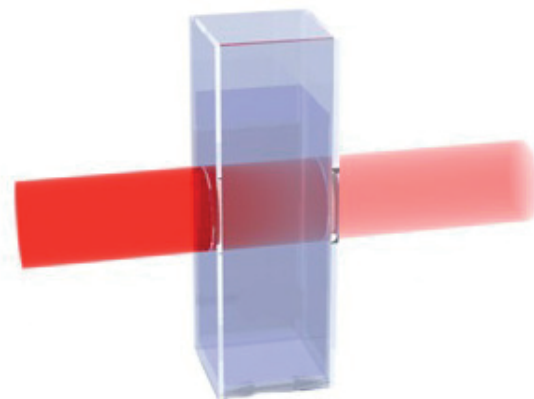




## Получите данные о мутности образца с функцией измерения пропускания

### Уникальная особенность серии Litesizer™

Ключевые слова: Litesizer™ 500, Litesizer™ 100, пропускание, мутность, осаждение, агрегация



## 1 Введение

Коэффициент пропускания - это процент потока падающего излучения, который полностью проходит сквозь образец и описывает эффективность материала пропускать света. Это напрямую связано с мутностью образца и, следовательно, с размером частиц и концентраций его компонентов. Анализаторы частиц серии Litesizer™ компании Anton Paar имеют уникальную способность считывать коэффициент пропускания либо непосредственным измерением коэффициента пропускания, либо при измерениях рассеяния света в режиме реального времени.

На практике пользователя интересует коэффициент пропускания именно образца, а не кюветы. Поэтому измерение проводится относительно тому, где эталоном является кювета, заполненная растворителем образца (рис. 1).

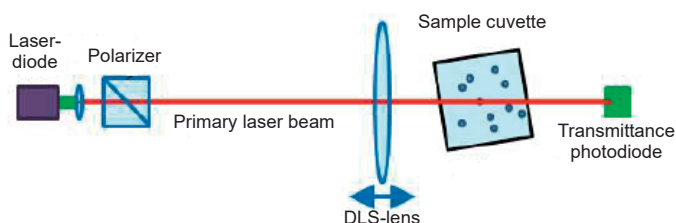


Рис.1 Схема оптической установки измерений пропускания в Litesizer

Измерение коэффициента пропускания может быть полезно в нескольких случаях:

### 1. Определение пропускания указывает на пригодность образца для измерений методами светорассеяния

Одним из требований методов рассеяния света является то, что образец должен быть прозрачным. Измерение коэффициента пропускания дает пользователю информацию о прозрачности и об интенсивности многократного рассеяния. Если образец слишком мутный, это вызовет множественные рассеяния, которые могут привести к ошибочным результатам.

Измерения электрофоретического рассеяния света (ELS) сильно зависят от мутности, потому что образец измеряется под углом  $15^\circ$  (передний угол), когда лазерный луч должен пройти сквозь весь образец, прежде чем достигнет детектора. Таким образом, мутный образец приведет к слишком низкой скорости счета обнаружения для получения надежного результата. Измерение статического рассеяния света (SLS) выполняется под боковым углом ( $90^\circ$ ) и поэтому также имеет ограничение по мутности. При определении пропускания Litesizer™ указывает на пригодность образца для необходимого измерения. Если значение слишком низкое, пользователь должен разбавить образец, пока мутность не достигнет значения, находящегося в пределах измеряемого диапазона.

Для определения размера частиц с использованием динамического светорассеяния (DLS), анализаторы Litesizer™ 500 могут измерять образец под углом  $15^\circ$ , боковым ( $90^\circ$ ) или задним углом ( $175^\circ$ ). Задний угол лучше всего подходит для измерения мутных или высоко концентрированных образцов, поскольку в этом случае путь лазера в образце кратчайший, что сводит к минимуму риск многократного рассеяния. Измерение пропускания позволяет Litesizer™ 500 автоматически определять оптимальный угол измерения для образца, предоставляя беспрецедентное удобство для пользователя.

### 2. Измерения пропускания - полезная функция для отслеживания осаждения, агрегации или флокуляции

Значение пропускания непрерывно измеряется и отображается в режиме реального времени в течение измерения. Пользователь может отследить, что происходит с образцом во время эксперимента и получить информацию об осаждении, агрегации или флокуляции образца.

Для измерений DLS агрегирование является распространенной проблемой, так как оседанию частиц мешает броуновское движение [2] [3] [4]. Это означает, что свободная диффузия частиц нарушается, что приводит к ошибочному результату. Крупные частицы осаждаются очень быстро, что означает, что за время пробоподготовки и установления равновесия анализатора, частицы могли уже осесть.

Это может уменьшить количество частиц, доступных для рассеяния света и/или нарушить распределение по размерам в образце, что негативно повлияет на точность измерения. Значения пропускания помогают пользователю определить, в какой момент должны быть предприняты действия для ограничения осаждения.

### 3. Благодаря коэффициенту пропускания можно легко и количественно изучить влияние растворителя или температуры на осаждение / агрегацию

Одной из возможностей предотвращения осаждения является модификация растворителя, в котором взвешены исследуемые частицы. В этом отчёте было исследовано осаждение сферических частиц полистирольного латекса 8,9 мкм в различных растворителях с целью найти растворитель, подходящий для измерений методом DLS.

Тепловую агрегацию белков также изучали с помощью инсулина; эталон белка, профиль агрегации которого хорошо известен при низком pH и высокой температуре [5]. В этом случае коэффициент пропускания оказался полезным показателем денатурации белка, поскольку при агрегации уменьшался и коэффициент пропускания.

## 2 Эксперимент

Полистирольный стандарт латекса (Thermo Fisher), состоящий из сферических частиц диаметром 8,9 мкм, разбавили до 0,2% мас./об. в трех разных растворителях: деионизированной воде, буферном растворе 10 mM NaCl и 13%-растворе сахарозы. Объем образца в кварцевой кювете составил 1 мл. Для каждого образца соответствующий растворитель был выбран в качестве эталона.

Время уравнивания было установлено на 2 минуты, продолжительность измерения - 1 час. Все измерения были проведены при температуре 25 ° C.

Для отслеживания агрегации, человеческий инсулин был приобретен у Sigma Aldrich (Кат. № 1342106).

Порошок растворили в 0,9% растворе NaCl до конечной концентрации 2,5 мг/мл и pH=2.

Образец отфильтровали (0,22 мкм) для удаления агрегатов и загрязнений. Раствор выдерживали в течение 5 часов при температуре 80 ° C. Образцы отбирались каждый час и стабилизировались при 25 ° C перед измерением.

## 3 Анализ полученных результатов

### 3.1 Мониторинг осаждения сферических частиц латекса с помощью пропускания

В начале эксперимента значения пропускания были очень низкими для всех 3 дисперсий сферических частиц, указывая на высокую мутность (Рис. 2).

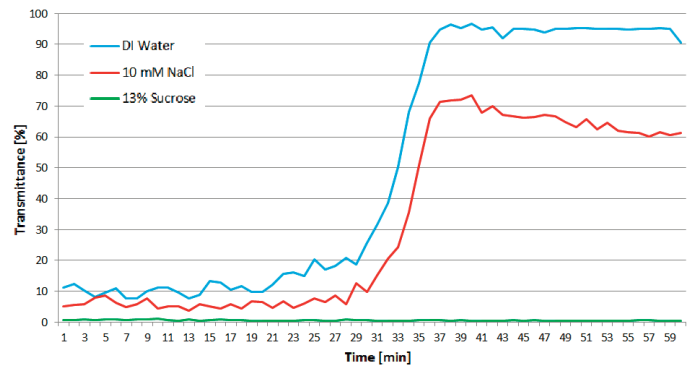


Рис.2. Коэффициент пропускания сферических частиц латекса 8,9 мкм от времени, диспергированные в деионизированной воде (синий), 10 mM NaCl (красный) и в 13% растворе сахарозы (зеленый).

Результаты, отслеживаемые на протяжении часа в режиме измерения пропускания показали, что характер осаждения частиц значительно зависит от используемого растворителя. Более того, для частиц латекса, взвешенных в 13% сахарозе, изменения коэффициента пропускания не наблюдалось в течение всего эксперимента, это указывает, что осаждения не произошло. Для сравнения, частицы в деионизированной воде и 10 mM NaCl начали оседать через 28 минут, о чем сигнализирует резкое увеличение коэффициента пропускания в этот момент времени.

Частицы, разведенные в дистиллированной воде, оседали в большей степени и заметно быстрее, чем в солевом буфере. Результаты показали, что коэффициент пропускания - это простой и эффективный способ анализа осаждения с течением времени. Раствор сахарозы оказался лучшим растворителем для измерения частиц латекса методом светорассеяния на протяжении длительных интервалов времени, так как он ограничивал осаждение как минимум в течении часа.

### 3.2 Пропускание как показатель агрегации инсулина

Во время измерения DLS образца инсулина непрерывно отслеживаемое пропускание использовалось для мониторинга агрегации. Таблица 1 и Рисунок 3 показали, что коэффициент пропускания инсулина выдерживаемого при температуре 80 ° C сперва уменьшался медленно, но после 4 часов произошло резкое снижение.

Это соответствовало резкому изменению внешнего вида прозрачного образца, ставшего замутненным после 4 часов инкубации. Кроме того, резкое снижение коэффициента пропускания было связано с появлением больших, микронных агрегатов, обнаруженных с помощью анализа DLS (не показано, см. отчет о применении [5]).

Таблица 1: Коэффициент пропускания раствора инсулина в зависимости от времени при температуре 80°C и pH=2. Каждое значение является средним из 5 последовательных измерений

Время [ч]	Пропускание [%]
0	89
1	89
2	88
3	88
4	41
5	45

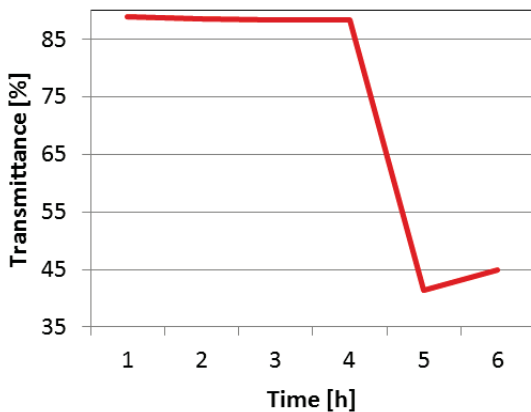


Рис. 3. Агрегация инсулина при 80°C и pH=2. Коэффициент пропускания с течением времени (среднее из 5 измерений)

## 4 Заключение

Осаждение частиц вызвано различными факторами. Важными переменными являются вязкость и плотность растворителя, а также плотность и концентрация частиц. Для измерений DLS частицы должны быть стабильны в дисперсии на протяжении всего эксперимента, чтобы получить воспроизводимые результаты, независящие от осаждения. Чтобы предотвратить осаждение частиц, растворитель должен иметь ту же плотность, что и частицы, взвешенные в нем.

13% раствор сахарозы используется для диспергирования частиц латекса, он не сдерживает осаждение частиц, но замедляет седиментацию до неопределенного уровня. Используя режим пропускания, можно отслеживать осаждение частиц в различных растворителях, чтобы найти оптимальный растворитель для измерения светопропускания DLS.

Непрерывно определяемое пропускание инсулина на протяжении измерений методами светорассеяния DLS является отличным показателем того, что происходит с образцом, обеспечивая быстрые данные о скорости агрегации белка.

С помощью специального режима измерения анализаторы серии Litesizer™ способны измерять коэффициент пропускания каждого образца независимо от размеров частиц.

Программное обеспечение Kalliope™ также отображает значение пропускания в режиме реального времени во время измерений DLS и ELS. И, наконец, данные о пропускании позволяют прибору автоматически выбирать наилучшие параметры измерения.

## 5 Литература

- [1] <http://www.wikidoc.org/index.php/Transmittance>
- [2] Batchelor G. K. (1982). Sedimentation in a dilute polydisperse system of interacting spheres. Part 1. General theory. *Journal of Fluid Mechanics* 119:379-408.
- [3] Robinson C. S. (1926). Some Factors Influencing Sedimentation. *Industrial and Engineering Chemistry* 18:869-871.
- [4] González-Serrano C., J. J. McDermott & D. Velego (2011). Sediments of soft spheres arranged by effective density. *Nature Materials* 10:716-721.
- [5] Burgstaller C. et al. (2017). Shedding light on insulin aggregation with the Litesizer™ 500. *Application Report, Anton Paar GmbH*, [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com).

Измерения и текст: Carina Burgstaller

### Contact Anton Paar GmbH

Tel: +43 316 257 7073

[pc-application@anton-paar.com](mailto:pc-application@anton-paar.com)

<http://www.anton-paar.com>

Эксклюзивный дилер в России:

ООО «АВРОРА»

[paar@avro-lab.com](mailto:paar@avro-lab.com)

[www.paar.ru](http://www.paar.ru)

+7(495)-258-83-05/06/07