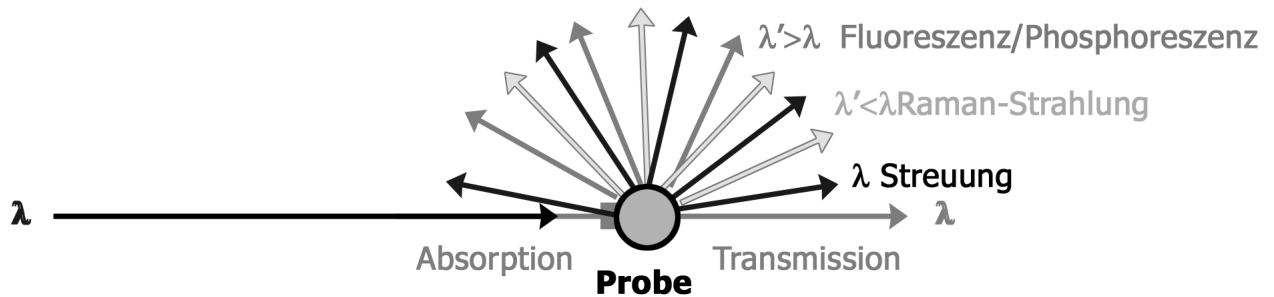


Partikelgrößenbestimmung über Lichtstreuung



Wird eine Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, so führen verschiedene physikalische Prozesse zu verschiedenen Effekten. Ein Teil des Lichts wird absorbiert und ggf. in Form von Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder Raman-Strahlung in alle Raumrichtungen re-emittiert. Diese Phänomene hängen neben Wellenlänge und Konzentration vor allem von den chemischen spektroskopisch-chemischen Eigenschaften der Probe ab. Das wird in der UV-Vis-, IR- und FLEM/FLEX-Spektroskopie ausgenutzt.

Ein weiterer Effekt ist das in alle Richtungen zurückgeworfene Streulicht, dessen Intensität weniger von der chemischen Natur der Probe, sondern (kolligativ) von der Dichte/Konzentration der Teilchen und von ihrer Größe und Form sowie von λ abhängt ($I \sim r^6$ und $I \sim 1/\lambda^4$, nach RAYLEIGH).

Man unterscheidet RAYLEIGH-Streuung ($\lambda > r$) und winkelabhängige MIE-Streuung ($\lambda \approx r$).

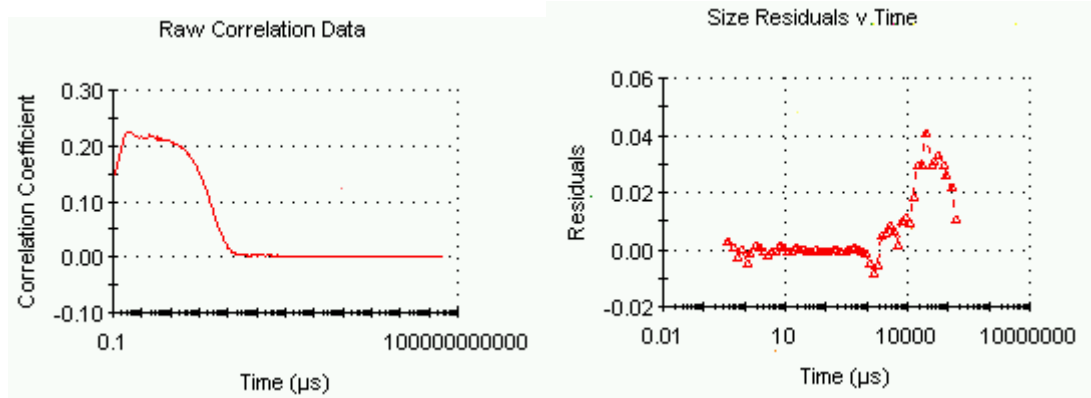
Während das Streulicht bei verdünnten Lösungen kleiner Moleküle vernachlässigbar ist, kann es bei höherer Konzentration und größeren Teilchen (Partikeln) dominieren und führt ggf. sogar zur sichtbaren Trübung. (Man beachte, daß die Unterscheidung zwischen Fluoreszenz und Streulicht problematisch sein kann.) Lösungen von Proteinen, Proteinaggregaten, Polymerpartikeln, Micellen usw. liefern ausreichend Streulicht, um Aussagen über die Größe der Partikel (typischerweise im Bereich von 2-2000 nm) zu treffen.

Statische Lichtstreuung

Faßt man die Lichtstreuung rein physikalisch als einen elastischen Zusammenstoß zwischen einem Partikel und einem Lichtquant auf, so erhält man eine Beziehung, die die Streulichtintensität bzw. die Trübung in Beziehung setzt zur Zahl der streuenden Teilchen, wobei mehr oder größere Teilchen mehr Streulicht liefern. Diese RAYLEIGH-Gleichung berücksichtigt Parameter wie die Polarisierbarkeit der Partikel, die Wellenlänge und Polarisationssebene des einfallenden Lichts usw, führt aber letztendlich bei bekannter Konzentration zu einem Wert für die Partikelmasse M . Die Methode kann zur Größenbestimmung von Proteinen verwendet werden und besteht in der Durchführung prinzipiell aus einer zeitlich gemittelten Messung des Streulichts der Probe.

Dynamische Lichtstreuung

Betrachtet man bei der Messung der Streulichtintensität ein ausreichend kleines Meßfeld und mißt das Streulicht mit einer Zeitauflösung im Mikrosekundenbereich, so wird man Schwankungen feststellen. Denn die Intensität des Streulichts hängt von der Anzahl der Partikel im Meßfeld ab, die aber bei entsprechend kleiner Zeit- und Raumskala auch bei einer homogenen Lösung eine Zufallsgröße ist. Das liegt daran, daß sich durch die BROWN'sche Diffusion alle Teilchen bewegen und so bei einer Messung einmal mehr und einmal weniger Teilchen im Meßfeld erfasst werden. Diese Schwankungen werden bei der DLS in Form einer Kurve ‚Intensität gegen Zeit‘ gemessen. Nun ist die Diffusion aber ein Effekt, der sehr stark von Größe und Beschaffenheit der Teilchen und des Lösungsmittels abhängt. Große Teilchen bewegen sich langsamer und werden deshalb langsamere Fluktuationen bei der Intensitätsmessung erzeugen. Die DLS liefert also im Grunde aus den Schwankungen der Streulichtintensität in einem sehr kleinen Orts- und Zeitabschnitt Aussagen über die Diffusion. Um die Diffusionsgeschwindigkeit (ausgedrückt durch D und gemessen in der Form von mehr oder weniger raschen Intensitätsschwankungen) zu quantifizieren, wird aus der Intensitäts-Zeit-Kurve eine sogenannte Autokorrelationsfunktion erstellt. Eine Korrelationsfunktion von $f(x)$ und $g(x)$ beschreibt die Ähnlichkeit der beiden Funktionen, die maximal 1 und minimal 0 sein kann. Für den Vergleich von $f(x)$ mit $(x + \delta x)$ spricht man von Autokorrelation. Bei der DLS ergibt sich so die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ von $I(t)$ und $I(t + \tau)$. Diesen Rechenschritt erledigt die Elektronik (unten links).



Für die BROWNSche Diffusion liefert die Theorie:

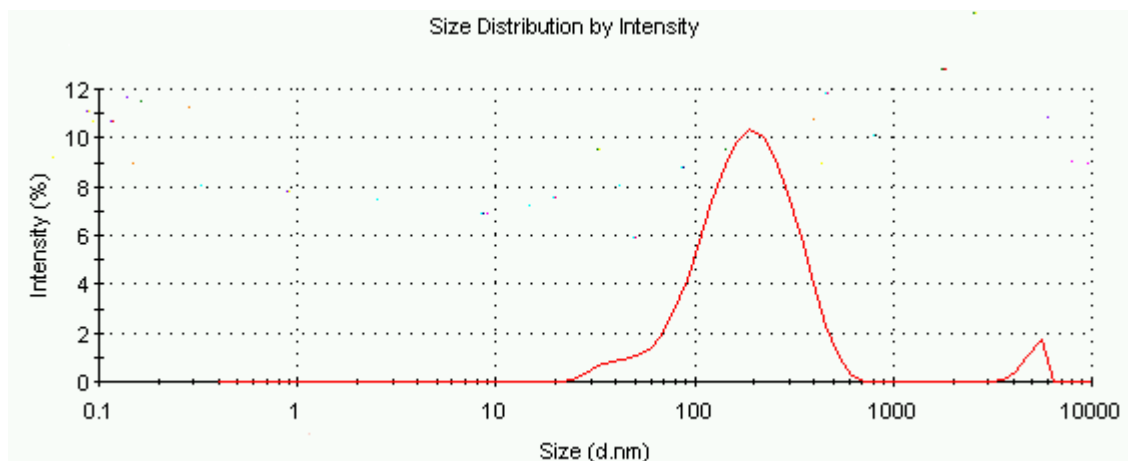
$$G(\tau) = A (1 + B e^{-2\Gamma\tau}) \text{ mit } \Gamma = D (4 \pi n \lambda^{-1} \sin(\theta/2))^2$$

Die Autokorrelationsfunktion aus den Meßdaten wird also durch **eine** entsprechende Exponentialfunktion (Cumulant Fit) angenähert und liefert über D und die STOKES-EINSTEIN-Gleichung

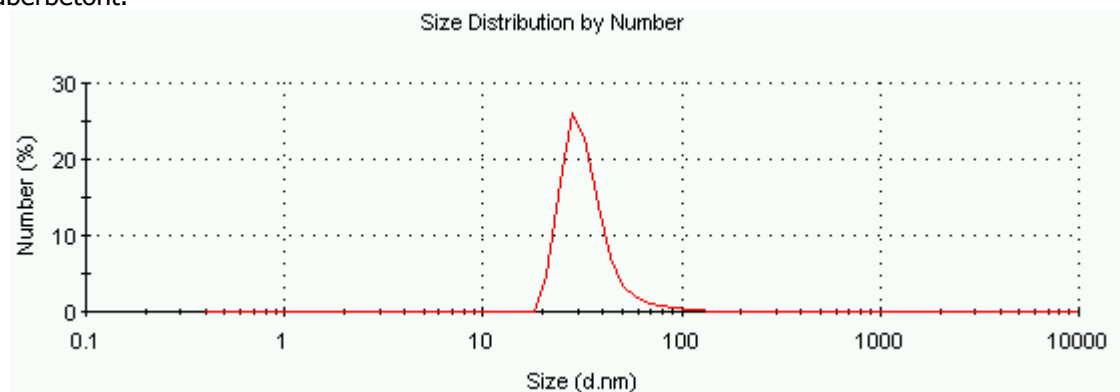
$$6 r \pi \eta D = k T$$

den hydrodynamischen Radius r (Z Average Diameter). Eine Annäherung durch eine **Summe** von e-Funktionen (CONTIN Analysis) liefert eine Größenverteilung (Intensity Distribution). In beiden Fällen müssen der Brechungsindex n und die Viskosität η des Lösungsmittels sowie der Meßwinkel θ und die Temperatur T bekannt sein.

Die Abweichung von den Meßdaten beschreibt die Qualität der Näherung (oben rechts).



Die Größenverteilung nach Intensität (oben) berücksichtigt nicht die Tatsache, daß größere Partikel viel mehr Streulicht liefern als kleine (s.o.). Mit entsprechenden Annahmen über den Brechungsindex der Partikel und die Dichte kann man jedoch eine Verteilung nach der Partikelzahl errechnen, die große Partikel nicht mehr überbetont.



Messung und Berechnung

Probe und Apparatur

Die Probe, die sich in einer Küvette befindet, wird mit einem roten Laser bestrahlt. Das im 180°-Winkel gestreute Licht wird im μs -Bereich vermessen und die Intensität gegen die Zeit aufgetragen.

DLS-Proben müssen frei von Staub und makroskopischen Partikeln (Gelmateriale usw.) und die Küvette muß sehr sauber sein. Die Probe sollte im Idealfall homogen sein und eine ausreichende Konzentration haben, die Schwankungen bei zu kleiner Konzentration durch Zufallseffekte zu hoch und bei zu hoher Konzentration durch statistische Mittelung zu gering werden. Falls Salze, Agenzien oder spezielle Lösungsmittel verwendet werden, ist das später zu berücksichtigen.

Rohdaten

Man erhält zunächst die Intensität/Zeit-Kurve, die einem Rauschen ähnelt.

Zu beachten ist hier nur die y-Achse. Niedrige Intensität/Count Rate deutet auf zu hohe Verdünnung oder zu kleine Partikel hin und macht die Messung unzuverlässig.

Korrelationsfunktion

Das Gerät zeigt als nächstes die Korrelationsfunktion an ($G(\tau)$ gegen τ).

Der Korrelationskoeffizient kann maximal 1 sein für einen Parameter, der zeitlich überhaupt nicht schwankt. Das kommt bei der DLS nicht vor. Umgekehrt würde man eine Nulllinie erhalten, wenn die Schwankungen zu schnell erfolgen; das ist z.B. bei einer Probe reinen Wassers der Fall. In allen übrigen Fällen ist der Wendepunkt der Kurve ausschlaggebend. Erfolgt der Abfall schnell, so liegen kleine Partikel vor; liegt der Wendepunkt weiter rechts, so bedeutet dies langsame Intensitätsschwankungen und damit langsamere Diffusion und größere Partikel.

Ist die Kurve sehr langgezogen und der Übergang unscharf, so deutet dies auf Unzulänglichkeiten bei der Messung hin.

Liegen mehrere diskrete Partikelgrößen vor, so überlagern sich ggf. zwei Kurven, die aber bis zu einem gewissen Grad bei der Berechnung aufgelöst werden können.

Die Abweichung der Ausgleichskurven von den Meßdaten wird ebenfalls ausgegeben. (Size Residuals gegen Zeit).

Die Abweichung sollte im Idealfall 0 sein und liefert ein gutes Kriterium für die Verlässlichkeit der folgenden Auswertung.

Automatische Auswertung

Diese nimmt der Computer anhand der Cumulant Fit-Funktion vor. Man kann auch aus der Korrelationsfunktion selbst den Wendepunkt und daraus die „charakteristische Zeit“ τ_0 bestimmen.

Anzugebende Parameter und Meßergebnisse

Als Meßparameter neben den genauen Daten zur Probe (Puffer, pH-Wert) sollte man angeben:

- Temperatur
- Geräteeinstellungen (Attenuatorposition, Meßwinkel, Focusposition)
- Meßprotokoll (Anzahl der Messungen und Runs)

Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- z-Average Diameter
- Intensitätsverteilung
- Größenverteilung (Number Distribution)
- Mean Count Rate
- ggf. Abweichungskurve.

Literatur

- Website von Malvern Instruments
- Gerätehandbuch
- WINTER R, NOLL F, Methoden der Biophysikalischen Chemie, Kap. IV 2.2