NAISL
Volume 2, Number 3, 2018
Pages:21-27
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir

Using MALS for detection of Molecular weight and size

Hamid Hekmati-Khalaf[1*]

Abstract

Multi-Angle Static Light Scattering (MALS) technic is a new method to make detection system. If it add to Size Exclusion Chromatography (SEC) or Gel Permeation Chromatography (GPC) systems can give us a detailed information about Molecular weight and size.

Principal of technics based on separation of macro molecules in GPC or SEC columns. So the large molecules are less intraction in column and remove faster the small molecules. Elution enter to RI and ELSD detectors and give less information about matrix. Therefore MALS detector can give us more information about size and molecular weight without any standard solutions.

Combination of two GPC (or SEC) and Multi-Angle detecting systems can made a new techniques for calculate molecular size and weight without expensive standards.

Key Words:

MALS,
GPC,
SEC,
Scattering,
Multi Angle,
Detector,
HPLC

(*) Corrosponding author
1. Technical manager of MabnaTeyf co, Tehran, Iran.
E-mail: hekmati@mabnateyf.com
Tel: 02126103058

استفاده از تکنیک MALS[1] (پراکندگی نور در زوایای مختلف) جهت اندازه‌گیری دقیق جرم مولی و سایز مولکولی[۲,۱]

حمید حکمتی خلف[1*]

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال دوم، شماره ۳, ۱۳۹۷
صفحات ۲۷-۲۱
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir

چکیده

حمید حکمتی خلف

تکنیک Multi -Angles static Light Scattering روش جدید برای ساخت دیتکتورهایی می‌باشد که در صورت تجمیع با روش‌های کروماتوگرافی SEC یا GPC می‌تواند اطلاعات جامعی در باره اندازه و جرم مولکولی یک مخلوط از ماکرومولکول‌ها به ما بدهد.

اساس کار بدین صورت می‌باشد که نمونه‌ای شامل ماکرو مولکول‌ها تزریق می‌شود و با توجه به اینکه اندازه ماکرو مولکول‌ها نسبت به بقیه اجزا بزرگ‌تر است لذا برهم‌کنش کم‌تری با ستون SEC یا GPC خواهد داشت و به همین جهت نسبت به بقیه اجزا زودتر از ستون خارج می‌گردد. خروجی این ستون‌ها معمولا به دیتکتور RI و یا ELSD وارد می‌شود و اطلاعات محدودی در مورد مولکول‌ها به ما می‌دهد و اطلاعات بیش‌تر منوط به استفاده از استاندار های مختلف با جرم مولکولی مختلف می باشد که بایستی تحت شرایط یکسان به ستون کروماتوگرافی تزریق گردند. در صورتی که ورود پیک‌ها به دتیکتور MALS و با تابش نور لیزر به ماکرو مولکول‌ها جرم دقیق مولی و اندازه آن‌ها تعیین می‌نماید. ترکیب دو روش کروماتوگرافی اندازه مولکولی با پراکندگی نور زاویه‌ای می‌تواند بر محدودیت‌های کالیبراسیون ستون نیز فائق آید و نیاز به استفاده از استانداردهای گران را تقریبا از بین می‌برد.

واژگان کلیدی:

MALS,
GPC,
SEC,
Scattering,
Multi Angle,
Detector,
HPLC

(*) مسئول مکاتبات.
۱. مدیر فنی شرکت مبناطیف، تهران، ایران.
ایمیل: hekmati@mabnateyf.com
تلفن: ۰۲۱۲۶۱۰۳۰۵۸

[1] Multi -Angles static Light Scattering

۱ مقدمه

در قرن ۱۹ میلادی، Lord Rayleigh (لرد رایلی) توضیحاتی پیرامون رنگ درخشان آبی آسمان در روز و در یک هوای صاف و آفتابی ارائه داد. مشاهدات او بر اساس معادلات بنیادی برهم‌کنش نور با ماده بود که توسط جیمز کلارک ماکسول در سال ۱۹۸۵ ارائه گردید که مهم‌ترین دستاورد در فیزیک نظری بود. بسط تئوری رایلی برای شرح دادن پراکنش نور توسط ماکرو ملکول‌ها در محلول تئوری Rayleigh-Gans-Deby یا تئوری پراکنش RGD نور نامیده می‌شود.

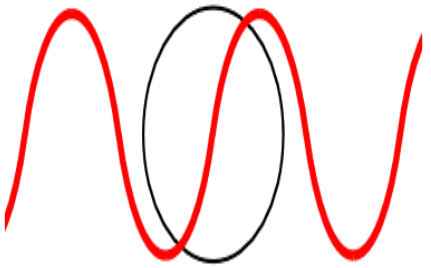
در یک آزمایش پراش نور، از یک پرتو نور تک فرکانس پلاریزه هم سو شده (مانند نور لیزر) جهت تابش به یک محلول سوسپانسیون شامل ماکرو مولکول‌ها یا نانوذرات استفاده می‌شود. میدان الکتریکی پرتو نور پلاریزه ترجیحا عمود بر سطح مولکول قرار می‌گیرد که در آن شدت و زاویه وابستگی نور پس از پراکندگی اندازه گیری می‌شود (طبق قرارداد جهت پلاریزه شده «عمودی» و صفحه اندازه گیری « افقی» می‌باشد). کل نور بازتابیده شده اطلاعاتی راجع به جرم مولی می‌دهد و نور نشر شده در زوایای مختلف (تفرق نور) اطلاعاتی راجع به اندازه ماکرومولکول‌ها ارائه می‌دهد.

در یک سیستم کروماتوگرافی مایع، با استفاده از دتکتور (light scattering multi angle) MALS می‌توان این پارامترها را اندازه‌گیری کرد. اساس کار بدین صورت می‌باشد که نمونه‌ای شامل ماکرومولکول‌ها تزریق می‌شود و با توجه به اینکه اندازه ماکرومولکول‌ها نسبت به بقیه اجزا بزرگ‌تر است لذا برهم‌کنش کم‌تری با ستون خواهد داشت و به همین جهت نسبت به بقیه اجزا زودتر از ستون خارج می‌گردد. سپس خروجی ستون به دتکتور MALS وارد شده و با تابش نور لیزر به ماکرومولکول‌ها جرم دقیق مولی و اندازه آن‌ها تعیین می‌گردد. بخش تئوری زیر شامل یک مرور کلی از موضوعات مربوط به پراکندگی نور چند زاویه‌ای می‌باشد.

تئوری

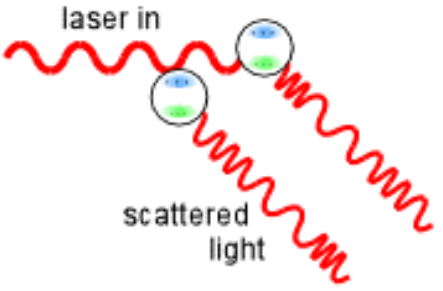
۱-شدت و جرم مولی

هنگامی که نور لیزر بر یک ماکرومولکول تابیده می‌شود، نوسان میدان الکتریکی نور، باعث نوسان دوقطبی آن مولکول می‌شود. این نوسان دو قطبی مجددا نور را بازنشر می‌کند. (مشابه آن اتفاقی که در یک آنتن ایستگاه رادیویی اتفاق می‌افتد و امواج پس از تقویت دوباره ارسال می‌گردند). بمنظور آنالیز نور پراکنده شده از یک محلول حاوی ماکرو ملکول‌ها، لازم است اطلاعاتی از قابلیت پلاریزه شدن محیط اطراف ملکول (یا حلال) بدانیم. برای اندازه‌گیری این پارامتر بایستی تغییرات ضریب شکست حلال Δn نسبت به تغییرات غلظت محلول Δc اندازه‌گیری شود تا پارامتر dc/dn (Δc/Δn=) که OptiLab T-rEX نامیده می‌شود، حاصل شود.



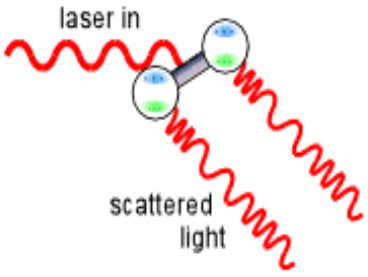
شکل ۱: اثر نوسان میدان الکتریکی نور

هنگامی که تعداد بسیاری ماکرومولکول در محلول وجود دارد، هر کدام از آنها از طریق مکانیزم اثر دوقطبی، نور را متفرق می‌سازد، از این‌رو شدت نور پراکنده شده رابطه متناسب با غلظت ماکرومولکول در محلول دارد. دو برابر شدن مولکول‌ها، دوبرابر شدن شدت نور نشر شده را باعث می‌شود، این نکته از آنجا حائز اهمیت است که دو تک مولکول همسان تشکیل یک مولکول همسان دوتایی را می‌دهند و به همین علت غلظت‌سنجی ماکرومولکول را خاص می‌سازد. توجیه این پدیده به صورت زیر است:



شکل ۲: پراکنده‌سازی نور توسط دو ملکول منومر

در ابتدا مونومرها (تک مولکول همسان) توسط مولکول‌های حلال به صورت یک نواخت احاطه شده و باعث حرکتی در مونومرها می‌شود که با آن حرکت Brownie (براونی) می‌گویند. این حرکت باعث می‌شود که دو مونومر جدا از هم نور نامنسجمی (غیر هم فاز) را متفرق سازند. در طول زمان متوسط شدت نور بازتابیده شده برای هر مونومر که تشکیل دیمر (یک مولکول همسان) می‌دهند به صورت: ۱+۱=۲ می‌باشد.

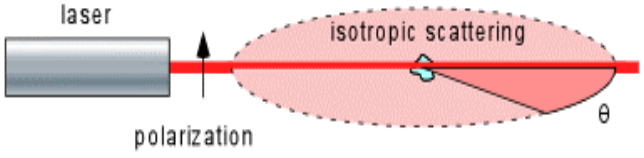


شکل ۳: پراکنده‌سازی نور توسط دو ملکول منومر

اگرچه وقتی که مونومرها تشکیل دیمر می‌دهند هر دو با هم حرکت می‌کنند، نور متفرق شده از یک مونومر رابطه فازی مستقیم با نور بازتابیده شده از مونومر دیگر دارد. به عبارت دیگر تفرق نور به صورت منسجم (هم فاز یا Coherent) صورت می‌گیرد. نتیجه اینکه نور پراکنده شده از یک ماکرومولکول همسان دوبرابر شدت نور پراکنده شده از هر کدام از مولکول‌های همسان (مونومر) می‌باشد. به عبارت ساده تر دوبرابر کردن جرم مولی، حتی زمانی‌که نسبت جرم به حجم را در غلظت برابر ثابت نگه می‌داریم باعث دوبرابر شدن شدت نور پراکنده شده می‌شود.

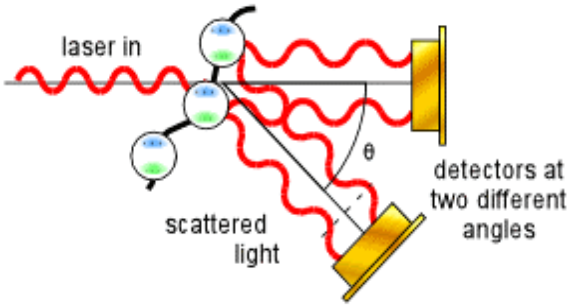
این شدت نور متفرق شده توسط مولکول بوسیله آشکارساز (دتکتور) MALS اندازه‌گیری شده که رابطه نسبی با جرم مولی دارد. از این‌رو تکنیک پراکنده‌سازی نور روشی بسیار دقیق برای اندازه‌گیری جرم مولی ماکرومولکول‌ها در محلول می‌باشد.

۲-وابستگی زاویه‌ای و اندازه



شکل ٤: وابستگی زاویه‌ای و اندازه

ماکرومولکول‌های کوچک‌تر از طول موج نور ورودی می‌تواند نور را به صورت نقطه‌ای متفرق سازند یعنی اینکه نوری که بر سطح آن‌ها تابیده می‌شود در هر زاویه‌ای که متفرق می‌گردد شدت یکسان دارد.

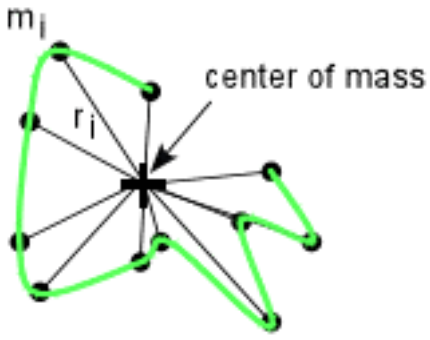


شکل ٥: اندازه‌گیری شدت پراکندگی در زوایای مختلف

برای ماکرومولکول‌های بزرگ‌تر نور متفرق شده از قسمت‌های مختلف سطح ماکرومولکول در فازهای مختلف به دتکتور می‌رسد. این کار باعث تداخل تخریبی یا سازنده برای دتکتور می‌شود. نتیجه اینکه نسبت شدت نور متفرق شده در جهت تابش پرتو لیزر کاهش پیدا می‌کند و در حقیقت در زاویه‌های مختلف متفاوت است و این توضیح تئوری RGD (Rayleigh -Gans -Debye) می‌باشد که قبلا ذکر شد.

اگر نور متفرق شده در صفحه «افقی» تابش اندازه‌گیری گردد امکان تشخیص اندازه مولکول را می‌دهد. این محاسبه‌ی اندازه به عنوان شعاع rms و یا بعضی موقع شعاع حرارتی (redius of gyration ,rg)نامیده می‌شود. این شعاع rms (root maen square) محاسبه ی اندازه جرم مولکولی بوسیله توزیع جرمی است که در مرکز ماده قرار دارد.

اگر ساختار مولکول به گروه خاصی تعلق داشته باشد شعاع rms ابعاد هندسی مولکول را نشان می‌دهد. نمونه‌ای که



شکل ٦: تمرکز جرم یک ماکروملکول در مرکز آن

شامل توزیع وسیعی از جرم مولی است توسط روش SEC یا GPC از یکدیگر جدا می‌گردد و داده‌های تفرق نور در هر پیک حاصل، جرم مولی (Mw) و شعاع چرخشی (rg) آن را مشخص کند. رسم نمودار شعاع rms در برابر جرم مولی اندازه‌گیری شده ساختار نمونه را مشخص می‌کند.

۳-معادلات و آنالیز داده‌ها

تئوری اساسی که توسط [۳] Bruno Zimm ارائه گردید امکان ساده‌سازی معادله تفرق نور تئوری RDG را فراهم کرد. این معادله بسط داده شده توسط [٤] Wyatt Philip مورد بازنگری قرار گرفت و در نهایت به صورت معادله زیر در سال ۱۹۹۳ ارائه شد:

(معادله شماره ۱): $$\frac{K^{*}c}{R(\theta,c)} = \frac{1}{M_{w}P(\theta)} + 2A_{2}c$$

در این معادله پارامترهای زیر قابل توضیح است:

R(θ,c): نسبت نور اضافه رایلی محلول به عنوان عامل تفرق زاویه‌ای (θ) و غلظت (c) که به طور مستقیم متناسب با شدت نور نشر شده در حلال خالص می‌باشد.

Mw: جرم مولی متوسط محلول

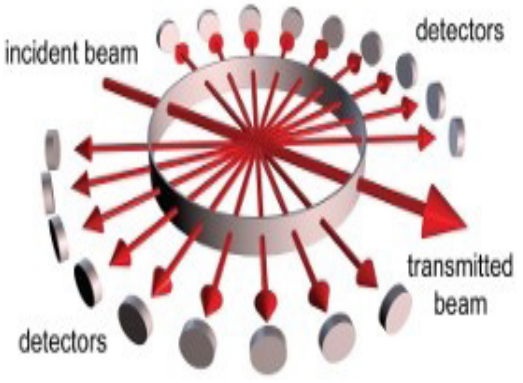
A_2: ضریب دوم معادله ویریال در بسط فشار اسمزی

K*: ثابت معادله $4\pi^4(dc/dn)^2 n_o^2/\lambda_0^4$

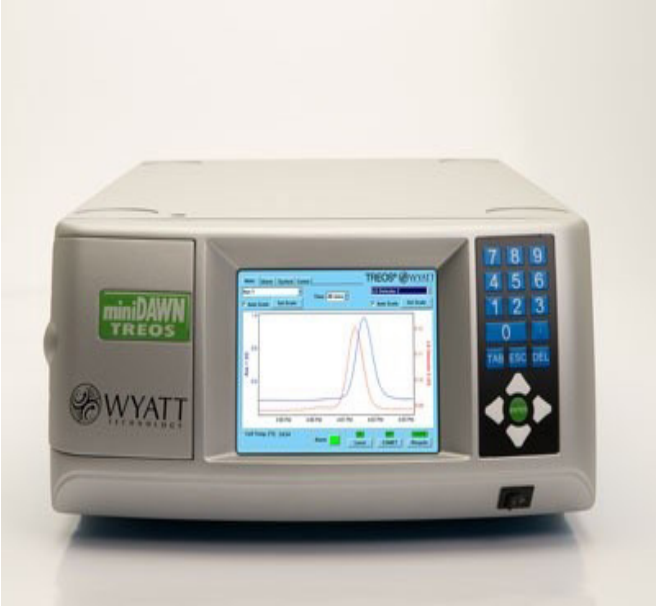
Na: عدد آووگادرو. این عدد همیشه وقتی ظاهر می‌شود که غلظت اندازه‌گیری شده بر اساس واحد mh/gr و جرم مولی mol/gr باشد.

P(θ): نور متفرق شده‌ی زاویه‌ای را تشریح می‌کند و بستگی به شعاع rms دارد.

معادله تفرق نور در تمامی زاویه‌ها صادق است، با کامپیوترهای مدرن امروزی اطلاعات زاویه‌ای جمع آوری شده و رابطه بین جرم، اندازه و غلظت در تمامی زاویه‌ها اندازه‌گیری و اثبات می‌شود. سازندگان دتکتورهای MALS تکنیک اندازه‌گیری هم زمان ۱۸ زاویه را فراهم کرده‌اند که با دقت و صحت بسیار زیاد پراکندگی نور را در زوایای مختلف محاسبه می‌کند.



شکل ۷: اندازه‌گیری پراکندگی در زوایای مختلف

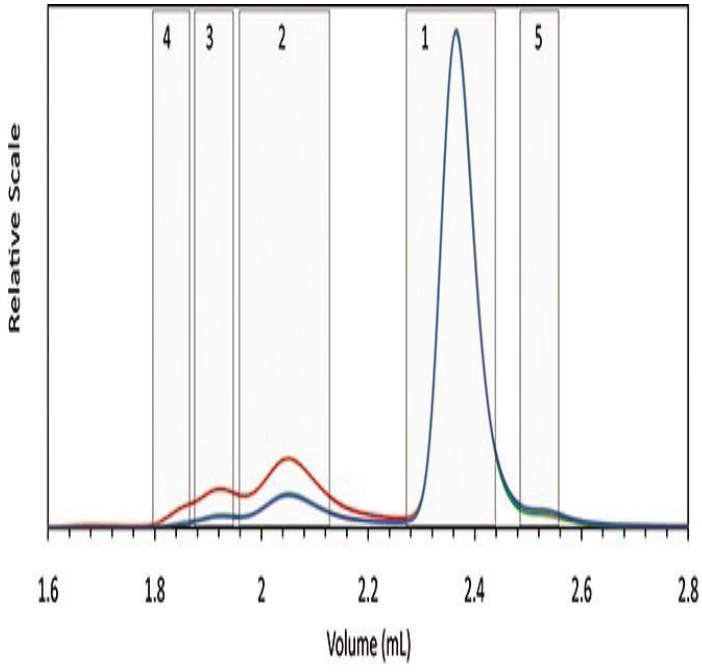


شکل ۸: دتکتورهای ساخته شده تجاری

همه ماکرومولکول‌ها رفتار یکسانی ندارند. مولکول‌های موجود در نمونه با مولکول‌های موجود در استاندارد ساختار متفاوتی دارند و رفتار غیرمترقبه‌ای را در برهم‌کنش با ستون نشان می‌دهند. به عنوان یک تکنیک اختصاصی برای مشخص کردن جرم مولی و شعاع rms در محلول، روش MALS-SEC یعنی ترکیب دو روش کروماتوگرافی اندازه مولکولی با پراکندگی نور زاویه‌ای می تواند بر محدودیت‌های کالیبراسیون ستون فائق آید

شکل ۹: نمای داخلی دتکتورها

شکل ۱۰: نمای کلی یک دستگاه HPLC با دیتکتور MALS



		Peak 1 (monomer)		Peak 2		Peak 3		Peak 4		Peak 5 (fragment)	
		Mw (kDa)	Mass (%)	Mw (kDa)	Mass (%)	Mw (kDa)	Mass (%)	Mw (kDa)	Mass (%)	Mw (kDa)	Mass (%)
mAb 1-C1	1	155.4	70.7	328.1	18.5	507.3	4.7	720.5	2.0	120.0	4.2
	2	155.3	70.6	329.7	18.6	510.9	4.8	735.9	2.0	119.9	4.0
mAb 1-C2	1	153.6	85.2	329.7	8.8	510.5	1.9	729.2	0.7	114.3	3.5
	2	153.3	85.1	329.9	8.9	510.8	1.9	730.0	0.7	115.4	3.4
mAb 1	1	152.4	96.0	323.4	1.1	--	<0.1	--	<0.1	98.2	2.8
	2	152.4	96.1	335.9	1.2	--	<0.1	--	<0.1	102.9	2.7

شکل ۱۱: نتایج حاصل و اطلاعات بدست آمده

در گراف فوق نتایج حاصل از آنالیز مخلوط چند آنتی بادی که توسط یک دیتکتور MALS بدست آمده مشاهده می شود.

نتیجه‌گیری

سیستم های کروماتوگرافی که مجهز به دیتکتورهای خاص باشند تا بتوانند علاوه بر غلظت، اطلاعات گوناگونی مانند جرم ملکولی و اندازه ذرات در اختیار ما قرار دهند جزء سیستم های بسیار کارآمد مانند دیتکتورهای جرمی بوده و کاربردهای فراوانی به منظور شناسایی ترکیبات بدون استفاده از استاندارد خواهند داشت.

مراجع

[1] ”MALS Bibliography”. www.wyatt.com.

[2] “Understanding Multi-Angle Static Light Scattering”. www.wyatt.com.

[3] Zimm, B. H. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. Journal of Chemical Physics 16, 1093-1099 Ibid. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; Preliminary results on polystyrene solutions. Journal of Chemical Physics 1948, 16, 1099-1116.

[4] Wyatt, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. Analytica Chimica Acta 1993, 272, 1–40