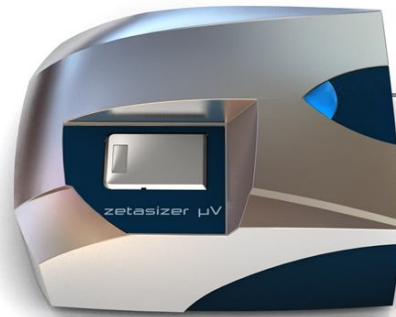


光散射技术最新进展及其在纳米领域应用

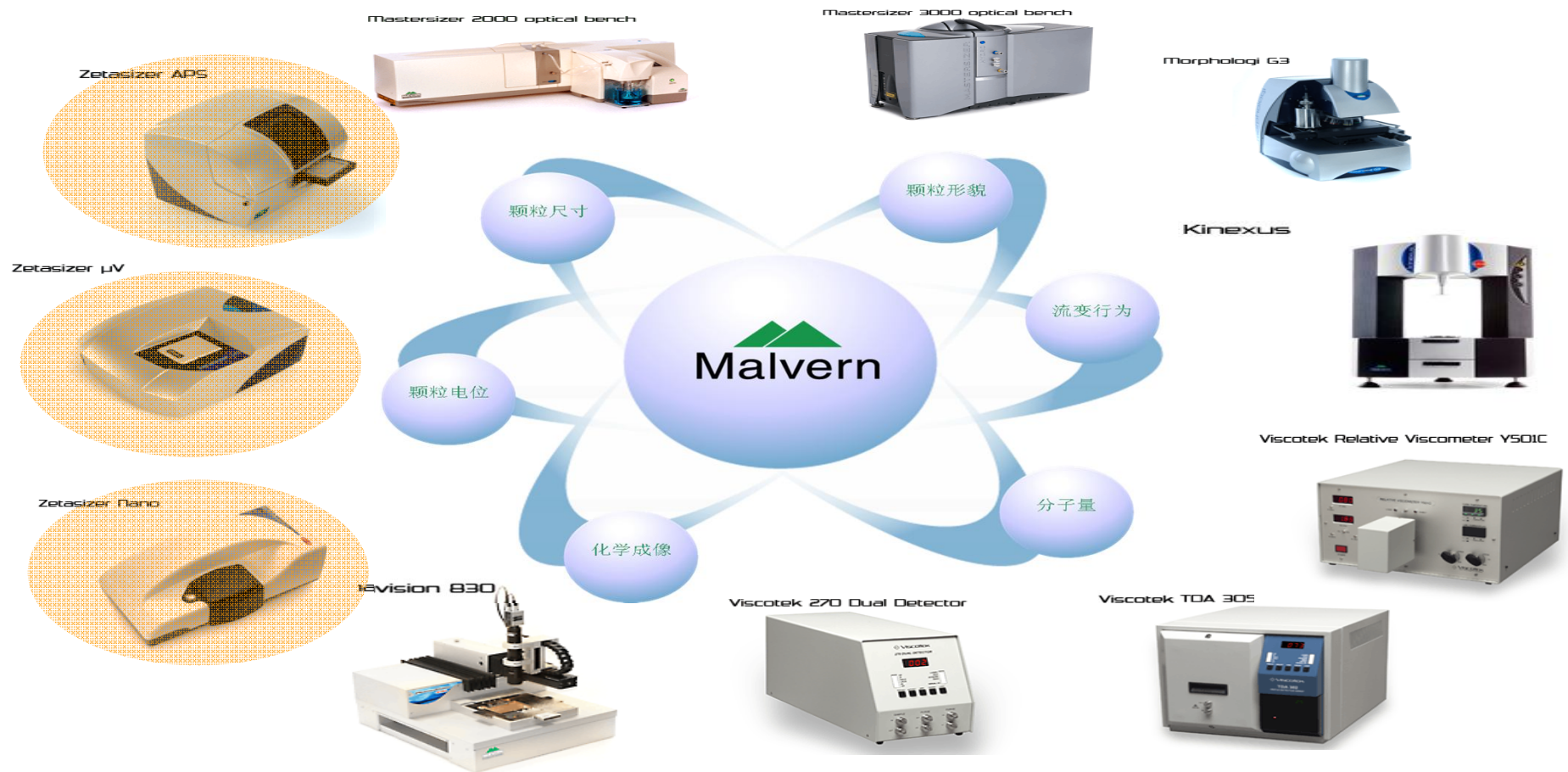


宁辉

Malvern Instrument



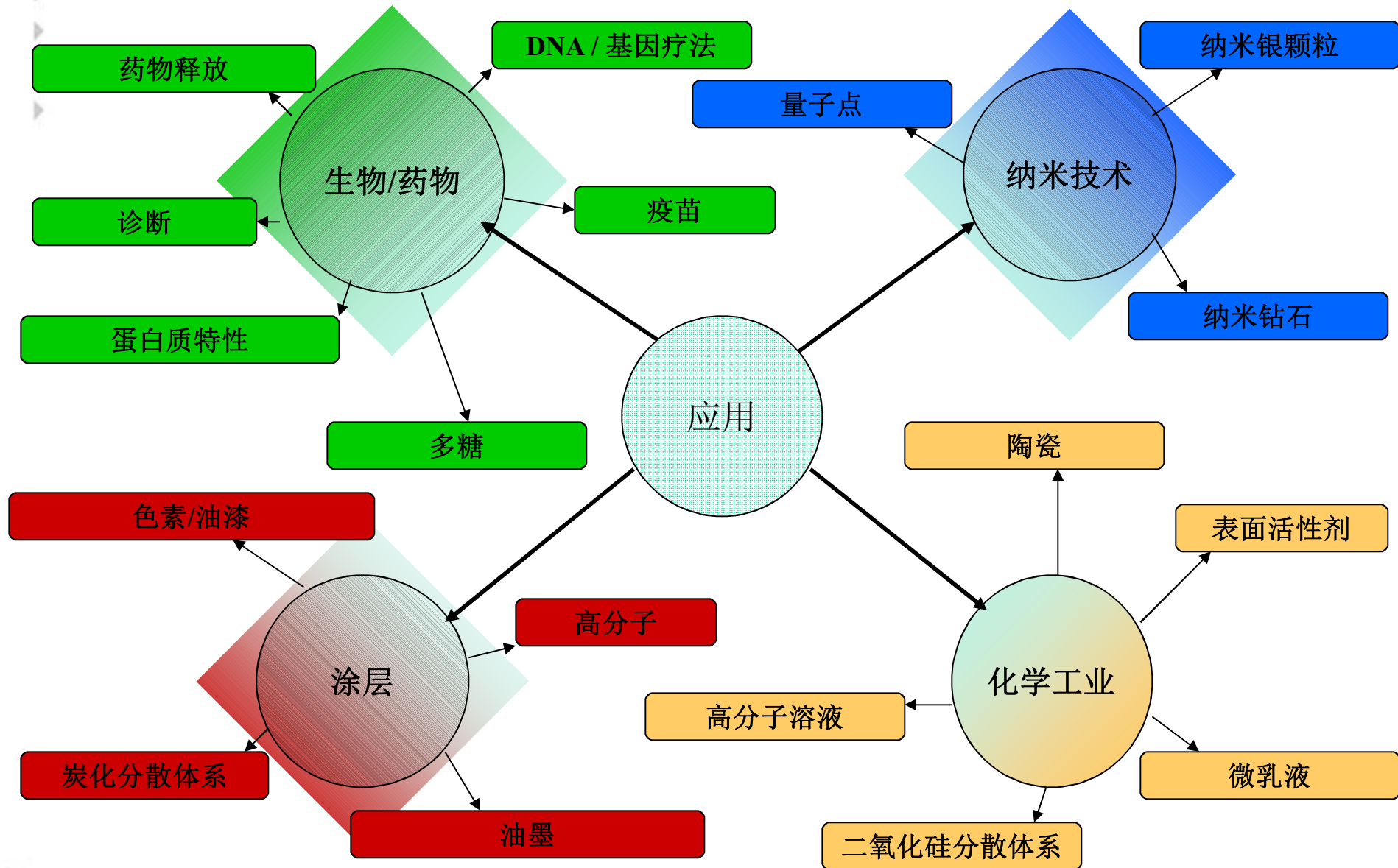
马尔文仪器产品



随着公司发展，马尔文仪器不断推出创新技术和杰出的检测系统。目前马尔文公司产品覆盖颗粒粒度表征，颗粒和表面电位表征，颗粒形貌表征，大分子分子量及其分布表征，流体行为表征等等领域。主要产品包括：

- Zetasizer Nano系列纳米粒度/zeta电位仪（动/静态光散射、电泳光散射）
- Mastersizer系列激光粒度仪（激光衍射法）
- Viscotek 多检测器凝胶渗透色谱GPC/SEC
- Viscotek DSV 毛细管电子相对粘度计
- Kinexus、Bolin系列 旋转、毛细管流变仪
- G3、FIPA（干/湿法图像分析仪）

Zetasizer 的应用

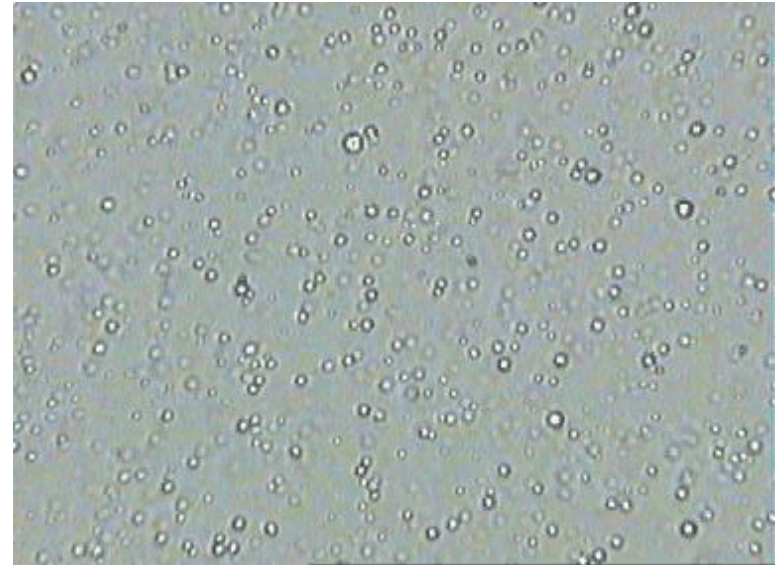
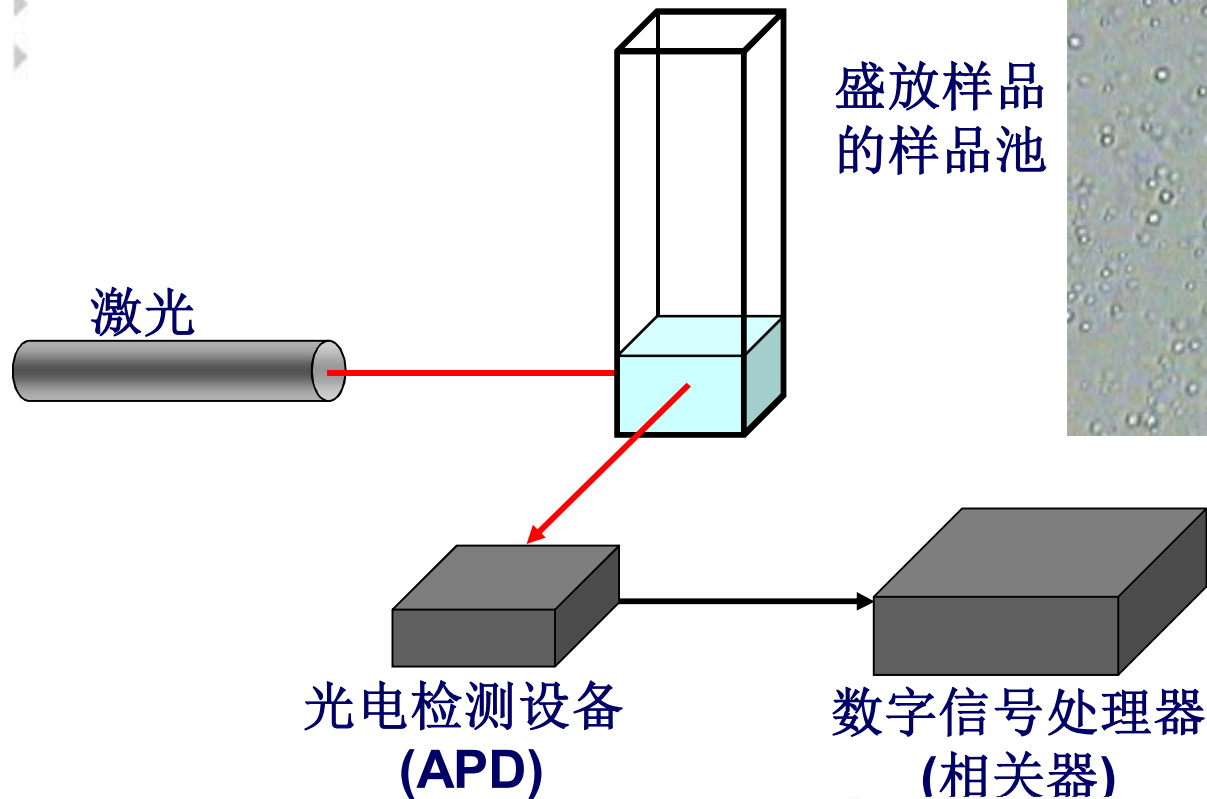


Contents

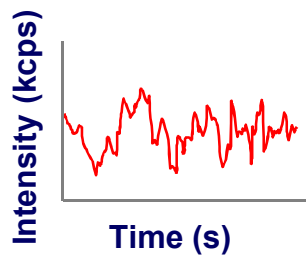
- ▶ 动态光散射
 - 测量原理
 - 由相关曲线得到粒径信息 – 数据分析
 - 样品要求及制备
- ▶ 静态光散射
- ▶ 与色谱连接flow-mode
- ▶ Zeta 电位/表面电位
- ▶ 应用



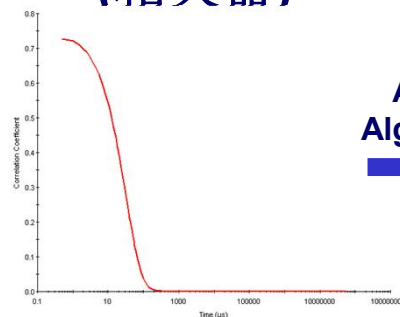
光散射技术仪器系统



- 布朗运动的速度依赖于
 - 粒子的大小
 - 媒体的粘度



Correlate



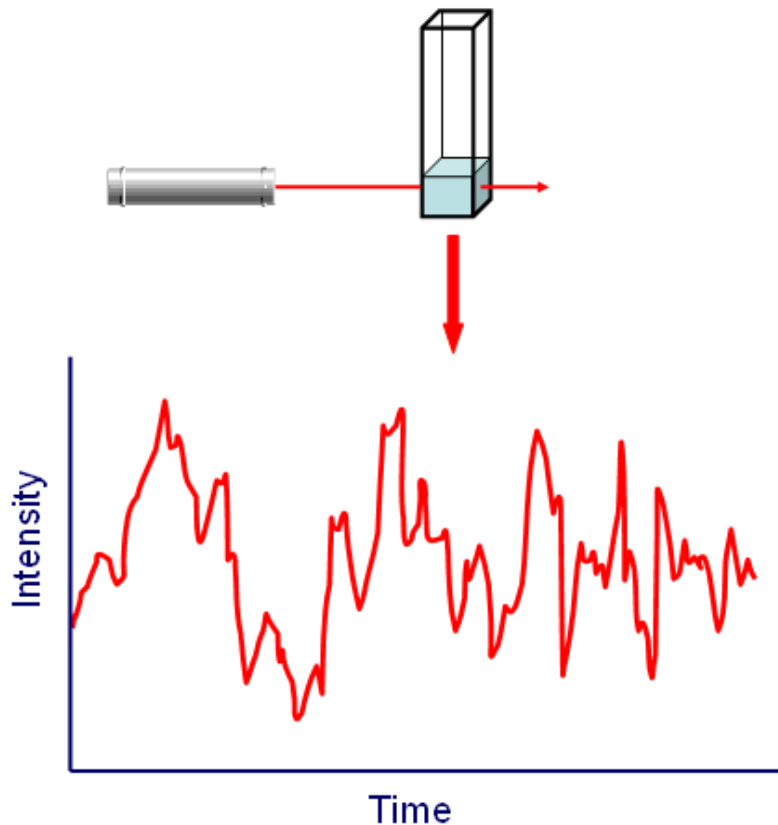
Apply
Algorithm



颗粒运动速度，
即扩散系数D
(cm^2/s)

动态光散射

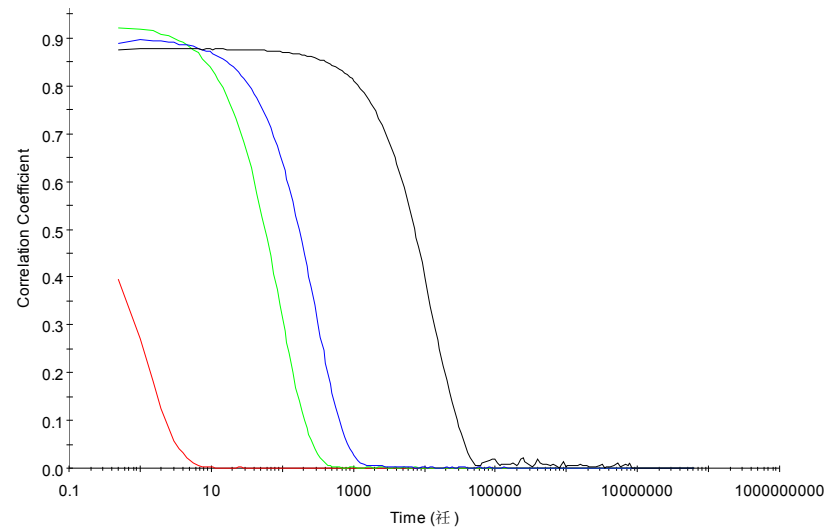
- ▶ 动态光散射技术检测 光强随时间的波动性行为 从而计算出颗粒的扩散速度 (D), 并通过 Stokes-Einstein 方程得到颗粒的 流体力学直径/半径 (D_H)



$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H}$$

k = Boltzmann's constant,
 T = absolute temperature,
 η = viscosity

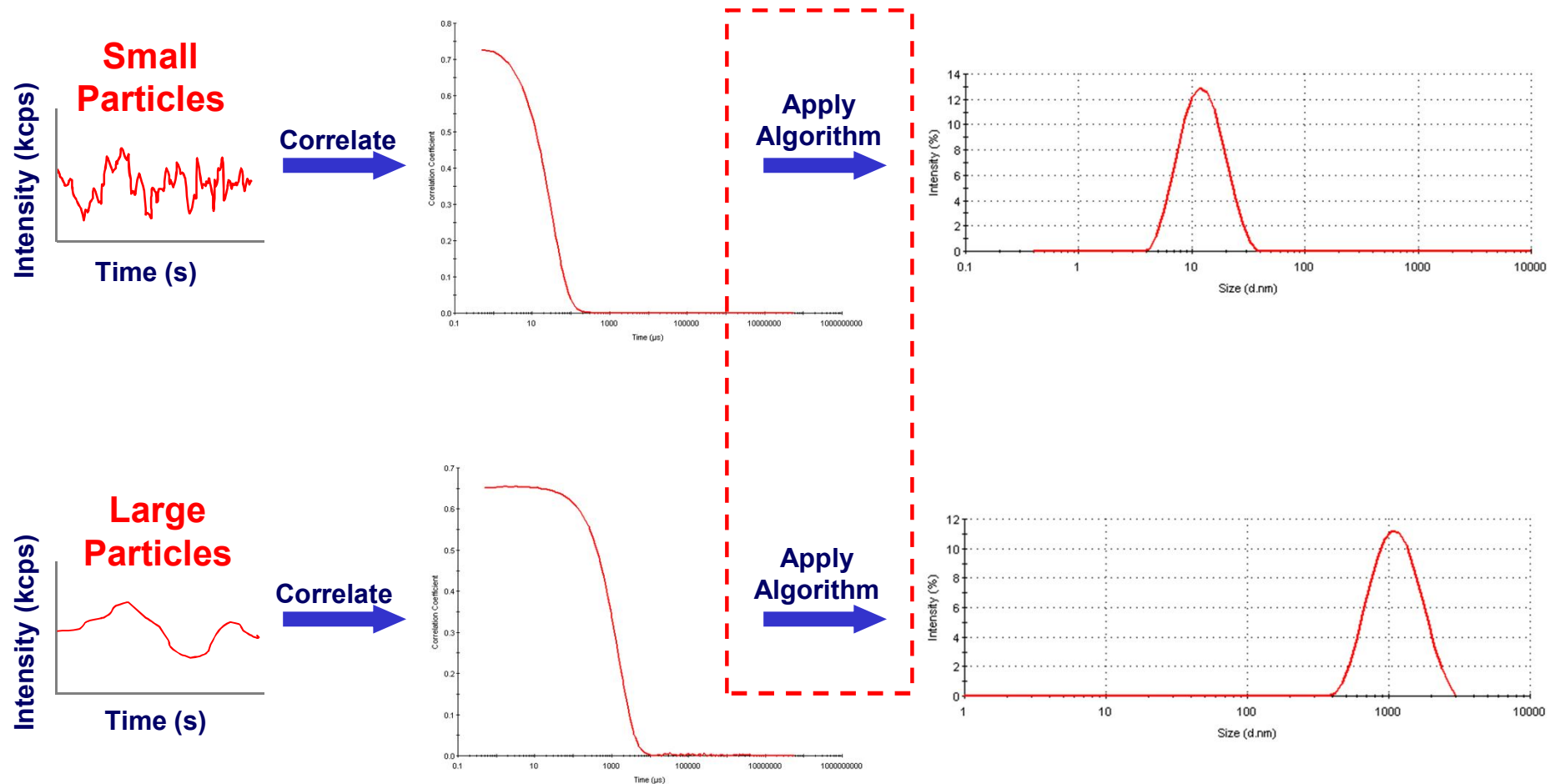
▶ 动态光散射



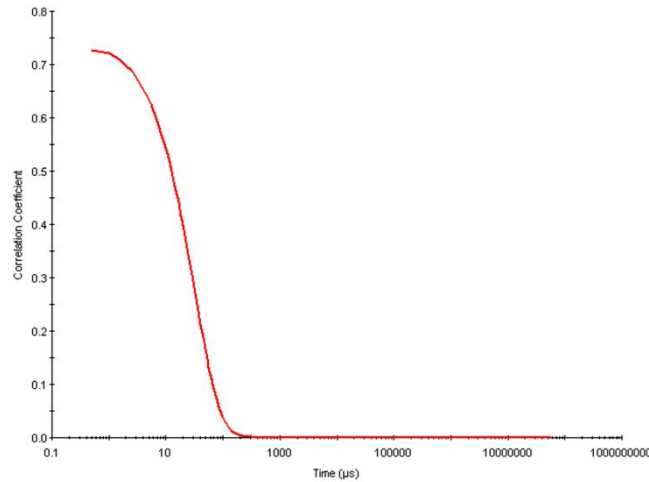
由相关曲线得到粒径信息：数据分析



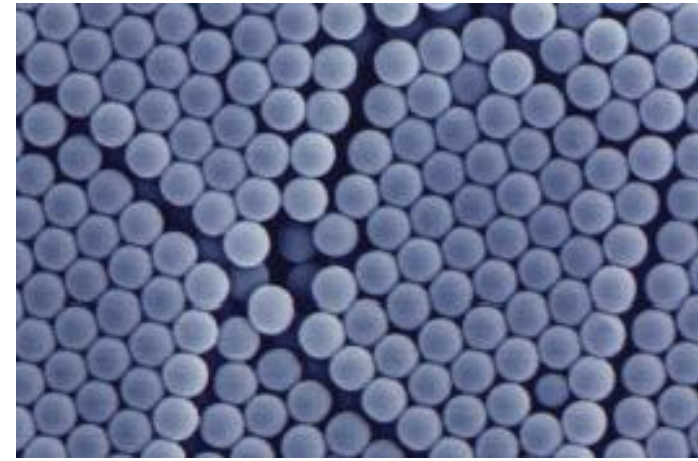
光强波动，相关函数和粒径分布



相关曲线



对于单分散体系



$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma t)$$

这里:

$\Gamma = Dq^2$ 为衰减率

D 为扩散系数

$q = (4\pi n / \lambda_0) \sin(\theta/2)$ 为散射矢量

n 为折光指数

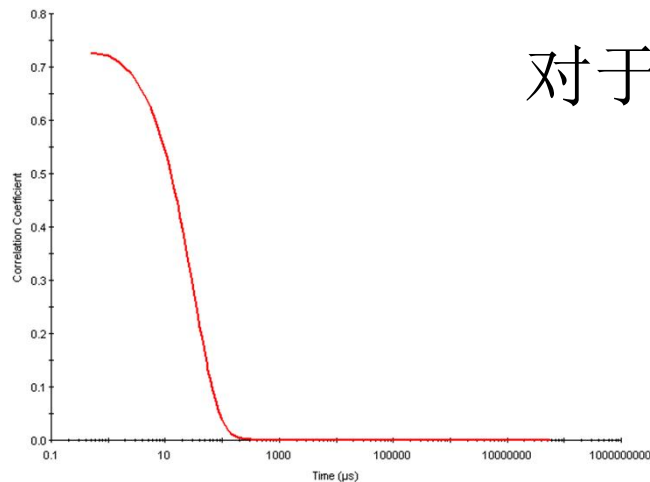
λ_0 为照射光波长

θ 为散射角度

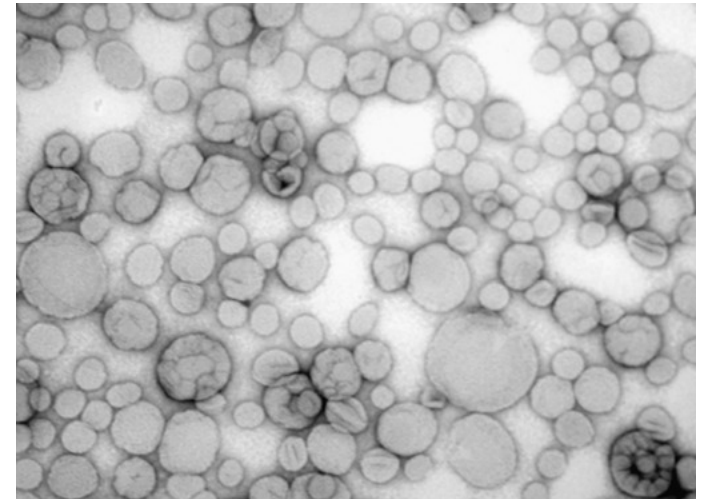
STOKES-EINSTEIN
EQUATION

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d(h)}$$

相关曲线



对于多分散体系



1. 累积距法：得到平均粒子尺寸和分布系数 (PD.I)

$$\ln g_1(\tau) = \ln A - \bar{\Gamma}t + (\mu_2 / 2!)t^2 - (\mu_3 / 3!)t^3$$

2. 多指数分析模型：得到粒子实际尺寸和分布

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma$$

这里 $g_1(\tau)$ 是相关曲线中所有指数衰减的总和

累积距法

- ▶ ISO13321 阐述用三次方多项式拟和相关方程

$$\ln g_1(\tau) = \ln A - \bar{\Gamma}t + (\mu_2 / 2!)t^2 - (\mu_3 / 3!)t^3$$

这里 τ 是衰减时间

- ▶ $\bar{\Gamma}$ 与z-均 扩散系数相关

$$\bar{\Gamma} = q^2 \bar{D}$$

- ▶ 由z-均 扩散系数得到z-均直径

$$\bar{D} = \frac{k_B T}{3\pi\eta d(h)}$$

- ▶ $\mu_2 / \bar{\Gamma}^2$ 为分布系数PD.I



分布系数 (PD.I)

分布系数值	注解
< 0.05	单分散体系，如一些乳液的标样。
< 0.08	近单分散体系，但动态光散射只能用一个单指数衰减的方法来分析，不能提供更高的分辨率。
0.08 - 0.7	适中分散度的体系。运算法则的最佳适用范围。
> 0.7	尺寸分布非常宽的体系，很可能不适合光散射的方法分析。



多指数分析模型对于分布的分析

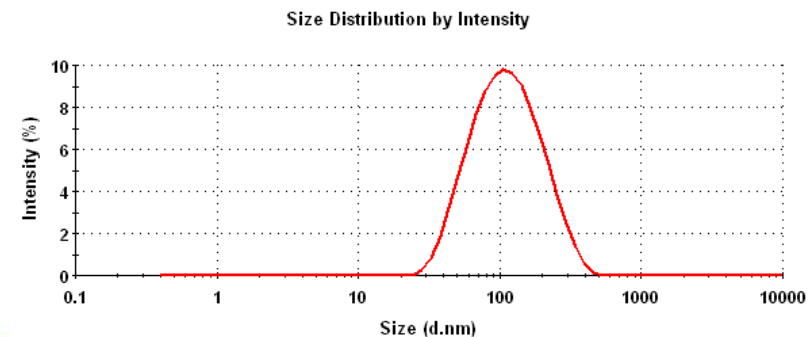
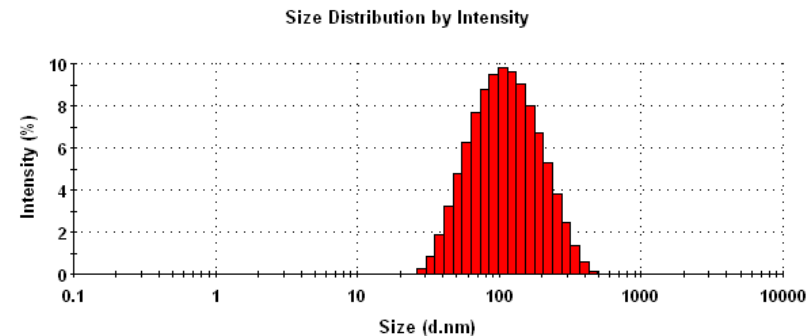
$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma_i) \exp(-\Gamma_i \tau) d\Gamma$$

得到多组
和其

粒径 $\Gamma_i \rightarrow D_i$
相对强度 $G(\Gamma_i)$

- ▶ **general purpose** 算法适用于大部分分布状况未知的样品
- ▶ **multiple narrow mode** 算法适用于已知的分布状况不连续的样品
- ▶ **CONTIN and Discrete exponential**

Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0.4000	0.0	13.54	0.0	458.7	5.1
0.4632	0.0	15.69	0.0	531.2	3.1
0.5365	0.0	18.17	0.0	615.1	1.4
0.6213	0.0	21.04	0.0	712.4	0.4
0.7195	0.0	24.36	0.0	825.0	0.0
0.8332	0.0	28.21	0.0	955.4	0.0
0.9649	0.0	32.67	0.0	1106	0.0
1.117	0.0	37.84	0.0	1281	0.0
1.294	0.0	43.82	0.0	1484	0.0
1.499	0.0	50.75	0.0	1718	0.0
1.736	0.0	58.77	0.0	1990	0.0
2.010	0.0	68.06	0.0	2305	0.0
2.328	0.0	78.82	0.1	2669	0.0
2.696	0.0	91.28	1.0	3091	0.0
3.122	0.0	105.7	2.7	3580	0.0
3.615	0.0	122.4	5.1	4145	0.0
4.187	0.0	141.8	7.6	4801	0.0
4.849	0.0	164.2	9.8	5560	0.0
5.615	0.0	190.1	11.4	6439	0.0
6.503	0.0	220.2	12.2	7456	0.0
7.531	0.0	255.0	12.1	8635	0.0
8.721	0.0	295.3	11.2	1.000e4	0.0
10.10	0.0	342.0	9.5		
11.70	0.0	396.1	7.4		



光强, 体积和数量分布

- 米式理论, 输入颗粒的折光指数和吸收率



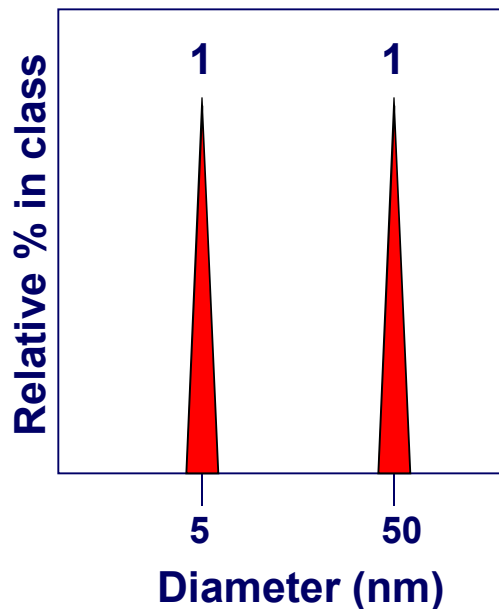
设想一个由相等数量的 5 nm 和 50nm 球型粒子组成的混合物

$$N_1:N_2$$

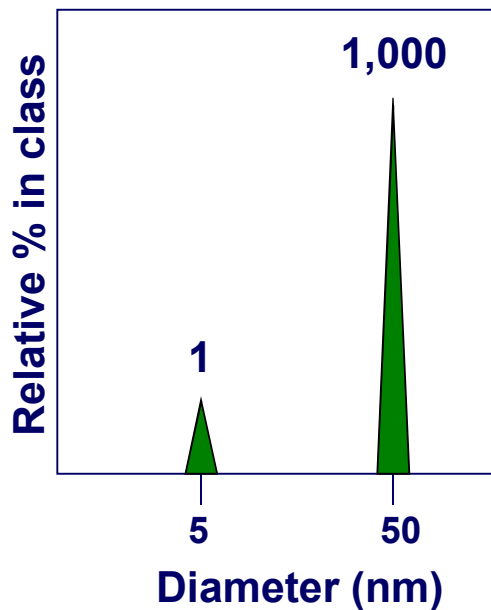
$$N_1 \cdot \frac{3}{4}\pi r_1^3 : N_2 \cdot \frac{3}{4}\pi r_2^3$$

$$N_1 V_1 : N_2 V_2$$

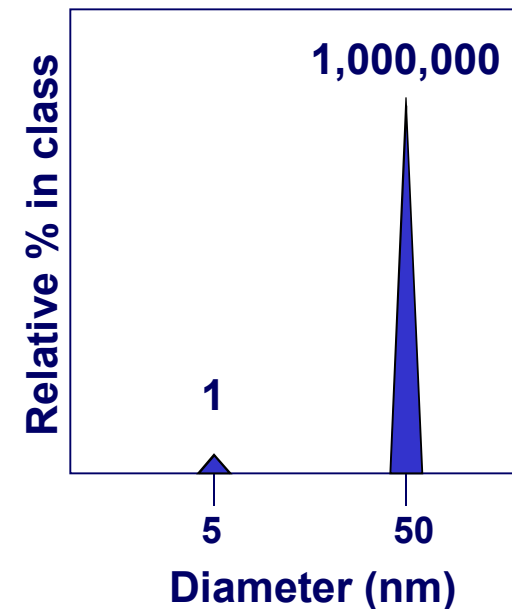
$$N_1 V_1^2 : N_2 V_2^2$$



数量平均粒径 $\approx 28\text{nm}$



体积平均粒径 $\approx 49\text{nm}$

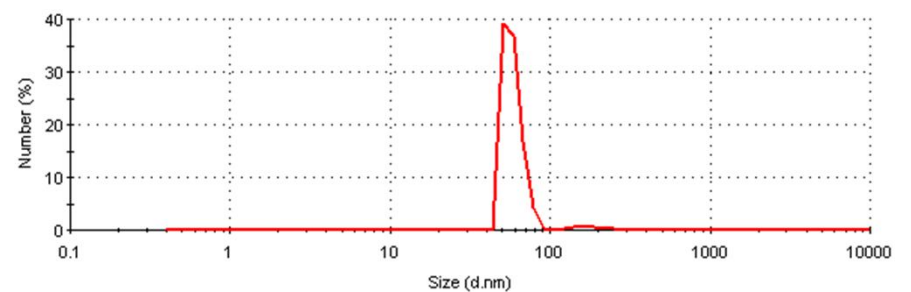
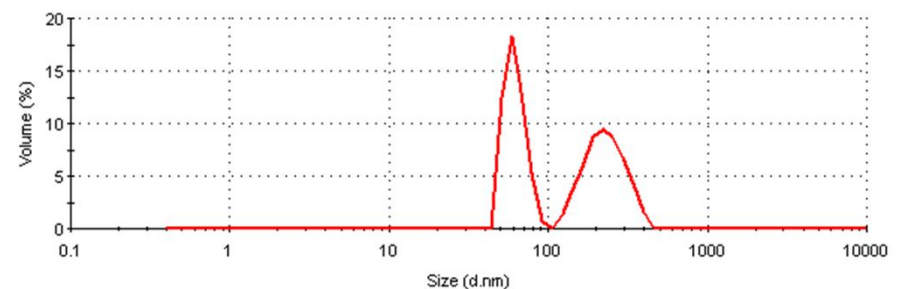
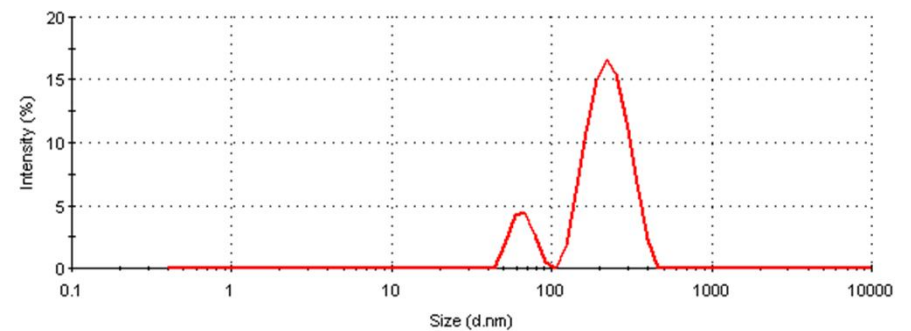


光强平均粒径 = 50nm

光强，体积和数量分布: 例子

60nm 和 220nm 聚苯乙烯乳液标样1:1 体积混合
 z-均直径 = 168nm
 PDI = 0.215

	Peak 1		Peak 2	
	Mean (nm)	%	Mean (nm)	%
Intensity	231	86.3	65.8	13.7
Volume	232	50.3	61.8	49.7
Number	184	2.6	58.2	97.4



微流变 - Microrheology



Zetasizer ZSP

DTS 7.0软件

针对弱散射样品，如蛋白质和纳米颗粒稀溶液

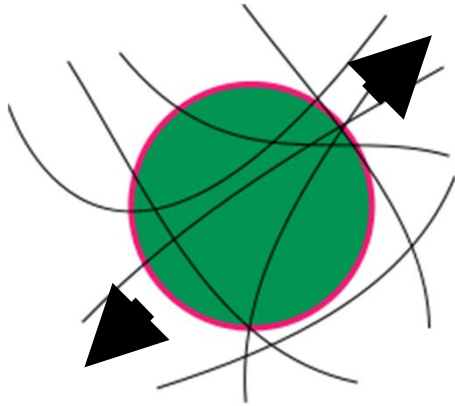


动态光散射微流变应用

- ▶ 低粘度、弱结构和对于应变敏感的样品
 - 对于粘弹性的测试超过旋转流变仪
- ▶ 高分子溶液
 - 高频率 G' , G''
 - 稀或者半稀范围
- ▶ 治疗蛋白
 - 监控蛋白质开始聚集
 - 蛋白质溶液的粘度随浓度的变化



原理

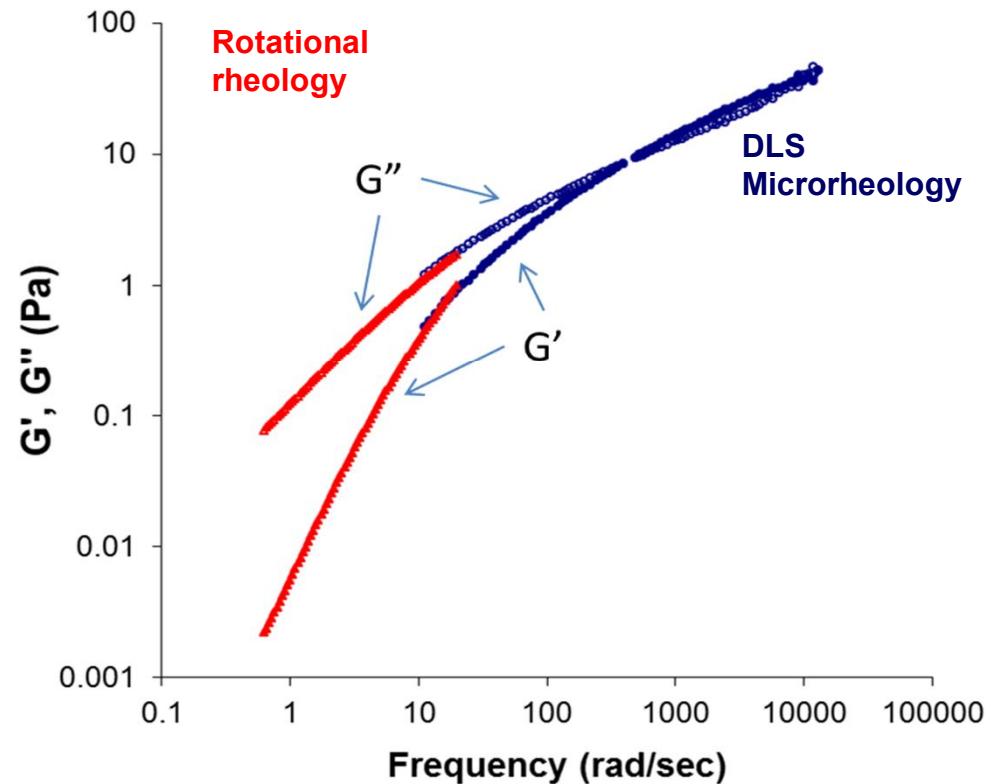


- 将示踪粒子加入到想要研究的体系中，如蛋白或者高分子稀溶液
- 悬浮在溶液系统中的颗粒通过热能交换 $k_b T$ 作无规运动。
- 颗粒的运动方式受到周围环境的流变性质所决定。
- 检测颗粒的运动就可以得到流变的信息。

DLS 微流变 — 和旋转流变仪功能互补

► 检测 PEO 稀溶液

- 检测范围和旋转流变仪有交叉的部分
- 扩展粘弹性谱图的频率测试范围
- 可以检测高频数据



Contents

- ▶ 动态光散射
 - 测量原理
 - 由相关曲线得到粒径信息 – 数据分析
 - 样品要求及制备
- ▶ 静态光散射
- ▶ 与色谱连接flow-mode
- ▶ Zeta 电位/表面电位
- ▶ 温度趋势
- ▶ 应用

静态光散射

Static light scattering (SLS)

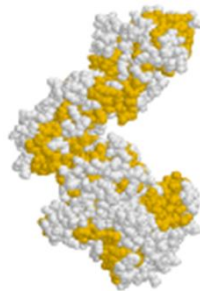
- ▶ 在静态光散射中，我们检测溶质粒子的绝对散射光强虽浓度的变化
- ▶ 在Zetasizer Nano ZS中，我们在一个角度检测光强
- ▶ 通过Debye曲线我们可以测量
 - 绝对分子量
 - 第二维利系数



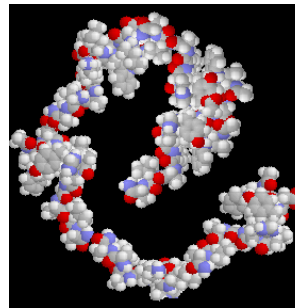
什么样的样品适合静态光散射?

YES

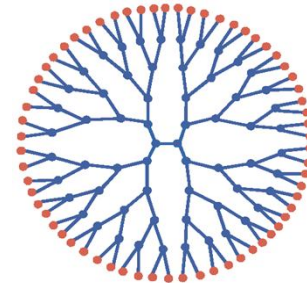
Proteins



Polymers

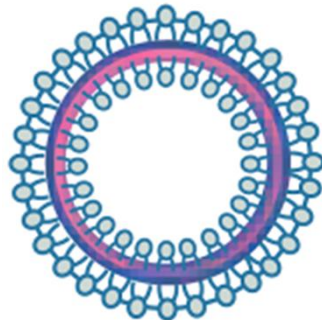


Dendrimers

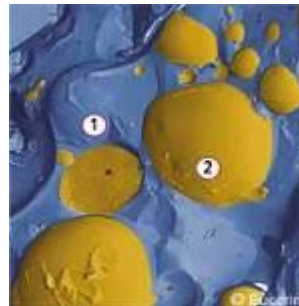


NO

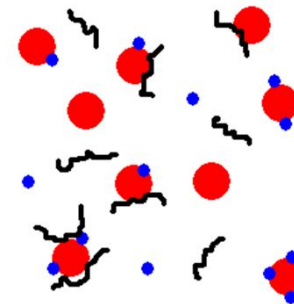
Liposomes



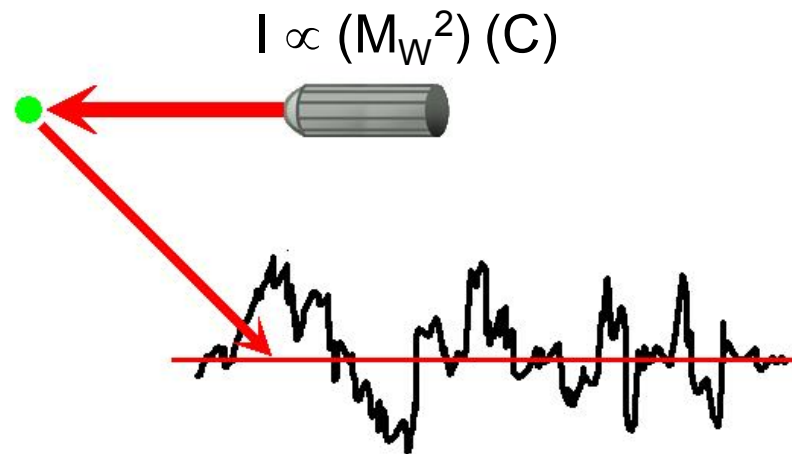
Emulsions



Mixtures



静态光散射



$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C \right) \quad (\text{Rayleigh Equation})$$

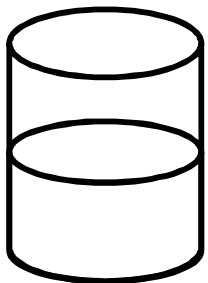
K : 光学常数
M : 分子量
 A_2 : 2nd 维利系数

C : 浓度
 R_θ : 样品的瑞利比
 $P(\theta)$: 形态因子

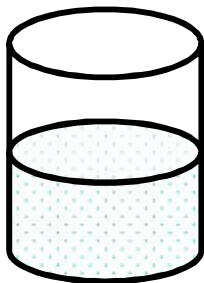


样品制备

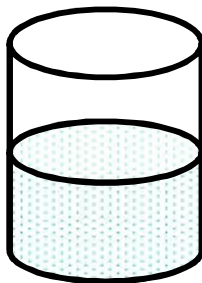
- ▶ 在适合的溶剂中，制备一系列已知准确浓度的样品溶液
- ▶ 具体浓度依赖于所测量的样品，一般在0.1-10g/L



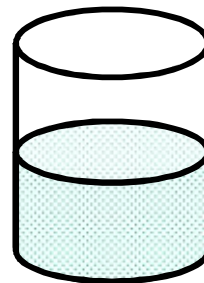
溶剂



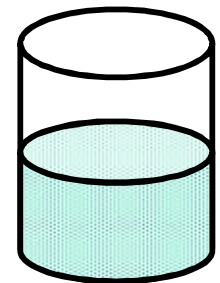
1



2



3



4

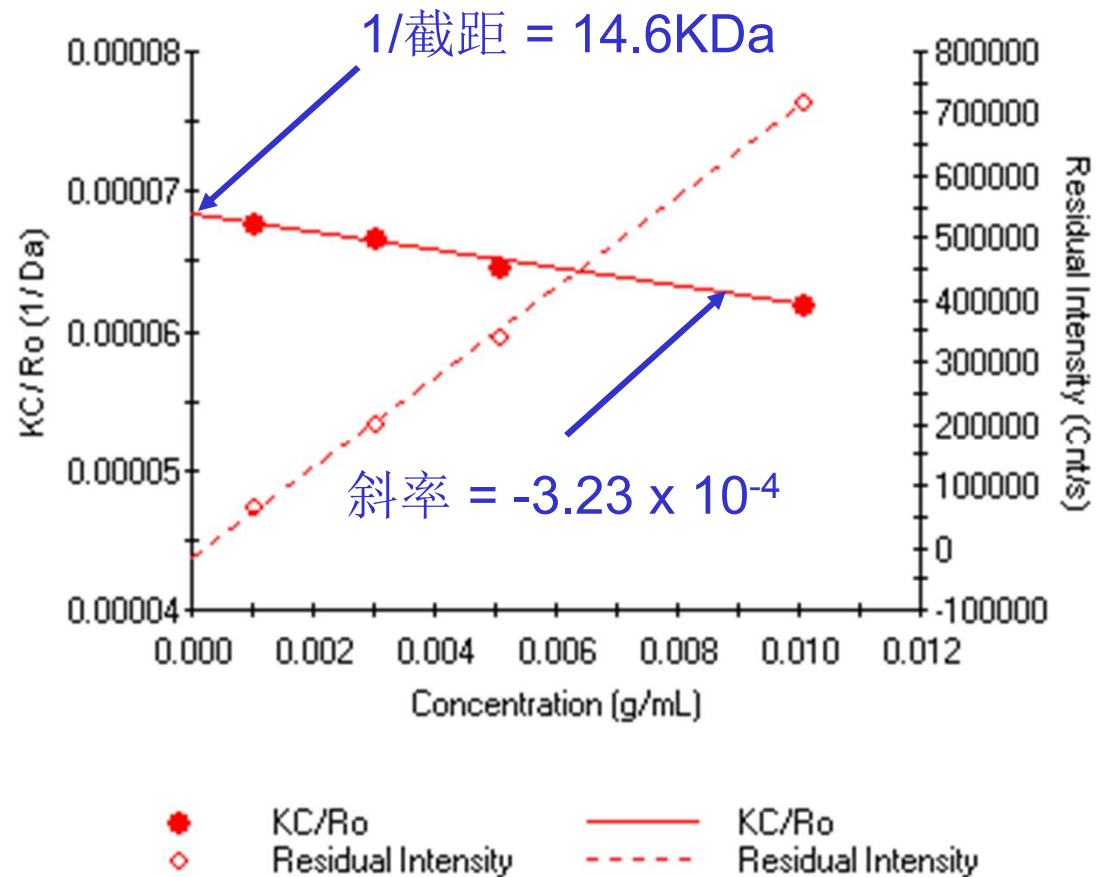


样品制备

- ▶ 所有使用的玻璃容器，吸液管，样品池，溶剂，均应无尘
- ▶ 用过滤膜过滤所有的溶剂，分散剂 (e.g. Whatman Anotop 20nm pore size filters)



分子量测定应用实例 (Lysozyme in PBS)



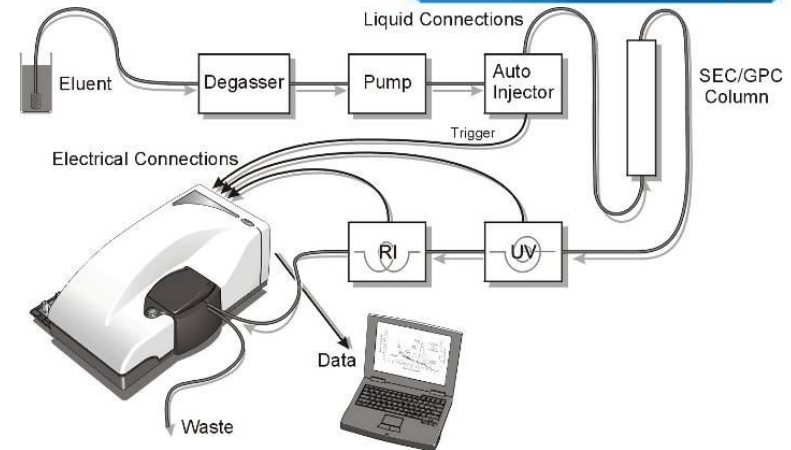
Contents

- ▶ 动态光散射
 - 测量原理
 - 由相关曲线得到粒径信息 – 数据分析
 - 样品要求及制备
- ▶ 静态光散射
- ▶ 与色谱连接flow-mode
- ▶ Zeta 电位/表面电位
- ▶ 温度趋势
- ▶ Zeta Nano ZS的应用

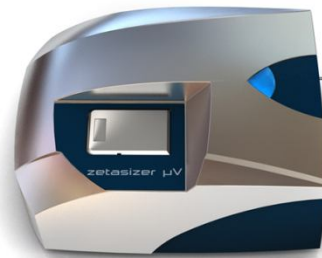


与液相色谱联合使用

- 更高的分辨率，更详细准确的分布信息
- 将液相色谱分离技术（SEC/GPC）和光散射技术(DLS)检测技术相结合，从而测量体系中不同成分的绝对尺寸和绝对分子量



Zetasizer μ V



- 流动模式动/静态光散射
- 绝对分子量及其分布
- 颗粒大小及其分布

Zetasizer Nano

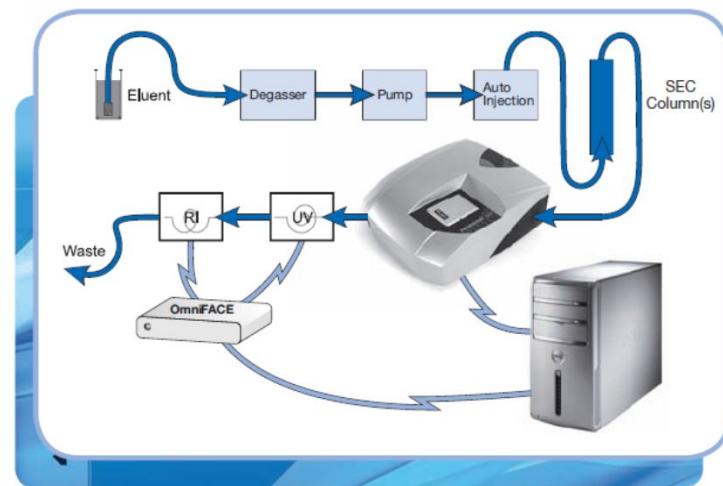


- 流动模式动态光散射
- 颗粒大小及其分布

Flow-mode和SEC/GFC连用作为动静态光 散射检测器



- 无需色谱柱校准
- 安装简单，只需添加到采用 浓度检测器的色谱系统，如UV或RI，即可
- 通过大小和绝对分子量确定流出组分
- 稳定的激光和光学装置意味着 优异的基线稳定性和信噪比，以及最高灵敏度
- 8 μ L 流动池体积最大限度地减少样品扩散效应
 - 保存每一个时间点相关函数



Flow-mode和SEC/GFC连用作为 动静态光散射检测器

低聚态

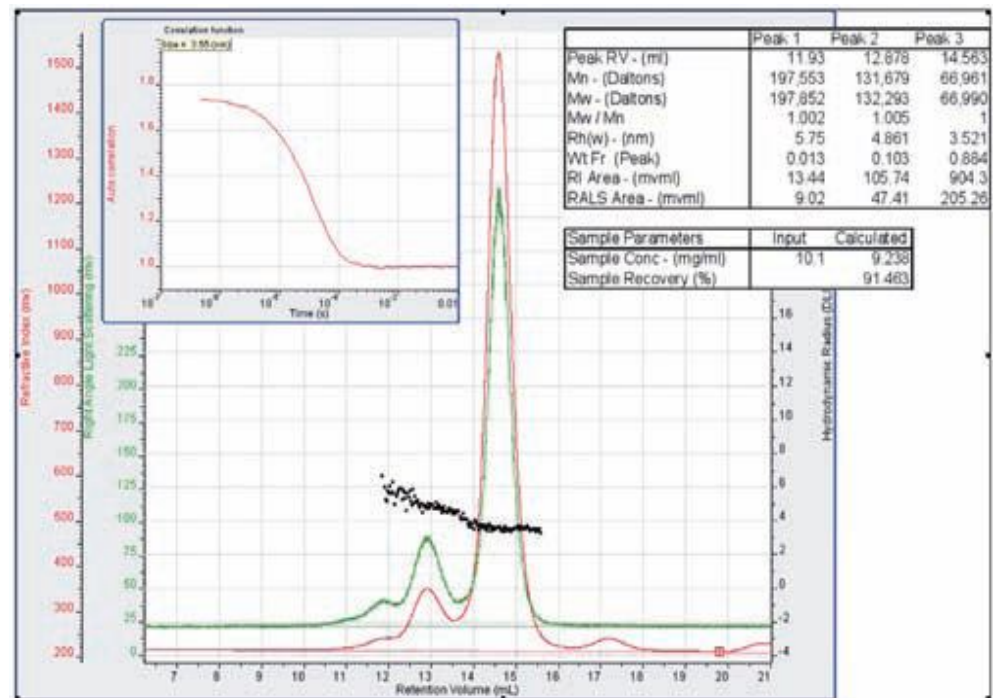
许多蛋白质的活动取决于其低聚态。通过色谱系统分离蛋白质低聚物混合物，能够测量每个组分分子的大小和绝对分子量，并确定其低聚体形式。

定量分析

许多研究者对于确定缔合或已形成的低聚物的各种组分含量非常感兴趣。色谱的分离能力使其能够得到充分、完整的表征。可以测量每个峰的分子量、浓度和含量。

共轭

许多蛋白质与其他分子共轭，如糖、表面活性剂或聚乙二醇（PEG）。如果体系中同时具有两个浓度探测器（RI+UV）则意味着可以进行共轭分析，以确定分子量和复杂的组成。



Contents

- ▶ 动态光散射
 - 测量原理
 - 由相关曲线得到粒径信息 – 数据分析
 - 样品要求及制备
- ▶ 静态光散射
- ▶ 与色谱连接flow-mode
- ▶ Zeta 电位/表面电位
- ▶ 应用

表面电荷的起源

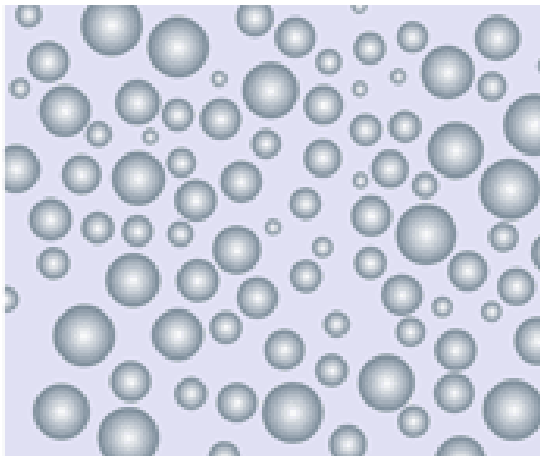
- ▶ 大部分存在于水体系中的胶体颗粒携带电荷
- ▶ 关于表面电荷的产生，有很多原因，依赖于粒子的表面性质和周围的媒体
 - 表面基团离子化
 - 有失去或者得到离子的趋势
 - 带电物质吸附在粒子表面



维持系统稳定性: 静电排斥作用

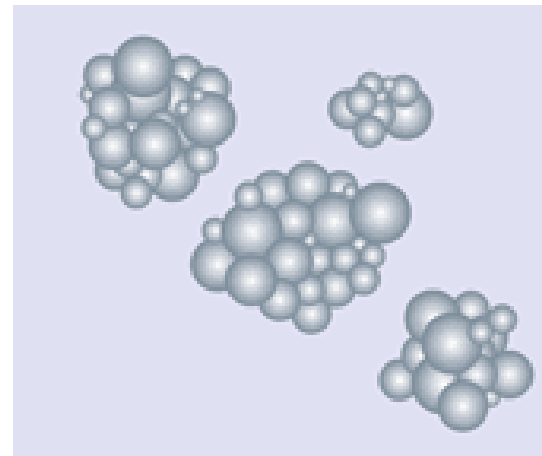
高 电位

- ▶ 颗粒间相互排斥力高
- ▶ 样品稳定



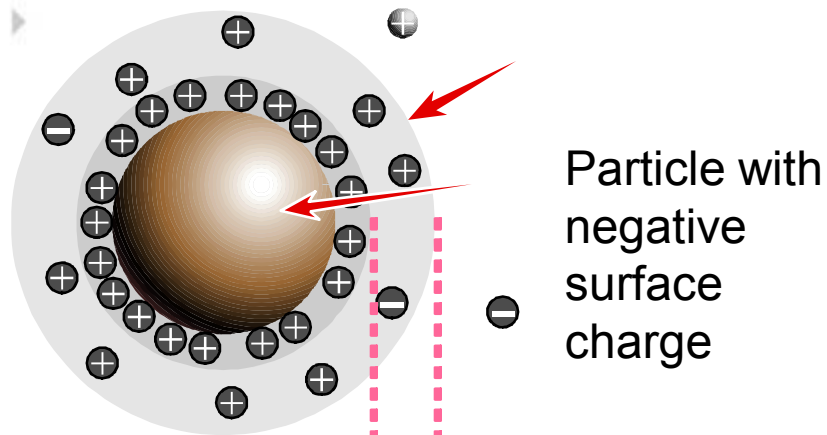
低 或者 零 电位

- ▶ 絮凝、团聚、沉淀
- ▶ 不稳定样品



Zeta电位(Zeta Potential)

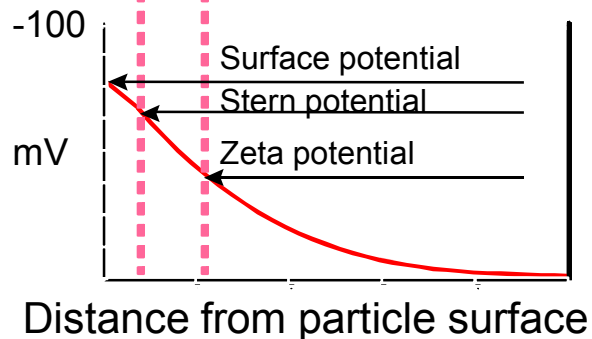
什么是Zeta电位？



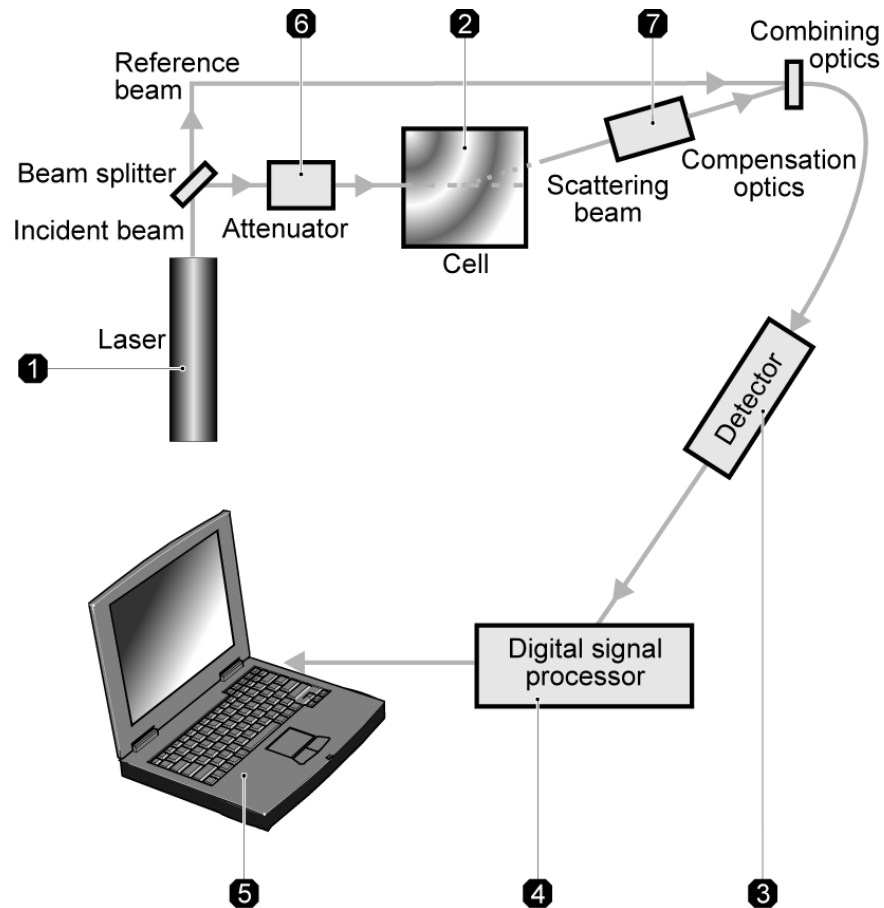
- ▶ Zeta电位同时依赖于粒子表面和分散剂的化学性质
- ▶ 对于静电力稳定的分散体系，通常是Zeta电位越高，体系越稳定
- ▶ 体系稳定与否通常以Zeta电位是否大于 $\pm 30\text{mV}$ 为标准

影响Zeta电位的因素

- ▶ 影响Zeta电位的因素有：
 - pH变化,
 - 电导率 (浓度, 盐的类型)
 - 组成成分浓度的变化 (如高分子, 表面活性剂)



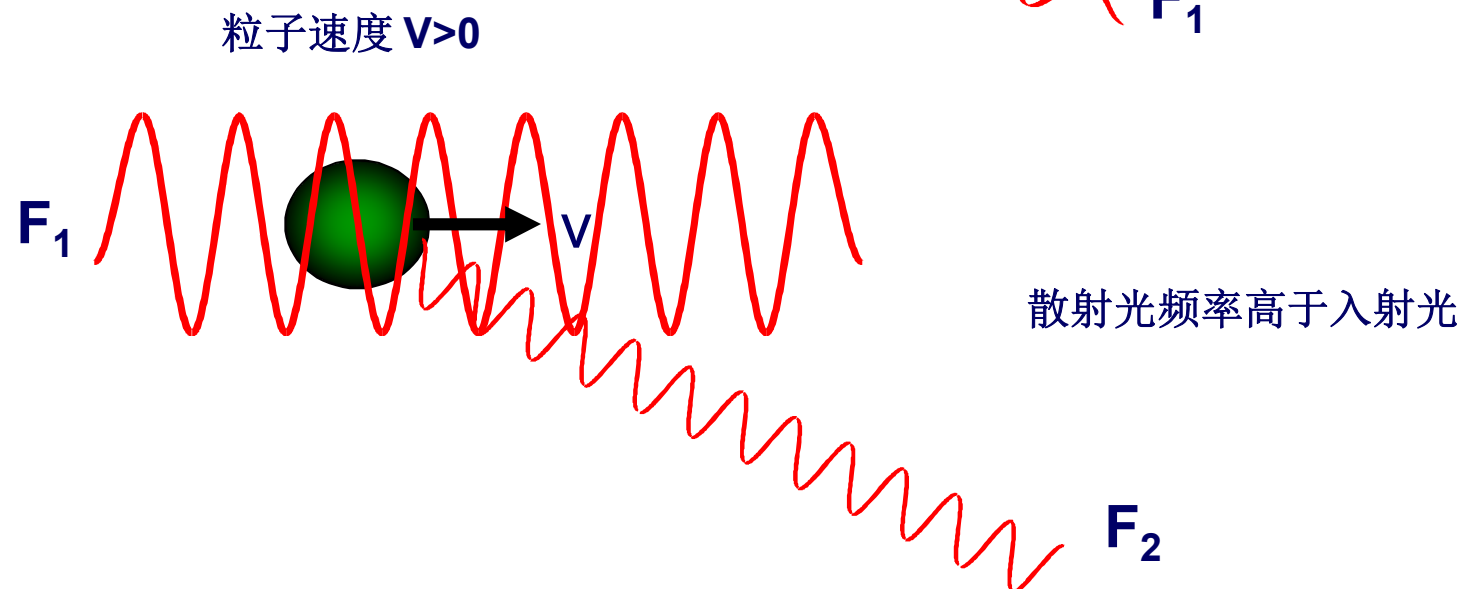
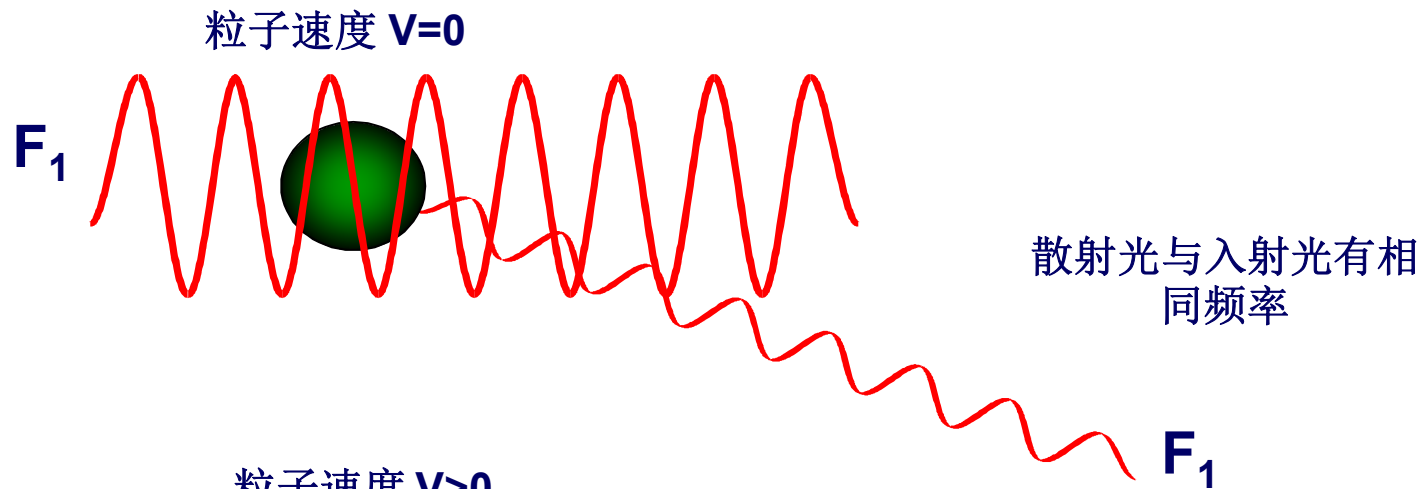
Zetasizer Nano是如何测量zeta电位的?



- ▶ 样品的散射光和参考光源相干产生调制信号
- ▶ 频率分析得出粒子电泳运动速度
- ▶ **Zeta**电位由**Henry** 方程换算而得

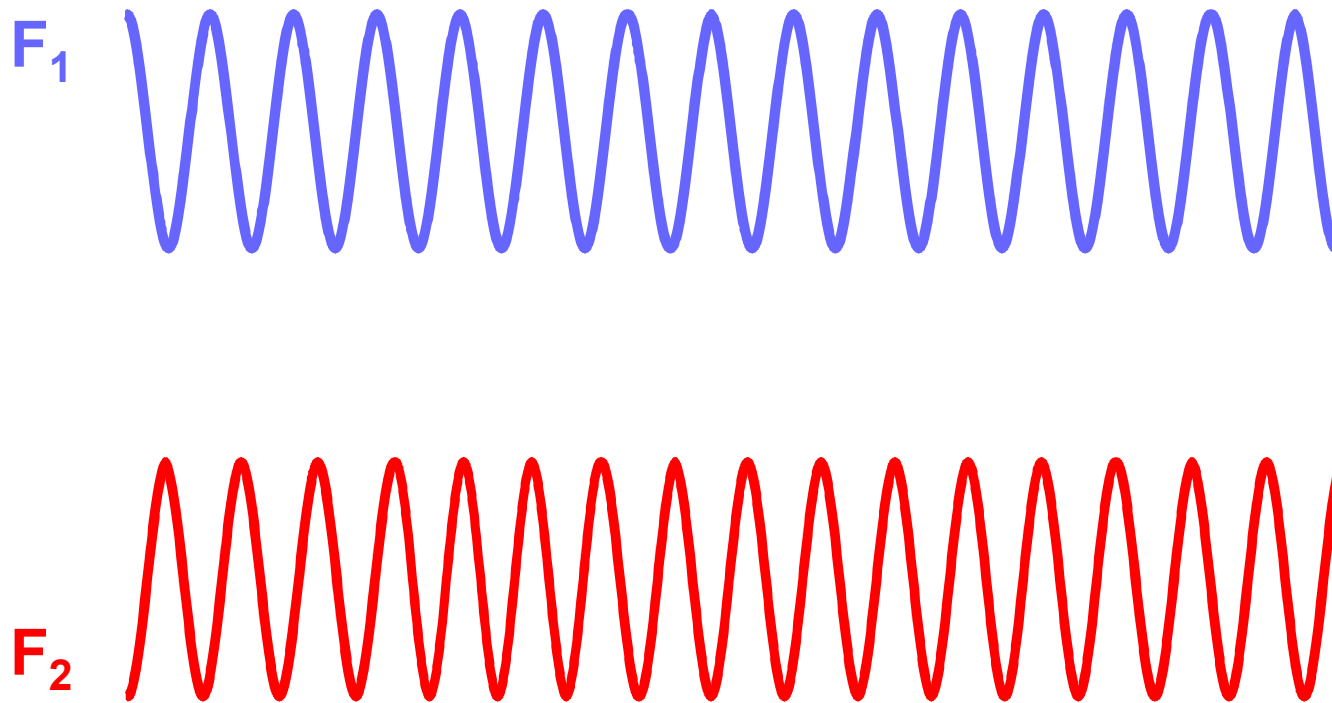
用激光多普勒电泳测量Zeta电位

- 相位分析光散射技术



光强的波动是怎样被引发的？

参考光 F_1 和散射光 F_2

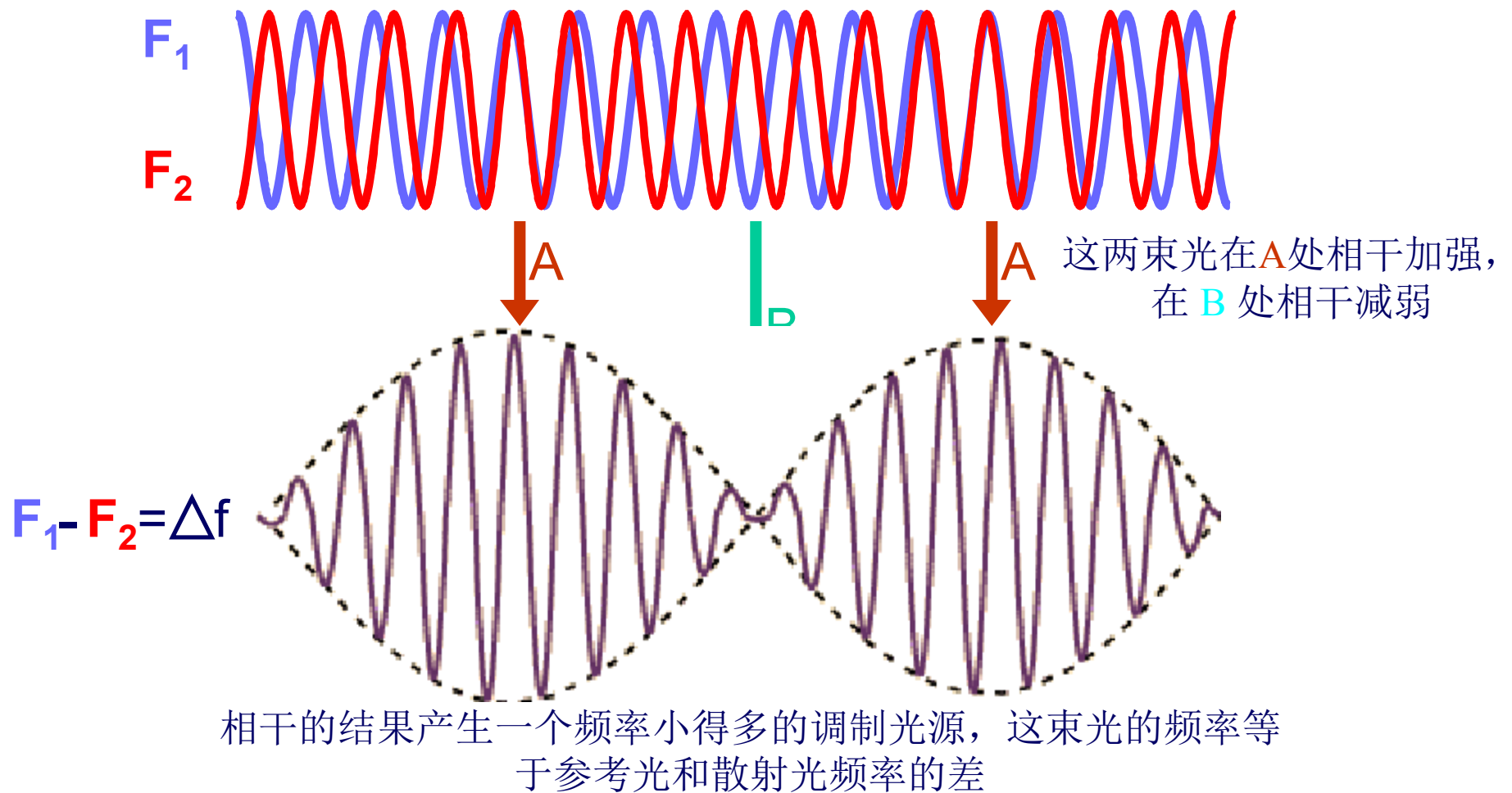


将两束光结合

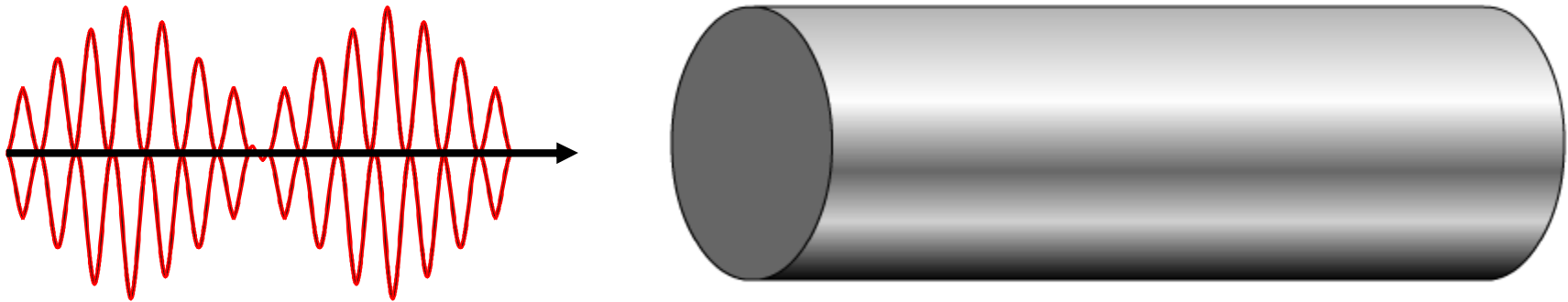


光强的波动是怎样被引发的？

参考光 F_1 和 散射光 F_2



拍频被聚焦到检测器处



检测器检测的是光强随时间的波动，进而得到拍频，
进而得到带电粒子速度信息

电泳光散射

- ▶ 一束激光穿照射在进行电泳运动的样品上，由于颗粒的电泳运动，散射光的频率发生偏移
- ▶ 频率的偏移 Δf 与电泳的速度相关:

$$\Delta f = 2v \sin(\theta/2)/\lambda$$

v = 粒子的电泳速度

λ = 激光波长

θ = 散射角

电泳 ELECTROPHORESIS

→ Zeta 电位可利用 HENRY EQUATION 由带电粒子电泳速度得到

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

U_E = 电泳速度

ζ = zeta 电位

ε = 介电常数

η = 粘度

$f(\kappa a)$ = Henry's function



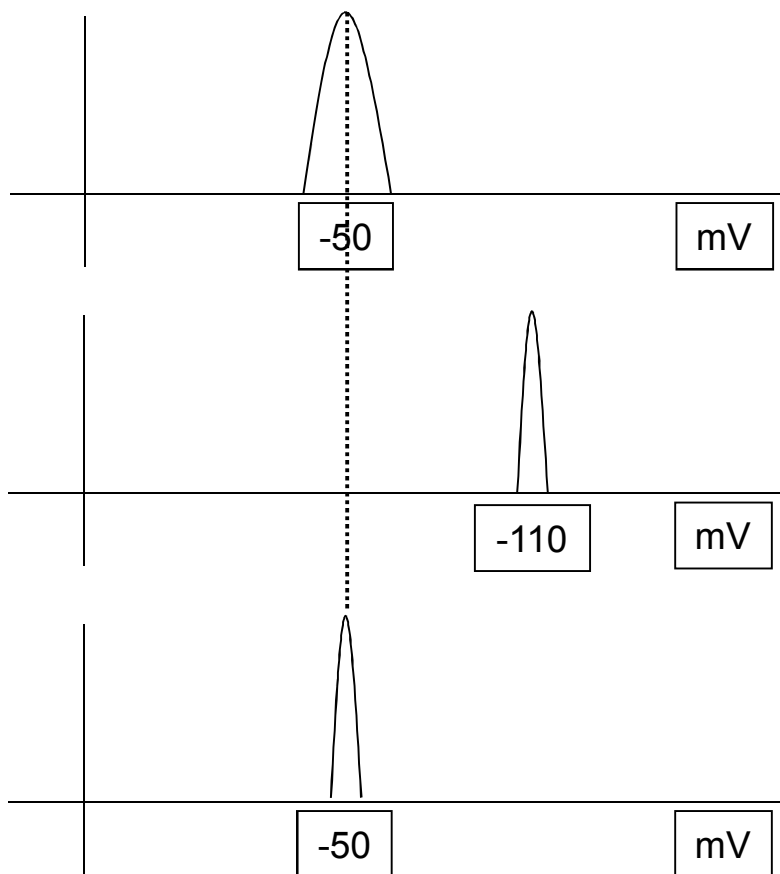
专利Zeta电位毛细管样品池 Disposable Zeta Cell

General Purpose
= FFR + SFR = M3

FFR: 高频转换
SFR: 低频转换



M3 测试技术



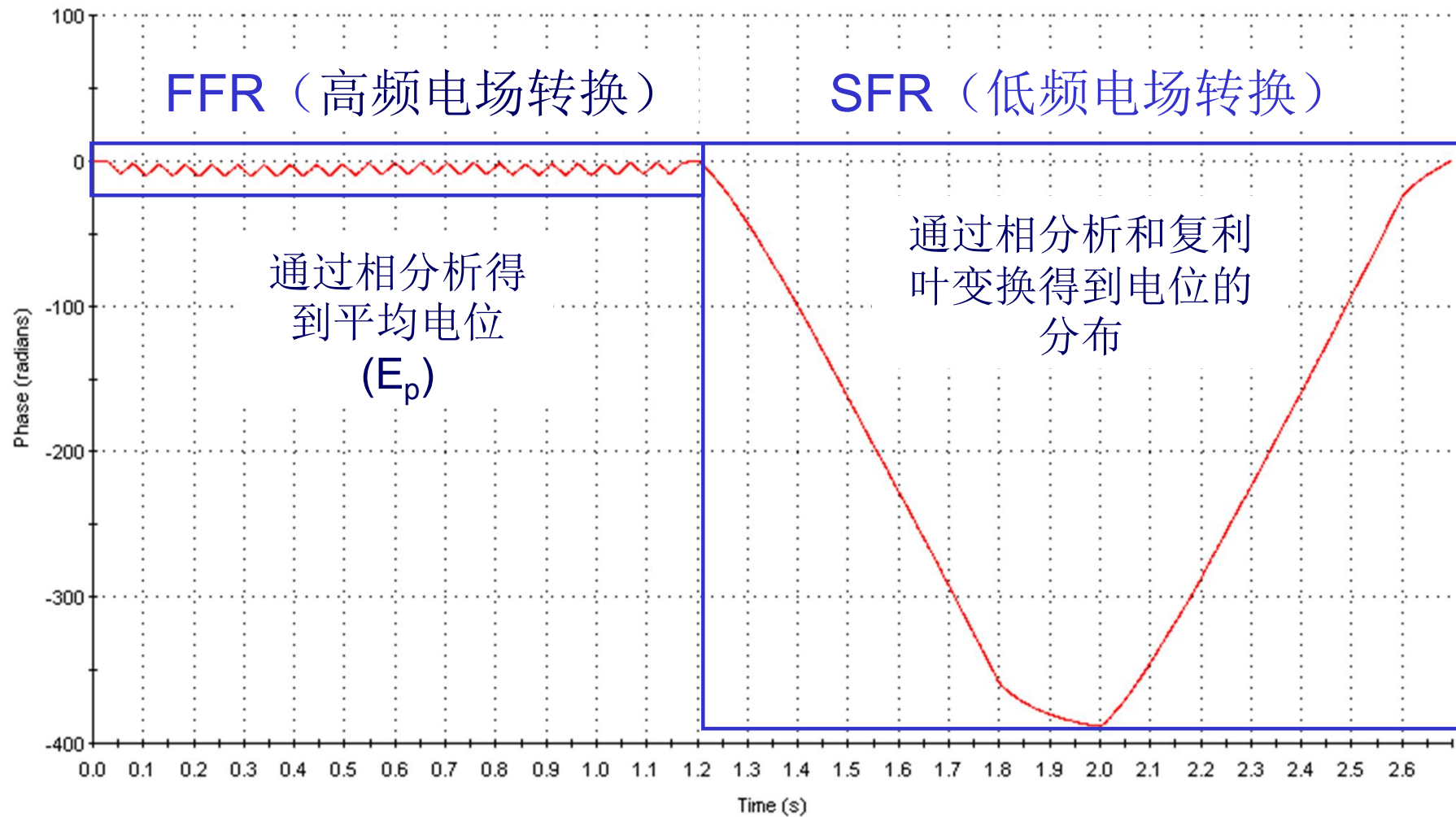
高频电场转换1000Hz能够准确地测量**zeta**电位的平均值，但是分辨率较低

低频电场的转换可以给出更好的分辨率但是受到电渗的影响

通过**M3**测试技术，结合高频和低频电场的转换，我们既得到准确地平均**zeta**电位，又得到了较高的分辨率



常规模式 (General Purpose) 相曲线



自动滴定仪 MPT-2 autotitrator



自动滴定仪可以进行以下滴定:

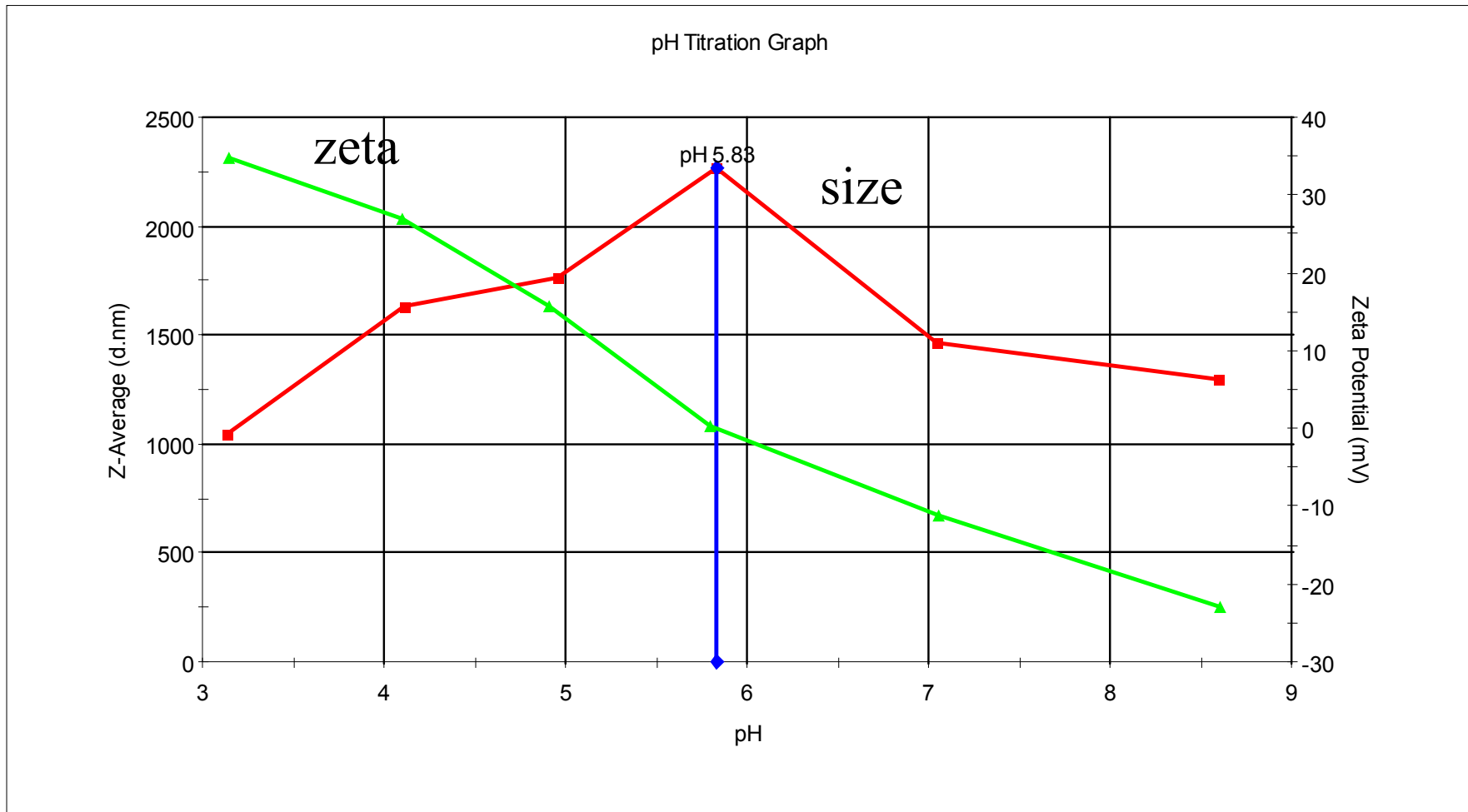
- pH
- 电导率
- 稀释 (样品浓度)

二氧化钛

- ▶ TiO_2 有广泛的应用:
 - 色素, 墨水和涂料
 - 食品, 医药和化妆品
 - 高分子, 纸张
- ▶ 有多种天然存在状态, 伴随着不同的性质
 - 金红石/Rutile
 - 锐钛矿/Anatase
 - 板钛矿/Brookite



TiO₂ 的pH滴定

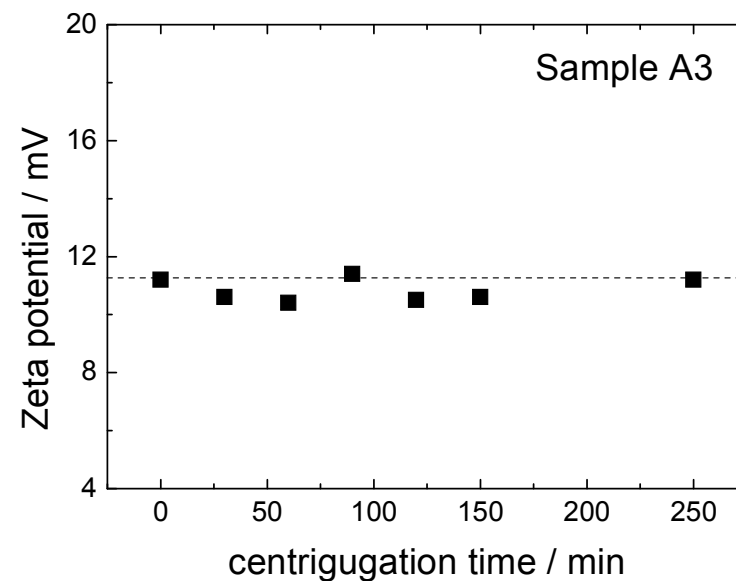
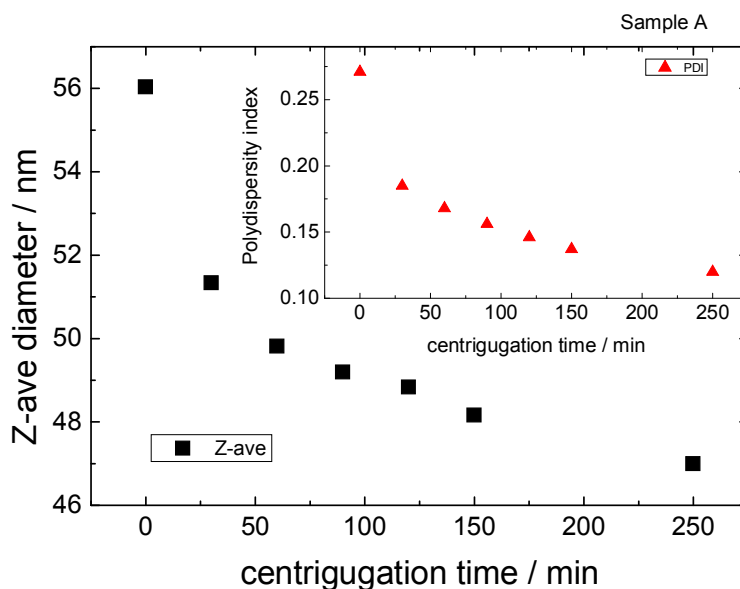


Zeta电位和颗粒大小的关系

- Zeta电位是颗粒在分散液中表面化学的体现
- 与溶液环境和颗粒的材质相关
- zeta电位是表面电荷分布密度体现
- 原则上，与颗粒大小无关



CMP slurry



但是zeta电位不变

随着离心时间，颗粒平均粒径变小

蛋白质的电泳测试*

► 改进的蛋白电泳测试包括三个部分:

1. 高灵敏度系统

- Zetasizer Nano ZSP

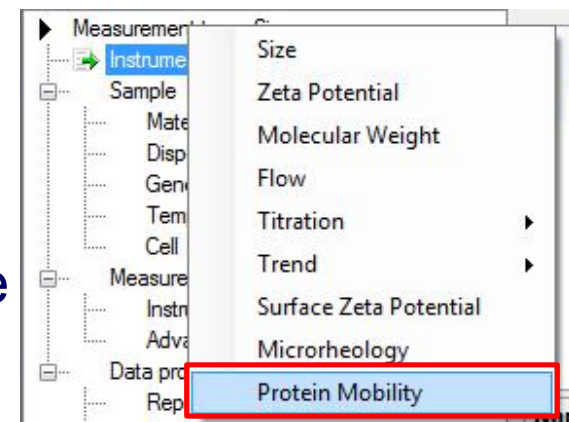


2. 保护样品和电极相互作用

- Diffusion Barrier Method

3. 恰当的测试方法

- Protein mobility measurement type



*Ref: ASTM E2865

1mg/mL BSA 电泳运动

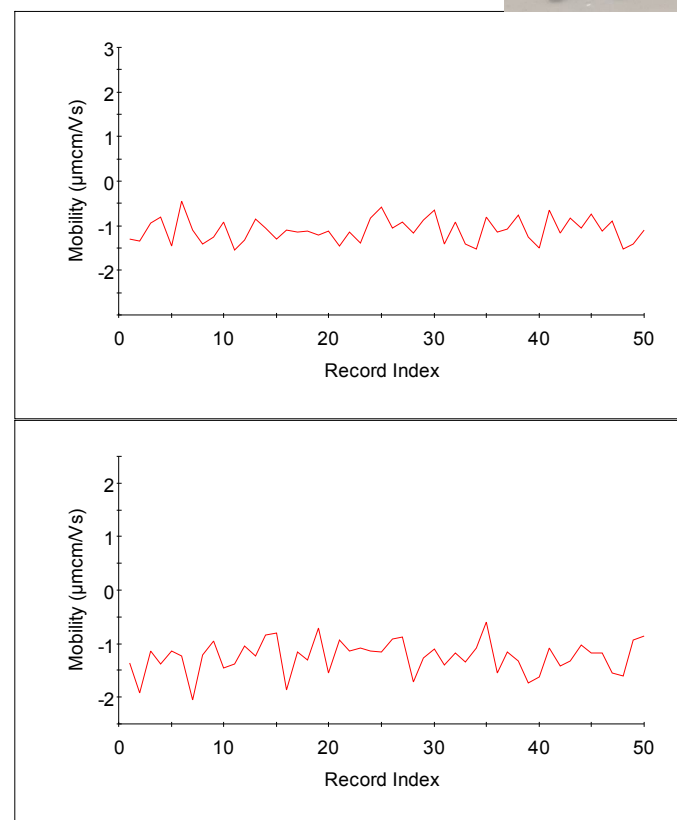
- ▶ 使用 “diffusion barrier” 得到稳定的结果

- $-1.184 \pm 0.091 \mu\text{mcm/Vs}$

- 4 个样品 50次重复测试

Record number	Mean protein mobility (mean \pm SD) ($\mu\text{mcm/Vs}$)
1-50	-1.103 ± 0.2745
51-100	-1.11 ± 0.3435
101-150	-1.279 ± 0.2675
151-200	-1.245 ± 0.3083

Average mobility	-1.184 ± 0.091
------------------	--------------------



表面zeta点为

- ▶ 检测不溶于溶剂的材料表面的zeta电位
 - 样品尺寸 5mm * 3mm, 1mm 厚度
- ▶ 应用材料
 - 滤膜
 - 骨骼材料
 - 接触透镜
 - 蛋白相互作用
- ▶ 功能
 - 检测各种环境改变对于材料表面电荷的影响
 - 环境表面对于材料表面吸附造成的影响, 如 pH、盐浓度、环境组分的浓度改变



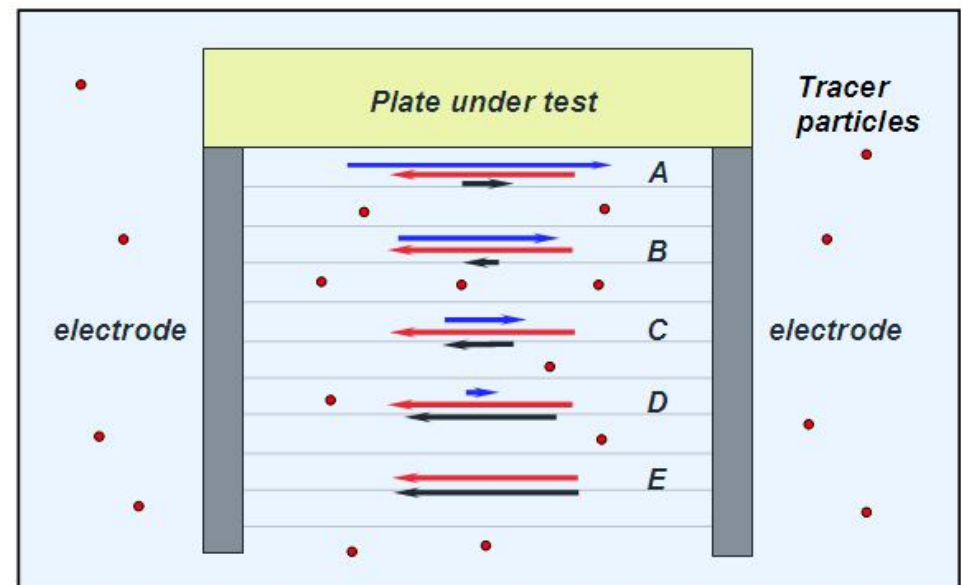
ZEN1020 表面 zeta 电位样品池

- ▶ 包括电极、样品池组件、专用工具



原理

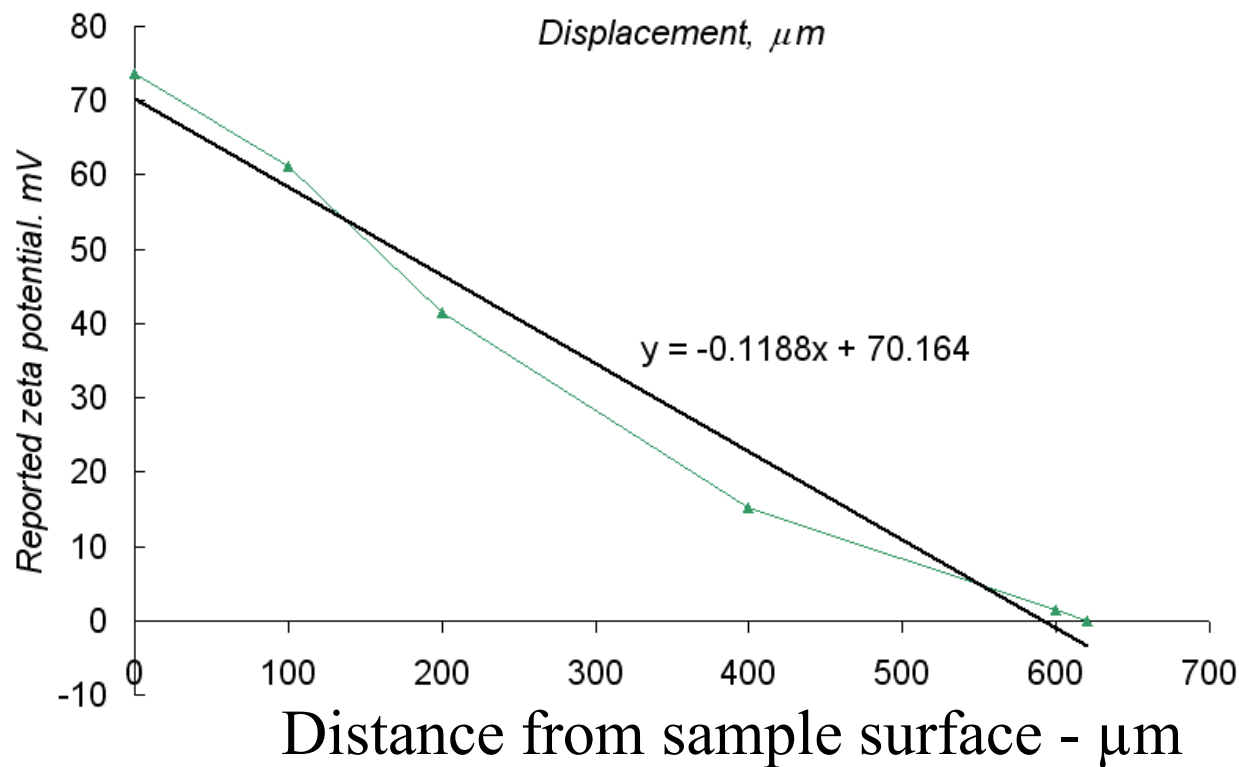
- ▶ 将样品粘贴在样品池基座上，插入到电极之间
- ▶ 加入带电示踪颗粒
- ▶ 检测示踪颗粒在距离表面不同位置的表面电泳速度



分析

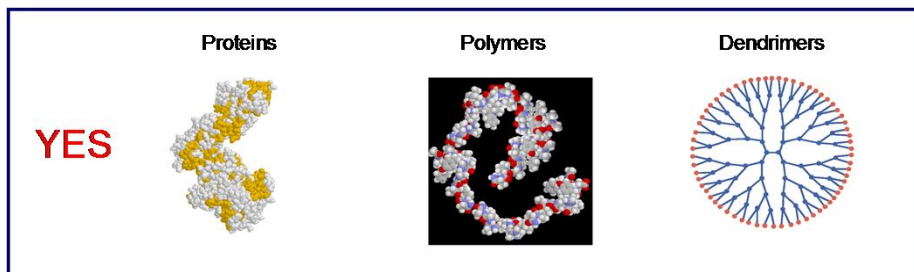
▶ 表面电位计算:

- 通过外推，在截距位置的电位大小就是表面电位



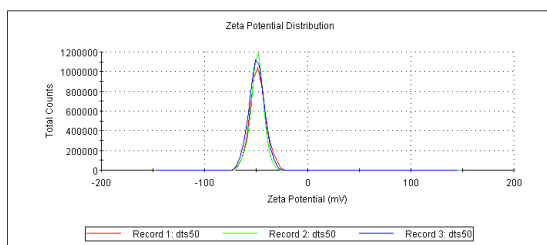
PTFE 样品使用 DTS1230 作为示踪颗粒 (pH 9)

Zetasizer 都可以实现那些功能



- 绝对分子量
- 第二维利系数

静态光散射



- Zeta 电位平均值
- Zeta 电位分布
- 表面电位

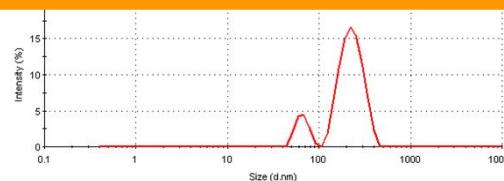
激光多普勒电泳和相分析光散射

Zetasizer
系列仪器

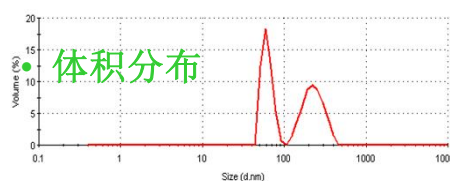
- 微流变
- 溶液粘弹性

动态光散射

- 平均粒径 (光强)
- 分散系数 PD.I

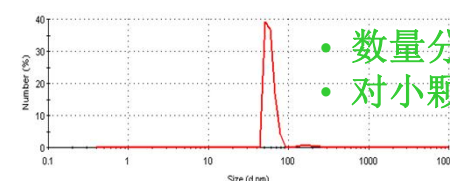


- 实际粒径分布 (光强)
- 分布峰值
- 对大颗粒敏感



- 体积平均粒径

Mie theory



- 数量分布
- 对小颗粒敏感

对分布进行几分运算

- 数量平均粒径

Contents

- ▶ 动态光散射
 - 测量原理
 - 由相关曲线得到粒径信息 – 数据分析
 - 样品要求及制备
- ▶ 静态光散射
- ▶ 与色谱连接flow-mode
- ▶ Zeta 电位/表面电位
- ▶ 应用

▶ Zetasizer Nano:

▶ 应用 – 极大/小颗粒检测

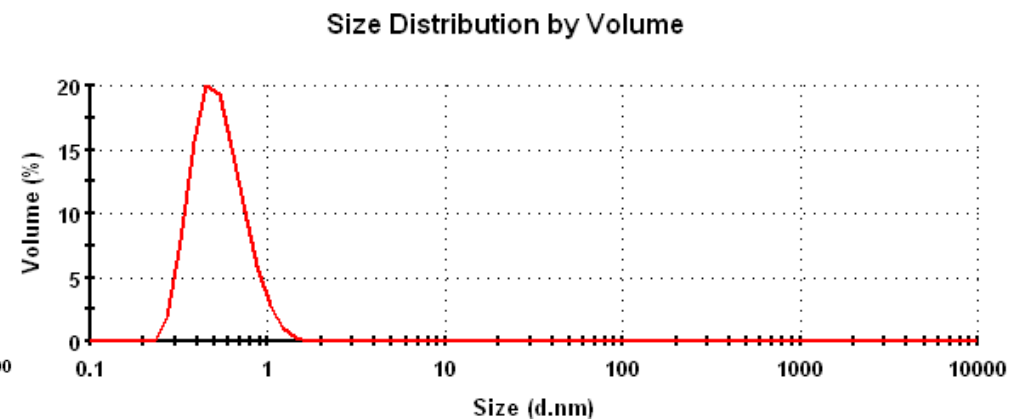
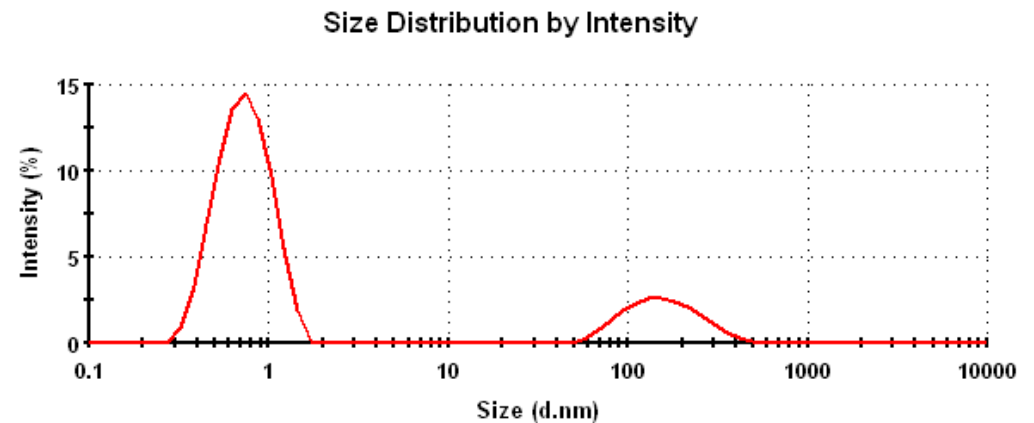
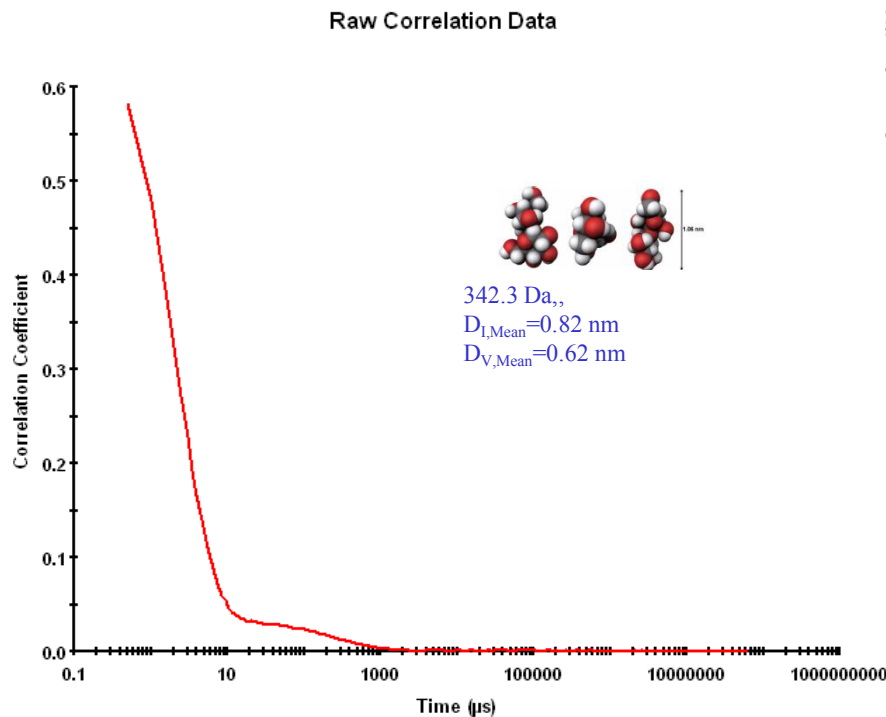
▶ 纳米胶体



DLS 粒径范围

M. Kaszuba, D. McKnight, M.T. Connah, F. McNeil-Watson and U. Nobbmann (2008) J. Nanoparticle Research 10, 823-829

► **0.6nm** to 8.9 μ m (sample dependent)

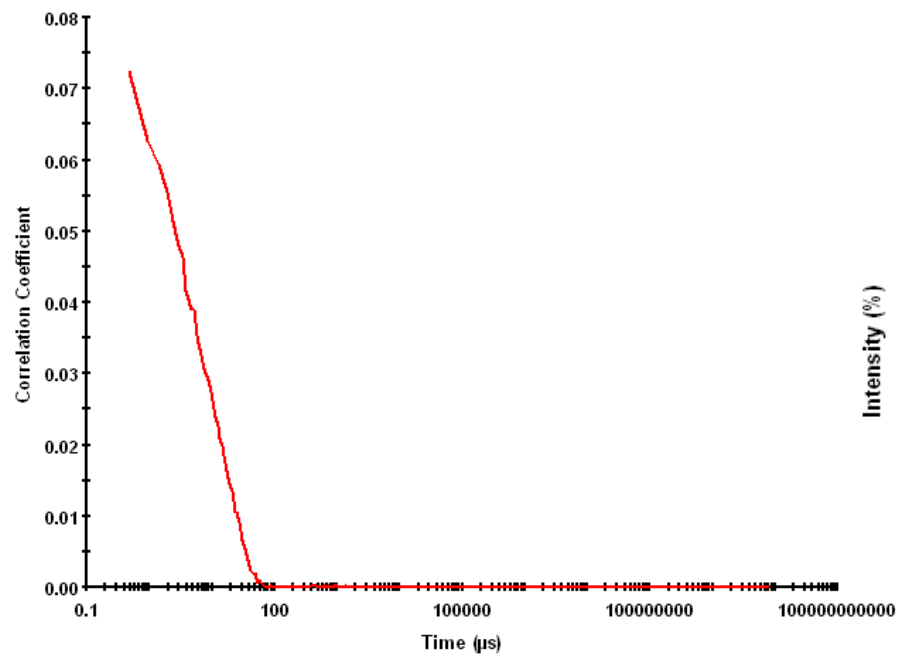


25% w/v 食糖分子

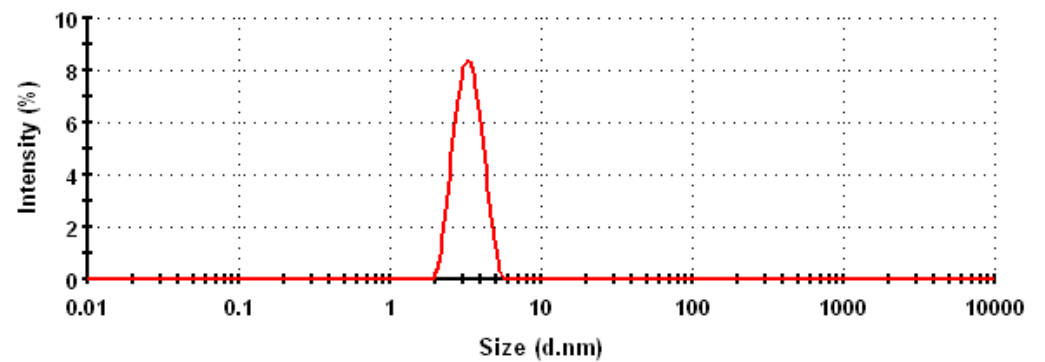
DLS

► 0.1mg/ml 溶菌酶

Raw Correlation Data



Size Distribution by Intensity



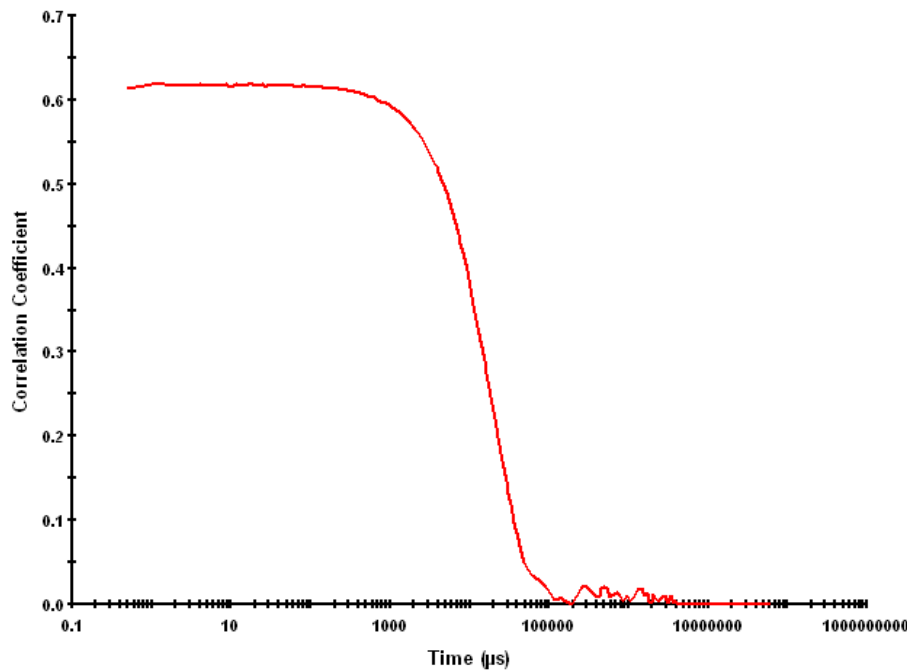
0.1mg/ml lysozyme



DLS Size Range

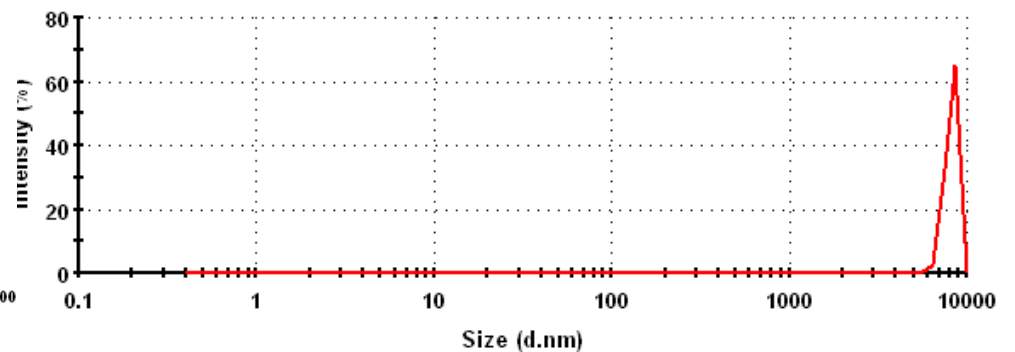
- ▶ 0.6nm to **8.9 μ m** (sample dependent)

Raw Correlation Data



Mean size = 8.84 μ m, PDI = 0.022

Size Distribution by Intensity



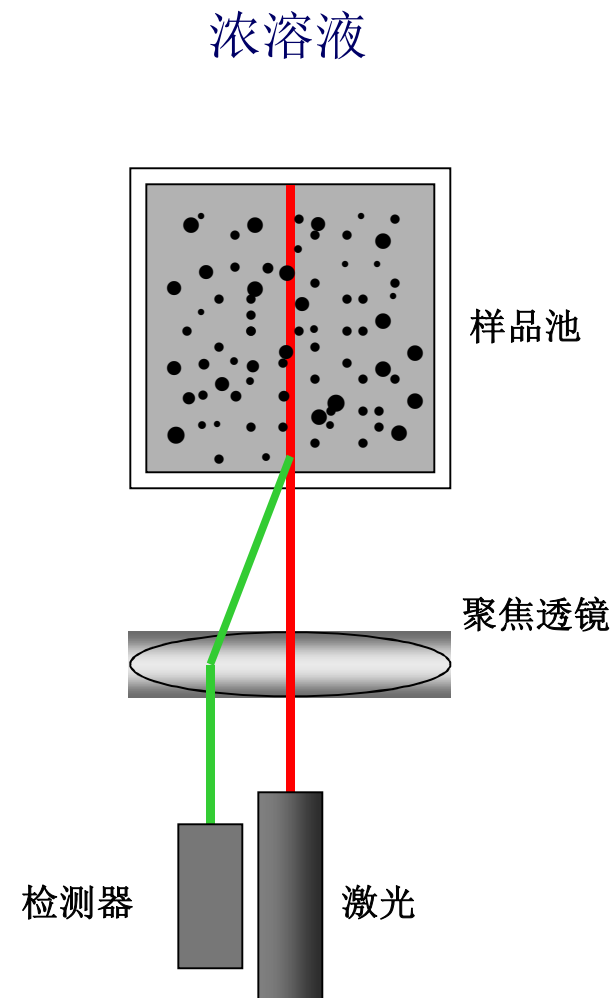
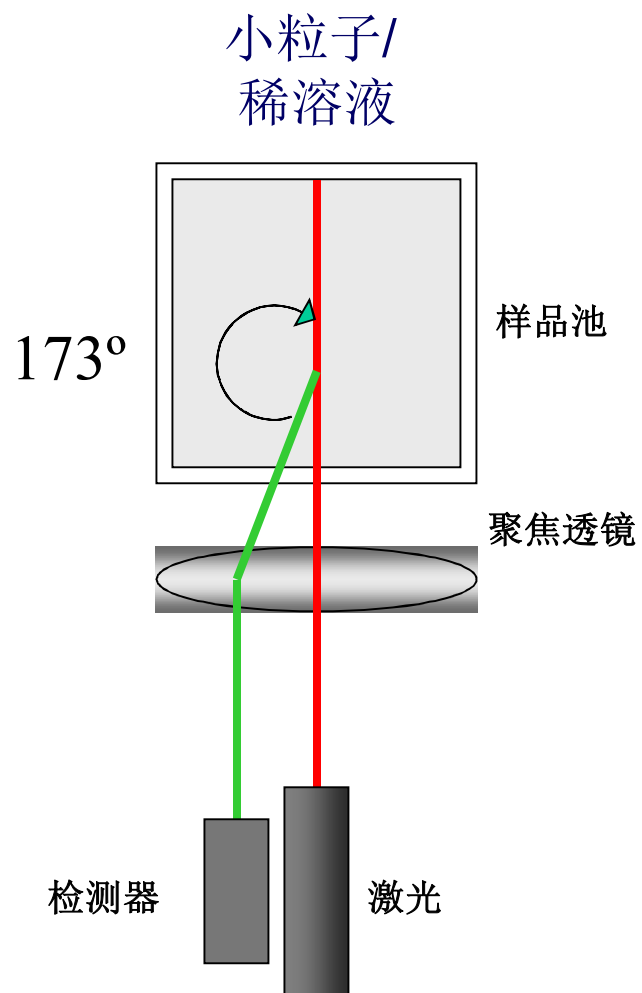
8.9 μ m 聚苯乙烯标准样品

▶ Zeta Nano的应用

高浓度样品表征



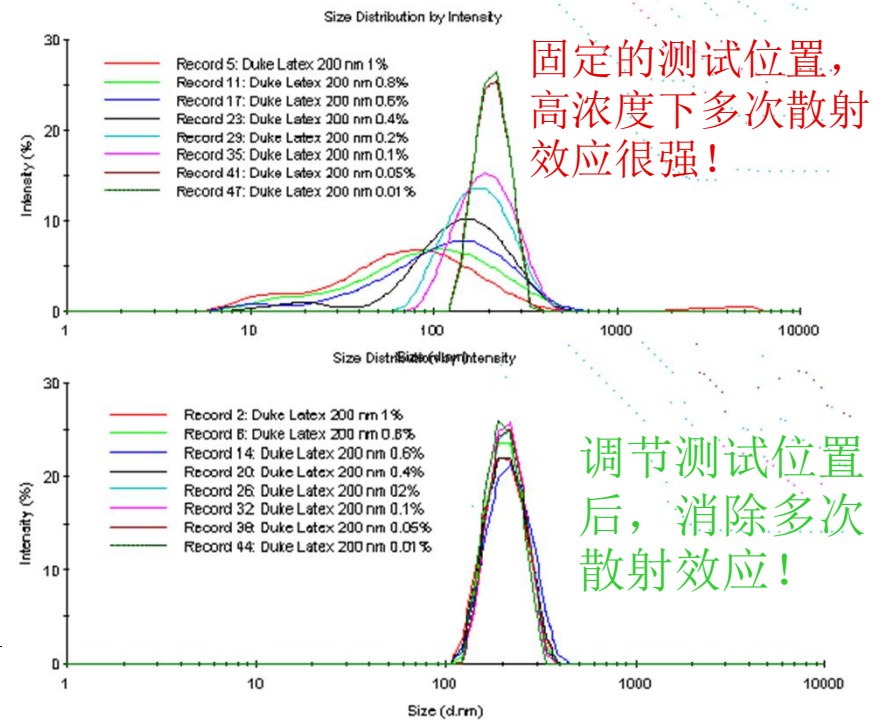
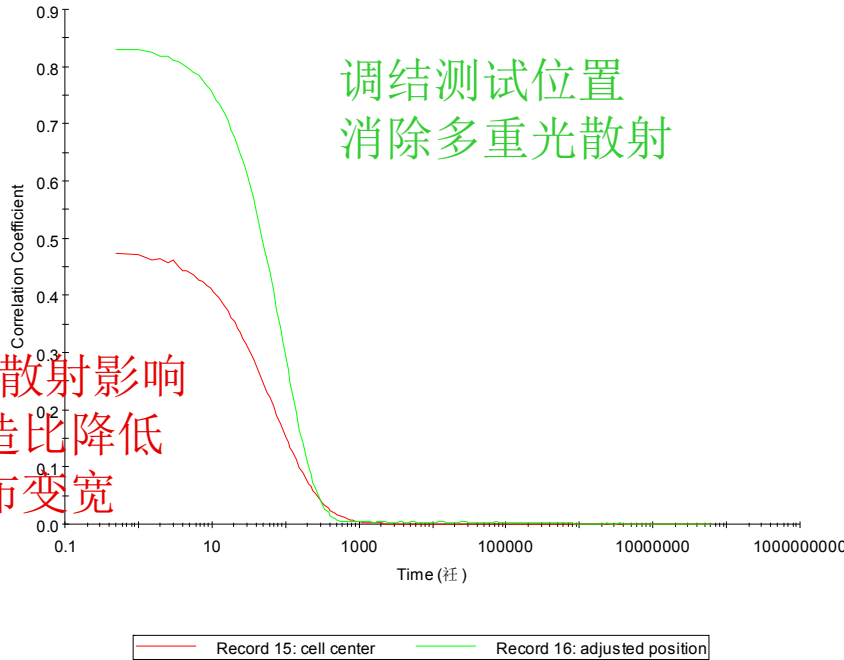
专利非侵入背侧光散射: NIBS



Malvern专利背散射+调整测试位置

- 避免多重光散射

200 nm标准样品

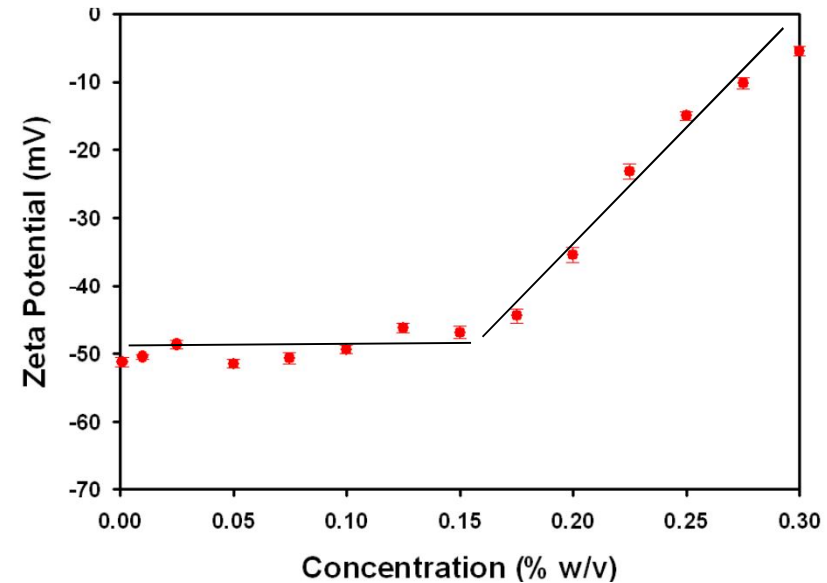


- ▶ 多次光散射效应通常降低粒子的表观尺寸，以及光子相关曲线的截距，使表观分布变宽
- ▶ 通过背散射和调节最佳测试位置可以消除多重光散射影响

最新高浓Zeta电位样品池 ZEN1010



Figure 2: Photograph of cuvettes containing various concentration of the TiO_2 dispersed in 10mM NaCl. A = 0.01% w/v, B = 0.1% w/v, C = 0.2% w/v and D = 0.3% w/v



Concentration (% w/v)	Zeta Potential (mV)	Standard Deviation (mV)	Conductivity (mS/cm)
0.001	-51.3	0.7	0.97
0.010	-50.5	0.33	0.99
0.025	-48.7	0.65	1.02
0.050	-51.5	0.66	0.99
0.075	-50.7	0.83	0.97
0.100	-49.4	0.66	1.01
0.125	-46.3	0.67	0.98
0.150	-46.9	0.95	0.99
0.175	-44.5	1.07	1.02
0.200	-35.4	1.08	1.01
0.225	-23.2	1.15	1.01
0.250	-14.9	0.623	1.01
0.275	-10.1	0.85	1.01
0.300	-5.4	0.7	0.98

- 在低浓度下，保持环境中的pH，盐度和添加物浓度不变，**zeta**电位不依赖于浓度
- 在高浓度下，由于颗粒浓度增高，颗粒间的相互作用导致**zeta**电位下降
- 推荐在不改变环境因素的条件下，在较低浓度检测**真实的zeta**电位

▶ Zeta Nano的应用



生物/医药领域领域



使用动态光散射和静态光散射表征 Rise Dwarf 病毒

- ▶ 典型的病毒尺寸范围在20-100 nm
- ▶ Rise Dwarf病毒是一种植物病毒，可以导致大范围的农作物减产
- ▶ 对病毒结构的研究，有利于防治疾病的发生
- ▶ 通过动态光散射的测量，我们得到病毒的直径在100 nm
- ▶ $PD.I < 0.01$ 表明这是一个单分散体系

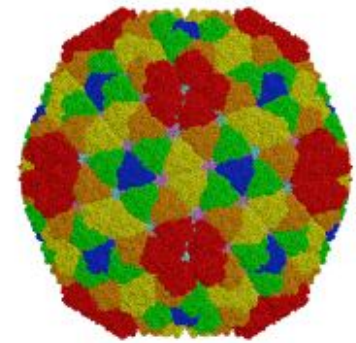


Figure 1: Molecular structure of rice dwarf virus [pdb:1UF2]

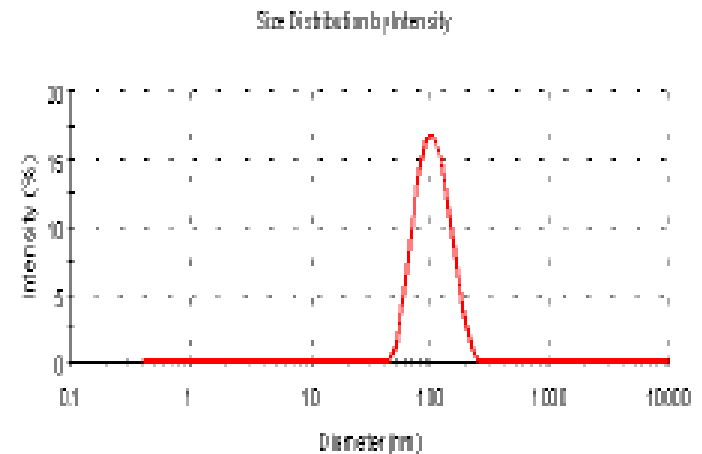
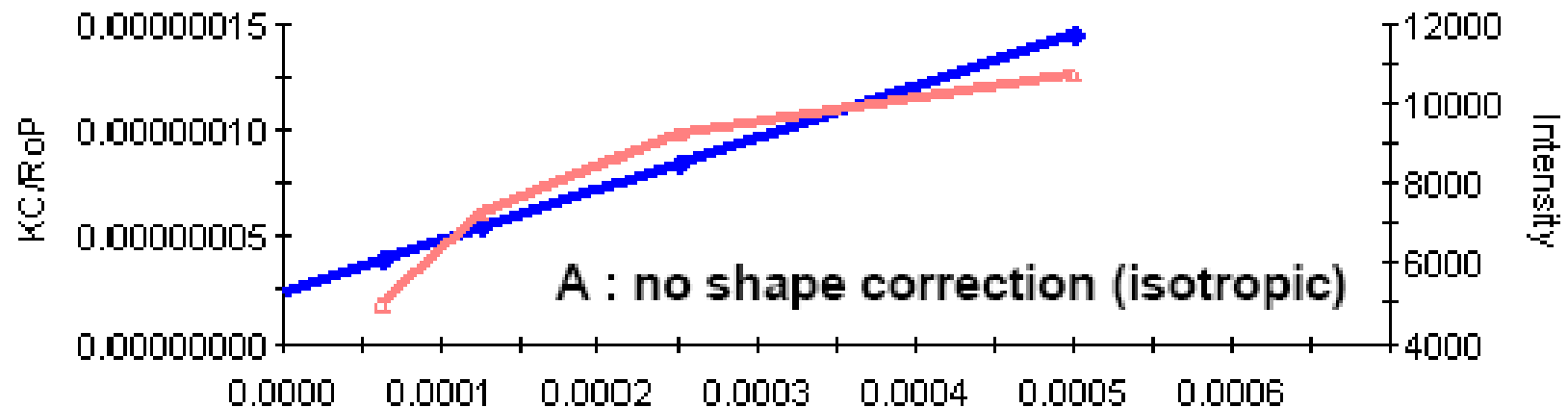


Figure 2: Size distribution by intensity of rice dwarf virus

使用动态光散射和静态光散射表征 Rise Dwarf 病毒

- ▶ 静态光散射实验中我们配置一系列不同浓度的溶液，并测量散射光强
- ▶ 通过Debye曲线，我们得到病毒的分子量为 $4.2 \times 10^6 \text{ Da}$



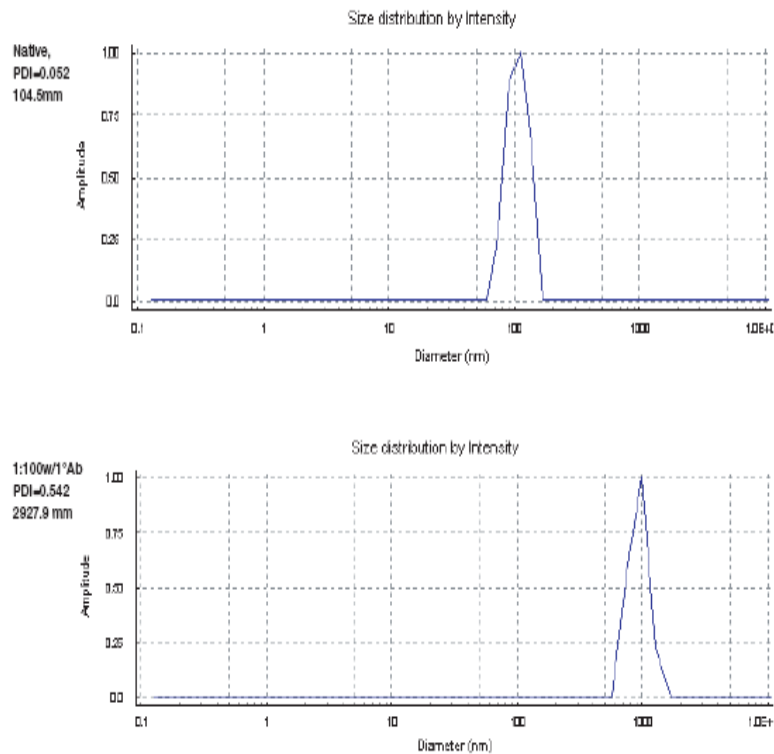
抗原和抗体

- ▶ 抗原是一种由人体产生的蛋白质，以对抗异物的侵入
- ▶ 抗体是导致抗原产生的异物
- ▶ 抗原可以和抗体结合形成免疫复合物

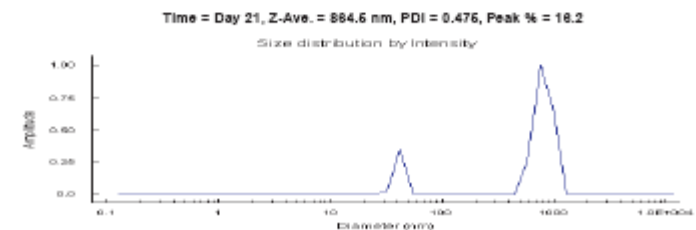
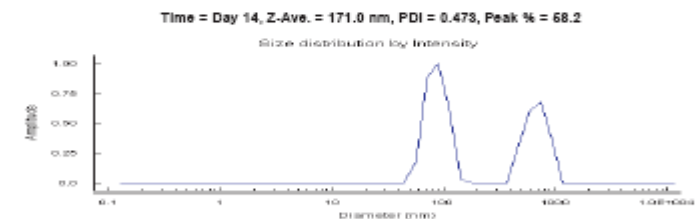
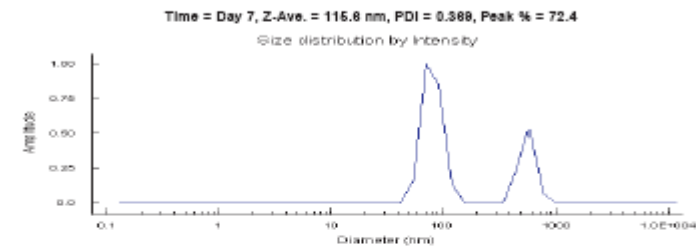
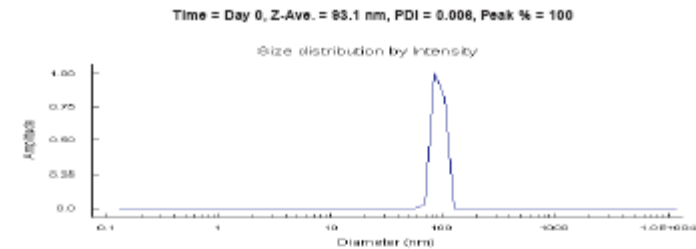


抗原和抗体：例1

Aggregation Analysis via DLS (Protein/Ab Interaction)



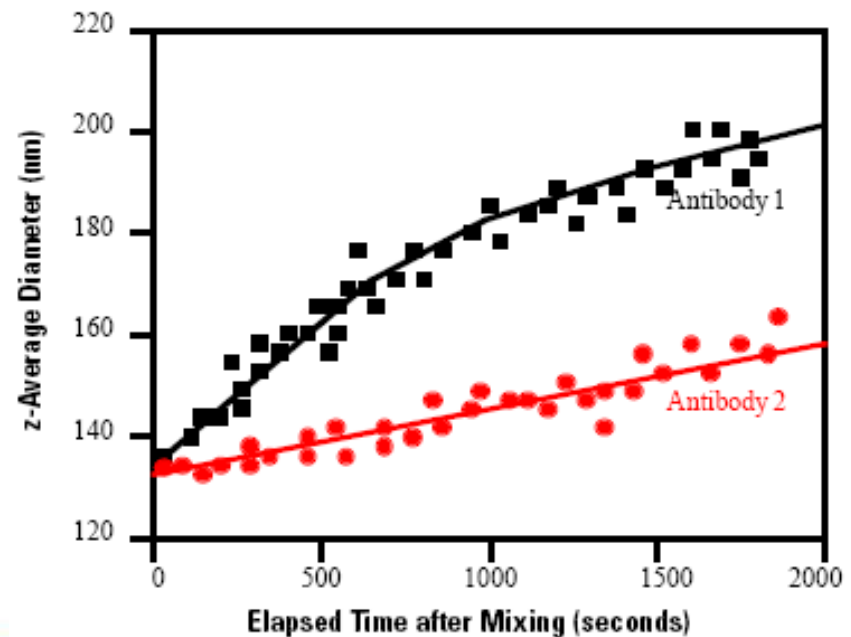
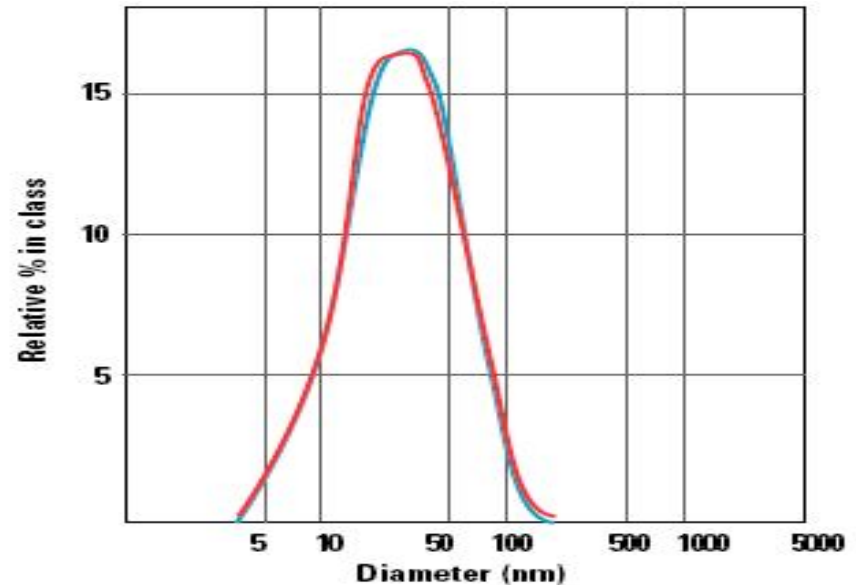
加入抗体前/后蛋白质尺寸变化



加入抗体后蛋白质尺寸
随时间变化

抗原和抗体：例2

- ▶ 图1显示了血清中一种抗体的三次重复测试.
- ▶ 在图2中我们分别混合两种不同的抗体和一种病毒，然后使用动态光散射测量体系的粒径，通过这种方法来判断这两种抗体的对病毒的亲和性
- ▶ 根据粒子尺寸增长的速率，我们可以得出结论：抗体1显示更高的亲和性.

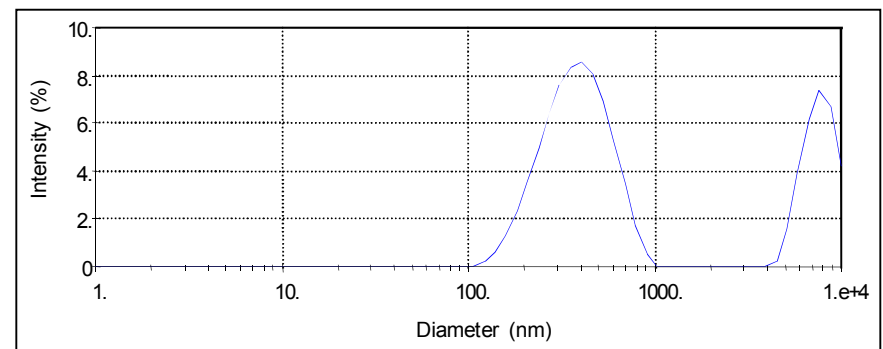
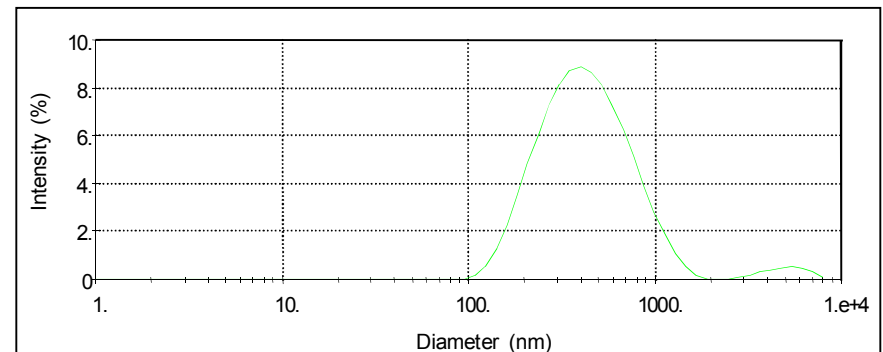
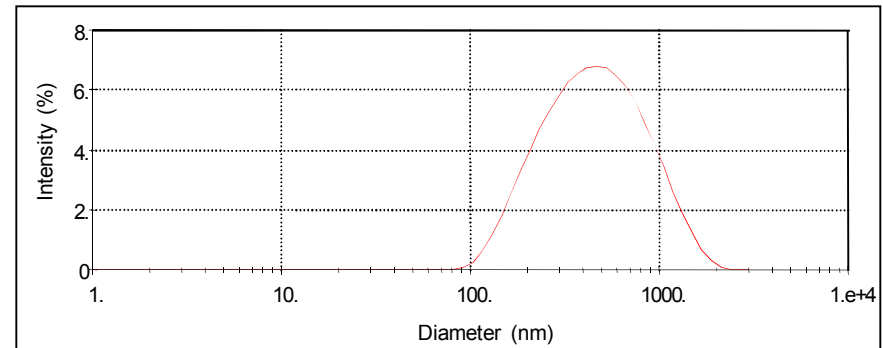
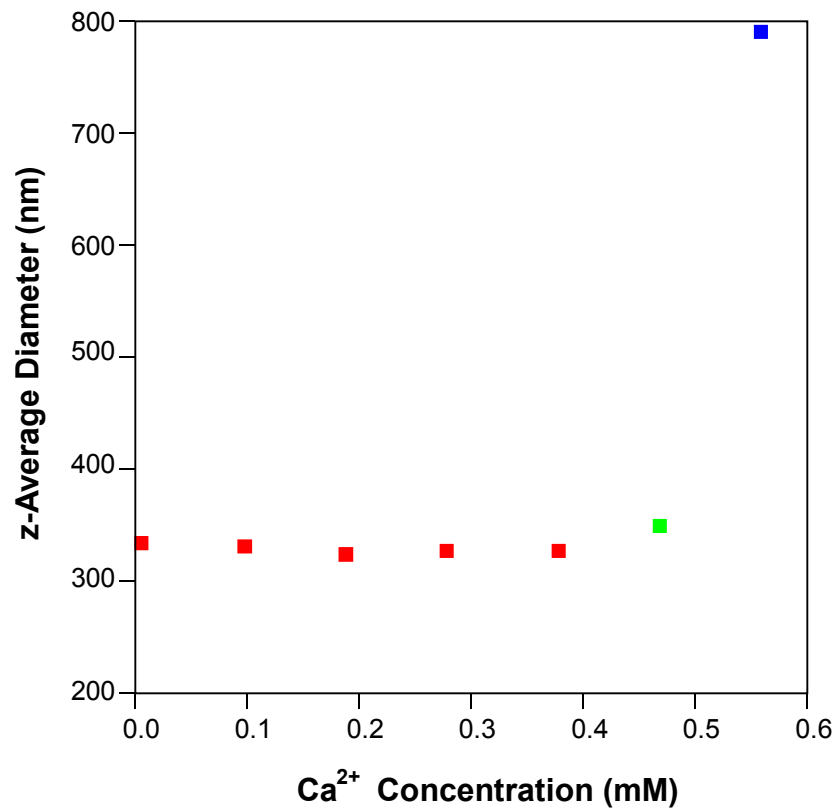


药物释放体系

- ▶ 在实际应用过程中有很多药物释放体系。携带体系 包括:
 - 脂质体, 微胶囊, 高分子微球, 乳液, 水凝胶.
- ▶ 对颗粒性质的了解有助于使药物释放更加有效
 - 比如说微米级的粒子可以陷入肺部的毛细血管
 - **Zeta** 电位可以用来表征药物携带体和药物的相互作用

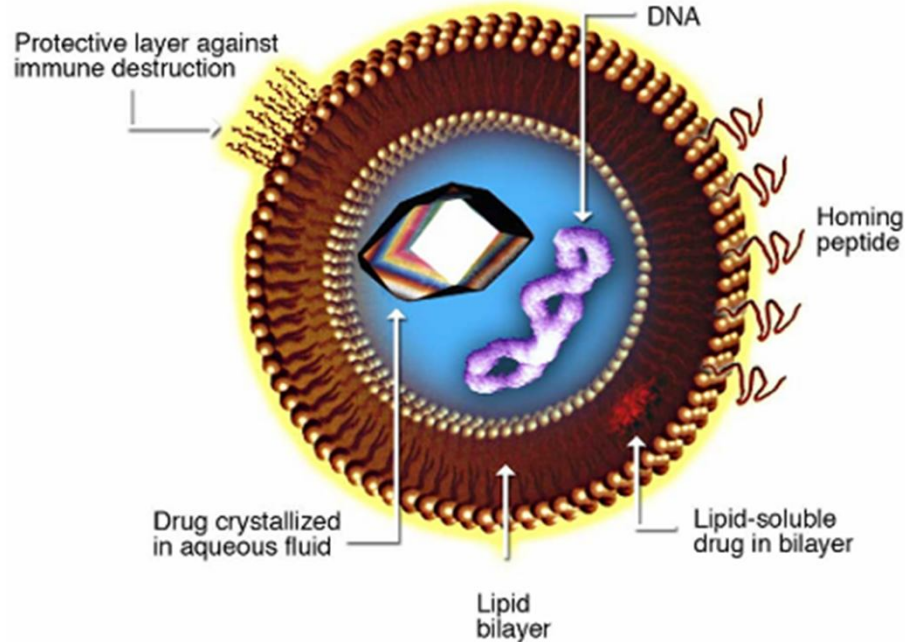


钙离子添加物对乳液的稳定性影响: 20% w/v Emulsion



基因疗法

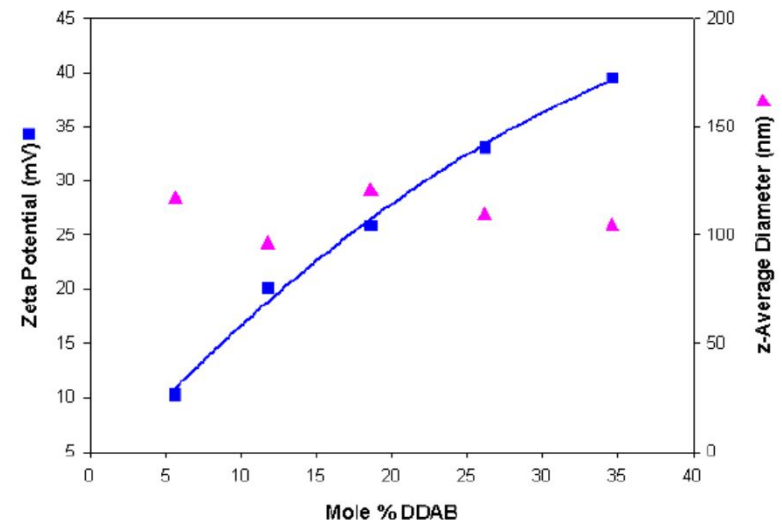
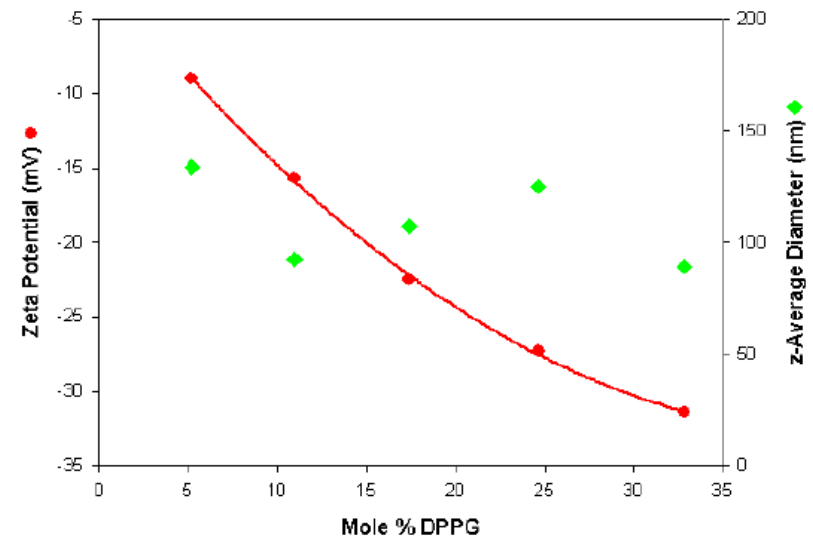
- ▶ 基因疗法释放基因物质来治疗遗传疾病
- ▶ 药物的携带物vector包括脂质体或者病毒
- ▶ 对于vector尺寸及结构稳定性的测定有利于了解药物的释放过程。携带物通常可以是脂质体或者病毒



阴离子和阳离子脂质体的检测

MRK575-01

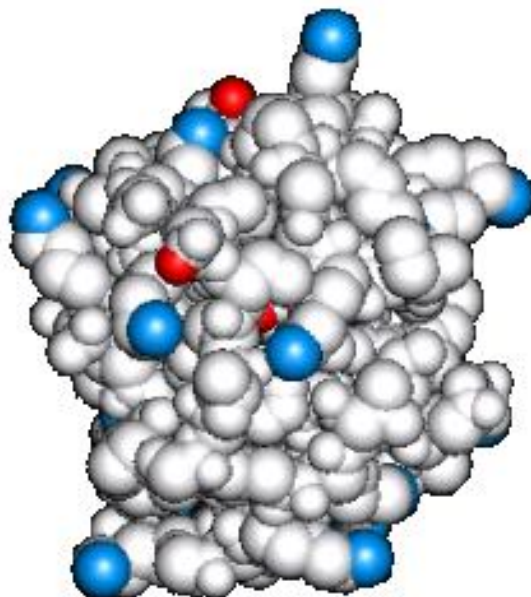
- ▶ 阴离子脂质体在加入 DPPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol) 后表面带有更多负电
- ▶ 阳离子脂质体在加入 DDAB (Dimethyldioctadecylammonium Bromide) 后表面带有更多正电
- ▶ 对 zeta 电位的检测有助于预测脂质体的性能



蛋白质表征

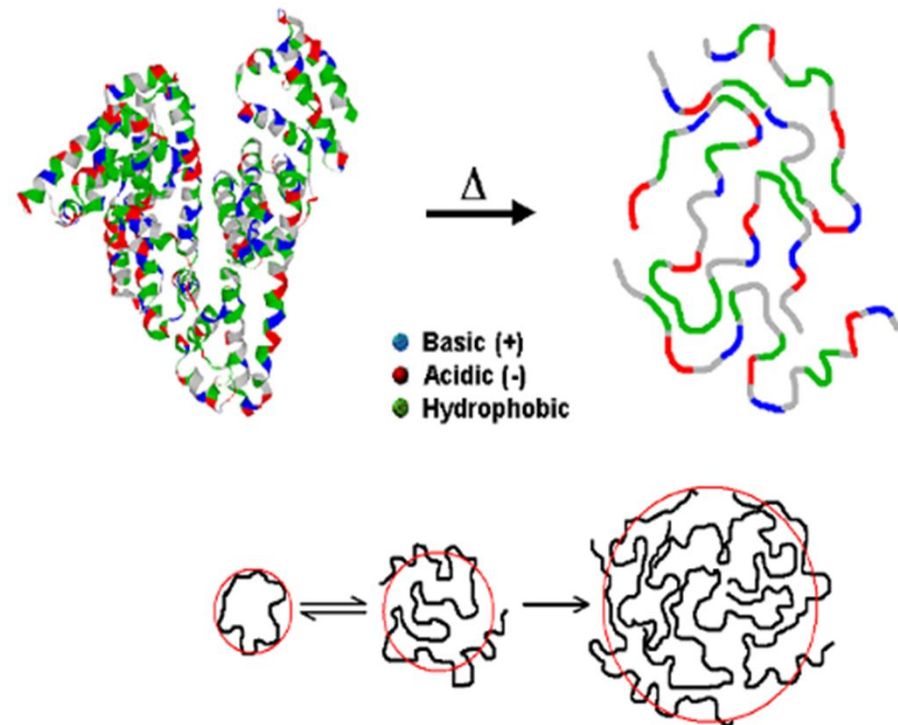
什么是蛋白质？

- ▶ 蛋白质是一种由带电的生物高分子紧密折叠堆积而成的结构
- ▶ 多数蛋白质的粒径在几个纳米至几十个纳米范围
- ▶ 蛋白质的结构对溶液的环境非常敏感，如pH，温度
- ▶ **Zetasizer**可以很方便的得到不同条件下蛋白质的稳定性



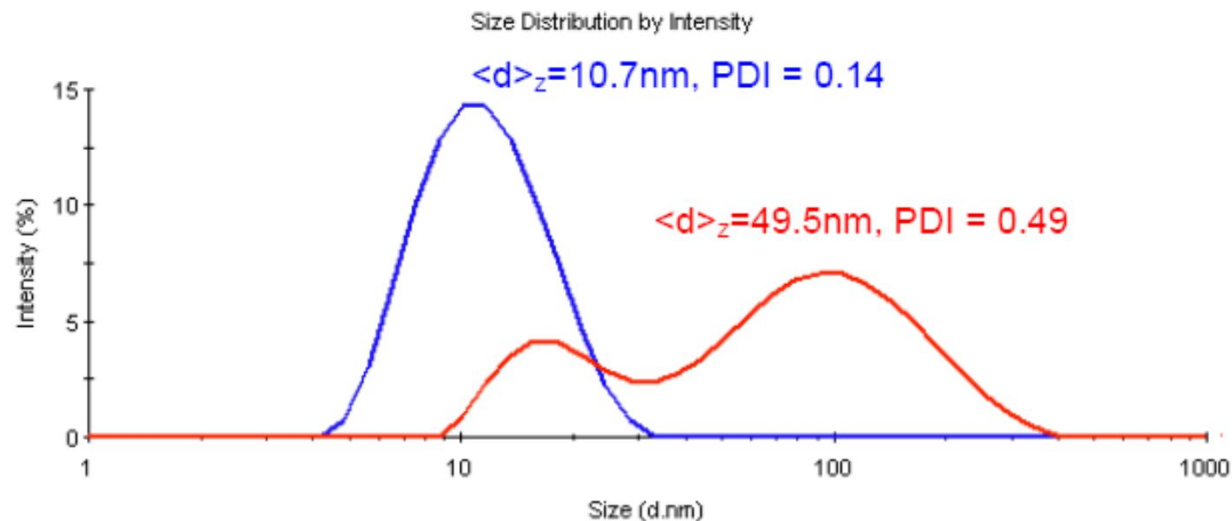
蛋白质表征

- ▶ 蛋白质得变性：在某些物理和化学因素作用下其特定的空间构象被改变，从而导致其理化性质的改变和生物活性的丧失
- ▶ 很多处理过程可导致蛋白质不可逆聚集，变性，如：加热，加入盐分，改变pH，加入重金属等等
- ▶ 蛋白质在变性分子结构松散，不能形成结晶，易被蛋白酶水解。蛋白质的变性作用主要是由于蛋白质分子内部的结构被破坏。
- ▶ 利用光散射，我们可以测量蛋白质的粒径，从而用来表征蛋白质是否稳定



蛋白质表征

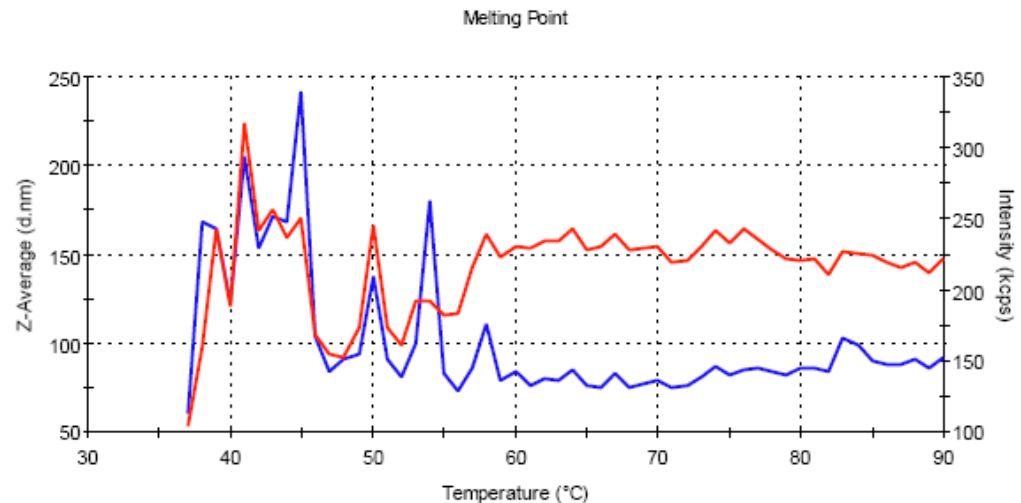
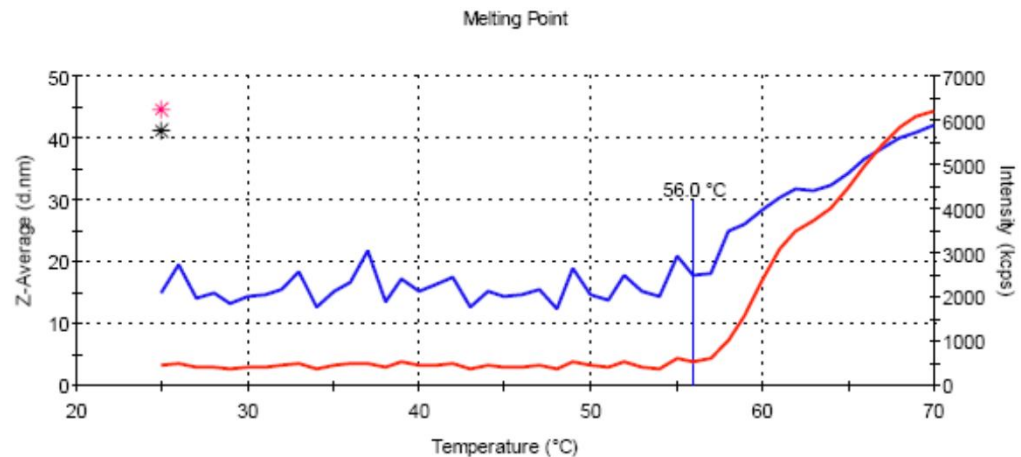
- ▶ 蛋白质表征对于了解其性能和行为非常重要
- ▶ 对蛋白质熔点的测定可以显示蛋白质变性的信息
- ▶ 测试还可以帮助寻找蛋白质最佳的结晶条件



蛋白质的表征：熔点

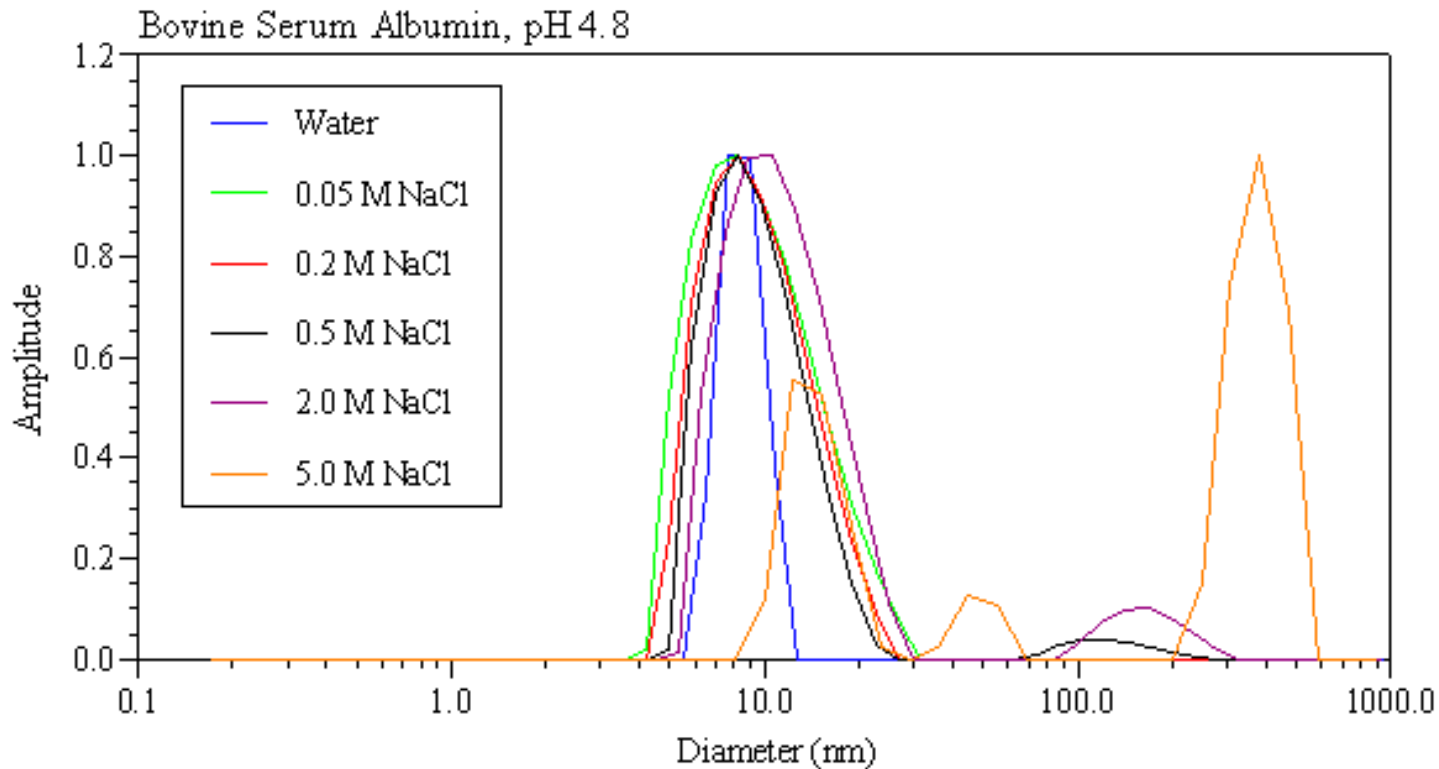
MRK704-01

- ▶ 样品A 熔点为 56°C
- ▶ 样品 B 为处理过的样品A
- ▶ 样品B没有显示熔点，这说明处理的过程中蛋白质已经发生变性



盐分对蛋白质稳定性影响：牛血清蛋白质（BSA）

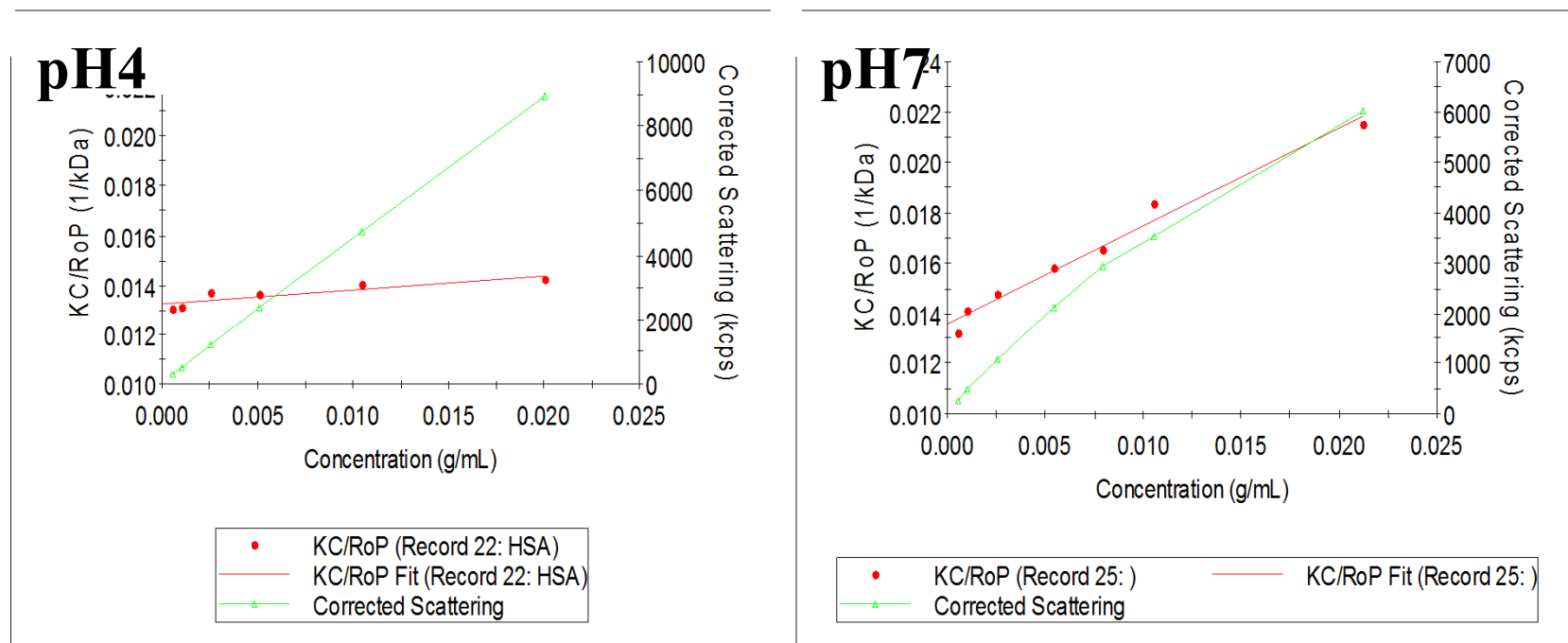
盐分的加入导致了静电屏蔽效应，增加了BSA聚集倾向



颗粒之间相互作用

- ▶ SLS第二维利系数
- ▶ 改进分子量检测和第二维利系数检测
- ▶ pH=7时, HAS的 A_2 更高, 说明批H=7更稳定

SLS Debye Plot



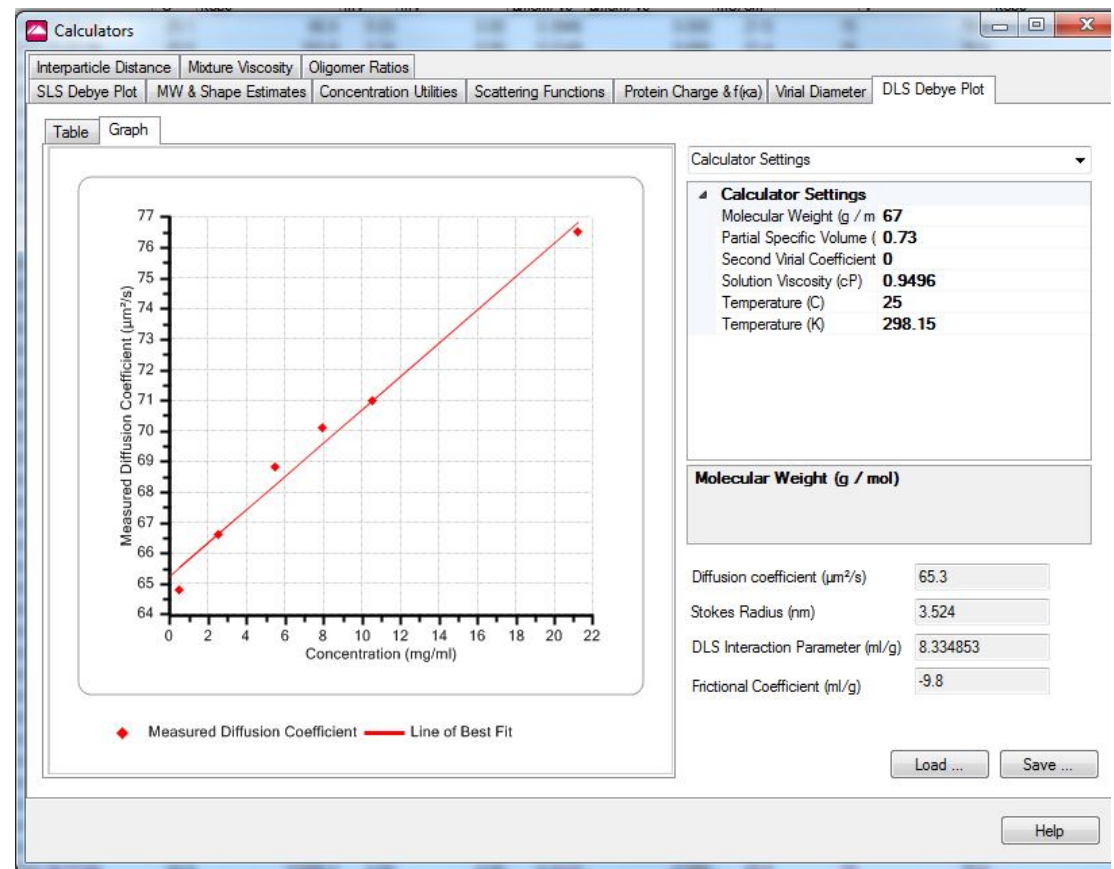
颗粒之间相互作用

► DLS Debye Plot

- DLS 相互作用因子, k_D (蛋白相互作用)
- ‘真实’ 流体动力学半径 (R_h at 0 浓度)

► 其他功能包括:

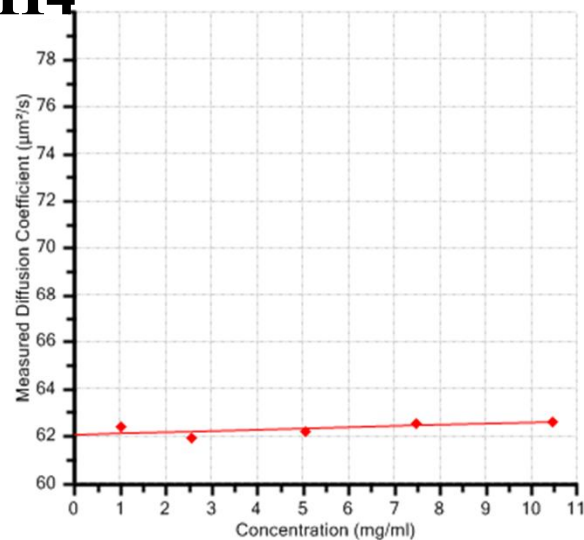
- 蛋白质电荷
- $F(ka)$
- 颗粒间距
- Virial diameter (thermodynamic diameter)



检测 k_D

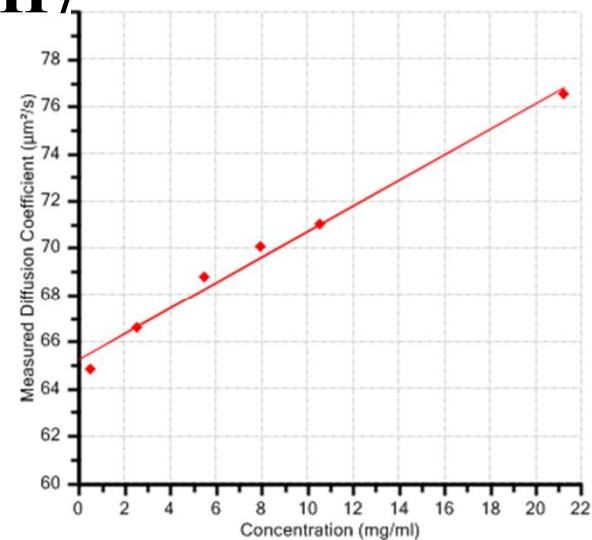
- ▶ pH=7时, HSA k_D 更高

pH4



◆ Measured Diffusion Coefficient — Line of Best Fit

pH7



◆ Measured Diffusion Coefficient — Line of Best Fit



▶ Zeta Nano的应用



高分子及表面活性剂体系



高分子

- ▶ 高分子具有丰富的性能以及广阔的用途
- ▶ 尺寸，形态，构造以及高分子的化学构成都可以对其宏观性能造成影响
- ▶ 要想了解高分子的性能，就一定要了解其结构

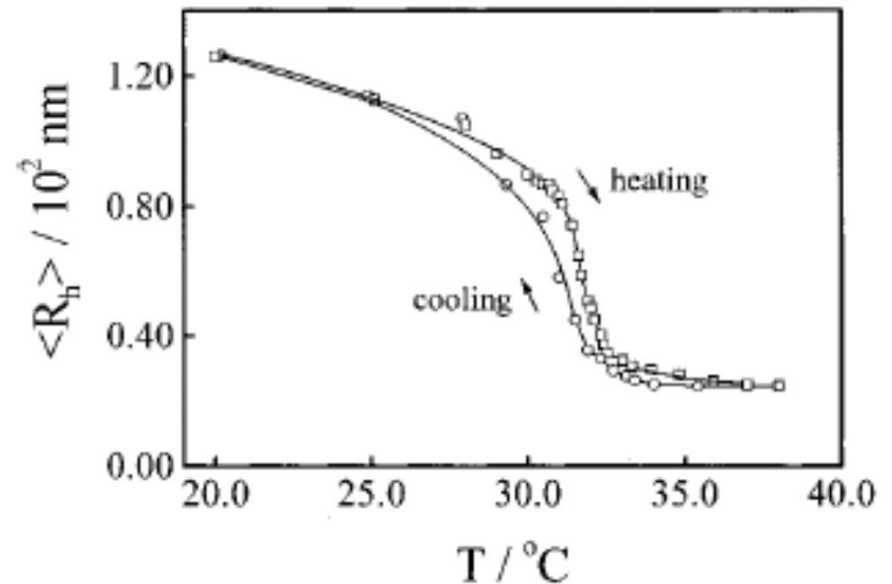
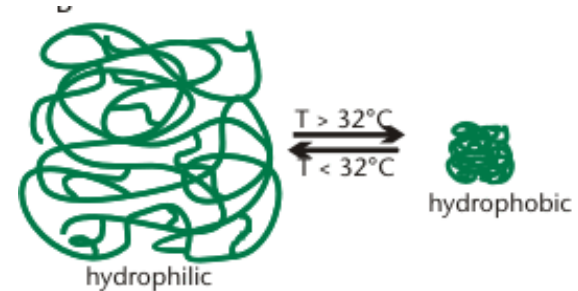
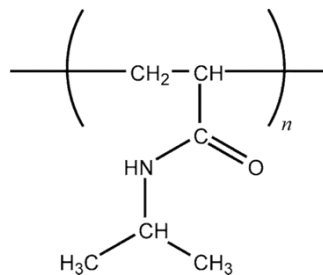


高分子的表征

MRK568-01 (在DTS软件中设定温度趋势程序)

测量高分子的状态随温度的变化

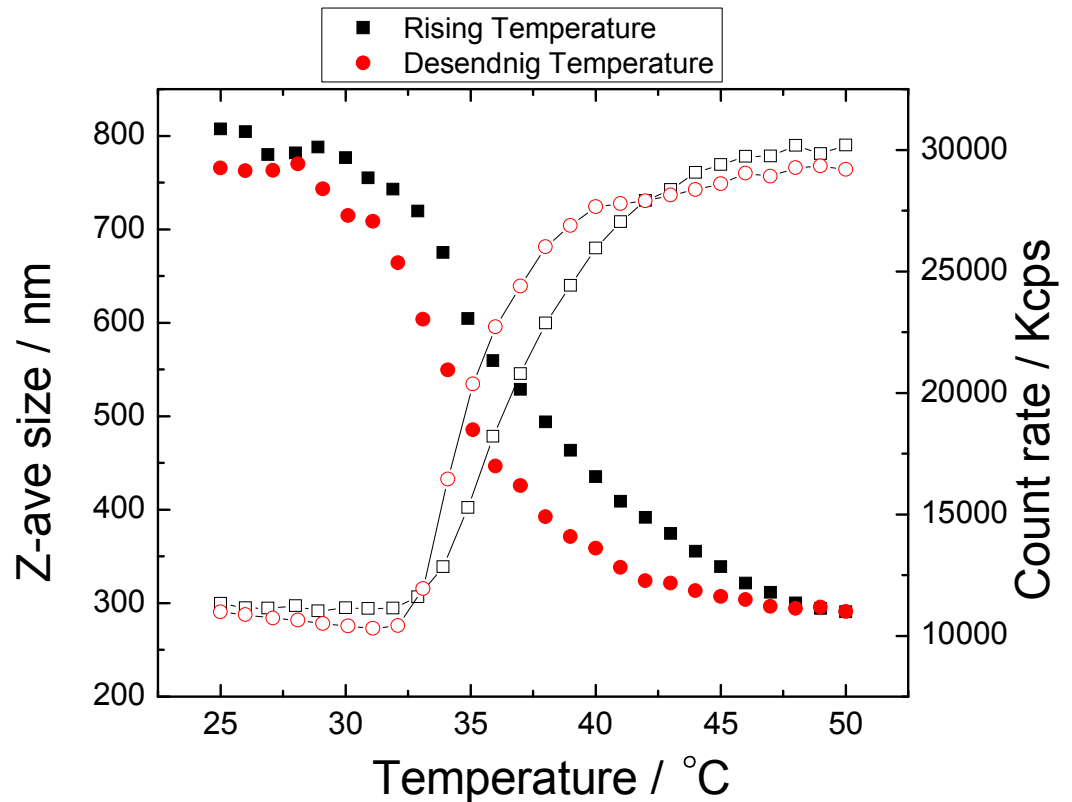
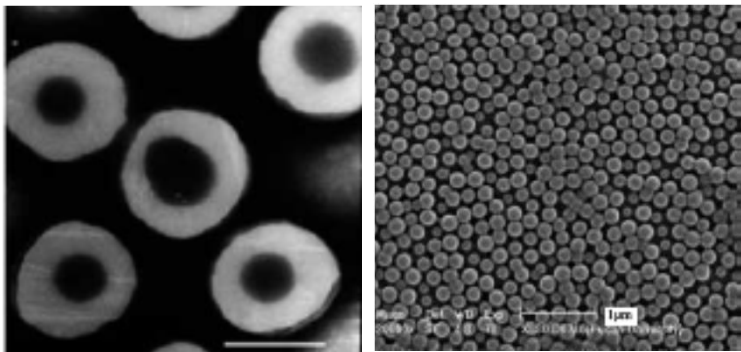
- 温敏材料：聚异丙基丙烯酰胺
Poly(N-Isopropylacrylamide)
- 低温下为链状结构，35° C时收缩为球状结构



PNIPAM 包裹的 SiO_2 纳米颗粒

- 与复旦大学化学系合作

在DTS软件中设定温度趋势程序

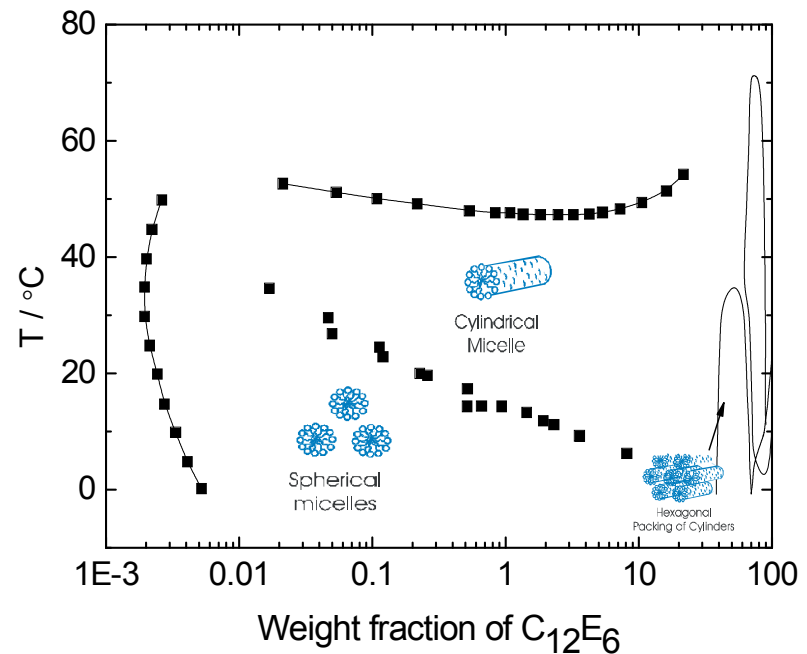
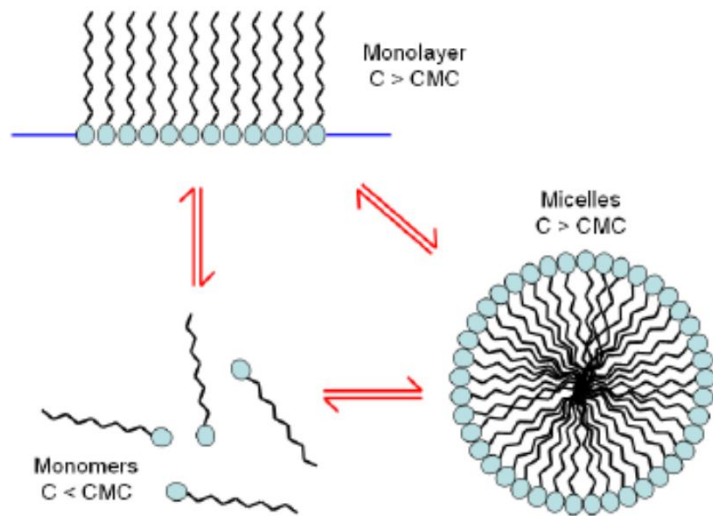


- 低温下膨胀
- 高温下收缩

颗粒尺寸的温度依赖性

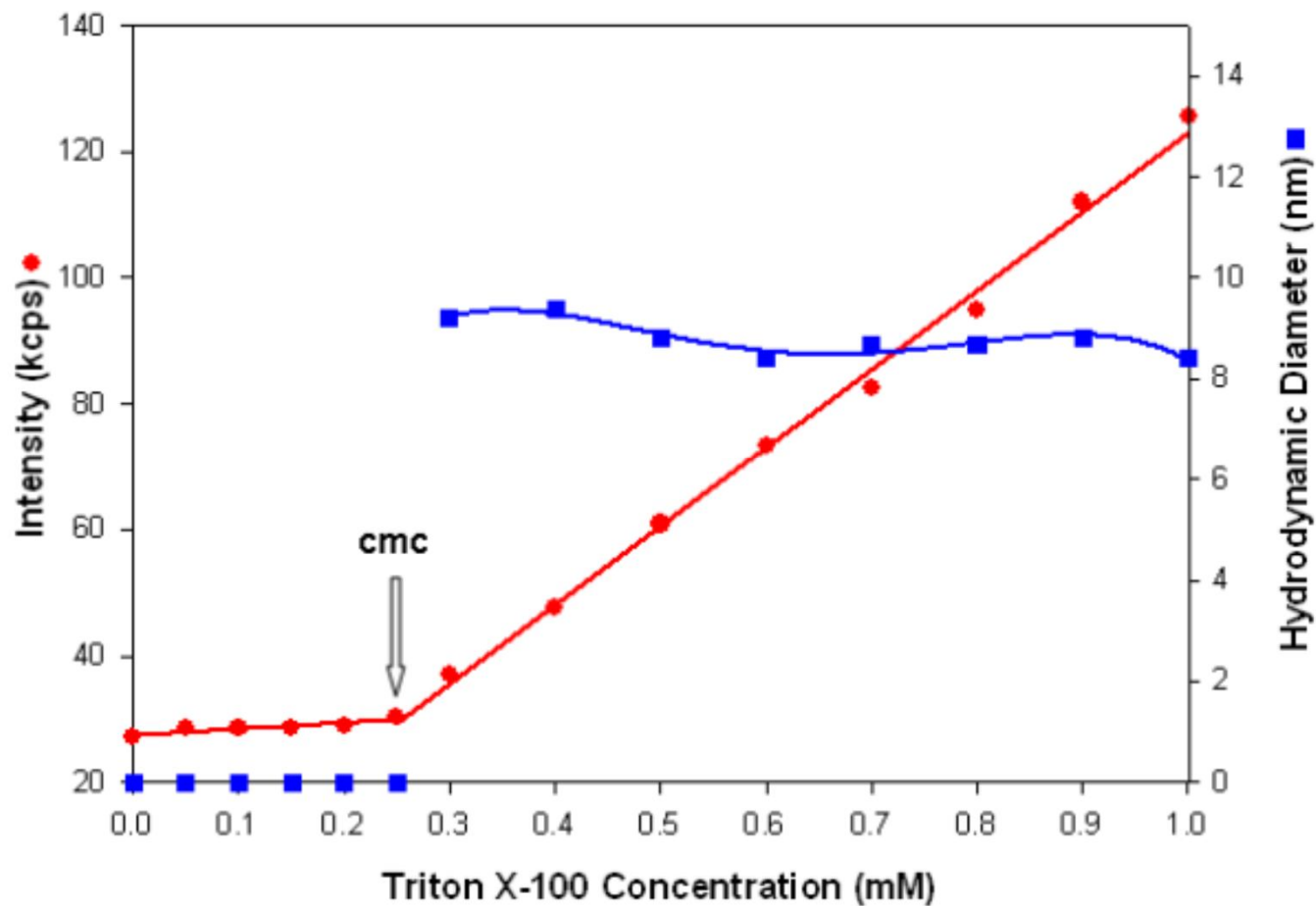
表面活性剂

- ▶ 表面活性剂降低溶液的表面张力
- ▶ 动态光散射可以用来检测临界浓度 **Critical Micelle Concentration**，这个浓度是表面活性剂开始形成胶束的最低浓度



使用动态光散射表征表面活性剂体系

MRK809-01



使用动态光散射表征表面活性剂体系

MRK809-01

- ▶ 胶束的聚合度是组成胶束的表面活性剂数量
- ▶ 胶束的聚合度可以由检测分子量来得到
 - 如果知道胶束粒子的形态，分子量可以由动态光散射来测量
- ▶ Triton X-100 单体的分子量为631Da
- ▶ 胶束的分子量为72kDa, 计算所得聚合度为114



结论

- ▶ 动态光散射是一种光学技术，用来测量纳米至微米级颗粒悬浮物的溶液
- ▶ 静态光散射的使用提供给我们分子量和第二维利系数的信息
- ▶ **Zeta**电位的测量可以提供悬浮物体系的稳定性信息
- ▶ 独特的混合模式相分析光散射**M3-PALS**极大的增加了检测的准确度和敏感度
- ▶ 与凝胶渗透色谱**GPC/SEC**连接 可以检测不同组分的分子量和大小的信息



更多信息

请登陆马尔文仪器网站:

www.malvern.com

或中文网站

www.malvern.com.cn

或**email**至

Info@malvern.co.uk

谢 谢!

