

Измерение размеров частиц в субнанометровом диапазоне методом динамического светорассеяния

Michael Kaszuba - David McKnight -
Malcolm T. Connah - Fraser K. McNeil-Watson -
Ulf Nobbmann

Получена: 13 июля 2007/Принята: 30 сентября 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Аннотация В основе метода динамического рассеяния света (ДРС; Dynamic light scattering – DLS) лежит анализ флуктуаций интенсивности света, рассеянного частицами, находящимися в состоянии хаотического Броуновского движения. В результате анализа флуктуаций определяется коэффициент диффузии и рассчитывается характерный размер частиц. В этой статье рассматриваются факторы, определяющие нижний предел размеров частиц, которые можно исследовать методом DLS, и приводится описание использования сахарозы, как тестового образца для оценки нижнего предела размеров, определяемых данным методом. Значения гидродинамического диаметра менее 1 нм получены путем регистрации обратно рассеянного света под углом 173° , что значительно увеличивает чувствительность метода DLS. Средние значения для соответствующих пиков (со стандартными отклонениями), полученные для распределений в единицах интенсивности (индекс I) и объема (индекс V) для различных концентраций сахарозы, в интервале от 5 до 35% (вес/объем), составили $D_{I,Mean} = 0.82$ нм (0.11 нм) и $D_{V,Mean} = 0.62$ нм (0.05 нм), соответственно. Эти результаты, полученные для сахарозы, позволяют предположить, что измерение частиц в субнанометровом диапазоне возможно с точностью до 0.1 нм. Обсуждается объективность полученных на примере сахарозы результатов.

Ключевые слова Динамическое рассеяние света · Динамическое светорассеяние · Размер молекул · Субнанометровый размер · Нижний предел размера · Нижний предел концентрации · Детектирование обратного рассеяния · Анализатор размеров частиц · Нанотехнология · Наночастицы

Введение

Измерение размеров малых молекул в настоящее время представляет большой интерес во многих приложениях. Это, например, относится к белкам, используемым в фармацевтической промышленности, в качестве активных составляющих лекарственных форм (Akagi и другие 2007; Nam и другие 2002). Размер молекул в этом случае может использоваться как критерий контроля качества. Так же, при производстве наночастиц, размер может использоваться как критерий для контроля качества производимой продукции (Hu и другие 2004; Zheng и другие 2002; Pascal и другие 1999). Однако, существует очень мало доступных (рутинных) методов измерения размеров малых молекул и частиц в растворах.

Динамическое рассеяние света (DLS) – это метод характеристики размеров коллоидных дисперсий, в котором суспензия частиц или молекул, находящихся в состоянии Броуновского движения, освещается лазерным лучом (Dahneke 1983; Pecora 1985; ISO13321 1996; Peters 2000). Возникающие при этом временные флуктуации интенсивности рассеянного света, анализируются автокоррелятором, который строит автокорреляционную функцию сигнала. Автокорреляционная функция интенсивности, G , затухает по экспоненциальному закону, со скоростью, определяемой диффузией исследуемых частиц (Dahneke 1983; Pecora 1985; ISO13321 1996).

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt = B + Ae^{-2q^2D\tau}$$

Где B – это базовая линия, A – амплитуда, и D – коэффициент поступательной диффузии.

M. Kaszuba (✉) · D. McKnight · M.T. Connah ·
F.K. McNeil-Watson · U. Nobbmann
Malvern Instruments Ltd, Grovewood Road, Enigma
Business Park, Malvern, Worcestershire WR14 1XZ, UK
e-mail: michael.kaszuba@malvern.com

Модуль волнового вектора рассеяния (q) определяется нижеприведенным уравнением, где \tilde{n} – это коэффициент преломления растворителя, λ_0 – длина волны лазера в вакууме, и θ – угол рассеяния:

$$q = \frac{4\pi\tilde{n}}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

На основании измеренной скорости Броуновского движения непосредственно рассчитывается коэффициент поступательной диффузии D частиц. Этот коэффициент диффузии связан с гидродинамическим диаметром частиц (D_H) уравнением Стокса-Эйнштейна:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, и η – вязкость растворителя.

Нижний размерный предел метода динамического светорассеяния определяется интенсивностью избыточного рассеяния. Избыточное рассеяние есть разница между рассеянием от исследуемой молекулы или частицы и дисперсанта, в котором она находится. Эта разница, в свою очередь, зависит от нескольких факторов, таких как показатели преломления молекулы и дисперсанта, концентрация образца, мощность и длина волны используемого лазера, чувствительность детектора и оптическая конфигурация анализатора. Чем меньше размер молекулы или частицы, тем меньше интенсивность избыточного рассеяния.

В традиционных анализаторах динамического рассеяния света используется угол детектирования 90° , а чувствительности приборов с такой оптической конфигурацией может быть не достаточно для успешного измерения малых частиц или молекул, даже при использовании мощного лазера с малой длиной волны. Оптическая конфигурация, использующая в своей основе детектирование обратно рассеянного излучения, позволяет проводить измерения образцов с более низкими концентрациями и меньшими размерами частиц. При обратном рассеянии под углом 173° , рассеивающий объем, сигнал с которого регистрируется детектором, приблизительно, в 8 раз превышает рассеивающий объем (сигнал с которого регистрируется детектором) при использовании классической оптической схемы с углом рассеяния 90° . Это обуславливает 8-и кратное увеличение регистрируемой скорости счета, которая напрямую связана с чувствительностью анализатора, или возможностью измерения малых частиц при низких концентрациях. Использование волоконной оптики наряду с такой конфигурацией обеспечивает достаточно высокое соотношение полезного и фонового сигналов, или что более точно, значение корреляционной функции при пересечении с осью ординат (максимальное значение), не уменьшается при увеличении объема детектирования, как это имеет место при использовании "классической" оптической конфигурации (Peters 2000).

Имеет место лишь незначительное уменьшение максимального значения корреляционной функции при увеличении скорости отсчета. Такая оптическая конфигурация (с регистрацией обратно рассеянного света) обуславливает исключительную чувствительность анализатора, которая просто необходима для измерения размеров наночастиц и молекул в низких концентрациях.

Оценка предельных возможностей DLS анализатора с точки зрения размера и концентрации исследуемых частиц обуславливает специфику экспериментальной методики и выбора образцов, которые могут быть использованы в качестве тестовых объектов. В диапазоне размеров более 20 нм существуют стандартные образцы латекса с сертифицированными диаметрами. Для размеров менее 10 нм могут быть использованы некоторые белки, такие как лизоцим и бычий сывороточный альбумин, однако, приготовление образца, содержащего мономеры данных белков, является достаточно непростой процедурой. В качестве тестового образца близкого по размерам к 1 нм или менее необходимо использовать отличный от белка объект. Получение подходящих образцов, содержащих наночастицы в хорошо диспергированном состоянии и не содержащих агрегаты, является довольно сложной задачей. Идеальным кандидатом на роль тестового образца для оценки качества функционирования чувствительности DLS анализатора является сахароза. Это вещество широкодоступно, оно существует в чистой кристаллической форме и легко растворяется в воде. Молекула сахарозы состоит из молекул глюкозы и фруктозы, соединенных посредством α -гликозидной связи (Stryer 2002) (Рис. 1).

В данной статье проводится оценка нижнего размерного предела метода динамического рассеяния света с использованием сахарозы в качестве тестового образца. Обсуждаются вопросы измерения сахарозы при использовании угла детектирования 173° , и подчеркиваются преимущества использования регистрации обратного рассеяния для характеристики образцов с субнанометровыми размерами. Проведено сравнение с оценками размера, полученными другими методами.

Эксперимент

Растворы сахарозы 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35% (вес/объем), соответственно, были подготовлены в сверхчистой воде и профильтрованы через фильтры

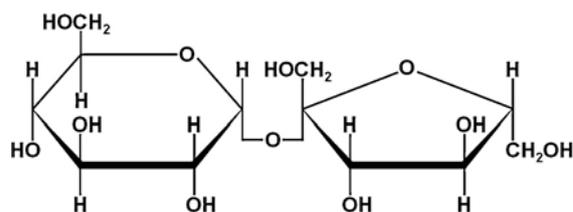


Рис. 1 Молекула сахарозы состоит из молекул глюкозы и фруктозы, соединенных посредством α -гликозидной связи.

Whatman Anotop с размерами пор 0.02 мкм (каталожный номер 6809-3002.). Все вещества, использованные в данной работе, имели чистоту, не ниже Analar grade.

Измерения для всех концентраций сахарозы проведены на анализаторе Malvern Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с углом детектирования в 173° . Все измерения в данном исследовании осуществлялись при температуре 25°C . Для контроля повторяемости результатов на каждом образце было выполнено не менее трех повторных измерений. В анализаторе Nano S используется гелий-неоновый (He–Ne) лазер мощностью 4 мВт, работающий на длине волны 633 нм. Распределения по размерам в единицах интенсивности были получены из анализа корреляционных функций с использованием алгоритма Multiple Narrow Modes (Мультиволновая модель анализа) программного обеспечения анализатора. В основе алгоритма используется подгонка методом NNLS (метод наименьших квадратов с ограничениями; Twomey 1997; Lawson и Hanson 1995). Распределения частиц по размерам из единиц интенсивности были преобразованы в объемные с использованием теории Ми (Mie 1908). Однако, оптические характеристики молекул сахарозы не влияют на получаемый результат, поскольку их размер значительно меньше, чем длина волны используемого лазера.

Метод DLS позволяет измерять коэффициенты диффузии молекул или частиц, находящихся в состоянии Броуновского движения. Для пересчета измеренного коэффициента диффузии в гидродинамический размер частиц по уравнению Стокса–Эйнштейна необходимо знать вязкость образца, как указано во введении. Существует несколько способов определения того, какое корректное значение вязкости должно использоваться для образцов. Например, относительная вязкость известных растворов сахарозы по отношению к воде может быть найдена в литературе (Руководство CRC 2006–2007), либо вязкости растворов сахарозы могут быть определены непосредственно с помощью вискозиметра. Однако, поскольку метод динамического светорассеяния измеряет скорость диффузии молекул или частиц, находящихся в состоянии Броуновского движения, то удобен метод определения вязкости непосредственно по измерению стандартного образца полистирольного латекса с известным размером при добавлении его в каждый образец сахарозы. В данной работе 10 мкл полистирольного латекса 150 нм (каталожный номер 3150A, производитель Duke Scientific, Palo Alto, США) добавляли к 990 мкл соответствующего образца сахарозы. Сравнение размера, полученного для латекса, диспергированного в сахарозе (используя значение вязкости воды), с размером, полученным для того же латекса, диспергированного в 10 мМ растворе NaCl (истинный гидродинамический диаметр), позволяет определить вязкости растворов сахарозы. Измерения проводились в 10 мМ растворе NaCl для компенсации двойного электрического слоя в соответствии с Международным Стандартом ISO13321 (1996).

Метод добавления латекса к растворам сахарозы эффективен с точки зрения оценки вязкости, поскольку интенсивность рассеяния от значительно более крупных частиц латекса существенно превышает интенсивность рассеяния от молекул сахарозы.

Результаты и обсуждение

Вязкости растворов сахарозы определяли по описанному ранее методу; в Таблице 1 сведены результаты, полученные для образца полистирольного латекса 150 нм в 10 мМ растворе NaCl и в растворах с различной концентрацией сахарозы.

В таблице приведены значения средних диаметров (по распределению в единицах интенсивности) в нанометрах, значения индексов полидисперсности и рассчитанные вязкости. Средние диаметры частиц, и значения индексов полидисперсности (PDI, оценка ширины распределения) рассчитаны из кумулянтного анализа, как определено в ISO13321 (1996). Значение индекса полидисперсности является очень чувствительным к присутствию агрегатов или загрязнений (пыли, инородных объектов). Ожидаемые значения индекса полидисперсности для монодисперсных образцов, в частности для использовавшегося в данной работе полистирольного латекса, не должны превышать 0.05. Все значения PDI, приведенные в Таблице 1, меньше 0.05, что указывает на отсутствие влияния различных концентраций сахарозы на монодисперсность стандартного образца. Рассчитанные вязкости для различных концентраций сахарозы определялись путем деления вязкости 10 мМ раствора NaCl (0,8872 мПа·с) на отношение среднего диаметра, для латекса в 10 мМ растворе NaCl к среднему диаметру, измеренному в растворе сахарозы соответствующей концентрации. Вязкость, которую необходимо задать для проведения корректных измерений методом DLS, это реальная вязкость (внутреннее трение) среды, в которой находятся исследуемые частицы, находящиеся в состоянии Броуновского движения. Описанный способ определения реального эффективного значения вязкости образца является наиболее удобным, и приемлем до тех пор, пока дисперсант не оказывает существенного влияния на латексный образец и сам полистирольный латекс не влияет на вязкость образца. Столь малые добавки стандартного образца (как использовавшиеся в данной работе) к каждой из концентраций сахарозы не влияли на вязкость растворов.

На Рисунке 2 приведены характерные корреляционные функции, полученные в результате измерений, выполненных для некоторых растворов сахарозы на анализаторе Zetasizer Nano S с использованием детектирования обратнорассеянного света. На рисунке приведены данные, для трех самых низких концентраций сахарозы (5, 10 и 15% вес/объем, соответственно), поскольку эти образцы должны давать наименьший сигнал.

Таблица 1 Результаты, полученные для стандартного образца полистирольного латекса 150 нм Duke Scientific, добавленного в 10 мМ раствор NaCl, и растворы с различной концентрацией сахарозы. В таблице приведены значения средних диаметров (по распределению в единицах интенсивности) в нанометрах, значения индексов полидисперсности и рассчитанные вязкости.

Концентрация сахарозы (% вес/объем)	Средний диаметр (нм)	Индекс полидисперсности	Рассчитанная вязкость (мПа с)
0 (только 10 мМ NaCl)	151.5	0.011	0.8872 (измеренная)
5	180.0	0.015	1.054
10	200.1	0.028	1.172
15	222.0	0.017	1.300
20	248.9	0.021	1.458
25	283.2	0.014	1.658
30	317.2	0.025	1.858
35	359.9	0.017	2.108

Максимум корреляционной функции (т.е., значение при пересечении оси Y, полученное экстраполяцией коэффициентов корреляции к нулевому моменту времени) это фактически полученное в эксперименте отношение сигнал/шум. Значения менее 0.1 указывают на плохое качество экспериментальных данных. Однако даже при измерении для 5% концентрации сахарозы, в точке пересечения получают значения около 0.5, и, таким образом, для всех образцов в данном исследовании, получены достаточно высокие значения.

Для корреляционных функций, приведённых на Рис. 2, отчётливо видны две скорости затухания. Высокие скорости затухания, до 10 мкс во временной шкале, могут быть ассоциированы непосредственно с диффузией молекул сахарозы. Более низкие скорости затухания, вблизи базовой линии корреляционных функций (при временах задержки между 10 и 1000 мкс, соответственно), вероятно, могут рассматриваться как результат коллективной диффузии молекул сахарозы. Эта гипотеза подтверждается тем, что при увеличении концентрации сахарозы имеет

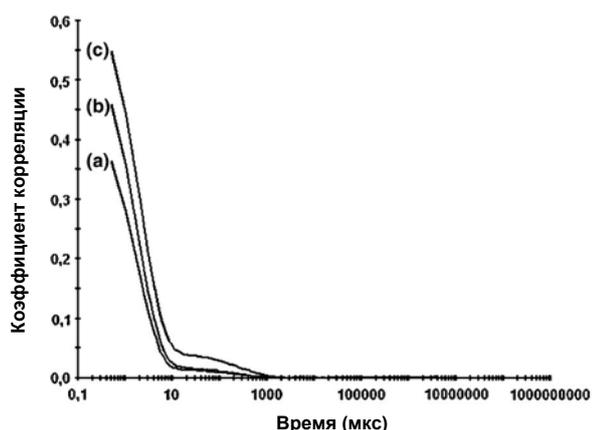


Рис. 2 Корреляционные функции, полученные для концентраций сахарозы (а) 5% вес/объем, (б) 10% вес/объем и (с) 15% вес/объем

место увеличение амплитуды медленной составляющей скорости затухания.

Распределения частиц по размерам (в единицах интенсивности), полученные из анализа этих корреляционных функций, показаны на Рис. 3. Для каждой концентрации имеет место бимодальное распределение с пиком основной моды около 1 нм, и пиком второй моды около 200 нм. Преобразование распределений по размерам из единиц интенсивности в объемные распределения производилось с использованием теории Ми (Mie 1908); полученные объемные распределения частиц по размерам приведены на Рис. 4. Все распределения являются мономодальными с модой, лежащей в диапазоне размеров менее 1 нм. Результаты полного анализа пиков распределений по размерам в единицах интенсивности и объёмных сведены в Таблице 2. В этой таблице приведены значения средних и мод для пиков, соответствующих молекуле сахарозы на основе данных распределений.

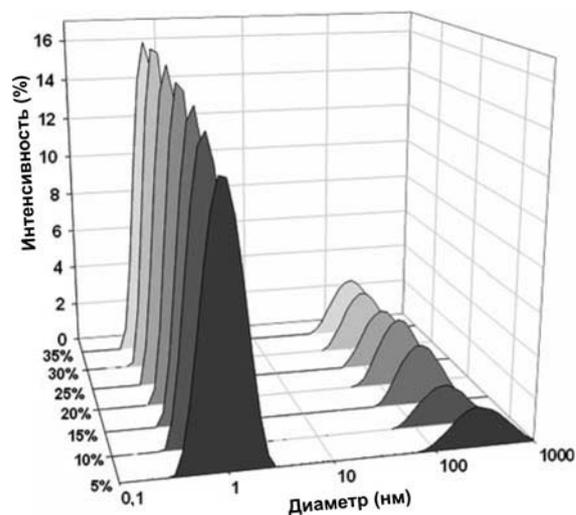


Рис. 3 Распределения частиц по размерам (в единицах интенсивности), полученные для образцов с различными концентрациями сахарозы, измеренных на анализаторе Malvern Zetasizer Nano S с использованием технологии регистрации обратного рассеяния

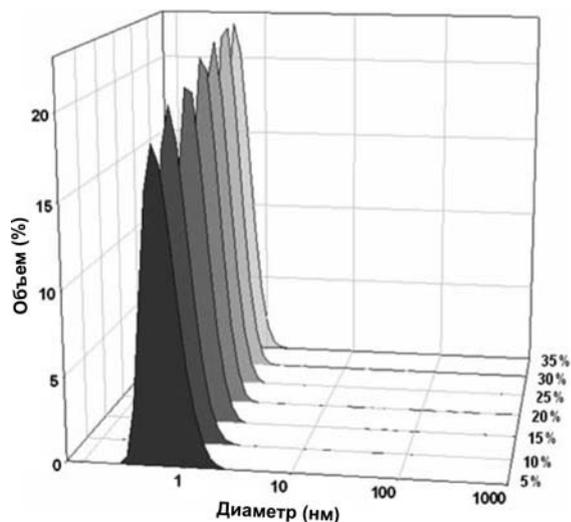


Рис. 4 Объёмные распределения частиц по размерам, полученные для образцов с различными концентрациями сахарозы, измеренных на анализаторе Malvern Zetasizer Nano S с использованием технологии регистрации обратного рассеяния

Экстраполяция значений для средних и мод к нулевой концентрации, позволяет рассчитать соответствующие значения для бесконечного разбавления (Рис. 5). Этот подход рекомендован в Международном Стандарте ISO13321 (1996) при исследовании образцов, для которых имеет место систематическая зависимость результата (размеров частиц) от концентрации. Эта концентрационная зависимость может быть обусловлена конформационными изменениями молекулы сахарозы, зависящими от концентрации.

Было показано, что содержание воды влияет на подвижность и реорганизацию молекул сахарозы; подвижность вокруг гликозидной связи увеличивается с увеличением концентрации сахарозы (Mathlouthi и Reiser 1995).

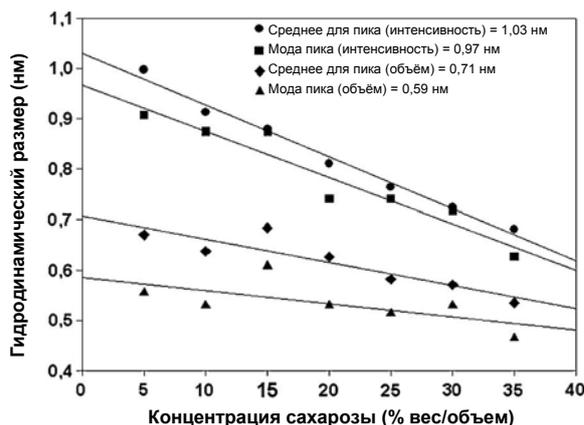


Рис. 5 Графики средних и мод для пиков распределений (в единицах интенсивности и объёма), как функции концентрации сахарозы. Данные экстраполированы к нулевой концентрации, рассчитаны и приведены значения в точках пересечения графиков с осью ординат

Можно предполагать, что такое конформационное изменение в молекуле сахарозы, в результате может привести к увеличению коэффициента диффузии при увеличении концентрации образца. Другое возможное объяснение зависимости размера от концентрации заключается в том, что межмолекулярное взаимодействие не возможно полностью компенсировать при использовании значений измеренной вязкости образца. Предположительно, степень взаимодействия между молекулами будет увеличиваться с увеличением концентрации сахарозы. В дополнение, уменьшение эффективной гидратации при высоких концентрациях, будет обуславливать уменьшение гидродинамического размера (Schultz и Solomon 1961). При экстраполяции к нулевой концентрации значения для средних и мод распределений в единицах интенсивности и объёма составили 1.03, 0.97, 0.71 и 0.59 нм, соответственно.

Таблица 2. Анализ пиков распределений частиц по размерам в единицах интенсивности и объёма, показанных на Рис. 3 и 4

Концентрация сахарозы (% вес/объем)	Данные для распределения в единицах интенсивности		Данные для объёмного распределения	
	Пик 1, среднее значение (нм)	Пик 1, мода (нм)	Пик 1, среднее значение (нм)	Пик 1, мода (нм)
5	0.998	0.907	0.670	0.555
10	0.913	0.875	0.637	0.530
15	0.879	0.875	0.684	0.608
20	0.811	0.741	0.626	0.530
25	0.764	0.741	0.582	0.514
30	0.724	0.718	0.571	0.530
35	0.681	0.627	0.535	0.465

В таблице приведены значения средних и мод для пиков, соответствующих молекуле сахарозы на основе данных распределений

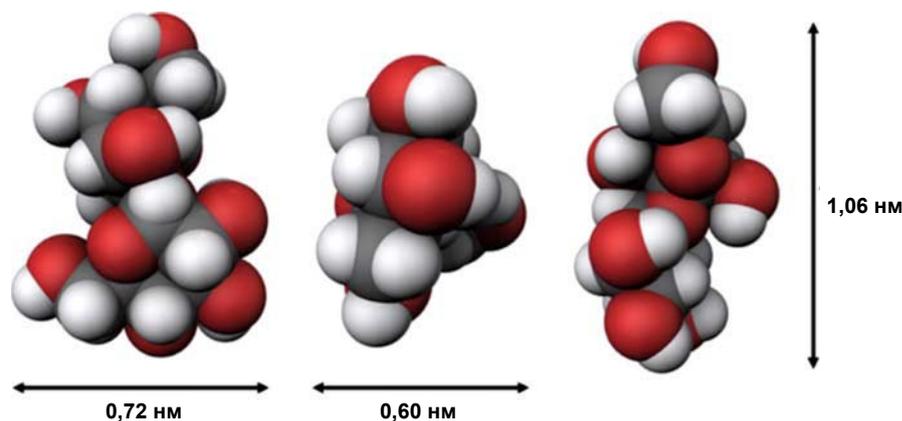


Рис. 6 Пространственная модель молекулы сахарозы и её линейные размеры вдоль осей X, Y и Z

Результаты, представленные в данной статье, свидетельствуют о возможности измерения частиц в субнанометровом диапазоне размеров при помощи метода динамического светорассеяния при условии использования соответствующей оптической конфигурации измерительного прибора. Однако, насколько правдоподобными являются результаты для размеров, полученных методом DLS в данной работе? На Рисунке 6 приведена пространственная модель молекулы сахарозы в наиболее развёрнутой конформации, наряду со значениями линейных размеров вдоль трёх основных осей, которые составляют 1.06, 0.72 и 0.60 нм, соответственно. Размер, получаемый при измерении методом динамического рассеяния света это гидродинамический диаметр сферы, которая имеет такой же средний коэффициент диффузии, как и исследуемая молекула. Таким образом, диаметры, полученные для различных концентраций сахарозы, рассмотренных в данной статье, оказываются в рамках ожидаемых значений. Помимо этого в соответствии с результатами, полученными ранее, поступательные коэффициенты диффузии сахарозы, должны находиться в диапазоне от 5.0 до $5.5 \times 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ при 298 K (Руководство CRC 2006–2007; Engelsen and Pérez 1997). Если эти значения пересчитать в гидродинамические диаметры сфер по уравнению Стокса–Эйнштейна, получатся размеры в диапазоне 0.90 – 0.98 нм. Такие значения размеров хорошо сопоставимы со значениями, полученными в результате измерений, описанных в данной работе.

Результаты, представленные в данной статье, указывают на возможность измерения частиц субнанометровых размеров при помощи метода динамического светорассеяния, при условии тщательной подготовки образцов и использования соответствующей оптической конфигурации анализатора. Использование детектирования обратнорассеянного света в сочетании с волоконной оптикой обеспечивает исключительную чувствительность анализатора и достаточно высокое отношение сигнал/шум, что позволяет достоверно измерять образцы с такими исключительно малыми размерами частиц.

Список литературы

- Akagi T, Wang X, Uto T, Baba M, Akashi M (2007) Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials* 28:3427–3436
- CRC Handbook of chemistry and physics: 87th edn. (2006–2007) CRC Press
- Dahneke BE (1983) Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering. Wiley, New York
- Engelsen SB, Pe' rez S (1997) Internal motions and hydration of sucrose in a diluted water solution. *J Mol Graph Model* 15:122–131
- Hu M, Chujo S, Nishikawa H, Yamaguchi Y, Okubo T (2004) Spontaneous formation of large-area monolayers of well-ordered nanoparticles via a wet-coating process. *J Nanopart Res* 6:479–487
- International Standard ISO13321 (1996) Methods for determination of particle size distribution part 8: photon correlation spectroscopy. International Organization for Standardization (ISO)
- Lawson CL, Hanson RJ (1995) Solving least squares problems. Society for industrial and applied mathematics (SIAM), Philadelphia
- Mathlouthi M, Reiser P (eds) (1995) Sucrose: properties and applications. Blackie Academic and Professional, London
- Mie G (1908) Beiträge zur optik trü ber medien, speziell kolloidaler metallo'sungen. *Ann Physik* 4:377–445
- Nam YS, Park JY, Han SH, Chang IS (2002) Intracellular drug delivery using poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles derivatized with a peptide from a transcriptional activator protein of HIV-1. *Biotechnol Lett* 24:2093–2098
- Pascal C, Pascal JL, Favier F, Moubtassim MLE, Payen C (1999) Electrochemical synthesis for the control of Fe_2O_3 nanoparticle size. Morphology, microstructure and magnetic behaviour. *Chem Mater* 11:141–147
- Pecora R (1985) Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy. Plenum Press, New York
- Peters R (2000) Fibre optic device for detecting the scattered light of fluorescent light from a suspension. US Patent 6,016,195
- Schultz SG, Solomon AK (1961) Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry. *JGen Physiol* 44:1189–1199
- Stryer L (2002) Biochemistry. W.H. Freeman, New York
- Twomey S (1997) Introduction to the mathematics of inversion of remote sensing and indirect measurements. Dover Publications, New York
- Zhang F, Chan SW, Spanier JE, Apak E, Jin Q, Robinson RD, Herman IP (2002) Cerium oxide nanoparticles: size-selective formation and structure analysis. *Appl Phys Lett* 80:127–129