

1. Grundlegendes & geschichtlicher Hintergrund

Die Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) oder auch dynamische Lichtstreuung ist ein hochauflösendes Laserstreulichtverfahren zur Bestimmung der Partikelgröße sehr kleiner Partikel. Der Meßbereich liegt zwischen ca. 3 nm bis 3 µm, größere Partikel, wie z.B. Mikropartikel, können mit dieser Methode also nicht vermessen werden. Die ersten Geräte erschienen Ende der 1970er Jahre auf dem Markt, Pionier auf diesem Gebiet war die englische Firma Malvern Instruments. Innerhalb von nur etwas mehr als 10 Jahren entwickelte sich die PCS zu einem Standardmeßverfahren und ist heutzutage in jedem guten technologischen Labor vertreten.

Wie so viele Dinge ist die PCS ein Abfallprodukt der Militärtechnik, stammend aus dem Royal Signal and Radar Establishment in Großbritannien. Beim Radar hat man das Problem über einem immer vorhandenen Grundrauschen das Signal eines fliegenden Flugzeuges und seine Geschwindigkeit herauszufiltern und genau dieses Prinzip liegt der PCS zugrunde. Auch hier soll die Geschwindigkeit von Teilchen über dem Grundrauschen ermittelt werden. Dazu werden bei der PCS Laserlichtstrahlen in eine Dispersion von Partikeln gesendet. Das von den sich bewegenden (diffundierenden) Partikeln zurück gestreute Licht wird dann über dem allgemeinen Grundrauschen anderer Lichtintensitäten detektiert und daraus über einen mathematischen Prozeß die Partikelgeschwindigkeit (Diffusionsgeschwindigkeit) ermittelt. Aus der Partikelgeschwindigkeit kann man die Diffusionskonstante D , und daraus über die Einstein-Gleichung die Partikelgröße berechnen (Abb. 1).

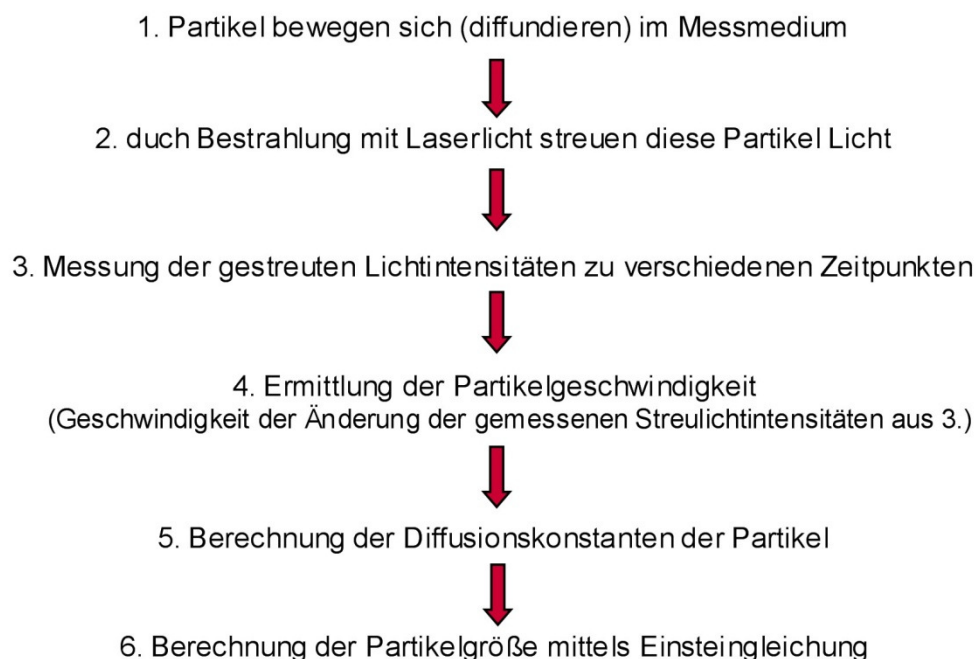


Abb. 1: Prinzip der Partikelgrößenbestimmung mittels PCS

Wichtig ist, dass die Partikelgröße nicht direkt gemessen wird, sondern indirekt ermittelt wird. Die PCS ist eigentlich ein Meßverfahren zur Ermittlung von Partikel- und Strömungsgeschwindigkeiten. Sie wird z.B. auch eingesetzt zur Ermittlung von Strömungsgeschwindigkeiten in Flüssigkeiten (die dann natürlich lichtstreuende Partikel enthalten müssen).

2. Meßaufbau

Der Meßaufbau ist sehr einfach (Abb. 2). Ein Laser erzeugt einen Lichtstrahl, der durch die Dispersion (Suspension oder Emulsion) geht. Das von den Partikeln erzeugte Streulicht wird unter einem Winkel von in der Regel 90° mit einem Photomultiplier oder einer Photodiode detektiert. Es ist auch die Detektion unter anderen Winkeln möglich, da ein Teilchen Streulicht über den vollen 360° Bereich aussendet. Es gibt auch PCS-Geräte, die die Dispersion unter mehreren Winkeln vermessen, und daraus präziser Partikelgröße und insbesondere Partikelgrößenverteilung ermitteln können. Das Meßsignal (detektierte Anzahl der Photonen) wird dann an einen Korrelator, verbunden mit einem Computer, zur Auswertung weitergeleitet.

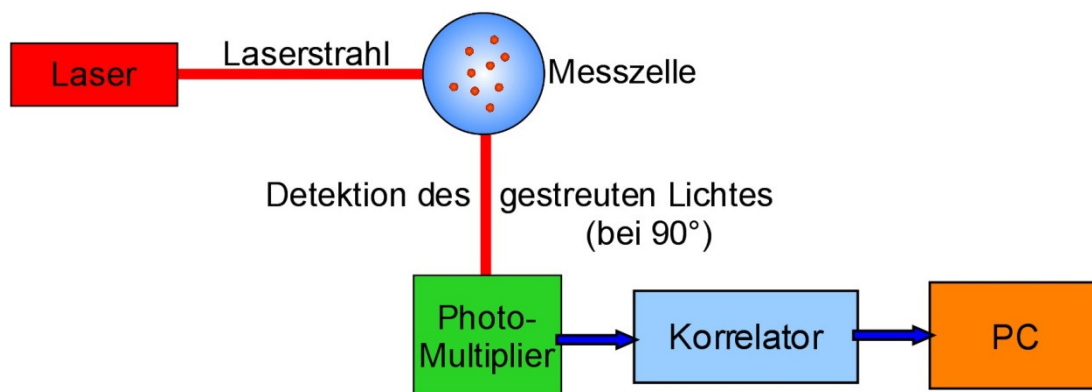


Abb. 2: Meßaufbau der PCS: Laser, runde oder viereckige Probenzelle mit Partikeln im Dispersionsmedium (meist Wasser), Streulicht detektiert mit Photomultiplier oder Photodiode und anschließender Aufarbeitung der Signale im Korrelator, verbunden mit PC (Abbildung modifiziert nach [1]).

3. Meßprinzip

Bei der PCS wird nicht die absolute gemessene Streulichtintensität ausgewertet, sondern die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität. Bei kleinen Teilchen schwankt die Intensität des gestreuten Lichtes schneller als bei großen Teilchen. Der Grund dafür ist, dass die Diffusionsgeschwindigkeit der kleinen Teilchen größer ist als die von großen Teilchen. Wie ist das zu erklären?

Die Diffusion von Partikeln ist auf die Brown'sche Molekularbewegung der Moleküle des die Partikel umgebenden Dispersionsmediums zurückzuführen. Die Moleküle des Dispersionsmediums stoßen die Partikel an und übertragen ihre kinetische Energie auf die Partikel, was zur Bewegung (Diffusion) der Partikel führt. Bei Übertragung einer gleich großen Energie führt dies bei einem kleinen Partikel zu schnellerer Bewegung als bei einem großen (vergleichbar man stößt mit einem Queue beim Billard eine Billardkugel oder einen Basketball an).

Wieso führt schnellere Diffusion nun zu schnelleren Schwankungen der Streulichtintensität?
 Dies erklären die Abbildungen 3-5. Wenn ein Laserstrahl auf ein Teilchen trifft, so geht von diesem Teilchen rundum über den gesamten Winkelbereich eine neue Lichtwelle aus (Abb. 3).

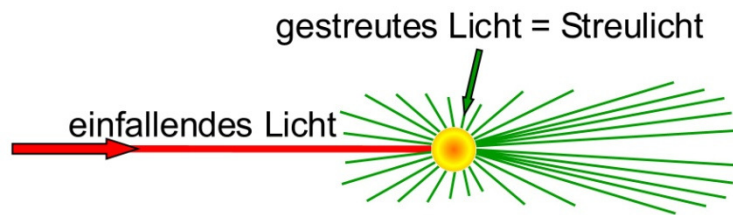


Abb. 3: Aussenden von neuen Lichtwellen von den Teilchen in der Dispersion (Abb. modifiziert nach [2]).

In der Probe sind viele Teilchen, das unter einem bestimmten Winkel (z.B. 90°) von der Photodiode detektierte Licht ist nun eine Überlagerung der Lichtwellen von diesen vielen Teilchen (Abb. 4). Bei der Überlagerung kommt es zu Interferenz, d.h. entweder zur Verstärkung oder zur Abschwächung der einzelnen Lichtstrahlen.

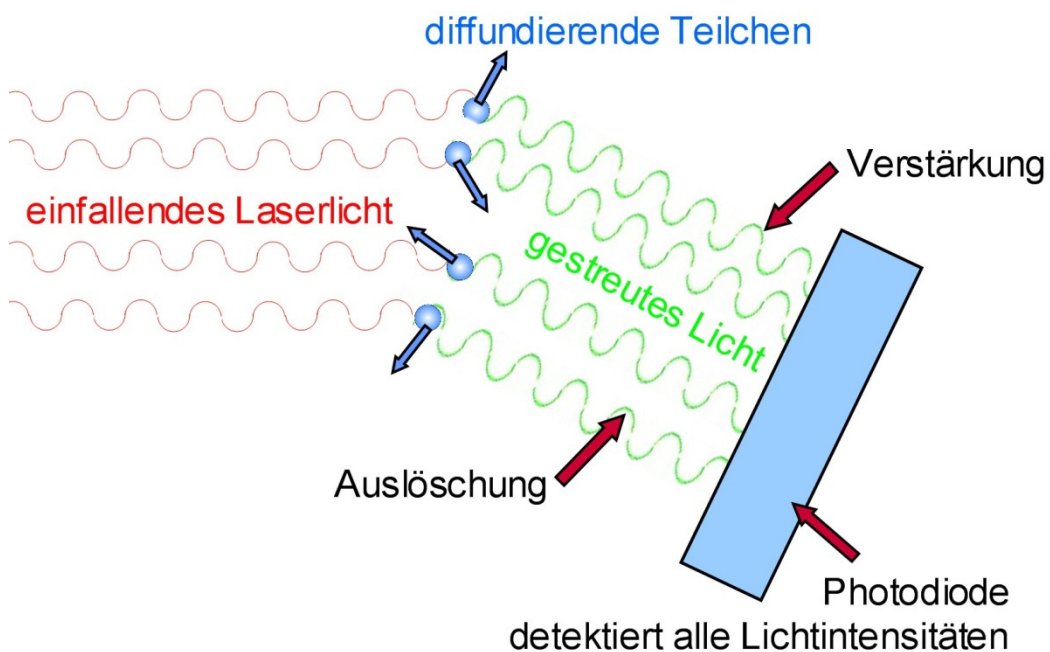


Abb. 4: Interferenz von Lichtstrahlen, ausgestrahlt von diffundierenden Partikeln in Richtung des Detektors Photodiode. Die Partikel diffundieren willkürlich in unterschiedliche Richtungen (blaue Pfeile), so dass sie bei der nächsten Intensitätsmessung unterschiedliche Positionen haben, was zu anderer Interferenz und gemessener Lichtintensität führt (Abb. modifiziert nach [3]).

Diffundieren Teilchen nun langsam (große Teilchen), so ist bei der nächsten Intensitätsmessung die Position nur sehr wenig unterschiedlich von der Ausgangsposition, die Interferenz ist ähnlich und man misst demzufolge eine wenig veränderte Streulichtintensität, Schwankungen treten nur langsam mit der Zeit auf. Diffundieren Teilchen sehr schnell, so sind sie an ganz anderen Orten, die Interferenz ist sehr stark unterschiedlich, entweder verstärkt oder abgeschwächt, so kommt es zu schnellen Änderungen / Schwankungen der Streulichtintensität bei kleinen Teilchen (Abb. 5).

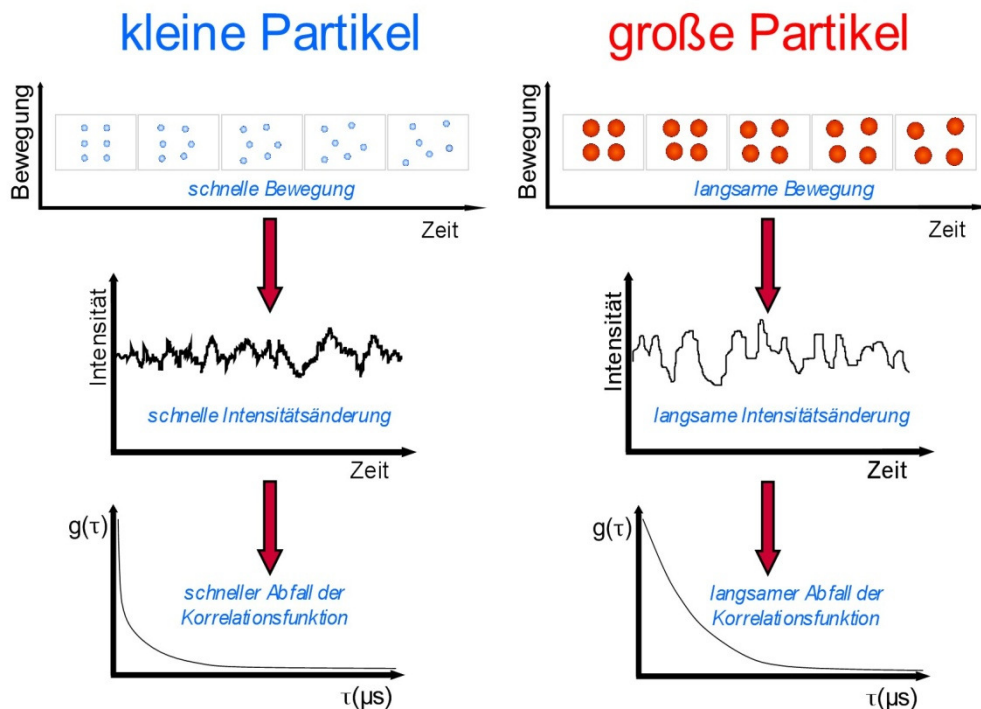


Abb. 5: Schwankung der Streulichtintensität bei großen Teilchen (links oben und bei kleinen Teilchen rechts oben) führt zu langsamen bzw. schnellen Intensitätsschwankungen (Mitte) und daraus resultierend zu einer langsam oder schnell abfallenden Korrelationsfunktion $g(\tau)$ als Funktion der Zeit (μs) (unten).

4. Auswertung der Streulichtsignale

Die PCS vermisst über bestimmte Zeiten (z.B. jeweils $10 \mu\text{s}$) die Lichtintensität. Daraus wird dann eine sog. Korrelationsfunktion $g(\tau)$ berechnet, die eine simple e-Funktion ist:

$$y = e^{-x} \qquad g(\tau) = e^{-2DK^2\tau}$$

$g(\tau)$ entspricht y und wird aus den gemessenen Intensitäten über einen Multiplikationsprozeß berechnet (darauf weiter einzugehen führt hier zu weit). Rechts von der Gleichung steht die bekannte Eulersche Zahl e , sowie der Streulichtvektor K , der aus der Wellenlänge des Laserlichtes und dem Streulicht (Detektions)winkel berechnet werden kann und auch die Meßzeit τ (Tau) ist bekannt. Die einzige Unbekannte ist die Diffusionskonstante D , die nun aus der Gleichung berechnet werden kann.

Abb. 5 zeigt, dass für langsam diffundierende Partikel die Korrelationsfunktion langsam abfällt, für kleine schnell diffundierende Partikel fällt sie steiler ab. Der unterschiedliche Abfall entspricht einer niedrigen (große Partikel) bzw. hohen Diffusionskonstanten D (kleine Partikel).

Zur endgültigen Berechnung des Partikelradiuses verwendet man die Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{K \cdot T}{6\pi r \eta} \qquad \text{aufgelöst nach:} \qquad r = \frac{K \cdot T}{D 6\pi \eta}$$

K – Boltzmann Konstante

T – absolute Temperatur in Kelvin

η – Viskosität

r – Partikelradius

Die Funktion $g(\tau)$ wird durch Multiplikation von Streulichtintensitäten berechnet, wobei für eine on-line Auswertung die Multiplikation abgeschlossen sein muß, bevor der nächste Messwert kommt. Da τ auch so kurz wie 50 ns sein kann, muß die Multiplikationsoperation in 50 ns abgeschlossen sein. Bei Einführung der PCS Ende der 1970er hatten die Computer noch keine so schnellen Rechenzeiten, so dass die Leistung von Malvern war, einen Multiplikator zu bauen, der eine Multiplikation in 50 ns durchführen konnte, der sog. Korrelator zu on-line Erstellung der Korrelationsfunktion. Heute haben die Computer bei der PCS nur noch eine Korrelatorkarte eingebaut.

Neben dem mittleren Partikelradius r ermittelt die PCS noch einen sog. Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung. Der PI ist Null bei monodispersen Partikeln, ca. 0,100-0,200 bei engen Verteilungen, 0,300 bei breiteren und ab 0,5 ist die Verteilung sehr breit.

5. Praktische Hinweise zur Messung

Es kann in jedem, dünnflüssigen (einige mPas) durchsichtigen Medium gemessen werden. Meist wird Wasser verwendet. Im Ggs. zum Coulter Counter ist keine Elektrolytlösung notwendig, so dass Aggregation aufgrund von Zetapotentialerniedrigung durch Elektrolyte vermieden wird.

Das Medium darf nicht zu viskos sein (z.B. Öle, 80-100 mPas), da dann die Korrelationsfunktion zu langsam abfällt und nicht mehr sauber ausgewertet werden kann (wird oft auch von Profis übersehen!).

Zur Messung muß die Dispersion in der Regel verdünnt werden, ca. 1-3 μ l auf 1 ml, so dass eine schwach bläulich tyndallisierende Dispersion entsteht. Es werden also nur sehr geringe Probenmengen benötigt.

Die Dispersion muß ausreichend verdünnt sein, damit ein Lichtstrahl nicht an mehreren Teilchen gestreut wird, bevor er detektiert wird. Dies führt zu stärker schwankenden Lichtintensitäten und täuscht kleinere Teilchen vor. Die Dispersion darf aber auch nicht zu stark verdünnt werden, da sonst kein klares Signal über dem Grundrauschen erhalten wird.

Verdünnen ist bei Emulsionen unkritisch. Werden jedoch Feststoffartikel verdünnt, so können sich diese beim Verdünnen beginnen aufzulösen! Dies kann auch bei sehr schwer löslichen Feststoffen auftreten, da die Verdünnung sehr stark ist. In solchen Fällen empfiehlt es sich in mit Feststoff gesättigter wässriger Lösung/Dispersionsmedium zu messen.

Die Messungen sind sehr schnell, z.B. 10 Messungen an einer Probe in 5 Minuten, woraus der Mittelwert berechnet wird. Somit ist die PCS auch für den Durchsatz großer Probenmengen geeignet, ein wichtiger Punkt in der pharmazeutischen Industrie.

6. Neueste Entwicklungen – Rückwärtsstreuung

Seit ihrer Einführungen gab es bei der PCS viele Verbesserungen, der erste 1-bit Korrelator entspricht der Tin Lizzy von Ford, die heutigen Instrumente entsprechen eher dem Ferrari von Michael Schumacher in der Formel 1.

Um die Auflösung von Feststoffpartikeln zu verhindern gibt es nun PCS-Geräte, die nicht mehr in Seitwärtsstreuung sondern in Rückwärtsstreuung messen (z.B. Nanosizer ZS. Malvern Instruments). Die Probe muß nicht mehr verdünnt werden, man misst in der Originalkonzentration

(bis zu 30% Feststoffgehalt). Der Laserstrahl wird von den im Außenbereich der Probe befindlichen Partikeln reflektiert und dann über die Korrelationsfunktion ausgewertet.

7. Literatur

1. Müller, R.H., Schuhmann, R., *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Band 38, ed. APVPaperback, 1996. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
2. Horiba-Instruments, *Theory And Techniques Of Light Scattering, Presentation (800) 446-7422*, 2004.
3. Malvern-Instruments, *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*, DLS - Technical Note MRK656-01.