

Größenbestimmung von Nanopartikeln mit Röntgenkleinwinkelstreuung

Michael Krumrey*, Raul Garcia-Diez, Christian Gollwitzer, Stefanie Langner

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS) ist eine etablierte Methode zur dimensionellen Charakterisierung von Objekten in Nanometerbereich [1]. Sie erlaubt zum Beispiel die Größenbestimmung von Mikro- und Nanopartikeln mit mittleren Durchmessern im Bereich zwischen wenigen nm und etwa 300 nm. Für hinreichend monodisperse Nanopartikel konnte im PTB-Labor bei BESSY II in den letzten Jahren eine metrologische Rückführung auf das SI-Einheitensystem erreicht werden, was für viele Anwendungen der dimensionellen Nanometrologie von großer Bedeutung ist. Aber auch an Nanopartikeln mit breiterer Größenverteilung lassen sich dimensionelle Untersuchungen durchführen. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über die Methode, den in der PTB verwendeten experimentellen Aufbau sowie die Auswertung von SAXS-Messungen und zeigt Beispiele für die rückgeführte Größenbestimmung von Referenzmaterialien und die Untersuchung von biologischen Nanoobjekten.

Bei dem Messverfahren trifft ein nahezu paralleler und monochromatischer Röntgenstrahl auf eine Probe, die z. B. in Form einer Suspension von Nanopartikeln in einer Flüssigkeit vorliegt und sich in einer dünnwandigen Glaskapillare befindet. Ebenfalls möglich ist die Untersuchung von festen Proben, etwa zur Bestimmung der Porengröße. In beiden Fällen wird die Röntgenstrahlung durch Diskontinuitäten in der Elektronendichte in Vorwärtsrichtung, also unter kleinen Winkeln zur Strahlrichtung, gestreut und dann von einem Flächendetektor aufgenommen (Bild 1). Die Streustrahlung ist dabei um mehrere Größenordnungen weniger intensiv als der transmittierte Strahl und nimmt von den achsnahen Strahlen bis zum Rand hin weiter über mehrere Größenordnungen ab. Daher muss der direkte Strahl mit einem *Beamstop* ausgeblendet werden, um den Detektor nicht zu übersteuern. Die Auswertung

der Streubilder erfolgt durch den Vergleich mit mathematischen Modellen, und man erhält, im Gegensatz zu mikroskopischen Techniken wie Elektronen- oder Rasterkraftmikroskopie, mit einer einzelnen Messung gleich die meist interessierende gemittelte Größe von sehr vielen Partikeln. Auch ist die Probenpräparation nicht sehr aufwändig. SAXS ist daher die in der PTB eingesetzte Ensemble-Methode zur Größenbestimmung von Nanopartikeln [2].

Für SAXS-Messungen wird intensive, monochromatische Röntgenstrahlung mit kleiner Divergenz benötigt. Synchrotronstrahlung ist daher optimal geeignet. Im PTB-Labor wird das Vierkristall-Monochromator-Strahlrohr (*Four-Crystal Monochromator*, FCM) verwendet, das den Photonenenergiebereich von 1,75 keV bis 10 keV abdeckt [3, 4]. Bis zu 15 gefüllte Kapillaren können gleichzeitig in das Röntgenreflektometer [5, 6], das als Probenkammer dient, eingeschleust werden. Zur Aufnahme des Streubilds dient ein großflächiger, ortsauflösender Detektor. Um im gesamten Energiebereich des Strahlrohrs messen zu können, wird ein speziell entwickelter, vakuumkompatibler Hybrid-Pixel-Detektor (Dectris PILATUS 1M)

* Dr. Michael Krumrey, Arbeitsgruppe „Röntgenradiometrie“, E-Mail: michael.krumrey@ptb.de

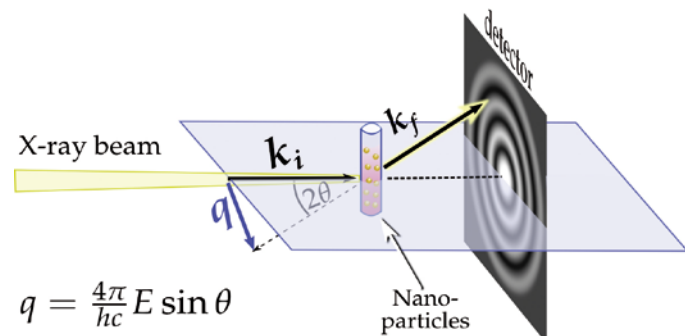


Bild 1: Prinzip von SAXS-Messungen.

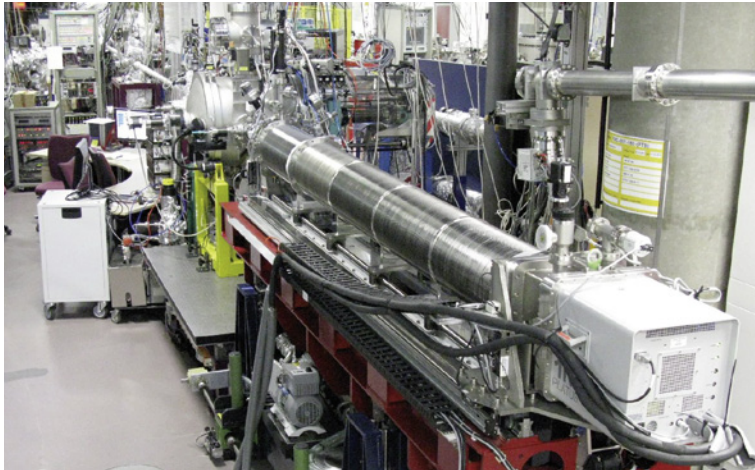


Bild 2: SAXS-Instrument des HZB am FCM(Four-Crystal-Monochromator)-Strahlrohr im PTB-Labor bei BESSY II. Rechts unten ist der direkt verbundene, vakuumkompatible PILATUS-Detektor zu erkennen.

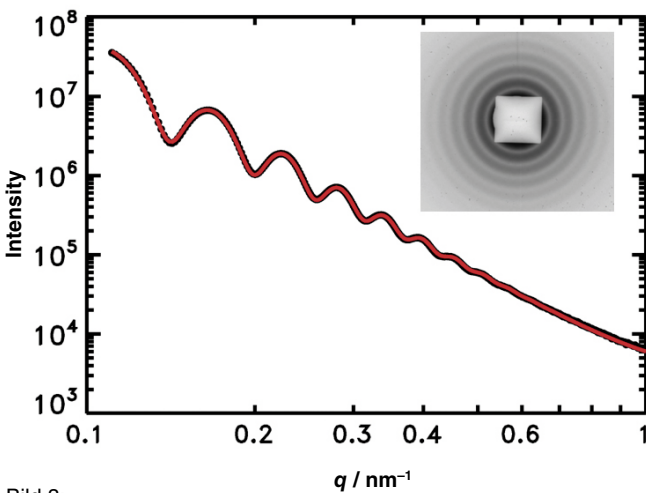


Bild 3: Streukurve für nahezu monodisperse PMMA-Partikel mit einem nominellen Durchmesser von 108 nm. Der Fit ergibt einen mittleren Durchmesser von $(109,0 \pm 0,8)$ nm.

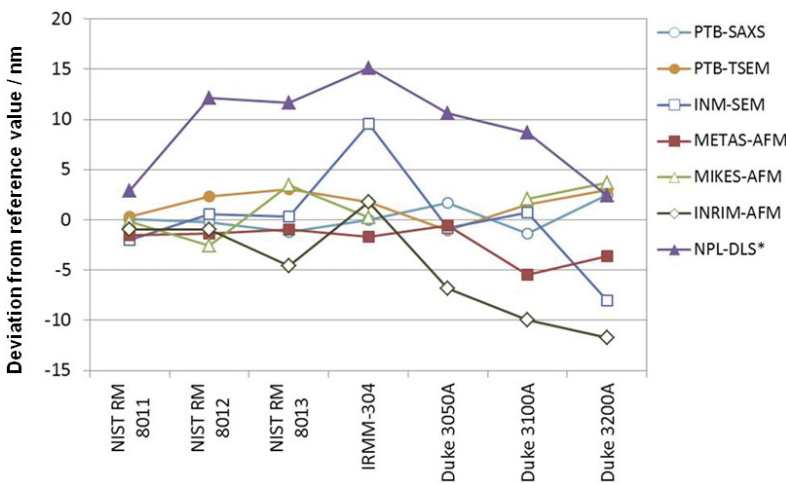


Bild 4: Ergebnis eines europäischen Projekts zur rückführbaren Größenbestimmung von Nanopartikeln mit 5 verschiedenen Messmethoden bei 6 Staatsinstituten. Die Partikel in den 7 untersuchten Proben hatten mittlere Durchmesser von 10 nm bis 200 nm.

mit einer Gesamtfläche von $179 \text{ mm} \cdot 169 \text{ mm}$ und einer Pixelgröße von $172 \mu\text{m}$ verwendet [7]. Der Abstand zwischen Probe und Detektor kann mithilfe der in Bild 2 gezeigten SAXS-Anlage des Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), die mehrmals pro Jahr am FCM-Strahlrohr betrieben wird, stufenlos zwischen 2,2 m und 4,3 m variiert werden [8]. Für die Untersuchung von nanostrukturierten Oberflächen in Reflexionsgeometrie unter streifendem Strahlungseinfall, *Grazing Incidence*, (GI)-SAXS, die in einem anderen Beitrag dieses Heftes beschrieben wird [9], kann die gesamte Anlage auch um bis zu 3° gekippt werden. Auch Nanopartikel auf Oberflächen können mit GISAXS untersucht werden [10].

In normaler SAXS-Geometrie besteht das Streubild für monodisperse Nanopartikel, also Partikel mit einer schmalen Größenverteilung, wie in Bild 3 aus konzentrischen Kreisen. Die radialsymmetrischen Streubilder lassen sich durch Mittelung auf eindimensionale Streukurven reduzieren, die nur noch vom Streuwinkel abhängen. Für die weitere Berechnung wird der Betrag q des Streuvektors eingeführt, der durch folgende Beziehung definiert ist:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta = \frac{4\pi E}{hc} \sin\theta$$

Hierbei ist λ die Wellenlänge bzw. E die Energie der Röntgenstrahlung und θ der halbe Streuwinkel. Eine so für monodisperse PMMA-Nanopartikel mit einem nominellen Durchmesser von 108 nm erhaltene Streukurve ist zusammen mit dem ursprünglichen Streubild in Bild 3 gezeigt [8]. Das Quadrat in der Mitte ist der Schatten des *Beamstops*, der den direkten, durch die Probe transmittierten Strahl abblockt. Bei der Berechnung der Streukurve wurde bereits die Transmission der Probe berücksichtigt und die Streuung einer wassergefüllten Kapillare abgezogen.

Die Streukurve kann mit einem analytischen Modell angepasst werden. Ähnlich wie bei der Schichtdickenbestimmung mit Röntgenreflektometrie [6] dient der Größenbestimmung auch hier die Periodizität der beobachteten Oszillationen, und auch hier wird die genaue Kenntnis der Wellenlänge ausgenutzt, die, im Gegensatz zur Lichtstreuung im sichtbaren Bereich, deutlich kleiner ist als die zu untersuchenden Objekte. Während die Periode der Oszillationen für kompakte kugelförmige Objekte nur vom mittleren Partikeldurchmesser abhängt, gehen in die Amplitude neben der Verteilungsbreite auch die Parameter des Untergrundes ein, sodass sich hier größere Unsicherheiten ergeben. Für monodisperse Partikel, die sich als homogene Kugeln beschreiben lassen, liefert SAXS jedoch inzwischen konsistente auf das

SI-System rückgeführte Ergebnisse für den mittleren Durchmesser mit sehr kleinen Unsicherheiten, wie auch das in Bild 4 dargestellte Ergebnis eines Methodenvergleichs von europäischen Metrologieinstituten zeigt [11]. Für die mit verschiedenen Methoden untersuchten Nanopartikel im Größenbereich von 10 nm bis 200 nm hatten die mit SAXS im PTB-Labor bestimmten Werte im Mittel die kleinste Abweichung vom jeweiligen Referenzwert. Wesentliche Beiträge zur Unsicherheit ergeben sich hier aus der Bestimmung des Probedetektor-Abstandes, der Pixelgröße des Detektors und aus der Anpassung des Modells. Für geeignete Partikel können relative Unsicherheiten von 1 % erreicht werden.

Im Bild 5 ist der kompliziertere Fall einer bidispersen Größenverteilung gezeigt, die durch Mischung von zwei monodispersen Anteilen erzeugt wurde. Für diese Mischung konnten die mittleren Durchmesser und die Verteilungsbreiten der beiden Komponenten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an den einzelnen Komponenten bestimmt werden [8].

Besonders interessante Anwendungen der Röntgenkleinwinkelstreuung liegen im Bereich biologischer Nanoobjekte bzw. bei Nanopartikeln in biologischen Medien. Für Partikel aus Materialien mit relativ geringer Dichte wie z. B. Polystyrol lässt sich die Anlagerung von Proteinen als Zunahme des Durchmessers nachweisen. Wie in Bild 6 gezeigt, wird die Proteinschale dicker mit steigender Konzentration von beispielsweise Immunglobulin G (IgG) in der umgebenden Lösung [12]. Für schwere Partikel ist der Einfluss der Schale dagegen sehr gering, sodass hier, im Gegensatz zu anderen Verfahren, immer der Durchmesser der eigentlichen Partikel bestimmt werden kann.

Biologisch relevante Nanoobjekte weisen meist eine relativ breite Verteilung des Durchmessers und auch der Form auf, äquidistante Ringe sind daher selten zu beobachten. Doch auch hier kann es ausgeprägte Strukturen geben, so wie in der in Bild 7 dargestellten Streukurve für synthetische Phospholipid-Vesikel, die als Modellsystem für biologische Membranen dienen [13]. Die Größe der Vesikel lässt sich aus der Streukurve bei kleinen q -Werten bestimmen, während die Dicke der Doppelschicht aus Streukurven bei großen q -Werten folgt.

Natürliche extrazelluläre Vesikel kommen in allen Körperflüssigkeiten vor. Im Rahmen eines europäischen Metrologieprojektes wird auch hier SAXS in Kombination mit anderen Techniken für die Größenbestimmung angewandt. Neben der großen Verteilungsbreite stellen dabei die geringe Konzentration der Vesikel und die Existenz anderer Partikel im ähnlichen Größenbereich große Herausforderungen dar. Mit sorgfältiger Probenvorbereitung konnten jedoch auch hier

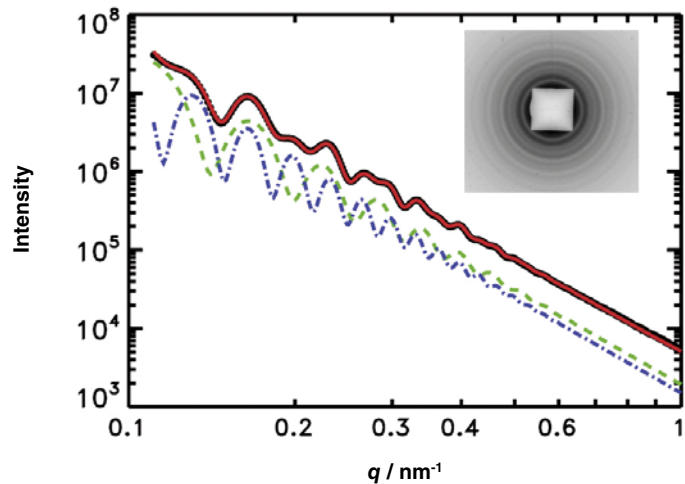


Bild 5: Streukurve für eine Mischung von PMMA-Partikeln mit nominellen Durchmessern von 108 nm und 192 nm. Der Fit liefert beide Größenverteilungen mit Mittelwerten von 109,2 nm und 188,2 nm.

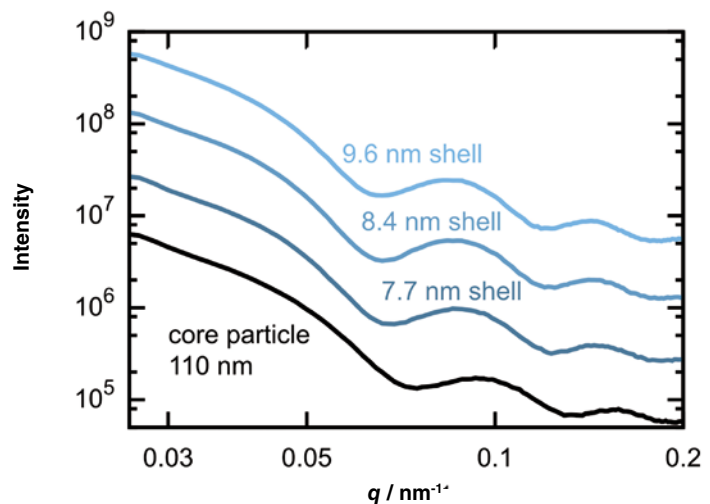


Bild 6: Größenzunahme von Polystyrol-Nanopartikeln durch die Anlagerung von Proteinen für zunehmende Konzentrationen von Immunglobulin G (IgG).

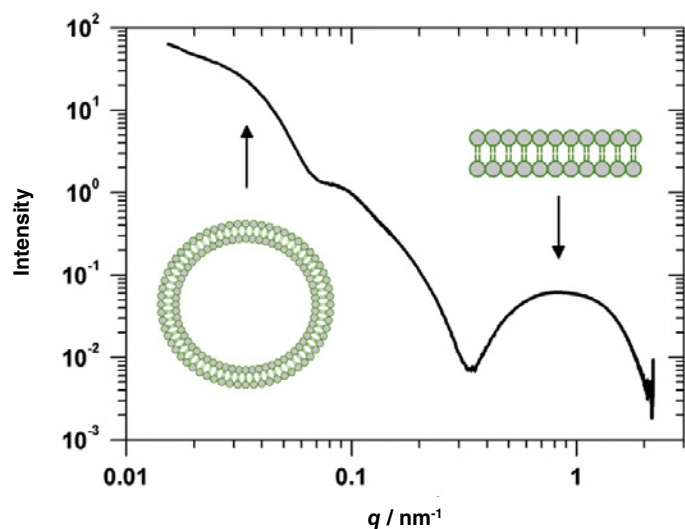


Bild 7: Streukurve für Phospholipid-Vesikel, aus deren Verlauf sich bei kleinen q -Werten ein mittlerer Durchmesser von 75 nm und bei großen q -Werten eine Dicke der Doppelschicht von 4 nm bestimmen lässt [13].

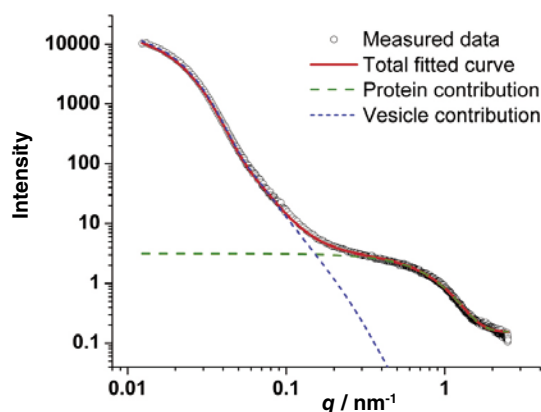


Bild 8:
Streukurve für Erythrozytvesikel, die sich durch eine Vesikelverteilung mit einem mittleren Durchmesser von 125 nm und einer Halbwertsbreite der Größenverteilung von 90 nm sowie einen Beitrag von deutlich kleineren freien Proteinen beschreiben lässt.

erste Ergebnisse gewonnen werden. Die in Bild 8 dargestellte Streukurve für Erythrozytvesikel lässt sich durch eine Vesikelverteilung mit einem mittleren Durchmesser von 125 nm und einer Halbwertsbreite der Größenverteilung von 90 nm sowie durch einen Beitrag von deutlich kleineren freien Proteinen beschreiben [14].

Auch andere biologische Fragestellungen wie z. B. der Einfluss von DNA und Heparin auf die mechanische Stabilität von Blutgerinnseln wurde mit SAXS im PTB-Labor bei BESSY II untersucht [15]. Für weitergehende Untersuchungen ist auch die so genannte anomale Röntgenstreuung (ASAXS) interessant, bei der die Änderung der Streuintensität in der Nähe einer Absorptionskante ausgenutzt wird. Somit werden Aussagen z. B. über die Verteilung chemischer Elemente in Kern-Hülle-Systemen möglich. Mit dem vakuumkompatiblen Hybrid-Pixel-Detektor sind am FCM-Strahlrohr, im Gegensatz zu fast allen anderen SAXS-Anlagen weltweit, auch die Absorptionskanten der biologisch relevanten Elemente Calcium, Kalium, Chlor, Schwefel und Phosphor zugänglich. ASAXS-Untersuchungen an der Ca-Kante wurden bereits erfolgreich durchgeführt [16].

Literaturverzeichnis

- [1] O. Glatter, O. Kratky (Hrsg.): Small-angle X-ray Scattering, Academic Press, London (1982)
- [2] A. Jordan-Gerkens, E. Buhr, T. Klein, C. G. Frase, M. Krumrey, T. Dziomba, A. Nowak, V. Ebert: PTB-Mitteilungen **121**, Heft 2, 5 (2011)
- [3] M. Krumrey, G. Ulm: Nucl. Instr. and Meth. A **467–468**, 1175 (2001)
- [4] M. Richter, G. Ulm: PTB-Mitteilungen **124**, Heft 3, 3 (2014)
- [5] D. Fuchs, M. Krumrey, P. Müller, F. Scholze, G. Ulm: Rev. Sci. Instrum. **66**, 2248 (1995)
- [6] M. Krumrey, L. Cibik, A. Fischer, A. Gottwald, U. Kroth, F. Scholze: PTB-Mitteilungen **124**, Heft 3, 35 (2014)
- [7] J. Wernecke, C. Gollwitzer, P. Müller, M. Krumrey: J. Synchrotron Rad. **21**, 529 (2014)
- [8] G. Gleber, L. Cibik, S. Haas, A. Hoell, P. Müller, M. Krumrey: J. Phys. Conf. Ser. **247**, 012027 (2010)
- [9] F. Scholze, A. Haase, M. Krumrey, V. Soltwisch, J. Wernecke: PTB-Mitteilungen **124**, Heft 3, 8 (2014)
- [10] M. Krumrey, G. Gleber, F. Scholze, J. Wernecke: Meas. Sci. Technol. **22**, 094032 (2011)
- [11] F. Meli et al.: Meas. Sci. Technol. **23**, 125005 (2012)
- [12] C. Minelli, R. Garcia-Diez, A. Sikora, C. Gollwitzer, M. Krumrey, A. G. Shard: Surf. Interface Anal. **46**, 663 (2014)
- [13] E. van der Pol, F. Coumans, Z. Varga, M. Krumrey, R. Nieuwland: J. Thromb. Haemost. **11** (Suppl. 1), 36 (2013)
- [14] Z. Varga, Y. Yuana, A. E. Grootemaat, E. van der Pol, C. Gollwitzer, M. Krumrey, R. Nieuwland: J. Extracell. Vesicles **3**, 23298 (2014)
- [15] C. Longstaff, I. Varjú, P. Sótónyi, L. Szabó, M. Krumrey, A. Hoell, A. Bóta, Z. Varga, E. Komorowicz, K. Kolev: J. Biol. Chem. **288**, 6946 (2013)
- [16] A. Hoell, Z. Varga, V. S. Raghuvanshi, M. Krumrey, C. Bocker, C. Rüssel: J. Appl. Cryst. **47**, 60 (2014)