



Взглянем под другим углом: выбор подходящего угла рассеяния для измерения методом динамического рассеяния света

Ключевые слова:

Размер частиц, динамическое рассеяние света, обратное рассеяние, боковое рассеяние, Litesizer 100, Litesizer 500



В зависимости от характеристик образца, выбор угла измерения может повлиять на результат анализа методом динамического рассеяния света (ДРС, DLS). Поэтому большинство hi-end приборов обеспечивают возможность измерения при разных углах рассеяния, в то время как более бюджетные конфигурации ограничиваются одним углом.

В этом отчете по применению приводится подробное сравнение между измерениями методом ДРС при боковом и обратном угле рассеяния, и показывается, что результаты сопоставимы в широком диапазоне концентраций. Кроме того, проведение измерений при обратном рассеянии обладают рядом преимуществ при анализе высококонцентрированных образцов, а также для образцов с частицами малого размера в низкой концентрации.

1 Введение

Из множества параметров, которые необходимо задать перед проведением анализа методом динамического рассеяния света, одним из наиболее важных является угол детектирования. Современные приборы предлагают выбор из трех углов: обратный (например, 175°), боковой (90°) и прямой угол (например, 15°). В то время как прямое рассеяние используется при исследовании специфичных образцов и сравнивается с результатами бокового или обратного рассеяния, выбор между двумя последними может быть более затрудненным. В этом отчете по применению обсуждаются различные параметры, которые необходимо учитывать, чтобы сделать осознанный и правильный выбор.

Исторически первая конфигурация динамического светорассеяния была реализована под боковым углом. Преимущество заключалось в том, что в связи с отсутствием движущихся частей, не было необходимости в точной механике. Поскольку такая конфигурация стала официальной рекоменда-

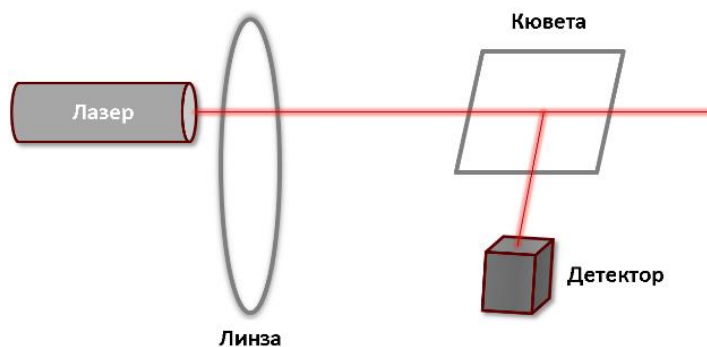
цией в первом ISO «Стандарт для фотонной корреляционной спектроскопии» (ISO 13321:1996), она быстро стала стандартной. Однако физическая модель динамического рассеяния света основывается на единичном событии рассеяния. Соответственно, падающий лазерный свет может быть рассеян только единожды до того, как рассеянный фотон без дальнейших воздействий достигнет детектора, что согласно четким указаниям в том же ISO, должно было достигаться путем сильного разбавления образцов, поскольку в режиме бокового рассеяния оптический путь лазера внутри кюветы относительно длинный.

Однако в некоторых случаях разбавление нежелательно, так как оно может изменить характеристики образца, поэтому были разработаны новые конфигурации ДРС, которые могут определять размер частиц в более широком диапазоне концентраций.

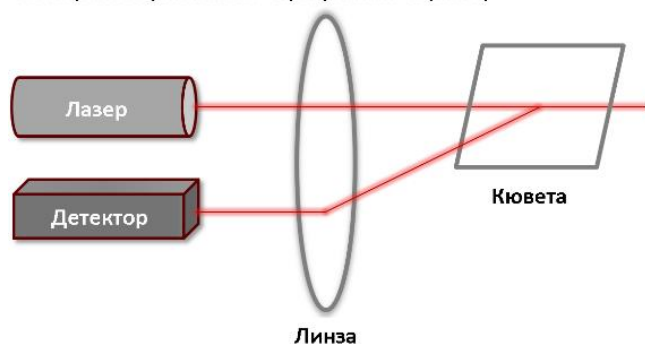
Как указано в обновленной версии соответствующего стандарта ISO (ISO 13321:2008), одним из таких методов является измерение в режиме обратного рассеяния. Измерение вблизи передней стенки кюветы в режиме обратного рассеяния эффективно минимизирует оптический путь внутри и наружу кюветы, тем самым уменьшая вероятность многократного рассеяния (рисунок 1, В).

Современные приборы ДРС оборудованы регулируемой фокусирующей линзой, установленной перед кюветой (рисунок 1, Б), которая позволяет выбрать положение измерения близко к передней стенке кюветы (рисунок 1, В) или в середине кюветы (рисунок 1, Б). Последний вариант в значительной степени расширяет диапазон концентраций и диапазон применений, в которых обратный угол рассеяния обеспечивает надежные результаты без необходимости разбавления образца.

А. Боковое рассеяние



Б. Обратное рассеяние - прозрачный образец



В. Обратное рассеяние - мутный образец

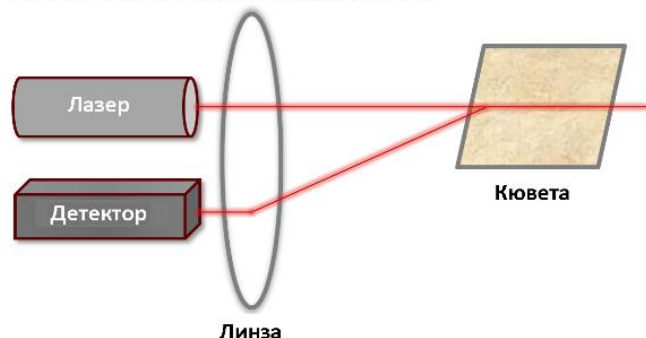
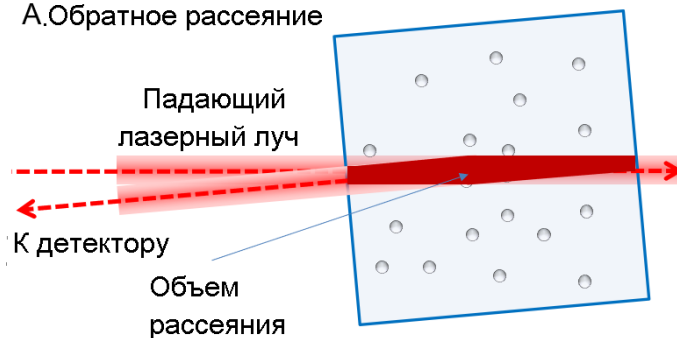


Рисунок 1. Позиция измерения для режима бокового рассеяния (А) и для режима обратного рассеяния в случае слаборассеивающего (Б) и мутного образца (В)

Помимо возможности определения высококонцентрированных образцов, измерения при обратном угле рассеяния также обеспечивают преимущество для анализа образцов с частицами малого размера в низкой концентрации. Благодаря скользящему пересечению падающего и рассеянного лазерных лучей, объем рассеяния - объем, из которого сигнал рассеяния собирается детектором - примерно в 18 раз больше, чем в традиционном режиме бокового рассеяния (см. рисунок 2).

А. Обратное рассеяние



Б. Боковое рассеяние

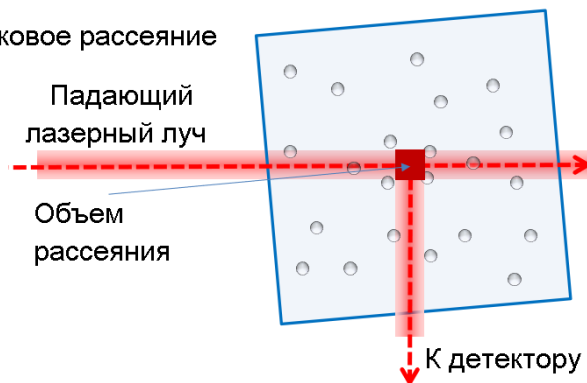


Рисунок 2. Сравнение объемов рассеяния в режиме обратного рассеяния (А) с настройками фокуса, приводящими к положению измерения в середине кюветы и в режиме бокового рассеяния (Б)

Большой объем рассеяния значительно увеличивает чувствительность измерения ДРС в режиме обратного рассеяния.

Измерение в режиме обратного рассеяния также обеспечивает преимущество при измерении дисперсии белков. Многие белки быстро агрегируют, находясь в жидкой дисперсии. Поскольку интенсивность рассеяния пропорциональна 6-й степени радиуса, сигнал, исходящий от небольшого количества крупных агрегатов, может значительно повлиять на определение размера одиночных белков. Одним из практических способов подавления сигнала больших агломератов является выбор большего угла измерения. Рассеяние мелких частиц более или менее изотропно, а это означает, что его интенсивность одинакова при любых углах. Однако для крупных частиц (например, агрегатов) интенсивность рассеяния уменьшается с увеличением угла. Следовательно, измерение под большим углом (например, 175°) эффективно подавляет сигнал, исходящий от крупных агрегатов, способствуя более чистому сигналу даже в сильно разбавленных образцах.

Основным недостатком конфигурации с обратным углом является то, что лазерный свет, попадая в кювету, генерирует блики, которые невозможно подавить. Блики вносят вклад в общий обнаруженный сигнал в виде шума и снижают отношение сигнал / шум, что отражается на точке пересечения корреляционной функции. Несмотря на то, что количество шума, создаваемого бликами, можно эффективно минимизировать, выбрав материал кюветы высокого оптического качества (например,

кварц), сниженное отношение сигнал / шум все равно приведет к снижению чувствительности для определенных диапазонов размеров и типов образцов. Следовательно, для обеспечения максимального диапазона концентраций во всем диапазоне размеров частиц, в случае высококлассных приборов ДРС, доступна возможность выбора между режимами бокового и обратного рассеяния.

В отличие от этого, более бюджетные решения предлагают только один угол измерения, что справедливо приводит к вопросу, какой угол дает больше возможностей для пользователя.

В данном отчете по применению показаны возможности обоих углов измерения (обратного и бокового), проводя серию измерений при различных концентрациях стандарта полистирольного латекса, а также белковой дисперсии.

2 Экспериментальная часть

Ряд концентраций образцов стандарта полистирольного латекса (ПЛ) 220 нм (Thermo Fischer), а также раствора лизоцима (Sigma Aldrich) измеряли с помощью Litesizer 500 в режиме обратного (175°) и бокового (90°) рассеяния. Лизоцим - антимикробный фермент с хорошо описанной структурой и номинальным размером от 3,8 до 4,6 нм. В случае стандарта ПЛ разбавление проводили с использованием отфильтрованного 10 mM раствора NaCl, полученного из сверхчистой воды, в то время как порошок лизоцима диспергировали и разбавляли отфильтрованным натрий-фосфатным буфером (НФБ). Подробная информация об образцах представлена в таблице 1.

Таблица 1. Образцы для анализа ДРС и соответствующие критерии приемлемости

Наименование образца	Номинальный размер, нм	Критерии приемлемости, нм
Стандарт полистирольного латекса	210,7 – 231,5	210,7 – 231,5
Лизоцим	3,82 – 4,59	3,82 – 4,59

Все параметры измерения были настроены автоматически, в то время как в качестве модели анализа была выбрана «Общая». Автоматические настройки позволяют Litesizer выбирать оптимальное положение фокуса луча внутри ячейки для каждого образца. Измерения проводились в одно-разовых или кварцевых кюветах. Все измерения были выполнены в трех повторениях. Параметры измерения приведены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры анализа образцов

Параметр	Полистирольный латекс	Лизоцим
Кювета	Одноразовая / Кварцевая	Кварцевая
Температура	25°C	25°C
Время термостатирования	3 минуты	3 минуты
Модель анализа	Общая	Общая
Кумулятивная модель	Расширенная	Расширенная
Качество	Автоматически	Автоматически
Фильтр	Автоматически	Автоматически
Фокус	Автоматически	Автоматически
Образец	Полистирольный латекс (n = 1,5850-0,001i)	Белок (n = 1,4500-0,001i)
Растворитель	10 mM раствор NaCl	Натрий-фосфатный буфер

3 Обсуждение результатов

3.1 Стандарт полистирольного латекса 220 нм

В таблице 3 представлены результаты измерения среднего гидродинамического диаметра (ГДД) стандарта полистирольного латекса 220 нм при различных концентрациях. Зеленым фоном отмечены результаты, удовлетворяющие критерию приемлемости (см. Таблицу 1).

Таблица 3. Результаты измерения среднего по трем повторениям гидродинамического радиуса частиц стандарта полистирольного латекса (220 нм).

Концентрация, мг/мл	Пропускание, %	Средний гидродинамический радиус	
		Обратное рассеяние (175°)	Прямое рассеяние (90°)
3,0	0,0	211,5	5,86
1,7	0,0	215,9	13,94
0,90	0,2	218,2	128,61
0,50	4,6	222,4	204,9
0,20	26,1	219,2	219,7
0,100	46,2	221,2	217,9
0,020	76,8	218,7	212,5
0,010	81,7	218,6	210,9
0,005	84,4	220,9	219,9
0,003	89,9	224,4	227,7
0,0020	90,9	227,2	226,3
0,0010	90,9	230,7	225,8
0,00050	91,0	227,5	224,1

Концентрация, мг/мл	Пропускание, %	Средний гидродинамический радиус	
		Обратное рассеяние (175°)	Прямое рассеяние (90°)
0,00020	91,2	229,3	230,9
0,00010	91,4	227,1	230,7
0,00005	91,7	217,2	218,7
0,00004	91,5	223,7	213,4

Отклонения, вызываемые многократным рассеянием, отчетливо просматриваются начиная с самой высокой концентрации в случае бокового угла рассеяния и проявляются в виде кажущегося меньшего измеренного диаметра. Основная причина данного явления заключается в том, что многократное рассеяние приводит к более быстрым флуктуациям интенсивности, что, в свою очередь, сокращает время убывания корреляционной функции. В случае бокового угла рассеяния отклонение от нижней границы критерия приемлемости составляет два порядка (ГДД равен 5,86 нм), в то время как режим обратного рассеяния уже обеспечивает достоверные результаты.

Полученные значения отражают эффективность подавления эффекта многократного рассеяния при помощи уменьшения оптического пути в режиме обратного рассеяния. Результаты дальнейших разбавлений показывают, что с уменьшением концентрации уменьшается и отклонение. Получение результатов в допустимом диапазоне при измерении в режиме бокового рассеяния требует разбавления образца до концентрации 0,2 мг/мл. В случае мутных проб это означает, что для получения надежных результатов имеется запас по концентрации в 1 порядок. Кроме того, серия показала, что оба угла детектирования обеспечивают одинаково надежные результаты в концентрациях от 0,04 мкг/мл до 0,2 мг/мл, подчеркивая факт того, что режим обратного рассеяния обладает преимуществами не только в случае высокой мутности образца.

Тем не менее, в случае определенных образцов упомянутые ранее блики лазера в режиме обратного рассеяния могут вызвать отклонения, что делает боковой угол предпочтительным. Таким образом, Litesizer 500 может выбирать наиболее подходящий угол рассеяния, постоянно контролируя пропускание образца для определения мутности пробы.

3.2. Лизоцим

На рисунке 3 показано типичное распределение частиц по размерам дисперсии лизоцима 10 мг/мл, измеренное как в режиме бокового, так и в режиме обратного рассеяния.

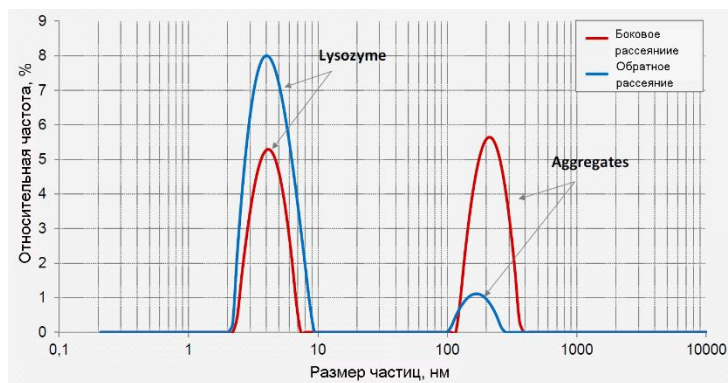


Рисунок 3. Распределение частиц по размерам дисперсии лизоцима 10 мг/мл, измеренное в режиме бокового и обратного рассеяния.

В то время как основной пик лизоцима определяется с превосходной точностью и воспроизводимостью для обоих углов, соотношение пика агрегата и пика мономера сильно различается. Основной причиной этого является обсужденная ранее тенденция уменьшения угла рассеяния более крупных частиц-агломератов с увеличением угла детектирования, которая приводит к меньшему относительному вкладу сигнала агрегатов при большем угле (175°).

Как показано на рисунке 4, данный факт в сочетании с большим объемом рассеяния в режиме обратного рассеяния обеспечивает получение надежных результатов даже для сильно разбавленных образцов.

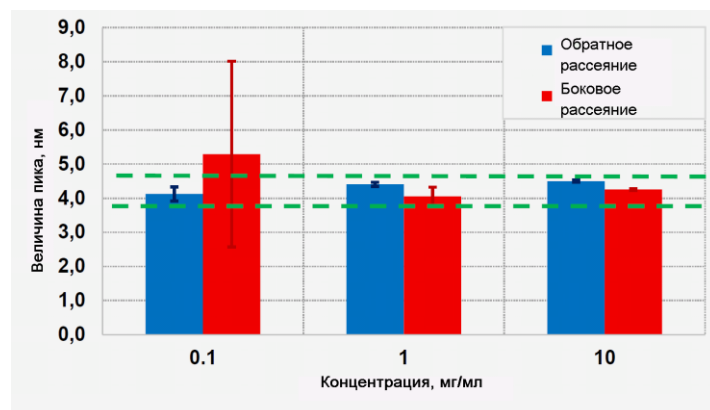


Рисунок 4. Результаты определения пиковых значений диаметра частиц лизоцима (в нм) при различных концентрациях. Средние значения по трем повторениям. Зеленые линии обозначают границы критерия приемлемости.

В данном случае, поскольку из-за образования агрегатов система лизоцима является полидисперсной, вместо гидродинамического диаметра обрабатывались данные распределения частиц по размерам, и для оценки использовались соответствующие положения максимумов пиков.

В случае бокового угла рассеяния уже при концентрации 1 мг/мл наблюдается увеличение стандартного отклонения. Однако еще более очевидным преимуществом обратного угла становится в

случае наименьшей концентрации (0,1 мг/мл), когда результаты, полученные при боковом рассеянии, не только характеризуются большими отклонениями, но даже среднее определенное пиковое значение выходит за пределы диапазона проверки. Напротив, измерение в режиме обратного рассеяния даже на границе предела обнаружения обеспечивает надежные результаты.

4 Выводы

В случае бюджетных приборов ДРС может потребоваться выбор между режимами бокового и обратного рассеяния. В данном отчете по применению демонстрируется, что в случае мономодальных образцов измерение в режиме обратного рассеяния увеличивает эффективный диапазон концентраций на порядок из-за более короткого оптического пути лазера внутри кюветы.

Также показано, что из-за совокупности большего объема рассеяния и зависящей от угла интенсивности рассеяния фракций частиц разного размера, измерение в режиме обратного угла дает более надежные результаты по сравнению с классическим режимом бокового рассеяния даже в сильно разбавленных белковых дисперсиях

Контакты

Anton Paar GmbH

pc-application@anton-paar.com

www.anton-paar.com

Эксклюзивный дилер в России: ООО "АВРОРА"

paar@avrrora-lab.com

www.paar.ru

+7(495)-258-83-05/-06/-07