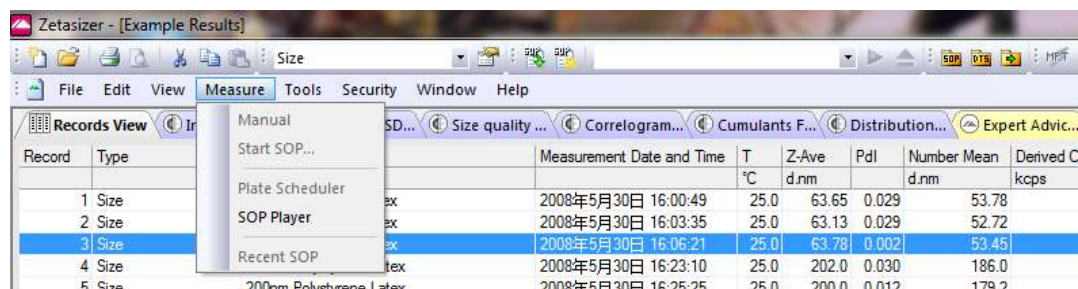
2.2.2 样品制备

1. 毛细管电极/高浓电极（水性样品）：将样品通过滴管或者注射器注入相应的样品池，注意不要有气泡在样品池中。
2. 插入式电极（有机相样品）：将 0.5ml 左右样品加入玻璃粒径检测样品池，45 度角插入电极。注意检查不要有气泡存在于电极之间。

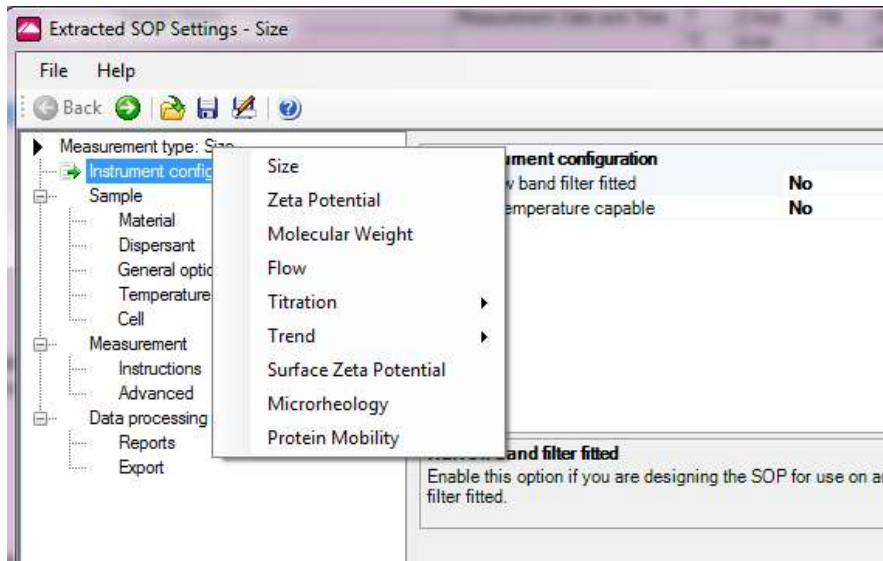
将样品池插入到样品槽中。


2.2.3 测试步骤

点击“measure”选择“Manual”




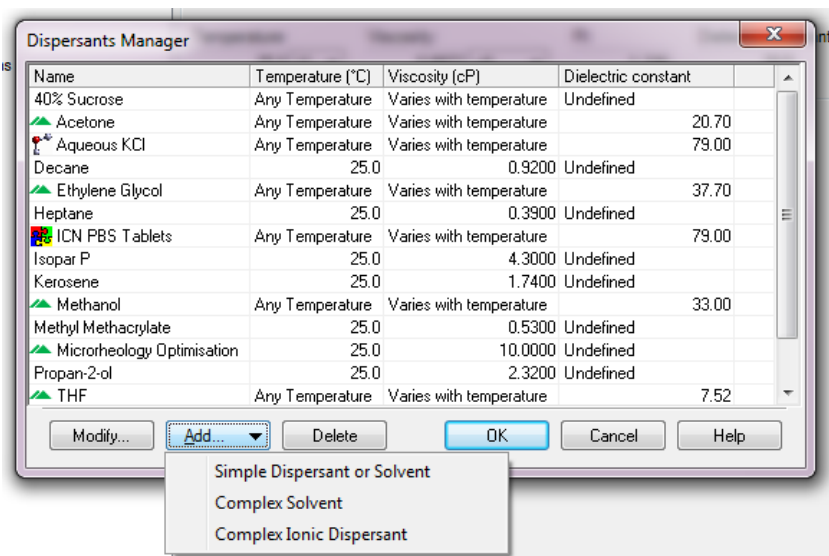
点击“Measurement type”选择“zeta potential”



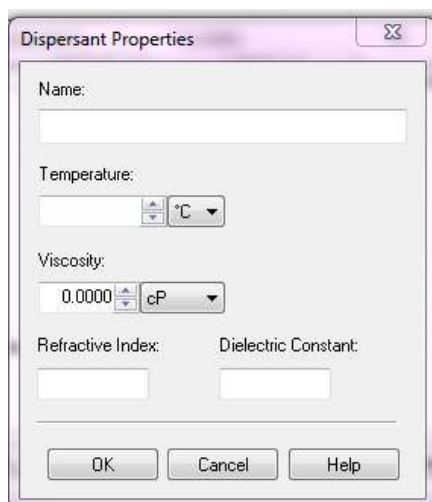
点击 ，在“sample”选项中输入样品名称和备注

点击 ，在“Material”中保留为默认值。检测 zeta 电位不需要其中参数的信息。

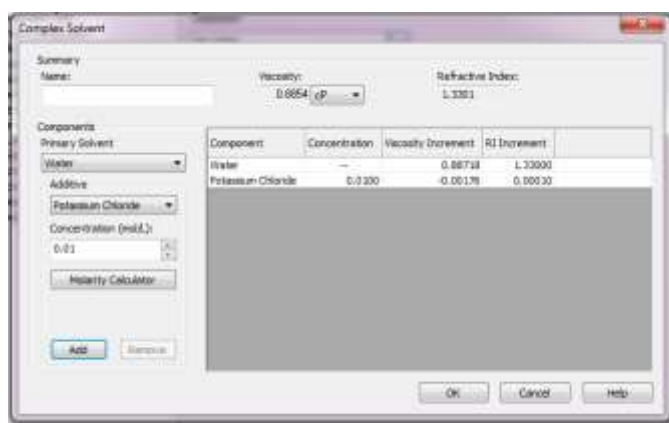
点击 ，在“Dispersant”选项中输入/选择溶剂的折光指数 RI，粘度 Viscosity 和介电常数 Dielectric constant 的信息。注：溶剂的 RI 和 Viscosity 参数随温度改变，所以应该输入对应温度的正确参数。如果在 Dispersant 的列表中没有对应的溶剂，请点击“Add.....”



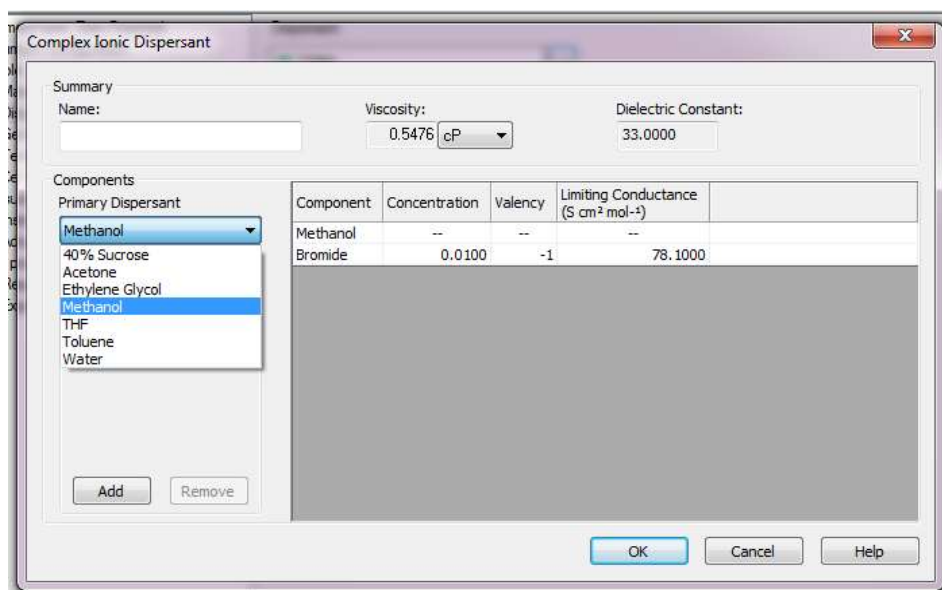
在“Simple Dispersant or Solvent”中输入对应 Dispersant 的信息，并起名保存。。





如果您的溶剂相为水相，Malvern 的 DTS 软件中具有复杂溶剂计算器，请点击“Complex Constant”，在对话框中选择正确的添加物，如 Potassium Chloride 氯化钾，输入浓度，如 0.01 M，点击添加“Add”。可以从对话框中选取多个添加物，输入浓度进行添加。最后请给您的复杂溶剂命名，并保存。




在 Complex Ionic Dispersant 中，提供多种极性溶剂加入可溶解盐类后的对应参数。



点击 ，在“General options”选项中选择模型。水相体系选择 Smoluchowski 模型，有机相体系选择 Huckel 模型

点击 ，在“Temperature”温度选项中输入检测的温度和平衡时间。注：如果您的测试温度和室温相差较大，需要输入较长时间用于样品平衡。通常如果您的样品从室温条件放入仪器在 25 度条件下测试，需要恒温至少 120 秒。


点击 ，在“cell”样品池选项中选择对应的样品池种类。


点击 ，在“measurement”测试选项中选择：


“Measurement duration”测试时间，通常检测电位请选择默认“Automatic”。

“Number of measurements”重复测试次数，至少输入三次或者三次以上。

“Delay between measurements”每次测试之间间隔时间。如果您的样品对于 6532.8nm 激光没有吸收，请输入 0。

点击 ，“introductions”和“Advanced”选项中保留位默认选择。

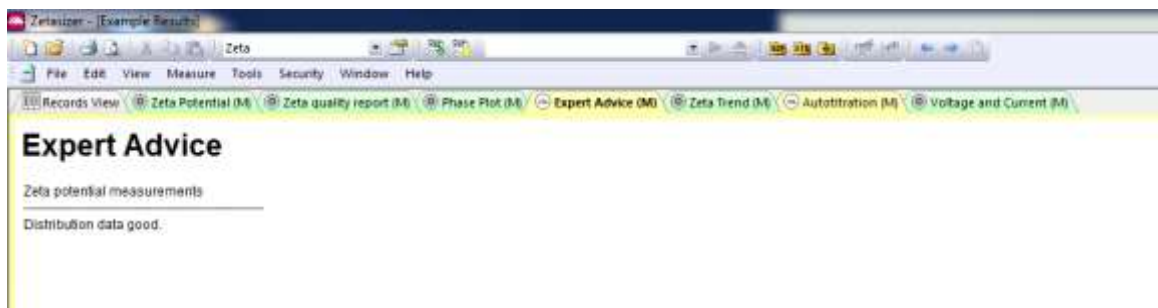
点击 ，“Data processing”中选择分析模型“Analysis model”，若果检测化学合成样品，请保留位默认选择“General purpose”。如果您的样品为蛋白质，请选择“protein analysis”。

点击 ，“Report”和“Export”请保留位默认选择。

点击“OK”开始检测。检测结束后，仪器自动停止测试。

2.2.4 测试质量判断

得到检测结果后请不要首先检查 zeta 电位结果，而是应该首先判断测试的质量。尽管仪器提供“Expert Advice”专家诊断系统（如下图），但是我们还是有必要有能力独自判断测试质量。



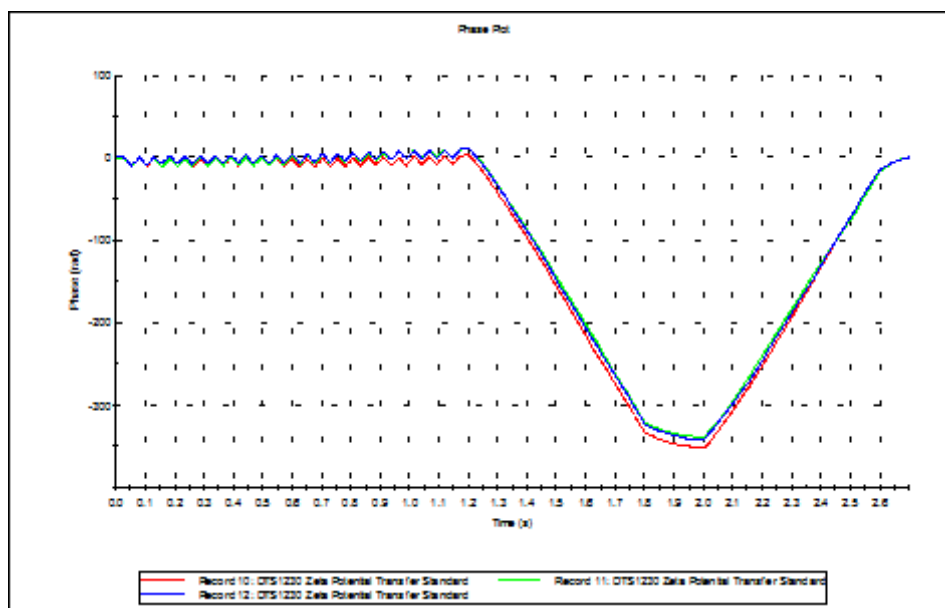
电位测试采用相分析光散射，其原始信号为相图-phase plot。

好的测试结果的相图将会有以下特性：

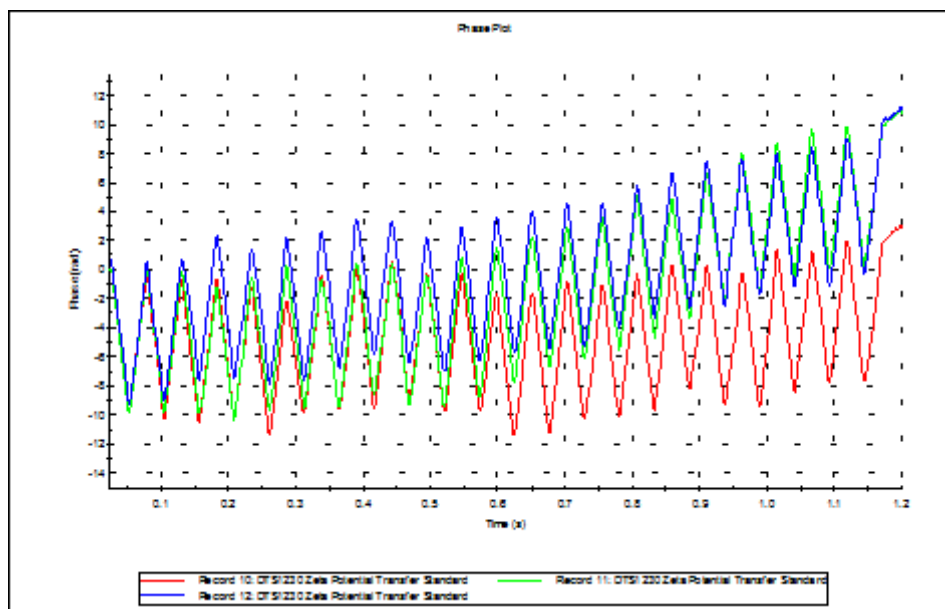
- 高频区域斜率清晰，明显观察到电压转换造成的相位转换
- 低频的斜率清晰，具有一定的线形

- 多次测试有重复性

下面是一个带负电的体系的三次检测的相图。前半部分为高频测试，后半部分为低频测试。



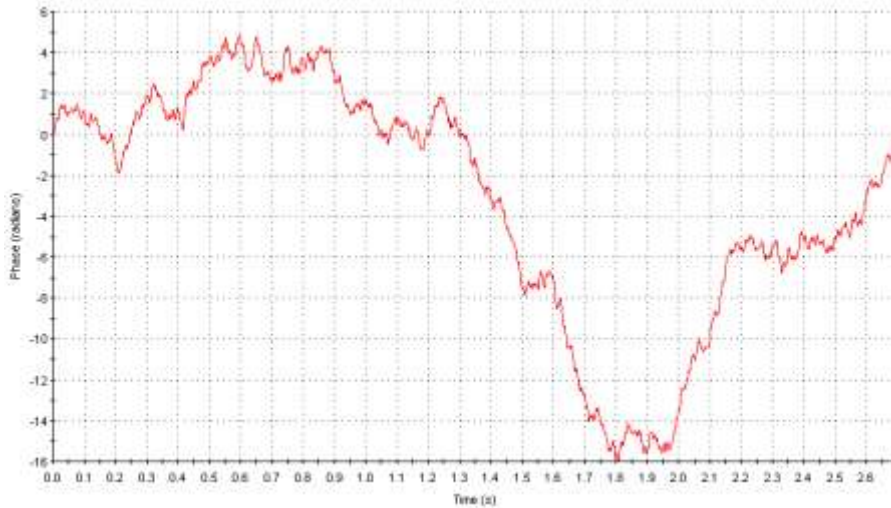
需要注意的是，有的时候用户只在相图中看到高频测试，这是由于体系的电导率较高（高于 5ms/cm 时），仪器为了保护电极只进行高频测试得到平均 zeta 电位，而主动放弃了低频测试即客户不会得到电位的分布信息，如下图。



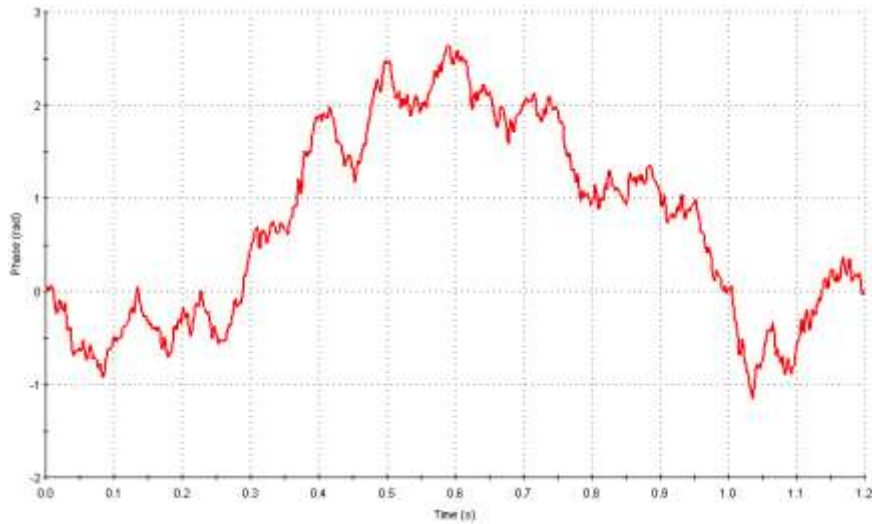
较差的信号通常是三种情况造成：

1. 颗粒较小，散射信号比较弱
2. 盐度很高，颗粒的电位被严重屏蔽，可以电泳速度很慢
3. 体系浓度太高，向前的透射光强很弱

此时，用户将会观察到如下信号：



电中点附近的颗粒的 zeta 电位相图



高盐浓度下颗粒的 zeta 电位相图

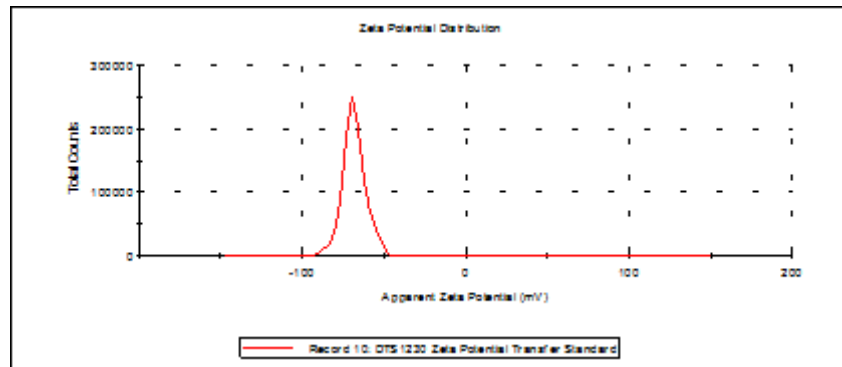
此时，用户应该检查 zeta 电位结果的重复性，以判断数据的可信程度。

2.2.5 结果解释

Zeta 电位测试通常使用多次测试的平均值和其标准偏差

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	ZP mV	Mob µmhos/cm	Cond µS/cm
10	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:05:23	25.0	68.3	-5.354	0.331
11	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:06:51	25.0	68.6	-5.376	0.331
12	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:08:15	25.0	69.4	-5.441	0.331
13	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:05:41	25.0	68.0	-5.300	0.331
14	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:11:06	25.0	68.8	-5.393	0.332
19	Titration	Coffee Complement	2008年3月19日 12:37:11	22.0			
58	Surface Zeta	PTFE (sample 2) in DTS0230 25C (aliquot 7)	2011年8月17日 10:02:28	25.0			
Mean 10:				25.0	68.1	-5.381	0.331
Std Dev:				0.0	0.563	0.04430	0.00
RSD %:				0.0	0.827	0.833	0.0

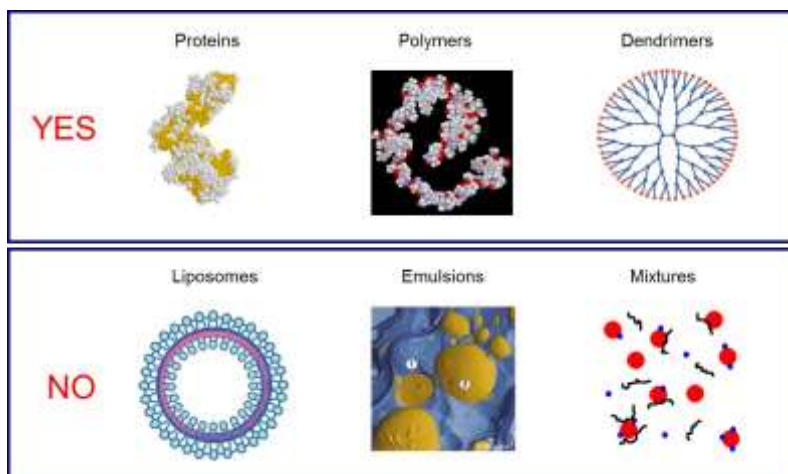
zeta 电位的分布值表征了整个体系颗粒的带电分布的均匀性，在文献中使用较少。



2.3 利用静态光散射检测分子量和第二维利系数

2.3.1 样品要求

利用静态光散射检测高分子/蛋白的绝对分子量是通过瑞利散射方程将样品的散射光强和绝对分子量联系起来，要求样品的分子/蛋白大小不能超过 15nm，良好的溶解在分散液中。可以检测和不可以检测的样品种类可以参考下图：

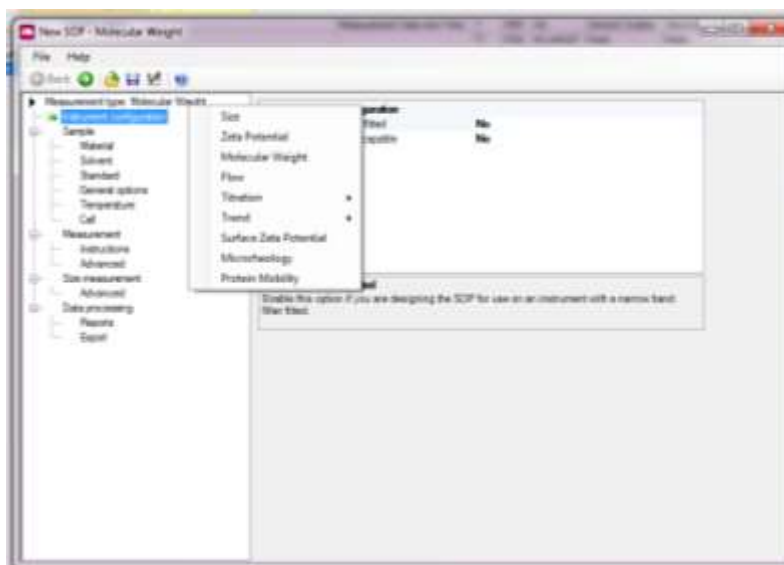



2.3.2 样品制备

依赖于样品的分子量，需要配置一系列浓度在 0.1-10 g/L 的样品溶液。至少配置 3-5 个不同浓度溶液。分子量越大，浓度范围越趋向于低浓度，分子量越小反之。每个浓度下样品都需要通过过滤膜过滤，然后滴入检测池。


2.3.3 测试步骤

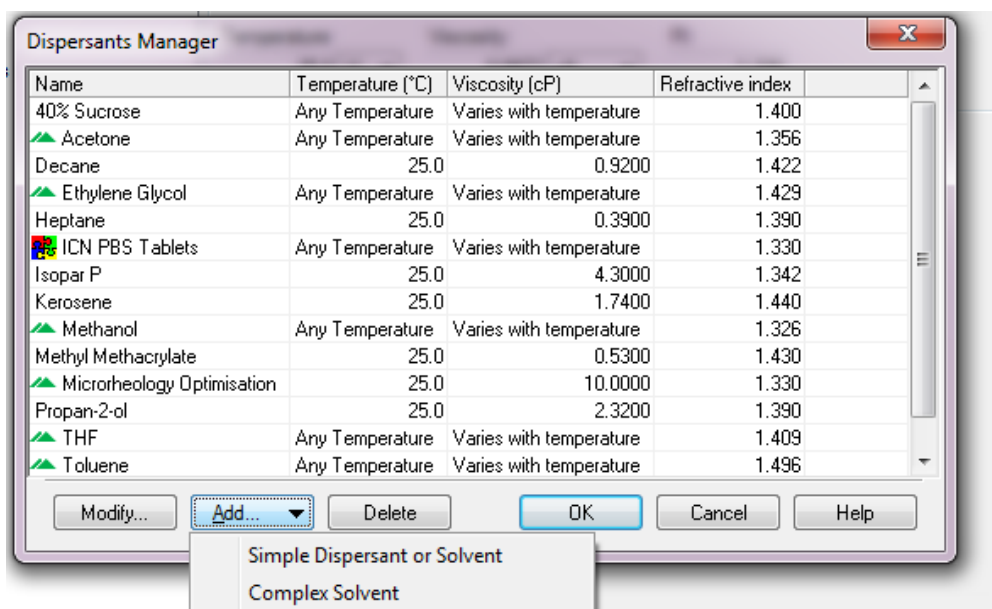
点击 “measure” 选择 “Manual”



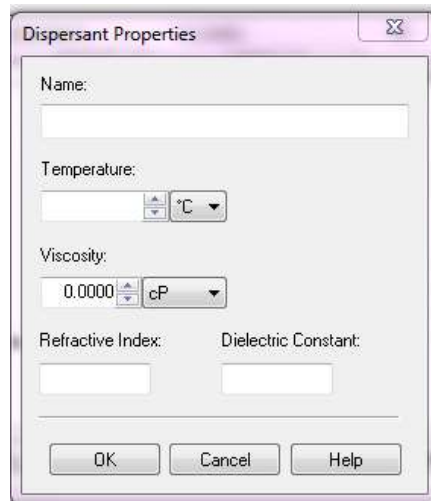
点击 ，在“sample”选项中输入样品名称和备注

点击 ，在“Material”中保留为默认值。检测分子量不需要其中参数的信息。

点击 ，在“solvent”选项中输入/选择溶剂的折光指数 RI，粘度 Viscosity 信息。注：溶剂的 RI 和 Viscosity 参数随温度改变，所以应该输入对应温度的正确参数。如果在 Dispersant 的列表中没有对应的溶剂，请点击“Add.....”





在“Simple Dispersant or Solvent”中输入对应 Dispersant 的信息，并起名保存。。

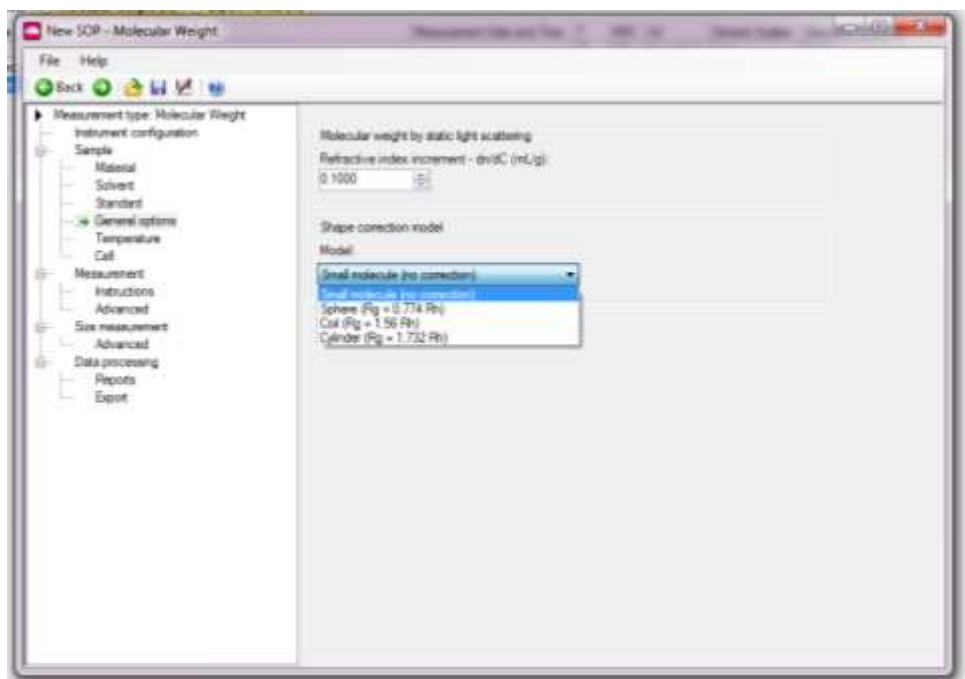



如果您的溶剂相为水相，Malvern 的 DTS 软件中具有复杂溶剂计算器，请点击“Complex Constant”，在对话框中选择正确的添加物，如 Potassium Chloride 氯化钾，输入浓度，如 0.01 M，点击添加“Add”。可以从对话框中选取多个添加物，输入浓度进行添加。最后请给您的复杂溶剂命名，并保存。



点击 ，在“Standard”选项中选择标准液体。标准液体的散射光强用来计算仪器的散射常数。

点击 ，在“General options”输入高分子/蛋白溶液的 dn/dc ，选择高分子/蛋白在溶液中的构象模型信息。



点击 ，在“Temperature”温度选项中输入检测的温度和平衡时间。注：如果您的测试温度和室温相差较大，需要输入较长时间用于样品平衡。通常如果您的样品从室温条件放入仪器在 25 度条件下测试，需要恒温至少 120 秒。


点击 ，在“cell”样品池选项中选择对应的样品池种类。


点击 ，在“measurement”测试选项中选择：


“SLS run duration”测试时间，通常检测电位请选择默认“Automatic”。


“SLS run repetitions”重复测试次数，通常检测电位请选择默认“Automatic”。

“model”模型，输入对应高分子模型。

点击 ，“introductions”和“Advanced”选项中保留位默认选择。

点击 ，“Size measurement”选择是否在检测分子量的同时检测粒径。

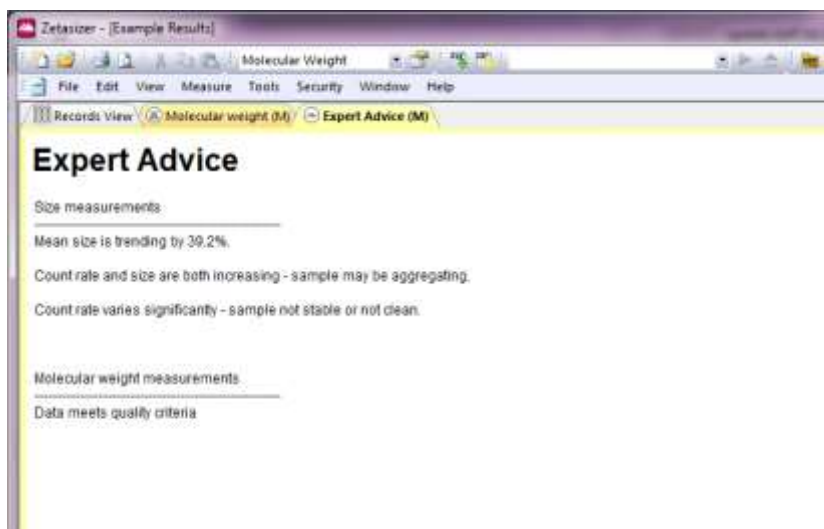
点击 ，“Data processing”中选择分析模型“Analysis model”，若果检测化学合成样品，请保留位默认选择“General purpose”。如果您的样品为蛋白质，请选择“protein analysis”。

点击 ，“Report”和“Export”请保留位默认选择。

点击“OK”开始检测，按照仪器提示放入样品，输入浓度信息进行检测。检测结束后，仪器自动停止测试。

2.3.4 测试质量判断

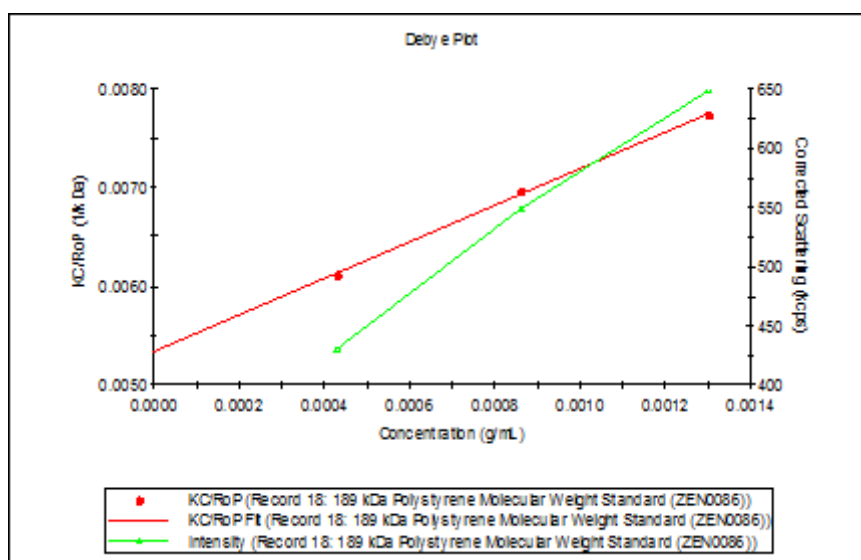
得到检测结果后请不要首先检查分子量结果，而是应该首先判断测试的质量。尽管仪器提供“Expert Advice”专家诊断系统（如下图），但是我们还是有必要有能力独自判断测试质量。



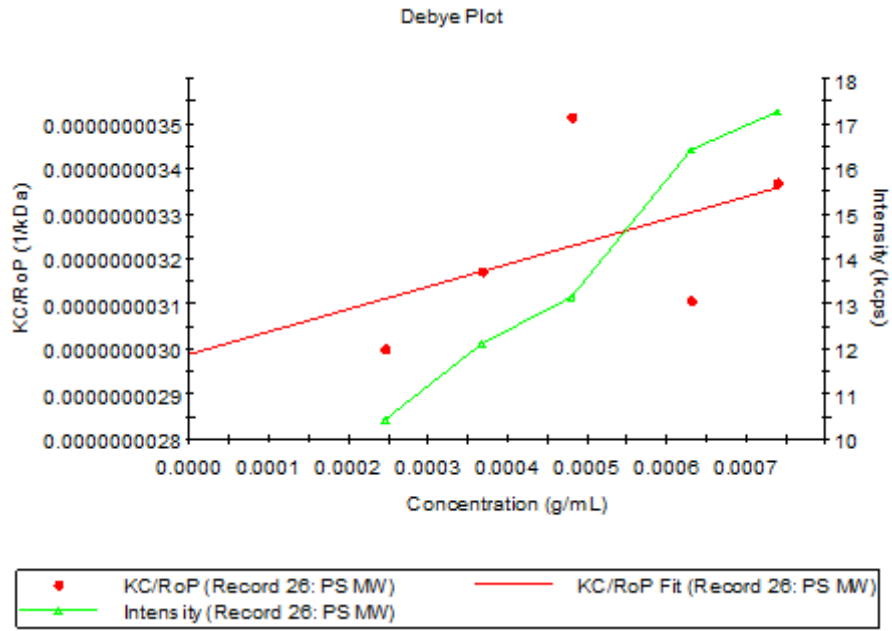
静态光散射检测分子量取决于两个因素：

1. 溶液是否干净
2. 溶液浓度是否准确

如果满足上述两个条件，则 Debye Plot 上的数据点呈现比较好的线性，结果比较可信，如下图：



如果不满足其中任何一个条件，则 Debye Plot 上的数据点呈现较差线性，结果比不可信，如下图：



2.3.5 结果解释

静态光散射给出体系的重均绝对分子量和第二维利系数 A_2 。第二维利系数表示体系的热力学稳定性。如果其数值为正，并且较高，说明体系较稳定，不易出现团聚，反之体系稳定型较差，可能出现团聚结晶的概率较高。

Zetasizer - [Example Results]

Molecular Weight

File Edit View Measure Tools Security Window Help

Records View Molecular weight (M) Expert Advice (M)

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	MW kDa	A2 mL mol/g ²	Solvent Scatter kcps	Standard Scatter kcps
10	Molecular Weight	105 kDa Polystyrene Molecular Weight Standard (ZEN0086)	2008年3月4日 14:09:37	25.0	105	0.26	271.2	233.2
88	Protein Mobility	2mg/ml BSA in 10mM KCl at pH7.0	2012年9月3日 15:30:01					

2.4 表面电位检测

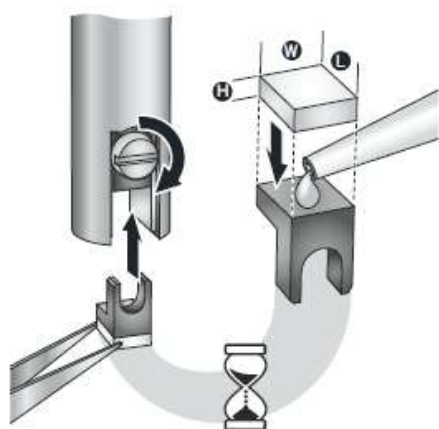
2.4.1 样品要求

表面电位测试功能是 DTS 软件 7.0 以上版本为客户设置的标准检测功能，但是用户需要采购一套表面电位样品池套件 Zen1020。此功能用于检测一个表面在特定的溶液环境中产生的电位的电性及其大小。

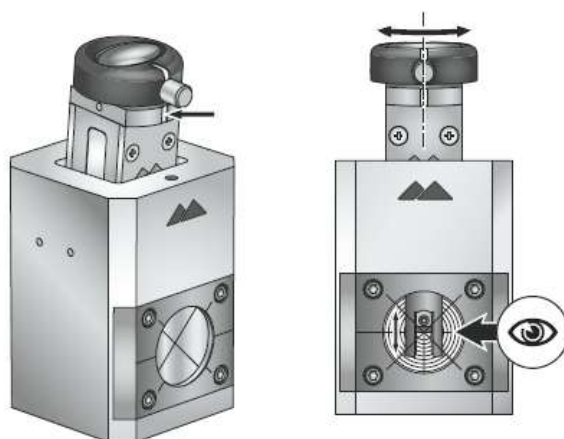
用户的样品需要可以裁减成为 3mm x 4mm 见方的平面，样品不能为高导电性样品材料，比如说金属片。

2.4.2 样品制备

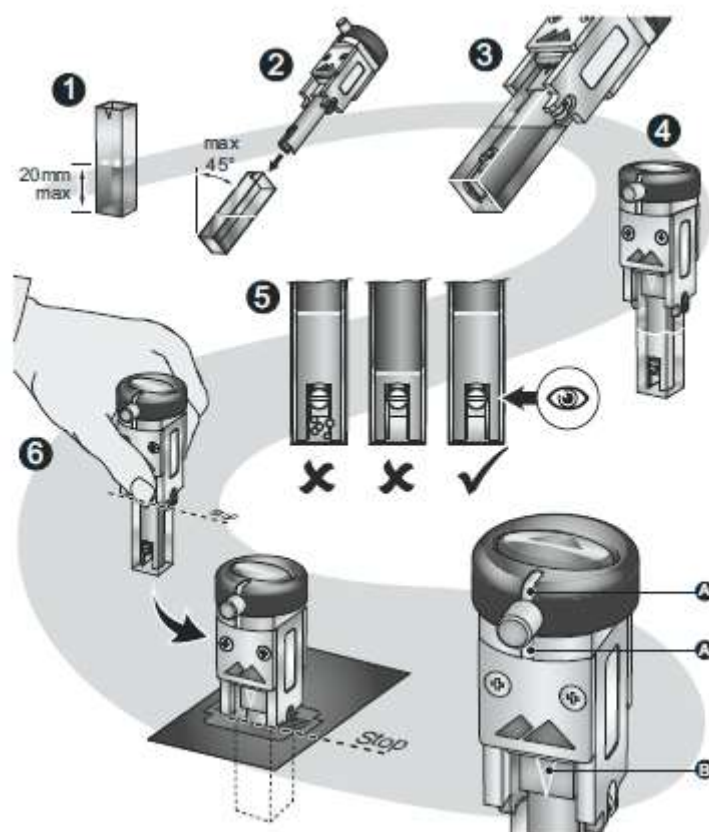
将样品裁减成为 3mm x 4mm 大小，用双面胶或者非水溶性胶水粘到样品托表面。将样品托固定到表面电位样品电极上，并旋紧固定螺丝。



样品平面位置粗调：固定电极圆形盖子上面的旋钮，将电极插入粗调对准装置，如下图。注意电极上马尔文标致朝粗调对准装置具有白点方向。通过旋转上面的位置调节器，将粗调装置两面的中心和样品平面在一条直线上。



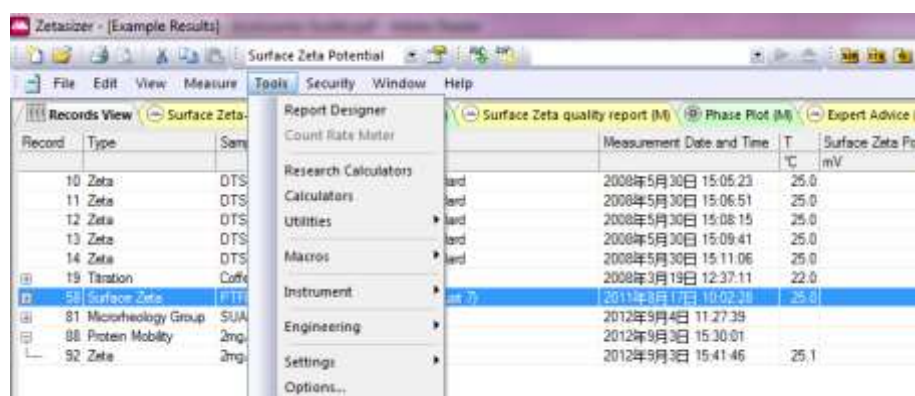
在粒径样品池中加入含有示踪粒子的悬浮液，加入量及其电极插入方式见下图：



注意示踪粒子应该和表面电性相同。

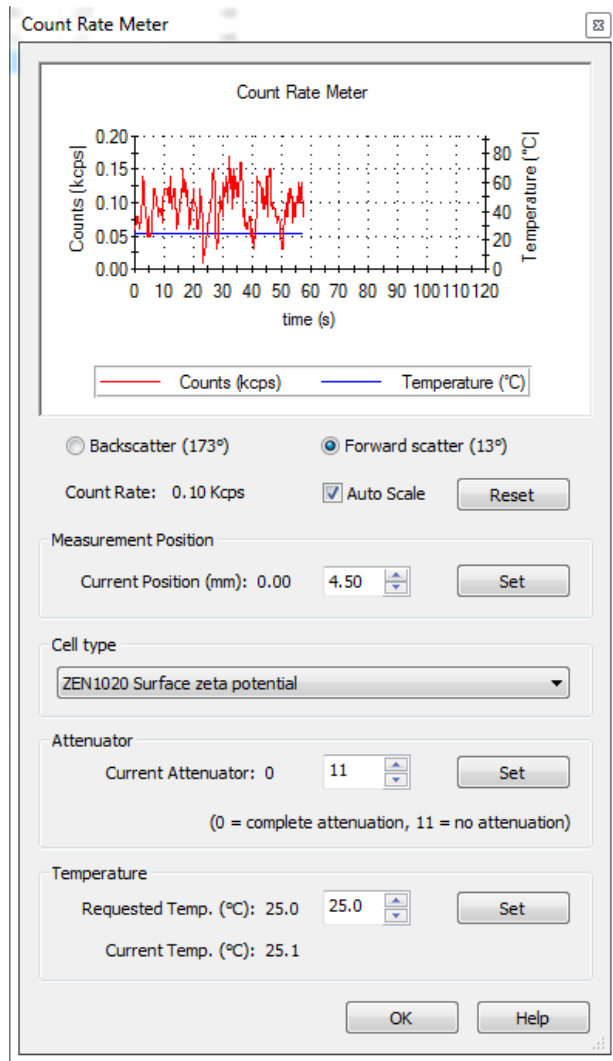
用手指拿住粒径样品池，插入仪器中，注意电极上马尔文标致朝外。

样品平面位置精调：插入样品池后，在打开软件 Tools-Count rate meter



在 Count rate meter 界面中选择

- Forward scatter
- ZEN1020
- Attenuator 11



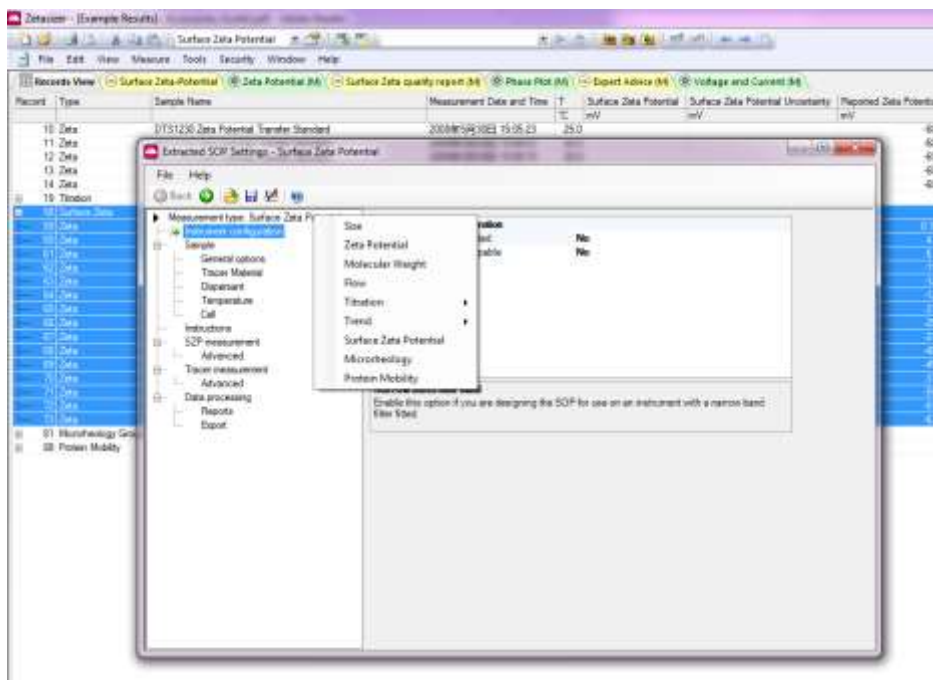
顺时针（向下）或者逆时针（向上）调节位置旋钮 1/8-1/4 周，盖上盖子观察散射光强变化。如果初始光强为几十 KCPS 或者更低，则应该向上调节平面位置，如果初始光强为几百-几千 KCPS 则向下调节平面位置。调节平面位置至 0 点位置，0 点位置光强为几十 KCPS，向上 1/4 周则增至几百-几千。


2.4.3 测试步骤


将平面调节为 0 点位置，点击“measure”选择“Manual”。


Record	Type	Measurement Date and Time	T °C	Z-Ave d.nm	PdI	Number Mean d.nm	Derived C kcps
1	Size	2008年5月30日 16:00:49	25.0	63.65	0.029	53.78	
2	Size	2008年5月30日 16:03:35	25.0	63.13	0.029	52.72	
3	Size	2008年5月30日 16:06:21	25.0	63.78	0.002	53.45	
4	Size	2008年5月30日 16:23:10	25.0	202.0	0.030	186.0	
5	Size	2008年5月30日 16:25:25	25.0	200.0	0.012	179.2	


点击“Measurement type”选择“Surface Zeta Potential”

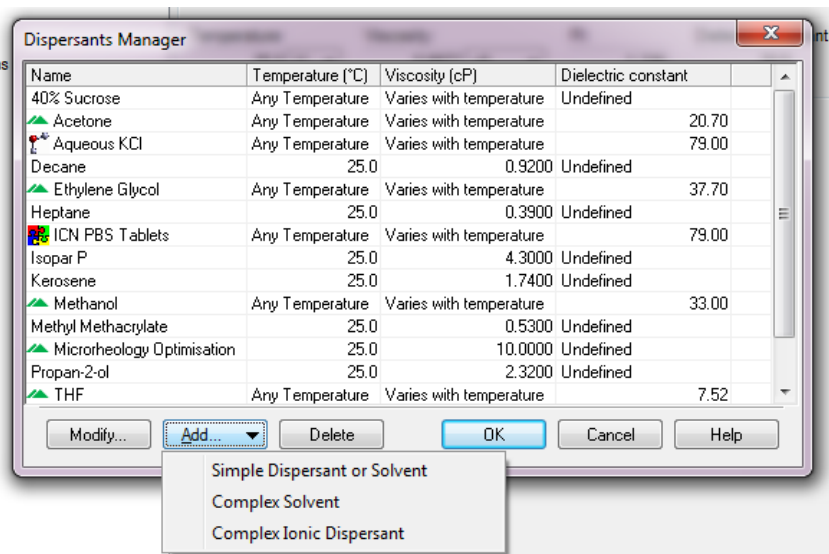


点击 ，在“sample”选项中输入样品名称和备注

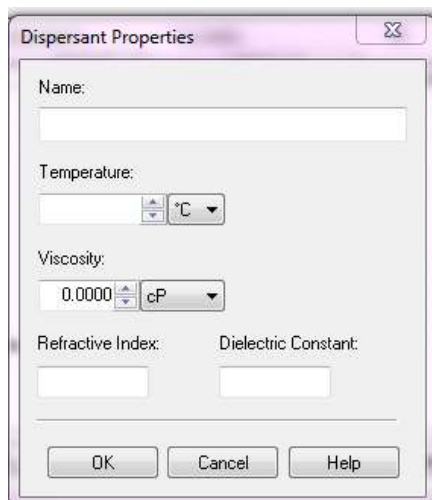
点击 ，在“General options”选项中选择模型水相体系选择 Smoluchowski 模型

点击 ，在“Tracer Material”中选择示踪粒子参数的信息。

点击 ，在“Dispersant”选项中输入/选择溶剂的折光指数 RI，粘度 Viscosity 和介电常数 Dielectric constant 的信息。注：溶剂的 RI 和 Viscosity 参数随温度改变，所以应该输入对应温度的正确参数。如果在 Dispersant 的列表中没有对应的溶剂，请点击“Add.....”




在“Simple Dispersant or Solvent”中输入对应 Dispersant 的信息，并起名保存。



如果您的溶剂相为水相，Malvern 的 DTS 软件中具有复杂溶剂计算器，请点击“Complex Constant”，在对话框中选择正确的添加物，如 Potassium Chloride 氯化钾，输入浓度，如 0.01 M，点击添加“Add”。可以从对话框中选取多个添加物，输入浓度进行添加。最后请给您的复杂溶剂命名，并保存。



点击 ，在“Temperature”温度选项中输入检测的温度和平衡时间。注：如果您的测试温度和室温相差较大，需要输入较长时间用于样品平衡。通常如果您的样品从室温条件放入仪器在 25 度条件下测试，需要恒温至少 120 秒。

点击 ，在“cell”样品池选项中选择对应的样品池种类。

点击 ，在“Introduction”中保留默认设置。


点击 ，在“SZP measurement”测试选项中选择：


- “SZP Measurement duration”测试时间，通常检测表面电位请选择默认“Automatic”。
- “Number of measurements”重复测试次数，至少输入三次或者三次以上。
- “Delay between measurements”每次测试之间间隔时间。如果您的样品对于 6532.8nm

激光没有吸收，请输入 0。


“SZP displacement” 输入 4-5。表示要测试的样品平面位置个数。


“Size of Step” 建议保留默认 125 microns。


点击 ， “Advanced” 选项中保留位默认选择。

点击 ， “Tracer measurement” 选项中

- “Trancer measurement duration” 建议选择 “Automatic”
- “Number of measurement” 建议选择 3 次以上
- “Delay between mesurement” 如果样品对于 632.8nm 激光没有吸收则设置为 0。
- “SZP displacememnt” 建议设置到 1500

点击 ， “Advanced” 选项中保留位默认选择。

点击 ， “Data processing” 中选择分析模型 “Analysis model”， 若果检测化学合成样品， 请保留位默认选择 “General purpose”。 如果您的样品为蛋白质， 请选择 “protein analysis”。

点击 ， “Report” 和 “Export” 请保留位默认选择。

点击 “OK” 开始检测。按照软件提示进行操作， 检测结束后， 仪器自动停止测试。

2.4.4 测试质量判断

通过 Expert Advice 判断测试质量。



2.4.5 结果解释

在 Records View 中读取表面电位信息。

Zetasizer - [Example Results] Surface Zeta Potential

File Edit View Measure Tools Security Window Help

Records View Surface Zeta-Potential Zeta Potential (M) Surface Zeta quality report (M) Phase Plot (M) Expert Advice (M) Voltage and Current (M)

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	Surface Zeta Potential mV	Surface Zeta Potential Uncertainty mV	Rep mV
10	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:05:23	25.0			
11	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:06:51	25.0			
12	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:08:15	25.0			
13	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:09:41	25.0			
14	Zeta	DTS1230 Zeta Potential Transfer Standard	2008年5月30日 15:11:06	25.0			
19	Titration	Coffee Compliment	2008年3月19日 12:37:11	22.0			
58	Surface Zeta	PTFE (sample 2) in DTS1230 25C (aliquot 2)	2012年09月17日 10:02:28	25.0	79.0		1.36
81	Microheology Group	SUA1 at 40C with 1mc Mel	2012年9月4日 11:27:39				
88	Protein Mobility	2mg/ml BSA in 10mM KCl at pH7.0	2012年9月3日 15:30:01				

2.5 温度趋势测定

2.5.1 样品要求

DTS 软件中提供粒径和 zeta 电位的温度趋势测定，即可以设定一定的温度程序，控制在不同的温度下自动进行粒径和电位检测。

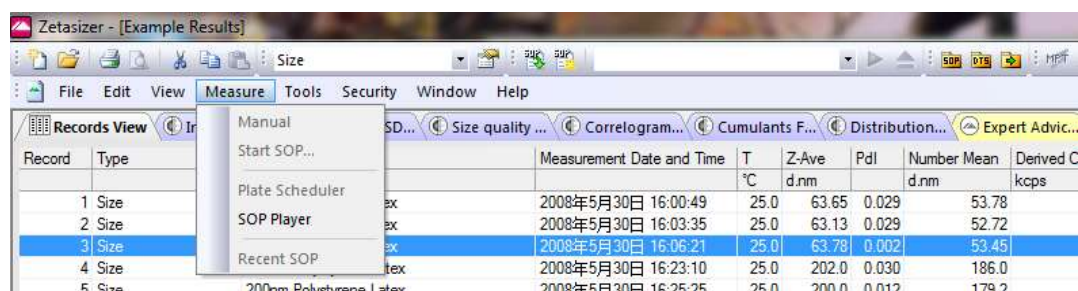
客户检测粒径或者电位的温度趋势，其样品要求请参照 2.1.1 和 2.2.1 中对样品状态的要求。

2.5.2 样品制备

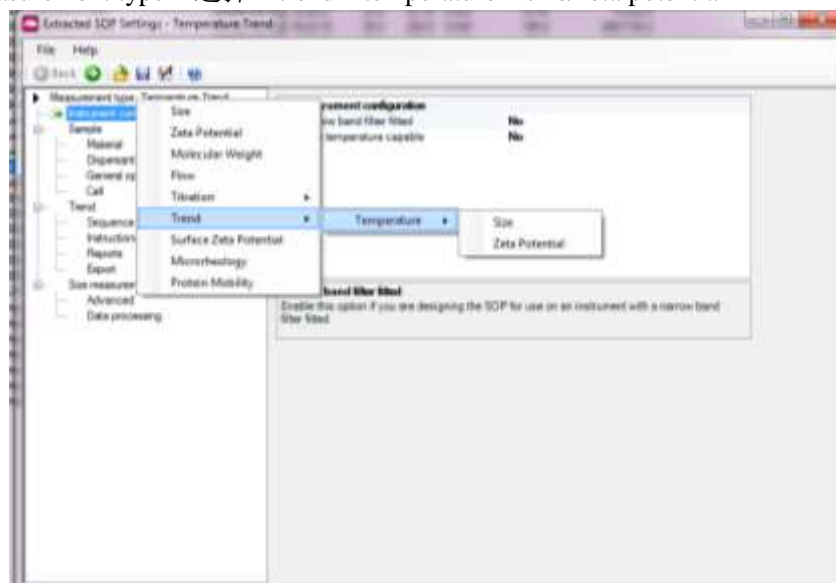
请参考 2.1.2 和 2.2.2 对于粒径和电位样品的制备方法。注意如果检测粒径的温度超过 40 度，请使用玻璃或者石英材质的样品池。


2.5.3 测试步骤


点击“measure”选择“Manual”



点击“Measurement type”选择“trend – temperature – size/zeta potential”




点击 ，在“sample”选项的各个选项依照粒径/电位测试输入

点击 ，在“Trend”中输入

- 测试起始温度“start temperature”，注意最低温度为 0 度
- 测试截止温度”end temperature”，注意最高温度为 90 度
- 测试温度间隔”Temperature interval”

其余保留为默认

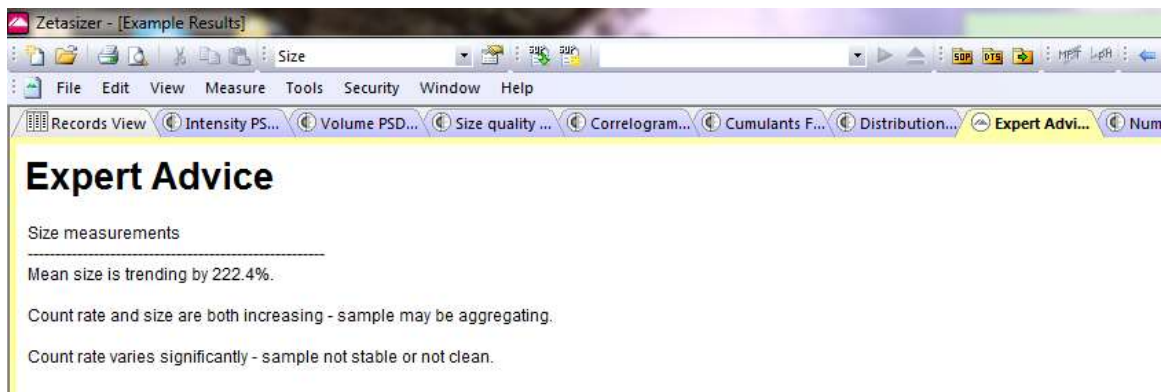
点击 ，在“size/zeta potential measurement”选项中输入

- 每一步升/降温的平衡时间“At each step Equilibration time”，推荐至少 30 秒/度的恒温时间
- 每一步升/降温的测试数量”Number of measurements”，推荐三次或者三次以上
- 每次测试的时间间隔”Delay between measurements”，如果您的样品对于 632.8nm 激光没有吸收，则可以选择 0 秒。

其余保留为默认

2.5.4 测试质量判断

通过 Expert Advice 报告页中描述，同时参考 2.1.4 和 2.2.4 中对于粒径和电位测试质量判断。



2.5.5 结果解释

如果检测蛋白质的稳定性，可以通过 Records View 得到不同温度下的粒径，PDI 以及温度突变点”Aggregation Point”

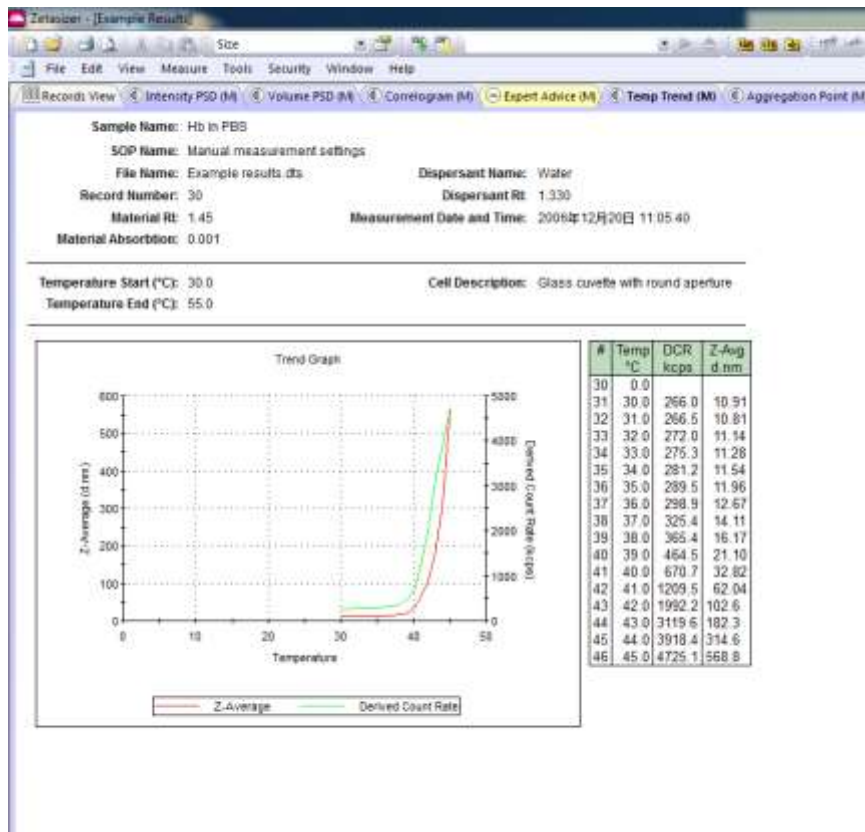
Zetacizer - [Example Results]

File Edit View Measure Tools Security Window Help

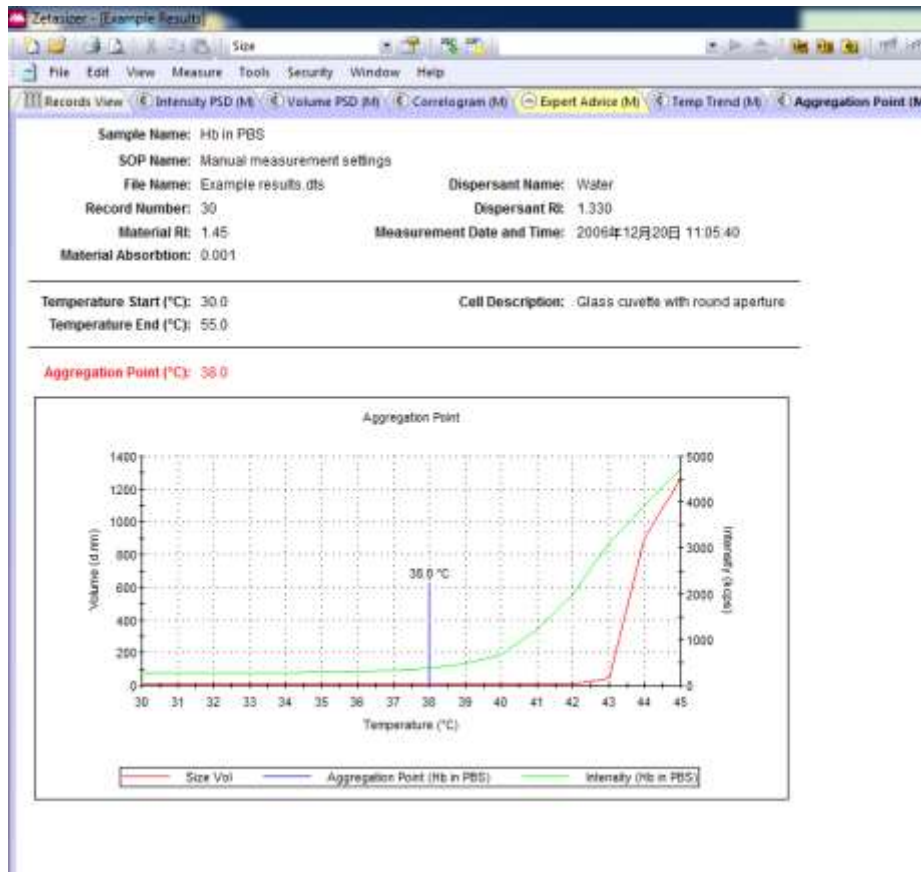
Records View Intensity... Volume... Size qual... Correlog... Cumulan... Distribut... Expert A... Number... Tem

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T	Z-Ave	PdI	Aggregation Point	Der
				°C	d nm		°C	kcp
1	Size	60nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:00:49	25.0	63.65	0.029		
2	Size	60nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:03:35	25.0	63.13	0.029		
3	Size	60nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:06:21	25.0	63.78	0.002		
4	Size	200nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:23:10	25.0	202.0	0.030		
5	Size	200nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:25:25	25.0	200.0	0.012		
6	Size	200nm Polystyrene Latex	2008年5月30日 16:27:40	25.0	199.5	0.010		
7	Size	60nm and 220nm Polystyrene Latex Mixture	2004年1月28日 14:10:45	25.0	173.7	0.196		
8	Size	60nm and 220nm Polystyrene Latex Mixture	2004年1月28日 14:22:52	25.0	175.1	0.191		
9	Size	60nm and 220nm Polystyrene Latex Mixture	2004年1月28日 14:35:12	25.0	173.5	0.191		
15	Size	Sucrose 25% (w/v)	2007年5月18日 12:36:37	25.0	2.048	0.234		
16	Size	Sucrose 25% (w/v)	2007年5月18日 12:39:07	25.0	2.003	0.230		
17	Size	Sucrose 25% (w/v)	2007年5月18日 12:41:37	25.0	2.042	0.233		
30	Aggregation Point	Hb in PBS	2006年12月20日 11:05:40	0.0			30.0	
31	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:09:57	30.0	10.91	0.369		
32	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:16:57	31.0	10.81	0.363		
33	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:24:50	32.0	11.14	0.370		
34	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:33:50	33.0	11.28	0.371		
35	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:39:50	34.0	11.54	0.372		
36	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:46:20	35.0	11.96	0.380		
37	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 11:54:16	36.0	12.67	0.396		
38	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 12:02:04	37.0	14.11	0.427		
39	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 12:09:32	38.0	16.17	0.471		
40	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 12:16:43	39.0	21.10	0.560		
41	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 12:24:35	40.0	32.82	0.633		
42	Size	Hb in PBS	2006年12月20日 12:31:38	41.0	62.04	0.589		

“Temperature trend”报页提供粒径/电位随温度变化趋势图和数据表格



“Aggregation Point”报告页提供蛋白质熔点检测信息



2.6 动态光散射微流变操作步骤

2.6.1 样品要求

动态光散射微流变功能需要 DTS7.0 以上版本软件，以及 ZEN2500 zetasizer Nano ZSP 或者 ZEN3600 Zetasizer Nano ZS。

动态光散射微流变 DLS Microrheology 技术是动态光散射和流变技术的交叉应用。**其样品对应的是低粘度弱相互作用力的体系如高分子/蛋白质稀溶液。**

2.6.2 样品制备

参考动态光散射（2.1.1 和 2.1.2）和电泳光散射（2.2.1 和 2.2.2）样品制备要求。

2.6.3 测试步骤

动态光散射微流变使用**示踪粒子检测应力和形变之间**的关系。同时需要动态光散射技术 DLS 和电泳光散射技术 ELS 来确保测试有效性。

确保示踪粒子具有正确的表面化学特性

通过 Zeta potential 检测保证示踪粒子和样品之间没有化学相互作用力。首先检测样品溶液环境下没有加入样品时示踪颗粒的 zeta 电位，然后检测首先检测样品溶液环境下加入样品时示踪颗粒的 zeta 电位。如果两次检测的电位值具有可比性，即电位变化非常小，那么说明样品和示踪粒子没有相互作用。

确保适合的浓度和示踪粒子的良好分散

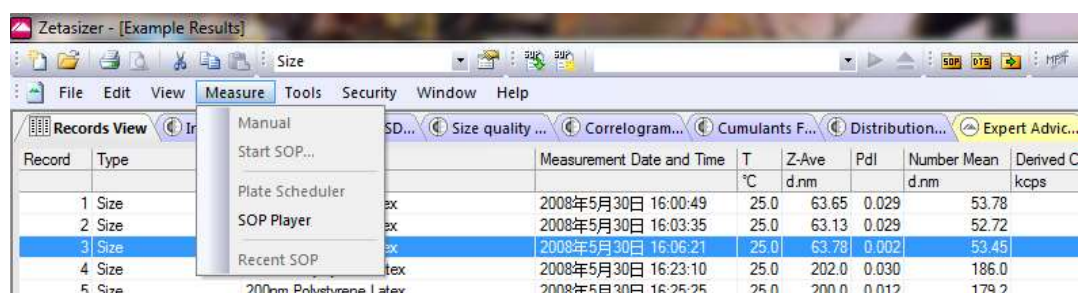
粒径检测功能确保散射光强度和分布符合检测条件。进行一个粒径检测，确保示踪粒子的散射光强贡献占到绝大部分，并且示踪粒子的分布是窄分布，这将说明示踪颗粒得到了良好的分散。

检测示踪粒子的相关方程

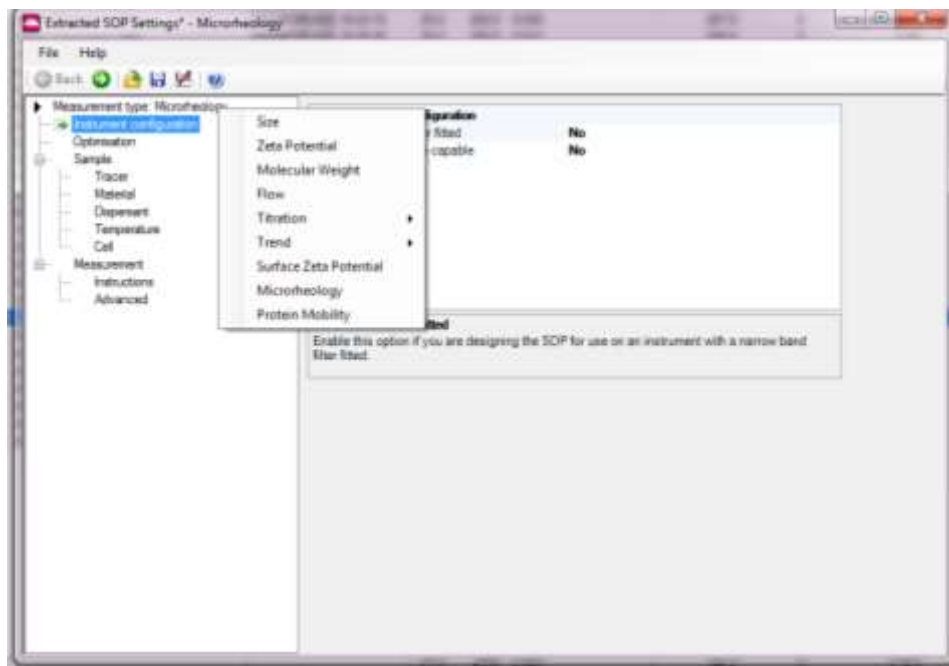
进行微流变测试，从均方平均位移曲线（Mean Square Displacement MSD）中提取微流变数据。


软件操作


点击“measure”选择“Manual”

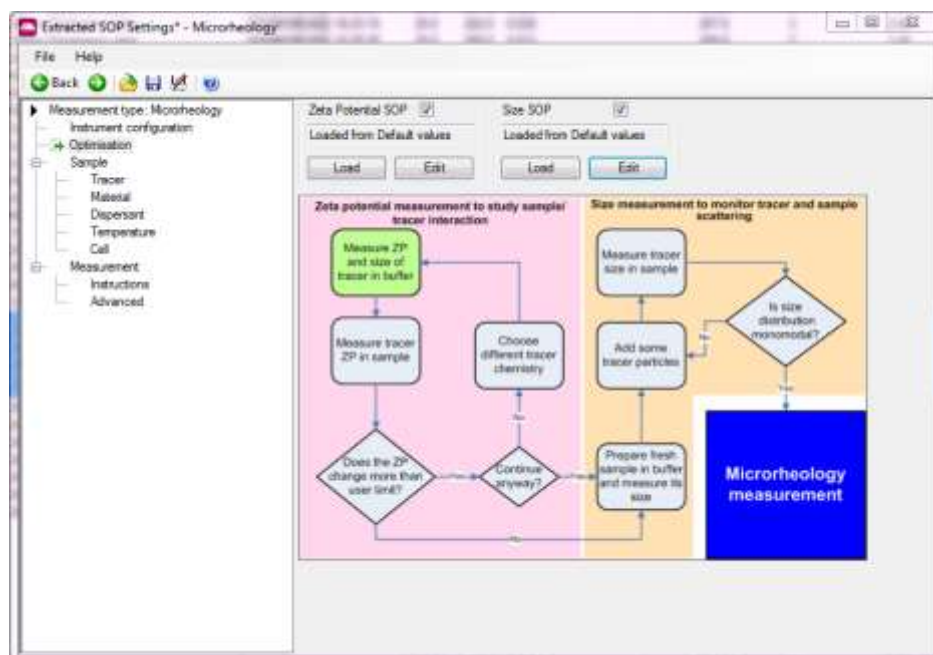


点击“Measurement type”选择“Micro rheology”



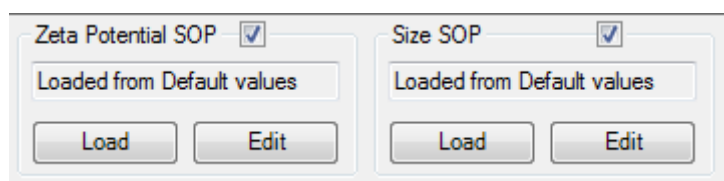
点击 ，“Instrument configuration” 选项中选择仪器中是否配置了窄频率光片 “Narrow band filter fitted” 以及是否有高温模块选项 “High temperature capable”。


点击 ，进入 “Optimisation” 选项。




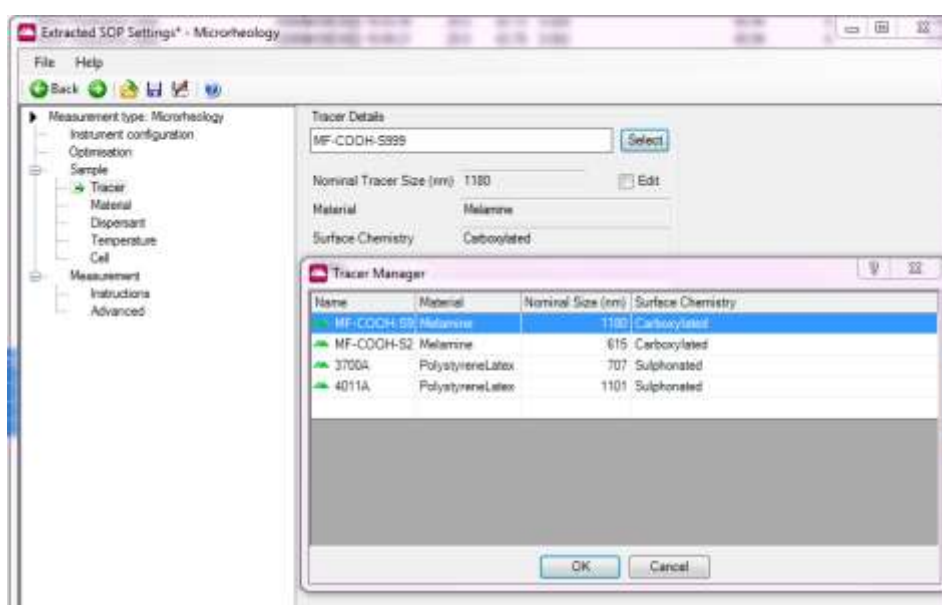
优化设置“Optimisation”界面中提供了优化最终微流变测试所需要的预测试项目。其中 zeta 电位检测是为了确认示踪颗粒 tracer 和体系是否有化学相互作用。粒径检测是为了确认示踪颗粒是否有足够的散射光以遮盖体系环境的散射光。建议客户选中“zeta potential SOP”


和“Size SOP”在最终试验之前确认体系是否达到检测标准。




点击 ，在“sample”选项中输入样品名称和备注

点击 ，在“tracer”中点击“Select”示踪颗粒的信息。马尔文公司为客户提供四个示踪颗粒，其中“其中其长子 MF-COOH-S999”和“MF-COOH-S2156”是表面带正电的示踪颗粒，“3700A”和“4011A”是表面带负电的颗粒。示踪粒子的电性应该和溶液体系的电性相同以避免他们的化学相互作用。



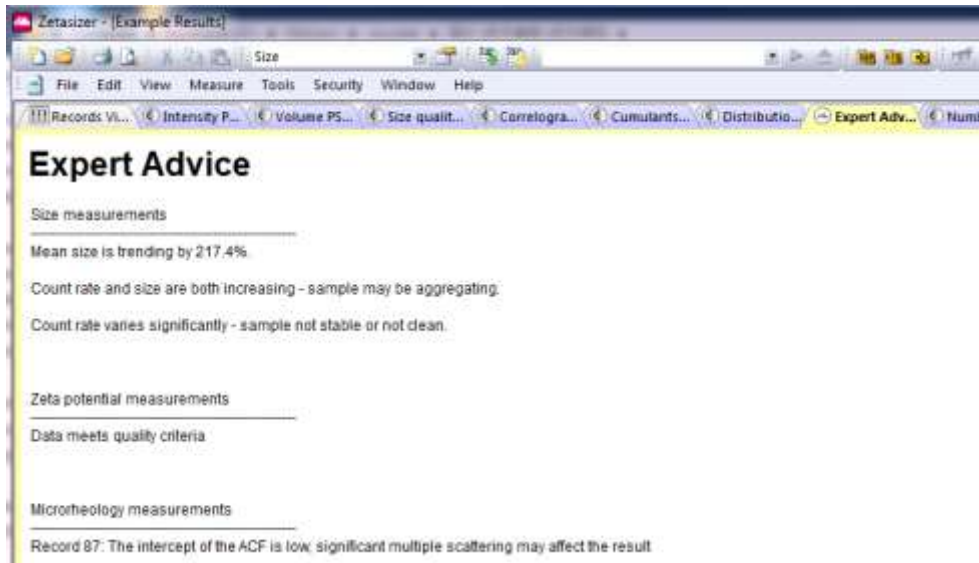
点击 ，“Material”，“Dispersant”，“Temperature”和“Cell”选项输入参考粒径测试的相同设置，详见 2.1.3

点击 ，“Measurement”，“Instruction”，“Advanced”选项输入参考粒径测试的相同设置，详见 2.1.3

点击“OK”按照软件提示进行操作测试，检测结束后，仪器自动停止测试

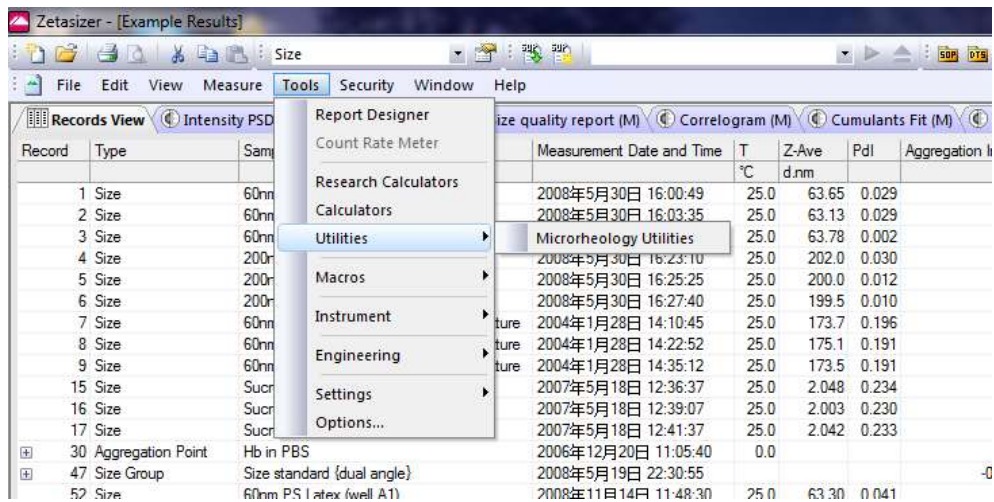
2.6.4 测试质量判断

请参照 Expert Advice 中描述判断测试质量



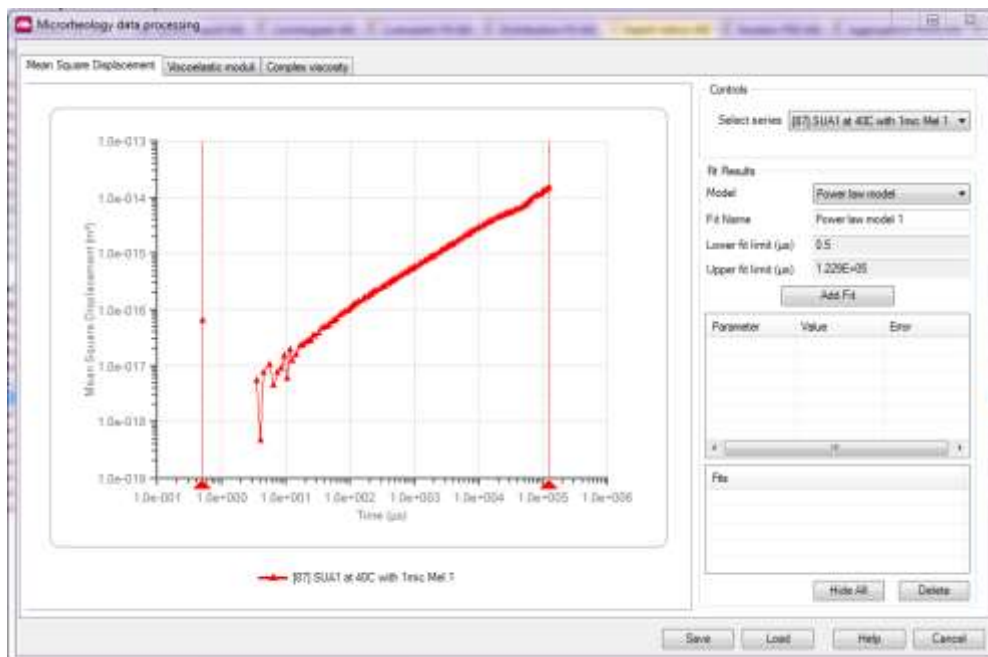
2.6.5 结果解释

测试结束后点击 Tools – Utilities – Microheology Utilities，或者将鼠标移至微流变结果，右击鼠标，选择 Microheology Utilities

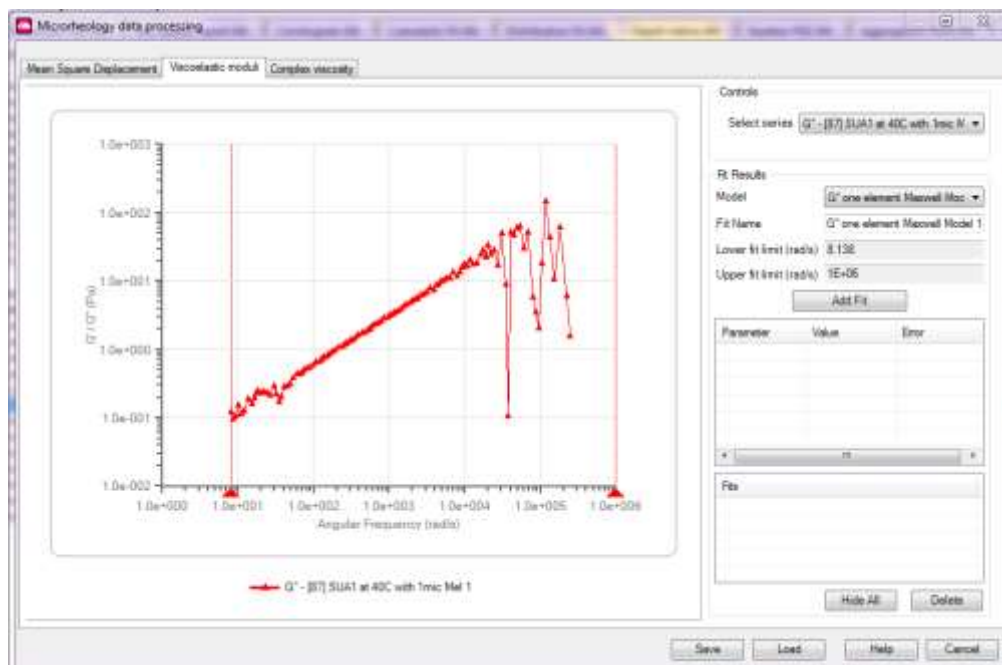


在微流变工具中提供三个结果选项：

“Mean square displacement” 平均均方位移随相关时间变化



“Viscoelastic Moduli” 粘弹性模量随角频率变化



“Complex viscosity” 复数粘度随角频率变化



2.7 自动滴定操作

2.7.1 测试目的

马尔文 Zetasizer Nano 系列仪器可以连接 MPT-2 自动滴定仪进行粒径和电位的自动滴定操作，其目的是检测一系列环境条件下颗粒的 zeta 电位和粒径的变化趋势。

2.7.2 样品制备

请参考 2.1.2 和 2.2.2 中对于粒径检测和电位检测样品的制备要求。样品池为马尔文毛细管电位样品池。



2.7.3 测试步骤

如果对于样品进行酸滴定，需要配置两个不同浓度的酸性滴定液，建议浓度分别为 0.25 M 和 0.025M。

如果对于样品进行碱滴定，需要配置两个不同浓度的碱性滴定液，建议浓度分别为 0.25 M 和 0.025M。

如果进行盐度滴定或者其他添加物滴定，请配置相应的添加物滴定液。将滴定液放入三个滴定液位置。

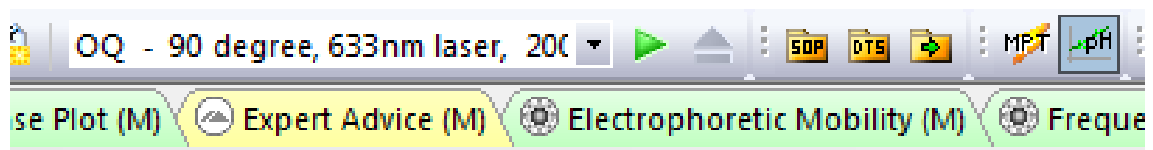
校正 MPT-2 自动滴定仪 pH 计

打开 MPT-2 自动滴定仪后面板的电源开关

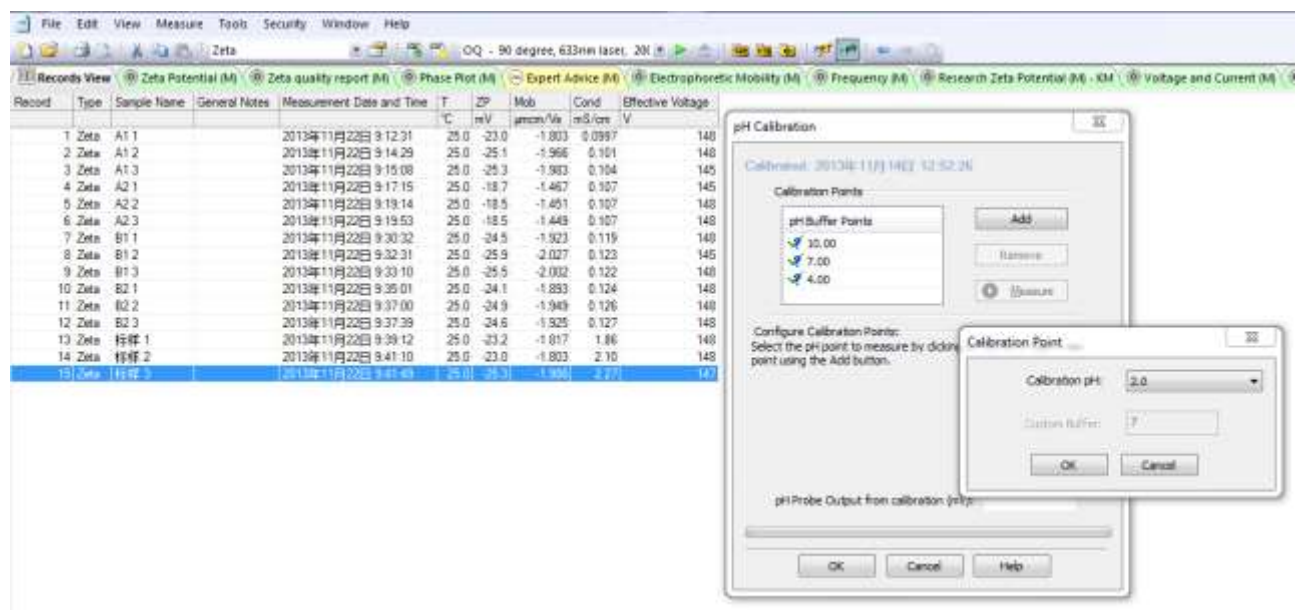
配置 2-3 个不同 pH 的缓冲溶液。注：马尔文 MPT-2 随机携带 2-3 个 pH 缓冲溶液胶囊，请按照胶囊的说明书配置缓冲溶液。



点击菜单栏“pH”菜单



在“pH calibration”对话框中选择配置好的 pH 缓冲溶液的 pH 值，点击“Add”添加



对话框中选择第一个要使用的缓冲溶液的 pH，将电极浸没在对应 pH 的缓冲溶液中，点击“Measure”

对话框中选择第二个要使用的缓冲溶液的 pH，将电极浸没在对应 pH 的缓冲溶液中，点击“Measure”

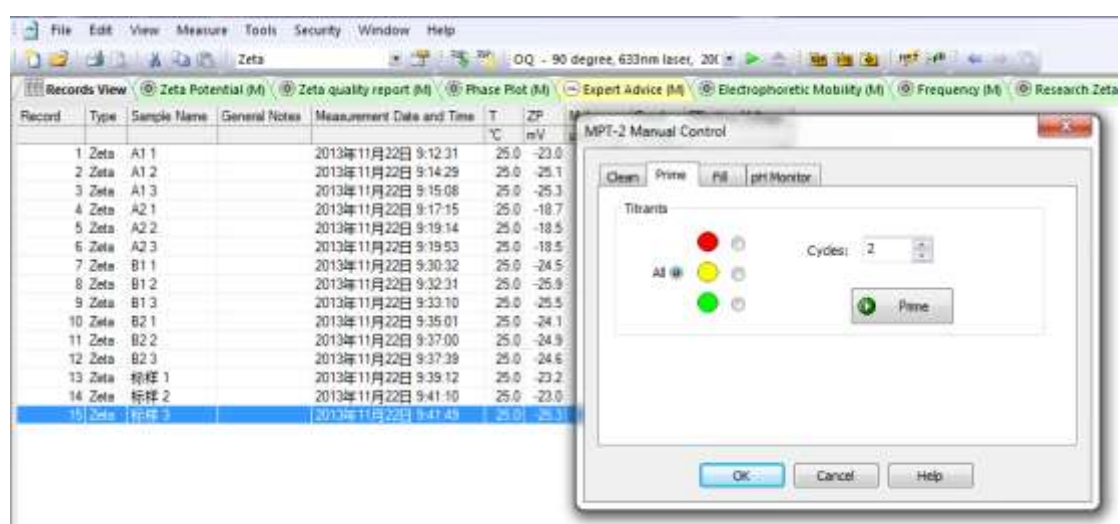
结束校正后点击对话框中“OK”

清洗/注入 MPT-2 自动滴定仪管路

点击菜单栏“MPT”菜单

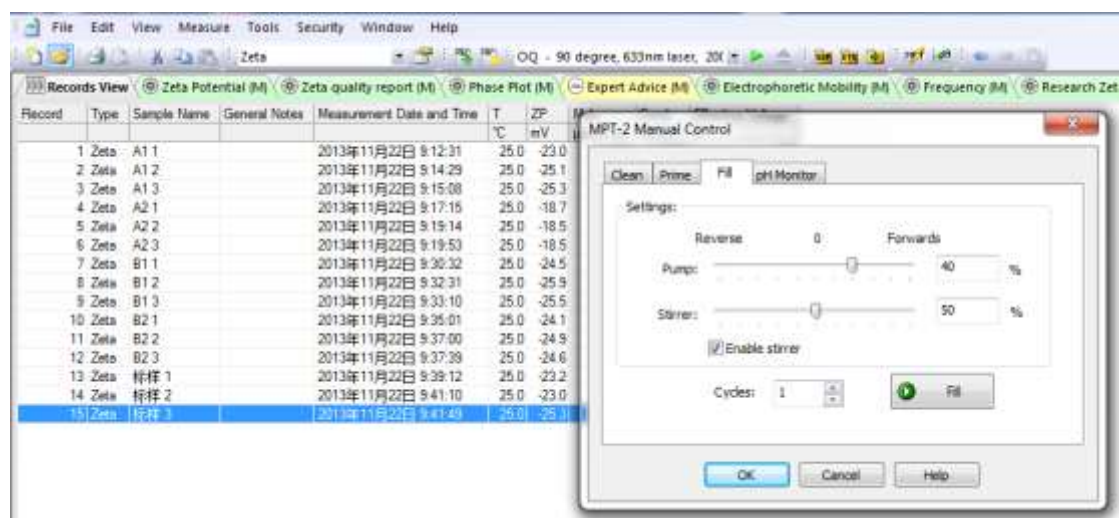


将配置好的酸或者碱溶液放置到 MPT-2 上对应的滴定口，在 Prime 菜单中选中“All”，点击“Prime”，待滴定液从管路流出后停止，并用干净的纸巾将管路口未滴下的滴定液擦净，防止交叉污染。



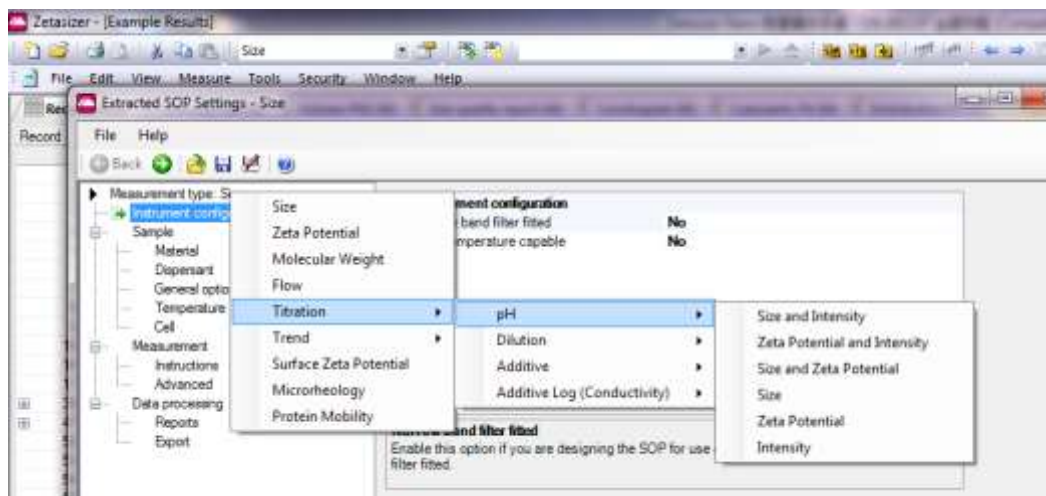
注入样品

准确量取 10-15ml 样品，加入滴定专用试管，加入磁力搅拌子。将试管旋转装入自动滴定仪，在“Fill”菜单中调节蠕动泵速度和电磁搅拌速度，点击“Fill”将样品注入毛细管池，注意观察池内不要有气泡存在





软件操作

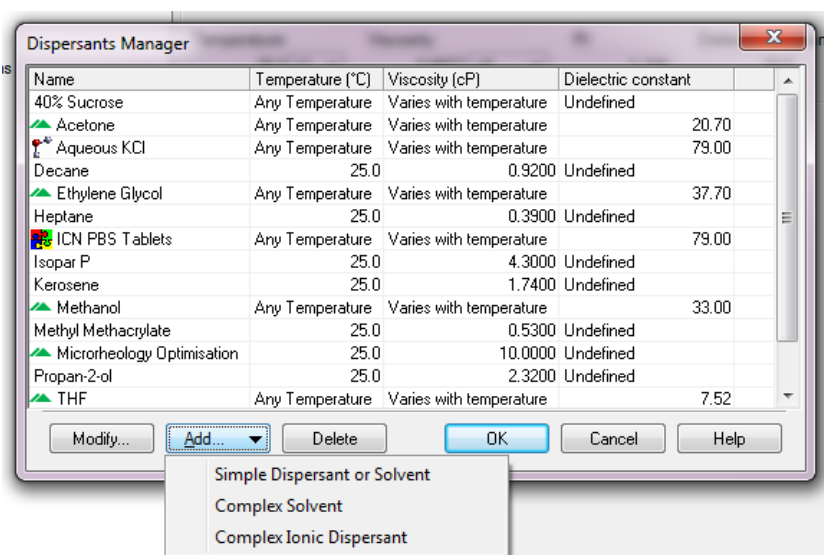
点击 Measure – Manual – Measurement type – Titration – 选择需要滴定的测试 (size 或者 zeta)



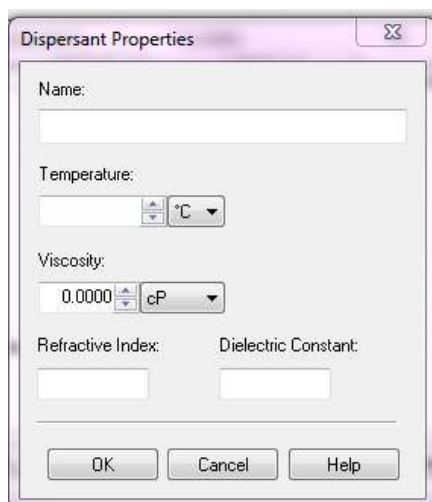
以进行 zeta 电位滴定操作为例，点击 ，在 “sample” 选项中输入样品名称和备注

点击 ，在 “Material” 中保留为默认值。检测 zeta 电位不需要其中参数的信息。

点击 ，在 “Dispersant” 选项中输入/选择溶剂的折光指数 RI，粘度 Viscosity 和介电常数 Dielectric constant 的信息。注：溶剂的 RI 和 Viscosity 参数随温度改变，所以应该输入对应温度的正确参数。如果在 Dispersant 的列表中没有对应的溶剂，请点击 “Add.....”



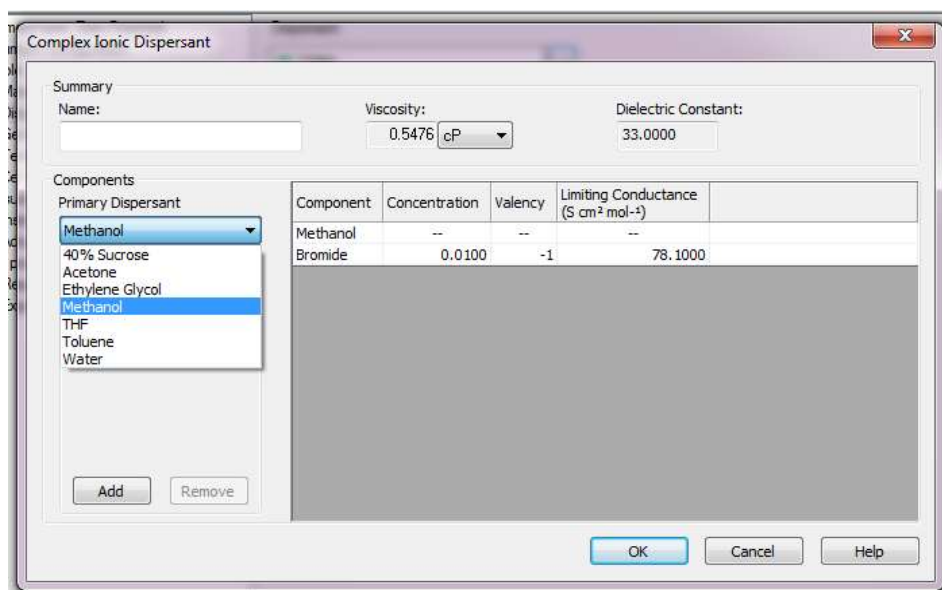
在 “Simple Dispersant or Solvent” 中输入对应 Dispersant 的信息，并起名保存。。





如果您的溶剂相为水相，Malvern 的 DTS 软件中具有复杂溶剂计算器，请点击“Complex Constant”，在对话框中选择正确的添加物，如 Potassium Chloride 氯化钾，输入浓度，如 0.01 M，点击添加“Add”。可以从对话框中选取多个添加物，输入浓度进行添加。最后请给您的复杂溶剂命名，并保存。





在 Complex Ionic Dispersant 中，提供多种极性溶剂加入可溶解盐类后的对应参数。



点击 ，在“General options”选项中选择模型。水相体系选择 Smoluchowski 模型，有机相体系选择 Huckel 模型

点击 ，在“Temperature”温度选项中输入检测的温度和平衡时间。注：如果您的测试温度和室温相差较大，需要输入较长时间用于样品平衡。通常如果您的样品从室温条件放入仪器在 25 度条件下测试，需要恒温至少 120 秒。


点击 ，在“cell”样品池选项中选择对应的样品池种类。


点击 ，在“measurement”测试选项中选择：


“Measurement duration”测试时间，通常检测电位请选择默认“Automatic”。

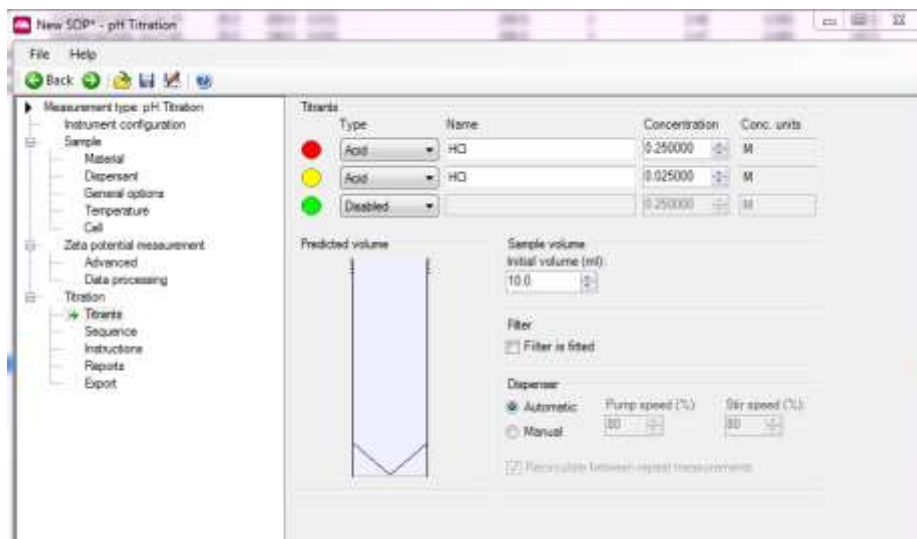
“Number of measurements”重复测试次数，至少输入三次或者三次以上。


“Delay between measurements”每次测试之间间隔时间。如果您的样品对于 6532.8nm 激光没有吸收，请输入 0。

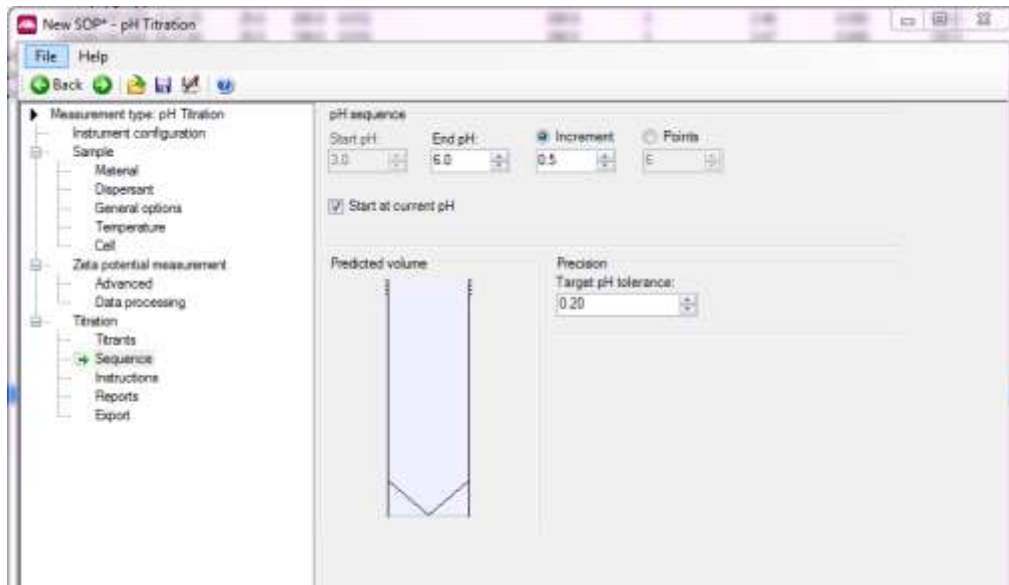
点击 ，“introductions”和“Advanced”选项中保留位默认选择。

点击 ，“Data processing”中选择分析模型“Analysis model”，若果检测化学合成样品，请保留位默认选择“General purpose”。

点击 ，“Titration - Titrants”中输入对应的滴定剂位置所放置的滴定液的种类和浓度。滴定的样品量“Sample volume”通常在 10-15ml 之间。“Dispenser”通常选择“Automatic”



点击 ，“Sequence”中选择起始 pH 值“start pH”和目标 pH“End pH”值。如果想要从当前 pH 开始滴定，请选择“start at current pH”。通过“Target pH tolerance”选择滴定到目标 pH 的精度范围。



“Introductions”、“Reports” 和 “Export” 中保留为默认设置。
点击 “OK” 开始检测。检测结束后，仪器自动停止测试。

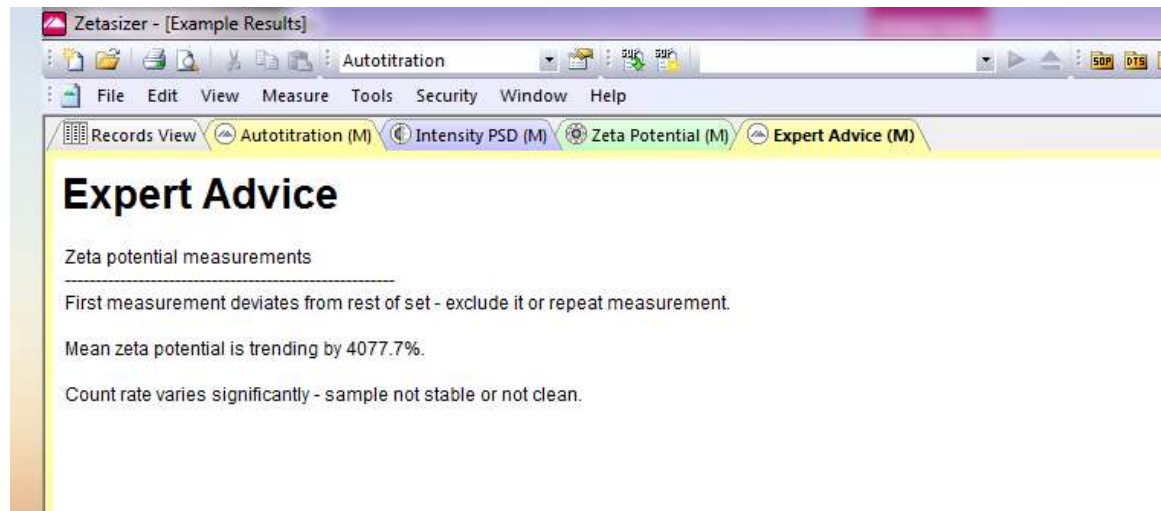
注意：在测试结束后应该用清水清洗所有管路，并且将酸碱滴定液从滴定位置移出，并将滴定管路中所有液体清空！

如果 pH 电极中的电解液液面很低，请使用马尔文随即配送的电解液将 pH 电极注满，盖好电极上的盖子。



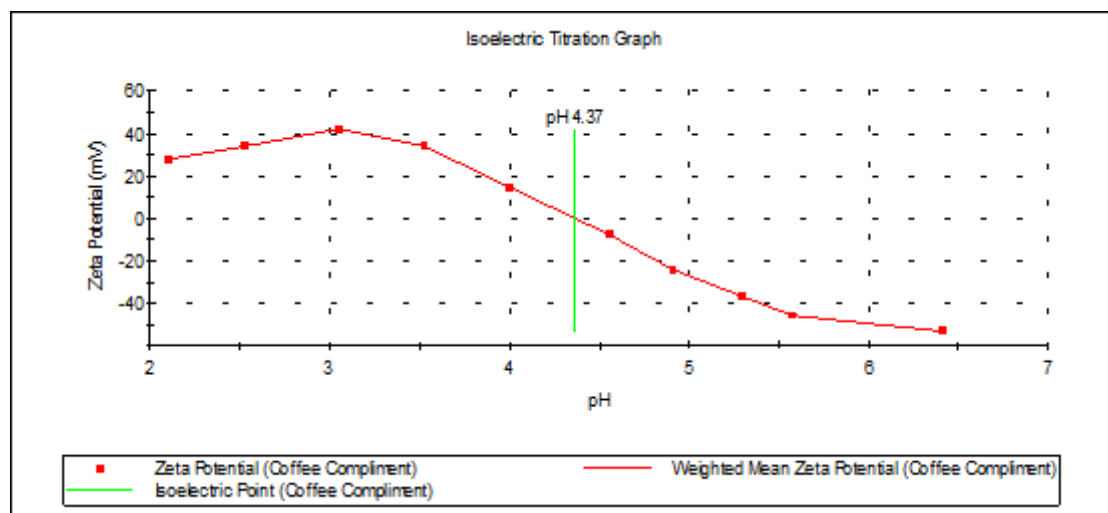
2.7.4 测试质量判断

具体测试质量，请参考“Expert Advice”报告页



2.7.5 结果解释

滴定测试目的通常是为了了解一系列环境下颗粒的电位及其粒径的趋势变化，通常用户会将一系列条件下的电位/粒径变化绘制曲线，比较直观的说明粒子的变化。

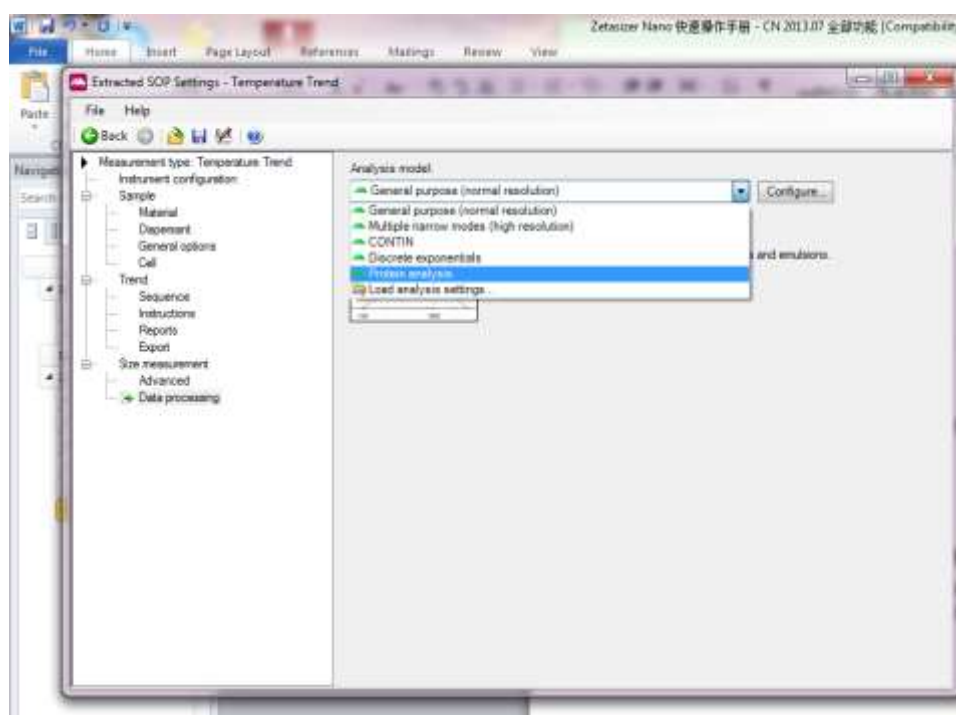


2.8 蛋白质的粒径和电位测定和以及数据解释

马尔文 DTS 7.0 以上软件版本提供专门的蛋白质粒径和电位检测/结果模块。

蛋白粒径检测

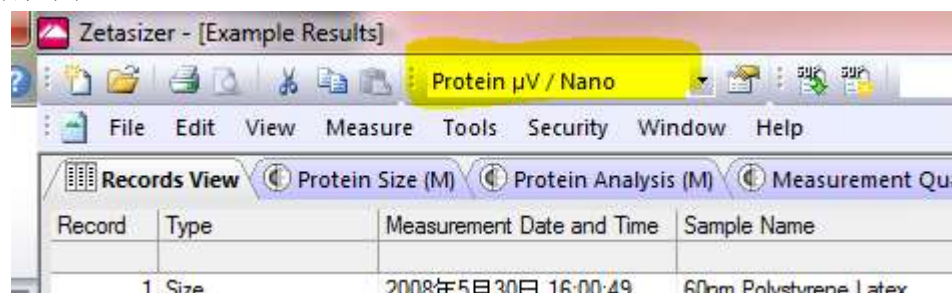
如果检测粒径，请在检测 SOP“Material”中选择蛋白质“Protein”参数，并在“Data Processing”中选择“Protein Analysis”，其他设置和检测粒径相同。



测试质量判断与粒径测试质量判断相同，详见 2.1.4。

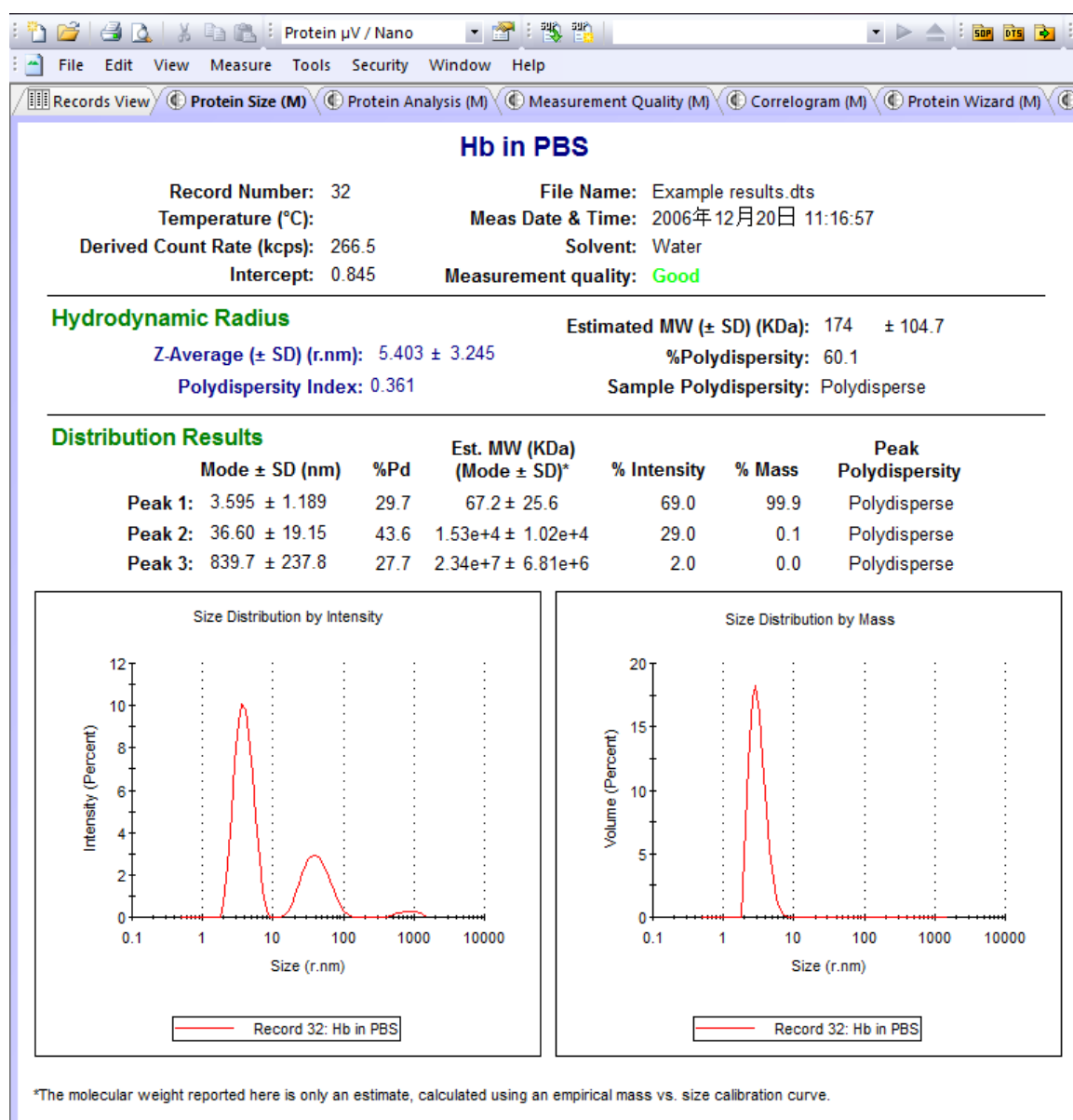
数据解释

请选择菜单栏“Protein uV/Nano”



在对应的报告页中将可以通过动态光散射结果分析蛋白质溶液的各种有关粒径及其分布的信息。

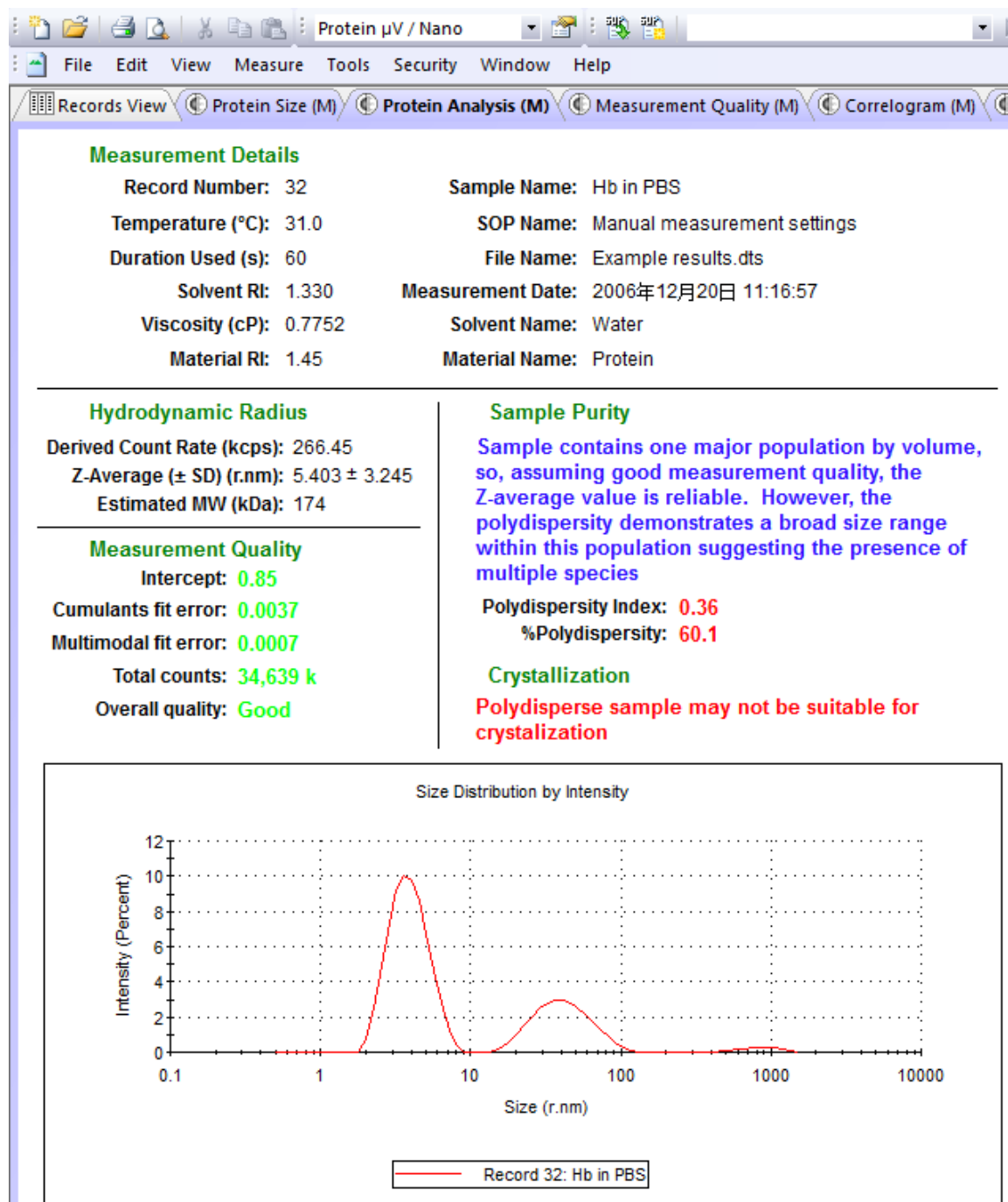
最主要的结果输出报告包括：**Protein size 报告页**



其有用信息包括：

- 平均蛋白粒径 “Z-ave”
- 蛋白分布 “PDI”
- 每一个峰的估算分子量 “Est. Mw (kDa)”
- 每一个峰的分布宽度系数 “PD”
- 每一个峰的质量百分含量 “%Mass”

Protein Analysis (M) 报告页



其有用信息包括:

- 样品纯度分析 “Sample Purity”
- 结晶化分析 “Crystallization”

Protein Wizard (M) 报告页

The screenshot displays the Protein Wizard (M) software interface. The title bar reads "Protein μ V / Nano". The menu bar includes "File", "Edit", "View", "Measure", "Tools", "Security", "Window", and "Help". The toolbar contains icons for "Records View", "Protein Size (M)", "Protein Analysis (M)", "Measurement Quality (M)", "Correlogram (M)", and "Protein Wizard (M)".

Measurement Details

Sample Name: Hb in PBS
SOP Name: Manual measurement settings
File Name: Example results.dts
Record Number: 32
Measurement Date and Time: 2006年12月20日 11:16:57

Z-Average

The Z-Average is reasonable and falls within expected limits for the size range of proteins.

Derived Count Rate

The derived count rate is appropriate for a protein.

Overall Sample Polydispersity

This overall sample polydispersity, derived from the PDI, is POLYDISPERSE. This suggests that there are a number of populations within the sample or a significant proportion of aggregated material.

Peak Analysis

The analysis has detected a peak that is likely to be a protein. The predicted MW of the protein is: 86 KDalton and its relative polydispersity is : 30% - indicating this peak is either a mix of oligomers, or contains non-globular molecules.

The peak accounts for 69% of the sample, by intensity, and 100% of the sample by volume.

Oligomer Estimate

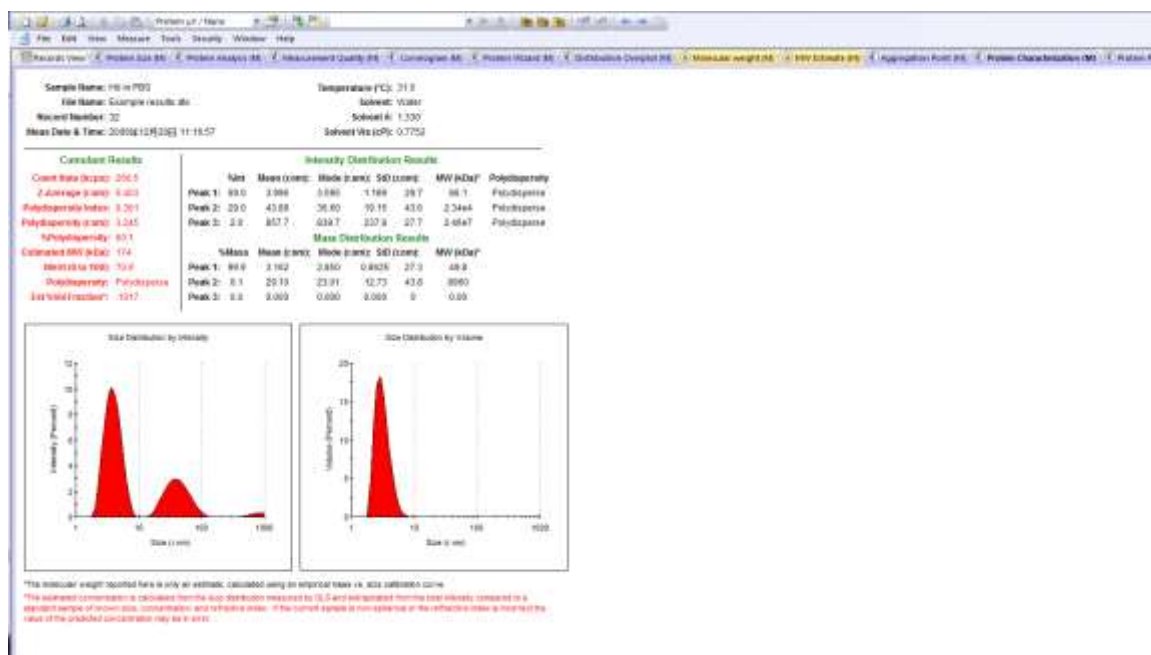
Possible Oligomer Equilibrium situations could be:
Main species by mass ('monomer') of 50 KDalton and
dimer 59 % by mass
OR: trimer 16 % by mass
OR: tetramer 8 % by mass

Other Comments

提供:

- 蛋白粒径分析 “Z-average”
- 散射光强分析 “Derived Count Rate”
- 样品整体分布分析 “Overall Sample Polydispersity”
- 每一个峰组分分析 “Peak Analysis”
- 寡聚体分析 “Oligomer Estimate”

Protein Characterization (M) 报告页



提供:

- 累计距 (粒径/PDI) 结果分析 “Cumulant Result”
- 光强分布结果分析 “Intensity Distribution Results”
- 体积/质量分布界 ugo 分析 “Mass Distribution Results”