ЛАЗЕРНЫЙ ДИФРАКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ РАЗМЕРА ЧАСТИЦ

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА – СТРАТЕГИЯ УСПЕХА

УДК 543.423.1,
БАК 02.00.02

Барс Б.Ф. (Bars B.F.), Мартинес Э. (Martinez E.), Гржески Н. (Grzeski N.),
Beckman Coulter, lsr-russia@beckman.com

Лазерный дифракционный анализатор размера частиц LS13320XR – самый современный в линейке Beckman Coulter – позволяет провести быстрый и точный анализ распределения частиц по размерам. Однако если проба для измерения подготовлена неправильно, получить точные, воспроизводимые и надежные результаты не удастся. Задача исследователя во многом напоминает игру в бильярд: сначала необходимо разбить пирамиду из шаров, т.е. разделить образец на отдельные частицы, после чего можно точно оценить состав популяции. Правильная подготовка образца – ключевой фактор для точного анализа распределения частиц по размерам.

Результаты измерений могут считаться надежными, когда они репрезентативны для всего образца и воспроизводимы как на одном и том же, так и на аналогичном оборудовании. Поэтому правильная подготовка образца имеет большое значение.

Лазерный дифракционный анализатор размера частиц LS13320XR имеет несколько модулей подачи образцов и позволяет работать как с сухими образцами, так и с дисперсиями порошков в жидких средах.

ВЫПОЛНЯТЬ АНАЛИЗ СУХОГО МАТЕРИАЛА, СУСПЕНЗИИ ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ОБА ПОДХОДА?
Анализ сухого материала (Dry Powder System – система анализа сухих порошков) предпочтителен при исследовании порошков с распределением частиц 0,4–3500 мкм, используемых в пищевой и химической промышленности, биотехнологии

и фармации. Система используется в случае неслипающихся образцов, когда на частицы не действуют ван-дер-ваальсовы силы и не образуются аутоагрегаты. Поскольку метод не требует пробоподготовки и обеспечивает минимальное воздействие на частицы, он идеально подходит для анализа хрупких материалов. Кроме того, такой анализ предпочтителен, если материалы в дальнейшем будут использоваться в сухом виде.

Методы подготовки и разделения образца для анализа сухих порошков представлены в таблице 1.

Анализ дисперсий образцов выполняют при исследовании суспензий или порошков с распределением частиц 0,01–2000 мкм, используемых в пищевой и химической промышленности, биотехнологии и фармации. Метод подходит для анализа слипающихся порошков, на частицы которых действуют ван-дер-

Таблица 1. Методы подготовки образца для анализа сухих порошков

Метод отбора образца	Примерные значения		
	КВ, %	Максимальная погрешность, %	Эффективность, %
Конирование и квартование	6,81	22,7	0,01
С помощью совка	5,14	17,1	0,02
Деление на плоскости	2,09	7,0	0,13
С помощью желобкового делителя	1,01	3,4	0,56
С помощью вращающегося рифлера	0,13	0,42	36,3
Случайное сочетание методов	6,81	22,7	0,01

ваальсовы силы. При этом суспензия должна состоять из отдельных частиц, без агломератов, и ее состояние не должно меняться на протяжении анализа.

КАЧЕСТВЕННОЕ ДИСПЕРГИРОВАНИЕ – КЛЮЧ К УСПЕШНОМУ АНАЛИЗУ

Процесс диспергирования образца включает в себя три этапа: смачивание поверхности частиц, измельчение агломератов и стабилизация полученной дисперсии, хотя в реальной работе выделить каждый из них не всегда возможно (рис.1).

Выбор диспергирующей среды. Для диспергирования используются как водная, так и неводная жидкие среды. При выборе среды необходимо учитывать следующие факторы.

Растворимость. Исследуемое вещество не должно растворяться в диспергирующей среде. При анализе распределения частиц веществ, растворимых в воде, в качестве дилуента выбирают неводную среду. Например, для анализа удобрений и многих фармацевтических порошкообразных препаратов, таких как ниацин, используют изопропанол.

Реакционная способность. Анализируемое вещество не должно взаимодействовать с растворителем. Так, вода непригодна для анализа гидрида лития или цемента, поскольку гидрид лития взрывается при контакте с водой, а цемент в воде затвердевает.

Суспендируемость. При суспендировании порошков с крупными или тяжелыми частицами может потребоваться использование более вязких жидкостей, например глицерина.

Конечная форма продукта. Пигменты часто диспергируют в толуоле, поскольку толуол является основным компонентом конечного продукта.

Из приведенных примеров видно, почему в некоторых случаях необходимо использовать неводную среду. Тем не

менее в большинстве случаев водные системы предпочтительны, поскольку они требуют меньших мер предосторожности при работе и утилизации отходов, кроме того, вода значительно дешевле любого органического растворителя.

Физические методы диспергирования частиц в жидкости. Для разбиения крупных агрегатов обычно применяют шпатель или ультразвуковое воздействие – ультразвуковую ванну или ультразвуковую головку. Полезным может оказаться разведение полученной смеси, поскольку при этом увеличивается расстояние между частицами. Диспергированию магнитных частиц может способствовать применение размагничивающей катушки или нагревания.

Химические методы диспергирования и стабилизации частиц в жидкости. К химическим методам диспергирования частиц относится применение смачивающих агентов и/или сурфактантов, которые облегчают смачивание и стабилизируют диспергированные частицы, сокращая при этом время диспергирования. Смачивающие вещества ускоряют увлажнение агломератов и уменьшают межфазное натяжение между дилуентом – водой и частицей – неионным агентом. Поверхностно-активные вещества (сурфактанты) стабилизируют образующуюся

Рис.1. Этапы образования суспензии

Рис.2. Виды стабилизации суспензии

дисперсию. Часто один и тот же агент выполняет функции и смачивающего, и диспергирующего вещества. Для сурфактантов характерно наличие в одной молекуле полярных структурных гидрофильных групп, которые могут быть как заряженными, так и незаряженными, и неполярных гидрофобных элементов. Сурфактанты могут придавать частицам отрицательный (диспергатор Beckman – Type IIA), положительный (диспергатор Beckman – Type IIIA) либо одновременно разноименные заряды, но могут лишь смачивать частицы (диспергатор Beckman – Type IA, IB и IC). Наличие или отсутствие заряда определяет тип стабилизации дисперсии: электростатический, стерический или электростерический (рис.2).

Электростатическая стабилизация хорошо работает в водных системах. Заряженные группы на поверхности частицы формируют поверхностный заряд, что вызывает взаимное отталкивание частиц и стабилизирует дисперсию. Заряженные группы могут быть частью вещества частицы либо образовываться на поверхности при использовании сурфактантов или добавок.

Плотность поверхностного заряда во многих случаях можно изменять, варьируя pH среды. Так, аминные, гидроксильные и карбоксильные группы при pH ниже их изоэлектрической точки (которую можно определить при измерении дзета-потенциала) связывают ион водорода и в результате приобретают положительный заряд. При pH выше изоэлектрической точки группы теряют ион водорода и приобретают отрицательный заряд. Как правило, изменение pH на 2 единицы выше или ниже изоэлектрической точки приводит к стабилизации дисперсии. Стабилизация наблюдается при значении дзета-потенциала по меньшей мере +30 мВ.

Заряд на диспергированных частицах может появиться при добавлении в раствор ионов, уже присутствующих в кристаллической решетке. Ионы адсорбируются на поверхности частиц и способствуют их взаимному отталкиванию, повышая, однако, риск возникновения эффекта сольватации.

На поверхности ионизированных частиц или частиц, имеющих полярные связи с молекулами воды, могут адсорбироваться многозарядные ионы, не являющиеся частью кристаллической решетки образца, придавая частице поверхностный заряд. Таким способом можно стабилизировать суспензии полифосфатов, гексаметафосфатов, пирофосфатов и полисиликатов.

Поверхность неполярных органических частиц в полярной органической среде может быть заряжена в результате адсорбции нейтральных ионных пар. Последующая диссоциация приведет к десорбции одной части ионной пары и появлению заряда на частице. Например, триметилдодециламингидроксибензоат диссоциирует на четвертичный амин (+) и полярную органическую кислоту (-), адсорбированную на поверхности органической частицы.

Стерическую стабилизацию чаще всего используют при диспергировании органических частиц либо в органических средах. При диспергировании органической частицы в воде в структуре сурфактанта должны присутствовать якорная область, которая хорошо адсорбируется на поверхности органической частицы, например, алифатические цепи или арильные группы, и группы, хорошо растворимые в воде, например, полиэтиленоксидные цепи.

Как правило, лучшие результаты достигаются при сочетании физических и химических методов дисперги-

рования образца. Показано, что наилучшее диспергирование достигается при смачивании образца диспергатором (смачивающим веществом или сурфактантом) с последующим перемешиванием шпателем и обработкой ультразвуком.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИСПЕРГИРОВАНИЮ ОБРАЗЦА В ЖИДКОСТИ

- **Проверка диспергатора:** используйте часовое стекло/чашечки для взвешивания, чтобы определить, какой диспергатор лучше взаимодействует с частицами.
- **Смачивание:** добавляйте ровно столько диспергатора или растворителя, чтобы при смешивании образовалась густая паста.
- **Перемешивание шпателем:** используйте шпатель или резиновый скребок для перемешивания образца с диспергатором до состояния густой пасты.
- **Добавление растворителя:** добавьте растворитель и тщательно перемешайте до образования однородной кашицы.
- **Оптическая проверка:** проконтролируйте степень диспергированности образца с помощью микроскопа. Если образец диспергирован не полностью, попробуйте другой диспергатор или добавьте в систему энергетическое воздействие, следя за тем, чтобы не разрушить частицы.
- **Добавление в систему энергетического воздействия:** используйте ультразвук (как правило, это наилучшее решение), перемешивание, нагрев и т.д., чтобы разбить агломераты частиц.
- **Проверка стабильности:** со временем образцы могут снова агломерировать или флокулировать. Этому способствуют разведение, изменение pH, изменение концентрации ионов или использование неподходящего диспергатора. Несмотря на нестабильность дисперсии во времени, рыхлые, слабо связанные хлопья вполне могут быть проанализированы с хорошим результатом, если насос или система циркуляции создают воздействие, достаточное для разделения частиц. Анализ плотных хлопьев и реаглюмератов может потребовать применения дополнительного энергетического воздействия, использования другого диспергатора или других условий, например, изменения pH, ионной силы или добавки полимеров, адсорбирующихся на поверхности частиц.
- **Отбор образца:** при добавлении образца в емкость модуля всегда следите за сохранением репрезентативности каждой порции образца. Во время отбора образец можно перемешивать магнитной мешалкой или пипеткой, что позволит поддерживать частицы в суспендированном состоянии.

Новая система визуализации позволяет наблюдать за раковыми клетками онлайн

Новая платформа для культивирования клеток впервые позволила исследователям наблюдать поведение живых раковых клеток под микроскопом.

До сих пор поведение раковой опухоли изучали на искусственно выращенных клеточных культурах или образцах опухолевых тканей. Однако, на культуральных чашках колонии раковых клеток ведут себя иначе, чем в естественной среде, а гистологическое исследование образцов ткани не дает никакой информации о развитии опухоли во времени.

Ученые под руководством Юкико Миятаке (Yukiko Miyatake) из Университета Хоккайдо создали уникальную микро/нанопластину для культивирования клеток, позволяющую наблюдать за

динамикой опухолевых клеток в реальном времени. На поверхности пластины были сформированы шероховатые микроостровки диаметром 30 мкм, на которых заякоривалось несколько раковых клеток. После инкубации в питательной среде в течение ночи раковые клетки самоорганизовывались в микроопухоли, которые обладали способностью согласованно перемещаться, как если бы это был один организм. Используя систему визуализации с временной задержкой и двумерную визуализацию высокого разрешения с помощью флуоресцентного микроскопа, исследователи обнаружили, что микроопухоли активно и направленно растягиваются, чтобы поймать обломки мертвых клеток (клеточ-

ный дебрис) с помощью филоподий и ламеллиподий и всосать их. Это указывает на сложную стратегию выживания опухоли, сходную с выживанием голодающих животных. После всасывания мертвых клеток происходит экзоцитоз характерного маркера фосфатидилсерина на поверхность клеток микроопухоли. Инкубация клеток, на поверхности которых находился фосфатидилсерин, с человеческими нормальными клетками-киллерами показала, что клетки-киллеры не атакуют такие клетки, очевидно, принимая их за мертвые. Исследователи полагают, что именно экзоцитоз фосфатидилсерина на поверхность позволяет раковым клеткам избежать разрушения иммунной системой организма.

Ученые уверены, что простой и недорогой метод визуализации динамики живых опухолевых клеток поможет понять механизмы их защиты от противоопухолевой терапии и разработать эффективные методы борьбы с этим опасным и агрессивным заболеванием.

Scientific Reports 2018
DOI:10.1038/s41598-018-32122-w