

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA BUBNIČ ŠTURM

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA BUBNIČ ŠTURM

**UPORABA FOTONSKE KORELACIJSKE SPEKTROSKOPIJE
ZA ANALIZO VELIKOSTI KOLOIDNIH DELCEV**

**APPLICATION OF PHOTON CORRELATION
SPECTROSCOPY FOR ANALYSING THE SIZE OF
COLLOIDAL PARTICLES**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Odonu Planinška in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek.

Za strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge se najlepše zahvaljujem izr. prof. dr. Odonu Planinšku in asist. dr. Petri Kocbek kot tudi vsem sodelavcem Katedre za Farmaceutsko tehnologijo, ki so mi veliko pomagali.

Iskrena hvala staršem in mojemu možu Mitji, ki so mi omogočili študij in mi pomagali premagovati ovire, hvala tudi bratu Vojku in prijatelju Dragu za vzpodbude in pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Hvala prijateljem za vzpodbudne besede in drugačne poglede.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Odonu Planinška in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek.

Ljubljana, marec 2011

VSEBINA

VSEBINA	IV
POVZETEK.....	VII
1 UVOD.....	1
1.1 KOLOIDNE DISPERZIJE	1
1.2 RAZDELITEV KOLOIDOV.....	1
1.3 POMEN DOLOČANJA VELIKOSTI KOLOIDNIH DELCEV.....	5
1.4 METODE MERJENJA VELIKOSTI DELCEV	6
1.4.1 METODE, KI TEMELJIJO NA SIPANJU SVETLOBE.....	6
1.4.2 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	8
1.4.3 SEPARACIJSKE METODE	8
1.5 ZETASIZER NANO ZS	9
1.5.1 ZGRADBA ZETASIZERJA NANO ZS	9
1.5.2 PRINCIP DELOVANJA ZETASIZERJA NANO ZS	11
1.5.3 INTERPRETACIJA PODATKOV O IZMERJENEM NIHANJU INTENZITETE SIPANJA SVETLOBE.....	12
1.5.4 UPORABA KORELACIJSKE FUNKCIJE	12
1.5.5 INTENZITETNA, ŠTEVILČNA IN VOLUMSKA DISTRIBUCIJA	13
1.5.6 KUMULANTNA ANALIZA – DOLOČITEV POVPREČNEGA PREMERA IN POLIDISPERZNEGA INDEKSA.....	14
1.5.7 DISTRIBUCIJSKA ANALIZA.....	14
1.5.8 PRIPRAVA VZORCA.....	14
1.6 INTERPRETACIJA PODATKOV	17
1.6.1 »SIZE QUALITY REPORT«.....	18
1.6.2 PONOVLJIVOST SIPANJA.....	22
1.6.3 KORELOGRAM.....	23
2 NAMEN DELA	24
3 EKSPERIMENTALNO DELO	25
3.1 MATERIALI.....	25

3.2	APARATURE	26
3.3	METODE.....	27
3.3.1	PRIPRAVA DESTILIRANE IN BIDEŠTILIRANE VODE TER ANALIZA KVALITETE VODE S FOTONSKO KORELACIJSKO SPEKTROSKOPIJO.....	27
3.3.2	PRIPRAVA DISPERZIJE NANODELCEV BARIJEVEGA SULFATA IN TITANOVEGA DIOKSIDA.....	27
3.3.3	PRIPRAVA RAZTOPINE SDS.....	28
3.3.4	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM).....	29
3.3.5	MERJENJE POVPREČNE VELIKOSTI DELCEV IN MICELOV.....	29
3.3.6	ANALIZA REZULTATOV MERITEV.....	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1	ANALIZA KAKOVOSTI VODE, KI JO V MERITVAH UPORABIMO KOT DISPERZNI MEDIJ.....	31
4.2	DOLOČANJE VELIKOSTI NANODELCEV.....	32
4.2.1	ANALIZA VELIKOSTI DELCEV BARIJEVEGA SULFATA IN TITANOVEGA DIOKSIDA V SUHI OBLIKI Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM (SEM).....	32
4.2.2	IZGLED DISPERZIJE NANODELCEV.....	32
4.2.4	VELIKOST DELCEV BARIJEVEGA SULFATA V DISPERZIJAH S 96 % ETANOLOM....	40
4.2.5	KRITIČEN PRISTOP K INTERPRETACIJI REZULTATOV.....	43
4.2.6	VELIKOSTI DELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA V VODNIH DISPERZIJAH.....	44
4.3	VELIKOSTI MICELOV IN OCENA KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE	50
4.3.1	VELIKOSTI MICELOV NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (SDS) V VODI.....	50
5	ZAKLJUČEK.....	60
6	LITERATURA.....	64
7	PRILOGA.....	67

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM – mikroskopija na atomsko silo

CMC – kritična micelarna koncentracija

DLS – dinamično sipanje laserske svetlobe

DTAB – dodeciltrimetilamonijev bromid

EPR – angl. »enhanced permeability and retention«

FFF – ang. »Field Flow Fractionation«

kcps – »kilo counts per second«

MALS – »Multi - Angle Light Scattering« – sipanje svetlobe pri različnih kotih

ND – nanodelci

NNLS – »non negative least squares« – ne-negativna analiza najmanjših kvadratov

QELS – angl. »Quazi Elastic Light Scattering«

PAS – površinsko aktivna snov

PCS – angl. »Photon Correlation Spectroscopy« – fotonska korelacijska spektroskopija

PI – polidisperzni indeks

R_H – hidrodinamski premer

SANS – ozkokotno sipanje nevtronov

SAXS – ozkokotno sipanje rentgenske svetlobe

SEM – vrstična elektronska mikroskopija

SDS – natrijev dodecil sulfat

SLS – statično sipanje laserske svetlobe

UZ – ultrazvok

o/v – olje v vodi

v/o – voda v olju

Korelogram – korelacijska funkcija

Intenzitetna distribucija – porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe

Volumska distribucija – porazdelitev velikosti glede na volumne

POVZETEK

V razvoju koloidnih dostavnih sistemov je eno od najpomembnejših vprašanj, kako pravilno določiti velikost struktur v nanometrskem območju. Vsaka od poznanih metod ima določene prednosti in slabosti, zato je za celovito sliko vzorca neizogibna uporaba različnih metod in primerjava rezultatov. Ena izmed teh metod, ki se dandanes široko uporablja za merjenje velikosti delcev v nanometrskem območju, je dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS). Metoda izkorišča sipanje laserske svetlobe za detekcijo hitrosti Brownovega gibanja delcev in ga povezuje z velikostjo delcev. Kot rezultat dobimo povprečno velikost delcev in polidisperzni indeks, ki je merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. Med napravami, ki temeljijo na tem principu merjenja, je na tržišču zelo uveljavljen Zetasizer Nano ZS, ki smo ga uporabili tudi v naši nalogi, kjer smo ugotavljali, kateri so kritični koraki pri praktični pripravi vzorca in izvedbi meritve, na katere moramo biti pozorni, če želimo zanesljiv rezultat. Nadalje smo kritično interpretirali podatke dobljene med merjenjem (intenzitetno distribucijo, podatke o sipanju in obliko korelogramov).

Ker je za meritev velikosti zelo pomembna kakovost disperznega medija, smo najprej poskušali pripraviti in izbrati vodo, ki bi bila najustreznejša za izvedbo naših meritev, tj. voda z najnižjim sipanjem svetlobe. Ugotovili smo, da se je gibalo sipanje svetlobe od 24,6 kcps za bidestilirano vodo do 73,9 kcps za pitno vodo. Na podlagi teh meritev smo se odločili, da bomo kot disperzni medij za pripravo vzorcev uporabili ultra čisto vodo, katere sipanje svetlobe se ni bistveno razlikovalo od sipanja bidestilirane vode, njena priprava pa je bila avtomatizirana. Za analizo velikosti smo uporabili komercialno dostopne nanodelce BaSO₄ in TiO₂. Najprej smo delce pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom v suhi obliki in ugotovili, da je večina delcev združena v agregate mikrometrskih velikosti, a vidni so bili tudi posamezni delci, katerih velikost je bila manjša od 100 nm. Nato smo merili velikost delcev BaSO₄ in TiO₂ v vodnih disperzijah in velikost nanodelcev BaSO₄ v 96 % etanolu. Ugotovili smo, da rezultati analize vodnih disperzij nanodelcev takoj po pripravi kažejo, da vzorci vsebujejo agregate in niso dovolj stabilni za izvedbo meritev z DLS-metodo. Soniciranje z UZ sondo se je izkazalo kot najboljši način za razbitje večjih agregatov, čeprav je bila izmerjena povprečna velikost delcev še vedno večja od deklarirane. Z redčenjem vzorcev pod minimalno priporočeno koncentracijo smo dokazali, da le majhen delež velikih delcev v vzorcu znatno vpliva na rezultat meritev, zato je za vsak posamezen vzorec nujno izbrati

optimalno koncentracijo za izvedbo meritev. Etanol se je izkazal kot neustrezni disperzni medij za izvedbo meritev velikosti BaSO₄, saj so delci takoj sedimentirali.

Uporabnost aparature smo želeli preveriti z merjenjem velikosti micelov natrijevega dodecil sulfata (SDS), kjer so strukture dispergirane faze bolj dinamične in manj sipajo svetlobo. Vzorce SDS smo pripravili bodisi iz nateht bodisi z redčenjem osnovne raztopine in jih pustili mirovati 48 ur, da bi preverili, ali sam postopek priprave vpliva na rezultat. V vseh vzorcih so bili prisotni delci > 100 nm, ki niso miceli, zato smo le-te poskušali pri redčenih vzorcih odstraniti s filtriranjem. Ugotovili smo, da se pri vseh vzorcih s koncentracijo 0,01 mol/l ali višjo, ki so glede na podatke iz literature pri oz. nad kritično micelarno koncentracijo SDS, pojavi še dodaten pik na krivulji porazdelitve velikosti. Predvidevamo, da so to miceli. Velikost micelov se z večanjem koncentracije SDS zmanjšuje nekje do vrednosti 2 nm, kar je v skladu s podatki iz literature. Primerjava meritev vzorcev, ki smo jih pripravili iz natehte SDS, z redčenimi in filtriranimi vzorci je pokazala, da manjše razlike sicer obstajajo, a niso bistvene za izmerjeno povprečno velikost micelov in določitev vrednosti CMC (med 0,0075 mol/l in 0,01 mol/l). Torej je DLS metoda ustrezna za ugotavljanje CMC površinsko aktivnih snovi.

Na podlagi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da je DLS enostavna metoda za merjenje velikosti koloidnih delcev, kakovost dobljenih podatkov pa je v veliki meri odvisna od pravilne priprave vzorca, ki zavisi od njegove narave.

1 UVOD

Eden izmed ciljev farmacevtske tehnologije je izbrati ustrezen nosilni sistem za dostavo izbrane učinkovine na mesto delovanja. Vse pomembnejši postajajo sistemi, ki zmorejo ciljano dostavljati molekule ali pa omogočajo nadzorovano sproščanje učinkovine. V sodobni farmaciji se kot potencialni dostavni sistemi vedno pogosteje pojavljajo koloidni sistemi, kot so mikroemulzije, liposomi in nanodelci. Za načrtovanje in napovedovanje lastnosti posameznih nosilnih sistemov ter uspešno optimizacijo farmacevtske oblike moramo poznati fizikalno-kemijske lastnosti določenega sistema, metode določanja le-teh in pomen teh parametrov. Fizikalni lastnosti, kot sta velikost delcev in struktura, nista edini pomembni, sta pa velikokrat ključni za obnašanje takšnih sistemov v *in vitro* ali v *in vivo* okolju (4).

1.1 KOLOIDNE DISPERZIJE

Koloidne disperzije so različni sistemi, ki jih sestavljata najmanj dve fazi. Notranja, dispergirana faza je porazdeljena v drugi – disperznem mediju ali kontinuirani fazi. Kadar je fazni prehod mikro- ali makroskopsko zaznaven, imamo opravka z grobodisperznimi sistemi (velikost delcev je večja od 1 μm). Kadar pri dispergiranju izgine fazna meja, dobimo raztopine ali molekularno-disperzne sisteme (velikost delcev je od 0,1 nm do 10 nm). Koloidne disperzije predstavljajo vmesno območje z velikostjo delcev od 10 nm do 1000 nm (1).

1.2 RAZDELITEV KOLOIDOV

Koloide glede na njihove lastnosti delimo na več sistemov: trdni koloidi, aerosoli, pene, liofilni, liofobni in asociacijski koloidi. Dispergirana faza koloidov je lahko tekočina, plin ali trdna snov in je enakomerno porazdeljena v disperznem mediju, ki je prav tako lahko trden, tekoč ali plinast.

V vsakdanjem življenju se srečujemo s primeri koloidov, ki se razlikujejo glede na naravo dispergirane in kontinuirane faze. Trdne ali tekoče snovi, dispergirane v plinu, se imenujejo aerosoli. Dim je primer sistema trdno-plinasto. Sistem tekoče-plinasto predstavlja megla. Mleko je emulzija, kjer so tekoče maščobe dispergirane kot drobne kapljice v vodni fazi. Žele predstavlja velike beljakovinske molekule, dispergirane v vodi. V kosteh so majhni delci kalcijevega fosfata, dispergirani v ogrodju kolagena (2). Koloide lahko razdelimo glede na afiniteto do medija ali glede na zgradbo. Večina koloidov, ki jih srečamo v praksi, nima jasno

ločene dispergirane in kontinuirane faze, temveč je njihova struktura zelo kompleksna zato lahko predvidevamo, da je njihovo razumevanje še toliko bolj zahtevno.

Delitev koloidov glede na afiniteto do medija:

a) Liofilni koloidi

Koloidni delci, ki imajo afiniteto do disperznega medija, tvorijo stabilne liofilne koloidne disperzije, ki nastanejo spontano. To so koloidne raztopine, kjer so molekule topljenca (polimeri) veliko večje od molekul topila (2). Arabski gumi npr. tvori liofilni koloid v vodi, kavčuk pa v organskih topilih. Liofilni koloidni delci so pogosto nabiti. Kadar je naboj na delcih različen, se delci zaradi elektrostatskih privlačnih sil združujejo v agregate. Koloid se obori in sedimentira ali flotira. Istoimenski naboj na koloidnih delcih pa povečuje stabilnost koloidne disperzije, ker preprečuje združevanje ali koagulacijo delcev (1).

b) Liofobni koloidi

Koloidni delci, ki imajo zelo majhno oz. nikakršno afiniteto do disperznega medija, tvorijo liofobne koloidne disperzije. Ti delci se od liofilnih razlikujejo po tem, da na površini nimajo solvatnega plaščka. To so predvsem delci anorganskih snovi (As, S, Au, AgS, AgJ), ki so dispergirani v vodi. Liofobni delci imajo na površini istoimenski električni naboj, kar je pomembno za njihovo stabilnost (elektrostatski odboj). Z dodatkom majhne količine elektrolita se naboj na delcih nevtralizira, kar povzroči obarjanje. Zaradi šibkih interakcij med dispergirano fazo in disperznim medijem so liofobni delci termodinamsko nestabilni in težijo k združevanju (3). V nasprotju z liofilnimi koloidnimi disperzijami, ki nastanejo spontano, liofobni koloidi ne nastanejo spontano, ampak zahtevajo poseben postopek priprave (1).

Delitev koloidov glede na zgradbo:

a) Molekularni koloidi

Molekularni koloidi so hkrati tudi liofilni koloidi. Predstavljajo jih disperzije polimerov v disperznem mediju. Koloidni delci so lahko:

- naravne snovi (želatina, arabski gumi, tragakant, ksantan, škrob, pektin, alginat ...);
- polsintezne snovi (celulozni etri, derivati škroba);
- sintezne snovi (polivinilpirolidon, poliakrilati, polietilenglikol ...).

b) Asociacijski koloidi

Poseben razred koloidov predstavljajo asociacijski koloidi. To so disperzije skupkov 100 do 1000 amfifilnih molekul PAS (površinsko aktivnih snovi) v disperznem mediju. Nastanejo spontano kot posledica interakcij med molekulami disperznega medija in PAS. PAS zaradi

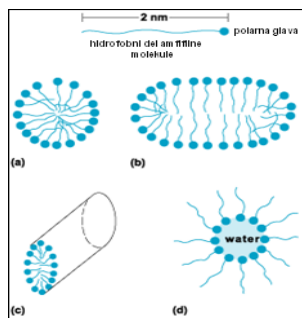
svoje kemijske sestave vstopajo v interakcije z disperznim medijem, tako da sistem doseže energijsko najugodnejše stanje. Ker vsebujejo molekule PAS liofilne in liofobne skupine, se adsorbirajo na mejnih površinah in znižajo površinsko napetost. Kadar je v raztopini nizka koncentracija PAS, se molekule zaradi svoje površinske aktivnosti porazdelijo na mejnih površinah. Če koncentracijo PAS povečujemo, pride do nasičenja mejnih površin, kar se odraža v konstantni površinski napetosti zaradi nastanka molekularnih agregatov ali micelov, ki nastajajo v mediju kot termodinamsko stabilni, dispergirani skupki. Nastanek asociacijskih koloidov je odvisen od različnih dejavnikov: koncentracije, temperature, sestave topila in specifične kemijske strukture. Asociacijske koloide delimo na micelle, mikroemulzije, vezikle in dvoslojne membrane (2).

b1) Mikroemulzije

Mnogi avtorji imenujejo mikroemulzije kar nabrekli miceli. V primerjavi z makroemulzijami, ki sodijo med grobodisperzne sisteme, so bistre in so termodinamsko stabilne. Sestavljene so iz dveh med seboj nemešajočih se tekočin, kjer se ena spontano dispergira v drugi v prisotnosti PAS in pomožnih PAS (2). Pripravimo jih lahko z nežnim stresanjem oz. po daljšem času nastanejo spontano, kar je v nasprotju s klasičnimi emulzijami, kjer je za nastanek potrebno močno mešanje. Mikroemulzije tipa O/V se uporabljajo za povečanje biološke uporabnosti težko topnih učinkovin, tako da učinkovino vgradimo v notranjo fazo mikroemulzije. Mikroemulzije V/O pa se uporabljajo za vgrajevanje polarnih učinkovin v vodno fazo (3).

b2) Miceli

Strukturo micelov tvorijo skupki od 50 do 100 molekul PAS. Jedro micela sestavljajo liofobne verige, medtem ko je na površini plašč, ki ga sestavljajo liofilne glave in na njih vezani ioni nasprotnega naboja ter molekule topila. V jedru ni vključenih molekul vode, saj je gonilo tvorbe micelov zmanjšanje stika med vodo in liofobnim delom molekule. Miceli niso statične strukture. Njihova struktura je zelo dinamična, saj prihaja ves čas do izmenjave molekul PAS med miceli in raztopino (2). Zato micelov ne moremo obravnavati kot rigidne strukture, lahko pa določimo njihovo povprečno obliko. Na obliko micelov lahko vplivamo s spreminjanjem temperature, koncentracije in s prisotnostjo elektrolitov v disperznem mediju. Spreminjanje katerega koli od teh dejavnikov izzove spremembe v velikosti, obliki in agregacijskem številu (število molekul PAS v micelu). Pri nizkih koncentracijah PAS nastajajo običajno najprej sferični miceli, z večanjem koncentracije pa se njihova oblika



deformira in nastanejo miceli v obliki cilindrov ali sploščenih diskov (slika 1). Pri zelo visokih koncentracijah nastanejo tekoči kristali.

Slika 1: Zgradba molekule PAS in različne oblike micelov: a) sferični, b) diskasti, c) cilindrični in d) reverzni miceli.

b3) Liposomi

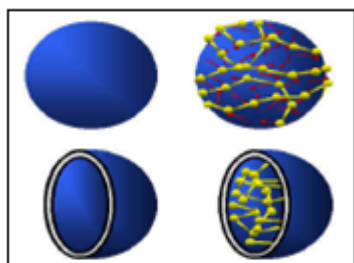
Liposomi so vezikli mikronskih ali submikronskih velikosti, dispergirani v vodnem mediju. Steno vezikla sestavlja dvosloj amfifilnih molekul, podoben biološkim membranam. Liposom je zelo univerzalen nosilni sistem, saj lahko v notranjo vodno fazo vključi hidrofilne učinkovine, v dvosloj pa lipofilne. Običajno liposome sestavljajo fosfolipidi, saj se na tak način še najbolj približamo strukturi bioloških membran (4).

c) Mrežasti koloidi

Mrežaste koloide je težko definirati, ker so sestavljeni iz dveh prepletajočih se mrež, za kateri težko določimo, katera je dispergirana faza in katera disperzni medij. Klasični primeri mrežastih koloidov so porozno steklo, mlečno steklo in geli (2).

d) Nanodelci

So trdni delci koloidnih velikosti od 1 nm do 1000 nm. Ogrodje nanodelcev, ki jih razvijamo v farmaciji, je pogosto sestavljeno iz fiziološko sprejemljivih polimernih makromolekul (predvsem iz polimerov mlečne in glikolne kisline), ki omogočajo nastanek polimernih nanodelcev, ali iz trdnih lipidov, iz katerih pripravimo trdne lipidne nanodelce. Učinkovine, ki jih vgrajujemo, so lahko v različnih agregatnih stanjih, v ogrodju pa so lahko raztopljene, suspendirane, emulgirane ali adsorbirane na površino delcev. Odvisno od parametrov proizvodnje, fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine in narave nosilnega materiala dobimo



glede na zgradbo dva osnovna tipa nanodelcev (slika 2):

- nanosfere, ki so ogrodni tip dostavnega sistema in imajo učinkovino porazdeljeno po celotnem ogrodju;
- nanokapsule, ki imajo rezervoar učinkovine v notranjosti delca (5).

Slika 2: Zgradbe nanosfere (zgoraj) in nanokapsule (spodaj).

Tovrstni dostavni sistemi se odlikujejo po veliki kapaciteti za vgrajevanje učinkovine in omogočajo nadzorovano sproščanje učinkovine kot tudi njeno zaščito pred nezaželeno

razgradnjo. Po intravenskem vnosu se nanodelci kopičijo v tkivih mononuklearno-fagocitnega sistema ter tudi v tumorskem tkivu, kar je posledica tako imenovanega EPR (angl.: »enhanced permeability and retention«) učinka, pri katerem se nanodelci zadržujejo v tkivih s povečano prepustnostjo. Z vezavo tarčno-specifičnih ligandov na njihovo površino (aktivno ciljanje) pa dosežemo specifično ciljanje v posamezne celice ali tkiva (6).

1.3 POMEN DOLOČANJA VELIKOSTI KOLOIDNIH DELCEV

Velikost delcev je pomembna lastnost sistema, ki je velikokrat ključna za obnašanje koloidnih sistemov v *in vitro* in/ali *in vivo* okolju. Po vnosu v organizem se nanodelci nespecifično porazdelijo po tkivih, še preden dosežejo njihovo tarčno mesto. Iz organizma se nanodelci velikosti < 20–30 nm izločijo skozi ledvice, večje delce pa privzamejo celice mononuklearno-fagocitnega sistema, ki so prisotne v jetrih, vranici in v manjši meri v kostnem mozgu. V raziskavah so nanodelce velikosti 150–300 nm v glavnem našli v jetrih in vranici, medtem ko so se delci velikosti 30–150 nm nahajali v kostnem mozgu, ledvicah, srcu in želodcu (7). Za zdravo tkivo je značilen zvezni žilni endotelij, ki preprečuje prehod nanodelcev iz žilja. Pri patoloških spremembah tkiva (rak ali vneto tkivo) pa žilni endotelij ni zvezen, zato lahko nanodelci prehajajo skozi pore (fenestre) v tkivo. V *tabeli 1* je podan pregled velikosti por v žilnem endoteliju za posamezne organe. Glede na dosedanje študije naj bi bila idealna velikost nanodelcev, ki jih razvijajo za zdravljenje raka, med 70 nm in 200 nm (7).

Tabela 1: Velikosti por v endoteliju žilja v različnih organih in nekaterih patološko spremenjenih tkivih (7).

Organ / tkivo	Velikost por
Ledvica	20–30 nm
Jetra	150 nm
Vranica	150 nm
Pljuča	1–400 nm
Kostni mozeg	85–150 nm
Skeletna, srčna in gladka mišica	≤ 6 nm
Kožna, podkožna in mukozna membrana	≤ 6 nm
Krvno - možganska pregrada	ni por
Tumorsko tkivo	200–780 nm
Možganski tumor	100–380 nm
Vneto tkivo	80 nm–1,4 μm

Pri razvoju koloidnih dostavnih sistemov je eno od najpomembnejših vprašanj, kako pravilno določiti velikost delcev v nanometrskem območju. Čeprav poznamo številne metode za vrednotenje velikosti delcev, jih je le nekaj sposobnih meriti velikost delcev v nanometrskem območju. Rezultati meritev se zaradi različnih metod merjenja med seboj pogosto ne skladajo. V nekaterih primerih je odstopanje med rezultati meritev za isti vzorec bistveno, kar vodi do vprašanj, kateremu instrumentu zaupati in kako razložiti razlike v rezultatih med meritvami. Razlogi, ki prispevajo k razlikam med rezultati, so številni in so odvisni tako od vzorca kot od metode merjenja, npr. homogenost vzorca, priprava vzorca, operativni postopek instrumenta itd. Položaj bi se zagotovo zelo izboljšal, če bi obstajali industrijski ali mednarodni standardi, ki bi vključevali referenčne protokole za izvedbo meritev (8). Vsaka metoda ima določene prednosti in slabosti, zato je za karseda celovito sliko vzorca neizogibna uporaba različnih metod in primerjava rezultatov (4).

1.4 METODE MERJENJA VELIKOSTI DELCEV

1.4.1 METODE, KI TEMELJIJO NA SIPANJU SVETLOBE

Metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe, ko le-ta prehaja skozi disperzni medij, so ene izmed najpogosteje uporabljenih metod pri strukturnih raziskavah koloidnih sistemov, tj. vzorcev z dispergiranimi delci reda velikosti od nekaj nm do nekaj 100 nm. Uporabne so za raziskave struktur kot tudi dinamičnih lastnosti v zelo širokem območju.

V splošnem se metode sipanja delijo na dve skupini, saj sta možna dva različna pristopa k izvedbi eksperimenta, t.i. »statični« in »dinamični« eksperiment. Pri statičnem eksperimentu skozi vzorec posvetimo s primarnim žarkom svetlobe in s pomočjo detektorja, ki se nahaja na določeni razdalji za vzorcem, detektiramo kotno odvisnost intenzitete sipanja. Pri dinamičnem eksperimentu pa nas zanima časovna odvisnost intenzitete sipanja (fluktuacije intenzitete sipanja) pri določenem fiksnem kotu. Slednja možnost je uporabna le v primeru, da je za vzorce, ki kažejo določeno stopnjo dinamike (tekoči vzorci in šibki geli) (9).

1.4.1.1 Med statične metode spadajo:

a. Ozkokotno sipanje rentgenske svetlobe (SAXS)

Osnovni princip SAXS-metode je v sipanju rentgenskih žarkov zaradi neenakomerne elektronske porazdelitve znotraj sistema. Tako so lahko sipalne krivulje odsev strukture samega sistema. Omogoča tudi meritve velikosti kapljic. Omejitev te metode je, da je

primerna predvsem za razredčene sisteme, pri bolj koncentriranih sistemih pa interakcije med kapljicami motijo meritve. Metoda je zelo primerna za karakterizacijo mikroemulzij (4), saj lahko ugotavljamo spremembe pri prehodu med posameznimi tipi mikroemulzij, in tudi micelov (9).

b. Ozkokotno sipanje nevtronov (SANS)

Ta metoda temelji na sipanju nevtronov in je zelo uporabna pri proučevanju mikroemulzij, saj podobno kot SAXS omogoča ne le meritve velikosti kapljic, ampak tudi ugotavljanje strukture sistema. SANS-metode ne omejujejo površinsko aktivne snovi, ki šibko sipajo X-žarke. SANS profili niso ustrezni pri nekoherentnem sipanju zaradi velike polidisperznosti sistema, kar pa je za SAXS-metodo manj moteče (4). Območje raziskovanja struktur je nanometerski red velikosti (9).

c. Statično sipanje laserske svetlobe (SLS)

Ta metoda se široko uporablja za ugotavljanje velikosti kapljic mikroemulzij. Na intenziteto sipane svetlobe najbolj vplivata polmer kapljice in razlika med lomnima količnikoma dispergirane faze in disperznega medija, ob predpostavki, da imamo razredčen sistem. V kolikor ga ni mogoče pripraviti, je potrebno upoštevati korekcijske faktorje zaradi interakcij med strukturami (4). Omogoča merjenje velikosti delcev do reda velikosti nekaj μm (9).

1.4.1.2 Med dinamične metode spada:

a. Dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS)

Metoda je poznana tudi pod imenom QELS (angl. »Quazi Elastic Light Scattering«) ali PCS (angl. »Photon Correlation Spectroscopy«). V praksi se ta metoda uporablja za rutinsko merjenje velikosti delcev ali struktur koloidnih sistemov. Primerna je tako za liposome in nanodelce kot tudi za mikroemulzije. Pri slednjih se pojavi težava zaradi majhnega sipanja, ki predstavlja problem za vse metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe (4). V primeru razredčenega monodisperznega vzorca daje takšen eksperimentalni pristop zanesljive rezultate o velikosti kapljic/delcev. Interpretacija rezultatov postane bolj kompleksna pri bolj koncentriranih sistemih zaradi možnih fizikalnih interakcij med delci in pojava multiplega sipanja, ki seveda vpliva na rezultat meritve. Druga omejitev te metode je uporaba kumulantne analize za zelo polidisperzni sistem, ki poda za končni rezultat v tem primeru nerealno povprečno velikost (10). Zaradi številnih parametrov, kot so viskoznost, pH vzorca, temperatura, koncentracija in sedimentacija delcev, je potrebno dobljene rezultate

interpretirati zelo previdno (7). Komercialno dostopni DLS instrumenti pokrivajo merilno območje od 5 nm do 5000 nm (8).

1.4.2 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

a. Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Omogoča vpogled v vzorec po sušenju. Ločljivost metode je med 3 in 5 nm. SEM prikaže direktno sliko nanodelcev in daje informacijo tako o strukturi kot o velikosti delcev. Težava SEM-metode je, kadar vzorec prekrijemo s plastjo zlata ali platine, saj mora biti le-ta čim tanjša v primerjavi z velikostjo nanodelcev. Poleg tega se lahko delci med postopkom sušenja spremenijo, npr. skrčijo, zato je ugotovljena velikost nerealna. Metoda zahteva analizo večjega števila delcev, zato je tudi zelo subjektivna in dolgotrajna (4,7).

b. Mikroskopija na atomsko silo (AFM)

Med mnogimi drugimi aplikacijami se AFM uporablja tudi za merjenje velikosti nanodelcev (8). Metoda je bolj primerna za analizo površine delcev kot za merjenje njihove velikosti. Metoda ni avtomatizirana, potrebuje vzorčenje in kompleksne nastavitve, poleg tega je subjektivna, saj zahteva obdelavo slik. Območje merjenja: 10 nm–1 μ m (7).

1.4.3 SEPARACIJSKE METODE

a. Analitično ultracentrifugiranje (ANUC)

ANUC je pomembno orodje pri karakterizaciji makromolekul in nanodelcev v disperziji. Ena od prednosti sedimentacije je ta, da so molekule oz. delci med meritvijo prosti v mediju in da je porazdelitev velikosti dejanski odraz ureditve delcev v vzorcu (11). Ta metoda – analiza hitrosti sedimentacije v analitični ultracentrifugi ima veliko moč ločevanja, kar omogoča identifikacijo populacije manjših delcev celo takrat, ko je distribucija velikosti v vzorcu zelo široka (12). Večji delci sedimentirajo hitreje kot manjši delci. Stopnja sedimentacije je povezana s porazdelitvijo velikosti delcev. Zahteva pa kompleksno podatkovno analizo (7).

b. »Field – flow fractionation« (FFF)

FFF spada v skupino elucijskih metod, ki se razlikujejo med seboj v vrsti polja, ki ga uporabimo, da omogočimo ločevanje. Uporablja se za ločevanje in merjenje številnih lastnosti makromolekul in koloidnih delcev, kot so masa delcev, velikost in gostota. FFF omogočajo ločevanje in vrednotenje delcev velikosti od 1 nm do približno 100 μ m, kot so liposomi, nanodelci, nanosfere in mikrosfere. Možnost kombinacije FFF z zelo sofisticirano detekcijsko

tehniko, kot je npr. MALS («Multi – Angle Light Scattering«, sipanje svetlobe pri različnih kotih) razširi področje uporabe te metode (13, 14).

c. Kapilarna elektroforeza (CE)

CE je vsestranska tehnika za ločevanje številnih snovi. V električnem polju imajo analiti z nabojem različno elektroforetično mobilnost in se zato ločijo v kapilarnem območju elektroforeze, medtem ko se nevtralni analiti gibljejo skupaj z elektroosmotičnim tokom, zato se jih ne da ločiti s tradicionalno CE. Ta metoda ni omejena le na ločevanje majhnih molekul, ampak so metodo uspešno uporabili tudi npr. za vrednotenje okroglih delcev zlata nanometrskih velikosti. Analize, ki se izvajajo z uporabo CE, so hitre, občutljive in zahtevajo zelo majhen volumen vzorca (15, 16, 17). CE dopušča ločevanje delcev v različnih raztopinah na osnovi naboja in porazdelitev velikosti komponent. Ker pa ločevanje ni osnovano samo na podlagi velikosti, je interpretacija podatkov komplicirana.

1.5 ZETASIZER NANO ZS

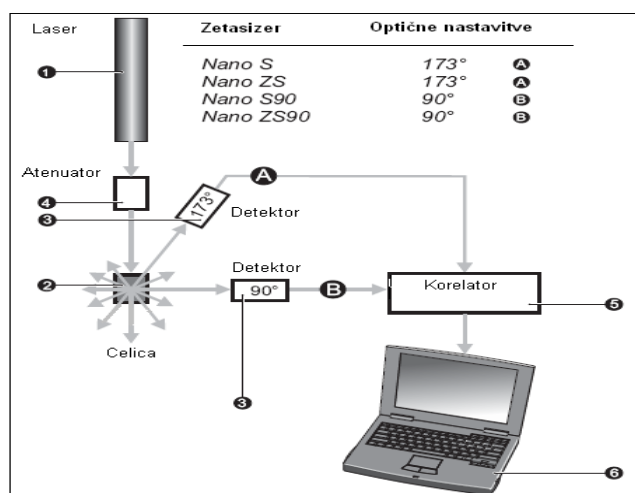
Zetasizer Nano ZS je trenutno v raziskavah najpogosteje uporabljana naprava za merjenje velikosti delcev v nanometrskem območju. To je posledica vsestranske enostavne uporabe in visoke občutljivosti ter širokega območja merjenja velikosti.

Meritve z Zetasizerjem Nano ZS temeljijo na procesu dinamičnega sipanja svetlobe («Dynamic Light Scattering«– DLS). DLS meri hitrost Brownovega gibanja delcev in ga povezuje z velikostjo delcev. To izvaja na ta način, da osvetli delec z laserskim žarkom in nato analizira intenziteto sipane svetlobe. Tipična uporaba DLS-ja je merjenje velikosti in porazdelitve velikosti delcev, kapljic in molekul, dispergiranih ali raztopljenih v tekočini (npr. proteini, polimeri, miceli, nanodelci, nanoemulzije, mikroemulzije) (19).

1.5.1 ZGRADBA ZETASIZERJA NANO ZS

Tipičen DLS-sistem (*slika 3*) sestavlja šest glavnih sestavnih delov. Kot vir svetlobe se uporablja laser¹ s fiksno valovno dolžino 633 nm, ki osvetljuje vzorec v celici². Delci v vzorcu sipajo le nekaj tega laserskega žarka, večina svetlobe potuje naravnost skozi vzorec. Za merjenje intenzitete sipane svetlobe se uporablja detektor³. Če delci sipajo svetlobo v vse smeri, je mogoče namestiti detektor na katerokoli mesto in sipanje bomo še vedno lahko detektirali. V primeru Zetasizerja Nano ZS sipano svetlobo detektiramo z »avalanche« fotodiodo pod kotom 173°. Za uspešno meritev mora biti intenziteta sipane svetlobe znotraj specifičnega območja detektorja. Če pade na detektor preveč svetlobe, postane detektor

prenasičen. Kot rešitev te težave uporabljamo atenuator⁴, ki zmanjša intenziteto laserskega žarka in s tem intenziteto sipanja. Npr. pri vzorcih z majhnimi delci ali nizko koncentracijo, ki ne sipajo veliko svetlobe, je za ustrezno detekcijo potrebno povečati količino svetlobe, ki potuje skozi vzorec in posledično količino sipane svetlobe v primerjavi z vzorci, ki močno sipajo. V tem primeru atenuator dopusti, da gre skozi vzorec več laserske svetlobe. Zetasizer Nano ZS med meritvijo avtomatsko določi primeren položaj atenuatorja. Intenziteta signala sipanja iz detektorja preide v korelator⁵, kjer se intenziteta signala sipane svetlobe prevede v digitalni signal. Te korelacijske informacije se prenesejo v računalnik⁶, kjer nato s programsko opremo analiziramo dobljene podatke (19).

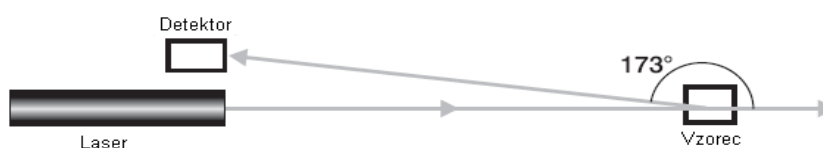


Slika 3: Shema zgradbe DLS-instrumenta: 1 – laser, 2 – celica, 3 – detektor, 4 – atenuator, 5 – korelator, 6 – računalnik.

1.5.1.1 Neinvazivna detekcija pod kotom 173°

Detekcija sipanja pri 173° je poznana kot »backscatter« detekcija (slika 4). Optika ni v stiku z vzorcem, zato je neinvazivna in ima številne prednosti:

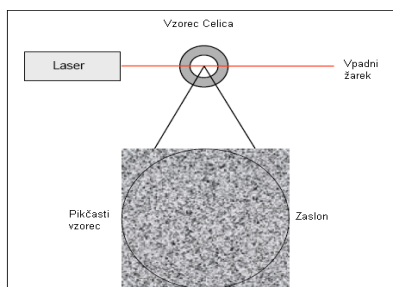
- laserska svetloba ne prehaja skozi ves vzorec, kar zmanjša učinek multiplega sipanja;
- pot svetlobe skozi vzorec je krajša, zato lahko merimo vzorce z visokimi koncentracijami;
- nečistote, kot so prašni delci v mediju, so veliko večji od delcev v vzorcu in sipajo svetlobo predvsem v smeri poti žarka, zato je vpliv na rezultat meritve manjši (18, 19).



Slika 4: Prikaz neinvazivne detekcije pod kotom 173°.

1.5.2 PRINCIP DELOVANJA ZETASIZERJA NANO ZS

Majhni delci sipajo svetlobo v vse smeri, če jih osvetlamo z izvorom svetlobe, kot je laser. Če se v bližino tega delca približa npr. mrzel steklen zaslon (*slika 5*), se le-ta osvetli s sipano svetlobo. Na tisoče takšnih stacionarnih delcev prikaže na zaslonu pikčast vzorec. Ta pikčast vzorec vsebuje jasna, svetla področja in temna področja, kjer ni detektirane svetlobe. Svetla področja svetlobe so tam, kjer sipana svetloba od delcev prihaja na zaslon z enako fazo in



konstruktivno sovpada, tako da oblikuje svetlo liso. Temna področja pa so tam, kjer so fazni dodatki medsebojno destruktivni in drug drugega izključujejo.

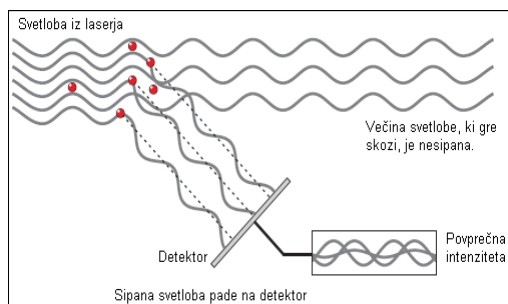
Slika 5: Shematični prikaz pikčastega vzorca.

V zgornjem primeru so opisane situacije, ko se delci ne gibajo in je pikčasti vzorec stacionaren. V praksi pa delci v tekočini niso nikoli stacionarni. Zaradi Brownovega gibanja se delci neprestano gibljejo. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev zaradi naključnih trkov z molekulami medija, ki obdajajo delce. Pomembna značilnost Brownovega gibanja, ki jo izkorišča DLS je ta, da se majhni delci gibljejo hitreje kot veliki delci. Odnos med velikostjo delca in njegovo hitrostjo je definiran v Stokes-Einsteinovi enačbi (enačba 1)

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad [1]$$

$d(H)$...hidrodinamični premer
 D ... translacijski difuzijski koeficient
 k ... Boltzmanova konstanta
 T ... absolutna temperatura
 η ... viskoznost

Glede na to, da so delci v neprestanem gibanju, izgleda, da se tudi pikčasti vzorec premika, konstruktivni in destruktivni fazni dodatki sipane svetlobe povzročijo, da svetla in temna področja rastejo in se zmanjšujejo v intenziteti, skratka zdi se, da intenziteta valovi (*slika 6*). Zetasizer meri fluktuacijo intenzitete sipane svetlobe in to uporabi za izračun velikosti delcev.

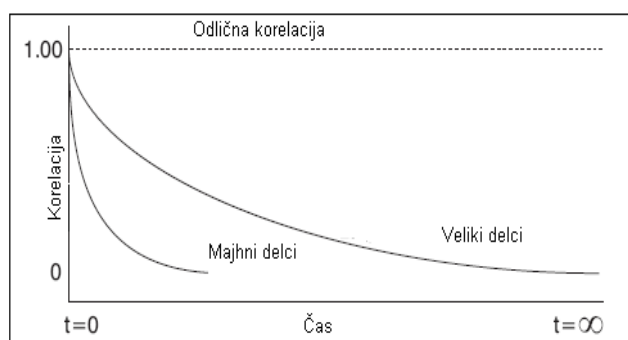


Majhni delci povzročajo hitrejše valovanje intenzitete sipane svetlobe kot veliki delci (18, 19).

Slika 6: Opazovani signal je odvisen od faznega dodatka sipane svetlobe, ki pade na detektor. Dva žarka interferirata in se, ali izključujeta, kar rezultira s padcem intenzitete sipane svetlobe, ali se ojačata, kar rezultira s povečanjem intenzitete (19).

1.5.3 INTERPRETACIJA PODATKOV O IZMERJENEM NIHANJU INTENZITETE SIPANJA SVETLOBE

Sestavni del instrumenta je tudi digitalni korelator, ki ugotavlja stopnjo podobnosti med dvema signaloma. Če primerjamo intenziteto signalov v določeni točki vzorca ob času $t = 0$ in po nekem daljšem času t , ugotovimo, da intenziteti obeh signalov nista povezani, saj se delci v vzorcu gibljejo v naključnih smereh; skratka med dvema signaloma ni korelacije. Če pa primerjamo intenziteto signala določenega dela pikčastega vzorca pri določeni časovni točki (t) z intenziteto signala v zelo kratkem časovnem intervalu pozneje ($t+\delta t$), vidimo, da sta si ta dva signala zelo podobna oz. močno korelirana. Če primerjamo signal pri času (t) s signalom pri času ($t+2\delta t$), je med njima sprejemljiva podobnost, vendar podobnost ni tako visoka kot pri primerjavi signalov ob časih (t) in ($t+\delta t$), torej se s časom korelacija zmanjšuje. Časovna perioda je ponavadi zelo majhna (nanosekunde, mikrosekunde) in se imenuje vzorčni čas



korelatorja. Če nadaljujemo z merjenjem korelacije pri ($t+3\delta t$), ($t+4\delta t$), ($t+5\delta t$)..., korelacija s časom izzveni (slika 7) (18,19).

Slika 7: Tipični korelogram za vzorce, ki vsebujejo velike in majhne delce.

1.5.4 UPORABA KORELACIJSKE FUNKCIJE

Če so delci, ki jih merimo, veliki, se le-ti gibljejo relativno počasi in intenziteta pikčastega vzorca se počasi spreminja. Če pa merimo majhne delce, se le-ti gibljejo hitreje in intenziteta pikčastega vzorca se tudi spreminja hitreje. Z velikostjo delcev je povezana tudi hitrost padanja korelacijske funkcije. Korelacija za manjše delce hitro izgine, medtem ko za večje delce traja dlje časa, preden izzveni. Pregled korelograma vzorca nam lahko poda veliko informacij o vzorcu. Točka, pri kateri začne korelacija padati, nakazuje povprečno velikost delcev v vzorcu. Kot, pod katerim korelacija pada, pa kaže na polidisperznost vzorca. Programska oprema Zetasizerja Nano ZS uporablja algoritme, ki povzamejo stopnje padanja te korelacijske funkcije za posamezne velikostne razrede za izračun porazdelitve velikosti delcev v vzorcu (19). Korelator, ki ga uporablja DLS-instrument, poda na podlagi intenzitete sipanja korelacijsko funkcijo $[G(\delta t)]$. Kadar so v vzorcu dispergirani monodisperzni delci, ki

se v mediju naključno gibljejo (Brownovo gibanje) in povzročijo fluktuacijo sipane svetlobe s časom, dobimo korelacijsko funkcijo $[G(\delta t)]$, ki eksponentno pada (enačbe 2 – 4) (18).

$$G(\delta t) = A[1 + B^{-2\Gamma(\delta t)}] \quad [2]$$

δt ... časovni interval

$$\Gamma = Dq^2 \quad [3]$$

A ... osnovna linija korelacijske funkcije

B ... presek korelacijske funkcije

D ... translacijski difuzijski koeficient

$$q = (4\pi\eta/\lambda^\circ)\sin \theta/2 \quad [4]$$

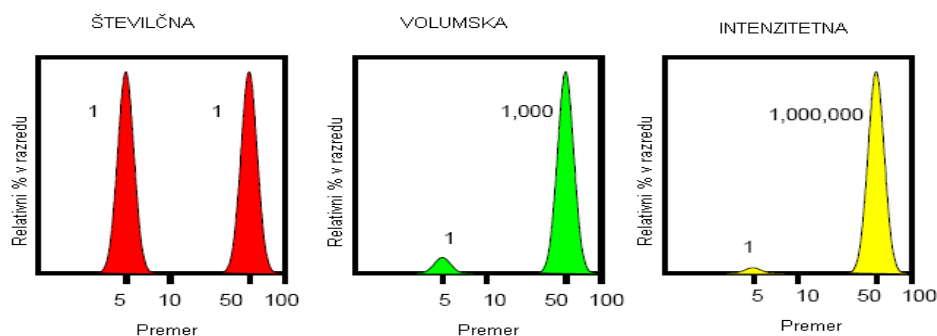
η ... lomni količnik medija

λ° ... valovna dolžina laserja

θ ... kot sipanja

1.5.5 INTENZITETNA, ŠTEVILČNA IN VOLUMSKA DISTRIBUCIJA

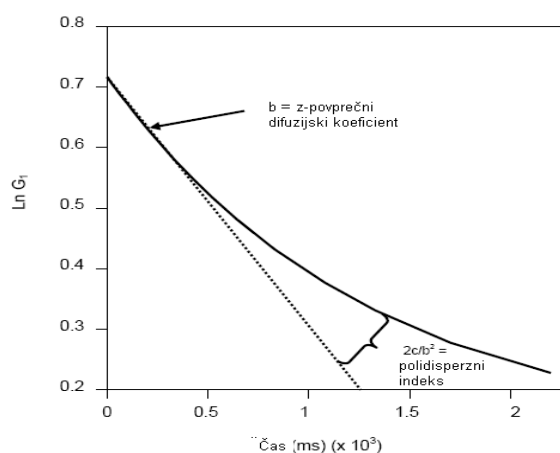
Osnovna velikostna distribucija, ki jo dobimo z DLS-meritvijo, je porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipane svetlobe (intenzitetna distribucija). Le-to lahko spremenimo z uporabo Mie-jeve teorije direktno v volumsko distribucijo le v primeru, če vsebuje intenzitetna distribucija le en sam pik. Če pa krivulja kaže precejšen “rep” ali več kot en pik, potem lahko uporabimo Mie-jevo teorijo za zamenjavo intenzitetne v volumsko distribucijo le z vnosom lomnega količnika vzorca. Volumsko distribucijo lahko spremenimo v številčno distribucijo, vendar ima le-ta omejeno uporabnost, saj se že majhne napake seštevajo in vodijo do večjih napak na številčni distribuciji. Razliko med temi tremi distribucijami lahko predstavimo na primeru vzorca, ki vsebuje dve populaciji istega števila okroglih delcev (5 nm in 50 nm) (slika 8). Krivulja številčne distribucije vsebuje dva pika v razmerju 1:1. Če številčno distribucijo spremenimo v volumsko, se razmerje med pikoma spremeni v 1:1000, saj je volumen krogle enak $4/3\pi(d/2)^3$. Tretji graf kaže rezultat intenzitetne distribucije, kjer je površina pika za 50 nm delce 10^6 krat večja kot za 5 nm delce. Razlog je v dejstvu, da veliki delci sipajo veliko več svetlobe kot majhni delci, intenziteta sipanja delca je sorazmerna z d^6 (iz Rayleigh-ove aproksimacije) (18, 19).



Slika 8: Prikaz številčne, volumske in intenzitetne distribucije bimodalne mešanice delcev.

1.5.6 KUMULANTNA ANALIZA – DOLOČITEV POVPREČNEGA PREMERA IN POLIDISPERZNEGA INDEKSA

Korelacijska funkcija $[G]$ pada eksponentno s časom. Najenostavnejši način za izračun velikosti delca iz te krivulje je uporaba kumulantne analize, kot je opisano v ISO13321 standardu. Kumulanta predstavlja tretji red prileganja polinoma k semi-logaritemski krivulji korelacijske funkcije $[G]$ (slika 9 in enačba 5). Če je vzorec polidisperzen, potem je dobljena semi-logaritemska krivulja ukrivljena. Naklon prilegajoče premice (b) je povprečni difuzijski koeficient. Povprečni premer delcev izračunamo iz dobljenega difuzijskega koeficienta z uporabo Stokes-Einsteinove enačbe. Ukrivljenost korelacijske funkcije stran od ekstrapolacije premice skozi začetni naklon krivulje daje oceno polidisperznosti vzorca ($2c/b^2$), tj. polidisperzni indeks (PI). PI je torej merilo širine distribucije velikosti delcev v vzorcu. Kumulantna analiza ima pomen le v primeru, če je vzorec monomodalen (le en pik) in monodisperzen (ozka porazdelitev velikosti delcev) (18).



$$\ln[G_1] = a + b\delta t + c\delta t^2 \quad [5]$$

$b\delta t$... prva kumulanta

$c\delta t^2$... druga kumulanta

Slika 9: Kumulanta predstavlja tretji red prileganja polinoma k semi-logaritemski krivulji korelacijske funkcije.

1.5.7 DISTRIBUCIJSKA ANALIZA

Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe, ki jo prikaže DLS-programaska oprema, dobimo z analizo korelacijske funkcije z ne-negativno analizo najmanjših kvadratov (\gg NNLS – non-negative least squares \ll). Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja je izrisana kot krivulja relativne intenzitete sipane svetlobe delcev v odvisnosti od različnih velikostnih razredov (70 velikostnih razredov je med seboj logaritemsko ločenih) (21).

1.5.8 PRIPRAVA VZORCA

Vzorec, primeren za DSL-analizo, mora vsebovati dobro dispergirane delce v tekočem mediju. Disperzni medij mora biti transparenten, čist in tak, da ga lahko filtriramo. Lomni količnik medija se mora razlikovati od lomnega količnika dispergiranih delcev, hkrati pa

medij ne sme raztapljati delcev ali povzročati njihove agregacije (ISO 13321 standard) (21). Pri izvedbi meritev moramo biti pozorni tudi na fizikalni lastnosti vzorca, kot sta njegova koncentracija in velikost delcev v vzorcu.

1.5.8.1 Koncentracija vzorca

Vzorec, v katerem želimo določiti velikost delcev, mora imeti ustrezno koncentracijo za izvedbo optimalne meritve. Npr. če je vzorec prekoncentriran, potem lahko pride do pojava multiplega sipanja svetlobe, ki zmanjša navidezno velikost (vrednost premera) in razmerje signal/šum (vrednost odseka korelacijske funkcije). Instrumenti, ki detektirajo sipano svetlobo pod kotom 173° , imajo širše koncentracijsko območje, znotraj katerega lahko merimo. V tabeli 2 so približne vrednosti maksimalnih in minimalnih koncentracij za vzorce z različno velikostjo dispergiranih delcev (te vrednosti veljajo za instrumente, ki temeljijo na detekciji pod kotom 173°). Za meritev moramo izbrati takšno koncentracijo vzorca, da so dobljeni rezultati koncentracijsko neodvisni. Če je izbira koncentracije otežena, potem moramo pripraviti različne koncentracije vzorca, jih analizirati in določiti, ali obstaja kakšen vpliv koncentracije vzorca na izmerjeno velikost delcev (npr. interakcije med delci, multiplo sipanje).

Tabela 2: Minimalne in maksimalne koncentracije za različne velikosti delcev v vzorcu (20).

Velikost delcev	Minimalna priporočena koncentracija	Maksimalna priporočena koncentracija
< 10 nm	0,5 mg/ml	Omejitev so le interakcije v vzorcu, agregacija, geliranje ...
10 nm – 100 nm	0,1 mg/ml	5 % m/v (predpostavljena gostota delcev 1g/cm^3)
100 nm – 1 μm	0,01 mg/ml (10^{-3} % m/v)	1 % m/v (predpostavljena gostota delcev 1g/cm^3)
>1 μm	0,1 mg/ml (10^{-2} % m/v)	1 % m/v (predpostavljena gostota delcev 1g/cm^3)

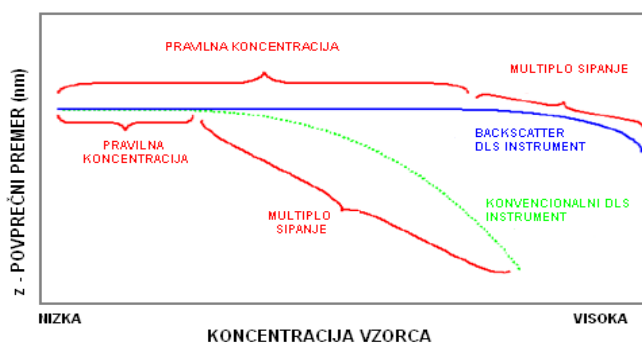
Vzorec z majhnimi delci

Za delce manjše od 10 nm je glavni dejavnik pri določanju minimalne koncentracije, ki je še ustrežna za meritev, količina sipane svetlobe vzorca. V praksi naj bi za meritev uporabili koncentracijo vzorca, ki ima minimalno 10 kcps (angl. »kilo counts per second«) večje sipanje, kot je sipanje samega disperznega medija. Maksimalno koncentracijo za vzorce z majhnimi delci se določi glede na lastnosti samega vzorca (npr. gel ni primeren za DLS

merjenje, saj interakcije med samimi delci vplivajo na difuzijo v vzorcu, kar vodi do nepravilnih rezultatov).

Vzorec z velikimi delci

Pri določitvi minimalne koncentracije za vzorce z velikimi delci je potrebno ugotoviti število delcev v sipanem volumnu, ki mora biti najmanj 1000. Na ta način se izognemo učinku, imenovanemu »številčna fluktuacija«. Zgornjo koncentracijsko mejo za vzorce z velikimi delci omejuje pojav multiplega sipanja. Z naraščanjem koncentracije učinek multiplega sipanja vse bolj prevladuje, dokler ne doseže točke, ko postanejo rezultati merjenja popačeni (slika 10). Glede na podatke iz literature morajo biti meritve izvedene na vzorcih, kjer so delci mobilni (19, 20). Fenomen multiplega sipanja in interakcije delec-delec vplivajo na izmerjeno



navidezno velikost delcev (19, 20).

Slika 10: Krivulja odvisnosti izmerjene velikosti delcev od koncentracije vzorca za DLS-instrument z detekcijo pri kotu 173° in za konvencionalni DLS-instrument z detekcijo pri kotu 90°.

1.5.8.2 Medij za redčenje vzorca

Medij, ki ga uporabimo za redčenje vzorcev s preveliko koncentracijo, mora biti enak zunanji fazi oz. disperznemu mediju samega vzorca.

1.5.8.3 Filtriranje

Medij, ki ga uporabimo za redčenje vzorca, moramo pred uporabo filtrirati, da se izognemo morebitni kontaminaciji razredčenega vzorca. Velikost por filtra določimo glede na pričakovano velikost delcev v vzorcu (polarna topila ponavadi filtriramo skozi filter z velikostjo por 0,2 μm , medtem ko nepolarna filtriramo skozi filter z velikostjo por 20 nm). Same vzorce redko filtriramo (20).

1.5.8.4 Soniciranje

Soniciranje je zelo uporabna tehnika priprave vzorca, če jo uporabimo pravilno (npr. za anorganske nanodelce, kot so delci titanovega dioksida). Soniciranje lahko uporabimo za odstranitev zračnih mehurčkov iz vzorca ali za razbitje aglomeratov, ni pa primerna za vse vzorce (npr. emulzije in liposome). Izmerjena velikost delcev nekaterih materialov je močno odvisna od uporabljene moči in časa soniciranja (20).

1.6 INTERPRETACIJA PODATKOV

Kvaliteta dobljenih podatkov iz meritev je nujna za kvalitetne in zanesljive rezultate meritev. Bolj kot so kvalitetni podatki, bolj so rezultati ponovljivi. V tem delu poudarjamo, kako prepoznati razliko med dobro in slabo kvaliteto podatkov (tabela 3).

Tabela 3: Priporočeni parametri in poročila, ki pomagajo pri interpretaciji rezultatov (20).

Ime poročila	Opis	Informacije
Poročilo o kvaliteti izmerjene velikosti »Size Quality Report«	Vsebuje 12 testov izbranih poročil.	Če katerikoli test ne ustreza specificiranim omejitvam, se pojavi opozorilo skupaj z nasveti o možnih razlogih zanj. Če vsi testi ustrezajo kriterijem, dobimo sporočilo o ustreznosti rezultatov, tj. »Result Meets Quality Criteria«.
Poročilo o korelogramu »Correlogram Report«	Podatki iz korelograma se pokažejo kot korelacijski koeficient.	Informacije o vzorcu. Povprečno velikost delcev lahko dobimo, če pogledamo točko, pri kateri se začne korelacija izgubljati. Kot padanja korelacijske funkcije nakazuje polidisperznost vzorca. Težave na osnovni liniji jasno pokažejo na prisotnost velikih sedimentnih delcev/agregatov.
Poročilo o prileganju kumulante »Cumulants Fit Report«	Prileganje podatkov, dobljenih s kumulantno analizo, od koder se izračuna po ISO13321 povprečni premer delcev in polidisperzni indeks.	Kvaliteta prileganja podatkov s kumulantno analizo nakazuje, ali sta izmerjen povprečni premer in polidisperzni indeks realna.
Poročilo o prileganju »Fit Report«	Prileganje podatkov, dobljenih z distribucijsko analizo, od koder dobimo intenzitetno velikostno porazdelitev.	Kvaliteta prileganja podatkov z distribucijsko analizo nakazuje, ali je intenzitetna velikostna distribucija realna.
Povprečno sipanje »Mean Count Rate«	Povprečno sipanje vzorca.	Primerjava povprečnih sipanj vzorca med ponovitvami meritev nam pove, ali je vzorec stabilen ali sedimentira/agregira.

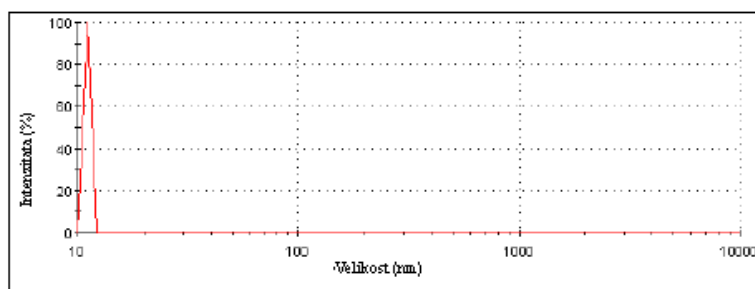
Ime poročila	Opis	Informacije
Izmerjen presek	Odsek korelacijske funkcije ekstrapoliran do časa nič.	Vrednost preseka je razmerje signal/šum in se spreminja glede na vzorec in optično namestitev. Vrednost se lahko giblje od 0,05 do 1,0. Če je vrednost nižja, kot je pričakovana, lahko to nakazuje na previsoko ali prenizko koncentracijo, absorpcijo ali fluorescenco vzorca.
Položaj merjenja	Položaj v kivetu ob izvedbi meritev.	Preveri, ali je izbrani položaj glede na izbrano programsko opremo ustrezen.
Napaka kumulante prileganja »Cumulants Fit Error«	Napaka prileganja, dobljena z analizo podatkov s kumulanto.	Vrednost, manjša kot 0,005, je dober namig, da sta izmerjen povprečni premer in polidisperzni indeks realna.
Napaka multimodalnega prileganja »Multimodal Fit Error«	Napaka prileganja, dobljena z analizo podatkov z multiplimi ozko metodnimi analizami.	Vrednost, manjša kot 0,005, je dober namig, da je dobljena intenzitetna velikostna distribucija realna.
Atenuator	Položaj atenuatorja, uporabljen pri meritvi.	Položaj atenuatorja daje v povezavi s sipanjem informacijo o koncentraciji vzorca.

1.6.1 »SIZE QUALITY REPORT«

Poročilo o kakovosti rezultatov (»Size Quality Report«), ki jih dobimo po analizi vzorca z Zetasizerjem Nano ZS, vsebuje 12 testov izbranih poročil (20).

- **Test 1 in 2: Ali je povprečni premer < spodnje analizirane meje oz. > zgornje analizirane meje?**

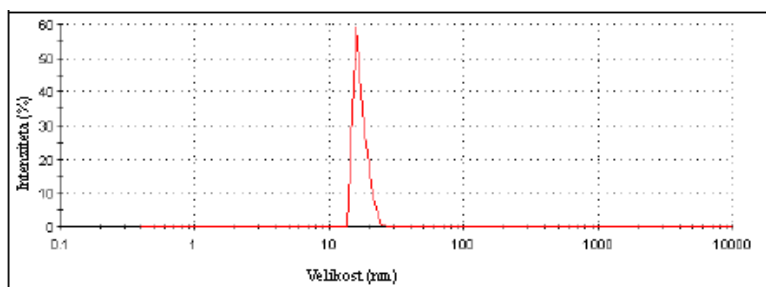
Ta dva testa preverjata primernost spodnje oz. zgornje meje velikosti, ki smo ju uporabili v distribucijski analizi. Le-ta je lahko napačno ročno nastavljena v raziskovalni programski opremi. Npr. če je spodnja analizirana meja porazdelitve ročno nastavljena v raziskovalni programski opremi na 10 nm in je dejanska vrednost povprečnega premera manjša od 10 nm, potem se v poročilu pojavi opozorilo, da je povprečni premer manjši od najnižje analizirane meje (*slika 11*).



Slika 11: Porazdelitev velikosti glede na intenziteto za vzorec s povprečnim premerom 8,9 nm, kjer je bila najnižja analizirana meja ročno nastavljena na 10 nm.

- **Test 3 in 4: Ali je povprečni premer < spodnje prikazane meje oz. > zgornje prikazane meje?**

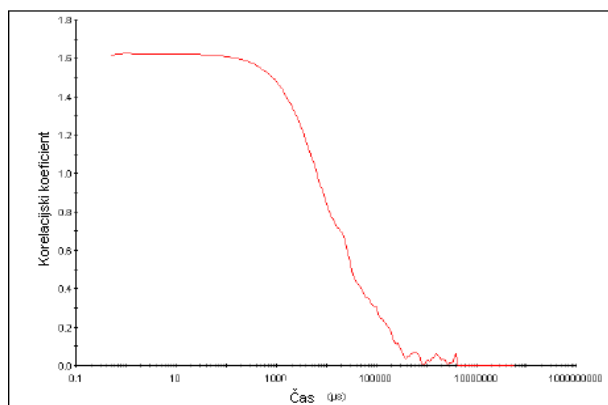
Ta dva testa preverjata primernost zgornje oz. spodnje meje velikosti, ki smo ju uporabili za prikaz rezultatov. Opozorilno sporočilo za ta dva testa se pojavi v primeru, da je uporabnik nepravilno nastavil najnižjo oz. najvišjo prikazano mejo. *Slika 12* prikazuje primer porazdelitve velikosti vzorca, kjer je najnižje prikazana meja nastavljena na 15 nm, kar je več od vrednosti povprečnega premera. Iz slike lahko vidimo, da je leva stran porazdelitve odrezana. Rešitev te težave je v spremembi nastavitve meje.



Slika 12: Porazdelitev velikosti glede na intenziteto za vzorec s povprečnim premerom 8,9 nm, kjer je bila najnižja prikazana meja ročno nastavljena na 15 nm.

- **Test 5: Ali je vrednost polidisperznega indeksa (PI) > 1?**

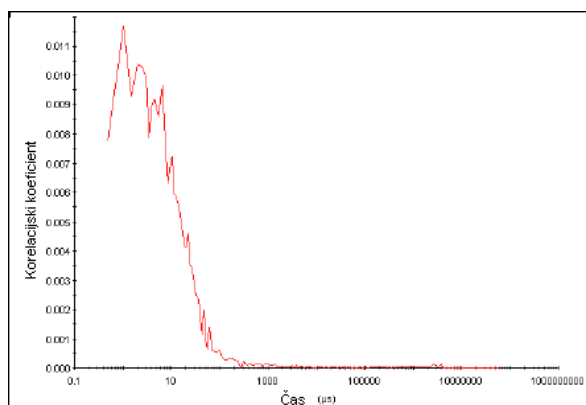
PI je brez dimenzije in ocenjuje širino porazdelitve velikosti, izračuna se iz kumulantne analize po ISO13321 standardu. Vrednost PI, ki je enaka 1, nakazuje na zelo široko porazdelitev velikosti, kar pomeni, da so v vzorcu prisotni veliki delci ali agregati, ki sedimentirajo. Vzorec je lahko tudi zelo polidisperzen in mogoče ni primeren za DLS-merjenje. Še en možni razlog za opozorilno sporočilo je v napačni nastavitvi položaja merjenja. Primer korelacijske funkcije za vzorec s PI enakim 1, je prikazan na *sliki 13*.



Slika 13: Korelacijska funkcija za vzorec s široko porazdelitvijo velikosti ($PI=1$), ki vsebuje velike delce, ki sedimentirajo.

➤ **Test 6: Ali je odsek (»intercept«) korelacijske funkcije $< 0,1$ ali $> 1,0$?**

Vrednost odseka predstavlja razmerje signal/šum in se spreminja glede na vzorec in optično konfiguracijo instrumenta. Primer korelacijske funkcije z vrednostjo odseka > 1 je prikazana na *sliki 13*, kar kaže prisotnost velikih delcev, ki sedimentirajo. Ti delci povzročajo, da je bazna linija nedefinirana in da poraste vrednost odseka nad 1. Vrednosti odseka, manjše od 0,1 nakazujejo na previsoko ali prenizko koncentracijo vzorca, na absorbenco ali fluorescenco vzorca. Primer korelacijske funkcije za vzorec, ki fluorescira in ima odsek $< 0,1$, je prikazana na *sliki 14*. Z uporabo ozko pasovnih filtrov ali druge valovne dolžine laserja lahko izboljšamo kvaliteto teh podatkov.



Slika 14: Korelacijska funkcija vzorca, ki fluorescira (vrednost preseka 0,011).

➤ **Test 7: Ali je prva korelacijska točka > 3 in povprečni premer < 5 nm?**

Ta test preverja, ali je ta točka, ki jo programska oprema uporabi pri distribucijski analizi, primerna za dobljeno velikost delcev.

➤ **Test 8: Ali je vrednost v območju (»in range«) manjša kot 90 %?**

Vrednost v območju je kazalec celotne kakovosti podatkov, ki jih dobimo iz meritve. Maksimalno dosežena vrednost je 100 % in večina učinkov, ki poslabša meritev, zmanjša to vrednost. Glavni razlog, da se pojavi opozorilno sporočilo je prisotnost velikih delcev, ki sedimentirajo, ali da vzorec fluorescira ali absorbira svetlobo.

➤ **Test 9a: Ali je povprečna vrednost sipanja < 20 kcps?**

Ta test preverja, ali je detektor zaznal dovolj sipanja med meritvijo. Večina razlogov za to opozorilo je v samem vzorcu: prenizka koncentracija vzorca, vzorec absorbira laserski žarek ali je vzorec nestabilen med meritvijo. Delci v vzorcu se lahko počasi raztapljajo, sedimentirajo ali se med meritvijo kako drugače spremenijo. V vseh teh primerih se bo sipanje s časom zmanjševalo. Takšni nestabilni vzorci niso primerni za DLS-meritve. Drugi možni razlog za opozorilo je nepravilna nastavitvev atenuatorja, kadar le-ta ni avtomatska.

➤ **Test 9b: Ali je povprečna vrednost sipanja > 1000 kcps?**

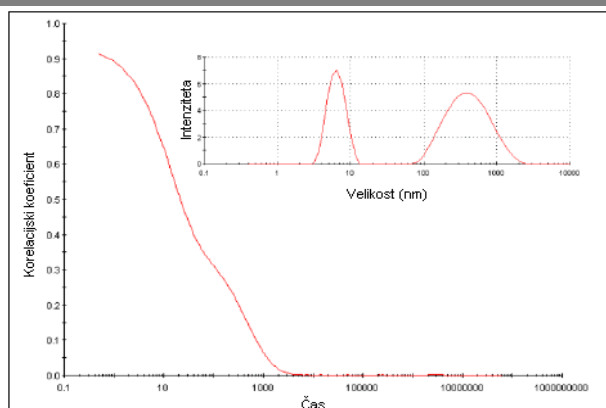
Ta test preverja, ali je detektor zaznal previsoko sipanje. Eden od razlogov za opozorilo je, kot v prejšnjem primeru, nepravilna namestitvev atenuatorja. Ostali razlogi pa so povezani z vzorcem. Vzorec lahko vsebuje velike delce, agregate, prah, kar povzroči visoko sipanje vzorca. Takšne delce je potrebno iz vzorca odstraniti, bodisi da jih pustimo, da sedimentirajo, bodisi da jih iz vzorca odfiltriramo oziroma da vzorec centrifugiramo. Vzorec je lahko tudi nestabilen, npr. da s časom agregira, kar povzroči porast sipanja (vzorec ni primeren za DLS-meritve).

➤ **Test 10: Ali je celokupno število zbranih fotonov $< 10000 \cdot 10^3$?**

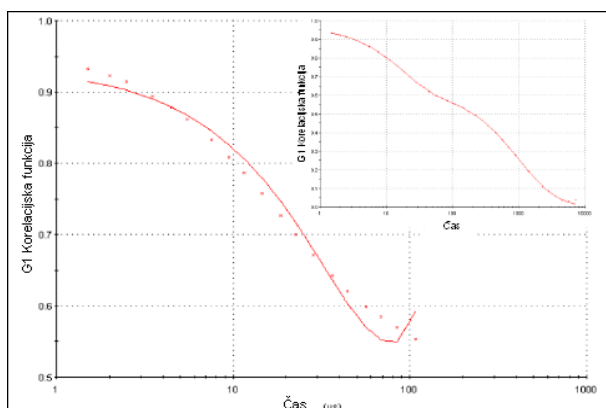
Ta test preverja, ali je bilo zbranih dovolj podatkov, in vsi razlogi za to opozorilo so povezani z nepravilno nastavitvijo programske opreme. Čas trajanja merjenja in položaj atenuatorja morda nista avtomatsko izbrana. Tretji razlog pa je povezan z raziskovalno programsko opremo (napačna vrednost filter faktorja).

➤ **Test 11: Ali je napaka kumulante prileganja $> 0,005$?**

Napaka kumulante prileganja je meritev kvalitete prileganja kumulante k izmerjenim podatkom in nam pokaže, ali sta povprečni premer in PI realni vrednosti. Opozorilno sporočilo se pojavi, če je napaka večja kot 0,005 (statistična vrednost, ki jo določi Zetasizer). Do tega pride, če je kvaliteta podatkov preslaba ali vzorec preveč polidisperzen za kumulantno analizo. Primer vzorca, ki ni primeren za DLS-meritev in kumulantno analizo, je na *sliki 13*. *Slika 15* prikazuje korelacijsko funkcijo in porazdelitev velikosti glede na intenziteto za bimodalni vzorec. Napaka kumulante prileganja v »Size Quality Report« pokaže, da povprečni premer in PI nista realna. Medtem ko je prileganje kumulante slabo zaradi bimodalnosti vzorca, je distribucijsko prileganje odlično (*slika 16*) in s tem tudi intenzitetna velikostna distribucija.



Slika 15: Korelacijska funkcija in intenzitetna velikostna distribucija (vloček v grafu), dobljeni pri analizi vzorca z bimodalno porazdelitvijo delcev.



Slika 16: Kumulanta prileganja in distribucija prileganja (vloček v grafu), dobljeni pri analizi vzorca z bimodalno porazdelitvijo delcev.

➤ **Test 12: Ali je napaka distribucije prileganja $> 0,005$?**

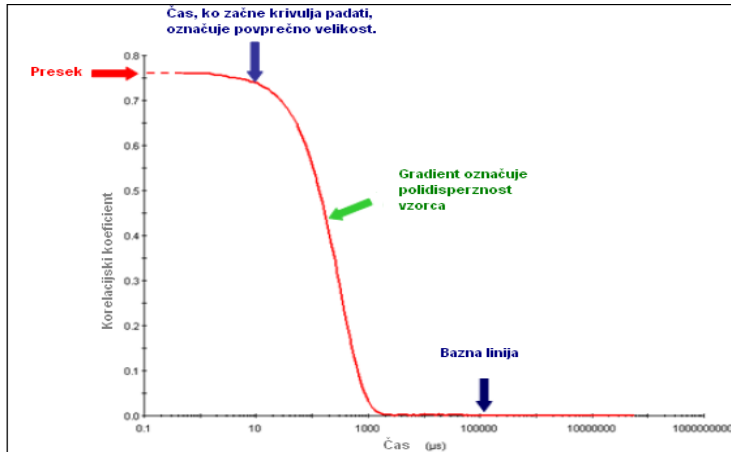
Napaka distribucije prileganja je meritev prileganja izbrane distribucijske analize k izmerjenim podatkom. Opozorilno sporočilo se pojavi, če je napaka večja kot 0,005 (statistična vrednost, ki jo določi Zetasizer). Do tega pride, če je kvaliteta podatkov premajhna ali če je vzorec preveč polidisperzen za distribucijsko analizo, kar kaže na to, da vzorec ni primeren za DLS-meritev. Primer vzorca, kjer se pojavi opozorilno sporočilo o tej napaki, je prikazan na *sliki 13*. Sporočilo, da je napaka večja od 0,005, se lahko pojavi tudi zaradi neprimerne nastavitve izbranega distribucijskega algoritma.

1.6.2 PONOVLJIVOST SIPANJA

Za preverjanje ponovljivosti je priporočena izvedba najmanj treh ponovitev meritev za vsak vzorec. Prvi parameter, ki ga moramo spremljati, je sipanje. Vrednosti ponavljajočih se meritev morajo biti znotraj nekaj odstotkov druga od druge. Padanje sipanja z uspešnimi meritvami kaže na pojav sedimentacije delcev, geliranja vzorca ali na raztapljanje delcev. Naraščanje sipanja z uspešnimi meritvami pa kaže na pojav nestabilnosti disperzije, in sicer na agregacijo, flokulacijo ali prisotnost mehurčkov. Vrednosti sipanja so naključne pri vzorcih, ki se spreminjajo s časom – agregirajo, razpadajo, ki imajo prisotne velike delce ali mehurček in ki niso homogeni (20, 21).

1.6.3 KORELOGRAM

Korelogram prikazuje korelacijski koeficient v odvisnosti od časa. Iz oblike krivulje korelogramov lahko razberemo nekatere značilnosti vzorca (*slika 17*) (20).



Slika 17: Shematični prikaz informacij, ki jih lahko razberemo iz korelograma.

2 NAMEN DELA

DLS se dandanes široko uporablja za merjenje velikosti delcev v nanometrskem območju. Med napravami, ki temeljijo na tem principu merjenja, je na tržišču zelo uveljavljen Zetasizer Nano ZS, ki smo ga uporabili tudi v naši nalogi. Sama meritve je precej enostavna; ključnega pomena za dobljene rezultate pa je sama priprava vzorca in interpretacija dobljenih podatkov.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, kako narava in priprava vzorca vplivata na rezultat DLS-meritve velikosti delcev. V prvem sklopu eksperimentalnega dela bomo z DLS-metodo preverili kakovost različnih vod in izbrali tisto, ki jo bomo v nadaljevanju uporabili kot disperzni medij za pripravo naših vzorcev. Kot modelne delce bomo uporabili komercialno dostopne nanodelce BaSO_4 in TiO_2 , ki jih bomo najprej pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Nato bomo z uporabo DLS ugotavljali velikost delcev BaSO_4 in TiO_2 v vodnih disperzijah ter velikost delcev BaSO_4 v 96 % etanolu. Proučili bomo, ali način priprave vzorca in njegova koncentracija vplivata na rezultat meritve velikosti, in kritično ovrednotili podatke, ki jih dobimo kot rezultat meritev.

V nadaljevanju bomo ugotavljali uporabnost DLS-metode za določanje velikosti micelov površinsko aktivne snovi in ali lahko na podlagi teh meritev ugotovimo CMC izbrane površinsko aktivne snovi. Spet se bomo osredotočili predvsem na povezavo med načinom priprave vzorca, njegovo koncentracijo in izmerjeno velikostjo micelov ter kritično interpretacijo rezultatov.

Cilj naloge je na podlagi praktičnih primerov meritev različnih vzorcev ugotoviti, kateri so ključni koraki pri pripravi vzorca in značilnosti vzorca, na podlagi katerih lahko že v naprej približno ocenimo, ali je vzorec primeren za DLS-analizo ali ne.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

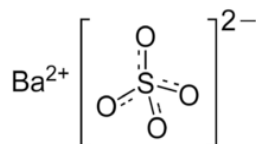
➤ ULTRA ČISTA VODA (PureLab Ultra)

Za pripravo vzorcev smo uporabili ultra čisto vodo, ki ima pri 25°C gostoto (δ) 0,9970 g/cm³, viskoznost (η) 0,8937 mPas in lomni količnik (μ) 1,3330. Ultra čista voda je filtrirana voda, ki vsebuje zelo malo kemijskih primesi ostalih elementov.

➤ 96% ETILNI ALKOHOL/ETANOL (Kefo)

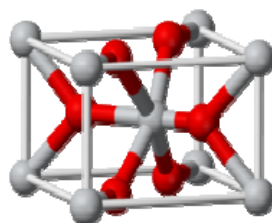
Kvaliteta ustreza Ph. Eur. 6th Ed.. Vrednosti nekaterih lastnosti etanola pri 25°C so sledeče: gostota 0,7852g/cm³, viskoznost 1,040 mPas in lomni količnik 1,361.

➤ BARIJEV SULFAT



Sachtoperse HU-N; Barium Sulphate #300010047; Manufacturer Sachtleben Chemie GmbH; deklarirana velikost nanodelcev 40 nm.

Barijev sulfat je bel kristaliničen prašek z molsko maso 233,43 g/mol. V vodi je praktično netopen (0,0002448 g/100 ml pri 20 °C) oz. (0,000285 g/100 ml pri 30 °C), v etanolu pa je netopen. Lomni količnik BaSO₄ je 1,64 in gostota 4,50 g/cm³.



➤ TITANOV DIOKSID

Titanov (IV) oksid; nanodelci; 99,5 % rutil; 637262-25G ALDRICH; deklarirana velikost nanodelcev: ~10 nm x 40 nm.

Titanov dioksid je bel prah z molsko maso 79,88 g/mol in gostoto 3,9 – 4,2 g/cm³. V naravi se nahaja v več polimorfnih modifikacijah: *rutil* (najstabilnejši), *anatas* in *brookit*. V vodi je praktično netopen. Ima zelo visok lomni količnik (za rutil 2,76) (29).

➤ **NATRIJEV DODECIL SULFAT (SDS)** ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)

Proizvajalec Merck KGaA 8.17034.1000



SDS je v obliki belih do blede rumenih kristalov ali prahu. Je anionska površinsko aktivna snov, dobro topna v vodi. Molska masa SDS je 288,38 g/mol in gostota 1,07 g/cm³ pri 20 °C. Kritična micelarna koncentracija SDS je 8,2 mmol/l pri 20°C (29).

3.2 APARATURE

➤ **ZETASIZER NANO ZS**

Proizvajalec Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija

Malvernov instrument Zetasizer Nano ZS (*slika 18*) omogoča meritve treh značilnosti delcev ali molekul v tekočem mediju: velikost delcev, zeta potencial in molekulsko maso. Opremljen je z monokromatskim He-Ne laserjem s fiksno valovno dolžino 633 nm. Sipano svetlobo



detektira detektor, ki je opremljen z »avalanch« fotodiodo (APD), ki je nameščena pod kotom 173° glede na vpadni kot laserske svetlobe. Detektor zazna svetlobo, ki se sipa nazaj glede na pot laserske svetlobe t.i. »backscatter« detekcija. Območje merjenja velikosti je od 0,6 nm do 6 μm.

Slika 18: Malvernov instrument Zetasizer Nano ZS.

➤ **TEHTNICA**

Proizvajalec *METTLER TOLEDO* AG 245, Švica

➤ **ULTRAZVOČNA KADIČKA**

Proizvajalec *SONIS* Pan Iskra

➤ **ULTRAZVOČNA SONDA**

Proizvajalec *COLE PARMER Instruments*, Illinois

Model:CPX 500; Power: 500W; Freq: 20kHz; Volts: 230V

3.3 METODE

3.3.1 PRIPRAVA DESTILIRANE IN BIDEŠTILIRANE VODE TER ANALIZA KVALITETE VODE S FOTONSKO KORELACIJSKO SPEKTROSKOPIJO

Destilirano in bideštilirano vodo smo pripravili iz prečiščene vode v stekleni destilacijski napravi. V 500 ml vode (prečiščene ali enkrat destilirane) smo dodali 0,079 g KMnO_4 in 0,1 g NaOH, vrele kamenčke ter nato pričeli destilirati. Kvaliteto vode smo preverjali z Zetasizerjem Nano ZS.

3.3.2 PRIPRAVA DISPERZIJE NANODELCEV BARIJEVEGA SULFATA IN TITANOVEGA DIOKSIDA

a) Najprej smo pripravili suspenzije nanodelcev z različnimi koncentracijami, tako da smo v 100 ml merilno bučko natehtali ustrezno maso vzorca (5 mg, 10 mg, 20 mg, 35 mg, 50 mg, 100 mg, 400 mg, 600 mg) in dopolnili z disperznim medijem (bideštilirana voda oz. etanol) do ustreznega volumna, vzorec dobro pretresli in pričeli z merjenjem. Rezultati za te meritve so v tabeli označeni: *PRED UZ*.

b) Po prvi seriji meritev smo bučke z vzorci postavili za eno uro v ultrazvočno kadičko. Vzorce smo med soniciranjem večkrat ročno pretresli, zato da smo preprečili nastanek zbitega sedimenta, ki je nastajal predvsem pri vzorcih BaSO_4 . Voda v ultrazvočni kadički se s časom soniciranja segreva in z njo tudi vzorci, zato smo pred meritvami vedno počakali, da so se vzorci ohladili do sobne temperature. Rezultati za te meritve so v tabeli označeni: *PO UZ*.

c) Nato smo del vzorca iz bučke prelili v centrifugirko (okrog 20 ml), ostali del vzorca pa smo čez noč pustili sedimentirati. Na sredino vzorca v centrifugirki smo namestili ultrazvočno sondo. Vzorec z BaSO_4 smo sonicirali enkrat pri 30 % amplitudi 2 min. Vzorce TiO_2 pa smo postavili na UZ sondo s 30 % amplitudo za 2 min, 4 min, 6 min in 8 min.. Vsi vzorci so se med soniciranjem močno segreli, zato smo jih vedno ohladili na sobno temperaturo, preden smo pričeli z merjenjem na Zetasizerju. Rezultati teh meritev so v tabeli, označeni kot *SONDA 2 min, SONDA 4 min ...*

d) Naslednji dan smo pomerili velikost delcev, ki so ostali dispergirani v supernatantu, ki smo ga s pomočjo kapalke za enkratno uporabo prenesli v kiveto. Rezultati teh meritev so v tabeli, označeni kot *SUPERMATANT*.

e) Vzorce s še nižjimi koncentracijami smo pripravili tako, da smo najprej stehali prazno 100 ml merilno bučko in nato vanjo natehtali večjo količino nanodelcev (za BaSO_4 400 mg, za TiO_2 200 mg) ter dopolnili z bidestilirano vodo do oznake. Tako pripravljen vzorec z višjo koncentracijo smo postavili za eno uro v UZ-kadičko, vmes smo vzorec večkrat ročno pretresli, da nebi nastal zbiti sediment. Po končanem soniciranju smo pustili bučko z vzorcem v mirovanju do naslednjega dne, nato smo s pomočjo pipete ločili ves supernatant od sedimenta. Sediment smo v sušilniku posušili do konstantne mase, nato pa smo stehali maso sedimenta in posredno določili koncentracijo delcev v supernatantu. Supernatant smo redčili z bidestilirano vodo do bistrega videza, in sicer 30/100, 15/100, 5/100, 3/100, 3/200, 3/400, 1/400, 1,5/1000. Tako pripravljenim vzorcem smo takoj po pripravi pomerili povprečno velikost delcev v disperziji. Ti rezultati so v tabeli označeni kot *REDČITEV SUPERNATANTA*.

3.3.3 PRIPRAVA RAZTOPINE SDS

a) Pripravili smo raztopine SDS z različnimi koncentracijami (koncentracije pod in nad cmc): 0,001 mol/l, 0,0025 mol/l, 0,005 mol/l, 0,0075 mol/l, 0,01 mol/l, 0,025 mol/l, 0,05 mol/l, 0,1 mol/l, 0,5 mol/l. Serijo vzorcev smo pripravili tako, da smo najprej ustrezno količino SDS v obliki prahu s pomočjo analitične tehtnice natančno natehtali v 100 ml bučko, ki smo jo predhodno temeljito oprali in večkrat splaknili z bidestilirano vodo, ter vzorec dopolnili z bidestilirano vodo do ustreznega volumna. Vse bučke smo nato dali v UZ-kadičko za približno pol ure, da se je ves SDS popolnoma raztopil. Pri tem so se vzorci nekoliko segreli, zato smo jih pred meritvami pustili ohlajati do sobne temperature. Po uspešno izvedenem merjenju smo pokrite kivete z vzorci shranili in jih pustili v mirovanju 48 ur. Po dveh dneh smo tako shranjene vzorce ponovno pomerili, ne da bi jih pretresli. Rezultati za te vzorce so iz tabele razvidni: *NATEHTAN – POMERJEN TAKOJ in NATEHTAN – V KIVETI POMERJEN PO 48 URAH*.

b) Vzorce smo pripravili še na nekoliko drugačen način, in sicer z redčenjem osnovnega vzorca z višjo koncentracijo (0,5 mol/l). Le-tega smo pripravili dan prej, tako da smo v 100 ml bučko natehtali ustrezno količino SDS (5767,6 mg) in z bidestilirano vodo zelo počasi dopolnili do oznake. Zaradi visoke koncentracije SDS se je vzorec v bučki močno penil, kar nam je otežilo natančno dopolnitev do 100 ml. Vedno smo počakali, da se je pena nekoliko razbila in šele nato po kapljicah nadaljevali z dopolnjevanjem. Tako pripravljen osnovni vzorec smo postavili v UZ-kadičko, da se je ves SDS raztopil. Z redčenjem osnovnega vzorca

smo nadaljevali naslednji dan. Zaradi primerjave rezultatov smo načrtovali redčitve glede na koncentracije natehtanih vzorcev (konc. natehtanih in redčenih vzorcev namreč sovpadajo). S pomočjo pipete smo iz osnovnega vzorca odvzeli določen volumen vzorca, ga dali v čisto 100 ml bučko in le-to dopolnili do oznake z bidestilirano vodo. Tako pripravljene vzorce smo pred polnjenjem v kiveto še filtrirali skozi 0,1 μm filter. Preden smo kiveto začeli polniti s filtratom vzorca, smo prve tri kapljice filtrata spustili v odtok, zato da bi odstranili morebitno prisoten prah na filtru in s tem preprečili kontaminacijo vzorca. Z ostalim filtratom smo polnili kiveto (približno 1 ml). Za vsak vzorec smo uporabili novo brizgo, nov filter in novo kiveto. Vse kivete smo takoj po polnitvi zaprli s pokrovčkom. Temu je sledilo merjenje vzorcev na Zetasizerju. Zaprte kivete smo shranili 48 ur in jih po dveh dneh mirovanja ponovno pomerili. Rezultati za te vzorce so iz tabele razvidni kot *REDČEN – FILTER – POMERJEN TAKOJ* in *REDČEN – FILTER – V KIVETI POMERJEN PO 48 URAH*.

3.3.4 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

Velikost in obliko delcev BaSO_4 smo vizualizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Prašek ND smo pritrdili na kovinske nastavke z dvostranskim prevodnim ogljikovim trakom (premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija) in jih opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP (Oberkochen, Zeiss, Nemčija) s pospeševalno napetostjo 1,00 kV in z uporabo sekundarnega detektorja.

3.3.5 MERJENJE POVPREČNE VELIKOSTI DELCEV IN MICELOV

Vse meritve smo izvajali pri 25 °C v polistirenski kiveti za enkratno uporabo (v napravi je področje za celice oz. kivete, ki je popolnoma zaprto in kontrolira temperaturo vzorca). Pred polnjenjem smo kiveto sprali z vzorcem in šele nato smo vanjo previdno nalili približno 1 ml vzorca, pri tem smo morali paziti, da ni nastal zračni mehurček. Polnjenje kivet z vzorci višjih koncentracij predvsem pri vzorcih z SDS-om je bilo oteženo, ker so se le-ti močno penili. Mehurčkov smo se poskušali znebiti s kratkim soniciranjem vzorca v UZ-kadički (2 s) oz. s pomočjo kapalke smo jih poskusili odstraniti s stene kivete. V primeru neuspešne odstranitve le-teh smo vzorec v kiveti zavrgli in ponovno vzorčili. Mehurčki namreč zelo motijo meritve, ponovljivost meritev in s tem interpretacijo rezultatov. Takoj po uspešnem vzorčenju smo kiveto pokrili s pokrovčkom, jo obrisali s papirčkom, še enkrat pregledali, ali je čista in brez mehurčkov, in jo vstavili v Zetasizer v za kiveto namenjen tesno zaprt termostatisiran prostor ter izvedli meritve. Najpomembnejša parametra, pri katerih je bila izvedena meritve, sta bila temperatura vzorca (25 °C) ter viskoznost medija (viskoznost bidestilirane vode je bila

0,8872 mPas). Vedno smo izvedli tri ponovitve meritev na istem vzorcu, zato da bi preverili ponovljivost. Pri merjenju velikosti nanodelcev smo za isto serijo vzorcev uporabili isto kiveto, ki pa smo jo vedno pred vsako naslednjo polnitvijo dobro sprali z vzorcem. Meritve smo izvajali od najnižje koncentracije do najvišje. Pri merjenju velikosti micelov pa smo za vsak vzorec uporabili novo kiveto.

3.3.6 ANALIZA REZULTATOV MERITEV

Za analizo rezultatov smo uporabili intenzitetno distribucijsko analizo, torej porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe, ki je shranjena v poročilu, dobljenem direktno iz instrumenta Zetasizer Nano ZS, ki je opremljen s programsko opremo, ki analizira korelacijske funkcije z NNLS-analizo (»NNLS – non-negative least squares«). V tabelo smo vključili le tiste podatke, ki so pomembni pri interpretaciji rezultatov. V stolpec, označen s PIK 1, ki predstavlja hidrodinamični premer delcev, so vpisane vrednosti (v nm) in predstavljajo srednjo vrednost enega vrha na velikostni distribuciji, kar pomeni, da je velikost te skupine delcev okrog izpisane vrednosti. V stolpcu, označenem z odstotkom intenzitete, so vpisane vrednosti (v %) površine pod krivuljo, ki pripada danemu pik. Kumulantne analize se nismo posluževali, ker je bila večina vzorcev multimodalna in torej neprimerna za to analizo. Pri ocenitvi kvalitete podatkov, dobljenih iz Zetasizerja smo vedno najprej pregledali dobljeni korelogram in podatke o sipanju vzorca, ki nam veliko povedo o ponovljivosti meritev in samem vzorcu.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ANALIZA KAKOVOSTI VODE, KI JO V MERITVAH UPORABIMO KOT DISPERZNI MEDIJ

S pomočjo Malvernovega instrumenta Zetasizerja Nano ZS smo poskušali izbrati vodo, ki bi bila najustreznejša za izvedbo naših meritev, tj. voda z najnižjim sipanjem svetlobe. Spremljali smo »derived count rate« oz. sipanje, ki nam pokaže število fotonov, ki jih instrument zazna na sekundo. Nižje kot je sipanje, čistejša je voda. Čista voda oz. nizko sipanje disperznega sredstva je zelo pomembno pri vzorcih, ki šibko sipajo svetlobo (v našem primeru so to vzorci micelov), saj bi lahko nečistote v vodi bolj sipale svetlobo kot analizirani delci v vzorcu in tako prekrile prave vrednosti analita. Preverjali smo sipanje vodovodne vode, vode prečiščene z reverzno osmozo, ultra čiste vode in destilirane vode, ki smo si jo pripravili sami z destilacijo. Glede na povprečje izmerjenega sipanja svetlobe, ki je prikazan v tabeli 4, lahko sklepamo, da je najmanj čista vodovodna voda, kar je pričakovano, sledi ji 1x destilirana voda. K višjemu sipanju 1x destilirane vode je kljub večkratnemu spiranju s prečiščeno vodo mogoče prispevala tudi še ne dovolj čista steklovina. Povprečno sipanje ostalih treh vod se le malo razlikuje (sipanje vseh vzorcev je pod 30 kcps). Vrednosti sipanja za ultra čisto vodo dnevno nihajo; mogoče je to odvisno od samega vzdrževanja naprave za pripravo vode (npr. zamenjave deionizacijskih kartuš) in od kakovosti vhodne vode, ki pride v prečiščevalni sistem. Naprava PureLab Ultra za prečiščevanje vode naj bi zagotavljala stalno kakovost vode z merjenjem upornosti vode, ki mora biti za anorganske snovi enaka ali manjša od 18,2 MΩ·cm pri 25°C. Kljub temu da je povprečna vrednost sipanja za 2x destilirano vodo, ki smo si jo sami pripravili, najnižja, smo se odločili za uporabo ultra čiste vode. Prvič zato, ker med njima ni v samem sipanju bistvene razlike, drugič pa zato, ker je priprava 2x destilirane vode dolgotrajna. Za naše delo smo potrebovali veliko več vode, kot smo je dnevno uspeli 2x destilirati.

Tabela 4: Intenziteta sipanja (kcps) različnih vzorcev vod.

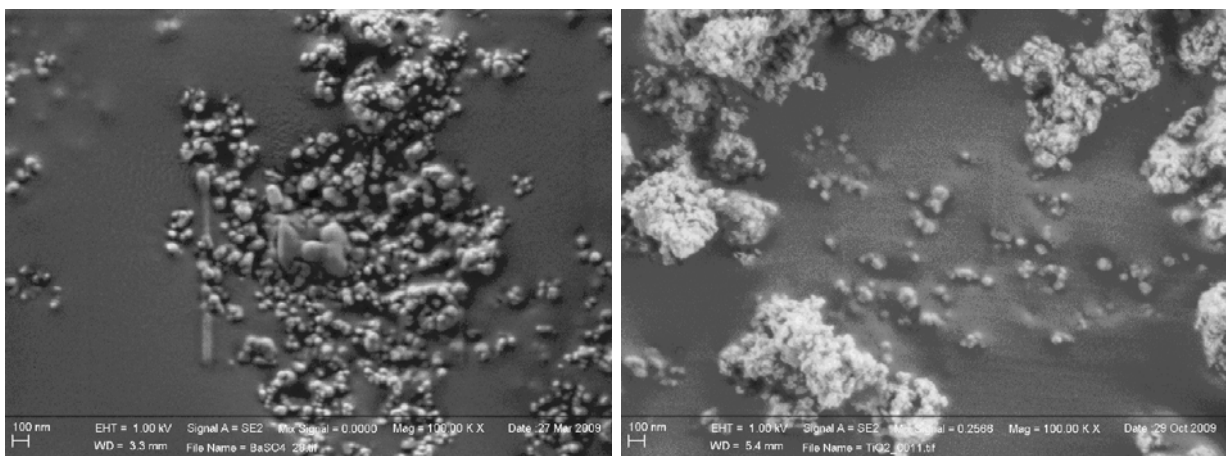
	VODOVODNA VODA	VODA PREČIŠČENA Z REVERZNO OSMOZO	ULTRA ČISTA VODA (PureLab Ultra)	1×DESTILIRANA VODA	2×DESTILIRANA VODA
POVPREČJE SIPANJA (kcps)	73,87	29,40	28,12	53,90	24,60

4.2 DOLOČANJE VELIKOSTI NANODELCEV

4.2.1 ANALIZA VELIKOSTI DELCEV BARIJEVEGA SULFATA IN TITANOVEGA DIOKSIDA V SUHI OBLIKI Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM (SEM)

Iz SEM-slike delcev BaSO_4 (slika 19, levo) vidimo, da so posamezni nanodelci sicer vidni, vendar jih je večina združena v manjše agregate. Vidnih je tudi nekaj večjih agregatov. Ocenimo lahko, da je večina posameznih delcev manjših od 100 nm.

Na SEM-sliki delcev TiO_2 (slika 19, desno) lahko vidimo, da je večina delcev TiO_2 združena v velike agregate (veliko večji od agregatov BaSO_4), a kljub temu lahko vidimo nekaj posameznih nanodelcev. Ocenimo lahko, da je velikost posameznih nanodelcev manjša od 100 nm.



Slika 19: SEM-slika delcev barijevega sulfata (levo) in SEM-slika delcev titanovega dioksida (desno).

4.2.2 IZGLED DISPERZIJ NANODELCEV

Slika 20 prikazuje disperzije BaSO_4 v 96 % raztopini etanola, slika 21 pa vzorce TiO_2 v vodi. Sklepamo lahko, da se delci TiO_2 bolje dispergirajo v vodi (že pri koncentraciji 0,20 mg/ml je vidna mlečno bela disperzija) v primerjavi z delci BaSO_4 v etanolu; delci BaSO_4 so se namreč takoj posedli na dno, dispergirani le majhen delež delcev BaSO_4 .



Slika 20: Prikaz vzorcev disperzije BaSO₄ v etanolu. Vzorci si sledijo od najnižje do najvišje koncentracije (od leve proti desni).



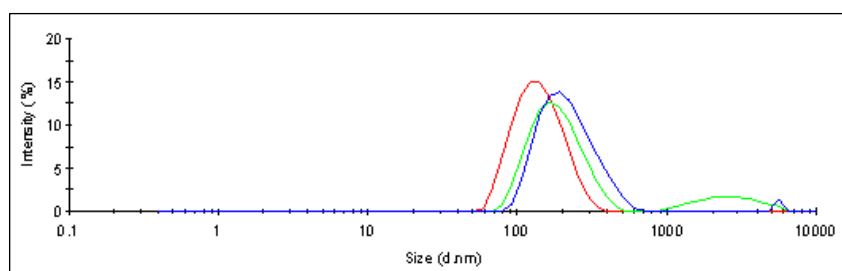
Slika 21: Prikaz vzorcev disperzije TiO₂ v vodi. Vzorci si sledijo od najnižje do najvišje koncentracije (od leve proti desni).

4.2.3 VELIKOST DELCEV BARIJEVEGA SULFATA V VODNIH DISPERZIJAH

Vse suspenzije delcev BaSO₄ v vodi so bile na videz mlečno bele barve, katere intenzivnost je naraščala s koncentracijo. SEM-slika delcev BaSO₄ v obliki prahu kaže, da so delci združeni v agregate. Že takoj po vizualnem pregledu vzorcev disperzij smo ugotovili, da so tudi v disperzijah prisotni veliki agregati, ki so se po končanem soniciranju v UZ-kadički v nekaj sekundah posedli na dno bučke in se z ročnim stresanjem niso ponovno redispersirali.

Vsi rezultati meritev so prikazani v tabelah v poglavju priloga. Reprezentativni rezultati meritev pa so v nadaljevanju predstavljeni v grafični obliki.

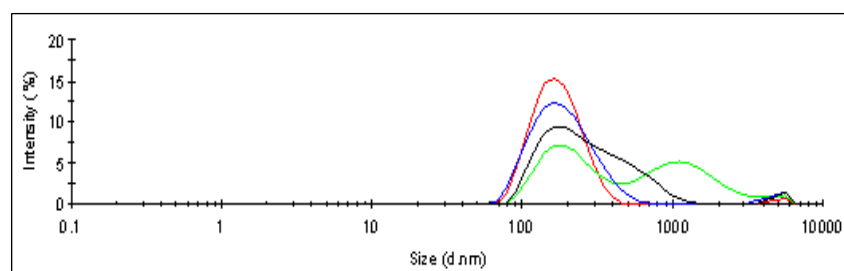
Slika 22 prikazuje porazdelitev velikosti delcev BaSO₄ v vodi takoj po pripravi vzorcev. Glede na to, da smo imeli nestabilne vzorce z agregati, ki so sedimentirali, in da za meritev na Zetasizerju Nano ZS potrebujemo le mililiter vzorca, se lahko zgodi, da le-ta ni reprezentativni predstavnik populacije vseh delcev v vzorcu. Kljub temu smo meritve vzorcev pred UZ (serija 1) izvedli in ugotovili, da je večina dobljenih meritev ustrezala 12 testom, ki smo jih predstavili v uvodu.



Slika 22: Porazdelitve velikosti delcev glede na intenziteto sipanja svetlobe za disperzije BaSO₄ v vodi pred uporabo UZ. Modra krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,50 mg/ml, rdeča s koncentracijo 0,76 mg/ml, zelena predstavlja koncentracijo 1,00 mg/ml.

Rezultati analize nižjih koncentracij vodnih disperzij delcev BaSO₄ kažejo, da je bil vzorec v času meritev dovolj stabilen, da smo lahko izmerili velikost delcev; kar pa v primeru ponovljenega poskusa z disperzijami delcev BaSO₄ v vodi z višjimi koncentracijami pred UZ (priloga 3) in za disperzijo delcev BaSO₄ v etanolu pred UZ ne drži, saj delci hitreje sedimentirajo in motijo meritev. Merjenje takšnih neustreznih vzorcev je dolgotrajno in neponovljivo. Iz slike 22 (zelena in modra krivulja) lahko vidimo, da je za večino vzorcev poleg pika okrog 180 nm z največjo intenziteto prisoten še najmanj en dodaten pik pri večjih velikostih, kar kaže na prisotnost agregatov v vzorcu. Izjema je bil vzorec disperzije BaSO₄ v vodi s koncentracijo 0,76 mg/ml, ki je bil takoj po pripravi stabilen brez prisotnosti večjih agregatov (slika 22, rdeča krivulja). Možna razlaga za takšno obnašanje vzorca je, da smo naključno natehtali ravno tiste praškaste delce BaSO₄, ki med shranjevanjem niso agregirali v večje skupke. Ponovno pripravljen vzorec z isto koncentracijo BaSO₄ v vodi pred UZ kaže čisto drugačen rezultat, tj. neustreznost vzorca. Ti rezultati kažejo, da je za zanesljivo analizo velikosti pomembno pripraviti več paralelnih vzorcev z isto koncentracijo.

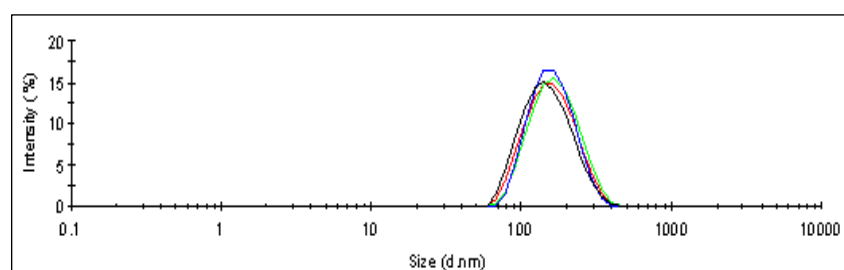
Vzorec, ki je primeren za DLS-analizo, ne sme vsebovati agregatov, ki med meritvijo sedimentirajo, zato smo poskušali agregate, ki so bili prisotni v naših vzorcih razbiti z uporabo ultrazvoka. Vzorce z višjimi koncentracijami smo morali med soniciranjem večkrat ročno pretresti zato, ker so se delci začeli združevati v skupke in adherirati na dno in stene bučke. Ti adherirani skupki so se po stresanju le delno redispergirali, saj krivulje še vedno kažejo prisotnost dodatnih pikov, ki nakazujejo prisotnost delcev v mikrometrskem območju (slika 23). Izjema ostaja vzorec s koncentracijo 0,76 mg/ml, ki je bil tudi po uporabi UZ stabilen. Spoznanje, da uporaba UZ-kadičke agregate delno razbije in istočasno na dnu bučke ustvari zbit sediment, ki ga je težko ponovno redispergirati, pride še bolj do izraza pri višjih koncentracijah (npr. 6,00 mg/ml, slika 23). Za razbitje teh agregatov je potreben vnos večje količine energije, zato smo te agregate skušali razbiti z uporabo ultrazvočne sonde.



Slika 23: Porazdelitev velikosti delcev $BaSO_4$ v vodi po uporabi UZ-kadičke: modra krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,76 mg/ml, črna s koncentracijo 1,00 mg/ml, rdeča s koncentracijo 4,00 mg/ml in zelena predstavlja koncentracijo 6,00 mg/ml.

Rezultati, prikazani na *sliki 24*, kažejo prisotnost le ene populacije delcev (en pik) ne glede na koncentracijo disperzije, kar pomeni, da večja moč UZ popolnoma razbije v vzorcu prisotne agregate. Soniciranje se je izkazalo kot učinkovit način za razbitje večjih agregatov, kljub temu pa so delci v vzorcu še vedno prisotni v obliki manjših agregatov, saj izmerjena velikost delcev ni enaka deklarirani (40 nm).

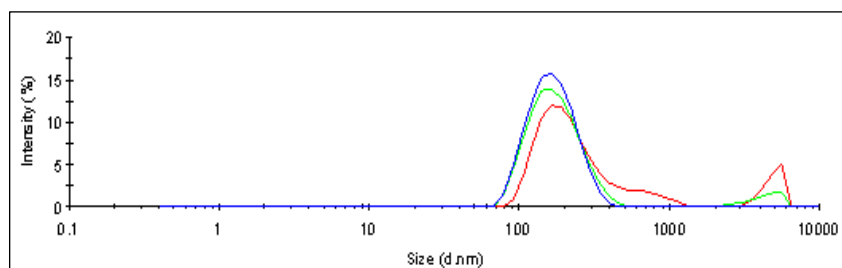
Preostali del vzorca smo pustili stati čez noč in mu naslednji dan izmerili velikost delcev v supernatantu, tj. delcev, ki so ostali dispergirani. Vsi agregati in določen delež manjših delcev je sedimentiral. V supernatantu so ostali dispergirani le nanodelci, kar potrjuje distribucija delcev na *sliki 25* (modra krivulja), viden je namreč le en pik s povprečno velikostjo delcev 170 nm.



Slika 24: Porazdelitev velikosti delcev $BaSO_4$ v vodi po uporabi UZ-sonde za 2 min. pri 30 % amplitudi: modra krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,76 mg/ml, črna s koncentracijo 1,00 mg/ml, rdeča s koncentracijo 4,00 mg/ml in zelena predstavlja koncentracijo 6,00 mg/ml.

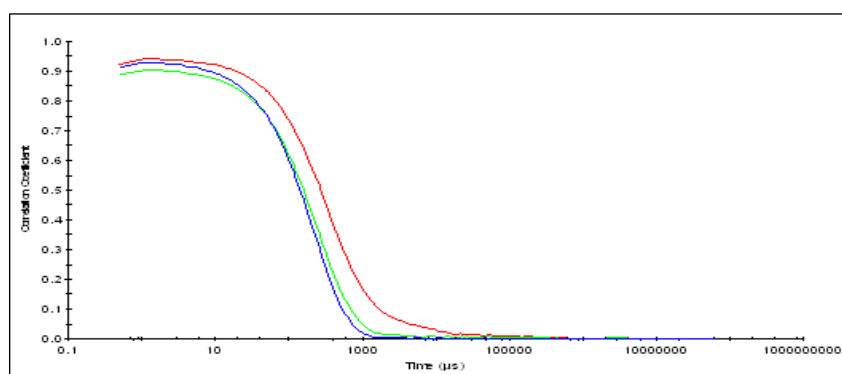
Vzorci, ali so ustrezni ali ne za DLS-meritev, lahko ocenimo takoj po pričetku merjenja že s pregledom korelogramov, še preden računalnik s pomočjo matematičnih analiznih metod izračuna porazdelitev velikosti. Porazdelitev velikosti delcev na *sliki 25* je odraz korelogramov na *sliki 26*. Meritev pred uporabo UZ predstavlja rdeč korelogram, ki se razlikuje od ostalih dveh. Prisotnost velikih delcev se namreč odraža na tem korelogramu z daljšim časom, ko začne korelacija padati, in neravno dvignjeno bazno linijo. Zeleni

korelogram ima še nekoliko dvignjeno bazno linijo, kar kaže na manjši delež prisotnih



agregatov, medtem ko je moder korelogram odraz vzorca brez prisotnih agregatov.

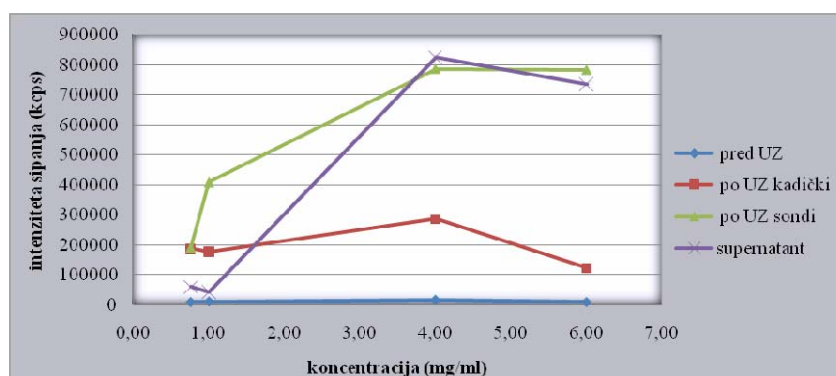
Slika 25: Porazdelitev velikosti delcev $BaSO_4$ v vodi pred uporabo UZ (rdeča krivulja), po uporabi UZ-kadičke (zelena krivulja) in za supernatant (modra krivulja) za vzorec s koncentracijo 0,50 mg/ml.



Slika 26: Korelogrami vzorca disperzije nanodelcev $BaSO_4$ v vodi s koncentracijo 0,50 mg/ml pred uporabo UZ (rdeča krivulja), po uporabi UZ-kadičke (zelena krivulja) in korelogram supernatanta (modra krivulja).

Eden izmed parametrov, ki nam veliko pove o ponovljivosti meritev, je tudi ponovljivost sipanja vzorca. Če želimo, da je vzorec ponovljiv, morajo biti vrednosti sipanja znotraj nekaj odstotkov druga od druge. Intenziteta sipanja svetlobe je odvisna od lastnosti in velikosti dispergiranih delcev ter od koncentracije vzorca. Iz *slike 27* vidimo, da intenziteta sipanja narašča s koncentracijo oz. s številom dispergiranih delcev v določenem volumnu. Najmanjše je sipanje vzorcev pred uporabo UZ. V teh vzorcih je prisotnih največ agregatov, ki zelo hitro sedimentirajo (že pred oz. med meritvijo), zato teh delcev naprava ne zazna in izmeri le sipanje delcev, ki so v disperziji. V nekaterih primerih sipanje s ponovitvami pada. Ta učinek je zlasti opazen pri vzorcih s koncentracijo 0,76 mg/ml in 1 mg/ml (*priloga 3*). Uporaba UZ del agregatov, ki so prisotni v vzorcu razbije, zato je delež delcev, ki so stabilno dispergirani v mediju večji, zato je tudi sipanje večje. Iz *slike 27* je razvidno, da je sipanje supernatanta visoko, kljub temu da je določen delež delcev sedimentiral. To bi lahko razložili z

izboljšanjem dispergiranja delcev oz. razbitjem manjših aglomeratov (tistih, ki ne sedimentirajo) po določenem času, saj je v večini primerov povprečna velikost nanodelcev v



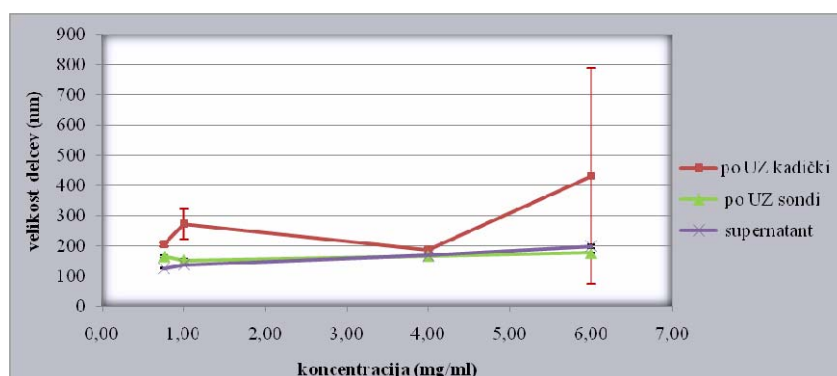
disperziji najmanjša pri supernatantu (*slika 28, slika 29*).

Slika 27: Povprečna intenziteta sipanja svetlobe v odvisnosti od koncentracije in od postopka priprave vzorca nanodelcev $BaSO_4$ v vodi (podatki iz tabele 6).

Običajno sipanje z večanjem koncentracije delcev v vzorcu narašča, kar prikazuje *slika 27* in kasneje še *slika 32*. To velja za koncentracije do 4 mg/ml, nato pa sipanje pade. Pri vzorcih z največjo koncentracijo na grafih opazimo rahel padec intenzitete sipanja svetlobe, kar je verjetno posledica večje težnje delcev po združevanju v skupke v bolj koncentriranih vzorcih in posledično sedimentacije večjega deleža delcev in zato manjšega sipanja. Druga možna razlaga je, da prične pri visokih koncentracijah (6 mg/ml) vzorec multiplo sipati svetlobo. Vzorec z najvišjo koncentracijo delcev $BaSO_4$ je bil na videz zelo moten, a meritve velikosti delcev kljub visoki koncentraciji (6 mg/ml) niso kazale večjih odstopanj v izmerjeni velikosti delcev glede na ostale vzorce (*slika 28, zelena krivulja*). Gre za vzorec, pri katerem sonda razbije večino agregatov, zato tak vzorec vsebuje več dispergiranih delcev, zato je največja možnost, da pride do medsebojnih interakcij delec-delec ali multiplega sipanja. Do multiplega sipanja pride pri preveč koncentriranih vzorcih, ko se svetloba, ki se siplje na enem delcu, nato naprej siplje na drugem delcu. Na rezultatu DLS-meritve se ta pojav pokaže kot zmanjšanje navidezne velikosti delcev in vrednosti odseka na y osi korelograma. Kadar ni prisotnega multiplega sipanja v vzorcu, sta ti dve vrednosti neodvisni od koncentracije v vzorcu (20).

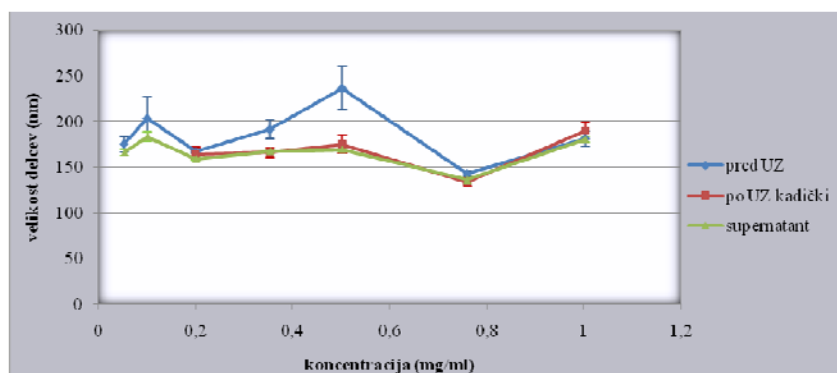
Sliki 28 in *29* prikazujeta povprečno velikost delcev (pik 1), dobljeno iz treh ponovitev v odvisnosti od koncentracije delcev v disperziji (ne prikazuje pa morebitno prisotnega pika 2 in pika 3). Če je intenziteta pika 1 100 %, to pomeni, da vzorec vsebuje le eno populacijo delcev. Na *sliki 29* vidimo, da velikost delcev, ki jo prikazuje pik z največjo intenziteto, kaže

nepravilen trend v vzorcih takoj po izdelavi, medtem ko je velikost po uporabi UZ in v



supernatantu neodvisna od koncentracije.

Slika 28: Povprečna velikost delcev (pik 1) v odvisnosti od koncentracije in od postopka priprave



vzorca z višjimi koncentracijami nanodelcev BaSO₄ v vodi (podatki iz priloge 3).

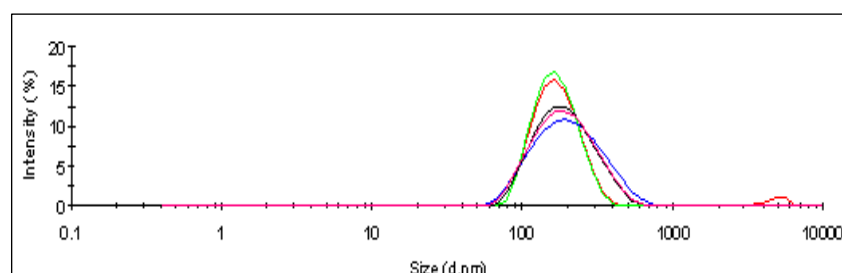
Slika 29: Povprečna velikost delcev (pik 1) v odvisnosti od koncentracije in od postopka priprave vzorca nanodelcev BaSO₄ v vodi (rezultat je povprečna vrednost treh meritev istega vzorca) (podatki iz priloge 2).

Na *sliki 28*, ki predstavlja velikost delcev (pik 1) za vzorce višjih koncentracij, ni vrisanih podatkov za vzorce pred uporabo UZ, saj le-ti variirajo in poleg tega vsebujejo vzorci najvišjih koncentracij različno velike agregate, ki predstavljajo glavno populacijo delcev v disperziji. V takem primeru ne moremo izpostaviti samo ene populacije z najvišjo intenziteto, saj naprava izmeri več populacij delcev nižje intenzitete. Iz *slike 28* lahko ugotovimo, da kažejo vzorci po uporabi UZ-kadičke v primerjavi s soniciranjem z UZ-sondo in supernatantom še vedno nepravilen trend, kar je pogojeno s prisotnostjo agregatov. Krivulji na *sliki 28*, ki predstavljata vzorce supernatanta in vzorce po soniciranju z UZ-sondo, kažeta neodvisnost velikosti delcev (pik 1) od koncentracije. Izmerjena povprečna velikost delcev je med 150 nm in 200 nm. Deklarirana velikost praškastih delcev pa je okrog 40 nm, kar pomeni, da so delci mogoče agregirali že med shranjevanjem ali da so delci zaradi velikih

kohezijskih sil med delci, ki so večje kot sile med delci in medijem, agregirali v samem disperznem mediju.

4.2.3.1 Rezultati analize velikosti delcev v supernatantu vzorca disperzije barijevega sulfata v vodi z začetno koncentracijo 4,00 mg/ml

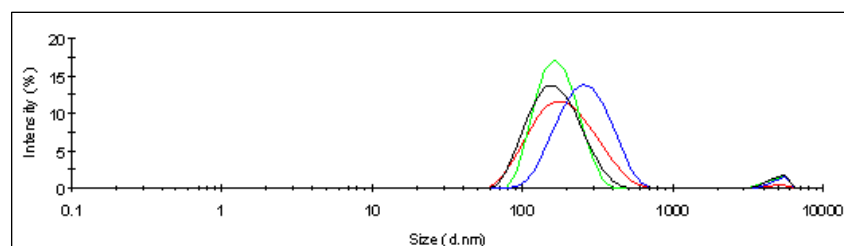
Iz začetne suspenzije s koncentracijo 4,00 mg/ml je po enem dnevu v 100 ml disperzije sedimentiralo 139 mg BaSO₄, kar pomeni, da je v supernatantu ostalo 261 mg. Iz *priloge 4* in *slike 30* lahko razberemo, da je v začetnem vzorcu supernatanta (2,61 mg/ml) Zetasizer Nano ZS zaznal tudi prisotnost agregatov, delež intenzitete sipanja, ki jo prispevajo t.i. delci (pik 2) pa je zelo majhen (1,5–2,9 %) v primerjavi z manjšimi delci. Z redčenjem supernatanta do koncentracije 0,08 mg/ml naprava pri večini meritev ne zazna prisotnosti agregatov (drugega pika) (*priloga 4, slika 30*), kar še ne pomeni, da v vzorcu ni agregatov, lahko je le delež teh tako majhen v primerjavi z ostalimi delci, da zato Zetasizer ne izriše pika za te delce.



Slika 30: Porazdelitev velikosti delcev BaSO₄ v vodi z različnimi koncentracijami. Vzorce smo pripravili z redčenjem supernatanta vzorca z začetno koncentracijo 4,00 mg/ml. Zelena krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,08 mg/ml, modra s koncentracijo 0,13 mg/ml, črna s koncentracijo 0,39 mg/ml, roza s koncentracijo 0,78 mg/ml. in rdeča predstavlja koncentracijo 2,6 mg/ml.

Ko supernatant redčimo (od koncentracije 0,04 mg/ml do 0,004 mg/ml), se pri vseh meritvah pojavi dodaten pik delcev v mikrometrskem področju. Delež intenzitete sipanja delcev, ki jih predstavlja pik 2, narašča z nižanjem koncentracije (*slika 31*). Pri najbolj razredčenem vzorcu se delež manjših delcev toliko zmanjša, da pridejo zaradi tega do izraza tudi večji delci, ki bolj sipajo svetlobo kot manjši delci, čeprav jih je številčno mnogo manj kot manjših delcev. To dokazuje, da le majhen delež velikih delcev znatno vpliva na rezultat meritev, zlasti pri razredčenih vzorcih. Z redčenjem naših vzorcev (do koncentracije 0,004 mg/ml) smo šli krepko pod priporočeno minimalno koncentracijo, ki je za delce velikosti od 100 nm do 1 μm 0,01 mg/ml, kar velja za delce z gostoto 1 g/cm³ (20). Zetasizer Nano ZS je vse meritve

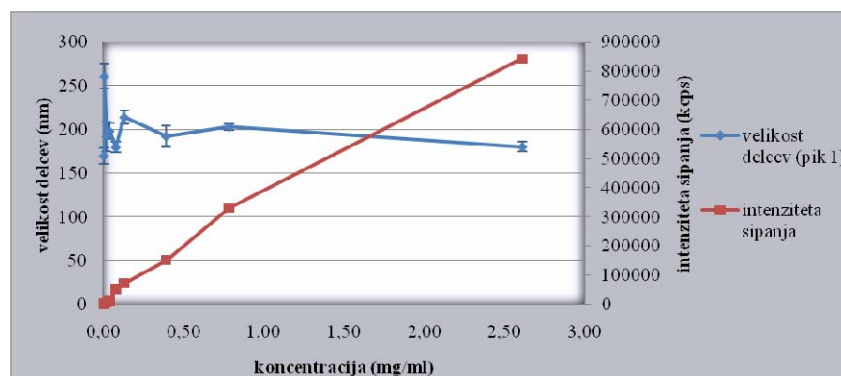
redčenih vzorcev označil za uspešne. Sipanje vzorcev ves čas konstantno narašča s koncentracijo do koncentracije vzorca 2,61 mg/ml, medtem ko velikost delcev, ki jih prikazuje pik 1 pri nižjih koncentracijah veliko bolj niha (140 nm–230 nm) kot pri višjih



(slika 32).

Slika 31: Porazdelitev velikosti delcev $BaSO_4$ v vodi z različnimi koncentracijami. Vzorce smo pripravili z redčenjem supernatanta vzorca z začetno koncentracijo 4,00 mg/ml. Črna krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,004 mg/ml, modra s koncentracijo 0,007 mg/ml, zelena s koncentracijo 0,02 mg/ml in rdeča s koncentracijo 0,04 mg/ml.

Na splošno velja, da višje koncentracije vodijo k bolj ponovljivim meritvam kot nižje koncentracije. V obeh primerih predpostavimo, da je kontaminacija s prašnimi delci enaka in v taki meri količina sipane svetlobe zaradi delcev v vzorcu narašča s koncentracijo vzorca, medtem ko je sipanje zaradi morebitne kontaminacije s prašnimi delci konstantno (20).



Slika 32: Povprečna velikost delcev, ki jih prikazuje pik 1 (modra krivulja), in povprečna intenziteta sipanja vzorca (rdeča krivulja) v odvisnosti od koncentracije delcev $BaSO_4$ v vzorcu, ki smo ga pripravili z redčenjem supernatanta (rezultat je povprečna vrednost treh meritev istega vzorca).

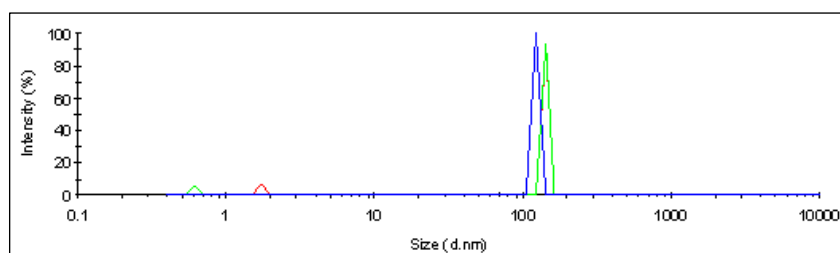
4.2.4 VELIKOST DELCEV BARIJEVEGA SULFATA V DISPERZIJAH S 96 % ETANOLOM

Vzorce $BaSO_4$ v 96 % etanolu smo pripravili na enak način kot vzorce $BaSO_4$ v vodi. Že takoj po pripravi so bili v vzorcih vidni agregati, ki so se takoj posedli na dno bučke (slika 20). To

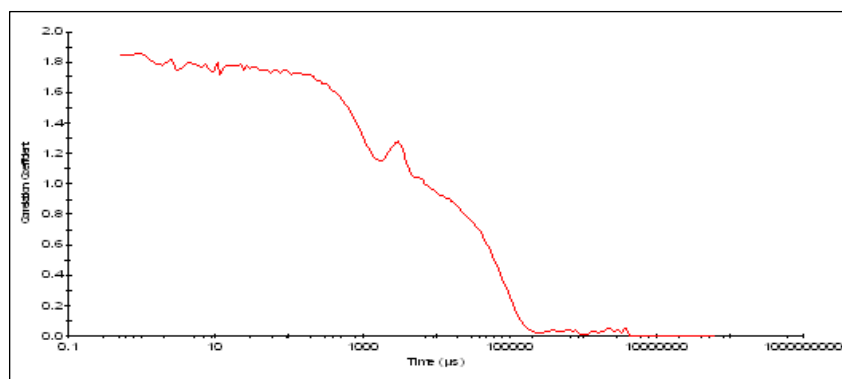
so potrdile tudi meritve velikosti, ki niso bile ustrezne glede na vse parametre, ki jih poda Zetasizer (skoraj vseh 12 testov je bilo neustreznih). Posamezne meritve so trajale zelo dolgo, kar kaže na heterogenost vzorca, ki se spreminja tekom meritve. Tako pripravljene vzorci torej niso ustrezali zahtevam za meritve velikosti delcev z DLS-jem.

Rezultate velikosti delcev BaSO_4 v etanolu pred uporabo UZ predstavljamo le kot primer meritev vzorca, ki ne ustreza zahtevam za meritev z DLS. Iz *priloge 5* in *slike 33* lahko razberemo, da so rezultati treh ponovitev meritev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe povsem različni in neponovljivi. Korelogram na *sliki 34* je tipičen za vzorec, ki vsebuje velike delce, ki med meritvijo sedimentirajo in motijo meritev. Prisotnost tako velikih delcev v vzorcu se pokaže na korelogramu kot nedefinirana bazna linija, kar povzroči, da so vrednosti odseka na y osi večje od ena. Korelacija začne tudi dokaj pozno padati in za korelacijsko funkcijo je značilno, da ima več odsekov z različnimi nakloni, kar potrjuje prisotnost velikih polidisperznih delcev v vzorcu. *Slika 35* ponazarja prileganje meritev k uporabljeni distribucijski analizi. V tem primeru vidimo, da porazdelitev velikosti delcev ni realna, saj rezultati meritev ne korelirajo z uporabljeno distribucijsko analizo.

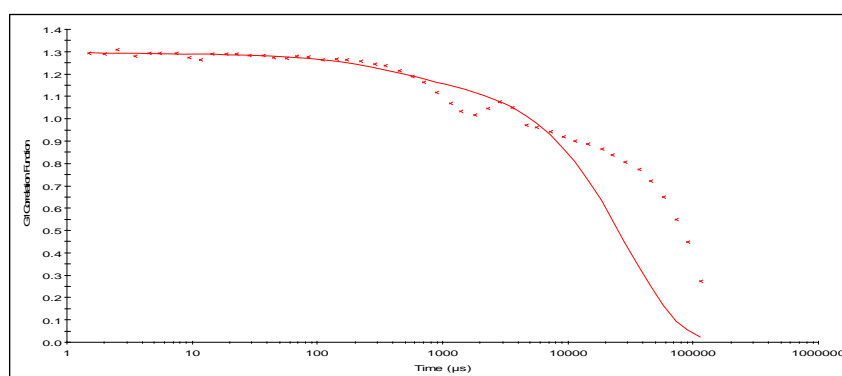
Rezultati meritev vzorcev BaSO_4 v etanolu po soniciranju v UZ-kadički so ustrezni in kažejo podobne ugotovitve kot pri meritvah vodnih disperzij BaSO_4 . Z uporabo UZ so se delci BaSO_4 hitro dispergirali v etanolu, pri višjih koncentracijah je sicer nastala usedlina, ki pa se je le z rahlim stresanjem takoj redispergirala.



Slika 33: Porazdelitev velikosti delcev BaSO_4 v etanolu pred uporabo UZ za tri ponovitve meritev na istem vzorcu, ne da bi jemali kiveto iz naprave.

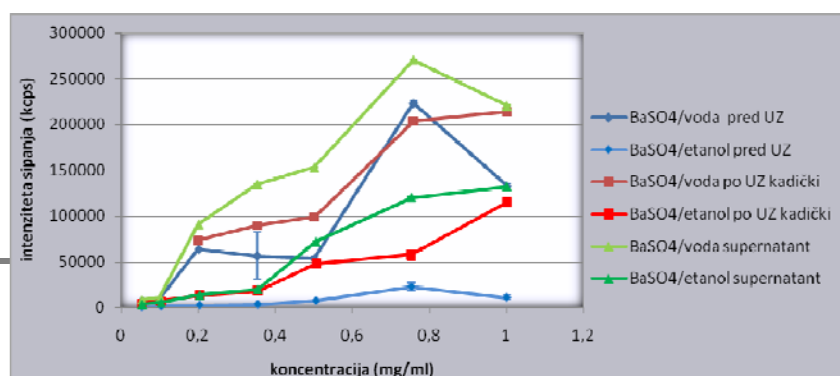


Slika 34: Korelogram vzorca disperzije nanodelcev BaSO_4 v etanolu s koncentracijo $0,20 \text{ mg/ml}$ pred uporabo UZ; vzorec, ki vsebuje široko porazdelitev velikosti delcev z velikimi delci, ki sedimentirajo.



Slika 35: Prileganje meritev (***) k uporabljeni distribucijski analizi (—) za vzorec disperzije nanodelcev BaSO_4 v etanolu s koncentracijo $0,20 \text{ mg/ml}$ pred uporabo UZ; vzorec, ki vsebuje široko porazdelitev velikosti z velikimi delci, ki sedimentirajo.

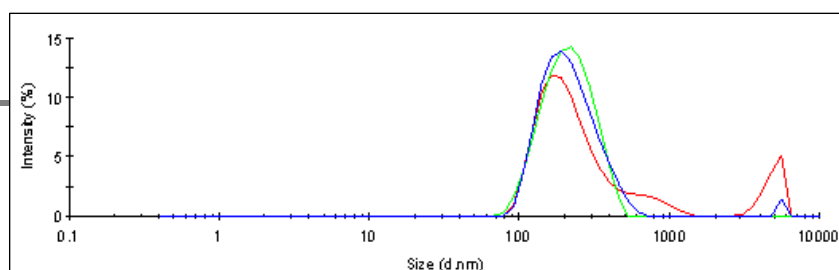
Iz priloge 5 in slike 36 lahko razberemo, da so vrednosti intenzitete sipanja dosti nižje pri vseh vzorcih, pripravljenih v etanolu, v primerjavi z vzorci, ki smo jih pripravili v vodi, kar pomeni, da delci v etanolu dosti hitreje sedimentirajo. Nižja gostota etanola ($0,7852 \text{ g/cm}^3$) v primerjavi z gostoto vode ($0,9970 \text{ g/cm}^3$) prispeva k temu, da je hitrost sedimentacije delcev BaSO_4 v etanolu hitrejša kot v vodi. To se odraža pri delcih v vzorcu pred uporabo UZ kot padec intenzitete sipanja med ponovitvami meritev istega vzorca. Nekaterih vrednosti velikosti delcev v vzorcu pred uporabo UZ naprava sploh ne more izmeriti. Velikost delcev BaSO_4 v etanolu po soniciranju v UZ-kadički se gibljejo od 150 nm do 250 nm , vrednosti v supernatantu pa so bolj ponovljive in v ožjem razponu (med 200 in 250 nm).



Slika 36: Povprečna intenziteta sipanja svetlobe v odvisnosti od koncentracije in od postopka priprave vzorca nanodelcev BaSO₄ v vodi in v etanolu.

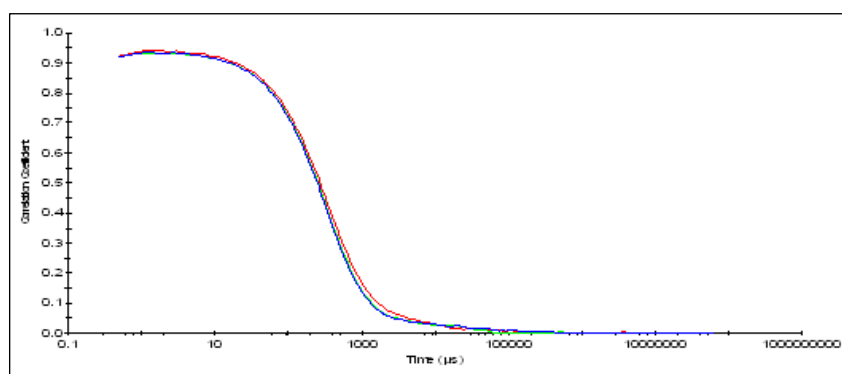
4.2.5 KRITIČEN PRISTOP K INTERPRETACIJI REZULTATOV

Opažena multimodalnost vzorcev je pomemben podatek pri določitvi in fizikalnem pomenu vrednosti R_h (hidrodinamski premer), zato je nesmiselno računanje povprečnega R_h z uporabo kumulantne analize v primeru vzorcev, ki kažejo multimodalno obnašanje. Na žalost podatki iz literature pogosto zanemarijo naravo distribucije velikosti in podajo rezultat kot povprečno velikost glede na kumulantno analizo (10). Zelo pomembna je ponovljivost DLS-meritev, ki jo z lahkoto preverimo, in sicer z večkratnimi ponovitvami meritev istega vzorca. Pri našem raziskovalnem delu smo pri vseh vzorcih izvedli tri ponovitve, ki so v mnogih primerih varirale in tako otežile interpretacijo dobljenih rezultatov. *Slika 37* prikazuje porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe istega vzorca, ki se razlikujejo v detekciji prisotnosti večjih delcev v vseh treh ponovitvah. Vrednost sipanja, ki nam tudi poda vpogled v ponovljivost meritev, pa se za ta isti vzorec bistveno ne razlikuje (*priloga 2*, vzorec pred UZ s koncentracijo 0,50 mg/ml). Če se pojavijo bistvene razlike v rezultatih DLS-meritev, je potrebno bolj podrobno pregledati korelacijske funkcije. Zavedati se moramo, da je točnost končnega rezultata odvisna od kvalitete korelacijske funkcije (10). *Slika 38* prikazuje korelograme treh ponovitev istega vzorca. Korelogrami se bistveno ne razlikujejo med seboj. Na vseh treh korelogramih je bazna linija dvignjena in neravna, kar pomeni, da je v vseh treh primerih Zetasizer Nano ZS zaznal prisotnost agregatov v vzorcu. Možni razlog za navidezno odsotnost pika, ki predstavlja večje delce na krivulji porazdelitve velikosti (glej *slika 37*, zelena krivulja), je izpis podatkov v obliki relativne intenzitete na distribucijski funkciji ali pa je bila velikost agregatov izven merilnega območja naprave. Variacije, povezane s samo DLS-meritvijo, se lahko zmanjša z uporabo večkotnega (»multi-angel«) DLS-instrumenta. Npr. detekcija pod kotom 30° je bolj občutljiva za večje delce in bolje odraža distribucijo le-teh kot »backscattering« DLS. Če pa DLS ne detektira večjih delcev, potem se priporoča, da preverimo morebitno prisotnost le-teh še z dodatnim paralelnim eksperimentom, in sicer s



statičnim sipanjem svetlobe SLS (»Static Light Scattering«).

Slika 37: Porazdelitev velikosti delcev $BaSO_4$ v vodi pred uporabo UZ za tri ponovitve meritev istega vzorca s koncentracijo 0,50 mg/ml, ne da bi jemali kiveto iz naprave.



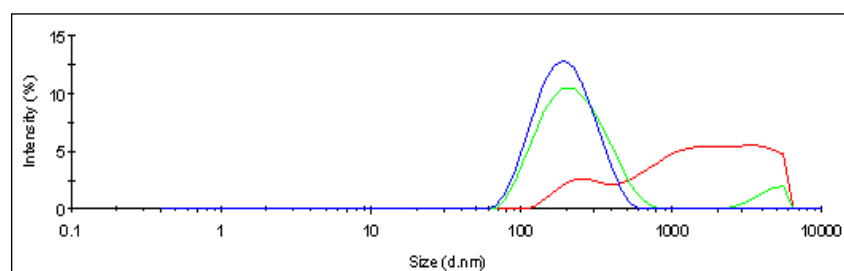
Slika 38: Korelogrami vzorca disperzije nanodelcev $BaSO_4$ v vodi pred uporabo UZ za tri ponovitve meritev istega vzorca s koncentracijo 0,50 mg/ml, ne da bi jemali kiveto iz naprave.

4.2.6 VELIKOSTI DELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA V VODNIH DISPERZIJAH

Odločili smo se, da bomo poleg delcev barijevega sulfata z Zetasizerjem Nano ZS izmerili tudi velikost nanodelcev titanovega dioksida v vodni disperziji. Uporaba nanodelcev (kovin, kovinskih oksidov – TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3) narašča v komercialnih izdelkih. Ugotavljanje možnih nevarnih učinkov zaradi izpostavljenosti nanodelcem kovinskih oksidov v okolju je odločilno pri oceni njihovega potencialnega tveganja za človekovo zdravje (22).

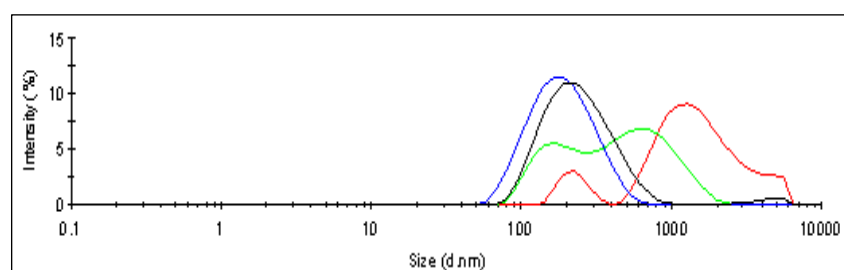
TiO_2 je v vodi netopen. Že vzorci nanodelcev TiO_2 v vodi z nižjimi koncentracijami so bili na videz mlečno bele suspenzije (slika 21). Večina meritev vzorcev pred uporabo ultrazvoka je bila neustrezna in neponovljiva. Do tega je prišlo zaradi prisotnosti velikih agregatov, ki so vidni tudi na SEM-sliki (slika 19). Iz velikosti delcev, ki jo deklarira proizvajalec TiO_2 , (~10 nm x 40 nm), lahko sklepamo, da so v vzorcu prisotni delci različnih oblik. Distribucija velikosti delcev pred uporabo UZ se nahaja v območju 100 nm–6000 nm (slika 39 in slika 40 – rdeča krivulja), kar potrjuje, da so delci zelo polidisperzni in združeni v agregate. To ugotovitev potrjujejo tudi podatki iz literature (22), kjer poročajo, da je povprečna velikost nanodelcev TiO_2 , izmerjena z DLS-jem pred soniciranjem, večja od 1000 nm. Agregate smo poskušali razbiti z ultrazvokom v UZ-kadički, kar nam ni najbolje uspelo (slika 40, zelena krivulja). Delci TiO_2 so se med soniciranjem v UZ-kadički posedali na dno bučke, niso pa nastajali zbiti agregati, kot se je to dogajalo z delci $BaSO_4$. Po soniciranju so rezultati meritev velikosti delcev nekoliko bolj ponovljivi. Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja

svetlobe je še zmeraj široka, le nekoliko bolj pomaknjena k nižjim vrednostim, kar nakazuje



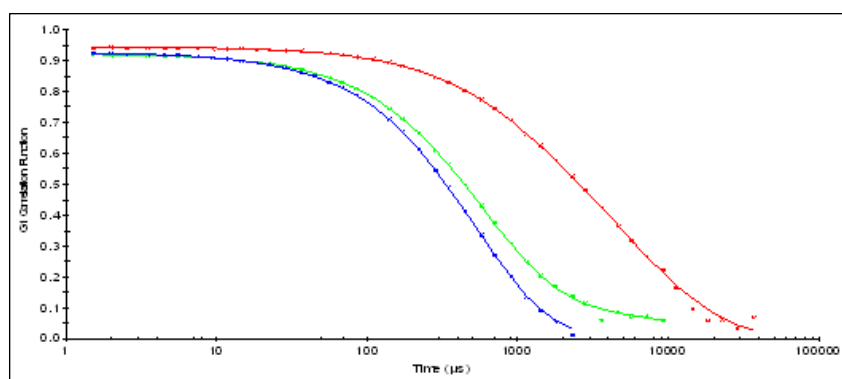
na bimodalnost vzorcev, o čemer so poročali tudi v literaturi (22).

Slika 39: Porazdelitev velikosti delcev TiO₂ v vodi pred uporabo UZ (rdeča krivulja), po soniciranju v UZ-kadički (zeleno krivuljo) in za supernatant 24 ur po pripravi vzorca (modra krivulja) za isti vzorec s koncentracijo 0,75 mg/ml (serija 1).



Slika 40: Porazdelitev velikosti delcev TiO₂ v vodi pred uporabo UZ (rdeča krivulja), po soniciranju v UZ-kadički (zeleno krivuljo), po 8 min soniciranja z UZ-sondo (modra krivulja) ter za supernatant 24 ur po pripravi vzorca (črna krivulja) za isti vzorec s koncentracijo 2,00 mg/ml (serija 2).

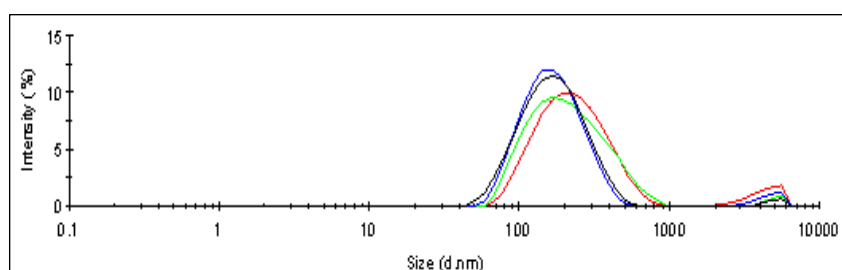
Tudi vzorce TiO₂ v vodi smo pustili sedimentirati in ugotovili, da pri večini vzorcev ostane porazdelitev velikosti dokaj široka (polidisperzna porazdelitev velikosti), pri nekaterih vzorcih se na porazdelitvi velikosti delcev pojavi dodaten pik pri večjih velikostih (*priloga 6* in *7*, *slika 40*, črna krivulja), pri nekaterih pa ne (*slika 39*, modra krivulja). Vzorec koncentracije 2,00 mg/ml smo pustili stati en dan, medtem ko smo vzorca s koncentracijo 0,50 mg/ml in 0,75 mg/ml tri dni (*priloga 7*, ni prisotnih dveh pikov). Iz porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe lahko vidimo (*slika 40*, črna krivulja), da vzorec, ki je stal samo en dan, še vedno vsebuje večje agregate (dodaten pik pri višjih vrednostih) in bolj polidisperzno distribucijo delcev (širša distribucija) kot vzorca, ki smo ju pustili stati več dni, kar je pričakovano. Modra krivulja (*slika 39*), ki predstavlja vzorec supernatanta, vsebuje samo en pik, kar nam nakazuje na verjetno odsotnost večjih agregatov oz. je teh dosti manj kot manjših delcev. To nam potrjuje tudi dobra kvaliteta prileganja korelacijske funkcije k izmerjenim podatkom (*slika 41*) pri modri in pri zeleni krivulji, kar pomeni, da je izrisana porazdelitev velikosti delcev za te vzorce realna. Prileganje meritev rdeče krivulje je nekoliko slabše.



Slika 41: Prileganje distribucijske funkcije (—) k izmerjenim podatkom (***) vzorca disperzije nanodelcev TiO_2 v vodi s koncentracijo 0,75 mg/ml pred uporabo UZ (rdeča krivulja), po uporabi UZ-kadičke (zelena krivulja) in za supernatant (modra krivulja).

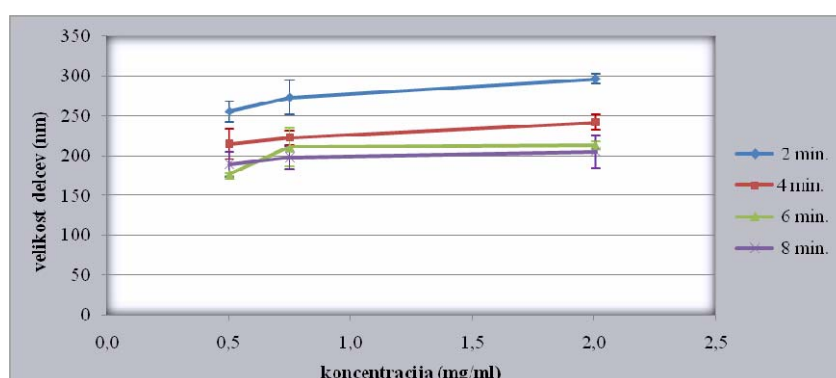
Tako kot pri BaSO_4 smo tudi v primeru TiO_2 poskušali razbiti agregate z uporabo UZ-sonde. Ugotovili smo, da je za razbitje nastalih agregatov TiO_2 v vodi potreben daljši čas soniciranja kot za agregate BaSO_4 . Iz priloge 7 in slike 42 lahko razberemo, da so v vzorcih po 8 min. soniciranja z UZ-sondo še vedno prisotni agregati. S časom soniciranja se krivulja porazdelitve velikosti glavne populacije delcev oža, poleg tega se zmanjšuje pik, ki predstavlja delce v mikrometrskem območju (agregate). V literaturi opisujejo, da je z 10 min soniciranjem povprečna velikost delcev TiO_2 padla s 1000 nm na približno 500 nm (deklarirana velikost delcev, ki jo navaja proizvajalec delcev TiO_2 , je bila 15 nm) (22). Kljub podaljšanju časa soniciranja na več kot 30 min, se povprečna velikost delcev ni bistveno zmanjšala (22). Podobno obnašanje pri dispergiranju so opazili tudi v raziskavah z drugimi komercialnimi nanodelci (Fe_2O_3 , ZnO , NiO) (22).

Agregate TiO_2 v vodi smo uspeli delno razbiti že z uporabo UZ-kadičke, vendar je bila bolj učinkovita in hkrati hitrejša metoda soniciranja z uporabo UZ-sonde. Na podlagi prejšnjih slik lahko ugotovimo, da so delci po soniciranju z UZ-sondo manj polidisperzni (ožja porazdelitev velikosti delcev) v primerjavi z vzorci, ki smo jih sonicirali v UZ-kadički.



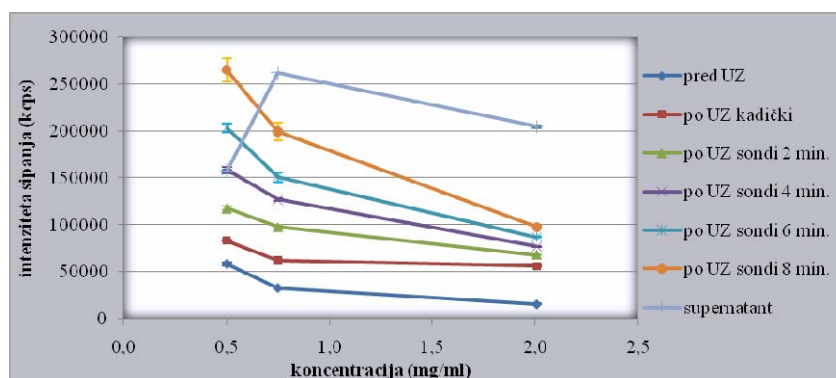
Slika 42: Porazdelitev velikosti delcev TiO_2 v vodi s koncentracijo 0,50 mg/ml po različnih časih soniciranja z UZ-sondo: 2 min. (rdeča krivulja), 4 min (zelena krivulja), 6 min (modra krivulja) in 8 min (črna krivulja).

Slika 43 prikazuje spremembe v velikosti delcev TiO_2 glede na čas soniciranja z UZ-sondo. Izmerjena velikost delcev po 2 min soniciranja se giblje med 250 nm in 300 nm, po 8 min pa je izmerjena velikost delcev praktično neodvisna od koncentracije vzorca (okrog 200 nm), kar kaže, da je 8 min soniciranja dovolj, da razbijemo večino prisotnih agregatov v vzorcu ne glede na njegovo koncentracijo. Predvidevamo, da tudi daljši čas soniciranja od 8 min verjetno ne bi vplival na izmerjeno povprečno velikost delcev, saj razlike v izmerjeni velikosti s časom soniciranja postajajo vedno manjše (ni signifikantne razlike v izmerjeni velikosti po 6 in 8 min soniciranja).



Slika 43: Povprečna velikost delcev (pik 1) v odvisnosti od koncentracije delcev TiO_2 v vodi in od časa soniciranja vzorca z UZ-sondo.

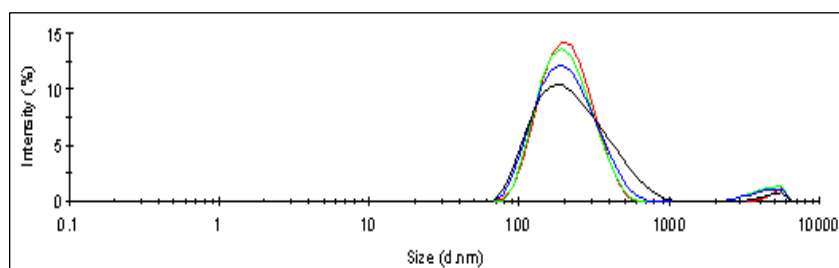
Na sliki 44 lahko vidimo, da intenziteta sipanja istega vzorca narašča po naslednjem zaporedju glede na pripravo vzorca: pred UZ < UZ-kadička < UZ-sonda 2 min < UZ-sonda 4 min < UZ-sonda 6 min < UZ-sonda 8 min. Intenziteta sipanja pri večini vzorcev pred uporabo UZ med posameznimi ponovitvami pada (*priloga 6* in *priloga 7*), kar pomeni, da delci sedimentirajo že med meritvami in da takšni vzorci niso primerni za DLS-analizo. Iz meritev velikosti delcev tako BaSO_4 (*slika 27*) kot TiO_2 (*slika 44*) lahko razberemo, da intenziteta sipanja vzorcev narašča s koncentracijo do določene koncentracije, nato pa začne padati. To je verjetno koncentracija, pri kateri že pride do interakcij delec–delec ali pa začne vzorec multiplo sipati svetlobo, ne daje pa še nerealnih rezultatov glede velikosti delcev. Trend sipanja svetlobe v odvisnosti od koncentracije, prikazan na *sliki 44*, je nekoliko drugačen za supernatant. Upoštevati moramo dejstvo, da je dejanska koncentracija delcev v supernatantu nižja (del delcev sedimentira), zato je prikazan začetek multiplega sipanja supernatanta pomaknjen k višjim koncentracijam.



Slika 44: Povprečna intenziteta sipanja svetlobe v odvisnosti od koncentracije in od postopka priprave vzorca nanodelcev TiO_2 v vodi.

4.2.6.1 Velikosti delcev v supernatantu disperzije titanovega dioksida v vodi z začetno koncentracijo 2,00 mg/ml

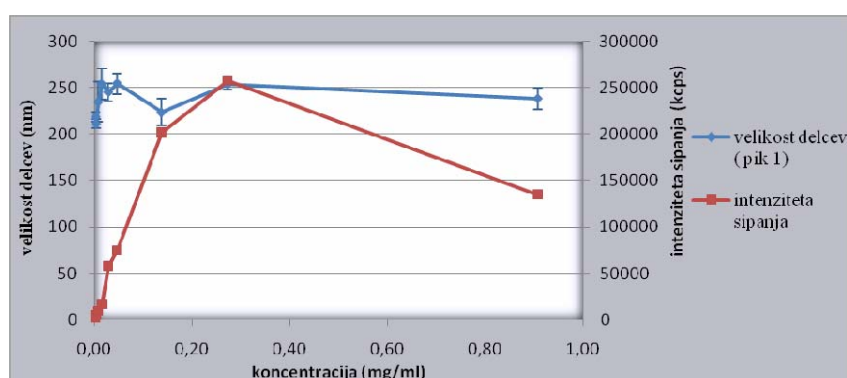
Iz začetne suspenzije nanodelcev TiO_2 v vodi s koncentracijo 2,00 mg/ml, ki smo jo pripravili prvi dan in nato pustili stati 24 h, je sedimentiralo v 100 ml disperzije 110 mg delcev TiO_2 , kar pomeni, da je v supernatantu ostalo 90,6 mg TiO_2 . Ta suspenzija je bila zelo motna, zato nismo pripravljali vzorcev s še višjo koncentracijo. Iz *priloge 8* lahko razberemo, da je naprava v eni od treh meritev osnovnega supernatanta s koncentracijo 0,91 mg/ml in nato pri večini vzorcev, ki smo jih pripravili z redčenjem tega supernatanta, zaznala prisotnost dodatne populacije delcev (dodatni pik), ki predstavlja večje delce na krivulji porazdelitve velikosti delcev (*slika 45*).



Slika 45: Porazdelitev velikosti delcev TiO_2 v vodnih disperzijah različnih koncentracij. Vzorce smo pripravili z redčenjem supernatanta vzorca z začetno koncentracijo 2,00 mg/ml. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,001 mg/ml, zelena 0,002 mg/ml, modra 0,007 mg/ml in črna predstavlja koncentracijo 0,013 mg/ml.

Delež intenzitete, ki ga k sipanju doprinese drugi pik z redčenjem vzorca (tj. z nižanjem koncentracije), narašča, kar pomeni, da prihaja sipanje prisotnih večjih delcev dejansko bolj do izraza, čeprav jih je količinsko manj. Do podobnih spoznanj smo prišli tudi pri vzorcih, dobljenih z redčenjem supernatanta BaSO_4 . Nekaj vzorcev smo poskušali popolnoma

redispersirati z uporabo UZ-sonde (2 min), a smo ugotovili, da pik, ki predstavlja agregate v vzorcu, tudi po soniciranju ne izgine, le njegova intenziteta je manjša. Tudi pri meritvah najnižjih koncentracij, ki so krepko pod priporočeno minimalno koncentracijo (glede na podatke iz literature za delce velikosti od 100 nm do 1 μm le-ta znaša 0,01 mg/ml (20)), je naprava označila vse meritve za uspešne. Le najbolj razredčen vzorec po soniciranju (0,001 mg/ml) ni bil več ustrezen za DLS-meritev. Vrednosti sipanja naraščajo do določene koncentracije, nato pa pri najvišji merjeni koncentraciji padejo, kar mogoče označuje začetek multiplega sipanja. Izmerjene vrednosti velikosti nanodelcev TiO_2 iz razredčenih vzorcev se gibljejo med 200 nm in 280 nm; nekoliko bolj nihajo pri najnižjih koncentracijah (slika 46).



Slika 46: Povprečna velikost populacije delcev z največjo intenziteto sipanja svetlobe (pik 1) (modra krivulja) in povprečna intenziteta sipanja svetlobe vzorca (rdeča krivulja) v odvisnosti od koncentracije delcev TiO_2 v vodni disperziji za vzorce, ki smo jih pripravili z redčenjem supernatanta (rezultat je povprečna vrednost treh meritev istega vzorca).

4.3 VELIKOSTI MICELOV IN OCENA KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE

4.3.1 VELIKOSTI MICELOV NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (SDS) V VODI

SDS je amfifilna molekula, ki v strukturi vsebuje sulfatno skupino kot hidrofilno »glavo« molekule in lipofilno verigo ogljikovodikov kot »rep«. V vodni raztopini začne SDS tvoriti micelle pri koncentraciji, ki jo imenujemo kritična micelarna koncentracija, le-ta je okrog 8,0 mmol/l. Miceli SDS so sferični ali paličasti agregati molekul, pri katerih je hidrofobni rep usmerjen v notranjost micela, medtem ko je hidrofilna glava izpostavljena vodnemu mediju (23).

Micelle SDS so že proučevali z različnimi tehnikami (23, 25, 26). Glede na to, da najnovejši Malvernov instrument Zetasizer Nano ZS detektira sipano svetlobo pod kotom 173° in da tako urejena najnovejša optika maksimizira detekcijo sipane svetlobe, medtem ko ohranja kvaliteto signala in zagotovi izjemno občutljivost, ki jo zahteva merjenje velikosti micelov pri nizki koncentraciji, smo mi želeli preveriti njegovo delovanje z meritvami micelov SDS-a. Izmerili smo velikost micelov in skušali oceniti kritično micelarno koncentracijo (CMC). Vse meritve smo izvajali pri 25°C ; kritičen parameter za točne meritve je natančen nadzor temperature vzorca, ki jo v našem primeru nadzoruje programska oprema inštrumenta. Poleg tega je tudi pomembno natančno poznavanje viskoznosti za uporabljen disperzni medij pri temperaturi meritev (v našem primeru smo uporabili vrednost za viskoznost bidestilirane vode 0,8872 mPas).

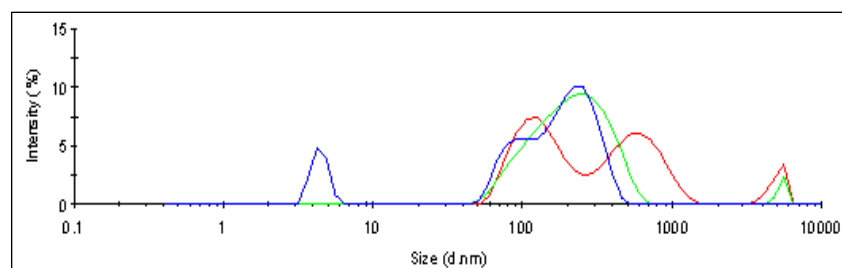
V tabele (*priloge 9, 10, 11, 12*) smo vključili tudi volumsko distribucijo, tj. porazdelitev velikosti delcev glede na njihove volumne. Za pretvorbo rezultatov velikostne distribucije iz intenzitetne v volumsko oz. številčno moramo poznati lomni količnik merjenih delcev. Mi lomnega količnika micelov nismo merili, saj je glede na podatke iz literature za ekstremno majhne delce, kjer so fizikalne dimenzije manjše od 60 nm, kotna odvisnost sipanja zanemarljiva in podatek o lomnem količniku ne vpliva bistveno na rezultat pretvorbe rezultatov iz intenzitetne v volumsko distribucijo z uporabo Mie-vega modela (tj. točna vrednost lomnega količnika ni kritičen parameter) (27). V tabele smo vključili rezultate volumske distribucije le za vzorce, kjer se pojavijo miceli. Rezultati volumske distribucije za vzorce s koncentracijo SDS nižjo od CMC so podobni rezultatom intenzitetne distribucije. Iz tabel lahko tudi razberemo, da je porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe

multimodalna, na krivulji je prisotnih več pikov. Ne glede na koncentracijo vzorca so okrog vrednosti 100–400 nm vedno prisotni piki, iz česar sklepamo, da imamo v vzorcu poleg micelov verjetno prisotne tudi agregate. Ko koncentracija vzorca doseže ali preseže CMC, se na krivulji porazdelitve velikosti pojavi dodaten pik okrog vrednosti 2 nm, iz česar sklepamo, da se v mediju pojavijo miceli. Iz različnih literaturnih virov lahko razberemo, da je velikost micelov SDS $1,9 \pm 0,1$ nm (25), $20,3 \pm 0,3$ Å (23), oz. $19,7$ Å (26). Možnih razlag za pojav dodatnega pika v vzorcih je več. Prvič, pri vzorcih, ki šibko sipajo svetlobo zaradi ekstremno majhnih velikosti delcev, je zelo pomembno, da so vzorci pripravljene v pogojih visoke čistoče, saj vsak prašni delec ali kakršnakoli druga nečistota znatno prispeva k celokupni intenziteti sipanja vzorca. Kljub našemu trudu so bili morda naši vzorci kontaminirani, kar se odraža s prisotnostjo dodatnih pikov pri večjih velikostih. Drugič, avtor Zana R. opisuje učinek prisotne nečistote v vzorcih SDS na lastnosti micelarne raztopine (28). Pogosta nečistota, ki je prisotna v vzorcih SDS, je dodekanol. V literaturi poročajo, da je pri koncentraciji nekoliko pod in nad CMC v vzorcih prisotno manjše število kapljic dodekanola, ki jih stabilizirajo molekule SDS. Prisotnost omenjenih kapljic se odraža v obliki velikih in ostrih maksimumov v intenziteti sipane svetlobe pri vzorcih s koncentracijo okrog CMC. Pri višjih koncentracijah SDS število micelov hitro naraste in dodekanol se vključi v micelle in s tem dodatno sipanje zaradi prisotnosti kapljic dodekanola izgine (28). Tretjič, v raziskavah vzorcev micelov SDS v vodi s krio-transmisijsko elektronsko mikroskopijo so ugotovili prisotnost različnih struktur, od agregatov v obliki traku do večkrat povezanih nitk. Te strukture naj bi nastale le na medfazi zrak–raztopina in ne v »notranjosti« raztopine (25).

Ker so meritve pokazale prisotnost več pikov (tudi nad 100 nm) in ker si nismo znali natančno razložiti, kaj ti piki predstavljajo, smo vzorce filtrirali, da bi odstranili morebitne večje delce. Kljub temu da smo vzorce filtrirali skozi filtre z velikostjo por blizu ali celo manjšo od velikosti micelov, je bilo tveganje za spremembo koncentracije micelov v vzorcu majhno, saj so miceli dinamične strukture. Kakršna koli sprememba strukture, ki bi se lahko pojavila med prehodom skozi ozke pore, bi bila reverzibilna in zato ne vpliva na ravnotežno porazdelitev velikosti (25).

Na naslednjih slikah bomo poskušali podrobneje razložiti spremembe na krivuljah porazdelitve velikosti pri različnih koncentracijah in vpliv postopka priprave vzorca na rezultat meritev. *Slika 47* prikazuje vzorce s koncentracijo SDS, ki je manjša od CMC (rdeča in zelena krivulja) in večja od CMC (modra krivulja). Kot lahko vidimo, so pri vseh treh krivuljah ne glede na koncentracijo prisotni delci večjih velikosti (> 100 nm), ki niso miceli. Pri koncentraciji $0,01$ mol/l, ki je glede na podatke iz literature nad CMC SDS-a, se pojavi še

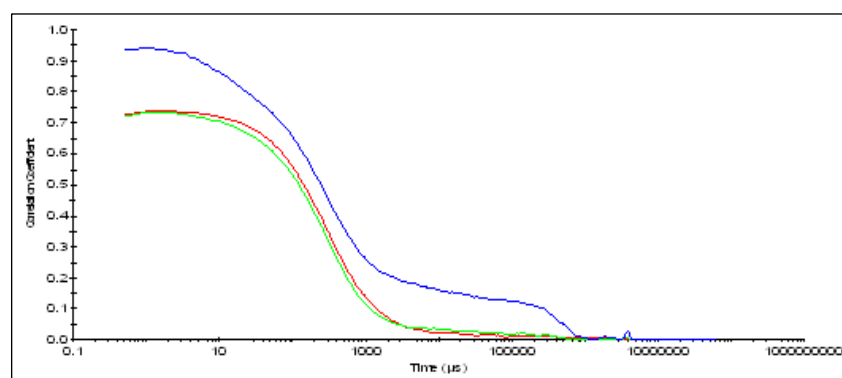
en pik, pri velikosti pod 10 nm. Predvidevamo, da ta pik, predstavlja micelle SDS-a. V literaturi najdemo naslednje vrednosti za vrednost CMC SDS-a: 0,00814 mol/l oz. 0,00830 mol/l (30), 0,0086 mol/l (31) in 0,00812 mol/l (29), kar pomeni, da so pri koncentraciji 0,01



mol/l v vzorcu prisotni miceli, ki jih Zetasizer Nano ZS tudi zazna.

Slika 47: Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe vzorcev SDS v vodi, ki smo jih pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,0025 mol/l, zelena s koncentracijo 0,0075 mol/l in modra predstavlja vzorec s koncentracijo 0,01 mol/l.

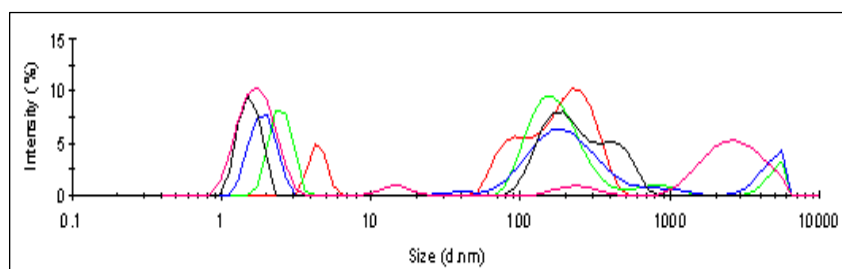
Zetasizer je večino meritev teh vzorcev označil za neuspešne. Iz pregleda korelogramov vzorcev s koncentracijo 0,01 mol/l smo ugotovili, da je izgled korelogramov popolnoma drugačen od ostalih vzorcev. Pri tej koncentraciji se namreč pojavijo miceli, sipanje na njihov račun je sorazmerno majhno (nizek delež intenzitete sipanja, ki pripada pikmu micelov) v primerjavi s prisotnimi večjimi delci, kar se odrazi na korelogramu kot sprememba naklona (slika 48, moder korelogram).



Slika 48: Korelogrami vzorcev SDS v vodi, ki smo jih pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,0025 mol/l, zelena s koncentracijo 0,0075 mol/l in modra predstavlja vzorec s koncentracijo 0,01 mol/l.

Primerjava povprečne velikosti micelov, ki jih prikazuje pik micelov na sliki 49, kaže, da se velikost micelov z večanjem koncentracije SDS zmanjšuje. Z večanjem koncentracije se povečuje tudi delež intenzitete sipanja, ki pripada pikmu micelov, kar pomeni, da število micelov s koncentracijo narašča. Do podobnih zaključkov so prišli tudi v raziskavah micelov

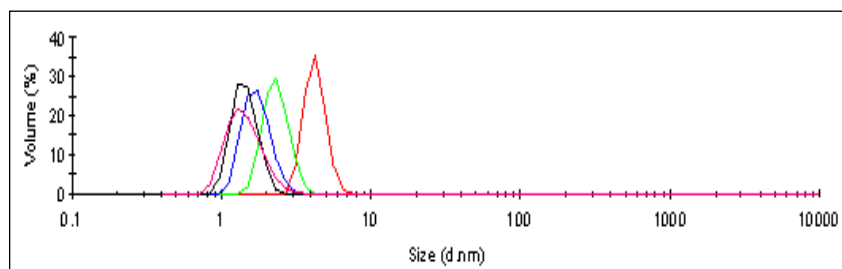
ionogenega surfaktanta dodeciltrimetilamonijevega bromida (DTAB), kjer so ugotovili, da velikost micelov z večanjem koncentracije DTAB pada (24). Do tega pojava naj bi prišlo zaradi velikih odbojnih sil med miceli DTAB, kar povečuje difuzijsko hitrost micelov, zato je



izmerjen hidrodinamski premer manjši.

Slika 49: Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe vzorcev SDS v vodi s koncentracijo SDS nad CMC, ki smo jih pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo **0,01 mol/l**, zelena s koncentracijo **0,025 mol/l**, modra s koncentracijo **0,05 mol/l**, črna s koncentracijo **0,1 mol/l** in roza predstavlja vzorec s koncentracijo **0,5 mol/l**.

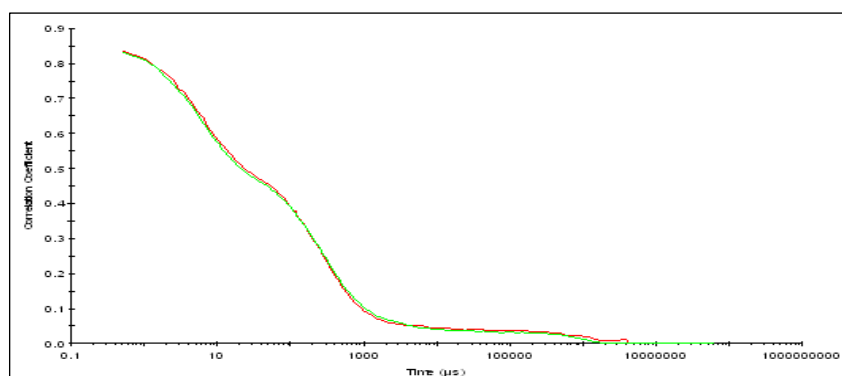
Slika 50 prikazuje volumsko porazdelitev delcev v vzorcih SDS. Ko se v vzorcu pojavijo miceli, vsi ostali piki za delce večje od 10 nm izginejo, kar pomeni, da so v vzorcu predvsem miceli in bistveno manj drugih večjih struktur, ki pa zaradi velikosti veliko bolj sipajo svetlobo kot majhni miceli. Ravno zaradi tega so te strukture vidne na krivuljah porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja ne pa na krivuljah porazdelitve velikosti glede na volumen delcev.



Slika 50: Porazdelitev velikosti glede na volumen za vzorce SDS v vodi s koncentracijami nad CMC, ki smo jih pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo **0,01 mol/l**, zelena s koncentracijo **0,025 mol/l**, modra s koncentracijo **0,05 mol/l**, črna s koncentracijo **0,1 mol/l** in roza predstavlja vzorec s koncentracijo **0,5 mol/l**.

Miceli niso rigidne strukture, hkrati pa nanje vplivajo številni dejavniki, zato smo želeli preveriti, ali se bodo vzorci, shranjeni v dobro zaprti kivetih, na sobni temperaturi po 48 urah popolnega mirovanja spremenili. Rezultati meritev so ostali praktično nespremenjeni pri vseh analiziranih koncentracijah. Pik micelov ostaja vedno na istem mestu, opazili smo le, da je pri nekaterih vzorcih po 48 urah mirovanja manjša intenziteta sipanja za delce nad 5000 nm. Korelograma za obe meritvi se popolnoma prekrivata (slika 51). Opazimo tudi, da prične

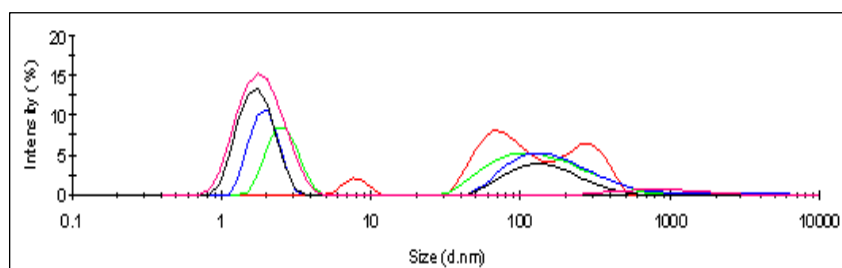
korelacija hitro padati, kar potrjuje prisotnost majhnih delcev, tj. micelov v vzorcu, česar pa še ne opazimo pri korelogramu vzorca s koncentracijo 0,01 mol/l, kjer se prvič pojavijo miceli



(slika 48, modra krivulja).

Slika 51: Korelogram vzorca SDS v vodi s koncentracijo 0,025 mol/l. Rdeč korelogram predstavlja meritev takoj po pripravi in zelen korelogram meritev po 48 h.

Vzorci SDS smo poleg priprave s tehtanjem SDS s posamezno koncentracijo pripravili tudi z redčenjem osnovnega vzorca z višjo koncentracijo, saj smo želeli preveriti, ali postopek priprave vpliva na rezultat meritev. Glede na to, da je porazdelitev velikosti vzorcev, ki smo jih neposredno pripravili, pokazala prisotnost večjih struktur, smo želeli preveriti, ali filtriranje vzorca te strukture odstrani. Merjeni miceli so namreč dovolj majhni in dinamični, da lahko preidejo skozi pore filtra.

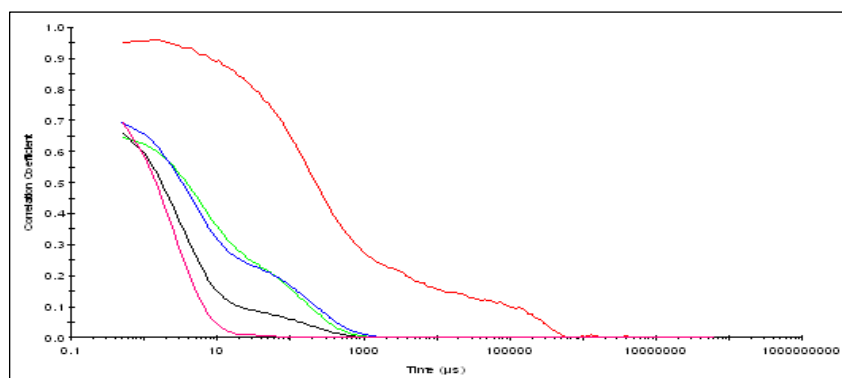


Slika 52: Porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe vzorcev SDS v vodi s koncentracijami nad CMC, ki smo jih pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 mol/l, filtrirali skozi filter velikosti 0,1 μm in pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,01 mol/l, zelena s koncentracijo 0,025 mol/l, modra s koncentracijo 0,05 mol/l, črna s koncentracijo 0,1 mol/l in roza predstavlja vzorec s koncentracijo 0,5 mol/l.

Na slikah 49 in 52 lahko vidimo, da se ne glede na postopek priprave vzorcev, pik micelov prvič pojavi pri vzorcih s koncentracijo 0,01 mol/l. Iz porazdelitve velikosti lahko razberemo, da so kljub filtriranju skozi filter velikosti 0,1 μm , v vzorcih še vedno prisotne strukture večje od 100 nm, kar pomeni, da te strukture niso rigidne, prehajajo skozi filter in so reverzibilne; torej ne predstavljajo trdih delcev. S primerjavo teh dveh slik in s pregledom korelogramov

(slika 53) lahko le opazimo, da pri filtriranih vzorcih ni oz. je zelo malo delcev, večjih od 1000 nm, iz česar sklepamo, da so se zadržali na filtru. S primerjavo slik tudi ugotovimo, da je ne glede na pripravo vzorcev z večanjem koncentracije vedno prisoten pomik micelnih pikov k nižjim vrednostim.

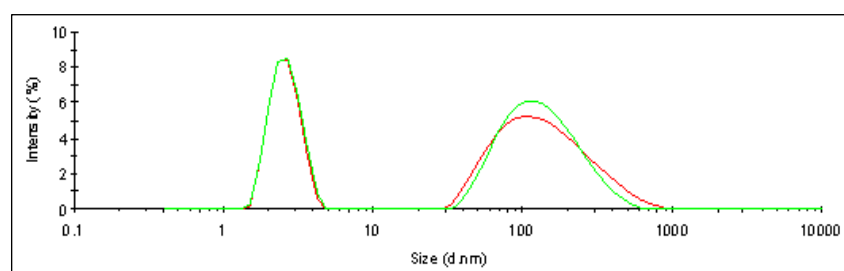
Slika 53 predstavlja korelograme vzorcev, ki vsebujejo micela. Rdeč korelogram, ki predstavlja vzorec, kjer se prvič pojavijo miceli, najbolj odstopa od korelogramov ostalih vzorcev. Pri ostalih korelogramih vidimo, da začne korelacija zelo hitro padati, kar potrjuje prisotnost majhnih delcev, tj. micelov. Hkrati pa vidimo, da so krivulje bimodalne, kar dokazuje tudi prisotnost večjih struktur (nad 100 nm) v vzorcu. Bazna linija je ravna, ni dvignjena, kar kaže na odsotnost še večjih delcev. Poleg tega lahko s primerjavo korelogramov vidimo (izjema rdeč korelogram), da se z večanjem koncentracije odsek na y-osi (razmerje signal/šum) večja, kar pomeni, da aparat ločuje razlike v koncentraciji vzorcev.



Slika 53: Korelogrami vzorcev SDS v vodi s koncentracijami nad CMC, ki smo jih pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 mol/l, filtrirali skozi filter velikosti 0,1 μm in pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja vzorec s koncentracijo 0,01 mol/l, zelena s koncentracijo 0,025 mol/l, modra s koncentracijo 0,05 mol/l, črna s koncentracijo 0,1 mol/l in roza predstavlja vzorec s koncentracijo 0,5 mol/l.

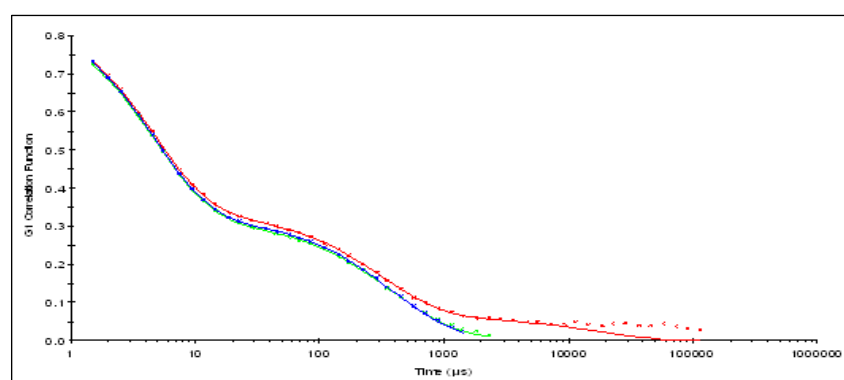
Primerjava meritev vzorcev, ki smo jih pripravili iz natehte SDS-a, z redčenimi in filtriranimi vzorci je pokazala, da manjše razlike sicer obstajajo, a niso bistvene za rezultate velikosti in določitev CMC. Razlike se pojavijo v območju velikosti delcev, ki so večji od 100 nm, poleg tega nefiltrirani vzorci vsebujejo večje delce (> 1000 nm), ki jih v filtriranih vzorcih ni.

Primerjava meritev vzorcev, ki so bili takoj pomerjeni po vzorčenju, z vzorci, ki so bili v mirovanju 48 ur, je pokazala, da razlik med meritvami praktično ni, še posebno ne pri koncentracijah nad CMC (slika 54).



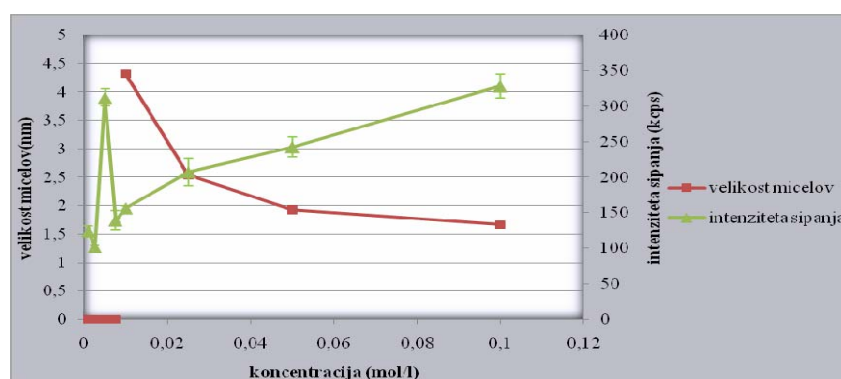
Slika 54: Prilaganje porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe vzorca SDS v vodi s koncentracijo 0,025 mol/l, ki smo ga pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 mol/l in filtrirali skozi filter velikosti 0,1 μm . Rdeča krivulja predstavlja vzorec, ki smo ga pomerili takoj po pripravi, zelena krivulja pa vzorec, ki smo ga pomerili po 48 urah.

Pregled oz. prekrivanje korelogramov ponovitev meritev istega vzorca potrjuje ponovljivost rezultatov. Ponovljivost meritev redčenih in filtriranih vzorcev je odlična (korelogrami se v celoti prekrivajo), te meritve so bolj ponovljive kot pri vzorcih, ki smo jih pripravili iz nateht, in jih nismo filtrirali. Slika 55 prikazuje prilaganje distribucije k izmerjenim podatkom za vse tri ponovitve in kaže, da se vse tri krivulje prekrivajo do določene točke, ko prva meritev začne odstopati. Korelacijska funkcija prve meritve morda odstopa zaradi prisotnosti delca prahu na poti laserskega žarka ali pa mogoče zaradi temperature vzorca, ki še ni bil termostatoran točno na 25 °C. Izgled rdeče krivulje in tudi slabše prilaganje k izmerjenim podatkom v zadnjem odseku nakazuje, da je aparat zaznal prisotnost večjih delcev (mogoče prašni delec). Pri drugi in tretji meritvi teh delcev očitno ni bilo več v merilnem polju instrumenta (morda so delci sedimentirali).



Slika 55: Prileganje distribucijske funkcije (—) k izmerjenim podatkom (*) za vse tri ponovitve meritev vzorca SDS v vodi s koncentracijo 0,1 mol/l, ki smo ga pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 mol/l, filtrirali skozi filter velikosti 0,1 μm in pomerili takoj po pripravi. Rdeča krivulja predstavlja prvo meritev, zelena drugo in modra tretjo meritev.**

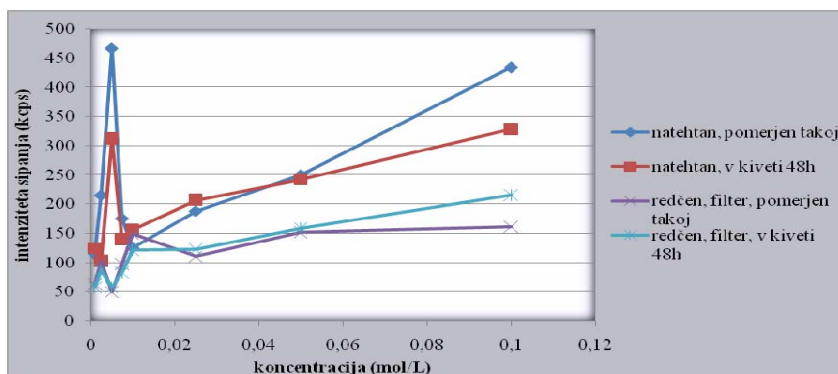
Glede na podatke iz literature je intenziteta sipanja svetlobe (sipanje) za vzorce s koncentracijo pod CMC podobna kot za samo vodo, zato ima dobljena korelacijska funkcija zelo majhen odsek na y-osi (razmerje signal/šum) in zato iz teh podatkov ni mogoče dobiti zanesljive informacije o porazdelitvi velikosti delcev v vzorcu (24). Ko enkrat koncentracija doseže CMC, sipanje narašča linearno s koncentracijo kot posledica prisotnosti micelov in odseki na y-osi korelacijskih funkcij so večji. V našem primeru je bilo izmerjeno sipanje svetlobe za vzorce SDS s koncentracijami pod CMC precej višje (nad 100 kcps) kot sipanje samega medija, tj. vode (39,6 kcps) (*slika 56*). Razlog za višje sipanje so mogoče nečistoče v samem SDS-u (dodekanol) ali morebitna prisotnost prašnih delcev v vzorcu. Sipanje bidestilirane vode je v tem primeru precej visoko, kar pomeni, da je mogoče že sama voda nečista oz. premalo čista za naše meritve. Pri koncentraciji 0,01 mol/l, ko se v vzorcu pojavijo miceli, začne sipanje skoraj linearno naraščati s koncentracijo. Rdeča krivulja, ki predstavlja velikost micelov in ki je odvisna od koncentracije vzorca, se giblje od 4,5 nm do 1,7 nm (*slika 56*). Glede na podatke iz literature lahko CMC izračunamo iz preloma krivulje, ki predstavlja odvisnost sipanja od koncentracije (24). Točka, kjer se krivulja prelomi, predstavlja CMC. Sami te metode nismo mogli uporabiti, saj so vrednosti sipanja pred CMC precej nihale. Glede na pojav micelov v vseh vzorcih s koncentracijo 0,01 mol/l ali večjo, lahko le sklepamo, da je CMC za SDS v vodi nekje med 0,0075 mol/l in 0,01 mol/l, kar je v skladu z vrednostmi iz literature (29, 30, 31).



Slika 56: Povprečna velikost micela (rdeča krivulja) in povprečna intenziteta sipanja svetlobe (zeleno krivuljo) v odvisnosti od koncentracije SDS-a v vodi, ki je bil pripravljen z natehtanjem in pomerjen po 48 urah mirovanja (rezultat je povprečna vrednost treh meritev istega vzorca).

Rezultati, prikazani na *sliki 57*, kažejo, da je intenziteta sipanja vzorcev, ki smo jih pripravili iz nateht, in jih nismo filtrirali višja od intenzitete sipanja vzorcev, ki smo jih pripravili z redčenjem in filtrirali. K višjemu sipanju vzorcev, ki smo jih pripravili iz nateht, je doprinesla tudi nekoliko manj čista bidestilirana voda (sipanje 39,6 kcps), medtem ko je bilo sipanje

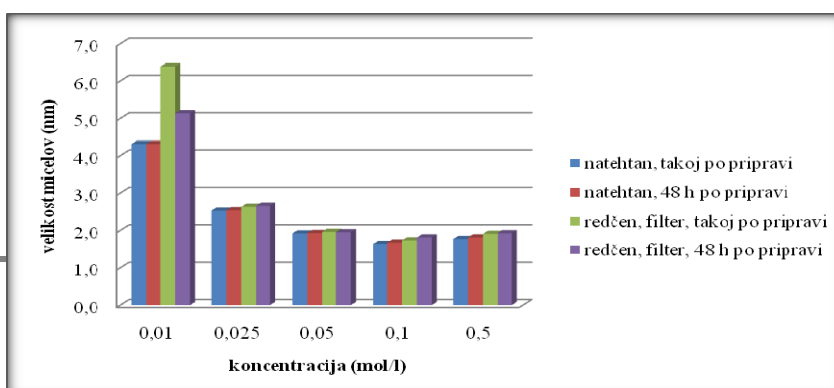
vode, s katero so bili pripravljene redčeni vzorci, nižje (29,8 kcps). S filtriranjem smo se znebili nečistot, večjih od 1000 nm (*slika 52*), kar tudi prispeva k nižjemu sipanju teh vzorcev. Iz vseh štirih krivulj lahko razberemo, da sipanje vzorcev s koncentracijo pod CMC precej niha, medtem ko se vrednosti sipanja na vseh štirih krivuljah pri koncentraciji



0,01 mol/l skoraj izenačijo in od tu naprej naraščajo skladno s koncentracijo.

Slika 57: Povprečna intenziteta sipanja svetlobe v odvisnosti od koncentracije SDS v vodi za različno pripravljene vzorce.

Na *sliki 58* je prikazana velikost micelov v odvisnosti od koncentracije in načina priprave vzorca. Večje razlike v izmerjeni velikosti se kažejo le pri vzorcih s koncentracijo 0,01 mol/l, kjer so miceli iz redčenih vzorcev precej večji od micelov iz vzorcev, ki smo jih pripravili iz nateht. SDS je PAS, ki se porazdeli najprej po vseh mejnih površinah in šele nato tvori micelle. Pri redčenju je bil vzorec z miceli izpostavljen večji površini (bučka, kivete) kot pa pri metodi z natehtami. Posledično je lahko prišlo na stenah posod do večjih izgub SDS in je dejanska koncentracija nižja od izračunane. To bi lahko pojasnilo, zakaj so miceli po metodi redčenja večji kot po metodi iz nateht. Pri višjih koncentracijah teh razlik ni, velikost micelov pa je manjša in v skladu s podatki iz literature. Zdi se, da Zetasizer Nano ZS pri vzorcih s koncentracijo 0,01 mol/l zazna spremembo, pojav micelov, čeprav dobljeni rezultati za te vzorce najbolj odstopajo, kar smo ugotovili že s pregledom korelogramov, ki niso ponovljivi. Poleg tega je velikost micelov (4 nm–6 nm), izmerjena pri tej koncentraciji, prevelika glede na vire iz literature, kjer najdemo podatek, da se velikost micelov SDS giblje okrog 2 nm (23, 25, 26).



Slika 58: Primerjava velikosti micelov v vzorcih, ki smo jih pripravili po različnih postopkih.

5 ZAKLJUČEK

Uporabnost instrumenta Zetasizerja Nano ZS, njegove prednosti in slabosti, smo poskušali oceniti z merjenjem velikosti delcev v vodnih disperzijah komercialno dostopnih nanodelcev BaSO₄ in TiO₂ ter disperzijah BaSO₄ v 96% etanolu. Zanimala nas je tudi uporabnost instrumenta za analizo vzorcev, ki šibko sipajo svetlobo in zahtevajo za kakovostno meritev izjemno občutljivost instrumenta. V ta namen smo merili velikost micelov SDS in ocenili kritično micelarno koncentracijo.

Proučili smo, kako način priprave vzorca in njegova koncentracija vplivata na rezultat meritve velikosti ter kritično ocenili dobljene podatke. Velikost nanodelcev smo določali iz vzorcev, pomerjenih takoj po pripravi, po uporabi ultrazvoka (UZ-kadička in UZ-sonda) in po vzorčenju iz supernatanta. Vzorce SDS-a smo pripravili iz nateht in z redčenjem osnovne raztopine SDS-a z višjo koncentracijo. Redčene vzorce smo tudi filtrirali skozi 0,1 µm filter, da smo odstranili morebitne večje delce v vzorcu. Vse vzorce smo pustili 48 ur v mirovanju zato, da smo preverili, ali se s časom vzorec spremeni.

Pri analizi podatkov smo uporabili intenzitetno distribucijsko analizo podatkov, tj. porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe. Kumulantne analize se nismo posluževali, ker je bila večina vzorcev multimodalna in torej neprimerna za to analizo. Pomemben parameter pri ocenitvi kvalitete in ponovljivosti meritev je tudi oblika korelogramov in podatki o sipanju vzorca.

Za kakovostno meritev velikosti koloidnih delcev je pomembna tudi kakovost disperznega medija, saj le-ta prispeva k celokupnemu sipanju vzorca. Tako smo v nalogi preverili kakovost vode, kot najpogosteje uporabljenega disperznega medija. Ugotovili smo, da se sipanje svetlobe na vzorcih različnih vod bistveno razlikuje. Najmanj je sipala svetlobo (24,6 kcps) bidestilirana voda in najbolj (73,9 kcps) vodovodna voda. Ker se kakovost ultračiste in bidestilirane vode ni razlikovala bistveno glede na sipanje svetlobe, smo se odločili, da bomo za vse nadaljne meritve uporabljali ultračisto vodo, saj je bila priprava bidestilirane vode dolgotrajna in količina pripravljene vode ni zadoščala za naše potrebe.

Analiza velikosti delcev v vodnih disperzijah BaSO₄ z nižjimi koncentracijami je pokazala, da je bil vzorec takoj po pripravi in v času meritve dovolj stabilen, da smo lahko izmerili velikost delcev, kar pa v primeru vodnih disperzij BaSO₄ z višjimi koncentracijami brez uporabe UZ in za disperzijo delcev BaSO₄ v etanolu brez uporabe UZ ne drži, saj delci tekom meritve sedimentirajo in vplivajo na dobljen rezultat meritve. Merjenje takšnih vzorcev je dolgotrajno

in neponovljivo, rezultat meritve pa ni reprezentativen za vzorec. Ugotovili smo, da je na krivuljah porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja svetlobe prisoten poleg pika okrog 180 nm še najmanj en dodaten pik, ki potrди prisotnost agregatov v vzorcu, kar kaže tudi SEM-slika delcev BaSO₄. Agregate BaSO₄ v vodi smo poskušali razbiti z uporabo UZ. Spoznali smo, da uporaba UZ-kadičke agregate delno razbije in sočasno na dnu bučke ustvari zbit sediment, ki ga je težko ponovno dispergirati. Za razbitje teh agregatov je potreben vnos večje količine energije. Soniciranje z UZ-sondo se je izkazalo kot učinkovit način za razbitje večjih agregatov, kljub temu pa so delci v vzorcu še vedno prisotni v obliki manjših agregatov, saj izmerjena velikost delcev (150 nm–170 nm) ni primerljiva z deklarirano (40 nm). V supernatantu vzorcev BaSO₄ v vodi so ostali dispergirani le nanodelci s povprečno velikostjo 170 nm, kar smo na krivulji porazdelitve velikosti videli kot en sam pik. Sipanje vzorca nam daje pomemben podatek o dispergiraniosti delcev v vzorcu, saj smo ugotovili, da supernatant, v katerem so delci dobro dispergirani, siplje svetlobo bolj kot osnovni vzorec, v katerem so agregati. Običajno sipanje z večanjem koncentracije delcev v vzorcu narašča. V raziskavi smo opazili pri vzorcu z najvišjo koncentracijo (6 mg/ml) padec intenzitete sipanja. Z redčenjem supernatanta pod priporočeno minimalno koncentracijo delcev smo dokazali, da le majhen delež velikih delcev v vzorcu znatno vpliva na rezultat meritev, zlasti pri razredčenih vzorcih.

Rezultati meritev vzorcev BaSO₄ v etanolu pred uporabo UZ niso bili ustrezni glede na vse parametre, ki jih poda Zetasizer. Posamezne meritve so trajale zelo dolgo. V tem primeru porazdelitev velikosti glede na intenziteto sipanja za vzorce BaSO₄ v etanolu pred UZ ni realna, saj rezultati meritev ne korelirajo z uporabljenimi distribucijsko analizo.

Distribucija velikosti delcev TiO₂ v vodi pred uporabo UZ se nahaja v območju 100 nm–6000 nm, kar kaže, da je vzorec zelo polidisperzen in delci, združeni v agregate, kar sovпада s SEM-sliko vzorca TiO₂. Soniciranje vzorca v UZ-kadički izboljša dispergiranje delcev v vzorcu, zato so meritve bolj ponovljive. Porazdelitev velikosti je še vedno široka, a pomaknjena k nižjim vrednostim in nakazuje na bimodalnost vzorcev, o čemer so poročali tudi v literaturi. Polidisperzen pa ni le vzorec kot celota, ampak tudi sam supernatant. Ugotovili smo, da je za razbitje nastalih agregatov TiO₂ v vodi potreben daljši čas soniciranja kot za agregate BaSO₄. S časom soniciranja se krivulja porazdelitve velikosti glavne populacije delcev oža, poleg tega se zmanjšuje pik, ki predstavlja delce v mikrometrskem območju. Minimalna velikost delcev, ki smo jo izmerili po soniciranju, je bila okrog 200 nm. Tudi pri vzorcih TiO₂ intenziteta sipanja vzorcev narašča s koncentracijo do dolečene koncentracije, nato pa začne padati. To je verjetno koncentracija, pri kateri že prihaja do

interakcij delec–delec ali pa vzorec začne multiplo sipati svetlobo, ne daje pa še nerealnih rezultatov glede velikosti delcev. Pri razredčenih vzorcih TiO_2 smo prišli do podobnih spoznanj kot pri razredčenih vzorcih BaSO_4 . Delež intenzitete, ki ga k sipanju doprinesejo delci, ki jih na intenzitetni distribuciji predstavlja drugi pik, z redčenjem vzorca narašča, kar pomeni, da prihaja sipanje prisotnih večjih delcev dejansko bolj do izraza, čeprav jih je količinsko manj.

Merjenje velikosti vzorcev SDS je pokazalo, da so v vseh vzorcih ne glede na njihovo koncentracijo in ne glede na pripravo vzorca prisotni delci velikosti 100 nm–400 nm, iz česar lahko sklepamo, da so poleg micelov prisotni tudi agregati. Pri vzorcu s koncentracijo SDS-a 0,01 mol/l, ki je glede na podatke iz literature nad CMC SDS-a, se pojavi poleg pika, ki predstavlja agregate, še en pik pri velikosti okrog 4 nm–6 nm. Predvidevamo, da ta pik predstavlja micelle SDS-a. Velikost micelov se z večanjem koncentracije zmanjšuje do vrednosti 1,7 nm in hkrati se povečuje delež intenzitete sipanja, ki pripada piku micelov, kar dokazuje, da število micelov s koncentracijo narašča. Pri pretvorbi porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja v porazdelitev velikosti glede na volumen delcev so vsi piki za delce, večje od 10 nm, izginili, ostal je le pik micelov. To pomeni, da so v vzorcu predvsem miceli in bistveno manj drugih večjih struktur, ki pa zaradi velikosti veliko bolj sipajo svetlobo kot majhni delci, kar kaže na pomen oz. vpliv potencialne kontaminacije vzorca z večjimi delci na končni rezultat meritve. Ugotovili smo, da način priprave vzorca (natehte, redčenje osnovnega vzorca) ne vpliva bistveno na izmerjeno povprečno velikost micelov in določitev CMC. Razlike smo zaznali le v območju velikosti delcev, ki so večji od 100 nm, poleg tega nefiltrirani vzorci vsebujejo delce > 1000 nm, ki jih v filtriranih vzorcih ni. Iz krivulj odvisnosti sipanja od koncentracije lahko razberemo, da sipanje vzorcev s koncentracijo pod CMC precej niha, medtem ko pri koncentracijah nad CMC sipanje narašča s koncentracijo. Predhodno objavljene metode za izračun CMC iz preloma krivulje (odvisnost sipanja od koncentracije) nismo mogli uporabiti, saj so vrednosti sipanja pred CMC precej nihale. Glede na pojav micelov v vzorcih pri koncentraciji 0,01 mol/l sklepamo, da je CMC za SDS v vodi med 0,0075 mol/l in 0,01 mol/l, kar je v skladu z vrednostmi iz literature. Torej je DLS-metoda pogojno ustrezna za ugotavljanje CMC površinsko aktivnih snovi. Potrebno je dobro poznavanje lastnosti vzorca in pregled obstoječih podatkov iz literature. K boljši kvaliteti podatkov in interpretaciji rezultatov pa vsekakor prispevajo izkušnje z delom na instrumentu.

Ugotovili smo, kljub temu da je aparaturna prilagojena merjenju velikosti vzorcev nizkih in zelo visokih koncentracij, da predstavljajo omejitev in napako merjenja interakcije delec–

delec pri visokih koncentracijah, ki vplivajo na izmerjeno velikost delcev in s tem na zanesljivost rezultata. Sklepamo, da večja koncentracija vzorca poveča tudi težnjo vzorca po agregaciji, kar pomeni, da so za meritev velikosti bolj primerni optimalno razredčeni vzorci. Analiza razredčenih vzorcev daje bolj realne rezultate o velikosti delcev kot analiza koncentriranih.

Pri interpretaciji dobljenih rezultatov moramo biti zelo previdni, saj so le-ti zelo odvisni od postopka priprave vzorca in od nadaljnjega rokovanja z njimi vse do meritve, kar močno vpliva na ponovljivost rezultatov. Pri pregledu rezultatov treh ponovitev na istem vzorcu se je večkrat zgodilo, da so bile vse tri prikazane porazdelitve velikosti glede na intenziteto sipanja različne, medtem ko se vrednosti sipanja niso razlikovale. V takem primeru je bistveno, da bolj podrobno pregledamo korelacijsko funkcijo in iz nje razberemo lastnosti vzorca, ki so vzrok dobljenemu rezultatu. Iz korelogramov lahko ugotovimo osnovne lastnosti vzorca, ki ga merimo (npr. povprečno velikost delcev, ki jo podaja hitrost upada korelacije, modalnost vzorca, prisotnost agregatov), kar nam daje informacije tudi o kvaliteti priprave samega vzorca.

Zaključimo lahko, da je DLS zelo praktična, neinvazivna in enostavna metoda za določanje velikosti koloidnih delcev v disperzijah. Nikakor pa se ne smemo zanesti zgolj na rezultat meritve, ki ga poda aparatura, saj je za pravilno interpretacijo dobljenih podatkov in kakovosten rezultat meritve nujna tudi analiza korelograma in poznavanje lastnosti vzorca, npr. njegova težnja po agregiranju.

6 LITERATURA

- 1) Kristl J., Šmid-Korbar J., Srčič S.: Farmaceutvska tehnologija, Slovensko farmaceutvsko društvo, Ljubljana, 1992: 22, 148–155.
- 2) Myers d.: Surfaces, interfaces and colloids, VCH Publishers, New York, 1991: poglavje 10(189-219), 13(275), 15(300–332).
- 3) Burgess D.: Colloids and drug delivery systems, Encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker Inc, New York, 1998: vol.III, 35–39.
- 4) F. Podlogar, M. Gašperlin. Izbor metod za določanje fizikalnih lastnosti koloidnih sistemov v farmaciji. Farmaceutvski vestnik 2003; 54: 47–56.
- 5) Kreuter J. Nanoparticles. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York-Basel-Hong-Kong: Marcel Dekker. 1994; 165–190.
- 6) N. Obermajer, J. Kos, J. Kristl. Nanodelci: Sodobni dostavni sistem za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. Farmaceutvski vestnik 2007; 58: 39–44.
- 7) M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 69: 1–9
- 8) Chen-Yu Wang, Shan-Peng Pan, Gwo-Sheng Peng, Jen-Hui Tsai. A comparison study on the measurement of nanoparticles. Center for measurement standards (CMS)/Industrial Technology Research Institute (ITRI) No. 321, Sec. 2, Taiwan.
- 9) M. Tomšič. Strukturne raziskave mikroemulzij z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Doktorska disertacija 2004.
- 10) C. Goddeeris, F. Cuppo, H. Reynaers, W.G. Bouwman, G. Van den Mooter. Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes. International Journal of Pharmaceutics 2006; 312: 187–195.
- 11) P.H. Brown, P. Schuck. Macromolecular size and shape distribution by sedimentation velocity analytical centrifugation. Biophysical Journal 2006; 90: 4651-4661.

- 12) M. Holzer, V. Vogel, W. Mantele, D. Schwartz. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009;
- 13) W. Fraunhofer, G. Winter. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceutics and biopharmaceutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 58: 369–383.
- 14) C. Contado, A. Dolpiaz, E. Leo. Complementary use of flow and sedimentation field-flow fractionation techniques for size characterising biodegradable poly (lactic acid) nanospheres. *Journal of Chromatography A* 2007; 1157: 321–335.
- 15) A. Helle, S. Hirsjarvi, L. Peltonen. Quantitative determination of drug encapsulation in poly (lactic acid) nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 2008; 1178: 248–255.
- 16) F.K. Lin, Y.Y Lin, C.H. Wu. Highly efficient approach for characterising nanometer sized gold particles by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 2005; 528: 249–254.
- 17) F.K. Lin. A high efficiency capillary electrophoresis based method for characterising the sizes of all nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 2007; 1167: 231–235.
- 18) Zetasizer Nano Series and HPPS training course. Chapter 1: Dynamic light scattering (DLS) size theory.
- 19) Zetasizer Nano user manual 2008, mano317; 4
www.indiana.edu/~physbio/images/Zetasizer%20Nano%20user%20manual.pdf
- 20) Zetasizer Nano Series and HPPS training course. Chapter 2: Dynamic light scattering (DLS) experimental.
- 21) Mike Kaszuba. Zetasizer Nano Training Course. University of Ljubljana 2009.
- 22) Yang Zhang, Yongsheng Chen, Paul Westerhoff, Kiril Hristovski. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water research* 2008; 42: 2204–2212
- 23) Seifollah Jalili, Mojdeh Akhavan. A coarse-grained molecular dynamics simulation of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (2009)
- 24) Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. Malvern Instruments Ltd. 2006. www.malvern.com

-
- 25) M. Almgren, J. C. Gimel, Ke Wang, G. Karlsson, K. Edwards, W. Brown, and K. Mortensen. SDS Micelles at High Ionic Strength. A Light Scattering, Neutron Scattering, Fluorescence Quenching, and CryoTEM Investigation. *Journal of Colloid and Interface science* 202, 222–231 (1998)
- 26) Chrystal D. Bruce, Max L. Berkowitz, Lalith Perera, and Malcolm D. E. Forbes. Molecular Dynamics Simulation of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: Micellar Structural Characteristics and Counterion Distribution. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 3788–3793
- 27) Vincent A. Hackley, Jeffrey D. Clogston. Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. NIST - NCL Joint Assay Protocol PCC-1 Version 1.0, 2007
- 28) R. Zana. Aqueous Surfactant-Alcohol Systems: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 57 (1995) 1–64
- 29) Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Paul J Weller. *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. Pharmaceutical Press, American Pharmaceutical Association. 4th edition.
- 30) Frank H. Quina, Patricia M. Nassar, Barney L. Bales. Growth of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles with Detergent Concentration. *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 17028–17031.
- 31) Kohsaku Kawakami, Naohiko Oda, Kyoko Miyoshi, Takeshi Funaki, Yasuo Ida. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28 (2006) 7–14.
- 32) http://www.kemomed.si/KEMOMED,,prodajni_program,obdelava_vod,purelab,ultra.htr

7 PRILOGA

Priloga 1: Intenziteta sipanja (kcps) različnih vzorcev vod.

	VODOVODNA VODA	VODA PREČIŠČENA Z REVERZNO OSMOZO	ULTRA ČISTA VODA (PureLab Ultra)	1×DESTILIRANA VODA	2×DESTILIRANA VODA
SIPANJE (kcps)	66,30	26,20	29,20	79,30	22,10
	40,30	26,20	25,00	47,60	26,00
	115,00	35,80	32,80	37,20	25,70
			31,90	73,20	
			31,02	32,20	
			22,85		
			22,40		
		29,80			
POVPREČJE SIPANJA (kcps)	73,87	29,40	28,12	53,90	24,60

Priloga 2: Velikost delcev barijevega sulfata v vodnih disperzijah vzorcev z nižjo koncentracijo: a) pred uporabo ultrazvoka, b) po soniciranju v ultrazvočni kadički in c) velikost delcev v supernatantu 24 ur po pripravi vzorca (serija 1).

KONCEN=	a) PRED UZ					b) PO UZ					c) SUPERNATANT				
	TRACIJA		PIK2		SIPANJE	PIK1		PIK2		SIPANJE	PIK1		PIK2		SIPANJE
	PIK1	%	(nm)	%		(nm)	INTENZ.	INTENZ.	(nm)		INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(nm)	
BaSO ₄	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(kpcps)	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(kpcps)	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(kpcps)
(mg/ml)															
0,05	165,2	100,0	-	-	7751,0						167,4	100,0	-	-	8410,6
	179,1	97,5	5184,0	2,5	7685,4						169,3	100,0	-	-	8386,1
	182,2	97,6	4963,0	2,4	7501,4						162,9	100,0	-	-	8335,3
0,10	176,5	100,0	-	-	10088,2						183,6	100,0	-	-	11443,7
	216,4	97,9	5388,0	2,1	9863,6						178,6	100,0	-	-	11357,6
	217,8	97,0	5266,0	3,0	9788,4						188,9	100,0	-	-	11309,0
0,20	168,1	98,2	5233,0	1,8	63400,8	166,6	98,7	5225,0	1,3	73638,5	158,4	100,0	-	-	91028,5
	167,3	98,9	5337,0	1,1	64100,7	158,1	98,9	5267,0	1,2	73677,2	160,3	100,0	-	-	91086,4
	165,4	98,3	5051,0	1,7	63611,2	171,0	100,0	-	-	74343,9	160,1	100,0	-	-	90909,5
0,35	183,0	83,7	982,6	11,3	27087,9	161,8	100,0	-	-	89773,6	165,6	100,0	-	-	134006,2
	188,4	87,0	782,0	9,6	69518,3	172,2	98,9	5385,0	1,1	89059,6	169,1	100,0	-	-	135158,3
	202,9	92,0	5046,0	5,2	73162,4	165,3	97,0	5087,0	3,0	90042,3	169,8	100,0	-	-	134586,3
0,50	264,0	88,2	4915,0	11,8	57884,0	164,1	92,0	4448,0	8,0	96236,1	165,7	100,0	-	-	153014,2
	221,2	100,0	-	-	56245,1	179,2	93,5	4375,0	6,5	98738,7	172,5	100,0	-	-	152817,1
	225,0	98,5	5560,0	1,5	57150,4	183,0	97,3	5045,0	2,7	101130,5	171,4	100,0	-	-	153443,0
0,76	139,6	100,0	-	-	225422,8	129,2	100,0	-	-	201767,7	137,9	100,0	-	-	270774,4
	145,1	100,0	-	-	222180,2	135,4	100,0	-	-	206393,0	136,2	100,0	-	-	270217,5
	143,9	100,0	-	-	221703,6	138,4	100,0	-	-	203736,5	136,2	100,0	-	-	270783,5
1,00	174,2	83,8	1361,0	14,2	132666,3	186,3	94,9	4315,0	5,1	209130,6	179,5	100,0	-	-	219772,7
	190,1	85,9	2711,0	14,1	130945,2	201,0	97,8	4637,0	2,2	213879,8	178,4	100,0	-	-	221236,4
	180,0	83,9	2353,0	16,1	135652,3	182,9	98,0	5241,0	2,0	218563,6	183,7	100,0	-	-	221106,5

Priloga 3: Velikost delcev barijevega sulfata v vodnih disperzijah vzorcev z višjo koncentracijo: a) pred uporabo ultrazvoka, b) po soniciranju v ultrazvočni kadički, c) po soniciranju v ultrazvočni kadički (60 min) in uporabi ultrazvočne sonde (2 min) ter č) velikost delcev v supernatantu 24 ur po pripravi vzorca (serija 2).

KONCENTRACIJA BaSO ₄ (mg/ml)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA							
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
a) PRED UZ								
0,76	745,4	100,0	-	-	-	-	10705,6	-
	752,4	100,0	-	-	-	-	8765,2	-
	547,4	100,0	-	-	-	-	6270,5	-
1,00	840,3	100,0	-	-	-	-	11278,3	-
	378,8	100,0	-	-	-	-	10326,8	-
	409,9	100,0	-	-	-	-	9308,9	-
4,00	1312,0	46,2	4501,0	36,0	270,4	17,8	15281,6	-
	1292,0	65,0	260,6	23,5	5325,0	11,5	15542,9	-
	1232,0	63,4	307,4	31,4	5477,0	5,2	16276,0	-
6,00	2515,0	88,8	293,4	11,2	-	-	8052,3	+
	1912,0	66,3	300,7	18,2	4735,0	15,5	8542,3	-
	1321,0	75,1	260,6	18,1	5402,0	6,8	9476,6	-
b) PO UZ 60 min.								
0,76	204,4	96,3	4457,0	3,7	-	-	184673,9	+
	198,2	96,6	4795,0	3,4	-	-	184120,0	+
	209,7	97,3	4300,0	2,7	-	-	192884,1	+
1,00	295,3	97,3	4997,0	2,2	-	-	177039,2	+
	307,2	97,3	5059,0	2,7	-	-	181052,4	+
	215,1	79,1	1587,0	20,9	-	-	176121,3	+
4,00	194,6	100,0	-	-	-	-	277337,3	+
	190,6	100,0	-	-	-	-	293060,4	+
	177,4	98,9	4971,0	1,1	-	-	289334,2	+
6,00	844,4	64	168,0	36,0	-	-	123489,4	+
	218,0	51,2	1305,0	46,5	4895,0	2,3	122332,4	+
	235,0	55,1	1845,0	44,9	-	-	124023,6	+

Priloga 3: Nadaljevanje priloge 3.

KONCENTRACIJA BaSO ₄ (mg/ml)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA							SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.			
c) PO UZ 60 min.+ SONDA 2min.									
0,76	161,0	100,0	-	-	-	-	192072,0	+	
	165,5	100,0	-	-	-	-	192971,6	+	
	167,4	100,0	-	-	-	-	190054,5	+	
1,00	146,1	100,0	-	-	-	-	410252,5	+	
	155,5	100,0	-	-	-	-	408709,7	+	
	156,1	100,0	-	-	-	-	408170,3	+	
4,00	165,6	100,0	-	-	-	-	796312,2	+	
	165,2	100,0	-	-	-	-	788212,5	+	
	169,0	100,0	-	-	-	-	776188,7	+	
6,00	176,8	100,0	-	-	-	-	775143,7	+	
	174,4	100,0	-	-	-	-	779213,3	+	
	178,6	100,0	-	-	-	-	797850,1	+	
č) SUPERNATANT									
0,76	125,0	100,0	-	-	-	-	60308,4	+	
	128,0	100,0	-	-	-	-	59816,7	+	
	125,1	100,0	-	-	-	-	59684,8	+	
1,00	140,1	100,0	-	-	-	-	43018,3	+	
	136,6	100,0	-	-	-	-	42960,6	+	
	136,0	100,0	-	-	-	-	42708,3	+	
4,00	172,4	100,0	-	-	-	-	834116,5	+	
	167,2	100,0	-	-	-	-	823024,6	+	
	167,1	100,0	-	-	-	-	819805,6	+	
6,00	193,2	98,2	4898,0	1,8	-	-	736820,5	+	
	203,7	100,0	-	-	-	-	737618,0	+	
	200,2	100,0	-	-	-	-	731878,9	+	

Priloga 4: Velikosti delcev barijevega sulfata v vodni disperziji za vzorce, ki smo jih pripravili z redčenjem supernatanta vzorca z začetno koncentracijo 4,00 mg/ml.

PRIBLIŽNA KONC. mg/ml	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA					
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
0,004	159,0	99,0	5474,0	1,0	656,4	+
	175,0	95,9	4940,0	4,1	661,2	+
	176,0	94,3	4063,0	5,7	611,2	+
0,007	245,1	95,7	4953,0	4,3	1414,0	+
	272,8	97,3	5117,0	2,7	1393,0	+
	264,9	97,2	4599,0	2,8	1405,6	+
0,02	209,8	98,9	4980,0	1,1	5705,6	+
	176,5	96,0	4817,0	4,0	5743,9	+
	189,7	98,1	5022,0	1,9	5597,5	+
0,04	189,6	98,4	5071,0	1,6	11814,3	+
	197,7	100,0	-	-	11898,6	+
	207,3	98,6	4620,0	1,4	11883,8	+
0,08	185,1	100,0	-	-	52594,7	+
	173,6	100,0	-	-	52606,8	+
	181,0	100,0	-	-	52791,2	+
0,13	211,3	100,0	-	-	73664,6	+
	222,3	100,0	-	-	73483,9	+
	208,8	100,0	-	-	73508,9	+
0,39	189,0	96,3	4308,0	3,7	149970,1	+
	205,6	100,0	-	-	153775,0	+
	182,4	97,3	4913,0	2,7	153369,7	+
0,78	204,2	100,0	-	-	332358,4	+
	206,0	100,0	-	-	332373,6	+
	199,1	98,7	4283,0	1,3	329098,1	+
2,61	178,5	98,5	5082,0	1,5	842444,5	+
	175,9	97,1	4858,0	2,9	844980,8	+
	186,8	97,9	4668,0	2,1	841466,2	+

Priloga 5: Velikosti delcev barijevega sulfata v 96 % etanolu pri različnih koncentracijah: a) pred uporabo UZ, b) po soniciranju v UZ-kadički in c) velikost delcev v supernatantu 24 ur po pripravi vzorca (sipanje etanola 55,5 kcps).

KONCEN= TRACIJA BaSO ₄ (mg/ml)	a) PRED UZ					b) PO UZ					c) SUPERNATANT				
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)
0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	520,3	180,3	100	-	-	4621,2	216,8	100,0	-	-	3413,0
	0,0	0,0	0,0	0,0	485,1	198,2	100,0	-	-	4343,9	208,5	98,9	5320,0	1,1	3383,5
	155,4	100,0	-	-	474,3	183,3	100,0	-	-	4307,1	216,3	100,0	-	-	3405,7
0,10	105,7	100,0	-	-	1542,6	201,1	100,0	-	-	7096,2	219,4	100,0	-	-	4993,1
	0,0	0,0	0,0	0,0	1527,6	197,0	100,0	-	-	6928,9	234,5	100,0	-	-	5042,4
	141,8	100,0	-	-	1310,3	238,2	90,0	92,3	10,0	6833,7	224,3	98,9	5189,0	1,1	5058,8
0,20	141,8	93,0	1,7	7,0	3246,8	229,4	97,4	5326,0	2,6	13035,5	231,9	100,0	-	-	13616,2
	141,8	93,9	0,6	6,1	2439,0	235,0	100,0	-	-	13013,1	227,5	100,0	-	-	13648,0
	122,4	100,0	-	-	2084,0	224,8	100,0	-	-	13115,3	230,0	100,0	-	-	13704,8
0,35	458,7	100,0	-	-	3477,1	199,9	82,0	1765,0	10,4	18179,2	234,2	100,0	-	-	19499,3
	273,9	100,0	-	-	3804,6	213,2	100,0	-	-	18049,0	236,7	100,0	-	-	19537,9
	220,2	100,0	-	-	2877,4	223,3	100,0	-	-	17658,0	228,8	100,0	-	-	19501,0
0,51	734,6	100,0	-	-	8377,7	237,8	97,5	5560,0	2,5	44631,3	233,3	100,0	-	-	71355,3
	220,9	100,0	-	-	7945,2	228,1	84,9	4857,0	15,1	49557,0	228,1	100,0	-	-	71101,5
	186,4	100,0	-	-	6088,8	222,0	72,1	3055,0	27,9	49724,7	230,5	100,0	-	-	71743,1
0,75	0,0	0,0	0,0	0,0	27919,1	219,8	100,0	-	-	52236,6	237,1	100,0	-	-	120398,8
	4776,0	100,0	-	-	21152,7	221,7	81,2	4700,0	18,8	56272,8	244,5	100,0	-	-	119674,2
	2163,0	100,0	-	-	18942,7	259,4	82,6	3879,0	17,4	63608,7	236,6	100,0	-	-	119908,2
1,00	0,0	0,0	0,0	0,0	14294,3	233,6	100,0	-	-	118380,3	234,6	100,0	-	-	131832,7
	1094,0	100,0	-	-	9529,5	250,5	97,0	5076,0	3,0	111886,9	243,7	100,0	-	-	131853,5
	1080,0	100,0	-	-	9365,5	262,2	98,2	4775,0	1,8	114637,3	231,5	100,0	-	-	131502,1

Priloga 6: Velikosti delcev titanovega dioksida v vodnih disperzijah pri različnih koncentracijah: a) pred uporabo ultrazvoka, b) po soniciranju v UZ kadički in c) velikost delcev v supernatantu 24 ur po pripravi vzorca (serija 1).

KONCEN= TRACIJA TiO ₂ (mg/ml)	a) PRED UZ					b) PO UZ					c) SUPERNATANT				
	PIK1	%	PIK2	%	SIPANJE	PIK1	%	PIK2	%	SIPANJE	PIK1	%	PIK2	%	SIPANJE
	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(keps)	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(keps)	(nm)	INTENZ.	(nm)	INTENZ.	(keps)
0,01	451,0	100,0	-	-	5179,9	233,4	93,7	77,5	6,3	7802,1	260,9	100,0	-	-	7689,2
	439,2	100,0	-	-	5506,6	262,9	100,0	-	-	7719,0	259,7	100,0	-	-	7537,1
	405,0	100,0	-	-	5419,3	403,1	60,3	151,1	39,7	7838,7	247,9	97,6	5397,0	2,4	7417,8
0,02	578,2	88,5	118,3	11,5	10025,5	369,9	69,2	134,7	30,8	12994,3	263,4	98,9	5536,0	1,1	12137,9
	514,4	87,7	119,5	12,3	10050,4	460,2	56,2	168,3	43,8	12988,9	270,3	98,5	5401,0	1,5	12030,6
	715,2	80,0	165,0	20,0	9705,0	467,1	68,8	148,5	31,2	12816,1	253,5	98,4	5436,0	1,6	11936,4
0,03	443,0	100,0	-	-	11489,8	565,4	54,3	188,6	45,7	13224,2	317,3	100,0	-	-	12650,5
	856,5	89,7	144,0	10,3	10785,2	539,3	66,5	161,0	33,5	13474,6	296,7	100,0	-	-	12664,6
	871,2	81,2	187,1	18,8	10198,6	768,8	50,9	211,3	49,1	13634,7	364,7	98,4	5381,0	1,6	12389,9
0,06	383,1	100,0	-	-	46359,6	654,2	100	-	-	55398,9	740,3	100,0	-	-	14892,4
	693,2	90,3	133,3	9,7	44914,1	837,1	94,6	131,9	5,4	55534,9	761,4	100,0	-	-	14938,4
	876,9	90,3	136,4	9,7	43110,8	1014,0	77,3	269,8	19,6	53082,1	779,4	100,0	-	-	14990,6
0,10	267,4	100,0	-	-	65967,2	358,2	100,0	-	-	73296,1	441,6	100,0	-	-	61308,3
	695,3	100,0	-	-	60255,0	447,5	90,2	102,6	9,8	71098,6	366,3	100,0	-	-	61740,7
	738,2	94,4	89,4	5,6	60723,1	660,3	73,3	159,2	26,7	71747,7	352,0	98,2	5011,0	1,8	61210,6
0,20	610,5	100,0	-	-	62921,2	670,4	58,2	184,9	40,2	81195,2	280,7	98,9	5191,0	1,1	123458,1
	722,8	91,2	128,6	8,8	63710,6	763,9	53,8	204,5	44,3	80690,6	285,1	98,1	4448,0	1,9	122427,8
	1397,0	74,6	236,1	19,3	58323,8	814,8	47,8	197,5	46,5	78090,5	296,1	100,0	-	-	123029,4
0,35	1086,0	83,2	210,8	16,8	62247,1	382,7	93,4	4183,0	6,6	120047,9	354,5	100,0	-	-	190265,0
	1124,0	86,8	183,8	13,2	55709,0	224,9	66,6	860,9	30,7	115372,4	287,1	98,9	5103,0	1,1	190666,4
	1183,0	75,8	209,0	15,8	54068,9	322,1	92,8	4683,0	7,2	118783,1	316,9	100,0	-	-	190616,9
0,50	1378,0	84,9	4961,0	8,0	85284,4	231,1	56,1	1358,0	43,9	84932,9	277,6	92,4	2375,0	7,6	234865,4
	1211,0	79,3	253,9	20,7	77970,7	443,7	90,3	3840,0	9,7	85236,8	302,2	100,0	-	-	234567,0
	1729,0	68,8	303,1	29,3	81219,0	437,9	93,8	4718,0	6,2	83910,9	298,2	100,0	-	-	233794,7
0,75	1024,0	56,2	3559,0	36,3	57435,4	277,2	95,3	4129,0	4,7	98611,0	211,4	100,0	-	-	327467,0
	1315,0	71,0	231,9	15,8	54566,6	241,3	92,9	4471,0	7,1	95498,4	208,2	100,0	-	-	328374,2
	2246,0	83,7	263,0	16,3	53314,2	270,2	91,6	3500,0	8,4	94410,1	213,9	100,0	-	-	329372,3
1,00	1299,0	80,2	237,0	17,0	66771,8	304,7	98,1	4785,0	1,9	76131,7	226,6	100,0	-	-	444181,3
	1591,0	78,7	281,9	21,3	66070,2	282,4	97,5	5032,0	2,5	73492,7	216,7	100,0	-	-	442008,1
	1443,0	100,0	-	-	66712,4	245,4	90,8	4216,0	9,2	71549,3	227,1	100,0	-	-	442880,9

Priloga 7: Velikosti delcev titanovega dioksida v vodnih disperzijah pri višjih koncentracijah: a) pred uporabo ultrazvoka, b) po soniciranju v UZ-kadički, c) ,č) ,d) ,e) po soniciranju v UZ- kadički 60 min in z uporabo UZ-sonde (2 min, 4 min, 6 min, 8 min) ter f) velikost delcev v supernatantu (serija 2).

KONCENTRACIJA TiO ₂ (mg/ml)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA							
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
a) PRED UZ								
0,50	1467,0	67,5	312,2	26,5	5374,0	6,0	60699,5	+
	2563,0	68,7	449,1	28,5	123,1	2,8	56169,6	-
	1786,0	64,0	4588,0	18,1	252,6	17,9	58622,0	-
0,75	1990,0	78,1	270,0	17,9	5230,0	3,9	34384,9	-
	2160,0	82,4	267,1	17,6	-	-	32731,2	-
	1945,0	75,8	282,2	19,4	5184,0	4,8	32273,7	+
2,01	1800,0	84,4	227,2	12,6	-	-	16456,2	-
	1838,0	88,5	226,2	11,5	-	-	16032,6	+
	1865,0	91,6	210,4	8,4	-	-	15670,7	+
b) PO UZ 60 min.								
0,50	444,8	96,4	4996,0	3,6	-	-	83698,5	+
	783,1	100,0	-	-	-	-	83510,8	+
	261,2	61,5	1209,0	38,5	-	-	83048,4	+
0,75	338,3	88,6	4156,0	11,4	-	-	62995,7	+
	228,1	56,0	1135,0	44,0	-	-	62837,4	+
	407,6	97,1	4837,0	2,9	-	-	61711,3	+
2,01	469,7	100,0	-	-	-	-	57282,2	+
	222,7	51,6	820,9	48,4	-	-	56450,1	+
	681,1	66,3	170,2	33,7	-	-	55946,4	+
c) PO UZ + SONDA 2min.								
0,50	251,0	94,4	4432,0	5,6	-	-	119299,1	+
	245,9	93,2	4412,0	6,8	-	-	115686,7	+
	270,3	94,6	4636,0	5,4	-	-	118501,2	+
0,75	279,5	100,0	-	-	-	-	99940,6	+
	249,0	94,2	4546,0	5,8	-	-	97304,3	+
	291,7	97,9	5129,0	2,1	-	-	96243,3	+
2,01	300,4	98,8	4519,0	1,2	-	-	68747,6	+
	290,0	97,1	4486,0	2,9	-	-	68591,0	+
	299,9	100,0	-	-	-	-	67930,8	+

Priloga 7: Nadaljevanje priloge 7.

KONCENTRACIJA TiO ₂ (mg/ml)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA							
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
č) PO UZ + SONDA 4 min.								
0,50	207,8	96,2	4564,0	3,8	-	-	158740,8	+
	236,6	98,3	5031,0	1,7	-	-	161804,8	+
	201,3	94,6	4613,0	5,4	-	-	155115,5	+
0,75	216,2	99,7	39,0	0,3	-	-	127488,1	+
	232,9	98,2	49,2	1,8	-	-	127801,8	+
	219,5	98,7	5280,0	1,3	-	-	125472,2	+
2,01	242,6	100,0	-	-	-	-	77643,9	+
	232,0	96,2	2850,0	3,8	-	-	77735,4	+
	251,2	100,0	-	-	-	-	76641,1	+
d) PO UZ + SONDA 6 min.								
0,50	177,7	96,7	4693,0	3,3	-	-	206865,6	+
	175,1	97,4	5179,0	2,6	-	-	198396,3	+
	176,5	93,5	4437,0	6,5	-	-	204981,5	+
0,75	184,1	94,7	4082,0	5,3	-	-	156007,0	+
	218,5	100,0	-	-	-	-	151512,7	+
	230,1	100,0	-	-	-	-	145753,2	+
2,01	212,3	100,0	-	-	-	-	87625,0	+
	209,3	96,0	4245,0	4,0	-	-	87280,0	+
	218,8	97,3	4247,0	2,7	-	-	86938,5	+
e) PO UZ + SONDA 8min.								
0,50	181,5	98,6	5002,0	1,4	-	-	251866,2	+
	207,8	100,0	-	-	-	-	267134,2	+
	179,3	97,3	4851,0	2,7	-	-	275525,1	+
0,75	186,5	100,0	-	-	-	-	210033,9	+
	193,9	98,7	5128,0	1,3	-	-	197471,6	+
	213,8	100,0	-	-	-	-	191683,2	+
2,01	202,8	100,0	-	-	-	-	98127,2	+
	186,2	95,3	4318,0	4,7	-	-	99119,0	+
	226,7	100,0	-	-	-	-	98216,1	+
f) SUPERNATANT								
0,50	203,8	100,0	-	-	-	-	159120,8	+
	204,5	100,0	-	-	-	-	156778,9	+
	208,2	100,0	-	-	-	-	157152,4	+
0,75	189,3	100,0	-	-	-	-	262549,4	+
	203,7	100,0	-	-	-	-	262148,1	+
	197,0	100,0	-	-	-	-	261876,3	+
2,01	271,1	98,4	3996,0	1,6	-	-	206632,0	+
	274,6	100,0	-	-	-	-	204417,4	+
	260,4	97,7	4402,0	2,3	-	-	203304,3	+

Priloga 8: Velikosti delcev titanovega dioksida v vodni disperziji za vzorce, ki smo jih pripravili z redčenjem supernatanta vzorca z začetno koncentracijo 2,00 mg/ml.

PRIBLIŽNA KONC. TiO ₂ (mg/ml)	REDČITVE SUPERNATANTA						REDČITVE SUPERNATANTA + SONDA 2min.					
	PIK 1	% INTENZ.	PIK 2	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV	PIK 1	% INTENZ.	PIK 2	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	USPEŠNOST MERITEV
0,001	215,4	96,1	4959,0	3,9	2190,3	+	141,7	100,0	-	-	4404,7	-
	216,7	98,0	5169,0	2,0	2148,0	+	166,4	100,0	-	-	4356,8	+
	225,1	97,4	4850,0	2,6	2180,4	+	157,0	100,0	-	-	4547,8	-
0,002	206,2	100,0	-	-	4775,1	+	182,7	978,8	5447,0	1,2	5429,8	+
	213,9	95,3	4438,0	4,7	4714,9	+	200,6	97,4	4972,0	2,6	5341,8	+
	215,1	95,1	4446,0	4,9	4710,9	+	169,9	100,0	-	-	5420,5	+
0,007	223,6	96,2	4434,0	3,8	10060,7	+	181,8	98,5	5324,0	1,5	11323,6	+
	260,4	100,0	-	-	9954,2	+	200,2	97,7	4873,0	2,3	11295,6	+
	221,2	95,8	4394,0	4,2	9796,7	+	189,7	98,3	5248,0	1,7	11237,2	+
0,013	240,3	100,0	-	-	16297,4	+	177,6	98,7	5301,0	1,3	18616,0	+
	249,7	98,1	4796,0	1,9	16247,0	+	197,5	98,3	5078,0	1,7	18558,8	+
	272,8	100,0	-	-	16291,6	+	219,1	100,0	-	-	18745,5	+
0,03	255,7	100,0	-	-	58617,5	+	202,5	100,0	-	-	64493,9	+
	243,4	100,0	-	-	58008,2	+	205,3	97,9	4622,0	2,1	64837,1	+
	236,8	100,0	-	-	58034,0	+	218,5	100,0	-	-	65343,8	+
0,04	267,3	98,3	4094,0	1,7	76195,7	+	197,6	100,0	-	-	91399,9	+
	249,4	98,8	52,6	1,2	75310,1	+	188,3	98,6	5172,0	1,4	91835,2	+
	247,2	100,0	-	-	74056,7	+	213,1	100,0	-	-	92243,9	+
0,14	238,7	100,0	-	-	203122,0	+	198,5	98,6	4919,0	1,4	229090,0	+
	209,9	97,2	4917,0	2,8	201178,1	+	216,4	100,0	-	-	230369,6	+
	222,7	96,2	3912,0	3,8	202488,0	+	221,3	100,0	-	-	229514,3	+
0,27	249,9	99,7	42,7	0,3	258305,1	+						
	257,1	100,0	-	-	257899,5	+						
0,91	225,8	97,1	4353,0	2,9	135304,1	+						
	243,7	100,0	-	-	135591,7	+						
	246,0	100,0	-	-	134799,5	+						

Priloga 9: Velikost micelov SDS-a v vodi pri različnih koncentracijah vzorcev, ki smo jih izmerili takoj po pripravi (sipanje vode 39,6 kcps).

KONCENTRACIJA (mol/L)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA								VOLUMSKA DISTRIBUCIJA	
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	MICELI	PIK MICELOV	% VOLUMNA
0,001	313,6	84,5	66,2	10,0	5361,0	5,5	110,6	-		
0,001	278,8	94,9	5246,0	5,1	-	-	112,4	-		
0,001	312,4	87,5	59,2	7,9	5352,0	4,7	122,9	-		
0,0025	431,1	58,3	104,0	41,7	-	-	216,0	-		
0,0025	133,9	48,5	590,0	44,9	5054,0	6,6	216,0	-		
0,0025	143,7	60,1	669,3	36,1	5418,0	3,8	215,6	-		
0,005	192,8	90,8	4266,0	7,0	1208,0	2,2	473,4	-		
0,005	184,5	93,4	4696,0	6,6	-	-	465,0	-		
0,005	166,1	86,0	4146,0	7,1	1744,0	6,9	463,4	-		
0,0075	239,6	93,1	5192,0	6,9	-	-	178,9	-		
0,0075	231,9	97,1	5428,0	2,9	-	-	171,1	-		
0,0075	269,6	93,5	4976,0	6,5	-	-	178,1	-		
0,01	180,7	88,2	4,2	11,8	-	-	133,8	+	3,6	100,0
0,01	218,4	67,7	84,9	21,1	4,4	11,2	126,2	+	4,2	99,9
0,01	201,5	87,4	4,4	12,6	-	-	118,8	+	3,7	100,0
0,025	229,8	70,0	2,5	25,8	5210,0	4,2	184,1	+	2,2	100,0
0,025	178,7	62,2	2,5	25,9	4992,0	6,7	180,7	+	2,3	100,0
0,025	150,7	52,3	2,6	22,8	764,1	18,7	200,8	+	2,4	100,0
0,05	177,0	58,4	1,9	40,0	5560,0	1,6	220,8	+	1,6	100,0
0,05	255,0	58,9	1,9	28,0	4712,0	12,0	251,0	+	1,7	100,0
0,05	227,8	68,7	2,0	28,8	5427,0	2,5	280,3	+	1,8	100,0
0,1	411,3	40,0	143,5	31,6	1,7	28,4	447,9	+	1,5	100,0
0,1	205,7	50,7	1,5	28,6	453,4	20,7	487,5	+	1,4	100,0
0,1	307,7	60,4	1,7	33,5	5039,0	6,1	368,4	+	1,4	100,0
0,5	1,8	51,5	2813,0	41,5	239,7	4,1	632,0	+	1,4	100,0
0,5	1,8	64,6	952,5	24,0	5373,0	5,1	627,3	+	1,3	100,0
0,5	1,8	56,6	1740,0	29,8	4932,0	6,7	636,3	+	1,5	100,0

*Siva polja označujejo pike micelov in njihovo intenziteto.

Priloga 10: Velikost micelov SDS-a v vodi pri različnih koncentracijah vzorcev, ki so 48 h po pripravi stali v kiveti (sipanje vode 39,6 kcps).

KONCENTRACIJA (mol/L)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA								VOLUMSKA DISTRIBUCIJA	
	PIK 1 (nm)	% INTENZ	PIK 2 (nm)	% INTENZ	PIK 3 (nm)	% INTENZ	SIPANJE (kpcs)	MICELEI	PIK MICELOV	% VOLUMNA
0,001	262,3	100,0	-	-	-	-	131,9	-		
0,001	349,2	93,2	60,3	4,3	4974,0	2,5	123,7	-		
0,001	371,3	94,2	4395,0	5,8	-	-	117,2	-		
0,0025	228,5	89,7	52,0	10,3	-	-	103,0	-		
0,0025	334,1	98,8	25,8	1,2	-	-	103,7	-		
0,0025	228,7	93,2	5231,0	6,8	-	-	99,5	-		
0,005	164,3	100,0	-	-	-	-	325,8	-		
0,005	178,2	97,1	5399,0	1,1	-	-	305,7	-		
0,005	180,6	92,9	3132,0	1,4	-	-	305,7	-		
0,0075	136,5	100,0	-	-	-	-	148,4	-		
0,0075	156,5	97,1	5399,0	2,9	-	-	145,9	-		
0,0075	200,5	92,9	3132,0	7,1	-	-	123,9	-		
0,01	189,6	77,4	4,3	12,5	70,5	10,2	152,9	+	4,0	99,9
0,01	144,1	57,9	548,0	31,5	4,3	10,7	156,5	+	3,9	99,9
0,01	401,8	44,8	144,0	41,8	4,3	10,0	159,9	+	4,0	99,9
0,025	223,5	74,4	2,5	25,6	-	-	229,0	+	2,4	100,0
0,025	165,1	53,6	2,5	26,5	847,4	12,2	195,1	+	2,2	100,0
0,025	180,0	61,6	2,6	24,8	3482,0	13,6	197,5	+	2,4	100,0
0,05	178,5	62,0	1,9	38,0	-	-	255,0	+	1,8	100,0
0,05	257,8	57,4	1,9	34,4	4567,0	8,2	245,6	+	1,8	100,0
0,05	156,2	35,5	1,9	35,2	580,6	24,6	227,1	+	1,7	100,0
0,1	260,3	49,1	1,6	43,0	83,0	7,9	342,9	+	1,5	100,0
0,1	277,6	47,8	1,7	43,9	4680,0	8,3	309,9	+	1,4	100,0
0,1	349,8	51,1	1,7	40,6	4814,0	8,3	332,7	+	1,4	100,0
0,5	1,8	79,0	463,1	10,4	4845,0	7,0	471,4	+	1,4	100,0
0,5	1,8	79,2	4270,0	9,2	507,7	7,7	461,6	+	1,4	100,0
0,5	1,8	77,0	584,1	10,1	4021,0	9,2	467,5	+	1,5	100,0

*Siva polja označujejo pike micelov in njihovo intenziteto.

Priloga 11: Velikost micelov SDS v vodi. Vzorce smo pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 M, filtrirali skozi 0,1 µm filter in takoj pomerili (sipanje vode 29,8 kcps).

KONCENTRACIJA (mol/L)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA								VOLUMSKA DISTRIBUCIJA	
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	MICELI	PIK MICELOV	% VOLUMNA
0,001	232,2	95,0	5432,0	5,0	-	-	65,5	-		
0,001	326,9	98,4	4997,0	1,6	-	-	66,1	-		
0,001	355,5	100,0	-	-	-	-	59,9	-		
0,0025	289,0	85,9	69,7	14,1	-	-	98,1	-		
0,0025	364,0	65,8	131,6	34,2	-	-	108,3	-		
0,0025	425,0	70,7	122,5	29,3	-	-	101,1	-		
0,005	98,5	93,4	16,5	6,6	-	-	42,6	-		
0,005	165,9	89,1	16,2	5,6	4529,0	5,3	53,1	-		
0,005	217,4	100,0	-	-	-	-	55,2	-		
0,0075	141,1	65,0	46,9	35,0	-	-	100,3	-		
0,0075	432,6	100,0	-	-	-	-	98,7	-		
0,0075	175,5	95,0	4876,0	5,0	-	-	93,8	-		
0,01	160,4	69,8	46,6	23,1	5,4	7,1	154,2	+	5,3	99,3
0,01	80,7	53,7	259,2	40,1	7,9	6,3	147,6	+	7,4	98,2
0,01	90,2	67,2	501,3	24,9	5,8	7,9	146,1	+	5,4	99,6
0,025	160,7	65,0	2,6	35,0	-	-	108,4	+	2,2	100,0
0,025	166,1	64,5	2,6	35,5	-	-	108,2	+	2,3	100,0
0,025	146,8	62,4	2,7	34,6	3801,0	3,0	115,4	+	2,3	100,0
0,05	222,6	58,9	2,0	41,1	-	-	153,0	+	1,7	100,0
0,05	207,6	56,4	2,0	41,3	-	-	153,8	+	1,8	100,0
0,05	294,4	57,8	2,0	42,2	-	-	149,8	+	1,8	100,0
0,1	1,7	64,7	126,7	32,4	4013,0	2,9	162,9	+	1,4	100,0
0,1	1,7	64,3	161,9	35,7	-	-	161,1	+	1,5	100,0
0,1	1,7	63,7	165,6	36,3	-	-	160,6	+	1,4	100,0
0,5	1,9	90,8	137,5	6,2	4961,0	3,0	327,3	+	1,3	100,0
0,5	1,9	92,8	991,6	7,2	-	-	312,0	+	1,4	100,0
0,5	1,9	87,9	165,5	9,7	3432,0	2,4	338,5	+	1,5	100,0

*Siva polja označujejo pike micelov in njihovo intenziteto.

Priloga 12: Velikost micelov SDS v vodi. Vzorce smo pripravili z redčenjem osnovnega vzorca s koncentracijo 0,5 M, filtrirali skozi 0,1 µm filter, shranili v kiveti in pomerili 48 ur po pripravi (sipanje vode 29,8 kcps).

KONCENTRACIJA (mol/L)	INTENZITETNA DISTRIBUCIJA								VOLUMSKA DISTRIBUCIJA	
	PIK 1 (nm)	% INTENZ.	PIK 2 (nm)	% INTENZ.	PIK 3 (nm)	% INTENZ.	SIPANJE (kcps)	MICELI	PIK MICELOV	% VOLUMNA
0,001	366,7	100,0	-	-	-	-	55,7	-		
0,001	377,0	98,2	54,0	1,8	-	-	61,5	-		
0,001	359,1	100,0	-	-	-	-	57,2	-		
0,0025	351,6	85,4	73,6	13,5	5560,0	1,0	88,5	-		
0,0025	323,2	80,8	77,2	17,1	5560,0	2,1	71,3	-		
0,0025	348,1	91,8	5117,0	8,2	-	-	101,9	-		
0,005	214,0	100,0	-	-	-	-	56,1	-		
0,005	204,3	100,0	-	-	-	-	59,4	-		
0,005	206,4	100,0	-	-	-	-	58,5	-		
0,0075	246,7	100,0	-	-	-	-	85,5	-		
0,0075	169,7	96,4	3924,0	3,6	-	-	83,2	-		
0,0075	214,2	98,6	4788,0	1,4	-	-	81,9	-		
0,01	120,7	84,8	5,3	8,4	4477,0	6,8	113,9	+	4,7	99,7
0,01	158,7	85,5	5,1	7,3	3821,0	7,2	124,5	+	4,7	99,7
0,01	110,9	75,3	731,4	11,4	5,0	7,4	126,4	+	4,5	99,6
0,025	130,7	60,8	2,6	36,6	4226,0	2,6	124,6	+	2,3	100,0
0,025	149,0	63,3	2,6	36,7	-	--	123,3	+	2,3	100,0
0,025	130,0	59,9	2,7	37,1	4199,0	3,0	122,6	+	2,4	100,0
0,05	168,0	51,7	2,0	44,4	3254,0	3,9	159,3	+	1,7	100,0
0,05	183,8	54,4	1,9	45,6	-	-	158,1	+	1,7	100,0
0,05	259,0	55,3	1,9	44,7	-	-	158,5	+	1,7	100,0
0,1	1,8	58,7	185,2	38,4	4150,0	2,8	214,1	+	1,5	100,0
0,1	1,8	59,4	234,1	40,6	-	-	209,0	+	1,4	100,0
0,1	1,8	57,4	252,7	42,6	-	-	224,9	+	1,4	100,0
0,5	1,9	93,0	345,2	4,6	3814,0	2,4	351,9	+	1,4	100,0
0,5	2,0	96,3	3469,0	3,7	-	-	345,5	+	1,4	100,0
0,5	1,9	92,5	290,1	7,5	-	-	347,6	+	1,3	100,0

*Siva polja označujejo pike micelov in njihovo intenziteto.