Skripta iz predmeta Biofizička hemija 1

3

Dinamičko rasejanje svetlosti

DLS, ***D**ynamic **L**ight **S**cattering*

Ana Popović Bijelić

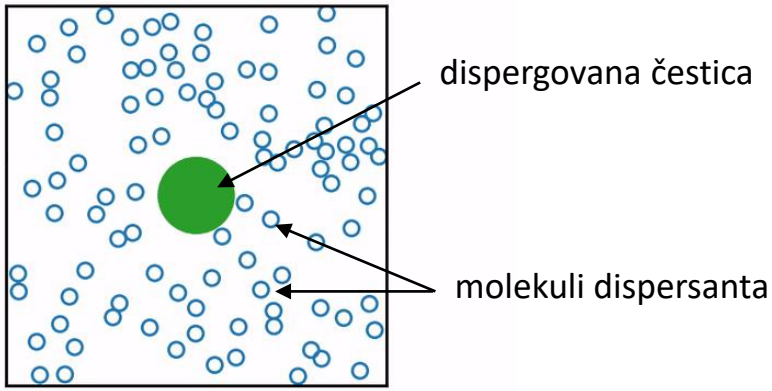
2025.

Citirati kao:
Ana Popović Bijelić, Skripta iz Biofizičke hemije 1, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2025.

Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS) - osnovno

- **DLS je fizičkohemijska tehnika koja se koristi za određivanje <u>veličine</u> i <u>zeta potencijala</u> čestica u disperzijama.**
- Opseg u kom DLS može da odredi veličinu čestica je **1 nm - 10 μm**.
- DLS se takođe koristi za određivanje elektroforetske mobilnosti i izoelektrične tačke, kao i za aproksimaciju mase makromolekula.
- DLS uređaj se zove ***zetasizer*** (zetasajzer).
- Drugi nazivi za DLS tehniku su:
  Fotonska korelaciona spektroskopija (*Photon Correlation Spectroscopy*)
  Kvazi-elastično rasejanje svetlosti (*Quasi-Elastic Light Scattering*)

- Princip DLS merenja se zasniva na fenomenu **Braunovog kretanja** čestica u disperziji: **dispergovane čestice** se sudaraju sa molekulima **dispersanta** i kreću se stohastičnom (nasumičnom) putanjom i <u>rasejavaju svetlost</u>.



Disperzija je sistem koji se sastoji od disperzne faze (dispergovane čestice) i disperzne sredine (faza u kojoj su čestice dispergovane). Ako je veličina čestica do 1000 nm, to su pravi koloidni rastvori, ako je veća od 1000 nm, to su grube disperzije.

- Na brzinu Braunovog kretanja dispergovane čestice utiče **masa (veličina)**, pa se zato veće čestice kreću sporije od manjih.
- Braunovo kretanje takođe zavisi od **viskoznosti dispersanta** (tečnost u kojoj se nalazi dispergovana čestica), a viskoznost zavisi od temperature. Temperatura u toku DLS merenja mora da bude konstantna.
- Brzina Braunovog kretanja se može opisati **translacionim difuzionim koeficijentom** (D).

Važno za fizikohemičara: kod DLS-a, rasejano zračenje ima istu λ kao upadno zračenje – elastično rasejanje.
Rayleigh-ovo rasejanje je takođe elastično.
Ramansko rasejanje je neelastično – λ rasejane svetlosti je različita od λ upadne.

DLS – princip merenja

Ukratko:

1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, λ = 633 nm) pada na uzorak (disperziju).
2. Čestice u disperziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljaju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

2. Čestice u disperziji rasejavaju deo zračenja.

Kako rasejavaju?

Zavisi od dimenzija čestica:

Rejlijevo rasejanje: ako su dimenzije čestica $< \frac{\lambda}{10}$, konkretno za 633 nm laser ako su čestice manje od 60 nm, rasejano zračenje će biti izotropno (isto u svim smerovima).

Mieovo rasejanje: ako su dimenzije čestica $>> \frac{\lambda}{10}$, konkretno za 633 nm laser ako su čestice ~ 600 nm, rasejano zračenje će biti anizotropno. (Matematički opis Mieove mape rasejanja svetlosti je kompleksan i ovde se neće razmatrati).

Intenzitet Rejlijevo rasejanog zračenja:

$$I = I_0 \left(\frac{1 + cos^2\theta}{2R^2}\right) \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \left(\frac{d}{2}\right)^6$$

θ - ugao rasejanja, I_0 - intenzitet upadnog zračenja, R - rastojanje između čestice i detektora λ - talasna dužina zračenja, n - indeks prelamanja sredine (dispersanta) i d - dijametar (prečnik) čestice.

Iz gornje jednačine koja povezuje intenzitet rasejanog zračenja, talasnu dužinu upadnog zračenja i dimenzije čestica se vidi da je $\mathbf{I \sim \lambda^{-4}}$ i $\mathbf{I \sim d^6}$.

Ovde je važno zapamtiti da pošto je $\mathbf{I \sim d^6}$, intenzitet rasejanog zračenja na česticama dijametra **50 nm** će biti **10^6 puta veći** od intenziteta rasejanog zračenja na česticama dijametra **5 nm**.

Takođe treba primetiti da za DLS merenje nije baš idealno ako imamo **smešu čestica različitih veličina**, npr. 50 nm i 1000 nm, jer će doprinos ukupnom izmerenom intenzitetu rasejane svetlosti koji potiče od rasejavanja na česticama od 50 nm biti izuzetno mali u odnosu na doprinos od rasejavanja na česticama od 1000 nm (drugim rečima nije moguće dobiti dobre DLS rezultate ako su uzorci polidisperzni, na str. 17 je dato detaljnije objašnjenje).

1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, λ = 633 nm) pada na uzorak (disperziju).
2. Čestice u disperziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljaju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

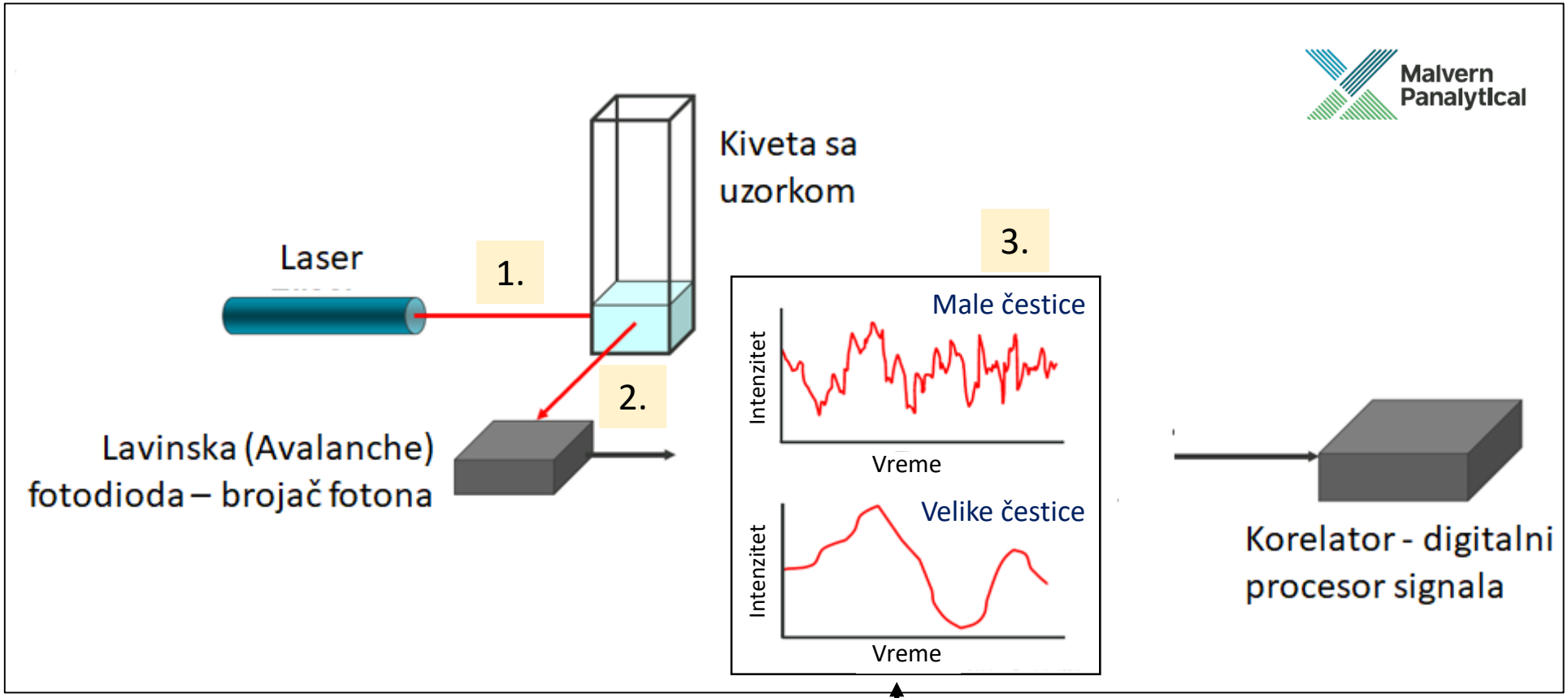
3. Javljaju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

Ovo znači da brzina kojom se menja intenzitet rasejane svetlosti (fluktuacija intenziteta rasejane svetlosti) zavisi od brzine difundovanja čestica. Kao što je na početku rečeno, čestice manjih dimenzija imaju brže Braunovo kretanje, pa su zato i fluktuacije intenziteta veće. Sada možemo preciznije da kažemo šta meri DLS uređaj:

- **DLS meri** fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti u vremenu (promenu intenziteta rasejane svetlosti u vremenu).
- Nakon toga, korišćenjem tzv. autokorelacione funkcije (str. 10), **DLS računa** promenu korelacionog koeficijenta u vremenu koji govori o brzini fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti.
- Iz toga **DLS računa** translacioni difuzioni koeficijent (str. 11).
- Zatim korišćenjem *Stokes-Einstein*-ove jednačine **DLS računa** hidrodinamički radijus čestice koji je mera veličine čestice (str. 12).

DLS – princip merenja

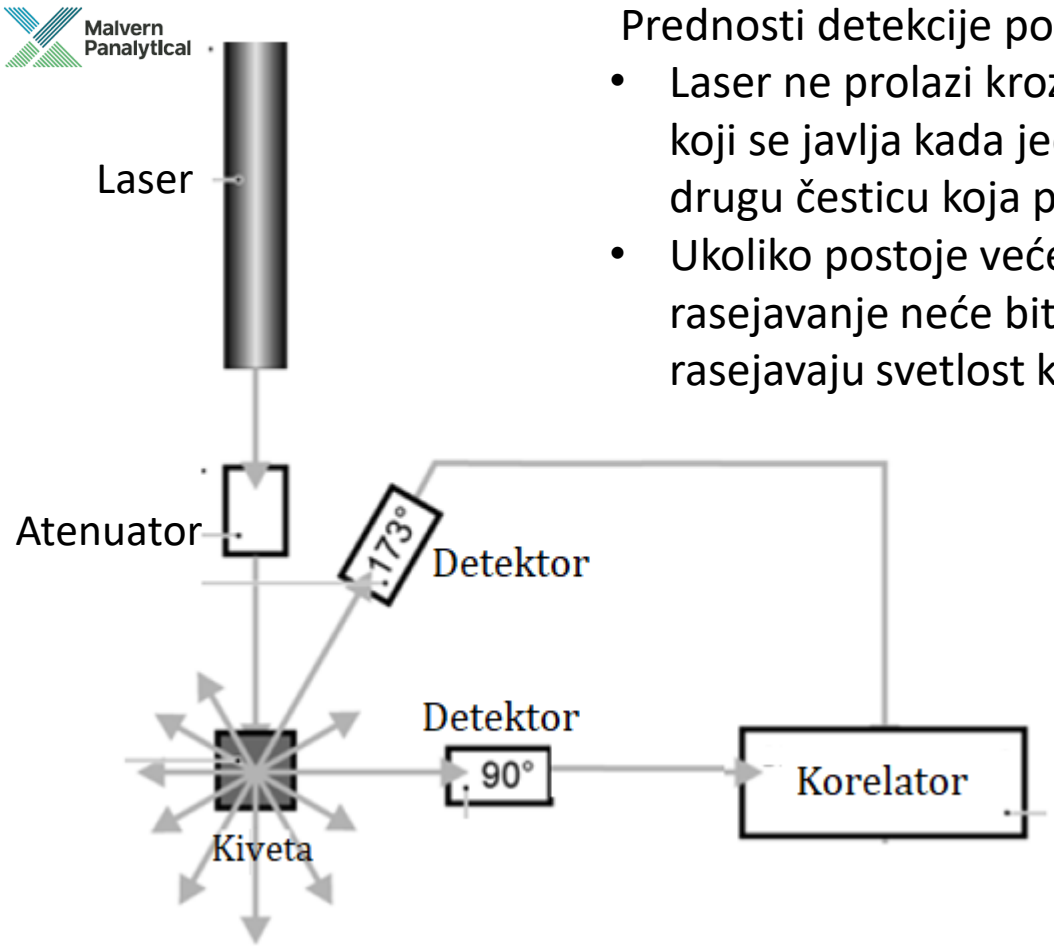
1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, λ = 633 nm) pada na uzorak.
2. Čestice u disperziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljaju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.



Ovi grafici prikazuju šta meri DLS uređaj - fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti u vremenu. Prikazani su karakteristični izmereni (neobrađeni) signali za male i velike čestice.

DLS detektori

Različiti modeli zetasajzera imaju detektore postavljene pod različitim uglovima u odnosu na smer upadnog zračenja na kivetu sa uzorkom: **13°, 90° i 173°**. Neki zetasajzeri sadrže više detektora i korisnik ima opciju da odabere pod kojim uglom će biti izvršeno merenje.



Prednosti detekcije pod uglom od **173°** (tzv. *backscatter* detekcija):

- Laser ne prolazi kroz ceo uzorak, smanjuje se efekat multirasejavanja koji se javlja kada jedna čestica raseje zračenje koje onda pada na drugu česticu koja ponovo rasejava to zračenje.
- Ukoliko postoje veće čestice u uzorku, agregati ili prašina, njihovo rasejavanje neće biti detektovano jer velike čestice uglavnom rasejavaju svetlost ka napred.

Autokorelaciona funkcija - $G(\tau)$

Primenom autokorelacione funkcije se od neobrađenog DLS signala dobija korelogram.

$$G(\tau) = \left\langle \frac{I(t) * I(t+\tau)}{I(t)^2} \right\rangle$$

I – intenzitet rasejane svetlosti
t – vreme
τ – vremensko kašnjenje korelatora

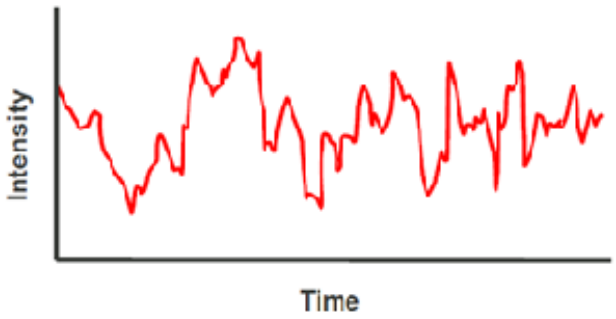
Autokorelaciona funkcija (sinonimi su autokorelator, komparator) govori o tome koliko dato stanje sistema (ili signal) liči na stanje sistema (odnosno signal) u prethodnom trenutku merenja.

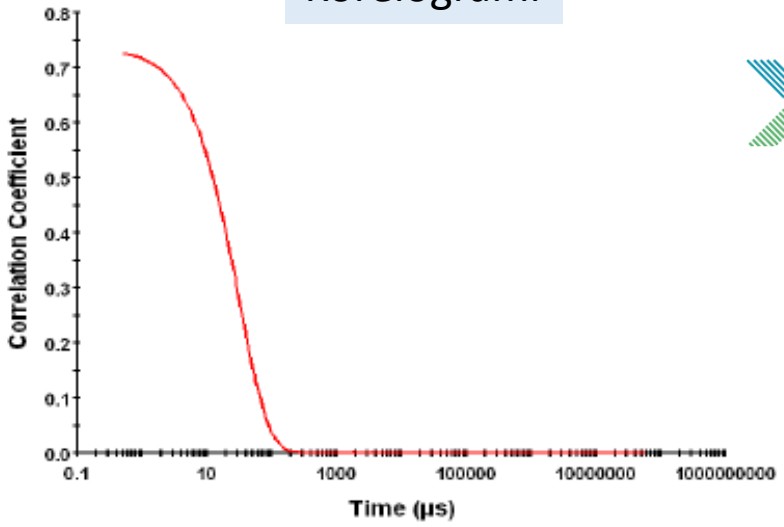
Autokorelaciona funkcija - korelogram

Neobrađeni signali sa detektora

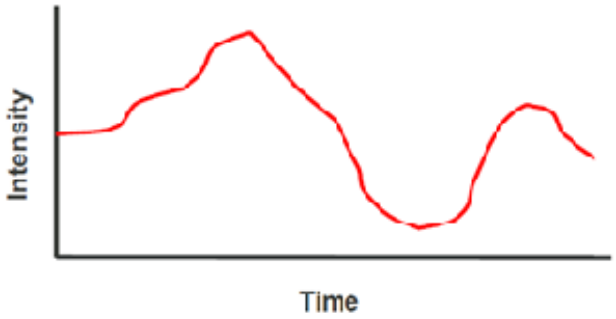
Korelogrami

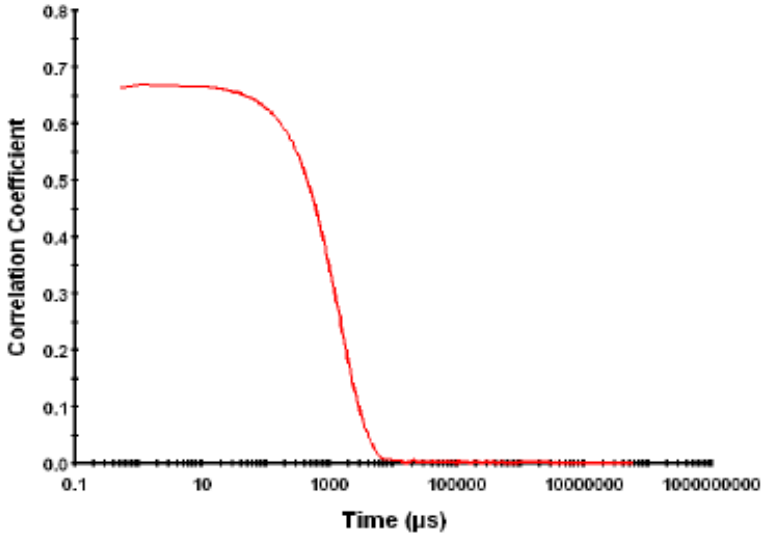
Male čestice





Velike čestice





Analiza korelograma – računanje D

Dobijeni korelogram se fituje eksponencijalnom funkcijom prikazanom niže, odakle se iz eksponencijalnog člana dobija vrednost **translacionog difuzionog koeficijenta (D)**.

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

B – bazna linija
A – amplituda
q – vektor rasejavanja, $q = (4\pi n/\lambda_0) \sin(\theta/2)$
n – indeks prelamanja dispersanta
λ_0 – talasna dužina lasera
θ – ugao detekcije
D – translacioni difuzioni koeficijent
τ – vremensko kašnjenje korelatora

Analiza korelograma – računanje R_h

Na kraju, izračunati translacioni difuzioni koeficijent (D) se uvršćava u ***Stokes-Einstein*-ovu jednačinu** i dobija se konačan rezultat DLS merenja - **hidrodinamički radijus čestice** (**R_h**), koji je mera veličine čestice:

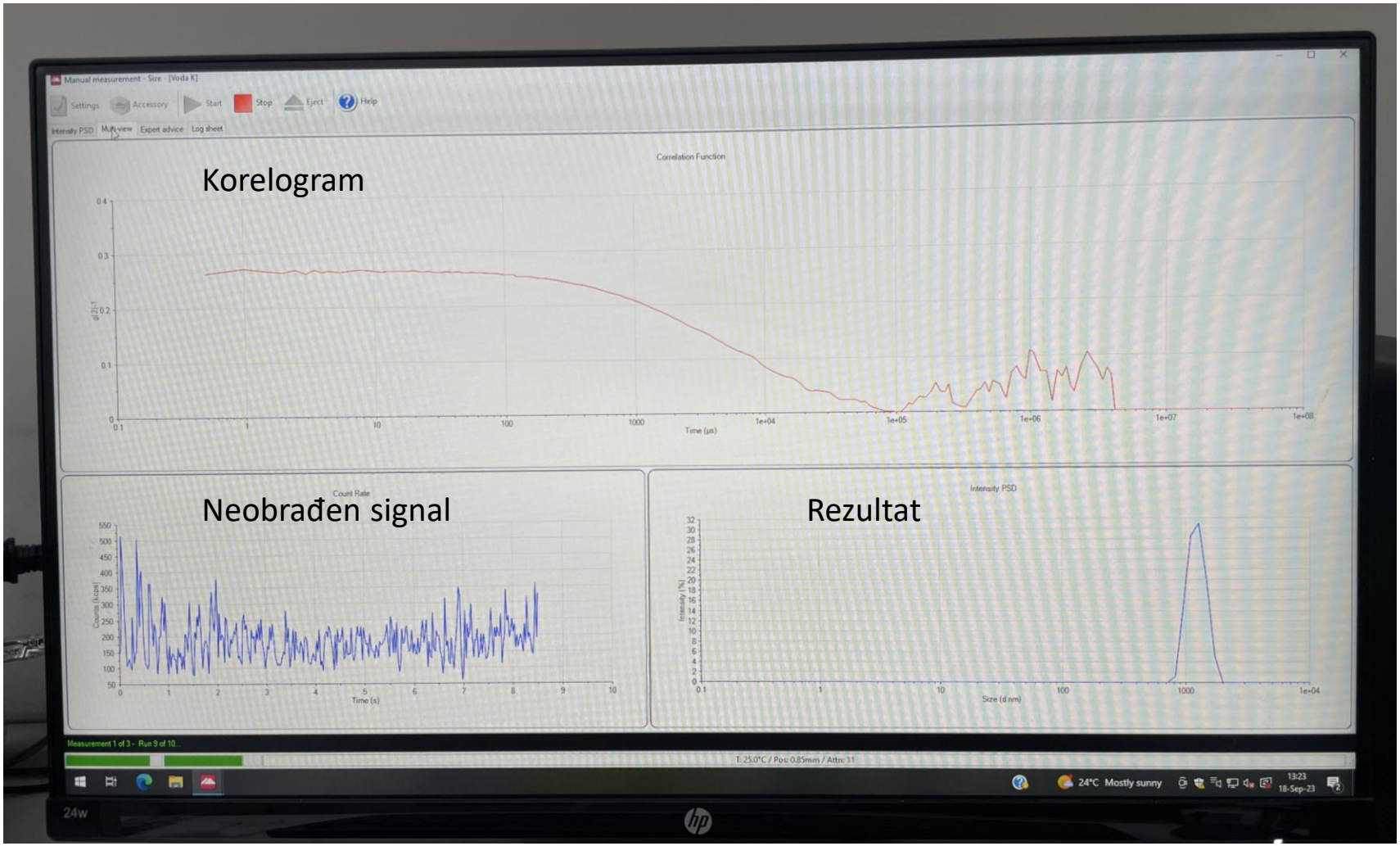
$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Stokes-Einstein-ova jednačina

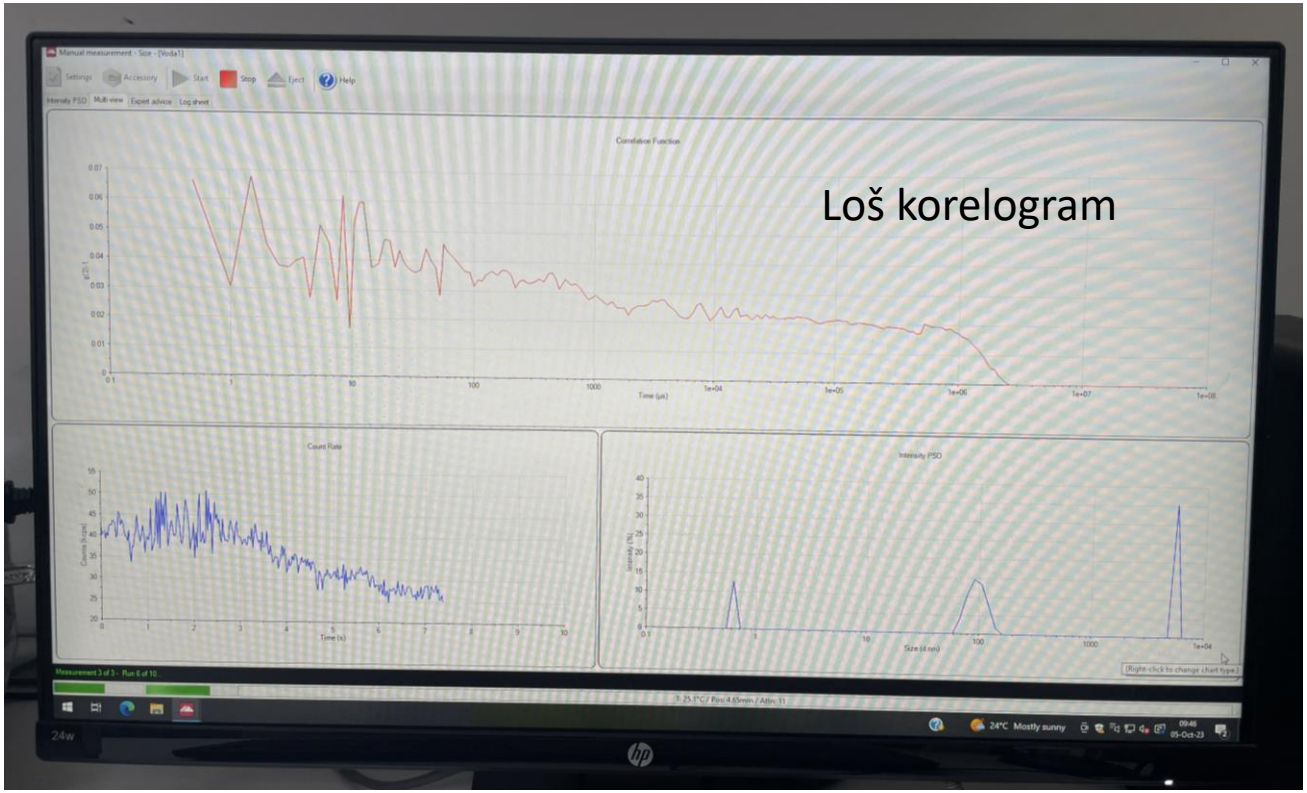
R_h – hidrodinamički radijus [m]
k_B – Boltzmann-ova konstanta = $1{,}38 \cdot 10^{-23}$ $m^2 \cdot kg \cdot s^{-2} \cdot K^{-1}$
T – apsolutna temperatura [K]
η – viskoznost [$kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$] tj. [Pa·s], u praksi obično [cP], 1 cP = 0,001 Pa·s
D – translacioni difuzioni koeficijent [$m^2 \cdot s^{-1}$], u praksi obično [$cm^2 \cdot s^{-1}$]

Veoma je važno imati u vidu da je određivanje hidrodinamičkog radijusa čestice (**R_h**) korišćenjem DLS tehnike zasnovano na pretpostavci da **R_h** predstavlja radijus **sfere** koja ima isti translacioni difuzioni koeficijent kao **čestica** - ovo znači da su sve čestice u DLS merenju aproksimirane kao sfere, što nije nužno tačno i može dati pogrešne rezultate.

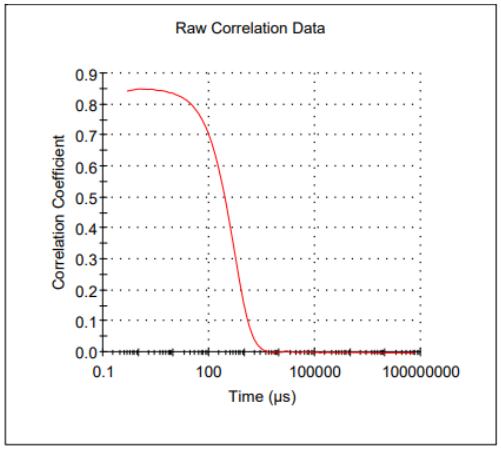
Na slici je prikazan ekran računara koji je povezan sa zetasajzerom na kome se može pratiti DLS merenje u realnom vremenu: dole levo je prikazan neobrađeni signal sa detektora, gore je prikazan korelogram dobijen primenom autokorelacione funkcije, i dole desno je prikazan konačan rezultat DLS merenja - raspodela veličina čestica.



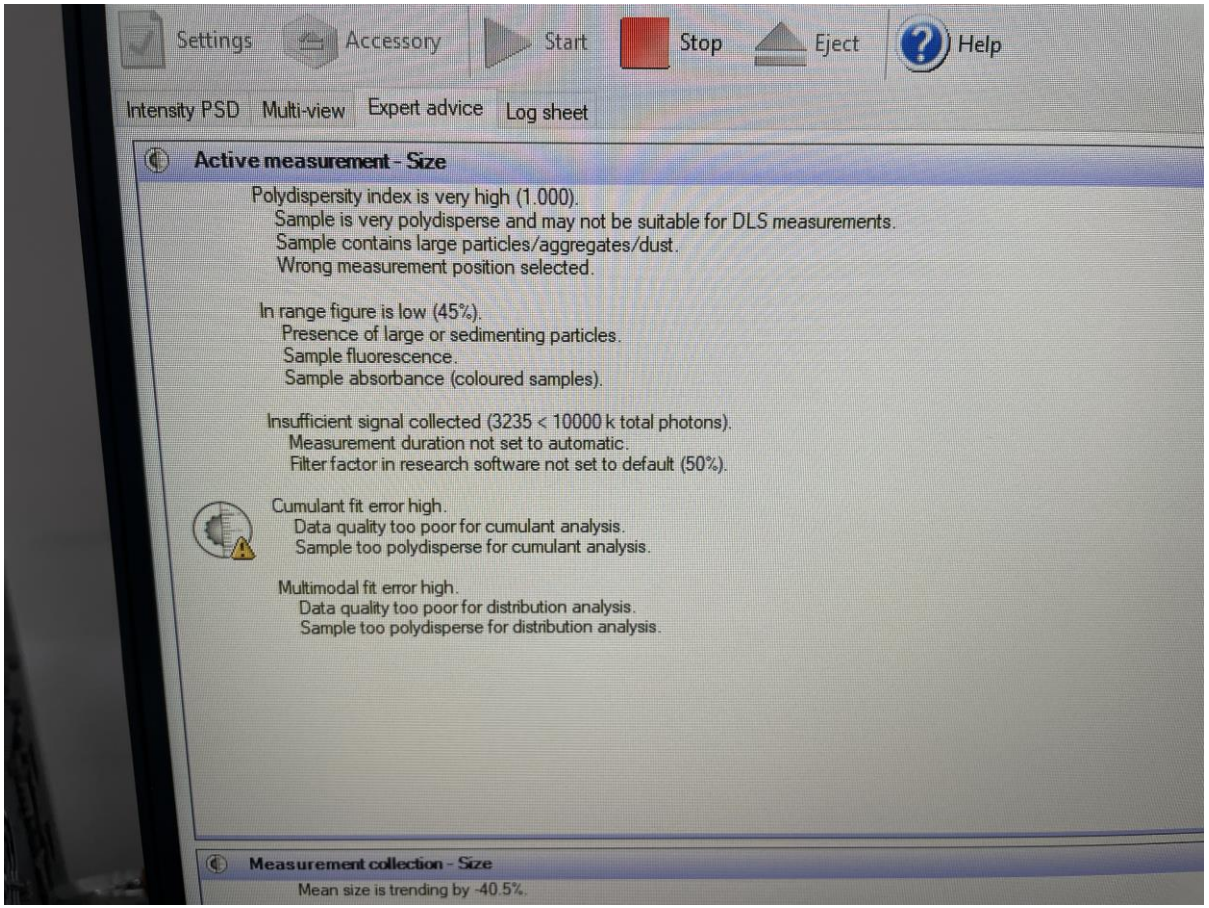
S obzirom da možemo da pratimo snimanje u realnom vremenu, to znači da već u toku DLS merenja posmatranjem samo neobrađenog signala i korelograma možemo da zaključimo da **rezultat neće biti dobar** jer se radi npr. o veoma polidisperznom uzorku, ili je koncentracija uzorka prevelika ili premala, ili uzorak apsorbuje, itd.
Primer lošeg korelograma zbog visoke polidisperznosti uzorka je prikazan levo. Ovakav rezultat odmah treba odbaciti kao **nepouzdan**! Desno je prikazan dobar korelogram.



Dobar korelogram



Naravno, mi ne moramo (i ako smo početnici nikako ne treba) sami da analiziramo pouzdanost merenja, jer će to računar svakako uraditi za nas. Kada se završi snimanje jednog uzorka može se otvoriti prozor „*Expert advice*“ gde ćemo dobiti kvalitativan opis merenja.
Niže je prikazan primer za uzorak koji **nije bio pogodan za DLS merenje**. I u takvom slučaju računar je dao sve rezultate merenja, ali mi te rezultate treba da odbacimo kao **nevalidne**. Drugim rečima, moramo biti vrlo oprezni sa tumačenjem rezultata DLS-a.



Faktori koji utiču na rezultat DLS merenja

Faktori koji utiču na DLS merenje zato što utiču na Braunovo kretanje su:

- **Jonska jačina rastvora**: brzina difuzije čestica zavisi od debljine električnog dvosloja (tzv. Debyeva dužina) – rastvori sa malom jonskom jačinom (niska provodljivost) stvaraju veći dvosloj jona oko čestice i tako smanjuju brzinu difuzije, čime se dobija lažno veća vrednost hidrodinamičkog radijusa (R_h).

- **Površina čestice**: ako je nešto adsorbovano na površini čestice tako da na neki način „štrči“ ovo će takođe smanjiti brzinu difuzije i dati lažno veću vrednost R_h.

- **Oblik čestice**: nesferne čestice se u DLS merenju tretiraju kao da su sferne, tako da se u tom slučaju uvek dobija aproksimirana vrednosti R_h.

Indeks polidisperznosti (PdI)

Disperznost je mera heterogenosti smeše, govori o zastupljenosti različitih veličina čestica u smeši.
Veličina kojom se kvantifikuje disperznost uzorka je indeks polidisperznosti (PdI):

$\mathbf{PdI < 0,1}$ **monodisperzan uzorak (sadrži čestice iste veličine)**

$\mathbf{0,1 < PdI < 0,5}$ **uzorak srednje polidisperznosti**

$\mathbf{PdI > 0,7}$ **veoma polidisperzan uzorak**

PdI je jedan od rezultata koji se dobija iz DSL merenja. Ukoliko je dobijen $\mathrm{PdI} > 0{,}7$ treba obavezno ponoviti merenje, promeniti dispersant, razblaženje itd. Ukoliko se PdI nije smanjio, treba znati da dobijeni rezultat za veličinu čestice nije pouzdan.

Opis DLS merenja

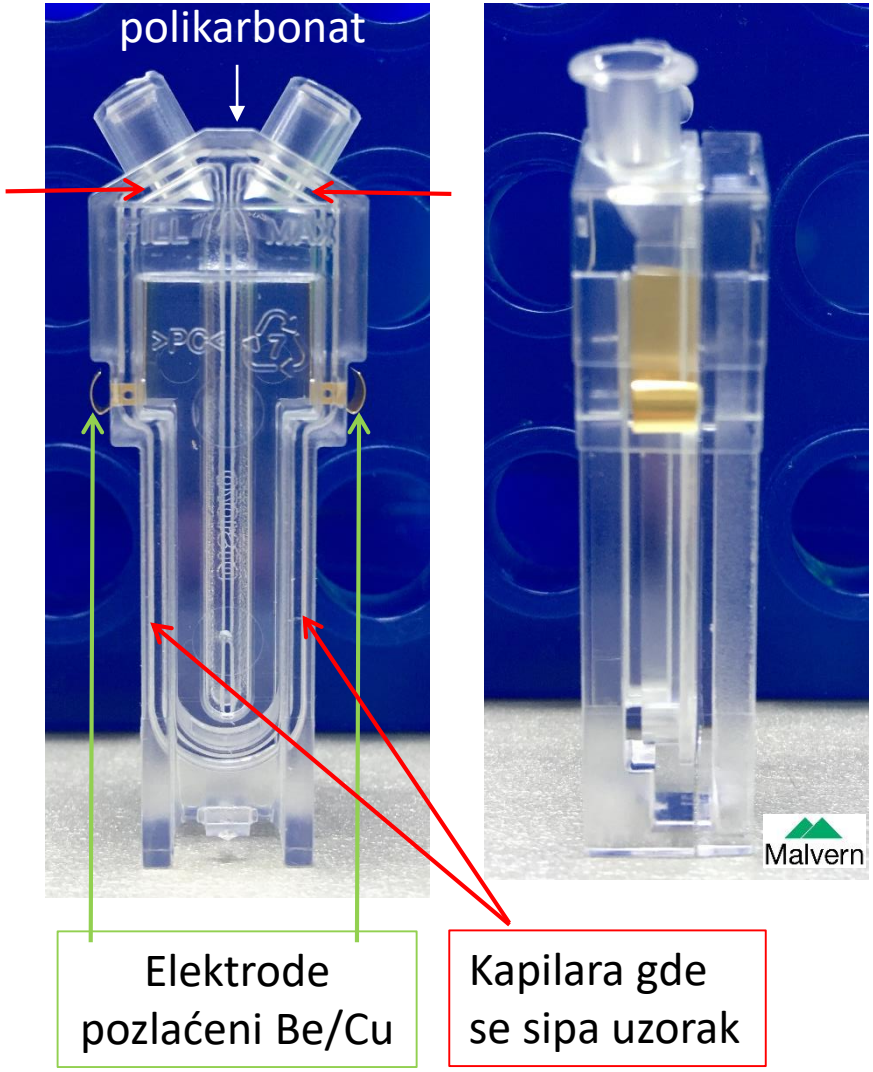
Žuta strelica pokazuje mesto gde se stavlja kiveta sa uzorkom. Snimanje je veoma jednostavno, potrebno je zadati nekoliko parametera i pritisnuti *Enter* na tastaturi.

Kiveta za određivanje veličine čestica

Istih je dimenzija kao kiveta za UV/vis spektrofotometriju.

Zapremina uzorka treba da bude oko 800 – 900 μL. U delu gde se postavlja kiveta postoje oznake za min i max dozvoljenu zapreminu.

Kiveta za određivanje zeta potencijala



Za svaki uzorak je potrebno uneti sledeće parametre:

„Sample“

Material (odnosi se na sastav dispergovanih čestica):

RI - indeks prelamanja (refrakcije)

Absorption – apsorpcija na λ=633 nm

Materijali	RI	Apsorpcija
Fosfolipidi	1.45	0.001
Proteini	1.45	0.001
Polistiren	1.59	0.01
Zlato	0.20	3.32
Platina	2.32	4.16

Dispersant (za vodu su date vrednosti niže):

Temperatura: 25 °C

Viskoznost: 0.8872 cP (0.00088 Pa·s)

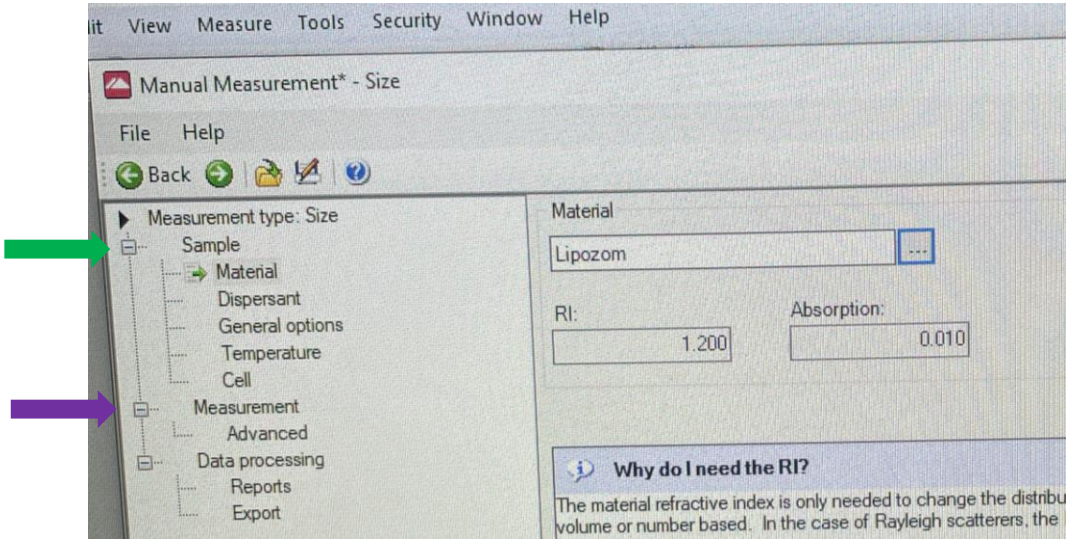
RI = 1.330

Temperature:

25 °C, vreme ekvilibracije 120 s

Cell:

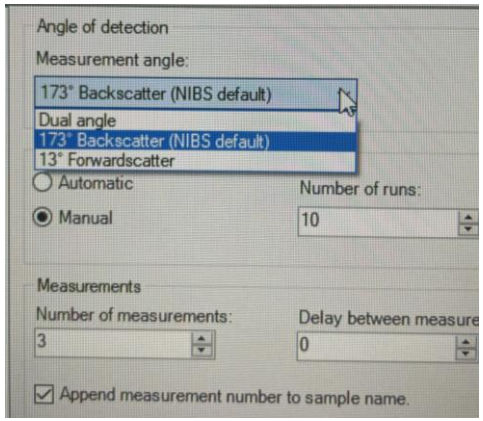
DTS0012



„Measurement“

Izabrati

- ugao detekcije (obično 173°)
- broj merenja (obično 3)
- broj snimanja u okviru jednog merenja (obično 10)



Interpretacija rezultata

Rezultati koji se dobijaju na kraju DLS merenja su:

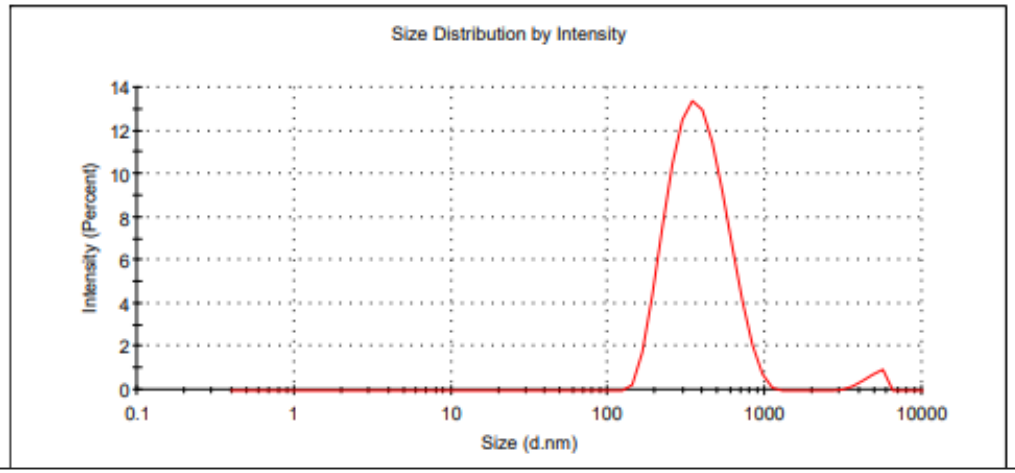
1. Intenzitetski procenjena raspodela veličina čestica – to je grafički prikaz raspodele veličina čestica (oznaka „d“ se odnosi na dijametar, izražen u *nm*) sa odgovarajućim intenzitetima rasejane svetlosti (izraženim u %).
Iz ove raspodele su izračunati:

2. Z-Average (d.nm) – srednja vrednost hidrodinamičkog dijametra čestice.

3. PdI – indeks polidisperznosti uzorka.

Results

			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	352.8	Peak 1:	395.9	97.6	161.4
PdI:	0.209	Peak 2:	4842	2.4	704.3
Intercept:	0.922	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



Iz intenzitetski procenjene raspodele veličina, računar može da preračuna još dve vrste raspodela veličina (zato smo unosili vrednosti za indeks prelamanja čestica u disperziji i apsorpciju na datoj talasnoj dužini), to su **zapreminski procenjena raspodela veličina čestica** i **brojčano procenjena raspodela veličina čestica**.
Ovi grafici će biti malo drugačiji od prvog (videti str. 24), ali će vrednosti **Z-Average i PdI** biti iste u sva tri slučaja jer su izračunate iz intenzitetski procenjene raspodele. Zato su **Z-Average i PdI** jedine dve vrednosti koje je smisleno prikazati kao **rezultate DLS merenja**.

Definicija:

Z-Average (**Z_{avg}**) je srednja vrednost hidrodinamičkog dijametra čestica izračunata iz intenzitetski procenjene raspodele veličina čestica.

Z_{avg} predstavlja prosečnu veličinu čestica u disperziji.

Obratiti pažnju da je **Z_{avg}** dijametar (prečnik) čestice, dok je **R_h** izračunat iz *Stokes-Einstein*-ove jednačine radijus (poluprečnik) čestice.

Na slici je prikazana intenzitetski procenjena raspodela veličina čestica za uzorak komercijalno dostupnog mleka sa 1,5% mlečne masti (mleko je koloid, sadrži čestice koje se sastoje od lipida i proteina dispergovane u vodi).

Možemo da uočimo da je uzorak pogodan za DLS merenje jer za „*Results quality*“ piše „*Good*“ što znači da je uzorak zadovoljio kriterijume merenja.

Nas interesuju dve vrednosti:

Z-Average: **352,8 nm**
PdI: **0,209**

Iz ovih rezultata možemo da zaključimo da je veličina dispergovanih čestica u mleku oko 350 nm i da je proizvođač dobro izvršio proces homogenizacije mleka jer se PdI nalazi u opsegu 0,1 < PdI < 0,5 (uzorak je niske srednje polidisperznosti).

Size Distribution Report by Intensity
v2.2

Malvern

Sample Details

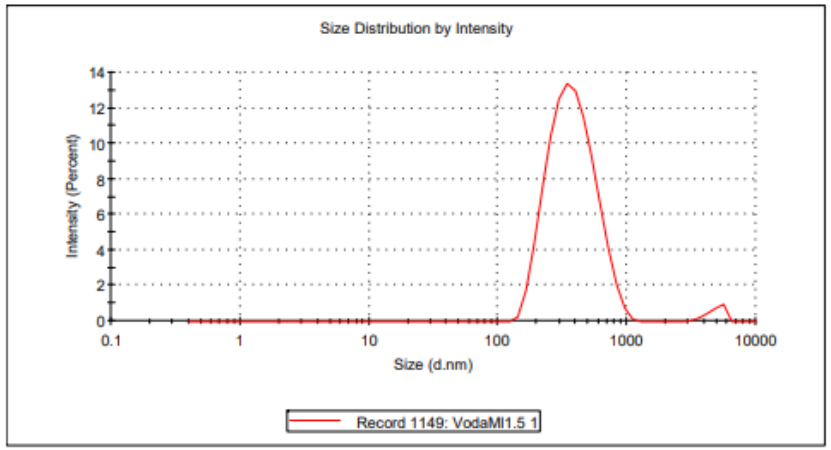
Sample Name:	VodaMl1.5 1		
SOP Name:	mansettings.nano		
General Notes:			
File Name:	AnaPB.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	1149	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.20	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.010	**Measurement Date and Time:**	Thursday, October 5, 2023 ...

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	50
Count Rate (kcps):	356.4	**Measurement Position (mm):**	0.45
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	352.8	**Peak 1:**	395.9	97.6	161.4
PdI:	0.209	**Peak 2:**	4842	2.4	704.3
Intercept:	0.922	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



Za isto merenje su prikazane **zapreminski (levo) i brojčano (desno)** procenjene raspodele veličina čestica. Vidi se da su, naravno, **Z_{avg} i PdI** isti kao kod intenzitetske, ali da su raspodele malo drugačije centrirane (oko drugačije srednje vrednosti dijametra). Takođe se mogu uočiti različiti doprinosi rasejanju, zbog prethodno pomenute zavisnosti $I \sim d^6$, kao i $V \sim r^3$(ovo je objašnjeno na hipotetičkom primeru na sledećoj strani).

Size Distribution Report by Volume
v2.2

Malvern

Sample Details

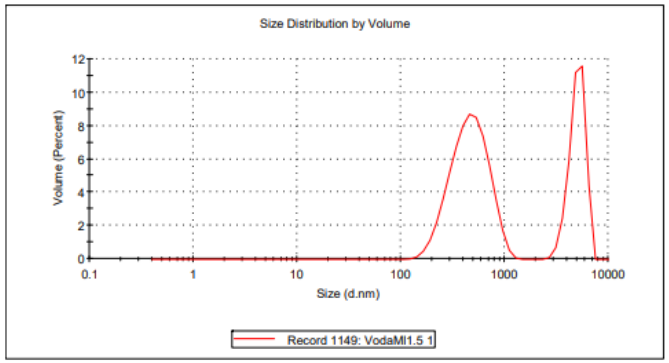
Sample Name:	VodaMI1.5 1		
SOP Name:	mansettings.nano		
General Notes:			
File Name:	AnaPB.dts	Dispersant Name:	Water
Record Number:	1149	Dispersant RI:	1.330
Material RI:	1.20	Viscosity (cP):	0.8872
Material Absorbtion:	0.010	Measurement Date and Time:	Thursday, October 5, 202...

System

Temperature (°C):	25.0	Duration Used (s):	50
Count Rate (kcps):	356.4	Measurement Position (mm):	0.45
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	Attenuator:	2

Results

			Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm):	352.8	Peak 1:	487.7	63.7	193.9
PdI:	0.209	Peak 2:	5014	36.3	839.8
Intercept:	0.922	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



Size Distribution Report by Number
v2.2

Malvern

Sample Details

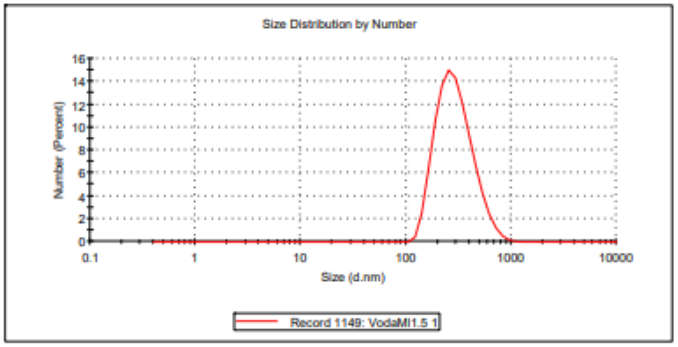
Sample Name:	VodaMI1.5 1		
SOP Name:	mansettings.nano		
General Notes:			
File Name:	AnaPB.dts	Dispersant Name:	Water
Record Number:	1149	Dispersant RI:	1.330
Material RI:	1.20	Viscosity (cP):	0.8872
Material Absorbtion:	0.010	Measurement Date and Time:	Thursday, October 5, 2023 ...

System

Temperature (°C):	25.0	Duration Used (s):	50
Count Rate (kcps):	356.4	Measurement Position (mm):	0.45
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	Attenuator:	2

Results

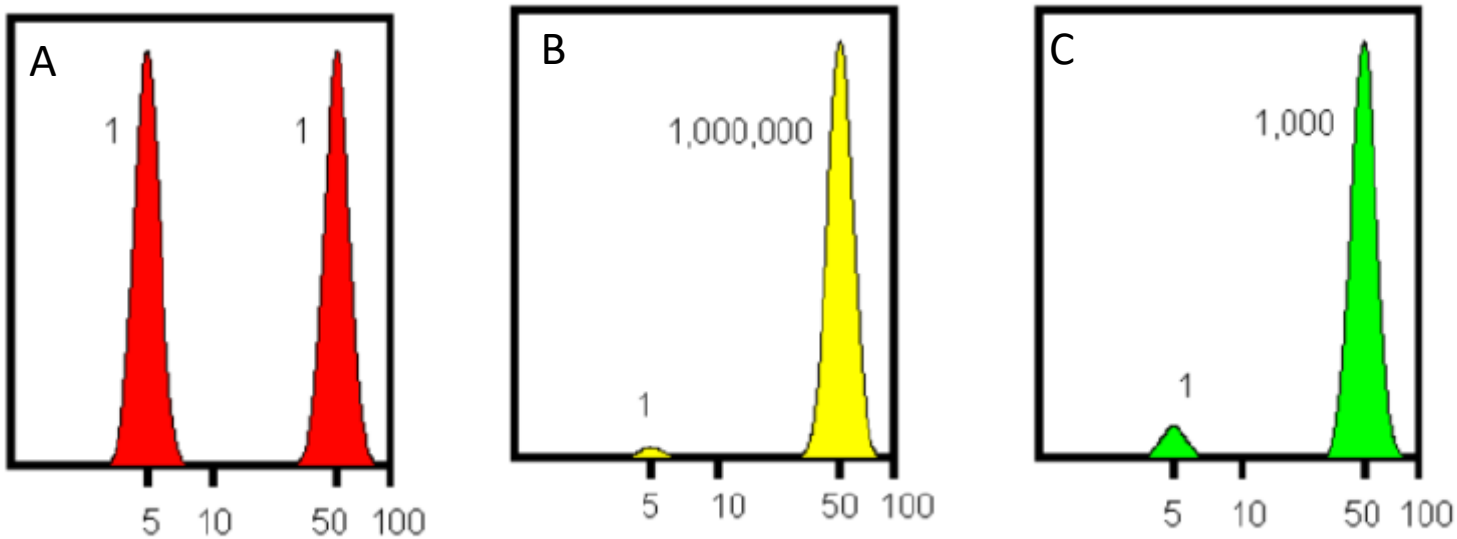
			Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	352.8	Peak 1:	308.7	100.0	128.8
PdI:	0.209	Peak 2:	4681	0.0	904.8
Intercept:	0.922	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



Poređenje „pikova“ u brojčano, intenzitetski i zapreminski procenjenim raspodelama veličina čestica:

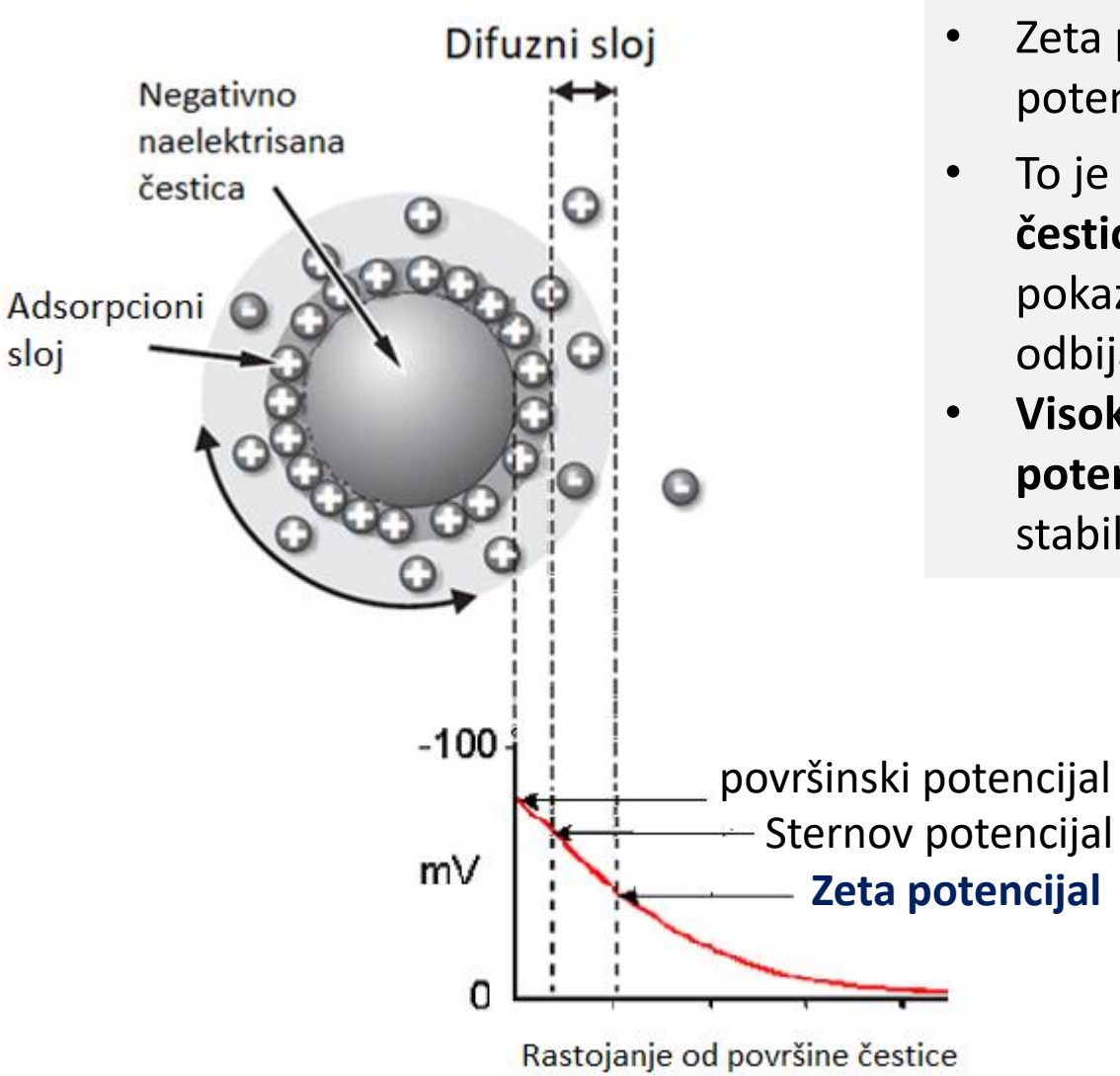
Hipotetički primer: u uzorku se nalazi smeša koja sadrži **jednak broj** čestica od 5 nm i čestica od 50 nm.

1. Kod **brojčano** procenjene raspodele veličina čestica (slika A) pikovi će biti jednaki jer je u uzorku prisutan jednak broj manjih (5 nm) i većih (50 nm) čestica.
2. Kod **intenzitetski** procenjene raspodele veličina (slika B), pik koji se pojavljuje na 50 nm će biti 10^6 puta veći od pika na 5 nm zbog zavisnosti $I \sim d^6$, tj. činjenice da čestice od 50 nm rasejavaju 10^6 puta više zračenja od čestica dijametra 5 nm.
3. Kod **zapreminski** procenjene raspodele veličina (slika C), pik koji se pojavljuje na 50 nm će biti 10^3 puta veći od pika na 5 nm zbog zavisnosti $V \sim r^3$ ($V_{sfere} = \frac{4}{3}\pi r^3$).



brojčano intenzitetski zapreminski

Zeta potencijal (ζ potencijal)



- Zeta potencijal je elektrokinetički potencijal na površini koloidne čestice.
- To je parametar **stabilnosti koloidnih čestica** – vrednost zeta potencijala pokazuje stepen elektrostatičkog odbijanja između koloidnih čestica.
- **Visoka apsolutna vrednost zeta potencijala** znači da su čestice stabilne i da neće doći do agregacije.

Stabilnost čestica zavisi od apsolutne vrednosti zeta potencijala. Predznak plus ili minus pokazuje da li je površinsko naelektrisanje čestice pozitivno ili negativno.

Zeta potencijal (mV)	Stabilnost čestica
0 do $\lvert \pm 5 \rvert$	Koagulacija ili flokulacija*
$\lvert \pm 10 \rvert$ do $\lvert \pm 30 \rvert$	Nestabilnost
$\lvert \pm 30 \rvert$ do $\lvert \pm 40 \rvert$	Srednja stabilnost
$\lvert \pm 40 \rvert$ do $\lvert \pm 60 \rvert$	Dobra stabilnost
$> \lvert \pm 60 \rvert$	Odlična stabilnost

*Koagulacija je proces u kom dolazi do agregacije čestica zbog odsustva elektrostatičkog odbijanja (agregacija na molekulskoj/nanoskopskoj skali). Flokulacija je proces koji se dešava nakon koagulacije u kom nastaju veći agregati koji se talože i mogu biti vidljivi golim okom (agregacija na mikroskopskoj/makroskopskoj skali).

Zeta potencijal (ζ) zavisi od pH, koncentracije jona (jonske jačine), tipa jona, prisustva surfaktanata itd.

Na izoelektričnoj tački (pI) je $\zeta \approx 0$, tada čestice lako prave agregate jer nema elektrostatičkog odbijanja između njih.
Na pH $<$ pI, ζ je pozitivan, na pH $>$ pI, ζ je negativan.

DLS meri zeta potencijal tako što određuje brzinu kretanja naelektrisanih čestica u električnom polju.

Brzina čestice u električnom polju se naziva **elektroforetska mobilnost** i zavisi od zeta potencijala:

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

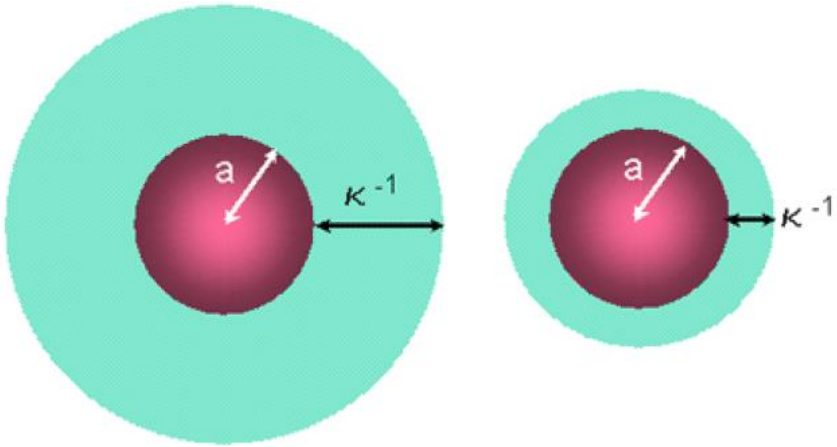
Podsećanje: jednačina za elektroforezu

$$u_E = \frac{v}{E} = \frac{z}{6\,\pi\,\eta\,r}$$

u_E – elektroforetska mobilnost, ε – dielektrična konstanta, ζ – zeta potencijal, f(κa) – Henrijeva funkcija, η – viskoznost.

<u>Henrijeva funkcija</u>: parametar κ je Debyeva dužina, odnosno κ^{-1} je mera „debljine“ električnog dvosloja; parametar a je radijus čestice, tako da funkcija κa meri odnos radijusa čestice i debljine dvosloja.

Za nepolarne rastvarače i male čestice,
f(κa) = 1,0
(Huckel aproksimacija)



Za polarne rastvarače i čestice ~ 0,2 μm,
f(κa) = 1,5 (Smoluchowski aproksimacija)

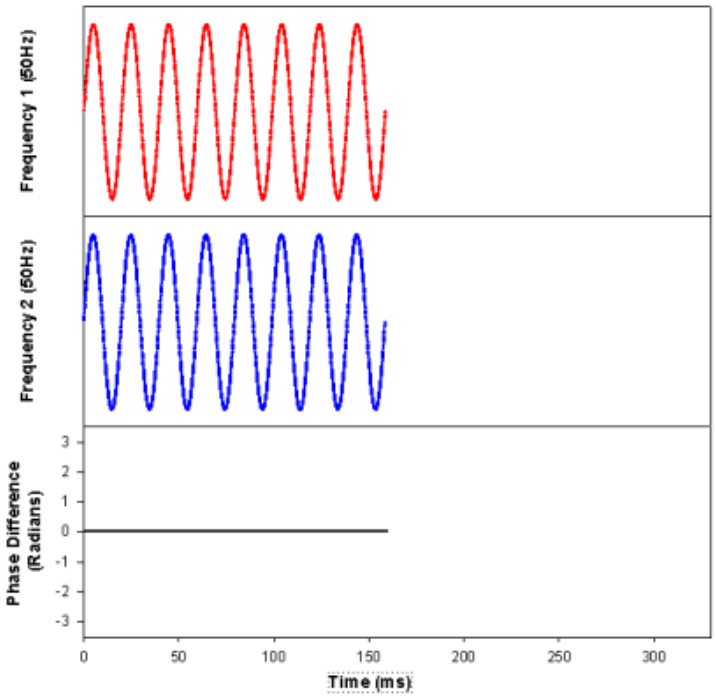
Opis merenja zeta potencijala

Procedura za merenje i procesiranje signala se naziva *Phase Analysis Light Scattering* (PALS) - određuje se fazni pomeraj koji je proporcionalan promeni pozicije čestice.

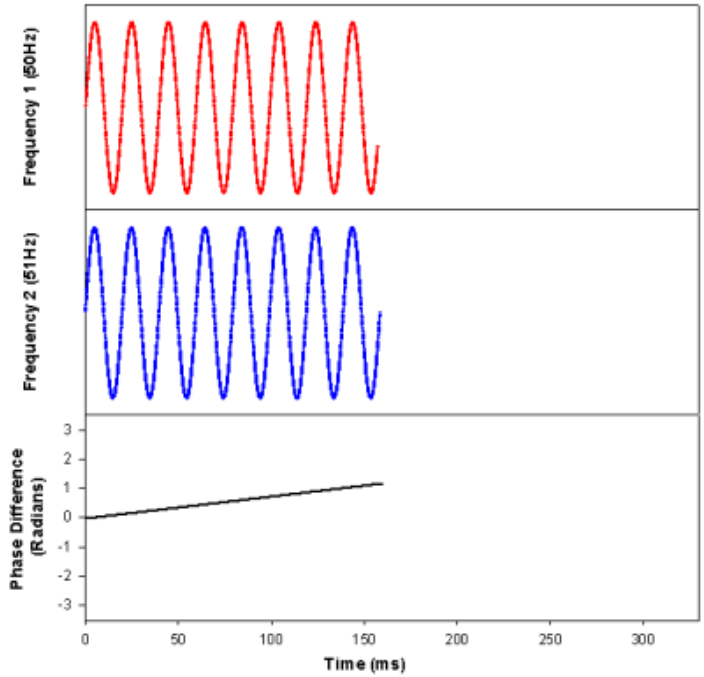
Lasersko zračenje se deli u delitelju snopa/separatrisi (*beam splitter*); deo prolazi kroz uzorak, a deo predstavlja referentni zrak. Deo koji prolazi kroz uzorak (kroz centar kivete) se rasejava na česticama, rasejano zračenje se detektuje na detektoru koji se nalazi ispred kivete, pod 13° u odnosu na upadni zrak (primetiti da se ovde ne koristi „*backscatter*“ detektor (173°) koji je tipičan izbor kada se određuje veličina čestice).

Kad se primeni električno polje, čestice koje se kreću unutar kapilare u kiveti će dovesti do fluktuacija u intenzitetu rasejanog zračenja sa frekvencijom koja je proporcionalna brzini čestice. Odatle računar određuje prvo elektroforetsku mobilnost a onda zeta potencijal.
Meri se fazna razlika između referentne frekvencije i frekvencije zračenja koje dolazi iz uzorka.

Da bi lakše razumeli šta znači „meri se fazna razlika“, na sledećem strani je prikazan primer u kom postoje dva signala sa istom frekvencijom od 50 Hz, i ako crtamo faznu razliku izmedju ova dva signala u funkciji vremena, dobićemo horizontalnu liniju (prava bez nagiba) jer nema razlike. Ali ako je jedna frekvencija 50 Hz, a druga 51 Hz, onda će grafik zavisnosti fazne razlike od vremena biti prava sa nagibom (gradijentom).



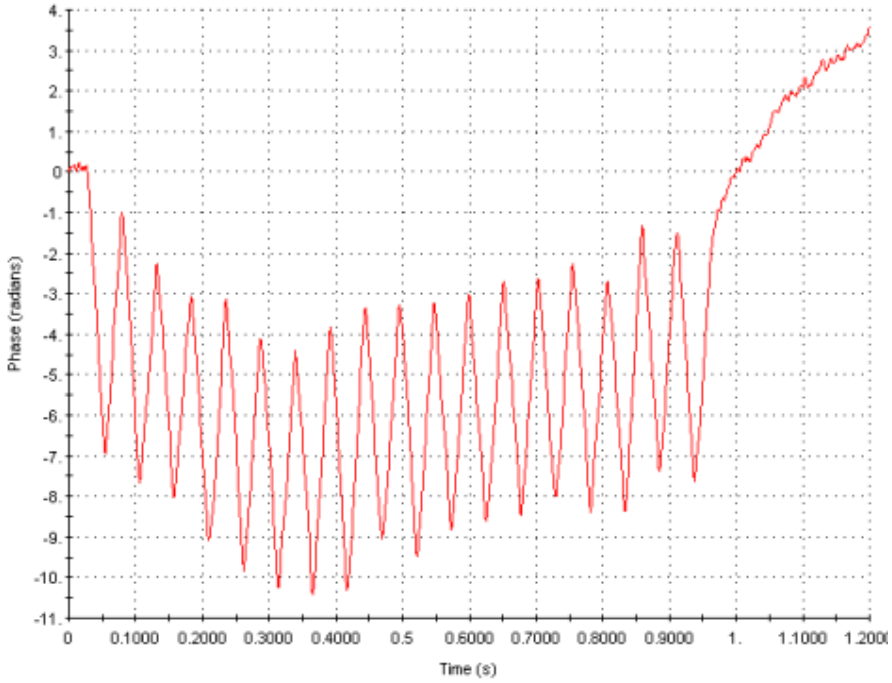
Fazna razlika između dva signala koji imaju istu frekvenciju (50 Hz)

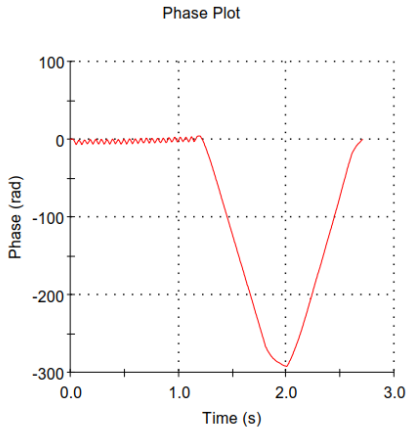


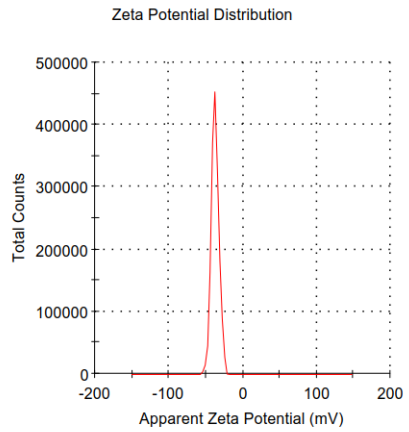
Fazna razlika između dva signala koji imaju različite frekvencije (50 i 51 Hz)

U DLS merenju postoji fazna razlika i detektovaće se nešto što nije horizontalna linija. Primer signala je prikazan niže. U toku merenja, primenjeni napon se menja, tj. polaritet se menja, tako da se čestice pomeraju na jednu pa na drugu stranu u kiveti, a zbog toga se dobijaju pozitivni i negativni nagibi, i na kraju se računa srednja vrednost.

Neobrađen signal koji se dobija prilikom merenja zeta potencijala – promena faze u vremenu (brzina promene fazne razlike zavisi od <u>brzine kojom se čestica kreće</u>):





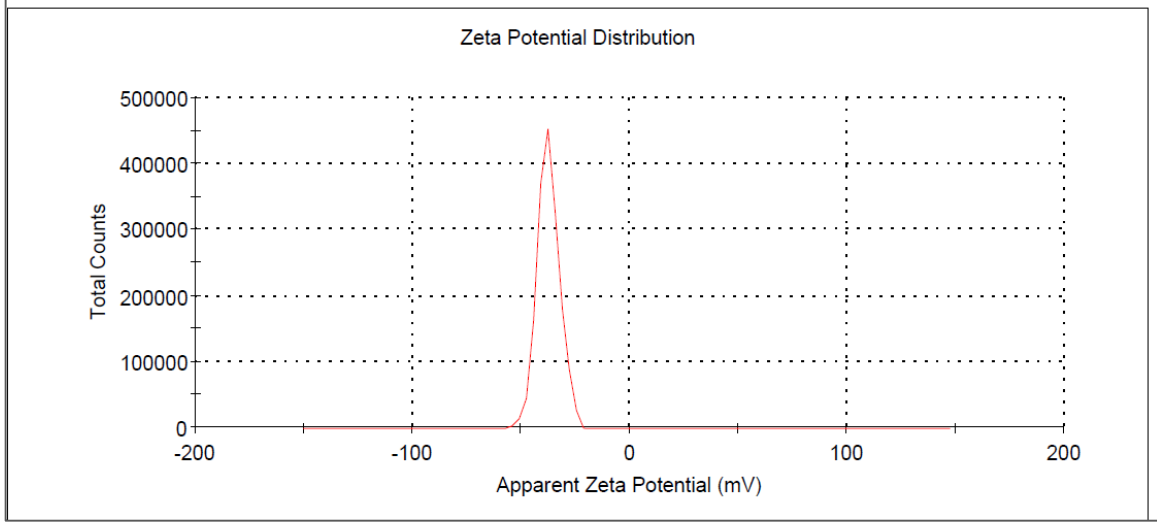


Konačan rezultat merenja zeta potencijala

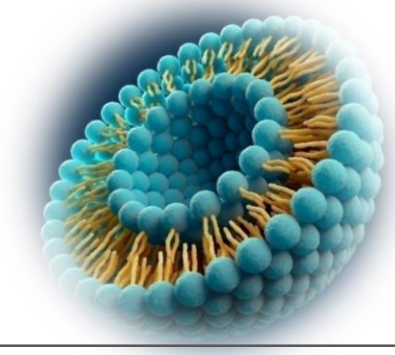
Niže je prikazan rezultat merenja zeta potencijala unilamelarnih fosfolipidnih lipozoma veličine 120 nm u vodi.

Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-37.4	Peak 1:	-37.4	100.0	5.14
Zeta Deviation (mV):	5.14	Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm):	0.348	Peak 3:	0.00	0.0	0.00
Result quality :	Good				

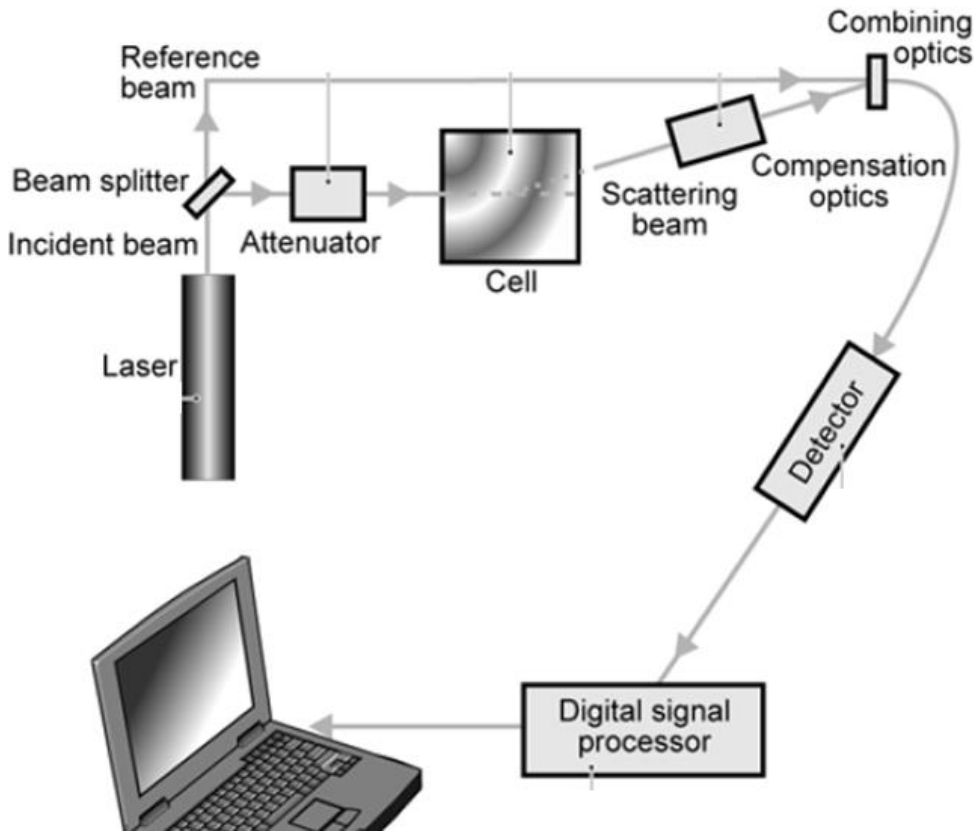


Podsetimo se da su **lipozomi** koncentrične koloidne čestice koje se sastoje od lipidnog dvosloja koji okružuje centralni deo ispunjen vodom (ili drugom polarnom supstancijom).



Vidimo da vrednost Zeta potencijala iznosi **-37,4 mV** sa standardnom devijacijom od 5,14 mV. Na osnovu ovog rezultata možemo da zaključimo da su lipozomi **srednje stabilni** u ovoj suspenziji i da imaju **negativno** površinsko naelektrisanje.
Kao i kod određivanja veličine čestica, i ovde možemo da uočimo da je uzorak zadovoljio kriterijume za DLS merenje jer za „*Results quality*“ piše „*Good*“.

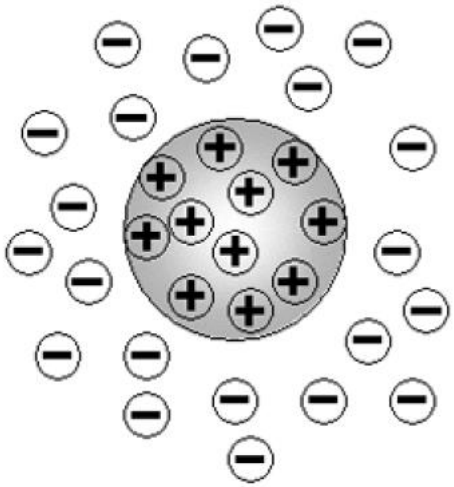
Shematski prikaz optike za merenje zeta potencijala u uređaju ***Malvern Zetasizer Nano.***



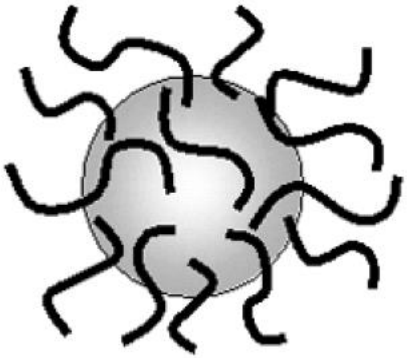
https://www.malvernpanalytical.com/

Stabilizacija čestica - *coating*

Ovo nema veze sa DLS-om ali kad već govorimo o stabilnosti koloidnih čestica treba napomenuti da pored **elektrostatičke stabilizacije**, koja je određena zeta potencijalom, koloidne čestice mogu da budu i **sterno stabilizovane**, tako što se za površinu čestice adsorbuju polimeri koji ne daju česticama da priđu blizu, tj. na rastojanje gde bi *van der Waals*-e sile dovele do agregacije.
Ovaj površinski sloj polimera se naziva ***coating*** (prevlaka).



elektrostatička stabilizacija



sterna stabilizacija