

Оценка размеров наночастиц в многокомпонентных коллоидных системах методом динамического рассеяния света

А. Д. ЛЕВИН¹, А. Ю. САДАГОВ¹, В. А. ЩЕЛКОНОВ², А. М. СИНЕБРЮХОВА²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: levin-ad@vniiofi.ru

²Московский технологический университет,
Москва, Россия, e-mail: asiliy9999@yandex.ru

Рассмотрены возможности метода динамического рассеяния света для измерений размеров наночастиц и их распределений по размерам. Наночастицы добавлены в сложную коллоидную систему (плазму крови или другую биологическую жидкость), содержащую частицы близких размеров. Выделение вклада добавляемых частиц в рассеяние осуществляется методом деполаризованного динамического рассеяния света (для анизотропных частиц) или с помощью обработки экспериментальных данных (для изотропных частиц). Приведены примеры определения размеров золотых наночастиц и липосом, добавленных в неразбавленную плазму крови.

Ключевые слова: динамическое рассеяние света, наносферы, наностержни, оптическая анизотропия, деполаризованное рассеяние света, интенсивность рассеяния, плазма крови, липосомы.

The possibilities of dynamic light scattering method for sizing of nanoparticles, added to the complicated colloid systems, containing the initial particles of the similar size are considered. The contribution of the added nanoparticles to the light scattering can be distinguished either by the using of depolarized dynamic light scattering (for anisotropic particles) or with the help of the new method of experimental data processing, proposed in the article (for isotropic ones). The examples of the sizing in undiluted blood plasma of the gold nanoparticles and liposomes are presented.

Key words: dynamic light scattering, nanospheres, nanorods, optical anisotropy, depolarized light scattering, scattering intensity, blood plasma, liposomes.

При работе с нанообъектами в жидких средах часто возникают ситуации, при которых наночастицы добавляют в суспензию, где имеются другие нанообъекты. Подобные ситуации возможны в биомедицинских технологиях, когда в биосистему, содержащую естественные компоненты нанометрового диапазона (например, белковые молекулы в плазме крови), вводят биосовместимые нанообъекты с лекарственными препаратами. При попадании наночастиц в биологическую жидкость, например в плазму крови, возможно увеличение их размеров за счёт образования оболочек, состоящих из белков плазмы, или же из-за агрегации наночастиц [1]. Эти эффекты существенно влияют на эффективность использования наночастиц в качестве носителей при адресной доставке лекарств и в других биомедицинских приложениях [2–4]. Поэтому необходимо отслеживать изменения размеров частиц, вводимых в коллоидную систему, где уже присутствуют частицы похожих размеров, но другой физической природы.

Эффективным методом определения размерных параметров наночастиц в жидких средах является динамическое рассеяние света (ДРС). Данный метод основан на исследованиях флуктуаций интенсивности лазерного излучения, рассеянного изучаемыми частицами. Далее по параметрам этих флуктуаций вычисляют коэффициенты диффузии частиц, а по полученным значениям указанных коэффициентов определяют размеры частиц. Для нахождения параметров флуктуаций излучения используются автокорреляционные функции (АКФ) интенсивности рассеянного излучения $G(\tau)$, где τ – время задержки (аргумент АКФ). При использовании метода ДРС для измерений размеров наночастиц и последующих их распределений по размерам требуется, чтобы рас-

сеяние на исследуемых объектах не менее чем на порядок превышало рассеяние на других нано- или микрообъектах, находящихся в образце. Поэтому при исследовании наночастиц, вводимых, например, в плазму крови, приходится либо существенно разбавлять плазму, либо увеличивать концентрацию добавляемых частиц. Такие подходы во многих случаях неприемлемы, поскольку эффекты образования белковых оболочек и агрегации существенно зависят как от свойств плазмы, которые изменяются при разбавлении, так и от концентрации наночастиц.

Измерения размеров анизотропных частиц. Возможны различные подходы к выделению вклада наночастиц в рассеяние света на фоне других рассеивающих объектов. Если требуется исследовать оптически анизотропные частицы на фоне оптически изотропных, то можно использовать эффекты, возникающие при рассеянии поляризованного лазерного излучения. Когда возбуждающее излучение имеет линейную поляризацию, например, в вертикальной плоскости (V), то в излучении, рассеянном на оптически анизотропных частицах, можно выделить составляющую VV , поляризация которой совпадает с поляризацией возбуждающего излучения (ко-поляризационную), и перпендикулярную ей составляющую VH (кросс-поляризационную). Наличие кросс-поляризационной составляющей VH является признаком некоторой анизотропии рассеяния у наносфер золота. При изотропной форме частиц это можно объяснить анизотропией поляризуемости. Метод анализа, использующий VH , получил название деполаризованного динамического рассеяния

Скорости счёта фотонов рассеянного излучения для чистой неразбавленной плазмы и плазмы с добавлением наночастиц

Скорость счёта	Плазма без добавок	Плазма с добавками золотых наносфер, мкл		Плазма с добавками золотых наностержней, мкл	
		300	600	300	600
I_{VV} , имп./с	565 900	5 08 900	618 900	–	428 900
I_{VH} , имп./с	6 100	10 900	12 400	12 400	19 400

света (ДДРС) и до последнего времени применялся главным образом для измерения размерных параметров несферических наночастиц [5]. У оптически изотропных частиц составляющая VH отсутствует, поэтому АКФ этой составляющей $G_{VH}(\tau)$ содержит информацию только об анизотропных частицах. Таким образом, регистрация этой составляющей позволяет определить размерные параметры анизотропных частиц, минимизировав влияние рассеянного излучения изотропного фона. Такой подход, основанный на применении ДДРС, был предложен в работе [6] и апробирован путём измерения размеров золотых наночастиц, добавляемых в искусственно приготовленные смеси. Указанные смеси содержали частицы биологического происхождения – бычий сывороточный альбумин, клеточные культуры и др.

Авторы сравнили возможности методов ДРС и ДДРС по определению параметров сферических и несферических наночастиц в неразбавленной плазме крови. При исследованиях использовали пулированную (смешенную) плазму крови, полученную от 10 условно здоровых доноров. В качестве антикоагулянта применяли 3,8 %-ный раствор цитрата натрия. В различных опытах в плазму добавляли золотые наносферы диаметром около 60 нм (коллоидный раствор производства фирмы British Biocore Int., Великобритания) и золотые наностержни длиной 63–79 нм и диаметром 19–25 нм (коллоидный раствор производства фирмы Alfa Aesar, Великобритания). Измерения проводили на анализаторе

размеров частиц АРН-2, разработанном во ВНИИОФИ, для составляющих VV и VH рассеянного излучения при угле рассеяния 90° . В качестве источника линейно-поляризованного излучения был задействован гелий-неоновый лазер мощностью 21 мВт, выделение указанных составляющих осуществлялось с помощью призмы Глана–Томпсона в канале сбора рассеянного излучения. Для точного определения слабой составляющей

VH необходимо учитывать темновой ток фотоприёмника, а также фоновые засветки, обусловленные деполяризованным рассеянием на стенках кюветы, на жидкости, в которой взвешены частицы, и на элементах оптической схемы прибора. В таблице приведены значения составляющих VV и VH скорости счёта фотонов, пропорциональной интенсивности рассеянного излучения I , для чистой неразбавленной плазмы и плазмы с различными добавками золотых наносфер и золотых наностержней. Коллоиды золотых наночастиц добавляли в 2 400 мкл неразбавленной плазмы крови. Все значения скоростей счёта указаны после вычитания темнового тока фотоприёмника (1 100 имп./с). Уровень фоновых засветок был оценён путём измерения составляющей VH при рассеянии света наносферами двуокиси кремния (диаметр порядка 10 нм), обладающими высокой степенью оптической изотропии. Этот уровень составляет порядка 6 000–7 000 имп./с (после вычитания темнового тока).

Из таблицы можно сделать следующие выводы:

для ко-поляризационной составляющей VV , используемой в методе ДРС, рассеяние добавляемыми в неразбавленную плазму наночастицами слабо различимо на фоне рассеяния частицами плазмы;

кросс-поляризационная составляющая VH для неразбавленной плазмы находится на уровне фоновых засветок;

для золотых наносфер и особенно золотых наностержней, добавляемых в такую плазму, получаются повышенные значения скоростей счёта.

Таким образом, для определения размерных параметров золотых наночастиц в неразбавленной плазме крови целесообразно использовать кросс-поляризационную составляющую VH рассеянного излучения. У наносфер её значение недостаточно для получения приемлемого качества АКФ, поэтому предпочтительнее проводить измерения с добавлением золотых наностержней с высокой анизотропией рассеяния и, соответственно, более интенсивной составляющей VH . На рис. 1 приведены АКФ золотых наностержней, зарегистрированные в водном растворе и неразбавленной плазме крови (добавлено 600 мкл раствора наностержней в 2 400 мл плазмы) после двух суток выдержки. Происходит изменение АКФ и размера частиц в результате их взаимодействия с плазмой. По виду АКФ можно заключить, что размер наностержней увеличился, а их аспектное отношение уменьшилось.

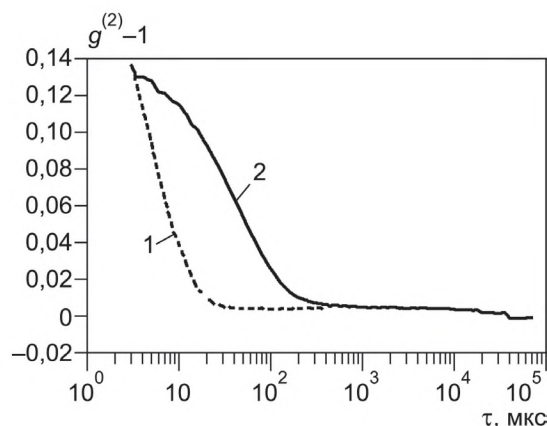


Рис. 1. Автокорреляционные функции интенсивности рассеянного излучения для наностержней в водном растворе (1) и в неразбавленной плазме крови (2)

Для нормированной АКФ кросс-поляризационной составляющей интенсивности рассеянного излучения $g_{\text{ВН}}^{(2)}$ справедливо следующее выражение [7]:

$$g_{\text{ВН}}^{(2)}(\tau) - 1 = \beta \exp\{-(2D_{\text{т}}q^2 + 12D_{\text{р}})\tau\}, \quad (1)$$

где β – фактор когерентности, т. е. коэффициент, зависящий от оптической схемы установки ДРС; $D_{\text{т}}$, $D_{\text{р}}$ – коэффициенты трансляционной и ротационной диффузии наностержней, соответственно; $q = 4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda_0$ – модуль волнового вектора рассеяния, n – показатель преломления среды (жидкости, в которой взвешены наночастицы), λ_0 – длина волны лазерного излучения в вакууме, θ – угол рассеяния.

Экспериментально зарегистрированная $g_{\text{ВН}}^{(2)}(\tau)$ позволяет по формуле (1) определить эквивалентный гидродинамический радиус наночастиц $R_{\text{н}}$, т. е. радиус сферических частиц, имеющих такие же коэффициенты трансляционной и ротационной диффузии, что и исследуемые наностержни. Для этого необходимо использовать формулы для коэффициентов трансляционной и ротационной диффузии [8]:

$$D_{\text{т}} = kT / (6\pi\eta R_{\text{н}}); D_{\text{р}} = kT / (8\pi\eta R_{\text{н}}^3), \quad (2)$$

где k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η – динамическая вязкость растворителя.

Для оценок $R_{\text{н}}$ по зарегистрированным АКФ необходимо решить обратную задачу по формулам (1), (2), при этом надо знать значения показателей преломления и вязкости использованной плазмы крови.

Измерения размеров изотропных частиц. Если добавляемые в коллоидную систему частицы изотропны, изложенный выше подход не позволяет отделить рассеянное ими излучение от света, рассеянного жидкостью.

Во ВНИИОФИ был предложен, апробирован и запатентован метод, позволяющий измерять размеры наночастиц (в том числе оптически изотропных), которые добавляют в коллоидную систему, уже содержащую близкие по размеру наночастицы, а также распределение этих частиц по размерам [9]. Метод основан на вычитании распределения частиц, измеренных в координатах «размер – интенсивность». Данное распределение определено для исходной системы из распределения, которое найдено для системы с добавленными частицами. При подобных распределениях в существующих приборах ДРС интенсивность отображается в относительных единицах, изменяющихся от образца к образцу. Чтобы вычитание распределений было корректным, необходимо отображение интенсивности в одних и тех же единицах для всех образцов, а именно – в единицах скоростей счёта фотонов, поступающих на фотоприёмник. Скорость счёта фотонов (число импульсов в секунду) является показателем интенсивности рассеянного света и в классическом методе ДРС применяется как дополнительная оптическая характеристика, т. е. вспомогательный параметр при подборе оптического фильтра. В расчётах эта величина не участвует. В предложенном авторами методе скорость счёта фотонов нужна для перехода к единой для данного прибора шкале интенсивностей, не зависящей от конкретного образца.

Для вычислений используем общую скорость счёта, которую измеряет анализатор размеров частиц. Пусть $I(d)$ – относительная интенсивность рассеянного излучения. Весь диапазон делится на N интервалов, k – номер интервала, $I_k(d)$ – относительная интенсивность рассеянного излучения на k -м интервале. Тогда можно определить интенсивность в единицах скорости счёта на k -м интервале:

$$I_k^c(d) = F I_k(d), \quad (3)$$

где F – коэффициент пропорциональности.

Этот коэффициент можно записать как

$$F = I_{\text{общ}} / \sum_{k=1}^N I_k, \quad (4)$$

где $I_{\text{общ}} = \sum_{k=1}^N I_k$ – скорость счёта при измерениях с липосомами.

Определив коэффициент F , можно перейти с помощью формулы (3) от интенсивностей в относительных единицах к интенсивностям, выраженным в единицах скорости счёта. Для этого необходимо учесть коэффициенты пропускания исследуемого образца $T_{\text{обр}}$ и фона $T_{\text{ф}}$, так как в некоторых анализаторах размеров частиц оптическая схема построена так, что рассеивающий объём находится в центре поперечного сечения кюветы, и имеет место эффект внутреннего фильтра. Для корректировки этого эффекта нужно вычислить приведённую скорость счёта P^* , т. е. скорость, которая была бы при отсутствии эффекта внутреннего фильтра. Эта скорость зависит от пропускания кюветы T и скорости счёта P :

$$P^* = P/T. \quad (5)$$

По формулам (4), (5) можно найти приведённые, т. е. скорректированные на эффект внутреннего фильтра, рас-

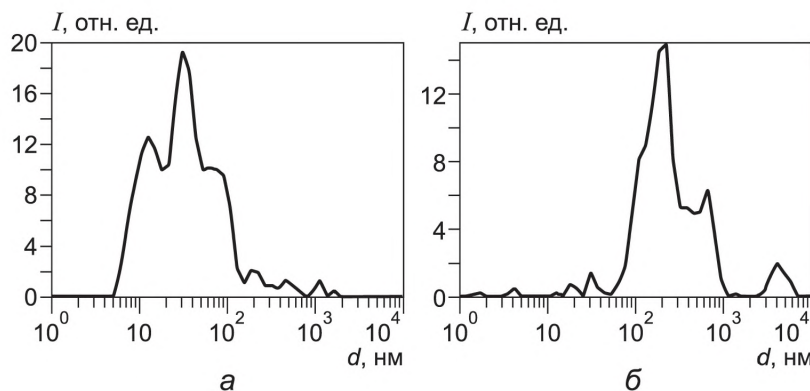


Рис. 2. Распределения $I(d)$ для исходной плазмы (а) и липосом в плазме (б)

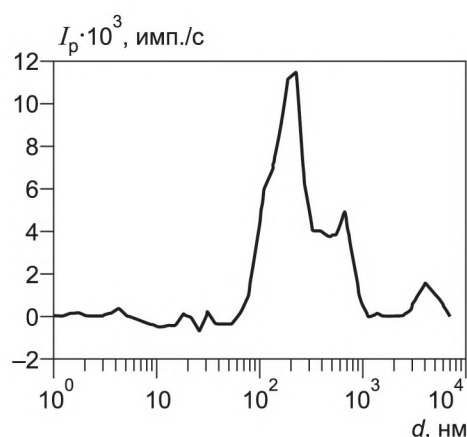


Рис. 3. Распределение $I_p(d)$ для липосом, «очищенное» от влияния собственных нанообъектов плазмы

пределения в координатах «диаметр – скорость счёта» для фонового раствора и исследуемого образца, состоящего из фонового раствора с добавленной частицей. Затем приведённое распределение для фонового раствора вычитают из аналогично приведённого распределения для исследуемого образца. В результате получается распределение для добавленных частиц, «очищенное» от влияния фона $I_p(d)$. Это распределение рассчитывают по формуле

$$I_p(d) = I_{обр}(d)P_{обр}^* / \sum_{k=1}^N I_{k,обр} - I_{ф}(d)P_{ф}^* / \sum_{k=1}^N I_{k,ф},$$

где $P_{обр}^*$, $P_{ф}^*$ – скорости счёта, скорректированные с учётом внутреннего фильтра, для образца и фона, соответственно.

Для проверки предложенного способа исследовали изменения размеров липосом при их попадании в плазму крови человека. В настоящее время липосомы рассматривают как перспективные носители для адресной доставки лекарств, поэтому их поведение в плазме, особенно неразбавленной, представляет значительный интерес. Были изучены образцы плазмы пяти доноров, предоставленные РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Вначале определяли распределение $I(d)$ для исходных образцов плазмы, затем в плазму вводили концентрированную суспензию липосом (80 мкл на 1 мл плазмы) и находили распределение $I(d)$ для полученного раствора. Измерения проводили на ДРС анализаторе АРН-2 при угле рассеяния 90° , коэффициенты пропускания определяли на спектрофотометре СФФ-2 «ФЛУОРАН», разработанном во ВНИИОФИ. Далее обрабатывали полученные данные по изложенной выше методике. Результаты измерений и их обработки приведены на рис. 2, 3. Таким образом, авторам удалось получить распределение по размерам липосом, добавленных в плазму. Данное распределение липосом «очищено» от вклада дисперсных частиц самой плазмы.

Заключение. Рассмотрены методы измерения размерных параметров наночастиц, добавляемых в сложные коллоидные системы. Приведены примеры по определению размеров золотых наночастиц и липосом в неразбавленной и слабо разбавленной плазме крови.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках прикладного научного исследования (уникальный идентификатор RFMEFI62417X0045).

Литература

1. Dobrovol'skaia M. A., Patri A. K., Zheng J., Clogston J. D., Ayub N., Aggarwal L. P., Neun B. W., Hall J. B. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009. V. 5. No. 2. P. 106–117.
2. De Paoli Lacerda S. H., Park J. J., Meuse C., Pristinski D., Becker M. L., Karim A., Douglas J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood protein // *ACS Nano*. 2010. V. No. 1. P. 365–379.
3. Lai W., Wang Q., Li L., Hu Z., Chen J., Fang Q. Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns // *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2017. V. 152. P. 317–325.
4. Ajdari N., Vyas C., Bogan S. L., Lwaleed B. A., Cousins B. G. Gold Nanoparticle Interactions in Human Blood: A Model Evaluation // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017. V. 13. No. 4. P. 1531–1542.
5. Шмыткова Е. А. Возможности метода деполяризованного динамического рассеяния света для определения геометрических параметров несферических наночастиц // *Метрология*. 2013. № 10. С. 16–21.
6. Balog S., Rodriguez-Lorenzo L., Monnier C. A., Obiols-Rabasa M., Rothen-Rutishauser B., Schurtenberger P., Petri-Fink A. Characterizing nanoparticles in complex biological media and physiological fluids with depolarized dynamic light scattering // *Nanoscale*. 2015. V. 7. P. 5991–5997.
7. Rodriguez-Fernandez J., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L. M., Lang P. R. Dynamic Light Scattering of Short Au Rods with Low Aspect Ratios // *J. Phys. Chem.* 2007. V. 111. No. 13. P. 5020–5025.
8. Воробьёв А. Х. Диффузионные задачи в химической кинетике. М.: Изд-во МГУ, 2003.
9. Пат. 2630447 РФ. Способ определения размеров частиц, добавленных в исходный коллоидный раствор // А. Д. Левин, А. Ю. Садагов., Е. А. Шмыткова // *Изобретения. Полезные модели*. 2017. № 25.

Дата принятия: 27.10.2017.