

Zetasizer Pro Red Lab

Dipartimento di Chimica - EX SCIENZE FARMACEUTICHE (Stanza 147, Ed.305)

Dynamic Light Scattering (DLS). Il DLS chiamato anche PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o QELS (Quasi-Elastic Light Scattering) è una tecnica largamente utilizzata per la misura della dimensione di oggetti aventi dimensione tipicamente $< \mu\text{m}$. Nelle misure DLS il campione viene irradiato con una luce monocromatica e coerente come quella di un laser in modo da avere una fluttuazione nel tempo dell'intensità della luce diffusa, causata dai moti browniani degli oggetti dispersi in soluzione. L'auto-correlatore mette in relazione le fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa con il tempo (ns- μs). L'intensità "scatterata" dipende dalla differenza di indice di rifrazione tra il materiale e il solvente e dalle dimensioni degli oggetti. A parità di materiale oggetti grandi "scatterano" più luce, si muovono lentamente e di conseguenza l'intensità diminuisce lentamente con il tempo (si dice che la funzione è correlata). La fluttuazione dell'intensità è convertita in diametro delle particelle attraverso l'equazione di Stokes-Einstein. Rif.: *Berna e Pecora 1976; Biophys Rev (2016) 8:409–427.*

Zetasizer Ultra Instrument Components

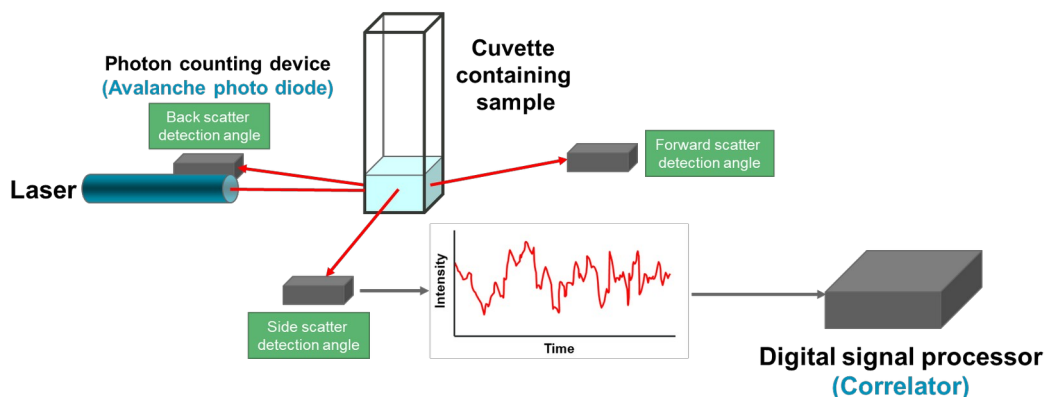


Figura 1: Schema Componenti Zetasizer Ultra.

Mobilità Elettroforetica. La maggior parte dei colloidi dispersi in acqua presenta una carica superficiale, dovuta a fenomeni di ionizzazione o assorbimento di specie cariche. Le particelle cariche sono circondate in soluzione da diversi strati ionici, la cui composizione risulta diversa da quella del bulk. Quando si muovono in soluzione (movimento Browniano ad esempio) le particelle si spostano insieme ad un doppio strato ionico, chiamato potenziale zeta o anche piano di scivolamento (slipping plane). Il potenziale zeta risulta essere la forza principale delle interazioni tra le particelle, ed è molto sensibile alla composizione delle specie cariche nella dispersione. L'Electrophoretic Light Scattering misura la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido, ed è direttamente proporzionale al potenziale zeta, come descritto dall'equazione di Henry. Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle, si applica un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura con il campione ed illuminata dal laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica. Per le nanoparticelle, il valore del potenziale zeta consente di predire la loro stabilità. Rif: *R.J. Hunter, 2013 Zeta potential in colloid science: principles and applications.*



Accensione Strumento.

- 1- Accendere il PC.
- 2- Avviare il software Zetasizer Nano facendo **doppio clic sull'icona. Password = DLS**
- 3- Accendere lo strumento tramite l'interruttore di alimentazione posto sul retro dell'unità (si udirà un "bip" per indicare l'accensione dello strumento e l'inizio della routine di inizializzazione, seguito da un secondo "bip" al termine della routine. Altri due segnali acustici indicano che lo strumento ha raggiunto la temperatura "predefinita" di 25°C). **Attendere 15-30 minuti affinché il laser si stabilizzi.**
- 4- Controllare che non ci siano campioni all'interno dello strumento.
- 5- **Evitare di accendere e spegnere lo strumento dopo ogni utilizzo.**
- 6- **È obbligatorio prenotarsi prima di utilizzare lo strumento.** Controllare sempre sul calendario **lo strumento PC e spegnere la ciabatta che si trova dietro il PC, dove sono collegati DLS, PC e Schermo.**
- 7- Controllare sempre che l'UPS sia funzionante

Software e Misura

- Doppio click sull'icona ZS XPLOERER sul desktop;
- Selezionare Measure
- Creare un progetto con il nome: **RADR** (=Intestatario dei fondi)_**Cognome Utente_XX** (=numeri crescenti, nel caso in cui si hanno diversi progetti). Ulteriori dettagli verranno spiegati durante il training. Per qualsiasi dubbio, fare sempre riferimento ai manuali dello strumento e al referente tecnico. Oppure richiamare un progetto esistente.
- Il progetto va esportato e salvato nella cartella **Measurements Data** (collegamento sul desktop). **È severamente vietato salvare dati e/o cartelle sul desktop. I dati verranno cancellati annualmente.** Il PC è collegato alla rete, quindi potete esportare i raw data. il programma di analisi è scaricabile dal sito Malvern previa registrazione.
- **Setting della Misura.** Lo strumento in automatico sceglie le condizioni migliori di misura. **Si consiglia di non cambiare i parametri. Nel caso in cui dovesse esserci l'esigenza di effettuare misure in manual mode dovete contattare il referente tecnico.** Lo strumento lavora in backscattering per minimizzare multiple scattering e avere una misura più attendibile degli oggetti di piccole dimensioni. Può anche lavorare in forward scattering (per oggetti grandi). **NON MODIFICARE QUESTA CONDIZIONE SENZA AVVISARE IL REFERENTE TECNICO e/o SCIENTIFICO.** NEL CASO IN CUI CAMBIATE LE CONDIZIONI RICORDATEVI DI RIPRISTINARE IL BACKSCATTERING. Rif: *Manual Zetasizer Ultra Pro User Guide, Capitolo 5.*

Preparazione del campione e Suggestimenti. Per analisi delle dimensioni delle particelle utilizzare le cuvette in plastica o quarzo. Le specifiche delle cuvette sono riportate nel manuale Zetasizer Ultra Pro, User Guide, Cell Selection, pagina 50. **!!!Solventi organici quali acetone etc. non vanno utilizzati nelle cuvette in plastica.**

La polvere è uno dei problemi principali nelle misure DLS e può falsare i risultati ottenuti. Si consiglia di filtrare i campioni prima della misura. Per evitare contaminazione da polvere durante la diluizione, il buffer deve essere filtrato. Se si utilizzano filtri a siringa per il buffer/solvente, bagnare bene il filtro e scartare le prime gocce della soluzione.

- La concentrazione del campione da utilizzare dipende dall'intensità di scattering del campione. Ogni tipo di campione ha un proprio intervallo di concentrazione ideale in cui effettuare le misure. Questo dovrebbe essere determinato attraverso una serie di misure di controllo, per garantire che le dimensioni ottenute siano indipendenti dalla concentrazione. Si consiglia sempre di controllare i conteggi (kcps) e la funzione di autocorrelazione. In base al risultato ottenuto si procede eventualmente con la diluizione. Evitare di misurare soluzioni opalescenti perché potrebbero dare luogo a *multiple scattering* e saturazione del segnale.

Dettagli e suggerimenti verranno forniti durante il training. Per qualsiasi dubbio contattare il referente tecnico.

- Per le misure di size utilizzare sempre cuvette di plastica nuove. A seconda del volume del campione potete utilizzare diverse tipologie di cuvette, riportate nello *Zetasizer Nano Accessories Manual*.
- Riempire la cuvetta o la cella con il campione preparato secondo le linee guida dello Zetasizer Nano per ogni tipo di misura (size e ζ -potenziale).

Misure Size: Per la misura di size le cuvette devono essere pulite con il solvente/buffer filtrato prima dell'uso. Riempire la cuvetta con un quantitativo di campione compreso tra 1,0 mL e 1,5 mL, inclinando la cuvetta e permettendo al campione di fluire lentamente (questa procedura evita la formazione di bolle).

- Verificare che l'altezza del campione sia compresa tra 10 e 15 mm posizionando la cuvetta contro il diagramma all'interno del coperchio dell'area della cuvetta, come mostrato in Figura 2a. La maggior parte delle cuvette ha un segno di triangolo o di punto, come mostrato di seguito. Questo segno deve essere rivolto verso la parte anteriore dello Zetasizer, Figura 2b

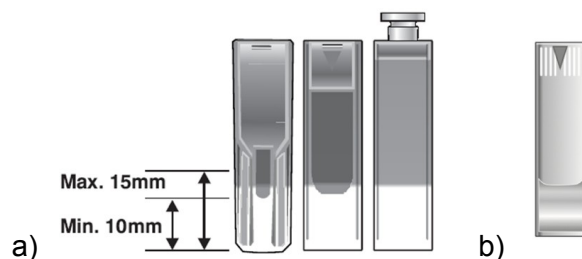


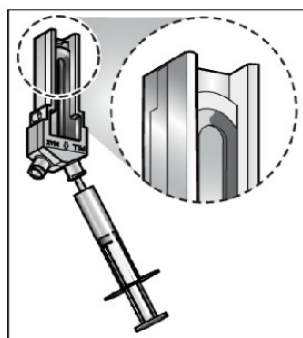
Figura 2 a) Volume minimo di campione per diverse cuvette. b) verso cuvetta.

- Chiudere sempre la cuvetta soprattutto se si fanno misure in funzione della Temperatura.
- Controllate sempre la compatibilità del buffer con la cuvetta di plastica nel dubbio usate la cuvetta in quarzo.

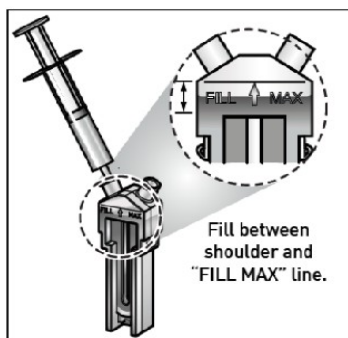
Lavorare in condizioni dust free. Evitare di utilizzare mai carta per asciugare/toccare le cuvette perché i pelucchi possono inficiare la misura.

Misure Z-Potential: Si consiglia di lavare la cella per garantire la pulizia e ridurre il rischio di formazione di bolle. La procedura consigliata richiede due siringhe, acqua deionizzata filtrata (DI) e etanolo. 1) Pulire la cella con etanolo per facilitare la bagnatura. 2) Riempire una delle siringhe con acqua DI e inserirla in una delle porte di campionamento della cella, mentre la siringa vuota viene inserita nell'altra porta. 3) Far scorrere il contenuto della siringa piena, attraverso il capillare, nella siringa vuota, quindi risciacquare. 4) Ripetere questo processo altre 4 volte prima di rimuovere le siringhe ed eseguire un lavaggio finale con il solvente utilizzato per la misurazione. A questo punto la cella è pronta per l'uso. Non tentare mai di pulire la superficie ottica della cella capillare ripiegata, ciò causerebbe piccoli graffi superficiali che darebbero risultati imprecisi. Riempire la cella in base al tipo di cella indicato di seguito, Figure 3.

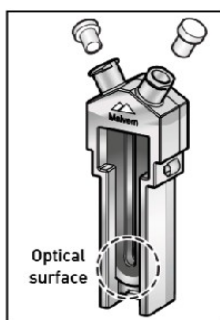
Dettagli sulla preparazione del campione, sulla concentrazione e setting dei parametri sono descritti nel manuale dello strumento *Zetasizer Ultra-Pro user guide english* e nella *Presentazione Zetasizer Pro and Ultra Customer Training Course Electrophoretic Light Scattering 2019*.



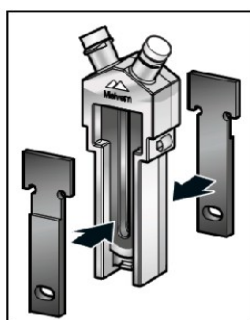
Invert the cell and slowly inject the sample from its syringe into the cell, filling the U tube to just over half way.



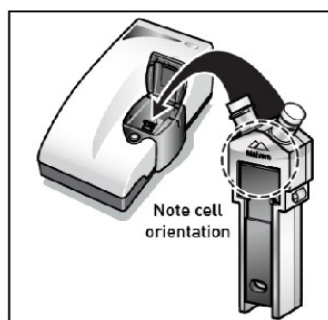
Check no air bubbles form in the cell - Tap the cell gently to dislodge any that form. Turn the cell upright and continue injecting slowly until the liquid reaches the fill area as shown. Remove syringe.



Fit one stopper firmly, the other one loosely, to avoid pressurisation of the cell. Remove any spillage from the electrodes.



Fit the thermal contact plates as shown. These are stored in the pull out cuvette holder, located under the instrument.



When inserting the cell, ensure that the Malvern logo faces towards the front of the instrument. Press down until the cell clicks into place. Before starting an experiment, ensure the software is set up to use the DIST100 cell.

Figure 3: Caricamento campione e posizionamento contatti termici nelle cuvette di potenziale zeta.

Procedura di spegnimento: 1) Spegner lo strumento; 2) Spegner il PC.

Manuali da leggere a disposizione dell'utente:

- 1- Presentazione Zetasizer Pro and Ultra Customer Training Course Electrophoretic Light Scattering 2019.
- 2- Presentazione Zetasizer Pro and Ultra DLS Customer Training Course 2019.
- 3- ZETASIZER ULTRA/PRO USER GUIDE.
- 4- ZETASIZER ADVANCE SERIES BASIC GUIDE.

Versione 1.0 Aprile 2024

Versione 1.1 Luglio 2024