

# Statische und Dynamische Lichtstreuung – Grundlagen und Anwendungen in der Polymer-, Protein- und Nanopartikelanalytik

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

## Einleitung

Im Bereich der Charakterisierung von Polymeren, Biopolymeren, Proteinen und Nanopartikeln haben sich heutzutage zwei Lichtstreuungstechniken kommerziell am Markt etabliert: die Statische Lichtstreuung, meist in der Form der Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS = Multi Angle (Static) Laser Light Scattering) und die Dynamische Lichtstreuung (DLS = Dynamic Light Scattering). Oft wird angenommen dass die Statische Lichtstreuung nur im Batch- bzw. Küvetten-Modus betrieben wird da der Begriff „Statisch“ einen ruhenden Zustand impliziert und die Dynamische Lichtstreuung einen Eluentenfluss benötigt da der Begriff „Dynamisch“ eine Bewegung andeutet. Dem ist natürlich nicht so; beide Methoden können sowohl „Statisch“ im Batch- oder Küvettenmodus wie auch „Dynamisch“ im Flussmodus betrieben werden. Vom apparativen Aufbau her gesehen sind sich die beiden Techniken sehr ähnlich. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Techniken liegt nur in der Verarbeitung der Messdaten. Dies wird im Abschnitt „Prinzip der Statischen und Dynamischen Lichtstreuung“ näher erläutert. Zunächst soll aber die Streulichtverteilung von Molekülen und Partikeln betrachtet werden.

## Streulichtverteilung von kleinen und großen Makromolekülen und Nanopartikeln

Die Verteilung des von einem Molekül oder Partikel gestreuten Lichtes in die verschiedenen Raumrichtungen hängt davon ab wie groß das Probeneteilchen ist (Abb.1). Bewegt man sich im Bereich der so genannten Rayleigh-Lichtstreuung (nach John William Strutt, 3. Baron Rayleigh, 1842-1919, englischer Physiker, Nobelpreis 1904), dann ist die Streulichtverteilung bei einem Probeneteilchen, das einen Durchmesser hat der kleiner ist als  $1/20$  der Laserwellenlänge, isotrop, d. h. das Licht wird von dem Teilchen in alle Raumrichtungen gleichmäßig gestreut.

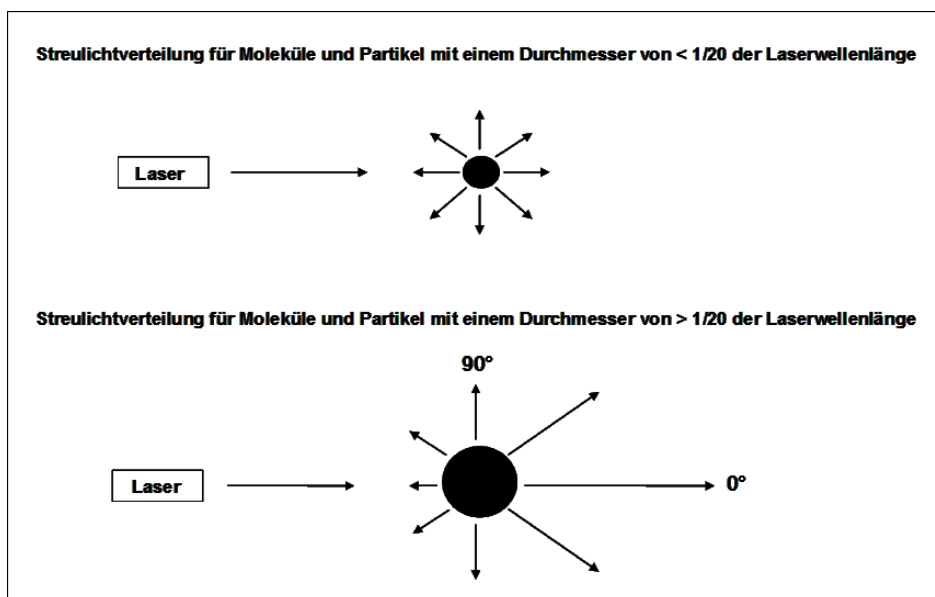


Abb. 1: Rayleigh-Streulichtverteilung bei kleinen und bei großen Makromolekülen und Nanopartikeln

Ein Durchmesser von  $1/20$  der Laserwellenlänge bedeutet bei einem roten Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm einen Durchmesser von ca. 30 nm und somit einen Radius von ca. 15 nm.

Bei einem Probeneteilchen das einen Durchmesser hat der größer ist als  $1/20$  der Laserwellenlänge, wird das Licht mit zunehmender Größe des Teilchens immer stärker in die Vorwärtsrichtung, also in Richtung des  $0^\circ$ -Winkels, gestreut. Dies gilt bis zu einer Teilchengröße, die in etwa der Laserwellenlänge entspricht. Werden die Probeneteilchen noch größer, dann ergeben sich Maxima und Minima in der räumlichen Streulichtverteilung. Man verlässt hierbei den Bereich in dem die Rayleigh-Theorie gültig ist und muss nun die Streulichtverteilung mit der Mie-Theorie (nach Gustav Adolf Feodor Wilhelm Ludwig Mie; 1886-1957, deutscher Physiker, Rektor der Universität Greifswald und später Direktor des Physikalischen Institutes an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) beschreiben.

## Prinzip der Statischen und Dynamischen Lichtstreuung

Bei beiden Techniken wird die Probe, die sich entweder statisch in einer Küvette befindet oder im Bereich der Chromatographie eine Durchflussküvette bzw. Messzelle durchläuft, mit einem Laserstrahl beleuchtet. Das von der Probe gestreute Licht wird in einem oder mehreren Winkeln von Messdioden aufgezeichnet. Meist werden hochempfindliche Avalanche-Photodioden (APD) zur Messung des Streulichtes verwendet, da das von der Probe gestreute Licht eine sehr geringe Intensität hat und die APD einen lichtverstärkenden Effekt aufweist. Dabei erzeugt ein einfallendes Photon quasi eine Lawine von Sekundärelektronen; von diesem Phänomen rührt die Bezeichnung Avalanche-Photodiode her (Avalanche: franz. und engl. für Lawine).

Während im Fall der Statischen Lichtstreuung eine eher geringe Zahl an Messdaten erfasst wird (typischerweise maximal 5-10 Messdaten pro Sekunde) werden bei der Dynamischen

schen Lichtstreuung die Messdaten sehr schnell im Mikrosekundenbereich aufgezeichnet. Bei der Statischen Lichtstreuung wird das erfasste Streulichtsignal (z. B. in mV) direkt über der Zeitachse dargestellt, bei der Dynamischen Lichtstreuung hingegen wird aus den in sehr kurzen Zeitabständen erfassten Messdaten eine mathematische Korrelationsfunktion berechnet; siehe Abbildung 2 und Gleichung [1].

### Dynamische Lichtstreuung

Berechnung der Korrelationsfunktion aus den in sehr kurzen Zeitabständen erfassten Messdaten:

[1]

$$g_2(t) = Ae^{-2\Gamma t} + 1$$

mit  $\Gamma = D_t q^2$

$D_t$  = Diffusionskoeffizient

Aus dem Diffusionskoeffizienten  $D_t$  kann nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung [2]) der **hydrodynamische Radius** einer Probe berechnet werden:

[2]

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

$k$  = Boltzmann-Konstante

$T$  = Temperatur

$\eta$  = Viskosität des

Lösungsmittels

$R_h$  = hydrodynamischer Radius

Weisen alle Bestandteile einer Probe die gleiche Größe auf wie das z. B. bei einer monodispersen Proteinprobe der Fall ist, dann zeigt die Korrelationsfunktion einen exponentiellen Verlauf erster Ordnung; je länger die Korrelationsfunktion benötigt um auf Null abzusinken desto größer ist der Durchmesser der Probenmoleküle.

Sind in der Probe Moleküle oder Partikel mit unterschiedlichen Größen enthalten dann folgt der Verlauf der Korrelationsfunktion nicht mehr einem exponentiellen Verlauf erster Ordnung; die Korrelationsfunktion setzt sich nun aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Exponentialfunktionen zusammen von denen quasi jede einer Molekül- oder Partikelgröße entspricht. Nun wird ein so genannter Regularisierungsalgorithmus (Gleichung [3]) verwendet um den besten Satz von einzelnen Exponentialfunktionen zu bestimmen, der benötigt wird um die komplexe Korrelationsfunktion bestmöglich zu beschreiben.

Aus den berechneten individuellen Exponentialfunktionen kann dann die Größenverteilung

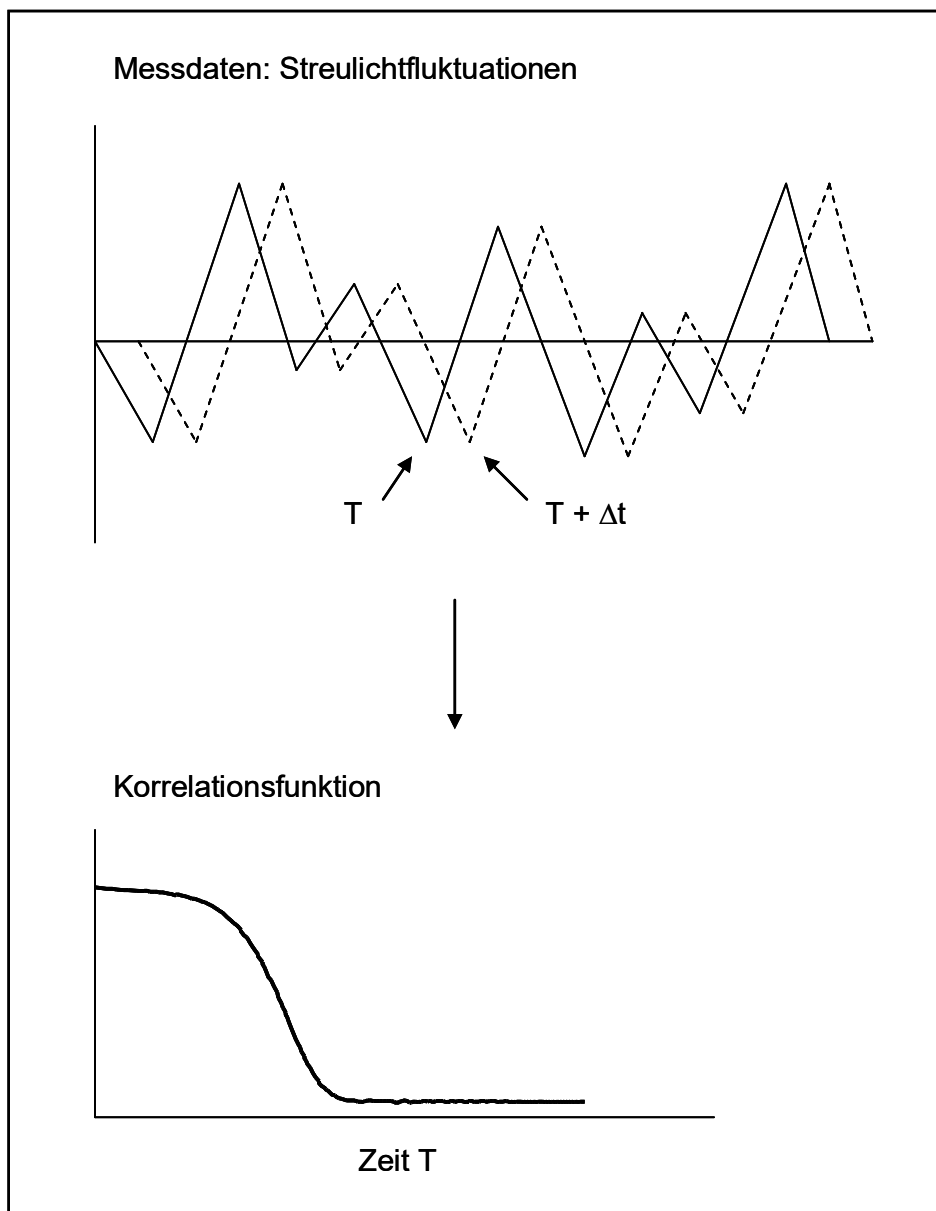


Abb. 2: Auswertung der Messdaten im Fall der dynamischen Lichtstreuung

$$[3] \quad g_2(t) - 1 = A_1 e^{-2\Gamma_1 t} + A_2 e^{-2\Gamma_2 t} + A_3 e^{-2\Gamma_3 t} + \dots + A_n e^{-2\Gamma_n t}$$

lung der in der Probe vorhandenen Moleküle oder Partikel bestimmt werden.

Ein wesentlicher Vorteil der Dynamischen Lichtstreuung ist die Tatsache dass zur Bestimmung der Molekül- und Partikelgröße keine Informationen über die Probe benötigt werden; es müssen lediglich der Brechungsindex sowie die Viskosität des verwendeten Lösungs- oder Dispergiemittels bekannt sein. Außerdem muss ein DLS-Instrument vom Anwender nicht kalibriert werden.

### Statische Lichtstreuung

Ein Instrument für die Statische Lichtstreuung muss hingegen mit einem Standard mit bekanntem Molekulargewicht oder bekanntem Rayleigh-Streulichtverhältnis kalibriert wer-

den. Meist werden entweder eng verteilte Polymer-, Biopolymer- und Proteinstandards oder auch Toluol als Kalibrierstandards verwendet. Damit man im Fall der Statischen Lichtstreuung aus der Fläche des Streulichtsignals das Molekulargewicht einer Probe bestimmen kann müssen die Konzentration der Probe sowie deren Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ -Wert) bekannt sein.

Die Unsymmetrie bzw. Winkelabhängigkeit der Streulichtverteilung von Teilchen  $> 1/20$  der Laserwellenlänge verwendet man im Bereich der Statischen Lichtstreuung (MALS). Dabei kann man durch Extrapolation der Messwinkelsignale auf den messtechnisch nicht zugänglichen Winkel von Null Grad das absolute Molekulargewicht der Probe bestimmen. Darüber hinaus kann aus

der Anfangssteigung der winkelabhängigen Streulichtverteilung der Trägheitsradius von Probeteilchen ermittelt werden (Abbildung 3).

### Anwendungsgebiete der Statischen und Dynamischen Lichtstreuung

Sowohl für die Statische wie auch die Dynamische Lichtstreuung gilt die Faustregel dass ein 10-fach größeres Molekül oder Partikel ca. eine Million Mal mehr Licht streut. Daher ist die Lichtstreuung sehr gut geeignet um wenige große Teilchen bzw. Moleküle neben einer großen Zahl an kleinen Teilchen bzw. Molekülen zu bestimmen.

### Dynamische Lichtstreuung

Die DLS wird sehr oft im pharmazeutischen Bereich als Küvettenmethode (Batch-Modus) angewendet um z. B. zu prüfen ob ein Protein- oder Antikörpermolekül in Lösung als reines Monomer vorliegt oder ob ein ggf. geringer Anteil an hochmolekularen Aggregaten vorhanden ist die eventuell die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Pharmazeutika beeinträchtigen könnten.

Weiterhin wird sie als Standardmethode zur Bestimmung der Größe von Nanopartikeln aller Art verwendet (ebenfalls überwiegend im Batch-Modus).

Seltener hingegen findet ein DLS-Gerät Anwendung als Durchflussdetektor in der Chromatographie oder der Feld-Fluss-Fraktionierung. Das liegt zum einen daran dass die Messzeiten zur Aufnahme einer gemittelten Korrelationsfunktion relativ lange sind (ca. 3 Sekunden als Mindestmessdauer für einen Messpunkt) und somit nur ein sehr geringer chromatographischer Fluss verwendet werden kann. Dieser liegt typischerweise bei 0,5 ml/min oder geringer. Außerdem sind die Flusszellen der meisten am Markt verfügbaren DLS-Geräte nicht für eine Durchflussmessung optimiert, da die Geräte überwiegend im Batch-Modus verwendet werden. Man verwendet meist eine herkömmliche Durchflussküvette mit einem recht großen Volumen, was zu einer starken Peakverbreiterung und somit einer starken Verdünnung der Probe führt. Daher müssen relative hohe Probenkonzentrationen verwendet werden um mit einem DLS-Gerät im Durchfluss einen auswertbaren Peak erhalten zu können.

Die obere Grenze hinsichtlich der messbaren Größe von Molekülen und Partikeln mit der DLS ist dann erreicht, wenn die Probe beginnt zu sedimentieren. Die Sedimentationsbewegung überlagert die Brown'sche Molekularbewegung der Probeteilchen und macht eine Größenbestimmung somit unmöglich. Ab welcher Größe Partikel beginnen

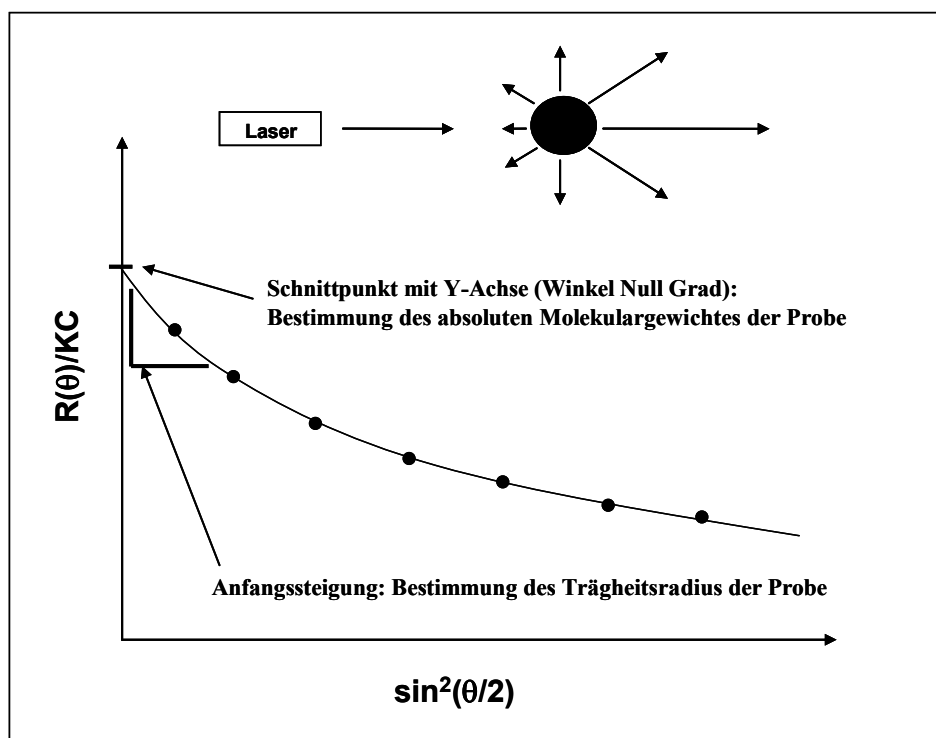


Abb.3: Bestimmung des Molekulargewichtes und des Trägheitsradius einer Probe mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS)

zu sedimentieren hängt natürlich stark von der Dichte der Probeteilchen ab. Bei metallischen Partikeln mit hoher Dichte beginnt die Sedimentation wesentlich früher als z. B. bei Latexpartikeln. Allgemein lässt sich sagen dass die Sedimentation bei den meisten Proben im Größenbereich von ca. 500 nm bis 1 µm beginnt.

### Statische Lichtstreuung

Die Statische Lichtstreuung ist sehr weit verbreitet; sie wird sowohl in der Polymerchemie als auch in der Pharmazie und der Nanotechnologie verwendet. Sie wird im Batch-Modus mit so genannten Goniometer-Systemen eingesetzt und sehr viel häufiger als Durchflusstechnik mit MALS-Detektoren. Die Anzahl der Messwinkel in kommerziell erhältlichen MALS-Detektoren variiert im Bereich von minimal 2 Winkeln bis maximal 21 Winkel. Da ein mathematischer Fit durch die Signale der einzelnen Messwinkel gelegt wird, ist die Qualität der Resultate, die mit einem MALS-Detektor erzielt werden können, am besten wenn der MALS-Detektor über eine möglichst große Anzahl an Messwinkeln verfügt.

In der Polymerchemie wird der MALS-Detektor zur Bestimmung der absoluten Molekulargewichte von Polymerproben und deren Trägheitsradien in Lösung verwendet.

Eine ähnliche Aufgabe erfüllt die SEC-MALS Technologie im pharmazeutischen Bereich, wobei hier auch die Überprüfung von biologi-

schen Proben wie z. B. Proteinen auf das Vorhandensein von hochmolekularen Proteinaggregaten eine wesentliche Aufgabe darstellt.

Im Bereich der Nanotechnologie wird der MALS-Detektor verwendet um die absoluten Größen von Nanopartikeln zu bestimmen die zuvor z. B. mittels einer Feld-Fluss-Fraktionierungsanlage aufgetrennt wurden. Anzumerken ist hier dass die Statische Lichtstreuung aus physikalischen Gründen den Trägheitsradius eines Partikels bestimmt, während die Dynamische Lichtstreuung den hydrodynamischen Radius eines Partikels misst. Im Fall eines kugelförmigen Partikels unterschieden sich diese Radien um den Faktor 0,775 (ein kugelförmiges Teilchen mit einem hydrodynamischen Radius von 100 nm hat einen Trägheitsradius von 77,5 nm). Für Partikelformen, welche von der Kugelform abweichen, gelten andere Faktoren.

Wichtig ist auch zu wissen dass die Statische Lichtstreuung nur begrenzt in der Lage ist die Größen von metallischen Nanopartikeln wie z. B. Gold- und Silberpartikeln zu messen; hier tritt durch die Bestrahlung der Partikel mit Laserlicht neben der reinen Streuung ein weiterer Effekt auf, der als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet wird (SPR = Surface Plasmon Resonance). Dieser Effekt führt dazu dass eine undefinierte zusätzliche Menge an Streustrahlung erzeugt wird, die nicht größenabhängig ist. Somit werden zwar Messsignale erhalten, diese korrelieren aber

nicht mit der Größe der Partikel. Derartige metallische Partikel können sehr viel zuverlässiger mit der Dynamischen Lichtstreuung vermessen werden da hier die absolute Menge an Streulicht keine Rolle spielt sondern nur die Streulichtfluktuationen.

#### **Fazit**

Sowohl die Statische Lichtstreuung als auch die Dynamische Lichtstreuung haben sich im Markt etabliert. Die Statische Lichtstreuung hat sich in Form von Durchflussdetektoren in der Chromatographie und der Feld-Fluss-Fraktionierung durchgesetzt (MALS-Detektoren), während die Dynamische Lichtstreuung überwiegend im Batch-Modus als Küvettengerät verwendet wird. Die kommerziell verfügbaren Geräte sind meist einfach zu handhaben.

Der Anwender sollte sich aber vor der Anschaffung eines Lichtstreugerätes genau fragen welche Informationen er mit dem

Gerät ermitteln will (Trägheitsradien oder hydrodynamische Radien, Molekulargewichte, Bestimmung von Proteinaggregaten, ...) und welche Art von Proben er vermessen möchte, da bestimmte Arten von Proben und bestimmte Informationen bzw. gewünschte Ergebnisse den jeweiligen Geräten ggf. nicht zugänglich sind. So kann z. B. die Statische Lichtstreuung aus physikalischen Gründen nur Trägheitsradien von Proben bestimmen, während die Dynamische Lichtstreuung nur hydrodynamische Radien bestimmen kann. Je nach Art der Probe unterscheiden sich diese Radien erheblich. Weiterhin kann die Statische Lichtstreuung nur begrenzt die Größen von metallischen Nanopartikeln bestimmen da hier der Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz das Ergebnis zum Teil verfälscht, während dieser Effekt bei der Dynamischen Lichtstreuung kein Problem darstellt.