

# DLS protocol comparison between ACEnano, nanoReg, ISO and NCEC

Factors	ACEnano	nanoReg	NCEC
Instrument	Malvern Zetasizer (nano ZS) 633-nm laser	Malvern Zetasizer (nano ZS) 633-nm laser	Malvern Zetasizer (nano ZS) 633-nm laser
Scattering angle	Back-scatter angle 173°	Back-scatter angle 173°	Side-scatter angle 90°
Temperature	20°C	25°C 37°C (in vitro / in vivo exposure media)	25°C
Replication	5 consecutive measurements	10 consecutive measurements	3 consecutive measurements

## DLS measurement

- Sample preparation

Particle size	Min. Concentration (Recommended)	Max. Concentration (Recommended)
< 10nm	0.5mg/ml	Only limited by the sample material interaction, aggregation, gelation, etc
10nm to 100nm	0.1mg/ml	5% mass (assuming a density of 1g/cm <sup>3</sup> )
100nm to 1µm	0.01mg/ml (10 <sup>-3</sup> % mass)	1% mass (assuming a density of 1g/cm <sup>3</sup> )
> 1µm	0.1mg/ml (10 <sup>-2</sup> % mass)	1% mass (assuming a density of 1g/cm <sup>3</sup> )

### 1. 샘플 준비

1) DLS 를 측정하기 위해 필요한 적정 샘플양은 3 mL 이고, 최소량은 1 mL 로 이 경우, 샘플 홀더 아래에 큐벳 뚜껑을 설치한 후 샘플을 로딩해야 빛이 샘플을 통과할 수 있을 정도의 높이가 된다.

2) 만일 시간에 따른 측정을 하고자 한다면, 큐벳의 뚜껑을 닫고 파라필름으로 잘 밀봉하여 용액의 증발을 최대한 막아야 한다. 큐벳 내부에 먼지와 같은 이물질이 절대로 없어야 하며, 공기방울이 생기지 않도록 해야 한다 (모든 샘플용액은 용액 안에 기포가 생기지 않도록 주의해야 한다. 특히 *In vitro* 배지 시료용액의 경우, 용액자체가 기포가 생기기 쉽기 때문에 더욱더 주의해야 한다.).

일회용 큐벳인 경우에는 깨끗한 상태로 보관하여 사용하도록 하고 quartz 재질의 큐벳인 경우에는 사용 전에 DI water 로 3 번, EtOH 로 3 번씩 세척한 후 뒤집어서 말리고 질소가스를 가볍게 쏘아줘서 물기를 없애준다.

3) 측정 전 용액 내 입자들이 잘 분산되도록 시료용액을 15 초간 충분히 vortexing 해준다.

## 2. 시료 상태에 따른 샘플링

입자의 뭉침이나 이온 용출 등으로 인한 사이즈 에러가 없게 하기 위해서 반드시 DLS 측정 직전에 새로운 나노입자 stock solution 을 준비해야 한다.

### 1) 용액시료일 경우

일반적으로 용액으로 존재하는 시료의 경우 적절한 농도로 묽혀 준다.

### 2) 고체 파우더시료일 경우

고체 파우더로 존재하는 시료의 경우 문헌조사나 존재하는 프로토콜에 따라 적정 용매에 묽혀 sonicator 나 vortexing 을 통해 잘 분산시켜 DLS 를 측정한다. 용매에 묽히기 전에 water bath sonicator 로 초음파 처리하여 stock solution 을 15분간 분산시킨다.

예시) TiO<sub>2</sub> 파우더의 경우,

1 L 의 DI water 에 10 g 의 TiO<sub>2</sub> 파우더를 넣어준 후 probe sonicator 을 이용하여 10 분동안 분산시킨 후 만들어진 안정적인 분산용액을 측정한다. (Song H.L et al. Bull.Korean Chem. Soc. 2014, Vol. 35, No.7)

## ● Measurement

1) 기기의 온도와 레이저의 안정화를 위해 장비를 켜고 30 분 동안 예열시켜준 후 바탕화면에서 Zetasizer software 를 실행시킨다.

2) DLS 의 시료도입부의 커버를 열고 큐벳을 삽입한 후 커버를 닫는다.

3) New 아이콘을 클릭하고, 위의 메뉴에서 File→New→Measurement File 을 클릭하여 측정 및 저장할 파일을 만든다.

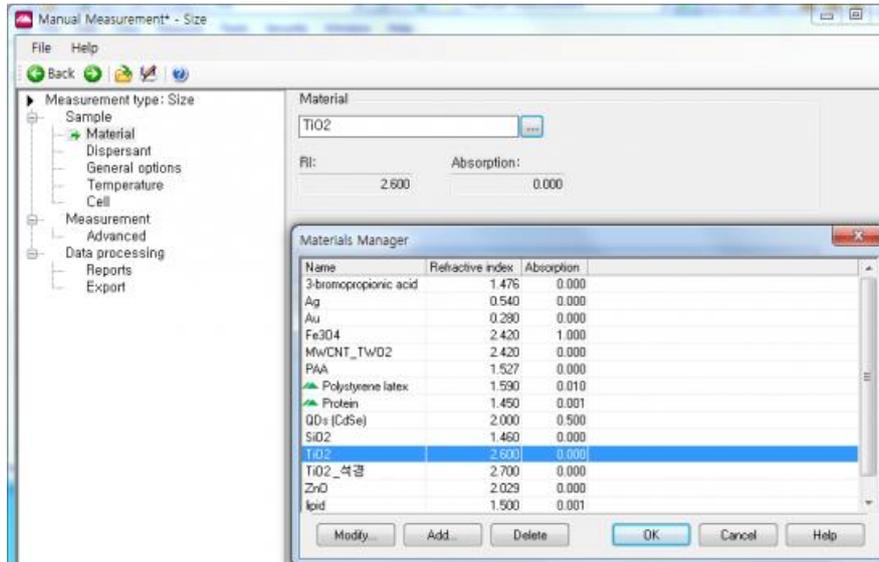
4) Measure→Manual 을 선택하여 Measurement type 을 size 로 설정한다. 이 후, 나노입자의 시료 정보를 입력한다. 특히 Equilibrium time 의 경우 온도 안정화 시간이므로 최소 120 초 정도로 설정한다.

- 사용하는 medium 의 정보를 입력한다. : refractive index (R<sub>i</sub>), absorption values (R<sub>a</sub>), dielectrical constant, and kinematic viscosity.

- 사용하는 material 에 대한 정보를 입력한다. : refractive index ( $R_i$ ) and absorption values ( $R_a$ ).

- 측정 온도를 선택한다. : 25°C (normal dispersion), 37°C (In vitro and In vivo exposure media)

5) Measurement 선택 후 Measure time 에 반복측정 횟수 (5 회 반복)를 입력하고 Data processing 을 지정한다.

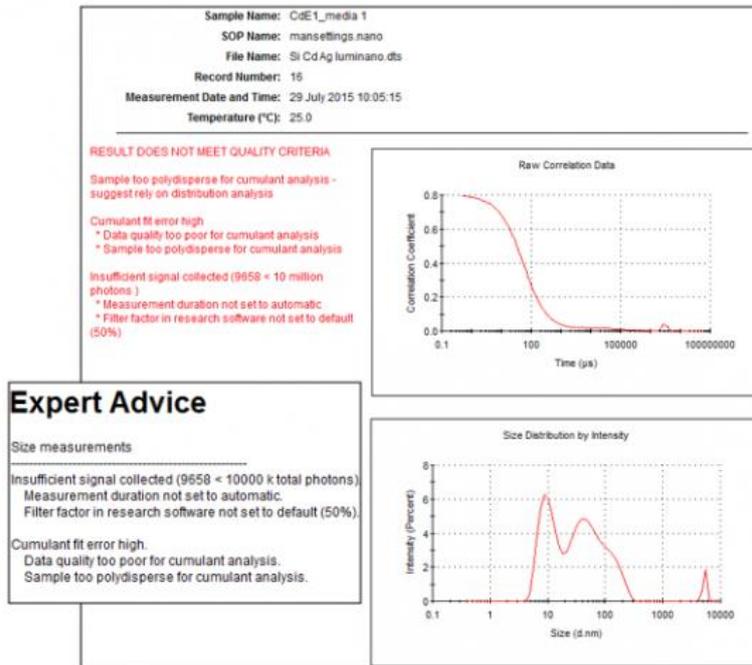


6) 시료에 대한 기본 정보 입력이 끝난 후, START 버튼을 클릭하면, 나노입자의 유체역학적 크기의 측정이 시작된다.

## ● Data analysis

1) 측정이 끝나면 제일 먼저 Quality Report 를 확인하면 제일 먼저 간편하게 측정에 대한 정보를 얻을 수 있다. (Good or Poor 로 표시됨)

2) 만약에 Result quality 가 “Refer to quality report”라고 표시되면, 샘플을 추가로 분석해야 한다. Polymodal distributions, 다량의 먼지, 큐벳 에러, 큰 입자, 침전 등으로 인한 높은 polydispersity (PDI) 때문인지를 알아보기 위해 size-distribution report 와 Expert advice 를 확인한다. Fitting curve 에서 큰 편차가 발생하면 크기 분포 데이터는 더 이상 신뢰할 수 없다.

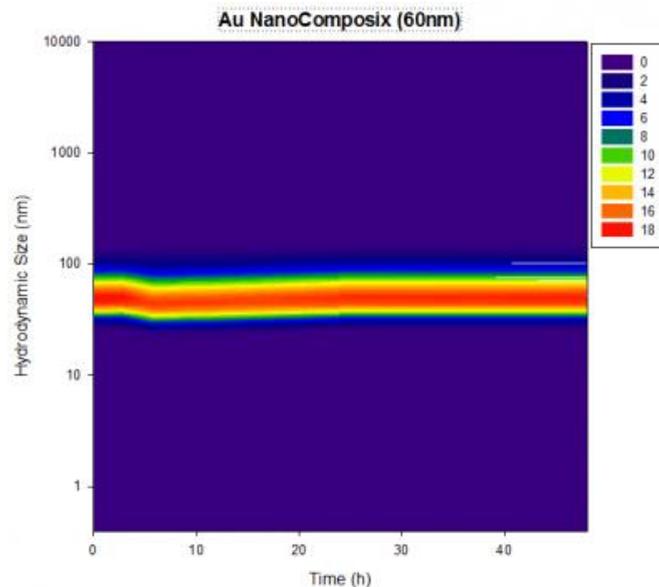


3) 샘플에 입자 크기 분포가 큰 입자들이 포함되어 있을 경우에는 주사기 필터를 이용해서 샘플을 필터링하여 입자를 분리해야 한다.

4) 측정된 시료에 대한 data 를 클릭→메뉴 Edit→Copy size values

5) Excel 창에서 결과 값들을 붙여 넣고, x 축과 y 축을 바꿔서 재배열한다. (x 축: 시간 y 축: hydrodynamic size → x 축: hydrodynamic size, y 축: 시간)

6) Sigmaplot 을 이용하여 아래와 같은 contour plot 을 그린다.



## ● Report

시험보고서에는 다음과 같은 사항들이 기재되어야 한다.

- a) 측정날짜
- b) 측정자
- c) 시료 정보: 시료명, 제품번호 등
- d) 시료의 분산 용매
- e) 시료의 전처리 방법
- h) 측정된 입자의 유체역학적크기 및 크기분포의 평균값 및 표준편차
- i) 측정 및 분석시 시험에 영향을 준 비정상적 특징