

Skripta iz predmeta Biofizička hemija 1

3

Dinamičko rasejanje svetlosti
DLS, *Dynamic Light Scattering*

Ana Popović Bijelić

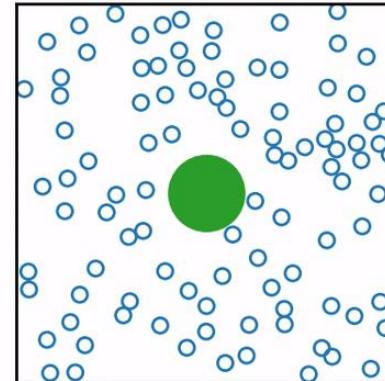
2023.

Citirati kao:

Ana Popović Bijelić, Skripta iz Biofizičke hemije 1, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2023.

Dinamičko rasejanje svetlosti - osnovno

- Drugi nazivi za DLS su: Fotonska korelaciona spektroskopija (*Photon Correlation Spectroscopy*) i Kvazi-elastično rasejanje svetlosti (*Quasi-Elastic Light Scattering*).
 - **Osnovna primena DLS-a je za određivanje veličine (1 nm - 10 μm) i zeta potencijala čestica u suspenzijama.**
 - Takođe se koristi za određivanje elektroforetske mobilnosti i izoelektrične tačke, kao i za aproksimaciju mase makromolekula.
 - DLS uređaj se zove **zetasizer**.
-
- Princip merenja se zasniva na fenomenu **Braunovog kretanja** čestica u suspenziji:
dispergovane čestice se sudaraju sa molekulima **dispersanta** i kreću se stohastičnom (nasumičnom) putanjom i rasejavaju svetlost.



- Na brzinu Braunovog kretanja čestice utiče **masa (veličina)**, pa se zato veće čestice kreću sporije od manjih.
- Braunovo kretanje takođe zavisi od **viskoznosti dispersanta** (tečnost u kojoj se nalazi dispergovana čestica), a viskoznost zavisi od temperature. Temperatura u toku DLS merenja mora da bude konstantna.
- Brzina Braunovog kretanja se može opisati **translacionim difuzionim koeficijentom (D)**.

Važno za fizikohemičara: kod DLS-a, rasejano zračenje ima istu λ kao upadno zračenje – elastično rasejanje.

Rayleigh-ovo rasejanje je takođe elastično.

Ramansko rasejanje je neelastično, λ rasejane svetlosti je različita od λ upadne.

DLS – princip merenja

Ukratko:

1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, $\lambda = 633 \text{ nm}$) pada na uzorak (suspenziju).
2. Čestice u suspenziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljuju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

- 
2. Čestice u suspenziji rasejavaju deo zračenja. Kako rasejavaju?

To zavisi od dimenzija čestica.

Rejlijevo rasejanje: ako su dimenzije čestica $< \frac{\lambda}{10}$, konkretno za 633 nm laser ako su manje od 60 nm, rasejano zračenje će biti izotropno (isto u svim smerovima).

Mieovo rasejanje: ako su dimenzije čestica $>> \frac{\lambda}{10}$, konkretno za 633 nm laser ako su reda veličine 600 nm, rasejano zračenje će biti anizotropno. (Matematički opis Mieove mape rasejanja svetlosti je kompleksan i ovde se neće razmatrati).

Rejlijevo rasejanje

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

θ - ugao rasejanja, I_0 - intenzitet upadnog zračenja, R - rastojanje između čestice i detektora
 λ - talasna dužina zračenja, n - indeks prelamanja sredine (dispersanta) i d - dijametar čestice.

Iz gornje jednačine koja povezuje intenzitet rasejanog zračenja, talasnu dužinu upadnog zračenja i dimenzije čestica se vidi da je $I \sim \lambda^{-4}$ i $I \sim d^6$.

Ovde je važno zapamtiti da postoje $I \sim d^6$, intenzitet rasejanog zračenja na česticama dijametra **50 nm** će biti **10^6 puta veći** od intenziteta rasejanog zračenja na česticama dijametra **5 nm**.

Takođe treba primetiti da za DLS merenje nije baš idealno ako imamo **smešu čestica različitih veličina**, npr. 50 nm i 1000 nm, jer će doprinos ukupnom izmerenom intenzitetu rasejane svetlosti koji potiče od rasejavanja na česticama od 50 nm biti izuzetno mali u odnosu na doprinos od rasejavanja na česticama od 1000 nm (drugim rečima nije moguće dobiti dobre DLS rezultate ako su uzorci polidisperzni, videti str. 17 za detalje).

DLS – princip merenja

1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, $\lambda = 633$ nm) pada na uzorak (suspenziju).
2. Čestice u suspenziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljuju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

3. Javljuju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.

Ovo znači da brzina kojom se menja intenzitet rasute svetlosti (fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti) zavisi od brzine difundovanja čestica. Pri manjim dimenzijama čestice, fluktuacije intenziteta su veće, jer je brže Braunovo kretanje.

- **DLS meri** fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti u vremenu (promenu intenziteta rasejane svetlosti u vremenu).
- Korišćenjem tzv. autokorelace ione funkcije **DLS računa** promenu korelacionog koeficijenta u vremenu koji govori o brzini fluktuacije intenziteta rasute svetlosti.
- Iz toga **DLS računa** translacioni difuzioni koeficijent.
- Zatim korišćenjem Stokes-Einstein-ove jednačine **DLS računa** hidrodinamički radijus čestice koji je mera veličine čestice.

DLS određuje translacioni difuzioni koeficijent (D) i korišćenjem *Stokes-Einstein-ove jednačine* računa hidrodinamički radijus čestice (R_h) koji je mera veličine čestice:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

R_h – hidrodinamički radijus [m]

k_B – Boltzmann-ova konstanta = $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$

T – apsolutna temperatura [K]

η – viskoznost [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] tj. [Pa·s], u praksi obično [cP], $1 \text{ cP} = 0,001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$

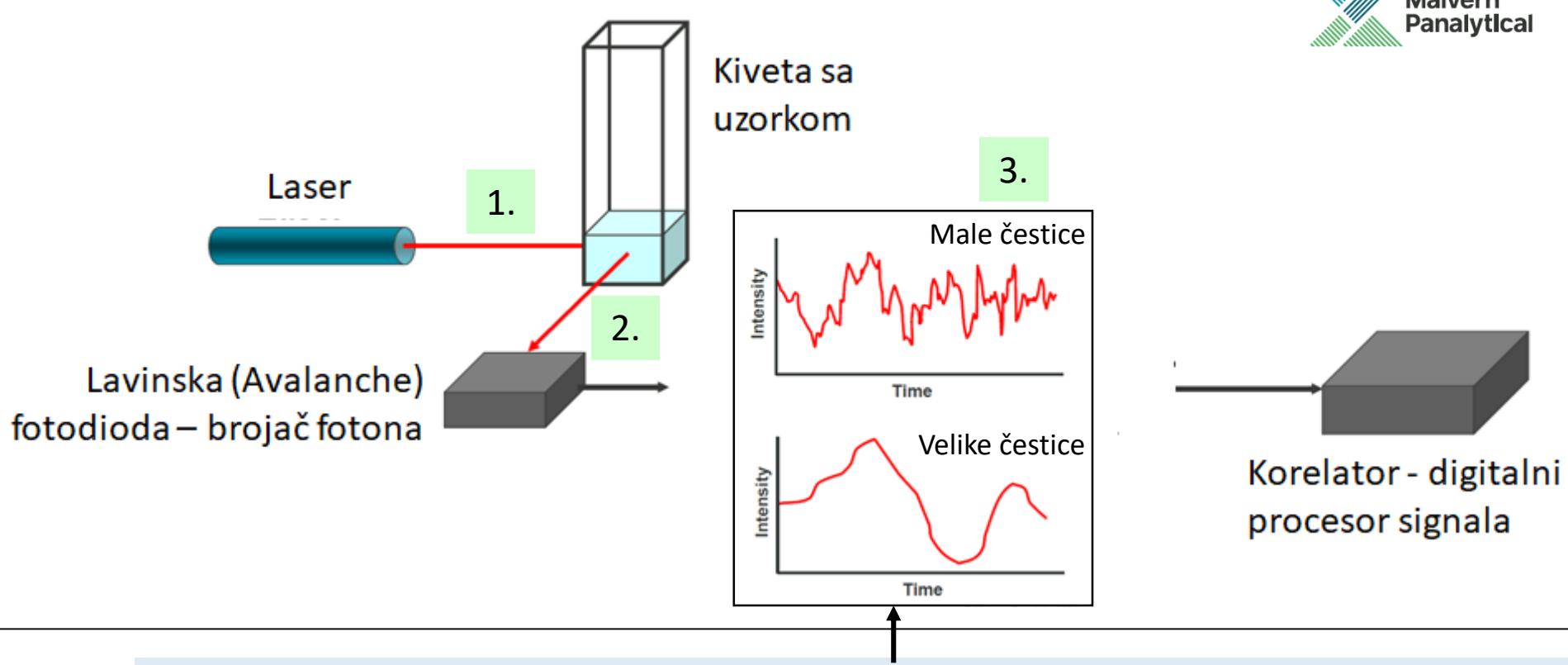
D – translacioni difuzioni koeficijent [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], u praksi obično [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

Definicija na kojoj se zasniva DLS merenje:

Hidrodinamički radijus čestice predstavlja radijus sfere koja ima isti translacioni difuzioni koeficijent kao čestica.

DLS – princip merenja

1. Intenzivno lasersko zračenje (HeNe laser, $\lambda = 633$ nm) pada na uzorak (suspenzija).
2. Čestice u suspenziji rasejavaju deo zračenja.
3. Javljuju se različite fluktuacije intenziteta rasejanog zračenja u zavisnosti od veličine čestica.



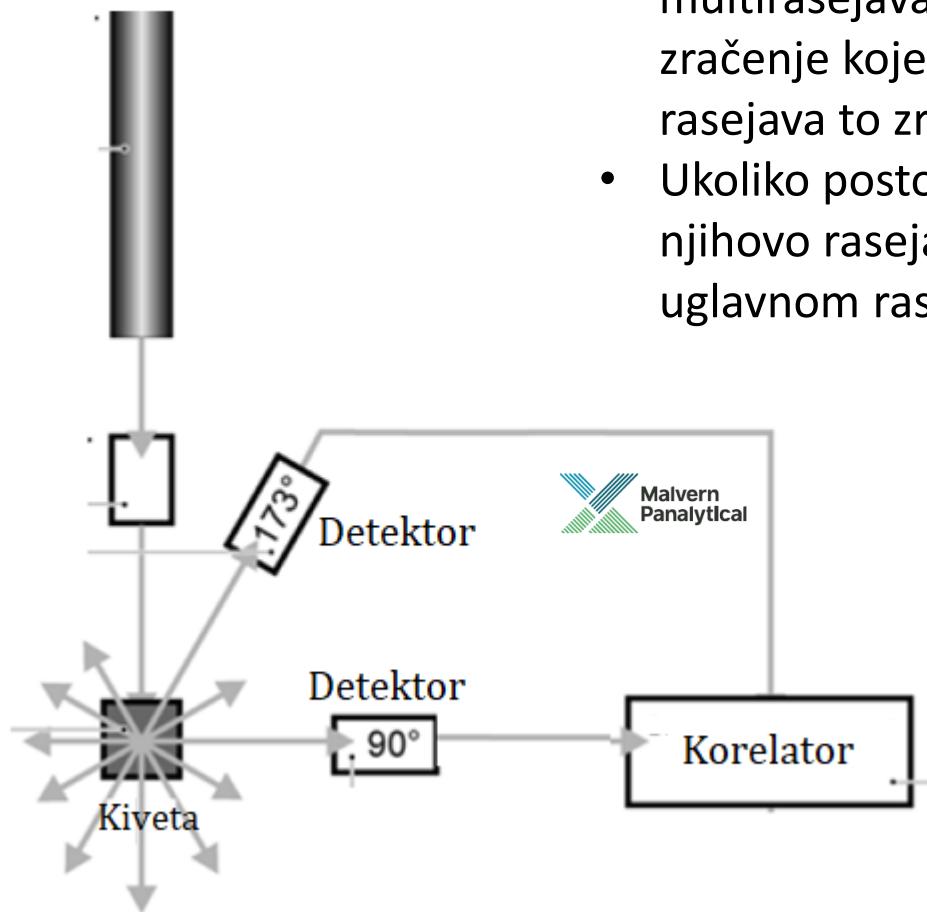
Prikaz neobrađenog signala. Ovo je ono što uređaj meri - fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti u vremenu. Prikazani su karakteristični signali za male i velike čestice.

DLS – 173° detektor

Zetasizeri imaju detektore na **13°, 90° i 173°**

Prednosti detekcije na 173° (tzv. „*backscatter*“ detekcija):

- Laser ne prolazi kroz ceo uzorak, smanjuje se efekat multirasejavanja koji se javlja kada jedna čestica raseje zračenje koje onda pada na drugu česticu koja ponovo rasejava to zračenje.
- Ukoliko postoje veće čestice u uzorku, agregati ili prašina, njihovo rasejavanje neće biti detektovano jer velike čestice uglavnom rasejavaju svetlost ka napred.



Autokorelaciona funkcija - $G(\tau)$

Primenom autokorelace funkcije se od neobrađenog DLS signala dobija korelogram.

$$G(\tau) = \left\langle \frac{I(t) * I(t + \tau)}{I(t)^2} \right\rangle$$

I – intenzitet rasejane svetlosti

t – vreme

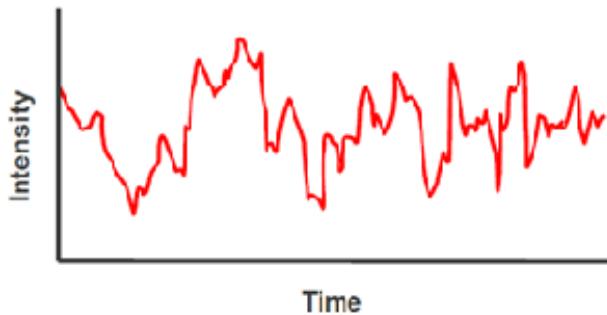
τ – vremensko kašnjenje korelatora

Autokorelaciona funkcija (sinonimi autokorelator, komparator) govori o tome koliko dato stanje sistema (ili signal) liči na stanje sistema (odnosno signal) u prethodnom trenutku merenja.

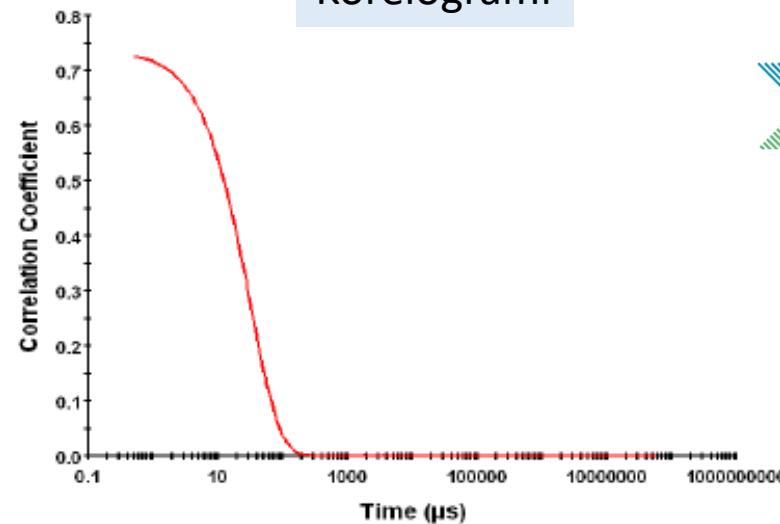
Autokorelaciona funkcija - koreogram

Neobrađeni signali sa detektora

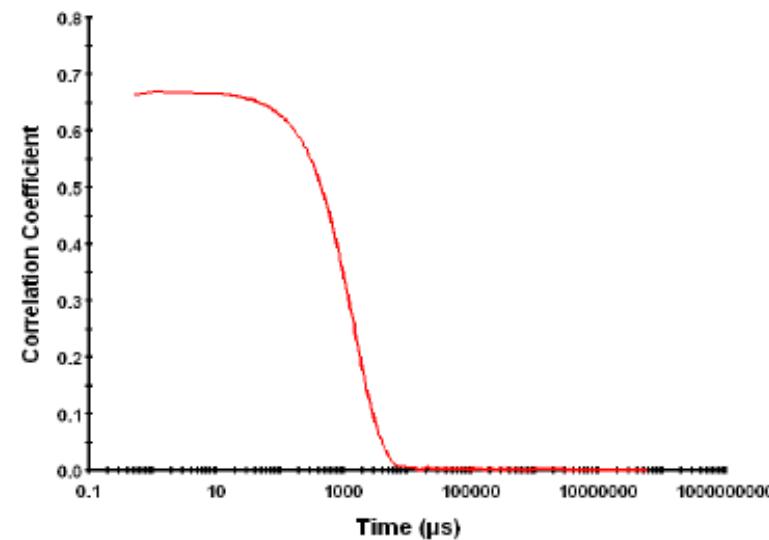
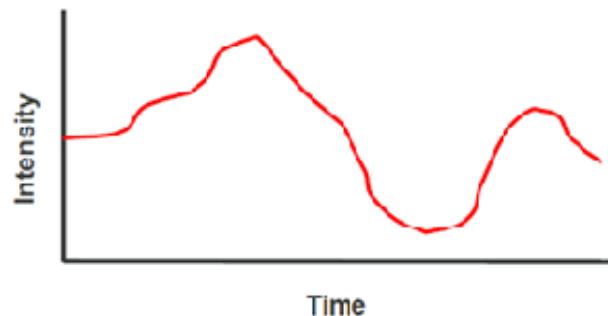
Male čestice



Koreogrami



Velike čestice



Analiza korelograma – dobijanje D i R_h

Dobijeni koreogram se fituje eksponencijalnom funkcijom prikazanom niže, odakle se iz eksponencijalnog člana dobija vrednost **translacionog difuzionog koeficijenta (D)**, koja dalje uvršćavanjem u *Stokes-Einstein*-ovu jednačinu daje konačan rezultat DLS merenja, a to je hidrodinamički radius, **R_h**.

$$G(\tau) = B + A \Sigma e^{-2q^2 D \tau}$$

B – bazna linija

A – amplituda

q – vektor rasejavanja, $q = (4\pi n/\lambda_0) \sin(\theta/2)$

n – indeks prelamanja dispersanta

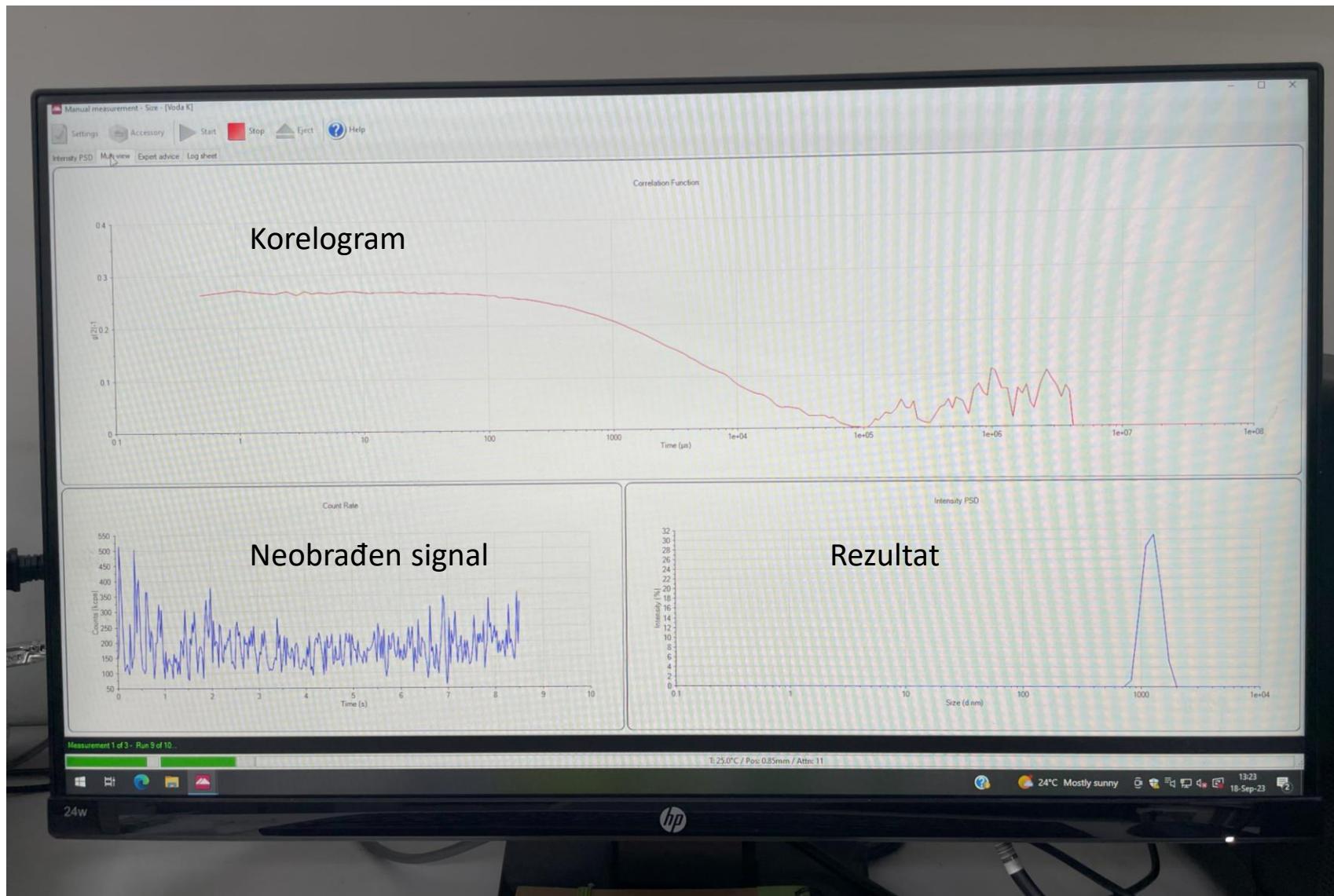
λ_0 – talasna dužina lasera

θ – ugao detekcije

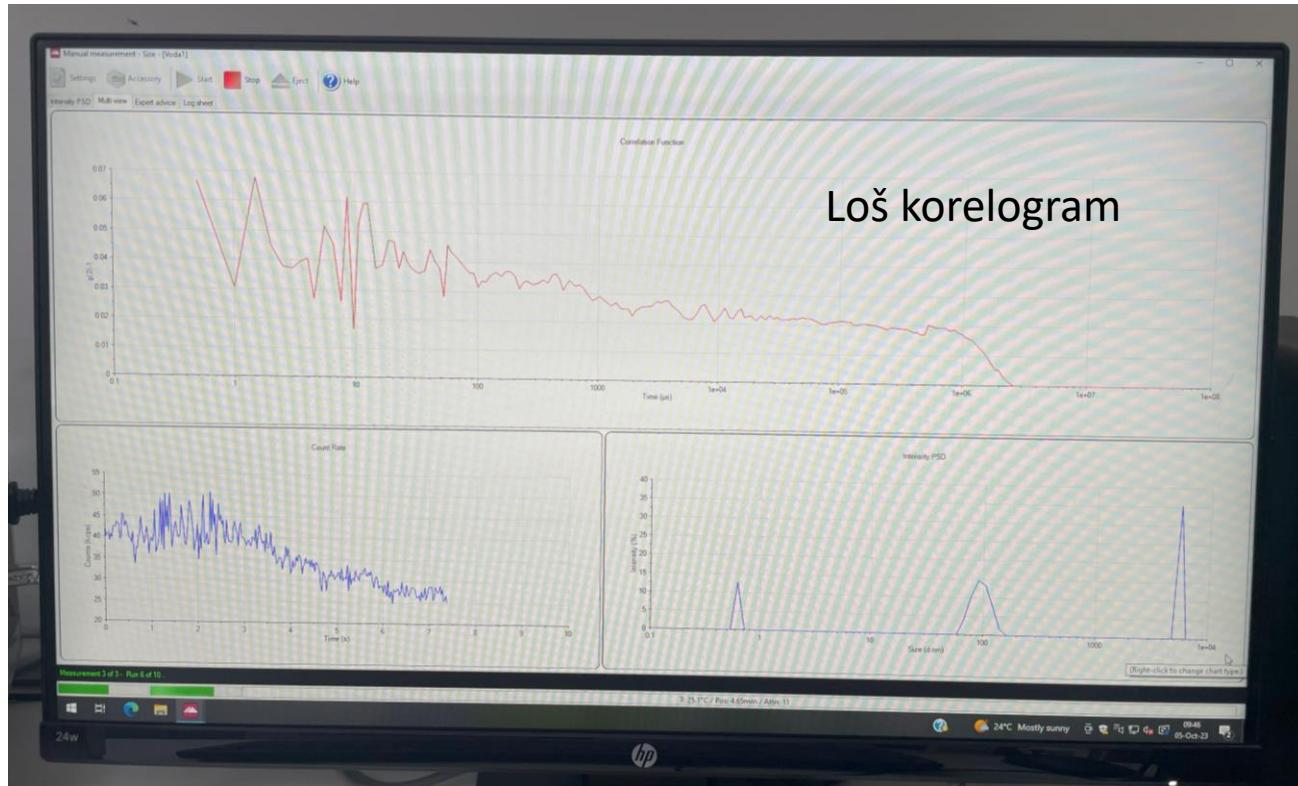
D – translacioni difuzioni koeficijent

τ – vremensko kašnjenje korelatora

Neobrađeni signal sa detektora, korelogram i konačan rezultat DLS merenja tj. raspodela veličina čestica se mogu posmatrati u realnom vremenu u toku DLS merenja:

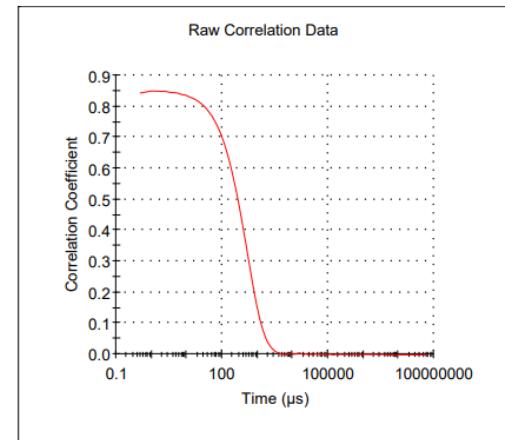


To znači da već u toku DLS merenja posmatranjem samo neobrađenog signala i korelograma može da se zaključi da **rezultat neće biti dobar** jer se radi npr. o veoma polidisperznom uzorku, ili je koncentracija uzorka prevelika ili premala, ili uzorak apsorbuje itd. Primer lošeg koreograma zbog visoke polidisperznosti uzorka je prikazan niže. Ovakav rezultat odmah treba odbaciti kao **nepouzdani**!

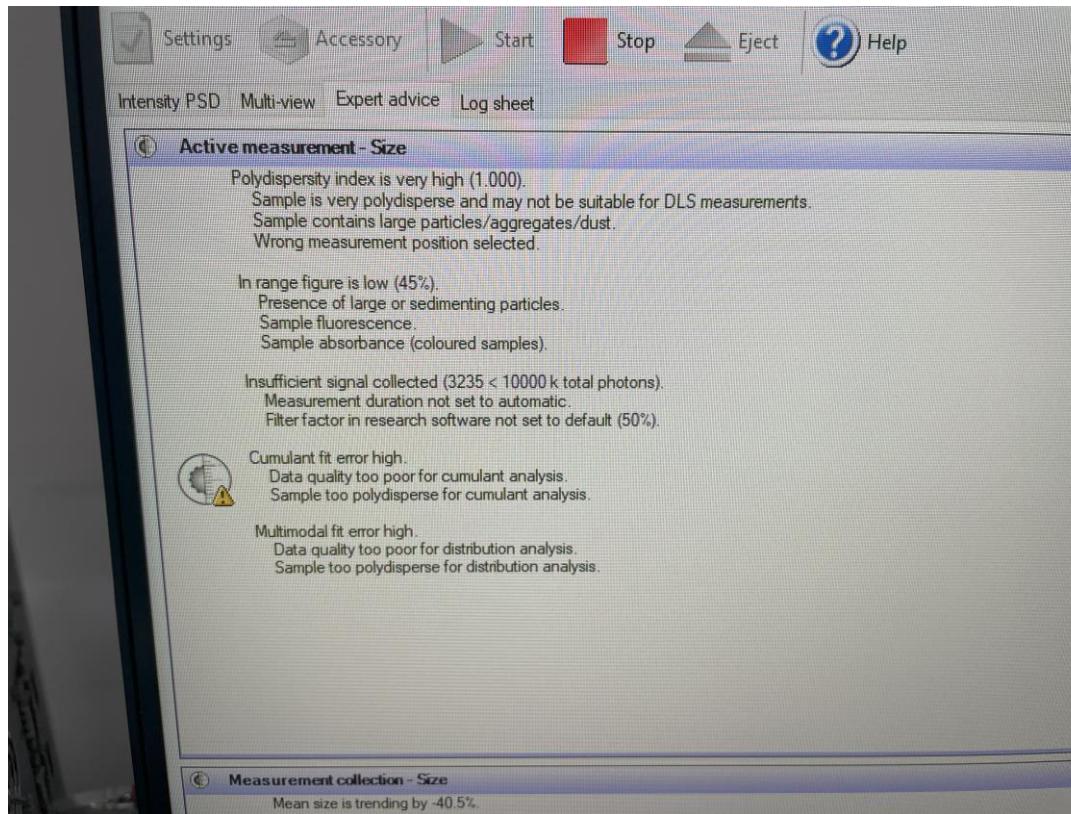


Loš koreogram

Dobar koreogram



Ako ne želimo da sami analiziramo pouzdanost merenja, to će računar uraditi za nas. Kada se završi snimanje jednog uzorka može se otvoriti prozor „*Expert advice*“ gde ćemo dobiti kvalitativan opis merenja. Niže je prikazan primer za uzorak koji **nije pogodan za DLS** i bez obzira što će računar izbaciti raspodelu veličina čestica i srednju vrednost hidrodinamičkog radijusa, mi ovo treba da odbacimo kao **nevalidan rezultat**. Drugim rečima, moramo biti vrlo oprezni sa tumačenjem rezultata DLS-a.



DLS – faktori koji utiču na rezultat merenja

Faktori koji utiču na DLS merenje zato što utiču na Braunovo kretanje su:

- **Jonska jačina rastvora:** brzina difuzije čestica zavisi od debljine električnog dvosloja (tzv. Debyeva dužina) – rastvori sa malom jonskom jačinom (niska provodljivost) stvaraju veći dvosloj jona oko čestice i tako smanjuju brzinu difuzije, čime se dobija lažno veća vrednost hidrodinamičkog radijusa (R_h).
- **Površina čestice:** ako je nešto adsorbovano na površini čestice tako da na neki način „štrči“ ovo će takođe smanjiti brzinu difuzije i dati lažno veću vrednost R_h .
- **Oblik čestice:** nesferne čestice se u DLS merenju tretiraju kao da su sferne, tako da se u tom slučaju uvek dobija aproksimirana vrednosti R_h .

DLS – indeks polidisperznosti (PdI)

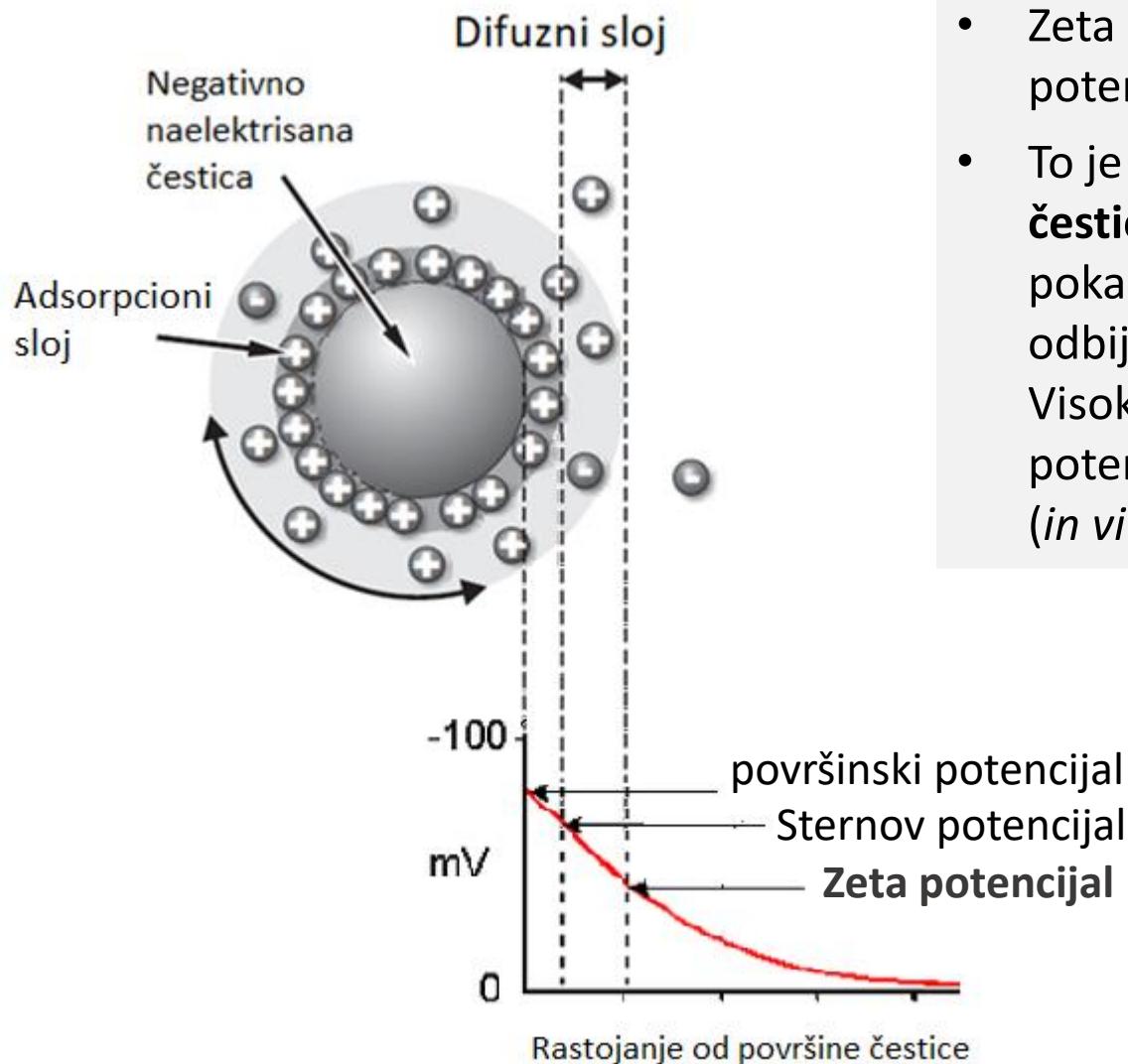
Disperznost je mera heterogenosti smeše, govori o zastupljenosti različitih veličina čestica u smeši.

PdI < 0,1 monodisperzan uzorak (sadrži čestice iste veličine)

0,1 < PdI < 0,5 uzorak srednje polidisperznosti

PdI > 0,7 veoma polidisperzan uzorak, DLS će dati rezultate ali oni neće biti pouzdani

Zeta potencijal (ζ potencijal)



- Zeta potencijal je elektrokinetički potencijal na površini koloidne čestice.
- To je parametar **stabilnosti koloidnih čestica** – vrednost zeta potencijala pokazuje stepen elektrostatičkog odbijanja između koloidnih čestica. Visoka apsolutna vrednost zeta potencijala znači da su čestice stabilne (*in vitro*) i da neće doći do agregacije.

<u>Zeta potencijal (mV)</u>	<u>Stabilnost čestica</u>
0 do ± 5	Brza koagulacija ili flokulacija*
± 10 do ± 30	Nestabilnost
± 30 do ± 40	Srednja stabilnost
± 40 do ± 60	Dobra stabilnost
$> \pm 60$	Odlična stabilnost

*Koagulacija i flokulacija su procesi u kojima dolazi do agregacije čestica. Razlika je što je koagulacija ireverzibilan proces - kod koagulacije dolazi do razdvajanja faza, nastaje agregat sa promenjenom gustinom pa se zato taloži na dnu ili izdvaja na površini disperzije.

Na izoelektričnoj tački, zeta potencijal je jednak nuli i tada molekuli lako prave aggregate.

Zeta potencijal zavisi od pH, jonske jačine tj. koncentracije jona (ovo utiče na debeljinu električnog dvosloja, a to dalje utiče na provodnost), tipa jona, prisustva surfaktanata itd.

$$u_E = \frac{v}{E} = \frac{z}{6\pi\eta r}$$

DLS određuje brzinu kretanja nanelektrisanih čestica u električnom polju.

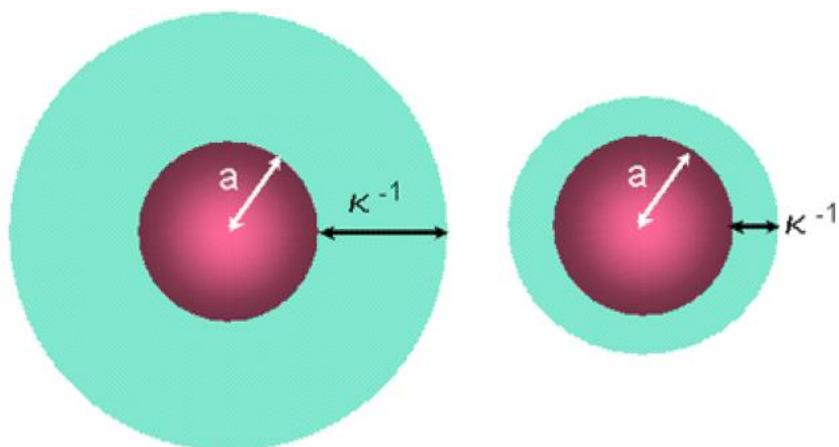
Brzina čestice u električnom polju se naziva **elektroforetska mobilnost** i zavisi od zeta potencijala:

$$u_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(\kappa a)}{3 \eta}$$

u_E – elektroforetska mobilnost, ε – dielektrična konstanta, ζ – zeta potencijal, $f(\kappa a)$ – Henrijeva funkcija, η – viskoznost.

Henrijeva funkcija: parametar κ je Debyeva dužina, odnosno κ^{-1} je mera „debljine“ električnog dvosloja; parametar a je radijus čestice, tako da funkcija κa meri odnos radijusa čestice i debljine dvosloja.

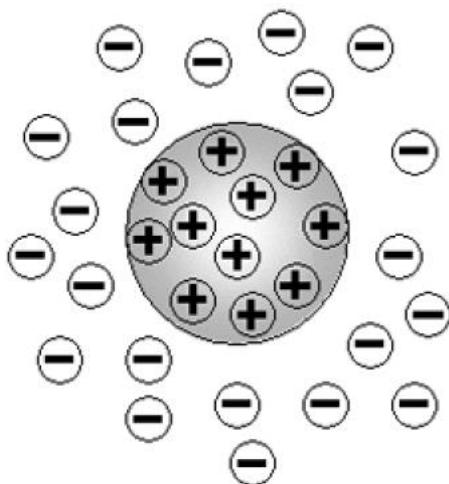
Za nepolarne rastvarače i male čestice,
 $f(\kappa a) = 1,0$
(Huckel aproksimacija)



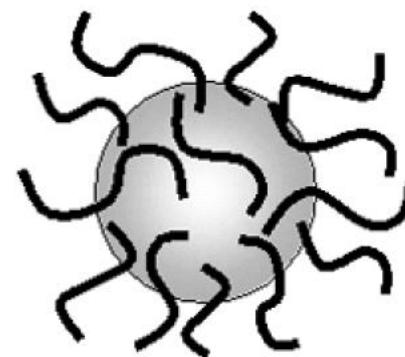
Za polarne rastvarače i čestice $\sim 0,2 \mu\text{m}$,
 $f(\kappa a) = 1,5$
(Smoluchowski aproksimacija)

Stabilizacija čestica - *coating*

Ovo nema veze sa DLS-om ali kad već govorimo o stabilnosti koloidnih čestica treba napomenuti da pored elektrostatičke stabilizacije, koja je određena zeta potencijalom, koloidne čestice mogu da budu i **sterno stabilizovane**, tako što se za površinu čestice adsorbuju polimeri koji ne daju česticama da priđu blizu, tj. na rastojanje gde bi *van der Waals*-e sile dovele do agregacije. Ovaj površinski sloj polimera se naziva **coating** (prevlaka).



elektrostatička stabilizacija



sterna stabilizacija

Merenje zeta potencijala

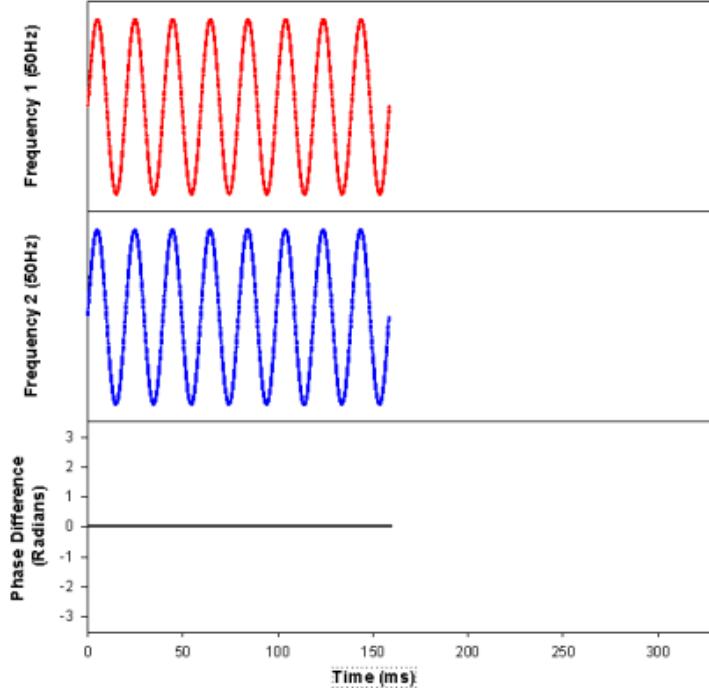
Procedura za merenje i procesiranje signala se naziva *Phase Analysis Light Scattering* (PALS) - određuje se fazni pomeraj koji je proporcionalan promeni pozicije čestice.

Lasersko zračenje se deli u delitelju snopa/separatrisi (*beam splitter*); deo prolazi kroz uzorak, a deo predstavlja referentni zrak. Deo koji prolazi kroz uzorak (kroz centar kivete) se rasejava na česticama, rasejano zračenje se detektuje na detektoru koji se nalazi ispred kivete, pod 13° u odnosu na upadni zrak (primetiti da se ovde ne koristi „*backscatter*“ detektor (173°) koji je tipičan izbor kada se određuje veličina čestice).

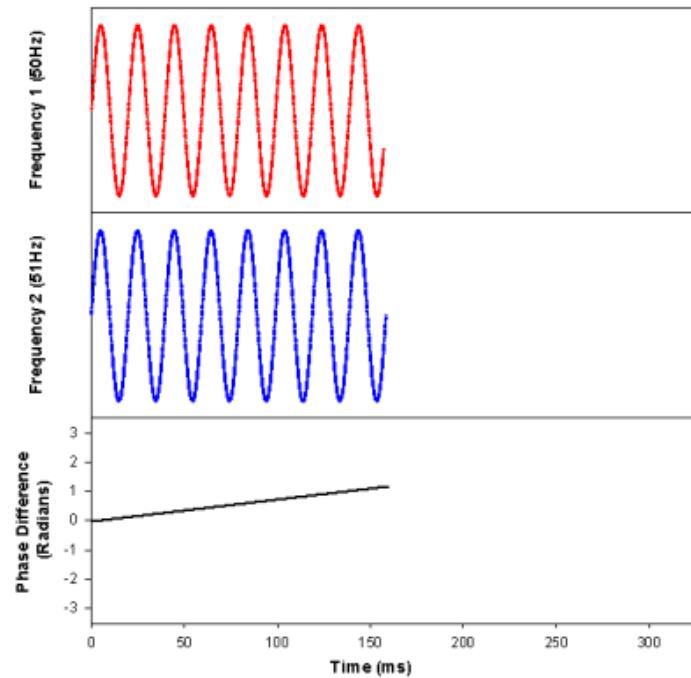
Kad se primeni električno polje, čestice koje se kreću unutar kapilare u kiveti će dovesti do fluktuacija u intenzitetu rasejanog zračenja sa frekvencijom koja je proporcionalna brzini čestice. Odatle računar određuje prvo elektroforetsku mobilnost a onda zeta potencijal.

Meri se fazna razlika između referentne frekvencije i frekvencije zračenja koje dolazi iz uzorka.

Da bi lakše razumeli šta znači „meri se fazna razlika“, na sledećem strani je prikazan primer u kom postoje dva signala sa istom frekvencijom od 50 Hz, i ako crtamo faznu razliku izmedju ova dva signala u funkciji vremena, dobićemo horizontalnu liniju (prava bez nagiba) jer nema razlike. Ali ako je jedna frekvencija 50 Hz, a druga 51 Hz, onda će grafik zavisnosti fazne razlike od vremena biti prava sa nagibom (gradijentom).



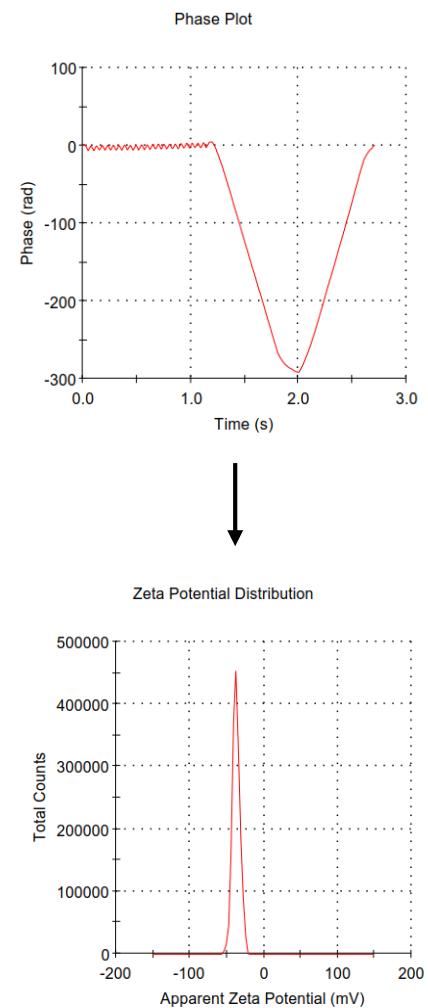
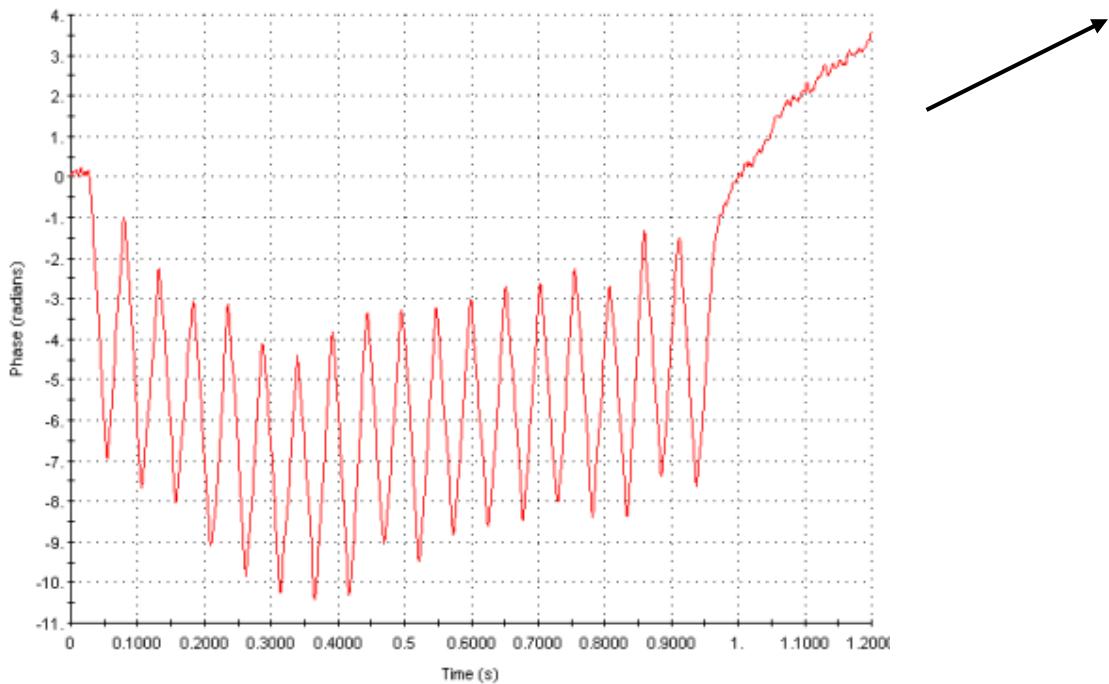
Fazna razlika između dva signala koji imaju istu frekvenciju (50 Hz)



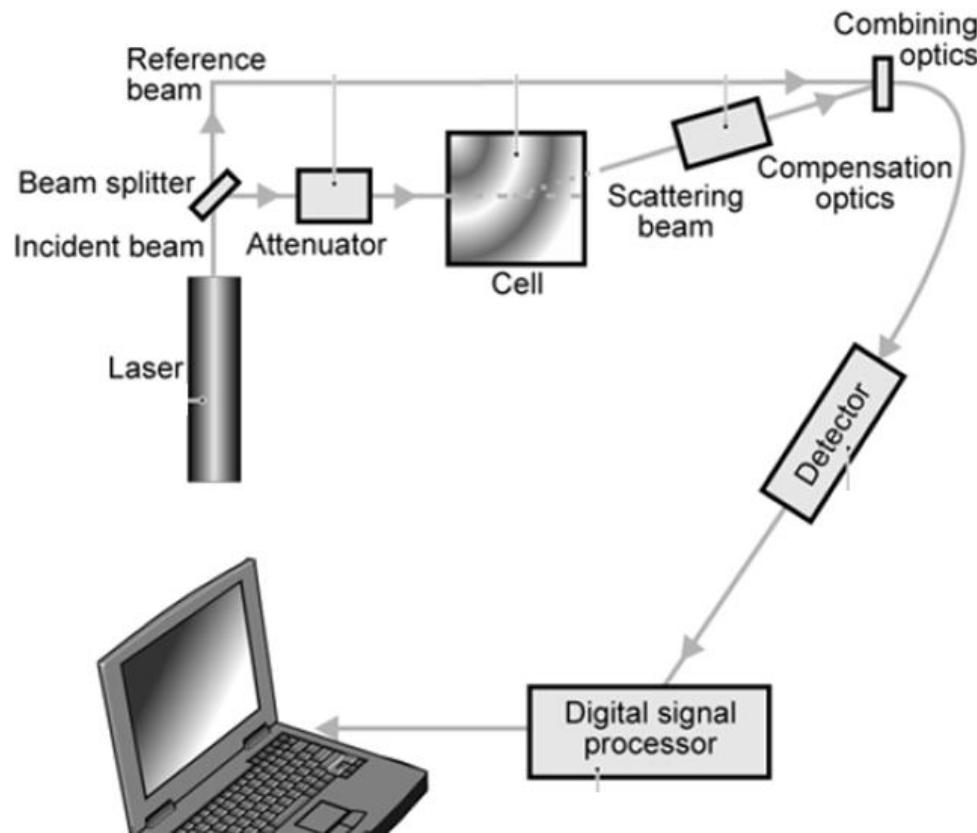
Fazna razlika između dva signala koji imaju različite frekvencije (50 i 51 Hz)

U DLS merenju naravno postoji fazna razlika i detektovaće se nešto što nije horizontalna linija. Primer signala je prikazan niže. U toku merenja, primjenjeni napon se menja, tj. polaritet se menja, tako da se čestice pomeraju na jednu pa na drugu stranu u kiveti, a zbog toga se dobijaju pozitivni i negativni nagibi, i na kraju se računa srednja vrednost.

Neobrađen signal koji se dobija prilikom merenja zeta potencijala – **promena faze u vremenu** (brzina promene fazne razlike zavisi od brzine kojom se čestica kreće)



Shematski prikaz optike za merenje zeta potencijala u uređaju **Malvern Zetasizer Nano**.



<https://www.malvernpanalytical.com/>

Merenje

Malvern Zetasizer Nano ZS



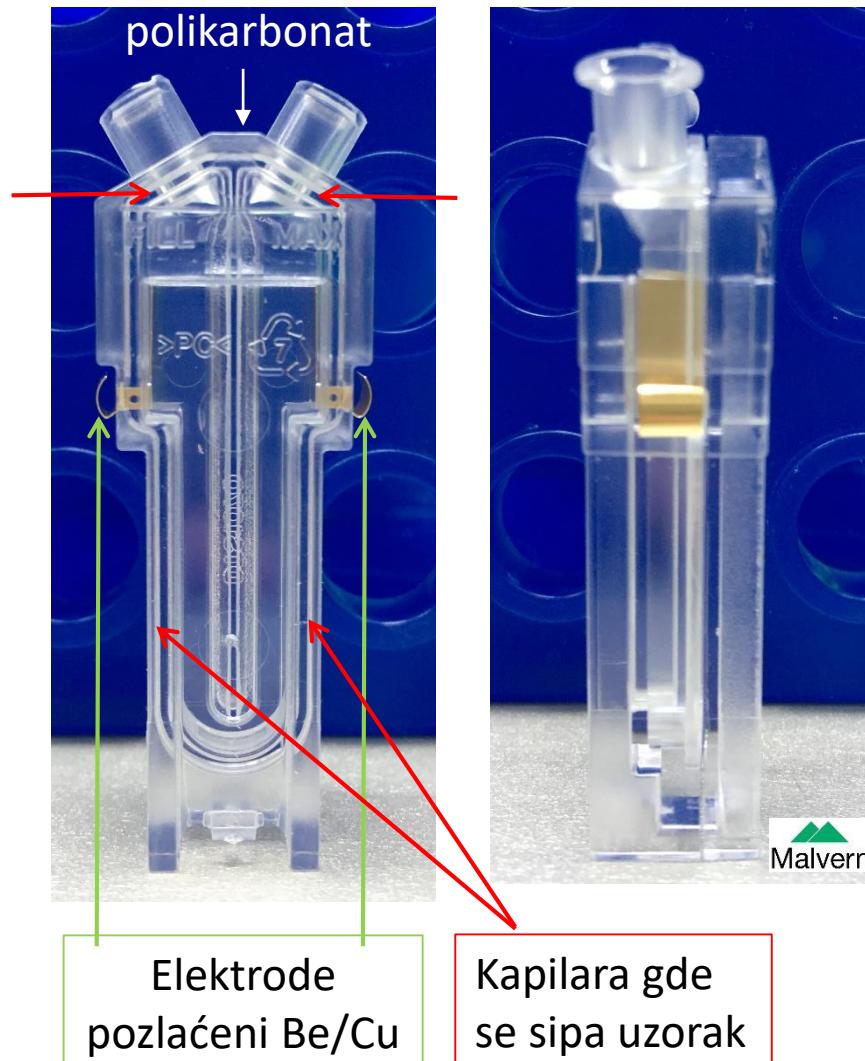
Strelica pokazuje mesto gde se stavlja kiveta sa uzorkom. Snimanje je veoma jednostavno, potrebno je zadati nekoliko parametara i pritisnuti *Enter*.

Kiveta za određivanje veličine čestica:
istih je dimenzija kao kiveta za UV/vis
spektrofotometriju.



Zapremina uzorka treba da
bude oko $800 \mu\text{L}$.

Kiveta za određivanje zeta potencijala



Za svaku vrstu uzorka je potrebno uneti sledeće parametre:

„Sample“

Material (tj. dispergovana čestica):

RI - indeks prelamanja (refrakcije)

Absorption – apsorpcija na $\lambda=633$ nm

Materijali	RI	Apsorpcija
Fosfolipidi	1.45	0.001
Proteini	1.45	0.001
Polistiren	1.59	0.01
Zlato	0.20	3.32
Platina	2.32	4.16

Dispersant (za vodu su date vrednosti niže):

Temperatura: 25 °C

Viskoznost: 0.8872 cP (0.00088 Pa·s)

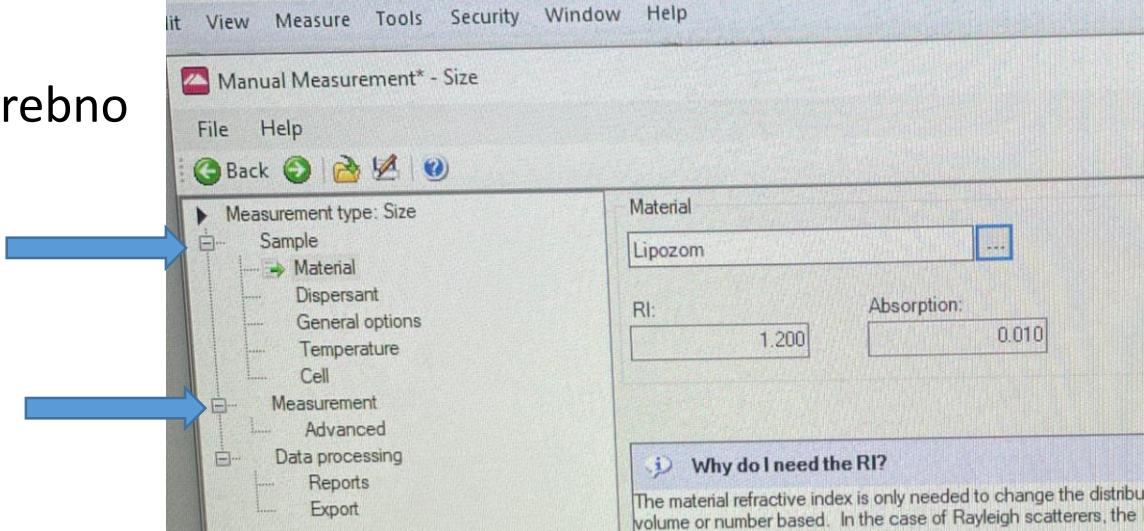
RI = 1.330

Temperature:

25 °C, vreme ekvilibracije 120 s

Cell:

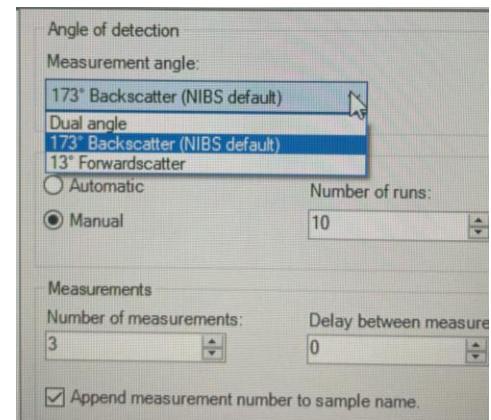
DTS0012



„Measurement“

Izabratи

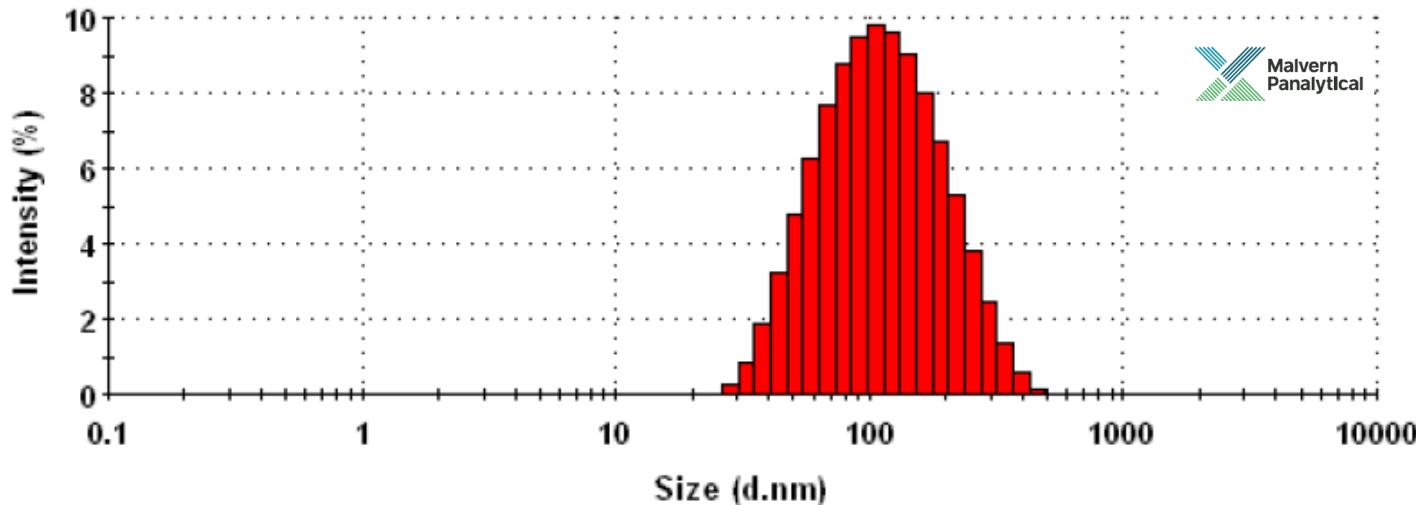
- ugao detekcije (obično 173 °)
- broj merenja (obično 3)
- broj snimanja u okviru jednog merenja (obično 10)



Interpretacija rezultata

Rezultat koji se dobija iz DLS merenja je grafički prikaz raspodele veličina čestica sa odgovarajućim intenzitetima rasejane svetlosti.

Ovaj grafik se zove **intenzitetski procenjena raspodela veličina čestica**.



Iz intenzitetski procenje raspodele, računar može da preračuna još dve vrste raspodela veličina (zato smo unosili vrednosti za indeks prelamanja čestica u suspenziji i apsorpciju na datoј talasnoј dužini), to su:

- **zapreminski procenjena raspodela veličina čestica**
- **brojčano procenjena raspodela veličina čestica**

Ovako izgleda **rezultat DLS merenja** – prikazana je intenzitetski procenjena raspodela veličina čestica za uzorak komercijalno dostupnog mleka sa 1,5% mlečne masti (mleko je koloid, sadrži dispergovane čestice masti u vodi).

Možemo da uočimo da je uzorak pogodan za DLS merenje jer za „*Results quality*“ piše „**Good**“ što znači da je uzorak zadovoljio kriterijume merenja.

Nas interesuju dve vrednosti:

- **Z-Average (Z_{avg})** - srednja vrednost hidrodinamičkog radijusa: **352,8 nm**
- **Pdl** - indeks polidisperznosti: **0,209**

Vidimo da se Pdl nalazi u opsegu $0,1 < Pdl < 0,5$, znači da je uzorak (niske) srednje polidisperznosti.

Iz rezultata bi mogli da zaključimo da je veličina lipidnih čestica u mleku oko 350 nm i da je proizvođač dobro izvršio proces homogenizacije mleka.

Size Distribution Report by Intensity

v2.2



Sample Details

Sample Name: VodaMI1.5.1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: AnaPB.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 1149

Dispersant RI: 1.330

Material RI: 1.20

Viscosity (cP): 0.8872

Material Absorbtion: 0.010

Measurement Date and Time: Thursday, October 5, 2023 ...

System

Temperature (°C): 25.0

Duration Used (s): 50

Count Rate (kcps): 356.4

Measurement Position (mm): 0.45

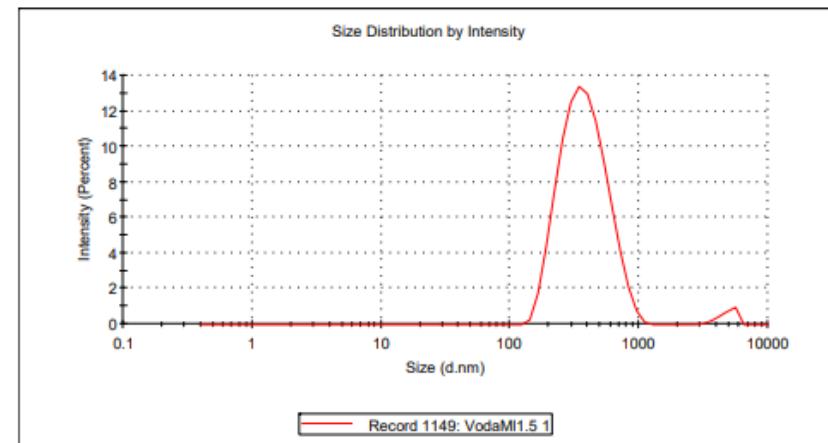
Cell Description: Disposable sizing cuvette

Attenuator: 2

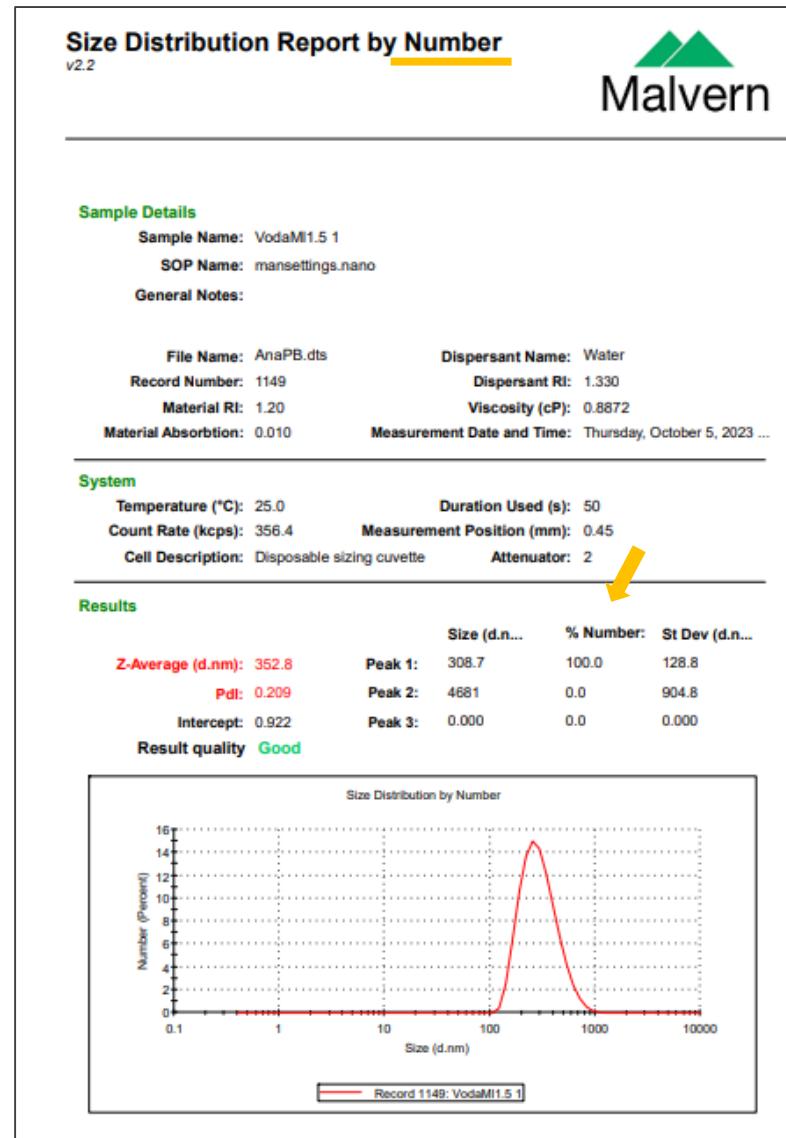
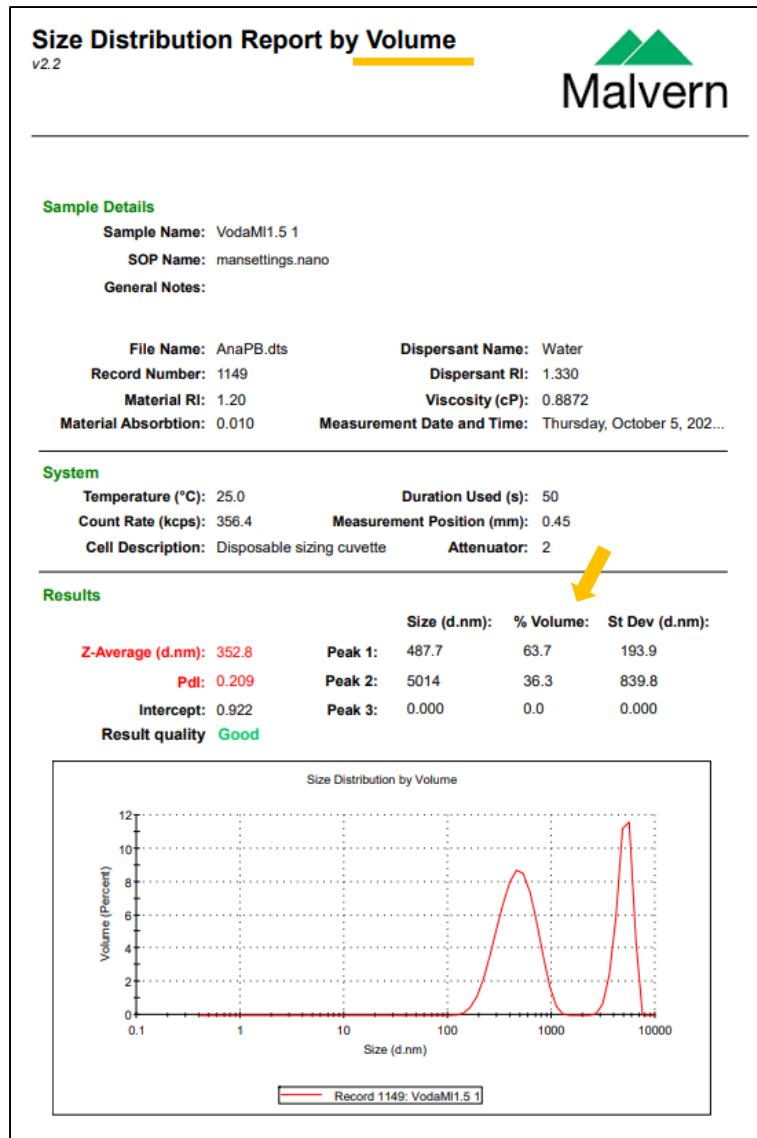
Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 352.8	Peak 1: 395.9	97.6	161.4
Pdl: 0.209	Peak 2: 4842	2.4	704.3
Intercept: 0.922	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**



Za isto merenje su niže prikazane **zapreminske (levo) i brojčane (desno)** procenjene raspodele veličina čestica. Vidi se da su, naravno, Z_{avg} i Pdl isti kao kod intenzitetske, ali da su raspodele malo drugačije centrirane (oko drugačije srednje vrednosti dijametra). Takođe se mogu uočiti različiti doprinosi rasejanju, zbog prethodno pomenute zavisnosti $I \sim d^6$, kao i $V \sim D_h^3$ (jednostavno objašnjeno na hipotetičkom primeru na sledećoj strani).



Poređenje „pikova“ u intenzitetski, zapreminske i brojčano procenjenim raspodelama:

Hipotetički primer: u suspenziji se nalazi smeša koja sadrži **jednak broj** čestica od 5 nm i čestica od 50 nm

1. Kod **brojčano** procenjene raspodele veličina (**slika A**) „pikovi“ će biti jednaki.
2. Kod **intenzitetski** procenjene raspodele (**slika B**), pik koji se pojavljuje na 50 nm će biti 10^6 puta veći od pika na 5 nm zbog zavisnosti $I \sim d^6$, tj. činjenice da čestice od 50 nm rasejavaju 10^6 puta više zračenja od čestica dijametra 5 nm.
3. Kod **zapreminske** procenjene raspodele (**slika C**), pik koji se pojavljuje na 50 nm će biti 10^3 puta veći od pika na 5 nm zbog zavisnosti $V \sim D_h^3$.

