

Методы светорассеяния для исследования растворов (био) полимеров и наночастиц

Евтушенко Евгений Геннадиевич

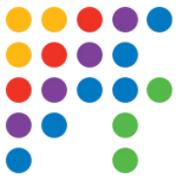
Ассистент

Химический Факультет МГУ

evtushenko@enzyme.chem.msu.ru

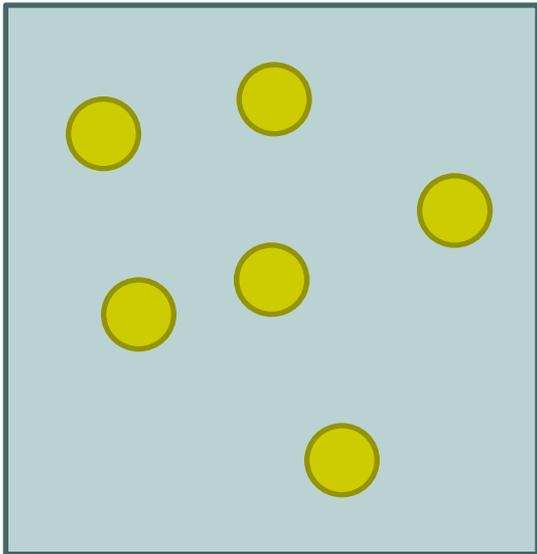


Предмет лекции



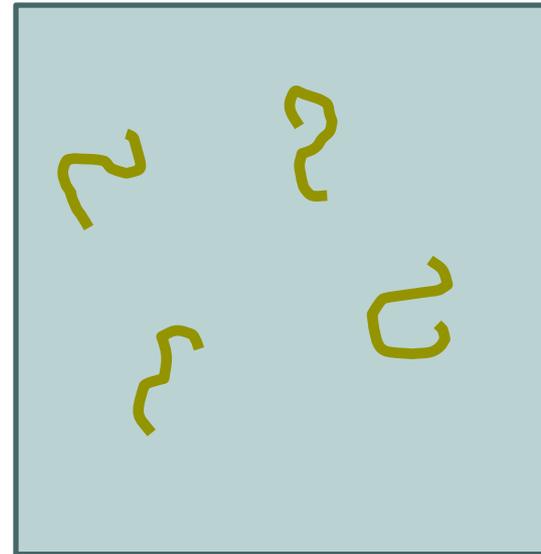
Коллоидные растворы – частый объект интереса ученых.

В общем виде, в него включаются как свободнодисперсные системы (лиофобные), состоящие из дисперсионной среды и дисперсной фазы, так и истинные растворы полимеров, в том числе биологических (белки, белковые комплексы)



Лиофобная дисперсная система

Две фазы, одна из которых – в высокодисперсном состоянии



Истинный раствор ВМС

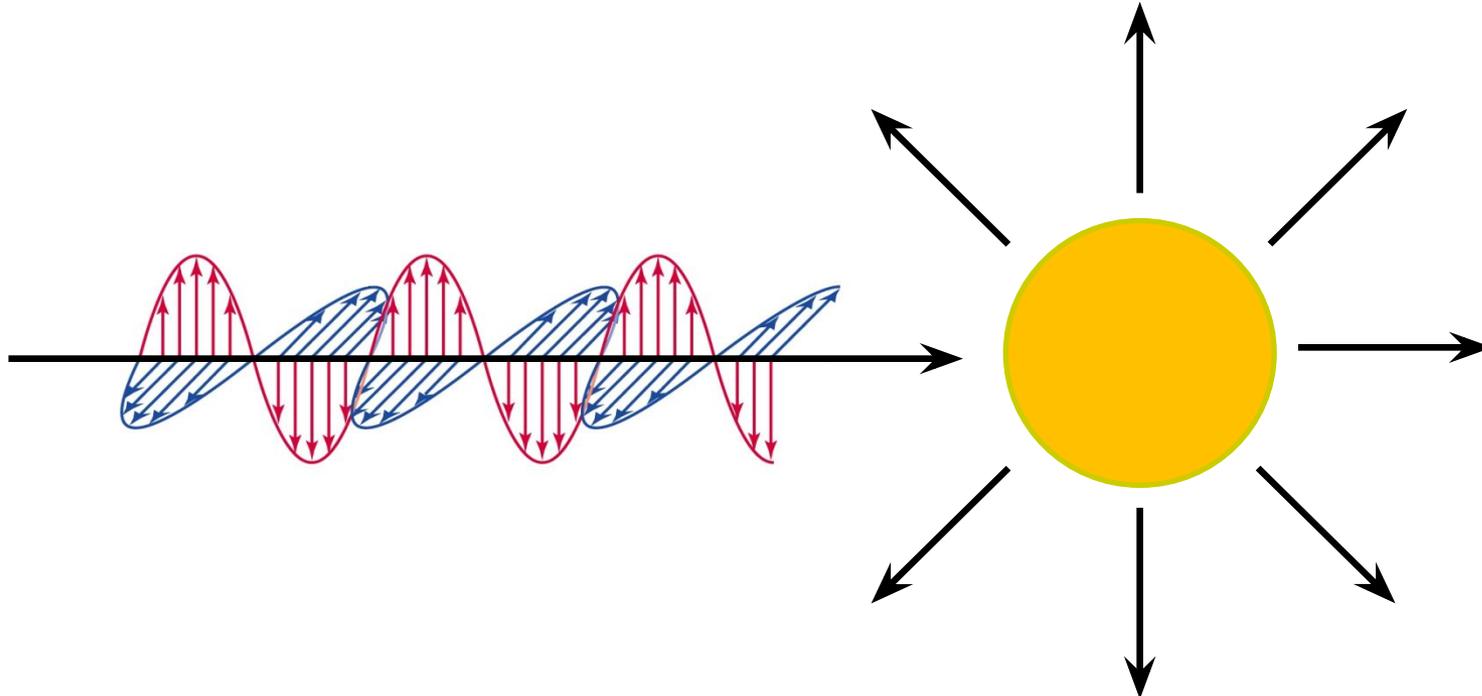
Молекулы полимера свободно двигаются в растворителе

Предмет лекции



В лекции пойдет речь о методах характеристики таких объектов, измерениях: размеров частиц/макромолекул, молекулярной массы, концентрации и т.д.

1. Классические методы светорассеяния: статическое и динамическое
2. Анализ траекторий наночастиц



Зачем нужно характеризовать коллоидные растворы?



1. Синтетические полимеры / биополимеры:

- Молекулярная масса M_w (что мы синтезировали?)
- Второй вириальный коэффициент A_2 (взаимодействие макромолекул с растворителем)
- Радиус инерции R_g (состояние макромолекулы в растворе)

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum m_i R_i^2}{\sum m_i}}$$

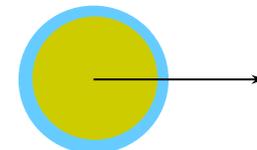


2. Полимеры, биомacroмолекулы, ассоциаты макромолекул

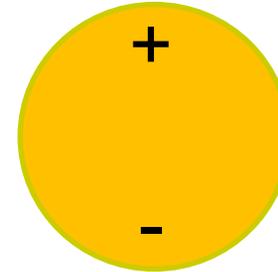
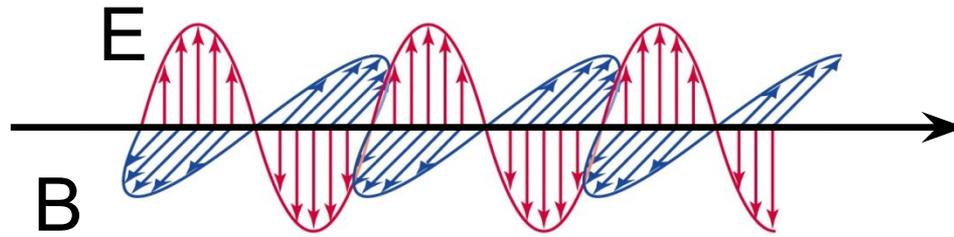
- Гидродинамический радиус (гомогенность, агрегация)

3. Наночастицы

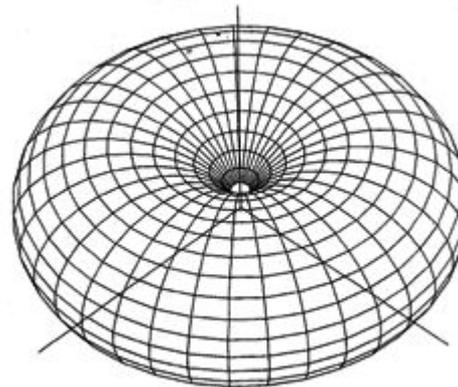
- Гидродинамический радиус (вся область нанотехнологий – область размерных эффектов, модификация наночастиц, агрегация наночастиц)



Рассеяние света малыми частицами



Индукцированный
осциллирующий
диполь

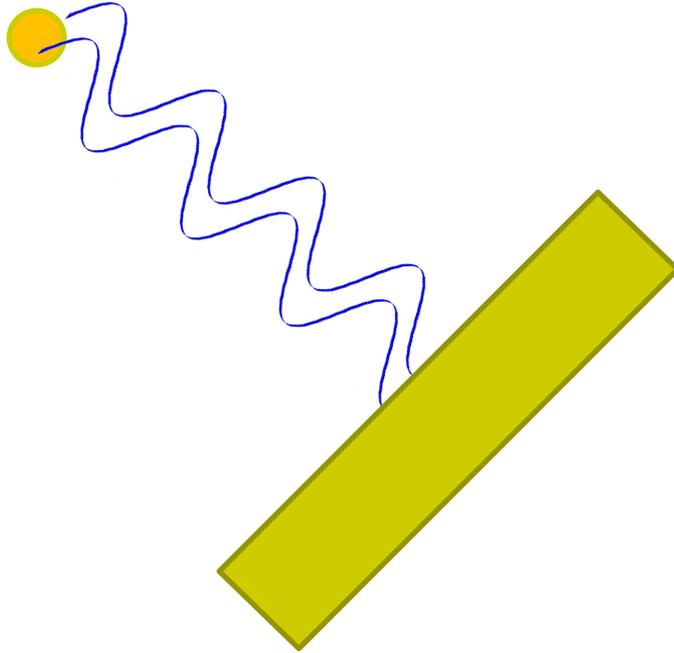


Рассеяние света малыми частицами

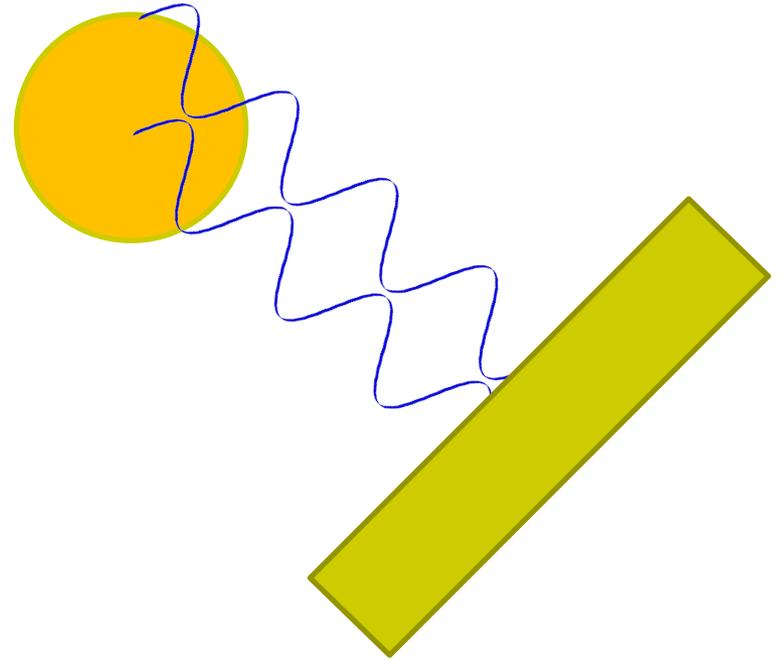


$$d < \lambda/20$$

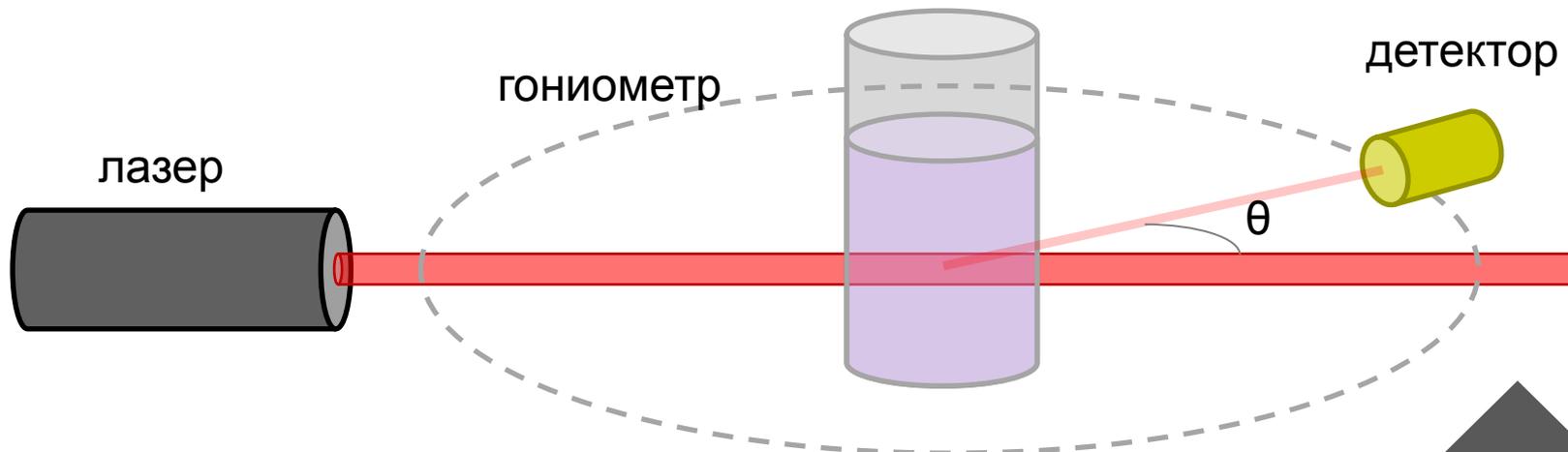
Релеевское рассеяние



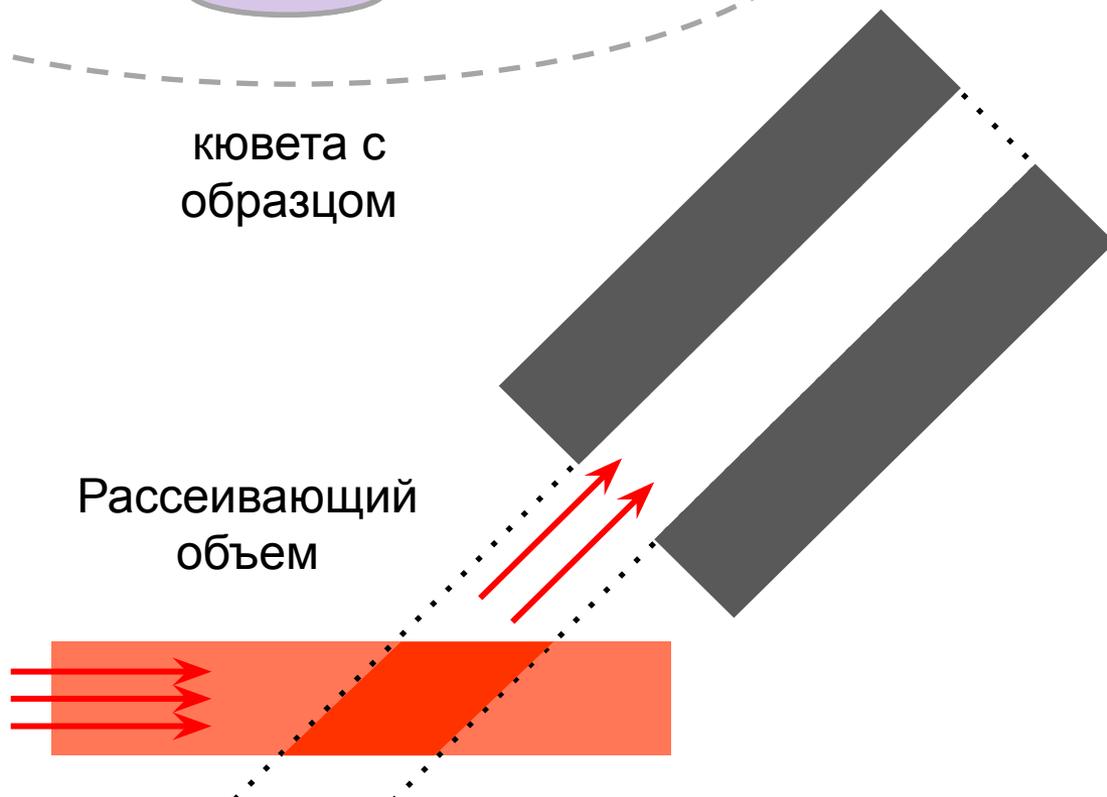
$$\lambda/20 < d < \lambda/2$$

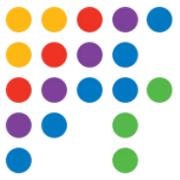


Статическое светорассеяние



Измерение усредненной по времени интенсивности рассеянного под углом θ излучения





Случай малых частиц ($<\lambda/20$)

$$I_{\text{изм}} = I_{\text{раств}} + I_{\text{расс}}$$

Растворитель также рассеивает излучение благодаря наличию флуктуаций

$$I_{\text{расс}} = \Omega \frac{I_0}{r^2} \frac{2 \pi^2 n_0^2}{\lambda^4} \frac{1}{N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \overline{M_w} c$$

Ω – приборная константа

I_0 – интенсивность падающего излучения

r – расстояние от рассеивающего объема до детектора

λ – длина волны излучения

n_0 – показатель преломления чистого растворителя

N_A – число Авогадро

$\frac{dn}{dc}$ – инкремент показателя преломления

$\overline{M_w}$ – средневесовая молекулярная масса полимера

c – массовая концентрация полимера (г/л)

К

оптическая
постоянная
раствора

$$R_{\theta} = \frac{I_{\text{расс}} r^2}{I_0 \Omega} \quad \text{коэффициент рассеяния (отношение Релея)}$$

Случай малых частиц ($<\lambda/20$)



Для идеального раствора полимера:

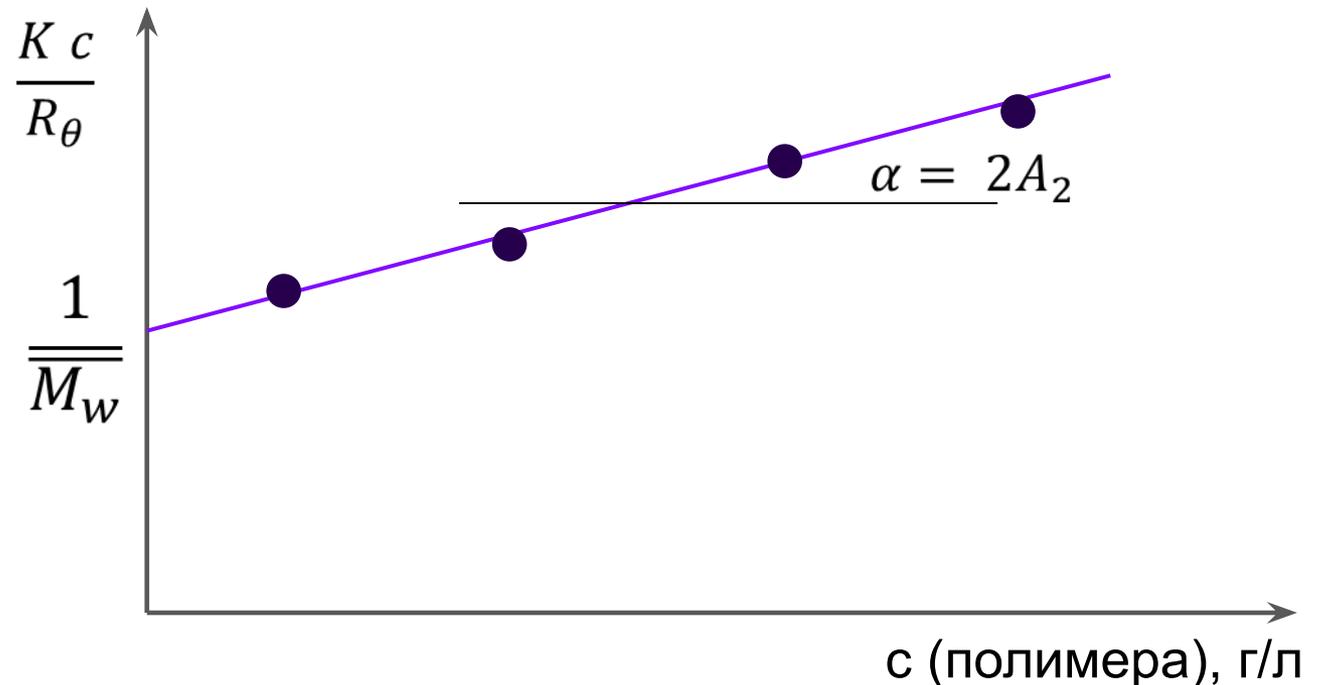
$$R_{\theta} = K c \overline{M}_w$$

Для не идеального раствора полимера (уравнение Дебая):

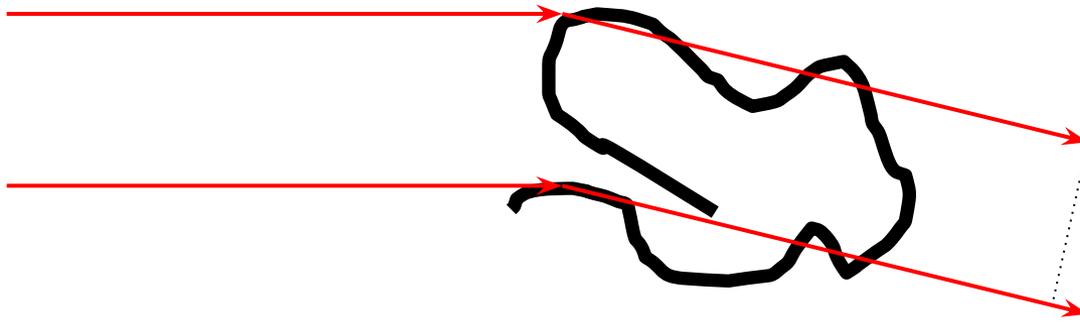
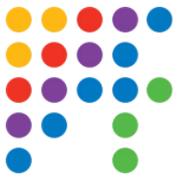
$$\frac{K c}{R_{\theta}} = \frac{1}{\overline{M}_w} + 2A_2 c$$

A_2 – т.н. второй вириальный коэффициент
Характеризует взаимодействие полимерных звеньев с растворителем

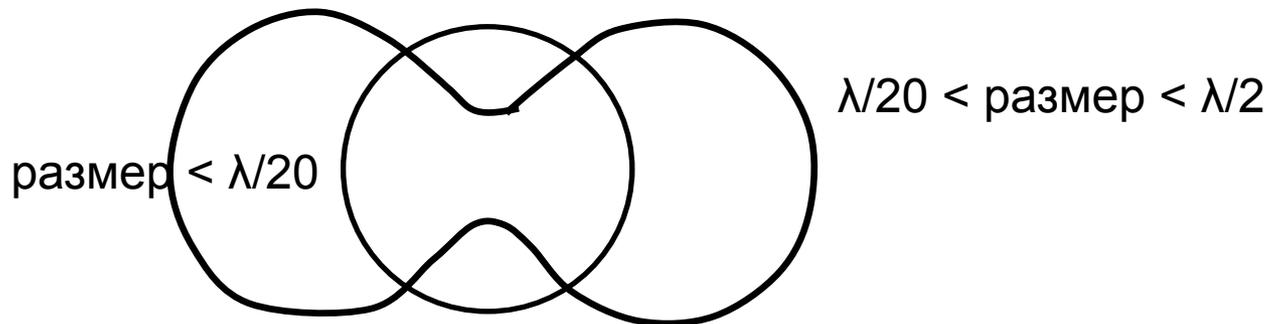
График
Дебая



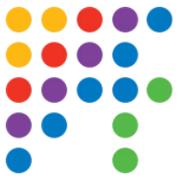
Статическое светорассеяние для частиц размером $> \lambda/20$, но $< \lambda/2$



Интерференция лучей, рассеянных на разных частях молекулы (проявляется на всех углах, кроме 0°)



Статическое светорассеяние для частиц размером $> \lambda/20$, но $< \lambda/2$

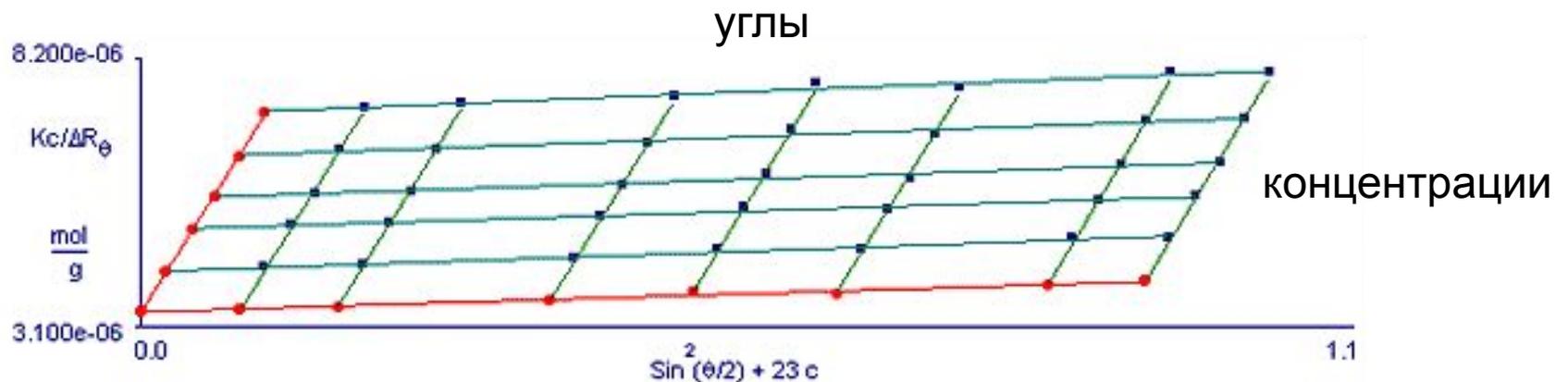


$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \cdot \overline{R_g^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} \right) + 2A_2c$$

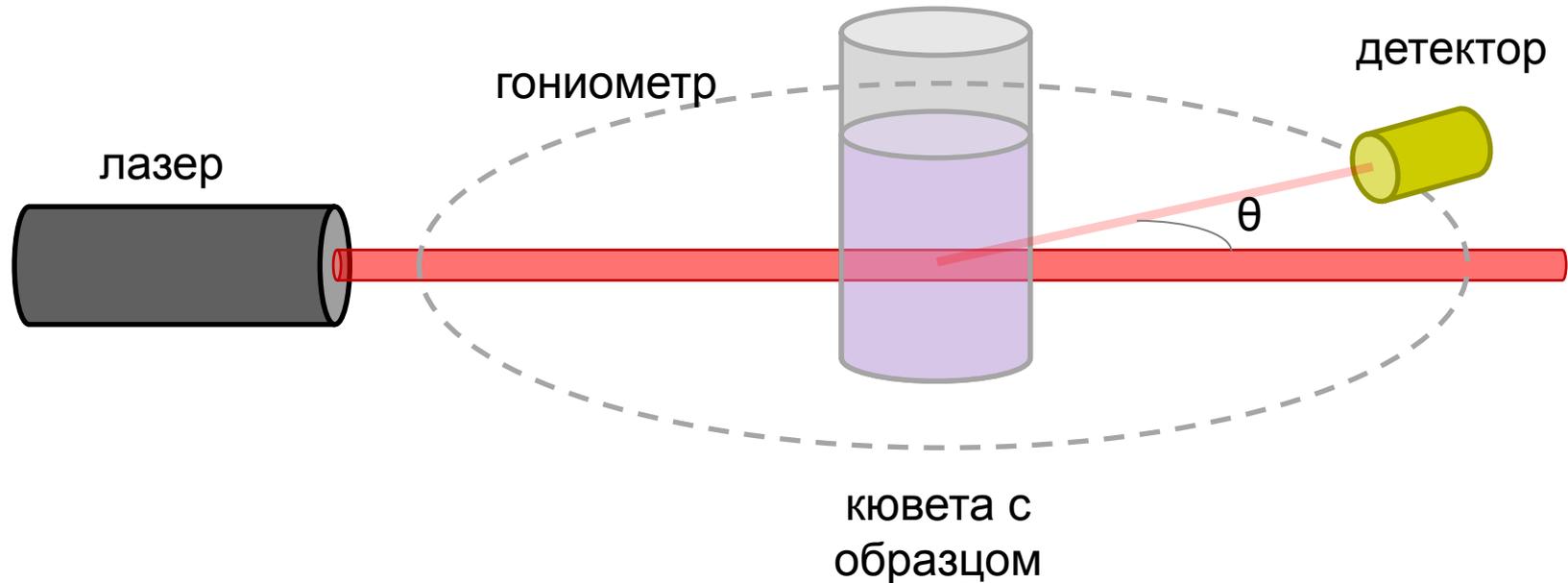
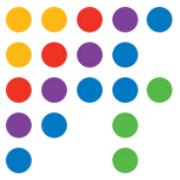
$$R_g = \sqrt{\frac{\sum m_i R_i^2}{\sum m_i}} \text{ — радиус инерции макромолекулы}$$



График Зимма:

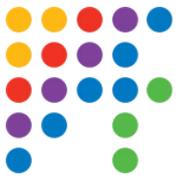


Статическое светорассеяние: резюме



- Чаще всего применяется для растворов полимеров
- Измеряем зависимости интенсивности рассеяния I от концентрации полимера и угла рассеяния
- Получаем:
 - Для малых частиц – средневесовую молекулярную массу, второй вириальный коэффициент
 - Для более крупных частиц + радиус инерции

Метод динамического светорассеяния



Множественные названия одного и того же метода как в англоязычной, так и в русскоязычной литературе:

Dynamic light scattering (DLS)

Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

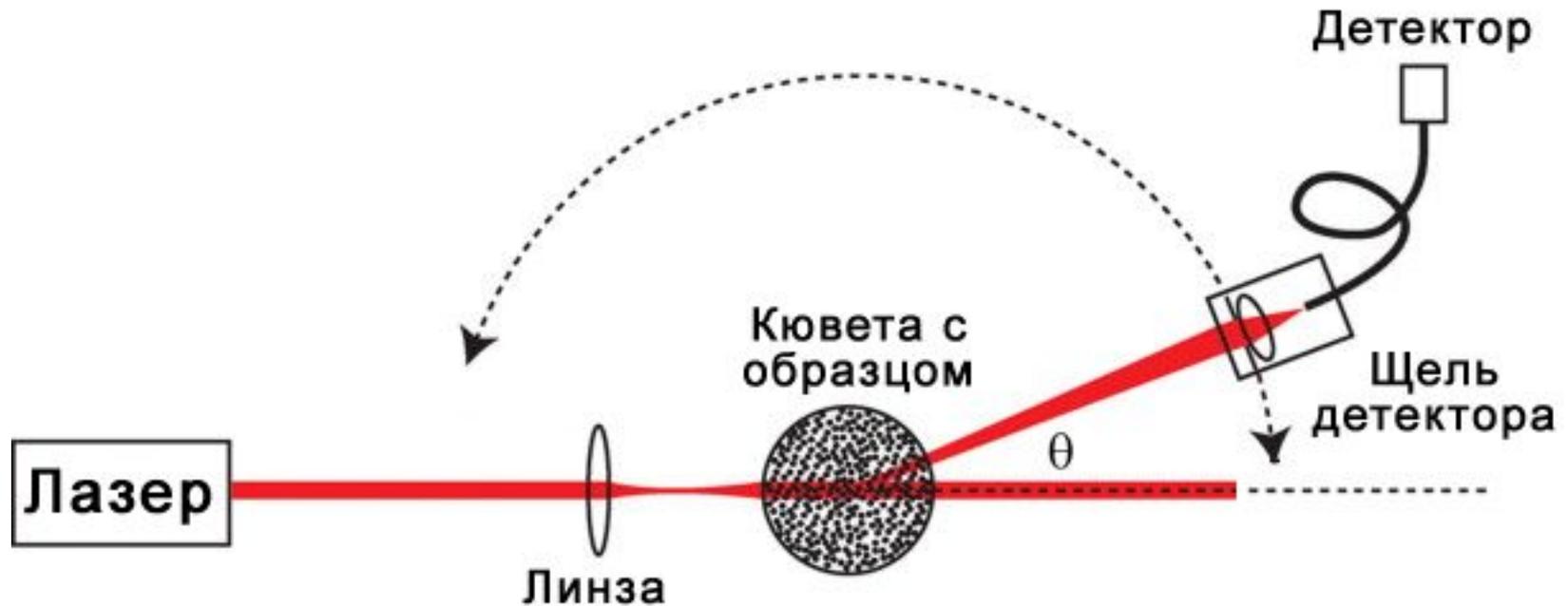
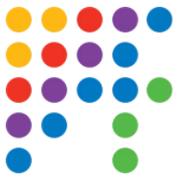
Quasielastic light scattering (QELS)

Динамическое светорассеяние (ДРС)

Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС)

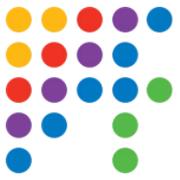
Динамическая спектроскопия рассеяния света

Метод динамического светорассеяния

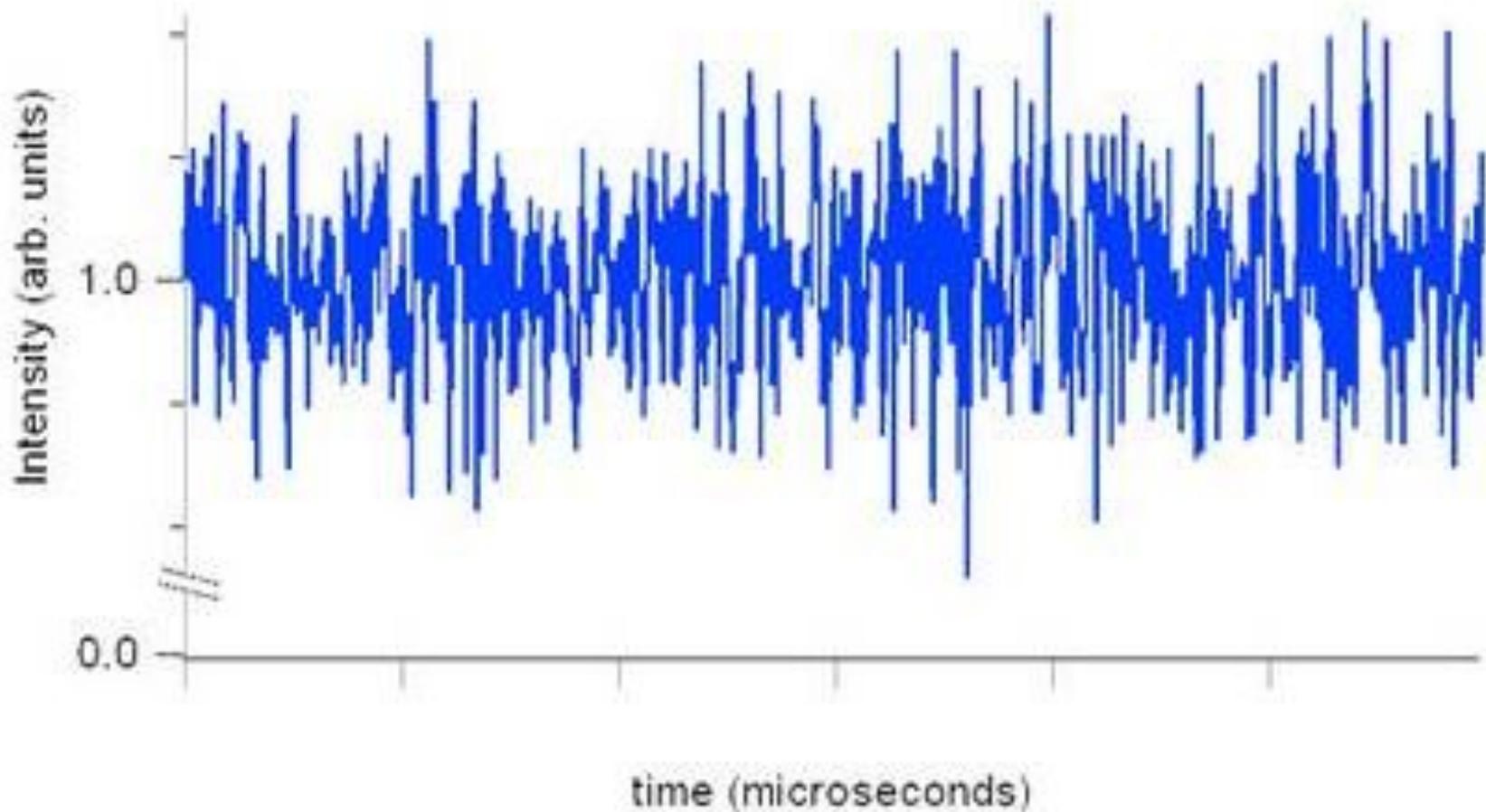


Измерения проводят, как правило, на одном фиксированном угле:
 90° , 135° - 145° , 173° - 178°

Метод динамического светорассеяния



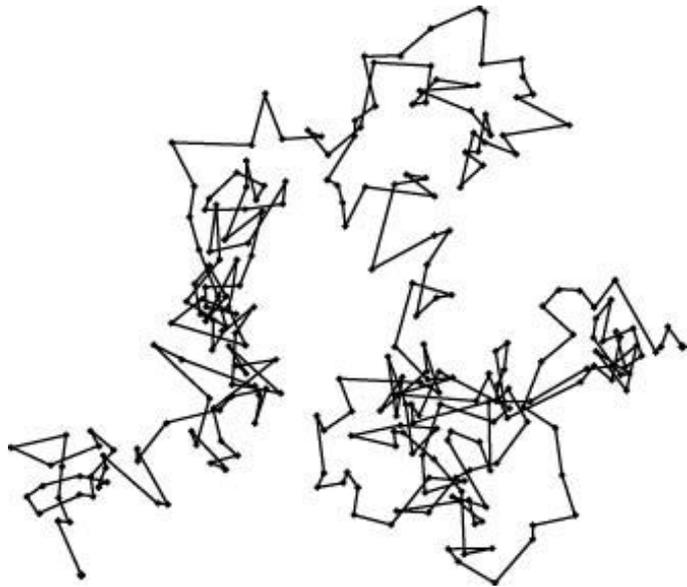
Флуктуации интенсивности рассеянного излучения при временах выборки десятки нс – миллисекунды:



Метод динамического светорассеяния



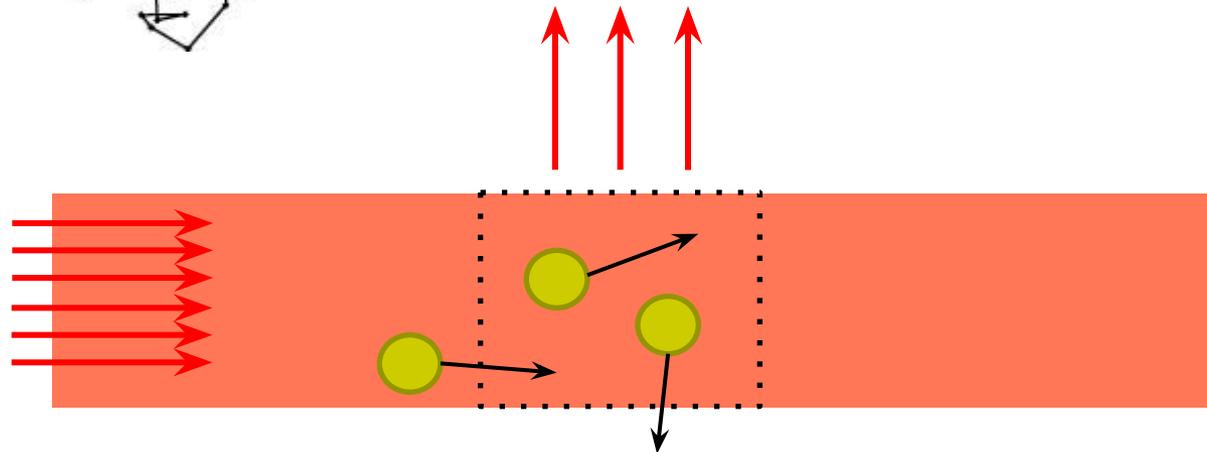
Броуновское движение частиц в рассеивающем объеме



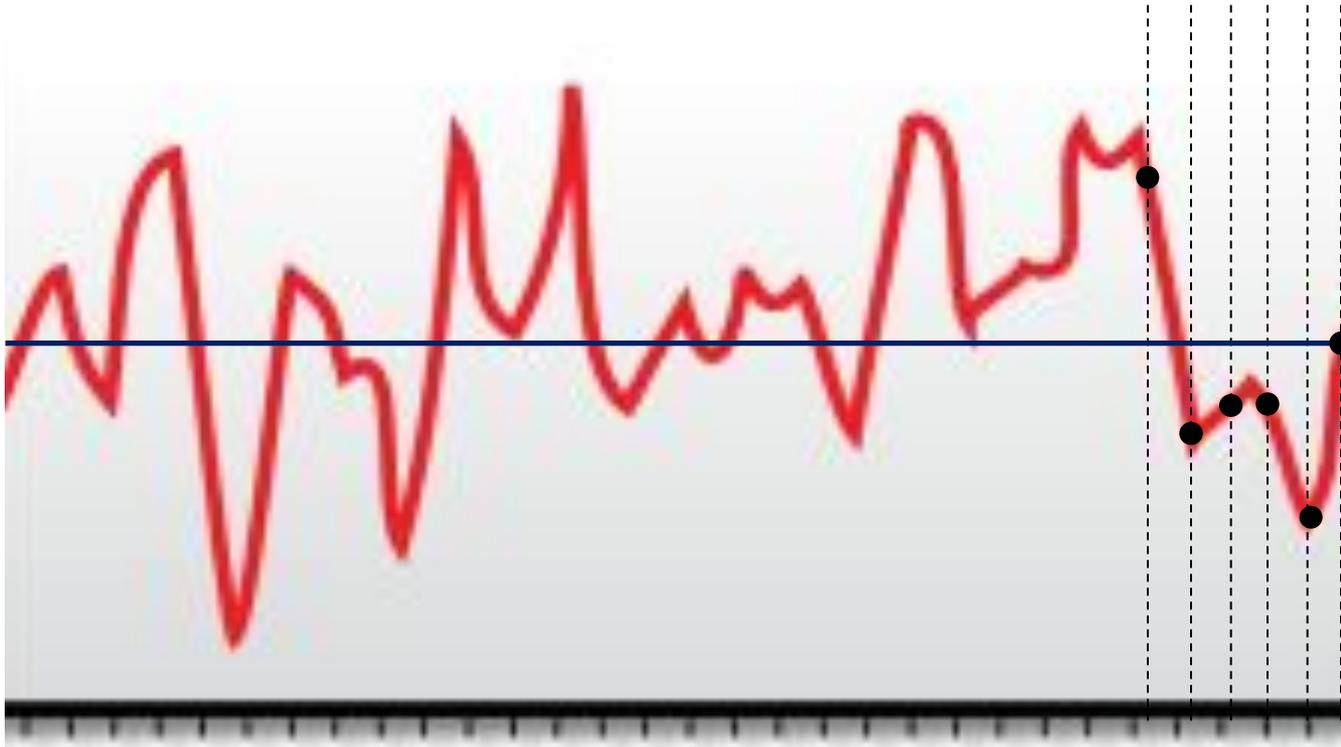
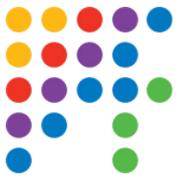
$$\overline{l^2} = 2 D t$$

Чем крупнее частица/молекула,
тем медленнее она движется

Крупные частицы – медленные
флуктуации интенсивности,
Мелкие частицы – частые флуктуации



Автокорреляционный подход



Математическое определение коэффициента корреляции:

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n - 1) SD(x_i)SD(y_i)}$$

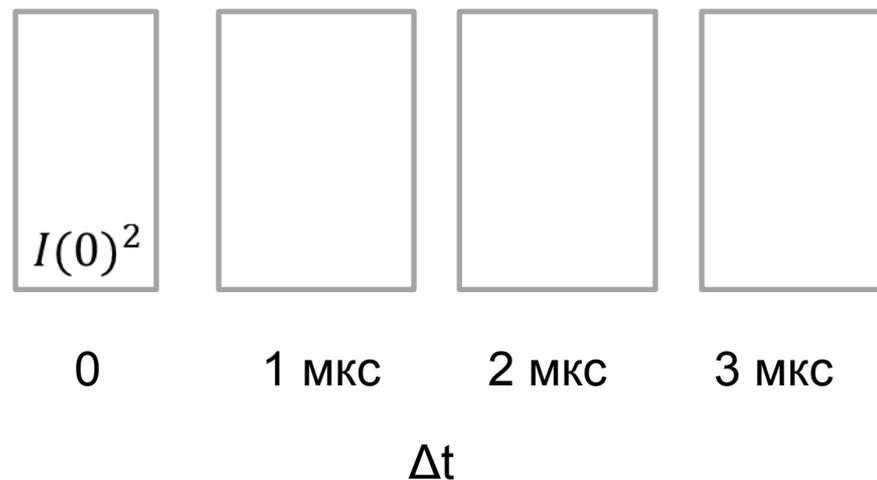
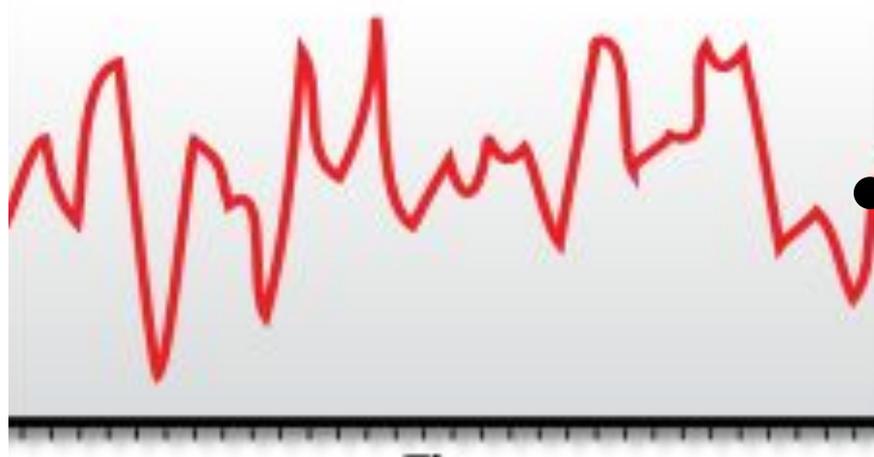
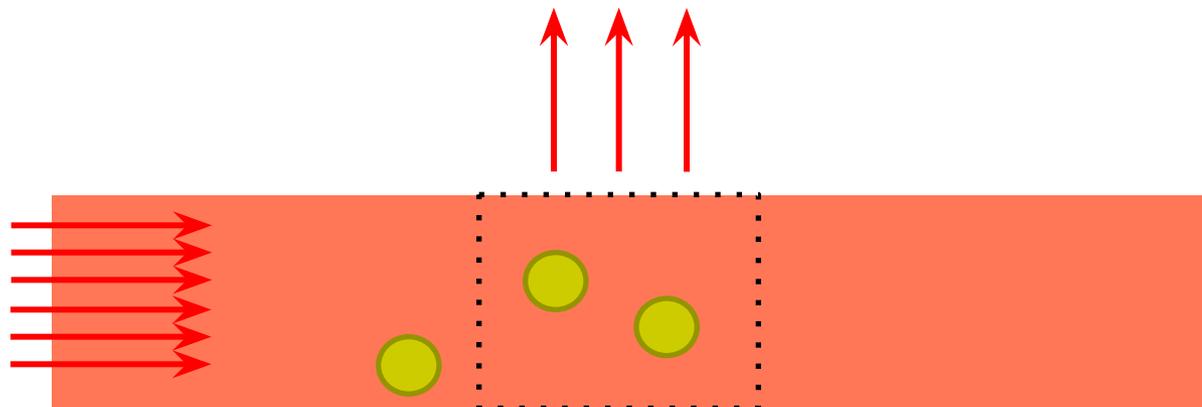
В техническом определении корреляции часто не вычитают среднее и не проводят нормировку на SD

$$\frac{1}{n} \sum x_i y$$

Метод динамического светорассеяния: вычисление автокорреляционной функции



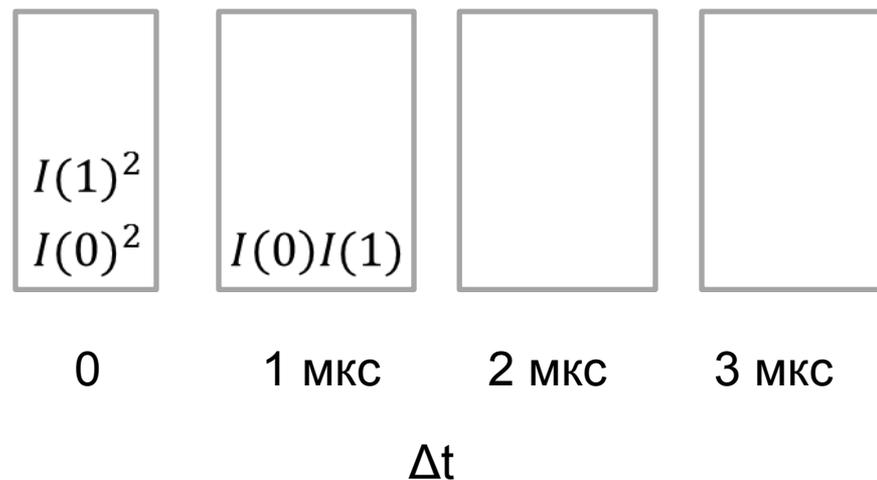
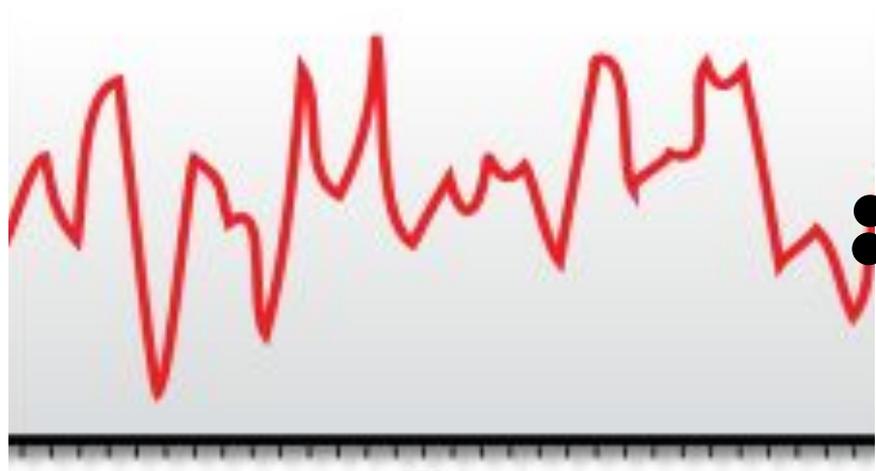
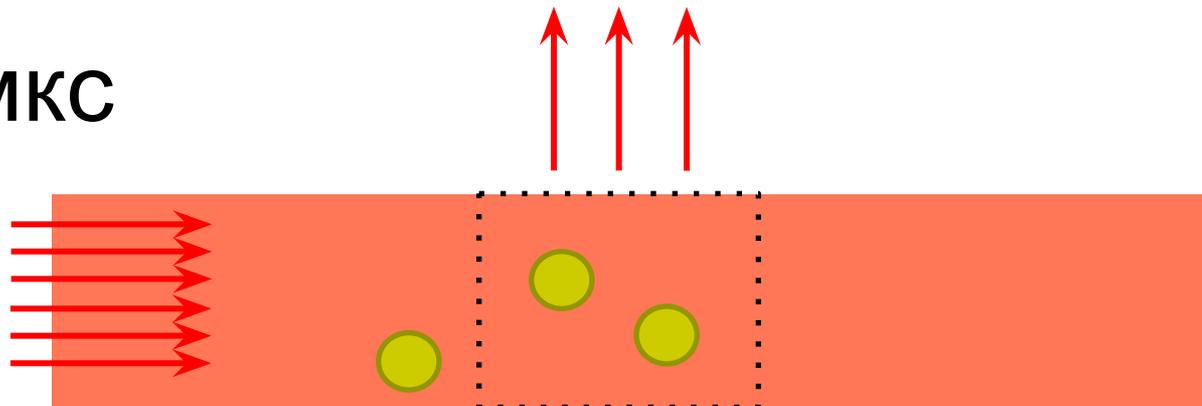
$t = 0$



Метод динамического светорассеяния: вычисление автокорреляционной функции



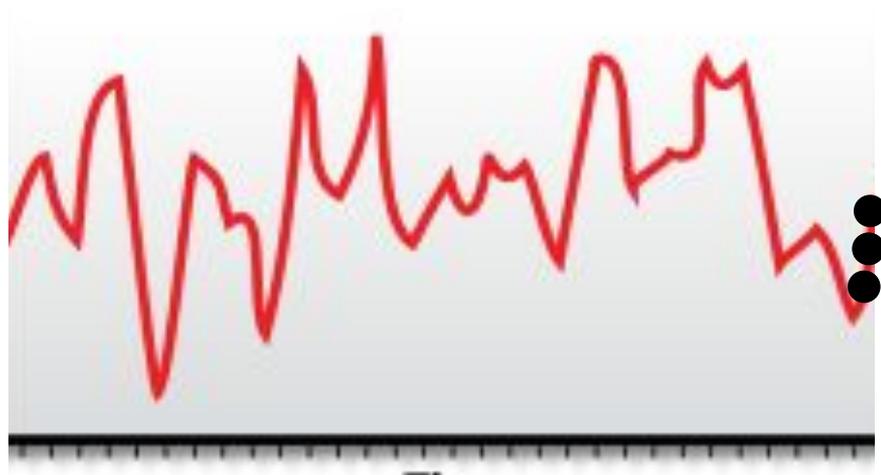
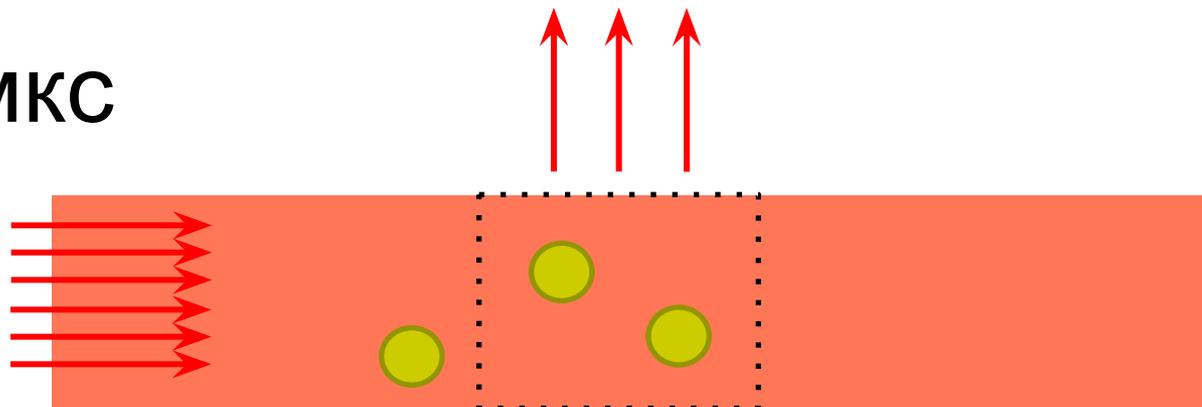
$t = 1$ мкс



Метод динамического светорассеяния: вычисление автокорреляционной функции

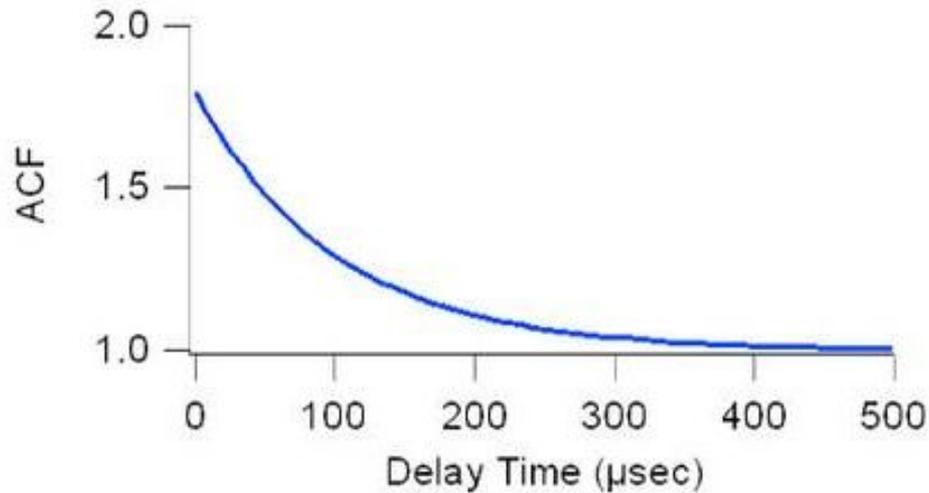
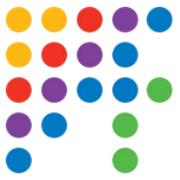


$t = 2 \text{ мкс}$



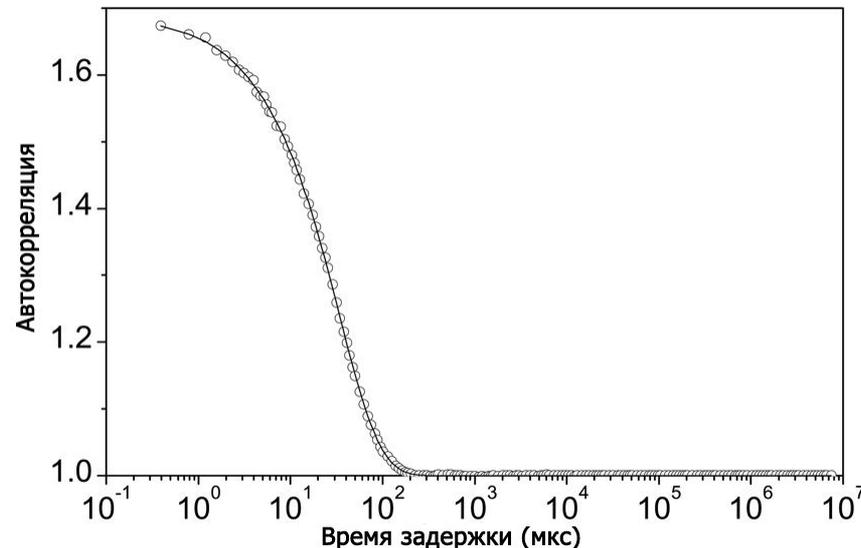
$I(2)^2$			
$I(1)^2$	$I(1)I(2)$		
$I(0)^2$	$I(0)I(1)$	$I(0)I(2)$	
0	1 мкс	2 мкс	3 мкс
Δt			

Метод динамического светорассеяния: подготовка автокорреляционной функции

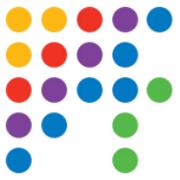


$$g^2 = \frac{\overline{I(t)I(t+\tau)}}{\overline{I(t)}^2}$$

$$g^2 = 1 + \beta (g^1)^2$$



Метод динамического светорассеяния: интерпретация автокорреляционной функции



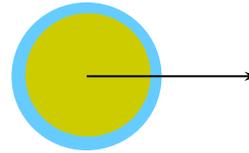
Если в растворе присутствуют частицы строго одного и того же размера, то:

$$g^1 = \exp(-\Gamma \tau) = \exp(-q^2 D_t \tau)$$

где D_t – коэффициент диффузии, q – волновой вектор

$$q = \frac{4 \pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

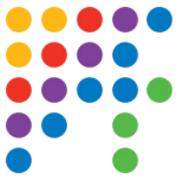
$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$



Если в растворе присутствуют разные частицы, то автокорреляционная функция представляет собой сумму (вернее, интеграл) экспонент от каждой фракции:

$$g^1 = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma = \int_{D_{min}}^{D_{max}} Z(D) \exp(-q^2 D \tau) dD$$

Метод динамического светорассеяния: интерпретация автокорреляционной функции



А) Метод кумулянтов:

Разложение этой функции в ряд:

$$g^1 = \exp(-\bar{\Gamma} \tau) \left(1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 + \dots \right)$$

Ограничение двумя первыми членами:

1) $\bar{\Gamma} = q^2 \bar{D}$ - взвешенный по интенсивности рассеяния средний коэф. диффузии, из него рассчитывается т.н. z-средний размер.

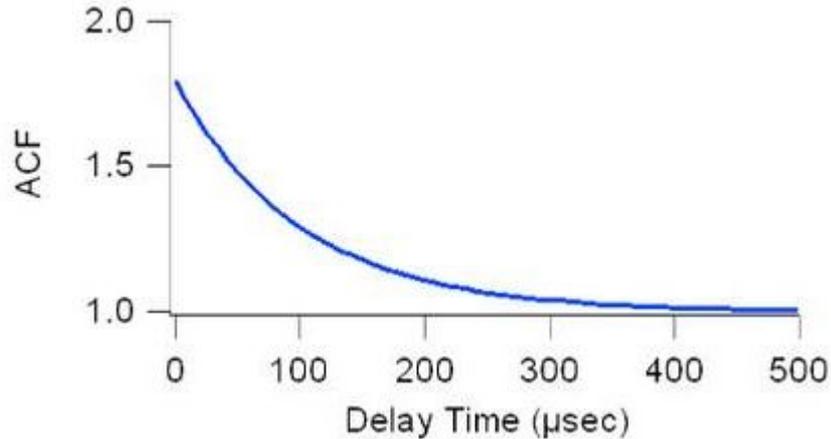
2) Ширина распределения $\mu_2/\bar{\Gamma}$, т.е полидисперсность частиц

Б) Алгоритм CONTIN:

Регуляризация, затем решение обратной задачи:

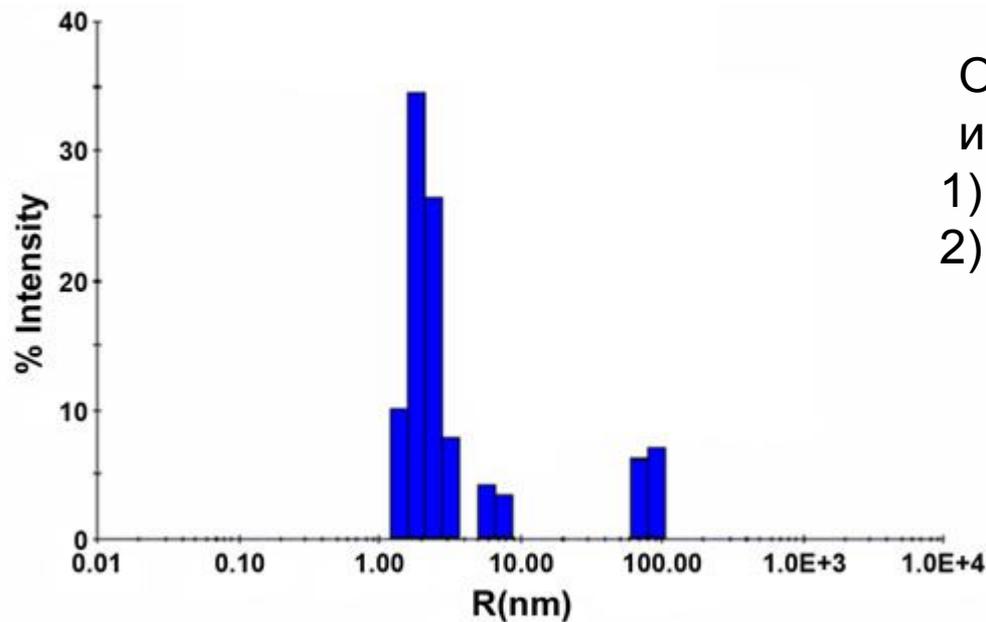
$$g^1 = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma = \int_{D_{min}}^{D_{max}} Z(D) \exp(-q^2 D \tau) dD$$

Метод динамического светорассеяния: интерпретация автокорреляционной функции



$$g_2(\tau) = 1 + C \left[\int_{D_{\min}}^{D_{\max}} Z(D) \exp(-q^2 D \tau) dD \right]^2$$

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$



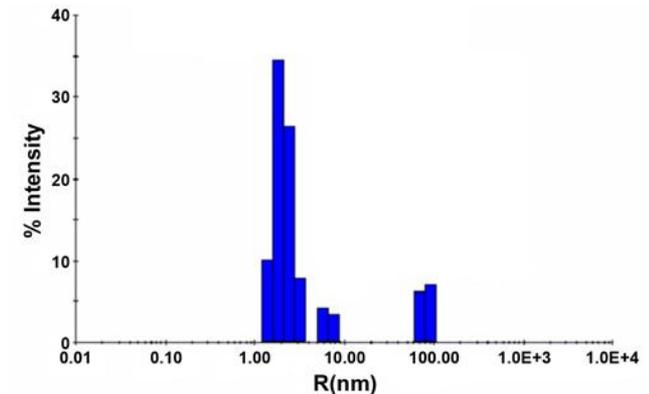
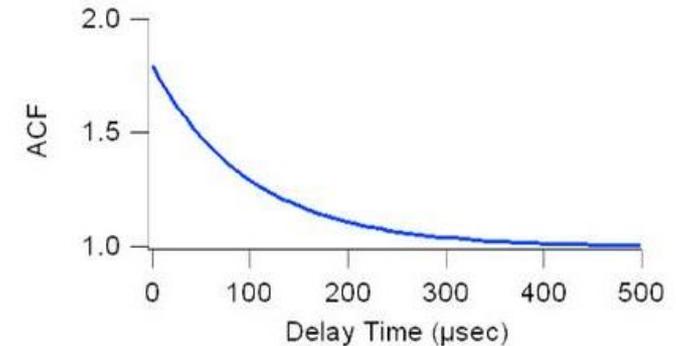
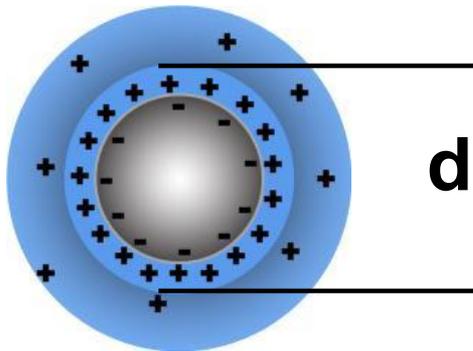
Ограничения, накладываемые при интерпретации АКФ:

- 1) Неотрицательность $Z(D)$
- 2) Минимальное соотношение Γ соседних фракций

Метод динамического светорассеяния: Тип данных

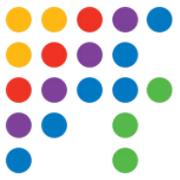


- Если в растворе присутствуют агрегаты, то мы измеряем размер агрегатов, а не первичных частиц
- Мы измеряем гидродинамический/ размер:



- При использовании пересчета D в размер мы использовали формулу для сферы. Размер является эффективным сферическим эквивалентом. Для полимеров – проблема протекаемости глобулы
- Распределение взвешено по интенсивности рассеяния, а не по объему или числу частиц

Метод динамического светорассеяния: Недостатки метода

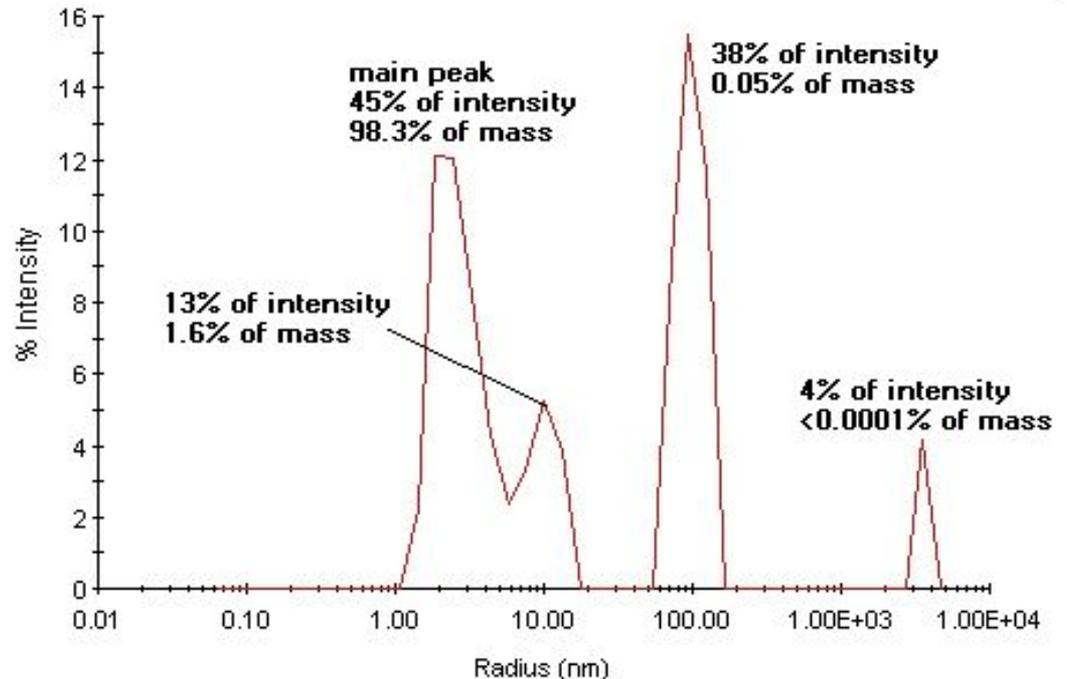


- Распределение взвешено по интенсивности рассеяния

Возможен пересчет распределения в объемное или числовое по теории Ми, зная оптические свойства материала частиц и жидкости (коэффициент преломления и поглощения)

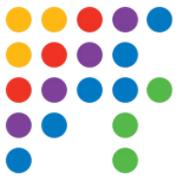
$$I \sim d^6 - d^4$$

$$V \sim d^3$$



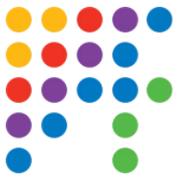
Метод динамического светорассеяния:

Ограничения метода



- Распределение взвешено по интенсивности рассеяния
Возможен пересчет распределения в объемное или числовое по теории Ми, зная оптические свойства материала частиц и жидкости (коэффициент преломления и поглощения)
- Высокая чувствительность к крупным частицам (пыли, крупным агрегатам)
 - А) Фильтрование растворов перед измерением через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм
 - Б) Выполнение серии коротких измерений АСФ с удалением выбросов и последующим усреднением
- Низкое разрешение по размерам
Теоретическое 1:2, практическое 1:2.5-3

Метод динамического светорассеяния: Измеряемые диапазоны



- Размер частиц – от 0.5 (реально 2-5) нм до 6 (реально 2-3) мкм

«Маскирование» мелких частиц крупными

Только диффузионное движение частиц (не должно быть седиментации или конвекции)

Чем меньше размер частиц, тем выше должна быть концентрация (ppm для частиц 200-500 нм, проценты – десятки процентов для частиц 1-5 нм)

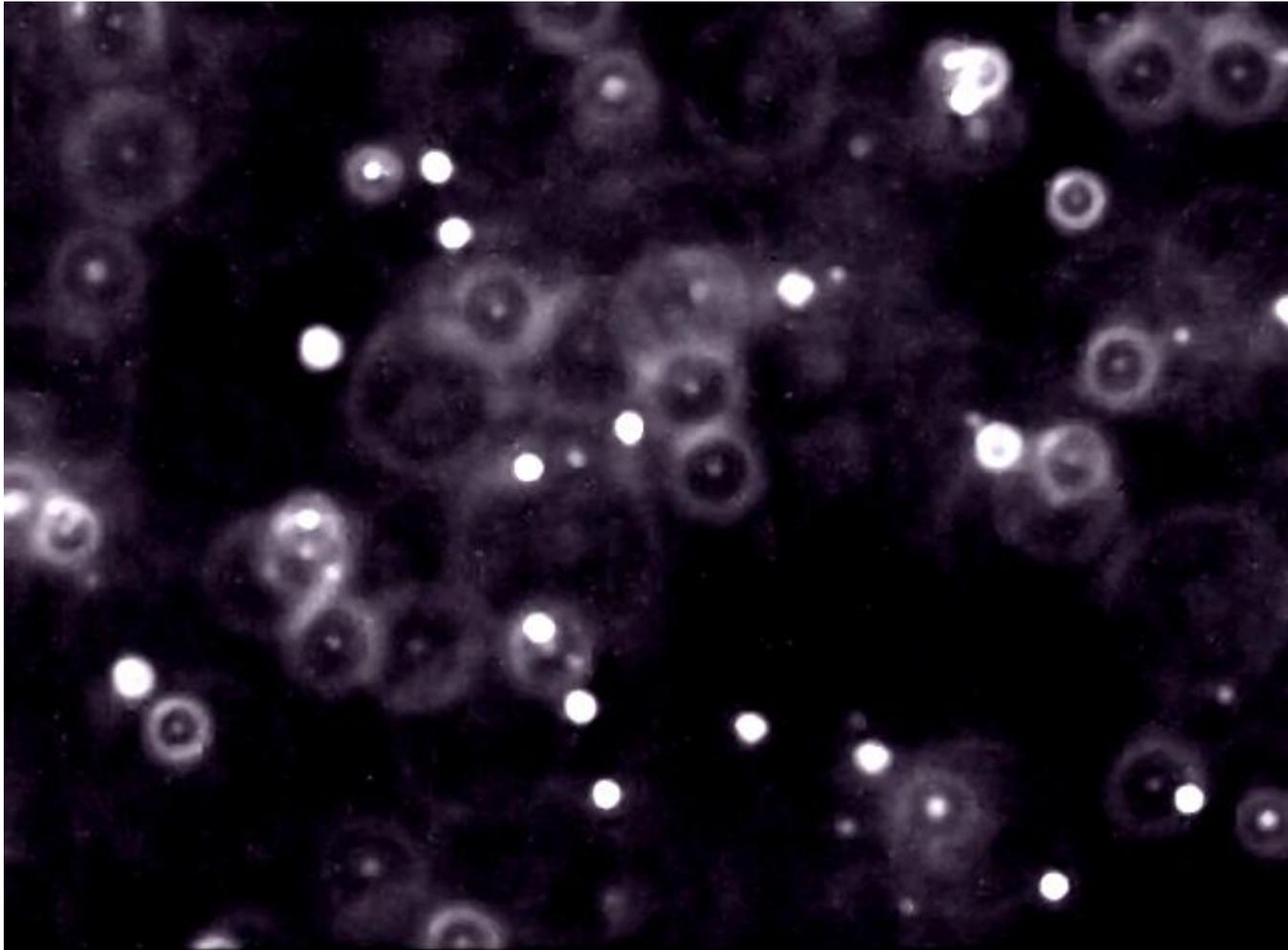
- Концентрации частиц

Подбирается индивидуально под образец

Низкая концентрация – долгое измерение

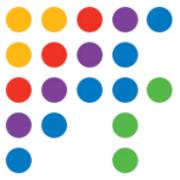
Высокая концентрация – многократное рассеяние, занижение размера.

Ультрамикроскопия



Анализ траекторий наночастиц

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)



Частицы в растворе постоянно движутся
(Броуновское движение)

Уравнение Стокса-Эйнштейна (двумерный случай):

$$\overline{r_{x,y}^2} = \frac{2 k T t}{3 \pi \eta r_{\text{частицы}}}$$

t – время наблюдения

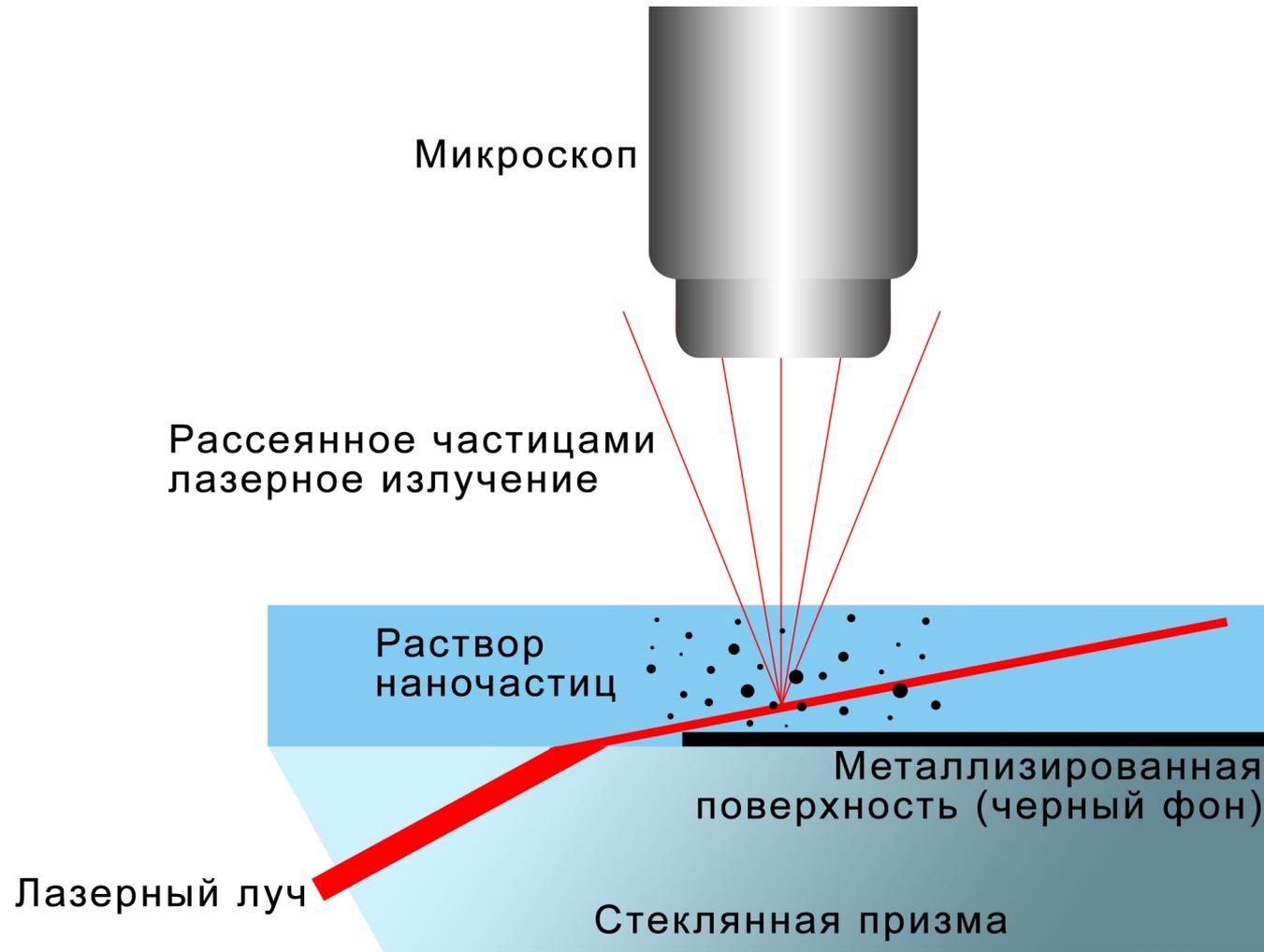
$\overline{r_{x,y}^2}$ – средний квадрат пройденного расстояния за время t

T – температура

η – вязкость растворителя

k – постоянная Больцмана

Анализ траекторий наночастиц: Схема прибора



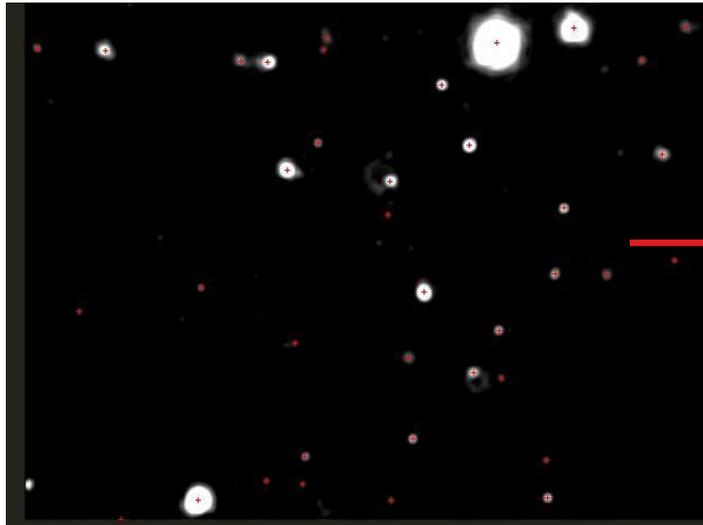
Анализ траекторий наночастиц: Схема прибора



Анализ траекторий наночастиц: Принцип работы

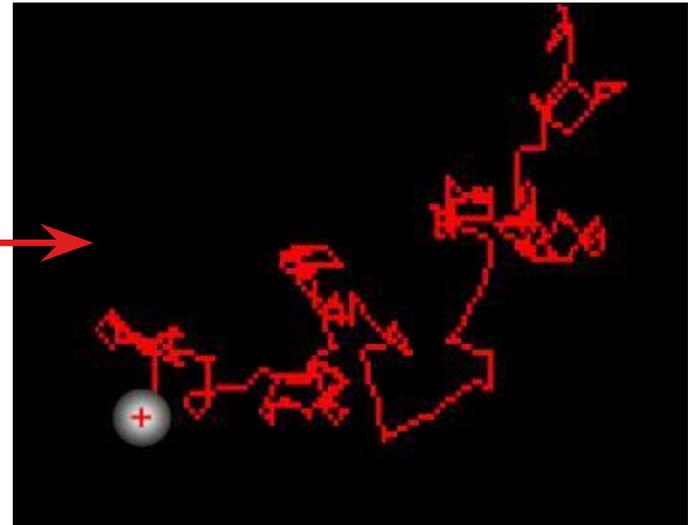


Шаг 1



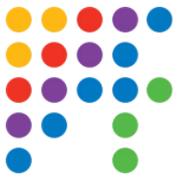
Выделение частиц,
вычисление положения центров

Шаг 2



Составление траекторий
Броуновского движения частиц

Анализ траекторий наночастиц: Принцип работы

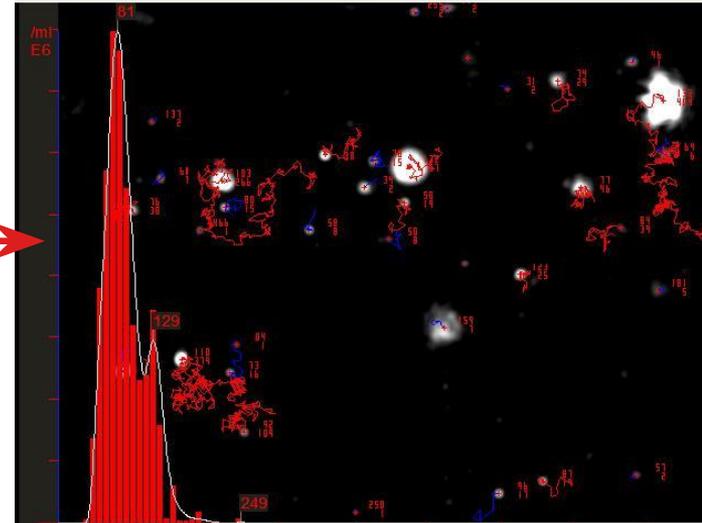


Шаг 3

Шаг 4

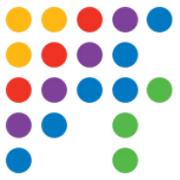
$$\overline{r_{x,y}^2} = \frac{2 k T t}{3 \pi \eta r_{\text{частицы}}}$$

Вычисление гидродинамического
размера частицы

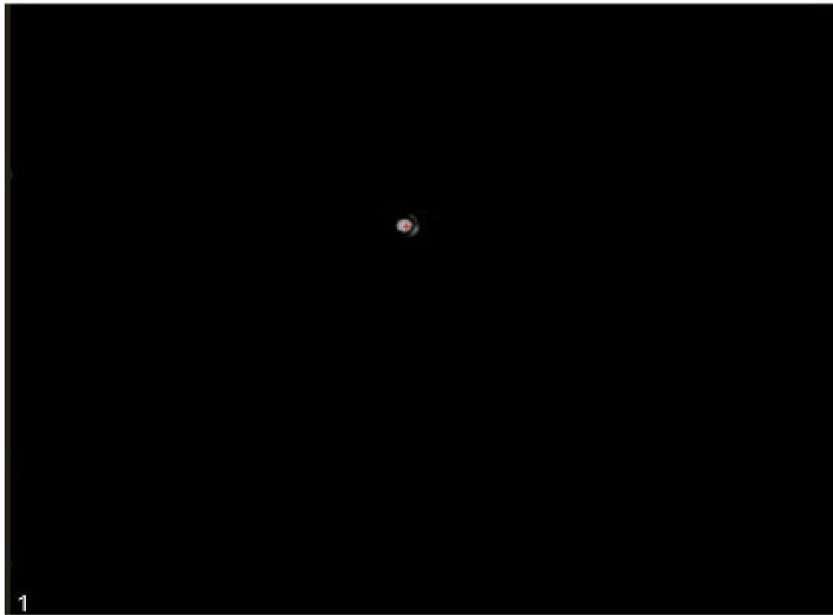


Накопление статистики,
построение гистограммы
распределения по размерам
и концентрации частиц

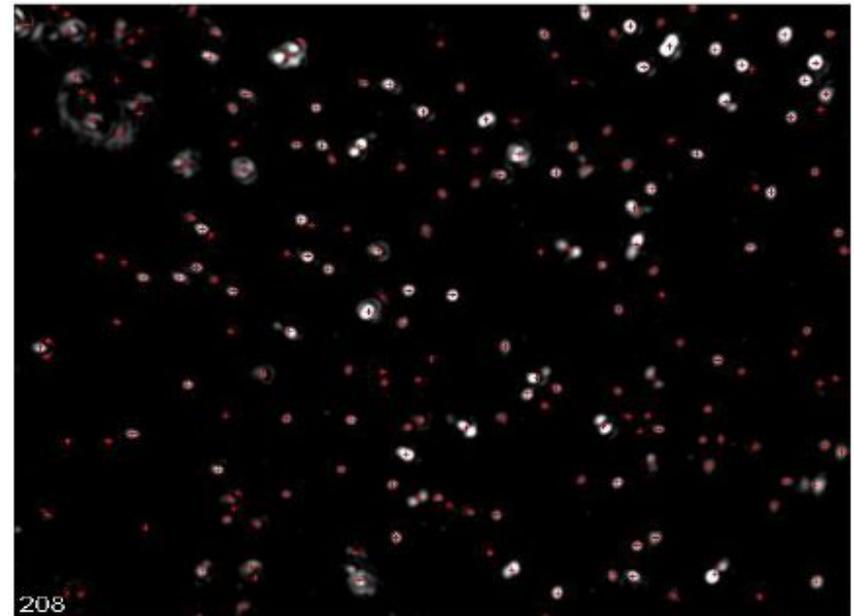
Анализ траекторий наночастиц: Допустимый диапазон концентраций



Диапазон допустимых концентраций: 10^7 – 10^9 частиц/мл

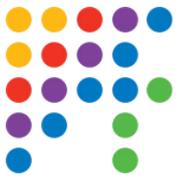


1 частица на кадре



> 200 частиц на кадре

Анализ траекторий наночастиц: Измеряемый диапазон размеров



Диапазон измеряемых размеров зависит от образца:
от 10 нм до 2 мкм

Закон Рэлея:

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6$$

$$I \sim d^6 R_i \quad R_i = \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2$$

Золото: $R_i = 2.78$, нижняя граница ~ 10 нм

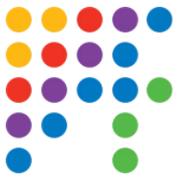
Полистирольный латекс: $R_i = 0.0157$, нижняя граница ~ 25 нм

Анализ траекторий наночастиц: Достоинства



- Наглядность и достоверность. Как минимум, по концентрации. Счетный базис распределения.
- Метод NTA дает более близкое к реальному распределение частиц по размеру, а не эффективное, как в DLS
Возможен анализ как мономодальных систем с узкими пиками, так и сложных полидисперсных систем с близкими по размеру фракциями.
- Не требуется знание коэффициента преломления частиц
- Значительно меньше, чем в DLS, мешающее влияние частиц пыли
- Одновременное измерение как размера, так и концентрации частиц
- Возможность расширенной интерпретации данных

Анализ траекторий наночастиц: Ограничения



- В диапазон измерений (от 10-25 нм) не попадает ряд важных объектов нанотехнологии и биохимии: квантовые точки, малые Au и Ag наночастицы, белковые олигомеры и т.п.
- Необходимость разведения образца
- Также, как и в DLS – эффективный сферический эквивалент